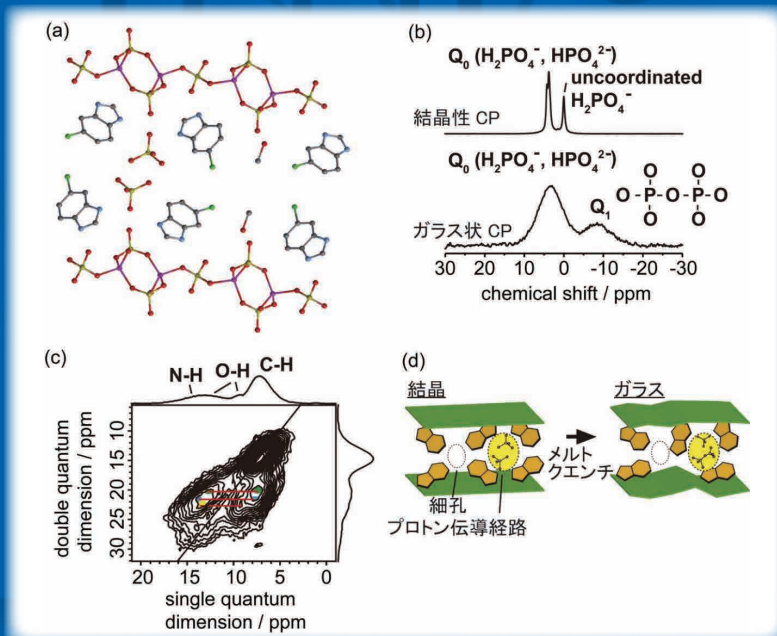


セルロース骨格を  $^{13}\text{C}$  標識したカルボキシメチルセルロースの  $^{13}\text{C}$  INADEQUATE スペクトル



- (a)  $[\{\text{Zn}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)\}(\text{ClbimH}^+)_2 \cdot (\text{H}_2\text{PO}_4^-) \cdot (\text{MeOH})_n]$  の結晶構造
- (b) 室温における  $^{31}\text{P}$  CP-MAS スペクトル
- (c) 室温におけるガラス状 CP の超高速 1H-1H DQ NMR スペクトル
- (d) ガラス状 CP の概略図



## 表紙の図

- (上段) : セルロース骨格を  $^{13}\text{C}$  標識したカルボキシメチルセルロース (DS = 0.91) の  $^{13}\text{C}$  INADEQUATE スペクトル。四種類の構成残基の相関ネットワークが確認できる。(苫小牧工業高等専門学校 応用化学・生物系 甲野 裕之 先生)
- (下段) : (a)  $[\{\text{Zn}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)\}(\text{ClbimH}^+)_2 \cdot (\text{H}_2\text{PO}_4^-) \cdot (\text{MeOH})_n]$  の結晶構造。紫 : Zn、黄 : P、赤 : O、青 : N、黒 : C を示す。水素は省略している。(b) 室温における  $^{31}\text{P}$  CP-MAS スペクトル。(c) 室温におけるガラス状 CP の超高速  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQNMRS スペクトル (回転速度 : 70 kHz)。O-H と C-H (緑)、N-H と C-H (青)、N-H と O-H (黄) は、それぞれの相関を示している。(d) ガラス状 CP の概略図。緑は  $\text{Zn}^{2+}$  とリン酸から組み上がる 2次元シートを表している。(徳島大学大学院 社会産業理工学研究部 犬飼 宗弘 先生)

# NMR

BULLETIN OF THE NUCLEAR  
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN

Vol. **10**

November 2019

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

●会長メッセージ	
新たな時代の日本核磁気共鳴学会 .....	5
加藤 晃一	
●追悼抄	
追悼：荒田洋治先生－出会いの頃 .....	6
甲斐荘 正恒	
故荒田洋治先生を偲ぶ .....	10
阿久津 秀雄	
我が恩師 荒田洋治先生を偲ぶ .....	12
加藤 晃一	
●解説	
20 kHz級 MAS条件の <i>D</i> -HMQC & <i>D</i> -RINEPT .....	14
永島 裕樹	
DFT 計算支援による天然物の NMR 解析 .....	31
橋本 勝、福土 江里、Warren Hehre	
●トピックス	
常磁性効果を活用した糖鎖の動的立体構造解析 .....	42
山口 拓実	
多糖類の構造研究における NMR の有用性 .....	48
甲野 裕之	
磁場配向 NMR – 反磁性体の磁場応答を利用した構造解析 – .....	57
久住 亮介	
●技術レポート	
生体分子レオロジー NMR の開発と応用 .....	64
森本 大智、菅瀬 謙治	
●研究報告	
固体 $^2\text{H}$ NMR による機能性材料中の分子運動の研究 .....	69
水野 元博	
天然物の NMR 研究 – 立体化学決定および溶液中と膜中における配座解析 .....	76
松森 信明	
NMR による生体高分子立体構造計算の基礎と最近の進展 .....	82
池谷 鉄兵	
●NMR 便利帳	
ESR の基礎と応用 .....	97
原 英之	
●NMR 史点描	
封筒の裏 .....	104
寺尾 武彦	

●NMR基礎講座	
錯体結晶の固体NMR .....	108
犬飼 宗弘	
●NMR研究室だより	
室蘭工業大学におけるNMRの利用状況 .....	113
馬渡 康輝	
●若手NMR研究会便り	
第20回若手NMR研究会開催報告 .....	117
谷中 冴子	
●海外学会報告	
EUROISMAR 2019参加報告書 .....	121
西澤 茉由	
8 <sup>th</sup> Asia-Pacific NMR Symposium 2019	
参加報告書 .....	123
朝倉 大河	
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 .....	125
2. ニュースレターの記録 .....	127
3. 日本核磁気共鳴学会規約 .....	129
4. 日本核磁気共鳴学会機関誌投稿規程 .....	133
5. 賛助会員名簿 .....	135
6. 日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員会委員名簿 (2018-2019年度) .....	136
7. 編集後記 .....	137



## 新たな時代の日本核磁気共鳴学会

日本核磁気共鳴学会会長

加藤 晃一

kkatonmr@ims.ac.jp

日本核磁気共鳴学会の第9期会長を拝命してはや2年目の秋を迎えました。この間に平成から令和へと時代は移り、本学会にとってもいくつかの大きな出来事がありました。

まず、昨年9月に北海道を襲った巨大地震の影響で、札幌で開催が予定されていた第57回NMR討論会が中止となりました。被災された地域の方々に改めてお見舞い申し上げます。私を含めて参加を楽しみにされていた会員の皆様にとっては大変残念な事態でありましたが、世話人の出村誠先生の並々ならぬご尽力により、学会運営の混乱を最小限に留めることができました。ご英断に敬意を表するとともに、討論会の運営に関わられた皆様に改めて御礼申し上げます。

そして悲しいことではありますが、昨年の秋から春にかけてお二人の名誉会員の先生方の訃報に接しました。昨年10月にはNMR討論会を創始された藤原鎮男先生がご逝去され、そして3月には本学会初代会長をつとめられました荒田洋治先生が鬼籍に入られました。我が国の核磁気共鳴研究の黎明期よりその開拓と発展に多大な貢献をされ、本学会の設立にも深く関わられた先生方のご功績を偲び、改めて哀悼の意を表します。

このように本学会にとっては厳しい出来事が続きましたが、新しい時代の訪れとともに新たな息吹をもたらす活動も活発化しつつあります。木川隆則先生が世話人として準備を進められている第58回NMR討論会は、初めての試みとして電子スピンスサイエンス学会との連合大会として開催されます。これは、再来年8月に大阪で開催される国際会議に向けての布石としての意味合いもあります。この国際会議は、第60回NMR討論会と第60回電子スピン学会年会に加えて、第22回国際核磁気共鳴学会会議 (ISMAR) と第9回アジア太平洋NMRシンポジウム (AP NMR) の合同会議として

開催を予定しています。それに向けて、ISMAR組織委員長の藤原敏道先生、AP NMR組織委員長の内藤 晶先生を中心に、まさにオールジャパンの体制で開催に向けての準備が進められており、第60回NMR討論会世話人の片平正人先生は合同年会全体のプログラム委員長としてもご尽力されています。会員の皆様におかれましても、世界の核磁気共鳴研究者が集結するこの一大イベントには是非奮ってご参加いただき、国際的な交流を深める機会としていただけましたら幸いです。

また改めて申すまでもなく、若手の研究活動を支援し、次世代を担う研究者を育成することは本学会の重要な役割です。日本核磁気共鳴学会では、若手の一層の活躍を願い、従来の若手ポスター賞、渡航費助成に加えて、NMRに関する研究成果が特に優れ、将来性が期待される若手研究者を顕彰する新たな取り組みを企画しつつあります。私は、今年8月のはじめに開催された第20回若手NMR研究会に講師として参加いたしました。そこで、全国から集った若手がNMR研究の新たな方向性を模索し、異分野の若手研究者も交えて夜遅くまで車座になって熱く語り合っている姿を目の当たりにし、その輪の中に加えてもらいました。情報通信技術の進展は、日々の研究はもとより、将来的には学会のあり方にも大きく影響を与えることが予想されます。このたびの研究会を通じて、若手の皆さんの沸き立つアクティビティを頼もしく思うとともに、人と人をつなぐ学会の役割について改めて深く考える機会を得ました。

このように未来につながる新たな胎動を感じる高揚感を会員の皆様と分かちつつ、新しい時代を迎えた日本核磁気共鳴学会の発展に微力を尽くしていきたいと思っております。引き続き、ご支援の程よろしくお願い申し上げます。

2019年仲秋

## 追悼：荒田洋治先生—出会いの頃

東京都立大学名誉教授、首都大学東京客員教授

甲斐荘 正恒

kainosho@tmu.ac.jp

荒田さん—以降、親しみを込めてこのように呼ばせて頂きます—は、我が国の高分解能NMR研究の黎明期より生体系を中心とした様々な研究活動を主導され、また指導者として多くの人材育成に努められました。亡くなられてから既に半年余りが過ぎましたが、かつて基礎研究を取り巻く状況が厳冬期にあった頃、共に切磋琢磨した日々を忘れることはできません。荒田さんを中心に、平成14年に設立された日本核磁気共鳴学会は、我が国のNMR研究の発展に多大な寄与を果たしてきましたが、生体系NMR研究は現在大きな転換期に差し掛かりつつあるように思われます。学会からの依頼を受けて、追悼文を寄せることを引き受けましたが、既に私はISMAR (International Society of Magnetic Resonance) に訃報を掲載し<sup>[1]</sup>、また東京大学薬学部嶋田一夫氏による追悼文も最近のファルマシア誌に掲載されています<sup>[2]</sup>。荒田さんのお人柄に関しては、機能水研究所長を務められた折に共同研究者として親交を深められたWilliam Price氏 (Western Sydney Univ.) が述べておられます<sup>[3]</sup>。更に、学生時代に荒田さんの薫陶を受けられた三森文行氏 (国立環境研)、荻野孝史氏 (獨協医科大学) による弔文が日本磁気共鳴医学会誌に掲載されており<sup>[4, 5]</sup>、本誌には加藤晃一氏、阿久津秀雄氏も弔文を寄せられておられます。そこで、多少私事にわたる内容となることをお許し頂き、本稿では半世紀に及ぶ荒田さんとの交流の端緒となった、出会いの頃について幾つかのエピソードを交えて振り返らせて頂くことにしました。

今を去ること50余年、1964年11月に東京大学理学部で開催された「第四回核磁気共鳴討論会」に出席したことが荒田さんとの邂逅の場となりました。この会議で、「アミノ酸—常磁性イオン水溶液のNMR」と題する荒田さんの講演を聞く機会を得ました。私は、東京都立大学理学部を卒業後、直ぐに味の素(株)中央研究所に就職しNMR

装置 (Varian A60) を担当することになり、NMRの勉強を始めたばかりでした。その私が、内容を十分理解できたとは思えませんが興味深く講演を拝聴させて頂きました。翌1965年9月に藤原鎮男先生が主催された国際学会“International Symposium on NMR”に出席し、荒田さんの分子内回転運動に関してNMRから得られる熱力学parameterに関する堂々たる講演を含め、最先端の研究成果を聞くことができNMRへの関心がおおいに高まりました。とりわけ、荒田さんが後年留学することになるOleg Jardetzky教授 (当時、Harvard Medical School) の選択的重水素化によるタンパク質NMR研究戦略に関する講演は、私のその後の研究に決定的な影響を与えることになりました。因みに、本会議はその後ISMARとして連綿と開催されることになりましたが、その先駆けとなる国際会議を、戦後復興の半ばにあった日本において、欧米から往時のNMR界の泰斗を集めて開催に漕ぎつけたことは、昨年98歳の天寿を全うして亡くなられた藤原先生をはじめとする我々の先達の稀なる識見と努力の賜物であることは本学会員にとって忘れてはならないでしょう<sup>[6]</sup>。来る2021年に、ISMARが半世紀の時を経て再び日本の地で開催されることには、感慨の念を禁じ得ません。

本国際会議を挟んで、1966年9月に宮城県民会館で開催されることになった第五回NMR討論会は忘れることができません。この討論会における私の不躰な振る舞いから、思いもかけず荒田さんをはじめ、幾人かの参加者の知遇を得ることになったからです。その事情を簡潔に述べることにします。当時利用されていた赤外線吸収スペクトル解析に比べて、<sup>1</sup>H-NMRのvicinal spin coupling定数を利用する有機化合物の立体配座解析は遥かに優れており、多くの研究結果が報告されておりました。しかしながら、この手法には当時は未解決の大きな問題がありました。それは、不斉炭



素に隣接したメチレンプロトン (diastereotopic protons) の立体特異的帰属法が確立していなかったことです。例えば、 $\alpha$ -アミノ酸の配座解析には、先ず置換基の相対的な“大きさ”を考慮して優位配座を仮定し、その仮定に基づいてメチレンの立体帰属を行うことが一般的でした。このことから、不確実なメチレンシグナルの立体帰属に基づく立体配座解析には曖昧さが避けられなかったのです。詳しい内容は省きますが、ある重鎮の研究室からの発表も典型的な一例でしたが、偶然私自身が全く同じ化合物の立体配座を研究していたことが問題の発端となりました。私は立体選択的重水素化により当該化合物のメチレンシグナルの立体帰属を確定していたために、報告された優位配座の仮定に基づく配座解析は誤りであることに直ちに気がつきました。そこで、矢も楯もたまたま立体帰属の根拠に関して演者に詰問してしまいました。明らかに誤りである証拠を持っていながら、そのような質問を直接演者にするのは礼を失していると今では考えますが、当時は若気の至りで思わず手を挙げてしまったのです。予想もしなかったことは、演者からではなく会場におられた重鎮が、怒りの形相で“優位配座の推定根拠は構造化学の常識に基づいている”と断定されたのです。そこで矛を取めれば良かったのですが、私は立体選択的重水素化によるメチレンプロトンの立体選択的帰属の結果は、発表とは異なると追い打ちをかけてしまったので、会場は大変気まずい雰囲気になってしまいました。ここに至って、私も拙いと思いましたが、時既に遅しでした。この大失敗に関して、懇親会の席上中西香爾先生 (東北大学) や通和夫氏 (塩野義製薬研) 等から個人的に温かい励ましの言葉を頂き、その後長い間親しくさせて頂く切っ掛けとなりました。荒田さんは、“事件”に関して折に触れ、尾鰭をつけて面白おかしく話をされては、私を当惑させて楽しんでおられました。

さて、当時私が使用していた 100 MHz 装置 (Varian HA-100) を FT-NMR (Varian XL-100) に更新する予算がついたために、1972年の4月末に米国 Palo Alto に出張したことが荒田さんと、より親しく交流する機会となりました。XL-100 は Gyrocode Decoupler と称する簡易型の周波数合成器を備えた、斬新な FT-NMR 装置であったために購入前に装置性能等を調査せよとの社命があったのです。これが私にとっては生まれて初

めての海外出張でした。San Francisco 空港から一人で Varian 社があった Palo Alto に辿り着き、Motel Flamingo にチェックインした途端にすっかり心細くなったのです。そこで、やむなく荒田さんに連絡しようと考えました。Palo Alto にある Stanford の Jardetzky 研究室に留学中であることを知っていたからです。電話帳で調べたところ、意外なことに“Arata”という苗字で掲載されている人物は複数おりましたが、手始めに電話をした“Y. Arata”氏は正解で奥様が出られたことで胸をなでおろしました。荒田さんは留守をされておられましたが、暫く後に大きな車で颯爽と現れた荒田さんは、すっかり現地に溶け込んでおられ少々驚かされたことを覚えております。NMR 討論会で何度か会話をしただけの私を、長年の知己のようにご自宅に招いて頂き、お陰で窮地を脱することができました。Jardetzky 研究室の大型の重水培養器等を見学し、ご家族と一緒に当時は未だ日本にはなかった大型スーパーに案内して頂いたりして米国生活の一端を垣間見ました。Varian 社での情報収集も無事終えることができ、引き続き荒田さんの車に同乗して Asilomar に行き、13th ENC (Experimental NMR Conference) に出席しました。この会議では、荒田さんが事務局と交渉してくれたために、同室に宿泊し、途中で購入した美味しいオレンジを食べながら親交を深めることができました。間違いなく、このことが米国出張の最大の成果となったのです。

荒田さんが留学を終え帰国されると、入れ替わるように私が渡米することになりました。留学前の慌ただしく、また不安な時期に、多量の英会話テープ (何度聞いても全く聞き取れず断念) やカリフォルニアの運転免許の筆記試験問題のコピー (渡米前に日本での免許獲得を目論み、川崎自動車教習所に通うも指導員と大喧嘩し断念) 等を頂き、親身にお世話頂きました。お陰様で、東大薬学部におられる頃から共同研究を続けていた京極好正先生 (阪大蛋白研) のお世話で留学することになった Caltech (California Institute of Technology) の Sunney Chan 教授の元で 1973-75 年迄の二年間の博士研究員生活を恙なく過ごすことができました。その間、沢山の方々が Los Angeles 郊外の Pasadena にあった我が家に立ち寄ってくれましたが、1975年の 16th ENC (Asilomar) に参加するために訪れた荒田さんと森島績氏 (京大工学部) の訪問の記憶は特に

鮮明です。そのわけは、森島さんの来訪予定日にChanさんから電話があり、Paul Lauterbur (後年、MRIの原理の発明でNobel賞を受賞) 教授を連れて来るようになったためです。森島さんから、Los Angeles空港に着いたとの連絡があった時に、その話をすると、レンタカーを飛ばしてくるので是非引き留めて置いてくれと頼まれたのです。空港からPasadena迄は距離こそ余りありませんが、米国で最初に整備されたPasadena Freewayは路幅の狭い曲がりくねった高速道ですので、夜間の運転は危険です。私の心配をよそに、我が家に無事に到着した森島さんを交えて大いに盛り上がりました。森島さんは翌日にはCaltechで長時間のセミナーを終え、合流した荒田さんも一緒にSan Diego郊外の砂漠地帯にあるAnza-Borrego State Parkに出かけたことも忘れられません。実は、前夜の森島さんの深夜迄の情熱的なdiscussionのためにすっかり睡眠不足となり、帰路に私が居眠り運転状態をして危うく谷底に転落するところでした。私の家族を含め、全員の命を危険にさらすことになり、今も申し訳ないと思っております。

75年秋に二年間の留学生生活を終え、味の素中央研究所に復職しましたが、カルチャーショックには悩まされました。荒田さんから、二年間留学すれば日本に戻り社会復帰するには最低一年間は掛かると覚悟せよとの助言を頂いておりましたが、まさにその通り帰国後には居心地の悪い日々が続くことになりました。この危機をなんとか克服できたのも荒田さんのお陰です。留学先のChan研究室では脂質二重膜で囲まれた小胞体(lipid vesicle)の物性に関するNMR研究をしておりましたが、通常の水溶液とは全く異なる不均一な分散系NMR測定や解析は一筋縄では行かず、手を焼く一方で多大な興味を持ちました。帰国後、留学経験を活かした新しい研究方向を模索するなかで、初めての冬を漫然と迎えることになりました。ある日、自宅裏庭のアオキの赤い実をぼんやり眺めていたら、突然この実丸ごとのNMRスペクトルを測定したら細胞質に溶存している低分子物質のシグナルが観測されるのではないかと妄想が浮かびました。当時は $^{13}\text{C}$ -NMRでは標準的に使われていた12 mm NMR試料管は、丸ごと一粒のアオキ果実を入れるには最適の大きさです。早速 $^{19}\text{F}$ 外部ロックを持つXL-100で測定したところ、アオキの成熟果実に多量に含まれる苦

味配糖体アウクビン(aucubin; 東北大学の天然物有機化学者藤瀬新一郎教授が長年にわたり構造決定に取り組んだ化合物です)と蔗糖に由来する見事な $\{^1\text{H}\}$ - $^{13}\text{C}$  NMRシグナルが観測できました。1976年初頭のことです。この結果に力を得て、様々な食品・化成品、微生物発酵液、生きたままの蚕、鳥卵の孵化過程等、まさに手あたり次第に $^{13}\text{C}$ -や $^{31}\text{P}$ -NMRを測定し、その結果を毎週のように御茶ノ水の山の上ホテルのロビーで荒田さんに報告しては感想を伺いました。その際、荒田さんからは只の一度も“もう少しまともな研究をしたらどうか”等といった否定的なコメントは一切無く、“ドンドン徹底的にやれ”とけしかけられるばかりでした。おまけに、藤原鎮男先生迄も私の測定結果を荒田さんから聞くと、“これは不均一な系の状態を各成分に分離せずに調べる新しい化学の流れ—Gross chemistry—のNMR版だ”と、一緒になって太鼓を叩いてくれました。藤原先生は、このような正統的とは云えない研究は評価されない謹厳実直な先生と思っておりましたので、私にとっては予想外のコメントでした。この“ハチャメチャな研究”の噂は、幾つかの論文をTetrahedron誌等に速報として発表したために国外にまで広がり、当時Columbia大学に移っておられた中西香爾先生も、本当かどうかは定かではありませんが、“貴君の研究はNew Yorkでは大変な話題になっている”とますます勇気づけてくれました。実際に、中西先生は78年7月にZürichで開催された4th IUPAC Congress of Pesticide Chemistryに私を招待して頂き、発表の機会を与えて頂きました。私にとって、36歳にして初めての大きな国際会議での講演となりました。その後、同年9月には藤原先生が組織委員長、荒田さんが実行委員長を務められた8th ICMRBSでの講演、更には様々なセミナーや学会への招待講演が続き忙しく過ごしている内に、カルチャーショックもいつの間にか消え去っておりました。

闇雲にNMR測定を試みることもそろそろ限界を感じ始めた頃、見計らったかのように荒田さんは東大薬学部でタンパク質の結晶構造解析を研究されておられた三井幸雄氏を紹介してくれました。当時、京都大学農学部の廣海啓太郎先生を中心として、欧米に比べ著しく立ち遅れていた、我が国のタンパク質科学の興隆をはかるために、放線菌由来のセリンプロテアーゼ阻害タンパク質SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) を共通ター

ゲットとして選定し、様々な専門的観点から多角的に研究するというユニークなプロジェクトが立ち上がっておりました。三井さんは、その中心メンバーとして活躍されておられましたが、たまたま私の高校の先輩であることもわかり、“SSI研究班”と称されたこのプロジェクトへのお誘いを頂きました。このことが、長期的な展望を見失いかけていた私が安定同位体利用NMR研究へと立ち戻る決定的な転機となりました。1978年末に京都で開催されたSSI班会議において、主鎖カルボニル炭素 $^{13}\text{C}$ -NMRシグナルの帰属手法 (“ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -二重標識法”), 更には $[1-^{13}\text{C}]$ -Metと $[^{15}\text{N}]$ -Valにより特定のペプチド結合を選択的に二重標識したSSIを利用する、SSI-subtilisin複合体中の切断結合 (Met $^{73}$ -Val $^{74}$ ) の電子状態に関するNMR研究手法に関する提案を致しました。班員の皆さんは、私の提案の独創性は理解して頂けたものの、その実現性に関しては大いに疑いをもっておられたとのことです。しかしながら、翌79年6月に東京大学理学部の向山光昭教授の研究室で修士課程を終えたばかりの優秀な新入研究員辻尚志氏が加わったことで、僅か一年足らずの間に、等価なダイマーとして分子量23kDaのSSIの主鎖カルボニル炭素 $^{13}\text{C}$ -NMRシグナルの帰属手法の開発、更には分子量78kDaの(2:2)SSI-subtilisin複合体中のMet $^{73}$ の $^{13}\text{C}$ -NMRシグナルの測定に成功しました。この結果、複合体における切断結合 (scissile bond) に関する詳細な構造情報を入手することができ、従来のX線解析結果で提案されていた切断結合の歪に関する明確な結論を得ることができました。この成果をもって、1980年9月に地中海の小島Bendor (France) で開催された9th ICMRBSに参加し、SSIに関する研究成果をposter発表しました。ところが、会場で思いがけず口頭での追加発表を依頼され、満足な資料もなく口頭発表をしなくてはならず、困り切ったことを覚えております。帰国直後の1980年10月1日に、合計16年余り在籍した味の素(株)中央研究所の主任研究員を

辞し、東京都立大学助教授として赴任することになりました。その後、当時は若手のタンパク質科学研究者の登竜門でもあった第31回タンパク質構造討論会 (1980. 10. 16) で、SSIのNMR研究に関する報告を行うことができ、構造生物学のNMR研究者としてのスタートを切ることができました。思い返してみれば、これまで紆余曲折を経つつも半世紀余り研究生生活を続けてこられたのは、大きな転機に差し掛かった折には必ず荒田さんが手を差し伸べてくれたこと、また荒田さんと共に築き上げてきた国内外の研究者との交流の賜物であることは間違いありません。

1980年9月、BendorでのICMRBSを終え、荒田さんと一緒にMarceill駅に移動しました。私はCaltech時代の友人をGrenobleに訪ね、荒田さんは別途Parisに向かう予定でした。一人駅のホームに荒田さんは降りて周囲の風景を写真に撮っていたところ、何の前触れもなく電車が動き出したのです。荒田さんの荷物は車内にありますので、車窓越しに困惑した顔を見合わせるしかなかったことを、今となっては懐かしく思い出します。電車はホームを変更するために動いただけで別のホームに戻り幸い事なきを得ましたが、邯鄲の夢の如く一瞬の内に過ぎた研究人生ですが、その源流を求めれば荒田さんとの出会いの頃に遡ることがおわかり頂けることでしょう。掛け替えのない友、畏友荒田さんが突然亡くなられたことは、日本のNMR研究にとっても大きな喪失であり、ただ呆然と立ち尽くすばかりです。

#### 文献

- [1] Masatsune Kainosho, <https://www.weizmann.ac.il/ISMAR/yoji-arata-1934-2019-1>
- [2] 嶋田一夫, *ファルマシア*, **55** (10), 960-961 (2019).
- [3] William Price, *ANZMAGazine*, **7**, 12 (2019).
- [4] 三森文行, *日磁医誌*, **39** (3), 69-70 (2019).
- [5] 荻野孝史, *日磁医誌*, **39** (3), 70-71 (2019).
- [6] 日本核磁気共鳴学会, *Bull. NMR Soc. Japan*, **9**, 6-7 (2018).

