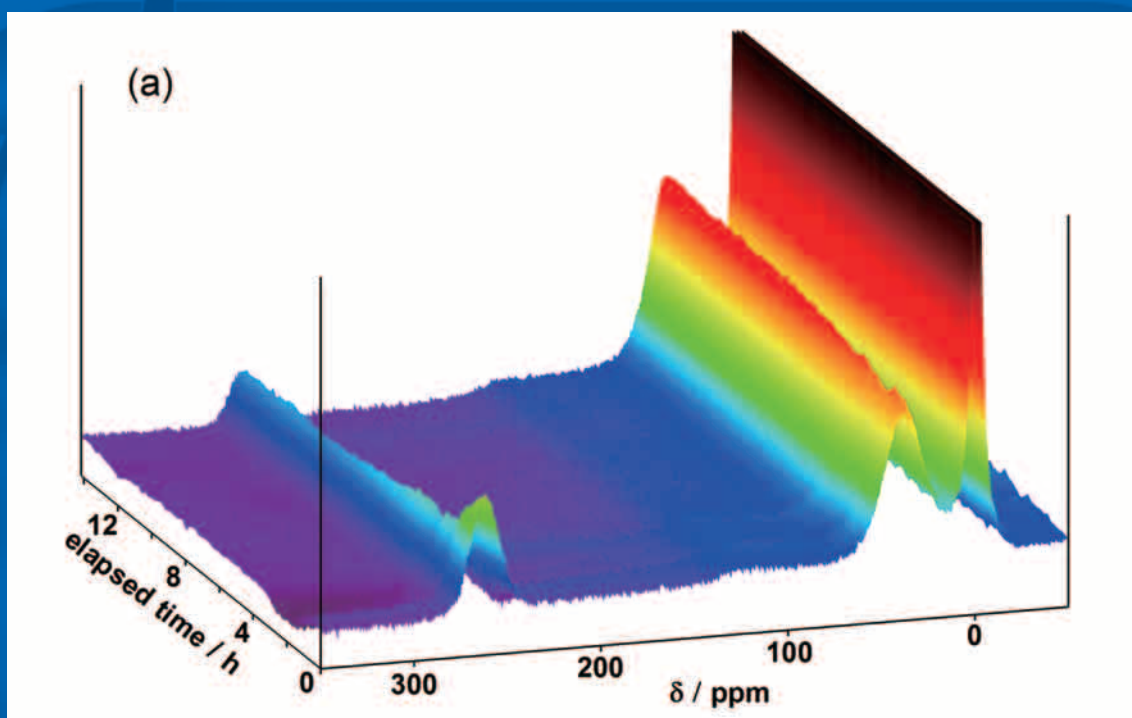
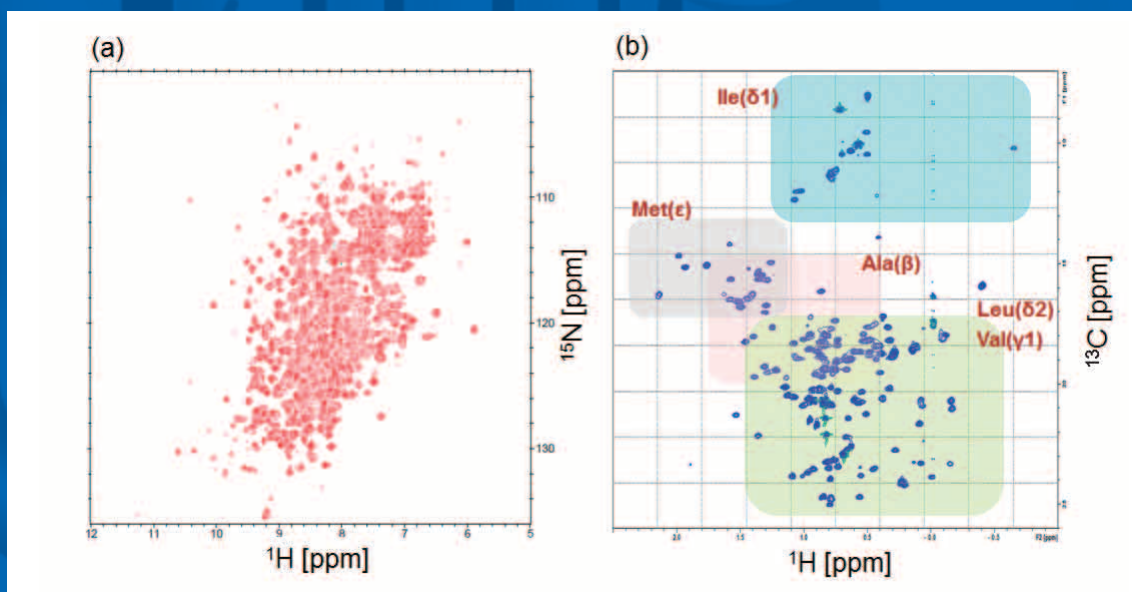




過充電直後からの ^7Li NMRスペクトルの変化



IgG 型モデル抗体 C の NMR スペクトル



表紙の図

(上段)：リチウムイオン電池の *in situ* Li NMR (図5(a))

岡山大学大学院自然科学研究所 後藤 和馬

(下段)：創薬における生体系NMRの位置づけ：中外製薬(株)の場合を中心に(図2)

中外製薬株式会社 研究本部 創薬基盤研究部 蛋白質構造解析グループ 鳥澤 拓也

NMR

BULLETIN OF THE NUCLEAR
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN

Vol. **7**

October 2016

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

●会長メッセージ

日本核磁気共鳴学会第8期会長の就任にあたり	5
竹腰 清乃理	

●追悼抄

追 悼～稲垣冬彦先生～	6
神田 大輔	

●巻頭エッセイ

固体高分解能NMR (Narrow is beautiful) の構造生命化学研究への展開	8
内藤 晶	

●解 説

創薬における生体系NMRの位置づけ：中外製薬(株)の場合を中心に	11
鳥澤 拓也	

NMRのハードウェアに関するメモ 2. 主に受信系について—ブローブ編	19
根本 暢明	

●トピックス

Gタンパク質共役受容体のNMRによる解析の現状と展望	26
磯貝 信	

●研究報告

はじめてのFloquet理論	33
～平均ハミルトニアン理論から行列ベースのFloquet理論、演算子ベースのFloquet理論まで～	
中井 利仁	

●若手ポスター賞表彰

第54回NMR討論会(2015)若手ポスター賞について(報告)	42
---------------------------------------	----

最優秀若手ポスター賞 (JEOL RESONANCE賞)

多量子遷移の緩和速度の差を利用した高分子量タンパク質のマイクロ秒から ミリ秒オーダーの化学交換の解析法の開発	44
外山 佑樹、大澤 匡範、横川 真梨子、嶋田 一夫	

優秀若手ポスター賞 (太陽日酸賞)

リアルタイムNMR法の新たな展開—抗HIVタンパク質APOBEC3Gの認識スクレオチド、 DNA上のスライディング及びエピジェネティクスとの関連に関する新知見—	48
神庭 圭佑、永田 崇、片平 正人	

大腸菌によるユビキチン過剰発現時に合成される単一細胞当りの分子数評価を指向した定量固体NMR法	50
山田 和哉、江川 文子、藤原 敏道	

優秀若手ポスター賞 (JEOL RESONANCE賞)

Pure shift NMRによる生体分子複雑系のデータマイニング高解像度化	52
小松 功典、菊地 淳	

かご型炭素クラスター C_{60} および $C_{59}N$ に内包された H_2O と H_2 の 1H NMR緩和時間	56
橋川 祥史、村田 理尚、若宮 淳志、村田 靖次郎	

若手ポスター賞

化学・生物学的統合プロファイリングによる水圏環境ブローブ生物の生育特性情報抽出	58
魏 菲菲、坂田 研二、朝倉 大河、伊達 康博、菊地 淳	

磁場配向微結晶粉末を用いた単結晶法による結晶多形の分析	60
奥村 学、久住 亮介、木村 史子、木村 恒久、出口 健三、大木 忍、藤戸 輝明、清水 禎	

<i>In-situ</i> マイクロ波照射NMRによるマイクロ波加熱におけるエネルギー移動過程の解明	62
田制 佑悟、藤戸 輝昭、川村 出、内藤 晶	

ゴム材料の ^1H - T_2 緩和解析：ラプラス逆変換法と主成分解析	66
角村 将希、浅野 敦志、大窪 貴洋、奥下 慶子	
NMR $R_{1\rho}$ dispersion 法によるユビキチン二重合体の動的構造特性の研究	70
西澤 茉由、菅瀬 謙治、森本 大智、Erik Walinda、白川 昌宏	
●NMR基礎講座	
直積演算子（プロダクトオペレータ）の覚え方	72
長土居 有隆、池上 貴久	
四極子核固体NMR法の基礎の基礎	77
山田 和彦	
●NMR史点描	
NMRの論文の被引用数ランキング	85
寺尾 武彦	
●海外学会報告	
若手研究者渡航費助成金について	88
ISMRM 24th annual meeting 参加報告書	90
山田 諒太	
●技術レポート	
リチウムイオン電池の <i>in situ</i> Li NMR	91
後藤 和馬	
●NMR便利帳	
定量CP-MAS法	95
木村 英昭	
●NMR研究室便り	
大阪大学理学部村田研究室	100
花島 慎弥、梅川 雄一、村田 道雄	
大阪市立大学 理学研究科 分析室	103
土江 松美	
帝人株式会社 構造解析センター	106
菅沼 こと	
●若手NMR研究会便り	
箱根高原ホテルで開催された第17回若手NMR研究会便り	109
石川 真帆	
●ICMRBS報告	
第27回ICMRBS参加報告	112
北原 亮	
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	114
2. 第55回NMR討論会（2016）	116
3. ニュースレターの記録	119
4. 日本核磁気共鳴学会規約	121
5. 日本核磁気共鳴学会機関誌投稿規程	125
6. 賛助会員名簿	127
7. 日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員会委員名簿（2016年度）	128
8. 編集後記	129

日本核磁気共鳴学会第8期会長の就任にあたり

日本核磁気共鳴学会会長

竹腰 清乃理

takeyan@kuchem.kyoto-u.ac.jp

本NMR学会の前身であるNMR討論会は1961年に誕生し、2002年に荒田先生を初代会長として、日本核磁気共鳴学会へと生まれ変わりました。私がNMR討論会に初めて参加したのは、第19回（1980年）の北大開催の討論会で、修士の1回生でした。それ以降、長年にわたり本学会を自身の研究の中心の学会として活動してまいりました。本年2016年4月1日から2年間の任期で、会長として本学会の運営を行うことになり、たいへん光栄に思うと同時に、55年の歴史を引き継いでさらに本学会を発展させる責務を考えますと、身の引き締まる思いです。

NMRは単なる分析の手段ではなく、その使い方によって、物質の構造・運動・機能を総合的に研究できる最も強力な分光法です。学会の参加者の分布からも判るように、その応用先は、物理～化学

～医学に及んでいます。このような多様性・発展性は、NMRの理論・方法論・装置の多彩な「自由度」によっています。つまり、NMRを深く理解することにより、単なるブラックボックスではなく、個々の問題に切り込むことのできる最適な道具にすることが可能になります。

本学会は、NMR研究に関する交流を盛んにすることで皆様のNMRスキルの向上に貢献する目的で設立されました。私も微力ではありますが、本学会の発展のためにできる限り頑張りたいと考えています。本学会の理事やさまざまな委員会の委員の皆様をはじめとして、学会員のすべての皆様に、学会活動へのご協力とご支援をお願いいたします。また、大学、研究機関、研究支援機構、学協会、関連する企業の方々にもさまざまな形でのご支援をお願い申し上げます。

2016年4月1日

追悼～稲垣冬彦先生～

九州大学 生体防御医学研究所 構造生物学分野研究室 教授

神田 大輔

kohda@bioreg.kyushu-u.ac.jp

稲垣冬彦先生が病氣療養中のところ、2016年6月15日に永眠されました。ご自身の免疫細胞を使う療法を準備されていて、29日には治療が始まる矢先だったと伺いました。最期まで回復に向けて諦めていらっしやらなかったことは、いつもまじめな稲垣先生らしさと感じます。享年69歳とまだまだ今後のご活躍が期待される年齢でのご逝去は、日本の構造生物学にとって計り知れない損失であり残念でなりません。日本核磁気共鳴学会にも大きな寄与をなされました。1997年に第36回NMR討論会を世話人として東京のこまばエミナースで開催され、さらに2007年には第46回NMR討論会を札幌コンベンションセンターで開催されました。また、2002年の学会の創立から5期にわたって計11年の間、評議員および理事をお務めになりました。

稲垣冬彦先生は、東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻で理学博士を取得後、東京大学理学部生物化学科の助手（故宮澤辰雄教授研究室、その間にオックスフォード大学にRamsay奨学生として留学）を務められた後、東レリサーチセンター主任研究員、東京都臨床医学総合研究所生理活性物質研究部門の室長と部長、北海道大学大学院薬学研究院教授を歴任されました。2016年4月から微生物化学研究所の客員研究員として、新たな研究活動を始めたばかりでした。当初から一貫して核磁気共鳴（NMR）法を用いた蛋白質の構造と機能の研究にたくさんの優れた業績を残されました。北海道大学に移ってからはX線結晶解析法も取り入れました。私は宮澤研究室の学生としては稲垣先生との接点はほとんどありませんでしたが、東京都臨床医学総合研究所の研究員として10年間、実に愉しく過ごさせていただきました。その頃のNMRを用いた蛋白質の研究は革新期にあり、安定同位体標識、多次元NMR測定を用いたシグナル帰属、NOE距離情報を用いた立体構造計算などが急速に発展した時代でありました。Sequential assignmentに連鎖帰属の日本語訳を当てたのが稲

受領日：2016年7月10日



稲垣冬彦先生

垣先生であられたことは、バイオNMR分野での稲垣先生の先見性と功績を物語る証しとして強調させていただきたく思います。その後、私は大阪の生物分子工学研究所を経て九州大学に、稲垣先生は北海道大学に赴任され、日本列島の北と南に分かれることになりましたが、タンパク3000プロジェクト、ターゲットタンパク研究プログラム、新学術領域研究等を通じて密接な関係を継続させていただきました。数ヶ月に一度は稲垣先生からお電話をいただき、ゴシップを含めていろいろな話をさせていただきました。「もしもし、コウダくん？（少し間を置いて、ゆっくりと少し恥づかしそうに）イナガキです」のフレーズが今でも耳に残っています。

北海道大学を退任された後、しばらくは北海道大学特任教授として研究を継続されていました。初心に帰るということで、宮澤研時代に研究されていた核酸分子を対象に開発したランタノイドNMR法を大きな蛋白質分子の構造や動的解析に適用する研究を精力的に展開されました。驚くことは、質の高い論文発表が退任後も変わらず多数あったことです。NMR討論会、日本蛋白質科学会、日本生化学会、日本分子生物学会などで、稲垣先生が要旨集に色とりどりの付箋を貼って、ポスター会場を熱心に廻られていたお姿を見かけた方は多かったと思います。稲垣先生は自身の研究ばかりでなく、審査員などの仕事も多数されていました。「忙しくて

いやになっちゃうよ」と言いながら、サイトビジットなどに行った話をしていただきました。豊富な知識とともに公平無私な人柄だからこそ、多くの委員や審査員を委嘱されたのだと思います。

こうしてふり返ってみますと、稲垣先生の日本の構造生物学分野、特に生体系の核磁気共鳴の研究分野における貢献は大変大きく、早すぎるご逝去はまことに残念です。ここに謹んで哀悼の意を

表します。

(追記) 個人的には、「一宿一飯の恩義を忘れない義理堅さ」、「実は武家屋敷オタク」、「大のカレー好き」、「趣味はツアーコンダクター」などのエピソードもあるのですが、他の機会にとっておきたいと思っています。

固体高分解能NMR(Narrow is beautiful)の 構造生命化学研究への展開

横浜国立大学大学院工学研究院

内藤 晶

naito@ynu.ac.jp

1. はじめに：固体高分解能 NMR との出会い (ブリティッシュコロンビア大学時代)

京都大学で博士を取得してから、カナダブリティッシュコロンビア (BC) 大学化学科に移り McDowell 教授の博士研究員として、常磁性2価銅イオンに配位したアミノ酸の配位電子状態を低温 ENDOR 法によって研究することになりました。ところが、研究を始めて9か月後、スイスの学会に出席中であった McDowell 教授は、現地で神経が麻痺する病気にかかり、しばらく研究室に戻ってこられない事態になりました。この間、McDowell 教授が学会出張前に注文されていた固体高分解能 NMR 分光器 (CXP-200) が到着しました。この装置はブルカー社製の試作機同様の装置でマニュアルも完備されておらず、使用する研究者はいませんでした。そこで、インド人の同僚と2人でこの装置を使ってみることにしました。これが固体高分解能 NMR との出会いでした。幸い、京都大学では赤坂先生の指導のもと、NMR についても詳しく勉強していたのと、装置の電気回路については電気部門のスタッフが丁寧に教えてくれました。そのような背景があり、マジック角度回転 (MAS) を使用した固体高分解能 NMR 測定が徐々に可能になってきました。当時はまだ、固体高分解能 NMR 装置は普及していないため、研究者の数もすくなく、公表されている固体高分解能 NMR の論文をほとんど網羅的に読み、研究するべきテーマの設定を行いました。参考にした本の中で Heaberlen 先生の著作に書いてあった Narrow is beautiful は固体高分解能 NMR の本質をつく言葉として感動しました。

まず、最初のテーマとして、アミノ酸アラニン単結晶の ^{13}C NMR 信号の角度依存性を観測し、 ^{13}C 化学シフトテンソルを決定することができました。この研究で、 $\text{C}\alpha$ 炭素は ^{14}N に直接結合していて、C-N 双極子相互作用を示し、3本に分裂しますが、この3本は非対称に分裂することを見出しました。そして、この非対称性は ^{14}N 核四極子相互作用であ

ることを、理論的に示すことができました。一方、アラニンの α -炭素の ^{13}C -NMR 信号について、固体高分解能 NMR を用いて観測したところ、非対称二重分裂線が観測されました。我々は、窒素核の核四極子結合定数が非常に大きいために、窒素核スピンの静磁場に量子化しないことが原因で非対称線形が現れることを理論的に解明し、実験結果を定量的に説明しました。

次に、イミダゾールの結晶を作成し、固体高分解能 ^{13}C -NMR スペクトルを観測したところ、NMR 信号はまったく観測されませんでした。この原因は、イミダゾールの ^{13}C 核のスピンの緩和時間が極端に長いことであることが分かりました。そこで、固体状態のイミダゾールに常磁性 Cu^{2+} をドーブした結晶を作成し、固体高分解能 ^{13}C -NMR スペクトルを観測しました。この結果、イミダゾール炭素核の固体高分解能 ^{13}C -NMR スペクトルを観測することに成功しました。 Cu^{2+} の不対電子が近傍のプロトンのスピンの緩和時間を短縮し、この短縮した緩和時間が他のプロトンに拡散し、結晶全体のプロトンの緩和時間が短縮したため、すべての炭素原子に磁化移動が可能になったためであると説明できます。この常磁性物質をドーブする方法は、固体高分解能 NMR 信号の感度向上に大きく貢献することになりました。

このほか、固体高分解能 NMR を用いて、MAS 条件下での T_1 や $T_{1\rho}$ の定式化や NOE の異方性効果の観測、双極子分裂を利用した2量子交換過程の直接観測等、固体高分解能 NMR を測定するための基本現象を実験で観測することができました。

2. 状態相関二次元 NMR への展開 (京都大学理学部化学教室時代)

ブリティッシュコロンビア大学に約6年滞在した後、京都大学理学部化学教室に助手とし、分析化学研究室 (波多野教授) に赴任しました。この研究室では、赤坂助教授と共同で、液晶分子の物性

評価に重要な配向因子を正確に決定するため、 ^1H -NMRの新しい測定法の開発を行いました。通常の溶液NMR分光器に高速加熱を可能にするマイクロ波照射装置を導入し、マイクロ波照射が可能なNMR分光器を製作しました。この装置により、NMR分光器内において短時間で液晶状態から等方相の状態に転移することが可能になりました。このマイクロ波照射NMR分光器を用いて、液晶状態と等方相状態の二次元相関NMRスペクトルの観測に世界で初めて成功しました。この二次元相関NMRスペクトルによって、液晶の各プロトンの双極子相互作用を等方相の分解能で観測することに成功しました。この結果、液晶の配向因子を正確に決定することができる状態相関二次元NMRなる新しい概念の二次元NMR分光法の開発に成功しました。さらに、状態相関2次元NMRの応用として、タンパク質の天然状態と変性状態の状態相関NMRを世界で初めて観測することに成功しました。

3. 生体物質構造学への展開 (姫路工業大学理学部生命科学科時代)

1990年より、新設された姫路工業大学理学部生命科学科に助教授として移り、斉藤 肇教授、辻助手とともに、固体高分解能NMRを用いて生体物質構造学分野の研究を行うことになりました。

まず、これまでに培ってきた固体NMRの新しい方法論を用いて、生体分子の構造決定を行う研究をスタートしました。このため、報告されたばかりの回転共鳴二重共鳴 (REDOR) 法なる精密原子間距離測定法を用いることにしました。そこで、生理活性ペプチドにターゲットを絞り、原子間距離測定に基づく構造決定の研究を行いました。まず、N-Ac-Pro-Gly-Pheなるトリペプチドについて、3種類の距離情報を精密に決定し、その距離情報のみから、立体構造を決定することに成功しました。

つぎに、生体膜に作用して、膜分断を引き起こす、ハチ毒の主成分であるメリチンと生体膜との相互作用について、固体NMR分光法を利用して解析する研究を行いました。まず、脂質2分子膜の ^{31}P NMR信号を固体NMRにより測定することにしました。この結果、メリチンを再構成した生体膜は磁場に配向する性質のあることを明らかにしました。この磁場配向は膜小胞が楕円形になり、その長軸が磁場に平行に向くためであることを明らかにしました。この磁場配向膜 (MOVS) を用いて、メリチンは膜中で膜法線の回りを回る動的構造を持つこと

を確立しました。カルボニル炭素を ^{13}C 標識したメリチンを生体膜に再構成して、異方性を観測したところ、化学シフト値は残基の位置に対応して振動パターンを示すことを明らかにしました。この化学シフト振動パターンの解析から、膜結合ペプチドの構造決定を可能にしました。この後、化学シフト振動パターン解析法を用いて、ボンボリチン、ラクトフェランピン、アラメシチンの膜結合構造解析に発展することができました。

さらに、アミロイド線維形成が知られているヒトカルシトニン (hCT) のアミロイド線維形成機構を固体NMR分光法により明らかにする研究を行いました。まず、部位特異的に ^{13}C 標識したhCTを固相法により合成し、化学シフト-二次構造相関により、hCTが中性条件下では、逆平行 β -シート構造を形成し、酸性条件下では、平行 β -シートと逆平行 β -シートの混合構造をとることを明らかにしました。さらに、線維形成速度を解析したところ、hCTは2段階自己触媒反応機構により、アミロイド線維が形成する機構を明らかにしました。すなわち、hCTは線維形成の段階で中間体を経て線維伸張が起こり、最終的に線維が形成されることが明らかになりました。

4. 構造生命化学への展開 (横浜国立大学大学院工学研究院時代)

2001年より、教授として横浜国立大学大学院工学研究院構造生命化学研究室を立ち上げることになりました。この研究室はこれまで、宮澤辰夫先生、阿久津秀雄先生が在籍しておられた研究室でもありました。

hCTのアミロイド線維形成については、hCTが甲状腺髄様癌の原因物質になっていることに注目し、より精密な線維構造と線維分子間相互作用を決定する研究を行い、線維形成阻害剤の開発につなげることを目的としました。このため、選択標識した ^{13}C - ^{15}N 間の精密原子間距離測定を行い、中性条件下で生成するアミロイド線維はPhe16, Phe19が1残基ずれている逆平行 β -シートを形成していることを明らかにしました。さらに、この構造を基にして分子動力学計算を行ったところ、芳香族アミノ酸はストランド間で強い相互作用を形成していることが明らかになりました。この結果を発展させて、フェニルアラニンをロイシンに置き換えた変異体では線維形成が強く阻害されることを明らかにしました。さらに、HEPES水溶液中で線維形成を行ったところ、線維が形成する過程で、球状の中間体が

存在することを電子顕微鏡により観測することに成功しました。

高度好塩菌に含まれている膜タンパク質、バクテリオロドプシン (BR)、センサリーロドプシン I (SRI)、センサリーロドプシン II (SRII) について、外部刺激 (温度、圧力、光照射) を行って、それに応答する膜タンパク質の構造変化を観測する研究を行いました。BRに関しては、MAS回転数を変化させて圧力変化を起こし、それに応答する構造変化を観測しました。この結果、暗順応状態に存在するレチナール異性体 all-trans (AT) と 13-cis, 15-syn (CS) は約 1:1 で存在するが、圧力が上昇すると、CS の割合が増えることが判明しました。また、光を照射すると、AT の割合が増えることが判明しました。この変化に対応して蛋白質側の構造も 2 種類存在し、その割合が変化することを観測しました。

光受容膜タンパク質の光反応サイクルの過程で生じる光中間体を固体 NMR により捕捉することは容易ではありません。そこで、効率の良い光照射 NMR 装置を新たに開発しました。この光照射 NMR 装置を用いて、高度好塩菌に存在する SRI の光活性中間体の捕捉に成功しました。この結果、SRI の正の光走性には M-中間体に関与しており、負の光走性には P-中間体に関与していることを明らかにしました。さらに、緑色光照射下では M-中間体が生成し、紫外線照射下では P-中間体が生成する波長依存的活性変換の分子機構を明らかにすることができました。

次に、SRII について、光反応サイクルで生成する中間体を固体 NMR で観測しました。緑色光を照射した場合、M-および N-中間体の捕捉が確認できました。さらに、この M-中間体は青色光照

射により O-中間体に変化する光反応経路を新たに発見しました。さらに、M-中間体は、負の光走性に関与していることが分かっているため、青色光照射で生成する O-中間体の光走性を明らかにしていきたいと考えています。

構造生命化学分野の研究に加えて、In-situ マイクロ波照射 NMR 分光法なる新しい NMR の研究分野を切り開く研究を行いました。近年マイクロ波を用いて有機化学反応や酵素反応を促進できることが報告されておりました。この反応促進効果に対してはマイクロ波による溶媒の加熱効果が主な原因とされていましたが、このマイクロ波加熱効果自身まだ不明な点が多く残っておりました。そこで、マイクロ波照射効率の高い液晶分子について、マイクロ波加熱の機構を明らかにする研究を行いました。液晶状態に温度を保ちマイクロ波を照射すると、液晶温度が相転移点以下であるにもかかわらず、等方相が局所的に現れる非平衡局所加熱現象を明らかにすることができました。また、等方相においては、液晶の温度を化学シフト値から決定できることを示し、この化学シフト温度計を用いて、マイクロ波照射下での等方相の液晶物質の温度を測定しました。この結果、短時間で 250 度以上温度上昇があることに加えて、分子内で極性グループの温度上昇が他の部位よりも 100℃ 以上高くなるというマイクロ波独自の加熱現象を発見することができました。

固体高分解能 NMR は材料科学と生命科学の両分野において構造と運動性について重要な情報を与えることを示すことができました。さらに今後、超分子、膜タンパク質、高分子材料、無機材料の分子の動的構造決定に発展していくことが期待されます。



内藤 晶 (ないとう・あきら)

1973 年 名古屋工業大学工学部合成化学科卒業
 1975 年 京都大学大学院理学研究科修士課程修了
 1978 年 京都大学大学院理学研究科博士課程単位取得満期退学
 1978 年 6 月 理学博士 (京都大学)
 1978 ~ 1983 年 プリティッシュコロンビア大学博士研究員
 1983 年 京都大学理学部助手
 1990 年 姫路工業大学理学部 (現兵庫県立大学) 助教授
 2001 年 横浜国立大学大学院工学研究院教授
 2002 年 日本核磁気共鳴学会会員 (2014 - 2015 年 会長)
 2015 年 横浜国立大学大学院工学研究院 名誉教授・非常勤講師
 大阪大学蛋白質研究所 招へい教授、放送大学 客員教授
 現在に至る

創薬における生体系NMRの位置づけ： 中外製薬(株)の場合を中心に

中外製薬株式会社 研究本部 創薬基盤研究部 蛋白質構造解析グループ

鳥澤 拓也

torizawatky@chugai-pharm.co.jp

はじめに

本稿の執筆にあたり、学会誌編集委員の先生から「創薬のNMR」についての「解説」の執筆を依頼されたとき、第一印象としてかなり漠然としたテーマだと感じた。この漠然とした依頼は、製薬企業でNMRがどのように使用されているのか外部からは非常にわかりにくいためだろうと推測した。NMRは製薬企業にて、少なくとも低分子化合物の分析技術として、既に確固たる地位が確立されており、将来的には技術の汎用化などにより研究員の寄与がどの程度になるかはわからないが、技術そのものとしての地位は継承されていくだろう。しかし、それ以外の使い道、つまり生体系のNMRとなると、現状でそのような確固たる地位があるとはいえない。私自身は生体系NMRで博士号を取得後、ポスドクを経て、現在勤務している中外製薬(株)に入社した。その後、同会社にて生体系NMRを専門とする研究員として10年以上の経験を積み、現在、生体分子のNMRやX線結晶構造解析等の構造解析、表面プラズモン共鳴 (SPR) 等の分子間相互作用解析の機能を有するグループのマネージャーの任に当たっている。本稿にてタンパク質を中心とした生体系NMRが弊社においてどう活かされているかをデータと共に具体的に示すことは難しいが、生体系NMRが創薬においてどういう位置づけにあるかという話を弊社の例を中心にある程度、お伝えすることはできると思う。

これまでの創薬における生体系NMRの方向性

日本、世界の製薬企業が近年、投稿している文献を“創薬”と“生体系NMR”のキーワードで調べると、イメージングを除くと低分子創薬、その中でも特にFragment Based Drug Design (FBDD) か、Metabolomicsが多くを占め、それらが一部の製薬企業のみからの投稿であることがわかる。文献のみならず、学会やコミュニティーを通じて情報収集しようとしても、これらの文献よりも製薬企業におけ

る生体系NMRの活動についてはるかに有用な情報を得ることは稀である。上記のことから私は少なくとも三つの事象を推察している。1、製薬企業各社における生体系NMRの活動内容は非常に機密性が高いこと 2、生体系NMRの活動が一定以上のレベルにある製薬企業は一部であること 3、生体系NMRを利用している場合でもほとんどが限られた使い方をされていることである。もしこの情報だけから、新たに生体系NMRを始めるかどうかを迷っている、あるいは生体系NMRを続けるかどうかの決断を迫られている製薬企業があったとすると、おそらくは生体系NMRを使うという選択をするということは少ないだろう。そう結論付けるに至る理由は各製薬企業の状況や考え方に依ると思うが、弊社がその立場だった場合を仮定してなるべく一般的な話をする。製薬企業でバイオマーカーの発掘などに使われるMetabolomicsそのものは中外製薬では取り組んでいない。仮に取り組むとしてもそこへアプローチするときの手法としてスループット等の面で質量分析法に劣るため、NMRを手放しで第一選択肢にする可能性は低いだろう。そして次に、低分子創薬への応用であるが、まずFBDDについて言えば、弊社でも取り組んだ時代があった。FBDDについては、一般的な化合物ライブラリーと比べるとフラグメントライブラリーは小規模でスクリーニングの規模が小さくて済むメリットがあるため、製薬企業の規模を問わず実施はしやすい。しかし、FBDDで見つけてきたフラグメントから化合物を展開合成する過程で、社内のMedicinal Chemistが興味を示すかどうかこの活動の成否を左右する。通常、FBDDと同時に一般的な化合物ライブラリーのスクリーニングは実施され、こちらから高い親和性の化合物が得られた場合、敢えて親和性の低いFBDD由来の化合物を出発物質としてChemistが化合物の誘導体化を始めたいと思うかどうかであるが、それは企業に依るだろう。仮にその条件を満たしたとして、FBDDはスクリーニング手法として

のNMRとの相性は良い方だとは思いますが、その場合でも他の、よりスループットの高い分析手法との競争を勝ち残ってNMRが選ばれるかどうかはケースバイケースである。FBDDのみならず、低分子創薬全般についても、生体系NMRの機能が存在しなくても動いていく創薬の研究体制はほぼ決まっている。そこに生体系NMRを当て込んでいくのは、もちろん不可能とは言わない。きっと新たな技術開発などにより、切り込み口はあるだろう。しかしそこでインパクトのある成果を出し続けるという観点では、低分子創薬プロジェクトが多くあるメガファーマにおいて生体系NMRに適したプロジェクトを自由に選べる場合を除けば、難易度が極めて高いと言って良い。このように上記のような社外から得られる情報のみを頼ると、生体系NMRの創薬への応用は将来的に大変厳しいと感じられてしまう。そして、筆者が問題であると感じるのは、基礎的な技術開発を担ってくれるアカデミアの研究者も上記の情報しか得られない場合である。「創薬」というキーワードはアカデミア研究にとって魅力的で、多くの研究の動機づけになっていると思う。しかし、上記の情報に頼ることは、そのような技術開発を諦める、あるいは正しい方向性に研究への投資ができない、あるいは創薬への動機が言葉上のものだけになることを危惧している。この状況は産学の領域を問わず、生体系NMR全体の活動の衰退につながりかねないことだと考えている。「創薬」というキーワードを標榜して研究を進めるアカデミアの研究者は是非、製薬企業の研究者と議論する機会を持っていただくことをこの場を借りてお願いしたい。

さて、ここまではあまり肯定的なことを書かなかったが、これはあくまで限られた情報にしかアクセスできず、それに倣った場合の話である。FBDDのための生体系NMRは古くは製薬企業の旧Abbott社(現Abbvie社)において、いくつかの創薬候補化合物を生み出すほどの地位を占めたが^[1]、それも今は昔の話である。このNMRでの成功体験にAbbvie社がもう縛られていない状況なのに、それ以外の研究者がそこに縛られ続けるとすれば少しおかしい話であり、生体系NMR研究者はその縛りから解かれてもよいかもしれない。実際はNMRの使い方の多様性を十分に活かせれば、創薬の各局面において生体系NMRは大いに役に立ちうる。この点については、2007年に製薬会社のNovartis社のJahnke氏が執筆された論説についても言及されており、読者の多くもそれを読まれたことだろう^[2]。

Jahnke氏の言っていることは、製薬企業のNMR研究者にとってもっともなことであり、私も同意できる意見が随所に書かれている。そこで述べられていることは、生体系NMRの多様性をうまく活かして、製薬企業内の各関係機能と連携しながら立ち回るべきである、ということと、実際の低分子創薬のパイプラインの中のどの部分にNMRを活かすべきか、にまとめられるかと思う。ただ、この論説が書かれたのは、本稿執筆時から10年ほど前のことである。当然、製薬企業の内外の状況や科学の発展はこの10年で変わっている。上記の論説は、低分子創薬を行う上でのNMRの活かし方について書かれているが、この10年で創薬のパラダイムは大きくシフトしている。世界の売上高の上位を占める医薬品のカテゴリーが低分子医薬品からバイオ医薬品、その中でも特に抗体医薬品が割拠するようになった。将来的にはその流れはますます加速するとともに、これまでに売上高の上位に存在しなかった核酸医薬品、あるいは細胞医薬品、中分子医薬品などの台頭も起こるかもしれない。このように創薬としての在り方が変遷する中、多様な使い方のできる生体系NMRの創薬における在り方も限定される必要はないし、変わって然るべきである。

中外製薬の研究背景

ここで弊社・中外製薬(株)の場合について話を移したい。弊社は2016年1月に3か年の中期経営計画(IBM 18: Innovation Beyond Imagination)を発表し、その中で低分子創薬、抗体創薬、中分子創薬を自社の創薬の中核技術としていくことを対外的に示した。弊社は低分子創薬において、最近では抗悪性腫瘍剤/ALK阻害剤「アレセンサ」を2014年に発売している。この薬はその前年にFDA(アメリカ食品医薬品局)のBreakthrough Therapyとして認定される(新薬の開発と審査を加速する制度)ほど有望視された医薬品である。一方、抗体医薬品では、ヒト化抗ヒトIL-6レセプターモノクローナル抗体「アクテムラ」が2005年に国内で製造販売された初の抗体医薬品として上市されており、関節リウマチ等の疾患へ適用されている。後にアクテムラも全身性強皮症(指定難病)の適用薬としてBreakthrough Therapyに認定されている。加えて抗体医薬品では、開発中の新規血友病A治療薬「ACE910」もBreakthrough Therapyとして認定されている。一方で、中分子創薬については、従来の低分子化合物よりも大きい分子で、低分子で

は狙えなかった創薬ターゲットを狙う次世代創薬領域であり、現在、開拓が始まっているところである。このように弊社の研究所では、これまでの低分子創薬の枠に留まらず、抗体創薬に力を入れており、さらには中分子といった創薬領域が加えられて創薬研究が実施されている。そのような研究背景に置かれている我々としては、多様な使い方のできる生体系NMRの利用を低分子創薬のみに留める理由はない。上述のJahnke氏の論説で低分子創薬への使い方が言及されているが、そこから10年経った今、他手法の台頭などの状況変化によりそれと同様の使い方が良いとは言えないかもしれない。そこで、我々は生体系NMRに従事する限られた研究員のリソースを、低分子創薬には割かないことにしている。すなわち、新たな活路を見出すべく生体系NMRのリソースを抗体創薬と中分子創薬に集中させる方針に舵を切っている（なお低分子創薬で必須となる化合物のNMR解析を専門に行う研究員は我々とは別のグループで研究している）。

生体系 NMR 周辺環境の整備

生体系NMRを適用する創薬領域を絞ったからと言って、すぐにそこで活躍できるかというとういうわけにもいかない。私が中外製薬に入社してから、生体系NMRラボとしては基本的にはゼロからの出発であったと言ってよい。まずNMRラボとしての人数であるが、アカデミアのように10人程度の研究員の頭数を揃えるのは不可能である。これはメガファーマですら同じ状況であろう。しかし、生体系NMRをまじめに取り組もうとするならば、熱意のあるNMR研究者が最低2人は必要であると考えている。これは業務量をこなす観点というより、NMRのデータ解釈や方向性について社内秘として専門的に議論する必要性があり、独りでは客観的にそれを実施しにくいという観点に基づいている。またその2人の内の1人は、現場に近く一般的な研究員よりも権限を持っており、かつ研究所全体を見渡しやすい研究者、つまりマネージャーが、少なくともNMRに理解を示す努力ができる人物であること、できればNMRの有用性を積極的に利用していくことを考えられる人物であることが、NMR活動の活性を高く保つためには肝要である。なぜそう思うかというと、私自身が、そのような人事体制のときに生体系のNMRの活躍の場が広まり、結果のインパクトが高まった経験をしているからである。上記の人事体制はどこの製薬企業でも成しえる訳で

はないかもしれないが、もし製薬企業が孤軍奮闘しているNMR研究者がいるなら是非とも長期的視点に立ってこの人事体制を形成すべく動いた方が良いと思う。

次に先立つ資源であるNMR機器について触れたい。弊社の研究所では生体系NMR用に750MHzと600MHzの2台を保有している。両機とも生体分子を測定するための仕様となっており、極低温プローブも装備されている。これは中外製薬のような中堅規模の製薬企業にとっては恵まれた機器環境と言って良い。生体系NMRを実施するならば、最低限、生体分子が測れるNMRとして600MHzを身近に保有すべきである。しかしこれでは感度、分解能の観点で物足りないと感じることが多いので、できれば700MHz以上の磁場のNMRにアクセスできる環境が望ましいと考えている。700MHzよりも高い磁場のNMRは機器の購入価格の観点でより高いクラスのマネージャーがNMRの必要性を理解し、他の研究機器の購入との競合に打ち勝つ必要があり、その実現の難易度は高い。幸い最近では日本でもアカデミアの高磁場装置を成果占有型で民間が利用する体制も整ってきたこともあり、将来的に企業にとってさらに使い勝手が良くなっていくだろうと期待されることから、これを利用することも視野に入れたほうが良いだろうと考える。

多くの生体系NMRに従事する研究者が最も時間を取られている作業は何であろうか。おそらくは安定同位体標識タンパク質の調製ではないかと思う。アカデミアの研究所にいる学生であれば、修学のためにそれに多くの時間を割くのも価値が高いと思う。しかし創薬という目標に向かう組織において、NMRで成果を出そうとしている研究者にとっては、このNMRのためだけの試料調製は、他の競合分析手法に対して大きな短所であると捉えた方がよい。これを如何に効率良く実践するかを考えることが重要である。製薬企業の多くは研究所でも実験作業の分業、外注化を進めており、タンパク質調製の機能がNMRラボとは別組織にあるところが多いのではないかと思う。この別組織の調製機能を使わず、NMRラボの中のみで同位体標識タンパク質の調製に多くの時間を費やすのは、NMRラボの最終成果としての生産性を著しく落とす。そこで我々が現在、取っている方法は2つある。一つはNMRラボ以外のタンパク質調製機能を使う方法である。中外製薬の研究所の場合、NMR以外の実験用に哺乳細胞発現系が常に稼働しており、多くのタンパ

ク質がこの発現系で調製されている。これらと同じ創業のタイムフレームに乗るためにも、この発現系を使ってNMR用の安定同位体標識試料を調製しない手はない。ここでは通常の発現プロトコルを標識用に修正して中外製薬のグループ会社の実験の実施を依頼している。ただし、委受託関係で気を付けなければならないのは、両者の間での十分な意思の疎通ができないと、受託側が標識試料調製をわかりにくい面倒な追加作業として認識して自在に試料調達ができなくなることである。我々の場合、この委受託の体制の整備は、委受託の両組織の人、対、人の信頼関係を構築しながら成しえることができた。これによりNMRラボとしては大きなリソースを割くことなく、標識NMR試料の入手が可能となっている。一方、哺乳細胞による標識タンパク質の調製にも到達できる限界がある。細胞の有する代謝系や細胞を育てる培地組成に起因する同位体の標識率がその一つである。これを補うために、自グループのリソースを割くことになるのだが、その労力をできるだけ軽減する発現系として大腸菌由来無細胞発現系を利用している。最近では質の良い無細胞発現系が市販で入手可能であるため、それを購入して使用している。この無細胞発現系で、正しい構造で発現さえしてくれれば、労せず一晩でNMR解析用のタンパク質試料の発現が完了するので、これを使える利点は絶大である。これまで弊社内のシステムとの併用により無細胞発現系により調製したタンパク質のNMR測定が可能であった確率は、67%程度である。この成功率から判断するに、まずは発現を試みる価値はあると思う。そのためNMRを適用するかもしれない創業プロジェクトが開始されるタイミングで、通常、解析タンパク質の無細胞系による発現、可溶化の可否を確認するようにしている。

発現システムを整備するのと同時に同位体標識のパターンにも配慮する必要がある。創業の現場で登場する解析対象のタンパク質は小さな分子ばかりではないので、分子量の観点で、主鎖アミド基シグナルを観測するためには、タンパク質に重水素標識を施さなければならない。また分子量や運動性の観点でそれでもシグナルを観測できない場合、近年はすっかり標準的な手法になったが、メチル基シグナルの観測も必要になる^[3]。我々の場合もメチル基シグナルの観測をしなければならないケースが頻出している。しかし、世の中で一般的なメチル基の標識は、大腸菌発現系にて α ケト酸を前駆体として培

地に加える手法が一般的である。この手法は上述の哺乳細胞や無細胞の発現系では α ケト酸の代謝による発現タンパク質への取り込みが機能しないため実施できない。そこで ^{13}C 、 ^2H が導入され、それぞれ立体選択的、位置選択的にメチル基シグナルを与えるVal, Leu,ならびにIle、それ以外にもメチル基を有するAla, Metを社外から先導的に調達し、この標識アミノ酸を標識源としている。これにより分子量の観点などで広い解析対象のタンパク質のNMR解析を可能としている。

上記以外の環境としてNMRの測定法や解析法についても、論文で報告されたもので自分たちにとって有用そうなものは試して評価し、実際に有用であれば自分たちの研究に取り入れていくようにしている。さすがにNMRの基礎開発は我々の本来の業務とは縁遠いため実施していないが、少なくともそれらの報告の原理と価値を理解し、自分たちで社内のインフラとして取り込んでいけるようNMRの知識と技術は、常に高く保持するようにしている。場合によっては、効率を重視して社外に接触してその技術導入を図ることもあるし、社外と共同研究を実施することもある。そのために、社外のアカデミアとのネットワークの構築も重視している。上記のような体制により、ごく一部の例を示すが、NNR測定の効率化のための不均一データサンプリング法^[4]や、時にX線結晶構造解析が適していないタンパク質の自動立体構造決定のためにCYANA^[5]、多くの時間を費やさなければならないシグナル帰属も自動に実施が可能なFLYA^[6]を用いたりすることができ環境を適時、整えている。

以上の積極的、かつ戦略的な生体系NMRの環境整備によって、やっと生体系NMRがまともに創業の早いタイムフレームに乗って結果を出し続けることができるようになる。

中外製薬(株)の生体系NMRの創業への適用例

我々の生体系NMR機能は、現状では中分子創業と抗体創業に資源を投じている旨を上で伝えた。具体的な適用例の話は企業としての情報の秘匿性の都合で明らかにできないが、一般論と共に問題のない範囲でお伝えしたい。まず中分子創業は新しい分野でこれまでの低分子創業と似ている部分もあるが、これまでになかった創業上の課題も数多く持っている。このような創業上の課題の解決に生体系NMRが役立つ局面が多い。ごく一例であるが、一般的に用いられるNMRによる化合物の標的タン

パク質上の結合サイトの同定も、低分子創薬におけるニーズ以上に重要になることもあるので実施することがある。これはX線結晶構造が結晶化の難易度、スピードの観点で得られにくい場合などに実施することになる。図1にモデルタンパク質A上の化合物Bの結合部位を化学シフト摂動法によりマッピングした例を示す。このように上記の無細胞発現系を用いて調製したタンパク質を解析対象として、アミド基シグナルやメチル基シグナルを指標に化合物結合部位を簡便、迅速に同定する作業を実施できる状況にある。加えて抗体創薬についても言及したい。抗体創薬への生体系NMRの製薬企業からの適用としては、米国の抗体創薬の一強であるAmgen社が、古くは大腸菌発現系から調製した抗体のFc

フラグメントの解析などについて報告している^[7]。またAbbvie社がNMRにより抗原のエピトープ（抗体の結合部位）を決定する試みも報告している^[8]。ごく最近では、Merck社によるIgGの構造解析の報告においてIgGのX線結晶構造解析と相補的にNMRを使った例もある^[9]。このように次第に製薬企業で生体系NMRが抗体創薬に使われる裾野が広まりつつある。また企業以外でも米国のNISTという研究機関から抗体の品質管理としてNMR手法を適用する例も報告されている^[10]。弊社の場合は、これらの世の動きの前から生体系NMRへの適用に独自に取り組んでいる。その技術レベルを示すデータを図2に載せる。図2(a)はIgG型モデル抗体C（150kDa）を哺乳細胞発現系で70%程度の重水素

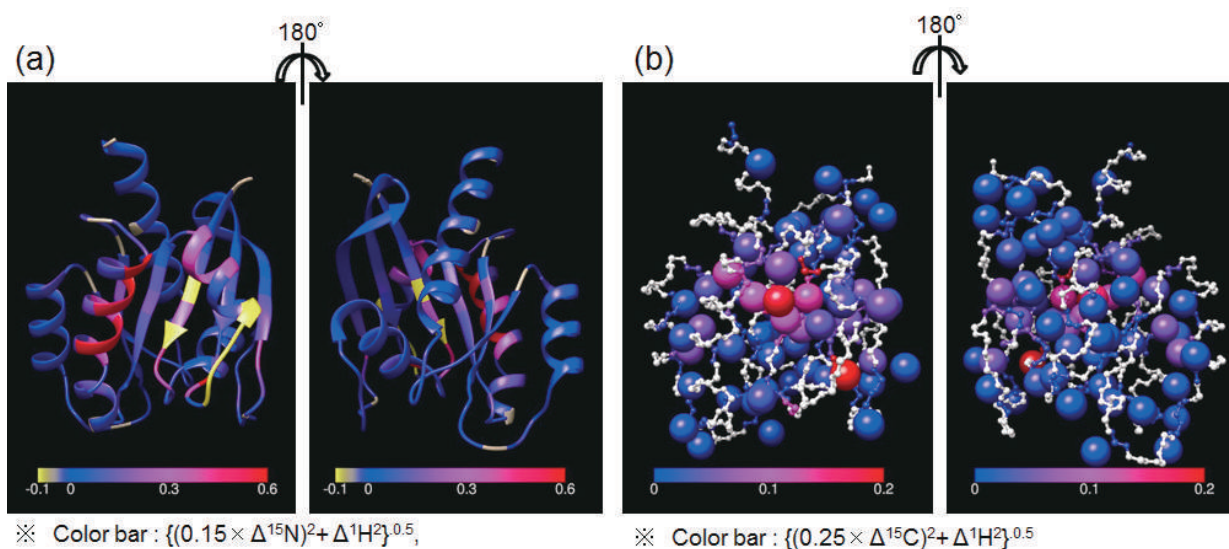


図1 化学シフト摂動法によるモデルタンパク質Aへの化合物Bの結合に関する部位のマッピング
(a) アミド基シグナルを観測指標とした場合（黄色は帰属ができなかった残基）、(b) メチル基シグナルを観測指標とした場合（(a)と同じ向きで表示されている）

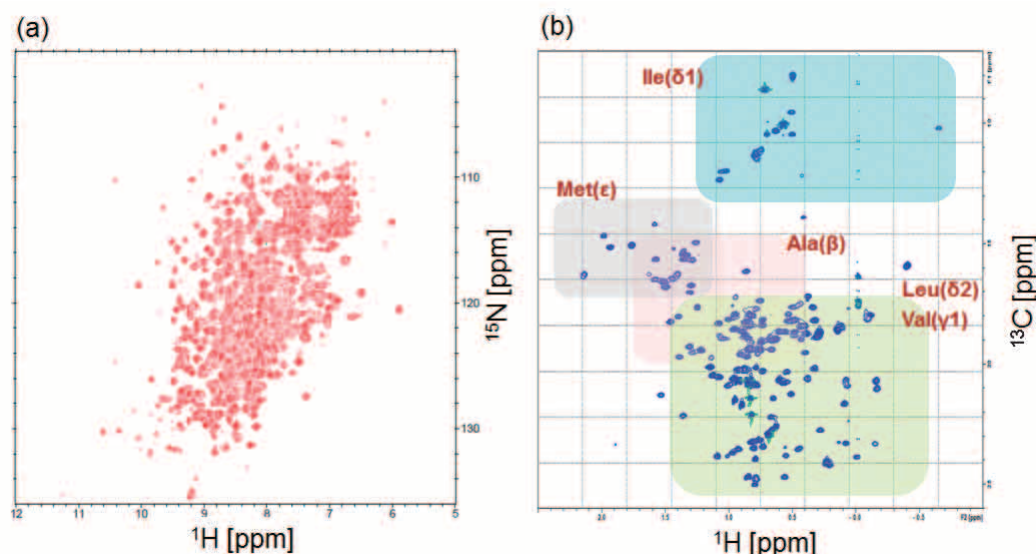


図2 IgG型モデル抗体CのNMRスペクトル

(a) 均一¹⁵N標識体の¹H-¹⁵N TROSY、(b) Leu、Val、Ile、AlaおよびMetのメチル¹³C標識体の¹H-¹³C HMQC

標識率で調製した試料のアミド基シグナルのNMRスペクトルであり、シグナルの帰属率は94%に上る。図2(b)はメチル基を有するアミノ酸の1個のメチル基のみを ^{13}C 標識した時のメチル基シグナルで、このIgGの分子量領域(150kDa)でも非常にきれいなNMRスペクトルが観測されている。これらの技術を創薬のどういう局面で使うかについて簡単に触れる。従来の抗体創薬の分子フォーマットは通常のIgGで、単に疾患の原因となっている標的タンパク質に結合するのみの抗体が多かった。今、世に上市されている抗体医薬品の多くもそのタイプである。このような場合、合理的な分子デザインの余地は少なく、立体構造情報、特に生体系NMRの情報は活かしにくい。しかし抗体創薬の技術進歩と共に、単に抗原に結合を示すだけでない機能を持たせた抗体が創生されるようになってきた。弊社でもそのような機能性抗体の一部がすでに開発ステージに進んでいる^[11, 12]。このような複雑な分子間相互作用メカニズムを持つ抗体の創生にとっては、NMRを含めた構造などの情報が必要となる場合がある。ここに生体系NMRの活路を見出している。中分子創薬の局面においても同様なことが多いが、NMRが固有な情報を与える可能性のある状況、つまり、運動性が機能に重要な場合、過渡的複合体(弱い相互作用の複合体)の形成が機能に重要な場合、X線結晶構造解析において結晶化のアーティファクトがある場合、構造解析対象が柔軟な領域を含む場合、細胞膜周辺のイベントを見たい場合、細胞内の分子の状態を見たい場合、分子が高濃度の状態、凝集体そのものを見たい場合などに生体系NMRを使いたいと我々は考えている。

創薬を目指す組織における生体系 NMR 機能としての在り方

製薬企業において生体系NMR機能が所属する創薬組織の形態については必ずしも一つではない。創薬の現場の中心組織に属している場合(以降、創薬適用型)もあるだろうし、創薬技術を中心とした組織に集約されている場合(以降、創薬技術型)もある。筆者の場合、いずれの組織形態も経験したことがあるが、今は後者の技術ごとに集約された創薬技術型の組織に属している。自分自身が率いるグループに生体系NMR機能が存在するが、そのグループはNMR以外にX線結晶構造解析等の構造生物学的機能や、SPR等の分子間相互作用解析機能も有した創薬技術型の組織である。NMRからの

目線では、構造や相互作用の観点で同様の機能が同じグループに集約されていることになる。生体系NMRを創薬に適用していくには、いずれの組織形態にも一長一短があるが、生体系NMR機能を保持している製薬企業の多くがおそらくは採用しているだろう創薬技術型について述べたい。この組織型では、各創薬技術の専門家が存在し社内の第一人者としてその技術に対して責任を持っている場合が多いと思う。この責任感自体は専門分野の技術レベルを高く保つために必要である。またこの組織型ではその技術レベルを組織として戦略的に管理しやすいメリットがある。我々が上記のように自分たちの生体系NMRの活動に必要な技術を保有できるに至ったのもその恩恵である。しかし、この組織型が有する危険な要素としては、創薬という最終目標から離れがちで、結果、その専門分野の業務のみに執着しやすいことである(逆に創薬適用型組織はこれらの長所・短所が反対になりやすい)。特にX線結晶構造解析のようにStructure Based Drug Designの創薬プロトコルに不可欠とされる機能の場合、分業が進み、立体構造を決定するというルーチン作業に終始している製薬企業の研究員も多いのではないと思う。ルーチン作業になると、同じグループ内でも研究員同士の科学的な交流が少なくなる場合もあるのではないだろうか。そうになってしまうと、創薬に必要な革新的アイデアは、自分たちが専門とする分野から生まれにくくなる。そのようなルーチンの分業体制でも良い、という考えもあるが、その場合、分業の究極の形態として、外部の研究機関にその業務を委託すれば良い、という話にもなりえる。そういう流れが科学分野を問わず、製薬業界に存在するのも事実である。弊社において我々のグループは自身らがそのような在り方へ移行することを望んでいない。なぜなら我々は製薬企業内の中核研究員として、創薬の最寄りの立ち位置で専門性を活かして活躍できるように、構造・相互作用情報があるからこそ発案できる創薬プロジェクトを主導できる状態をグループとして目指しているからである。

さて話は属する組織から、その組織の中の生体系NMR機能そのものに戻るが、まずNMR機能単独で成果をあげ続けるのは創薬領域に関わらず難易度が高い。NMRの使用法の多様性や難解な解釈は、創薬に携わる周囲の分野の研究者には伝わっていないのはよくあることだと思われ、NMR機能を有する同じグループのメンバーにすらそれが伝

わっていないこともある。そのような状況の中、生体系のNMRの業務が受け身の状態で継続的に発生することはなかなかない。一方で受け身の状態で、常に同じ形態で発生する業務、例えばNMRによる化合物のスクリーニングなど、つまりルーチン業務を獲得できたとすると、そこに製薬企業の研究者が介在しなければならない意味も薄れるという矛盾がある。これが意味していることは創薬分野において生体系NMRで積極的に身を立てようと思うのであれば、受け身の業務体制は少なくとも取ってはいけないこととなる。生体系NMRが、研究所のどの創薬プロジェクトに、どのタイミングで、どのように役に立てられるのかを探るアンテナを張り、必要であればそこに自ら飛び込んでいく前のめりの姿勢がなければならない。このニーズ発掘活動を、研究員が実験作業に従事しながら同時に行うのはかなりの労力を要する上に、仮にそれができたとしてNMR機能全体の生産性は低くなる。そのために上述にもあるが、NMRを理解するマネージャーがそのニーズ発掘の任を担うのが一つの解である。加えて、ニーズ発掘の観点で中外製薬の我々のグループで機能している点についても紹介する。我々のグループにも含まれる機能であるX線結晶構造解析やSPRは、それぞれ立体構造、分子間結合の解離定数（さらには速度論パラメータ）を提供するという点で得られる情報が極めて明快である。そのため創薬の周辺分野、あるいは創薬プロジェクトからの直接的な解析願いは出てきやすい。その解析情報の提供のみで解決するような定型的な創薬ニーズについては肅々とそれを実施するのみだが、創薬フォーマットが十分に固定されていない低分子創薬以外では、必ずしもその依頼を実施するのみでは本質的な創薬課題の解決に至らないケースが散見される。このような場合に、生体系NMRの出番がある。しかし、グループ内で連携が取れていない場合、隣に座っている研究員の机でそのようなチャンスがあることに気付かない、あるいは気づいても入り込んでいけないことが多いことを私は経験している。そこで我々のグループでは、定型依頼業務以外は、X線結晶構造解析であろうが、SPRであろうが、依頼のあった案件をグループ内に共有し、その表面的な解析依頼の背景には何が解決すべき課題として存在するのかをグループ内で議論するようにしている。この本質的課題を解決する方法の一つとして、NMRがその特有な質のデータを供給し、多様な使い方を発揮することができるのである。した

がって、生体系NMRが所属するグループ内の議論が活発に交わされるよう組織体制をそれに向けて改革した経緯がある。そして構造、分子間相互作用の観点で解決すべき創薬課題を抽出できて、生体系NMRが活きる場があったとしても、その手法単独で解決できる成果には限りがある。その場合、他の分析手法と“相補的”な効果、できれば“相乗的”な効果を得られるようにNMRを利用することを考えるようにしている。このような手法間の連携はIntegrative Structural Biology^[13]として次世代の構造生物学の一つの潮流となっている。我々のグループもこのような考えの下、単独手法で行きつける限界を超えた成果を求めている。生体系NMRの視点からも、他手法との連携することで、従来のNMR単独よりも高い価値の創出を狙うべきだろうと考える。このような組織体制に生体系NMRが位置することは、新たな局面を切り開いていく切掛けになることを予感させる。グループ内の連携は以上の体制を取っているが、グループ外との連携も言わずもがな創薬研究に貢献する意味で非常に重要である。特にこの創薬技術型の組織の場合、グループ外からの解析の委託をグループ内で受託するだけの関係に留まってしまうと、創薬にとって重要な新たな価値の創造への発展の幅が狭くなる。これは生体系NMRにとっては非常に窮屈な関係性である。グループ外のMedicinal chemist, Pharmacological biologist, Molecular engineerなどの異分野研究者と共通の創薬という目標に向かって一緒に議論をする現場の風通しの良さが必要である。

最後に

本稿は創薬における生体系NMRの位置づけ、という内容で、NMR研究者としての目線に偏って執筆した。しかし、創薬の現場で生体系NMRを実施する我々にとっては、革新的な医薬品の提供を通じて新たな価値を創造し、患者さんの健康に貢献する、という大前提の価値観が存在することを申し伝えたい。この価値観を失念すると、NMRという専門分野に入り込んでしまっただけで何のために研究しているのかわからなくなってしまう。この価値観に基づいて、創薬研究を考え続ける必要があるのである。さらに言えば、この前提に立つと、目前の創薬課題の解決のために生体系NMRの適用が必ずしも最適解ではないかもしれないと思ってしまうことにもなりかねない。しかし、NMRは折角、それに従事する研究者の力量で、それ特有の情報を提供ができ、

かつ多様な使い方をできるわけである。したがってそれを専門分野とする研究者としては、創薬と専門技術への想いのバランスを取りつつ、さまざまな創薬課題に対して、現場の仲間の研究者と共に、NMRがどのようにアプローチできるのかを絶えず考え続けたい。この思考プロセスにこそ製薬企業に生体系NMR研究者が存在する意義があるのだと思う。

引用文献

- [1] Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., Fesik, S.W. (1996) Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science*. **274**, 1531-1534.
- [2] Jahnke, W. (2007) Perspectives of biomolecular NMR in drug discovery: the blessing and curse of versatility. *J. Biomol. NMR*. **39**, 87-90.
- [3] Tugarinov, V., Hwang, P.M., Ollerenshaw, J.E., Kay, L.E. (2003) Cross-correlated relaxation enhanced ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 10420-10428.
- [4] Hyberts, S.G., Milbradt, A.G., Wagner, A.B., Arthanari, H., Wagner, G. (2012) Application of iterative soft thresholding for fast reconstruction of NMR data non-uniformly sampled with multidimensional Poisson Gap scheduling. *J. Biomol. NMR*. **52**, 315-327.
- [5] Güntert, P., Buchner, L. (2015) Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA. *J. Biomol. NMR*. **62**, 453-471.
- [6] Schmidt, E., Güntert, P. (2012) A new algorithm for reliable and general NMR resonance assignment. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12817-12829.
- [7] Liu, D., Ren, D., Huang, H., Dankberg, J., Rosenfeld, R., Cocco, M.J., Li, L., Brems, D.N., Remmele, R.L. Jr. (2008) Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation. *Biochemistry*. **47**, 5088-5100.
- [8] Olejniczak, E.T., Ruan, Q., Ziemann, R.N., Birkenmeyer, L.G., Saldana, S.C., Tetin, S.Y. (2010) Rapid determination of antigenic epitopes in human NGAL using NMR. *Biopolymers*. **93**, 657-667.
- [9] Scapin, G., Yang, X., Prosise, W.W., McCoy, M., Reichert, P., Johnston, J.M., Kashi, R.S., Strickland, C. (2015) Structure of full-length human anti-PD1 therapeutic IgG4 antibody pembrolizumab. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 953-938.
- [10] Arbogast, L.W., Brinson, R.G., Marino, J.P. (2015) Mapping monoclonal antibody structure by 2D ^{13}C NMR at natural abundance. *Anal. Chem.* **87**, 3556-3561.
- [11] Igawa, T., Ishii, S., Tachibana, T., Maeda, A., Higuuchi, Y., Shimaoka, S., Moriyama, C., Watanabe, T., Takubo, R., Doi, Y., Wakabayashi, T., Hayasaka, A., Kadono, S., Miyazaki, T., Haraya, K., Sekimori, Y., Kojima, T., Nabuchi, Y., Aso, Y., Kawabe, Y., Hattori, K. (2010) Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1203-1207.
- [12] Kitazawa, T., Igawa, T., Sampei, Z., Muto, A., Kojima, T., Soeda, T., Yoshihashi, K., Okuyama-Nishida, Y., Saito, H., Tsunoda, H., Suzuki, T., Adachi, H., Miyazaki, T., Ishii, S., Kamata-Sakurai, M., Iida, T., Harada, A., Esaki, K., Funaki, M., Moriyama, C., Tanaka, E., Kikuchi, Y., Wakabayashi, T., Wada, M., Goto, M., Toyoda, T., Ueyama, A., Suzuki, S., Haraya, K., Tachibana, T., Kawabe, Y., Shima, M., Yoshioka, A., Hattori, K. (2012) A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat. Med.* **18**, 1570-1574.
- [13] Ward, A.B., Sali, A., Wilson, I.A. (2013) Biochemistry. Integrative structural biology. *Science*. **339**, 913-915.