## 故荒田洋治先生を偲ぶ

大阪大学名誉教授、横浜市立大学客員教授

阿久津 秀雄

akutsu@yokohama-cu.ac.jp

私にとって荒田洋治先生は故藤原鎮男先生との関係を抜きにして考えられません。藤原先生はわが国において最初の核磁気共鳴装置を作製し、NMR討論会の立ち上げとその後の発展に寄与されました。荒田先生は藤原先生の下で仕事を始められ、その後を受けてわが国のNMR分野の国際的な発展に尽くされました。その生涯にはわが国におけるNMR研究を立ち上げた研究室の使命感が流れているように感じられました。

私は大阪大学蛋白質研究所京極研究室に採用された1972年からNMR討論会に参加するようになった改宗組で、藤原先生は雲の上の人でした。荒田先生はJardetzky研究室から戻って、そこでの経験を生き生きと語っていたのが印象に残っています。彼等の研究環境の違いに危機感を抱いているようでした。重水をドラム缶で買って湯水のように使っているという話は有名です。荒田先生の話は私たちにいろいろな形で影響を与えました。例えば、タンパク質のアミドプロトンを観測する際に軽水信号の影響を除く際には、全信号を同時に取り扱うpulse-Fourier Transform (pFT) 法よりも軽水信号を除いてスキャンする

Correlation Spectroscopyの方が効率がよいというJ. Dadokらの考えを発展させたシステムを荒田先生が発表しました。これを聞いて私達も京極研のPS-100 (JEOL) NMR装置に自作の相関システムを構築して試してみたものです。

私は生体膜系に興味を持っていましたので、荒田先生が大きな系のNMRへの挑戦として免疫グロブリンIgGの解析に取り組み始めたことに共感を覚えていました。その頃、私はスイスバーゼル大学J. Seelig教授の下で選択的に重水素化された脂質二重膜と金属イオンの相互作用について固体NMRによる研究を行いました。この方法を自分の研究に取り入れるために、帰国してFX-100 (JEOL) を固体NMR用に改造して、主に $^{31}\text{P}$ を使ってウイルスや細胞等の大きな系の解析に取り組みました。1984年のインドGoaで開催された第11回ICMRBS (生体系磁気共鳴国際会議) ではインタクトな $\lambda$ ファージの中でのDNAダイナミックスについて報告しました。これは私の視点からのArataismへのアプローチでした。この学会では、たまたま荒田、甲斐荘両先生が泊まっていた部屋の向かいが私の部屋であったため、3人



写真 インド、ゴアの街角で (1984年)

でいろいろ話をする機会に恵まれました。また、ゴアの海岸や街なかにも繰り出してインドの奥深い哲学的雰囲気に触れることができました。写真はそのような折りに甲斐荘先生に撮ってもらった巡礼風景です。写真からも想像できますが荒田先生は大変思慮深く、インドでマラリヤ等のさまざまな病魔から身を守る術をよく研究し、身につけていました。何の備えもない私は半日寝込む羽目になりましたが、荒田、甲斐荘両先生は帰国までピンピンとしておりました。

その後、荒田先生は東大薬学部に移り、本格的にIgG研究を展開され、次々と成果を花開かせました。IgGに取り組んでいる自分の姿を荒田先生はよくドンキホーテに喩えておりましたが、私には刻苦勉励して己が求めるNMRの理想を極めんとする求道者のように見えました。瘦躯と謹厳な相貌がその思いを強くさせたのかもしれませんが、しかし、謹厳な荒田先生の巧まざるサプライズに出会うこともあります。荒田先生は蛋白研のNMR装置を時々使いに来ておりました。ある

時、リケジョとは思えない華やかな女子学生と二人で現れ、蛋白研中の噂になりました。勿論、お弟子さんを教育するために伴われたわけで、何の問題もありませんが、荒田先生に持っていた先入観とのコントラストがなんともメルヘンチックでした。学生の指導ではいつもの謹厳な先生でしたが、うちうちに集まった時に冷やかすと笑みがこぼれてきました。

荒田先生は東大薬学部教授の頃から若手のための国際ワークショップに取り組み、世界の第一線で活躍していた研究者を次々と招聘して日本の若手研究者が顔見知りになり、国際感覚をつける機会をつくりました。また、難産であった、NMR討論会の発展としての日本核磁気共鳴学会の創立に尽力し、その初代会長としてわが国のNMRコミュニティの発展に貢献しました。

藤原鎮男先生が中心となって立ち上げた日本のNMR分光学とそのコミュニティの発展に対する使命感を荒田洋治先生は最後まで持ち続け、全うされたと思います。

## 我が恩師 荒田洋治先生を偲ぶ

自然科学研究機構 生命創成探究センター  
名古屋市立大学 大学院薬学研究科

加藤 晃一

kkatonmr@ims.ac.jp

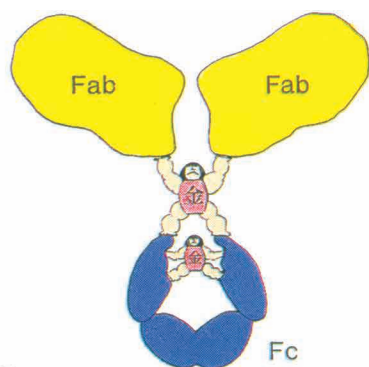
3月5日の穏やかな朝に、荒田洋治先生のご逝去の報に接したことは私にとってまさに晴天の霹靂でした。現会長のつとめとして、初代会長の訃報をとにかく配信はしたものの、私自身は学会の活動とは別次元の、極めて個人的な喪失感を禁じ得ない想いでおりました。そしてその想いは時間が経過しても薄らぐ兆しは見えません。追悼文を寄せるこの機会に、私の恩師である荒田洋治先生との思い出を振り返らせていただきたいと思います。

荒田先生との出会いは昭和61年(1986年)の春でした。当時、東京大学薬学部の修士課程の学生として私が所属していた薬品物理化学教室に、坪井正道教授の後任として荒田洋治先生が理学部生物化学科から着任されました。当時の研究室は、主に振動分光学を専門としていた旧坪井研のスタッフと学生、そこに配属してきた薬学部学生と日本女子大学からの受託学生、そして荒田先生とともに理学部から加わった大学院生といった極めてヘテロな集団から構成されていました。ちなみに、荒田先生は当時、「サイエンスの本質はヘテロジニアス」としばしば口にされていました。異分野融合が推進される現在の潮流の中で、私は荒田先生のこの言葉のある種の感慨を持って噛みし

めています。

博士課程進学を機に、私は荒田先生のもとでNMRによる抗体分子の構造研究に取り組みさせていただくことになりました。抗体は分子量15万を越える巨大な糖タンパク質で、当時のNMRのアプローチ法でこれを研究対象とすることは、荒唐無稽とも思える試みでした。しかも、荒田先生が当初対象としていた抗体試料は骨髄腫患者の検体から単離されたものでした。したがって、安定同位体標識技術はおろか、アミノ酸配列の情報すら手にすることなく、1次元 $^1\text{H}$  NMRによる地道な研究が丹念に進められていました。幸い、私が博士課程の研究テーマを決めるときには、アミノ酸配列がわかっている一連のモノクローナル抗体を研究室で扱うことができる状況になっており、都立大学(当時)の甲斐荘先生のお力添えもあって、ほどなくアミノ酸選択的な安定同位体標識もできるようになりました。

当時、荒田先生の教授室には、大小の2人の金太郎が抗体の四次構造を支えている様子を描いた手作りのcartoon(図1: IgGの像)が飾られていました。おそらくそれが荒田先生の抗体構造の直感的描像であり、私たちはこの判じ絵にこめられた作業仮説の検証に向けて標識試料の調製とNMR計測に明け暮れる日々を送っていました。荒田先生は、抗体のような大きな系を扱うためには愚直一徹、ドン・キホーテの精神で行こうと私たち学生をエンカレッジされていました。私たちが取り組んでいた研究の主な部分は、1次元 $^{13}\text{C}$  NMRの1つのピークの帰属のために1種類の標識抗体を調製して計測するという、今にして思えばかなり気の長いアプローチ法ですが、個々のピークの帰属の成否を荒田先生とともに一喜一憂しながら実験していたことは良き思い出です。そして、東京都臨床医学総合研究所より嶋田一夫先生を研究室に迎えられ、さらに西村千秋学兄もスタッフに加わり、荒田研の研究は急速に充実発展



IgGの像

[原作：東伸昭，着色：荒田美香子]

図1 東大ご在職時に教授室に飾られていた抗体の概念図



写真1 東大薬学部の退官記念誌  
(平成6年)より

していきました。

一方その頃、海外では多次元NMRを主体としたタンパク質の溶液内3次元構造の決定手法が確立され、生体分子のNMR研究の大きな流れが形成されつつありました。荒田先生はこうしたトレンドにはあえて背を向けられ、研究において独自のスタイルを貫くことに徹底的にこだわっておられました。当時、荒田先生は薬学部の物理化学の講義の中で、谷崎潤一郎の「陰翳礼讃」や世阿弥の「風姿花伝」の一節を紹介されて、科学のありようと研究者の精神について学部学生に真摯に問いかけられていました。

その一方で、荒田先生は海外の第一線の研究者を頻繁に招かれ、我が国のNMR研究者、特に若手研究者との交流の場を設けることに並々ならぬ情熱を注がれました。また、意気投合した数多くの共同研究者との交流を通じて、結晶構造解析、分子モデリング、溶液散乱、質量分析、糖鎖プロファイリングなど、NMR以外の手法も積極的に

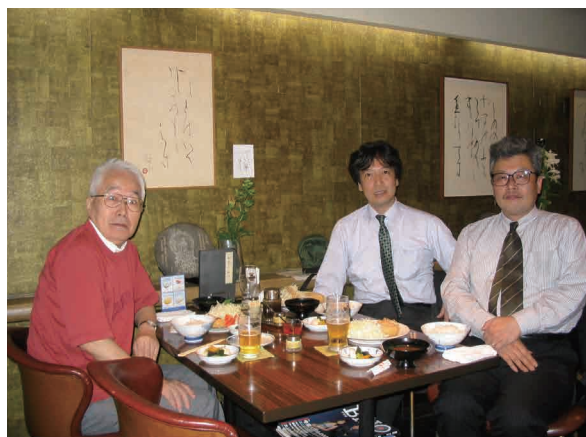


写真2 ご退職後の悠々自適のひとつき(2005年夏  
御徒町のぼん多にて)

取り入れて抗体の構造研究を展開されてきました。荒田先生は、抗体のNMR研究に着手されてまだ間もない時期に、国内外の著名な免疫学者と人的ネットワークを構築されていました。こうしたことは今にして思えば驚くばかりですが、おそらく「愚直一徹」を実践された荒田先生のお人柄が多くの人達を惹きつけ、このような交流を可能にしたのだと思います。研究者としての意気地と豊かな好奇心とが渾然一体となった妙境を荒田先生は楽しんでおられたことでしょう。

荒田先生のもとで培われた抗体のNMR研究は、嶋田先生のグループで活発に展開されている膜タンパク質の構造ダイナミクス研究へと発展するとともに、私たちが取り組んでいる糖鎖の生命分子構造学研究へと受け継がれています。そして何より、私たちは荒田先生のもとでNMRの技術論を越えた研究の精神を深く学ばせていただきました。この想いを次世代へとつなぐことをお約束しつつ、改めて哀悼の誠を捧げます。

# 20 kHz級 MAS 条件の $D$ -HMQC & $D$ -RINEPT

産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター

永島 裕樹

nagashima-hiroki@aist.go.jp

## 1. はじめに

Heteronuclear dipolar ( $D_{IS}$ ) recoupling によって達成する Dipolar-mediated Heteronuclear Multiple Quantum Correlation ( $D$ -HMQC) と Dipolar-mediated Refocused Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer ( $D$ -RINEPT) は、近年、四極子核を含む相関実験において、実験条件設定の簡便さと種々のロバスト性<sup>[1]</sup> から CPMAS の代わりに使用され、様々な材料への適用が進んでおり、2次元相関実験のみならず、核間距離測定やフィルター法としての利用も大変有効である。特に高速 MAS ( $\geq 40$  kHz) を組み合わせることで、 $^1\text{H}$  と四極子核の相関実験を効率よく達成でき、これまで得られなかった構造情報の取得に成功している。一方で、 $^1\text{H}$  を含まない相関実験の場合には低～中速 MAS 条件 ( $\leq 20$  kHz) で達成可能であり、試料量も稼げることから 3.2 mm あるいは 4 mm の試料管を用いて実施されている。本記事では、20 kHz 以下の MAS 条件での  $D$ -HMQC と  $D$ -RINEPT を利用した 1/2 核と半整数四極子核の相関実験を解説する。また、必然的に  $D_{IS}$  recoupling の知識が必要になるため、最初に簡潔に解説する。具体的な事例は著者のリール大学での博士課程中の研究結果を主に取り上げるが、関連したトピックにも触れていきたい。

## 2. Heteronuclear dipolar ( $D_{IS}$ ) recoupling

はじめに  $D$ -HMQC あるいは  $D$ -RINEPT で使用される  $D_{IS}$  recoupling について説明する。これまで多くの Recoupling sequence が提案されているが、目的に適したものを選ぶことが実験達成の鍵になる。全ての  $D_{IS}$  recoupling を詳細に説明することは厳しいので、ここでは MH. Levitt et al. が発展させた Symmetry 理論 ( $CN_n^V$ ,  $RN_n^V$ )<sup>[2]</sup> を導入して、いくつかを説明する。Symmetry 理論は規約テンソルの回転の定義に基づいて、MAS などによる空間回転によって生じる  $2l+1$  個の Space components  $m = -l, -l+1, \dots, +l$  と RF 磁場によるスピン回転によって生じる  $2\lambda+1$  個の Spin components  $\mu = -\lambda, -\lambda+1, \dots, +\lambda$  を使って Recoupling あるいは Decoupling を説明する。

まず、MAS 条件の相互作用表示中の各スピン相互作用の  $l, m, \lambda, \mu$  の値を Table.1 に示す。

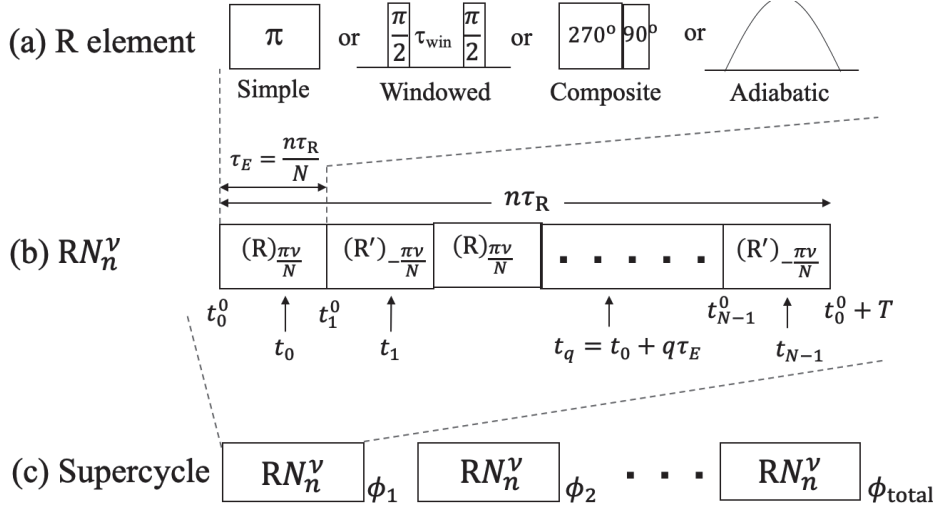
### $RN_n^V$ sequence

今回は  $D_{IS}$  recoupling によく使用される  $RN_n^V$  (Fig.1b) に着目する。一般的に  $RN_n^V$  は  $CN_n^V$  よりも、望みのスピン相互作用を recouple し、欲しくないスピン相互作用を効率よく decouple する傾向にある。

**Table.1** Components of spin interactions in the interaction frame under MAS. The spatial components with  $m = 0$  disappear for exact magic angle spinning in the case of  $l = 2$

Interaction	Space rank $l$	Space component $m$	Spin rank $\lambda$	Spin component $\mu$
$\delta_{iso}$	0	0	1	-1, 0, 1
CSA	2	-2, -1, 1, 2	1	-1, 0, 1
$D_{  }$	2	-2, -1, 1, 2	2	-2, -1, 0, 1, 2
$D_{IS}$	2	-2, -1, 1, 2	1	-1, 0, 1
$J_{  }$	0	0	0	0
$J_{IS}$	0	0	1	-1, 0, 1





**Fig.1** General hierarchy of R sequence. (a) R element (e.g. simple  $\pi$  pulse, Windowed  $\pi$  pulse, Composite  $\pi$  pulse, Adiabatic inversion pulse). (b)  $RN_n^\nu$  sequence which is composed of  $N/2$  phase alternating  $R_\phi R'_\phi$  pairs. A selection of time points is indicated as  $t_q$  ( $q = 0, \dots, N-1$ ). The whole sequence spans exactly  $n$  rotational periods. (c) Supercycle.  $120^\circ$  phase shift supercycle ( $[RN_n^\nu]_0 [RN_n^\nu]_{120} [RN_n^\nu]_{240}$ ) and phase inversion supercycle ( $RN_n^\nu R'_n^\nu$ ) are commonly utilized for  $D_{IS}$  recoupling sequence.

$RN_n^\nu$  は次のように構築する。

- (i)  $R_\phi$  element の選択 ( $x$  軸周りに  $180$  度回転させるものを選ぶ必要がある)
- (ii) 位相  $\phi = \pi\nu/N$  の符号を逆転させた  $R'_\phi$  の作成
- (iii)  $RN_n^\nu = \{R_\phi R'_\phi\}_{N/2}$  を構築する ( $R_\phi R'_\phi$  のペアを  $N/2$  回繰り返す)

ここで重要な 3 つの symmetry number ( $N, \nu, n$ ) が登場した。  $N$  は  $RN_n^\nu$  の R element の個数、  $\nu$  は RF 位相 ( $\phi = \pi\nu/N$ ) と結びつき、  $n$  は  $RN_n^\nu$  全体の長さ ( $n\tau_R$ ) に関係し、これから RF 磁場強度は  $\omega_1 = N\omega_R/2n$  (単純な  $\pi$  pulse の場合) で与えられる。  $\omega_1$  は R element の選択でも変わり、もし R element に  $270^\circ$ - $90^\circ$  composite  $\pi$  pulse を選択した場合には  $\omega_1 = N\omega_R/n$  となる。 実際の実験では  $RN_n^\nu$  を  $1/2$  核のみに照射する場合、  $1/2$  核に対して  $\omega_1$  を決定すれば良いので、四極子核を含む CPMAS に比べて実験条件の設定が単純である。ここで、  $RN_n^\nu$  の recoupling あるいは decoupling がどのように生じるのか確認する。

$RN_n^\nu$  の Interaction frame Hamiltonian (詳しい導出は Ref[3] を参照) は

$$\tilde{H}_{lm\lambda\mu}(t_q) = \tilde{H}_{lm\lambda\mu}(t_0) \exp\left\{i \frac{2\pi q}{N} \left(mn - \mu\nu - \frac{\lambda N}{2}\right)\right\}$$

ここで  $q$  は Fig.1b に示すように  $t_q = t_0 + q\tau_E$  として  $q = 0, \dots, N-1$  である。続いて、1st order average Hamiltonian ( $\overline{\tilde{H}_{lm\lambda\mu}}^{(1)} = T^{-1} \int_{t_0}^{t_0+T} \tilde{H}_{lm\lambda\mu}(t) dt$ ) をとると、次の選択則が導かれる。

$$\overline{\tilde{H}_{lm\lambda\mu}}^{(1)} = 0 \quad \text{if } mn - \mu\nu \neq \frac{N}{2} \cdot Z_\lambda$$

ここで、  $\lambda$  が偶数の場合  $Z_\lambda = 0, \pm 2, \pm 4, \dots$ 、奇数の場合  $Z_\lambda = \pm 1, \pm 3, \pm 5, \dots$  となる。実際、後述する  $R18_2^5 = \{180_{50} 180_{-50}\}_9$  の  $D_{IS}$  coupling と CSA に関して、  $\{l, m, \lambda, \mu\} = \{2, \pm 2, 1, \mp 1\}$  の値から  $\overline{\tilde{H}_{lm\lambda\mu}}^{(1)} \neq 0$  ( $mn - \mu\nu = \pm 9 = \frac{N}{2} \cdot Z_\lambda$ ) となる。対照的に、Homocoupling ( $D_{II}$ ) coupling に関しては  $\{l, m, \lambda, \mu\} = \{2, m, 1, \mu\}$  において、  $\overline{\tilde{H}_{lm\lambda\mu}}^{(1)} = 0$  ( $mn - \mu\nu \neq \cdot Z_\lambda$ ) となる。従って、  $R18_2^5$  の照射は  $D_{IS}$ 、CSA recoupling と同時に  $D_{II}$  decoupling が達成されることを意味する。

一方、  $R16_3^5$  の場合、  $D_{IS}$  coupling と CSA に関しては  $\{l, m, \lambda, \mu\} = \{2, \pm 1, 1, \mp 1\}$  から  $\overline{\tilde{H}_{lm\lambda\mu}}^{(1)} \neq 0$  ( $mn - \mu\nu = \pm 8 = \frac{N}{2} \cdot Z_\lambda$ ) となるが、  $D_{II}$  coupling に関しても  $\{l, m, \lambda, \mu\} = \{2, \pm 2, 2, \mp 2\}$  から  $\overline{\tilde{H}_{lm\lambda\mu}}^{(1)} \neq 0$  ( $mn - \mu\nu = \pm 16 = \frac{N}{2} \cdot Z_\lambda$ ) となり、  $D_{IS}$ 、  $D_{II}$ 、 CSA recoupling が生じる。すなわち  $R16_3^5$  は  $D_{II}$  decoupling が伴わないため、  $D_{II}$  coupling が大きい場合には使用しないほうが良い。上記の議論は各スピン相互作用に対して Space-Spin Selection (SSS) diagram で図にまとめるとわかりやすい<sup>[2]</sup>。同様に 2nd

order average Hamiltonian  $\overline{H}_{lm\lambda\mu}^{(2)}$  についても選択則が導かれ、 $RN_n^V$  の性能に影響を与えるが、ここでは取り扱わない。次に  $D_{IS}$  recoupling の各性質について述べる。

### Recoupled $D_{IS}$ Hamiltonian $\overline{H}_{D,IS}^{(1)}$

1 チャンネルの  $RN_n^V$  照射の場合、Longitudinal two spin order あるいは Single quantum の  $\overline{H}_{D,IS}^{(1)}$  を作る。実際に  $R4_1^2$  と  $R18_2^5$  の  $\overline{H}_{D,IS}^{(1)}$  はそれぞれ

$$R4_1^2: \overline{H}_{D,IS}^{(1)} = \omega_{D,IS}^{|m|=2} 2\hat{I}_z \hat{S}_z \text{ (Longitudinal two spin order)}$$

$$R18_2^5: \overline{H}_{D,IS}^{(1)} = \omega_{D,IS}^{|m|=2} [\cos(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_x \hat{S}_z - \sin(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_y \hat{S}_z] \text{ (Single quantum)}$$

である。ここで、 $\Omega_{PR}^{D,IS} = \{\alpha_{PR}^{D,IS}, \beta_{PR}^{D,IS}, \gamma_{PR}^{D,IS}\}$  は Principle axis system(PAS)と Rotor fixed frame 間の Euler angle を表す。 $\omega_{D,IS}^{|m|}$  は Effective dipolar coupling といい、 $D_{IS}$  recoupling によって異なり、 $R4_1^2$  では  $\omega_{D,IS}^{|m|=2} = \frac{1}{4} b_{IS} \sin^2(\beta_{PR}^{D,IS}) \cos(2\gamma_{PR}^{D,IS})$ 、 $R18_2^5$  では  $\omega_{D,IS}^{|m|=2} = \kappa \frac{3\sqrt{2}}{4} b_{IS} \sin^2(\beta_{PR}^{D,IS})$  となる。 $\kappa$  は後述する Scaling factor、 $b_{IS} = -\frac{\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar}{4\pi r_{IS}^3}$  は Heteronuclear dipolar coupling constant である。CPMAS のような Zero quantum (flip-flop) あるいは Double quantum (flip-flip or flop-flop) の  $\overline{H}_{D,IS}^{(1)}$  を得るには、 $RN_n^{VS}$  と  $RN_n^{VK}$  を各々のチャンネルに同時に照射する Dual symmetry sequence  $RN_n^{VS,VK}$  にしなければならない<sup>[3]</sup>。例えば、MAS 条件の COMPOZER<sup>[4]</sup> は  $C8_2^{1-5}$  に該当すると考えられる。また、1 チャンネルの  $RN_n^V$  照射の場合、CSA は  $\{l, m, \lambda, \mu\}$  が  $D_{IS}$  coupling と同じなので、CSA と  $D_{IS}$  の Recoupling は同時に生じる。Recoupled CSA Hamiltonian は

$$R4_1^2: \overline{H}_{CSA}^{(1)} = \omega_{CSA}^{|m|=2} \hat{I}_z$$

$$R18_2^5: \overline{H}_{CSA}^{(1)} = \omega_{CSA}^{|m|=2} [\cos(2\gamma_{PR}^{D,IS}) \hat{I}_x + \sin(2\gamma_{PR}^{D,IS}) \hat{I}_y]$$

であるので、Longitudinal two spin order  $\overline{H}_{D,IS}^{(1)}$  では  $\overline{H}_{CSA}^{(1)}$  と可換  $[\overline{H}_{D,IS}^{(1)}, \overline{H}_{CSA}^{(1)}] = 0$ 、Single Quantum  $\overline{H}_{D,IS}^{(1)}$  では  $\overline{H}_{CSA}^{(1)}$  と不可換  $[\overline{H}_{D,IS}^{(1)}, \overline{H}_{CSA}^{(1)}] \neq 0$  になるため、照射核に大きな CSA が存在する場合には Longitudinal two spin order が感度的に有利になる。

### Dipolar truncation

Dipolar truncation とは  $i$  スピンと  $j$  スピンに強い相互作用があり、なおかつ  $i$  スピンと  $k$  スピンに弱い相互作用があるときに、 $[\overline{H}_{D,IS}^{(1)}(ij), \overline{H}_{D,IS}^{(1)}(ik)] \neq 0$  である場合、 $\overline{H}_{D,IS}^{(1)}(ik)$  の効果が抑制される現象である。すなわち、 $i$  スピンと  $k$  スピンの弱い相互作用は消えたように振る舞う。従って、Dipolar truncation は長距離相関の妨げとなるため、特に  $^{13}C$  ラベルを用いての  $D_{II}$  recoupling 実験の場合には大きな問題となる。一方、 $D_{IS}$  recoupling の場合、Dipolar truncation は Longitudinal two spin order の場合には生じなく ( $[\overline{H}_{D,IS}^{(1)}(ij), \overline{H}_{D,IS}^{(1)}(ik)] = 0$ )、Single quantum の場合に生じる ( $[\overline{H}_{D,IS}^{(1)}(ij), \overline{H}_{D,IS}^{(1)}(ik)] \neq 0$ )。そのため、自然存在比が高い核に対して、 $D_{IS}$  recoupling を使い分けることで、長距離相関と近接相関のコントロールが可能になると考える。

### $\gamma$ -encoding

$\overline{H}_{D,IS}^{(1)}$  のノルムが  $\gamma_{PR}^{D,IS}$  に依存しない場合の Recoupling sequence は  $\gamma$ -encoding であるという<sup>[5]</sup>。例えば、Rotary Resonance Recoupling ( $R^3$ ) ( $\nu_1 = q\nu_R, q = 1, 2$ )<sup>[6]</sup> の場合、

$$\left\| \overline{H}_{D,IS}^{(1)} \right\| = \text{Tr} \left[ \overline{H}_{D,IS}^{(1)\dagger} \overline{H}_{D,IS}^{(1)} \right]^{1/2} = |\omega_{D,IS}^{|m|=1}| = \frac{1}{2\sqrt{2}} |\sin(2\beta_{PR}^{D,IS})|$$

となり、 $\gamma$ -encoding である。すなわち、 $\gamma$ -encoding は Effective dipolar coupling  $\omega_{D,IS}^{|m|}$  が  $\gamma_{PR}^{D,IS}$  に依存しない。一方、 $R4_1^2$  では  $\omega_{D,IS}^{|m|=2} = \frac{1}{4} b_{IS} \sin^2(\beta_{PR}^{D,IS}) \cos(2\gamma_{PR}^{D,IS})$  であり、 $\gamma_{PR}^{D,IS}$  に依存するので non- $\gamma$ -encoding

である。R symmetry による簡易的な区別は、 $m$  と  $\mu$  が bijection でない場合 (e.g. R18<sub>2</sub><sup>5</sup>)  $\{l, m, \lambda, \mu\} = \{2, \pm 2, 1, \mp 1\}$  は  $\gamma$ -encoding、 $m$  と  $\mu$  が bijection である場合 (e.g. R4<sub>1</sub><sup>2</sup>)  $\{l, m, \lambda, \mu\} = \{2, \pm 2, 1, 0\}$  は non- $\gamma$ -encoding となる<sup>[2]</sup>。  $\gamma$ -encoding の性質は、(i)  $\gamma$ -encoding は non- $\gamma$ -encoding よりも励起効率が 25%高い、(ii)  $\gamma$ -encoding の Build-up curve は dipolar oscillation が顕著である、(iii)  $\gamma$ -encoding は一般的に MAS の不安定性にロバスト (MAS 軸周りの  $\gamma_{PR}^{D,IS}$  に依存しないため)、である。

### Scaling factor $\kappa$

$\kappa$  は分極移動の速さに関する指標であり、基本的に大きい方が好まれる。RN<sub>n</sub> <sup>$\nu$</sup>  の各スピン相互作用の  $\kappa$  は以下の式から計算できる。

$$\kappa_{lm\lambda\mu} = \frac{1}{\tau_E} d_{m0}^l(\beta_{RL}) \int_0^{\tau_E} d_{\mu 0}^\lambda[-\beta_{RF}(t)] \exp\left\{i\left[\mu\gamma_{RF}(t) - \mu\frac{\pi\nu}{N} + m\omega_R t\right]\right\} dt$$

さらにポイントは reduced Wigner element  $d_{\mu 0}^\lambda[-\beta_{RF}(t)]$  である。ここで  $\beta_{RF}(t)$  は R element 内における RF 磁場による核スピンの回転角度である。R18<sub>2</sub><sup>5</sup> の場合、 $d_{\pm 10}^1[-\beta_{RF}(t)] = \mp(1/\sqrt{2}) \sin \beta_{RF}$  となり、 $\beta_{RF} = \pi/2$  のとき最大となる。従って、これから windowed R element ( $P_{\pi/2} - \tau_w - P_{\pi/2}$ ) のコンセプトが導かれる (Fig.1a)<sup>[7]</sup>。R4<sub>1</sub><sup>2</sup> の  $D_{IS}$  recoupling の場合、 $d_{00}^1[-\beta_{RF}(t)] = \cos \beta_{RF}$  となるため、windowed R element は  $\tau_w/2 - P_\pi - \tau_w/2$  となる。windowed R element は RF 磁場強度を高くしなければならないが、 $\kappa$  を改良するのに有効である。また、Composite  $\pi$  pulse も  $\kappa$  を変える要因になるが、しばしば  $\kappa$  を小さくするので使用する場合は注意したい。

### Supercycle

Supercycle は RN<sub>n</sub> <sup>$\nu$</sup>  の RF 位相などを変えて繰り返し構造を作ること、Recoupling sequence の性能を改良する (Fig.1c)。RN<sub>n</sub> <sup>$\nu$</sup>  の  $D_{IS}$  recoupling にしばしば使用される Supercycle は 120° phase shift supercycle と Phase inversion supercycle の 2 つである。

120° phase shift supercycle は  $[RN_n^\nu]_0 [RN_n^\nu]_{120} [RN_n^\nu]_{240}$  の 3 step phase cycle によって、0 と 3 の倍数の  $\mu$  を持つ  $\overline{H_{lm\lambda\mu}}^{(1)}$  以外を全て抑制する。全てのスピン相互作用は -2 から +2 の間の  $\mu$  を持つので、結果的に  $\mu=0$  の  $\overline{H_{lm\lambda\mu}}^{(1)}$  が残る。すなわち Single quantum  $\overline{H_{D,IS}}^{(1)}$  を持つ R<sup>3</sup>、R18<sub>2</sub><sup>5</sup>、R16<sub>3</sub><sup>5</sup> には適用できない。Longitudinal two spin order  $\overline{H_{D,IS}}^{(1)}$  を持つ R4<sub>1</sub><sup>2</sup> に適用する場合には  $D_{IS}$  recoupling が残り、なおかつ  $D_{II}$  decoupling が達成されるため有効である。

Phase inversion supercycle は RN<sub>n</sub> <sup>$\nu$</sup>  の RF 位相の符号を逆転させた RN<sub>n</sub> <sup>$-\nu$</sup>  をとり、RN<sub>n</sub> <sup>$\nu$</sup>  RN<sub>n</sub> <sup>$-\nu$</sup>  を形成するもので、RF offset や RF 磁場の不均一性などのロバスト性の改良に有効である。一方で、Phase inversion supercycle は  $\gamma$ -encoding である R<sup>3</sup>、R18<sub>2</sub><sup>5</sup>、R16<sub>3</sub><sup>5</sup> などを non- $\gamma$ -encoding に変化させる性質がある。例えば、R<sup>3</sup> ( $q=1$ ) に適用する場合、RF 位相が  $1\tau_R$  ごとに  $\pm x$  と変化する。すると、 $\overline{H_{D,IS}}^{(1)} = \omega_{D,IS}^{|\mu|=1} [\cos(\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_z \hat{S}_z - \sin(\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_y \hat{S}_z]$  の  $\hat{I}_z \hat{S}_z$  項は変化しないが、 $\hat{I}_y \hat{S}_z$  項は符号が  $\pm$  と繰り返し変化する。従って、Phase inversion supercycle 後の  $2\tau_R$  で平均すると、 $\overline{H_{D,IS}}^{(1)} = \omega_{D,IS}^{|\mu|=1} 2\hat{I}_z \hat{S}_z$  with  $\omega_{D,IS}^{|\mu|=1} = \frac{1}{2\sqrt{2}} b_{IS} \sin(2\beta_{PR}^{D,IS}) \cos(\gamma_{PR}^{D,IS})$  となり、non- $\gamma$ -encoding になる。

### R<sup>3</sup>、SR4<sub>1</sub><sup>2</sup>、REDOR、SFAM<sub>N</sub> recoupling

$D$ -HMQC でよく使用される R<sup>3</sup>、SR4<sub>1</sub><sup>2</sup><sup>[8]</sup>、Rotational Echo Double Resonance (REDOR)<sup>[9]</sup> は Symmetry 理論で説明できる。R<sup>3</sup> ( $\nu_1 = q\nu_R, q=1,2$ ) は  $q=1$  に対して R2<sub>1</sub><sup>0</sup>、 $q=2$  に対して R4<sub>1</sub><sup>0</sup> である。SR4<sub>1</sub><sup>2</sup> =  $[R4_1^2 R4_1^{-2}]_0 [R4_1^2 R4_1^{-2}]_{120} [R4_1^2 R4_1^{-2}]_{240}$  は R4<sub>1</sub><sup>2</sup> に 120° phase shift supercycle と Phase inversion supercycle が組み合わされたものである。REDORxy-4 は R4<sub>1</sub><sup>2</sup> に対応し、windowed R element ( $\tau_w/2 - P_\pi - \tau_w/2$ ) を適用したものと理解できる。REDOR は  $\pi$  パルス幅を小さくすると  $D_{II}$  decoupling が働くようになるが、効率は良くないので注意が必要である。REDORxy-8 あるいは xy-16 は Phase inversion supercycle が R4<sub>1</sub><sup>2</sup> に加わったものとして理解できる。

SFAM<sub>N</sub> (Simultaneous Frequency Amplitude Modulation)<sup>[10]</sup> は低～中速 MAS 条件で有効である。SFAM<sub>N</sub>

は R element に Adiabatic inversion pulse を用いており、SFAM<sub>N</sub> の RF 磁場は

$$\omega_{1I}(t) = \omega_{1I}^{max} \sin(N\omega_R t)$$

である。ここで、 $\omega_{1I}^{max}$  は RF peak amplitude である。RF 位相と RF offset はそれぞれ

$$\phi_I(t) = \frac{\Delta\omega_{0I}^{max}}{N\omega_R} \sin(N\omega_R t), \quad \Delta\omega_{0I}(t) = \Delta\omega_{0I}^{max} \cos(N\omega_R t)$$

である。SFAM<sub>N</sub> の理論的な取り扱いには少々特殊なので、詳しくは Ref[10]を参照いただきたい。SFAM<sub>1</sub> はR2<sub>1</sub><sup>y</sup>、SFAM<sub>2</sub> はR4<sub>1</sub><sup>y</sup> の R symmetry に対応している。SFAM<sub>N</sub> を効率よく達成するには高い RF 磁場強度が必要であるが、RF offset や CSA などにロバストであるため有効である。一方、MAS が高速化すると、Adiabatic pulse のパフォーマンスが低下するため、基本的に高速 MAS 条件には向かない。最後にいくつかの D<sub>IS</sub> recoupling の特徴を大まかに Table.2 にまとめた。それでは次項から D<sub>IS</sub> recoupling を使った D-HMQC の説明に入る。

### 3. Basics of D-HMQC & D-RINEPT

#### 3.1. D-HMQC

まずは Z. Gan et al と S. Cavadini et al によって最初に提案された R<sup>3</sup> (q=2) 照射による D-HMQC から始める<sup>[11,12]</sup>。Fig.2a から、D<sub>II</sub> decoupling を伴う R<sup>3</sup> (q=2) が <sup>1</sup>H チャンネルに照射されて D-HMQC が実行される。実験は簡単な密度演算子の展開により理解できる。R<sup>3</sup> (q=2) によって  $\overline{H_{D,IS}}^{(1)} =$

$$\begin{aligned} & \omega_{D,IS}^{|m|=2} [\cos(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_z \hat{S}_z - \sin(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_y \hat{S}_z] \text{ が生じるので、} \\ & \hat{I}_x \xrightarrow{\overline{H_{D,IS}}^{(1)}} \cos(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) \hat{I}_x + \sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) \{ \cos(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_y \hat{S}_z + \sin(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_z \hat{S}_z \} \\ & \xrightarrow{\frac{\pi}{2} \hat{S}_x} \sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) \{ -\cos(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_y \hat{S}_y - \sin(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_z \hat{S}_y \} \\ & \xrightarrow{\frac{\pi}{2} \hat{I}_x} \sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) \{ \cos(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_y \hat{S}_y + \sin(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_z \hat{S}_y \} \\ & \xrightarrow{\frac{\pi}{2} \hat{S}_x} \sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) \{ \cos(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_y \hat{S}_z + \sin(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_z \hat{S}_z \} \\ & \xrightarrow{\overline{H_{D,IS}}^{(1)}} -\sin^2(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) \hat{I}_x \end{aligned}$$

t<sub>1</sub> 展開は省略した。R<sup>3</sup> (q=2) 照射自体は単純であるが、 $\overline{H_{D,IS}}^{(1)}$  が複雑であるため途中で  $[2\hat{I}_y \hat{S}_z, 2\hat{I}_z \hat{S}_z] = i\hat{I}_x$  の計算が多く入り、やや複雑になる。R<sup>3</sup> (q=2) 照射の D-HMQC から最後に得られる NMR 信号は  $\gamma_{PR}^{D,IS}$  に依存しない ( $\omega_{D,IS}^{|m|=2} = \frac{1}{4} b_{IS} \sin^2(\beta_{PR}^{D,IS})$ )。また、ここでの注意点は  $\pi$  パルスの余計な Phase cycle によって  $\hat{I}_z \hat{S}_y$  成分を消さない方が感度を稼げるということである。もし  $\hat{I}_z \hat{S}_y$  成分を消去した場合は最後に得られる NMR 信号は  $\gamma_{PR}^{D,IS}$  に依存するようになる。

他方で、REDOR、SR4<sub>1</sub><sup>2</sup>、SFAM<sub>N</sub> を適用した場合の  $\overline{H_{D,IS}}^{(1)}$  は Longitudinal two spin order であるため、D-HMQC の密度演算子の展開は J-HMQC と同じになる。同様に Fig.2a を使って、SR4<sub>1</sub><sup>2</sup> が <sup>1</sup>H に照射される場合に生じる  $\overline{H_{D,IS}}^{(1)} = 2\omega_{D,IS}^{|m|=2} \hat{I}_z \hat{S}_z$  によって密度演算子を展開すると、

**Table.2** The qualitative property of selected D<sub>IS</sub> recoupling.  
The evaluation for each property is better in the order of ○, △, ×.

	γ-encoding	D <sub>II</sub> decoupling	Robustness to CSA	Robustness to RF offset	Robustness to RF field inhomogeneity	Scaling factor κ	RF field demand
R <sup>3</sup>	○	○(q=2)	△	△	×	high	low
SR4 <sub>1</sub> <sup>2</sup>	×	○	○	○	○	high	low
SFAM <sub>N</sub>	×	○(N=2)	○	○	○	high	high
REDOR	×	△	○	○	○	high	high
R18 <sub>2</sub> <sup>5</sup>	○	○	△	△	△	moderate	moderate
R16 <sub>3</sub> <sup>5</sup>	○	×	△	△	△	moderate	moderate

$$\begin{aligned} \hat{I}_x \xrightarrow{\overline{H}_{D,IS}^{(1)}} & \cos(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) \hat{I}_x + \sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) 2\hat{I}_y \hat{S}_z \\ & \xrightarrow{\frac{\pi}{2} \hat{S}_x} -\sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) 2\hat{I}_y \hat{S}_y \\ & \xrightarrow{\pi \hat{I}_x} \sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) 2\hat{I}_y \hat{S}_y \\ & \xrightarrow{\frac{\pi}{2} \hat{S}_x} -\sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) 2\hat{I}_y \hat{S}_z \\ & \xrightarrow{\overline{H}_{D,IS}^{(1)}} \sin^2(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau) \hat{I}_x \end{aligned}$$

となる。R<sup>3</sup> (q = 2) 照射と同じ結果に見えるが、SR4<sub>1</sub><sup>2</sup> では Effective dipolar coupling が  $\omega_{D,IS}^{|m|=2} = \frac{1}{4} b_{IS} \sin^2(\beta_{PR}^{D,IS}) \cos(2\gamma_{PR}^{D,IS})$  なので、最後に得られる NMR 信号は  $\gamma_{PR}^{D,IS}$  に依存することになる。

Fig.2a の D-HMQC は信号検出のチャンネルに D<sub>IS</sub> recoupling を照射する。これを D-HMQC-DR (Direct observed channel Recoupling) と呼ぶ。一方、Fig.2b のように信号検出をしないチャンネルに D<sub>IS</sub> recoupling を照射する場合には D-HMQC-IR (Indirect non-observed channel Recoupling) と呼ぶ。どちらを選ぶかは、感度が最大になるように検出核に核磁気回転比(γ)の高い核や T<sub>1</sub> が短い核を設定すると決まる。加えて、後に述べるように(Q)CPMG 検出によって感度が向上する場合は考慮に入れる必要がある。また、検出核の横緩和 T<sub>2'</sub> によって信号の減衰が生じるので、T<sub>2'</sub> の短すぎる核を検出核に設定すると、F<sub>1</sub> 軸のスペクトルの歪みや、感度の著しい低下を導くため注意が必要である。また、t<sub>1</sub> 展開の取り込み数が少ない方が、実験時間は短くて済む。すなわち、F<sub>1</sub> 軸には F<sub>2</sub> 軸よりもスペクトル幅が広い核を選ぶ方が良い。

### Rotor synchronization

実際に D-HMQC を達成するには MAS との同期を考える必要がある。Fig.2 に示されるようにパルス間に適切な Delay を設けなければならない。Delay は (i) T<sub>A</sub> + τ + T<sub>B</sub> +  $\frac{t_1}{2} = n\tau_R$ 、(ii) τ = kτ<sub>R</sub>、(iii) 2T<sub>A</sub> + t<sub>1</sub> = pτ<sub>R</sub> と定義する(n, k, p は整数)。(i)は CSA や四極子相互作用による観測信号のモジュレーションを抑える。(ii) は D<sub>IS</sub> recoupling に対して必要である。(iii)は non-γ-encoding recoupling (SR4<sub>1</sub><sup>2</sup>, REDOR, SFAM<sub>N</sub>)に対して重要である。T<sub>A</sub>、T<sub>B</sub>は t<sub>1</sub>を増加させる毎に再計算される。T<sub>B</sub>は初めのπ/2パルスに対して MAS への同期を行うもので、パルス幅が短い場合には除いても影響は少ない。

D-HMQC-DR の場合に、一次の四極子相互作用を refocus させたい場合(特に整数四極子核に対して)には t<sub>1</sub> = jτ<sub>R</sub> (j は整数)としなければならない。反対に D-HMQC-DR で半整数四極子核の t<sub>1</sub> 展開の場合で、ST を観測したくない場合は t<sub>1</sub> ≠ jτ<sub>R</sub> (Rotor asynchronous) とする必要がある。

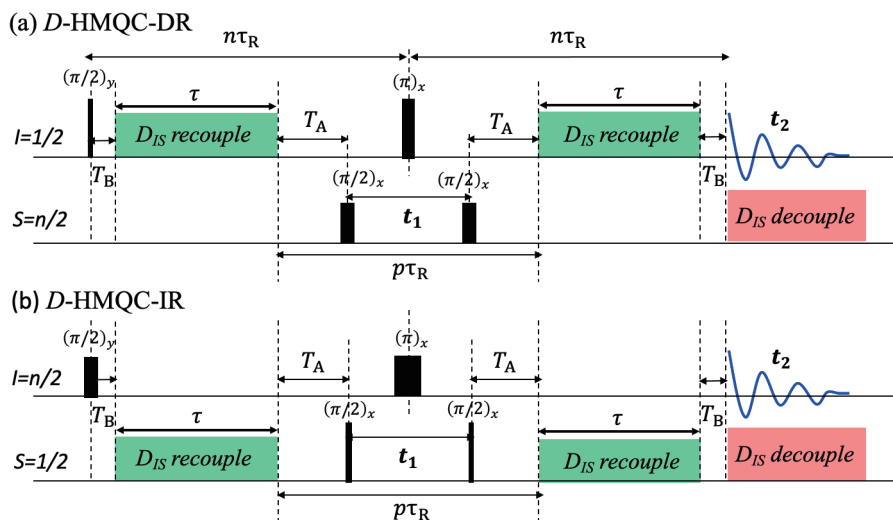


Fig.2 Schematic diagram of (a) D-HMQC-DR and (b) D-HMQC-IR

## $t_1$ ノイズ

$D$ -HMQC パルスシーケンスの重要な欠点は、 $t_1$  ノイズの抑制が困難なことである。 $t_1$  ノイズとは、装置の不安定性に起因して 2D 実験中のスキャン毎に NMR 信号強度がランダムに変化することによって、2D スペクトルの  $F_1$  軸に沿ってノイズが発生する現象である。固体 NMR では  $t_1$  ノイズを避けるために、MAS 周波数( $\nu_R$ )が非常に安定している必要がある。特に、non- $\gamma$ -encoded  $D_{IS}$  recoupling を照射した  $D$ -HMQC-DR では MAS 周波数の変動に敏感であり、MAS 周波数が不安定な場合、スキャン毎にランダムに信号強度が変わる。これは、 $D$ -HMQC の 2 つの  $D_{IS}$  recoupling 部分の各々の開始時に粉末試料中の各々の Crystallite が同じ方向になる必要があるためである。すなわち 1 つ目の  $D_{IS}$  recoupling の開始と 2 つ目の  $D_{IS}$  recoupling の開始との間は完全に MAS 周波数と同期する必要がある。このような条件は、 $t_1$  展開時間と  $D_{IS}$  recoupling 発展時間( $\tau$ )が長くなるほど達成が困難になる。また、MAS 周波数の変動により Saturation pulse や、 $D_{IS}$  recoupling sequence による  $D_{II}$  decoupling の効率も変化し、スキャン毎に信号強度が変わる原因になる。これらに起因した信号強度の変化による  $t_1$  ノイズは Phase cycle のみでは抑えきれない。

一方、Double CP の場合、 $t_1$  展開と信号検出( $t_2$ )の間に  $D_{II}$  DQ filter を挿入することで、相関のない核スピンのコヒーレンスを減らして、 $t_1$  ノイズを大幅に低減できることが知られている<sup>[13]</sup>。しかしながら、この方法は  $D$ -HMQC には適用できない。密度演算子の計算から明らかなように、 $D$ -HMQC では NMR 信号を検出するまで常に異種核相関した状態 (e.g.  $2\hat{I}_y\hat{S}_y$ ) であるため、 $D_{II}$  DQ filter を適用すると、取得したい相関した核スピンのコヒーレンスも同時に減ってしまう。従って、 $D$ -HMQC の 2D 実験で発生する  $t_1$  ノイズの問題は根本的にはまだ解決していない。

## 3.2. $D$ -RINEPT

$D$ -RINEPT(Fig.3a)は片方の核が四極子核である場合、あるいは低周波数核である場合に CPMAS との代替として使用される<sup>[14]</sup>。 $D$ -RINEPT に似た手法として PRESTO (Phase shifted Recoupling Effects a Smooth Transfer Order) があるが、照射する  $RN_n^V$  が異なることによって、全体の構造が異なっている<sup>[15]</sup>。 $R^3$  ( $q=2$ ) 照射による  $D$ -RINEPT の密度演算子の展開は

$$\begin{aligned} \hat{I}_x \xrightarrow{\overline{\hat{H}}_{D,IS}^{(1)}} & \cos(\omega_{D,IS}^{|m|=2}\tau) \hat{I}_x + \sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2}\tau) \{ \cos(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_y\hat{S}_z + \sin(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_z\hat{S}_y \} \\ & \xrightarrow{\frac{\pi}{2}\hat{I}_x, \frac{\pi}{2}\hat{S}_x} \sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2}\tau) \{ \cos(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_z\hat{S}_y + \sin(2\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_y\hat{S}_z \} \\ & \xrightarrow{\overline{\hat{H}}_{D,IS}^{(1)}} -\sin^2(\omega_{D,IS}^{|m|=2}\tau) \hat{S}_x \end{aligned}$$

となり、確かに  $I$  核から  $S$  核への分極移動が達成される。 $\pi$  パルスの計算は省略したが、化学シフトと CSA を refocus させる効果がある。また、 $D$ -HMQC と同様に  $R^3$  間に Rotary echo を考慮した Delay を入れる必要がある<sup>[14]</sup>。 $D$ -HMQC のときと同様に、 $R^3$  照射では最後に得られる NMR

信号は  $\gamma_{PR}^{D,IS}$  に依存しない ( $\omega_{D,IS}^{|m|=2} = \frac{1}{4} b_{IS} \sin^2(\beta_{PR}^{D,IS})$ )。  $R^3$  は試料管内の RF 磁場の不均一性に弱いので、最近では  $SR4_1^2$  が使用されており、もちろん SFAM $_N$  も適用可能である。ここでも  $SR4_1^2$  あるいは SFAM $_N$  を用いた場合の  $D$ -RINEPT の密度演算子の展開は  $J$ -RINEPT と同じになる。

$$\begin{aligned} \hat{I}_x \xrightarrow{\overline{\hat{H}}_{D,IS}^{(1)}} & \cos(\omega_{D,IS}^{|m|=2}\tau) \hat{I}_x + \sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2}\tau) 2\hat{I}_y\hat{S}_z \\ & \xrightarrow{\frac{\pi}{2}\hat{I}_x, \frac{\pi}{2}\hat{S}_x} -\sin(\omega_{D,IS}^{|m|=2}\tau) 2\hat{I}_z\hat{S}_y \\ & \xrightarrow{\overline{\hat{H}}_{D,IS}^{(1)}} \sin^2(\omega_{D,IS}^{|m|=2}\tau) \hat{S}_x \end{aligned}$$

$D$ -HMQC のときと同様に、 $SR4_1^2$  照射では最後に得られる NMR 信号は  $\gamma_{PR}^{D,IS}$  に依存することがわかる ( $\omega_{D,IS}^{|m|=2} = \frac{1}{4} b_{IS} \sin^2(\beta_{PR}^{D,IS}) \cos(2\gamma_{PR}^{D,IS})$ )。また、 $D$ -RINEPT における横緩和による信号の減衰は前半において  $I$  核による  $T_{2I}'$ 、後半においては  $S$  核による  $T_{2S}'$  によって生じる。

PRESTO は  $D$ -RINEPT と似ており、違いは  $R18_2^5$  あるいは  $R18_1^7$  などを使用することである。 $R18_2^5$  の Recoupled  $D_{IS}$  Hamiltonian

$$\begin{aligned} \left(\overline{H}_{D,IS}^{(1)}\right)_0 &= \omega_{D,IS}^{|m|=2} \exp(-i2\gamma_{PR}^{D,IS} I_z) 2\hat{I}_x \hat{S}_z \exp(i2\gamma_{PR}^{D,IS} \hat{I}_z) \\ \left(\overline{H}_{D,IS}^{(1)}\right)_{\pi/2} &= \omega_{D,IS}^{|m|=2} \exp(-i2\gamma_{PR}^{D,IS} \hat{I}_z) 2\hat{I}_y \hat{S}_z \exp(i2\gamma_{PR}^{D,IS} \hat{I}_z) \end{aligned}$$

を用いて、PRESTO-I の密度演算子の展開は以下である。

$$\begin{aligned} \hat{I}_z \frac{\left(\overline{H}_{D,IS}^{(1)}\right)_0}{\rightarrow} e^{(-i2\phi\hat{I}_z)} \left\{ \cos\left(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau\right) \hat{I}_z - \sin\left(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau\right) 2\hat{I}_y \hat{S}_z \right\} e^{(i2\phi\hat{I}_z)} \\ \xrightarrow{\frac{\pi}{2}\hat{S}_y} e^{(-i2\phi\hat{I}_z)} \left\{ -\sin\left(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau\right) 2\hat{I}_y \hat{S}_x \right\} e^{(i2\phi\hat{I}_z)} \\ \frac{\left(\overline{H}_{D,IS}^{(1)}\right)_{\pi/2}}{\rightarrow} \sin^2\left(\omega_{D,IS}^{|m|=2} \tau\right) \hat{S}_y \end{aligned}$$

ここで、 $[2\hat{I}_y \hat{S}_z, 2\hat{I}_y \hat{S}_x] = i\hat{S}_y$  を使用した。R18<sub>2</sub><sup>5</sup> 照射では最後に得られる NMR 信号は  $\gamma_{PR}^{D,IS}$  に依存しない ( $\omega_{D,IS}^{|m|=2} = \kappa \frac{3\sqrt{2}}{4} b_{IS} \sin^2(\beta_{PR}^{D,IS})$ )。PRESTO には I、II、III のバージョンがあるが、PRESTO-III(Fig.3b)を使用することが多く、RN<sub>n</sub><sup>v</sup> 照射の間に Delay を設ける必要はなく、D<sub>IS</sub> recoupling 部分の RN<sub>n</sub><sup>v</sup> 全体の位相を変えることによって化学シフトと CSA を refocus させることができる。