鳥澤 拓也 (とりざわ・たくや)

1996年：東京大学薬学部製薬化学科卒業、2001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(嶋田一夫研究室)、2001～2005年：科学技術振興機構にて研究員として勤務(甲斐荘正恒研究室)、2005～2014年：中外製薬株式会社にて研究員として勤務、同社にて2014年より主席研究員、2016年より蛋白質構造解析グループのマネージャーとして勤務、現在に至る。

NMRのハードウェアに関するメモ

2. 主に受信系について—プローブ編

(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グループ

根本 暢明

nnemoto@jeol.co.jp

「主に受信系について—プローブ編」への序

本稿ではNMR (Nuclear Magnetic Resonance; 核磁気共鳴) のハードウェアについて述べる。今回は主にプローブ (送受信器コイル、いわゆるアンテナ) を含む受信系についてである。前回は主に送信系について述べた^[1]。ユーザが発したパルスが分光計に伝わり、その後分光計の中のシーケンサ、トランスミッタ、パワーアンプなどを通るうちに変換され、最終的にプローブに到達するところまで述べた。実はこれはNMRにおける電磁波の旅の片道 (未満) に過ぎない。つまり、プローブに到達した電磁波は静磁場 B_0 中で (パルスNMRでは時間変動) 磁場 B_1 を発生させ、磁気共鳴現象が発生するわけで、信号を今度はプローブから受信系へ渡さないといけない。言い方を変え、プローブは送信系と受信系の折り返し地点であるということができる。なお紙面の都合で、本稿ではプローブについて述べ、次号でそれより後ろについて述べることにする。

1. プローブ

1-1 プローブの分類

現在の市販のNMRでは使用するプローブが測定ごとに細分化されており、分類を述べることは一概には難しい。非常に大雑把に分けると、溶液測定用、固体測定用、イメージング (MRI; Magnetic Resonance Imaging) 用に分けることができる。プローブは、概ね、以下のような項目で分類することができる: *1

- (1) 磁石の磁場強度 (共鳴周波数) とボア径
- (2) サンプル管の径
- (3) 対象核と多重共鳴か否か (単一の核に核磁気共鳴を起こすか、すなわち一重共鳴プローブか、複数の核に共鳴を起こすか、すなわち多重共鳴プローブか。共鳴周波数のレンジ内に存在する核種であればすべて測定することができるものもある。また多重共鳴プローブの

場合、multiple-tuneや複数コイルの場合がある。その場合、どの核に対応するコイルを内側にして他の核に対応するコイルを外側にするのかなどによって種類分けされる)

- (4) パルス磁場勾配 (Pulsed Field Gradient, PFG) コイル (Z軸単軸なのかx, y, z-3軸なのか)
- (5) 動作温度 (大別すれば、室温、室温より高温の数十℃から数百℃付近、窒素沸点付近、極低温10 K付近)。また極低温プローブでcold-preamplifier (冷却前置増幅器) を装着したものは、その対象核を指定する。
- (6) (固体の場合) 最高回転速度 (固体MAS (Magic Angle sample Spinning; マジック角試料回転) プローブ)

溶液プローブの例をあげると、

500 MHz (11.7 T) (54 mm ボア (ナローボア) 磁石用) 5 mm ^1H - $\{^{13}\text{C} \cdot ^{15}\text{N}\}$ Z-PFG 極低温 (He 温度) $\{^1\text{H}, ^2\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ 冷却前置増幅器付きプローブ

これは、

- ① ^1H の共鳴周波数が 500 MHz (11.7 T) でボア径が 54 mm の磁石用
- ② 試料管の外径が 5 mm
- ③ 二つのコイルからなり、内側が ^1H のシングルチューンで (本当はロック用の ^2H とのダブルチューンで)、外側が ^{13}C と ^{15}N のダブルチューン
- ④ Z 単軸 PFG
- ⑤ 極低温プローブで、 ^1H と ^2H 、 ^{13}C の冷却前置増幅器を装着したプローブ

ということになる。以下、上記の項目別に説明する。

1-2 磁石の磁場強度 (共鳴周波数) とボア径

当然のことながら、静磁場強度 B_0 や観測核が変わればそれに応じてプローブ回路の共鳴周波数は変わってくる。ところで、ポピュラーな縦置きを超伝

導磁石の場合、通常磁石の静磁場強度 B_0 が大きくなるに従って磁石の大きさも大きくなるので、磁石の中心（スイートスポット）から磁石底部のプロープボディまでの長さも長くなる。溶液のルーチン測定などに使用される超伝導磁石（Super Conducting Magnet）は例えばボア径54mmなどのナローボア磁石がほとんどである。しかし、固体測定やイメージングでは、より太い径の磁石が用いられることがある。固体用プローブを太いボア径の磁石で使用することは、より大きなキャパシタ（コンデンサ）などのパーツをプローブ内に使用しやすく、試料管を回転させるために必要なエアー系の配管取り回しにも有利である。マイクロイメージングなどに使用される磁石のボア径は測定対象が何であるかによって変わってくる。すなわち、54mmのナローボア磁石では通常イトミミズくらいのごく小さい動物を測定し、まれにマウスを専用ホルダーに挿入固定して（ぎゅうぎゅうに押し込んで）測定する。89mmのスーパーワイドボア磁石では、マウスその他の小動物を余裕をもって測定対象とすることができる。

1-3 試料管の径（外径）

溶液および固体NMRのシステムでは、試料管が太くなるほど試料が大量に入るわけで、単純に高い感度が欲しい場合、手取り早いのは太い径の試料管用プローブを使用することである。そもそもNMRは測定感度が極端に低い測定方法なのだから、外径の太い試料管で多量の試料を測定すればよいかと思いがちである。しかし、それは必ずしも正しくないことを示す。太い試料管を使用するプローブにおいてプローブコイルが作り出す時間変動磁場 B_1 の均一度^{*2}を高くすることは困難を伴う。例えば、サンプル中央部の均一度が良い部分で10 μ sの90°パルスを与える場合に、均一度の低いところで例えば、15 μ sだったとしよう。すると場所によってフリップ角が異なり90°パルス長があっていないことになる。つまり試料全体ではそのような状態で測定した信号が重ね合わさっているような状況になる。さらに、単一パルス実験（single pulse experiment）では問題が少ないが、複数のパルスからなる実験では、パルスをかけるたびにこのようなフリップ角の誤差がつもり重なってしまい、思ったような信号強度を得ることができないこともある。一方、固体のMASプローブの場合、試料管の外径（ローター径）が細いほど回転速度を上げることができるので、単なる感度の要求以外の要求で

ローター径の太さの選択が重要になってくる。したがって、実施する測定の諸々の要求によって試料管の径は自ずと決まってくる。

また溶液NMRの場合、ありがちな問題として、次の2つのパラメータ、つまり使用することができる試料の量（質量）と試料の溶媒に対する溶解度で、使用するプローブと試料管の外径（の傾向）が決まる。まず、溶解度が低い場合、例えばタンパク質の溶液測定の場合について考える。通常NMR測定に供するタンパク質の試料は、大腸菌などの大量発現系から望む気になれば時間と体力とお金を投入しさえすればいくらでも入手可能である場合が多い（実際のものには限度というものはあるのは言うまでもない）。試料の溶解度が低い場合は、通常最もよく使用されている外径5mm（以下 ϕ 5のように書く）の試料管かそれよりも外径が太い ϕ 8や ϕ 10のプローブを使用したほうがより良い感度を得られるかもしれない。ただ、この「外径の太い試料管を使用する作戦」は単一パルス実験など、用いるパルスの個数が少ない実験向きである。一般に、プローブの径が太くなると B_1 の均一度が低くなるため、複数のパルスからなる実験ではパルスをかけるたびにエラーが蓄積して感度低下を招き、 ϕ 8のプローブを使用して感度向上を狙ったが大して感度向上しなかった、という事態が起こりかねない。

次に、例えば手持ちの試料の質量が限定されている、天然物の試料などのようなケースを考える。測定に使用することができる試料の量が非常に限られていても、溶媒に対する溶解度が十分高く、濃度を上げて粘性が大きく変化しない場合は、使用する溶媒の量を減らして試料濃度を高めることができる。まず、対称型の試料管^[2]を使用すると、同一径の試料管であっても試料管の高さ方向に必要な試料液体の高さ（必要な液中高）、別の言い方をすると使用する試料液体の体積を概ね半分以下にすることができる^{*3}。そのため、溶液では同一質量の試料に対し使用する溶媒の量を半分にできることになるので、その結果試料濃度を2倍にすることができる。また最も使用頻度が高い ϕ 5のプローブに比べ、より細い ϕ 3やさらに細い試料管径用のプローブを使用することでも、試料液体の体積を減らすことができる^{*4}。典型的には ϕ 5のプローブ用試料管の内径は4.2mm程度、 ϕ 3のプローブのそれは2.4mm程度なので^[3]、 ϕ 3の試料管内側の断面積は ϕ 5のその約1/3である。 ϕ 5と ϕ 3のプローブ用試料管を同じ液中高で比較すると、試料液体

の体積は約1/3になる。仮に、同一濃度の溶液に対して（例えばS/Nを測定する0.1% ethylbenzeneのような溶液に対して） $\phi 5$ のプロープと $\phi 3$ のプロープが半分の感度を示したとすると、同一質量の試料に対し溶媒の量を1/3にすることができれば1.5倍感度が上がることになる。さらに、上記で述べたが、 $\phi 3$ の対称型のセル^{*5}を使用して高さ方向も半分の液中高にすると、トータル約3倍の感度が期待できる。結局のところ、ここで述べた感度向上の方法は、試料管の断面積が減っても対応するプロープの感度が断面積の比から考えられるほどは低くないことから可能である。ただし、複数パルスからなる実験においては B_1 の均一度が良いことに起因する効果もあるので、この点で高感度になる場合はあろう。

1-4 対象核

チューニングについて：

まずここでは、使おうとしているプロープのコイルを、測定しようとしている対象の核の共鳴周波数に同調させる、いわゆるチューニングの作業についても述べる。図1に、非常に単純化した典型的なプロープ回路の模式図を示す（図1Aは特に単核の場合）。縦置き of 超伝導磁石では、主磁場 B_0 の方向が鉛直方向で、かつ溶液のサンプル管の場合は鉛直方向に長く、この横側から時間変動磁場 B_1 を印加する必要があるため、ソレノイドコイルは使用せず、サドル型（鞍型）コイルを使用する。図ではコイルと並列にチューニングキャパシタ（コンデンサ）、それらと直列にマッチングキャパシタが配置されているが、実際にはコイルに電気抵抗があり、

それ以外のコイルやキャパシタが多数存在する。多くの場合共鳴周波数において回路を同調させるために、チューニングとマッチングという作業が必要になる^{*6}。

複数核の取り扱いについて：

複数の異なる共鳴周波数を取り扱うことを考える。まず考えられるのは物理的に分離した2つのコイルを使用することである。このとき、コイルは内側のコイルと、外側のコイルができるわけであるが、内側のコイルのほうがfilling-factor（充填因子）が高く、感度が高い^{*7,8}。また2つの回路で電気回路的にちゃんと分離できていないと、直接観測しないほうのチャンネルから直接観測するほうのチャンネルにノイズが乗る。特に観測時のデカップルで問題が起きやすい。ところで、回路に複数の共鳴点を設けることもできる。図1Bに簡略化した回路図を示す。同調させる周波数が2つの場合、ダブルチューン、3つの場合トリプルチューンという（珍しいが存在する）。具体的例として、溶液測定でもっとも良く使用する核の一つが ^1H であり、多くの場合溶液の測定では ^2H (D) で標識した溶媒を使用し ^2H の信号を使いフィールドをロック（固定）する。 ^1H と ^2H は共鳴周波数が適度に離れていることもあり（11.7 Tの静磁場で ^1H の共鳴周波数が500 MHzに対し、 ^2H が76.7 MHz）、この核種のペアがダブルチューンになっていることはよくあることである。

高磁場や極低温プロープなどを除くと、多くの溶液プロープでは ^2H のチューニングを毎度とる必要がない。例えば、タンパク質溶液測定で非常によく使用する、 $^1\text{H} - \{^{13}\text{C} \cdot ^{15}\text{N}\}$ プロープ^{*9}のRFの入力

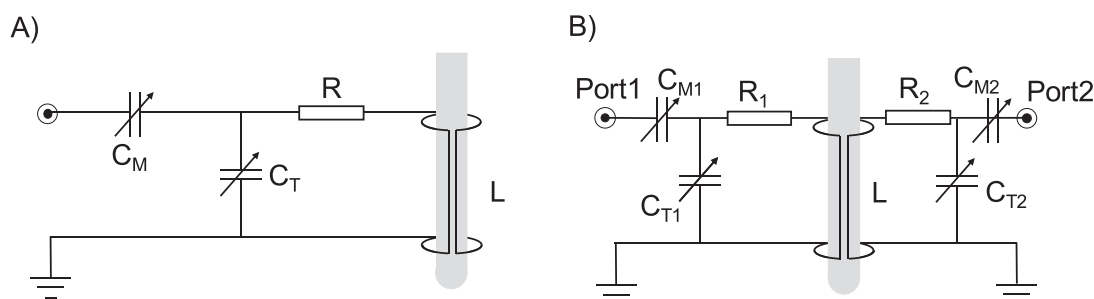


図1 非常に単純化した、プロープ回路の模式図

実際、コイルには無視できない電気抵抗がある。電気抵抗とコイルを分けて描いてあるが実際はコイルに含まれ一体のものである。極低温プロープでは冷却してコイルの電気抵抗を下げ、Q値を上げ、感度向上を実現する。これ以外にも固定のコイルやコンデンサ等の部品が多数必要である。市販の製品の場合、固定されたキャパシタを使用したり、ユーザの目に触れない場所にあつて、工場などにおける調整時にプロープカバーを外して調整するようなキャパシタも存在する。A) 単核の場合。Lはコイルのインダクタンス、 C_T はチューニングキャパシタ（コンデンサ）、 C_M はマッチングキャパシタである。B) 複数核（ダブルチューン）の場合。この図でいうPort1とPort2の2か所RFを入力する場所がある。それぞれ、チューニングキャパシタやマッチングキャパシタがある。

ポートは ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^2H (Lock) の4つであって、それらの核種の組み合わせを変更することはできない。ところが、例えばチューナブルプローブと言われるプローブでは、例えば ^{15}N の共鳴周波数 (50.6 MHz, 11.7 T, ^1H の共鳴周波数が500 MHzのとき) から ^{31}P の共鳴周波数 (202 MHz, 同じく 11.7 Tにて) の間の周波数で、内側のコイルの同調を取ることができたりする。この周波数可変のチャンネルのことをXチャンネルとか、対応する核のことをX核と書くことも多い。なお、このプローブではX核用のコイルの外側に、デカップル用の ^1H 用のコイルがある。したがって、X (^{15}N - ^{31}P) - $\{^1\text{H}\}$ プローブである。この場合、この領域の周波数を連続的に変化させることができることも多いが、プローブや核種によってはスティック (実態はキャパシタやコイル。長い柄が付いていてプローブ下部から挿入) を使う必要がある。市販製品の場合、どの核にどのスティックを使用するかは、プローブ付属の説明書を参照する^{*10}。溶液のルーチンの ^{13}C の単一パルス実験 (^1H デカップル付き) や ^1H の単一パルス実験を両方まんべんなく測定している装置では、このチューナブルプローブを磁石に挿しっぱなしという装置もあるかと思う。チューナブルでなくCHデュアルプローブ (^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ プローブ) の場合もある。それに対し、測定対象がほぼ ^1H のみとか、 $\{^{13}\text{C}\}$ - ^1H のHMBCばかり、という装置では、インバースタイプの ^1H -X (^{15}N - ^{31}P) のようなプローブが重宝するかもしれない。これはデュアルプローブとコイル配置が内外逆で、内側に ^1H (と ^2H) 用のコイルが、外側にX核用のコイルがある。発展形として、インバースタイプの ^1H -X (^{15}N - ^{31}P) にもう一つ ^{13}C や ^{15}N 固定のチャンネルを持つ、 ^1H - $\{^{13}\text{C} \cdot \text{X} (^{15}\text{N}-^{31}\text{P})\}$ や ^1H - $\{^{15}\text{N} \cdot \text{X} (^{15}\text{N}-^{31}\text{P})\}$ のようなプローブも市販されている。

1-5 磁場勾配 (Field Gradient)

今日、例えば溶液測定において、磁場勾配 (Field Gradient ; FG) パルスは無くしてはならない。その主な用途は、1) FGを使用した coherence pathway の選択 (sensitivity-enhancement, echo/anti-echo などと呼ばれる感度向上も含まれる)、2) Grad.-180-Grad. といったように180°パルスの不完全性由来のアーティファクトの除去やZZ-crusherと言われる磁化がZ方向を向いたものだけの選択、3) 拡散係数の測定やDOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) の測定、4) イメージング (MRI) か

ら派生するシングルスキャン多次元測定^[4]、5) (これもイメージングからの派生であるが) FGシミングなど多岐に及ぶ。溶液測定にFGパルスが導入された当初はZ軸単軸であったが、後にx, y, zの3軸FGコイルを搭載したプローブが市販されるようになってきた。この3軸FGコイルがあると、PFG (Pulsed Field Gradient ; パルス磁場勾配) を使用したシミングにより radial 項つまりz軸以外の軸の項も含んだFG-shimmingが可能となる。3軸FGコイルでなく、Z単軸のFGコイルを搭載したプローブであっても、さらにFGコイルを積んでいないプローブであってもFGコイルからの磁場勾配の代わりにホモスポイルを使用することで、液量の違いによる影響が出やすいZ方向の高次の項が調整できるので、これだけでも非常に重宝する^{*11}。Z以外の項を含む項は通常大きく変化しない。後述する極低温プローブでは、3軸FGコイルを組み込むデザインは困難なので通常Z単軸である。3軸FGコイルを使うことによってFG-shimming以外では、DQF-COSY (two dimensional Double Quantum Filtered shift COrelation Spectroscopy ; 2量子フィルタ付き2次元シフト相関分光法) での溶媒除去が綺麗になる^[5]。

1-6 極低温プローブ (Cryogenically Cooled Probe)

観測コイルの温度を室温ではなく、極低温で測定を行うためのプローブを極低温プローブ (Cryogenically Cooled Probe) と呼ぶ。現在商用ベースに乗っている溶液用のプローブでは、主に数十Kで測定するタイプのプローブと窒素の沸点付近で測定するタイプのプローブがあるが、両者の違いは動作温度が異なる程度である。前者は同等の室温プローブに比べ、概ね5倍程度に、後者は2倍程度S/N比の増大が期待できる^[6]。

コイルの全体のデザインと排気系

極低温プローブ全体の形状は、通常の室温プローブと比べ、排気系のポートと冷却系のポートがある点で大きく異なる。図2のように、試料空間は室温付近であるのに対し、そこから数mm隔てたコイル空間は低圧低温である^[6]。極低温プローブの作成はこの大変大きな温度勾配と真空に耐えられる強度で作らないといけないことがまず難しい。最近のNMRの磁石は自己シールド型磁石がほとんどなので、あまり気にすることも少なくなったのかも

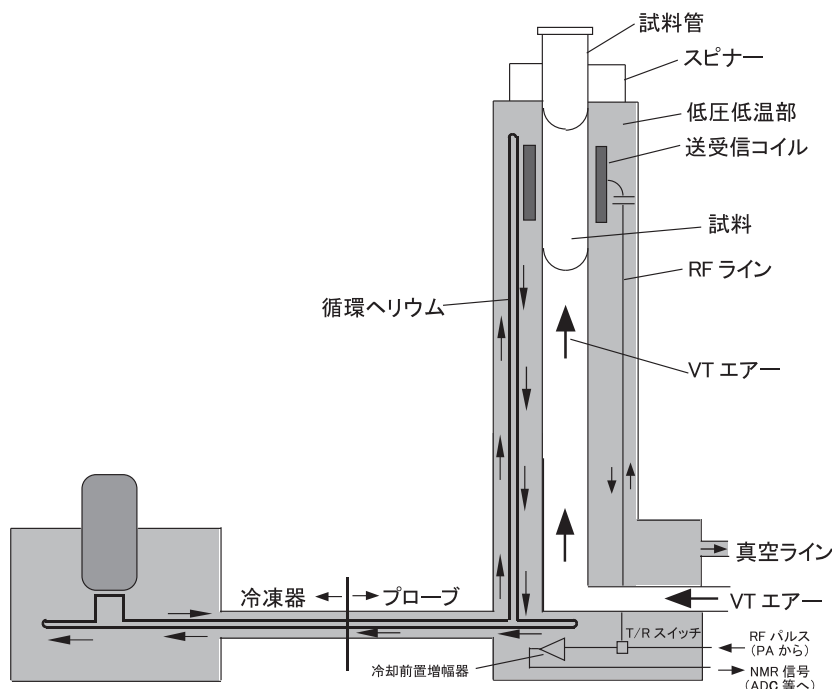


図2 極低温プローブの概略図 (JEOL RESONANCE ホームページ^[6]より改変)

縮尺は適当である。薄い灰色で塗った部位が、低圧低温の部分であり、真空ラインに繋がっている。冷凍器で冷やされたヘリウムガスは、プローブの送受信コイル付近をまず冷却し、その後に冷却前置増幅器 (Cryo-Preamplifier) を冷却する。その後冷凍器に戻る。パワーアンプで電力を増幅されたRFパルスは送T/Rスイッチ (デュプレクサ、duplexer) を通った後、受信コイルから試料に照射される。NMR信号はT/Rスイッチを通った後、冷却前置増幅器を通して、プローブ外のADC (Analog to Digital Converter; AD変換器) 等へ伝わる。そのため、RFを入れるポートと出すポートが分かれて2つ存在する点が室温動作のプローブと異なる。

しれないが、コイル空間の低圧を実現するための真空ポンプをあまり磁石に近づけたくはなく、さりとて真空系の空間を無為に大きくするのも避けなければならない。次に、極低温プローブの作成には、さらに冷凍機の振動がプローブに伝わらないようにしないとイケない。この振動の絶縁ができないと、NMRスペクトルに不要なピークがアーティファクトとして現れるので避けないとイケない。実際には冷却および排気パイプがプローブへ向かう経路を重たい支柱や砂袋で固定する^{*12}。

冷却系

次に冷却系について述べる。極低温プローブはコイル空間が排気されてからヘリウムガスで数十～100 K程度の温度に冷却された後使用される。運転開始時のみ高純度ヘリウムガスが必要である (運転中ヘリウムは消費されない)。冷凍機にはGM冷凍機 (Gifford-McMahon cooler; ギフォード・マクマホン冷凍機) などが使用される。また数十 Kで動作させる場合、冷凍機を冷却するウォーターチラーが必要であり、そのチラーの室外機 (家庭用エアコン室外機と理屈は同じだが大きさはもう少し大きい) を設置する必要がある。一度冷却された後は基本

的に運転し続けることになる。万が一停電になった時は、冷凍機の消費電力が大きいため無停電電源装置などでバックアップするのは事実上無理なので、やむなく運転を停止することになるが、その際のバルブの操作用に圧縮空気のボンベが必要な場合がある。また冷却後はコイル空間に付着したガスを叩き出す (追い出す) のに普通のNMRのRFパルスを使う場合もある。

コイルを冷却したガスが循環系の帰り道に前置増幅器 (preamplifier、プリアンプ) を冷却する。この種の前置増幅器を冷却前置増幅器 (cryopreamplifier) と呼ぶ。コイルを冷却するのみならず前置増幅器を冷却することでS/Nの増大が期待できる。もっともポピュラーな溶液用極低温プローブである、 $^1\text{H}-\{^{13}\text{C}\cdot^{15}\text{N}\}$ プローブは、以前は、 ^1H チャンネルのみ冷却前置増幅器を装着していたが、その後、 ^{13}C のチャンネルも装着したものが現れた。極低温プローブの場合、室温プローブと比べプローブ交換が面倒なので、溶液実験では ^{13}C 直接観測の実験であってもプローブ交換をせずに測定することは珍しくない。内側にコイルがある場合に比べると感度が低い、 ^{13}C チャンネルに冷却前置増幅器を装着することで感度の低下を最小限に抑えること

ができる。

電気系

極低温プローブは通常の室温プローブと比べ、送受信コイルと前置増幅器が冷却されているのが大きく異なる。コイルの温度を T_c 、冷却前置増幅器のノイズ温度を T_a とすると^{*13}、S/Nは

$$S/N \propto \sqrt{\frac{1}{(T_c + T_a)}}$$

の関係がある。送受信コイルと前置増幅器が低温になったことでノイズが減る。加えて、コイルの持つ電気抵抗が減ることに起因するQ値 (Quality factor, Q-factor) の向上によってもS/Nが向上する。それ以外に、前置増幅器が冷却前置増幅器となったために、前回述べた受送信を切り替えるT/Rスイッチ (デュプレクサ, duplexer) をプローブ筐体内に収納しないといけなくなった^{*14}。前置増幅器はノイズの少ないものを使い可能な範囲、検出コイル=アンテナの近傍に置くのが電子工学の教えるところであるので、このデザインは大変理にかなっているといえよう。

最後に

今回はプローブについて述べたが、溶液の話ばかりになってしまい大変申し訳なく思う次第である。次回は受信系の続きについて解説させていただく。

本稿執筆にあたり、編集委員長の防衛大学校浅野敦志教授、編集委員の名古屋工業大学吉水広明准教授に大変ご心配とご迷惑をおかけしました。陳謝いたし、感謝いたします。またJEOL RESONANCEの同僚たち、特に中井利仁博士には「読みやすい原稿作成の点で」協力を仰ぎました。深く感謝いたします。

^{*1} どうしても視点が筆者の専門である溶液NMRに偏ってしまい恐縮である。

^{*2} homogeneity. どういうわけか、不均一度 inhomogeneity という言葉もよく登場する。

^{*3} 通常の溶液NMR用の試料管は「いわゆる試験管の形」をしている。それに対し、この対称型の試料管は、試料管が内管と外管に分かれ、外管の中に液体試料と内管を挿入して使用する。外管が試料上部にいわばガラスの「蓋」をする。そして外管の底の部分は厚く、外管の内側外側ともに平らになっている。加えて、溶媒とガラスの磁化率が完全に一致していることが理想的である。通常の試料管では、試料管下から上に向かって、ガラス→試料→空気という順に並んでいるものが、この対称型のセルではガラス→試料→ガラスと並ぶ。一

般に、標準的な溶剂量より少なく液中高が短いと、通常の試料管においては分解能調整が非常に困難になる。それに対し対称型のセルにおいては通常の試料管の場合よりも分解能調整が容易である。そのため、使用する溶液の量を減らすことができる。

^{*4} 細いセルは繊細で扱いに細心の注意が必要であるので、筆者は正直苦手である。

^{*5} さらに操作が難しい。老眼の私の眼にはつらい。

^{*6} 「多くの場合」と書いたのには訳があり、同調が浅いプローブで、試料とくに溶液測定の場合溶媒を変更しても同調点から大きくずれず、特にチューニングやマッチングの作業が不要なプローブ (やプローブ内の特定のコイル) が存在したりする。こういったものは例外であって、基本的に自動であれ手動であれ、チューニングが必要なプローブでは、以下の目的でチューニングとマッチングの作業が絶対必要である：1) パワーアンプからのパルスロスなく試料に伝える、2) プローブから得られる微弱なNMR信号を効率よく得る。3) パワーアンプからの出力がプローブから反射し反射波として経路上のデバイスを破損するのを防ぐ。インピーダンス整合を取るという。パワーアンプ側から見たプローブ側の回路のインピーダンスが予期された値 (必ずしも50Ωである必要はないが通常50Ω) に合っていないと反射波が発生する。特に、強いパワーを使うような実験でチューニングがあてないと、3) の反射波がプローブ内部の回路や経路上のデバイスを破壊することは珍しいことではない。したがって、新しいサンプルをプローブにセットしたら必ずチューニングをする癖をつけておかないといけない。具体的には、送信系から微弱な単一周波数のCW (Continuous Wave; 連続波) か掃引波をあて、まず C_T (Tuning Capacitor) を変化させて、反射が最低になるポイントを探す。次に、 C_M (Matching Capacitor) を動かし、さらに反射が小さくなる場所を探す。これを数回繰り返してもっとも反射が少なくなる場所を探す。掃引波が出力されネットワークアナライザやスペクトラムアナライザのような周波数特性が表示されるような機能があると、同調が深くなる方向がわかりやすいので非常にやりやすい。また以下に述べるような、複数の核種のパルスを同時に打つことが出来るようなプローブの場合、チューニングが必要なチャンネルそれぞれのチューニング、マッチングが必要である。チューニングマッチングについてはチャンスがあればまた別の機会に述べたい。

^{*7} 極めて雑な比較だが、内側にコイルがある場合と外側にコイルがある場合、概ね2倍程度感度が違う。

^{*8} 溶液をメインで測定する装置の場合、当該装置で通常もっとも頻繁に測定されている実験において直接観測する核が内側のコイルになるようにプローブを選択する人が多い。ただ、あくまでも「もっとも頻繁に行う実験」であって、必ずしも最適な感度を得ることが期待できると考えられるプローブに交換しないことも珍しいことではない。測定をオートで流すためにはプローブ交換は避けなければならない、オートでなくともプローブ交換はケーブルの脱着交換などそれなりに手間と時間もかかる。

^{*9} 内側のコイルを{|}の外、外側のコイルを{|}の中に書く。またロック用の 2H は書かない。

^{*10} プローブのチューニングが取れない、などと言ってメーカーに宅配便でプローブを送り返し、その後挿入するスティックを間違えていたことに気付くような初歩的なミスをするとは非常に恥ずかしい。

^{*11} シムコイルの Z_1 を時間変動させる。このことでZ方向の磁場勾配パルスを発生させることができる。磁場勾配パルスはプローブ内のFGコイルで発生するが、それに対しホモスポイルプローブと磁石の間にある室温シムコイルの電流値を一時的に変化させ発生させる。一般

的に、FGコイルはField recoveryがシムコイルより短く、また符号を正負反転することができるが、ホモスポイルは通常同じ符号のみである。そのため、ホモスポイルを使ったFGシミングの場合、イメージングでいうところのSpin Echoシーケンスが使われる。それに対し、FGコイルを使ったFGシミングの場合、イメージングでいうところのGradient Echoシーケンスが使われることが多い。イメージング関連についてはチャンスがあれば別途述べたい。

*¹²実際に砂が使用されているわけではなく、重量のある砂状の物体。砂鉄は鉄、つまり磁性体なので、砂が砂鉄を含むと非常に都合が悪い。

*¹³抵抗の雑音電圧 V_n を温度 T_a で表したもので、

$$V_n = \sqrt{4kT_aRB}$$
 の関係で表される。ここで k : Boltzmann 定数、 R : 抵抗、 B : 帯域である。

*¹⁴そのため、冷却前置増幅器を搭載しているチャンネルは、パルスを入れる入力用のポートと、信号を取り出す出力用のポート2つ必要になった。

引用文献

- [1] 根本暢明 (2014) NMRのハードウェアに関するメモ 1. 送信系について. *Bulletin of Nuclear Magnetic Society of Japan*, **5**, 16-31.
- [2] Takahashi, S. & Nagayama, K. (1988) A novel NMR microcell with symmetric geometry. *Journal of Magnetic Resonance*, **76** (2), 347-351. doi:10.1016/0022-2364 (88) 90119-9.
- [3] <http://www.wilmad-labglass.com/>. (2016.10.5確認)。

- [4] Frydman, L., Scherf, T., Lupulescu, A. (2002) The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99** (25), 15858-15862. doi: 10.1073/pnas.252644399.
- [5] Mattiello, D. L., Warren, W. S., Mueller, L., Farmer, B. T. (1996) Minimizing the Water Resonance in Biological NMR: Characterization and Suppression of Intermolecular Dipolar Interactions by Multiple-Axis Gradients. *Journal of American Chemical Society*, **118** (113), 3253-3261. doi: 10.1021/ja953186o.
- [6] <http://www.j-resonance.com/topics/ultracool/> (2016.8.25確認).; Kovacs, H., Moskau, D., & Spraul, M. (2005) Cryogenically cooled probes—a leap in NMR technology, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **46** (2), 131-155. doi: 10.1016/j.pnmrs. 2005.03.001. Mizuno, T., Hioka, K., Fujioka, K., & Takegoshi, K. (2008) Development of a magic-angle spinning nuclear magnetic resonance probe with a cryogenic detection system for sensitivity enhancement. *Review of Scientific Instruments*, **79**, 044706. doi: 10.1063/1.2912946.; Styles, P., Soffe, N. F., Scott, C. A., Cragg, D. A., Row, F., White, D. J. & White, P. C. J. A. (1984) High-Resolution NMR Probe in Which the Cell Coil and Preamplifier Are Cooled with Liquid Helium. *Journal of Magnetic Resonance*, **60** (3), 397-404. doi:10.1016/0022-2364 (84) 90050-7.



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

クラシック音楽鑑賞 (特にCDやハイレゾデータの蒐集)、国内J社の飛行機に乗りマイルを集めること。

Gタンパク質共役受容体のNMRによる解析の現状と展望

Biozentrum, University of Basel

磯貝 信

shin.isogai@unibas.ch

はじめに

Gタンパク質共役受容体 (GPCR) は光、神経伝達物質、におい、味、ホルモン、フェロモンなどさまざまな外部刺激の認識とその伝達を担う膜タンパク質受容体である。GPCRはヒト遺伝子上におよそ800遺伝子以上コードされており、環境刺激に対する細胞内または細胞間 (ケモカイン等) シグナル伝達応答の重要な起点であるとともに、薬学上重要なターゲットである。近年の結晶構造解析の飛躍的發展により、この受容体クラスの基本アーキテクチャおよび活性化状態など多くの基本的な構造情報が明らかにされた。しかし、GPCRはその揺らぎのある構造により、結晶構造では見ることのできない機能制御機構を持つと考えられている。このことから、NMRでの詳細な動態解析が期待されている。本レビューではGPCR研究におけるNMR法利用の課題と、限られてはいるもののNMRによってこれまでに明らかにされたGPCRの動態についてまとめ、この分野の発展の方向性について解説する。なお、本稿ではロドプシン以外の化学物質受

容GPCRを取り扱うこととしたい。ロドプシン研究分野は古細菌、非脊椎動物、オプトジェネティックス、各種分光法での解析など、かなり広大な研究分野であり、筆者にはそれらの詳細な解説を行うことは荷が重い。他の優れた総説を参照いただきたい^[1]。

GPCR とは

GPCRは7回膜貫通型受容体である。GPCRにより認識された外部刺激は限られた数の細胞内シグナル共役因子である三量体型Gタンパク質およびβ-アレスチンに伝達され、さらに下流のエフェクター分子にシグナルが受け渡される (図1)。興味深いことに、GPCRが外部刺激を認識した際の活性化レベルは薬剤の作用強度により変化する。また、受容体は薬剤の性質により、それぞれ一定のシグナル伝達経路をより強く刺激するという、シグナル偏重 (biased-signaling) の性質を持つ。目下のGPCR構造解析研究における疑問はこれらプロセスがどのように制御されているのかという点に集約さ

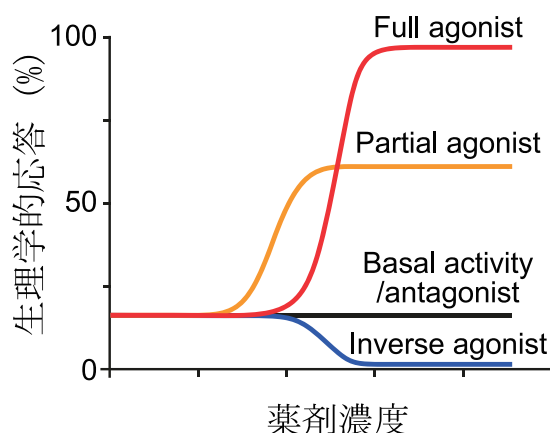
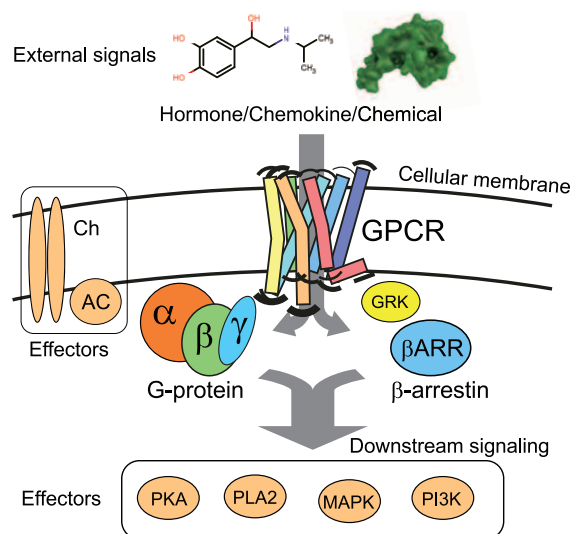


図1 GPCRのシグナリング

左: GPCRは細胞外シグナルを認識し、細胞内へとシグナルを伝える。Gタンパク質やβ-アレスチンなどの細胞内シグナリング分子を選択的に結合することでさまざまな下流エフェクター分子の活性化を引き起こす。右: 生理学的応答の強度は薬剤の作用強度により変化する。また、アポ状態での受容体の活性が認められる。

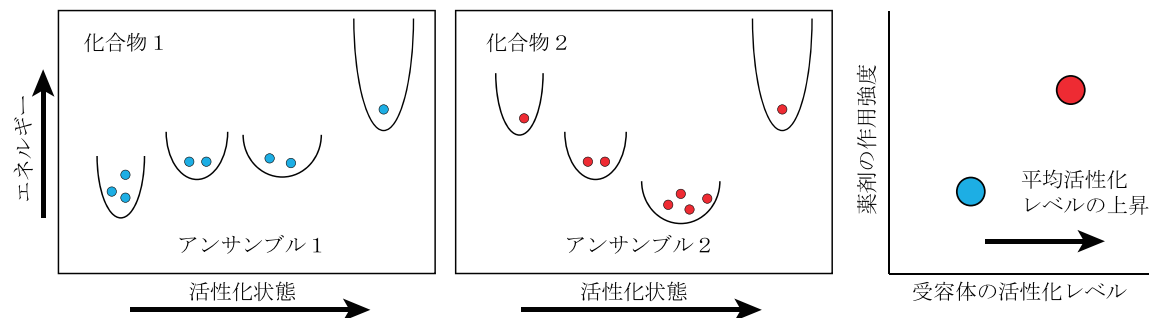


図2 活性化状態の占有とアンサンブルの活性化レベル

GPCRの活性化レベルは幾つかの構造状態を占有するアンサンブルとして考えられ、全体として、低い活性化状態の占有率が高い場合（青）と高い活性化状態の占有率が高い場合（赤）では、赤のアンサンブル状態の平均の活性化レベルが高い。これらは各活性化状態のエネルギーがリガンドにより上下することにより達成される。

れる。近年の種々のX線結晶構造解析法、特に膜タンパク質のメゾ相結晶化法^[2]、点変異による熱安定化法^[3]等により、GPCRの立体構造解析は大きく進歩した^[4]。それらの情報は受容体のみならず、受容体-三量体Gタンパク質複合体^[5]や β -アレスチン複合体^[6]など個々の活性化状態の形を理解する上で大きく役立っている。しかしながら、結晶構造は化学平衡のある安定状態のスナップショットであることから、これまでのところ受容体がどのように選択的制御を受けるのかを理解するには至っていない。例えば、拮抗薬と作動薬のそれぞれに結合したアドレナリン受容体の結晶構造はほぼ完全に重なり (rmsd, $<1\text{\AA}$)、作動薬の作用強度の違いをGPCRの結晶構造の違いから説明することは困難である。

ロドプシンとロドプシン様 GPCR

本稿で取り扱うGPCRは主にロドプシン様GPCRに属する。この種のGPCRはおよそ800のヒトGPCR遺伝子のうち、約600を占める（うち半数以上は嗅覚受容体^[7]）。その名の通り、これらのGPCRはロドプシンに似た一次配列のドメイン構造を持ち、細胞外にあるアミノ末端および細胞内にあるカルボキシル末端が短く、細胞外・細胞内ドメインを特には持たないことを特徴とする。ロドプシンとの主な違いはその活性化ステップの制御システムの違いにある。ロドプシンは補因子レチナールの*cis-trans*異性化により活性状態の切り替えが明確に行なわれ、定常状態でのGタンパク質複合体へのシグナル活性が強く押さえられている^[8]。一方で、ロドプシン様受容体の一つであって化学物質受容体のアドレナリン受容体などは、不活性状態において、ロドプシンの活性化中間体のMI、MII状態に似通った構造をとり、定常状態（例えばアポ状態）

におけるシグナル活性が認められると示唆されている^[9]。この半活性化状態はこれらのGPCRの揺らぎの大きい動態の理由の一つであり、また、GPCRの試料としての不安定な性質にも寄与している。

GPCR 解析における NMR の役割

このようなGPCRの構造の揺らぎはその機能に不可欠であり、そのダイナミクスはNMRによる解析対象として最適である。しかし、この揺らぎが重要であるという性質は特に溶液NMRでは諸刃の剣となる。試料の作成法、安定性、生体膜を模倣する系の選択、共鳴シグナルの交換による線形の広がりなど、実際の測定を行う上での困難は尽きない。このことから、 ^{13}C メチル基、 ^{19}F ラベル等の選択的・特異的側鎖標識を用いた R_2 緩和条件の好ましい手法の利用が主流である^[10~13]。無論、これらの標識法により得られる情報は空間的に構造上の観察可能な位置に限られ、ダイナミクスの時間軸においても限られている。しかし一方でこの方法は、大腸菌発現系に強く依存しない安定同位体標識試料の調製を可能にし、比較的低い濃度での解析も可能となるなど利点も多い。こうしたことから、GPCRのNMR解析は生理学現象を解析するための手法として、生理学、X線結晶構造解析および分子動力学(MD)によって得られた詳細かつ部位特異的なアロステリックモデルの証明に、より生物現象に近い形であると理解され、取り入れられている^[14]。

これらの例として、最も解析が進んでいる、 β_2 -アドレナリン受容体でわかっていることの要点をまとめる。6番目の膜貫通ヘリックス(TM6)の構造変化からなる、およそ4つの構造状態を示す ^{19}F プローブの共鳴シグナルが観察できる。そしてその各状態の占有率が変化することで作用強度に応じた異なる受容体の活性化レベルを実現していると

考えられている^[15](図2)。また、完全な活性化にはGタンパク質が必要であることがわかっている^[12]。しかし、今のところ活性を定義する構造状態の数と、その間の交換速度に関しては、一定の見解が得られていない。原因は、これらの解析に主に用いられてきた¹⁹F標識官能基の性質の違いと界面活性剤の化学交換速度の違いに起因していることが示されている^[15,16]。特に界面活性剤は受容体の化学交換速度、つまり揺らぎの強さに寄与しており、今後の解析において、より良い生体膜模倣系を確立する必要性を強く示唆している。

現在、多くのNMRによる解析はDrorによる長時間MD解析によって提唱された、緩く共役したアロステリー (loosely-coupled allostery) をモデルとし進められている^[17]。これは β_2 -アドレナリン受容体とGタンパク質複合体による受容体の活性化状態がGタンパク質を取り除くことで不活性構造に緩和・遷移する際に、GPCRで高く保存された側鎖相互作用部位が各々のコンフォメーション変化に依存的に次第に不活性状態に至ることを示した報告である。本モデルでは要するに、受容体の中に異なるアロステリック機構が共存しており、各アロステリック部位の間がネットワークを形成し、その共役が緩いために、各ネットワークのON/OFF状態の組み合わせにより多数のコンフォメーションを取

ることが可能になることを示している(図3左)。前述のNMR解析による作用強度と関連した基底状態の占有率の変化の観測はこのモデルを支持している。

また、現在多くの報告で、受容体を二つの剛体として表すモデルがよく見られる(図3右)^[14]。これは細胞外リガンド結合部位と細胞質側のアロステリック共役の様子、リガンドによる受容体の活性化、Gタンパク質結合の誘起および、Gタンパク質結合によるアゴニスト選択的な結合能上昇の様子をよく表現している。しかし、このモデルでは、シグナル偏重のような選択性を伴う系がどのように制御されているのかを捉えきれていない。我々は、 β_1 -アドレナリン受容体について主鎖アミド化学シフト摂動と点変異を組み合わせることによってNMR解析をおこなったところ、受容体が局所的な強い共役を示す箇所があることを示すことができた^[18]。今後、モデルの完全な証明には各々の共役系内でのON/OFF状態の化学交換速度の比較や、実際のシグナル経路に重要な相互作用の解明など、さらに詳細な研究が望まれる。

今後の GPCR 分野の発展と課題

GPCR分野の解析対象およびその目的は非常にはっきりしている。しかしながら、この分子の取り

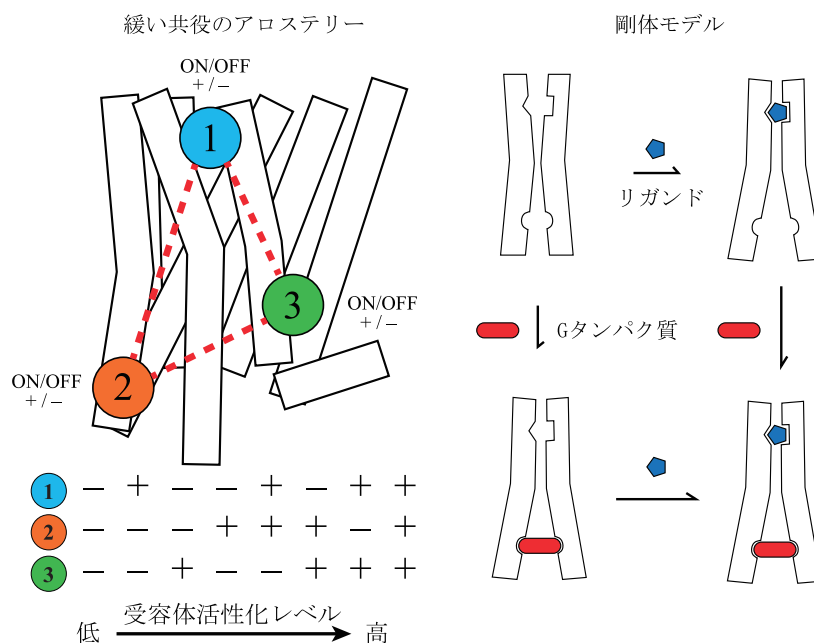


図3 2つのアロステリーモデル

左：緩い共役のアロステリー。3つの構造部位のON/OFFがまったく共役していない場合、合計8つの活性化状態が発生する。また、完全に共役している場合、一斉にON/OFFとなり、2状態しか発生しない。GPCRはこの二つの場合の間であると考えられている。右：最もシンプルな剛体モデル。外部のリガンドとGタンパク質の受容体への相互作用が右下の三者複合体への移行を促進し、相乗効果をもたらす。しかし、このモデルではリガンド・Gタンパク質・ β -アレスチンの結合選択性をモデル化できない。

扱いはたくさんの困難が伴い、多くの優れた研究者がその解決への努力を続けている。それでは、実際、NMRにより解析を進めていくのに当たり、どのような問題があり、今、どのような解決法が示されているのかを解説していきたいと思う。

生体膜の模倣系

極めて数少ない例^[19]を除き、これまでにGPCRの解析は界面活性剤によるミセル条件下において行われてきた。界面活性剤ミセルは、生体膜とは異なり、球状の一重膜を形成することで、膜タンパクの疎水性表面を水溶媒から隔離する。生体膜は二重膜を形成するため、膜タンパク質周辺の機械的性質が異なる。さらに、用いられる界面活性剤によっては電荷等の化学的な環境も異なる。そのためGPCRに代表される、動的な構造変化がその機能に密接な関係を持つ系では、このような周辺環境の違いは大きな問題となる。また、溶液NMRの測定分子量限界から、多くの場合短鎖(7–10)の界面活性剤を使用することになり、その際にはターゲットGPCRが不安定化するため、多くの場合測定することができない。近年では、amphipol^[20]、MNG (Maltose Neopentyl Glycol) 界面活性剤^[21]等の開発によりそれぞれ、ミセルのサイズの極小化および、タンパク質の安定性の向上が図られている。また、高密度リボタンパク質複合体から開発されたナノディスク^[22, 23]を用いて、脂質二重膜からなるディスク上の膜画分ユニットに膜タンパク質を取り入れる方法が近年盛んに用いられており、ナノディスクに埋め込まれたGPCRのシグナル観測はメチル¹³C標識法ですでに達成されている^[19]。また、ナノディスク試料では、遊離の界面活性剤による可溶タンパク質(Gタンパク質など)の凝集・不安定化を防ぐことができる^[24]。また、固体NMRでは生体膜および脂質二重膜そのものを使うことができるため、前述のような界面活性剤依存的な化学交換速度の変化などの、生体膜の模倣系によるアーティファクトの影響が少ない。

タンパク質発現系と安定化

試料の短鎖界面活性剤ミセル下での測定は点変異を用いてタンパク質の熱安定性の上昇もしくはコンフォメーションの固定化を狙った手法(thermostabilization, conformational stabilization)により、可能になる^[3, 25]。タンパク質の安定化は測定上の利益のみならず、タンパク質発現においても

一定の効果を示すようである。従来GPCRの発現は最低、昆虫細胞発現系を必要としてきた。しかし、点変異を用いることで大腸菌においてその安定性を向上するdirected-evolution法によって安定化されたニューロテンシン受容体は、マルトース結合タンパク質(MBP)発現タグとの組み合わせにより大腸菌での発現が可能であることが示されている^[26]。これにより重水素化などの標識法を使用することもできる。このようなコンフォメーションの安定化はTateらにより盛んに用いられている^[27]が、コンフォメーションの安定化の結果、GPCRは活性を失っていくことが示されている^[28]。しかし、この手法は活性化機構を観察する上では障害となるものの、比較的良い解像度でのリガンド結合部位の構造決定を可能にする^[29]ことから、拮抗薬等の薬剤の開発には最適の方法である。また、我々の解析においては、安定化されたGPCRにおいても活性化に関連するコンフォメーション変化が観察されることが示されている^[18]。しかしながら、点変異により得られた安定性が、他のオリジナルの野生型配列で高い熱安定性を示す受容体とどのように違うのかは現在のところ不明である。今後、より多くの受容体を解析する上では、その配列の熱安定性にかかわらず、すべての野生型受容体を安定同位体標識する方法が望ましい。2015年、Gosser^[30]並びに我々のグループ^[31]から、昆虫細胞系におけるタンパク質の重水素化を含めた実験室系で現実的なスケールでの安定同位体標識法が発表されており、GPCRを含む大腸菌では発現が難しいタンパク質安定同位体試料の作成が可能となった(図4)。また、無細胞発現系における膜タンパク質の発現も可能になり^[32]、NMRに最適なGPCR試料の作成は、近年比較的容易になってきている。

NMR装置および測定法

溶液NMRはタンパク質の溶液条件下での動態を観察できる点ですぐれている。しかし、その測定可能分子量の限界から、膜タンパク質解析においてはかなり大きな制限を受けてきた。実際、我々が示したバリリン選択標識受容体の主鎖アミドNMR解析では、短鎖界面活性剤ミセルを用いて分子量を抑えたのにもかかわらず、通常の実験室の設備では発現系と測定時間の制約やタンパク質の安定性から、2次元HSQCを計測するのが限界であり、高度なパルス系列を適用するには至っていない。前述の通り、これはサイズおよび構造の交換による激し

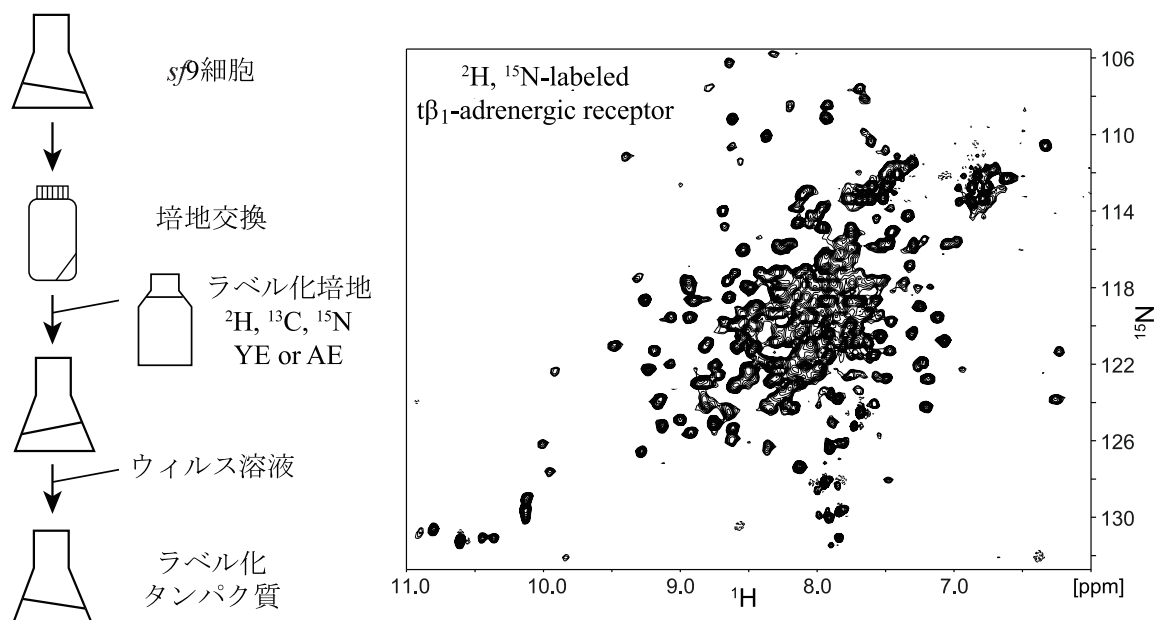


図4 GPCRの解析に向けた手法の開発例：昆虫細胞発現系での安定同位体標識

左：昆虫細胞発現系を用いた安定同位体標識法の大まかな流れ。YE：酵母抽出液、AE：藻類抽出液。右：昆虫細胞発現系を用いて作成した重水素化、 ^{15}N 標識 β_1 -アドレナリン受容体の $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ TROSY スペクトル。

い R_2 緩和に起因するため、過重水素化 (100%に近い重水素化) のみでのスペクトルの改善では不十分であることが予測できる。また、大腸菌発現系以外を用いたタンパク質の過重水素化は困難である。このことから、Wagner、嶋田らにより ^{15}N の非常に鋭い線形を X 核直接観測により使用する方法が提唱されている。この手法では GHz を超える磁場での更なる感度の向上や重水素化を必要としないなど他の利点が挙げられる^[33, 34]。今後、パルス系列および標識法の最適化により、どのように対プロトン核 100 倍比もの磁気モーメントの違いによるシグナル低下を補っていくのか、また、直接観察プローブへの高価な NMR インフラの移行など、一般のユーザーに浸透していくまでに幾つかの問題はあるものの、非常に期待される技術である。一方で、高速 MAS を利用した固体 NMR はこの 10 年でめざましい発展を遂げ、現在では常温プローブを用いた溶液 NMR のシグナル強度に迫ってきている^[35]。この手法は GPCR を含め、生体高分子の構造決定^[36] およびダイナミクス解析^[37] に十分利用することができる。加えて、昨今の低温電子顕微鏡での構造解析との相性が良く、電子顕微鏡と固体 NMR のハイブリッド法を用いた研究が進んでいる^[38]。固体 NMR による GPCR の解析はこの先多く見られるはずである。

終わりに

GPCR は薬剤開発のターゲットとして非常に有効

であり、たくさんの研究者が医学的な観点からその理解を目指して研究を行っている。特に NMR 分野においては、その構造の揺らぎ制御機構が重要であり、それが結晶構造解析では観察することができない系であることから、注目が集まっている。しかし、その非常に困難な性質は、我々 NMR 研究者に更なるイノベーション (試料の作成法、測定法および装置) を要求している。2016 年 8 月に開催された京都での ICMRBS 2016 においては、締めくくりの Wagner による講演を含め、多くの GPCR 研究の報告がされ、我々 NMR 研究者の地道な努力が無駄ではなく、着実に分野の発展に貢献していると感じられた。筆者も GPCR の研究を通じて、今後、タンパク質 NMR 分野全体の発展に貢献していきたいと考えている。

- [1] O.P. Ernst, D.T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L.S. Brown, H. Kandori, Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms, *Chem. Rev.* **114** (2014) 126-163. doi:10.1021/cr4003769.
- [2] M. Caffrey, D. Li, A. Dukkupati, Membrane Protein Structure Determination Using Crystallography and Lipidic Mesophases: Recent Advances and Successes, *Biochemistry*. **51** (2012) 6266-6288. doi:10.1021/bi300010w.
- [3] C.G. Tate, G.F. Schertler, Engineering G protein-coupled receptors to facilitate their structure determination, *Current Opinion in Structural Biology*. **19** (2009) 386-395. doi:10.1016/j.sbi.2009.07.004.
- [4] E. Ghosh, P. Kumari, D. Jaiman, A.K. Shukla, Methodological advances: the unsung heroes of the

- GPCR structural revolution, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **16** (2015) 69-81. doi:10.1038/nrm3933.
- [5] S.G.F. Rasmussen, B.T. DeVree, Y. Zou, A.C. Kruse, K.Y. Chung, T.S. Kobilka, et al., Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex, *Nature*. **477** (2011) 549-555. doi:10.1038/nature10361.
- [6] Y. Kang, X.E. Zhou, X. Gao, Y. He, W. Liu, A. Ishchenko, et al., Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser, *Nature*. **523** (2015) 561-567. doi:10.1038/nature14656.
- [7] R.C. Stevens, V. Cherezov, V. Katritch, R. Abagyan, P. Kuhn, H. Rosen, et al., The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function, *Nat Rev Drug Discov.* **12** (2012) 25-34. doi:10.1038/nrd3859.
- [8] P.S.H. Park, D.T. Lodowski, K. Palczewski, Activation of G protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **48** (2008) 107-141. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094630.
- [9] X. Deupi, Relevance of rhodopsin studies for GPCR activation, *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. **1837** (2014) 674-682. doi:10.1016/j.bbabi.2013.09.002.
- [10] J.J. Liu, R. Horst, V. Katritch, R.C. Stevens, K. Wüthrich, Biased signaling pathways in β_2 -adrenergic receptor characterized by 19F-NMR, *Science*. **335** (2012) 1106-1110. doi:10.1126/science.1215802.
- [11] R. Nygaard, Y. Zou, R.O. Dror, T.J. Mildorf, D.H. Arlow, A. Manglik, et al., The Dynamic Process of β_2 -Adrenergic Receptor Activation, *Cell*. **152** (2013) 532-542. doi:10.1016/j.cell.2013.01.008.
- [12] A. Manglik, T.H. Kim, M. Masureel, C. Altenbach, Z. Yang, D. Hilger, et al., Structural Insights into the Dynamic Process of β_2 -Adrenergic Receptor Signaling, *Cell*. **161** (2015) 1101-1111. doi:10.1016/j.cell.2015.04.043.
- [13] Y. Kofuku, T. Ueda, J. Okude, Y. Shiraishi, K. Kondo, M. Maeda, et al., Efficacy of the β_2 -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region, *Nature Communications*. **3** (2012) 1045. doi:10.1038/ncomms2046.
- [14] A. Manglik, B. Kobilka, The role of protein dynamics in GPCR function: insights from the β_2 AR and rhodopsin, *Current Opinion in Cell Biology*. **27** (2014) 136-143. doi:10.1016/j.ceb.2014.01.008.
- [15] T.H. Kim, K.Y. Chung, A. Manglik, A.L. Hansen, R.O. Dror, T.J. Mildorf, et al., The role of ligands on the equilibria between functional states of a G protein-coupled receptor, *Journal of the American Chemical Society*. **135** (2013) 9465-9474. doi:10.1021/ja404305k.
- [16] K.Y. Chung, T.H. Kim, A. Manglik, R. Alvares, B.K. Kobilka, R.S. Prosser, Role of detergents in conformational exchange of a G protein-coupled receptor, *Journal of Biological Chemistry*. **287** (2012) 36305-36311. doi:10.1074/jbc.M112.406371.
- [17] R.O. Dror, D.H. Arlow, P. Maragakis, T.J. Mildorf, A.C. Pan, H. Xu, et al., Activation mechanism of the β_2 -adrenergic receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108** (2011) 18684-18689. doi:10.1073/pnas.1110499108.
- [18] S. Isogai, X. Deupi, C. Opitz, F.M. Heydenreich, C. J. Tsai, F. Brueckner, et al., Backbone NMR reveals allosteric signal transduction networks in the β_1 -adrenergic receptor, *Nature*. **530** (2016) 237-241. doi:10.1038/nature16577.
- [19] Y. Kofuku, T. Ueda, J. Okude, Y. Shiraishi, K. Kondo, T. Mizumura, et al., Functional Dynamics of Deuterated β_2 -Adrenergic Receptor in Lipid Bilayers Revealed by NMR Spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2014). doi:10.1002/anie.201406603.
- [20] C. Tribet, R. Audebert, J.L. Popot, Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions, *P Natl Acad Sci Usa*. **93** (1996) 15047-15050.
- [21] P.S. Chae, S.G.F. Rasmussen, R.R. Rana, K. Gotfryd, R. Chandra, M.A. Goren, et al., Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins, *Nat Meth.* **7** (2010) 1003-1008. doi:10.1038/nmeth.1526.
- [22] I.G. Denisov, Y.V. Grinkova, A.A. Lazarides, S.G. Sligar, Directed Self-Assembly of Monodisperse Phospholipid Bilayer Nanodiscs with Controlled Size, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 3477-3487. doi:10.1021/ja0393574.
- [23] F. Hagn, M. Etzkorn, T. Raschle, G. Wagner, Optimized Phospholipid Bilayer Nanodiscs Facilitate High-Resolution Structure Determination of Membrane Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013) 1919-1925. doi:10.1021/ja310901f.
- [24] C. Yoshiura, Y. Kofuku, T. Ueda, Y. Mase, M. Yokogawa, M. Osawa, et al., NMR Analyses of the Interaction between CCR5 and Its Ligand Using Functional Reconstitution of CCR5 in Lipid Bilayers, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 6768-6777. doi:10.1021/ja100830f.
- [25] P. Egloff, M. Hillenbrand, C. Klenk, A. Batyuk, P. Heine, S. Balada, et al., Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in Escherichia coli, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **111** (2014) E655-62. doi:10.1073/pnas.1317903111.
- [26] C.A. Sarkar, I. Dodevski, M. Kenig, S. Dudli, A. Mohr, E. Hermans, et al., Directed evolution of a G protein-coupled receptor for expression, stability, and binding selectivity, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105** (2008) 14808-14813. doi:10.1073/pnas.0803103105.
- [27] N. Vaidehi, R. Grisshammer, C.G. Tate, How Can Mutations Thermostabilize G-Protein-Coupled Receptors? *Trends Pharmacol. Sci.* **37** (2016) 37-46. doi:10.1016/j.tips.2015.09.005.
- [28] J.G. Baker, R.G.W. Proudman, C.G. Tate, The pharmacological effects of the thermostabilising (m23) mutations and intra and extracellular (β_36) deletions essential for crystallisation of the turkey β -adrenoceptor, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **384** (2011) 71-91. doi:10.1007/s00210-011-0648-4.
- [29] J.L. Miller-Gallacher, R. Nehmé, T. Warne, P.C. Edwards, G.F.X. Schertler, A.G.W. Leslie, et al., The 2.1 Å Resolution Structure of Cyanopindolol-Bound β_1 -Adrenoceptor Identifies an Intramembrane Na⁺ Ion that Stabilises the Ligand-Free Receptor, *PLoS ONE*. **9** (2014) e92727. doi:10.1371/journal.pone.0092727.
- [30] A. Sitarska, L. Skora, J. Klopp, S. Roest, C. Fernández,

- B. Shrestha, et al., Affordable uniform isotope labeling with ^2H , ^{13}C and ^{15}N in insect cells, *J. Biomol. NMR.* **62** (2015) 191-197. doi:10.1007/s10858-015-9935-6.
- [31] C. Opitz, S. Isogai, S. Grzesiek, An economic approach to efficient isotope labeling in insect cells using homemade ^{15}N -, ^{13}C - and ^2H -labeled yeast extracts, *J. Biomol. NMR.* **62** (2015) 373-385. doi:10.1007/s10858-015-9954-3.
- [32] R.-B. Rues, V. Dötsch, F. Bernhard, Co-translational formation and pharmacological characterization of beta1-adrenergic receptor/nanodisc complexes with different lipid environments, *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* **1858** (2016) 1306-1316. doi:10.1016/j.bbamem.2016.02.031.
- [33] K. Takeuchi, H. Arthanari, I. Shimada, G. Wagner, Nitrogen detected TROSY at high field yields high resolution and sensitivity for protein NMR, *J. Biomol. NMR.* **63** (2015) 323-331. doi:10.1007/s10858-015-9991-y.
- [34] K. Takeuchi, H. Arthanari, M. Imai, G. Wagner, I. Shimada, Nitrogen-detected TROSY yields comparable sensitivity to proton-detected TROSY for non-deuterated, large proteins under physiological salt conditions, *J. Biomol. NMR.* **64** (2016) 143-151. doi:10.1007/s10858-016-0015-3.
- [35] J.M. Lamley, D. Iuga, C. Öster, H.-J. Sass, M. Rogowski, A. Oss, et al., Solid-State NMR of a Protein in a Precipitated Complex with a Full-Length Antibody, *J. Am. Chem. Soc.* **136** (2014) 16800-16806. doi:10.1021/ja5069992.
- [36] S.H. Park, B.B. Das, F. Casagrande, Y. Tian, H.J. Nothnagel, M. Chu, et al., Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers, *Nature.* **491** (2012) 779-783. doi:10.1038/nature11580.
- [37] D.B. Good, S. Wang, M.E. Ward, J. Struppe, L.S. Brown, J.R. Lewandowski, et al., Conformational Dynamics of a Seven Transmembrane Helical Protein Anabaena Sensory Rhodopsin Probed by Solid-State NMR, *J. Phys. Chem. A.* **136** (2014) 2833-2842. doi:10.1021/ja411633w.
- [38] L. Sborgi, F. Ravotti, V.P. Dandey, M.S. Dick, A. Mazur, S. Reckel, et al., Structure and assembly of the mouse ASC inflammasome by combined NMR spectroscopy and cryo-electron microscopy, *P Natl Acad Sci Usa.* **112** (2015) 13237-13242. doi:10.1073/pnas.1507579112.



磯貝 信 (いそがい・しん)

2006年 京都大学大学院 農学研究科食品生物科学専攻 修士課程 修了

2006年 京都大学大学院 工学研究科分子工学専攻 博士課程
博士課程の所定の単位を修得のうえ退学

2009年 京都大学・キャノン協働研究プロジェクト 研究員

2010年 博士(工学)の学位取得

2010年 京都大学・キャノン協働研究プロジェクト 博士研究員

2012年 スイス連邦 バーゼル大学バイオセンター 博士研究員
(Biozentrum, University of Basel, Switzerland)

はじめてのFloquet理論 ～平均ハミルトニアン理論から行列ベースのFloquet理論、 演算子ベースのFloquet理論まで～

(株)JEOL RESONANCE

中井 利仁

tnakai@jeol.co.jp

§ 1. はじめに

“Floquet ? What ?”である。Floquetと書いてフロケと読む。NMR の分野においてFloquet理論はS. Vegaらの精力的な研究^[1]があり、名前は聞きしことがある読者も多いかと思う。しかし理化学辞典を調べてみても載っていない。やはり、“Floquet ? What ?”である。かろうじていくつかの微分方程式の教科書^[2]に「Floquetの定理」が登場する。そこでは周期的な係数をもつ連立微分方程式(ベクトル微分方程式)の解の形式を与えるものとして説明されている。インターネットでも同様の情報が得られる。しかしNMRと何の関係があるのか、ますます、“Floquet ? What ?”である。あるいは、“NMR Floquet”でヒットする論文を当たってみたは良いが、長大な数式に飲み込まれて本質が見えず、ため息とともに論文を引き出しに入れた読者も少なくないと聞く。

そもそもFloquetの定理とは1883年、G. Floquetが証明した純粋に数学的な定理である^[3]。最初にこの定理が物理に適用されたのは月の運動である^[4]。周期的な相互作用と言えば天体の運動であった19世紀にあっては自然なことであろう。Floquetの定理は1928年、結晶場における波動関数、すなわち空間に関して周期的な相互作用を受けた電子の運動方程式に適用され、Blochの定理を導いた^[5](理化学辞典のブロッホの定理の項ではフロケの定理に言及している)。その後、解の形式を与えるのみならず、周期的な係数をもつ連立微分方程式を解く理論として「Floquet理論」が発展した。時間に関するさまざまな周期的相互作用が現われるNMRの分野でFloquet理論が重要な意義をもつことは何となく推察できるかと思う。本稿では、この「何となく」を確かなものとするべく、NMRにおけるFloquet理論の必要性和意義を説明したい。そのためまず、時間に依存する相互作用としてNMRの基本であるRF磁場の例を示し(§2)、平均ハミ

ルトニアン理論(Average Hamiltonian theory)の説明(§3)の後、Floquetの定理が何を解決するか明らかにし(§4)、ついで行列ベースのFloquet理論(§5)、最後に演算子ベースのFloquet理論(§6)を詳述する。

§ 2. 時間に依存するハミルトニアンの取り扱い

時間に依存するハミルトニアンをいかにして扱うか、NMR研究者にとって最も身近な例で示そう。実験室系において静磁場 B_0 と一方向に振動しているRF磁場 $B_1(t)$ が印加されているスピン系を考える。標準的な教科書^[6]を参考にすると、系が従う相互作用ハミルトニアンは、

$$\begin{aligned}\mathcal{H}^{\text{LAB}}(t) &= \mathcal{H}_0^{\text{LAB}} + \mathcal{H}_1^{\text{LAB}}(t) \\ &= -\omega_0 I_z - 2\omega_1 I_x \cos(\omega_1 t + \phi),\end{aligned}\quad (1)$$

と表せる。静磁場の強度から導かれる $\omega_0 = \gamma B_0$ はLarmor周波数であり、RF磁場の振動周波数 ω_1 はLarmor周波数 ω_0 に近いものとする。また、RF磁場の強度を周波数 $2\omega_1 = 2\gamma B_1$ で表わし、初期位相を ϕ とした。スピン系の状態を記述する密度演算子 $\rho^{\text{LAB}}(t)$ がしたがうLiouville-von Neumann方程式(以下、Liouville方程式)、

$$\begin{aligned}\frac{d\rho^{\text{LAB}}(t)}{dt} &= -i[\mathcal{H}^{\text{LAB}}(t), \rho^{\text{LAB}}(t)] \\ &= -i[-\omega_0 I_z - 2\omega_1 I_x \cos(\omega_1 t + \phi), \rho^{\text{LAB}}(t)],\end{aligned}\quad (2)$$

は時間依存するハミルトニアンによってスピン系の状態が駆動される形式になっており、

$$\rho^{\text{LAB}}(t) = e^{-i\mathcal{H}^{\text{LAB}}t} \rho^{\text{LAB}}(0) e^{+i\mathcal{H}^{\text{LAB}}t},\quad (3)$$

のように、一定ハミルトニアン $\mathcal{H}^{\text{LAB}}$ の集積で表わすことはできない。もちろんスピン系の主たる時間変化は静磁場によってもたらされるから、RF磁場による項を無視すれば、

$$\begin{aligned}
\rho^{\text{LAB}}(t) &= e^{-i\mathcal{H}_0^{\text{LAB}}t} \rho^{\text{LAB}}(0) e^{+i\mathcal{H}_0^{\text{LAB}}t} \\
&= e^{+i\omega_0 t I_z} \rho^{\text{LAB}}(0) e^{-i\omega_0 t I_z} \\
&= I_x \cos \omega_0 t - I_y \sin \omega_0 t,
\end{aligned} \quad (4)$$

となる(初期状態を $\rho^{\text{LAB}}(0) = I_x$ とした)。これは横磁化が静磁場の周りに Larmor 周波数で時計回りに回転することを示しているが、RF 磁場の効果は考慮されていない。

そこで、スピン系に対する相互作用の効果をより詳細に評価するために、「スピン系の主たる状態変化(磁化の運動)をあらかじめ『おりこみ済み』として表わしておき、残りの相互作用による状態変化を評価する」という「相互作用描像」を用いる。すなわち、式(4)を模した次式で新たな密度演算子 $\rho(t)$ を定義する:

$$\rho^{\text{LAB}}(t) = e^{+i\omega_1 t I_z} \rho(t) e^{-i\omega_1 t I_z}. \quad (5)$$

ここで、変換に用いた周波数 ω_1 は Larmor 周波数 ω_0 に近いと、スピン系の時間変化はおおむね式(4)で記述されることが理解される。密度演算子 $\rho(t)$ がしたがう方程式は、式(5)を元の Liouville 方程式(2)に代入し、左辺の微分を実行して項を整理すれば、

$$\frac{d\rho(t)}{dt} = -i[\mathcal{H}(t), \rho(t)], \quad (6)$$

となる。ただし、スピン系を駆動する新しいハミルトニアン $\mathcal{H}(t)$ は、

$$\begin{aligned}
\mathcal{H}(t) &= -(\omega_0 - \omega_1)I_z - 2\omega_1(I_x \cos \omega_1 t + I_y \sin \omega_1 t) \cos(\omega_1 t + \phi) \\
&= +\Omega I_z - \omega_1(I_x \cos \phi - I_y \sin \phi) - \omega_1[I_x \cos(2\omega_1 t + \phi) \\
&\quad + I_y \sin(2\omega_1 t + \phi)],
\end{aligned} \quad (7)$$

と求められる。この式は、オフセット周波数 Ω に相当する静磁場(第1項)に加え、時間依存しない RF 磁場(第2項)と周波数 $2\omega_1$ で回転する RF 磁場(第3項)がスピン系を駆動することを示している。すなわち、実験室系で印加された RF 磁場から相互作用描像では止まって見える磁場が導出され、この変換は磁化と同じ方向(時計回り)に回る回転系に乗ることを意味している。実験室系における RF 振動磁場は時計回りと反時計回りの回転磁場に分解ことができ、式(7)は片方(時計回り)の回転磁場が回転系で静止して見え、もう一方(反時計回り)の回転磁場は回転系では2倍の周波数で回転することを表わしている。実験室系における振動磁場の強度は2つの回転磁場に分けられることを見越して $2\omega_1$ としてあり、止まって見える磁場はその半分の

強度 ω_1 になっている。振動磁場の初期位相 $\phi = 0$ とすると回転系の x 方向に止まった RF 磁場が、 $\phi = -\pi/2$ とすると y 方向に止まった RF 磁場がかけられることになる(余談であるが、NMR を学び始めた頃、 x 方向と y 方向に RF 磁場をかけることができると聞き、プローブの中に2つの RF コイルを探したものである)。

回転系における RF 磁場のスピン系に対する効果を見るために、簡単に $\Omega = 0$ (オンレゾナンス)、 $\phi = 0$ (x 方向への RF 磁場印加)とする。この時、回転系におけるハミルトニアンは、

$$\mathcal{H}(t) = -\omega_1 I_x - \omega_1 (I_x \cos 2\omega_1 t + I_y \sin 2\omega_1 t). \quad (8)$$

スピン系の状態 $\rho(t)$ はこのハミルトニアンを用いた Liouville 方程式(6)にしたがって時間変化するが、式(2)と同様、ハミルトニアンが時間依存するため厳密解は得られない。この困難を解決する最も大雑把な方法は式(8)で時間依存する第2項を無視することである:

$$\mathcal{H} = -\omega_1 I_x. \quad (9)$$

このような取り扱いの妥当性は、「相互作用を変調する周波数 ($2\omega_1/2\pi \approx 100$ MHz) が相互作用の大きさ ($\omega_1/2\pi \approx 10 \sim 100$ kHz) より十分大きい場合、その相互作用は時間平均されてゼロになる」というもっともらしい事実に基づいている。式(8)から第2項を無視して式(9)を得る操作を「トランケーション(打ち切り、簡縮)」と呼ぶ。この近似によって Liouville 方程式(6)の解は、

$$\begin{aligned}
\rho(t) &= e^{-i\mathcal{H}t} \rho(0) e^{+i\mathcal{H}t} \\
&= e^{+i\omega_1 t I_x} \rho(0) e^{-i\omega_1 t I_x} \\
&= I_z \cos \omega_1 t + I_y \sin \omega_1 t,
\end{aligned} \quad (10)$$

となる(初期状態を $\rho(0) = I_z$ とした)。すなわち、 z 磁化は RF 磁場によって y 方向にフリップされる。ここで示したトランケーションによる近似解のみならず、より高次の効果を含んだ解を評価する理論が次に示す平均ハミルトニアン理論 (Average Hamiltonian theory) である。

§ 3. 平均ハミルトニアン理論

(Average Hamiltonian theory)

前節で用いた「変調の速さが変調される相互作用よりずっと大きい」という仮定が成り立たない場合は高次の補正項を含んだ有効ハミルトニアンが必要であり、それを評価する方法のひとつが平均ハミル

トニアン理論 (Average Hamiltonian theory)^[7] である。平均ハミルトニアン理論では変調の周期を $t_c = 2\pi/\omega$ (ω は変調周波数) として、 $\mathcal{H}(t)$ を時間平均したハミルトニアンが次のような摂動展開で与えられる:

$$\begin{aligned}\bar{H} &= \bar{H}^{(0)} + \bar{H}^{(1)} + \bar{H}^{(2)} + \dots, \\ \bar{H}^{(0)} &= \frac{1}{t_c} \int_0^{t_c} dt_1 \mathcal{H}(t_1), \\ \bar{H}^{(1)} &= -\frac{i}{2t_c} \int_0^{t_c} dt_1 \int_0^{t_1} dt_2 [\mathcal{H}(t_1), \mathcal{H}(t_2)], \\ \bar{H}^{(2)} &= \frac{1}{6t_c} \int_0^{t_c} dt_1 \int_0^{t_1} dt_2 \int_0^{t_2} dt_3 \left\{ [\mathcal{H}(t_1), [\mathcal{H}(t_2), \mathcal{H}(t_3)]] \right. \\ &\quad \left. + [\mathcal{H}(t_3), [\mathcal{H}(t_2), \mathcal{H}(t_1)]] \right\}, \\ &\dots\end{aligned}\quad (11)$$

ここで $\bar{H}^{(n)}$ を n 次の平均ハミルトニアン (Average Hamiltonian) と呼ぶ。相互作用描像に移る前の主たる相互作用 $\mathcal{H}_0^{\text{LAB}}$ を非摂動項とすると、 $\bar{H}^{(0)}$ は1次の摂動項、 $\bar{H}^{(1)}$ は2次の摂動項などとなる (このため最低次の項を1次の平均ハミルトニアンと呼び、 $\bar{H}^{(1)}$ と表わすこともある)。

平均ハミルトニアン理論において0次のハミルトニアン $\bar{H}^{(0)}$ は単純な時間平均であり、ハミルトニアン $\bar{H}$ を $\bar{H}^{(0)}$ で打ち切るとは前節で示したトランケーションにはかならない。たとえば、式 (8) で表わされる回転系でのRF磁場のハミルトニアンに対しては、

$$\begin{aligned}\bar{H} &= \bar{H}^{(0)} \\ &= -\omega_1 I_x,\end{aligned}\quad (12)$$

である。より高次の平均ハミルトニアンを考える必要があるかどうかは摂動展開の収束の速さに依存している。 n 次の平均ハミルトニアン $\bar{H}^{(n)}$ の大きさは、

$$|\bar{H}^{(n)}| = \frac{1}{t_c} |\mathcal{H} \cdot t_c|^{n+1} = \left| \frac{\mathcal{H}}{\omega} \right|^n |\mathcal{H}|, \quad (13)$$

の程度であるから、1つ高次の平均ハミルトニアンを考えることは、 $|\mathcal{H}/\omega|$ 倍だけ小さな相互作用を扱うことである。RF磁場の例で言えば、 $\omega_1/\omega_0 = 10 \sim 100 \text{ kHz}/100 \text{ MHz} = 1/10,000 \sim 1/1,000$ が収束の速さを決めている。

平均ハミルトニアン理論を具体的に見るために1次の平均ハミルトニアン $\bar{H}^{(1)}$ を評価する。回転系におけるハミルトニアンを、

$$\begin{aligned}\mathcal{H}(t) &= -\omega_1 I_x - \omega_1 (I_x \cos 2\omega_I t + I_y \sin 2\omega_I t) \\ &\equiv -\omega_1^c(t) I_x - \omega_1^s(t) I_y,\end{aligned}\quad (14)$$

といて1次の平均ハミルトニアンに含まれる交換子積を計算すると、

$$\begin{aligned}\mathcal{H}(t_1), \mathcal{H}(t_2) &= [-\omega_1^c(t_1) I_x - \omega_1^s(t_1) I_y, -\omega_1^c(t_2) I_x - \omega_1^s(t_2) I_y] \\ &= [\omega_1^c(t_1) \omega_1^s(t_2) - \omega_1^s(t_1) \omega_1^c(t_2)] (iI_z).\end{aligned}\quad (15)$$

t_2 に関する積分を実行すると、

$$\begin{aligned}\int_0^{t_1} dt_2 \omega_1^s(t_2) &= \int_0^{t_1} dt_2 \omega_1 \sin 2\omega_I t_2 \\ &= \frac{\omega_1}{2\omega_I} (1 - \cos 2\omega_I t_1), \\ \int_0^{t_1} dt_2 \omega_1^c(t_2) &= \int_0^{t_1} dt_2 \omega_1 (1 + \cos 2\omega_I t_2) \\ &= \omega_1 \left(t_1 + \frac{1}{2\omega_I} \sin 2\omega_I t_1 \right).\end{aligned}\quad (16)$$

t_1 に関して積分する際に、 $\cos/\sin 2\omega_I t_1$ の1乗の項を1周期にわたって積分したものは0であることに注意すると、1次の平均ハミルトニアンは、

$$\begin{aligned}\bar{H}^{(1)} &= -\frac{i}{2t_c} \int_0^{t_c} dt_1 \left[\omega_1 (1 + \cos 2\omega_I t_1) \cdot \frac{\omega_1}{2\omega_I} (1 - \cos 2\omega_I t_1) \right. \\ &\quad \left. - \omega_1 \sin 2\omega_I t_1 \cdot \omega_1 \left(t_1 + \frac{1}{2\omega_I} \sin 2\omega_I t_1 \right) \right] (iI_z) \\ &= -\frac{i}{2t_c} \int_0^{t_c} dt_1 (-\omega_1^2 t_1 \sin 2\omega_I t_1) (iI_z) \\ &= \frac{\omega_1^2}{4\omega_I} I_z,\end{aligned}\quad (17)$$

となる。この結果はRF磁場照射によって共鳴線がいわゆる Bloch-Siegert シフト^[8]を呈することを示している。たとえば、 $\omega_I/2\pi = 100 \text{ MHz}$ 、 $\omega_1/2\pi = 10 \text{ kHz}$ とすると、 $\omega_1^2/4\omega_I = 0.25 \text{ Hz}$ の Bloch-Siegert シフトが生じることが分かる。物理的に言えば、回転系において1次摂動では無視していた磁化と逆回りの回転磁場が2次摂動として Bloch-Siegert シフトをもたらすと言える。

この節で具体的に見た平均ハミルトニアン理論の特徴をまとめておく。

○ (1) 平均ハミルトニアン理論は解析的な数学表現を与え、現象に対する物理的洞察を加えやすい。

× (2) 平均ハミルトニアン理論では高次の補正項の評価が困難である。すなわち高次の平均ハミルトニアンを評価するにはスピン部分に対する多重交換子積の計算および空間部分に対する多重積分を実行することになり、しかも各次数の平均ハミルトニアンは独立に評価する必要がある。この結果、高次の平均ハミルトニアンが有効な場合 (収束が遅い場合)、現象を表現する解析的な数式を求めるのが困難であるために物理的洞察を加えにくい。また、数値計算によって高次の平均ハミルトニアンを評価しようとしても、交換子積・多重積分ともに数値計算に乘せにくいいため、近似を高めて物理的現象を正し

く再現 (シミュレーション) することが困難である。
 × (3) 平均ハミルトニアンは周期的相互作用を1周期にわたって積分して得られるため、厳密には周期の整数倍の時刻 (ストロボスピックな時刻) での効果しか評価できない。このことはたとえば試料回転によって変調されたスピン相互作用を評価する場合、試料回転周期以外の時刻の相互作用に由来するスピニングサイドバンドを扱えないことを意味する。

ここで指摘した平均ハミルトニアン理論の問題点を克服する理論が次節以降で詳述する Floquet 理論である。

§ 4. Floquet の定理

Floquet の定理は係数が周期関数で与えられるベクトル微分方程式 (連立微分方程式) の解の性質を特徴づけるものである^[2,3]。すなわち、

$$\frac{d}{dt}|\psi(t)\rangle = C(t)|\psi(t)\rangle, \quad C(t) = C(t+t_c), \quad (18)$$

の解が、

$$|\psi(t)\rangle = P(t)e^{Qt}P(0)^{-1}|\psi(0)\rangle, \quad P(t) = P(t+t_c), \quad (19)$$

の形式を取ることを証明するものである。周期的演算子 $P(t)$ と一定演算子 Q は未知であり、これらを既知の演算子 $C(t)$ で直接的に表わすことはできない。しかしながら、Floquet の定理は結晶場中の電子の波動関数、すなわち空間に関する周期的ポテンシャルの下での Schrödinger 方程式の解が、

$$|\psi(x)\rangle = |u(x)\rangle e^{-ikx}, \quad |u(x)\rangle = |u(x+a)\rangle, \quad (20)$$

と表わせることを示した (Bloch の定理)。

時間に関して周期的なハミルトニアン $\mathcal{H}(t)$ を伴った Liouville 方程式、

$$\frac{d\rho(t)}{dt} = -i[\mathcal{H}(t), \rho(t)], \quad \mathcal{H}(t) = \mathcal{H}(t+t_c), \quad (21)$$

に Floquet の定理を適用する場合、次のプロパゲータ $U(t)$ を導入するのが便利である:

$$\rho(t) = U(t)\rho(0)U(t)^{-1}, \quad U(0) = \hat{1}. \quad (22)$$

すなわち、時間推進因子を指数関数であらわに表す代わりに未知の $U(t)$ で仮置きする。これによって Liouville 方程式 (21) は式 (18) と同じ形式になる:

$$\frac{dU(t)}{dt} = -i\mathcal{H}(t)U(t), \quad \mathcal{H}(t) = \mathcal{H}(t+t_c). \quad (23)$$

この結果、Floquet の定理を適用することができ、

プロパゲータ $U(t)$ の解の形式は式 (19) と同様、

$$U(t) = P(t)e^{-iQt}, \quad P(t) = P(t+t_c), \quad (24)$$

となる。ここで $U(0) = \hat{1}$ を用い、一般性を失うことなく初期条件を $P(0) = \hat{1}$ とした。変調の周期ごとの時刻 $t = kt_c$ では $P(kt_c) = P(0) = \hat{1}$ であるからプロパゲータは演算子 Q のみを用いて e^{-iQt} で与えられる。一方、周期の間の時刻 $kt_c < t < (k+1)t_c$ でのプロパゲータは $P(t)$ も含めた式で記述される。こうして平均ハミルトニアン理論の問題点 (3) が克服される。

演算子 $P(t)$ と Q は未知であり、既知のハミルトニアン $\mathcal{H}(t)$ から直接的に与えられるわけではない。ただし、プロパゲータ $U(t)$ の解の形式 (24) から $P(t)$ と Q に対する束縛条件が得られる:

$$\frac{dP(t)}{dt} = iP(t)Q - i\mathcal{H}(t)P(t), \quad P(0) = \hat{1}. \quad (25)$$

こうして Liouville 方程式を解くことは、上の束縛条件からいかにして未知の演算子 $P(t)$ と Q を求めるかという問題に帰着された。これらの未知の演算子を評価するひとつの方法が次に示す Shirley の Floquet 理論である。

§ 5. 行列ベースの Floquet 理論 ~ Shirley の理論 ~

Shirley は前出の微分方程式 (25) に対して積分を実行する代わりに、周期関数である $\mathcal{H}(t)$ および $P(t)$ をフーリエ級数展開して問題を静的なものに変換した^[9]。すなわち、

$$\begin{aligned} \mathcal{H}(t) &= \sum_m \mathcal{H}^m e^{im\omega t}, \\ P(t) &= \sum_{m=-\infty}^{\infty} P^m e^{im\omega t}, \end{aligned} \quad (26)$$

を式 (25) に代入して $e^{im\omega t}$ の係数を整理すると、解くべき方程式は、

$$\sum_{n=-\infty}^{\infty} (\mathcal{H}^{m-n} + m\omega\delta_{mn}) P^n = P^m Q, \quad (27)$$

となる。ここで、未知の演算子 Q を対角化する状態を $|\lambda_{f0}\rangle$ 、対応する固有値を q_f とする:

$$\langle \lambda_{f0} | Q | \lambda_{f'0} \rangle = q_f \delta_{ff'}. \quad (28)$$

完全系を成す任意のスピン状態 $|\mu\rangle, |\nu\rangle$ および固有状態 $|\lambda_{f0}\rangle$ で式 (27) を成分表示すると、

$$\sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\nu} \langle \mu | (\mathcal{H}_{\mu\nu}^{m-n} + m\omega\delta_{mn}) | \nu \rangle \langle \nu | P^m | \lambda_{f0} \rangle = \langle \mu | P^m | \lambda_{f0} \rangle \langle \lambda_{f0} | Q | \lambda_{f0} \rangle, \\ i.e. \quad \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\nu} (\mathcal{H}_{\mu\nu}^{m-n} + m\omega\delta_{mn}\delta_{\mu\nu}) P_{\nu f}^m = P_{\mu f}^m q_f. \quad (29)$$

ここで、 $\mathcal{H}_{\mu\nu}^{m-n}$ 、 $P_{\mu f}^m$ はそれぞれフーリエ係数 $\mathcal{H}^{m-n}$ 、 P^m を行列表現したものである:

$$\mathcal{H}_{\mu\nu}^{m-n} \equiv \langle \mu | \mathcal{H}^{m-n} | \nu \rangle, \\ P_{\mu f}^m \equiv \langle \mu | P^m | \lambda_{f0} \rangle. \quad (30)$$

さらに $P_{\mu f}^m$ から2つの引数を持つ状態 $|\mu m\rangle$ を、

$$P_{\mu f}^m \equiv \langle \mu m | \lambda_{f0} \rangle, \quad i.e. \quad \langle \mu | P^m = \langle \mu m |, \quad (31)$$

によって定義して式 (29) を表わせば、

$$\sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\nu} (\mathcal{H}_{\mu\nu}^{m-n} + m\omega\delta_{mn}\delta_{\mu\nu}) \langle \nu n | \lambda_{f0} \rangle = q_f \langle \mu m | \lambda_{f0} \rangle. \quad (32)$$

ここで、新たなハミルトニアン H_F を、その行列要素が上式の左辺の括弧内で与えられるものとして定義する:

$$\mathcal{H}_{\mu\nu}^{m-n} + m\omega\delta_{mn}\delta_{\mu\nu} \equiv \langle \mu m | H_F | \nu n \rangle. \quad (33)$$

この結果、式 (32) は、

$$\sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\nu} \langle \mu m | H_F | \nu n \rangle \langle \nu n | \lambda_{f0} \rangle = q_f \langle \mu m | \lambda_{f0} \rangle, \\ i.e. \quad H_F | \lambda_{f0} \rangle = q_f | \lambda_{f0} \rangle, \quad (34)$$

となる。このようにフーリエ級数展開および既知の量で定義されるハミルトニアン H_F と2つの引数をもつ状態 $|\mu m\rangle$ の導入により、未知の演算子 $P(t)$ および Q を求める問題は H_F の固有値問題に帰着された。新たに導入した H_F を Floquet ハミルトニアン、 $|\mu m\rangle$ を Floquet 状態と呼ぶ。状態 $|\mu m\rangle$ は相互作用ハミルトニアン $\mathcal{H}(t)$ の変調成分 $\mathcal{H}^m$ を行列表現するために、スピン状態 $|\mu\rangle$ と量子化された変調相互作用 (場) の状態 $|m\rangle$ の直積 $|\mu\rangle \otimes |m\rangle$ として導入したものである。このため、Floquet 状態は「場の衣」を着た “dressed state” と解釈できる。

Floquet ハミルトニアン H_F を Floquet 状態 $|\mu m\rangle$ で行列表現したものを Floquet 行列と呼ぶが、基底ベクトル $|\mu m\rangle$ のうち、スピン状態 $|\mu\rangle$ は $|\alpha\rangle$ 、 $|\beta\rangle$ のように有限個であるとしても、量子化された変調相互作用の状態 $|m\rangle$ は無限に存在する。したがって Floquet 行列は無限次元であり、その固有方程式は式 (34) を一般化した、

$$H_F | \lambda_{fm} \rangle = \lambda_{fm} | \lambda_{fm} \rangle, \quad (35)$$

で表わされ、無限個の固有値 λ_{fm} および固有ベクトル $|\lambda_{fm}\rangle$ を与える。しかし、これらは本質的な固有値 q_f および固有ベクトル $|\lambda_{f0}\rangle$ と、

$$\lambda_{fm} = q_f + m\omega, \\ \langle \nu n | \lambda_{fm} \rangle = \langle \nu n - m | \lambda_{f0} \rangle, \quad (36)$$

という並進性をもつことが分かっており、未知の演算子 Q および $P(t)$ をそれぞれ式 (28) および式 (31) を用いて評価する際に問題にならない。Floquet 行列の対角化により固有値 q_f と固有ベクトル $|\lambda_{f0}\rangle$ (あるいは固有ベクトルの成分 $\langle \mu m | \lambda_{f0} \rangle = P_{\mu f}^m$) が得られたならば、プロパゲータ $U(t)$ の行列成分は次のように表わされる:

$$U_{\mu\nu}(t) = \langle \mu | U(t) | \nu \rangle \\ = \langle \mu | P(t) e^{-iQt} | \nu \rangle \\ = \langle \mu | \left(\sum_{m=-\infty}^{\infty} P^m e^{im\omega t} \right) e^{-iQt} | \nu \rangle \\ = \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_f \langle \mu | P^m | \lambda_{f0} \rangle \langle \lambda_{f0} | e^{-iQt} | \lambda_{f0} \rangle \langle \lambda_{f0} | \nu \rangle e^{im\omega t} \\ = \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_f P_{\mu f}^m e^{-iq_f t} \langle \lambda_{f0} | \nu \rangle e^{im\omega t}. \quad (37)$$

こうして Floquet 行列の対角化によって任意の時刻のプロパゲータ $U(t)$ 、したがってスピン系の状態 $\rho(t)$ が評価できる。なお形式論ではあるが、プロパゲータは固有値と固有ベクトルの並進性を利用して、

$$U_{\mu\nu}(t) = \sum_{m=-\infty}^{\infty} \langle \mu m | e^{-iH_F t} | \nu 0 \rangle e^{im\omega t}, \quad (38)$$

と表わせることが分かっている。

Shirley の Floquet 理論 (行列ベースの Floquet 理論) を具体的に見るために、前述の RF 磁場が印加されたスピン系のハミルトニアン (式 (8)) を取り上げる。ただし簡単のため、変調周波数を $2\omega_l = \omega$ と置くと、

$$\mathcal{H}(t) = -\omega_l I_x - \omega_l (I_x \cos \omega t + I_y \sin \omega t) \\ = -\omega_l I_x - \frac{1}{2}\omega_l I_- e^{+i\omega t} - \frac{1}{2}\omega_l I_+ e^{-i\omega t}, \quad (39)$$

であり、それゆえフーリエ係数は、

$$\mathcal{H}_{\alpha\alpha}^0 = 0, \quad \mathcal{H}_{\alpha\beta}^0 = -\frac{1}{2}\omega_l, \quad \mathcal{H}_{\beta\alpha}^0 = -\frac{1}{2}\omega_l, \quad \mathcal{H}_{\beta\beta}^0 = 0, \\ \mathcal{H}_{\alpha\alpha}^1 = 0, \quad \mathcal{H}_{\alpha\beta}^1 = 0, \quad \mathcal{H}_{\beta\alpha}^1 = -\frac{1}{2}\omega_l, \quad \mathcal{H}_{\beta\beta}^1 = 0, \\ \mathcal{H}_{\alpha\alpha}^{-1} = 0, \quad \mathcal{H}_{\alpha\beta}^{-1} = -\frac{1}{2}\omega_l, \quad \mathcal{H}_{\beta\alpha}^{-1} = 0, \quad \mathcal{H}_{\beta\beta}^{-1} = 0, \quad (40)$$

となる。Floquet 行列を書き下すと、

$$\begin{pmatrix} \langle \mu m | H_F | \nu n \rangle \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \langle \alpha m | H_F | \alpha n \rangle & \dots & \langle \alpha m | H_F | \beta n \rangle \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \langle \beta m | H_F | \alpha n \rangle & \dots & \langle \beta m | H_F | \beta n \rangle \end{pmatrix}. \quad (41)$$

ここでブロック行列は、

$$\begin{aligned} \begin{pmatrix} \langle \alpha m | H_F | \alpha n \rangle \\ \langle \beta m | H_F | \beta n \rangle \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} \ddots & & & & \\ & 2\omega & & 0 & \\ & & \omega & & \\ & & & 0 & \\ & 0 & & & -\omega & \\ & & & & & -2\omega & \\ & & & & & & \ddots \end{pmatrix}, \\ \begin{pmatrix} \langle \alpha m | H_F | \beta n \rangle \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} \ddots & & & & & 0 \\ & -\omega_1/2 & -\omega_1/2 & & & \\ & 0 & -\omega_1/2 & -\omega_1/2 & & \\ & & 0 & -\omega_1/2 & -\omega_1/2 & \\ & & & 0 & -\omega_1/2 & -\omega_1/2 \\ & 0 & & & 0 & -\omega_1/2 & \ddots \end{pmatrix}, \\ \begin{pmatrix} \langle \beta m | H_F | \alpha n \rangle \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} \ddots & & & & & 0 \\ & -\omega_1/2 & 0 & & & \\ & -\omega_1/2 & -\omega_1/2 & 0 & & \\ & & -\omega_1/2 & -\omega_1/2 & 0 & \\ & & & -\omega_1/2 & -\omega_1/2 & 0 \\ & 0 & & & -\omega_1/2 & -\omega_1/2 & \ddots \end{pmatrix}. \quad (42) \end{aligned}$$

問題はいかにして無限次元の Floquet 行列を対角化して固有値 λ_{fm} と固有ベクトル $|\lambda_{fm}\rangle$ を求めるかである。そこで、変調相互作用の低次のものだけを取り込むという近似を用い、具体的には無限次元の Floquet 行列を有限次元にトランケートする。近似した Floquet 行列は相互作用に関して1次摂動では、

$$\begin{pmatrix} H_F^{(1)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} |\alpha 0\rangle & |\beta 0\rangle \\ 0 & \vdots & -\omega_1/2 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ -\omega_1/2 & \vdots & 0 \end{pmatrix}, \quad (43)$$

である。これは Floquet ハミルトニアンが式 (39) から時間依存する部分を見捨てた、

$$H_F^{(1)} = -\omega_1 I_x, \quad (44)$$

で表わされることを意味し、0次 (1次摂動) の平均ハミルトニアン $\bar{H}^{(0)}$ に一致する。一方、2次摂動近似での Floquet 行列は、

$$\begin{pmatrix} H_F^{(2)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} |\alpha 1\rangle & |\alpha 0\rangle & |\alpha -1\rangle & |\beta 1\rangle & |\beta 0\rangle & |\beta -1\rangle \\ \omega & 0 & 0 & \vdots & -\omega_1/2 & -\omega_1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \vdots & 0 & -\omega_1/2 & -\omega_1/2 \\ 0 & 0 & -\omega & \vdots & 0 & 0 & -\omega_1/2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots & \vdots \\ -\omega_1/2 & 0 & 0 & \vdots & \omega & 0 & 0 \\ -\omega_1/2 & -\omega_1/2 & 0 & \vdots & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -\omega_1/2 & -\omega_1/2 & \vdots & 0 & 0 & -\omega \end{pmatrix}, \quad (45)$$

であり、この Floquet 行列を対角化することは数値計算としては容易である。さらに高次の効果が有効な場合でも計算結果が収束するまで対角化する Floquet 行列の大きさを大きくすることで計算が可能であり、物理現象を定量的に再現し得る。その一方で、Floquet ハミルトニアンを解析的に表わすことは困難であり、たとえば式 (45) がもたらすはずの Bloch-Siegert シフトの表式は得られないなど、現象に対して洞察を加えることが困難である。

したがって、行列ベースの Floquet 理論の特徴は次のようにまとめることができる。

× (1) 行列ベースの Floquet 理論は解析的な数学表現を与えることが困難であり、現象に対する物理的洞察を加えにくい。

○ (2) 行列ベースの Floquet 理論は高次の近似計算が容易であり、計算が収束するまで取り込む Floquet 行列を大きくして数値的に対角化することで物理的現象を正しく再現することができる。

○ (3) 行列ベースの Floquet 理論は元となる Floquet の定理の性質から、周期の整数倍の時刻 (ストロボスコープ的な時刻) だけでなく、一般の時刻でのプロパゲータを与え、多くの問題に適用できる。

このように行列ベースの Floquet 理論は平均ハミルトニアン理論の短所を克服するが、現象を記述する解析的な数式を得にくいことが欠点である。この点を克服するのが次に示す演算子ベースの Floquet 理論である。

§ 6. 演算子ベースの Floquet 理論

Floquet の定理において中心的な役割を果たす式、

$$\frac{dP(t)}{dt} = -i\mathcal{H}(t)P(t) + iP(t)Q, \quad (46)$$

はさまざまな摂動論を適用して解くことができ、総説などにまとめられている^[10]。ここでは Maricq の理論^[11]を詳述する。摂動次数を分類するためのパラメータ λ を用いて求めるべき演算子 $P(t)$ と Q を、

$$\begin{aligned} P(t) &= \sum_{\ell=0}^{\ell_{\max}} \lambda^{\ell} P^{(\ell)}(t), \\ Q &= \sum_{\ell=0}^{\ell_{\max}} \lambda^{\ell} Q^{(\ell)}, \end{aligned} \quad (47)$$

のように展開し、またハミルトニアン $\mathcal{H}(t)$ 全体が摂動と見なせるとして $\lambda\mathcal{H}(t)$ と置く。これらを式 (46) に代入すると、 λ^{ℓ} の係数より、

$$\frac{dP^{(\ell)}(t)}{dt} = -i\mathcal{H}(t)P^{(\ell-1)}(t) + i \sum_{k=0}^{\ell} P^{(k)}(t)Q^{(\ell-k)}, \quad (48)$$

が得られ、摂動の各次数 ℓ に対する摂動項 $P^{(\ell)}(t)$ 、 $Q^{(\ell)}$ が関係づけられる。0 次の項 $P^{(0)}(t)$ 、 $Q^{(0)}$ は、0 次近似でハミルトニアン $\mathcal{H}(t)$ の影響が無視できて状態 $\rho(t)$ が時間変化しない、すなわちプロパゲータが $U(t) = \hat{1}$ であるとして求められる：

$$U(t) = P^{(0)}(t)e^{-iQ^{(0)}t} = \hat{1}, \quad \text{i.e.} \quad Q^{(0)} = \hat{0}, \quad P^{(0)}(t) = \hat{1}. \quad (49)$$

式 (48) の和に含まれる $k=0$ および $k=\ell$ の項として式 (49) を代入すれば、

$$\frac{dP^{(\ell)}(t)}{dt} = -i\mathcal{H}(t)P^{(\ell-1)}(t) + i\sum_{k=1}^{\ell-1} P^{(k)}(t)Q^{(\ell-k)} + iQ^{(\ell)}t. \quad (50)$$

ただし、 $\ell=1$ に対しては総和を表わす第2項がないと見なす。この式を0から任意の時刻 t まで積分すれば、

$$P^{(\ell)}(t) = -i\int_0^t dt' \left[\mathcal{H}(t')P^{(\ell-1)}(t') - \sum_{k=1}^{\ell-1} P^{(k)}(t')Q^{(\ell-k)} \right] + iQ^{(\ell)}t. \quad (51)$$

特に周期に一致する時刻 $t = t_c$ に対して、 $P^{(\ell \geq 1)}(t_c) = P^{(\ell \geq 1)}(0) = \hat{0}$ より、

$$0 = -i\int_0^{t_c} dt' \left[\mathcal{H}(t')P^{(\ell-1)}(t') - \sum_{k=1}^{\ell-1} P^{(k)}(t')Q^{(\ell-k)} \right] + iQ^{(\ell)}t_c, \quad \text{i.e.} \quad Q^{(\ell)} = \frac{1}{t_c} \int_0^{t_c} dt' \left[\mathcal{H}(t')P^{(\ell-1)}(t') - \sum_{k=1}^{\ell-1} P^{(k)}(t')Q^{(\ell-k)} \right], \quad (52)$$

を与える。 $Q^{(\ell)}$ は平均ハミルトニアン $\bar{H}^{(\ell-1)}$ を一般化した一定演算子であり、周期ごとの状態の時間変化を記述する。一方、周期の間の時刻での状態は $P^{(\ell)}(t)$ を含めて記述される。式 (51) および式 (52) は ℓ 次の摂動項 $P^{(\ell)}(t)$ と $Q^{(\ell)}$ がより低次の摂動項 $P^{(k)}(t)$ ($k=0, 1, \dots, \ell-1$) と $Q^{(k)}$ ($k=0, 1, \dots, \ell$) から求められるという連立漸化式になっている。Maricq が導いたこの漸化式は摂動展開が収束するまで高次の項を計算する方法を与えており、その重要性から Ernst らの教科書にも取り上げられている^[12]。

平均ハミルトニアン理論で見たように、連立漸化式 (51) および (52) に含まれる積分は実際の計算を困難にする。そこで Nakai および McDowell はフーリエ級数展開を用いて漸化式を静的なものに変換した^[13]：

$$P^{(\ell)}(t) = \sum_{m=-\infty}^{\infty} P^m(\ell) e^{im\omega t}, \quad \mathcal{H}(t) = \sum_m \mathcal{H}^m e^{im\omega t}. \quad (53)$$

これを連立漸化式 (51) および (52) に代入して $e^{im\omega t}$

の係数を整理すると、 $\ell=0$ の項として漸化式の初項は、

$$Q^{(0)} = \hat{0}, \quad P^{(0)} = \hat{1}, \quad P^{n \neq 0} = \hat{0}, \quad (54)$$

となり、また $\ell \geq 1$ に対して漸化式、

$$Q^{(\ell)} = \sum_m \mathcal{H}^{-m} P^m(\ell-1) - \sum_{k=1}^{\ell-1} P^{(k)} Q^{(\ell-k)}, \quad P^{n \neq 0}(\ell) = -\frac{1}{n\omega} \left[\sum_m \mathcal{H}^{-m} P^{m+n}(\ell-1) - \sum_{k=1}^{\ell-1} P^{(k)} Q^{(\ell-k)} \right], \quad P^{(0)}(\ell) = -\sum_{n \neq 0} P^{(n)}(\ell), \quad (55)$$

が得られる。ただし、 $\ell=1$ に対しては k に関する総和の項がないと見なす。こうして演算子ベースの Floquet 理論として、未知の演算子 $P(t)$ および Q を摂動論によって求める漸化式が見出された。

解析的な表現として低次のいくつかの摂動項を求めている。多くの場合、0 でないフーリエ係数 $\mathcal{H}^m$ の数は有限個であり、ここでは例として変調を受けた二階のテンソルのように、 $m=0, \pm 1, \pm 2$ に対してのみ $\mathcal{H}^m$ が0でないとする。初項 (54) を漸化式 (55) に代入すると、

$$Q^{(1)} = \mathcal{H}^0, \quad P^{n=\pm 1, \pm 2}(1) = -\frac{1}{n\omega} \mathcal{H}^n, \quad P^{(0)}(1) = \sum_{n=\pm 1, \pm 2} \frac{1}{n\omega} \mathcal{H}^n, \quad P^{n \neq 0, \pm 1, \pm 2}(1) = \hat{0}. \quad (56)$$

また、 $\ell=2$ に対して、

$$Q^{(2)} = \sum_{m=\pm 1, \pm 2} \frac{1}{m\omega} (\mathcal{H}^0 \mathcal{H}^m - \mathcal{H}^m \mathcal{H}^0 - \mathcal{H}^{-m} \mathcal{H}^m), \quad P^{n=\pm 1, \dots, \pm 4}(2) = -\frac{1}{n\omega} \sum_{m=\pm 1, \pm 2} \frac{1}{m\omega} (\mathcal{H}^n \mathcal{H}^m - \mathcal{H}^{n-m} \mathcal{H}^m) - \left(\frac{1}{n\omega}\right)^2 \mathcal{H}^n \mathcal{H}^0, \quad P^{(0)}(2) = \sum_{n=\pm 1, \dots, \pm 4} \left[\frac{1}{n\omega} \sum_{m=\pm 1, \pm 2} \frac{1}{m\omega} (\mathcal{H}^n \mathcal{H}^m - \mathcal{H}^{n-m} \mathcal{H}^m) + \left(\frac{1}{n\omega}\right)^2 \mathcal{H}^n \mathcal{H}^0 \right], \quad P^{n \neq 0, \pm 1, \dots, \pm 4}(2) = \hat{0}. \quad (57)$$

さらに高次の摂動項をあらわに書き下すと長くなるが、 $Q^{(2)}$ などを逐次代入した形式で表わすことは容易である。たとえば $Q^{(3)}$ は、

$$Q^{(3)} = \mathcal{H}^0 P^{(0)}(2) - P^{(0)}(2) \mathcal{H}^0 + \sum_{m=\pm 1, \pm 2} \mathcal{H}^{-m} P^m(2) - \sum_{m=\pm 1, \pm 2} \mathcal{H}^m Q^{(2)}, \quad (58)$$

となる。平均ハミルトニアン理論では各次数の摂動項を独立に求める必要があったのに対して、演算子ベースの Floquet 理論ではこのような再帰的な表現が可能であるため、高次の摂動項を比較的コンパクトな数式で表わすことができ、また数値計算では効率よく高次項を計算できる。

演算子ベースの Floquet 理論を具体的に見るために、これまで取り上げてきた RF 磁場が印加された

スピン系のハミルトニアン (式 (8) または式 (39)) を考える (変調の周波数を $\omega = 2\omega_I$ として):

$$\begin{aligned}\mathcal{H}(t) &= -\omega_I I_x - \omega_1 (I_x \cos \omega t + I_y \sin \omega t) \\ &= \mathcal{H}^0 + \mathcal{H}^1 e^{i\omega t} + \mathcal{H}^{-1} e^{-i\omega t},\end{aligned}\quad (59)$$

ここで、0でないフーリエ係数は、

$$\mathcal{H}^0 = -\omega_I I_x, \quad \mathcal{H}^1 = -\frac{1}{2}\omega_1 I_-, \quad \mathcal{H}^{-1} = -\frac{1}{2}\omega_1 I_+, \quad (60)$$

である。1次の摂動項 $Q^{(1)}$ は式 (56) が示すように $\mathcal{H}^0$ であり、回転系で止まって見えるRF磁場の効果にはかならない。2次の摂動項 $Q^{(2)}$ は式 (57) を計算することによって求められる:

$$\begin{aligned}Q^{(2)} &= \sum_{m=\pm 1} \frac{1}{m\omega} (\mathcal{H}^0 \mathcal{H}^m - \mathcal{H}^m \mathcal{H}^0 - \mathcal{H}^{-m} \mathcal{H}^m) \\ &= \frac{1}{\omega} (\mathcal{H}^0 \mathcal{H}^1 - \mathcal{H}^1 \mathcal{H}^0 - \mathcal{H}^{-1} \mathcal{H}^1 - \mathcal{H}^0 \mathcal{H}^{-1} + \mathcal{H}^{-1} \mathcal{H}^0 + \mathcal{H}^1 \mathcal{H}^{-1}) \\ &= \frac{1}{\omega} [\mathcal{H}^0, \mathcal{H}^1 - \mathcal{H}^{-1}] + \frac{1}{\omega} [\mathcal{H}^1, \mathcal{H}^{-1}] \\ &= \frac{1}{\omega} [-\omega_I I_x, i\omega_1 I_y] + \frac{1}{\omega} \left[-\frac{1}{2}\omega_1 I_-, -\frac{1}{2}\omega_1 I_+ \right] \\ &= \frac{\omega_I^2}{4\omega_I} I_z.\end{aligned}\quad (61)$$

このように演算子ベースのFloquet理論は、平均ハミルトニアン理論における冗長な多重積分を実行することなく、Bloch-Siegert シフトの解析的な表現を与える。

したがって、演算子ベースのFloquet理論の特徴は次のようにまとめることができる。

○ (1) 演算子ベースのFloquet理論は解析的な数学表現を与えることが可能であり、現象に対する物理的洞察を加えやすい。

○ (2) 演算子ベースのFloquet理論は高次の近似計算が容易であり、連立漸化式を用いて収束するまで高次項を計算することで物理的現象を正しく再現することができる。また高次項は再帰的な代入により効率よく求められる。

○ (3) 演算子ベースのFloquet理論は周期の整数倍の時刻 (ストロボスコピックな時刻) だけでなく、一般の時刻でのプロパゲータを与え、多くの問題に適用できる。

このように演算子ベースのFloquet理論は平均ハミルトニアン理論や行列ベースのFloquet理論の短所を克服すると言える。

参考のため、双極子結合した同種核スピン対のスピンングサイドバンドパターンの計算結果を図1に示す。試料回転によって変調された同種核双極子相互作用を扱うためには何らかの近似が必要であるが、平均ハミルトニアン理論は試料回転周期の整数倍の時刻におけるFIDを評価するだけであり、スピンングサイドバンドを再現できない。図のスペ

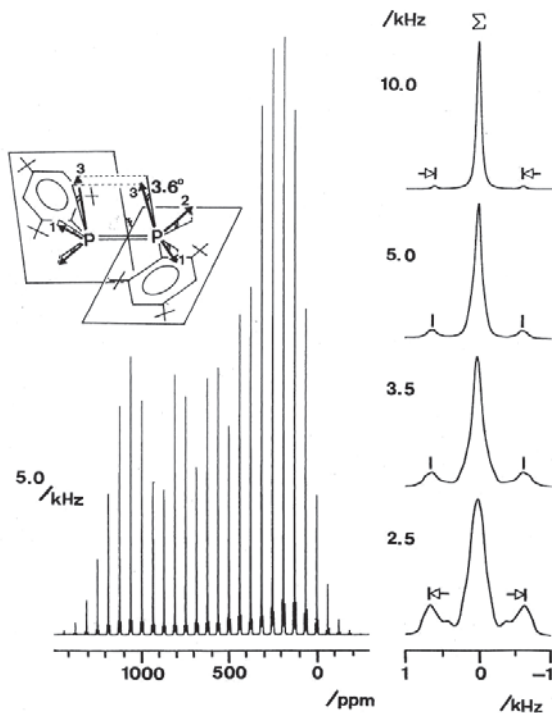


図1 演算子ベースのFloquet理論によるNMRスペクトルの計算例

1,2-bis (2,4,6-tri-tert-butyl-phenyl)-disphosphene (TBPDP) と呼ばれる化合物 (図中に表示) の ^{31}P マジックアングルスピンングスペクトルを示している。計算に用いた摂動次数は試料回転速度5.0 kHzに対して5次などである。2つのP原子の化学シフト等方値は等しいが、化学シフト異方性テンソルの主軸方向が一致しないために、P原子間のJ結合が復活している ($n=0$ Rotational Resonance^[14])。復活したJ-satellite線の強度やスピンングサイドバンドパターンを実験結果^[14]と比較することにより、化学シフトテンソルのずれが 3.6° であることなどが分かる。

クトル計算ではこの点でFloquet理論の長所 (3) が威力を発揮している。また、漸化式を用いて再帰的に低次の項を代入することで効率よく高次項が計算されており、演算子ベースのFloquet理論の長所 (2) が効果的に使われている。

§ 7. おわりに

本稿ではまずFloquet理論の必要性を平均ハミルトニアン理論との対比で明らかにした。これらの理論が必要となる時間に依存するハミルトニアン問題は、デカップリングなどのRF磁場や固体試料回転による内部相互作用の変調など、NMRにおいて頻繁に直面する。本稿ではFloquet理論の総説ではほとんど取り上げられない基礎となるFloquetの定理を紹介し、行列ベースおよび演算子ベースのFloquet理論との関係を示した。NMRの分野ではS. Vegaらがもっぱら行列ベースのFloquet理論を用いてさまざまな現象を研究してきたため^[1]、

Floquet理論という巨大な行列が出てくるものと思われがちであった。しかし、ひとたびNMR以外の分野に目を移すと行列ベースのFloquet理論がすべてでないことが分かる^[10]。実際、本稿で明らかにしたように演算子ベースのFloquet理論はより強力であるとも言える。筆者は所属していたブリティッシュコロンビア大学McDowell研究室の研究^[15]の流れから、演算子ベースのFloquet理論をNMR現象に適用する研究を行なったが、必ずしも主流にはならなかった。ところが、Krishnanのグループ^[16]が一般的な演算子ベースの摂動論であるvan Vleck変換^[17]をFloquet理論に応用すると流れは演算子ベースのFloquet理論に移り、現在では主要な研究者が演算子ベースのFloquet理論を扱うようになった^[18]。本稿では紙幅の関係でvan Vleck変換に触れられなかったが、読者諸賢におかれては演算子ベースのFloquet理論のエッセンスを感じ取り、より発展したFloquet理論への足掛かりをつかんで頂ければ、筆者として望外の喜びである。

謝 辞

原稿発表の機会を与えて下さった学会誌編集委員の横浜市立大学池上貴久教授および前編集委員長の筑波大学山本泰彦教授に心よりお礼申し上げます。また、招待講演の機会を与え、van Vleck変換について議論させて頂いた台湾サンイェットセン大学のShangwu Ding教授に感謝する。海外の学位論文の手配から学問的な議論まで多くの部分を(株)JEOL RESONANCEの同僚諸氏に頼っており、この場をお借りして謝したい。最後にさまざまな情報を提供して頂いた同僚の根本暢明氏に感謝する。

参考文献

- [1] Y. Zur, M. H. Levitt, S. Vega, *J. Chem. Phys.* **78**, 5293 (1983); E. M. Krauss, S. Vega, *Phys. Rev.* **A34**, 333 (1986); A. Schmidt, S. Vega, *J. Chem. Phys.* **96**, 2655 (1992); O. Weintraub, S. Vega, *J. Magn. Reson.* **109**, 14 (1994); S. Vega, "Nuclear Magnetic Probes for Molecular Dynamics", edited by R. Tycko, (Kluwer Academic, 1994), p155; S. Vega, "Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance", edited by D. M. Grant and R. K. Harris (Wiley, 1996), Vol. 3, p2011.
- [2] 例えば、笠原皓司「微分方程式の基礎」朝倉書店、p94。
- [3] G. Floquet, *Ann. Ecol. Norm. Suppl.* **12**, 47 (1883).
- [4] G. W. Hill, *Acta Math.* **8**, 1 (1886).
- [5] F. Bloch, *Z. Phys.* **52**, 555 (1928).
- [6] 例えば、北丸竜三「核磁気共鳴の基礎と原理」共立出版。
- [7] U. Haeberlen, J. S. Waugh, *Phys. Rev.* **175**, 453 (1968); U. Haeberlen, "High Resolution NMR in Solids: Selective Averaging", (Academic, 1976).
- [8] F. Bloch, A. Siegert, *Phys. Rev.* **57**, 522 (1940). 13
- [9] J. Shirley, *Phys. Rev.* **B138**, 979 (1965).
- [10] D. R. Dion, J. O. Hirschfelder, *Adv. Chem. Phys.* **35**, 265 (1976); J. O. Hirschfelder, R. E. Wyatt, R. D. Coalson, "Lasers, Molecules, and Methods", (John Wiley & Sons, 1989).
- [11] M. M. Maricq, *Phys. Rev.* **B25**, 6622 (1981); M. M. Maricq, *Adv. Magn. Reson.* **14**, 151 (1990).
- [12] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, "Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions", (Oxford, 1987), p82, Eqs. (3.2.50) and (3.2.51).
- [13] T. Nakai, C. A. McDowell, *Mol. Phys.* **88**, 1263 (1996).
- [14] T. Nakai, C. A. McDowell, *Chem. Phys. Lett.* **180**, 13 (1991); R. Challoner, T. Nakai, C. A. McDowell, *J. Chem. Phys.* **94**, 7038 (1991).
- [15] A. Kubo, C. A. McDowell, *J. Chem. Phys.* **92**, 7156 (1990); T. Nakai, C. A. McDowell, *J. Chem. Phys.* **96**, 3452 (1992); T. Nakai, C. A. McDowell, *Mol. Phys.* **77**, 569 (1992); S. Ding, C. A. McDowell, *Chem. Phys. Lett.* **288**, 230 (1998); S. Ding, C. A. McDowell, *Mol. Phys.* **98**, 841 (1998); S. Ding, C. A. McDowell, *Ch. J. Phys.* **40**, 429 (2002).
- [16] R. Ramesh, M. S. Krishnan, *J. Chem. Phys.* **114**, 5967 (2001); M. K. Pandey, M. S. Krishnan, *J. Chem. Sci.* **119**, 417 (2007).
- [17] J. H. van Vleck, *Phys. Rev.* **33**, 467 (1929); E. C. Kemble, "The Fundamental Principles of Quantum Mechanics with Elementary Applications", (Dover, 1958), p394; R. N. Zare, "Angular Momentum: Understanding Spatial Aspects in Chemistry and Physics", (John Wiley & Sons, 1988), p277.
- [18] R. Ramachandran, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **122**, 164502 (2005); M. Ernst, A. Samoson, B. H. Meier, *J. Chem. Phys.* **123**, 64102 (2005); J. R. Sachleben, J. Gaba, L. Emsley, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **29**, 30 (2006); M. Leskes, R. S. Thakur, P. K. Madhu, N. D. Kurur, S. Vega, *J. Chem. Phys.* **127**, 24501 (2007); I. Scholz, B. H. Meier, M. Ernst, *J. Chem. Phys.* **127**, 204504 (2007).



中井 利仁 (なかい・としひと)

京都大学理学部卒。同大学院博士課程修了(理学博士)。カナダ ブリティッシュコロンビア大学助手、分子科学研究所非常勤講師、筑波大学講師、東京農工大学生研機構特別研究員、徳島大学助教授などを経て、日本電子株式会社(現(株)JEOL RESONANCE)入社(現職)。物質・材料研究機構外来研究員およびJST研究員(現職、兼任)。

若手ポスター賞表彰

第54回NMR討論会(2015)若手ポスター賞について(報告)

今年度の『若手ポスター賞』では、従来の『若手ポスター賞I』と『若手ポスター賞II』の区別を無くして統合しました。これは、大学や民間企業など広範な研究環境で活躍する若手研究者への柔軟な支援体制を整えるためです。また、特に優秀な発表に与えられる従来の副賞『JEOL RESONANCE賞』に加えて、副賞『大陽日酸賞』を創設しました。大陽日酸(株)から安定同位体の利用の促進を通してNMRの発展に寄与したいとお申し出によるものです。

若手ポスター賞の歴史や応募資格など、詳しくは第54回NMR討論会(2015)のホームページ「若手ポスター賞」(<http://www.nmrj.jp/NMR2015/poster.html>)を御参照下さい。

今回は25名の応募がありました。研究内容などを考慮して、応募者を4つのグループに分け、グループごとに日本核磁気共鳴学会の評議員6名あるいは7名が、規定の選考方針に基づいて応募者の発表を5点満点で採点しました。同時に、大陽日酸賞の趣旨に沿った内容かどうかをyes/noで判定しました。採点結果の各グループの平均点の差が0.5点以上の場合にはグループ間調整をすることにしていたのですが、今回は必要ありませんでした。

最優秀若手ポスター賞1人を選び、賞状を授与し、副賞としてJEOL RESONANCE賞10万円と記念の楯を贈りました。ついで、優秀若手ポスター賞4人を選び、賞状を授与しました。優秀若手ポスター賞4人のうちの2人に大陽日酸賞5万円と記念の楯を、そして2人にJEOL RESONANCE賞5万円と記念の楯を、それぞれ副賞として贈りました。さらに、若手ポスター賞5人を選び、賞状を授与しました。



奥側左から：魏、奥村、田制、角村、西澤、増澤 JEOL AI営本本部長
手前左から：折笠*、山田、神庭、橋川、小松、外山、内藤NMR学会会長
(*大陽日酸メディカル事業本部SI事業部長)

■最優秀若手ポスター賞(JEOL RESONANCE賞)

外山侑樹(東京大学大学院薬学系研究科)

「多量子遷移の緩和速度の差を利用した高分子量タンパク質のマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換の解析法の開発」

■優秀若手ポスター賞（太陽日酸賞）

神庭圭佑（京都大学 エネルギー理工学研究所）

「リアルタイムNMR法の新たな展開—抗HIVタンパク質APOBECG3Gの認識ヌクレオチド、DNA上のスライディング及びエピジェネティクスとの関連に関する新知見—」

山田和哉（大阪大学 蛋白質研究所）

「大腸菌によるユビキチン過剰発現時に合成される単一細胞当りの分子数評価を指向した定量固体NMR法」

■優秀若手ポスター賞（JEOL RESONANCE 賞）

小松功典（理化学研究所 環境資源科学研究センター）

「Pure shift NMRによる生体分子複雑系のデータマイニング高解像度化」

橋川祥史（京都大学化学研究所）

「かご型炭素クラスター C_{60} および $C_{59}N$ に内包された H_2O と H_2 の 1H NMR緩和時間」

■若手ポスター賞

魏 菲菲（理化学研究所 環境資源科学研究センター）

「化学・生物学的統合プロファイリングによる水圏環境プローブ生物の生育特性情報抽出」

奥村 学（京都大学大学院 農学研究科）

「磁場配向微結晶粉末を用いた単結晶法による結晶多形の分析」

田制侑悟（横浜国立大学大学院 工学研究院）

「*In-situ* マイクロ波照射NMRによるマイクロ波加熱におけるエネルギー移動過程の解明」

角村将希（防衛大学校 応用化学科）

「ゴム材料の 1H - T_2 緩和解析：ラプラス逆変換法と主成分解析」

西澤茉由（京都大学大学院 工学研究科）

「NMR $R_{1\rho}$ dispersion 法によるユビキチン二重合体の動的構造特性の研究」

選考委員会の議論の中で、安定同位体利用に限定する副賞を授与することになると、採点の順位付けと齟齬が生じる場合があるとの指摘がありました。幸い今年度の順位付けにおいて問題は生じませんでしたが、今後、検討する必要があります。

各賞担当理事 神田大輔、藤原敏道、山本泰彦

P6

多量子遷移の緩和速度の差を利用した高分子量タンパク質のマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換の解析法の開発

○外山 侑樹^{1,2}, 大澤 匡範¹, 横川 真梨子¹, 嶋田 一夫¹¹東京大学大学院薬学系研究科²日本バイオ産業情報化コンソーシアム**NMR method for characterizing microsecond-to-millisecond chemical exchanges utilizing differential multiple-quantum relaxation in high molecular weight proteins**○Yuki Toyama^{1,2}, Masanori Osawa¹, Mariko Yokogawa¹, and Ichio Shimada¹¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Tokyo, Japan.²Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), Tokyo, Japan

Chemical exchange processes of proteins with the order of microsecond (μsec) to millisecond (msec) are found to be critical for biological functions. Developments of methyl transverse relaxation optimized spectroscopy (methyl-TROSY) have enabled the study of biologically important large proteins, however, the analysis of the μsec to msec chemical exchange processes based on methyl-TROSY principle is still challenging, due to the relaxation properties of slowly relaxing ^1H - ^{13}C multiple quantum (MQ) coherences. Here, we present a new methyl-based NMR method for characterizing the chemical exchanges utilizing differential MQ relaxation. The method enables quantitative evaluations of the chemical exchange processes, involving both ^1H and ^{13}C chemical shift differences, which have been difficult to be characterized by the conventional relaxation dispersion based approaches. The versatility of the methodology is demonstrated with the application to KirBac1.1 with an apparent molecular weight of 200 K.