D-RINEPT with SR4<sub>1</sub><sup>2</sup> と PRESTO-III は AIPO<sub>4</sub>-14 (Al<sub>8</sub>P<sub>8</sub>O<sub>32</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>N)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>) を用いた <sup>1</sup>H-<sup>27</sup>Al 相関実験によって比較され、 $\nu_R = 60$  kHz at 18.8 T では D-RINEPT、 $\nu_R = 15$  kHz at 9.4 T および  $\nu_R = 20$  kHz at 18.8 T では PRESTO-III、が感度が優れている結果となった<sup>[16]</sup>。低～中速 MAS 条件において、PRESTO-III が優れている理由は D<sub>II</sub> decoupling 効率が R<sup>3</sup> や SR4<sub>1</sub><sup>2</sup> よりも良く、さらに <sup>1</sup>H チャンネルに Delay が必要がないためである。Fig.3 は D-RINEPT、PRESTO 共に、励起核を 1/2 核、検出核に四極子核を選択しているが、入れ替えても構わない。ただし、D<sub>IS</sub> recoupling は常に 1/2 核に照射すべきである。

## 4. Development & application

### 4.1. <sup>31</sup>P- {<sup>27</sup>Al, <sup>23</sup>Na} 3D correlation <sup>[17]</sup>

D-RINEPT と D-HMQC を組み合わせた <sup>31</sup>P, <sup>27</sup>Al, <sup>23</sup>Na の 3 チャンネル実験を紹介する。上記の系は <sup>27</sup>Al と <sup>23</sup>Na の共鳴周波数が近いので、REDOR-box<sup>[18]</sup> を使用して単一のチャンネルを二重共鳴回路に分割して相関実験を実施する。同様に、共鳴周波数が近い系は他にもあり、例えば、<sup>13</sup>C-<sup>27</sup>Al、<sup>13</sup>C-<sup>51</sup>V、<sup>27</sup>Al-<sup>51</sup>V、<sup>23</sup>Na-<sup>51</sup>V、<sup>7</sup>Li-<sup>31</sup>P などがある。REDOR-box の実験では同時に <sup>27</sup>Al と <sup>23</sup>Na にパルスを照射することができない。D-HMQC あるいは D-RINEPT はパルスの重なりが少なく実験をすることが

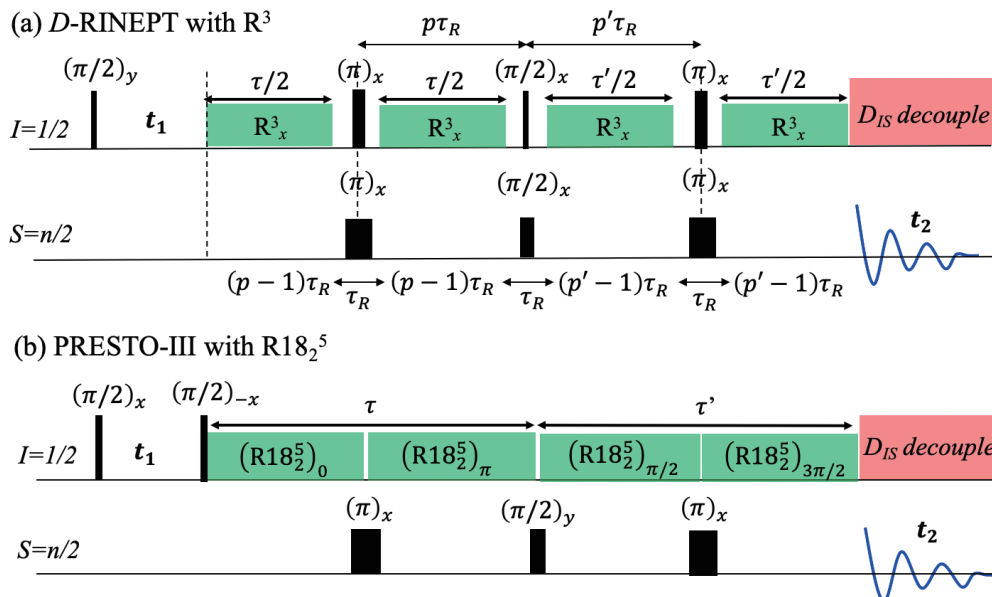


Fig.3 Schematic diagram of (a) D-RINEPT with R<sup>3</sup> and (b) PRESTO-III with R18<sub>2</sub><sup>5</sup> where I and S channel are assumed to be spin-1/2 and half-integer quadrupolar nuclei, respectively.

できるため、同時に長時間照射しなければならない CPMAS よりも REDOR-Box の実験に向いている。本実験でも  $^{23}\text{Na}$  と  $^{27}\text{Al}$  に同時にパルス照射していない。

$^{31}\text{P}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{23}\text{Na}$  の 3 チャンネル実験において、励起核と検出核の組み合わせを決めることは重要である。 $I_{\text{det}} > 1$  の固体の場合には、検出核の NMR 信号は  $2I_{\text{det}}$  へ分割される。従って、信号検出の感度は  $2I_{\text{det}}$  で割ることになる。他方で、DFS などの Population transfer を適用することによって感度が増強する。従って、相関実験の感度の式は以下になる。

$$\frac{S}{N\sqrt{T_{\text{tot}}}} = C\gamma_{\text{exc}}\gamma_{\text{det}}^{3/2}(B^0)^{3/2}\frac{I_{\text{det}}(I_{\text{det}} + 1)}{I_{\text{det}}}\varepsilon_{\text{PT}}\left(\frac{Q_{\text{det}}}{2FWHM_{\text{det}}}\right)^{1/2}\frac{1}{\sqrt{\tau_{\text{RD}}}}$$

$T_{\text{tot}}$ : total acquisition time,  $C$ : constant (such as coil geometry, filling factor, temperature, receiver noise, spin density, saturation factor, apodization, polarization transfer efficiency),  $\gamma_i$  ( $i = \text{exc}$  or  $\text{det}$ ): gyromagnetic ratio of excited or detected nuclei,  $I_{\text{det}}$ : the spin of the detected nucleus,  $Q_{\text{det}}$ : the quality factor of the detection circuit,  $\varepsilon_{\text{PT}}$ : enhancement factor by population transfer,  $FWHM_{\text{det}}$ : full-width at half maximum of the detected NMR signal,  $\tau_{\text{RD}}$ : recycle delay.

これから計算された相関実験の相対感度は Table.3 に与えられる。従って、励起核を  $^{23}\text{Na}$  に、検出核を  $^{31}\text{P}$  に設定することが最も効率が良いことになる。3 次元相関のパルスシーケンス  $^{31}\text{P}\{-^{23}\text{Na}, ^{27}\text{Al}\}3\text{D R}^3\text{-RINEPT/SR4}_1^2\text{-HMQC}$  を Fig.4a に示す。最初に  $^{23}\text{Na}$  に DFS を照射し、ついで、 $^{31}\text{P}$  に  $\text{R}^3$  を照射した  $^{23}\text{Na} \rightarrow ^{31}\text{P}$   $D\text{-RINEPT}$ 、その後  $^{31}\text{P}$  に  $\text{SR4}_1^2$  を照射した  $^{31}\text{P} \rightarrow ^{27}\text{Al}$   $D\text{-HMQC}$  を適用する。 $D_{\text{IS}}$  recoupling は全て  $^{31}\text{P}$  に照射することが重要である。本研究ではデモンストレーションとして、放射性廃棄物の封入材として使用される  $40\text{Na}_2\text{O}\cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 40\text{P}_2\text{O}_5$  に Fig.4a のパルスシーケンスを適用した。

$40\text{Na}_2\text{O}\cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 40\text{P}_2\text{O}_5$  は  $\text{NaAlP}_2\text{O}_7$  結晶相と  $\text{Na}_7(\text{AlP}_2\text{O}_7)_4\text{PO}_4$  結晶相で構成されるが、 $^{31}\text{P}$  スペクトルからガラス成分が約半分の割合で存在することがわかっている。まず  $2\text{D } ^{31}\text{P}\{-^{23}\text{Na}\} \text{R}^3\text{-RINEPT}$  を実施すると、ガラス成分が同様に観測され、リン酸ナトリウムで構成されていることがわかった (Fig.4b)。次に  $^{31}\text{P}\{-^{23}\text{Na}, ^{27}\text{Al}\}3\text{D R}^3\text{-RINEPT/SR4}_1^2\text{-HMQC}$  による 3D スペクトルの  $^{23}\text{Na}\text{-}^{31}\text{P}$  2D projection

Table.3 Relative sensitivity of  $^{31}\text{P}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{23}\text{Na}$  correlation

		Excited nucleus		
		$^{31}\text{P}$	$^{23}\text{Na}$	$^{27}\text{Al}$
Detected nucleus	$^{31}\text{P}$	5.7	100	20
	$^{23}\text{Na}$	1	18	3.6
	$^{27}\text{Al}$	1.8	31	6.5

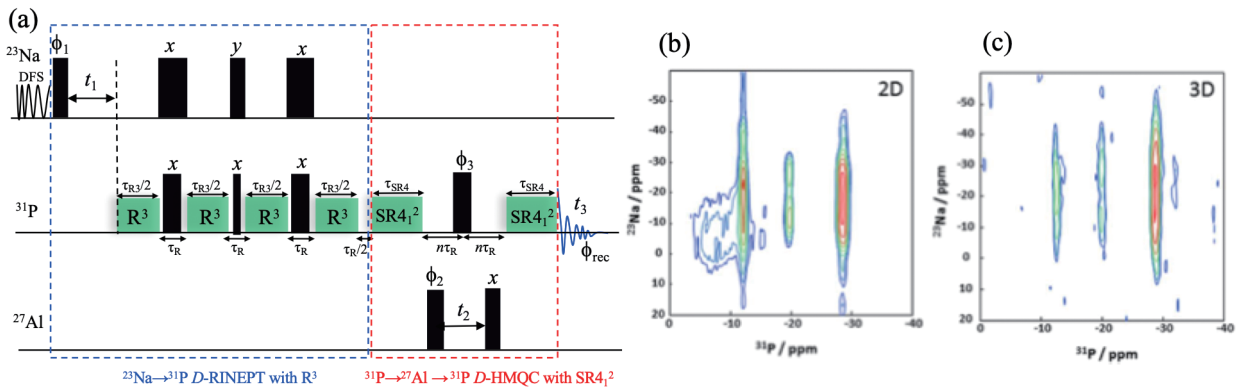


Fig.4 (a)  $^{31}\text{P}\{-^{23}\text{Na}, ^{27}\text{Al}\}3\text{D R}^3\text{-RINEPT/SR4}_1^2\text{-HMQC}$  pulse sequence with  $\phi_1=x, -x, \phi_2=x, x, -x, -x, \phi_3=x, x, x, x, -x, -x, -x, -x, \phi_{\text{rec}}=\phi_1+\phi_2+2\phi_3$ . (b)  $^{31}\text{P}\{-^{23}\text{Na}\} \text{R}^3\text{-RINEPT}$  2D spectrum and (c) 2D  $^{23}\text{Na}/^{31}\text{P}$  projections of  $^{31}\text{P}\{-^{23}\text{Na}, ^{27}\text{Al}\}3\text{D R}^3\text{-RINEPT/SR4}_1^2\text{-HMQC}$  experiment of  $40\text{Na}_2\text{O}\cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 40\text{P}_2\text{O}_5$  at 9.4 T with  $\nu_{\text{R}} = 10$  kHz. Adapted with permission from [17]. Copyright 2017, Elsevier.



を取ってみると、ガラス成分は観測されない(Fig.4c)。従って、ガラス成分はアルミニウムを含まないということが明らかとなった。ただ、3D 実験は非常に時間がかかってしまうので、 $D$ -HMQC の  $t_2$  展開をせず、単に  $^{27}\text{Al}$  フィルターとして実験を行っても同様の結果が得られるだろう。

また、同じ時期に Q Wang et al によって  $^{23}\text{Na}$ - $^{27}\text{Al}$  の直接的な相関実験が発表されている<sup>[19]</sup>。この場合、半整数四極子核のどちらかに  $D_{IS}$  recoupling を照射しなければならないため、 $D_{IS}$  recoupling の効率は減少する。この時、CT 選択を行うために弱い RF 磁場強度の  $D_{IS}$  recoupling ( $R^3$ ,  $R2_1^+$ ,  $SR4_1^+$ ) を使用しなければならないため、RF offset の問題も生じる。

#### 4.2. $J/D$ -HMQC & $J$ -RINEPT with (Q)CPMG acquisition<sup>[20]</sup>

(Quadrupolar) Curr-Purcell-Meiboom-Gill ((Q)CPMG) は低い自然存在比を持つ核を高感度で検出する方法として有効である。(Q)CPMG はそれ単体で使用されるが、分極移動後に(Q)CPMG を適用して信号を検出することもでき、実際に CP-(Q)CPMG、PRESTO-QCPMG が発表されている。同様に  $D$ -HMQC と  $D$ -RINEPT に対しても(Q)CPMG 検出との組み合わせは可能であるが、これまでに報告はなかった。

著者らは  $\beta$ - $\text{Ga}_2\text{Se}_3$  結晶と赤外線レンズの用途に有望な Ga-Ge-Se ガラスに対して、 $^{71}\text{Ga}$ - $\{^{77}\text{Se}\}$   $J/D$ -HMQC と  $\{^{71}\text{Ga}\}$ - $^{77}\text{Se}$   $J$ -RINEPT に(Q)CPMG 検出を組み合わせ、 $^{71}\text{Ga}$ - $^{77}\text{Se}$  相関実験を初めて達成した。 $^{77}\text{Se}$ - $^{71}\text{Ga}$  相関実験が難しい理由は、(i)  $^{77}\text{Se}$  と  $^{71}\text{Ga}$  の自然存在比はそれぞれ 7.6%、39.6%、(ii)  $^{71}\text{Ga}$  と  $^{77}\text{Se}$  の核磁気回転比  $\gamma$  は  $^{13}\text{C}$  に近い ( $\gamma_{^{71}\text{Ga}} = 1.22\gamma_{^{13}\text{C}}$ ,  $\gamma_{^{77}\text{Se}} = 0.76\gamma_{^{13}\text{C}}$ )、(iii)  $^{71}\text{Ga}$  はスピン  $I = 3/2$  であり、 $^{23}\text{Na}$  と同程度の四極子モーメントを持つ、(iv) 長い  $^{77}\text{Se}$  の  $T_1$  (>100 秒)、である。 $^{77}\text{Se}$ - $^{71}\text{Ga}$  相関実験では  $^{71}\text{Ga}$  の高い  $\gamma$  と短い  $T_1$  を活かして、励起核は常に  $^{71}\text{Ga}$  に設定した。(Q)CPMG は  $^{71}\text{Ga}$  と  $^{77}\text{Se}$  の長い  $T_2'$  と低い自然存在比から両方の核に適用可能である。 $D$ -HMQC-IR に関しては  $D_{IS}$  recoupling として SFAM<sub>1</sub> を適用した。 $J/D$ -HMQC-IR-QCPMG に対する Phase cycle は Fig.5 のように設定した。(Q)CPMG を組み込む時に重要なことは Phase cycle によって、(Q)CPMG 前段階で、 $\pm 1Q$  コヒーレンス選択を行うことである。0Q コヒーレンスを通してしまうと、アーティファクトが生じる恐れがあるので注意が必要である。

#### (Q)CPMG による感度向上

$\beta$ - $\text{Ga}_2\text{Se}_3$  結晶に対して、 $J/D$ -HMQC-IR あるいは  $J$ -RINEPT に対する(Q)CPMG による感度向上を調べた。 $^{71}\text{Ga}$  に対して約 32 倍、 $^{77}\text{Se}$  に対して約 28 倍もの感度向上を得ることができた。この大きな感度の理由は FID が短く、なおかつ  $^{71}\text{Ga}$  と  $^{77}\text{Se}$  の  $T_2'$  が長いため、(Q)CPMG によって多くのエコーを取得できたためである。次に  $^{71}\text{Ga}$ - $\{^{77}\text{Se}\}$  2D  $J/D$ -HMQC と  $\{^{71}\text{Ga}\}$ - $^{77}\text{Se}$  2D  $J$ -RINEPT の感度を調べたところ、 $J$ -HMQC が良い感度を示した。この理由は  $^{71}\text{Ga}$ - $^{77}\text{Se}$   $J$  coupling が 500 ~ 800 Hz と非常に大きく、 $T_2'$  も長い分極移動中でのロスが少なく、加えて、 $\omega_{D,IS}^{|m|}$  の角度依存性のために  $D_{IS}$  recoupling の効率は  $J$  coupling の場合のおよそ半分程度になると考えられる。測定時間は  $J$ -HMQC と QCPMG の組み合わせに対して、 $^{71}\text{Ga}$ - $^{77}\text{Se}$  2D スペクトルが 1 時間程度で取得できた Fig.6a。これは驚くべき速さであり、QCPMG なしでは 1 ヶ月以上の測定時間がかかる計算になる。

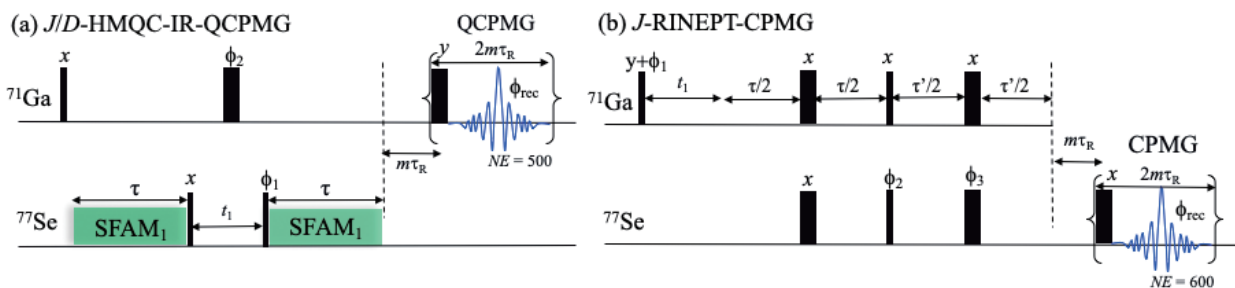


Fig.5 Schematic diagram of (a)  $J/D$ -HMQC-IR-QCPMG with  $\phi_1 = x, -x, \phi_2 = x x -x -x y y -y -y, \phi_{\text{rec}} = \phi_1 + 2\phi_2$  and (b)  $J$ -RINEPT-QCPMG with  $\phi_1 = x -x, \phi_2 = x x -x -x, \phi_3 = x x x x -x -x -x y y y y -y -y -y, \phi_{\text{rec}} = \phi_1 + \phi_2 - 2\phi_3$ . NE: Number of echo,  $m$ : Integer number

## $\beta$ -Ga<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>の構造

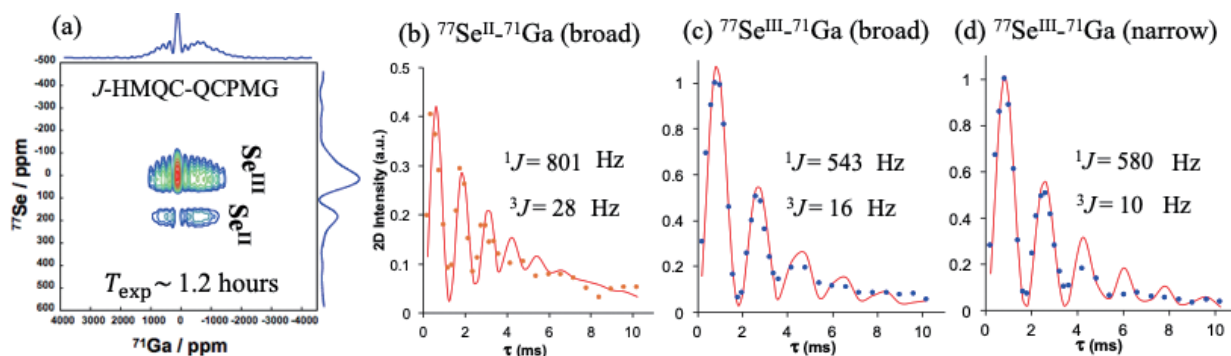
$\beta$ -Ga<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>結晶の構造はXRDの構造解析からMonoclinic構造が指摘されている。しかしながら、<sup>71</sup>Ga 1Dスペクトルにはシャープとブロードの2種類が存在している。過去の固体NMRの研究ではシャープなスペクトルのみしか観測しておらず、これがMonoclinic相と考えられていた。しかしながら、Monoclinic相ではSe<sup>II</sup>とSe<sup>III</sup>サイト両方の<sup>77</sup>Seと<sup>71</sup>Gaが相関を示すはずである。2DスペクトルからブロードなスペクトルはSe<sup>II</sup>とSe<sup>III</sup>の両方に強く相関している。一方で、シャープなスペクトルはSe<sup>III</sup>サイトのみに相関している。したがって、ブロードなスペクトルがMonoclinic相の<sup>71</sup>Gaの信号である。他方で、過去文献Ref[20]において、 $\beta$ -Ga<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>にはCubic相(Space group: F-43m)が存在していることが指摘されていた。Cubic相の場合には<sup>71</sup>GaのC<sub>0</sub>は小さいことが予想され、Se<sup>III</sup>サイトとの相関が期待される。従って、Cubic相の存在は観測したシャープなスペクトルと良い一致が見られた。加えて、<sup>71</sup>Ga z filter split-*t*<sub>1</sub> DQF-STMAS-QCPMG測定<sup>[20]</sup>により、シャープなスペクトルには大きなDisorderが観測された。これはCubic相にはランダムなGaの空孔が存在するというRef[21]の予測と一致している。最後に、*J*-HMQCの*J* couplingの発展時間( $\tau$ )を変えて2Dスペクトルを19個取得し、各々の*J* build-up curveを作り、解析フィッティングから*J* couplingを見積った(Fig.6b,c,d)。これらは想定されるGa-Se結合長との良い一致が見られた。

## Ga-Ge-Se ガラス

同様の実験をGa-Ge-Seガラス(0.2Ga<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>-0.8GeSe<sub>2</sub>)に適用した。ここでも*J*-HMQCは*D*-HMQC-IRよりも感度は良いが、一方で*J*-RINEPTの感度が*J*-HMQCよりも優れていた。これは<sup>71</sup>Gaがブロードなスペクトルのみであり、そのため*t*<sub>1</sub>展開の取り込み数が少なく済むからである。逆にHMQCは<sup>77</sup>Seを十分に分解しなくてはならないので、*t*<sub>1</sub>展開の取り込み数が*J*-RINEPTに比べて多くなる。*J*-HMQCと*J*-RINEPT共に10時間程度で2Dスペクトルを取得できた。

Fig.7b,c,dは*J*-HMQC、*D*-HMQCと*J*-RINEPTから得た2D projection<sup>77</sup>Se 1Dスペクトルである。スペクトル形状に特徴が少ないが、3つのスペクトルの同時フィッティングにより、6成分のSeを決定した。さらに*D*-HMQC-IRからの<sup>77</sup>Se 2D projectionにおいて、600 ppm付近にもう1成分観測された。この成分はGeのみに結合したSeの成分と推測され、距離的にGaに十分近いことが示唆される。対照的に、800 ppm以上にあるSeのみで構成される成分は観測されなかった。

以上述べてきたようにHMQCとRINEPTに(Q)CPMG検出を組み合わせることで、<sup>71</sup>Ga-<sup>77</sup>Se相関を達成でき、より詳しい構造情報を入手した。提案したシーケンスは検出核が(Q)CPMGで感度向上ができる場合に有効に働くものと考えられる。ここでは述べなかったが、*D*-RINEPTに関しても(Q)CPMG検出の組み合わせは可能で、実際に著者が作成して動作を確認済みである。



**Fig.6**  $\beta$ -Ga<sub>2</sub>Se<sub>3</sub> crystal: (a) <sup>71</sup>Ga-<sup>77</sup>Se 2D spectra obtained by *J*-HMQC-QCPMG sequence and *J*-build-up curve of (b) <sup>77</sup>Se<sup>II</sup>-<sup>71</sup>Ga (broad resonance), (c) <sup>77</sup>Se<sup>III</sup>-<sup>71</sup>Ga (broad resonance) and (d) <sup>77</sup>Se<sup>III</sup>-<sup>71</sup>Ga (narrow resonance) obtained by 19 pieces of 2D spectra of <sup>71</sup>Ga-<sup>77</sup>Se *J*-HMQC-IR-QCPMG at *B*<sub>0</sub> = 9.4 T, *v*<sub>R</sub> = 20 kHz. Red line is shown as analytical fitting. Adapted with permission from [20]. Copyright 2017, Elsevier.