【序論】

タンパク質は多数の構造の間の化学交換にあり、一過的に形成される存在割合の低い構造が機能に重要な役割を果たしている例が数多く報告されている。特にマイクロ秒 (μsec) からミリ秒 (msec) オーダーの化学交換はフォールディング反応や酵素反応をはじめとする多様な機能とタイムスケールが一致していることから、 μsec から msec オーダーの化学交換を検出し、定量的に解析することはタンパク質の機能を明らかにするうえで重要な課題である。

溶液NMR法はタンパク質の化学交換を原子レベルの分解能で解析することが可能な手法であり、これまで数多くのタンパク質の化学交換の解析と、それに基づく機能メカニズムの解明に応用されてきた。膜タンパク質やタンパク質複合体などに代表される生物学的に重要な高分子量タンパク質を溶液NMR法にて解析する場合、選択的に ^1H , ^{13}C 標識した側鎖メチル基の ^1H - ^{13}C の多量子 (MQ) 遷移を観測するmethyl transverse relaxation optimized spectroscopy (methyl-TROSY) 法による感度向上を利用することが望ましい。しかしながら、methyl-TROSY法に基づき μsec から msec オーダーの化学交換を解析する手法は、MQ遷移を観測する必要があるという制約のために、十分に確立されていない。

既存の手法として唯一、MQ Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 緩和分散法 [1] が報告されているものの、 ^1H と ^{13}C 両核の化学シフト値が変化する部位ではCPMGパルス系列により零量子 (ZQ)

multiple quantum coherence, relaxation, chemical exchange

○とやまゆうき, おおさわまさのり, よこがわまりこ, しまだいちお

遷移と二量子 (DQ) 遷移の寄与が平均化されるため、化学交換が見かけの緩和速度の変化として観測できず、解析対象となるメチル基が大幅に限られるという問題があった。したがって、溶液 NMR 法により高分子量タンパク質の機能メカニズムを明らかとするうえで、側鎖メチル基を対象として包括的な解析が可能な化学交換解析法を開発することが必要であると考えた。

本研究では高分子量タンパク質の側鎖メチル基を対象として、 μsec から msec オーダーの化学交換を解析するための新規 NMR 手法を開発することを目的とした。

【結果】

多量子遷移の緩和速度の差から化学交換の寄与を算出する methyl-HDR 法を考案した。

本研究では DQ 遷移の緩和速度 (R_{DQ}) と ZQ 遷移の緩和速度 (R_{ZQ}) の差 $\Delta R_{\text{MQ}} (= R_{\text{DQ}} - R_{\text{ZQ}})$ が化学交換の存在を鋭敏に反映することに着目した。 ΔR_{MQ} の大きさのうち化学交換に由来する成分 $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ は、2 状態間の化学交換かつ化学シフト差よりも交換速度が大きい場合を仮定した場合、状態間の交換速度 k_{ex} 、マイナー状態の存在割合 p ($0 < p < 0.5$)、 ^1H , ^{13}C の化学シフト差 $\Delta\omega_{\text{H}}$, $\Delta\omega_{\text{C}}$ を用いて、下記の式で近似することができる [2]。

$$\Delta R_{\text{MQ,ex}} = \frac{4p(1-p)\Delta\omega_{\text{H}}\Delta\omega_{\text{C}}}{k_{\text{ex}}}$$

$\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ は ^1H と ^{13}C 両方の化学シフト差に対して比例する。そのため、既存の MQ CPMG 緩和分散法では検出することが困難であった ^1H と ^{13}C 両方の化学シフト差が存在する部位の化学交換を検出し、かつ定量的に評価することが可能である。しかしながら、 ΔR_{MQ} の観測値には $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ だけでなく、メチル基の ^1H と空間的に近接する ^1H , ^2H との双極子-双極子相互作用、ならびにメチル基 ^1H , ^{13}C 間の化学シフト異方性相互作用の交差相関緩和項が同時に観測される。本研究で対象とする高分子量タンパク質においては、前者の寄与が化学交換の寄与 $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ と同程度の大きさになるため、 $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ の定量的な算出が困難であることが問題であった。

そこで、 $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ の寄与のみを選択的に抽出する methyl heteronuclear double resonance 法 (methyl-HDR 法) を考案した (Fig.1)。Methyl-HDR 法は、(1) 化学交換による位相の散逸よりも十分に速い周波数でスピロックすることにより、化学交換の寄与を選択的に抑制し定量すること、(2) 多量子コヒーレンス状態をスピロックするために heteronuclear double resonance (HDR) パルス法 [2] を用いることを特色とし、 $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ を定量的に算出することを可能とする手法である。

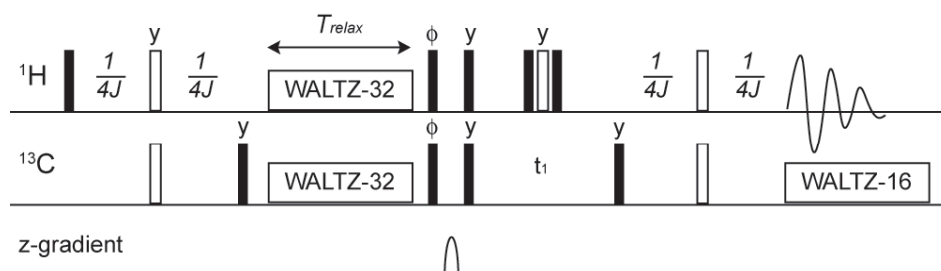


Fig.1 Pulse sequence of methyl-HDR experiment

Phase ϕ is set to y for observing $2\text{C}_x\text{H}_x$ and x for observing $2\text{C}_y\text{H}_y$. WALTZ-32 copposite pulse sequence during T_{relax} is replaced for spin echo sequence for reference experiment.

Fig.1にはmethyl-HDR法のパルスプログラムを示した。メチル基 ^1H - ^{13}C 相関における $2\text{C}_\text{x}\text{H}_\text{x}$ コヒーレンス ($\text{ZQ} + \text{DQ}$) と $2\text{C}_\text{y}\text{H}_\text{y}$ コヒーレンス ($\text{ZQ} - \text{DQ}$) をそれぞれ位相 ϕ を変えることで選択的に観測し、緩和時間 T_{relax} における両コヒーレンスの交差緩和速度から ΔR_{MQ} を算出した。 T_{relax} の間にWALTZ-32コンボジットパルス系列からなるHDRパルスを照射した条件と、HDRパルスを照射しない条件でそれぞれ ΔR_{MQ} を測定し、その差を算出することで化学交換の寄与 $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ を算出した。

モデルケースとしてMBPならびにFFドメインにmethyl-HDR法を適用し、化学交換の寄与 $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ を十分な精度で算出可能であることを明らかにした。また、既存の手法では解析が困難であった部位もmethyl-HDR法により化学交換の寄与を検出できることが分かった。

考案した手法が妥当であることを示すことを目的として、顕著な化学交換が存在しないとされている分子量40 Kのマルトース結合タンパク質 (MBP) のイソロイシン側鎖 $\delta 1$ メチル基にmethyl-HDR法を適用した。各メチル基の $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ を算出した結果、その大きさは全てのメチル基で 2.5 s^{-1} 未満となり顕著な化学交換がないことを支持する結果が得られた。以上より、methyl-HDR法によって疑陽性の $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ が検出されず、 $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ を定量的に算出することができると示された。

次に、基底構造とフォールディング中間構造との間を $2,000 \text{ s}^{-1}$ 程度の交換速度で化学交換していること、ならびに一量子遷移を観測する緩和分散実験から各メチル基の ^1H , ^{13}C 化学シフト差が既知であるHYPA/FBP11 FFドメイン (以降はFFドメインと略記) のイソロイシン側鎖 $\delta 1$ メチル基、ロイシン側鎖 $\delta 1$, $\delta 2$ メチル基、バリン側鎖 $\gamma 1$, $\gamma 2$ メチル基を対象にmethyl-HDR法を適用した。各メチル基の $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ を算出した結果、多くのメチル基で 10 s^{-1} 以上の顕著な $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ が算出され、化学交換が存在することを示す結果が得られた。また、算出された $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ の大きさは既知の化学シフト差を用いて算出した理論値と一致していたことから、methyl-HDR法によって $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ を定量的に算出可能であることが示された。

FFドメインのmethyl-HDR法による解析結果を既存のMQ CPMG緩和分散法の結果と比較した。 ^1H と ^{13}C 両方向の化学シフト変化を伴う残基番号52のロイシン $\delta 1$ メチル基に着目したところ、MQ CPMG緩和分散法ではCPMGパルス周波数依存的な緩和速度の変化が観測されなかったのに対し、methyl-HDR法では 7.1 s^{-1} の顕著な $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ の寄与が検出され、化学交換の寄与を明瞭に検出することが可能であった。化学交換が存在する全10メチル基中、8メチル基で同様にmethyl-HDR法でより顕著に化学交換の寄与を検出できる傾向がみられた。以上の結果から、既存の手法で解析が困難であった部位も、methyl-HDR法によって化学交換を解析できるようになることが示された。

見かけの分子量が約200 Kの膜タンパク質KirBac1.1にmethyl-HDR法を適用し、化学交換が存在する部位を同定することに成功した。

KirBac1.1はヒトにおいて心拍数や神経伝達速度の調節などに関与する内向き整流性カリウムイオンチャネルの類鼻祖菌由来のホモログタンパク質である。膜貫通領域と細胞内領域を含む全333残基からなるサブユニットが4量体を形成し、可溶化のためのミセル分子を合わせると見かけの分子量は200 K程度となる。そこで、methyl-HDR法をKirBac1.1のイソロイシン側鎖 $\delta 1$ メチル基に適用し、高分子量タンパク質でも有効であることを示すこととした。

Methyl-HDR法による解析を行ったところ、全15残基存在するイソロイシンのうち8残基について $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ を算出することが可能であった。各イソロイシンの $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ を比較したところ、残基番号39, 279のイソロイシンには 40 s^{-1} 以上の、残基番号138, 163, 232のイソロイシンには 8.0 s^{-1} を超える顕著な $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ が検出された。これらのイソロイシンは、N末端側の細胞内領域 (残基番号39)、膜貫通ヘリックス (残基番号138)、細胞内領域の β ストランド上 (残基番号163, 232, 279) に位置しており、これらの部位に μsec から msec オーダーの化学交換が存在することが明らかとなった。

以上の結果から、見かけの分子量が200 K程度の高分子量タンパク質であっても、methyl-HDR法により $\Delta R_{MQ,ex}$ を定量的に算出することが可能であり、化学交換が存在する部位を同定できることが示された。

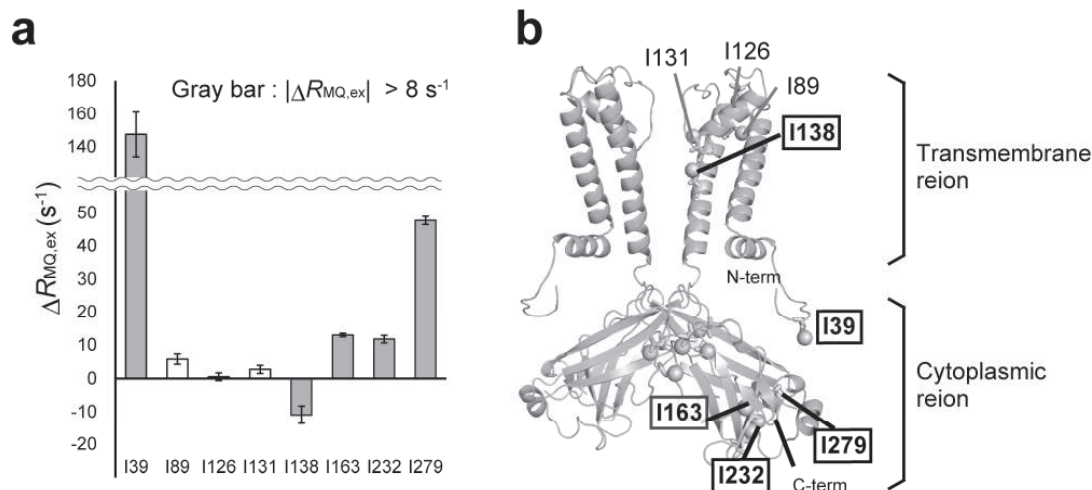


Fig.2 Methyl-HDR analysis of KirBac1.1

(a) Plot of $\Delta R_{MQ,ex}$ rates of Ile methyl groups in KirBac1.1. (b) Ile methyl groups with $|\Delta R_{MQ,ex}|$ values larger than $8 s^{-1}$ are mapped onto the structure of KirBac1.1 (PDB ID: 1P7B) [4].

【考察】

本研究では高分子量タンパク質の側鎖メチル基を対象として、多量子遷移の緩和速度の差における化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ を算出するmethyl-HDR法を考案した。また、考案した手法により十分な精度で $\Delta R_{MQ,ex}$ を算出できること、ならびに見かけの分子量が約200 Kの高分子量タンパク質であっても解析できることを示した。

高分子量タンパク質で化学交換を解析する既存のMQ CPMG緩和分散では 1H , ^{13}C の両方の化学シフト差がある部位で解析が困難であったのに対し、methyl-HDR法において算出する $\Delta R_{MQ,ex}$ は 1H , ^{13}C の両方の化学シフト差がある部位で顕著に変化することを特徴とする。これまでにMQ CPMG緩和分散では解析できなかった部位が解析可能となることにより、高分子量タンパク質の化学交換の解析の適用範囲を大きく拡大するものであると考える。

さらに、メチル基の 1H , ^{13}C 化学シフト値はそれぞれ近接する芳香環の配向、側鎖の χ 角と関連することが知られている。そのため、 $\Delta R_{MQ,ex}$ は化学交換の存在を鋭敏に反映するのみならず、状態間の遷移に伴い生じるタンパク質の構造変化の情報を含む。 $\Delta R_{MQ,ex}$ の符号や大きさを結晶構造と対応させて評価することにより、一過的にしか形成されないマイナー状態の構造的特徴を議論することが可能となり、タンパク質の動的な構造変化が機能を発揮する分子機構の解明に繋がることが期待される。

【引用文献】

- [1] Korzhnev, D. et al., *Journal of American Chemistry Society* **126**, 3964-3973, 2004.
- [2] Kloiber, K., and Konrat, R., *Journal of Biomolecular NMR* **18**, 33-42, 2000.
- [3] Ulzega, S. et al., *Journal of Chemical Physics* **131**, 224503, 2009.
- [4] Kuo, A. et al., *Science* **300**, 1922-1926, 2003.

P20

リアルタイムNMR法の新たな展開

—抗HIVタンパク質APOBEC3Gの認識ヌクレオチド、DNA上のスライディング及びエピジェネティクスとの関連に関する新知見—

○神庭 圭佑^{1,2}, 永田 崇^{1,2}, 片平 正人^{1,2}¹京都大学 エネルギー理工学研究所²京都大学大学院 エネルギー科学研究科**Novel aspects of real-time NMR methods –New findings in anti-viral protein APOBEC3G concerning sequence-recognition and sliding on the DNA, and its involvement in epigenetics–**○Keisuke Kamba^{1,2}, Takashi Nagata^{1,2}, and Masato Katahira^{1,2}¹*Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Japan.*²*Graduate School of Energy Science, Kyoto University, Japan.*

Human APOBEC3G (A3G), an anti-viral factor that restricts HIV infection, deaminates cytosine (C) into uracil (U) within the viral cDNA. Although the structures of several constructs of A3G were determined, the mechanism of the interaction between A3G and single-stranded DNA (ssDNA) are yet to be elucidated. We previously developed a real-time NMR method that can monitor A3G's deamination reaction involving sliding along DNA. Here, we present new findings obtained by this method. Firstly, we have shown that A3G recognizes 5 consecutive nucleotides of ssDNA. Secondly, the electrostatic interaction between A3G and the phosphate backbone of ssDNA turns out to be the key for sliding. Finally, we have applied this method to 5-methylcytosine (5mC), an epigenetic marker, or 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) containing DNA and demonstrated for the first time that A3G can deaminate 5mC.

【序】 ヒトAPOBEC3Gタンパク質 (A3G) はHIVのゲノムに変異を導入し無力化する抗ウイルス因子である。A3Gは一本鎖DNA中のシトシンを脱アミノ化しウラシルに変換する¹⁾。特にシトシントリプレット (CCC) 配列の3番目のシトシンに対し強い活性を示す。CCC配列が複数ある場合、A3Gは5'端に近いCCC配列ほどより強く脱アミノ化する (3'→5' polarity)。これまでに我々はA3Gの脱アミノ化反応をリアルタイムNMR法により実時間計測する方法を確立した。そして酵素活性がスライディングの方向に依存することを導入する事で、3'→5' polarityが説明できることを示した²⁾。しかしA3GとssDNAの相互作用は高度に動的なうえ、互いの結合が弱い (解離定数100 μM~1 mM程度) ため、いくつかのグループによりA3G単体の構造が決定されているにも関わらず、A3GによるCCC配列の認識機構及びスライディング時におけるA3G-ssDNA相互作用機構については、未だ不明である¹⁾。本研究では、リアルタイムNMR法を用いてさまざまな核酸基質と溶媒条件でA3Gの脱アミノ化反応活性を比較し、A3Gと相互作用する1本鎖DNA上の領域を特定した³⁾。またスライディングを支える相互作用に関する情報も得た³⁾。近年、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる修飾塩基 (5-メチルシチジン; 5mC、5-ヒドロキシメチルシチジン; 5hmC) もA3Gの基質となることが示唆されている⁴⁾。そこでA3Gがこれらの修飾塩基を脱アミノ化するかどうかもリアルタイムNMR法により検証した³⁾。

リアルタイムNMR法, 酵素反応, 認識部位

○かんばけいすけ, ながたたかし, かたひらまさと

〔結果と考察〕 ①CCC配列を1つ含む10残基のDNAに関し、一残基ずつ系統的にRNAに置換して脱アミノ化活性を比較したところ、CCCとその前後1つを置換した際に顕著な活性の低下がみられた(Fig. 1)³⁾。これによりA3Gは連続した5ヌクレオチドを認識することが明らかになった。

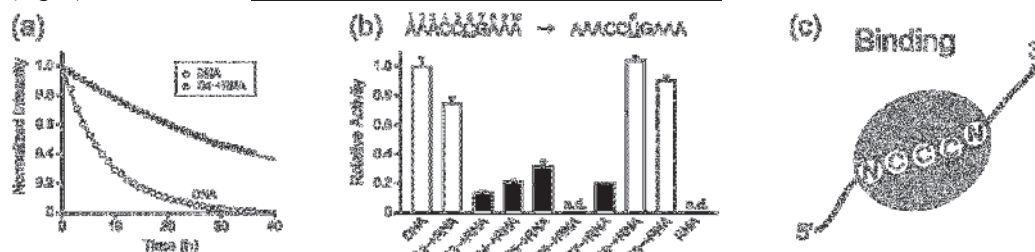


Fig. 1 Deamination for substrates containing a single DNA→RNA substitution. (a) Time course of the decay of C6 due to deamination. (b) Relative deamination activity. (c) Scheme of the nucleotide recognition.

②二つのCCCをリンカーでつないだ38merの1本鎖DNAを基質として、3'→5' polarityに関する解析を行った。リンカー配列をRNAあるいはAbasic DNAに置換しても、3'→5' polarityに変化は見られなかった。また3'→5' polarityは塩濃度が高くなるに従い減少し、逆に塩濃度が低い程上昇した(Fig. 2)³⁾。以上の結果は、高塩濃度ではリン酸基が関与した静電相互作用が弱まりA3GがDNAから容易に脱落してスライディングが中断されてしまうが、低塩濃度では静電相互作用が強まりスライディングが有効に機能し、この結果高い3'→5' polarityがもたらされたと解釈される。

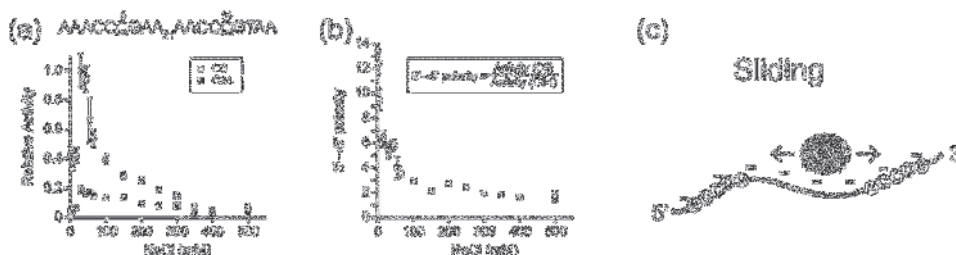


Fig. 2 The effect of NaCl on the deamination activity and 3'→5' polarity. (a) Relative deamination activity. (b) 3'→5' polarity. (c) Scheme of the sliding.

③CX配列 (ただしXはC、5mC、または5hmC) を1つ含む10残基のDNAを基質とし、A3Gの脱アミノ化活性を比較した。A3Gが5mCを脱アミノ化することを、リアルタイムNMR法により初めて検出できた (Fig. 3)³⁾。一方5hmCは脱アミノ化されない事も分かった (Fig. 3)。

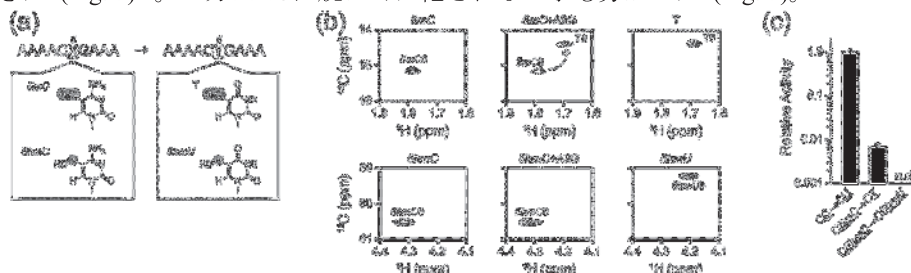


Fig. 3 Deamination reactions for substrates containing 5mC or 5hmC. (a) Scheme of the experiments. (b) ¹H-¹³C HSQC spectra of DNA containing 5mC (upper) or 5hmC (lower). (c) Relative deamination activity.

- 〔参考文献〕 1) Aydin, H. *et al.*, *Structure* **22**, 668-684, 2014.
2) Furukawa, A. *et al.*, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **53**, 2349-2352, 2014.
3) Kamba, K. *et al.*, *PLoS One* **10**, e0124142, 2015.
4) Bhutani, N. *et al.*, *Cell* **146**, 866-872, 2011.

P60

大腸菌によるユビキチン過剰発現時に合成される単一細胞当りの分子数評価を指向した定量固体NMR法

○山田 和哉¹、江川 文子¹、藤原 敏道¹

¹大阪大学・蛋白質研究所

Quantitative solid-state NMR method for counting the number of molecules synthesized during the overexpression of ubiquitin in an *Escherichia coli* cell

○Kazuya Yamada¹, Ayako Egawa¹, and Toshimichi Fujiwara¹

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

The quantitative analysis of the biological systems in a living cell is essential to understanding lives. However there are little methods to obtain the quantitative data. Here, we report a method for counting the number of molecules synthesized during the overexpression of ubiquitin in an intact *Escherichia coli* cell by using quantitative solid-state NMR. On the basis of the high-resolution ¹³C NMR of the cells and the membrane fraction of the cells, it was revealed that not only ubiquitin but also peptidoglycans and lipids were synthesized during the overexpression. Then, the amount of molecules were evaluated from the integral signal intensities. The number of the cells in a sample were counted by a cell counter. From these results, we calculated the number of the molecules in the cell.

【序論】

生命システムを定量的に測定・解析することは、生命の理解に必須である。しかしながら、これまで生命システムを定量的に測定し、解析できる手法は存在しないため、現状ではこれらの情報は全く得られていない。そこで、筆者らは固体NMRを用いて上記の課題を解決

できると考えた。なぜなら、固体NMRは低感度だが、低温では原子数とシグナルの積分値が完全に比例し、運動性に関わらず全ての¹³Cや¹⁵N原子を観測し、原子分解能の情報を得ることが可能であるからである。今回は定量固体NMR法を用いて、IPTGを用いた大腸菌過剰発現時に一細胞あたり合成される分子数を計数し、細胞環境を議論することに成功したので、以下に報告する。

手法の概略としては、まず大腸菌をMASローターに詰め、¹³C-NMR 1次元スペクトルを測定した。その信号積分値と外部標準を用いて作成した検量線から、MASローター中の炭素原子数を求め、さらに分子数に換算した。一方、MASローター中に存在する菌体数はセルカウンターを用いて計数した。最後にMASローター中の分子数を大腸菌数で割ることで、一細胞あたり合成された分子数を見積もることが可能となった。(Fig. 1)

【方法】

実験では、ユビキチンを組み込んだpET21cプラスミドをRosetta (DE3)に形質転換した大腸菌を用いた。培養は、前培養及び本培養を非標識のLB及びM9最少培地で行い、発現誘導直前に菌体を¹³C/¹⁵N標識されたM9最少培地に移し、発現誘導時に合成された分子のみ¹³C/¹⁵N標識される手法を用いた。¹ 発現誘導時間は4時間とした。また、膜画分は菌体をSDS存在下高温で処理し、遠心分離

定量NMR、in-cell 固体NMR、分子数定量

○やまだかずや、えがわあやこ、ふじわらとしみち

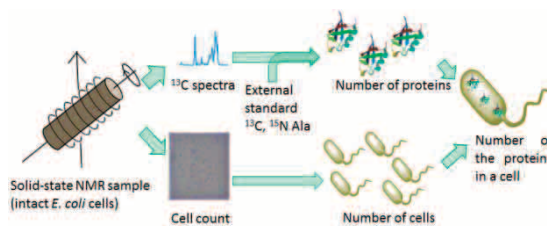


Fig. 1 Outline of the research

離によって調製した。² 培養した菌体は集菌後に生理食塩水で洗浄後、直接MASローターに詰め、膜画分も調製後直接MASローターに詰め、測定に用いた。全ての測定でMASローターは外形4.0 mm、容量35 μ Lのものを使用した。¹³C 1Dスペクトルの測定では、定量性を確保するためにCPを含まないパルス系列(DD-MAS)を用い、縦緩和時間の6倍の待ち時間を各測定間に設けた。¹⁵N 1Dスペクトルの測定ではCP-MASを用い、同様の待ち時間を各測定間に設けた。2D ¹³C-¹³C双極子相関スペクトル(DARR)測定は混合時間60 ms、温度 - 60度でJEOL社の500MHz装置を用いた。

【結果と考察】

菌体の¹³C 1Dスペクトルでは、殆どのピークがユビキチンのシグナルと一致したが、脂質由来の脂肪族炭素と糖鎖由来の炭素の信号も観測された。また、2D DARR測定でもユビキチンの他に糖鎖由来の信号が観測された。(Fig. 2) これらの結果より、ユビキチン過剰発現でユビキチン以外にペプチドグリカンなど糖鎖を含む分子も合成されていることが強く示唆された。続いて、糖鎖由来のシグナルがペプチドグリカン由来であることを確認するために、膜画分の¹³C 1D測定と 2D DARR測定を行った。(Fig. 3) 結果、膜画分の糖鎖由来シグナルと菌体の糖鎖由来ピークは完全に一致し、ユビキチン過剰発現時に合成された糖鎖は、膜画分即ちペプチドグリカン由来であることが示された。

一細胞あたりが合成した分子数の見積もりは以下のように計算した。まず、細胞の¹³C 1Dスペクトルを、ユビキチン、脂質及びペプチドグリカンのスペクトルを用いて、フィッティングした。次にそれぞれのスペクトルの積分値を求め、外部標準の¹³C 1Dスペクトルから求めた積分値と炭素原子数の比を用いて、MASローター内の炭素原子数に換算した。その値を、それぞれの分子内に存在する炭素原子数と、MASローター内の大腸菌数で割ることで、大腸菌1細胞当りの分子数に換算し、Table. 1にまとめた。

最後に、発現誘導時間を変えて集菌した菌体及びそれらの膜画分を用いて、発現誘導中に合成される分子数の時系列解析を行った。結果、1細胞当りの¹³C原子数は発現誘導後1時間ではほぼ一定数になったのに対し、¹⁵N原子数は増加し続けた。これは、炭素源が細胞に早く取り込まれ、アミノ酸前駆体の合成に時間がかかるのに対し、窒素源はアミノ酸前駆体の合成後にゆっくりと取り込まれ、素早くタンパク質に変換されていることを示唆している。

今回のNMR実験で定量的に得られた分子数は、大腸菌細胞の培地からの炭素の取り込み率、ユビキチンの細胞体積に占める割合、ユビキチン合成に関与するリボソームの個数などに関する情報を与える。これらの情報を基に、発現誘導時の大腸菌の状態についての議論を行う予定である。

以上より、本研究ではタンパク質過剰発現時に大腸菌1細胞が合成する分子数を、定量分析可能な固体NMRを用いて見積もった。この結果は大腸菌の分子の取り込みや合成能力を評価し、大腸菌を理解する上で重要な結果である。また、大腸菌のシステム生物学を議論するのに必要不可欠なデータとなる。

【引用文献】

1) Ikeya, T. *et al. Nature Protocols*, **2010**, 5, 1051. 2) Glauner, B. *et al. J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 10088.

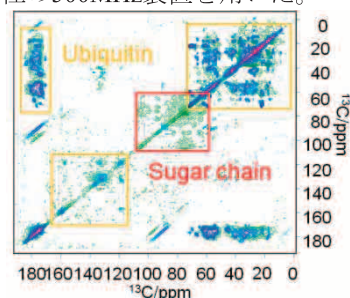


Fig. 2 2D DARR spectra of whole cells (white) and ubiquitin (black)

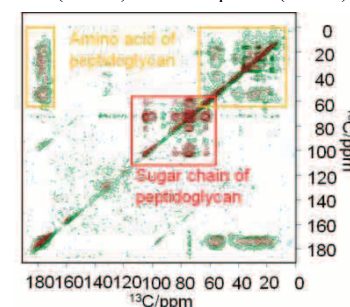


Fig. 3 2D DARR spectra of whole cells (white) and membrane fraction (black)

Table. 1 The number of molecules in one cell

Ubiquitin (molecules / cell)	$(9.5 \pm 0.4) \times 10^6$
Lipid (molecules / cell)	$(1.62 \pm 0.09) \times 10^7$
Peptidoglycan (units / cell)	$(1.39 \pm 0.04) \times 10^7$

P34

Pure shift NMRによる生体分子複雑系のデータマイニング高解像度化

○小松 功典^{1,2}, 菊地 淳^{1,2,3}¹ 理化学研究所 環境資源科学研究センター, ² 横浜市立大学大学院 生命医科学研究科, ³ 名古屋大学大学院 生命農学研究科

High-Resolution Data Mining of Biological Molecular Complexes using Pure Shift NMR

○Takanori Komatsu^{1,2} and Jun Kikuchi^{1,2,3}¹ RIKEN CSRS, Japan² Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Japan³ Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Japan.

Pure shift NMR techniques were applied in the NMR metabolome analysis to enhance performance in data mining process. As a feasibility study, pure shift NMR spectra of water soluble metabolites in ripening fruits of *Persea americana* were recorded as fine ¹H-NMR spectra in which there was less spectral overlap than conventional way. Especially in sugar region of these spectra, signals from sucrose, preiseitol, pectin digests were successively resolved in pure shift NMR spectra. And these spectra also indicated dynamic sugar metabolic change in ripening fruits in which pectin digests increased and energy substrates decrease with ripening. And we will discuss how pure shift NMR spectra improve the data mining process in metabolomics.

【緒言】NMRメタボロミクスでは、多検体から得られた¹H-NMRスペクトルを数値マトリックスとして扱い、多変量解析をおこなうことで特徴的な変数を探索する。NMRには、溶液・固体に関わらず混合物を非分離のまま計測できる利点があるが、一方、混合物ではNMRシグナルのオーバーラップが問題となる [1-5]。計測スペクトル上でNMRシグナルがオーバーラップした場合、その化学シフト変数は、多成分の合成となるため、個々の成分の変動を正確に反映しない。スペクトルの分解能を向上させることで、個々の成分の変動をより正確に反映したマトリックスを取得することが可能となり、後の多変量解析において、より成分の変動を反映した結果が期待できる。

NMRスペクトルの分解能を向上させる試みとして、磁石の高磁場化が挙げられる。NMRシグナルのオーバーラップには、スピン-スピン結合によるシグナルの分裂が問題となる。2次元J分解スペクトル (2D-J) を、投影化した1次元スペクトルを利用することで、シグナルの分裂が取り除かれるため、結果的に高分解能化と同じような効果が得られる [6]。しかしながら、通常の2次元J分解スペクトルは絶対値モードでフーリエ変換する必要があるため、スペクトルの定量性および分散成分の混入に伴う幅広化が問題である。

そこで、本研究ではPCYCHE [7]やZangger-Sterk (ZS) 法 [8]などのpure shift法に着目した。Pure shift法では、磁場勾配とシェープドパルスの巧みな組み合わせによって水素核間の同種核デカップリングをおこなう。この方法では、分解能において有利な吸収型の波形でNMRシグナルが取得でき、なおかつ、定量性はある程度担保されることが報告されている。本研究では、種々のpure shift法による超高分解能のNMRスペクトルをNMRメタボロミクスへと適用した。糖は、化学構造の類似によってNMRシグナルのオーバーラップが激しく、これまでのNMRメタボロミクスでは解析が困難であった。そこで、クリマクテリック型果実のアボカド (*Persea americana*) の追熟過程における水溶性糖が増減する系をモデル試料としてpure shift NMRの有用性を実証した (Figure 1)。

PSYCHE, multivariate analysis, sugar mixture

○こまつたかのり, きくちじゅん

【実験】

PSYCHE, ZS, PSYCHE-TOCSY [9], および pure shift NMR の再構成プログラムは Manchester NMR methodology group の web ページ (<http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk/>) から、ZS による吸収モードの 2D-J (ZS-Jres) [10] のパルスプログラムは、Keeler group の web ページ (<http://www-keeler.ch.cam.ac.uk/>) から入手した。パルスシーケンスによるスペクトルの比較は、ナンヨウアブラギリ (*Jatropha curcas*) の種子の水溶性代謝産物を用いた。糖変動代謝のモデル試料として *P. americana* を使用した。市販されている *P. americana* の果実を購入した。果実は 20°C の恒温器に静置し、自発的に追熟させた。購入後、定期的に試料を回収し直ちに凍結した。果実から水溶性画分を抽出し、乾固した後に、リン酸緩衝液に再溶解させ NMR 計測をおこなった。

【結果と考察】

まず、種々の pure shift NMR 法から NMR メタボロミクスに適切な計測法の選定をおこなった。PSYCHE, ZS, ZS-Jres, および絶対値モードの 2D-J を投影した 1 次元スペクトル (Abs-Jres) による

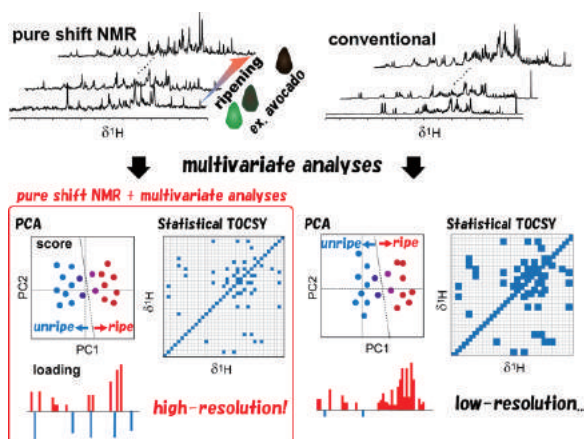


Figure 1. Concept: high-resolution data mining of biological molecular complexes using pure shift NMR.

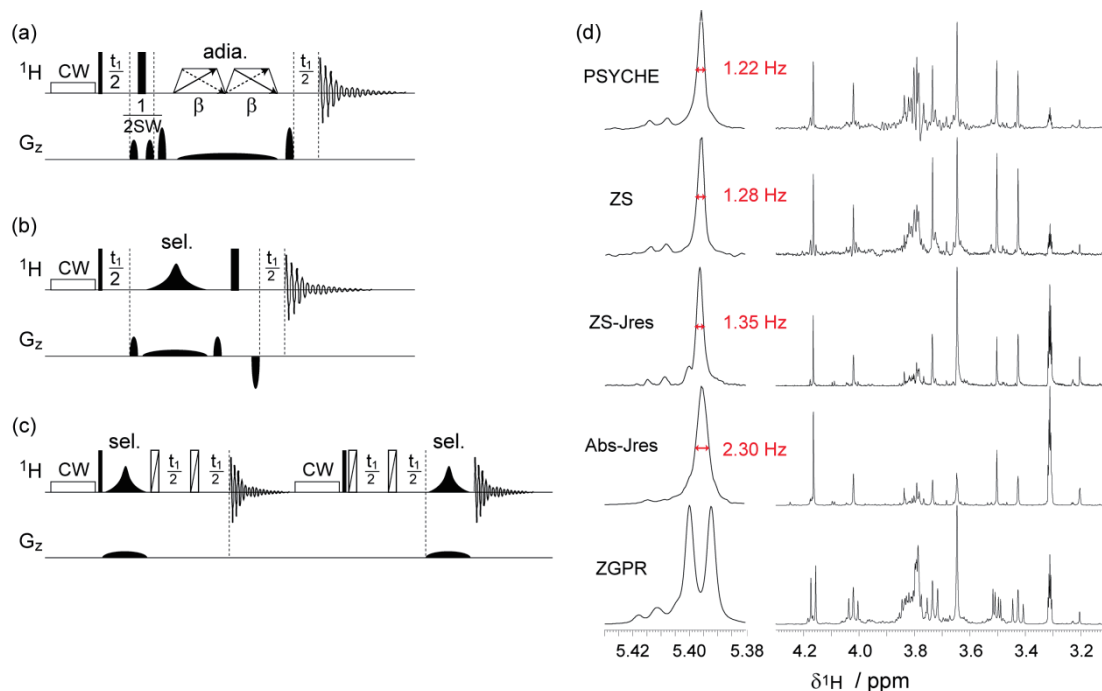


Figure 2. Comparison of pure shift NMR method and J-resolved spectroscopy. Pulse sequences of (a) PSYCHE, (b) ZS, and (c) ZS-Jres. See detail in these original papers [4,5,6]. (d) Spectra of water soluble metabolites extracted with kernel of *Jatropha curcas* recorded by PSYCHE, ZS, ZS-Jres, absolute-mode J-res, single pulse with presaturation. In PSYCHE spectrum, two 20° adiabatic pulse (β) were used under 79.5 mG/mm of field gradient along with z-axis. In ZS and ZS-Jres spectra, gauss-shaped 180° selective pulse were used under 79.5 mG/mm of field gradient along with z-axis.

Jatropha curcas の種子の水溶性代謝産物の ^1H -NMR スペクトルを **Figure 2** に示す。PSYCHE, ZS, および ZS-Jres のスペクトルの線幅は, Abs-Jres のそれと比較し小さかった (**Figure 2(d)**)。これは, 前述したように Abs-Jres では sine-bell 関数を適用したとしても, 分散波形によって幅広化してしまうためである。また, スペクトルの感度は Abs-J, PSYCHE, ZS, ZS-J の順であった。pure shift NMR 法では, 大多数の核スピンを受動スピンとして検出しないため低感度化が避けられない。Keeler らによると Abs-Jres における ZS 能動スピンは 0.3% 程度と推定されており (これは原理上, 選択パルスの励起幅, グラジエント強度に依存する, **Figure 2(b,c)**) ZS も同程度であることが予想される [10]。一方, PSYCHE では 20 度の 2 つの小角プリップ角パルス (β) によって核スピンを反転させた場合, 能動スピンは $\sin^2(20^\circ) \times 100 = 11.7\%$ 程度であり ZS-Jres および ZS と比較し, 10 倍以上の感度が期待できる (**Figure 2(a)**) [6]。低濃度代謝産物の検出のために感度は必要不可欠であるため, PSYCHE 法を NMR メタボロミクスに採用した。

PSYCHE-TOCSY スペクトルを使って *P. americana* 中の水溶性糖の同定をおこなった (**Figure 3**)。PSYCHE-TOCSY スペクトルでは, F1 において PSYCHE を適用し, indirect covariance 法でプロセスすることにより F1 および F2 の両軸で J_{HH} による分裂がないシグナルが得られるため [9], オーバーラップが激しい糖の同定が容易になった。結果として, sucrose, ペクチンの分解産物 (galacturonic acid, homogalacturonine acid, arabinooligosaccharide), C7 糖アルコールの perseitol (および C7 糖の mannoheptuose) が同定された。これまでに ^{13}C による安定同位体標識をおこなうことでより化学シフトの分離がよい ^{13}C -NMR による生体分子の同定が報告されている [1-5]。しかしながら, 安定同位体標識実験は, コストが高く, また, 安定同位体標識できる試料系は, 実験室系の試料に限られる。一方, 今回示した PSYCHE-TOCSY 法による代謝産物の同定は, 天然存在比が高い ^1H のみを利用するため, 安定同位体標識の必要がなく, 適用範囲が広い。

未熟, 半熟, 熟成した *P. americana* の果実の水溶性糖の 1D-PSYCHE スペクトルおよび presaturation したシングルパルスのスペクトルを **Figure 4** に示す。1D-PSYCHE スペクトルでは, 糖のシグナルが分離し, 熟成に伴いペクチン分解産物が増大が確認できた。果実の熟成過程の生化学研究によると, 熟成は, エチレン濃度の増大によってはじまり, つづいて, ペクチンメチルエステラーゼやポリガラクトツロナーゼなどの活性が増大しペクチンが分解し, 1次壁が崩壊することで果実が軟化することが明らかになっている [11]。したがって, 今回観測されたペクチン分解産物の増大は, この知見と合致する。一方, perseitol および mannoheptuose の C7 糖は, $^{14}\text{CO}_2$ を使ったトレース実験から, 主な光合成産物のひとつであることが判明しており, また, 熟成を抑止する働きが推定されている [12]。しかしながら, 今回得られた結果からは, perseitol 量の変動の傾向が捉えられていない。多検体の計測をおこない, この傾向にも着目して解析する予定である。

シングルパルスのスペクトルではこれらの糖の信号のオーバーラップが激しいため多変量解析からこれらの情報を引き出すのは困難であるが, PSYCHE スペクトルを使うことでこれらの情報

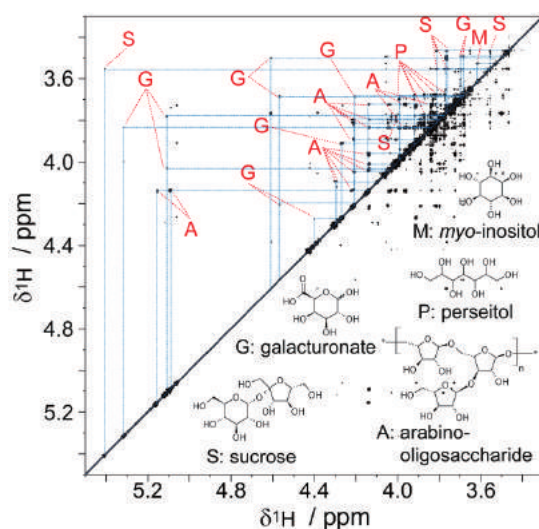


Figure 3. Resonance assignment and metabolite identification in PSYCHE-TOCSY spectrum. 50 ms of spinlock was used, and other parameters were the same as PSYCHE in Figure 2. A, G, M, P, and S represent resonance from arabinooligosaccharide, galacturonate, myo-inositol, perseitol, and sucrose, respectively.

を引き出すことができるようになることが期待できる。討論会当日は、PSYCHEがいかにデータマイニングを改善できるかを討論する。

【引用文献】

- [1] Komatsu, T., Kobayashi, T., Hatanaka, M., Kikuchi, J., “Profiling Planktonic Biomass Using Element-Specific, Multicomponent Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy”, *Environ. Sci. Tech.* **49** (2015) 7056-7062.
- [2] Komatsu, T., Ohishi, R., Shino, A., Akashi, K., Kikuchi, J., “Multi-spectroscopic analysis of seed quality and ^{13}C -stable-isotope monitoring in initial growth metabolism of *Jatropha curcas* L.”. *Metabolites* **4** (2014) 1018-1033.
- [3] Komatsu, T. and Kikuchi, J., “Comprehensive Signal Assignment of ^{13}C -Labeled Lignocellulose Using Multidimensional Solution NMR and ^{13}C Chemical Shift Comparison with Solid-State NMR”, *Anal. Chem.* **85** (2013) 8857-8865.
- [4] Komatsu, T. and Kikuchi, J., “Selective Signal Detection in Solid-State NMR Using Rotor-Synchronized Dipolar Dephasing for the Analysis of Hemicellulose in Lignocellulosic Biomass” *J. Phys. Chem. Lett.* **4** (2013) 2279-2283.
- [5] Komatsu, T., Ohishi, R., Shino, A., Kikuchi, J., “Metabolomic structure compiling by 2D and 3D-NMR connectivities using ^{13}C -labeled tree, *Rhododendron japonicum*” (in prep., 第53回NMR討論会要旨P)
- [6] Ludwig, C., J. Easton, M., Lodi, A., Tiziani, S., Manzoor, S., Southam, AD., Byrne, JJ., Bishop, LM., He, S., Arvanitis, TN., Günther, UL., Viant, MR., “Birmingham Metabolite Library: A publicly accessible database of 1-D ^1H and 2-D ^1H J-resolved NMR spectra of authentic metabolite standards (BML-NMR)” *Metabolomics* **8** (2012) 8-18.
- [7] Foroozandeh, M., Adams, RW., Meharry, NJ., Jeanneratz, D., Nilsson, M., Morris, GA., “Ultrahigh-resolution NMR Spectroscopy” *Angew. Chem. Int.* **53** (2014) 6990-6992.
- [8] Zangger, K., Sterk, H., “Homonuclear Broadband-Decoupled NMR Spectra” *J. Magn. Reson.* **124** (1997) 486-9.
- [9] Foroozandeh, M., Adams, RW., Nilsson, M., Morris, GA., “Ultrahigh-resolution Total correlation NMR Spectroscopy” *J. Amer. Chem. Soc.* **136** (2014) 11867-11869.
- [10] Pell, AJ., Keeler, J., “Two-dimensional J-spectra with absorption-mode lineshapes” *J. Magn. Reson.* **189** (2007) 293-299.
- [11] Bapat, VA., Trivedi, PK., Ghosh, A., Sane, VA., Ganapathi, TR., Nath, P., “Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene” *Biotech. Adv.* **28** (2010) 94-107.
- [12] Lui, X., Sievert, J., Arpaia, L., Madore, A., “Postulated Physiological Roles of the Seven-carbon Sugars, Mannoheptulose, and Perseitol in Avocado” *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **127** (2002) 108-114.

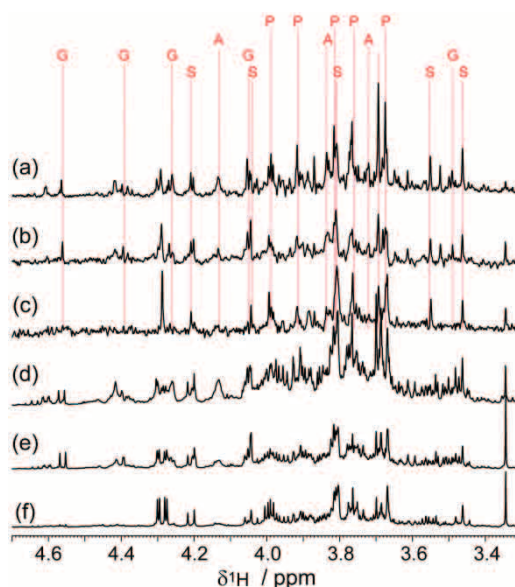


Figure 4. PSYCHE and conventional single pulse spectra of water soluble metabolites from (a, d) dark-ripe, (b, e) medium-ripe, and (c, f) flesh *P. americana*. (a, b, c) PSYCHE and (d, e, f) conventional single pulse spectra. Abbreviations in the spectrum were agreed with Figure 3.

P48

かご型炭素クラスター C_{60} および $C_{59}N$ に内包された H_2O と H_2 の 1H NMR緩和時間○橋川 祥史¹, 村田 理尚¹, 若宮 淳志¹, 村田 靖次郎^{1,2}¹京大化研²JSTさきがけ 1H NMR Relaxation Times of H_2O and H_2 Entrapped inside Carbon-Cluster Cages of C_{60} and $C_{59}N$ ○Yoshifumi Hashikawa,¹ Michihisa Murata,¹ Atsushi Wakamiya,¹ and Yasujiro Murata^{1,2}¹Institute for Chemical Research, Kyoto University.²JST-PRESTO.

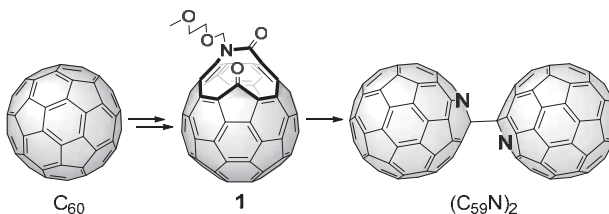
Fullerene C_{60} is a caged carbon-cluster with an internal space which is suitable for accommodating a small atom or molecule. We have already synthesized endohedral fullerenes such as $H_2@C_{60}$,¹ $He@C_{60}$,² and $H_2O@C_{60}$ ³ by using organic chemical reactions. Nitrogen doping of the carbon cage of C_{60} is expected to have an appreciable influence on the nature inside the cage. N-doped fullerene $C_{59}N$ is known as the only heterofullerene for which organic synthetic methods have been established.⁴ In this work, we focused on endohedral $C_{59}N$ and developed synthetic methods of $H_2O@C_{59}N$ and $H_2@C_{59}N$ in macroscopic scale. To elucidate the nature of inner surface of $C_{59}N$, 1H NMR relaxation times of $H_2O@C_{59}N$ and $H_2@C_{59}N$ were measured as well as $H_2O@C_{60}$ and $H_2@C_{60}$. The relaxation time T_1 of $H_2O@C_{59}N$ was found to be three times longer than that of $H_2O@C_{60}$ despite almost no difference in T_1 values between $H_2@C_{59}N$ and $H_2@C_{60}$, suggesting the electrostatic interaction between the nitrogen atom and entrapped H_2O .

序論 フラーレン C_{60} は、直径約3.7 Åの内部空間をもつかご型カーボンクラスターであり (Scheme 1), 小分子を包接することができる。当研究室では、有機化学的手法を用いて水素分子¹やヘリウム原子², 水分子³などを内部に導入した内包フラーレンの合成に取り組んできた。フ

ラーレン cage を構成する60個の炭素原子のうち、1つのみを窒素原子に置き換える手法が報告されており⁴, 形式的に $C_{59}N$ と表記されるこのフラーレンはアザフラーレンと呼ばれる (Scheme 1)。

本研究では、フラーレン cage への窒素原子のドーピングに起因するフラーレン骨格内部の性質の変化を明らかにするために、 $C_{59}N$ の内部空間に小分子を導入する有機化学的手法を開発した。また、内包小分子として、フラーレン cage 上の窒素原子との相互作用が期待される水分子および相互作用をほぼ無視できる水素分子を選定し、NMRアクティブな内包小分子のプロトン核磁気緩和時間を測定することにより、 $C_{59}N$ 骨格内部の性質について考察した。

結果と考察 小分子内包 $C_{59}N$ を合成するために、(1) 小分子内包 C_{60} から直接誘導する方法、(2) 前駆体**1**の11員環開口部を拡大し、小分子を導入した後、元の大きさの開口部まで閉環し⁵, $C_{59}N$ 骨格を構築する方法の2通りの手法を開発した。合成した $H_2O@(C_{59}N)_2$, $H_2@(C_{59}N)_2$ の 1H NMRを測

Scheme 1. Synthesis of aza fullerene ($C_{59}N$)₂ from fullerene C_{60} 

○はしかわよしふみ, むらたみちひさ, わかみやあつし, むらたやすじろう

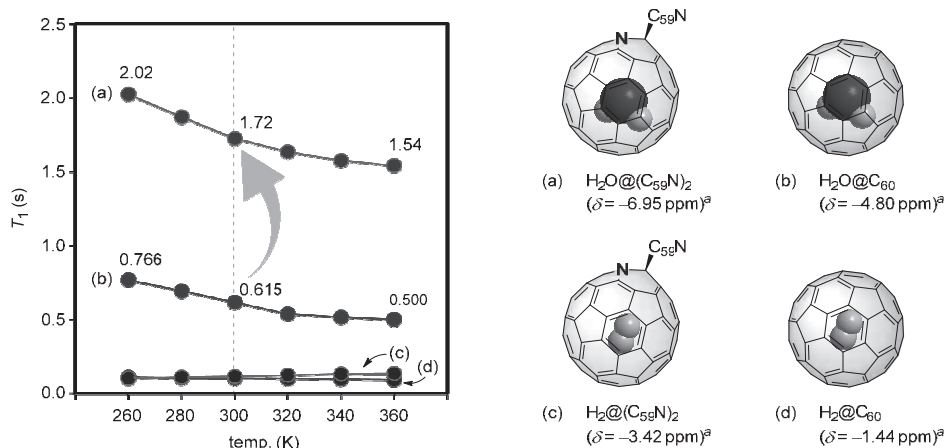


Figure 1. The spin-lattice relaxation times T_1 (500 MHz, in ODCB- d_4 , measured by inversion recovery method) of (a) $\text{H}_2\text{O} @ (\text{C}_{59}\text{N})_2$, (b) $\text{H}_2\text{O} @ \text{C}_{60}$, (c) $\text{H}_2 @ (\text{C}_{59}\text{N})_2$, and (d) $\text{H}_2 @ \text{C}_{60}$. ^a 300 K.

定した結果、 C_{59}N 骨格に内包された小分子のプロトンシグナルは、 C_{60} に比べより強く遮蔽された高磁場領域に観測された (Figure 1). また、 $\text{H}_2\text{O} @ (\text{C}_{59}\text{N})_2$ のプロトンシグナルの半値幅は1.6 Hzであるのに対し、 $\text{H}_2 @ (\text{C}_{59}\text{N})_2$ は4.1 Hzとブロードニングしていることがわかった。

そこで、より詳細に内包小分子の挙動を調べるために、260–360 Kの温度範囲においてスピン格子緩和時間 T_1 を測定した (Figure 1). その結果、 $\text{H}_2 @ \text{C}_{59}\text{N}$ の T_1 は $\text{H}_2 @ \text{C}_{60}$ とほぼ同程度であったにも関わらず、 $\text{H}_2\text{O} @ \text{C}_{59}\text{N}$ の T_1 は $\text{H}_2\text{O} @ \text{C}_{60}$ の約3倍の値をもつことがわかった。これは、内包された水分子とフラーレン骨格上の窒素原子との間に何らかの相互作用が存在することを示している。想定される相互作用として、(1) 水素結合に由来する $\text{N} \cdots \text{H}_2\text{O}$ 相互作用、(2) 静電的な反発に基づく $\text{N} \cdots \text{OH}_2$ 相互作用が考えられる。また、(3) C_{59}N の二量体構造に由来する寄与や (4) C_{59}N 由来の常磁性化学種の残存効果については、 $\text{H}_2 @ (\text{C}_{59}\text{N})_2$ および $\text{H}_2 @ \text{C}_{60}$ の場合に明確な T_1 の差が見られなかったことから除外することができる。

$\text{H}_2\text{O} @ (\text{C}_{59}\text{N})_2$ におけるより長い緩和時間の起源を明らかにするために、モデル化合物 HC_{59}N の静電ポテンシャルを理論計算を用いて評価した結果、予想に反し、窒素原子上の静電ポテンシャルは、骨格外部では負に、骨格内部では正に帯電していると示唆された (Figure 2). このことから、窒素原子上の非共有電子対の大部分がフラーレン骨格の π 共役に寄与しており、内包水分子の酸素原子は骨格上の窒素原子との間にむしろ引き合うような相互作用が働いていると考えられる。さらに、温度可変NMR測定の結果、水素結合に基づく相互作用を否定する結果が得られており、 C_{59}N に内包された水分子は骨格上の窒素原子の影響により、その回転運動が抑制され、核磁気緩和が遅延しているものと推測される。

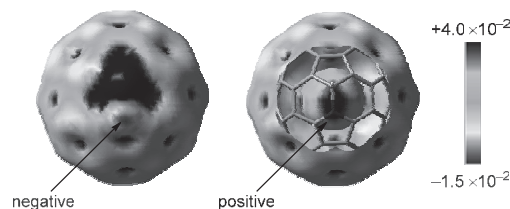


Figure 2. Electrostatic potential of HC_{59}N , calculated at the MP2/6-31G(d,p)//M06-2X/6-31G(d,p) level of theory.

References

- [1] Murata, M.; Murata, Y.; Komatsu, K. *Science* **2005**, 307, 238.
- [2] Morinaka, Y.; Tanabe, F.; Murata, M.; Murata, Y.; Komatsu, K. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 4532.
- [3] Kurotobi, K.; Murata, Y. *Science* **2011**, 333, 613.
- [4] (a) Hummelen, J. C.; Knight, B.; Pavlovich, J.; González, R.; Wudl, F. *Science* **1995**, 269, 1554.
(b) Nuber, B.; Hirsch, A. *Chem. Commun.* **1996**, 1421.
- [5] Hashikawa, Y.; Murata, M.; Wakamiya, A.; Murata, Y. *Org. Lett.* **2014**, 16, 2970.

P36

化学・生物的統合プロファイリングによる水圏環境プローブ生物の
生育特性情報抽出

○魏 菲菲¹, 坂田 研二¹, 朝倉 大河^{1,2}, 伊達 康博^{1,2}, 菊地 淳^{1,2,3}

¹理研CSRS, ²横浜市大院・生命医, ³名大院・生命農

Integral analysis of yellowfin goby *Acanthogobius flavimanus* in estuarine environment

○Feifei Wei¹, Kenji Sakata¹, Taiga Asakura^{1,2}, Yasuhiro Date^{1,2}, and Jun Kikuchi^{1,2,3}

¹RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Yokohama, Japan; ²Grad. Sch. Medbio. Sci., Yokohama City Univ., Yokohama, Japan; ³Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., Nagoya, Japan.

Yellowfin goby *Acanthogobius flavimanus* is a common benthic inhabitant of estuarine mudflat native to northern Asia and Japan and is believed to be strongly associated with environmental variables influenced by coastal conditions and upland freshwater drainage. In this study, an NMR-based integral analysis was applied to investigate the temporal, spatial and growth characteristics on the metabolic, mineral and microbial profiles of yellowfin goby and its potential utilization as the probe animal of estuarine environments.

【背景・目的】人間は自然が持つ自己修復性を超える負担をかけ、自然の自己修復能力を損なう行為を繰り返してきた。その結果、自然修復が遅れ、人為修復するには莫大な投資が必要となつてします。そのため、生態系のバランスが崩れる前に環境の変動を捉えるバイオマーカーやプローブ生物を見出す基盤技術の構築が重要である。一方、河口・沿岸域の水圏環境は里域環境と人間活動に大きな影響を与えられている。河口・沿岸域の砂泥底や砂底に生息しているマハゼは、水質や底質などの環境変化等の影響を受けやすいものの、汚濁への耐性は非常に強く、汚染された都市の河川やその沿岸にも数多く生息しているため、沿岸域水圏環境を評価するプローブ生物として活用できると考えられる(1-3)。本研究では、異なる河口・沿岸域の環境から採取した水棲生物のマハゼとそれを取り巻く環境を比較し、化学・生物的統合プロファイリングによる水棲生物と生育環境の関係性を見出すための解析法を試みた(4)。

【材料・方法】本研究では2012年から2015年、北海道から中国地方の約20河川の河口・沿岸に生息するマハゼ(n=1036)、それと代表的な棲息地の水(n=42)や底泥(n=38)の採集を行った。以下の2つの分析内容を計画した: 1) プールした試料の統合解析。地域・季節の特徴を明らかにするため、粉末化したサンプルを地域・季節ごとにプールし、筋肉組織の¹H-NMR (2DJ)、¹³C-NMR、ICP-OES、腸内容物の¹H-NMR (2DJ)、¹³C-NMR、ICP-OES、腸内微生物叢解析のMiSeq、底泥及び環境水のICP-OESの分析を行った。¹H、¹³Cのシグナルを帰属するために¹H-¹³C HSQC-TOCYの計測や、STOCSY法及びSHY法の2次元相関解析法などを用いた。得られた多検体データは数値・マトリックス化した後、フリーソフトRを用いてPCA、相関係数等の多変量解析によって評価した; 2) 個別試料のNMR解析。1036個体のマハゼを解剖後、筋肉組織を凍結乾燥し、シェイクミキサーによって破碎し、得られた粉末のMeOD可溶化成分の¹H-NMR (2DJ)計測を行った。得られたデータは数値・マトリックス化し、RによるPCA、OPLS-DA、アソシエーション分析等で評価した。

SHY, ネットワーク解析、環境応答

おうえいふえいふえい, さかたけんじ, あさくらだいが, だてやすひろ, きくちじゅん

【結果・考察】まず、マハゼ筋肉組織の MeOD 画分の NMR シグナルの帰属には、従来法の ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY 以外に ^1H - $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ - ^{13}C STOCSY と ^1H - ^{13}C SHY といった 2 次元相関解析法も有用性を示した。Fig.1 にピークピックした 1 次元 ^1H と ^{13}C NMR スペクトルのマトリクスに基づいて計算した ^1H - ^{13}C SHY と実測した ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY の結果を重ねて示した。 ^1H - ^{13}C SHY では、同じ化合物に由来するシグナル以外にも、同調して変化する代謝物に由来するピークも高い相関が示された

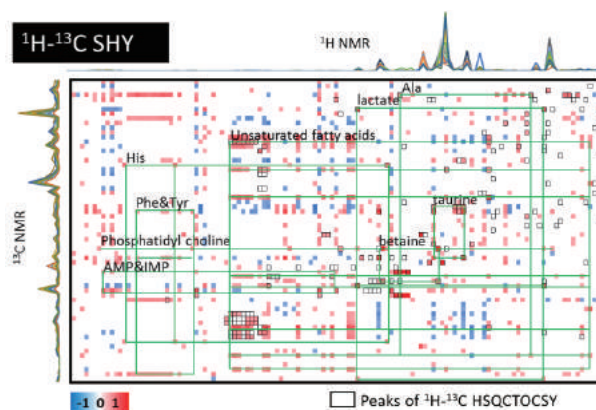


Fig.1 A comparison of peaks in ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY and correlations in ^1H - ^{13}C SHY of yellowfin goby.

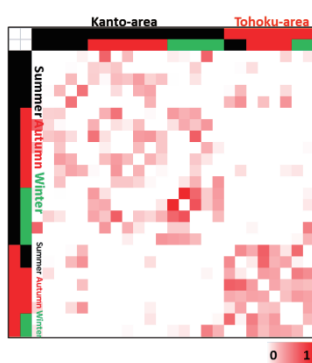


Fig.2 Correlations between yellowfin goby samples pooled according to their habitats and sampling seasons.

り、特に実測のスペクトルでは観測困難な 4 級炭素との相関性も確認できたため、帰属に価値のある情報が多く得られていた。

さらに、棲息地・季節ごとにプールしたマハゼサンプルの統合解析を行い、相関解析の結果 (Fig.2) から、同じ関東地方にある河川・沿岸域で生息したマハゼ同士の間と比較的高い化学・生物学的な相関性が見られ、マハゼの地域特性が示唆された。一方、地域特性と同様に、同じ季節に採集したマハゼ同士の間にもより高い相関性を示し、マハゼが時期の特性も有することが示唆された。

最後に、約 1000 匹のマハゼの NMR データに基づいた多変量解析を行ったところ、地域や季節の特性以外にも、マハゼの生育特性に関する情報も抽出できた。Fig.3 の PCA の結果から、雌でも無卵のマハゼより、抱卵したマハゼが PC1 負の方向にプロットされた。OPLS-DA やボルケーノプロットによって、冬の繁殖期に入ってから抱卵するマハゼの筋肉組織に taurine が蓄積しやすい傾向を捉えることができた。

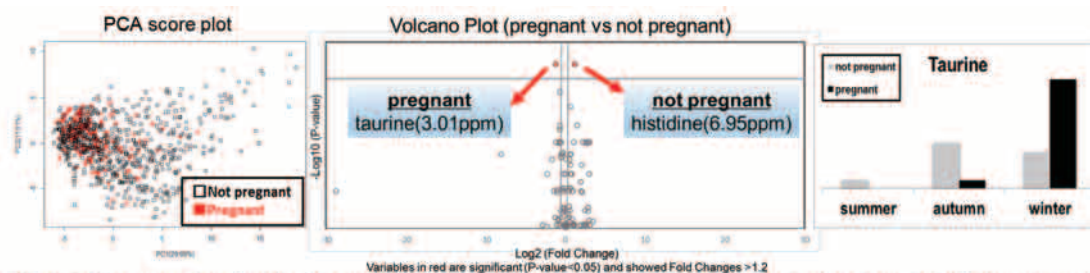


Fig.3 PCA score plot of yellowfin goby (left); volcano plot of female yellowfin goby in winter (middle); temporal changes of taurine in muscle of yellowfin goby (right).

【引用文献】

1. Asakura, T., Sakata, K., Yoshida, S., Date, Y. and Kikuchi, J. PeerJ, 2, e550 (2014).
2. Asakura, T., Date, Y. and Kikuchi, J. Anal. Chem., 86, 5425-5432 (2014).
3. Yoshida, S., Date, Y. and Kikuchi, J. Sci. Rep., 4, 7005 (2014).
4. Wei, F., Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, J. Anal. Chem., 87, 2819-2826 (2015).

P52

磁場配向微結晶粉末を用いた単結晶法による結晶多形の分析

○奥村学¹, 久住亮介¹, 木村史子¹, 木村恒久¹, 出口健三², 大木忍²,
藤戸輝明², 清水禎²

¹京大・院農

²物材機構

Analysis of polymorph by the single-crystal NMR measurement by using magnetically oriented microcrystal array

○Manabu Okumura¹, Ryosuke Kusumi¹, Fumiko Kimura¹, Tsunehisa Kimura¹, Kenzo Deguchi², Shinobu Ohki², Teruaki Fujito², Tadashi Simizu²

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

²National Institute for Materials Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

The chemical shift anisotropy (CSA) reflects the local distribution of electrons around resonance nuclei under consideration. Single-crystal NMR measurement is a powerful method to determine full information of CSA, enabling to elucidate, for example, differences in local structures of crystal polymorphisms. However, it needs large single crystals. To overcome this limitation, we have proposed use of MOMAs (magnetically oriented microcrystal arrays) in place of large single crystals. A MOMA is a single-crystal-like composite in which microcrystals are three-dimensionally aligned in a polymer matrix. In this report, we prepared MOMAs of histidine A and B forms and compared their CSAs.

序論

化学シフトの異方性 (CSA) は観測核周囲の電子分布を反映するので結晶中での局所構造の解析に有用である。特に単結晶法はCSAを主軸の方向を含めて完全に決定することができるため、同一化合物でありながら異なる結晶構造を持つ結晶多形間での局所構造の解析などに特に有効である。しかし単結晶法には数mmサイズの単結晶が必要である。そのため大きな単結晶を得ることが困難な物質に対しては適用が困難であった。それを克服するため、当研究グループでは変調回転磁場を用いて、微結晶を三次元配向させる擬単結晶法 (MOMA法) を単結晶NMR測定に応用することを提案している。これまでにMOMA法を用いて¹³Cや³¹Pの化学シフトテンソルを決定することに成功している^[1-3]。本研究では2つの結晶多形を持つL-histidineについてMOMA法を応用し、結晶多形間の水素結合様式の差が現れると考えられるカルボキシル炭素の¹³CのCSAを完全に決定して結晶多形間での局所構造の相違について考察を行った。

実験

L-histidine A形・B形微結晶を紫外線硬化樹脂に分散させ、25wt%の微結晶懸濁液を作製した。得られた懸濁液を円柱状のプラスチック容器に入れ、試料回転装置を備えた8 T超伝導磁石にセットして、変調回転磁場($\omega_s=5$ rpm, $\omega_q=50$ rpm, $\alpha=90^\circ$)を60分間印加した。その後、UVを90分間照射して配向を固定し、MOMAを得た。磁場に対する円柱容器のセッティング方向を変えて同様の操作を行い、円柱試料内での微結晶の配向方向が異なる3つのMOMAを作製した(Fig.1)。

結晶多形, 磁場配向, 単結晶法

○おくむら まなぶ, くすみ りょうすけ, きむら ふみこ, きむら つねひさ, でぐち けんぞう,
おおき しのぶ, ふじと てるあき, しみず ただし

得られたMOMAはX線回折測定に供し、配向性の評価を行った。配向性の良いMOMAをゴニオプロブ内セットし、回転角を ψ としMOMAを $\psi=0-180^\circ$ まで 15° 毎に回転させながら ^{13}C の共鳴周波数125MHzにて固体NMR測定を行った。

結果

得られたL-histidine A形・B形それぞれのMOMAのX線回折図の一部をFig.2に示す。いずれの面においても回折点がスポットで得られ、配向の程度を表す方位角方向の半幅幅が 5° 以下であることから、微結晶が硬化した媒体中で精密に三次元配向した擬単結晶の作製に成功したことがわかる。得られたMOMAの ^{13}C NMRスペクトルの一部をFig.3に示す。カルボキシル炭素由来のピークを帰属し、角度 ψ ごとに得られるカルボキシル炭素ピークの化学シフト値に対して以下の理論式 $\delta_{lab}(\psi)$ を用いてフィッティングを行った。

$$\delta_{lab}(\psi) = \delta_{jj} \cos^2 \psi + \delta_{jk} \sin 2\psi + \delta_{kk} \sin^2 \psi$$

ここで、 i, j, k は磁化軸 χ_1, χ_2, χ_3 軸の巡回置換であり、 i 軸が静磁場に垂直な結晶軸で結晶軸 j と静磁場のなす角を ψ としている。得られた化学シフトテンソルの主値と分子軸に対する主軸の方向をFig.4に示す。どちらも主値はほぼ同じであったがそれぞれの主軸の方向はわずかに異なっていた。

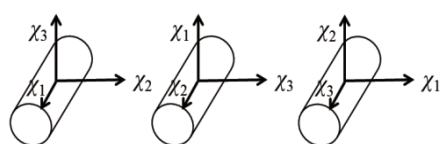


Fig.1 Magnetic axes χ_1 , χ_2 and χ_3 of three MOMAs prepared for single crystal NMR measurements.

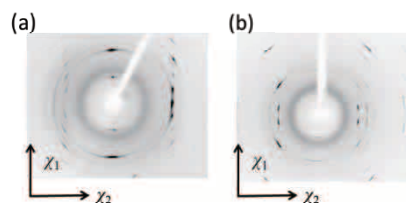


Fig.2 X-ray diffraction patterns of MOMAs of L-histidine (a)A-form and (b)B-form

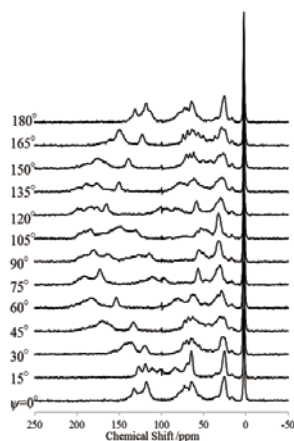


Fig.3 ^{13}C CP NMR spectra of B-form of L-histidine measured for various rotation angles ψ s about the χ_1 axis.

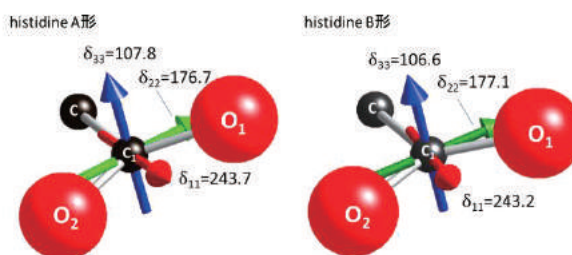


Fig.4 Principal axes and values of the chemical shift tensors of carboxyl groups in L-histidine A and B forms.

参考文献

- [1] R. Kusumi, F. Kimura, G. Song, and T. Kimura. *J. Magn. Reson.* **2012**, 223, 68.
- [2] R. Kusumi, F. Kimura, and T. Kimura. *Cryst. Growth & Des.* **2015**, 15, 718.
- [3] G. Song, R. Kusumi, F. Kimura, T. Kimura, K. Deguchi, S. Ohki, T. Fujito, and T. Shimizu. *J. Magn. Reson.*, **2015**, 255, 28

P84

*In-situ*マイクロ波照射NMRによるマイクロ波加熱におけるエネルギー移動過程の解明○田制 侑悟¹, 藤戸 輝昭², 川村 出¹, 内藤 晶¹¹横浜国立大学大学院・工学研究院²プローブ工房**Process of energy transfer under microwave irradiation revealed by *in-situ* microwave irradiation NMR spectroscopy**○Yugo Tasei¹, Teruaki Fujito², Izuru Kawamura¹ and Akira Naito¹¹Graduate school of Engineering, Yokohama National University, Yokohama²Prove Laboratory Inc.

Microwave heating is widely used in the acceleration of organic reactions. However, the detailed molecular mechanisms associated with microwave heating effects on the chemical reactions have not yet well understood. This study revealed the microwave heating effects of organic compounds using newly developed *in situ* microwave irradiation nuclear magnetic resonance spectroscopy, by analyzing ¹H NMR spectra under microwave irradiation. The sample temperature during microwave irradiation was estimated by measuring the temperature dependent chemical shifts of individual protons in the sample, and the different protons were found to indicate significantly different temperatures within the molecule. It is noticed that the protons bound to polar group were found to indicate different electron density from these of other protons. These results suggest that microwave heating polarizes bonds in polar functional groups, and this effect may partly explain the attendant acceleration of organic reactions.

<序論>

マイクロ波はNMR分光法で用いられるラジオ波より高周波数の電磁波である。物質にマイクロ波を照射することで加熱現象が起こることはよく知られている。マイクロ波加熱を利用したものが電子レンジであり日本では2.45 GHzの周波数が使われている。また化学の分野では有機反応を中心にマイクロ波加熱を用いることで反応性が大幅に上昇することが数多く報告されている。これらの現象は他の加熱では起こらないためマイクロ波効果と呼ばれ、低エネルギーで高い加熱効率をもつことも相まってグリーンケミストリーの観点からマイクロ波化学という分野で盛んに研究されている。マイクロ波加熱が通常の加熱である熱伝導加熱とは異なるという事例は数多くありながらマイクロ波加熱機構について詳細に理解されていないのが現状である。マイクロ波加熱を研究するにあたって障害になるのが分子レベルで解析できる実験方法が非常に少ない点である。そこで*In-situ* マイクロ波照射NMR装置の開発[1]を行い、マイクロ波加熱機構の解明に取り組んだ。マイクロ波加熱を取り扱う際には温度上昇効果と区別することが非常に難しいとされるが、線幅や化学シフトの温度依存性を利用することで分子および原子レベルでマイクロ波加熱現象を解析することが可能である。これまでマイクロ波加熱効率が高い液晶分子を用いた¹H NMRスペクトルの結果から局所加熱が起こり空間的温度分布が生じること[1][2]や極性基に結合したプロトンの

マイクロ波加熱、マイクロ波照射NMR、有機溶媒

○たせい ゆうご、ふじと てるあき、かわむら いずる、ないとう あきら

電子密度が他のプロトンに比べて増加することを示した[2]。

マイクロ波はわずかなエネルギーで加熱効率は非常に高い。この要因としてエネルギーから熱に変換される過程が他の加熱とは大きく異なることが考えられ、マイクロ波加熱機構およびマイクロ波効果を理解するにはエネルギー移動過程を理解することが重要である。今回の発表では合成反応で用いられる有機溶媒を独自に開発した*In-situ*マイクロ波照射NMR装置で ^1H 化学シフトと温度の相関関係を利用してマイクロ波加熱におけるエネルギー移動過程について議論する。

<装置開発・実験>

●*In-situ* マイクロ波照射NMR装置の開発[1]

I. *In-situ* マイクロ波照射 NMR 装置 (Figure 1)

In-situ マイクロ波照射NMR装置は温度ジャンプ状態相関2DNMR装置を改良して行った[3][4]。既存の固体NMR分光器(Chemmagetics CMX-400 infinity)に独自に開発したマイクロ波共振回路が備えてあるプローブを組み込んでいる。マグネトロン(2.45 GHz)で発生したマイクロ波はNMR分光器の近くまでは導波管を通り、同軸ケーブルに変換してプローブ内に入れている。

II. マイクロ波共振回路 (Figure 2)

マイクロ波共振回路はラジオ波回路の分離を良くし、ラジオ波回路の加熱を防ぐためにラジオ波共振回路の中に組み込んだ。ラジオ波の共振回路ではコイルに試料を挿入してコンデンサーで同調をとっているのに対して、マイクロ波の共振回路では試料をコンデンサーに挿入してコンデンサーのキャパスタンスを変化させて同調をとることで双方の回路の分離をよくした二重同調回路になっている(Fig.2 (A))。幅4 mm、長さが38 mmの銅箔を直径6 mmのガラス管で挟むことでコンデンサーの役割を果たし、端の部分で180°銅箔を覆ったものをコイルとしてマイクロ波共振回路として使用した。また、径の小さい直径3 mmの試料管を用いてマイクロ波回路と接触しないようにし、空気で断熱することで試料のみが加熱されるようにした(Fig.2(B))。

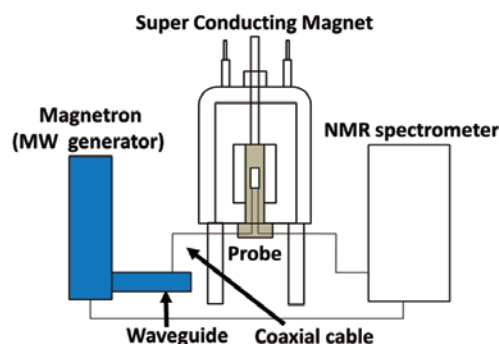


Figure 1 Schematic diagram of the in situ microwave irradiation NMR spectrometer equipped with a microwave transmitter.

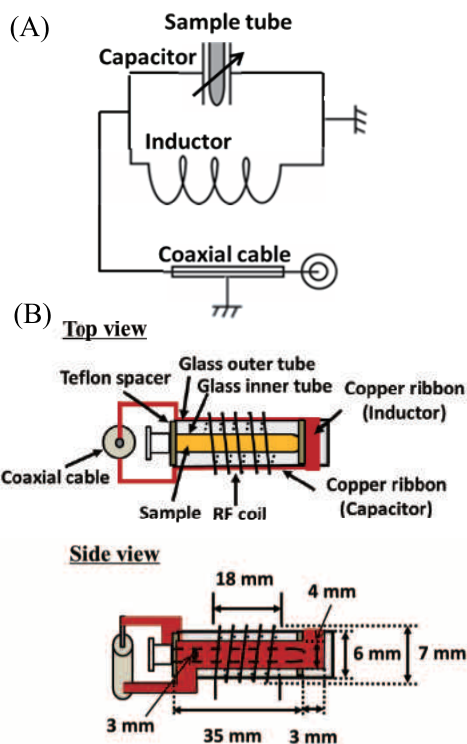


Figure 2 (A) Equalizing microwave resonance circuit consists of an inductor and capacitor. (B) Schematic diagrams of sample tube, capacitor and inductor of microwave resonance circuit and inductor of radio frequency. The top view indicates the names of components and the side view indicates the dimensions of components.

●NMR 測定

① ^1H 化学シフト値と温度の相関

マイクロ波照射 NMR 測定を行う際、マイクロ波加熱によって NMR 装置に付随している温度コントロールシステムで設定した温度より高くなるため、マイクロ波照射下で分子状態を観測するためには正確な試料温度を知ることが重要である。そこで、まず試料の ^1H 化学シフト値と温度の相関を調べた。温度コントロールシステムで設定した温度で ^1H NMR 測定を行い、温度に対して化学シフトのずれ($\Delta\delta$)のプロットをそれぞれのプロトンで正確に行った。

② CW (連続波) によるマイクロ波照射NMR測定

初期温度は 0°C 、マイクロ波の外部出力を135 Wに設定して、 0°C のガスを流しながらCWによるマイクロ波加熱を10分間行った。この加熱過程を30 秒毎に ^1H NMR測定を行い、化学シフト値を正確に求めた。得られた化学シフト値を①の相関関係を用いてそれぞれのプロトンの温度を求めた。

<結果>

ここではエタノール($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)の結果を述べる。

① ^1H 化学シフト値と温度の相関 (Figure 3)

エタノールの温度に対して ^1H 化学シフト値のずれ($\Delta\delta$)のプロットをFigure 3に示す。 $\Delta\delta$ 値は 0°C を初期値(0 ppm)とし温度上昇による高磁場シフトした値をプロットした。その結果、それぞれのプロトンが温度上昇によって直線関係で高磁場シフトすることがわかり、その傾きを求めることでエタノールの ^1H 化学シフト値と温度の相関を調べることが出来た。

② CWによるマイクロ波照射NMR測定(Figure 4, 5)

マイクロ波加熱時間に対して①の相関関係から求めた温度のプロットをFigure 4に示す。時間経過によって全てのプロトンで温度上昇が確認されたが、最終的にはヒドロキシル基のプロトンがメチレン基やメチル基のプロトンに比べて 10°C 以上の低い温度を示した。さらに興味深いことに、この温度のずれはマイクロ波加熱の時間経過によって大きくなっており、照射開始からしばらくは起こらなかった。

マイクロ波加熱を 10 分間行った直後とこの時の

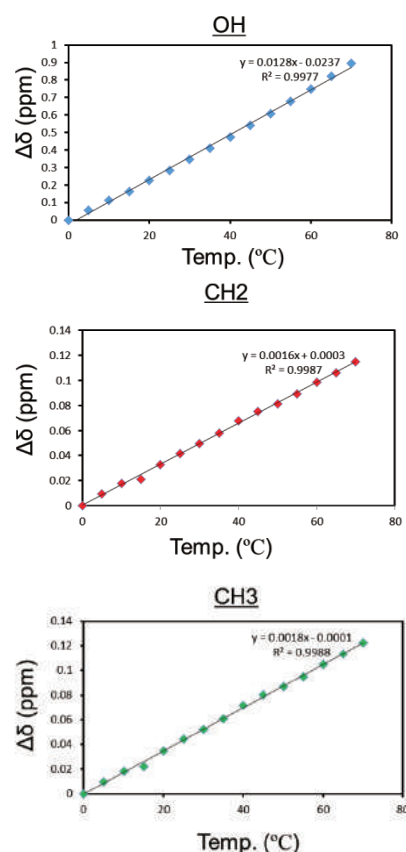


Figure 3 Plots of ^1H chemical shift values of Ethanol for individual protons against temperatures regulated by the instrument's temperature control system.

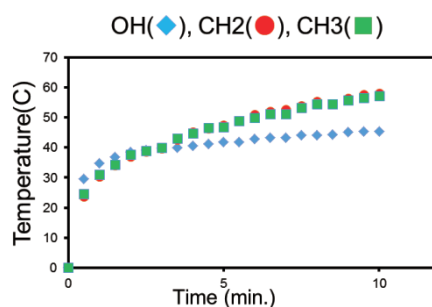


Figure 4 Plots of temperature increase against microwave irradiation time. Temperatures were determined using the slopes obtained for the individual protons.

バルク温度に近い 55 °C の ^1H NMR スペクトルを Figure 5 に示した。メチレン基やメチル基はバルク温度と同じ化学シフトを示し2つのスペクトルは重なるが、ヒドロキシル基は低磁場側にバルク温度とは異なる化学シフト値を示し、熱伝導加熱では生じないマイクロ波加熱特有の NMR スペクトルが得られたといえる。

<考察>

マイクロ波加熱を行うとヒドロキシル基の温度が異なる結果が示された。しかし、分子内で温度が異なることは物理化学的に有り得ないことである。 ^1H 化学シフトは結果①で示したように通常、温度上昇とともに高磁場シフト、言い換えれば電子密度が高くなる。つまりマイクロ波照射によってヒドロキシル基の電子密度が低くなっているといえる。

この理由としてマイクロ波が与える分子の影響は回転モードの励起が考えられるが、そのエネルギーは非常に小さく分子の電子密度を変えるほどではない。そこでマイクロ波におけるエネルギー移動過程に起因することが考えられる。

今回の結果からエネルギー移動過程の違いは熱伝導加熱ではエンタルピーが増大し、ランダムな分子は運動速度が増大する。その結果、温度が上昇してそれぞれプロトンの電子密度が高まる。

マイクロ波加熱は発生した電場に対して分子は配向しようとする。このときエントロピーが減少し、エネルギーの吸収が起こる。そして他の分子と衝突することで配向状態が乱れるとエントロピーが増大しエネルギーを放出する。その結果、温度上昇と極性基の電子密度が変化する分極効果が得られる。この分極効果は分子が配向するまで時間がかかることが考えられ、実験結果と一致している。

このエントロピー変化による分極効果は熱伝導加熱では決して起こらないものであり、有機反応の反応性が上昇するマイクロ波効果を説明するのに有力な概念である。

<引用文献>

- 1) Yugo Tasei et. al. *Journal of Magnetic Resonance*, 2015, **254**, 27-34
- 2) Yugo Tasei et. al. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015, **17**, 9082-9089
- 3) Akira Naito et al, *Thermotropic Liquid Crystals* 2007 85-116 Springer.
- 4) Akira Naito and Yugo Tasei, *Materials Science & Technology* 2010 2886-2894

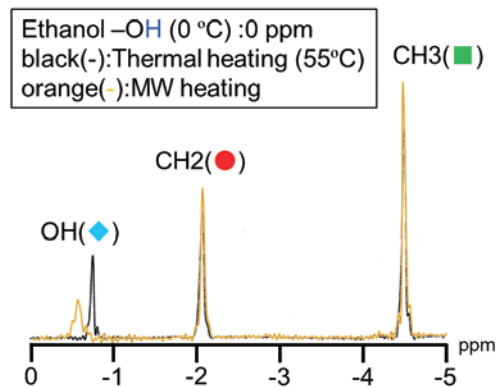


Figure 5 ^1H NMR spectra of ethanol at 55 °C and under CW microwave irradiation for 10 min while regulating the instrument temperature at 0 °C.

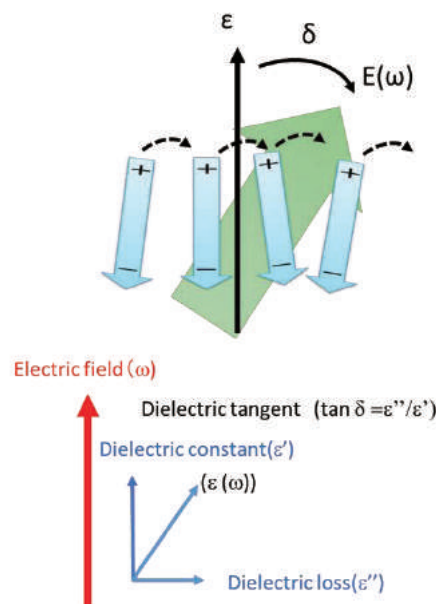


Figure 6 Orientation model of molecular under microwave irradiation and definition of term about dielectric loss heating.

P66

ゴム材料の ^1H - T_2 緩和解析：ラプラス逆変換法と主成分解析○角村 将希¹, 浅野 敦志¹, 大窪 貴洋², 奥下 慶子³¹防衛大学校・応用化学科²千葉大学大学院・工学研究科³分子科学研究所**A new approach of the ^1H - T_2 Relaxation of Rubber Materials : Inverse Laplace Transform and Principal Component Analysis**○Masaki Tsunomura¹, Atsushi Asano¹, Takahiro Ohkubo², and Keiko Okushita³¹ Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Kanagawa, Japan² Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Chiba University, Chiba, Japan³ Institute for Molecular Science, Aichi, Japan

We observed the ^1H - T_2 relaxation decays of un-cross-linked and cross-linked polyisoprene rubbers filled with different kinds and quantities of carbon black by means of the pulse NMR method. The observed ^1H - T_2 relaxation decays were divided into Gaussian and Exponential components. The former contains the residual dipolar coupling (D_r) and the latter mostly reflects the molecular motion. Furthermore, we estimated the T_2 distribution from the exponential component by the inverse Laplace transform. In addition, the principal component analysis of the T_2 distributions, D_r components, and the ^1H - T_2 relaxation decays was performed to reveal the correlation among carbon black species, rubber chain mobility, and physical property.

＜緒言＞ ゴム材料は、カーボンブラック（CB）などの無機物の混練や架橋を行うことにより物性を改良して用いられることが多い。CB充填ゴム材料では、ゴム鎖がCB表層部に吸着して分子運動が束縛される。そのため、ゴム鎖の運動はCBから離れるにつれてバルクと同様の運動性をもつ。架橋すると、架橋点近傍のゴム鎖の運動がさらに付加される。ゴム材料の ^1H - T_2 緩和曲線には、このように広範な運動変化が含まれて観測される。通常、このようなゴム材料の ^1H - T_2 緩和曲線は、運動が極端に遅いガウス関数成分と、それよりも運動が速い指数関数成分の和として解析される。運動の遅いガウス成分は、ネットワーク鎖からの異方的な運動から生じる残余双極子相互作用（residual dipolar coupling; D_r ）を含んでいる。ガウス成分を D_r のみの項で表し、 ^1H - T_2 緩和曲線（ $M(t)$ ）を理論的に書き示すと(1)式となる¹⁾。

$$\frac{M(t)}{M(0)} = f_{D_r} \cdot \exp\left(-\frac{9}{40} \cdot D_r^2 \cdot t^2\right) + f_A \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2A}}\right) + f_B \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2B}}\right) \quad (f_{D_r} + f_A + f_B = 1) \quad (1)$$

ただし、関数の個数には任意性がある。そこで、実測の ^1H - T_2 緩和曲線を(1)式を用いて最小二乗フィットした後、ガウス関数部分を抽出し、残りの指数関数成分をラプラス逆変換法により T_2 分布として求め任意性を排除した。さらにガウス成分、 T_2 分布、実測の ^1H - T_2 緩和曲線を統計解析の一種である主成分解析により運動成分を細分化して抽出し、CB近傍の情報取得を目指した。

ラプラス逆変換法, T_2 緩和分布, 主成分解析

○つのむらまさき, あさのあつし, おおくぼたかひろ, おくしたけいこ

<実験・解析> ^1H - T_2 緩和減衰曲線は、JEOL社製JNM-MU25パルスNMR装置を用いて測定した。 ^1H 観測周波数は25 MHzである。solid echo法による T_2 緩和測定は、積算16回、繰り返し2.0 s、パルス間隔8.0 μs 、観測時間1 ~ 10 ms、測定温度は30°Cで行った。Hahn echo法による T_2 緩和測定は、積算4回、繰り返し1.0 s、パルス間隔 50.0 μs 、観測時間10 ~ 20 msで行った。測定温度は30°Cと60°Cである。試料は、東海ゴム工業（現、住友理工株式会社）より提供された、CB充填量の異なる未架橋、架橋ポリイソプレンゴム（PI/CB）を用いた。CBは、比表面積の異なる3種類（HAF、FEF、FT）を総表面積が同じになる質量比でそれぞれ混練した。

<結果・考察> Fig. 1 は、Hahn echo 法から得られた架橋 PI/HAF = 100/20.0 の 60°Cにおける ^1H - T_2 緩和減衰曲線である。(1)式を用いて解析した結果を実線で示した。残余双極子相互作用の成分を破線で示してある。得られた値はそれぞれ、 $f_{Dr} = 0.45$ 、 $D_r = 1492 \text{ rad s}^{-1}$ 、 $f_A = 0.49$ 、 $T_{2A} = 1.32 \text{ ms}$ 、 $f_B = 0.06$ 、 $T_{2B} = 23.8 \text{ ms}$ である。観測した ^1H - T_2 緩和減衰曲線（○）から残余双極子相互作用の成分を差し引いた ^1H - T_2 緩和減衰曲線（△）を、ラプラス逆変換法により T_2 緩和分布として求め、運動成分を視覚化して Fig. 2(A)に示した。PI/CB のうち、(a)PI/HAF = 100/20.0、(b)PI/FEF = 100/36.9、(c) PI/FT = 100/66.4 の 3 種類を代表して示した。充填した CB の表面積の総和は全て等しい（2490 m^2 ）。

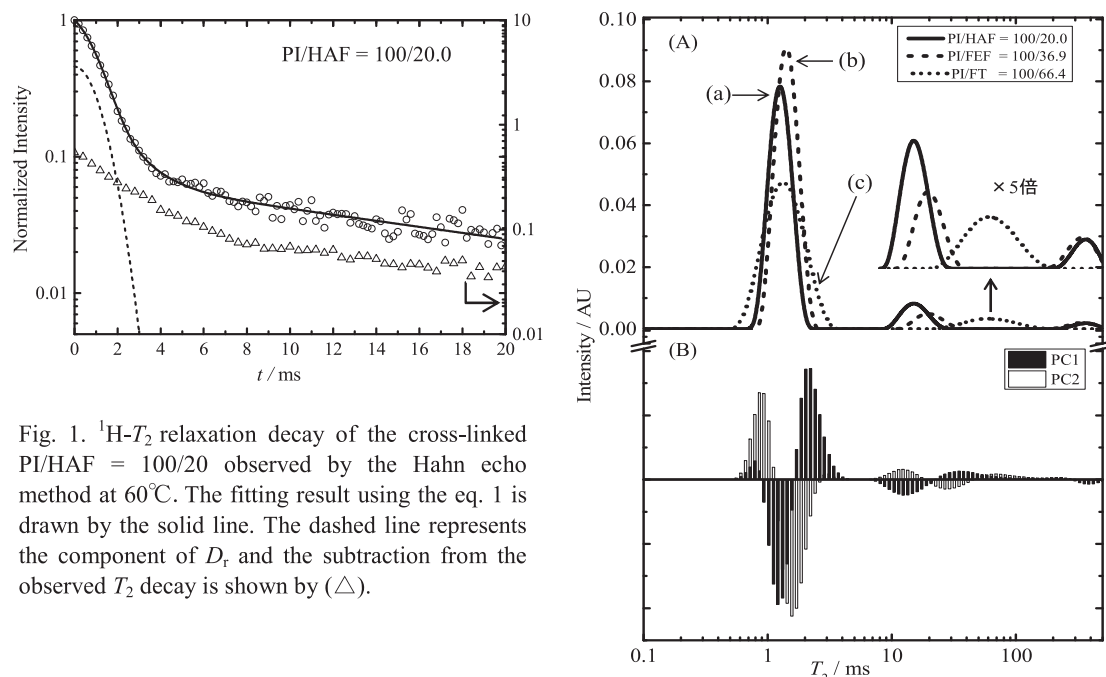


Fig. 1. ^1H - T_2 relaxation decay of the cross-linked PI/HAF = 100/20 observed by the Hahn echo method at 60°C. The fitting result using the eq. 1 is drawn by the solid line. The dashed line represents the component of D_r and the subtraction from the observed T_2 decay is shown by (Δ).

Fig.2 (A) T_2 distributions estimated from the inverse Laplace transform; (a) PI/HAF = 100/20.0, (b) PI/FEF = 100/36.9, and (c) PI/FT = 100/66.4. (B) the loading plot for PC1 and PC2 obtained from the principal component analysis for all cross-linked polyisoprene rubbers.

PI/HAF と PI/FEF は 3 ケ所（1.2 ms、15 ms、370 ms 近傍と、1.4 ms、19 ms、350 ms 近傍）、PI/FT は 2 ケ所（1.3 ms と 60 ms 近傍）に T_2 緩和分布が観測された。これらの T_2 分布は、1 ms 前後の T_2 分布がゴム鎖と相互作用し運動を束縛している成分、350 ms より長い T_2 分布がゴム鎖のバルク状態に近い成分、そして、それらの中間成分（15 ~ 19 ms）を反映していると考えられる。FT は HAF や FEF と比べて比表面積が小さく（HAF を 1 とした時、FEF は約半分、FT は 1/3 の比表面積）、同じ表面積にするために CB 充填量が 2~3 倍と多い。そのため、バルク状態の T_2 分布が観測されず 60 ms 付近に T_2 分布が現れたと考えられる。

T_2 分布を求めただけでは CB 近傍の情報が不明確であったので、 T_2 分布に隠れた情報を探求するため主成分解析を行った。Fig. 2(B)は、架橋試料の T_2 緩和分布の主成分解析から得られた、PC1（寄与率：61.3 %）と PC2（寄与率：28.5 %）のローディングプロットを示してある。1~2 ms に観測される大きな T_2 分布成分は、PC1 と PC2 の指標では特徴的に分割されることがわかる。例えば、PC1 では 2.2 ms 近傍で正の最大値を示し、1.2 ms 近傍では負の最大値を示す。PC2 では 0.9 ms 近傍で正の最大値を示し、1.0 ms 近傍で負の最大値となった。このローディングプロットと T_2 分布の関係を Fig. 3 に示した。Fig. 3 にはすべての架橋 PI/CB 試料の結果をプロットした。

PC1 と PC2 が両方とも正の領域(+, +)と、負の領域(-, -)、さらに PC1 が負、PC2 が正の領域(-, +)にそれぞれ(c), (b), (a)の試料が帰属されている。Fig. 2 の(c)を見ると、PC1 の 2.2 ms 近傍の正の値、PC2 の 0.9 ms 近傍の正の値まで T_2 分布が広がっている。また、Fig. 2 の(b)では PC1, PC2 の正の最大値を示す領域には T_2 分布がほとんど存在せず、 T_2 分布が狭い範囲にあるという傾向が示される。さらに Fig. 2 の(a)では、PC2 の正の最大値の領域側に T_2 分布が寄っていることがわかる。これらの結果から、PC1 と PC2 の符号が分布幅と関係していることが示された。

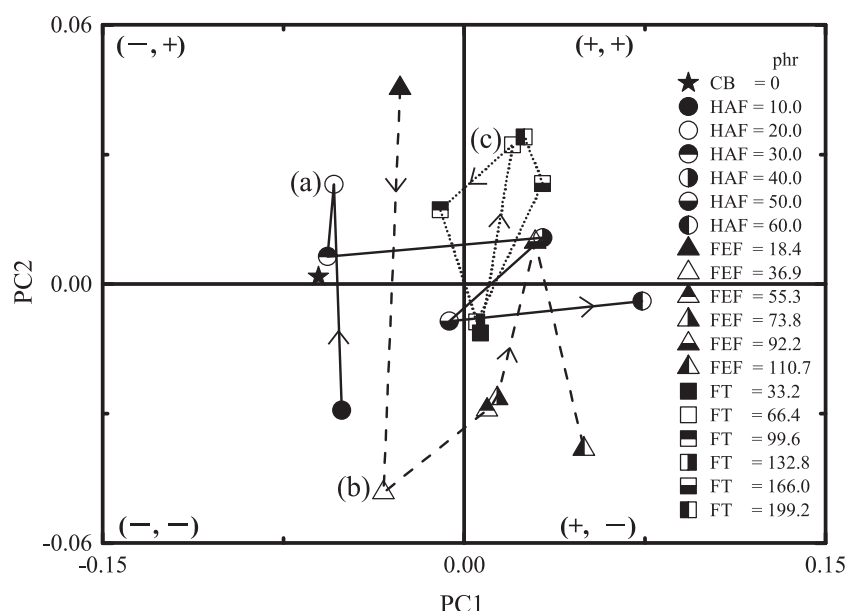


Fig.3 . Score plot of all cross-linked polyisoprene rubbers. The arrow shows the increment of CB quantity.

より試料間の関係をより明確に区分けするため、PC3（寄与率：4.7 %）の軸方向にもデータを展開し、3次元プロットを行った。結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4 の3次元プロットから、HAF、FEF、FT の CB の種類別に見比べてみると、FT と FEF は PC3 軸の負側に集中し、また特に FT は PC1~3 軸に関して狭い範囲に CB の添加量に関係なく固まって存在していることがわかる。それらに比べ HAF では、PC3 軸においても正負に大きく広がり、CB の添加量に応じて運動性が大きく影響を受けていることがわかった。

これらの運動性の違いと応力-ひずみ曲線の関係を比較した。Fig. 5 には(a)~(c)の応力-ひずみ曲線を示した。CB を含有していない架橋 PI (★)と比較すると、PI/HAF、PI/FEF、PI/FT は、CB を添加することで伸び率は共に 2~3 割減少するものの、引張り強さは 4 倍前後向上している。これら 3 種類の PI/CB 試料の CB の総表面積は等価である。CB と相互作用している PI 鎖が物性に大きく寄与するとすれば、FEF と FT は CB と相互作用するゴム鎖が同じ量だけ存在すると考えられるので、PI と CB の相互作用成分（バウンドラバー）が物性に関与していると考えられる。

しかし HAF の剛性は FT ほど高くない。このことは、CB 添加量が PI 鎖の架橋に与える影響も考慮する必要があることを示している。つまり、CB 添加量に依存して PI 鎖の架橋密度が異なっている可能性が示唆され、その影響が剛性に現れていると考えられる。Fig. 2 より、PI/FT は、PI/HAF や PI/FEF より 1~2 ms の T_2 分布が幅広い。このことは、様々な分子運動成分を含むことを示している。CB との相互作用を表す D_r 成分も検討する必要もあるが、Fig. 2 と Fig. 5 から T_2 分布の広がりが剛性の高さに関係していると示唆される。

当日は、他の試料や D_r と架橋密度の関係なども踏まえ、運動性と物性などの相関性を求めた結果を報告する。

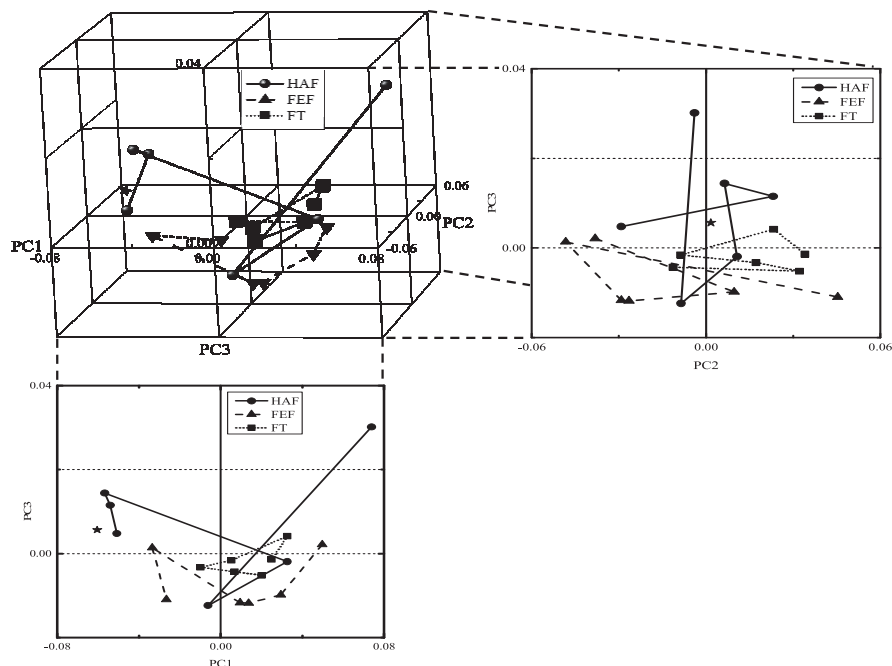


Fig.4. Three dimensional score plots of cross-linked PI/CB samples. PI/HAF (●), PI/FEF (▲), PI/FT (■), and without CB (★).

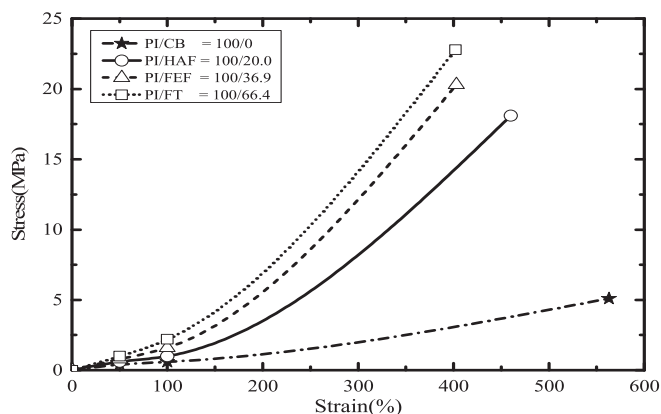


Fig.5 . Stress-strain curves for PI/HAF = 100/20.0 (●), PI/FEF = 100/36.9 (▲), PI/FT = 100/66.4 (■), and PI/CB = 100/0 (★).

<参考文献>

- 1) A. Asano, *Annual Rep. NMR*, **86** (2015) 1-72. (doi:10.1016/bs.arnmr.2015.04.001)

P26

NMR $R_{1\rho}$ dispersion法によるユビキチン二重合体の動的構造特性の研究

○西澤茉由¹, 菅瀬謙治¹, 森本大智¹, Erik Walinda¹, 白川昌宏¹

¹京都大・工学研究科・分子工学専攻

Dynamic structural properties of diubiquitin by $R_{1\rho}$ dispersion

○Mayu Nishizawa¹, Kenji Sugase¹, Daichi Morimoto¹, Erik Walinda¹ and Masahiro Shirakawa¹

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

All eukaryotes use the small signaling protein ubiquitin, which is recognized by downstream proteins, to control a wide variety of functions such as intracellular localization, protein lifetime. In particular, ubiquitin exerts its important biological roles as a multi-domain protein.

In a previous study, it was revealed that ubiquitin exhibits greatly reduced heat stability when it is covalently linked to form diubiquitin. However, it is still unknown by what kind of mechanism the heat stability is decreased. Therefore, in this study I analyzed the dynamic characteristics and structural fluctuations of diubiquitin using $R_{1\rho}$ relaxation dispersion measurements to elucidate the structural destabilization mechanism.

【緒言】

真核生物のあらゆる細胞において、76個のアミノ酸から成るユビキチンという小さなタンパク質が存在する。ユビキチンは細胞内で標的タンパク質に幾つも鎖状に結合し、そのタンパク質の機能や局在、寿命を制御している。この制御機構の不全は、

癌や神経変性疾患などの病気を引き起こす。最も興味深い点は、標的タンパク質に形成するポリユビキチン鎖の多様性である。ポリユビキチン鎖は、ユビキチンの7個のリシン残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63)や、N末端のアミノ基を介して形成されるため、合計8つの種類が存在する。

先行研究において、ユビキチンは結合様式に関わらず熱安定性が下がり、さらに穏やかな攪拌等によって凝集体形成することを明らかにした。特に二重合体の形成時に大きく熱安定性が低下した (Fig. 1)。しかし、なぜ熱安定性が低下するのかは未だに不明である。

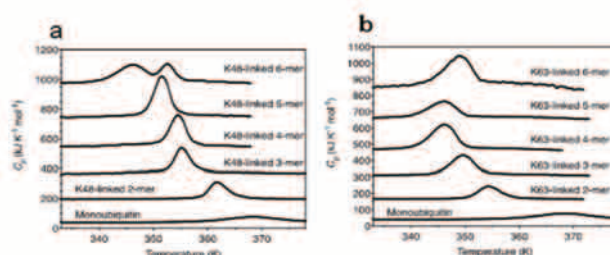


Fig.1 Heat stability of ubiquitin chain

a:K48 linked polyubiquitin chains b:K63 linked polyubiquitin chains

$R_{1\rho}$ dispersion 法、ユビキチン

○にしざわまゆ、すがせけんじ、もりもとだいち、うありんだえりつく、しらかわまさひろ

そこで本研究では、 $R_{1\rho}$ dispersion 法を用いてユビキチン二重合体の動的特性、すなわち構造揺らぎを観測することによって、構造不安定化のメカニズムを解明することを目的とする。 $R_{1\rho}$ dispersion 法とは、マイクロ秒からミリ秒のタイムスケールにおけるタンパク質の構造変化の速度や構造変化の大きさ、さらには各状態の存在比を部位特異的に定量解析できる NMR 緩和実験法である

【結果】

本研究では、細胞内における存在比の高いユビキチン二重合体の種類である K48 結合型と K63 結合型を用いた。基部のユビキチンだけを ^{15}N 標識した二重合体を調製し、 ^{15}N アミド基を対象として $R_{1\rho}$ dispersion 測定を行った。

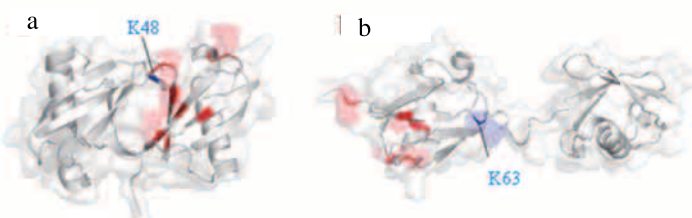


Fig.2 fluctual changes of diubiquitin red: $R_{1\rho}$ dispersion
a:K48 linked diubiquitin b:K63 linked diubiquitin

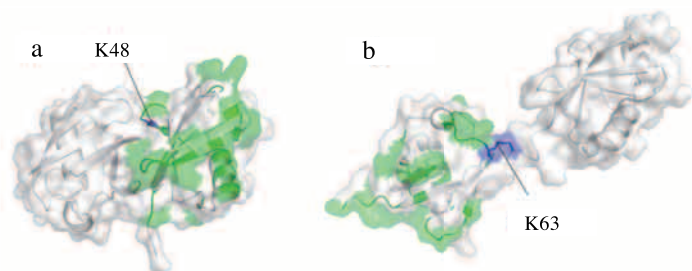


Fig.2 fluctual changes of diubiquitin green: CLEANEX-PM
a:K48 linked diubiquitin b:K63 linked diubiquitin

その結果、 $R_{1\rho}$ dispersion 法により、K48 結合型二重合体、K63 結合型二重合体の両者ともに $10^{-6} \sim 10^{-3}$ (sec) に minor 構造が存在し、K48 結合型では 10 残基、K63 結合型では 5 残基の構造揺らぎを観測できた (Fig. 2)。これらをより詳細に解析すると、K48 結合型二重合体は二重合体界面で構造が揺らぎ、K63 結合型二重合体は C 末端、 α

ヘリックスにおいて構造が揺らいでいることが分かった。

また、 $R_{1\rho}$ dispersion データとともに CLEANEX-PM 法という溶媒中の水とアミドプロトンの交換速度を観測する NMR 測定法を用いることによって、多元的にユビキチン二重合体の構造揺らぎを解析した。観測した交換速度を解析すると、K48 結合型二重合体、K63 結合型二重合体の両者ともに α ヘリックスの内側により速い水素交換が確認できた。加えて、 β シートにおいても速い交換が観測され、二重合体の構造の一部が解け、より溶媒に露出した構造を形成していることが示唆された。今後は、これらの結果をもとに構造不安定化のメカニズム解明に迫る。

【参考文献】

Morimoto, *et al.*, *Nat Commun.* **2015**, 6, 6116

直積演算子（プロダクトオペレータ）の覚え方

横浜市立大学 生命医科学研究科

長土居 有隆、池上 貴久

ikegamit@yokohama-cu.ac.jp

はじめに

NMRの勉強を始めた頃、先輩よりproduct-operator (直積演算子) の表を手洗いに貼り、毎回となえるように言われました。最初は念仏のようにブツブツ言って暗唱していたのですが、そのうちこれに周期性を見つけ、何もすべてを丸暗記しなくても、最初の化学シフトの式^{注1}とそれを少しだけ複雑にしたJカップリングの式^{注2}の2つさえ暗記してしまえば、後はx, y, zなどを順番に入れ替えればよいということに気づきました。先輩に「product-operatorなんて楽勝ですよ」と言うのと、「それではHSQCをproduct-operatorで書いてみよ」と言われました。これも簡単はずと思ながら他の4回生やM1数人で計算し始めたのですが、これがなかなか大変でノートにずらっと数式が並びました。そして、途中の符号のミスに何度も悩まされながらやっと最終的に簡単な項に落ち着いた頃には、もはや終電の時間を超えていました。今回は、これからNMRを始めよう、直積演算子の公式を覚えようと考えている学部生および修士院生を対象に「壁にぶつかってしまって嫌になりNMRをやめてしまわないように」と願って書いてみました。途中で少しだけ難しい表現も混じっていますが、あまり一本の木だけにとらわれずに全体の森を理解するようにしてください。

ハミルトニアンをまとめるという考え方

INEPTだけでもこれほど大変な直積演算子の計算を、HSQCに適用するとどうなるのでしょうか? さらに、もっと複雑な三次元CBCA(CO)NHなどにおけるコヒーレンス移動を計算するには、一週間ぐらいかかってしまうかもしれないと思ったものでした。しかし、すこし違った面白い方法を使うと、かなり簡単に計算できてしまうのです。それは、先にINEPTの中のいくつかの時間発展演算子をパルスの効果も含めて一つにまとめてしまうのです。そのまとめた1つの時間発展演算子を

スタート時点のコヒーレンスに適用して一気に答えを出してしまうのです。教科書では、しばしば「平均ハミルトニアン」といった項目に詳しく説明されています。たとえば、デカップリングなどの複雑なパルス系列の中で磁化ベクトルがどのように動くのかを直積演算子で時間にそって順に追いかけていくと、感覚的には分かりやすいのですが、計算が大変です。しかし、本NMR学会誌Vol.7において中井氏が書かれたフローケ理論のように「平均ハミルトニアン」という考え方を使うと、もっときれいに表現できるのです。

INEPTの間に働く時間発展演算子の統合

まず、I核からS核に磁化を移すINEPTの過程を追ってみることにします。何もパルスを打っていない時のハミルトニアンを

$$\mathcal{H} = \omega_I \cdot I_z + \omega_S \cdot S_z + \pi J \cdot 2I_z S_z$$

とします。これは、 I_z 軸まわりに ω_I (rad/s)の化学シフトが、 S_z 軸まわりに ω_S (rad/s)の化学シフトが、そして、 $I_z S_z$ 軸まわりに J (Hz)のカップリングが働くことを意味しています^{注3}。

INEPTのパルス系列を図1に示しました。最初にI核に90°パルスがy軸方向(位相y)から打たれます。そのパルスの演算子は $R_{90, Iy} = \exp\left(i\frac{\pi}{2}I_y\right)$ となりますが、ここは簡単にするため、スタートとしての平衡磁化 I_z が90°yパルスにより I_x になったとしておきましょう。一応、数式では

$$R_{-90, Iy} \cdot I_z \cdot R_{90, Iy} = \exp\left(-i\frac{\pi}{2}I_y\right) \cdot I_z \cdot \exp\left(i\frac{\pi}{2}I_y\right) = I_x$$

のように表されます。スタートである I_z に対して、お互いにiの前が逆符号の(Rはユニタリー演算子ですので複素共役どうしの)演算子を両端からかけます。次に $\tau/2$ だけ休みます。その間の展開のための演算子は $U = \exp\left(i\mathcal{H}\frac{\tau}{2}\right)$ となります($\hbar$ を省略してあります)。そして、I核とS核の両方に180°パルスが打たれますので、そのパルスの演算子は

$$R_{180 \cdot Iy \cdot 180 \cdot Sy} = \exp(i\pi I_y) \cdot \exp(i\pi S_y) \\ = \exp(i\pi I_y + i\pi S_y)$$

です。最後に再び $\tau/2$ だけ休みますので、展開の演算子として再び $U = \exp(i\mathcal{H}\frac{\tau}{2})$ がきます。さて、これらを左から順番に並べると

$$U(\tau) = \exp(i\mathcal{H}\frac{\tau}{2}) \cdot R_{180 \cdot Iy \cdot 180 \cdot Sy} \cdot \exp(i\mathcal{H}\frac{\tau}{2})$$

となります。ここで以下のように式を変形します。

$$U(\tau) = R_{180 \cdot Iy \cdot 180 \cdot Sy} \cdot R_{-180 \cdot Iy \cdot -180 \cdot Sy} \cdot \exp(i\mathcal{H}\frac{\tau}{2}) \cdot \\ R_{180 \cdot Iy \cdot 180 \cdot Sy} \cdot \exp(i\mathcal{H}\frac{\tau}{2})$$

先頭に2つの項を付け加えたのですが、この2項は $R_{180 \cdot Iy \cdot 180 \cdot Sy} \cdot R_{-180 \cdot Iy \cdot -180 \cdot Sy} =$

$$\exp(+i\pi I_y + i\pi S_y) \cdot \exp(-i\pi I_y - i\pi S_y) = 1$$

です。これは I 核と S 核に $+180^\circ$ パルスを与え、直後に -180° パルスを与えることを意味しますので、この2つをあわせて先頭に付け加えたとしても特に問題はありせん。ところが、真ん中の

$$R_{-180 \cdot Iy \cdot -180 \cdot Sy} \cdot \exp(i\mathcal{H}\frac{\tau}{2}) \cdot R_{180 \cdot Iy \cdot 180 \cdot Sy}$$

だけに着目すると面白いことが起こるのです。この R はパルスによる回転を表し、ユニタリー演算子と呼ばれます。このようなユニタリー演算子は真ん中の $\exp$ の中に入れることができ、

$$\exp\left\{i\left(R_{-180 \cdot Iy \cdot -180 \cdot Sy}\right) \cdot \mathcal{H} \cdot \left(R_{180 \cdot Iy \cdot 180 \cdot Sy}\right) \frac{\tau}{2}\right\}$$

のように変えることができます。すると、次のように計算されます。

$$\left(R_{-180 \cdot Iy \cdot -180 \cdot Sy}\right) \cdot \mathcal{H} \cdot \left(R_{180 \cdot Iy \cdot 180 \cdot Sy}\right) \\ = \left\{\exp(-i\pi I_y - i\pi S_y)\right\} \cdot (\omega_I \cdot I_z + \omega_S \cdot S_z + \pi J \cdot 2I_z S_z) \cdot \\ \left\{\exp(i\pi I_y + i\pi S_y)\right\} = -\omega_I \cdot I_z - \omega_S \cdot S_z + \pi J \cdot 2I_z S_z$$

なぜ最後のようなのかについてはあまり深入りしませんが、 $\exp(-i\pi I_y) \cdot I_z \cdot \exp(+i\pi I_y) = -I_z$ のような式を利用しています。これは磁化 I_z に y 位相で 180° パルスを当てると、 I_z が y 軸まわりに回転して $-I_z$ になることを意味しています。このように複素共役の関係にあるユニタリー演算子で対象とする演算子 I_z を挟むと、その演算子 I_z は回転させられることになります。しかし、ここで不思議なのは回転させられた I_z は今そこにある磁化ベクトルではなく、 I 核の化学シフトを示すハミルトニアン軸です。このINEPTの最中の I 核の磁化ベクトルは xy 平面上にあるので、 I_z は磁化ベクトルそのものではなく、むしろその横磁化ベクトルを回転させるための駆動

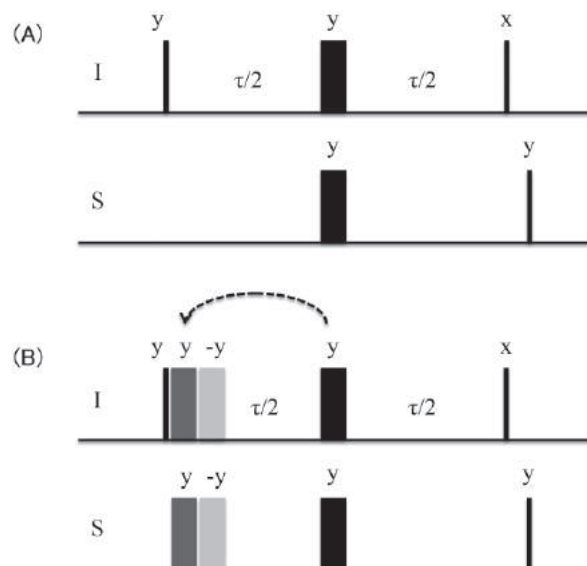


図1 NMRでよく出てくるINEPT部分のパルス系列
細い縦線と太い縦線はそれぞれ 90° と 180° パルスを表す。それらの上に記された x, y はパルスの位相を表す。ベクトルモデルにおいては、回転座標系におけるパルスによる回転軸に相当する。(A) のパルス系列に対して、(B) では $\{\tau/2 - \pi - \tau/2\}$ の真ん中の I 核と S 核への 180° パルスを前方に移した。あるいは、前方に 180°_{+y} 180°_{-y} パルスを付け加えた。これにより、前半 $\tau/2$ の間のハミルトニアン内の I_z, S_z の符号が逆転する。なお $2I_z S_z$ の直積演算子の符号は変わらない $(-)\times(-)=(+)$ 。そのため、前半と後半 $\tau/2$ ずつの時間発展演算子を合わせると、それぞれの I, S スピンの化学シフトはキャンセルされるが、 J_{IS} カップリングは残ることになる。

力です。ところが $180^\circ y$ パルスによって駆動力の軸である I_z の方がむしろ逆転させられてしまったと考えることもできるのです。このように、磁化ベクトルそのものを時間とともに順をおって時間発展演算子で回転させるのではなく、その駆動力であるハミルトニアンの方を時間とともに回転させて、後からスタートの磁化にまとめてかぶせてやるような方法があります。ハミルトニアンが時間に依存しないなどの制限はありますが、NMRでは2つのうち分かりやすい方を選んで説明に使うことができますので、両方を使えるようにしておくといよいでしょう。

さて、化学シフトの軸である I_z と S_z は $180^\circ y$ パルスを I, S 核の両方に打つことによって逆転しました。一方、 J カップリングの軸である $2I_z S_z$ 軸の方はどうでしょうか？ これは $(-I_z) \otimes (-S_z) = (+I_z S_z)$ の関係から、そのままの符号となります^{注4}。もちろん、 I 核だけに 180° パルスをかけた場合には、この J カップリングの軸も反転します $(-I_z) \otimes (S_z) = (-I_z S_z)$ 。さて、それではINEPTの間に働く演算子をすべてまとめてみましょう。

$$\begin{aligned}
& R_{180^\circ I_y, 180^\circ S_y} \cdot \left\{ R_{-180^\circ I_y, -180^\circ S_y} \cdot \exp\left(i\mathcal{H} \frac{\tau}{2}\right) \cdot \right. \\
& \quad \left. R_{180^\circ I_y, 180^\circ S_y} \right\} \cdot \exp\left(i\mathcal{H} \frac{\tau}{2}\right) \\
&= R_{180^\circ I_y, 180^\circ S_y} \cdot \exp\left\{i(-\omega_I \cdot I_z - \omega_S \cdot S_z + \pi J \cdot 2I_z S_z) \frac{\tau}{2}\right\} \\
& \quad \cdot \exp\left\{i(+\omega_I \cdot I_z + \omega_S \cdot S_z + \pi J \cdot 2I_z S_z) \frac{\tau}{2}\right\} \\
&= R_{180^\circ I_y, 180^\circ S_y} \cdot \exp\{i(\pi J \cdot 2I_z S_z)\tau\}
\end{aligned}$$

複雑な計算でしたが、このINEPTの間の化学シフトによる展開は最終的には収束して消えてしまい、 J カップリングだけが τ の間に展開したという結果になりました。

パルスを前方に移動させる

ここで、INEPTパルス系列の真ん中にある I 核と S 核への $180^\circ y$ パルスを前方に移した結果、前半(左側) $\tau/2$ の間に作用する化学シフトのハミルトニアン I_z の符号が反転したと考えてもよいでしょう^{注5}。そのパルス移動の名残として、最終的にまとめられた時間発展演算子には J カップリングの演算子 $\exp\{i(\pi J \cdot 2I_z S_z)\tau\}$ の前に $R_{180^\circ I_y, 180^\circ S_y}$ が見られます。これはたまたま 180° パルスでしたので忘れてしまっても結果に大きな影響はありませんが、 90° パルスの場合には注意が必要です。つまり、最初に移動させた 90° パルスで磁化ベクトルを回転させて

	ωI_z Iの化学シフト	$2\pi J I_z S_z$ I-SのJカップリング
I - +	—	—
S + +	—	—
- +		
I - +	—	○
S - +	—	○
+ +		
I + +	○	—
S - +	○	—
- +		
I + +	○	○
S + +	○	○
+ +		

図2 INEPTを含めた種々のspin-echoシリーズ

図1のように $\{\tau/2 - \pi - \tau/2\}$ の真ん中の 180° パルスを前方に移した場合、そのパルスがなぞった時間域の化学シフトのハミルトニアン I_z の符号が逆転する。その場合(一)で示した。もし、ハミルトニアン内の I_z と S_z の両方の符号が逆転する場合には、両者の直積である $I_z S_z$ の符号は(+)のままであるので、 J カップリングは有効に働く。右側に I 核の化学シフト展開と J_{IS} カップリング展開について、これらが働く場合には(○)を、前半 $\tau/2$ と後半 $\tau/2$ とで打ち消し合う場合を(一)で表した。

おいてから、まとめた時間発展演算子をかけます。また、パルスを前方にではなく後方に移した場合、符号の変化に注意してください。 90° パルスを後方へ移した場合には、磁化ベクトルは最後に -90° パルスによって回転させられることになります。

図2にINEPTなどNMRのパルス系列によく出てくる $\{\tau/2 - \pi - \tau/2\}$ のパターンをリスト化してみました。例えば I 核への 180° パルスを前へ移動させると、その移動がなぞった時間域のハミルトニアン I_z が反転すると考えることができます。これで I 核の化学シフトのハミルトニアン I_z の符号は負になります。同様に、 S 核の 180° パルスを前へ移動させると、その移動した時間域のハミルトニアン S_z が反転します。これで S 核の化学シフトのハミルトニアン S_z の符号は負になりますが、この4つのパターンでは S 核の初期の磁化ベクトルは z 方向にありますので、 S 核の化学シフトによる展開は実質的には何の影響も与えません。 I と S 核の間の J カップリングのハミルトニアンについては、 I_z, S_z 両者の掛け算としての符号を考えますので、 I, S 両方の 180° パルスを移動させた場合には、その時間域の J カップリングのハミルトニアン $I_z S_z$ の符号はそのままとります。

さて、INEPT全体としての演算子は

$$U(\tau) = R_{180^\circ I_y, 180^\circ S_y} \cdot \exp\{i(\pi J \cdot 2I_z S_z)\tau\}$$

と求まりましたので、これを I_x に $90^\circ y$ パルスをかけた直後の I_x にかけていくと I_x がどのように発展していくのかが分かります。

$$U^*(\tau) \cdot I_x \cdot U(\tau)$$

$$\begin{aligned}
&= \exp\{-i(\pi J \cdot 2I_z S_z)\tau\} \cdot R_{-180^\circ I_y, -180^\circ S_y} \cdot I_x \cdot \\
& \quad R_{180^\circ I_y, 180^\circ S_y} \cdot \exp\{i(\pi J \cdot 2I_z S_z)\tau\}
\end{aligned}$$

真ん中の $R_{-180^\circ I_y, -180^\circ S_y} \cdot I_x \cdot R_{180^\circ I_y, 180^\circ S_y}$ は、 I_x に(真ん中から前方に移してきた) $180^\circ y$ パルスをかけるという意味ですので、結果として $-I_x$ が生じます。 S 核にも $180^\circ y$ パルスがかけられていますが、これは I_x に対しては何も作用しません。次の $\exp\{-i(\pi J \cdot 2I_z S_z)\tau\} \cdot (-I_x) \cdot \exp\{i(\pi J \cdot 2I_z S_z)\tau\}$ は $-I_x$ を τ 時間の間 J カップリングで展開させることを意味します。そこで、 $-I_x \rightarrow -I_x \cos(\pi J \tau) - 2I_y S_z \sin(\pi J \tau)$ となります。

さいごに

溶液NMRのパルス系列をよく見ますと、そのほとんどは図2に示した4つのパターンを組み合わせ

ていることが分かります。さらに、タンパク質の解析に使われるHNCACOのように複雑そうにみえる実験でも、対象とするスピン系は ^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}'$ のようにお互いに異種核どうしであり、スカラーカップリングの演算子は $I_z S_z$ の形で表されます($^{13}\text{C}^\alpha$ の化学シフトは56ppm付近、 $^{13}\text{C}'$ の化学シフトは176ppm付近とお互いに離れていますので、異種核のように扱うことができます)。したがって、図2のパターンがそのまま適用できます。この平均ハミルトニアン概念を使うと、TROSYのspin-state selective inversionパルス系列を図だけで大まかに理解することができ、なぜこのパルスの位相を反転させるとTROSYではなくanti-TROSYが選ばれてしまうのかなどがひと目で分かるようになります。これを最初から直積演算子で解いていては、確かに答えは求まりますが、大変な時間がかかってしまいます。固体NMRでも最近は溶液NMRで使うパルス系列とほとんど同じ様式でタンパク質の微結晶を測ることが多く、今回ご紹介した内容はきっと役立つことでしょう。本当に難しいのは同種核の場合です。これは、結合のハミルトニアンが化学シフトのハミルトニアンと交換できないため、今回のような平均化が簡単にできないからです。したがって、3D CBCACONHと2D TOCSYのどちらを理解するのが難しいかと問われれば、まちがいに後者であろうと思われる。

(注1) 磁化ベクトル I_x が、化学シフト ω (rad/s)により $I_x \rightarrow I_x \cos(\omega t) + I_y \sin(\omega t)$ のように展開する。第1項目には $\cos$ が、第2項目には $\sin$ がきます。第1項目には展開前と同じコヒーレンスがきますが、第2項目では、 $x \rightarrow y \rightarrow -x \rightarrow -y$ の順に添字が回ります。なお、この時の化学シフトのハミルトニアンは $\mathcal{H} = \omega \cdot I_z$ です。 z 軸を中心として $+x$ ベクトルを 90° だけ回すと $+y$ 方向に行くので、第2項目の添字は $+y$ になります。つまり、ベクトルをハミルトニアンが示す軸のまわりに 90° 回せば何処に行くかさえ分かれば、これを暗記する必要はありません。

(注2) 磁化ベクトル I_x が、 S 核との J カップリングにより $I_x \rightarrow I_x \cos(\pi J t) + 2I_y S_z \sin(\pi J t)$ のように展開します。複雑に見えますが、化学シフトの展開の式と比べてみると、第2項目に 2 と S_z が増えているだけで、その他の規則はほとんど変わりません。ただし、この時の J カップリングのハミルトニアンは $\mathcal{H} = \pi J \cdot 2I_z S_z$ です。化学シフトのハミルトニアンに比べて「 $2S_z$ 」が増えています(さらに ω が πJ になっている)。よってそれをそのまま第2項目に書き加えるだけでよいのです。この規則にしたがうと、次のような式にも応用できます。

$$2I_x S_x \rightarrow 2I_x S_x \cos(\pi J t) - I_z \sin(\pi J t), \mathcal{H} = \pi J \cdot 2I_y S_x$$

ハミルトニアンの軸が $2I_y S_x$ と変ですが、TOCSY実験を表す時などに便利なのです。数式というより、パズルだと思って見てください。

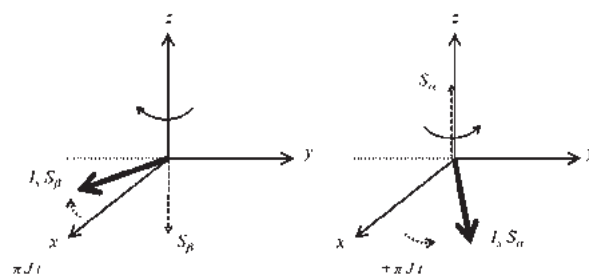


図3 S 核とスカラーカップリングした I 核における J_{IS} カップリング展開の様子

古典的ではあるが、 S 核は上向き S_α と下向き S_β の2つのスピン状態のどちらかにあると考える。それぞれのスピン状態に結合した I 核は、あたかも化学シフトがそれぞれ $\pm J/2$ (Hz) だけずれたかのように展開する。 S_α と S_β の2つのスピン状態を z 軸方向に矢印で示した。この矢印を軸にして2種類の I_x 磁化ベクトルがそれぞれ逆向きに回る。このようなベクトルモデルは物理的な描像を正しく表しているわけではなく、あくまで理解を助けるための疑似的な(しかし強力な)表現法の一つに過ぎない。

(注3) J カップリングのハミルトニアン演算子 $\mathcal{H} = \pi J \cdot 2I_z S_z$ に、なぜ「 2 」や「 π 」が付くのか不思議に思われるかもしれませんが、あまり深入りしませんが、まず単位をかえると $2\pi J$ (rad/s)は J (Hz)であるという点を押さえておいてください。なお、 $2I_z S_z$ 軸まわりに $J/2$ (Hz)のカップリングが働くと考えてもかまいません。実際、この演算子をヘルツ単位で表すと $J \cdot I_z S_z$ となり、 J カップリングの展開の直積演算子も $I_x \rightarrow I_x \cos(\frac{J}{2}t) + 2I_y S_z \sin(\frac{J}{2}t)$ となります。この方が化学シフトの展開の式と書式を統一することができ、もともとはsingletであったピークが、なぜ J カップリングによって高磁場側と低磁場側へそれぞれ $J/2$ (Hz) ずつ逆方向にずれたdoubletになるのかをきれいに説明することができます。しかし、 $\cos, \sin$ の中の位相を化学シフトでの ωt に合わせてradの単位で表してしまうと、 $\pi J t$ という妙な書き方になってしまい、なぜ 2π ($=360^\circ$)ではなく π ($=180^\circ$)だけがぽつんと登場するのか、初心者にはなかなか理解しがたい壁となります。

ここで I_x には2種類の S 核が結合していると考えます。一つは S スピンの上向きでこれを S_α と表すことにします。もう一つは S スピンの下向きでこれを S_β と表すことにします。また、 J をヘルツ単位で表すことにします。 S_α が結合した I_x スピンは、化学シフトが少しずれて $+J/2$ で展開します。そこで、化学シフトの展開における直積演算子とまったく同じ様式で次のように書けます。

$I_x S_\alpha \rightarrow I_x S_\alpha \cos(+\frac{J}{2}t) + I_y S_\alpha \sin(+\frac{J}{2}t)$ これは化学シフトの式における ω を $+J/2$ に書き換え、 I_x, y に S_α を付けただけです。一方、 S_β が結合した I_x スピンは、化学シフトのずれの向きが逆で $-J/2$ で展開すると考えます。そこで、 $\cos, \sin$ の中に負号がつきます。 $I_x S_\beta \rightarrow I_x S_\beta \cos(-\frac{J}{2}t) + I_y S_\beta \sin(-\frac{J}{2}t)$ それぞれの式を足し合わせて二重線のピークを同時に表すと、

$$I_x S_\alpha + I_x S_\beta \rightarrow (I_x S_\alpha + I_x S_\beta) \cos(\frac{J}{2}t) + (I_y S_\alpha - I_y S_\beta) \sin(\frac{J}{2}t)$$

となりますが、これはもちろん $\cos(-\theta) = \cos(\theta)$, $\sin(-\theta) = -\sin(\theta)$

の関係を使っています。さらに、上向きの S_α と下向きの S_β を足し合わせると、すべてのスピン状態となり1に置き換えられます。一方、上向きの S_α から下向きの S_β を引くと、少しだけ上向きのスピン

が残り、これが $2S_z$ となります。したがって、これらを上記に代入すると、 $I_x \rightarrow I_x \cos(\frac{J}{2}t) + 2I_y S_z \sin(\frac{J}{2}t)$ となります。

(注4) ⊗の記号は単なる行列どうしの内積ではなくクロネッカー積(ベクトルどうしの外積や直積に相当)を表します。 I_x や S_z などの演算子はしばしば行列で表されますが、 $I_x S_z$ のように2種類のスピンの絡んだ形の演算子を表すには、二つの行列を外積します。行と列の数は、スピンの数が増えるにつれてどんどん増殖していきます。直積演算子(product-operator)の名はここから来ています。

(注5) いつでもこのような方法が使えるとは限りません。化学シフトのハミルトニアン $\omega_I \cdot I_z + \omega_S \cdot S_z$ は 180° パルスで I, S 両スピンに打つことによって反転するのですが、弱い J カップリングのハミルトニアン $\pi J \cdot 2I_x S_z$ は反転しません。この2種類のハミルトニ

アンが交換可能な場合にのみ、平均ハミルトニアンとしてまとめることができます。 I と S 核が同種核の場合は $\mathcal{H} = \omega_I \cdot I_z + \omega_S \cdot S_z + \pi J \cdot 2(I_x S_x + I_y S_y + I_z S_z)$ となるため、化学シフトの項と強い J カップリングの項が交換できず、上記のような簡単な方法で平均ハミルトニアンとしてまとめることはできないのです。

参考文献

- ・(引地 邦男 著) NMRノート http://www.h6.dion.ne.jp/~k_folder/
- ・(日本化学会 編) 第五版 実験化学講座8 NMR・ESR (丸善株式会社) 2006.
- ・(竹腰 清乃理 著) 新・物質科学ライブラリ16 磁気共鳴-NMR (サイエンス社) 2011.