### 4.3. $D$ -HMQC with $\gamma$ -encoded $D_{IS}$ recoupling [22]

$D$ -HMQC で使用する  $D_{IS}$  recoupling の選択肢は主に  $R^3$ 、 $SR4_1^2$ 、 $SFAM_N$  である。これらの  $D_{IS}$  recoupling は用途によって使い分けることができる。低～中速 MAS 条件で高い RF 磁場強度が使用できる場合には  $SFAM_N$  が有効であり、CSA や RF offset にロバストである。一方で、 $SR4_1^2$  と  $SFAM_N$  は MAS 周波数の不安定性に弱く、 $D$ -HMQC-DR で使用する場合に、 $D_{II}$  coupling あるいは CSA を起源として大きな  $t_1$  ノイズが発生する場合がある。対照的に  $R^3$  は  $\gamma$ -encoding の性質を持ち、理論的に励起効率は non- $\gamma$ -encoding よりも 25 % 高く、MAS の不安定性にロバストである。しかしながら、 $R^3$  は試料管中の RF 磁場の不均一に弱く、一般的に低感度になる。そのため、 $\gamma$ -encoding の性質を持ち、なおかつ RF 磁場の不均一にロバストな  $D_{IS}$  recoupling を活用した  $D$ -HMQC-DR が望まれる。

ここで着目したのが  $R10_2^3$ 、 $R14_2^5$ 、 $R16_3^5$ 、 $R18_4^5$  (代表して  $R16_3^5$ ) の R symmetry である。これらは  $\{l, m, \lambda, \mu\} = \{2, \pm 1, 1, \mp 1\}$  であり、 $\gamma$ -encoding の性質を有している。 $|m| = 1$  を持つ  $R16_3^5$  は  $D_{II}$  decoupling の性質は有していないが、 $|m| = 2$  に比べて高い Scaling factor  $\kappa$  を有するため、 $T_2'$  のロスが最小限になるため有利である。それでは  $R16_3^5$  を  $D$ -HMQC-DR に組み込むために、 $R^3$  と  $R16_3^5$  の  $\overline{H}_{D,IS}^{(1)}$  を確認しよう。 $R16_3^5$  の  $\overline{H}_{D,IS}^{(1)}$  は  $R18_2^5$  に似て  $\overline{H}_{D,IS}^{(1)} = \omega_{D,IS}^{|m|=1} [\cos(\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_x \hat{S}_z - \sin(\gamma_{PR}^{D,IS}) 2\hat{I}_y \hat{S}_z]$  である。 $R^3$  と同じ Single Quantum であるが、最初の項の  $\hat{I}_z$  が  $R16_3^5$  では  $\hat{I}_x$  となっている。従って、 $R16_3^5$  を  $R^3$  と同じ  $\overline{H}_{D,IS}^{(1)}$  にするには  $D_{IS}$  recoupling を  $\pi/2$  パルスで挟めば良い。

$$\hat{U}(\tau)_{(R^3)} = \exp\left(-i\overline{H}_{D,IS}^{(1)} \tau\right) \approx \exp\left(-i \cdot e^{i\frac{\pi}{2}\hat{I}_y} \cdot \overline{H}_{D,IS}^{(1)} \cdot e^{-i\frac{\pi}{2}\hat{I}_y} \cdot \tau\right)$$

これから、Fig.2a の  $D$ -HMQC-DR の  $R^3$  ( $q = 1$ ) を  $90^\circ$  パルスで挟んだ  $R16_3^5$  に置き換えれば良い。これにより、 $D$ -HMQC-DR の密度演算子の発展は  $R^3$  と  $R16_3^5$  の場合で同じと考えて良い。 $R^3$  あるいは  $R16_3^5$  を照射した  $D$ -HMQC-DR では、コヒーレンスが  $SR4_1^2$ 、 $SFAM_1$  とは異なり、MQ ( $\hat{I}_y \hat{S}_y$ ) の他に SQ ( $\hat{I}_z \hat{S}_y$ ) が生み出される。これから、 $\pi$  パルスの Phase cycle を調整して、 $\hat{I}_y \hat{S}_y$  と  $\hat{I}_z \hat{S}_y$  の両方を信号に寄与させる方が感度的に有利である (Fig.8a)。

シミュレーションによる MAS 周波数の不安定性に対するロバスト性の比較を Fig.8b に示す。10 kHz の CSA が存在する中で、 $SFAM_1$  は MAS が少しでもずれてしまうと信号が大きく損なわれることがわかる。一方で、 $R16_3^5$  と  $R^3$  は MAS 周波数の不安定性に対して非常にロバストである。一方、 $SFAM_1$  は RF 磁場の不均一性に非常にロバストであり、 $R^3$  は RF 磁場の不均一性に弱い。対して、 $R16_3^5$  は RF 磁場の不均一性にある程度ロバストである。実際にシミュレーションでは  $R^3$  と  $R16_3^5$  は同じ励起効率を示すが、実験では試料管内で RF 磁場が不均一であるために  $R^3$  の励起効率は  $R16_3^5$  の 1/3 に減少する (Fig.8c)。以上から、 $R16_3^5$  は  $R^3$  と同じく MAS 周波数の不安定性にロバストであり、加えて RF 磁場の不均一性に関して  $R16_3^5$  は  $R^3$  よりもロバストであるため、 $t_1$  ノイズが発生しにくく、なおかつ  $R^3$  よりも高感度になる。

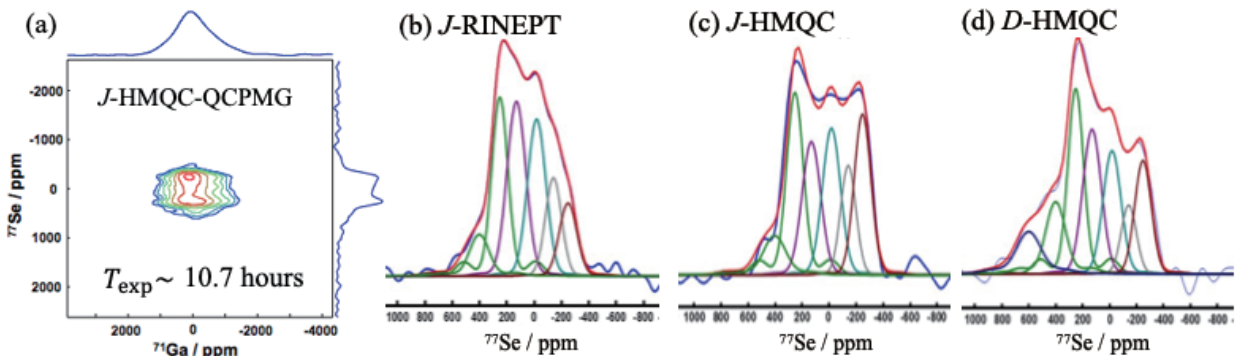


Fig.7 0.2Ga<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>-0.8GeSe<sub>2</sub> glass: (a) <sup>71</sup>Ga-<sup>77</sup>Se}2D spectra obtained by  $J$ -HMQC-QCPMG sequence and 2D projection spectra obtained by (b)  $J$ -RINEPT-CPMG, (c)  $J$ -HMQC-QCPMG, (d)  $D$ -HMQC-IR-QCPMG) at  $B_0 = 9.4$  T,  $\nu_R = 20$  kHz. The fitting of the spectra was performed by dmfit software. Adapted with permission from [20]. Copyright 2017, Elsevier.

実際に 18.8 T、 $\nu_R = 20$  kHz において、測定試料  $\text{Na}_7\text{Al}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_4(\text{PO}_4)$  を用いて  $^{31}\text{P}\{-^{27}\text{Al}\}$   $D$ -HMQC-DR を検証した。この試料には 3 つの P サイトが存在する： $\text{P}_1$  ( $\delta_{\text{iso}} = 12$  ppm,  $\delta_{\text{aniso}} = 85$  ppm,  $\eta_{\text{CSA}} = 0.6$ ),  $\text{P}_2$  ( $\delta_{\text{iso}} = 15$  ppm,  $\delta_{\text{aniso}} = 10.5$  ppm,  $\eta_{\text{CSA}} = 0.85$ ),  $\text{P}_3$  ( $\delta_{\text{iso}} = 28$  ppm,  $\delta_{\text{aniso}} = 75.7$  ppm,  $\eta_{\text{CSA}} = 0.3$ )。  $\text{P}_1$  と  $\text{P}_3$  サイトは CSA が非常に大きく、反対に  $\text{P}_2$  サイトは CSA が小さい。各  $D_{IS}$  recoupling によって得られた各 P サイトの 2D スライスを示す。CSA が大きい  $\text{P}_1$  と  $\text{P}_3$  サイトに関して、 $\text{SFAM}_1$  は大きな  $t_1$  ノイズが生じているが、 $\text{R}^3$  と  $\text{R16}_3^5$  は  $t_1$  ノイズが抑えられている。この差は MAS 周波数の不安定性へのロバスト性の違いから生じている。また、 $\text{R16}_3^5$  は  $\text{R}^3$  よりも全てのサイトで感度が良く、特に CSA が小さい  $\text{P}_2$  サイトは 2 倍以上の差がある。これは明らかに RF 磁場の不均一性へのロバスト性能の差から生じている。このように、 $\text{R16}_3^5$  照射による  $D$ -HMQC-DR は高磁場の相関実験において優れており、今後選択肢の一つになり得る。

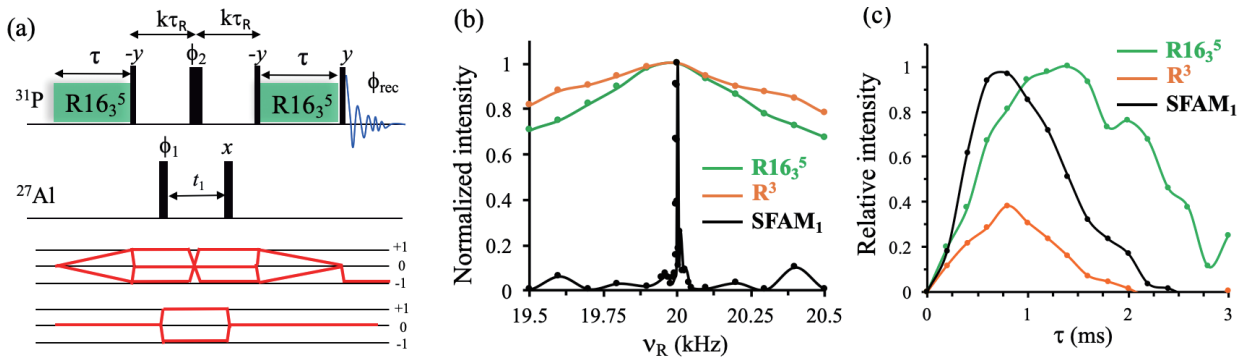
**$D_{II}$  coupling に起因する  $t_1$  ノイズ**

最後に  $D_{II}$  coupling に起因した  $t_1$  ノイズについて述べておく。FA.Perras et al.は  $\text{R18}_2^5$  照射の  $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\}$   $D$ -HMQC-DR を使用して、2D スペクトルに発生する  $D_{II}$  coupling による  $t_1$  ノイズを抑制できるか確認している<sup>[23]</sup>。しかしながら、 $D_{II}$  coupling を起源とする  $t_1$  ノイズを消去する目的には使用できなかった。これは著者も同様に確認しており、CSA と  $D_{II}$  coupling の  $t_1$  ノイズの発生メカニズムは根本的に異なることが示唆される。

一方で、Ref[23]では  $t_1$  ノイズが Additive(相加性)ノイズではなく、Multiplicative(相乗性)ノイズであることに着目し、繰り返し時間  $d_1$  を縦緩和時間  $T_1$  よりも短く設定することで、 $t_1$  ノイズを低減できることを示した。Multiplicative ノイズは信号に起因したノイズを意味し、信号強度が大きくなるほど  $t_1$  ノイズは大きくなる。熱平衡状態での  $t_1$  と  $t_2$  ノイズレベルの比を  $x$  として、時間単位の感度が最大になる場合の  $x$  と縦緩和の関係式は

$$x = \frac{\exp\left(\frac{d_1}{T_1}\right) \sqrt{\left(\exp\left(\frac{d_1}{T_1}\right) - 1\right) \left(-\exp\left(\frac{d_1}{T_1}\right) + 2\frac{d_1}{T_1} + 1\right)}}{\left(\exp\left(\frac{d_1}{T_1}\right) - 1\right)^2} \approx \frac{T_1}{d_1}$$

ここで、 $t_1$  ノイズが大きい場合、すなわち  $x$  が大きい ( $d_1/T_1$  が小さい) として、1 次の項までのテイラー展開によって上式最後の  $x \approx \frac{T_1}{d_1}$  が導かれる。近似前の式において  $x = 0$  ( $t_1$  ノイズがない) の場合には、 $d_1/T_1 = 1.3$  が導かれ、 $x \geq 2$  の場合には近似前後でほぼ同じグラフを示す。これから、 $t_1$  ノイズが発生するときは  $d_1$  を  $T_1$  よりも短く設定する方が感度は良くなる。FA.Perras et al.は実際に  $t_1$  ノイズが大きく生じる 2D 相関実験において、 $d_1 = 0.2T_1$  の場合に感度が最大になることを確認した。もちろん  $t_1$  ノイズの大きさによって、 $d_1$  の最適値は変わるが、 $t_1$  ノイズが発生する実験では、 $d_1$  を少なくとも  $T_1$  よりも短く設定した方が良いだろう。また、 $d_1$  が duty cycle よりも短くなってしまった場合はもちろん



**Fig.8** (a) The pulse sequence of  $D$ -HMQC-DR- $\text{R16}_3^5$  with  $\phi_1 = x, -x, \phi_2 = x, x, -x, -x, \phi_{\text{rec}} = x, -x$ . (b) Simulated robustness to MAS fluctuation (CSA = 10 kHz). (c) The experimental build-up curve at  $B_0 = 9.4$  T,  $\nu_R = 20$  kHz for the sample: VPI-5 ( $\text{Al}_3(\text{PO}_4)_3(\text{H}_2\text{O})_5$ ) (CSA ~ 5 kHz). Each data is for  $\text{R16}_3^5$  (green),  $\text{R}^3$  (orange) and  $\text{SFAM}_1$  (black). Adapted with permission from [22]. Copyright 2017, Elsevier.

duty cycle を優先した方がよい。

#### 4.4. $D$ -HMQC with Adiabatic $D_{IS}$ recoupling [24]

$D$ -HMQC-IR の場合に多く使用される  $D_{IS}$  recoupling は SFAM<sub>1</sub> である。 $D$ -HMQC-IR に  $D_{IS}$  recoupling を適用する際には MAS の不安定性は  $D$ -HMQC-DR ほど厳しくはないため、SFAM<sub>1</sub> を用いても大きな  $t_1$  ノイズは発生しない。SFAM<sub>1</sub> は CSA や RF offset にロバストであるので、 $t_1$  展開で幅広いスペクトルを取得するのに適している。このような理由から  $^{71}\text{Ga}$ - $^{77}\text{Se}$  相関実験でも SFAM<sub>1</sub> を使用している。本研究では SFAM<sub>1</sub> の RF offset と CSA へのロバスト性能をさらに向上させることを試みた。

SFAM<sub>1</sub> の RF offset と CSA に対するロバスト性能は R element で使用している Adiabatic pulse のパフォーマンスに由来すると考える。この点において、SFAM<sub>1</sub> の Sin/Cos 関数はベストとは言えない。本研究では SHAP (Short High Adiabatic Pulse) のコンセプトで使用された Tanh/Tan パルスを適用することを試みた [25]。SHAP は Adiabatic pulse に対して短いパルス幅と高い RF 磁場強度を用いることで、CSA や、常磁性のような大きな異方性が存在した場合にも MAS 条件において inversion を高効率で達成する。実施することは SFAM<sub>1</sub> の波形を Tanh/Tan 関数 (tt) に変えるだけである。Tanh/Tan パルスの RF 磁場は

$$\omega_{nutI}(t) = \begin{cases} \omega_{1I}^{max} \tanh[2\xi t/\tau_p] & 0 \leq t < \tau_p/2 \\ \omega_{1I}^{max} \tanh[2\xi(1-t/\tau_p)] & \tau_p/2 \leq t < \tau_p \end{cases}$$

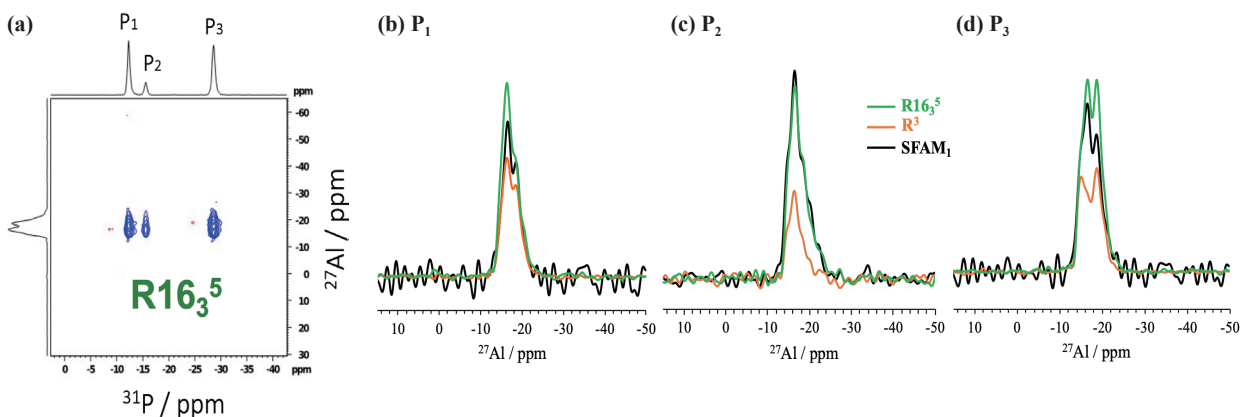
である。位相と RF offset は

$$\phi_I(t) = \frac{\Delta\omega_{0I}^{max}}{2\theta \tan(\theta)} \ln \left\{ \cos \left[ \theta \left( 1 - 2 \frac{t}{\tau_p} \right) \right] \right\}, \quad \Delta\omega_{0I}(t) = \frac{\Delta\omega_{0I}^{max}}{\tan(\theta)} \tan \left[ \theta \left( 1 - 2 \frac{t}{\tau_p} \right) \right]$$

である。実際の測定では位相を変化させることで周波数掃引を達成する。ここで、 $\xi = 10$  と  $\tan(\theta) = 20$ 、 $\tau_p$  はパルス幅である。SFAM<sub>1</sub> と、Tanh/Tan を用いた  $D_{IS}$  recoupling である  $R2_1^{-1}(tt)$  の波形を Fig.10a に示す。

Adiabatic pulse の性能の違いに関して、Adiabatic pulse の quality factor  $Q^{(1)}$  を用いる評価では不十分であることが近年指摘されており、代わりに Superadiabatic factor  $Q_s$  の評価が提案されている [26]。本研究では  $Q_s$  を用いて SFAM<sub>1</sub> と  $R2_1^{-1}(tt)$  を比較した。詳細な結果は Ref[24] を参照いただきたいが、 $R2_1^{-1}(tt)$  の  $Q_s$  がより高いことが確認され、Tanh/Tan パルスを用いた方が RF offset と CSA にロバストであることが予期された。

実際に  $^{13}\text{C}$ - $\{^{31}\text{P}\}$ - $D$ -HMQC-IR のシミュレーションと測定試料 VPI-5 ( $\text{Al}_3(\text{PO}_4)_3(\text{H}_2\text{O})_5$ ) に対する  $^{27}\text{Al}$ - $\{^{31}\text{P}\}$ - $D$ -HMQC-IR (Fig.10b,c) の結果から、RF offset と CSA に対して、 $R2_1^{-1}(tt)$  は SFAM<sub>1</sub> あるいは REDOR よりもロバストであることが示された。一方、Fig.10b,c の結果から、RF 磁場強度を小さくす



**Fig.9**  $\text{Na}_7\text{Al}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_4(\text{PO}_4)$ : (a)  $^{31}\text{P}$ - $^{27}\text{Al}$  2D spectra obtained by  $^{31}\text{P}$ - $\{^{27}\text{Al}\}$   $D$ -HMQC with  $R16_3^5$  and experimental  $F_1$  slices observed for (b)  $P_1$ , (c)  $P_2$  and (d)  $P_3$  at  $B_0 = 18.8$  T and  $\nu_R = 20$  kHz. Each  $F_1$  slice spectra was obtained by  $R16_3^5$  (green),  $R^3$  (orange) and SFAM<sub>1</sub> (black). Adapted with permission from [22]. Copyright 2017, Elsevier.

る、あるいは MAS を高速化すると、 $Q_s$  の低下により RF offset と CSA へのロバスト性能が低下することがわかる。従って、 $R2_1^{-1}(tt)$  のメリットを活かすにはなるべく低い MAS 周波数で、高い RF 磁場を用いることが重要である。いずれにしても、 $\nu_R \leq 20$  kHz において  $R2_1^{-1}(tt)$  は REDOR と SFAM<sub>1</sub> よりも RF offset と CSA にロバストであるので、今後、低～中速 MAS 条件の  $D$ -HMQC-IR の測定では  $R2_1^{-1}(tt)$  が多く選択されると考えられる。最後に、著者らは  $D$ -HMQC-IR with  $R2_1^{-1}(tt)$  のデモンストレーションとして、 $^{11}\text{B}$ - $\{^{207}\text{Pb}\}$  相関実験を実施した<sup>[24]</sup>。

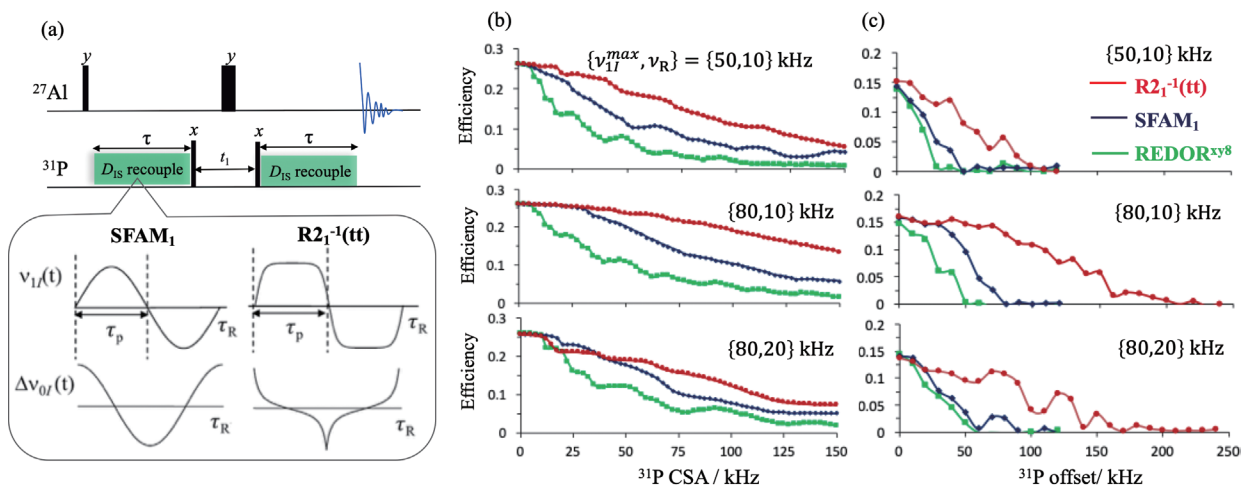
## 5. その他のテクニック

### 5.1. PT- $J$ / $D$ -HMQC<sup>[27]</sup>

$J$ / $D$ -HMQC の  $J$  coupling あるいは  $D_{IS}$  coupling による発展時間( $\tau$ )の間に WURST, DFS, HS のような Population transfer (PT) を半整数四極子核に照射し、 $\tau$  を短縮する手法である。 $\tau$  を短縮することにより、 $T_2'$  による信号のロスを回避し、結果として感度の向上を得る。 $J$  coupling による発展時間後の密度演算子は  $2\hat{I}_x\hat{C}_z \sin(\pi J\tau) + 2\hat{I}_x\hat{T}_z \sin(3\pi J\tau) + 2\hat{I}_x\hat{F}_z \sin(5\pi J\tau)$  である。 $\hat{C}_z, \hat{T}_z, \hat{F}_z$  は CT, 3 量子, 5 量子の Fictitious operator に相当する。従って、上式から ST 項の方が CT 項よりも展開が速い。これから、一つ目の CT 選択的パルスの前に PT パルスの照射により、 $\hat{I}_x\hat{T}_z$  と  $\hat{I}_x\hat{F}_z$  を  $\hat{I}_x\hat{C}_z$  に変換し、二つ目の CT 選択的パルスの後に  $\hat{I}_x\hat{C}_z$  を  $\hat{I}_x\hat{T}_z$  と  $\hat{I}_x\hat{F}_z$  に戻す。このように ST 項を参加させることで、 $\tau$  を短縮する。

### 5.2. MQ- $D$ -RINEPT

MQMAS と HETCOR の組み合わせは MQ-CP-HETCOR<sup>[28]</sup>、ST-CP-HETCOR<sup>[29]</sup>、MQ- $J$ -RINEPT<sup>[30]</sup>、MQ- $J$ -HMQC<sup>[31]</sup>、HMQC-ST<sup>[32]</sup> などがある。MQ- $J$ -HMQC は 3D 実験なので、かなり長い測定時間がかかるので達成は困難であり、HMQC-ST は  $S = 3/2$  にのみ適用可能である。CPMAS を使用した実験は半整数四極子核に対してロバストではなく、MQ- $J$ -RINEPT は  $J$  coupling が小さい場合、発展時間( $\tau$ )が長くなってしまふことで  $T_2'$  による信号のロスが大きくなり、感度が大幅に低下する。そこで、MQ- $D$ -RINEPT が開発された<sup>[5]</sup>。発表された  $^{27}\text{Al}$ - $^{31}\text{P}$  MQ- $D$ -RINEPT はまず  $^{27}\text{Al}$  に対して SPAM MQMAS の後、ついで、 $R^3(q=1)$  を使った  $D$ -RINEPT により  $^{31}\text{P}$  信号を検出し、 $^{27}\text{Al}$  の高分解能化した 2D スペクトルが得られる。



**Fig.10.** (a) The pulse sequence of  $^{27}\text{Al}$ - $\{^{31}\text{P}\}$   $D$ -HMQC-IR with SFAM<sub>1</sub> or  $R2_1^{-1}(tt)$ . (b) Simulated robustness to  $^{31}\text{P}$  CSA by  $^{13}\text{C}$ - $\{^{31}\text{P}\}$   $D$ -HMQC-IR. (c) Experimental robustness to  $^{31}\text{P}$  offset with VPI-5 ( $\text{Al}_3(\text{PO}_4)_3(\text{H}_2\text{O})_5$ ) at  $B_0 = 9.4$  T. The condition of RF field and MAS frequency:  $\{\nu_{1f}^{max}, \nu_R\} = \{50, 10\}$  kHz in top,  $\{\nu_{1f}^{max}, \nu_R\} = \{80, 10\}$  kHz in middle,  $\{\nu_{1f}^{max}, \nu_R\} = \{80, 20\}$  kHz in bottom. Each data is obtained by  $R2_1^{-1}(tt)$  (red), SFAM<sub>1</sub>(blue) and REDOR<sup>xv8</sup>(green). Adapted with permission from [24]. Copyright 2018, Elsevier.