長土居 有隆 (ながどい・ありたか)

1999年3月 横浜市立大学大学院 総合理学研究科 理学博士 取得
 1998年4月 日本学術振興会 特別研究員
 2001年4月 横浜市立大学大学院 総合理学研究科 助手
 2013年4月 同大大学院 生命医科学研究科 助教 現在に至る



池上 貴久 (いけがみ・たかひさ)

1991年 3月 大阪大学 理学部 生物学科 卒業
 1991年 4月 株式会社日立製作所 計測器事業部 入社
 1994年 4月 大阪大学 大学院理学研究科 生物化学 修士課程 入学
 1996年 4月 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 教務職員
 1997年 4月 同上 助手
 1999年 3月 博士号取得(理学生物化学 大阪大学)
 2000年11月 フランクフルト大学 (Prof. Griesinger) JSPS海外特別研究員
 2001年10月 ゲッティンゲン マックスプランク研究所 同上
 2002年 3月 大阪大学 蛋白質研究所 助教授
 2003年 日本核磁気共鳴学会会員
 2003年10月 大阪大学 生命機能研究科 (兼任) 助教授
 2007年 4月 蛋白質研究所 および 生命機能研究科 (兼任) 准教授
 2012年 4月 京都大学 エネルギー理工学研究所 客員准教授
 2014年 4月 横浜市立大学 生命医科学研究科 教授 現在に至る

四極子核固体NMR法の基礎の基礎

高知大学総合科学系複合領域科学部門

山田 和彦

kyamada@kochi-u.ac.jp

1. はじめに

ほとんどすべての元素は固有の核スピン (I) を有する安定同位体を含んでいる。従って、原理的には周期表上のほとんどの元素がNMR測定の対象になるはずである。また、その8割程度は四極子核と呼ばれる $I \geq 1$ の核種であり、四極子モーメントを有している。そのため、周囲の電荷が創出する電場勾配と四極子モーメントの間で、核四極相互作用と呼ばれる静電的な核スピン相互作用が生じる。概して、NMRユーザーは ^1H や ^{13}C など $I = 1/2$ の核種を測定対象とすることが多く、四極子核NMRを使用する機会は少ないかもしれない。これは、化学シフト相互作用や双極子-双極子相互作用などに比べて、核四極相互作用は線形に与える影響が大きいため、線幅が広がることを反映した結果と思われる。しかしながら、近年の技術的な進歩に伴って、これら難易度は確実に下がっており、NMR測定が可能な四極子核が増えてきた。その結果、NMR法を応用できる研究分野は確実に広がってきている。このような背景から、従来からのNMRユーザーのみならず、これからNMR法を活用する研究者においても、四極子核を測定対象とするNMR法への関心が高まってきている。

後述する通り、四極子核固体NMRスペクトルは、広い線幅を有し特徴的な線形を示すことが多い。 $I = 1/2$ の核種のNMRスペクトル解析と異なり、NMRパラメータを算出するためには、理論曲線を用いて実験スペクトルを最適化することが一般的である。筆者の個人的な意見ではあるが、この作業が四極子核NMRのハードルを上げているように思われる。また、初学者向けに適切な教科書が存在しないことも敬遠される一因だと感じている。そこで本稿では、四極子核NMRにこれから挑戦するNMRユーザーを対象として、最もシンプルな次元NMRスペクトルを中心に、四極子核NMRにおいて基盤となるスペクトル解析について概説する。

2. 核四極相互作用とは？

$I > 1/2$ の場合、分子自身が創出する電場勾配 (electric-field-gradient, EFG) と原子核固有の四極子モーメントの積で決定する核四極相互作用が新たに生じる^[1]。この相互作用は、他の核スピン相互作用と同様に異方性を有するため、テンソルで記述することができる。そして、EFGテンソルはトレースレスであるため、相互作用の大きさを示す核四極結合定数 (C_Q [Hz]) とEFGテンソルの対称性を示す非対称因子 (η_Q , $0 \leq \eta_Q \leq 1$) が、核四極相互作用のパラメータとして用いられる。

また、核四極相互作用のハミルトニアンは

$$\mathcal{H}_Q = \frac{C_Q}{4I(2I-1)} \left[\frac{\sqrt{6}}{3} (3I_z^2 - I^2) V_0 + (I_z I_+ + I_+ I_z) V_{-1} - (I_z I_- + I_- I_z) V_{+1} + I_+^2 V_{-2} + I_-^2 V_{+2} \right] \quad (1)$$

と記述される^[2]。ここで、 $I_{\pm}$ は昇降演算子、 V はEFGテンソルのspherical tensor componentである。仮に核四極相互作用の大きさがゼーマン相互作用に比べて十分小さい場合 (High-field approximation)、式 (1) は簡素化され、

$$\mathcal{H}_Q^{(1)} = \frac{\sqrt{6} C_Q}{12I(2I-1)} [3I_z^2 - I(I+1)] V_0 \quad (2)$$

と

$$\mathcal{H}_Q^{(2)} = -\frac{1}{\nu_0} \left[\frac{C_Q}{4I(2I-1)} \right]^2 \{ 2V_{-1}V_1I_z[4I(I+1) - 8I_z^2 - 1] + 2V_{-2}V_2I_z[2I(I+1) - 2I_z^2 - 1] \} \quad (3)$$

になり、前者を一次の核四極相互作用、後者を二次の核四極相互作用と呼ぶ^[2]。ここで、 ν_0 はラーモア周波数である。これら2式は摂動論から導き出された結果である。スペクトル解析を行う上で、 C_Q 値が小さい場合は式 (2) を、また、大きい場合は式 (3) を適宜使い分ける。式 (3) 右辺の分母にラーモア周波数が含まれていることから、二次の核四極相互作用の大きさは外部磁場に反比例することになる。つまり、高磁場NMR装置を活用することで、二次の核四極相互作用の大きさを抑制することが可能である。

これらの議論で最も重要なことは、式 (2) と式 (3) の導出は摂動論を用いていることである。換言すれば、仮に高磁場で測定しても C_Q 値が大きくなりすぎると、もしくは、小さな C_Q 値を有する試料

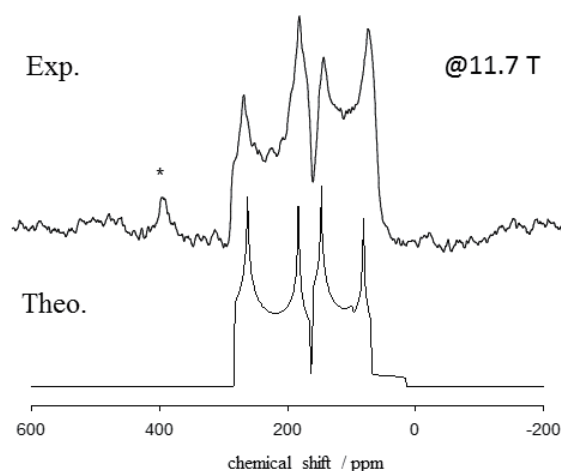


図1 Experimental and calculated ^{17}O MAS spectra of ^{17}O -Fmoc-amino acid, measured at 11.7 T with a sample spinning frequency of 19.9 ± 0.2 kHz. The peak marked by * arises from the MAS rotor material, ZrO_2 .

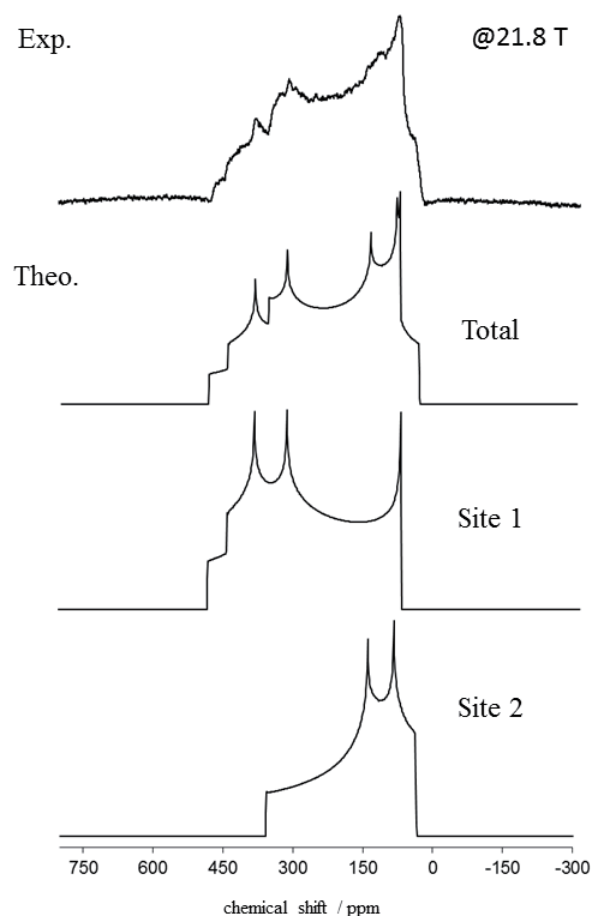


図2 Experimental and calculated ^{17}O stationary spectra of ^{17}O -Fmoc amino acid, observed at 21.8 T. The calculated total spectrum (site A + site B) is a sum of site A and site B sub-spectra with a 1 : 1 intensity ratio.

であっても低磁場装置で測定すれば、両式は成り立たなくなる (そもそも一次や二次という定義は存在しなくなる)。このような場合は、式 (1) を用いて遷移確率を計算する必要がある。本稿では、この手法を direct diagonalization 法と呼ぶことにする。ところで、 C_Q 値以外にも核四極相互作用の大きさを表すパラメータとして、しばしば quadrupole frequency (ν_Q [Hz]) が用いられる^[2]。

$$\nu_Q = \frac{3C_Q \sqrt{1 + \frac{\eta_Q^2}{3}}}{2I(2I-1)} \quad (4)$$

これは NQR もしくはゼロ磁場 NMR で観測する共鳴周波数である。四極子核の NMR スペクトルを解析する際、 ν_Q と ν_0 の大きさを比較する (見積もる) ことで、摂動論から導き出された式を用いるか、direct diagonalization 法を採用するかを判断すればよい。次項目以降、核四極相互作用の大きさがゼーマン相互作用に比べて十分小さい場合 (摂動論) と、そうではない場合 (direct diagonalization 法) において、それぞれの実験スペクトルを紹介し、スペクトル解析の基礎について述べる。

3. 核四極相互作用がゼーマン相互作用に比べて小さい場合

本項目では、(筆者の個人的な見解ではあるが) 四極子核の中でも最も重要性が高いと思われる、酸素 17 安定同位体 ($I=5/2$ 、天然存在比 = 0.038%、 $\gamma = -3.62808 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $Q = -2.558 \text{ fm}^2$) を測定対象とする酸素 NMR を事例に、摂動論を用いた四極子核 NMR のスペクトル解析方法を概説する。図 1 と図 2 に、MAS プロブを用いて試料を高速回転した状態と、静止状態におけるアミノ酸の固体 ^{17}O NMR スペクトルをそれぞれ示す^[3]。両スペクトルとも複雑で、かつ、特徴的な線形を示している。一般に、理論曲線を用いてこれら実験スペクトルを最適化することで、NMR パラメータを算出することになる。ところで、試料を高速回転しているか否か、一次、二次、もしくは、両方の核四極相互作用を用いるべきかどうか、化学シフト相互作用や双極子-双極子相互作用を考慮すべきかどうか、など試料や測定条件によって、計算に用いる理論式が異なるので注意が必要である。本項目では、中央遷移 (central transition、 $m = 1/2 \Leftrightarrow m = -1/2$) に着目し、(1) 静止状態において二次の核四極相互作用が支配的な場合、(2) MAS プロブによる高速回転条件下で二次の核四

極相互作用が支配的な場合、そして、(3)(1)の状態に化学シフト相互作用を追加した場合について述べる。

3.1 静止状態において二次の核四極相互作用が支配的な場合

^{17}O ($I=5/2$) NMR の場合、強磁場中においてゼーマン分裂が起こると六つのエネルギー準位が存在する。そのうち、central transition は一次の核四極相互作用からは影響を全く受けないので、共鳴周波数に変化はない。しかしながら、二次の核四極相互作用では、それらエネルギー準位も変動することから、次式で示す通り、共鳴周波数 ($\nu_Q^{(2)}$) はシフトする^[4]。

$$\begin{aligned} \nu_Q^{(2)} &= \left\langle -\frac{1}{2} \left| \mathcal{H}_Q^{(2)} \right| -\frac{1}{2} \right\rangle - \left\langle \frac{1}{2} \left| \mathcal{H}_Q^{(2)} \right| \frac{1}{2} \right\rangle \\ &= -\frac{1}{\nu_0} \left[\frac{C_Q}{4I(2I-1)} \right]^2 \{ 2V_{-1}V_1[3-4I(I+1)] \\ &\quad + V_{-2}V_2[3-4I(I+1)] \} \quad (5) \end{aligned}$$

試料が静止状態である場合、EFG テンソルの Principal Axis System (PAS) を実験室座標系に変換する必要がある。具体的には、式 (5) 中の V_i (実験室座標系) を V_i^{PAS} (PAS フレーム) で置き換え

ば良い。図3 (a) に、本稿で定義した磁場中 (実験室座標系) における EFG テンソルの PAS フレームを示す^[5]。このような座標変換には、次式を使うと便利である。

$$V_i = \sum_{j=-2}^2 D_{ji}^{(2)}(\phi, \theta, 0) V_j^{\text{PAS}} \quad (6)$$

ここで $D_{ji}^{(2)}$ は Wigner rotation matrix である^[6]。試料が単結晶であれば、上式で一組の θ と ϕ が決まり共鳴周波数を求めることができる。従って、その周波数の位置に鋭い一本の NMR 吸収線を示すことになる。一方、測定対象としてより一般的である粉末試料においては、微結晶がランダムに配向しているので、 θ と ϕ はあらゆる可能な向きをとる。その結果、NMR スペクトルは粉末パターンと呼ばれる特徴的な形をした線幅の広がりを見せる。図4 (a) に、空間平均した静止状態での核四極相互作用 ($I=5/2$) による粉末パターンを示す。この計算では、 $\nu_0=100\text{ MHz}$ 、 $C_Q=10\text{ MHz}$ と仮定し、 η_Q を 0.2 刻みで 0 から 1 まで変化させた。このように線形は、 η_Q によって大きく変化することが分かる。また、 η_Q が同じ値であれば、線幅は C_Q 値と I によって決定されている。スペクトル解析の基本は、実際に測定された実験スペクトルに対して、式 (5) に適当な C_Q 値と η_Q を代入して、計算した理論スペクトルとの差が最小になるまでこの作業を繰り返す。最もよく実験スペクトルを再現できた値が、実験で得られた NMR パラメータとなる。

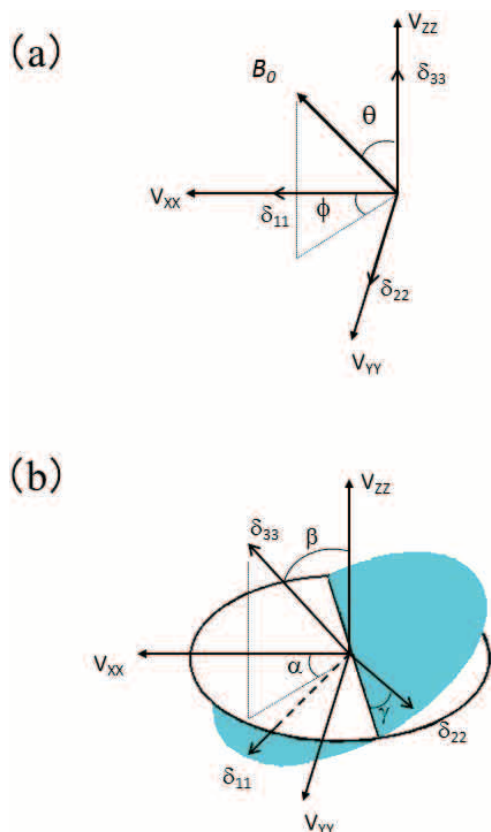


図3 (a) Initial alignment of the ^{17}O EFG and CS tensors and direction of the external magnetic field, B_0 . (b) Euler angles relating EFG and CS tensors.

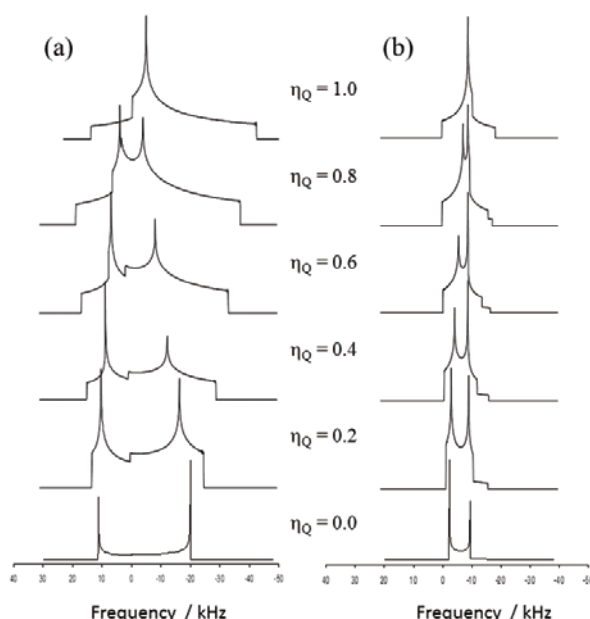


図4 Dependence of η_Q on (a) stationary and (b) MAS NMR spectra of half-integer quadrupole nuclei, calculated by Eq. (5). See the text in the details.

3.2 MAS プローブによる高速回転条件下で 二次の核四極相互作用が支配的な場合

試料を外部磁場に対してマジック角度 ($\theta_M = 54.7^\circ$) で高速回転させる場合は、式 (5) において、EFGテンソルのPASフレームをMASフレームに、そして、MASフレームを実験室座標系に変換すれば良い。具体的には、

$$V_i = \sum_{j=-2}^2 D_{j,i}^{(2)}(\omega_R t, \theta_M, 0) V_j^{MAS} \quad (7)$$

と

$$V_j^{MAS} = \sum_{k=-2}^2 D_{k,j}^{(2)}(\phi, \theta, 0) V_k^{PAS} \quad (8)$$

を順次計算し、式 (5) に代入するだけである。式中の $\omega_R t$ は試料の回転角度に相当する。図4 (b) に前節同様の理論MASスペクトルを示す。試料の回転により、NMR吸収線の線幅が減少することが分かる。また、仮に線幅を上回るMAS回転数になっても、等方的なピークを得ることはできない点に注意が必要である。ところで、共鳴線の真の等方的化学シフト値 (δ_{iso} 、この場合は0 Hz) はスペクトルの中央部分ではなく、共鳴線の左側、即ち、高周波数側に位置している。この実験条件下 (試料回転が

十分高速である場合) で得られるNMRパラメータは、 δ_{iso} 、 C_Q 値、そして η_Q である。図1のカルボン酸の例では、二つの酸素サイトがあると仮定し、それぞれ、C=O: $\delta_{iso} = 305 \pm 2$ ppm、 $C_Q = 7.90 \pm 0.08$ MHz、 $\eta_Q = 0.18 \pm 0.04$ 、O-H: $\delta_{iso} = 180 \pm 2$ ppm、 $C_Q = 7.05 \pm 0.08$ MHz、 $\eta_Q = 0.15 \pm 0.04$ を得ることができた。もし線幅に対して試料回転速度 (周波数) が遅い場合は、化学シフト相互作用同様にサイドバンドが出現する。この場合、測定難易度が上がり得られる線形はより複雑になるが、解析は可能である^[7]。

半整数四極子核固体NMRにおける代表的な高分解能化手法として、MQMAS法^[8]、STMAS法^[9]、DOR法^[10]、DAS法^[11]などが挙げられる。そのうち、通常のMASプローブで測定できるMQMAS法は、普及度という点では群を抜いている。図5にアミノ酸の¹⁷OMQMASスペクトルを示す^[3]。併せて、図6の最上部に同試料の¹⁷OMASスペクトルを示す。MASスペクトルは、複数サイトの重なりから成り、このまま解析することは難しいと思われる (実際にMASスペクトル単体によるスペクトル解析は極めて困難である)。しかしながら、MQMAS

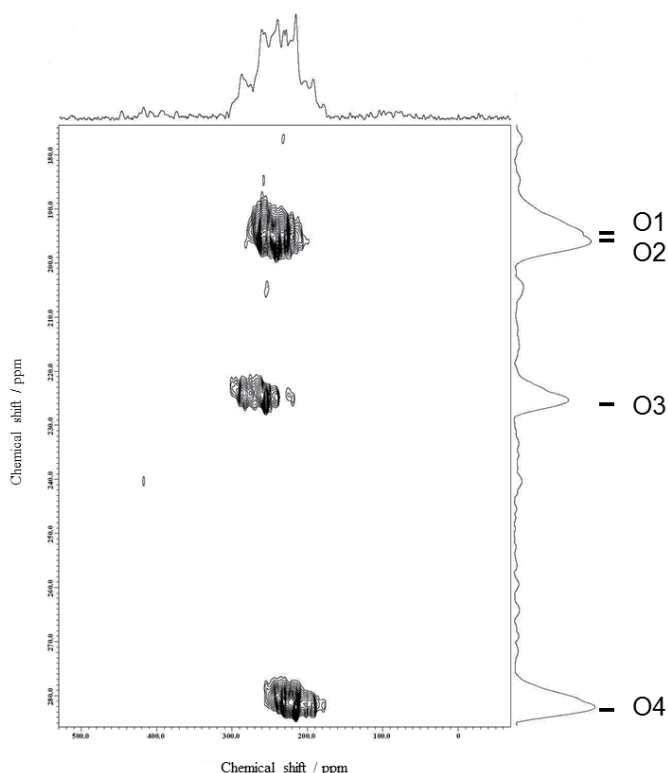


図5 Contour plot of the ¹⁷O z-filter 3QMCMAS spectrum of [¹⁷O]-amino acid, recorded at 16.4 T. The lengths of the first and second hard pulses were 4.5 and 1.4 μ s, respectively. The soft pulse length was 20 μ s. The recycle delay was 5 s. 156 data points were acquired in the t_1 dimensions with 528 transients per point.

法を用いれば、 f_1 投影軸方向に等方的なスペクトルを得ることが可能になり、それぞれのサイトを分離できる。その結果、サイトごとに式 (5) を用いた MAS スペクトルの最適化を行うことが可能になる。ただし、MQMAS 法における信号強度は MQ の発生効率に依存するため定量性の保障はないこと、並びに、線形が歪む場合があることにも注意が必要である。一般論として、MQMAS 法の解析で得られた NMR パラメータを初期値として 1D MAS スペクトルの解析を行い、定量性ととも NMR パラメータの高精度化を施すことが望ましい。

3.3 化学シフト相互作用を追加する場合

化学シフト相互作用が存在する場合は、該当する共鳴周波数を式 (5) に加算すれば良い。本来 chemical shielding (CS) テンソルは遮蔽定数 (σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) で記述すべきであるが、便宜上、本稿では化学シフト値 (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33}) を用いることにする。図 3 (a) の定義より、化学シフト相互作用に寄与する周波数 (ν_{CS}) は

$$\nu_{CS} = \delta_{11} \sin^2 \theta \cos^2 \phi + \delta_{22} \sin^2 \theta \sin^2 \phi + \delta_{33} \cos^2 \theta \quad (9)$$

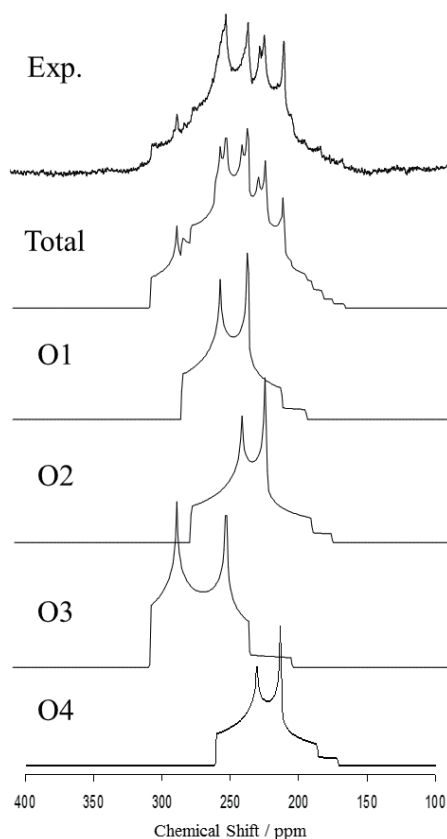


図 6 Experimental and calculated 1D ^{17}O MAS spectra of $[\text{O}^{17}]$ -amino acid, recorded at 16.4 T. The calculated total spectrum is a sum of O1, O2, O3, and O4 sub-spectra with a 1 : 1 intensity ratio.

と記述できる^[6]。ただし、CS テンソルと EFG テンソルの PAS が測定対象の分子座標中で一致しているとは限らないので注意が必要である。言い換えると、式 (5) と式 (9) の ϕ と θ は同一ではない場合がある。このような場合には、どちらかのテンソルを記述する ϕ と θ を基準にして、他方の ϕ と θ を相対的に移動する必要がある。例えば、EFG テンソルの PAS に対して CS テンソルの PAS をオイラー変換で座標転換すればよい (図 3 (b) を参照)。ただし、オイラー変換の定義や右手・左手系の座標軸の設定、そして、回転の方向等、さまざまな定義が使われているので、文献値と比較する場合には、その都度解析に用いた定義を確認しなければならない。図 2 では、図 1 の解析と同様に酸素が 2 サイト存在すると仮定し、各酸素サイトにつき合計 8 個の NMR パラメータ (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33} , C_Q , η_Q , α , β , γ) を使い、実験スペクトルを再現した。ここでは、MAS 法で得られた NMR パラメータと併せて、C=O, $\delta_{11}=478 \pm 9 \text{ ppm}$, $\delta_{22}=409 \pm 9 \text{ ppm}$, $\delta_{33}=28 \pm 9 \text{ ppm}$, $\alpha=14 \pm 10^\circ$, $\beta=90 \pm 8^\circ$, $\gamma=134 \pm 10^\circ$; O-H, $\delta_{11}=325 \pm 9 \text{ ppm}$, $\delta_{22}=108 \pm 9 \text{ ppm}$, $\delta_{33}=107 \pm 9 \text{ ppm}$, $\alpha=10 \pm 15^\circ$, $\beta=12 \pm 8^\circ$, $\gamma=-16 \pm 10^\circ$ を得ることができた^[3]。ところで、これらオイラー角度 (α , β , γ) は、両テンソルの相対的な配向を決定するパラメータであり、分子座標における配向ではないことを強調したい。従って、単結晶 NMR 法や量子化学計算等で分子座標における NMR テンソルの配向を別途決定することが、物性研究においては重要である。

4. 核四極相互作用がゼーマン相互作用に比べて大きい場合

概して、核四極相互作用の大きさがゼーマン相互作用に比べて 2 割以上になると摂動法が用いることが困難になる。その場合は前述した通り、direct diagonalization 法を使用すべきである。図 7 に、両手法で計算した理論スペクトルを示す。この計算では、 $I=3/2$, $C_Q=150 \text{ MHz}$, $\eta_Q=0.1$, $\nu_0=100 \text{ MHz}$ と仮定した。高周波数領域では、両手法とも同一の線形を示したが、低周波数側では、摂動法の方が低周波数側に延伸していることが判明した。従って、 C_Q 値 (と CS テンソル) の算出の際には、摂動法を用いると実際よりも大きな値になる可能性がある。

核四極相互作用によって線幅が広がる NMR スペクトルを計測する測定方法として、周波数掃引法と

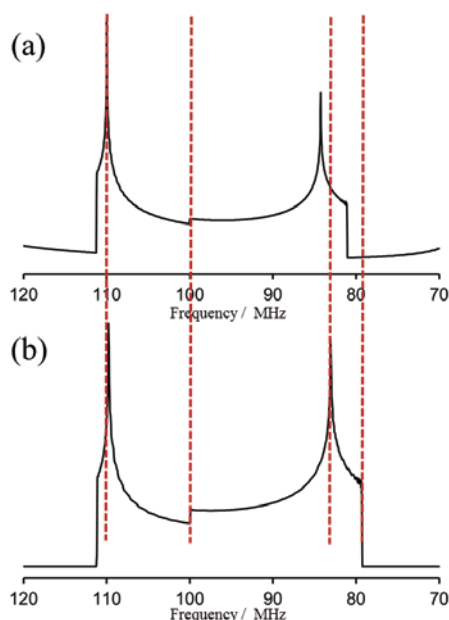


図7 Theoretical NMR spectra of half-integer quadrupole nuclei, based on (a) Eq. 5 and (b) Eq. 1. See the text in the details.

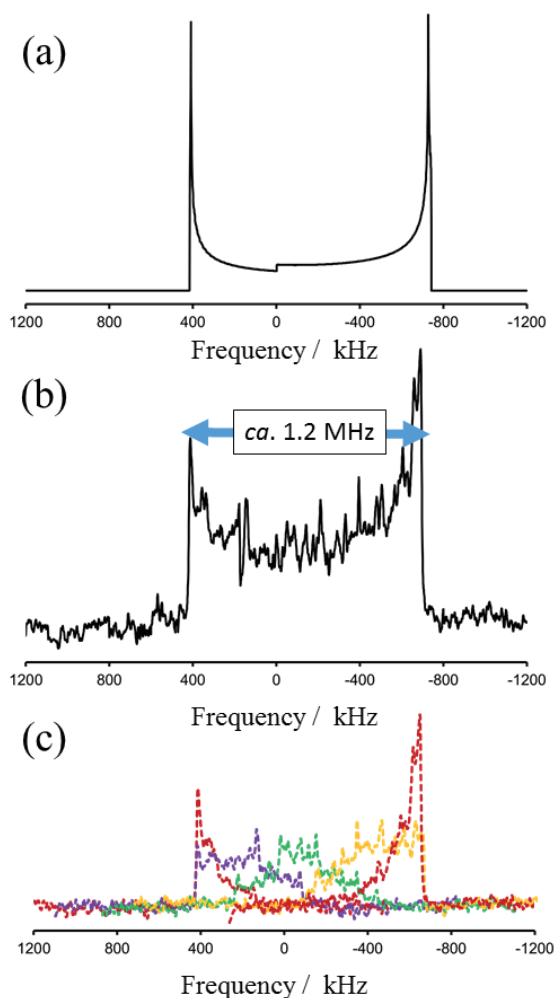


図8 (a) Calculated and (b) experimental stationary ^{79}Br ($I = 3/2$) NMR spectra of SrBr. The experimental spectrum is a sum of (c) five sub-spectra. All the NMR spectra were kindly provided by S. Ohki and K. Deguchi in National Institute for Materials Science, Japan.

磁場掃引法が広く知られている。前者は、固定磁場もしくは静磁場中において、照射するラジオ波の周波数を連続的に変化させてNMR信号を記録する方法である。本手法が提案された当初は、比較的输出の弱いラジオ波を連続照射するCW (continuous wave) 法が主流であったが、近年は、ある周波数範囲に強いパルス照射するFT (Fourier transform) 法でNMR信号を受信しながら、周波数を掃引する手法が用いられている。後者は、照射周波数を固定して、外部磁場を連続的に掃引することでNMR信号を記録する方法である。こちらも近年はパルスFT法を用いるのが一般的である。次項目で、それぞれの手法における実験スペクトルの実例と、長所と短所について簡便に述べる。

4.1 周波数掃引型固体 NMR 法

周波数掃引型NMR法の実例として、図8に静止状態におけるSrBrの ^{79}Br ($I = 3/2$) 固体NMRスペクトルと最適化した理論曲線を示す。測定磁場は11.7Tである。ここでは照射周波数を300kHzごとに掃引したエコー測定を実施し、合計5個のサブNMRスペクトル(図8(c))を参照)を加算した。 C_Q 値は30MHzを超えるため、スペクトルの線幅は1.2MHz以上となった。仮に20T級の磁場で測定を実施しても、通常のFT型NMR測定法では一度に観測することは困難である。本手法の長所はハードウェアに特殊な仕様が不要である点、並びに、スペクトル解析が容易な点である。本解析では式(1)の理論曲線を用いているが、容易にMAS法への変換や他の核スピン相互作用を加算することができる。一方、短所は観測可能な線幅に制限が生じることである。理論上そのような制限は存在しないはずであるが、現実にはNMRプローブの制約を受けることになる。具体的には、トリマコンデンサーの可変範囲で観測範囲が決定する。また、観測可能な周波数帯域を拡張することは、NMRプローブのQ値を下げることに同義であり、結果として感度低下に繋がる。測定試料と核種に応じて、測定ごとにプローブの調整が必要である。

4.2 磁場掃引型固体 NMR 法

図9に16.2MHzの照射周波数条件下における ^{33}S - α - S_8 の磁場掃引型 ^{33}S 固体NMRスペクトルと最適化した理論曲線を示す^[12]。磁場の可変範囲は約6Tからゼロ磁場である。スペクトル解析から $C_Q = 43.68\text{MHz}$ と $\eta_Q = 0.57$ を得た。なお、共有

結合性を示す硫黄NMRの場合、化学シフト相互作用は核四極相互作用に比べて小さいため、理論式には含んでいない。本手法の短所は、照射周波数が低いこと（低感度）から積算や磁場掃引に時間を要することになり、結果として測定時間が長期化する点である。更には、スペクトル解析において、横軸を周波数から磁場に変換する必要があるため、計算が長期化する点が挙げられる。しかしながら、磁場掃引法の最大の長所は、観測するNMRスペクトルの線幅に関して一切の制限が存在しない点であり、これは何事に変えがたい利点である。換言すれば、上述した低感度と磁場掃引速度の問題を解決できれば、化学分野における理想的な四極子核NMRの測定手法に成り得ると筆者は考えている。本手法は物理の研究分野では一般的であるが、まだ化学の研究分野では応用例が少ないかもしれない。その一因として、本手法で得られるNMRスペクトルの分解能が極端に低いため、化学の研究分野で必須となる J 結合定数などの値が小さなNMRパラメータの算出に不向きな点が挙げられる。しかしながら、近年、Ichijoらは磁場掃引条件下でも高分解能NMRスペクトルを計測することが可能な常磁性シムの開発に成功しており^[13]、高分解能磁場掃引NMRスペクトルの実現も時間の問題と言える。磁場掃引型NMR法における今後の進展に期待をしている。

5. 終わりに

四極子核を測定対象とする固体NMR法において基本となるスペクトル解析について概説した。一例として、摂動論から導入した二次の核四極相互作用のハミルトニアンから理論曲線を求める方法と、フルハミルトニアンを対角化して遷移確率を求める方法を紹介したが、限られた紙面ですべてを網羅することは困難である。理論式の最終的な数式については、各自に求める余地を残し、敢えて記述を避けた。一人でも多くのNMRユーザーが四極子核NMRに挑戦することを切望しており、本稿が四極子核固体NMR法に興味を抱く一助になれば幸いである。

ところで、高磁場NMRの恩恵を受け飛躍的にNMR測定が可能な四極子核が増えているが、周期表上には未開拓な四極子核が数多く残っている。本稿を執筆した時点における市販品NMR装置の最高磁場強度は、ブルカー社（ドイツ）の23.5T（ ^1H のラーモア周波数は1.00 GHz）であり、同社は高温

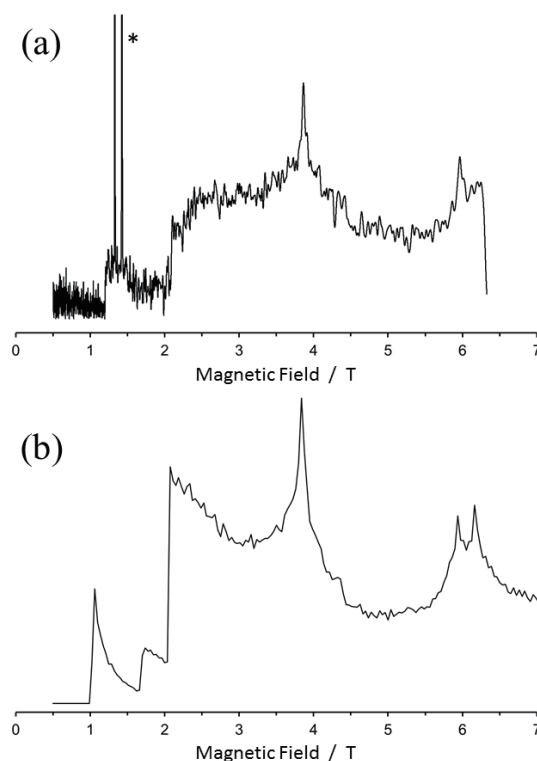


図9 (a) Experimental and (b) best-fitted calculated field-swept ^{33}S NMR spectra of $\alpha\text{-S}_8$, acquired at 16.2 MHz. Analyzing the NMR spectrum assuming that there was a single sulfur site gave $C_Q = 43.68$ MHz and $\eta_Q = 0.57$.

超伝導 (HTS) 線材を使用し、1.2 GHzの超高磁場NMR装置の市販を準備している。しかしながら、仮に1 GHzクラスの超伝導磁石をNMRに応用しても、残念ながら、これまでNMR測定が不可能であった四極子核の測定が実現する可能性はほとんど無いと予想している。理由は二つある。

一つ目の理由は、メーカー側とユーザー側の「超高磁場」の定義の差異に起因する磁場強度不足である。低温超伝導 (LTS) 線材を用いた従来型の超伝導磁石からHTS線材に移行することは、メーカー側にとっては革新的な挑戦である。一方、ユーザー側の視点では、ラーモア周波数が二割程度上がる（例えば、硫黄などのLow γ を示す核種では数MHz程度の上昇）だけでは、焼け石に水と言える。二つ目の理由は、外部磁場強度にその大きさが比例する化学シフト相互作用の存在である。一般に、核四極相互作用のみを有する核種は稀であり、化学シフト相互作用や双極子-双極子相互作用など、複数の核スピン相互作用を有する試料（核種）が多数派である。従って、仮に高磁場NMR装置で測定を実施し核四極相互作用を抑制することはできても、化学シフト相互作用が線幅を支配するため、結果として線幅は広がることになる。また、超高速

MAS法を活用しても、試料量がごく僅かであるため絶対的信号強度が著しく低下することが予想される。未開拓な四極子核においては、現時点における高磁場化から享受できるメリットはほとんど存在しない点を留意すべきである。

筆者は、測定が困難な四極子核NMRを実現する方法として、高磁場以外の代替方法の開発が必要不可欠であると考えている。一つの解決策として、磁場掃引型NMR法の活用が挙げられる。前述した通り、観測可能な線幅に制限が生じない反面、感度不足は深刻な問題である。しかしながら、固定周波数で測定できる点は、感度向上に向けて多大なる恩恵を与える可能性を秘めている。例えば、HTS線材を応用して極めて高いQ値を示す超高感度化NMRプローブ^[14]を活用することや、ラジオ波をレーザーに変換するオプトメカニクス法^[15]を応用することが可能になる。いずれにせよ、周期表上の全原子を対象としたNMR測定を実現するためには、従来の装置開発の延長ではないパラダイムシフトが必要不可欠だと考えている。

引用文献

- [1] Abragam, A. (1961) The principles of nuclear magnetism, Oxford University Press, Oxford.
- [2] Vega, A. J. (1996) Quadrupolar nuclei in solids, In "Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance" (Eds. D.M. Grant and R.K. Harris), pp. 3869-3889, Wiley, Chichester.
- [3] Yamada, K. (2010) Recent applications of solid-state ¹⁷O NMR, In "Annual Reports on NMR spectroscopy" (ed. Webb G. A.) Chapter 3. pp.115-158. Academic Press.
- [4] Slichter, C. P. (1990) Principles of magnetic resonance, Springer-Verlag, Berlin.
- [5] Yamada, K., Dong, S., and Wu, G. (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11602-11608.
- [6] Mehring, M. (1983) Principles of High-resolution NMR in Solids, Springer-Verlag, New York.
- [7] Samoson, A., Kundla, E., Lippmaa, E. (1982) *J. Magn. Reson.*, **49**, 350.
- [8] Frydman, L. and Harwood, J. S. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5367.
- [9] Gan, Z (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3242-3243.
- [10] Samoson, A., Lippmaa, E., and Pines, A. (1988) *Molec. Phys.*, **65**, 1013.
- [11] Mueller, K. T., Sun, B. Q., Chingas, G. C., Zwan-ziger, J. W., Terao, T., and Pines, A. (1990) *J. Magn. Reson.*, **86**, 470.
- [12] Yamada, K., Kitagawa, K., and Takahashi, M. (2015) *Chem. Phys. Lett.*, **618**, 20-23.
- [13] Ichijo, N., Takeda, K., and Takegoshi, K. (2014) *J. Magn. Reson.*, **246**, 57-61.
- [14] 戦略的イノベーション創出推進プログラム「高温超伝導材料を利用した次世代NMR技術の開発」
- [15] 特願2016-160376「磁気共鳴装置および方法並びにオプトエレクトロメカニクス測定装置」



山田 和彦 (やまだ・かずひこ)

2002年 Queen's University at Kingston, Dept. of Chemistry, Ph.D. program 修了。2002年独立行政法人理化学研究所に入所。生体分子を対象とした酸素NMR法の研究開発に従事。2008年より東京工業大学大学院理工学研究科物質科学専攻助教。主に半整数四極子核固体NMR法の研究開発に従事。2014年より高知大学総合科学系複合領域科学部門特任講師。NMR法を用いた物性研究に従事。

NMRの論文の被引用数ランキング

京都大学

寺尾 武彦

terao@beige.plala.or.jp

NMRの開発以来、おびただしい数のNMRに関する論文が発行されてきた。その中で被引用数の高い論文はどれだろうか。それらの論文の被引用数の経年変化を調べれば何が見えてくるだろうか。これらの興味からNMRの論文の被引用数を調べてみた。

表1は、これまでに発行されたNMRの論文のうち被引用数ランキングベスト15のリストである。このリストを作成した手順を示しておく。まず、学術文献データベース“Web of Science”を使用し、「トピック」のフィールドに“NMR OR (nuclearmagnetic resonance)”を入力して検索された文献(116万件あまりヒットした)を被引用数の多い順に並び替え、上位の論文をピックアップした。初期にはNMRの呼称がまちまちであったため、“nuclear AND (magnetic OR spin)”でも検索して補った。それでもBloch方程式、スピネコー、久保・富田の論文は拾えず、個々に補った。ソフトウェアに関する論文、NMRを単に手段とし

て使用した物質研究の論文は除外した。ひょっとすると見落としがあるかも知れないが、ご容赦願いたい。

ランキングの堂々のトップは緩和現象の本質を明らかにした、いわゆるBPPの論文^[1]である。年ごとの被引用数をプロットしたグラフ図1(a)に見られるように、発行されてから70年近く経つ現在もなおコンスタントに引用され続けている、まさに偉大な論文である。開発競争華やかかりし頃の2DNMRの論文が4編^[3, 8, 10, 13]ランキング入りしている。図1(b)は4編の平均被引用数のプロットである。いずれの論文もこのように1995年前後にピークを持つ山型のグラフとなり、最近はあまり引用されなくなったことを示している。Hahnのスピネコーの論文^[7]とともに、スピネコーを応用に向けて発展させたCarr-Purcell^[6]、Meiboom-Gill^[9]、Stejskal-Tanner^[2]の論文も揃って入っている。これらの論文の被引用数は未だに右肩上がりだ。図1(c)は4編平均のプロットである。ほとん

どの論文は鳴かず飛ばずで終わり、一握りのヒット論文でも何年か経てば通常あまり引用されなくなることを考えると、数十年間被引用数が上昇し続けているのは、まさに驚異的である。ランキング外ではあるが、比較的最近、パルス磁場勾配スピネコー^[2]を拡張して拡散係数をテンソル量として測定可能にし、さらに画像化した論文(最も被引用数が高いものは文献[16]で、2,479、昨年分:213)も現れ、MRIなどに使われている。溶液NMRを記述する3つの基本パラメータ、化学シフト^[4, 14]、 J -結合定数^[5]、 T_1 ^[12]の計算法に関する論文も入っている。特に、GIAO法による化学シフト計算の

表1 歴代NMR論文の被引用数ランキングベスト15(2016年7月12日調べ)
“昨年分”は2015年1年間の被引用数を表す。

順位	被引用数	昨年分	論文	発行年
1	5043 →	104	BPP理論[1]	1948
2	4969 ↗	190	パルス磁場勾配下のスピネコー観測による拡散測定[2]	1965
3	4469 ↘	55	2次元交換NMR[3]	1979
4	3989 ↗	317	GIAO法による 化学シフト計算の効率化[4]	1990
5	3855 ↘	46	VB法による結合定数の計算[5]	1959
6	3850 ↗	164	Carr-Purcellパルス系列[6]	1954
7	3646 ↗	110	スピネコー[7]	1950
8	3485 ↘	14	COSYによるタンパク質中のプロトン間スピン結合の測定[8]	1983
9	3255 ↗	189	CPMGパルス系列[9]	1958
10	3093 ↘	25	プロトン検出2次元多量子NMRによる長距離C-H相関[10]	1986
11	3045 ↘	77	水信号抑制のためのWATERGATE法[11]	1992
12	3001 ↗	104	高分子における緩和時間のモデルフリー解析[12]	1982
13	2985 ↘	44	2次元NMRの最初のフルペーパー[13]	1976
14	2894 ↗	169	GIAO法による最初の化学シフト計算[14]	1974
15	2821 →	56	カープラスの式[15]	1963

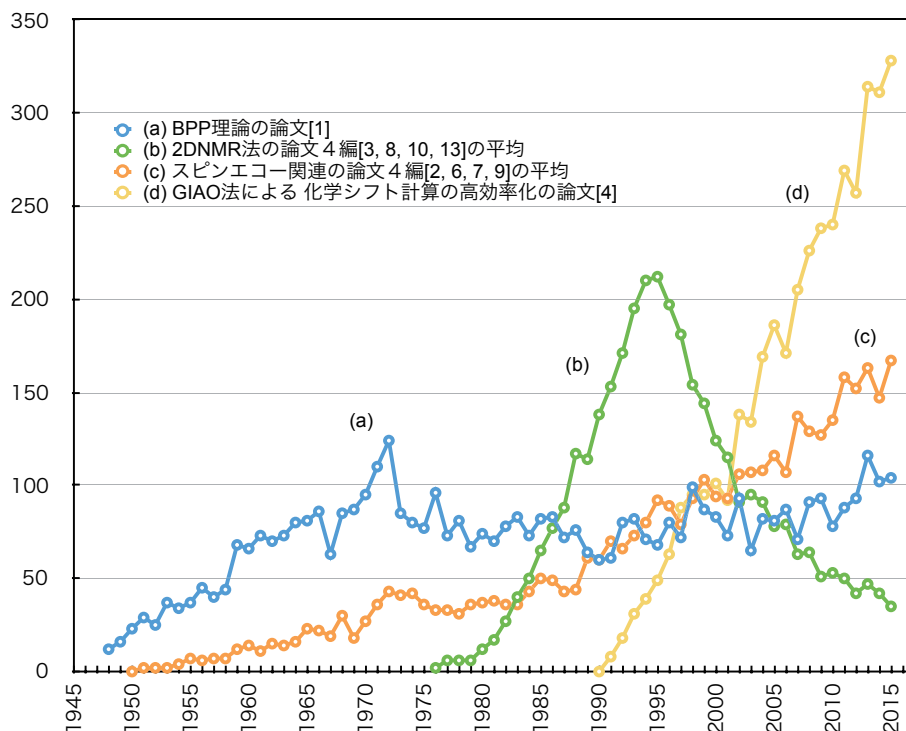


図1 ランキング上位の論文の年別被引用数

効率を大幅に改善した Wolinski らの論文^[4]は、図 1 (d) に示すように、1990 年に出版されて以来、現在も被引用数は急上昇し続けている。溶液中の巨大分子の緩和時間をモデルフリーで解析する方法^[12]も健闘している。

どう思われたでしょうか。予想通りだったでしょうか。それとも意外に思われたでしょうか。筆者は 1965 年以前の古典的な論文が半数を占め、スピンエコーの観測や緩和時間の測定、化学シフトや結合定数の計算や経験則^[15]といったきわめて基本的な内容の論文が 10 編もランクインしていることに驚いた。とくにスピンエコー関連および化学シフト計算の論文の躍進と 2 次元 NMR 関連の論文の下降が際立っている。スピンエコー関連の論文の躍進は、スピンエコー法がさまざまなパルス系列に頻繁に組み込まれるばかりでなく、近年とくに材料の NMR や MRI において、 T_2 や拡散係数、流れの測定、あるいは感度の向上にますます使われるようになってきている状況の反映なのであろう。化学シフト計算の論文の躍進は、コンピューターの発達とともに化学シフト計算が信号の帰属や分子の構造情報取得にますます活用されてきていることを表しているのだろう。多次元 NMR そのものはとっくの昔にすっかり根を下ろし、もはや後戻りすることはないが、2 次元 NMR 関連の論文の下降は、引用される文献がその後現れた多数の多次元 NMR 系列の文献に分散していることを示しているのだろう。これらの傾

向は表 1 における昨年 1 年間の被引用数の欄にも大きく反映されている。このまま推移すれば、1、2 年後にはパルス磁場勾配スピンエコーの論文^[2]がトップに躍り出るが、数年後には Wolinski らの化学シフト計算の論文^[4]がトップの座を奪うと思われる。

このように重要論文の被引用数の経年変化から NMR 研究の変遷を読み取ることができるが、最近の論文はランキング入りが難しく調査対象から外れてしまう。そこで、被引用数は上記の論文ほど高くはなくても現在急上昇している論文を探してみた。結果は思わしくなかったが、その中で 2009 年に発行された TALOS+ の論文^[17]が (被引用数: 1,051、昨年分: 224) が急上昇中である。化学シフトから主鎖の 2 面角を経験的に求める TALOS の改良版である。溶液 DNP-NMR の論文^[18]も 2003 年の発行以後 1,004 の被引用数 (昨年分: 143) を積み重ね、上昇している。他には目を引く上昇論文は見つけれなかった。

上記リストに入らなかった 2、3 の歴史的論文に言及しておきたい。Bloch 方程式が載った論文^[19]の被引用数は 2,266 であった。理由は分析していないが、2005 年以降増加傾向にある。久保・富田の論文^[20]は 1,978 であり、日本人の論文の中で最高である。リストには固体 NMR の論文が見当たらないが、これは論文数が少ないことによる (ざっと全体の 2 割程度)。固体 NMR の中では、クロス・ポーラリゼーションの論文^[21]が最高で 2,282 である。

文献の被引用数は、その文献の重要性を示す簡便な指標ではあるが、たとえ発行後の年数も分野も同じであったとしても必ずしも論文の重要性、偉大さに比例するものではないということを指摘しておきたい。たとえば、Hahnのスピネコーの論文は、スピネコー自体がもう空気のような存在になっていてCPMGやパルス磁場勾配スピネコーなどと比べて元の論文をわざわざ引用しない場合が多く、被引用数はそれらの論文ほどには高くはないが、パルス磁場勾配スピネコーなどの論文よりはるかに偉大である。

もう暫く経つと、2次元NMRの文献は被引用数ランキングから姿を消し、古典的基本的な文献ばかりになりそうな気配である。スピネコー(1950年)や2次元NMR(1975年)のようなNMRのメインストリームを劇的に変革するイノベーションはもう誕生する余地はないのであろうか。

文 献

- [1] Bloembergen, N., Purcell, E. M., and Pound, R. V. (1948) Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Phys. Rev.*, **73**, 679.
- [2] Stejskal, E. O., and Tanner, J. E. (1965) Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *J. Chem. Phys.*, **42**, 288.
- [3] Jeener, J. Meier, B. H., Bachmann, P., and Ernst, R. R. (1979) Investigation of exchange processes by 2-dimensional NMR-spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, **71**, 4546.
- [4] Wolinski, K., Hinton, J. F., and Pulay, P. (1990) Efficient implementation of the gaugeindependent atomic orbital method for NMR chemical-shift calculations. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 8251.
- [5] Karplus, M. (1959) Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. Chem. Phys.*, **30**, 11.
- [6] Carr, H. Y., and Purcell, E. M. (1954) Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Phys. Rev.*, **94**, 630.
- [7] Hahn, E. L. (1950) Spin echoes. *Phys. Rev.*, **80**, 580.
- [8] Marion, D., and Wüthrich, K. (1983) Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling-constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **113**, 967.
- [9] Meiboom, S., and Gill, D. (1958) Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev. Sci. Instrum.*, **29**, 688.
- [10] Bax, A., and Summers M. F. (1986) ^1H and ^{13}C assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2093.
- [11] Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR-spectroscopy of aqueous-solutions. *J. Biomol. NMR.*, **2**, 661.
- [12] Lipari, G., and Szabo, A. (1982) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules.1. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4546.
- [13] Aue, W. P., Bartholdi, E., and Ernst, R. R. (1976) 2-dimensional spectroscopy – application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.*, **64**, 2229.
- [14] Ditchfield, R. (1974) Self-consistent perturbation-theory of diamagnetism. 1. Gauge-invariant LCAO method for NMR chemical-shifts. *Mol. Phys.*, **27**, 789.
- [15] Karplus, M. (1963) Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2870.
- [16] Basser, P. J., Mattiello, J., and LeBihan, D. (1994) MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Bio-phys. J.*, **66**, 259.
- [17] Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., and Bax, A. (2009) TALOS plus : a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. NMR.*, **44**, 4, 213.
- [18] Ardenkjær-Larsen, J. H., Fridlund, B., Gram, A., Hansson, G., Hansson, L., Lerche, M. H., Servin, R., Thaning, M., and Golman, K. (2003) Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 10158.
- [19] Bloch, F. (1946) Nuclear induction. *Phys. Rev.*, **70**, 460.
- [20] Kubo, R., and Tomita, K. (1954) A general theory of magnetic resonance absorption. *J. Phys. Soc. Jpn.*, **9**, 888.
- [21] Pines, A., Gibby, M. G., and Waugh, J. S. (1973) Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids. *J. Chem. Phys.*, **59**, 569.



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ための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ことは可）。
- ・ 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名のみ応募可。

◆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 池上 貴久 (ikegamit@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。

◆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（右記参照）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ニューズ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に提出してください。NMRニューズレター、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28年3月～6月開催の学会に参加した助成金採択者

山田諒太 筑波大学大学院数理物質科学研究科 博士前期課程2年

ISMRM 24th annual meeting に参加

若手研究者渡航費助成金選考委員 池上貴久、朝倉哲郎、浅野敦志

平成27年度日本核磁気共鳴学会第3回若手研究者渡航費助成金 ISMRM 24th annual meeting 参加報告書

筑波大学大学院数理物質科学研究科博士前期課程2年

山田 諒太

s1520377@u.tsukuba.ac.jp

この度、平成27年度日本核磁気共鳴学会第3回若手研究者渡航費助成金の支援により、5月7日から5月13日にシンガポールで開催されたInternational Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) 24th annual meetingに参加いたしましたのでご報告いたします。

私は“Planar-type multi-circular shimming for a 1.0T permanent magnet”という題目でポスター発表をしました。複数の円形コイルを格子点上に配置し、それぞれの円形コイルに印加する電流値を独立に制御することで目的の磁場を発生させることが可能な装置を開発したという内容で、この装置を平面型のシムコイルとして運用することで従来型の二次シムコイルよりも、より高次の不均一性に対して補正効果の優位性があることを示しました。発表中はさまざまな方に興味をもっていただき、質問やアドバイスをいただきました。

例えばXY平面型のシムコイルだと、Z軸を含む成分に対しては直交性が良いが、XY平面において支配的な成分に対しては前者よりは直交性が良くないため、わずかな不均一成分が残るのではないかという意見や、multi-sliceでのdynamic shimmingに挑戦してみるべきだというアドバイスなどをいただきました。また、国内の学会ではあまりいませんでしたが、違うジオメトリで近い研究をしている方

と密な会話ができたことも大変貴重な経験でした。私自身の英語力が未熟であるがゆえに適切な回答ができたかやや不安なところもありましたが、完璧な英語ではないにしても、相手の反応を見ながらポスターやジェスチャーなども交えることで、コミュニケーションをとることができたように思います。そういった観点では、学術的な収穫とは別に英語を活用する機会があったことは非常に有意義でした。

講演は主にハードウェアに関わるセッションを中心に参加しました。国内ではあまりハードウェアの講演は目立ちませんが、本学会ではあらゆる専門の方が参加しており、臨床ばかりではなくハードウェアも充実していたため、とても勉強になりました。また各種イメージング手法の進捗や、今注目されているMRFingerprintingについて最先端の話を聞いたことで、MRI業界の潮流を知ることができ、今後の研究の方向性を考えるうえで大変参考になりました。

最後になりますが、今回の学会参加に際してご支援くださいました日本核磁気共鳴学会会長である内藤先生や選考委員長である朝倉先生をはじめ、日本核磁気共鳴学会関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

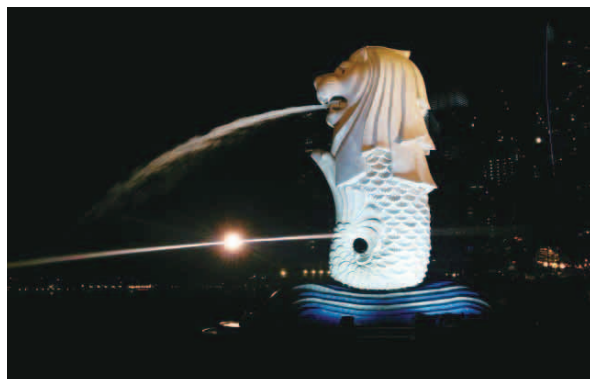


写真 マーライオン

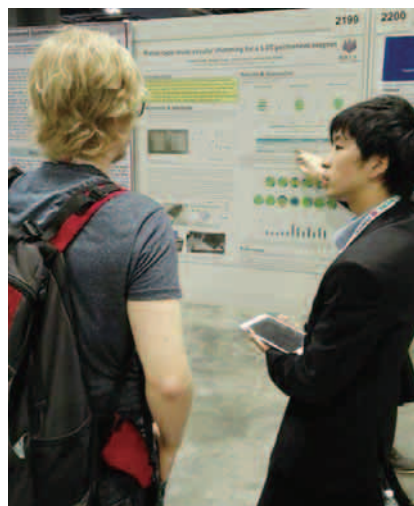


写真 発表の様子

リチウムイオン電池の *in situ* Li NMR

岡山大学大学院自然科学研究科

後藤 和馬

kgotoh@okayama-u.ac.jp

1. はじめに

リチウムイオン電池 (LIB) の電極材料や電解液についてのNMRを用いた解析研究は、LIBが実用化されたところから積み重ねられてきている。電極材料の構造やリチウムイオンの吸蔵状態を明らかにするためには ^7Li 核などの固体NMRが有効であるため、新規材料の解析研究や、合成した材料のキャラクタリゼーションなどのために、固体NMRは今も幅広く用いられている。しかしながら、リチウム金属やリチウム化合物は空气中で不安定であることが多いため、サンプルを「生きた」状態で測定するためには数多くの手順と細心の注意が必要になる。一般的にLIB電極材料についてNMR測定を行うときには、まず①電池 (実電池 or 半電池) を組んで充放電し、②所定の電位 (電気量) で充放電を止めて、③グローブボックス (高純度Ar大気) 中で電池を解体、電極を電解液で軽く洗浄してから銅箔からはがし、④密閉できるNMRサンプル管 (MASローター or ガラス) に詰める、という手順が必要になる。この作業中のサンプルの劣化の可能性は、電池材料の測定において常につきまとう不安要因となる。また、充放電深度の異なる複数サンプルを測定する場合、全く同じように電池を作製しても個々の電池で容量が微妙に異なったり、電極の貼り合わせや接着の状態が異なるなどの違いが生じるため、完全に同じサンプルの変化を追えるわけではない。これらの問題を克服し、迅速に電池反応による状態の変化を検出するための方法として、リチウムイオン電池をNMRプローブ中で充放電させながらその場観察でNMRを測定する *in situ* Li NMR法が注目され、測定例が増えてきている。

2. *in situ* NMR

in situ NMRを用いたLIBの研究としては、LetellierらによるLi金属-炭素 (黒鉛もしくはハードカーボン) 半電池についての報告が最も古い^[1-3]。銅およびアルミのメッシュに炭素電極を塗工し各種

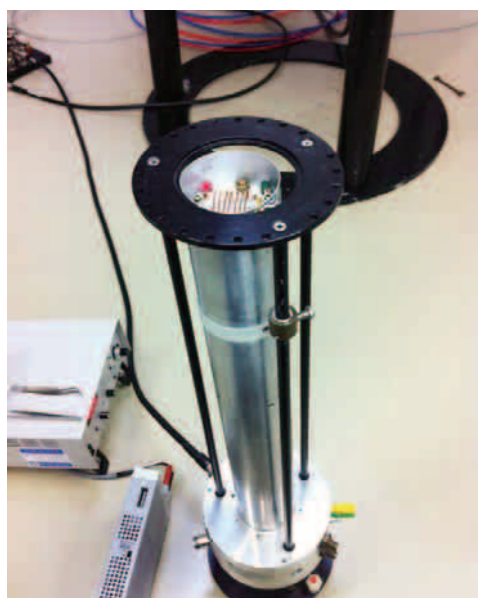
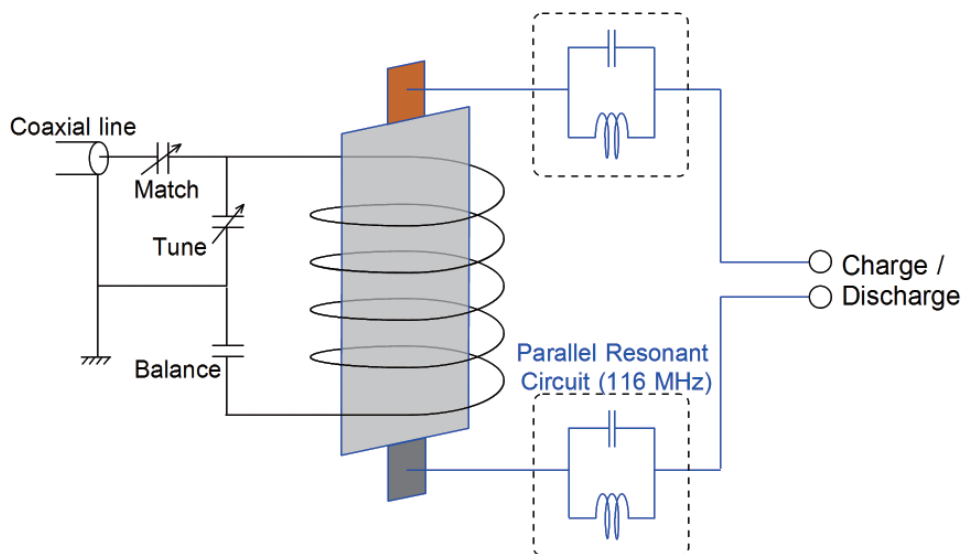


図1 *in situ* 測定用プローブ^[9]

部材と合わせて組み立てたラミネート外装セルの測定から、充放電挙動とリチウムの状態変化を関連づけて定量的に分析が行えることが示されている。その後徐々に測定例は増えつつあり、国内では正極材料の *in situ* NMR^[4,5] や電池自体の *in situ* イメージング測定^[6] などが報告されている。最近ではケンブリッジ大のGreyグループが非常に活発に電池材料 (正極材料や金属系負極材料) に関する研究を進めており、 ^7Li , ^6Li だけでなく ^{23}Na 核の *in situ* NMR^[7,8] も報告している。我々のグループも *in situ* 測定用プローブと専用セルを用意し、特に負極に関する安全性評価にかかわる部分に着目して研究を進めている^[9,10]。本レポートではその内容について紹介させていただく。

3. *in situ* NMR 用プローブおよび電池

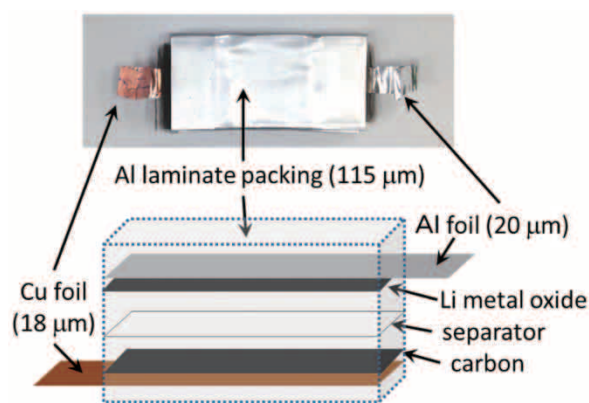
in situ の測定では、既存の固体広幅用ワイドボアプローブを改造したものを使っている。このプローブは岡山大ではなく京大理学研究科 (竹腰研) に設置されている。岡山大では固体NMRは複数研究室が使用する共通機器であり、プローブの加工な

図2 *in situ* 定用プローブの構成^[9]

どができず困っていたところ、武田和行先生が所有のプローブを加工して京大で*in situ*測定できるようにして下さったものである。ちなみに分光器はOpencore NMRである^[11]。(竹腰先生、武田先生、毎回使わせていただきありがとうございます。) プローブにはラミネートセルを安定して置けるように扁平に巻いたコイルを設置してあるほか、電池電極から外部まで充放電用の電線が接続されており、コイル内に電池を設置したままNMR測定や充放電ができるようになっている(図1)。電極用回路側には高周波遮断回路も組み込まれており、低ノイズでの測定が可能である(図2)。電池については図3のような構成で電極接続用の銅箔が引き出された20 mm×20 mm角のアルミラミネートセルを作製し、これを折り畳んでコイル内に挿入して実験している。この設計の電池ではアルミラミネートがある程度rfパルスを遮断すること、銅箔およびアルミ箔にはさまれた部分からの信号は観測されないことからNMR信号強度は1/3～1/4に下がってしまうことを確認している。しかし、銅メッシュ・アルミメッシュの電極に比較して機械的強度が高く、アルミラミネートの保護効果で数か月たっても中の部材の劣化がないという非常に優れた試験用電池となっており、我々はこれを用いて実験を進めている。

4. 過充電状態の変化の観察

電池のさまざまな挙動、特に充放電によって生じる非平衡状態を詳細に観測するのに*in situ* NMRは優れているが、その中でも我々は安全性の観点から過充電時の電池の挙動を詳細に把握することを目的とした研究を進めた。リチウムイオン電池が過充

図3 *in situ* NMR測定用電池

アルミラミネート外装のフレキシブルなセルである^[9]。

電されると、負極上にデンドライト(針)状のリチウム金属が析出し、電極短絡および発火の原因となる。析出したリチウムについて時間変化を観察するために、我々はコバルト酸リチウム(LCO)正極と黒鉛もしくはハードカーボン負極から構成されたLIB実電池を作製した。充放電により⁷Li NMRスペクトルがくり返し安定して変化することを確認(図4)した後、4.9Vまで2～3C(20～30分で充電が終わる充電速度)で過充電し、その直後から約17分(1s×1,000回)ごとに積算を繰り返して、スペクトルの変化を記録した。図5(a)はLCO-黒鉛電池、5(b)はLCO-ハードカーボン電池の結果である。どちらのスペクトルでも、260 ppm付近のリチウム金属シグナルが数時間の間に大きく減少し、代わりに炭素内吸蔵リチウム((a): 38 ppm, (b): 80 ppm)のシグナルが増えることが観測された(図6(a)、6(b))。これは過充電により負極炭素上に析出した金属リチウムが数時間の間に徐々に再酸化し負極内に取り込まれていく緩和現象が起きている

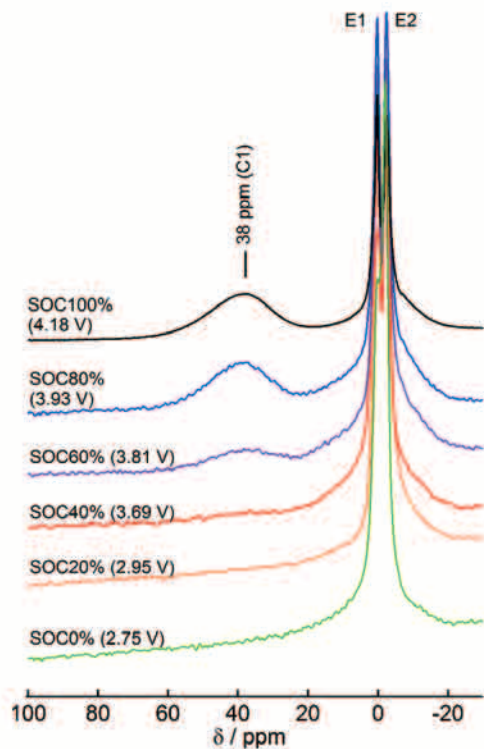


図4 LCO (コバルト酸リチウム) - 黒鉛電池の充放電変化についての *in situ* ^7Li NMR スペクトル
38 ppm の信号は炭素内 Li, 0 ppm 付近の2つのピークは電解液由来である^[9]。

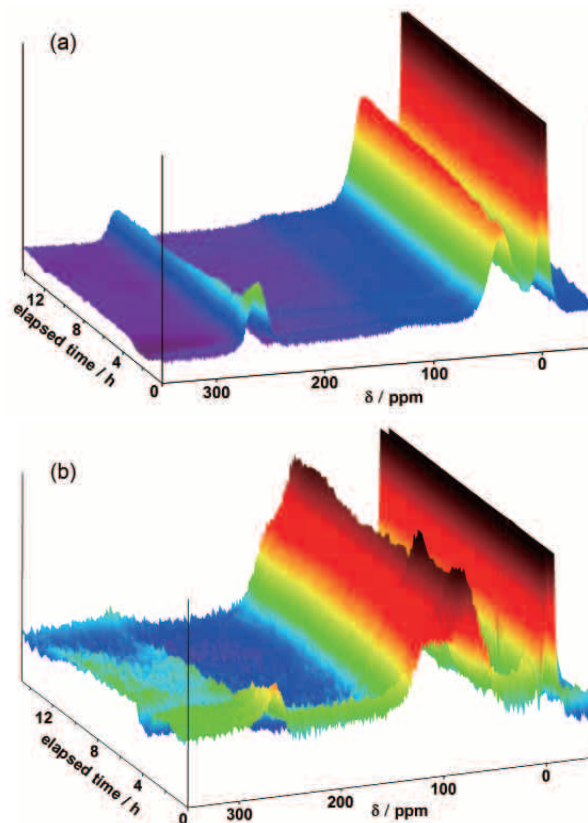


図5 過充電直後からの NMR スペクトルの変化
(a): LCO - 黒鉛電池、(b): LCO - ハードカーボン電池^[9]。

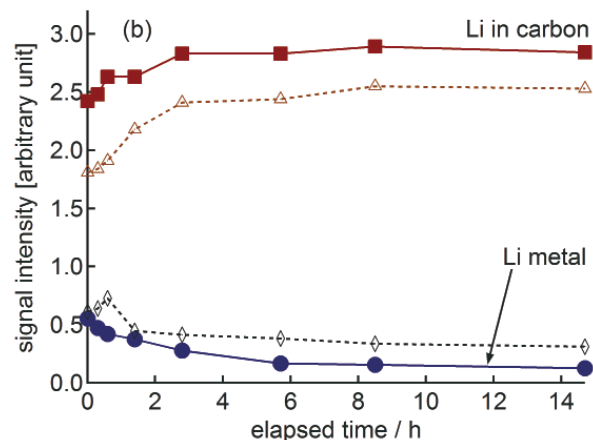
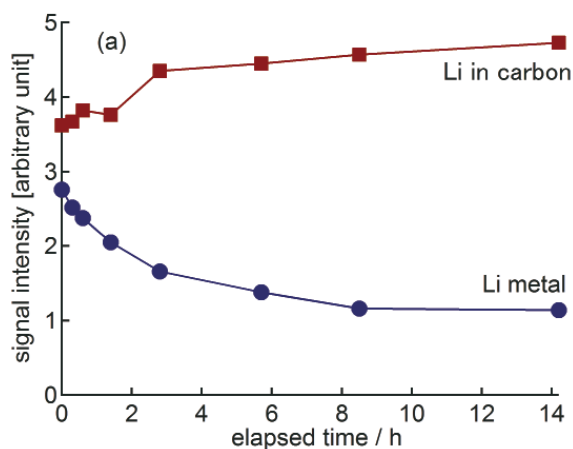


図6 過充電直後からの NMR スペクトル内の各成分の強度 (面積) 変化

(a): LCO - 黒鉛電池、(b): LCO - ハードカーボン電池^[9]。(b) の△および◇はそれぞれ炭素内リチウム信号 (■) のうちの主要成分およびショルダー構造部分の信号強度を示している。

ことを示している。このような現象が起きることは電池の開発現場ではある程度想像されていたが、*in situ* NMRにて初めてはっきりと観測することができた。また、(a) と (b) では後者のほうが金属リチウムの減少幅が大きく、8時間後には80%以上の信号が消えている。図5 (b)、図6 (b) で使われているハードカーボンはアモルファス炭素の一種であり黒鉛に比較して密度が低いため、その内部に隙間 (closed pore) を多くもっている。このような隙間のある構造が、析出リチウムの再吸蔵に有効であるこ

とが本研究から明らかとなった。

5. おわりに

in situ NMRは上記のような過充電状態の解析以外にも、多くの用途に利用できる。充放電後の定常状態の詳細な観測をするのもよいが、電池の充放電反応中やその直後は本質的に「非平衡」な状態であり、このときに何が生じているのかをリアルタイムで観測できることが、*in situ* 測定の一の長所であると筆者は思っている。現在、複数素材から構

成された混合電極の挙動に関する研究などを進めているほか、我々が別に *ex situ* で行っているナトリウムイオン電池の研究^[12, 13] などへの適用も検討している。今後も「NMRの可能性を生かす研究」、そして「物質科学の発展に貢献できる研究」を進めていきたいと考えている。

なお、本研究の *in situ* 測定用電池については新井寿一氏はじめヤマハ発動機(株)の皆様との共同研究により作製されたものである。ここに謝意を申し上げます。

参考文献

- [1] Letellier, M., Chevallier, F., Clinard, C., Frackowiak, E., Rouzaud, J.-N., Béguin, F., Morcrette, M., and Tarascon, J. (2003) The first *in situ* ^7Li nuclear magnetic resonance study of lithium insertion in hard-carbon anode materials for Li-ion batteries. *J. Chem. Phys.* **118**, 6038-6045.
- [2] Letellier, M., Chevallier, F., and Morcrette, M., (2007) *In situ* ^7Li nuclear magnetic resonance observation of the electrochemical intercalation of lithium in graphite: first cycle. *Carbon* **45**, 1025-1034.
- [3] Chevallier, F., Poli, F., Montigny, B., and Letellier, M., (2013) *In situ* ^7Li nuclear magnetic resonance observation of the electrochemical intercalation of lithium in graphite: second cycle analysis. *Carbon* **61**, 140-153.
- [4] Shimoda, K., Murakami, M., Takamatsu, D., Arai, H., Uchimoto, Y., and Ogumi, Z., (2013) *In situ* NMR observation of the lithium extraction/insertion from LiCoO_2 cathode. *Electrochim. Acta* **108**, 343-349.
- [5] Shimoda, K., Murakami, M., Komatsu, H., Arai, H., Uchimoto, Y., and Ogumi, Z., (2015) Delithiation/lithiation behavior of $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ studied by *in situ* and *ex situ* $^{6,7}\text{Li}$ NMR spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **119**, 13472-13480.
- [6] 河村純一 (2010) リチウムイオン電池のNMRマイクロイメージング. *電気化学*, **78**, 999-1003.
- [7] Pecher, O., Bayley, P.M., Liu, H., Liu, Z., Trease, N.M., and Grey, C.P., (2016) Automatic Tuning Matching Cyclor (ATMC) *in situ* NMR spectroscopy as a novel approach for real-time investigations of Li- and Na-ion batteries. *J. Mag. Res.* **265**, 200-209.
- [8] Bayley, P.M., Trease, N.M., and Grey, C.P., (2016) Insights into electrochemical sodium metal deposition as probed with *in situ* ^{23}Na NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 1955-1961.
- [9] Gotoh, K., Izuka, M., Arai, J., Okada, Y., Sugiyama, T., Takeda, K., and Ishida, H., (2014) *In situ* ^7Li nuclear magnetic resonance study of the relaxation effect in practical lithium ion batteries. *Carbon* **79**, 380-387.
- [10] Arai, J., Okada, Y., Sugiyama, T., Izuka, M., Gotoh, K., and Takeda, K., (2015) *In situ* solid state ^7Li NMR observations of lithium metal deposition during overcharge in lithium ion batteries. *J. Electrochem. Soc.* **162**, A952-A958.
- [11] 武田和行 (2015) NMR分光計の開発. *NMR (日本核磁気共鳴学会機関誌)*, **6**, 81-84.
- [12] Gotoh, K., Ishikawa, T., Shimadzu, S., Yabuuchi, N., Komaba, S., Takeda, K., Goto, A., Deguchi, K., Ohki, S., Hashi, K., Shimizu, T., and Ishida, H., (2013) NMR study for electrochemically inserted Na in hard carbon electrode of sodium ion battery. *J. Power Sources* **225**, 137-140.
- [13] Morita, R., Gotoh, K., Fukunishi, M., Kubota, K., Komaba, S., Yumura, T., Nishimura, N., Deguchi, K., Ohki, S., Shimizu, T., and Ishida, H., (2016) Combination of solid state NMR and DFT calculation to elucidate the state of sodium in hard carbon electrodes. *J. Mater. Chem. A*, **4**, 13183-13193.



後藤 和馬 (ごとう・かずま)

2002年3月 筑波大学 大学院化学研究科化学専攻 修士 博士(理学)

2002年4月 呉羽化学工業株式会社(現(株)クレハ)勤務

2004年4月 日本大学 文理学部化学科 助手

2005年4月 岡山大学 大学院自然科学研究科 助手(助教)

2009年7月~2010年1月 米オレゴン州立大学 化学科 客員研究員

2016年4月~現在 岡山大学 大学院自然科学研究科 准教授

2014年9月~現在 京都大学 触媒・電池元素戦略研究拠点(ESICB) 拠点准教授

[専門] 物理化学、無機材料(炭素材料)

定量CP-MAS法

ブルカー・バイオスピン株式会社

木村 英昭

hideaki.kimura@bruker.com

はじめに

高分解能NMRによる定量は、NMRユーザーがNMRに期待する大きな役割の一つである。固体NMRでは、核種に応じたさまざまな高分解能化の方法が提案され、スペクトルから定量的な議論が行われることは珍しくない。 ^1H , ^{19}F のように感度が高く同種核間双極子相互作用が強い核は、超高速MASやCRAMPS (Combined Rotation And Multiple Pulse Spectroscopy) 法によって固体高分解能スペクトルが観測でき、それらのスペクトルは定量性があるとされている^[1]。一方、 ^{11}B , ^{23}Na , ^{27}Al といった半整数スピンの四極子核の固体高分解能スペクトルを得る手法として、MQ-MAS (Multiple Quantum-Magic Angle Spinning) 法が汎用的な手法になりつつあるが、MQ-MASスペクトルに定量性はなく、また、四極子核はシングル・パルスで測定した1次元スペクトルでさえ定量性に難があり、四極子核の定量的なスペクトルを得る方法の提案はこの分野の今後の課題である。

さまざまな固体高分解能スペクトルを観測する方法が提案された現在でも、固体高分解能NMRの基本はやはりCP-MAS (Cross Polarization-Magic Angle Spinning) 法とDD (Dipolar Decoupling) - MASである。両者とも、 ^1H 以外の核種 (^{13}C , ^{29}Si , ^{15}N 等) を、MASをしながら ^1H デカップリングをすることで固体高分解能スペクトルを観測する手法はあるが、パルス列は幾分異なる。

図1にCP-MASとDD-MASのパルス列を示した。CP-MAS法は、contact timeの間に感度の低いX核 (^{13}C , ^{29}Si , ^{15}N 等) に感度の高い ^1H 核の磁化を双極子-双極子相互作用を通して移す (Cross Polarization; CP) ことで積算効率を上げるのが特徴であるが、 ^1H の磁化がサンプル中のすべてのX核に均一に移るとは限らず、信号強度に定量性はない。これらX核の定量的なスペクトルを観測するには、DD-MAS法を用いる必要がある。DD-MAS法は、X核への励起パルスと ^1H デカップリングからなるシン

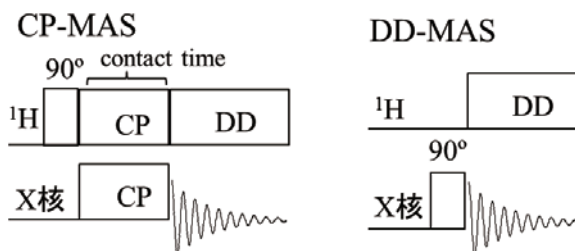


図1 CP-MASとDD-MASのパルス列

ブルなパルス列であるが、X核の長い T_1 緩和時間に合わせた待ち時間設定が必要なためにCP-MASに比べて積算効率が悪い。両手法で観測したスペクトルをご覧ください。

図2にシリカ (Evonik社VN3) の ^{29}Si DD-MAS及びCP-MASスペクトルを示した。両スペクトルのシリカのQ3ピークのS/N比がほぼ同等になるようにした。測定時間は、DD-MASでは約16.5時間を要したのに対し、CP-MASでは約2分であったが、CP-MASで観測されたQ4の相対的信号強度は、DD-MASで観測されたそれよりかなり低く、定量的ではなかった。これは、シリカのQ4は ^1H から遠い位置にいるために、 ^1H の近い位置にいるQ3よりも ^1H からの磁化がCPで移りにくいためである。

「CP-MAS並みの積算効率でDD-MASの定量性を！」とは誰もが思うところである。もしも、CPの間に ^1H の $T_{1\rho}$ 緩和時間 ($T_{1\rho\text{H}}$) によって ^1H の磁化が失われず、contact timeを無限に長く設定することができれば、 ^1H 磁化をサンプル中のすべてのX核に均一に移すことが可能となり、定量的なスペクトルを観測することができるはずである。これから紹介するMulti-CP法は、 $T_{1\rho\text{H}}$ による強度の減衰を最小限に抑え、かつ実質的なcontact timeを長くすることで定量性を高めた手法である^[2]。

2. Multi-CP 法

図3にMulti-CP法のパルス列を示した。Multi-CPは、duration time " T_z " を挟んで、CPを繰り返して行う方法である。CPの間に $T_{1\rho\text{H}}$ で失われた ^1H 磁

化は、直後の90°パルスで縦軸に戻されている T_z の間に T_1 緩和を受けてほぼ平衡状態に戻り、再びCPを繰り返すことで実質的なcontact timeを長くできる。

Multi-CPの条件設定では、CP条件、MASの回転周期のほかに、duration time (T_z)、1度のcontact time (T_{cp})、CPの繰り返し回数 (L_0) が可変パラメーターとなる。原著論文では、低分子化合物の ^{13}C 測定のための条件として、MASは10 kHz以上、 T_{cp} を $T_{1\rho\text{H}}$ の1/4より短くする ($T_{1\rho\text{H}}/T_{cp} > 4$)、 T_z を ^1H の T_1 緩和時間 ($T_{1\text{H}}$) の2倍程度にする ($T_z \cong 2T_{1\text{H}}$) ことを推奨している。したがって、サンプルの $T_{1\rho\text{H}}$ と $T_{1\text{H}}$ を把握している方が好ましいが、この条件があらゆるサンプル、核種に有効であるかは検討が必要かもしれない。

本稿では、 T_1 緩和時間が特に長く、DD-MASで

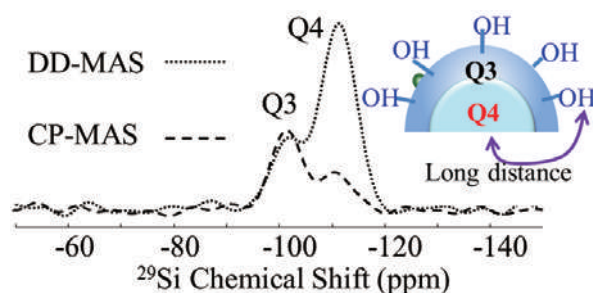


図2 シリカ (Evonik社VN3) の ^{29}Si DD-MASおよびCP-MASスペクトル

BRUKER AVANCE III HD 400 MHz (for ^1H) WB (Wide Bore) NMR分光計で7 mm HX DVTプローブを用いて、MAS回転周波数を5 kHz、 ^1H デカップリング強度を55.6 kHzで観測した。化学シフトはTMSを1次基準 ($\delta = 0.0 \text{ ppm}$) とし、Q8M8 (Alfa Aesar製) を2次基準 ($\delta = 12.6 \text{ ppm}$) として用いた。DD-MASでは90°パルス (4.5 マイクロ秒) を照射し、待ち時間は330 秒、積算回数は180回、CP-MASでは、contact timeを4 ミリ秒、 ^1H スピロック強度を40 kHz、待ち時間を1 秒、積算回数は120回に設定し、両スペクトルのシリカのQ3ピークのS/N比がほぼ同等になるようにした。

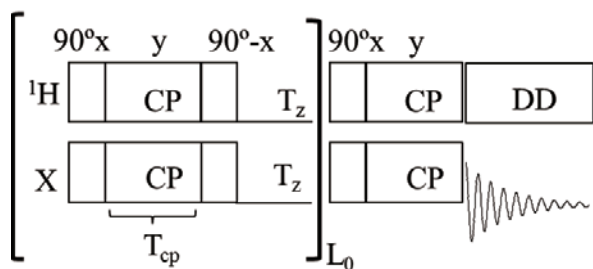


図3 Multi-CPのパルス列

duration time " T_z " を挟んで、CPを繰り返す行う。1度のcontact time、CPの繰り返し回数をそれぞれ、 T_{cp} 、 L_0 とした。

の定量で苦勞するユーザーが多いと思われる ^{29}Si 核を例にMulti-CPの条件を検討していく。Multi-CPの条件の最適化に確立された手順や方法はないが、筆者が行う方法で特定のサンプルについて成果があったので、このNMR便利帳で紹介させていただく。Multi-CPの条件最適化には、まず基準となる定量的な ^{29}Si スペクトルが必要であるので、 ^{29}Si DD-MASスペクトルを観測する。サンプルは、図2で示したシリカで行う。

3. DD-MAS 法による定量的なスペクトルの観測

定量的な ^{29}Si DD-MASスペクトルを得るには、観測された信号のうち最も長い T_1 緩和時間の5倍以上を設定する必要があると言われるが、それは90°パルスを照射した場合、99%以上の磁化が回復する時間が $5T_1$ だからである。ちなみに T_1 では63.2%、 $3T_1$ では95.0%しか回復しない。

図4に待ち時間を変えて測定したシリカ (Evonik社VN3) の ^{29}Si DD-MASスペクトルを示した。この図から、定量的なDD-MASスペクトルを得るには T_1 緩和時間の5倍以上を設定しなければならないことが確認できる。このシリカのQ4ピークの T_1 緩和時間は61秒であったので (Q3の T_1 は26秒)、定量的なスペクトルを観測するには、待ち時間として305秒以上を設定しなければならないが、この程度の待ち時間は ^{29}Si 核では珍しいことではない。このように長い待ち時間を設定すれば定量的な ^{29}Si スペクトルを観測できるが、7 mm径のサンプル管でこのレベルのS/N比のスペクトルを観測するのに、 $5T_1$ の待ち時間で15 時間以上を要した。より径の小さなサンプル管を用い、サンプル量がさらに少ない

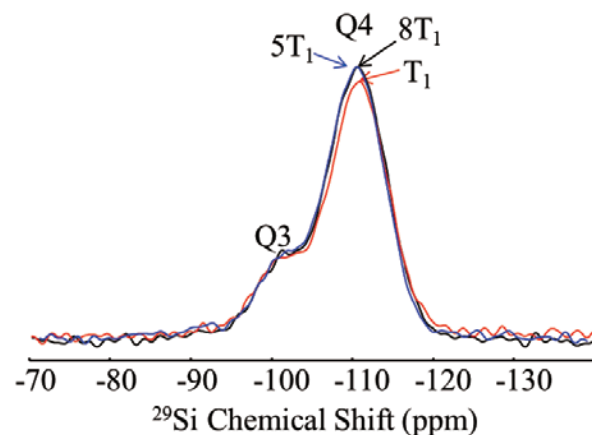


図4 シリカ (Evonik社VN3) の ^{29}Si DD-MASスペクトル

待ち時間を T_1 (61 秒)、 $5T_1$ (305 秒)、 $8T_1$ (488 秒) と変えて測定した。その他の条件は図2に同じ。

環境で測定すれば、より多くの測定時間を要することは想像に難くない。

4. Multi-CP 法の条件の検討

基準となる定量的な ^{29}Si スペクトルを待ち時間 $5T_1$ に設定したDD-MASで観測できたので、次にこのDD-MASスペクトルと同等のスペクトルをMulti-CP法を用いてより短時間で観測できる条件を検討する。図5に原著論文で推奨されている、 $T_{1\rho\text{H}}/T_{\text{cp}} > 4$ 、 $T_z \div 2T_{1\text{H}}$ の条件で測定した ^{29}Si Multi-CPスペクトルをDD-MAS, CP-MASスペクトルとともに示した。この条件で観測したMulti-CPスペクトルは、CP-MASスペクトルよりはQ4の相対的強度が改善したものの、DD-MASと重なるには程遠い。この原著論文での条件は低分子化合物の ^{13}C 測定での条件であり、シリカの ^{29}Si 測定のように ^1H からの

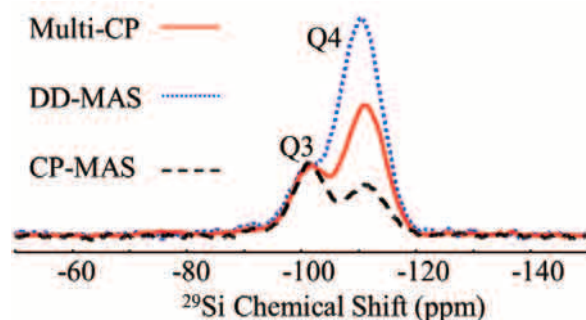


図5 シリカ (Evonik社VN3) の ^{29}Si DD-MAS, CP-MASおよび原著論文の推奨条件 ($T_{1\rho\text{H}}/T_{\text{cp}} > 4$ 、 $T_z \div 2T_{1\text{H}}$) で測定したMulti-CPスペクトル

このシリカの $T_{1\rho\text{H}}$ と $T_{1\text{H}}$ は、それぞれ6.0ミリ秒、35ミリ秒であったので、Multi-CPでの T_{cp} は1.1ミリ秒、 T_z は70ミリ秒に設定した。 L_0 に推奨値はないのでとりあえず25回、待ち時間1秒、積算は160回に設定したので、測定時間は7.5分であった。DD-MAS, CP-MASは図2に同じ。

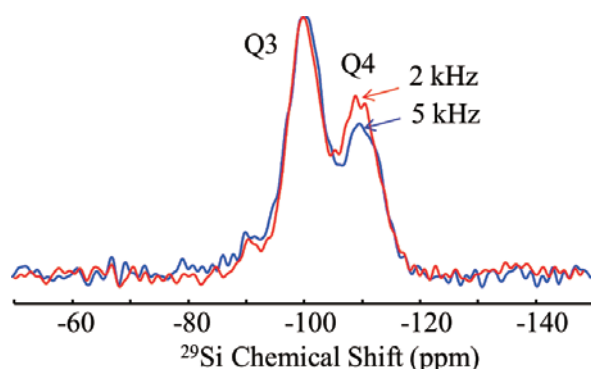


図6 シリカ (Evonik社U360) の ^{29}Si CP-MASスペクトル

MASを5 kHz, 2 kHzと変えて測定した。7 mm HX DVTプローブを用いて、contact timeを4ミリ秒、待ち時間を1秒、積算回数は400回に設定した。

距離がさまざまな ^{29}Si が存在する試料のMulti-CPでは異なる条件が必要なのかもしれない。そこで、Multi-CPスペクトルとDD-MASスペクトルが完全に重なるレベルを目指して、これからMAS回転周波数、 T_{cp} 、 T_z 、 L_0 の値を検討する。

まず、MAS回転周波数を検討する。図6にMAS回転周波数を変えて測定したシリカ (Evonik社U360) の ^{29}Si CP-MASスペクトルを示した。この図からMASは低速である方がQ4の相対的強度が大きいことがわかる。これはCP-MASでの信号強度は、 ^1H - ^{29}Si 双極子-双極子相互作用に依存し、MASはその相互作用を平均化するので、特に、Q4の ^{29}Si のように ^1H から遠く、双極子-双極子相互作用が小さい信号の強度は、MASの影響をより強く受けるためと考えられる。したがって、CPを用いて定量的なスペクトルを観測しようとするなら、化学シフトの異方性を平均化できる範囲で、可能な限り低速のMASを行うのがコツといえる。このケースでは、2 kHzのMASが最適であった。

次に T_{cp} の最適値を求めるために、 T_{cp} と ^{29}Si のトータル信号強度との関係を調べた (図7)。トータルの信号強度をとる理由は、シリカのQ3とQ4の信号が重なっており、どれか一つをピーク分離等で取り出そうとすると誤差を含むこと、また、この手法を他の材料へも応用することを考慮すると全体の面積をとる方が扱いやすいことがあげられる。この図の信号強度は、3ミリ秒までは T_{cp} とともに増加し、その後減少する傾向が見られた。この信号強度が最も高くなる3ミリ秒の T_{cp} は、 ^1H の磁化が ^{29}Si に最も広く、均一に移る値と考えられる。他種のシリカでも調べたが、2.5-4ミリ秒程が T_{cp} の最適値であった。それらはシリカの $T_{1\rho\text{H}}$ のほぼ1/2の値である。

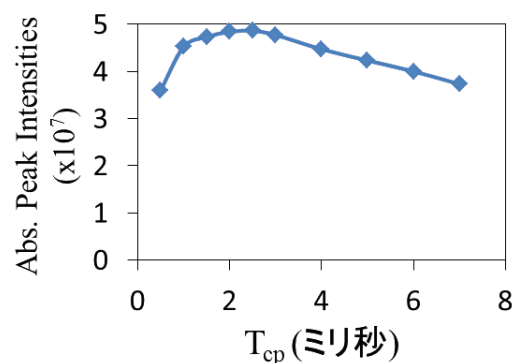


図7 ^{29}Si Multi-CPにおける T_{cp} と ^{29}Si トータル信号強度との関係

シリカはEvonik社U360を用いた。MASは2 kHz、 T_z は0.28秒、 L_0 は75、待ち時間は1秒、積算は80回に設定。

次に T_z の最適値を求めるために、 T_z と ^{29}Si トータル信号強度との関係を調べた(図8)。信号強度は0.35秒までは T_z とともに増加し、それ以降は飽和することがわかる。U360の T_{1H} は71ミリ秒であったので、0.35秒の T_z は、 T_{1H} の約5倍であった。他の T_{1H} の異なるいくつかのサンプルでも調べたが、どのシリカも0.35秒程度で信号強度は飽和した。

最後に L_0 の最適値を求めるために、 L_0 と信号強度との関係を調べた(図9)。 T_{cp} は3ミリ秒、 T_z は0.35秒に設定し、他の条件は図7のそれと同じである。この図から、信号強度は100までは L_0 とともに増加し、それ以降は飽和することがわかる。他のいくつかのサンプルでも調べたが、どのシリカも100の L_0 で信号強度は飽和した。

以上から、シリカの定量的な ^{29}Si Multi-CPスペ

クトルを観測する条件として、MAS: 2kHz, T_{cp} : 2.4-4ミリ秒, T_z : 0.35秒, L_0 : 100が最適であると考えられる。これらの条件を適用して、Multi-CPとDD-MASスペクトルを比較する。

5. 条件を最適化した Multi-CP スペクトルと DD-MAS スペクトルの比較

図10に4種のシリカ(Evonik社製9000GR, VN3, 5000GR, U360)^[3]それぞれの ^{29}Si Multi-CPスペクトルとDD-MASスペクトルを重ねて示した。この図から、前項で最適化した条件を適用して観測したMulti-CPスペクトルは、DD-MASスペクトルにほぼ完璧に重なることがわかった。このMulti-CPでは、CPを0.35秒間隔で100回も繰り返すために、CP-MASよりは測定時間を要するが、DD-MASで

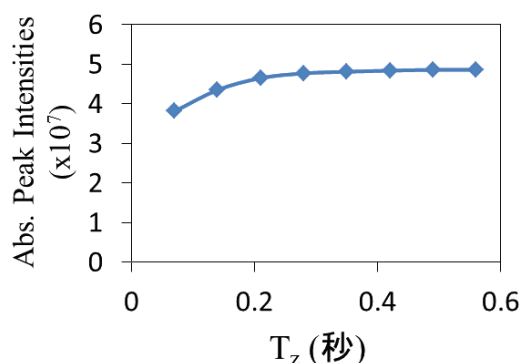


図8 ^{29}Si Multi-CPにおける T_z と ^{29}Si トータル信号強度との関係
 T_{cp} は3ミリ秒に設定。他の条件は図7のそれと同じ。

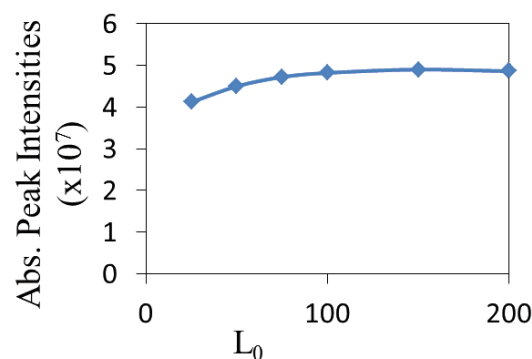


図9 ^{29}Si Multi-CPにおける L_0 と ^{29}Si トータル信号強度との関係
 T_{cp} は3ミリ秒、 T_z は0.35秒に設定。他の条件は図7のそれと同じ。

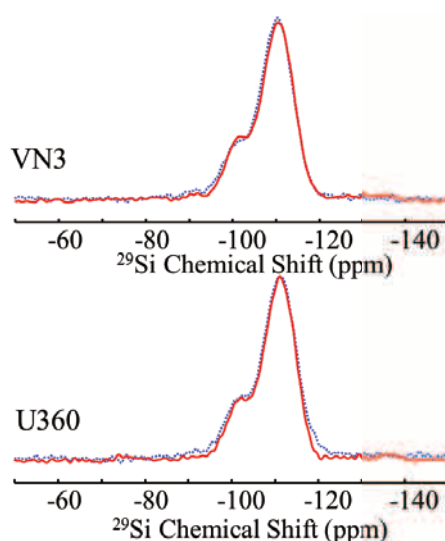
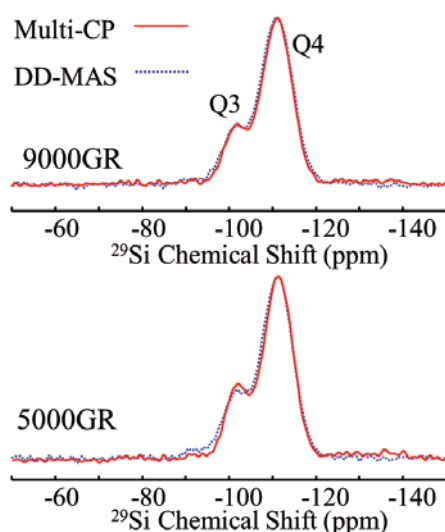


図10 4種のシリカ(Evonik社製9000GR, VN3, 5000GR, U360)の ^{29}Si Multi-CPスペクトルとDD-MASスペクトルそれぞれのシリカのMulti-CPとDD-MASスペクトルを重ねて示した。Multi-CPの条件は、MAS: 2kHz, T_{cp} : 2.4-4ミリ秒, T_z : 0.35秒, L_0 : 100に設定した。 ^1H スピンロック強度は40kHzで、待ち時間は1秒、積算は144回としたので、測定時間は1時間27分であった。DD-MASでは 90° パルス(4.5マイクロ秒)を照射し、待ち時間は330秒、積算回数は180回で行ったので、測定時間は16.5時間であった。

の測定時間を大幅に短縮することができる。このように Multi-CP 法は、DD-MAS より短時間で定量的な固体 NMR スペクトルを得る手法として、今後応用範囲を広げる可能性のある手法として期待できる。Multi-CP のパルス・プログラムは原著論文のサポーティング・インフォメーションに掲載されている (BRUKER 用)。

6. Multi-CP 法に取り組むにあたって

Multi-CP 法はより短時間で定量的な NMR スペクトルを得る手法として期待することができ、上述のように ① MAS は可能な限り低速に、② T_{cp} は $T_{1\rho H}$ で信号強度が低下しない値に、③ T_z は 1H 磁化がほぼ完全に回復する値に、④ L_0 は信号強度が飽和する値に、設定すればよい。とはいえ、パラメーターが多く、それらが適切でないと定量的なスペクトルは得られない。そして、それらパラメーターはサンプルに依存する。したがって、たった一つのサンプルを定量する場合にこの手法は有用ではなく、同種類の複数のサンプルを定量するための手法といえる。

また、筆者の周囲の Multi-CP に取り組んだ方々

から、うまくいっていない話を複数聞いた。うまくいくかどうかは、サンプルと核種に依存するようである。サンプル内に分子運動の活発・不活発な部分が共存したり、また、シリカのように 1H と X 核との距離に大きな分布がある場合、CP の利きやすい・利きにくい部分ができる。そういった場合、MAS を低速にするのが有効な旨を記述したが、X 核の化学シフト異方性が大きい場合、低速にも限度がある。そういったケースにおいても Multi-CP 法を有用な手法にする条件の検討は今後の課題である。

7. References and Notes

- [1] Bronnimann, C. E., Hawkins, B. L., Zhang, M., Maciel, G. E. (1988) Combined rotation and multiple pulse spectroscopy as an analytical proton nuclear magnetic resonance technique for solids. *Anal. Chem.* **60**, 1743-1750.
- [2] Johnson, R.L., Schmidt-Rohr, K. (2014) Quantitative solid-state ^{13}C NMR with signal enhancement by multiple cross polarization. *J. Magn. Reson.* **239**, 44-49.
- [3] <http://ultrasil.evonik.com/product/ultrasil/en/Pages/default.aspx>



木村 英昭 (きむら・ひであき)

1998年3月 群馬大学大学院工学研究科生産工学専攻博士後期課程修了
 1998年5月 化学技術戦略推進機構 博士研究員 (NEDO Fellow)
 2001年4月 東京工業大学大学院工学研究科 JSPS 特別研究員
 2004年4月 筑波大学 VBL 非常勤研究員
 2005年4月 住友ゴム工業株式会社
 2012年3月 ブルカー・バイオスピン株式会社 現在に至る

大阪大学理学部村田研究室

大阪大学理学部村田研究室¹⁾、ERATO 脂質活性構造プロジェクト²⁾

花島 慎弥¹⁾、梅川 雄一^{1,2)}、村田 道雄^{1,2)}

murata@chem.sci.osaka-u.ac.jp

村田研究室が所属する大阪大学の大学院理学研究科化学専攻は、大阪府の北部に位置する待兼山の丘の上につくられた豊中キャンパス内にあります。理学研究科は理化学研究所との連携利用も含めると、溶液用と固体用の300 MHzから700 MHzのNMR装置をあわせて9台有しています。さらに村田脂質活性構造プロジェクトでは固体専用の600 MHzの装置1台を所有しており、NMRの利便性が大変高い環境の中にあるといえます。村田研究室では、このような研究環境を最大限に生かして、生体膜を構成する脂質とその周辺分子の構造と相互作用に焦点を絞り、固体NMRを用いた解析に取り組んでいます。今回、このような機会を賜りましたので、村田研究室と村田脂質活性構造プロジェクトにおけるこれまでのNMR研究の一端を紹介させていただきます。

村田研究室

村田研究室は、執筆時点で1名の博士研究員、9名の博士課程の学生、11名の修士課程、6名の学部学生が所属しており、村田道雄教授を中心に、土川博史助教、花島の3名のスタッフにより構成されています。村田研究室では、“誰もできないことをやる。誰もやらないことをやる”をモットーに研

究を行っています。研究テーマは、生体膜とその周辺で起こる生命現象の精密な解析というキーワードのもと、有機化学的な手法に機軸を置きつつ、物理化学やケミカルバイオロジーまで多岐にわたっています。その中でも今回は特に、有機合成と固体NMRを併せて用いた生体膜脂質の構造と機能の解析に関連する研究について紹介させていただこうと思います。固体NMRでは、測定感度と原子位置の分解能を補うためにNMR感度の高い核種で標識した分子が必要になります。特に脂質分子は、ちょっとした化学修飾をするだけで生体膜中での本来の特性を失ってしまうことも少なくありません。そのため安定同位体標識した脂質分子は、膜中で分子本来のふるまいを再現できる優れた“分子プローブ”として重用されています。研究室に所属する学生の多くは、日々化学合成に勤しみ、位置選択的に標識を導入したターゲット分子を多段階にて自身で合成します。苦勞して合成を達成し、自分自身で化合物を創り出した喜びに加えて、自分で合成した試料でNMRを測定して新しい(時には予期せぬ?)成果が得られるのは大変うれしいものです。以下に、現在進行中の研究テーマに関して説明させていただきます。

1) 生体膜には、シグナル伝達を担う機能ドメインである脂質ラフトが存在することがわかってきました。この脂質ラフトは“ラフト脂質”と呼ばれる特有の脂質分子が寄り集まって構成されていると考えられています。ラフト脂質の代表的な分子としてスフィンゴ脂質やコレステロールなどが挙げられます。そこで、脂質の各メチレン上のプロトンを順番に重水素で置換したスフィンゴミエリンを系統的に合成し、コレステロールを含むリポソームに組み込み重水素固体NMRを測定しました。得られたスペクトルの核四極子に由来するシグナルの分裂幅を解析すると、対応するホスファチジルコリンと比べ、スフィンゴミエリンはより深い位置でコレステロールと相互作用することが明らかになりました。



写真1 村田研究室で頻繁に使用する研究科の Bruker 400 MHz 固体NMR装置

2) アンホテリシンB (AmB) は、放線菌が産生する強力な抗真菌活性物質で、真菌の細胞膜に存在するステロール分子と選択的に結合して活性を発現します。その作用メカニズムとして、AmB-ステロール複合体チャネルを形成することが示唆されていますが、生体膜中での詳細なチャネル構造は不明な点が多く残されています。そこで、 ^{13}C や ^{19}F で位置選択的に標識を施したAmBを化学的、生物工学的な手法で系統的に調製し、REDORを測定することにより膜中でのAmB-ステロール複合体チャネル構造の全貌解明に取り組んでいます。

村田脂質活性構造プロジェクト

本ERATOプロジェクトはJSTのもと2010年の秋から約5年半(+1年)のプロジェクトとしてスタートしました。脂質分子の構造解析を通じて、機能分子である膜脂質や膜タンパク質の構造や動態を解明するための学術的基盤を作ることを目的としており、具体的には以下の3つの段階的目標(図1)を設定しました。

- i. マイクロドメイン：膜脂質分子などフレキシブルで疎水的な分子について、脂質二重膜における立体配座と相互作用を正確に解析し、細胞膜のドメイン形成(脂質ラフト等)の物理化学的性質の分子基盤を解明する。
- ii. タンパク質内部脂質：タンパク質に結合した脂質性リガンドの活性配座を解析し、脂質分子とタンパク質の相互作用に関して汎用的な研究手法および共通概念を創出する。
- iii. 膜タンパク質周辺脂質：前二項目で得られた知見と技術をもとに、膜タンパク質に結合することによって機能している周辺脂質や脂質性リガンド分子の立体構造および機能を解明する。

これらの目的を達成するため、固体NMRのほか、X線結晶構造解析、計算化学、有機合成化学、生物物理等、さまざまな分野を専門とする研究員が集まりました。

マイクロドメインに関する研究(i)では脂質ラフトにフォーカスし、蛍光色素やラマン分光用のプローブで標識したスフィンゴミエリンの合成、およびそれらを用いた分光測定を行うことで、ラフトドメインの中にもスフィンゴミエリン分子の濃淡があることを明らかにしました。また、村田研究室とも密に連携し、固体重水素NMR測定などによる脂質分子の運動性解析も行いました。

タンパク質内部脂質(ii)では心臓型脂肪酸結合



写真2 村田研究室とERATOのメンバー
(2016年6月撮影)

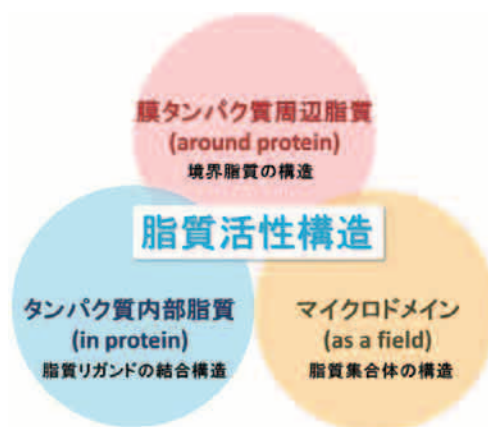


図1 プロジェクトの3つの目標

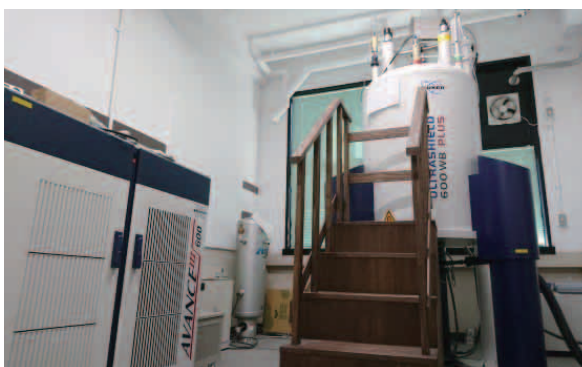


写真3 プロジェクトで導入した
Bruker 600 MHz固体NMR装置

4mm H/X/Y三重共鳴MASプローブと4mm H/F/X/Y四重共鳴MASプローブが使用可能。

タンパク質(FABP3)に着目し、FABP3-脂肪酸の親和性測定法の開発とともに、X線結晶構造解析と計算化学を主とする研究を行い、FABPは脂肪酸結合ポケット内にある水分子の数を調節することで、鎖長の異なる脂肪酸と幅広く結合するというユニークな認識機構を有していることを明らかにしました。

タンパク質周辺脂質の研究(iii)ではバクテリオロドプシン(bR)をモデルタンパク質として使用し、

その周辺脂質がbRにどのような影響を与えるかを活性試験や、CDスペクトル等により評価しました。また、bRとリン脂質の相互作用を重水素の四極子分裂や ^{31}P の化学シフト異方性の変化から周辺脂質を直接観測する検討も行っています。

ほかにも化学シフト異方性の簡便な測定法の開発や温度計分子の合成を行い、生体膜系の固体

NMR測定の基盤となる研究も行っています。

最後に当理学研究科のNMRは、研究科の技術職員である稲角直也博士、戸所泰人博士の2名が中心となり、多様な依頼測定から新人への測定講習、さらには管理運営にひとかたならぬご尽力をいただいております。ここに改めて深く感謝いたします。

大阪市立大学 理学研究科 分析室

大阪市立大学

土江 松美

matsumi@sci.osaka-cu.ac.jp

1. はじめに

大阪市立大学は大阪市中心部との交通の便の良い立地にある総合型公立大学です。旧帝大等国立大学に比べると規模が小さいため、学生は少人数制であり、教員とのマンツーマン教育を強みとしています。

今回紹介する分析室所属のNMR室は、杉本キャンパスの理系地区内理学研究科に属し、全学にオープンにしています。他大学の理系学部で運営されているNMR室とおそらく同等の運営形態であり、特記した事項があるわけではありません。

大阪市立大学では2008年より7年をかけて理学部学舎を中心とした大規模な立替工事が計画・実施されました。仮設学舎を建設し一時移動しての立替が可能ほど敷地に余裕もなく、着工後5年の歳月をかけ、いわゆる押し出し式による3期に分けての長丁場の工事となりました。分析室ユーザーの研究棟は1期および2期に工事が完了して何とか引越しも終え、2014年はようやくその新学舎での研究がスタートする年でした。

一方、分析室の大型分析機器が位置する3期工事エリアは、完全立替ではなく耐震中心の大規模改造工事が最終年度で計画されていました。工事期間中大型分析機器のほとんどが現地で休止、入念な防塵・耐震処理を施した上で部屋を封印し完全な冬眠状態になる旨、通達がありました。

ただし当初我々は、こういった状況は2か月程度との情報を信じており、夏休み程度で終わると甘く見ていました。しかし工事直前に工程が丸1年にも及ぶという現実を知ることとなりました。1年もの間4台のNMRが全部止まったとすると、ユーザーの研究が破綻することは明らかであり、ここから我々の悪戦苦闘が始まりました。

ここで紹介させていただくことが、同等の共同施設を管理されている皆様にいつか何かの参考になれば幸いという思いです。

2. 300 MHz 1 台の移設

この時点で、研究棟部分は完成して機能しておりましたので、その中の1室を何とか確保し、ここにせめて1台移設して稼働させようということになりました。

理学部にはヘリウムガスの液化施設が併設しており、ここのヘリウムを利用させてもらうため、完全回収ラインの設置はNMR室としての必須条件でした。将来の低温系実験室もしくはNMR等の利用を想定した回収配管の施された部屋が1室使えることになったのは本当に幸運でした。

次に問題になったのが、どのNMRを移すかということです。当時の分析室のNMRは年月を経たものがほとんどで、600 MHzも15年近く、400 MHzおよび300 MHz 2台のうちの1台は共に20年近く経た装置で移設に耐えられそうにない状況でした。そこで購入後6年目の300 MHz NMRに白羽の矢が立ちました(図1)。この装置には、オートサンプラーを装備させていたのも好都合でした。

但しこの装置は納入後、本組織の都合で既に2回の移設を経験しており、今回移設するとすれば、導入時を含め4回目の励磁による磁石への負担も多大であるため、その部屋をこのNMRの永住の地にし



図1 耐震工事1年間、移設により唯一稼働が可能だった300 MHz NMR

たいと考えました。最終的に全工事完成後、この1台だけが他のNMR室エリアから離れて位置することにはなりますが。

3. 測定効率向上のための試み

(1) システム関係

分析室のNMRはかつてサイバー攻撃を経験したことから、それまでの学内LAN経由でのデータ吸い上げが可能な方式をやめ、スタンドアロン方式に切り替え、データは本体PCシステムから各自USBで持ち帰る形をとってきました。その後、ウイルスに感染している学生のUSBで本体PCが感染し、駆除に大変苦勞した経験もあり、各研究室にはNMR専用USBを用いてもらい、責任をもってウイルス対策を行ってもらってきました。

加えて分析室NMRでは、毎年化学系ユーザーを中心に150名近くの登録があります。それぞれが比較的マナーの良い共同利用を実践してもらっており、ユーザーの本人測定の稼働率は汎用機3台において、2011年度8,884hr、2012年度8,274hr、2013年度8,380hr程度ありました。しかもその研究分野は有機化学・無機化学に加えて、物理化学分野と広範囲であり、以上の背景から、今後1年間1台でやっていくため相当の工夫が必要でした。

例えば自動測定モードの固定画面での測定の形をとればかなり効率的な運営が可能ですが、マニユ

アル測定を望む無機化学系のニーズもあり、**図2 (a)**のように研究室の数のアカウントを作成し、ログインを研究室ごととしました。

データ取得に関しては、工事半ばでネットワーク関係の整備も部分的な環境下、2ndPCを設置し本体PCとイントラネットで結び、本体PCは測定のみを利用し、データ吸い上げはすべて2ndPCデスクトップから行うこととしました(**図2 (b)**)。

自動測定にあるアーカイブ機能を有効活用することで、測定データを2台のPCに同時に落とすことが可能であったため、持ち時間ぎりぎりまで測定を行い、次のユーザーと交代することが可能になりました。

また最近の装置の技術は目覚ましく、回転なしでも遜色ない線形のプロトン測定が可能でしたので、重クロ、アセトン等の溶媒においてはno spin設定として、回転不良でロックに進まない等のエラー軽減と時間短縮を目指しました。

(2) オートサンプラー関係

設置していたオートサンプラーは、本来標準試料管仕様であり、「ヤング管等の特殊試料管は対象外である」とメーカーの取説にもありましたが、有機化学、無機化学のユーザーが同様に1台の装置を使わざるを得ない今回の状況では、それでも何とか測定可能な環境にせざるをえませんでした。当初はサ

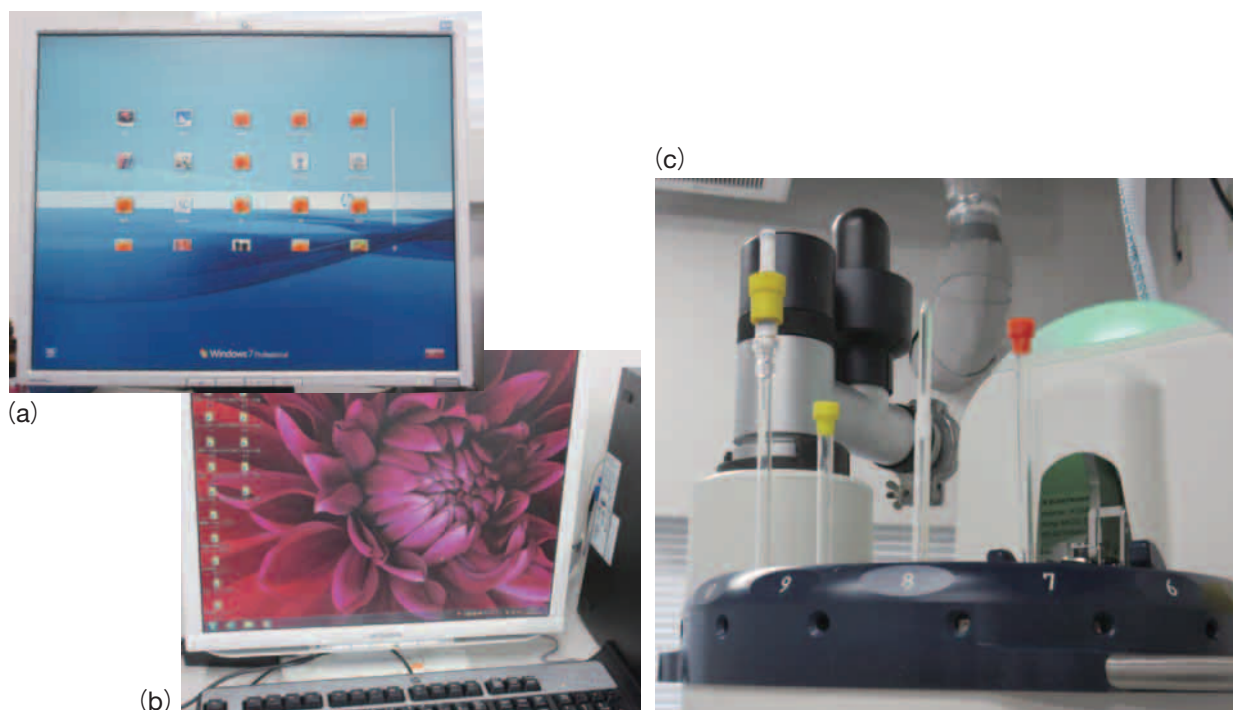


図2 測定効率を上げるための工夫

(a) 本体PCログイン画面 (左上図)、(b) 2nd PC デスクトップのショートカット (左下図)、(c) オートサンプラー最適化 (右図)

ンプル出し入れのエア量調整が大変で、通常の試料管に合わせると重い試料管測定で排出エラーを起こすことがあり対策に迫られました。

エンジニアさんに苦勞をおかけしながら、エア量を最適な状態に調整し、バッファータンク設置による mild なエアでの制御法を取り入れたことで、**図2 (c)** のような状況でも問題なく測定が可能となりました。

以上のような1つひとつの試みにより、1こま30分で9本近くのプロトン測定が可能となり、夜中2時3時にも測定予約が入っているような状況ではありましたが、怒涛のような1年間で何とか切り抜けることができました。

(3) 他施設からの援助をうけて

一方でもっぱら依頼測定を行ってきた600 MHzも例年6,000時間を越えるマシンタイムが必要であり、学内他部署の装置で室温測定は可能でしたが、 ^{77}Se 等の多核測定や物性研究のための高温や低温等の温度可変測定はお手上げ状態となりました。

しかし、大阪大学科学機器リノベーションのシステムを利用して、理学研究技術部に依頼測定が可能となりました。モノレールに乗って柴原駅を目指していたのが懐かしく思い出されます。

ついでながら、質量分析装置においてもまったく同様な状況であったため、こちらについても、大学連携研究設備ネットワークを通じて、大阪大学産業科学研究所に通い、セクター型質量分析装置を使わせてもらい持参したサンプルの測定をするという1年でした。

4. 嵐が去って今

2015年の初めから、ようやく封印されていた分析室エリアに立ち入りが可能となりはじめ、春には各装置が立ち上がりました。

もともと導入後経年による老朽化に加え、1年放置後、各装置が立ち上がるかが懸念される状況であったことから、1年間の工事期間中に協議が重ねられました。その結果、運営委員会や財務担当部署、大阪市、各メーカーの担当者等、多くの方々の尽力により、各装置の分光計部の刷新が可能となり、**図3**のように、現在順調に稼働しています。



(a) 600 MHz NMR室



(b) 400 MHz NMR室 (2台1室)