### 5.3. DNP enhanced *D*-HMQC & *D*-RINEPT

近年、動的核偏極(DNP)-NMR が発展したことで、様々な材料系に対して新たな構造解析の機会がもたらされている。現状の汎用固体 DNP-NMR 装置は 105 K の温度で MAS を実施するため、汎用の 3.2 mm LT-MAS プローブでは実質的に  $\nu_R = 12.5$  kHz が上限である。この MAS 周波数では  $^1\text{H}\{-\text{X}\}$ -*D*-HMQC を実施するメリットはないが、代わりに高感度を活かして自然存在比での  $^{13}\text{C}\{-\text{X}\}$ -*D*-HMQC を実施することができる。具体的には、 $^{13}\text{C}\{-^{27}\text{Al}\}$ -*D*-HMQC-DR with REDOR-Box<sup>[33]</sup>,  $^{13}\text{C}\{-^{14}\text{N}_{\text{OT}}\}$ -*D*-HMQC<sup>[34]</sup>,  $^{13}\text{C}\{-^{35}\text{Cl}\}$ -*D*-HMQC-DR<sup>[35]</sup>,  $^{13}\text{C}\{-^{111}\text{Cd}\}$ -*D*-HMQC<sup>[36]</sup>,  $\{^{29}\text{Si}\}$ - $^{27}\text{Al}$  *D*-RINEPT<sup>[37]</sup>などが発表されている。これらはまず CPMAS により  $^1\text{H}$  から 1/2 核に分極移動してから実施される。従って、必然的に *D*-HMQC-DR が使用され、*D*-RINEPT の場合は検出核が四極子核になる。また、 $\{^1\text{H}\}$ - $^{17}\text{O}$  PRESTO-II-QCPMG は自然存在比での OH の  $^{17}\text{O}$  観測を簡便に実施するのに適している<sup>[38]</sup>。しかしながら、 $\nu_R = 12.5$  kHz の条件では R18<sub>2</sub><sup>5</sup>あるいはR18<sub>1</sub><sup>7</sup>の *D*<sub>II</sub> decoupling の性能が不十分なため、 $^1\text{H}$  から遠い  $^{17}\text{O}$  (金属酸化物の場合には骨格の酸素)や、低周波数核(e.g.<sup>47,49</sup>Ti, <sup>95</sup>Mo)には分極移動の効率が著しく低下する。このあたりの技術改善は現在著者らが実施しており、近く発表予定である。

### 6. おわりに

本記事を書いているうちに最初の基礎的な話が少々長くなってしまったが、まだ十分に記述できていないため厳密な議論は元文献を参照していただきたい。後半は  $\nu_R \leq 20$  kHz の MAS 条件での *D*-HMQC と *D*-RINEPT について、著者の博士課程の結果を中心に手法改良とアプリケーション例について紹介してきた。高速 MAS だけでなく、通常の HXY 3.2 mm あるいは 4 mm MAS プローブで実験が達成できることは魅力的であり、無機材料を中心にまだ多くのアプリケーションが潜在していると思われる。また、近年発展した DNP-NMR による感度の向上と合わせて、*D*-HMQC、*D*-RINEPT の適用例が増えていくことが期待される。DNP-NMR では必然的にここで述べたような低い MAS 周波数に適応したパルスシーケンスが求められる。また、これからますますの NMR 装置の高磁場化が進むにつれて、半整数四極子核の高分解能化、高感度化が進み、無機材料に対して *D*-HMQC、*D*-RINEPT を活用する場面が増えていくと期待される。本解説記事が四極子核を含む相関実験の発展と他材料への適用の一助になれば幸いである。

### 謝辞

本解説記事で紹介した研究結果はリール大学の博士課程在学中に実施されました。Olivier Lafon 教授、Julien Trébosc 博士、Frédéric Pourpoint 博士、François Mear 博士、Jean-Paul Amoureux 教授をはじめ、共同研究者の方々に感謝申し上げます。

### References

- [1] G. Tricot, O. Lafon, J. Trébosc, L. Delevoye, F. Méar, L. Montagne, J.-P. Amoureux, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 16786–16794.
- [2] M. H. Levitt, in *EMagRes*, John Wiley & Sons, Ltd, **2007**.
- [3] A. Brinkmann, M. H. Levitt, *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 357.
- [4] T. Kamihara, M. Murakami, Y. Noda, K. Takeda, K. Takegoshi, *Journal of Magnetic Resonance* **2014**, *245*, 94–97.
- [5] C. Martineau, B. Bouchevreau, F. Taulelle, J. Trébosc, O. Lafon, J. P. Amoureux, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 7112–7119.
- [6] T. G. Oas, R. G. Griffin, M. H. Levitt, *The Journal of Chemical Physics* **1988**, *89*, 692–695.
- [7] M. Edén, *Chemical Physics Letters* **2003**, *378*, 55–64.
- [8] A. Brinkmann, A. P. M. Kentgens, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14758–14759.
- [9] T. Gullion, J. Schaefer, *Journal of Magnetic Resonance* **1989**, *81*, 196–200.
- [10] R. Fu, S. A. Smith, G. Bodenhausen, *Chemical Physics Letters* **1997**, *272*, 361–369.
- [11] Z. Gan, J. P. Amoureux, J. Trébosc, *Chemical Physics Letters* **2007**, *435*, 163–169.
- [12] S. Cavadini, S. Antonijevic, A. Lupulescu, G. Bodenhausen, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 1363–1374.
- [13] M. Shen, S. Wegner, J. Trébosc, B. Hu, O. Lafon, J. P. Amoureux, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **2017**, *87*, 111–116.
- [14] J. Trébosc, B. Hu, J. P. Amoureux, Z. Gan, *Journal of Magnetic Resonance* **2007**, *186*, 220–227.
- [15] X. Zhao, W. Hoffbauer, J. Schmedt auf der Günne, M. H. Levitt, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **2004**, *26*, 57–64.
- [16] R. Giovine, J. Trébosc, F. Pourpoint, O. Lafon, J.-P. Amoureux, *Journal of Magnetic Resonance* **2019**, *299*, 109–123.
- [17] H. Nagashima, G. Tricot, J. Trébosc, O. Lafon, J.-P.

- Amoureux, F. Pourpoint, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **2017**, *84*, 164–170.
- [18] <https://www.nmr-service.de/redor-box.html>
- [19] S. Xin, Q. Wang, J. Xu, N. Feng, W. Li, F. Deng, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **2017**, *84*, 103–110.
- [20] H. Nagashima, J. Trébosc, L. Calvez, F. Pourpoint, F. Mear, O. Lafon, J.-P. Amoureux, *Journal of Magnetic Resonance* **2017**, *282*, 71–82.
- [21] P. G. Ghemard, S. Jaulmes, J. Etienne, J. Flahaut, *Acta Cryst.* **1983**, *C39*, 968–971.
- [22] H. Nagashima, A. S. Lilly Thankamony, J. Trébosc, F. Pourpoint, O. Lafon, J. P. Amoureux, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **2017**, *84*, 216–226.
- [23] F. A. Perras, M. Pruski, *Journal of Magnetic Resonance* **2019**, *298*, 31–34.
- [24] H. Nagashima, A. S. Lilly Thankamony, J. Trébosc, L. Montagne, G. Kervern, J.-P. Amoureux, O. Lafon, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **2018**, *94*, 7–19.
- [25] G. Kervern, G. Pintacuda, L. Emsley, *Chemical Physics Letters* **2007**, *435*, 157–162.
- [26] M. Deschamps, G. Kervern, D. Massiot, G. Pintacuda, L. Emsley, P. J. Grandinetti, *The Journal of Chemical Physics* **2008**, *129*, 204110.
- [27] Q. Wang, Y. Li, J. Trébosc, O. Lafon, J. Xu, B. Hu, N. Feng, Q. Chen, J.-P. Amoureux, F. Deng, *The Journal of Chemical Physics* **2015**, *142*, 094201.
- [28] S. H. Wang, S. M. De Paul, L. M. Bull, *Journal of Magnetic Resonance* **1997**, *125*, 364–368.
- [29] R. Siegel, J. Rocha, L. Mafra, *Chemical Physics Letters* **2009**, *470*, 337–341.
- [30] J. W. Wiench, M. Pruski, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **2004**, *26*, 51–55.
- [31] C. M. Morais, V. Montouillout, M. Deschamps, D. Iuga, F. Fayon, F. A. A. Paz, J. Rocha, C. Fernandez, D. Massiot, *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, 942–947.
- [32] J. Trébosc, O. Lafon, B. Hu, J.-P. Amoureux, *Chemical Physics Letters* **2010**, *496*, 201–207.
- [33] F. Pourpoint, A. S. L. Thankamony, C. Volkringer, T. Loiseau, J. Trébosc, F. Aussenac, D. Carnevale, G. Bodenhausen, H. Vezin, O. Lafon, et al., *Chem. Commun.* **2013**, *50*, 933–935.
- [34] A. J. Rossini, L. Emsley, L. A. O' Dell, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 12890–12899.
- [35] D. A. Hirsh, A. J. Rossini, L. Emsley, R. W. Schurko, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 25893–25904.
- [36] L. Piveteau, T.-C. Ong, A. J. Rossini, L. Emsley, C. Copéret, M. V. Kovalenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13964–13971.
- [37] M. Valla, A. J. Rossini, M. Caillot, C. Chizallet, P. Raybaud, M. Digne, A. Chaumonnot, A. Lesage, L. Emsley, J. A. van Bokhoven, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10710–10719.
- [38] F. A. Perras, T. Kobayashi, M. Pruski, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8336–8339.



永島 裕樹 (ながしま・ひろき)

2007年3月 東邦大学 理学部 物理学科 卒業  
 2009年3月 東京大学 新領域創成科学研究科 物質系専攻 修士課程 修了  
 2009年4月 株式会社ブリヂストン 入社  
 2014年6月 株式会社ブリヂストン 退職  
 2014年10月 リール大学 触媒・固体化学研究所 博士課程 入学  
 2017年11月 リール大学 触媒・固体化学研究所 博士課程 Ph.D. 取得  
 2017年11月 リール大学 触媒・固体化学研究所 特別研究員  
 2018年4月 産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター 入所  
 現在に至る



# DFT計算支援による天然物のNMR解析

<sup>1</sup>弘前大学農学生命科学部、<sup>2</sup>北海道大学農学部、<sup>3</sup>米国Wavefunction社

橋本 勝<sup>1</sup>、福士 江里<sup>2</sup>、Warren Hehre<sup>3</sup>

hmasaru@hirosaki-u.ac.jp<sup>1</sup>, feria@cen.agr.hokudai.ac.jp<sup>2</sup>, hehre@wavefun.com<sup>3</sup>

## 初めに

NMRスペクトル解析は天然物の構造を解析する上で最も有効な非破壊分析手法といえる。NMR現象は他の分光法に比べ感度は低いが、フーリエ変換型装置の普及は数mgのサンプルでの詳細な構造解析を可能にした。さらに、1980年代以降にはさまざまな二次元スペクトルが開発され、短時間の訓練により高度で確実な構造決定が可能となった。NMR現象からはさまざまな構造情報が得られるが、その中でも化学シフトは最も重要である。機器分析の教科書には化学シフトと周辺官能基との関係を示す表が示されているが、実際には複数の周辺官能基が影響する。また、立体化学に基づく磁気遮蔽効果などの影響も大きく単純とはいえない。特に<sup>13</sup>C NMRスペクトルでは、感度不足を補うためプロトンとのスピントカップリングを除去した分裂のない1重線として観測するため、カップリング情報などを得にくく、新規な構造の場合、<sup>13</sup>Cシグナルの帰属は経験者といえども類縁化合物の値と比較をしながら慎重に行う必要がある。HMQCやHMBCなどの二次元スペクトルは<sup>13</sup>Cシグナルの帰属を支援する有用な手段ではあるが、感度や分解能の点で不十分なケースも少なくない。

近年はNMR化学シフト帰属を支援するプログラムも開発されている。例えば構造式描画プログラムChemDraw<sup>®</sup>では内部データベースを参照することで、構造から瞬時に化学シフトを予想することができる<sup>[1]</sup>。化合物によっては極めて精度が高いが、*E/Z*異性体など一部を除き立体化学を考慮した予想はできない。帰納的手法なため、データベースでカバーできない新奇な骨格や、複数の官能基との組み合わせを持つ化合物では不安が残る。

一方、分子軌道法をもとにした分子モデリングでは理論的な磁気遮蔽に基づく演繹的な化学シフト予想が可能である。本手法の場合、存在しない

構造や官能基を持った化合物といえどもその予想が可能である。量子化学計算手法及びコンピュータ技術の発展は計算による予想精度を実用レベルにまで高めるだけでなく、今世紀初頭にはスーパーコンピュータを要した計算も、現在はPCワークステーションレベルで実行可能とした。

本稿で紹介する<sup>13</sup>C NMR化学シフト計算は、密度汎関数法を用いる。量子化学計算は波動関数を近似するHartree Fock法を中心に進展してきたが、電子密度から物性を計算する密度汎関数法は、同精度で考えた場合計算コストが低いことから<sup>[2]</sup>、近年では主流となっている<sup>[3]</sup>。しかし、汎関数を構築する普遍的な理論は存在せず、構造化学、反応化学といったそれぞれのシーンで実験結果を再現するように様々な汎関数が開発されてきた。言い換えれば、非経験手法と思われがちだが密度汎関数法は経験パラメータを有しており、その選択では経験的要素が入り込む。開発段階での対象分子群については精度よく再現する。しかし、開発時に対象となった構造群以外では、検証すらされていないといっても過言ではない。汎関数によって得手不得手があり<sup>[4]</sup>、万能な汎関数は存在しない。文献では汎関数にB3LYPを用いた計算報告を最も多く見かける<sup>[5]</sup>。しかし、多様な構造空間と高い配座自由度を特徴とする天然物有機化合物において、汎関数B3LYPの有効性が検証された例は少ない<sup>[6]</sup>。

10年近く前になるが、橋本はWavefunction社Spartanに装備された化学シフト計算の高精度に感動し、開発者で本稿共著者でもあるW. Hehreに、天然物化学領域で応用することができれば素晴らしいと相談していた<sup>[7,8]</sup>。最近Wavefunction社は、天然物の<sup>13</sup>C NMR化学シフト予測を視野に入れ最適化したSpartan'18をリリースした<sup>[9]</sup>。Wavefunction社では、本手法について2,000を超える天然物のNMRデータと比較検証し、実用レベルにあることを証明している。その過程で、い

くつかの天然物においてNMRシグナル帰属に不具合が見いだされ、橋本と福士はその原因を文献、過去の化合物などから探り、一部ではあるが帰属ミスやより適切な構造の提案をするに至った<sup>[10,11]</sup>。本稿では、Spartan'18による<sup>13</sup>C NMR化学シフト計算法の特徴と有用性、および天然物構造決定への応用例を紹介する。

## 1. NMR 化学シフト計算プログラムの特徴と Spartan'18 における 包括的プロトコルの開発<sup>[11]</sup>

### 1-1. DFT法によるNMR化学シフト計算の概要

NMR化学シフトはすべての量子化学計算で算出可能であるが、計算精度、計算コストの点から専ら密度汎関数(DFT)法が用いられている。DFT法では、汎関数(考え方)と基底関数(精密さ)を組み合わせ安定構造を求め(ステップ1)、各原子核の磁気遮蔽から化学シフトに変換する(ステップ2)。用いる汎関数、基底関数の違いで予想される化学シフトは大きく異なる場合も少なくない。安定構造は、用いる汎関数や基底関数にあまり依存しないということであろうか、ステップ1を比較的低コストの基底関数6-31G\*レベルで行い、ステップ2で基底関数のレベルを高くして計算する例が多いようである。スペクトル計算では汎関数にB3LYPやmPW1PW91、基底関数に6-31G\*<sup>[12]</sup>や6-311+G(2d,p)などを用いた文献を多く見かける。Tantilloらの総説では、<sup>13</sup>C NMR化学シフトの実測値との差異の二乗平均平方根(RMSD)は、精度の高いもの(mPW1PW91/6-311+G(2d,p))で4-5 ppm程度である<sup>[6]</sup>。平面構造の違いであれば十分な議論が可能だが、異性体を識別するには3 ppm以下の精度が欲しい。

### 1-2. Spartan シリーズの紹介

Spartan シリーズは、共著者W. Hehreが開発したWindowsやMac OSといった通常のパソコンを用いて、グラフィック環境でほぼすべての計算条件の設定、結果の解析が可能な、実験化学者にやさしい分子モデリングプログラムである。搭載された汎関数や基底関数、計算可能なスペクトルの種類は多くはないものの、実用性を重視した装備がなされており、構造解析やエネルギー計算では不便を感じることはない<sup>[13]</sup>。最大の特徴は、一つのファイルで配座探索を含めた安定配座グ

ループの物性が計算可能な点で、天然有機化合物のような配座自由度の高い分子の解析には頼もしいソフトウェアである。最新版Spartan'18では、特に天然有機化合物の<sup>13</sup>C NMRスペクトル化学シフトの再現を重視してプロトコルを最適化している。

計算にはPCワークステーションの利用が望ましいが、CPUの冷却に注意すれば、ゲーム用デスクトップ機でも十分対応可能である。ノートパソコンではスペクトル計算に用いるのはさすがに難しいかもしれない。複数のCPU(コア)に分散して計算を実行する並列化にも対応しており、コア数の多いCPUの方が有利である。メモリはコアあたり2-4 GB必要となる。尚、Spartan'18は利用できるコア数により3つのバージョンが用意されている。最上位バージョンではコア数に制限がなくなる。しかし、これを活かすにはハードウェアも高価になることから、頻繁に計算するのでなければ必要ないかもしれない。計算経過を頻繁にハードディスクに書き込むため高速な書き込みが可能なSSD(ソリッドステートドライブ)の利用が推奨されている。ただし、SSDは書き込み回数に限界があるため、データは別のハードディスクに保存することが賢明といえる<sup>[14]</sup>。

### 1-3. Wavefunction における

#### <sup>13</sup>C NMR化学シフト計算プロトコルの開発

天然有機化合物は、C、H、O、Nといった軽元素を中心に構成される。ハロゲンを含む天然物も見受けられるが、一般に原子番号は小さく、取り扱う元素としては計算化学が御しやすい分子群といえる。一方、DFT計算の主戦場である構造化学などではあまり取り扱わない、狭い空間に複数の官能基を有する、或いは配座自由度が高いといった化合物も珍しくなく、汎関数の開発段階で天然物の物性再現性の検証が十分になされたかは疑問である。

#### 1-3-1. 汎関数・基底関数の決定

Wavefunctionでは、遠隔相互作用を考慮する $\omega$ B97X-Dを汎関数に採用して、計算条件の最適化・精度の確認を行った。基底関数レベルを高くすれば、計算コストは増大するが原理的には計算精度は高くなる。しかし、実際に再現性が高くなるとは限らないため、実用性を考えると基底関数の設定は極めて重要であるといえる。

配座異性体が存在せず、また、分子内に多彩な炭素原子を含む特長を活かしてstrychnineをモデル分子に、様々な基底関数で $^{13}\text{C}$ 化学シフトを計算した。その結果、計算コストの比較的低い6-31G\*レベルで満足できる結果を与え、基底関数のレベルを高くしても計算精度は向上しないことを確認し、組み合わせ $\omega\text{B97X-D/6-31G}^*$ を化学シフト計算のエンジンとして設定した<sup>[15]</sup>。

この方法を用い、配座異性体が存在しない20化合物の化学シフト(370炭素)に適用させたところ、 $\text{sp}^3$ 領域(10~75ppm)では実験値を極めてよく再現したが、 $\text{sp}^2$ 領域など(110~175ppm)では差異が大きくなり、全体の平均RMSDは3.4ppmと実用に十分とはいえない結果であった。Wavefunction社では、上記差異は計算手法に由来すると想定し、各炭素核の周辺環境に基づいて5つのパラメータで補正することで、精度は1.5-2.0ppmまで向上した。

### 1-3-2. 配座解析の最適化と自動化

天然有機化合物の多くには複数の配座異性体が存在する。配座間相互変化の速度が極めて遅い場合を除き、観測される化学シフトは各配座のボルツマン分布で傾斜をかけた平均値となる。我々は何気なく配座のボルツマン分布といった議論を行うが、実験的に配座間のエネルギー差を求めた例は少ない。Wavefunction社では、比較的簡単な分子群について、現在最も精度の高いとされる結合クラスター法で求めた配座エネルギーを再現する条件を実用的計算時間も考慮して探索し、 $\omega\text{B97X-V/6-311+G(2df,2p)[6-311G}^*]$ を選択した<sup>[16]</sup>。採用した基底関数はデュアル基底関数と呼ばれるもので、6-311+G(2df,2p)レベルの計算を比較的高速に実行できることが特徴である。とはいえ6-31G\*に比べ格段に高コストとなるため、 $\omega\text{B97X-D/6-31G}^*$ で求めた配座を固定したまま、 $\omega\text{B97X-V/6-311+G(2df,2p)[6-311G}^*]$ でエネルギーを見積もり、ボルツマン分布を計算する手法を採用している。

次に配座探索法である。Spartanシリーズでは早くから配座解析プロトコルを装備しており、その実績から信頼性は高い。回転可能な結合がn箇所とした場合、単純に考えると探索すべき配座数は $3^n$ となり、天然物では探索する初期配座が数万配座を超えることも少なくない。これらすべてを丁寧に計算していたら、コンピュータの性能が

高くなったとはいえ非現実的な計算時間が必要となる。一般には、計算コストの低い分子力場法で広く配座を探索し、徐々に計算レベルを上げながら配座を絞り込むが、重要配座を見落とすことなく効率よく探索するには経験が必要であった。一方、Spartan'18では、これまでの知見をもとに上記プロセスを自動化したプログラムを装備した。これにより、構造を入力するだけで、①配座探索、②配座の絞込み、③ボルツマン分布計算、④化学シフト計算、⑤ボルツマン分布に基づく化学シフトの補正を一括して効率よく行うことができるようになった。本機能は、計算化学になじみの少ない実験化学者には朗報である。各段階での設定変更も可能だが、筆者(橋本)はその必要性を感じることは少ない。配座探索のアルゴリズムも改良され、性能が向上しており、比較的配座自由度の小さい環状セスキテルペンの場合では、Core-i7クラスのPCで約1-2日での計算が可能である。

ここで、いくつかの注意点がある。例えばヘキシル基の存在は配座探索初期配座を80倍に増大させるように、直鎖構造は著しく計算時間を増大させる。したがって、ヘキシル基のような直鎖構造の配座の違いからNMR化学シフトの議論を行う場合には慎重になる必要がある。そのため、計算ではこのような側鎖はメチル基やエチル基に置換して計算することが賢明かもしれない。また、カルボン酸のように電荷を持つ官能基は、ありえない分子内水素結合を形成した配座を安定配座として予想してしまうことがある。これは、メチルエステルとすることで解決できると思われるが、探索する配座数が5倍以上となるため除去してしまうのも一つのアイデアである。ポリペプチドは上記2点の問題を併せ持つため、計算する意味すら疑問である。

### 1-4. 天然有機化合物を用いた計算精度の検証

Wavefunctionでは、二段階で実際の天然物化学シフトに適用させその実用性を検証した。まず、X線結晶解析、或いは全合成がなされた構造が確かな分子量150-750の約875天然物に適用させた(A群)。データは日本電子(株)の“CH-NMR-NP database”<sup>[17]</sup>、および2019年までに報告された論文などを活用した。その結果、平均RMSD値は1.8ppmと十分に満足のできるものであった(図1)。

次に、NMRスペクトル解析を中心に構造決定された1,725個の天然物 (B群) に適用させたところ、そのほとんどで満足できる精度で実験値を再現、本手法の有効性を実証した。結晶解析がなされていないB群の化合物では、配座自由度が高く結晶性が低いものも多く含まれる。B群では計算精度が若干低くなったが、配座とエネルギーの再現性、即ち重要配座の寄与率の再現性が主な原因と推察している。また、本プロトコルでは真空条件を想定しており、溶媒条件を考慮していない。天然物の構造決定では溶媒効果を考慮して化学シフトを計算した論文も少なくない。しかし、現在の溶媒モデルは溶媒を分子としてではなく分極する連続体として扱うシミュレーションであり、NMR再現において重要となる溶媒分子との水素結合のような溶媒-溶質間相互作用は原理的に考慮していないことを把握すべきである。Spartanも溶媒モデルとしてC-PCM法を備えているが、その効果は全く不明である。計算時間も著しく増大することから、溶媒効果の加味についてWavefunctionは消極的である。筆者(橋本)は、配座変換が容易な、いわゆる「柔らかい分子」については、エントロピー項の考慮も必要と感じているが、本プロトコルでは電子相互作用のエネルギーのみで配座のボルツマン分布を求めている。今回の検証から、溶媒効果などを考慮しない本プロトコルにおいても、十分な精度で $^{13}\text{C}$  NMR化学シフトを再現することが確認された。また、本プロトコルの実験値との平均RMSDが約2ppmであることが証明されたが、この値は従前法(約4ppm)と比べ明らかに精度が向上しており、ジアステレオマーや配座異性体をも区別できるレベ

ルといえる。Wavefunctionでは、これら計算結果についてWeb上 (<http://nmr.wavefun.com>) で公開しており、不定期だが更新している。

なお、汎関数にB3LYPを設定することも可能である。筆者が行った限りでは、B3LYPにおいても満足できる精度で $^{13}\text{C}$  NMR化学シフトが再現されている。計算では同時に $^1\text{H}$  NMR化学シフト値も計算される。カタログでは0.1ppm程度の精度と書かれているが、 $^1\text{H}$  NMR化学シフトの場合、溶媒の異方性効果などを受けやすく、Wavefunction社では詳細な検証を行っていない。

## 2. 計算値との化学シフト差異が大きかった天然物の検証

図1に示すように、本手法は平均RMSD値が約2ppmと極めて高い精度で天然物 $^{13}\text{C}$ 化学シフトを再現した。しかし、X線結晶解析、或いは全合成によって構造が確かなA群といえども、実験値-計算値のRMSDが4ppmを超える例が存在した。これまでに検証した精度を考えると、許容できるものではないため、次に我々はそれらの原因について探った。

### 2-1. 帰属の入れ替わりが示唆された例

多くの場合、その原因を明確にすることはできなかったが、いくつかの例では帰属シグナルの入れ替えなどで差異が顕著に小さくなることが判明した [図2: Daldinone C (1)<sup>[18]</sup>、13,18,20-epi-isochandonanthone (2)<sup>[19]</sup>、mycolectodiscin A (3)<sup>[20]</sup>、5-bromo-8-methoxy-1-methyl- $\beta$ -carboline (4)<sup>[21]</sup>、Simaroubin E (5)、Simaroubin A (6)<sup>[22]</sup>、wortmin (7)<sup>[23]</sup>]。化合物4の場合、C4はエナミ

### ωB97-D/6-31G\* based $\delta^{13}\text{C}$ (empirically corrected)

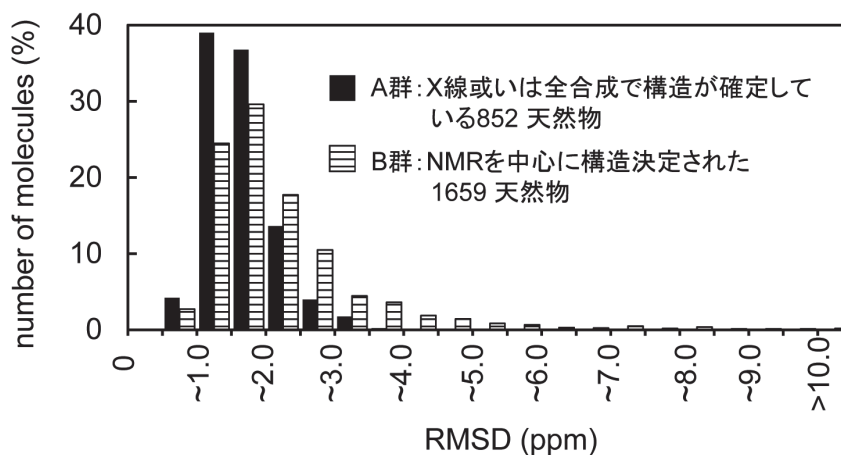


図1 Spartan'18の $^{13}\text{C}$  NMR化学シフト計算プロトコルの天然物を用いた検証

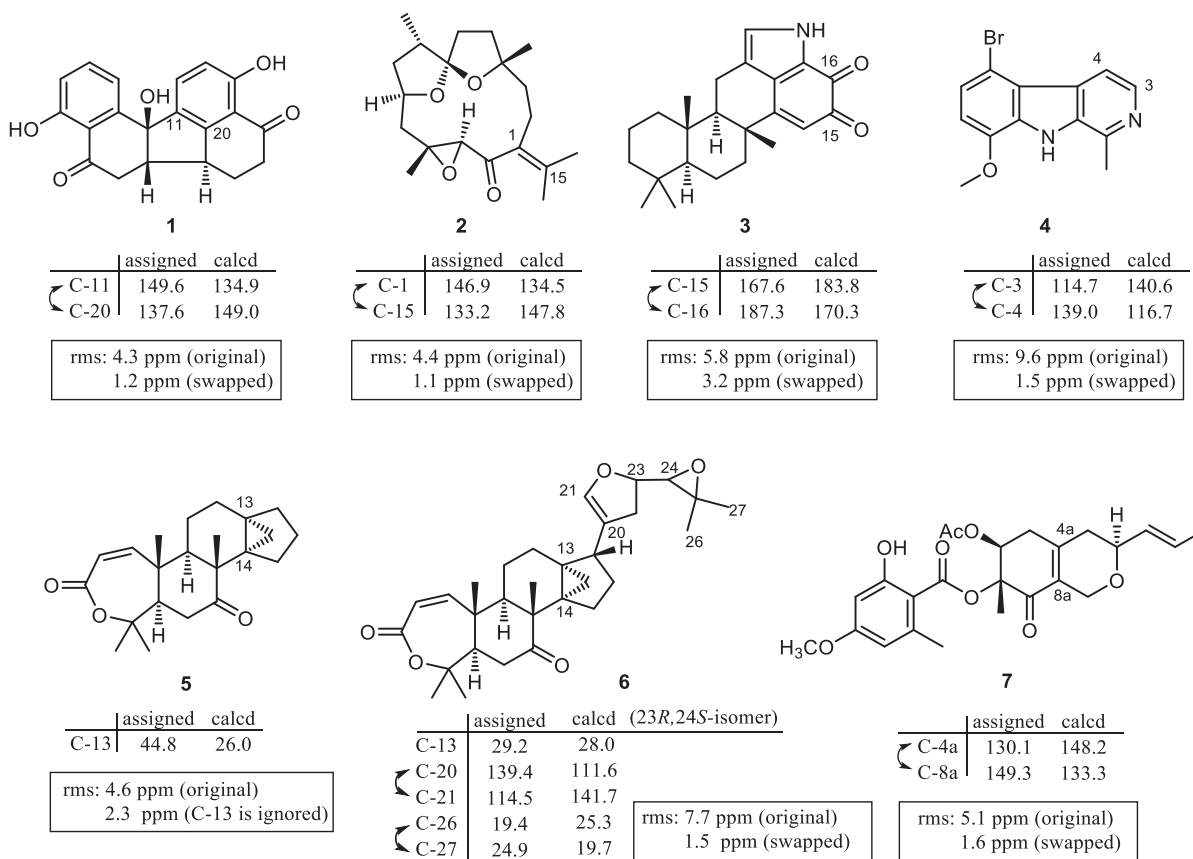


図2 帰属炭素の入れ替えで計算値との差異が十分に小さくなった例

ンの $\alpha$ 炭素であり窒素原子による遮蔽で説明できるが、計算によるサポートが有るからこそ可能な議論かもしれない。化合物**5**のC-13の化学シフトは、化合物**6**のC-13と比較してみると入力ミスと思われる。C-13を除いてRMSDスコアを再計算すると2.3ppmと許容範囲の値となった。いずれの場合も、問題となった炭素周辺に水素原子が不在なため、帰属はHMBCスペクトルを頼ることになるが、多様な構造を有する天然物の $^1J_{C/H}$ を経験的に予想することは容易ではなく、このような場合には計算による化学シフトの確認は有用といえる。

## 2-2. 別の構造を提案した例

新たな構造を提案することで計算値との差異が著しく減少する例も経験した。Gunnilactam A (**8**)はX線構造も報告されている<sup>[24]</sup>。しかし、実験値とのRMSDは11.0ppmと、とても許容できるものではなかった。結晶状態と溶液では配座が大きく異なることを期待して、初期配座を強制的に変化させて計算してみたが、新たな配座は見つからなかった。種々検討したところ、窒素原子に隣接した $sp^3$ 炭素で顕著な差異が見られることが判明した。そこですべての窒素原子を酸素に置換

して再計算したところ、RMSD値は2.6ppmまで減少することが判明した。しかし、論文では精密質量も報告されており、分子量で4Da間違えることは考えにくく謎が残った結果となった。

以下は、NMRを中心に構造決定がなされたB群についてである。Phyllostictine B (**9**)は、極度にひずみを持つ大環状 $\beta$ -ラクタムとして報告されていた<sup>[25]</sup>。この化合物の場合、計算値との差異RMSDは12.2ppmと大きい。有機化合物に造詣が深い研究者であれば、計算を行わなくてもどこかおかしいと疑う構造である。最近、Coxらはこの化合物のDMSO中での $^1H$ 及び $^{13}C$ 化学シフトはphaeosphaeride B (**9'**)のものとは一致すると報告した<sup>[26, 27]</sup>。そこで**9'**について計算したところ、実験値とのRMSDは3.1ppmと比較的小さくなった。しかし差異が十分に小さくなったとはいえない。我々は測定溶媒に原因があると考えた。論文には側鎖ペンチル基がヘキシル基に置き換わったphaeosphaeride A (**9''**)も報告されていた。ヘキシル基に置換されたことで、溶解性が高くなったためであろうか測定溶媒は重クロロホルムであった。そこで、側鎖について、母核から5炭素より遠くは除外して比較したところ、RMSD値は1.8ppmと十分に小さくなることが判明した。以上の結果

は極性溶媒で測定されたデータについて再現性が若干低下することを例示することとなった。

トリプロモ誘導体 laurenmariallene (**10**) では、計算値との差異 RMSD 値は 9.3 ppm と大きく、テトラヒドロピラン環上の炭素では差異が 30 ppm と極めて大きいものであった (図 3)<sup>[28]</sup>。精査したところ、この化合物の NMR データは既知のモノプロモ誘導体 panacene (**10'**)<sup>[29, 30]</sup> と一致した。**10'** について化学シフトを計算したところ RMSD 値は 1.4 ppm まで減少した。したがって **10** と **10'** は同一分子であり、計算では **10'** の構造を支持する。

アルゼンチンのマメ科植物から単離された化合物 **11** は歪んだ anti-Bredt 則構造を有している<sup>[31]</sup>。

計算では RMSD 値は 11 ppm と著しく大きい。調査したところ、1960 年代に報告された lolilide (**11'**) と NMR データが一致しており、構造 **11'** の計算値と良い一致を示した (RMSD 値 2.2 ppm)。最近、Williams らは、彼らが開発した二重結合のひずみ、理論化学シフト、理論<sup>1</sup>H スピンを総合的に評価する DU8+法によって同じ結論を得ている<sup>[32]</sup>。

### 3. 天然物の構造決定における応用例

#### 3-1. Cyclohelminthol Y の構造決定

筆者(橋本)の研究では、本手法は cyclohelminthol Y (図 4: **12a-12d**) の構造決定でその威力を発揮した<sup>[33]</sup>。これらは抗菌活性物質として

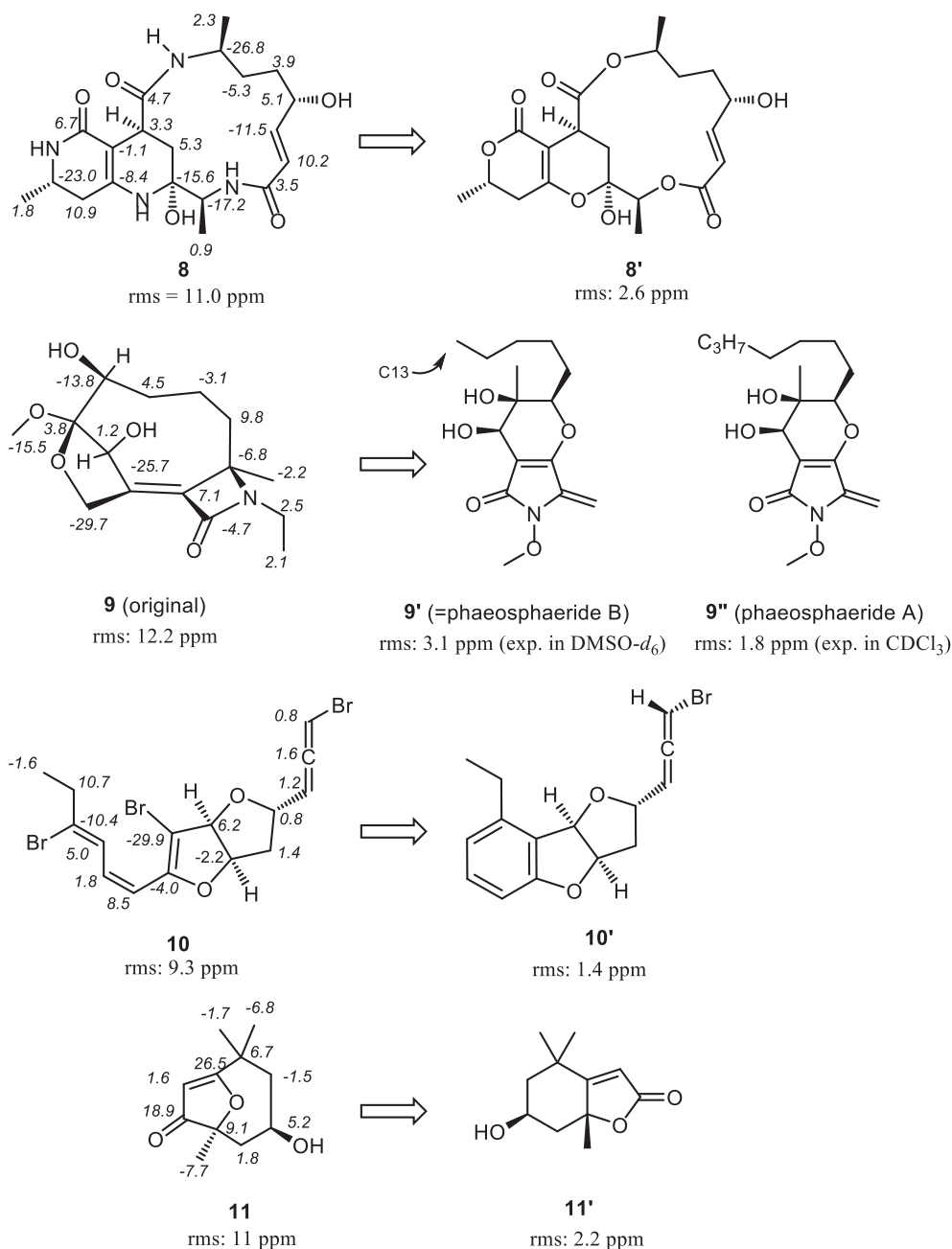


図 3 新たな構造を提案することで実験値・計算値の差異が有意に減少した例

*Helminthosporium velutinum* yone96培養液から見出した二つのスピロシクロプロパンを有する興味深い天然物である。HMBCスペクトルの解析やこれまでに単離した同菌の代謝物**13**とのスペクトルや生合成の類似性などから、**12a-12d**は、**13**の6,7-二重結合にC1'-C8'-ペンテニルシクロペンテンがシクロプロパン化により結合したC-6/C-7/C-1"に関するジアステレオマーであると推定した。6位7位の相対配置はNOE実験をもとにすべてトランス配置と帰属した。**12a-12d**間における各炭素 $^{13}\text{C}$ 化学シフトの差異の標準偏差は0.17 ppmと酷似していたが、差異がC-6/C-7/C-1'シクロプロパン部周辺に集中しており、上記推定を支持した。そこで分子モデリング計算による考察を行った。前述した理由により計算時間を考慮して16位に結合したヘキシル基をプロピル基に置換、23位カルボン酸を省略して計算した。研究を行った当時はSpartan'16が最新バージョンで

$\omega\text{B97X-V/6-311+G(2df,2p)[6-311G}^*]$ によるボルツマン分布は示されておらず、 $\omega\text{B97X-D/6-31G}^*$ に基づく立体エネルギーから各配座のボルツマン分布を算出した。

最大の問題は**12a-12d**間で $^{13}\text{C}$ 化学シフトの違いが小さいことであった。計算値とのRMSD値は、比較する異性体の如何に関わらず2-3 ppmであり、計算値から直接立体化学を特定することは不可能であった。**12a-12d**間で $^{13}\text{C}$ 化学シフト差異の標準偏差が0.2 ppm以上の炭素を抽出したところ、多くの炭素で化学シフトが大きいグループ(太文字)と小さいグループ(標準文字)に分かれることが判明した。計算値を同様に並べてみると、やはり二つのグループに分けることが出来た。そこでその組み合わせが一致するように並べ替えたところ、**Table 1**で示した組み合わせとした場合、化学シフトのパターンが天然物と計算値で完全に一致した。B3LYP/6-31G $^*$ 、

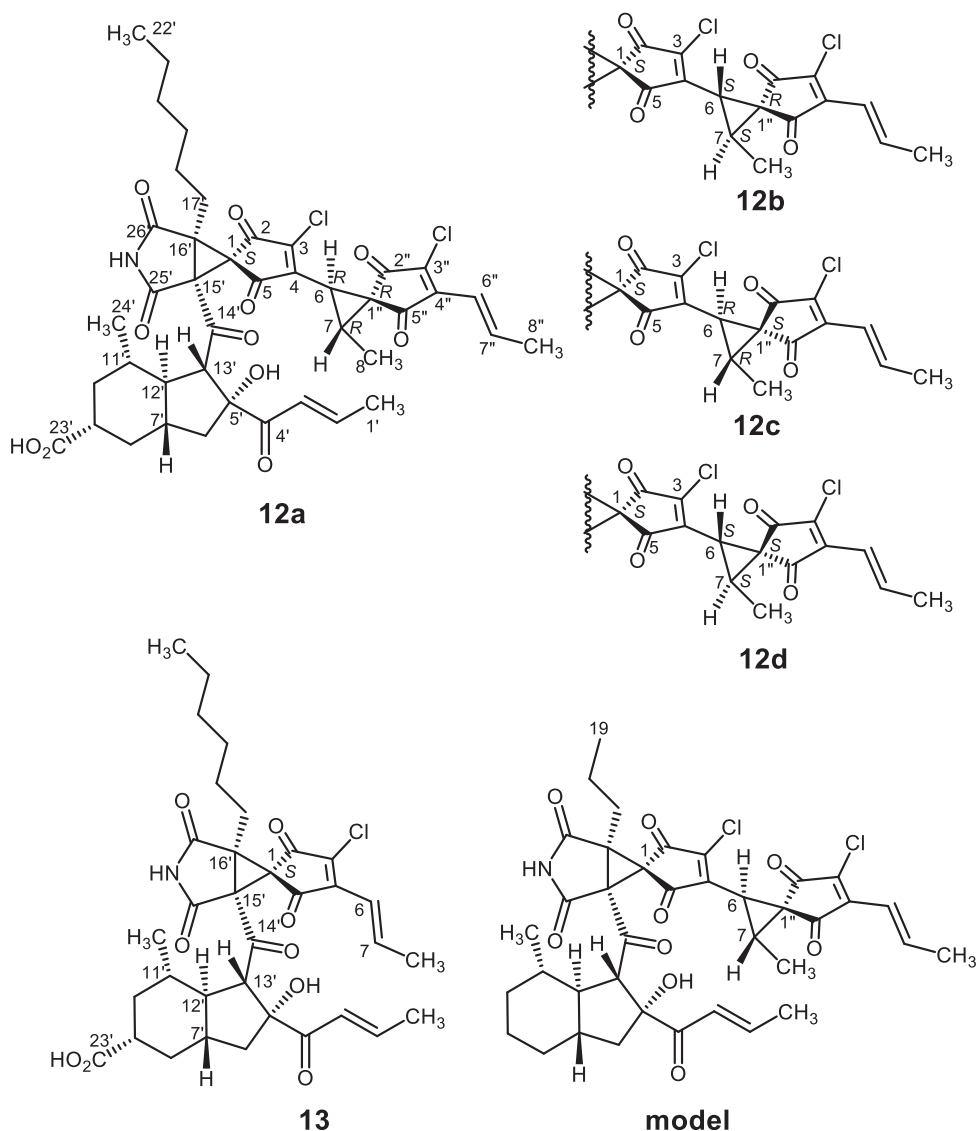


図4 cyclohelminthol Y1-Y4 (**12a-12d**)、cyclohelminthol X、及び計算に用いたmodelの構造

EDF2/6-31G\*, および  $\omega$ B97X-D/6-311G\* と条件を変えて計算を行ったが同じ結果が得られた。一方、(1R)-異性体では、組み合わせを変化させてもどこかで矛盾が生じた。以上の結果は、確率的にも偶然とするには無理があると判断し、**12a-12d**の立体配置を図4に示したように決定した。実際には、さまざまな実験的傍証も得て最終結論に導いている。

### 3-2. 遠隔CHカップリング定数 ( $^nJ_{CH}$ ) の利用

天然物構造、特に立体構造の決定の多くでは、プロトン間スピнкаップリングにおけるKarplus式やW字ロングレンジカップリング、またNOEなどが主に用いられてきた。しかし**12a-12d**のように4級炭素が連続する場合は、それらの手法を用いることができない。

$^nJ_{CH}$  値の活用も有用であるが、一部を除きその値と立体構造との関係の整理は不十分である。前章でHMBCシグナル帰属の入れ替えをいくつか提案したが、経験的知見に基づく $^nJ_{CH}$ の活用の難しさを示すものといえる。Spartan'18では、理論スピнкаップリング定数の計算を装備した。本手法も天然物の立体化学決定に重要な手段になりうる。次に、 $^nJ_{CH}$  値の計算を利用した構造決定を紹介する<sup>[34]</sup>。

Mellein (**17**) の連続したメチル基と水酸基の付け根のプロトン間の結合定数 $^3J_{H3/H4}$ は1.8Hzであり、常識的にはシス配置(構造**17'**)を想像する。**17'**の $^{13}C$ 化学シフトを計算したところ、実験値とのRMSD値が2.6ppmと比較的大きな値を与えた。一方、トランス異性体**17**では2.3ppmと微妙に小さな値となった。興味深いことに**17**の安定配座では3位メチル基と4位水酸基が1,2-ジアクシアル配置であった。これは3位メチル基と4位水酸基のいずれも1,3-ジアクシアル反発の原因となる原子或いは置換基がないため、計算では**17**の3位メチル基と4位水酸基がジアクシアルとなる配座(図5、左)はジエクアトリアルとなる配座(図5、右)より約9kJ/mol安定でほぼ独占配座である。筆者らはHMBCスペクトルと、計算した $^nJ_{CH}$  値を比較してこれを確認した。HMBCスペクトルでは $^nJ_{CH}$ の絶対値が設定値(通常は7-10Hz、図5のHMBCスペクトル測定では8Hz)に近いほどシグナルが強く現れる。構造**17**のH-3とのC-1, C-4, C-4aおよびC-9との $^nJ_{CH}$ についてB3LYP/PCJ-1により計算したところ、6.3、-4.2、5.6、および-2.5Hzとなった。次にHMBCスペクトルのH-3スライスを作成したところ、計算された $^nJ_{CH}$ とHMBCスライスにおけるピーク強度とは良い一致を示した。一方、**17'**では強度との相

**Table 1** 15a-15b間で差異の大きい炭素核の化学シフトと、各異性体における相当する炭素核 $\omega$ B97X-D/6-31G\*で求めた化学シフト

異性体間で数値の大きなグループあるいは組み合わせを太文字で示した。

実験値	C1"	C6	C5	C3	C4	C2	C7"	C7	C5"
<b>15a</b>	<b>43.4</b>	<b>32.1</b>	189.7	153.1	<b>152.2</b>	185.6	<b>146.3</b>	<b>32.2</b>	194.7
<b>15b</b>	41.3	31.1	<b>190.7</b>	<b>153.9</b>	151.9	185.8	146.0	<b>32.2</b>	194.6
<b>15c</b>	<b>43.2</b>	<b>32.1</b>	189.9	153.2	151.6	185.2	146.1	<b>32.3</b>	194.4
<b>15d</b>	41.2	31.1	<b>190.7</b>	<b>153.9</b>	<b>152.5</b>	<b>186.0</b>	<b>146.7</b>	31.7	<b>195.0</b>
SD (ppm)	1.03	0.50	0.46	0.38	0.34	0.30	0.27	0.23	0.22
計算値									
(1S,6R,1"R)-異性体	<b>45.2</b>	<b>32.2</b>	192.9	147.4	<b>157.2</b>	193.7	<b>150.7</b>	<b>31.3</b>	200.4
(1S,6S,1"R)-異性体	41.0	30.6	<b>195.8</b>	<b>150.5</b>	154.6	193.5	147.3	<b>32.2</b>	200.4
(1S,6R,1"S)-異性体	<b>44.6</b>	<b>32.5</b>	194.0	148.7	155.0	193.9	147.8	<b>32.0</b>	199.9
(1S,6S,1"S)-異性体	40.8	29.8	<b>196.0</b>	<b>150.3</b>	<b>157.0</b>	<b>194.7</b>	<b>152.1</b>	30.5	<b>201.2</b>
一致○/不一致×	○	○	○	○	○	○	○	○	○
(1R,6S,1"S)-異性体	<b>44.5</b>	<b>32.2</b>	198.6	153.1	151.7	189.2	<b>148.9</b>	31.5	200.5
(1R,6R,1"S)-異性体	40.2	31.6	<b>200.8</b>	<b>154.4</b>	<b>152.7</b>	190.1	147.5	31.7	201.1
(1R,6S,1"R)-異性体	<b>44.3</b>	<b>32.1</b>	<b>199.1</b>	153.4	151.1	189.3	147.8	31.2	200.1
(1R,6R,1"R)-異性体	40.1	31.9	195.8	153.3	<b>153.1</b>	<b>191.3</b>	<b>148.2</b>	<b>32.2</b>	<b>201.8</b>
一致○/不一致×	○	○	×	×	×	○	○	×	○



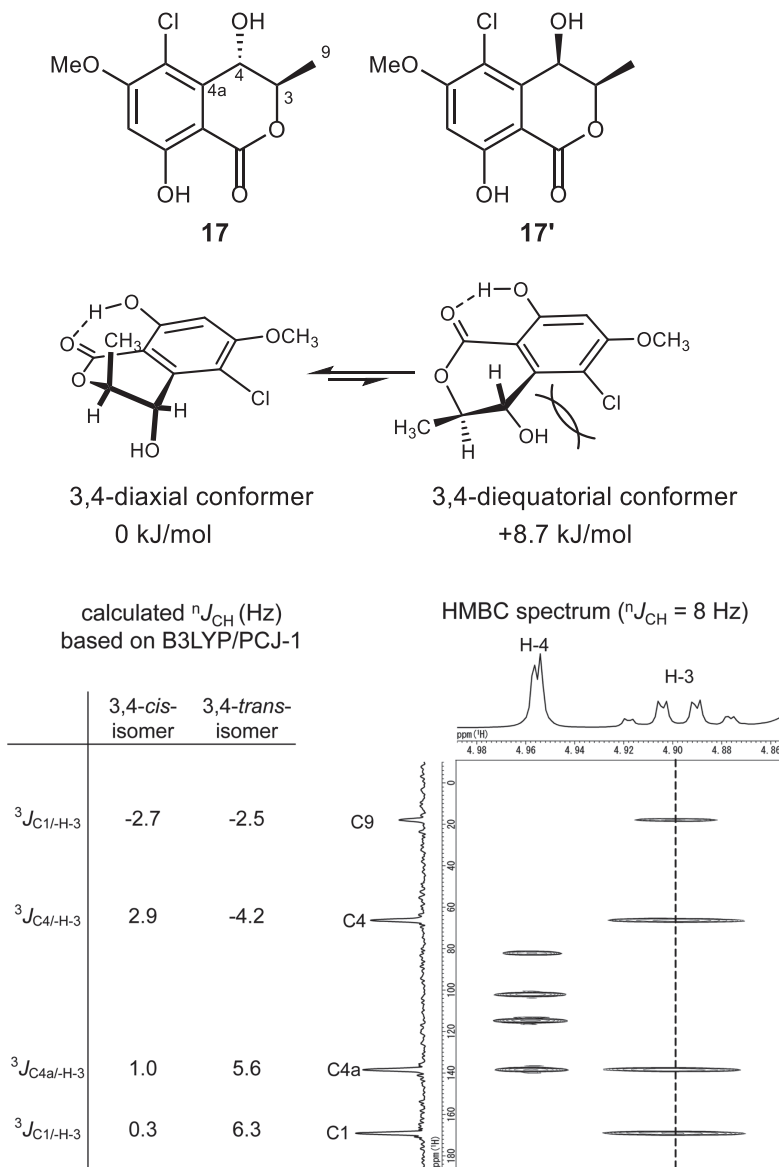
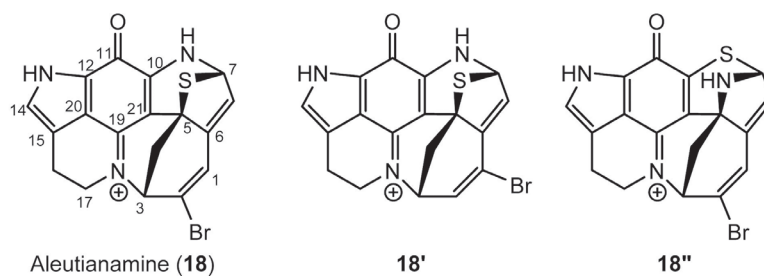


図5 Mellein 17とそのジアステレオマー 17'の構造とHMBCスペクトルを利用した構造決定



	18	18'	18''
<b>Gaussian</b> mPW1PW91/6-311+G(d,p) PCM (DMSO)	8.14 (2.66)	8.20 (3.33)	11.73 (5.12)
<b>Spartan</b> @B97X-D/6-31G* (vacuum condition) (geometry: @B97X-V/6-311+G(2df,2p)[6-311G*])	2.10	3.19	6.91

カッコ内は化学シフト補正後の実験値との差異絶対値の平均

図6 Aleutianamineにおける計算方法の比較

関が全く一致せずその可能性を否定、天然物の構造を**17**と決定することが出来た。円二色性スペクトルの解析も上記結論に矛盾しないことも加えて最終結論に導いたが、詳細は省略する。

### 3-3. 最近の論文データと比較したSpartan'18プロトコルの検証

以上、天然物の構造決定において、DFT計算は力強いツールになりうることを紹介してきた。論文ではSarottiらのDP4/DP4+が広く用いられている。利用可能な汎関数/基底関数を考慮するとGaussianユーザーには利用しやすいであろう。DP4/DP4+では予想構造が百分率(%)で出力されるため判り易いともいえるが、構造情報が確率という次元に集約されてしまうため、判断の閾値を決めにくく不安ともいえる。筆者は、**図3**に示したように、計算値-実験値の差異を構造式上に書き示す方が、視覚的に評価でき、新たな構造のヒントが得やすいと考えている。

最近Hammanらは含臭素天然物aleutianamine(**18**)を単離し、GaussianとDP4+と組み合わせてスペクトル解析から得た構造の妥当性を可能な異性体**18'**、**18''**とともに評価している<sup>[35]</sup>。個人的興味からSpartan'18を用いた計算と比較してみたところ、やはり良好な結果が得られた。興味深いことに、Spartan'18では構造の最適化に6-31G\*を基底関数に用いるが、Hammanらの用いた基底関数6-311+G(d,p)と比べ格段に計算コストが低い。さらに前者は真空条件、後者は測定に用いたDMSOをPCM法により考慮しており、前者の計算コストはさらに低くなる。それにもかかわらず同程度以上のスコアを与えていることは興味深い。

一つの化合物のみで全体を評価することは危険であるが、Spartan'18に付属する計算プロトコルは、低コストの計算で信頼性の高い<sup>13</sup>C化学シフトを予想することを示す一例といえる。

## 5. まとめ

以上、Spartan'18を用いた<sup>13</sup>C化学シフト計算手法の特徴や、筆者らの応用例を紹介した。本手法はNMR解析から推定した天然物構造の妥当性を検証するに十分な精度を有しているといえる。また、<sup>1</sup>J<sub>CH</sub>などを組み合わせることにより、これまで出来なかった構造解析が可能になったともいえる。Spartan'18では、パソコン画面上で構造式

を構築するだけで、精度の高い<sup>13</sup>C NMR化学シフトの予想が可能で、これを体験した筆者としては、まずは計算してみることを強く勧める。

しかし、計算手法は間違った計算を行っても何らかの答えを出してしまう可能性があることを忘れてはいけない。間違った計算結果が一人歩きしてしまうと大変である。我々は化学・物理の視点から計算結果を一つ一つ検証する必要があることを忘れてはいけない。