図3 工事完成後再開した各NMR室

分析室では、ユーザーの研究分野が多岐に及ぶため、多くを学べる環境に感謝しています。また耐震工事を前後して、質量分析も担当しており、こちらについても囑託職員とともにユーザーからの要望に何とか応えようと奮闘しています。

この間、研究のサポートのためあらゆる努力をされた本学運営委員会の先生方、ユーザー研究室の先生方と学生さん、日々ずっとサポートいただいたメーカーの皆様、さらに測定でお世話になった大阪大学の技術職員の方々、現在のNMR室環境整備のために尽力下さったすべての皆様に心から感謝いたします。

帝人株式会社 構造解析センター

帝人株式会社 構造解析センター

菅沼 こと

ko.suganuma@teijin.co.jp

帝人株式会社は、1918年に日本初のレーヨンメーカーとして設立し、ポリエステル繊維メーカーへの転換、医薬事業への進出などにより事業を拡大し、現在では、高機能繊維・複合材料、電子材料・化成品、ヘルスケア、繊維製品・流通、ITなど、多岐にわたる事業を展開しております。

構造解析センターは、帝人グループでの分析解析の中心部署として東京都日野市と山口県岩国市に拠点をもち、4台のNMRを活用しております。解析のターゲットとしては、当社の主要製品であるアラミド繊維や高機能ポリエステル繊維、炭素繊維複合材料、ポリカーボネート樹脂、ポリエステルフィルムなどが挙げられます。さまざまな解析を行っていますが、本稿では高強度繊維であるテクノーラ®と、環境負荷低減素材であるバイオフロント®の解析事例について紹介いたします。

当社では、1987年から共重合パラ型アラミド繊維であるテクノーラ®の商業生産を開始しました。テクノーラ®は、高強力・高弾性率・耐薬品性・耐摩耗性・耐屈曲疲労性に優れており、ゴムや樹脂材料の補強、ロープやケーブル、さらに土木建築資材など、産業資材用途を中心に幅広く使用されています。テクノーラ®は、テレフタル酸とパラフェニレンジアミンのほか、3,4'-ジアミノジフェニルエーテル

テルを共重合しているため、その連鎖分布を詳細に把握することは重要です。しかしながら、テクノーラ®は耐薬品性に優れるため一般的なNMR溶媒には不溶であること、全芳香族のため¹H NMRではピークの分離が難しいこと、さらに、3,4'-ジアミノジフェニルエーテルが非対称ジアミンであるため頭尾結合の連鎖構造を生じ、ピークがより複雑になることなどの理由から、NMRによる連鎖構造解析が困難な素材でした。ここでは、¹H NMRに比べピーク分離の良い¹³C NMRを用いて適切な測定条件を検討し、さらにモデルサンプルの作製により、テクノーラ®の連鎖分布の解明に挑戦した事例について紹介させていただきます。

テレフタル酸 (T) を中心としたとき、パラフェニレンジアミン (A) と3,4'-ジアミノジフェニルエーテル (B) の連鎖、さらに3,4'-ジアミノジフェニルエーテル (B) の頭尾結合を考慮すると、テレフタル酸 (T) のカルボニル炭素は最大9本に分離して観測されます (図1)。まず、これら9本のカルボニル炭素を分離して観測できるNMR測定条件の検討を行いました。その結果、測定溶媒にトリフルオロメタンスルホン酸を用い、100℃で測定したとき、カルボニル炭素が8本に分離して検出できることを見いだしました (図2)。次に、頭尾結合を含めた連鎖分布を制御して重合したモデルポリマーを作

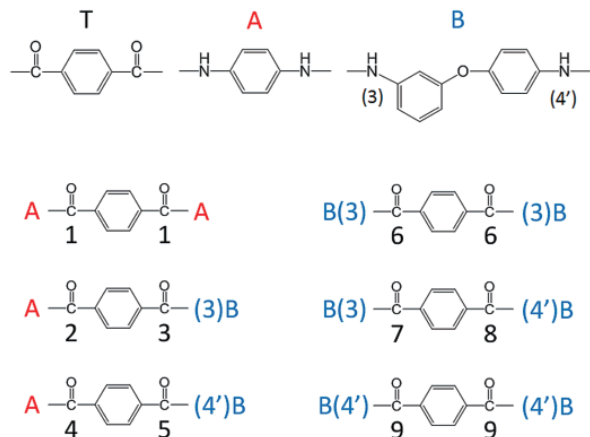


図1 3連鎖構造の種類とカルボニル炭素の種類

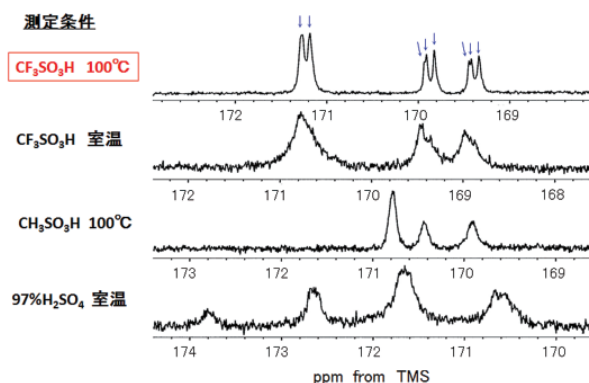


図2 測定条件の違いによるカルボニル炭素ピークの違い

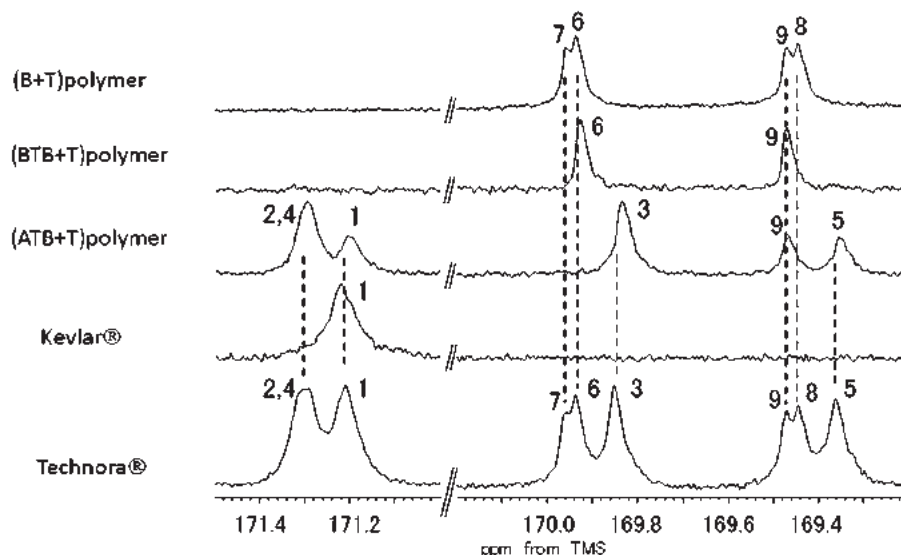


図3 モデルポリマーを用いたカルボニル炭素ピークの帰属

製し、ピークの比較を行うことにより各ピークの帰属を試みました。その結果、図3に示す通りピークが帰属され、各ピークの面積比よりテクノラ®が完全ランダムに共重合していることが確認できました^[1]。

また、当社では環境負荷低減をサポートする高機能バイオプラスチックとして、バイオフロント®を開発しました。バイオプラスチックは、生物資源を原料としているため、カーボンニュートラルな環境にやさしい素材として注目されています。しかし、代表的なバイオプラスチックであるポリ乳酸は、耐熱性が低いなどの理由により、使用用途が限定されてしまいます。バイオフロント®は、従来のポリ乳酸に比べ融点の高いステレオコンプレックスポリ乳酸から成ります。これにより、従来のポリ乳酸に比べ耐熱性が格段に向上します。さらに、バイオフロント®は耐熱性以外にも、結晶性、耐薬品性、透明性、ガス透過性にも優れているため、自動車や電子電機、アパレルなど、幅広い用途に適用が可能です。

ステレオコンプレックスポリ乳酸は、L体のポリ乳酸(PLLA)とD体のポリ乳酸(PDLA)がペアになって結晶化しています。しかし、PLLAとPDLAを溶融混練した場合、すべてがステレオコンプレックス結晶を形成するのではなく、一部ホモ結晶が混在してしまうことがあります。一方、L-乳酸とD-乳酸の連鎖がブロック状に配列したステレオブロックポリ乳酸では、100%ステレオコンプレックス結晶を形成することが知られています^[2]。これは、L-乳酸とD-乳酸の連鎖がポリ乳酸の耐熱性などの物性発現に大きく影響を及ぼすことを意味し

ており、その連鎖構造に関する知見を得ることは重要です。溶液NMRは、ポリマー中の連鎖構造を把握する上で極めて有力な方法です。このため、ポリ乳酸に対しても、LL或いはDDの連鎖(アイソタクチック)とLD或いはDLの連鎖(シンジオタクチック)を詳細に解析する立体規則性解析が溶液NMRによって一部行われてきました。立体規則性解析には、観測されるNMRピークが立体規則性を反映して分裂することが前提となります。このピーク分裂の原因の一つは、各コンフィギュレーションごとに、溶液中での時間平均のコンフォメーションが異なることにあると解釈されています。しかしながら、ポリ乳酸に対して、コンフィギュレーション、コンフォメーション、NMR化学シフトの相関性を詳細に解析報告した例はあまりありません。そこで、ポリ乳酸についてこれらの相関性の検討を行いました。

まず、PLA二量体モデルについて、Gaussian 09のTZVP基底関数を用いて、内部回転角 Φ 、 Ψ の関数としてコンフォメーションエネルギー計算を行い、二つの安定構造を得ました($\Phi \rightleftharpoons -70^\circ$ 、 $\Psi \rightleftharpoons 165^\circ$ および $\Phi \rightleftharpoons -80^\circ$ 、 $\Psi \rightleftharpoons 0^\circ$)。この二つの構造をベースに、アイソタクチックとシンジオタクチックPLA二量体モデルについて、優位コンフォメーションエネルギーを再度計算し、得られたエネルギー差から各コンフォメーションの存在確率を計算しました。その結果、アイソタクチックモデルでは、最も安定な構造が75%以上の確率で存在すること、シンジオタクチックモデルでは、複数のコンフォメーションを考慮する必要があることがわかりました。ここで得られたコンフォメーションの妥当

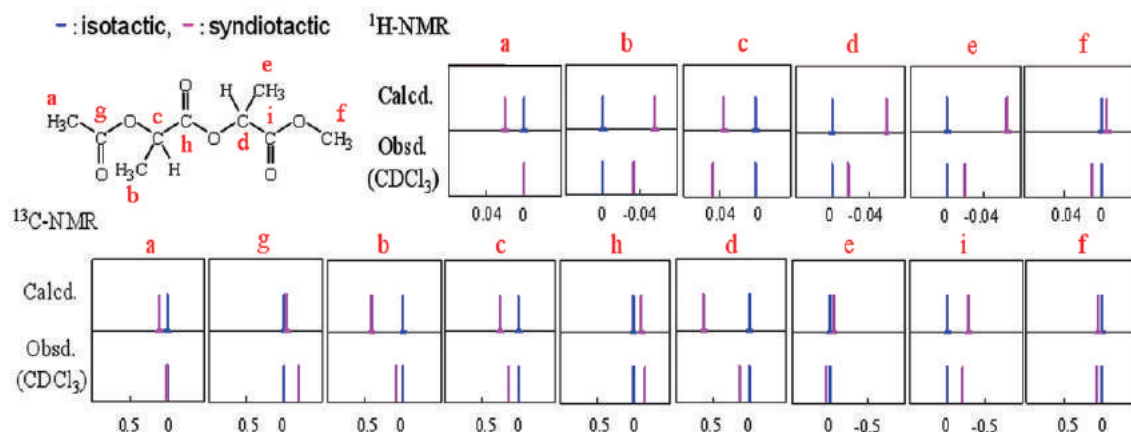


図4 PLA二量体モデル化合物における化学シフト計算値と実測値の比較

性を確認するため、各コンフォメーションとNMR化学シフトの関係を明らかにするため、化学シフトの計算、並びにその計算値と実測値との比較を行いました。化学シフトの計算値は、それぞれのコンフォメーションごとに ^1H および ^{13}C NMR化学シフトを計算し、存在確率を掛け合わせて荷重平均をとり求めました。そして、重クロロホルム溶媒で測定した二量体モデル化合物のNMR実測値と比較しました。その結果、 ^1H および ^{13}C NMR化学シフトについて、アイソタクチックとシンジオタクチック間のシフトの傾向が、実測値と計算値の間で概ね一致し、計算結果が妥当であり、相関性があることが確認できました(図4)^[3]。

以上、簡単ではございますが、当社でのNMRの活用事例について一部紹介させていただきました。

現在当社は、技術の融合化による新しい機能・ソリューションの創発・提案を目指しております。構造解析センターは、これを実現するために必要な、NMRを用いた解析技術の開発に取り組んでいきたいと思っております。

引用文献

- [1] Matsuda, H., Asakura, T., and Nakagawa, Y., (2003) Sequence analysis of Technora (copolyamide of terephthaloyl chloride, p-phenylenediamine, and 3,4'-diaminodiphenylether) using ^{13}C NMR, *Macromolecules*, **36**, 6160-6165.
- [2] Fukushima, K., and Kimura, Y., (2005) A novel synthetic approach to stereo-block poly(lactic acid). *Macromol. Symp.*, **224**, 133-143.
- [3] Suganuma, K., Horiuchi, K., Matsuda, H., Cheng, H.N., Aoki, A. and Asakura, T., (2011) Stereoregularity of poly(lactic acid) and their model compounds as studied by NMR and quantum chemical calculations. *Macromolecules*, **44**, 9247-9253.

箱根高原ホテルで開催された 第17回若手NMR研究会便り

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後期課程1年

石川 真帆

ishikawa-maho@ed.tmu.ac.jp

はじめに

2016年9月10日～12日の3日間、第17回若手NMR研究会が箱根高原ホテル（神奈川県足柄）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について学ぶだけでなく、若手研究者間の交流も目的とした合宿形式の勉強会です。ここでは実行委員を代表し、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。従来は、企画・実行すべて博士課程の学生を中心とした学生のみによる運営でしたが、昨年開催された第16回NMR研究会の懇親会にて話し合いの末、本年は学生ではなく、首都大学東京の池谷先生、理化学研究所QBiCの八木先生、名古屋大学の宮ノ入先生を世話人代表として開催されました。会期中の実行・運営は上記の方々に加え、首都大学東京の学生達が担当いたしました。

一昨年までの若手研究会は、大学院博士前期・後期課程の学生を対象にNMRの基礎をみっちり勉強するという傾向が強かったのですが、昨年から三十代から五十代の経験豊富なNMR研究者にも多数ご参加いただき、これまでのような基礎的勉強に加え、より深い議論と研究室間の活発な交流を促す場として刷新されました。今年度は、この方向性をさらに進め、より広い分野からのシニアの研究者の参加をお願いし、昨年以上に深い議論と、一層広い横の繋がりを築くことを目標としました。従って、昨年から行っている、学生を含む参加者から研究内容について15分程度のプレゼンを行っていただき、それに対して活発に議論するという基本軸はそのままに、分野間の交流を活発に行うための自由討論の場や学生による研究室紹介等のプログラムを新たに追加いたしました。

世話人の先生方とともに何度か協議を重ねた末プログラムは以下のように決定いたしました。

9月10日(土)

口頭発表1

- L1 岩川 直都(京都大院・工・分子工)
「細胞内におけるALS関連タンパク質SOD1のフォールディングに関する動的構造解析」
- L2 山田 和哉(大阪大学・蛋白質研究所)
「定量固体NMRによる単一大腸菌細胞内で合成される分子種・分子数の計測」
- L3 竹内 恒(産総研・創薬分子プロファイリング研究センター)
「多剤耐性転写制御因子LmrRの転写制御機構」

口頭発表2

- L4 天野 剛志(名大院・創薬科学・基盤創薬学)
「タイトジャンクションを制御する低分子化合物」
- L5 来見田 遥一(東工大・院・生命理工)
「抗TGFα・抗体のエピトープ解析」
- L6 守谷 潤(エーザイ株式会社)
「エーザイの化合物探索現場におけるNMRの活用」
- L7 赤木 謙一(医薬基盤・健康・栄養研究所)
「基盤研におけるこれまでとこれからの取り組み」

口頭発表3

- L8 奥村 学(京大・院農)
「磁場配向微結晶粉末を用いた単結晶法による結晶多形の分析」
- L9 羽矢 和未(横浜国大・院・工)
「¹³C固体NMRによるDMPC脂質二分子膜存在下でのペプチドホルモングルカゴンの線維形成過程の解析」
- L10 武田 和行(京都大学・大学院理学研究科・化学専攻)
「オプトメカニクスを利用したNMR信号の光変換」

基礎講座1

- S1 平野 桐子 (ブルカー・バイオスピン株式会社)
「低分子有機化合物のためのNMRの基礎講座」

基礎講座2

- S2 松本 陽 (大阪大学・蛋白質研究所)
「DNP固体NMRの基礎」

9月11日(日)

基礎講座3

- S3 池上 貴久 (横浜市大院・生命医科学研究科)
「生体系溶液NMRの基礎 (プロダクトオペレータ)」

企業セミナー1

- C1 日本カンタム・デザイン株式会社講演者:
大田 剛司
C2 太陽日酸株式会社講演者: 寺内 勉
C3 ブルカー・バイオスピン株式会社講演者:
金場 哲平

基礎講座4

- S4 山口 秀幸 (味の素株式会社・イノベーション研究所)
「MRI最初の一步」

企業セミナー2

- C4 株式会社システムプラス講演者: 梅本 伸一
C5 株式会社 JEOL RESONANCE 講演者:
笹川 拡明
C6 株式会社 シゲミ講演者: 関 充男

9月12日(月)

口頭発表4

- L11 奥出 順也 (東大院・薬)
「 μ -オピオイド受容体の efficacy および function selectivity 決定機構の解明」
L12 柴田 友和 (筑波大院数物)



写真1 会場では多くの質問が飛び交いました。

「ヘムと平行型四重鎖DNAの複合体の構造および機能の解析」

- L13 山口 芳樹 (理化学研究所・糖鎖構造生物学研究チーム)

「レクチンを利用したN-結合型糖鎖の準安定構造の解析」

- L14 藤浪 大輔 (九州大学・生体防御医学研究所)
「古細菌糖鎖の化学構造決定」

口頭発表5

- L15 北原 亮 (立命館・薬)
「静水圧NMRとガス圧NMRによるタンパク質の構造、ダイナミクス研究」
L16 鎌足 雄司 (岐阜大学・生命科学総合研究支援センター)
「タンパク質の構造揺らぎと機能発現」
L17 西村 千秋 (帝京平成大・薬・薬)
「アポミオグロビン折りたたみ中間体に含まれる非天然構造」

会場には、箱根の山々や芦ノ湖を間近に臨み、温泉も堪能できる「箱根高原ホテル」といたしました。今回のコンセプトでもある幅広い分野間での深い議論を達成するため、開催が決定してから多くの先生方にお声がけを行い、その結果総勢87名の研究者・学生の参加を募ることができ、また多くの企業および学会にもご協賛いただくことができました。

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、多少雨模様の空ではあったものの円滑に運営することができました。

今年の若手NMR研究会は学生や先生方による口頭発表で幕を開けました。昨年から始まったこの企画は、ただ座って話を聞くだけでなく各々が主体となって議論できる場となっており、今年も各発表終了後活発にさまざまな分野の方から質問が飛び交いました(写真1)。口頭発表10件に続き、ブルカー・バイオスピンの平野先生にNMR測定におけるロック・チューニング・マッチングの合わせ方のコツ等お話しいただきました。続いて大阪大学 松本先生にDNP固体NMRの基礎から最新の研究までお話しいただき、1日目は終了しました。

2日目は横浜市大の池上先生による講義で始まりました。プロダクトオペレーターの公式をこれから覚えようと考えている学生を対象に分かりやすく解説していただきました。続いて3社の企業の方に自

社製品紹介や制作秘話など普段聞くことのできないようなお話をしていただきました。その後、味の素の山口先生に実際の企業での研究におけるMRIの活用等について講演いただきました。その後、さらにもう3社の企業の方に自社製品の紹介をしていただきました。2日目の講義はここで終了し、会場の近くにあるバーベキュー場で昼食を取りながら、分野や世代を超えた活発な議論を行い、大いに盛り上がりました。

3日目は口頭発表7件を行い白熱した議論が展開された後、閉会となりました。

合宿形式の研究会の醍醐味は、何と言っても参加者同士の交流に尽きると思います。1日目の夜の懇親会では参加した各研究室の紹介を、所属している学生に「ユーモアたっぷりに」行っていただきました。また2日目のバーベキューでは、みんなで協力して着火剤を用いない火おこしから行い一層活発に交流を行いました(写真2)。

第17回研究会に参加して

第17回若手NMR研究会の準備・運営に関しましては、多くの方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。参加者の視点で振り返ってみますと、今年は昨年に比べ女性の参加者が多く、私としましては部屋に戻ってからも活発に議論・交流することができ有意義でした。また、昨年度より取り入れている口頭発表ですが、今年は昨年に比べ学生からの発表が少なかったことが残念に感じましたが、全体ではさまざまな研究室の学生と



写真2 2日目の昼食のバーベキューは班に分かれ、火おこしから一体となって取り組みました。

交流でき、充実した研究会でした。

次回第18回若手NMR研究会は2017年に関西で宗先生(阪大)、櫻井先生(近畿大)、星野先生(京大)主催で開催される予定です。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貸していただけると幸いです。

末筆となりますが、このような会の運営に携わられたおかげで、多くの方々と関わりをもつことができ、いろいろな意味で世界が広がり、大いに成長する機会をいただきました。ご参加いただいた皆様、講師の諸先生、会場の箱根高原ホテルの皆様、協賛企業・学会の関係者、スタッフの皆様、そしてアドバイザーの方々に、この場をお借りして心より御礼申し上げます。



写真3 箱根高原ホテル前にて集合写真を撮影いたしました(1日目)。

第27回ICMRBS 参加報告

立命館大学薬学部 准教授

北原 亮

ryo@ph.ritsumei.ac.jp

2016年8月21日～26日に京都国際会館にて第27回International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS) が開催された。阿久津秀雄、甲斐荘正恒、嶋田一夫の3名の先生を学会組織委員長として、オールジャパン体制で準備に臨んだ学会である。30の国々から参加され、正規登録者数は772名、海外からの参加者は約7割と大変国際色豊かな学会となった。学会運営に関わられた先生方、学生スタッフの方々に、大変素晴らしい学会にさせていただいたことを感謝いたします。筆者も、実行委員として、発表者として参加したため体験記を寄稿させていただきます。

AMAZING JAPAN !

学会期間中は、幸か不幸か晴天に恵まれ、京都国際会館付近は日中33℃前後となった。蒸し暑い日が続いたが、海外から来日された参加者も含めて、京都滞在を大いに楽しめたと思う。海外の研究者と日本の文化やテクノロジーの話になると、光栄なことに多くの方が日本に高い関心を持っていると感じる。今回、Welcome Reception、Conference Banquet、企業nightや企業ブースを

通じて、日本の文化が多数発信されていたことが嬉しい。とりわけ印象に残ったのは、JEOL nightで披露された、書道家万美 (Mami) による「磁気共鳴 Magnetic Resonance」のライブペイントである。その様子は、彼女のホームページでも紹介されている。金屏風を背景に、長い黒髪に青い着物、スタイリッシュな和装姿の万美さんのしなやかな動きから描かれた作品は力強く、見学者の心を魅了した(写真)。また、舞妓さんによる舞も宴席に興を添えた。その日本髪や華やかな衣装と化粧は印象深く、多くの外国人が舞妓さんと記念撮影をしていた。

筆者は、日本滞在中の予定や日本食について海外の若手研究者と積極的に会話をした。スウェーデンの方は、学会前に和歌山の高野山や京都の大原界限など数十kmをランニングし、さらには学会後に富士山の登山も予定していた。彼は、果敢にもホテルの朝食にて納豆にチャレンジし、とても気に入ったようだった。「納豆好き？ 君は、外国人では例外の5%だよ」と伝えておいた。個人的には長年共同研究をしている友人を、信楽焼で有名な滋賀県信楽に案内し、私の子供たちとも一緒に陶芸体験を行った。彼らにとってファーストの滅多にこない国、Amazing Japanを満喫する良い機会となったことだろう。国際会議は、旧知の友との再会だけでなく、新しい出会いや互いの文化に触れ合う大変貴重な機会であり、新たな国際共同研究に発展できる可能性もある。大学院生や若手研究者も、英語を話すことに臆せず、日本の文化、自らのサイエンスを国際発信していこう。



書道家万美さんのライブペイント
(撮影：北原 亮)

磁気共鳴と電子顕微鏡

今回のプログラムでは、磁気共鳴の学会にも関わらず、Plenary Lectureの1つに電子顕微鏡の専門家、藤吉先生の講演があったことが印象的である。近年のクライオ電子顕微鏡による、超高分解能のタンパク質構造解析は強いインパクトを与え、構造生物学の未来を大きく拓いた。高分解能に至った技

術革新は、検出器の感度向上だけでなく、試料調整法など周辺技術の改良も大きく影響しているようだ。電子顕微鏡やX線結晶構造解析において、膜タンパク質や複合体など研究対象が高分子量化する中で、溶液NMR、固体NMRは、構造生物学にどのように貢献していくのか、改めて考えた学会であった。個人的には、小さなタンパク質でさえも、幅広い時間スケールで生じる構造ゆらぎの全体像、すなわち多様なコンフォメーション間で転移する様子を捉えることが難しいのに、構造生物学の話題はどんどんと大きくて複雑な系に移行していると感じる。生物物理やNMR関連の国際会議においても、disordered proteinsやAggregationに関するセッションはあっても、Protein FoldingやDynamics

というセッションはあまり見かけなくなった。しかし、今回、Protein FoldingやDynamicsに関するセッションが複数組まれ、タンパク質の構造揺らぎの問題が積極的に議論されていたことは大変喜ばしい。世界中で使用されつつある R_2 緩和分散法、Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST)法は、タンパク質の動的性質やコンフォメーション間の自由エネルギー差を解明できるNMR特有の技術である。タンパク質の機能発現が、「構造」「ダイナミクス」「熱力学」の協調によるものだと考えると、NMRはまだまだ構造生物学を牽引できるポテンシャルを感じる。次回のICMRBSは2018年にダブリンで開催されるが、日本からインパクトある研究成果を発信できるよう頑張らしましょう。



北原 亮 (きたはら・りょう)

H11年より 日本核磁気共鳴学会会員

H14 神戸大学大学院卒業 博士(理学)

H14-H16 理化学研究所 基礎科学特別研究員

H17-H19 日本学術振興会 特別研究員(理化学研究所播磨研究所)

H20より 立命館大学薬学部 専任講師(生体分子構造学研究室主宰)

H23より 准教授

NMR学会からのお知らせ

日本核磁気共鳴学会の決定事項

2015年度 通常総会 議事次第

日時：2015年11月6日（金）14時00分～14時30分
 場所：千葉工業大学 津田沼キャンパス 2号館
 3階大教室

総会次第

1. 開会の辞
2. 会長挨拶
3. 2015年NMR討論会世話人 挨拶
4. 事業報告
5. 2014年度 収支決算の承認
6. 2015年度 中間報告の承認
7. 2016年度 収支予算案の承認
8. 2016年度 役員の選任
9. 2016年NMR討論会世話人 挨拶
10. その他
11. 閉会の辞

会員数

会員種別	2013年 9月30日	2014年 9月30日	2015年 9月30日
正会員	431	438	439
学生会員	143	151	158
名誉会員	12	12	12
賛助会員	8	8	8
合 計	594	609	617

H27 年度現役役員名簿

■会長 (H26-H27)

内藤 晶 横浜国立大学

■理事 (H26-H27) 会長 (*) 副会長 (**)

内藤 晶 (*) 横浜国立大学
 嶋田 一夫 (**) 東京大学
 朝倉 哲郎 東京農工大学
 浅野 敦志 防衛大学校
 加藤 晃一 自然科学研究機構
 神田 大輔 九州大学
 菅瀬 謙治 京都大学
 竹腰清乃理 京都大学
 藤原 敏道 大阪大学

山本 泰彦 筑波大学

■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

■評議員 (H27-H28)

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
 金橋 康二 新日鐵住金
 木川 隆則 理化学研究所
 神田 大輔 九州大学
 佐藤 一 日本ブルカー
 白川 昌宏 京都大学
 菅瀬 謙治 京都大学
 武田 和行 京都大学
 朽尾 豪人 京都大学
 西山 裕介 (株) JEOL RESONANCE
 松木 陽 大阪大学
 水野 元博 金沢大学
 山本 泰彦 筑波大学

■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
 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****●2014年度**

1. 第53回NMR討論会(2014)
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5巻の発行
5. その他

●2015年度

1. 第54回NMR討論会(2015)
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6巻の発行
5. その他

●2016年度(方針)

1. 第55回NMR討論会(2016)
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7巻の発行
5. その他

2015年度 通常総会 議事録

出席：出席者数と委任状受領数の合計109名

* 定足数[一般会員439名(2015年9月30日現在)]
/5=88名

* 配布資料と投影資料に基づき全て承認された。

* 2014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28年度の評議員と会計監査が選出、承認された。

■評議員(H28-H29)

朝倉 哲郎	東京農工大学
池上 貴久	横浜市大
大澤 匡範	慶應義塾大学
梶 弘典	京都大学
片平 正人	京都大学
加藤 晃一	自然科学研究機構
児嶋長次郎	大阪大学

高橋 栄夫	横浜市大
竹腰清乃理	京都大学
楯 真一	広島大学
出村 誠	北海道大学
内藤 晶	横浜国立大学
野村 薫	(公財)サントリー生命科学財団
半沢 宏之	第一三共製薬株式会社
廣明 秀一	名古屋大学
藤原 敏道	大阪大学
吉水 広明	名古屋工大

■会計監査(H28-H29)

芦田 淳	(株)JEOL RESONANCE
林 文晶	理化学研究所

11月6日(金)開催の新評議員会および新理事会にて、平成28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28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

竹腰清乃理(*)	京都大学	H28-H29
加藤 晃一(**)	自然科学研究機構	H28-H29
朝倉 哲郎	東京農工大学	H28-H29
浅野 敦志	防衛大学校	H27-H28
池上 貴久	横浜市立大学	H28-H29
神田 大輔	九州大学	H27-H28
菅瀬 謙治	京都大学	H27-H28
内藤 晶	横浜国立大学	H28-H29
藤原 敏道	大阪大学	H28-H29
山本 泰彦	筑波大学	H27-H28

■会計監査(H28-H29)

芦田 淳	(株)JEOL RESONANCE
林 文晶	理化学研究所

■幹事

阿久津秀雄	日本学術振興会
伊藤 隆	首都大学東京
河合 剛太	千葉工大
楯 真一	広島大学

第55回NMR討論会 (2016)

第55回NMR討論会を、平成28年11月16日(水)、17日(木)、18日(金)の3日間で開催します。今回は、世界遺産・広島原爆ドームに隣接する平和記念公園内にある広島国際会議場を会場とします。先般、オバマ大統領の訪問があり世界的にも注目を集めた場所です。

本年は8月にICMRBS2016が京都で開催されますが、第55回NMR討論会では、例年同様にNMRチュートリアルコースを開催し、若手ポスター賞表彰も行います。ただ、ICMRBSの直後でもあるので、本討論会では、できるだけ多くの若手研究者に口頭発表をしていただけるようにプログラムを組みたいと思っています。海外からの招待講演者として、国際的に活躍している2名の若手研究者と、すでに国際的に著名な2名の研究者を招聘することができました。それぞれ個性的な研究を進めている研究者ですので、NMRを利用した新たな研究の可能性を考える上ではよい機会になると思います。

秋の広島は、気候も良く、牡蠣など食べ物を楽しむにも良いところです。懇親会は、瀬戸内クルーズ船をチャーターしており、もう一つの世界遺産である厳島神社の夜景を海側から眺めるディナークルーズです。ただし、乗船者数には限りがあるので早めに懇親会の参加登録をお願いします。

多くのNMR研究者の皆さんの参加と、活発な討論をお願いいたします。

第55回NMR討論会 世話人 楯 真一 (広島大学)

会期：2016年11月16日(水)～18日(金)

チュートリアルコース 2016年11月15日(火)

会場：広島国際会議場 (広島市中区中島町1-5 (平和記念公園内))

招待講演・特別講演のプログラム

第2日目 11月17日(木)

招待講演1 座長：山田 和彦

13:10～13:45 Elucidation of Chain Trajectory and Chemical Reaction of Semicrystalline Polymers by Solid-State NMR

Prof. Miyoshi Toshikazu (University of Akron, Akron, USA)

招待講演2 座長：田中 好幸

13:50～14:25 Advanced NMR studies of DNA conformational polymorphs

Prof. Lukáš Trantírek (CEITEC Masaryk University, Brno, Czech)

招待講演3 座長：坂倉 正義

14:30～15:05 Cholesterol Binding to the C99 Domain of The Amyloid Precursor Protein as a Factor that May Promote Alzheimer's Disease

Prof. Charles Sanders (Vanderbilt University, Nashville, USA)

招待講演4 座長：楯 真一

15:10～15:45 The Future of NMR in Metabolomics

Prof. David Wishart (University of Alberta, Edmonton, Canada)

特別講演1 (功労賞) 座長: 野村 薫

16:00 ~ 16:35 Gazing NMR for Thirty Six Years
岩下 孝 (サントリー生命科学財団)

特別講演2 (学術賞) 座長: 朝倉 哲郎

16:40 ~ 17:15 High Resolution Solid-State NMR Spectroscopy. Development and Application to
Structural Biochemistry
内藤 晶 (横浜国立大学)

チュートリアルコース

日時: 11月15日 (火)

会場: 広島国際会議場

13:40 ~ 14:40

フーリエ変換を工夫してNMRスペクトルをよみがえらせる

池上 貴久 先生 (横浜市立大学 教授)

同じ測定データでも、どのようにフーリエ変換するかによって、スペクトルに大きな違いが生じることがあります。もちろん、プロセス法も考えておいたうえで測定パラメータを設定するのがよいのですが、もし間違えて測定してしまったとしても、フーリエ変換をなんとか工夫することによって、そのミスを少しでもカバーできればそれに越したことはありません。今回はプロセス用パラメータをブラックボックスとして使っている NMR 初心者を対象に、プロセス法における工夫や個々の基本的なパラメータの意味について、できるだけ詳しく紹介したいと思います。

14:50 ~ 15:50

四極子核固体NMR法の基礎の基礎

山田 和彦 先生 (高知大学 特任講師)

ほとんど全ての元素は固有の核スピン (I) を有する安定同位体を含んでいる。従って、原理的には周期表上のほとんどの元素がNMR測定の対象になるはずである。また、その八割程度は四極子核と呼ばれる $I \geq 1$ の核種であり、四極子モーメントを有している。そのため、周囲の電荷が創出する電場勾配と四極子モーメントの間で、核四極相互作用と呼ばれる静電的な核スピン相互作用が生じる。概して、NMRユーザーは ^1H や ^{13}C など $I = 1/2$ の核種を測定対象とすることが多く、四極子核NMRを使用する機会は少ないかもしれない。これは、化学シフト相互作用や双極子-双極子相互作用などに比べて、核四極相互作用は線形に与える影響が大きいため、線幅が広がることを反映した結果と思われる。しかしながら、近年の技術的な進歩に伴って、それら難易度は確実に下がっており、NMR測定が可能な四極子核が増えてきた。そして、NMR法を応用できる研究分野は確実に広がってきている。このような背景から、従来からのNMRユーザーのみならず、これからNMR法を活用する研究者においても、四極子核を測定対象とするNMR法への関心が高まってきている(と思われる)。本講演では、これから四極子核NMRに挑戦するユーザーを対象に、四極子核NMRの基礎的理論やバックグラウンドを概説し、四極子核の代表格(核?)である酸素 (^{17}O) NMRを実例として、スペクトル解析の重要性について説明する。

16:00 ~ 17:30**NMRを創った人たち：第1話 夜明け前****1. SternとGerlach—偶然はいかに彼らに微笑んだか**

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成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、学問が創られた背景には、様々な味わい深い物語がある。研究対象の選択や鍵となるアイデアの着想の経緯、あるいは回り道やつまずきなど創造の過程で辿った軌跡を知ることが、学問を創る側に立とうとしている若い人々にとって素晴らしい財産となろう。研究を行なった本人の人物像、研究が行なわれた時代背景、研究環境、周辺の人々などもまた創造の物語を構成する重要な要素である。本講演では、時代を画した研究を行った人物にスポットを当て、可能な限りその研究が行われた現場を蘇らせる。その試みが研究者として歩みだした若い人たちにとって一つの道標になれば幸いである。今回は角運動量の方向量子化を発見し、陽子などの磁気能率を初めて測定してNMRが出現する土壌を培った先人の物語を話す。

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

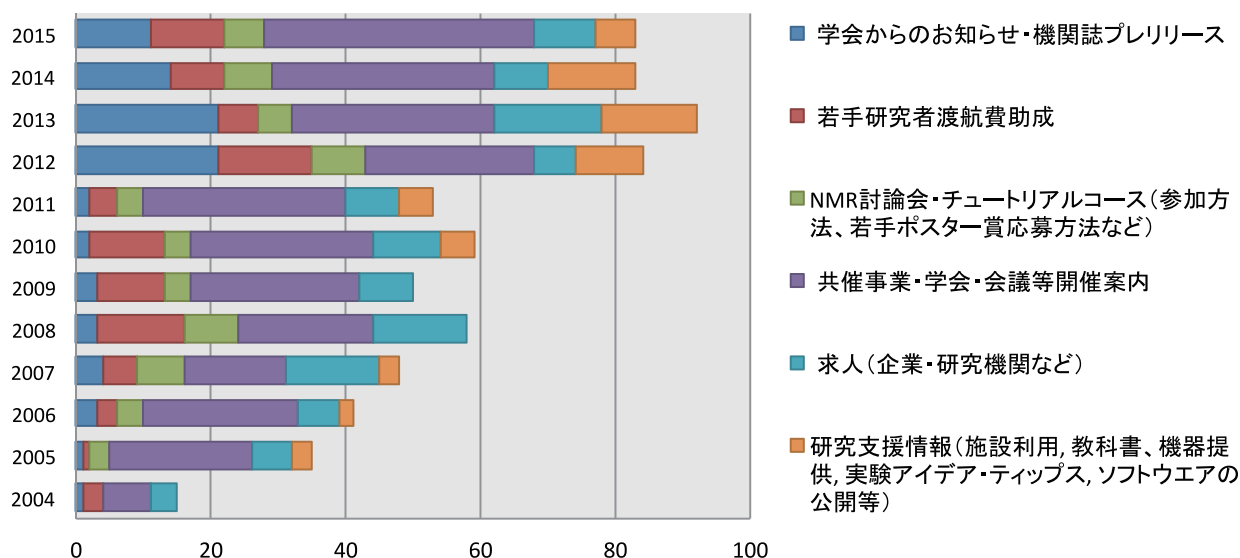
学会ホームページ <http://www.nmrj.jp> から「NMRニュースレター」→「バックナンバー」を選択してください。キーワード、発行日検索もできます。

◎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.638-720 (2015年4月～2016年3月)

年度別発行数



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当事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@t.kyoto-u.ac.jp (2016年1月1日から)

▶ 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います(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。理事は役員の互選により決定する。会長、副会長は理事の互選による。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。役員の任期は2年とする。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もって決する。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 役員の選出

第4条 毎年役員の半数を改選する。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回の役員の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。2,000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 mem-

brane 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

株式会社カモソフトウェアジャパン

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28年9月1日現在の本学会賛助会員は、上記の通りです。
本学会の事業への御賛助に対して、厚くお礼申し上げます。

日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員会委員名簿 (2016 年度)

委員長	浅野 敦志	防衛大学校
副委員長	池上 貴久	横浜市立大学
	吉水 広明	名古屋工業大学
委 員	浅川 直紀	群馬大学
	恩田 光彦	株式会社三井化学分析センター
	梶 弘典	京大化研
	金橋 康二	新日鐵住金株式会社
	北原 亮	立命館大学
	児嶋長次郎	横浜国立大学
	菅瀬 謙治	京都大学
	野村 薫	公益財団法人サントリー生命科学財団
	橋本 康博	旭化成株式会社
	福士 江里	北海道大学
	村上 美和	京都大学
	山本 泰彦	筑波大学

編集後記

NMR学会誌第7巻を会員の皆様方にお届けします。前編集委員長の山本泰彦 筑波大学教授よりバトンを受け、編集委員長を仰せつかりました。第7巻の原稿を執筆いただいた諸先生に編集委員を代表してお礼申し上げます。本巻の編集作業も編集委員の力添えで無事完了することができました。これまでのNMR学会誌同様、本巻も充実の内容となっていると自負しております。会員の皆様には、ぜひお手にとっていただきお楽しみいただければと思います。

NMR学会誌は、冊子体およびPDF形式で会員の皆様に配布しておりますが、第5巻からは冊子体の受領を希望する会員のみに、冊子体を配布しております。PDF形式の電子媒体はNMR学会のWebページからダウンロードできますが、全ページ版の高解像度PDFを、試験的にgoogleサイト（下記参照）から提供します。ご利用していただき、ご意見をぜひお寄せくだされば幸いです。

本巻におきましても、冊子体受領希望調査の回答フォームに寄せられた要望をできるだけ反映し、内容を充実させることができたと思っております。特に前回からの要望の1つである「NMR研究室便りの掲載件数を増やして欲しい」というご意見に対しては、本巻において掲載数を1件増やし2大学1企業としました。研究室便りは編集委員から執筆をお願いしておりますが、会員からの掲載希望も受け付けております。奮ってご応募ください。

最後になりましたが、株式会社クバプロおよび株式会社プロアクティブにはNMR学会誌第7巻発行に向けて多大な御尽力をいただきましたことに対して感謝いたします。今後ともNMR学会誌の発展にさらなる御協力をお願い申し上げ、私のあいさつとさせていただきます。

2016年10月 NMR学会誌編集委員長 浅野敦志

E-mail: asanoa@nda.ac.jp



NMR学会誌アーカイブ <http://goo.gl/UXpAji>

NMR

**BULLETIN OF THE NUCLEAR
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN**

Vol.7

2016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

Solutions for Innovation

原子、それはこの宇宙に存在する全ての物質、生命を形造っています。

これまで、118種類の元素とその組み合わせを発見することが、わたしたちの生活を豊かにしてきました。

日本電子は、より多くの原子の観察と分子レベルでの構造情報の解析、そして新たな発見を求め
電子顕微鏡や核磁気共鳴装置など、様々な最先端理科学機器を開発し続けます。

観察するチカラ、解析するチカラ、

新たな物質の創造と機能の発見へと繋がる、それが JEOL のチカラ

JNM-ECZR シリーズ

JNM-ECZR シリーズは、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ました。

JEM-ARM300F

JEM-ARM300F は自社開発の収差補正装置を組み込んだ最高加速電圧 300kV の原子分解能電子顕微鏡です。商用機として世界最高レベルの STEM-HAADF 保証分解能 63pm を実現しました。

最高のNMRのための 世界最高性能の磁石



He再凝縮機能付きAeon 1 GHz磁石

ブルカー・バイオスピンでは、超伝導技術の進歩と冷凍技術の発達により、まったく新しい形の超高磁場磁石を完成させることができました。この新しい磁石はいまでのものとは異なり、小型で、設置しやすく、冷媒の充填が不要となりました。初めてのAeon 950 MHzシステムはイギリスのリーズ大学でインストールされ、初めてのAeon 1 GHzシステムもすでにドイツのパイロイト大学にインストールされています。これらのシステムで得られる結果がこの革新的なAeon超高磁場磁石の性能と可能性を示していくことでしょう。

アクティブシールディング技術の進歩

- 漏えい磁場を最小に抑え、5 Gラインの範囲をノンシールド磁石に比べて97%削減。
- 外部摂動に対する抑制機能を内蔵
- 磁場の安定性を確保するためにドリフトを最小限にする設計

Aeon冷却技術

- 液体窒素不要
- 2ステージのパルスチューブ冷凍機を使ったHe再液化機構を搭載
- 通常運用時はほぼ冷媒損失がない
- ユーザによる冷媒充填は不要。冷媒充填による時間のロスを抑え、より効率の良い運用を実現。

UltraStabilized™ 過冷却技術

- 過冷却による低温稼働で超高磁場でも長期間の安定性を達成
- ジュール・トムソン効果を使った過冷却でコイルを大気圧下において運用
- 世界中で230台以上の同型磁石を納入した経験と実績に基づいた品質

設置要領

- 5G ライン: 半径方向 3.6 m / 軸方向 4.9 m
- 最低天井高: 4.9 m
- 重量: 8000 kg

Ascend Aeon 950 MHz磁石 He再凝縮機能付き小型超高磁場磁石

新しいAscend Aeon 950 MHzは以前の950 MHz磁石とは異なり、コンパクトサイズと低重量、小さな漏えい磁場により、さまざまな環境でインストールすることができます。それに加え、液体窒素を使わず通常運用時の液体ヘリウムの消費もほとんどないため、ユーザによる冷媒の充填も必要ありません。

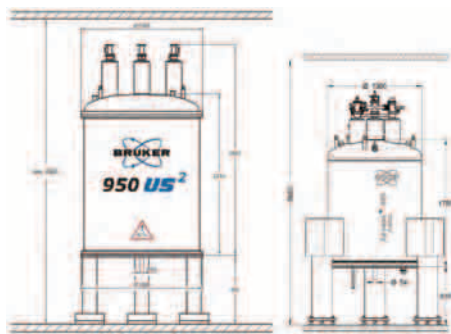


Fig. 2 左 (旧型): 7,200 kg, Heホールド: 60日, 5 Gライン 半径方向 3.3 m
右 (新型): 5,000 kg, He再凝縮, 5 Gライン半径方向 2.8 m



Fig. 1 パイロイト大学 (ドイツ) にインストールされたAeon 1GHz。
ドリフトレート ~ 1 Hz/hr (実績値)。写真は Prof. P. Röschより提供。

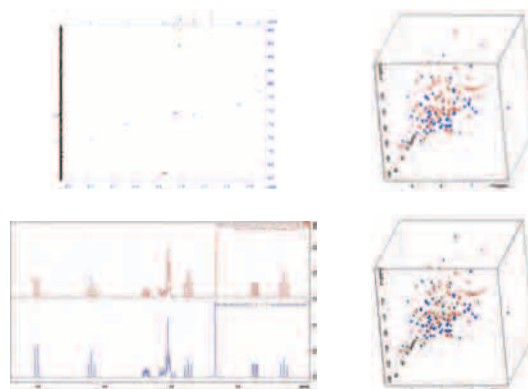


Fig. 3 パイロイト大学 (ドイツ) の1 GHz NMR データ



Fig. 4 リーズ大学 (イギリス) にインストールされた
Ascend Aeon 950。ドリフトレート ~ 1Hz/hr (実績値)。
写真はProf. A. Breezeより提供



ブルカー・バイオスピン株式会社

横浜事務所

神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9

電話: 045-444-1390

電子メール: info.bbjo.jp@bruker.com

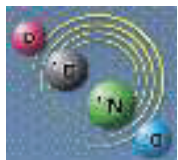
大阪事務所

大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29

電話: 06-6394-8989

電子メール: info.bbjo.jp@bruker.com

ウェブサイト: www.bruker.com



安定同位体標識試薬

(^{13}C ^{15}N D $^{17,18}\text{O}$)

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
硫安 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 サイエンティフィック(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/

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

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。

抗体用

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も可能です。

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

無細胞くん[®] SI



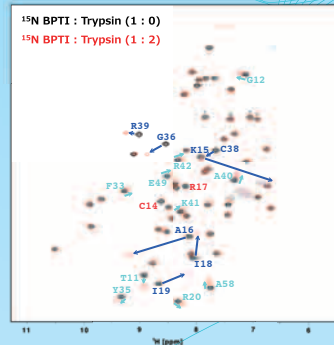
安定同位体標識タンパク質合成キット

無細胞くん[®] SI

迅速・簡単なタンパク質大量合成用キットです(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。

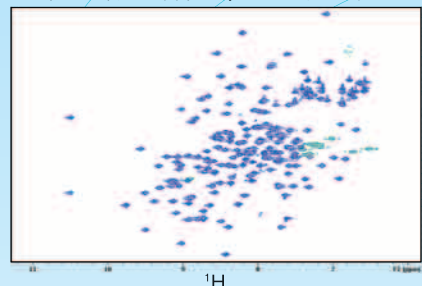
製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格(円)
A29-0059	無細胞くんSI	1キット	-80℃	55,000

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.

Ras (Y32W) タンパク質の ¹H, ¹⁵N-HSQCスペクトル



ご提供：理化学研究所生命分子システム基盤研究領域 NMR/バイライン高度化研究チーム殿

無細胞くん用 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。

※ Biomolecular NMR専門カタログをご用意し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

購入単位は**200本**以上のご購入で

5mmNMR サンプルチューブがなんと**1本220円**です。

型式 EC-57 (全長 180mm) 200本×220円＝**44,000円**

2万円以上ご購入の場合送料は無料、しかもキャップ付きです！！

型式	寸法 (mm)			真直度 (μ m)	単価 (1本の価格)			1箱入数
	全長	外径	内径		1箱購入時	2～7箱購入時	8箱以上購入時	
EC-57	180	4.965 +0.005 -0.010	4.220 ± 0.10	30	320円	280円	220円	25本

材料は最高級品質のドイツ ショット社(ほう珪酸ガラスを発明したフリードリッヒ・オットー・ショットさんの会社です。)の DURAN を使用しています。安価なものにはクラス B(JR-2)を使用しているものがほとんどです。当社の製品はすべて、クラス A(JR-1)を使用しております。

材質による違いの違い

1. 熱膨張係数が違うので class B は温度可変に実験ができない。
2. class B はアルカリ溶出量が2倍も大きい。
3. サンプル管上部を口焼きしているため、非常に丈夫。

■表1 JIS R-3503 化学分析用ガラス器具 抜粋

等級	ホウケイ酸ガラス class A	ホウケイ酸ガラス class B
記号	JR-1	JR-2
熱膨張係数 $\times 10^{-7}/^{\circ}\text{C}$	35 以下	55 以下
アルカリ溶出量 (m l / g) (μ g / g)	0.10 以下 31 以下	0.20 以下 62 以下

☆外径はセンタレス研磨により 4.965+0.005-0.010 と超高精密に研磨されておりスピナータービンに常に真っ直ぐ、きちっと収まります。

☆真直度は 30um でスピニングサイドバンドが出る心配はありません。

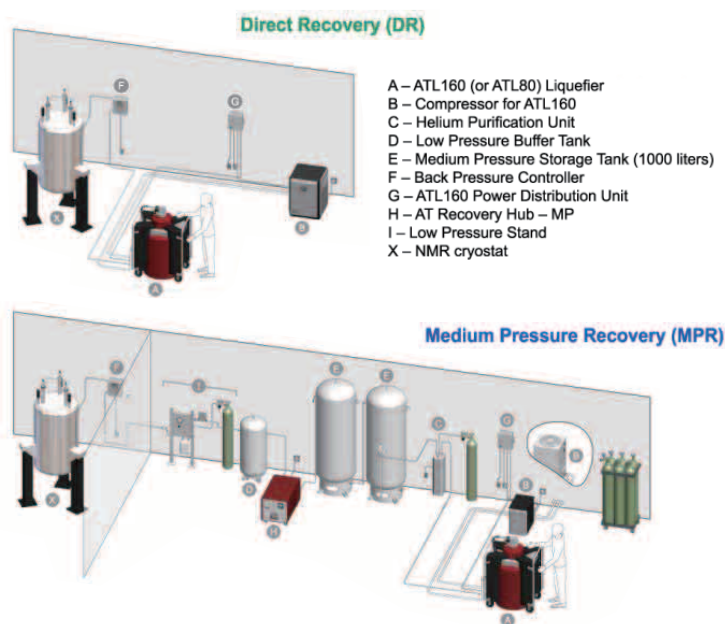
ご注文、ご質問は電話 042-624-2207(受付時間 9時～16時), FAX 042-622-0937 メール shigemi-corp@nifty.com あるいは mitsuo.seki@shigemi.co.jp Home page は <http://www.shigemi.co.jp>

マルチシステム対応

NMR用 液体ヘリウムリカバリー装置

複数台のNMRより蒸発したヘリウムガスを回収し、リカバリーを行うことで、
直面している供給不安・価格高騰といったヘリウムの諸問題を解決！
装置の安定稼働とランニングコストの削減を実現します。

リカバリーシステム構成例



ATLシリーズの特徴

マルチシステム対応

複数のNMRからヘリウムを回収し、再凝縮を行うことが可能。

スペクトルへの影響なし

回収配管で接続するため、ATL設置による測定への影響はありません。

簡便なトランスファー

内部にヒーターを内蔵しており、圧力調整が可能な為、トランスファー時にガスボンベやバルーンは不要です。

タッチパネル式完全自動制御

設定や操作は、タッチパネルで行うことが可能。稼働開始後は完全自動制御です。



Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens.

国内実績

- ・九州工業大学
- ・沖縄科学技術大学院大学

海外実績

- ・サラゴサ大学
- ・カリフォルニア大学
- ・ジョージア大学 他

型 式	ATL80	ATL160
再凝縮能力	12 L/日	22 L/日
デュワー容量	80 L	160 L
コンプレッサー	空冷式	分離型空冷式 or 水冷式
消費電力	3.8 kW ~ 5.4 kW	6.5 kW ~ 7.5 kW
設置寸法	530 mm×1370 mm×1440 mm	790 mm×1780 mm×1550 mm

※再凝縮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。設置寸法はW×D×Hです。



Quantum Design Japan

日本カンタム・デザイン株式会社

〒171-0042 東京都豊島区高松1-11-16 西池袋フジタビル
Tel:03-5964-6620 Fax:03-5964-6621 Email:info@qdj.co.jp

<http://www.qd-japan.com/>

液体ヘリウム消費ゼロ

NMR用 液体ヘリウム蒸発防止装置

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。



NMRに搭載したHe蒸発防止装置

JHRSシリーズの特徴

完全無冷媒型(液体ヘリウム供給不要)

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。

スペクトルへの影響がない

冷凍機の振動は、独自の除振構造により最小限に抑えられているため、常時稼働中でも測定に影響を与えません。

既設NMRヘレトロフィット可能

すでにお持ちのNMRへ後付が可能です。
Agilent, Bruker, JEOLのNMRで動作実績があります。

完全自動制御

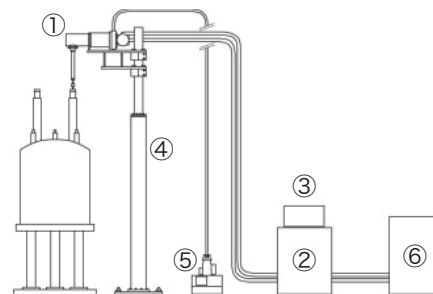
稼働開始後は、全自動・無人運転のため、長期休暇中でも安心です。



凝縮ユニット

JHRSシリーズ機器構成

- ① 凝縮ユニット
- ② ヘリウム圧縮機(水冷)
- ③ コントローラー
- ④ 専用架台
- ⑤ ターボ分子ポンプ
- ⑥ 冷却水循環装置



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 MHz ~ 500 MHz		300 MHz ~ 600 MHz
GM冷凍機	形式	RDK - 408D2		RDK - 415D
	冷凍能力	1.0 W at 4.2 K		1.5 W at 4.2 K
ヘリウム圧縮機	形式	F - 50 L		
	消費電力	6.5 kW ~ 7.5 kW		

※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。

<納入実績>

・徳島文理大学
・東京理科大学 他

※NMR主要メーカ装置に実績あり



Quantum Design Japan

日本カンタム・デザイン株式会社

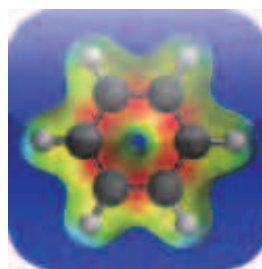
〒171-0042 東京都豊島区高松1-11-16 西池袋フジタビル
Tel:03-5964-6620 Fax:03-5964-6621 Email:info@qdj.co.jp

<http://www.qd-japan.com/>



Spartan'16

for Windows, Macintosh and Linux



Download on the
App Store

iSpartan

WAVEFUNCTION



米国法人 **Wavefunction, Inc.**
日本支店

〒102-0083 東京都千代田区麹町3-5-2
BUREX麹町

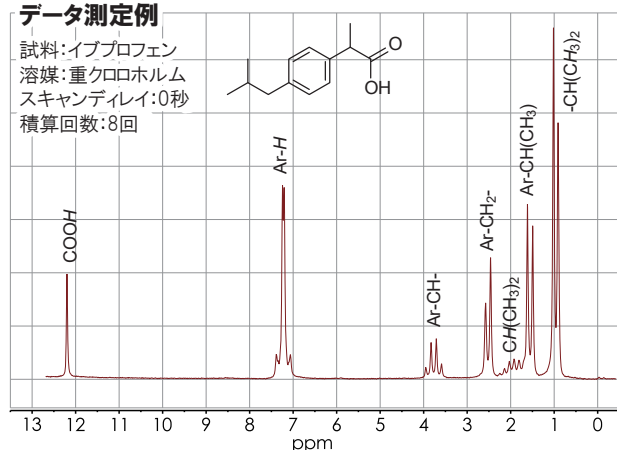
TEL: 03-3239-8339
FAX: 03-3239-8340
Email: japan@wavefun.com
URL: <http://www.wavefun.com/japan>

簡単操作・冷媒不要

卓上型NMR **NMReady**

データ測定例

試料: イブプロフェン
溶媒: 重クロロホルム
スキャンデレイ: 0秒
積算回数: 8回



■ 特長

- ▶ A3サイズのコンパクトサイズ
- ▶ タッチスクリーンで簡単操作
- ▶ 冷媒不要・Heフリー
- ▶ 様々な核種に対応
- ▶ 2次元測定対応
- ▶ フロー測定オプション

■ 用途

- ▶ 化学反応確認
- ▶ 学生実験・教育
- ▶ 組成分析
- ▶ 品質管理

■ 主な仕様

	NMReady 60Pro	NMReady 60e
対応核種	(必須) (1種選択) ^1H , ^{11}B , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P	(1種選択) ^1H , ^{19}F
動作周波数	60 MHz (1.4 T)	
分解能	< 1.2 Hz	
測定機能	1D, 1D(^1H), JRES, COSY, DEPT, HSQC, T1, T2, Nutation	1D, JRES, COSY, T1, T2, Nutation
サイズ	30 x 28 x 49 cm, 25 kg	

※仕様は予告なく変更になることがあります。

TII 株式会社 東京インスツルメンツ
TOKYO INSTRUMENTS, INC.

Mutual Satisfaction

<http://www.tokyoinst.co.jp/>

本社 〒134-0088 東京都江戸川区西葛西6-18-14 Tビル TEL 03(3686)4711 FAX 03(3686)0831
大阪営業所 〒532-0003 大阪市淀川区宮原4-1-46 新大阪ビル TEL 06(6393)7411 FAX 06(6393)7055

ELEVATING YOUR SCIENCE



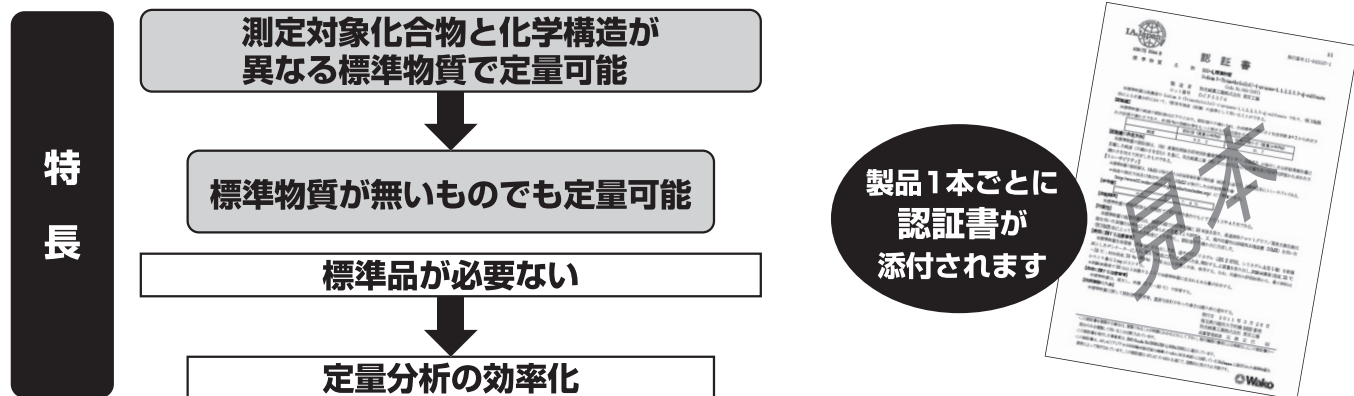
米フェニックス社は、プローブヘッドとプローブベースを分割することによって、数種類のプローブをリーズナブルに提供できる製品を開発しました。

特徴	プローブヘッド交換により様々な口径のサンプル測定が可能になります。 ヘッド交換は専用ツールにて簡単に脱着可能。
ラインナップ	400MHz~900MHz (上記以外の周波数についてもお問い合わせください。)
オプション	・ロックシステム ・低周波測定用ツール。
その他	各社の NMR 装置に対応。 Chemagnetics 社、Varian/Agilent 社製 T3 プローブのサンプルローターに対応。
固体 NMR 消耗品 (Revolution NMR,LLC)	1.2mm ~ 6.0mm の固体 Chemagnetics 社、Varian/Agilent 社製 ローターアセンブリ、各パーツを取り揃えております。

詳しくは弊社にお問合せください。

定量NMR用 標準物質

NMRによる純度検定は、適切な国家標準品を用いることで国際単位系 (SI) へのトレーサビリティが容易に実現できるため高い信頼性を得ることが出来る分析法です。



(独)産業技術総合研究所 計量標準総合センター(NMIJ)のISO/IEC 17025に基づく純度校正サービスによって純度値が決定されます。

コードNo.	品 名	規 格	容 量
024-17031	1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄ 標準物質	TraceSure®	50mg
020-17033		TraceSure®	50mg×4
048-33271	ジメチルスルホン標準物質	TraceSure®	100mg
044-31671	DSS- <i>d</i> ₆ 標準物質	TraceSure®	50mg
040-31673		TraceSure®	50mg×4
135-17951	マレイン酸標準物質	TraceSure®	100mg
093-06731	定量NMR用内部標準物質セット (4種) 【セット内容】 ・1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄ (50mg×1) ・DSS- <i>d</i> ₆ (50mg×1) ・ジメチルスルホン (100mg×1) ・マレイン酸 (100mg×1)	定量NMR用	1 セット

【標準液】内標準法及び外標準法として使用することができる標準液です。

コードNo.	品 名	規 格	容 量
041-33641	DSS- <i>d</i> ₆ 標準液(500mg/1重水)	定量NMR用	1ml×5A
041-33641	ヘキサメチルジシラン標準液 (500mg/1メタノール- <i>d</i> ₄ 溶液)	定量NMR用	1ml×5A

【標準品】標準物質を用いて定量NMR法によって値付けされた標準品です(※含量値には不確かさがついています)。

コードNo.	品 名	規 格	容 量
207-20411	1,3,5-トリメトキシベンゼン標準品	定量NMR用	500 mg
204-20421	トリフェニルメタン標準品	定量NMR用	500 mg
028-19011	安息香酸標準品	定量NMR用	500 mg
166-27911	フタル酸水素カリウム標準品	定量NMR用	500 mg
046-34171	テレフタル酸ジメチル標準品	定量NMR用	500 mg

ご購入に際し製品情報 (適用法規・保管条件など) のご確認は、当社総合カタログおよび検索サイト (siyaku.com) をご参照ください。

和光純薬工業株式会社

本 社：〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
 東京本店：〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号
 営 業 所：北海道・東北・筑波・藤沢・東海・中国・九州

問い合わせ先

フリーダイヤル：0120-052-099 フリーファックス：0120-052-806
 URL：http://www.wako-chem.co.jp
 E-mail：labchem-tec@wako-chem.co.jp

広告掲載一覧

(順不同)

日本電子株式会社

ブルカー・バイオスピン株式会社

SIサイエンス株式会社

大陽日酸株式会社

株式会社シゲミ

日本カンタム・デザイン株式会社

Wavefunction, Inc.

株式会社 東京インスツルメンツ

JTEバルテック株式会社

和光純薬工業株式会社