## 文献

- [1] <https://www.perkinelmer.com/category/chemdraw/>
- [2] 解を得るのに必要な計算量のこと。分子計算では完了に数十時間必要な場合も少なくなく、計算コストの増大は深刻である。
- [3] 平尾公彦; 武次徹也 新版 すぐできる 量子化学計算ビギナーズマニュアル 講談社, 2015.
- [4] 常田貴夫 密度汎関数法の基礎; 講談社, 2012.
- [5] <http://masa-cbl.hatenadiary.jp/entry/20121028/1351428346/>
- [6] Lodewyk, M. W.; Siebert, M. R.; Tantillo, D. J. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1839-1862.
- [7] Takekawa, H.; Tanaka, K.; Fukushi, E.; Koichi Matsuo; Nehira, T.; Hashimoto, M. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1047-1051.
- [8] Hashimoto, M.; Murakami, T.; Funahashi, K.; Tokunaga, T.; Nihei, K.; Okuno, T.; Kimura, T.; Naoki, H.; Himeno, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8259-8270.
- [9] <https://www.wavefun.com/japan/>
- [10] 橋本勝. *Wavefunction User Letter* **2018**, *6*, 1-8.
- [11] Hehre, W. J.; Kuunzinger, P.; Deppmeier, B.; Driesen, A.; Uchida, N.; Hashimoto, M.; Fukushi, E.; Takata, Y. *J. Nat. Prod.* **2019**.
- [12] 6-31G(d)と同義。
- [13] 現在のところECD、VCDスペクトルの計算には対応していない。
- [14] 筆者の場合、約4年間でSSDの交換が必要であった。
- [15] 計算に利用した汎関数と基底関数とを"/(スラッシュ)"で連結して表現する。構造と物性を異なった組み合わせを用いた場合、物性を計算した汎関数と基底関数の組み合わせと構造を求めた汎関数と基底関数の組み合わせとを"/(ダブルスラッシュ)"で連結して表現する。
- [16] 個人的には、 $\omega$ B97X-D/6-31G\*や $\omega$ B97X-V/6-311+G(2df,2p)[6-311G\*]は、直鎖構造など配座変化が容易な分子では、エネルギー再現性が低くなるような感覚を持っている。また、このような分子の場合、エントロピー的には不利な各原子が整頓された配座が安定となる傾向があるため、振動解析により自由エネルギーを求めにボルツマン分布を計算する必要があるように感じている。筆者の場合、そのような分子ではBHLYP/def2-TZVPなどで自由エネルギー/配座のボルツマン分布を求め、 $\omega$ B97X-D/6-31\*による化学シフトに適用させる工夫をしている。
- [17] <https://www.j-resonance.com/en/nmrdb/>
- [18] Gu, W.; Ge, H. M.; Song, Y. C.; Ding, H.; Zhu, H. L.; Zhao, X. A.; Tan, R. X. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 114-

- 117.
- [19] Komala, I.; Ito, T.; Nagashima, F.; Yagi, Y.; Kawahata, M.; Yamaguchi, K.; Asakawa, Y. *Phytochem.* **2010**, *71*, 1387-1394.
- [20] Ortega, H. E.; Graupner, P. R.; Asai, Y.; TenDyke, K.; Qiu, D.; Shen, Y. Y.; Rios, N.; Arnold, A. E.; Coley, P. D.; Kursar, T. A.; Gerwick, W. H.; Cubilla-Rios, L. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 741-744.
- [21] Till, M.; Prinsep, M. R. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 796-798.
- [22] Grosvenor, S. N. J.; Mascoll, K.; McLean, S.; Reynolds, W. F.; Tinto, W. F. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1315-1318.
- [23] Merlini, L.; Mondelli, R.; Nasini, G.; Hesse, M. *Helv. Chim. Acta.* **1973**, *56*, 232-239.
- [24] Zheng, Y.; Zhang, J.; Wei, L.; Shi, M.; Wang, J.; Huang, J. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1935-1938.
- [25] Evidente, A.; Cimmino, A.; Andolfi, A.; Vurro, M.; Zonno, M. C.; Cantrell, C. L.; Motta, A. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1612-1619.
- [26] Maloney, K. N.; Hao, W.; Xu, J.; Gibbons, J.; Hucul, J.; Roll, D.; Brady, S. F.; Schroeder, F. C.; Clardy, J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4067-4070.
- [27] Trenti, F.; Cox, R. J. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1235-1240.
- [28] Ji, N.-Y.; Li, X.-M.; Li, K.; Ding, L.-P.; Gloer, J. B.; Wang, B.-G. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1901-1905.
- [29] Kinnel, R.; Duggan, A. J.; Eisner, T.; Meinwald, J.; Miura, I. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 3913-3916.
- [30] Boukouvalas, J.; Pouliot, M.; Robichaud, J.; MacNeil, S.; Snieckus, V. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3597-3599.
- [31] Larit, F.; Nael, M. A.; Benyahia, S.; Radwan, M. M.; León, F.; Jasicka-Misiak, I.; Poliwoda, A.; Wiczorek, D.; Benayache, F.; Benayache, S.; Wiczorek, P. P.; Cutler, S. J. *Phytochemistry Letters* **2018**, *24*, 1-5.
- [32] Sung, P.-J.; Chen, B.-Y.; Chen, Y.-H.; Chiang, M. Y.; Lin, M.-R. *Biochem. Syst. Ecol.* **2010**, *38*, 116-118.
- [33] Tanaka, S.; Tanaka, K.; Maeda, H.; Hashimoto, M. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 5688-5697.
- [34] Inose, K.; Tanaka, K.; Koshino, H.; Hashimoto, M. *Tetrahedron* **2019**, 130470.
- [35] Zou, Y.; Wang, X.; Sims, J.; Wang, B.; Pandey, P.; Welsh, C. L.; Stone, R. P.; Avery, M. A.; Doerksen, R. J.; Ferreira, D.; Anklin, C.; Valeriote, F. A.; Kelly, M.; Hamann, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4338-4344.



橋本 勝 (はしもと・まさる)

1985年 北海道大学理学部卒業  
 1990年 北海道大学大学院理学研究科修了 (理学博士)  
 1990年 財団法人相模中央化学研究所  
 1997年 米国コロンビア大学博士研究員  
 1998年 弘前大学農学生命科学部助教授  
 2005年 弘前大学農学生命科学部教授



福士 江里 (ふくし・えり)

1987年 北海道大学農学部卒業  
 1989年 北海道大学大学院農学研究科修士課程修了  
 1989年 北海道大学大学院農学部 文部科学技官、GC-MS・NMR室勤務、現在に至る  
 1996年 博士 (農学) 北海道大学



Warren J. Hehre

B.A. Cornell University  
 Ph.D. Carnegie-Mellon University  
 NSF postdoctoral fellowship University of Paris  
 1972 University of California Irvine  
 1977 Prof. of University of California Irvine  
 1991 President & CEO Wavefunction, Inc.  
 1995 Emeritus Prof of University of California Irvine

# 常磁性効果を活用した糖鎖の動的立体構造解析

北陸先端科学技術大学院大学

山口 拓実

takumi@jaist.ac.jp

## はじめに

糖鎖は、細胞内外の様々な生命分子システムにおいて重要な役割を果たしている。例えば、糖鎖が脂質と結びついた糖脂質は、糖鎖-タンパク質間や糖鎖同士の相互作用を通して、細胞膜上の機能性超分子ドメインの形成に密接に関わると考えられている<sup>[1]</sup>。糖脂質を含む細胞表層の糖鎖は、細胞間コミュニケーションとともに、ウイルス感染やがんの浸潤・転移等にも関与している。また、自然界に存在するタンパク質の半数以上は糖鎖修飾を受けているとされ、タンパク質の安定性の向上や機能維持に糖鎖が不可欠な存在となっている場合も多い。さらに、糖タンパク質が分泌される過程や、不要となって分解処理されるプロセスには、多くの糖認識タンパク質(レクチン)が協働している<sup>[2]</sup>。

このような糖鎖の重要性が広く知られるようになり、糖鎖は、核酸、タンパク質と並ぶ第3の生命鎖とも呼ばれている。ところが、立体構造解析を含む糖鎖の物理化学研究に関しては、タンパク質の場合と比較して未成熟な部分が多い。その原因の一つには、均一で十分な量の試料を調製することの困難さにあるが、近年では有機合成化学や生化学、分子生物学等の手技を駆使することで、複雑な構造をもった糖鎖についても精密計測の対象とすることができるようになりつつある。このような状況の中、NMRは糖鎖研究にとっても有用な測定法として、糖鎖の構造決定や相互作用解析において重要な実験手段となっている<sup>[3]</sup>。本稿では、常磁性効果を活用した糖鎖のNMR研究例について紹介する。

## 糖鎖研究における常磁性プローブ

大きな磁気モーメントを持つ不対電子は、空間を介した双極子相互作用を通して、周囲の核のNMR信号に影響を与える。常磁性種を含んだ溶液のNMR計測において、その摂動の大きさ

は、常磁性中心と各原子核との間の距離や角度に依存している<sup>[4]</sup>。したがって、常磁性効果は、原子核の空間配置情報を鋭敏に映し出す。本質的に弱い相互作用によっている糖鎖ならびに糖鎖が関与する分子システムの研究において、常磁性効果を利用したNMR解析は極めて有用な手法となり得る<sup>[5,6]</sup>。例えば、スピンラベル化やランタニドイオンで修飾された糖鎖が、レクチンや糖転移酵素の基質結合部位のNMR解析に用いられている<sup>[7,8]</sup>。また常磁性金属イオンは、糖鎖と金属イオンとの相互作用を調べることに適している<sup>[9]</sup>。

金属イオンは、レクチンによる糖鎖認識に必要となることに加え、糖鎖およびそのクラスターの機能発現にも重要であると考えられている。我々は、人工設計によって糖鎖を集積した化合物を利用して、糖鎖クラスターの機能発現メカニズムの構造基盤解明に取り組んでいる<sup>[10]</sup>。ルイスX型糖鎖は、主に神経幹細胞に見られる分岐型3糖構造であり、カルシウムイオン濃度に依存した糖鎖間相互作用を示すことが知られている<sup>[11]</sup>。糖鎖同士の結合は単体では弱く過渡的ではないため、こうした糖鎖間相互作用の観察にあたっては、糖鎖を集積することが必要となる。そこで、機能発現とNMR解析に適したサイズを両立するため、ルイスX構造を含むオリゴ糖鎖を、自己組織化形成する超分子錯体へと組み込んだサイボーグ分子を創出した。これにより、直径およそ40Åの球状分子表面に、24個のルイスX型糖鎖を一義的に集積することができる(図1)。合成した糖鎖クラスターは期待通り、カルシウムイオン依存的な糖鎖間相互作用によって水中でより大きな分子間会合体を形成することがわかった。マンガンイオンをプローブとした常磁性緩和促進(PRE)法による解析を行った結果、分子間会合を誘起するために必要なカルシウムイオンとの相互作用においても、糖鎖の化学構造のみならず、その集積形

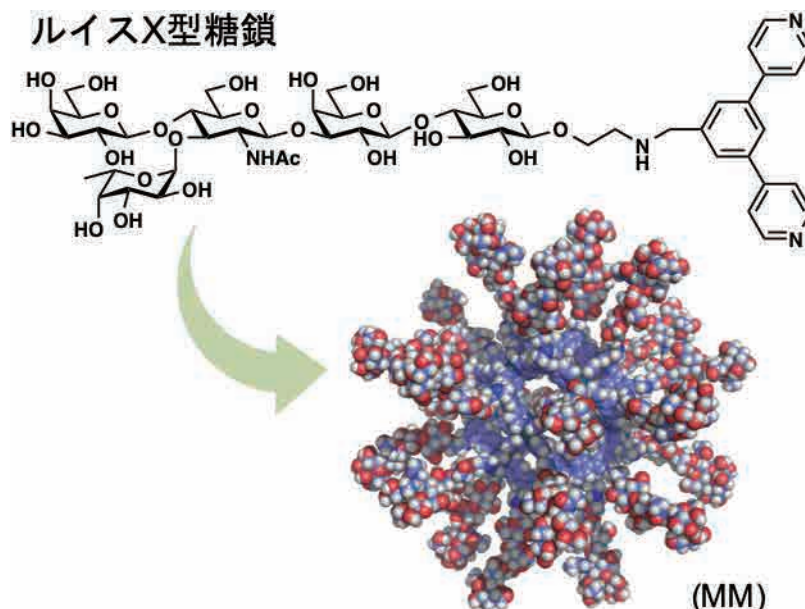


図1 糖鎖クラスターの自己組織化構築。ルイスX型糖鎖を超分子錯体形成を利用して集積化した。文献12より改変。

態が重要であることを示すことができた<sup>[12]</sup>。

### 糖鎖の3次元構造ダイナミクスの描像

糖鎖は高い内部運動の自由度をもち、水中でコンフォメーションを絶えず変化させる。糖鎖の立体構造を理解するためには、静的な安定構造を捉えるだけでなく、その揺らぎを含めた動態としての解釈が重要となる。分子の動きを描像する手法の一つは、分子動力学 (MD) シミュレーションである。しかし分子シミュレーションの結果は、用いる初期構造や力場、計算時間等の条件に依存することが一般的であり、計算結果の実験的な検証は欠かせない。常磁性効果の利用は、糖鎖のMD計算結果の妥当性を評価し、その3次元構造ダイナミクスを理解するためにも有効である<sup>[13]</sup>。

NMR計測を通して得られる、核オーバーハウザー効果 (NOE) やスピン結合定数による構造情報は、糖鎖を含む生体分子のシミュレーション結果の検証に広く用いられてきた。しかし糖鎖は<sup>1</sup>Hの密度が低く、空間的に近接できる原子数が少ないため、観測可能なNOEの数が多い。糖鎖のNMR解析において、NOEやスピン結合定数が与える情報は、主に隣接する糖残基間の配置という局所の構造に関するものとなる。こうした近距離情報からだけでは、コンフォメーションの揺動が大きい糖鎖を対象とする際に、分子全体の動態を十分に捉えることができない場合がある。これに対し、常磁性効果の一つである擬コン

タクトシフト (PCS) は、40Åにわたる原子の空間配置を反映した、長距離の分子構造情報を与える<sup>[14]</sup>。PCSを利用して得られる遠距離情報は、スピン結合定数やNOEによって得られる情報と相補的である。

そこで我々は、この性質を応用して糖鎖の動的立体構造解析を行うため、常磁性ランタニドイオンをプローブとして糖鎖へ導入した<sup>[15,16]</sup>。原子核の空間配置情報をより定量的に得るためには、常磁性中心となるランタニドイオンの位置が揺らぐことは望ましくない。そこで糖鎖還元末端の化学反応性の違いを利用し、金属イオンをキレートするEDTA誘導体を連結した。また、糖鎖との間のリンカーには剛直性を有する分子構造を設計した。このキレート部位を介して磁化率異方性を有するランタニドイオンを導入し、糖鎖の各<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>Cの化学シフト変化を観測することで、分子構造情報を含有するPCS値を求めることが可能となった。

一方、糖鎖のMD計算によって得られる複数のコンフォマーを考慮した立体構造のアンサンブルモデルを作成し、PCSによる化学シフト変化の理論値を見積もる。導入されたランタニドイオンの磁化率テンソルの主軸方向はNMRによって直接決定することはできないので、分子モデルと組み合わせた解析を行うことになる。まず、糖鎖のアンサンブルモデルに対するランタニドイオンの平均位置を計算し、これと、先に求めたPCSの実測値を用いて、磁化率テンソルの異方性に関する

パラメータ ( $\Delta\chi_{ax}$ ,  $\Delta\chi_{rh}$ ) を決定する (図2)。その後、得られた  $\Delta\chi_{ax}$ ,  $\Delta\chi_{rh}$  を使い、アンサンブルモデルから再度、各原子のPCS値の理論値を見積もる。このようにして求めた計算値と実験値のずれを比較することで、アンサンブルモデル (= MD 計算結果) の妥当性を評価することができる。実験結果を満足するPCSの計算値が得られていないときは、初期構造の変更やシミュレーション時間の延伸等を図り、新たなアンサンブルモデルを構築する。

こうしたアプローチ法により、我々はこれまでに、神経細胞に存在する糖脂質ガングリオシドの糖鎖構造や、糖タンパク質の品質管理機構に関わる高マンノース型糖鎖の動的構造解析を行い、糖鎖が水中で取り得る配座空間を定量性をともなって明らかにすることに成功している<sup>[17, 18]</sup>。ここでは、小胞体においてタンパク質の品質を提示する役割を担う高マンノース型糖鎖M9の解析例を紹介する。

糖転移酵素および糖分解酵素をコードする遺伝子を欠損させた酵母変異株を用いることにより、M9糖鎖をもった糖タンパク質を大量に調製することができる<sup>[19]</sup>。こうした変異酵母を<sup>[13C<sub>6</sub>]</sup>グルコースを炭素源として含む培地で培

養することによって糖鎖を<sup>13C</sup>で均一に標識した。得られたM9糖鎖に常磁性プローブとしてツリウムイオンを導入し、PCSの測定を行った (図3a)<sup>[20]</sup>。M9はマンノース (Man) 9残基を含む11糖であり、その非還元末端にいずれも共通するMan $\alpha$ 1-2Man配列を含む3本の分岐鎖を有している。通常、そのNMRスペクトルは多くの信号が縮重してしまい詳細な解析には困難をとまうが、PCSにより化学シフトを空間配置に応じて変化させることで、すべての糖残基の信号を良好に観測することができるようになった。そこで、実測したPCS値をMD計算の結果と照らし合わせた。条件の異なるシミュレーションについて評価したところ、計算時間の延伸のみならず、レプリカ交換MD (REMD) 法を用いてサンプリング効率を向上させることで<sup>[21]</sup>、理論値と実験値がよく一致することが判明した (図3b)。シミュレーションデータの解析の結果、M9糖鎖の3本の分岐鎖の挙動は有意に異なっていることがわかった。M9糖鎖は、3本の枝を伸ばしたコンフォメーションのほか、一部の枝を還元末端側に倒したフォールドバック構造を取り得ることが示された。また、通常のMD計算の結果と比較すると、REMDシミュレーションではこれらのコンフォ

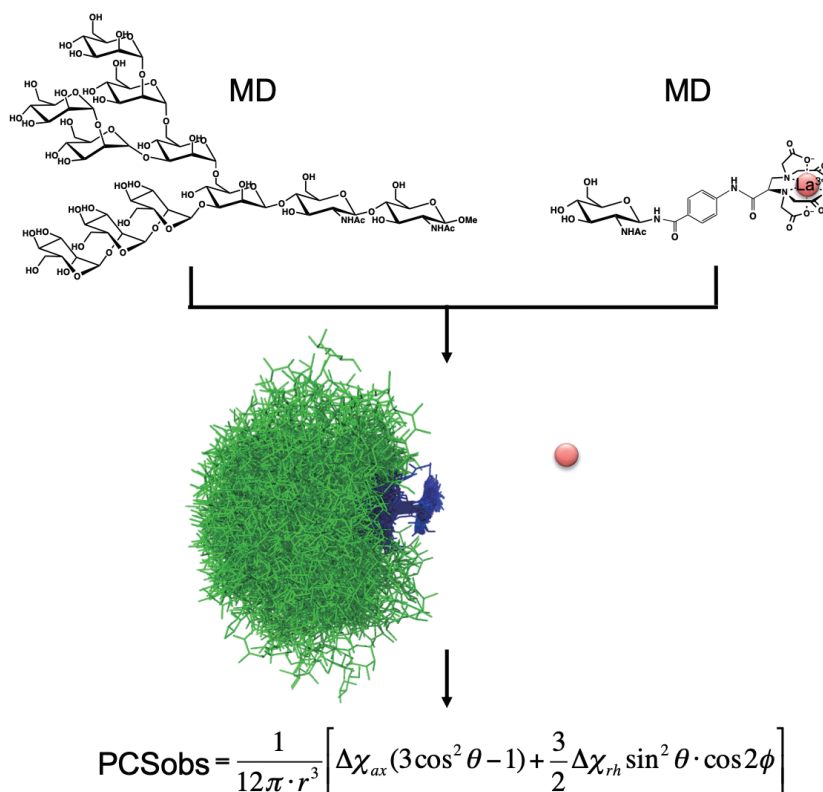


図2 磁化率テンソルのパラメータ決定の概略。糖鎖のアンサンブルモデルに対する常磁性中心の平均位置は、還元末端の糖残基に該当する単糖 (ここではN-アセチルグルコサミン) を含むEDTA誘導体のシミュレーションから定義する。文献13より改変。

マーの出現頻度に有意な差が生じており、フォルドバック構造をあらわに考慮することが、水中でのM9糖鎖の動的構造を正しく反映するために重要であることがわかった。

このように、NMRデータによって裏付けられた計算結果を基に、糖鎖の立体構造の揺らぎを定量的に描像することが可能となった。さらに、遊離糖鎖の動的な配座空間情報は、タンパク質結合状態の静的な構造情報を統合することで、レクチンによる糖鎖認識の仕組みについての理解を深める道標となる。

PCS法とREMDシミュレーションから導かれた動的構造から、G1M9糖鎖と、これを認識する小胞体分子シャペロン・カルレティキュリンとの相互作用機構について考察した<sup>[22]</sup>。M9糖鎖にグ

ルコース1残基が付加されたG1M9糖鎖のNMR解析は、酵母遺伝子破壊と試験管内酵素反応を組み合わせ、本糖鎖の安定同位体標識体を作成して行った(図4)。この際、化学合成したUDP-[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]グルコースと、UDP-グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素(UGGT)を用いることで、<sup>13</sup>C標識を施したG1M9糖鎖を得た<sup>[23]</sup>。G1M9糖鎖のアンサンブルモデルを用いて各グリコシド結合の二面角の分布を調査し、タンパク質との複合体の結晶構造中に見られる糖鎖の配座と比較した。その結果、結晶中での糖鎖の立体構造の一部は、遊離状態で取り得る配座空間の範囲から逸脱することがわかった。このことは、多様なコンフォメーションの間を揺らいでいる糖鎖をレクチンが識別する際に、糖鎖の立体構造変化を伴う誘導適

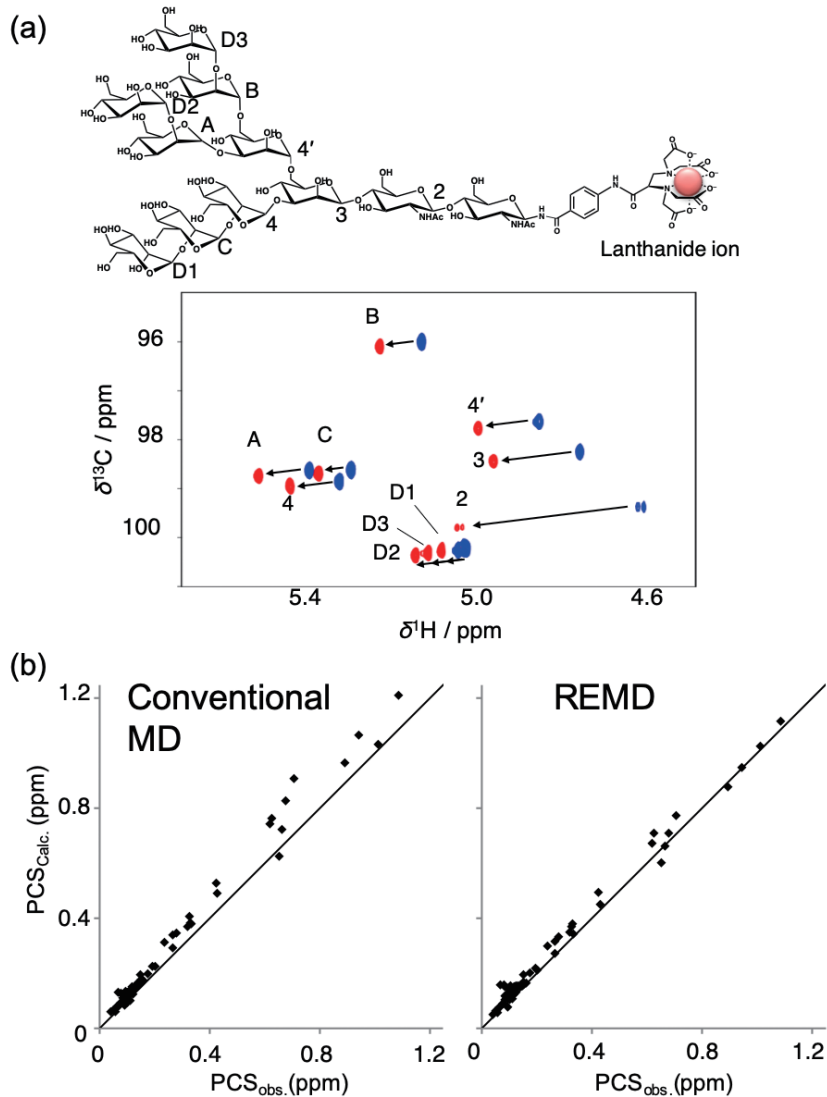


図3 (a) 常磁性プローブを導入したM9糖鎖のアノマー領域の<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC スペクトル。La<sup>3+</sup> (青; 反磁性) およびTm<sup>3+</sup> (赤; 常磁性) を用いて観測したPCSに基づく化学シフトの変化を矢印で示した。(b) M9糖鎖の実験的に得られたPCS値とMD計算から得たPCS値の相関。いずれも総計算時間は3.07マイクロ秒。解析には24,000個のコンフォマーからなるアンサンブルモデルを用いた。文献20より改変。

合と配座選択とを巧みに組み合わせた結合過程が存在することを示唆している。糖鎖とレクチンとが織り成す精緻な分子システムにおいて、こうした分子認識機構が重要な鍵となっていると予想している。

### おわりに

常磁性効果を応用することで、糖鎖の相互作用解析ばかりでなく、糖鎖やその複合体についてコンフォメーションの揺らぎを定量的に考慮した分子描像を進めることが可能となった。計算機が目覚ましい発達もあり、NMRをはじめとする実験計測がもたらす生体分子のダイナミクスに関する情報を解釈するために、分子シミュレーションが果たす役割は大きくなってきている。NMRに基づく定量的検証を行うことを通して、複雑な糖鎖を対象とした計算科学の一層の発展を促すことも期待される。

また、こうした動的構造情報の蓄積は、糖鎖が関わる生命現象の物理化学的理解を深めるのは勿論のこと、合成化学における新たな反応の制御や開拓の一助となるとも期待される。糖鎖とレクチンとの結合プロセスを正しく理解することで、標的タンパク質に対する親和性や特異性を高めた新たな分子設計を行うことも可能となるであろう<sup>[24]</sup>。さらに糖鎖のNMRは、ライフサイエンスのみならず、マテリアルサイエンスの分野でも、今後ますます重要な位置を占めると考えている。

本稿で紹介した研究成果の多くは、自然科学研究機構 生命創成探究センター/分子科学研究所 加藤晃一教授らとの共同研究で行ったものである。加藤グループのメンバーをはじめ、共同研究者の皆様に感謝いたします。

### 参考文献

- [1] Todeschini, A. R., and Hakomori S., (2008) Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains, *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 421–433. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.10.008.
- [2] Kamiya, Y., Satoh, T., and Kato, K., (2012) Molecular and structural basis for *N*-glycan-dependent determination of glycoprotein fates in cells, *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, **1820**, 1327–1337. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.017.
- [3] Kato, K., and Peters, T., eds., (2017) *NMR in Glycoscience and Glycotechnology*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge. doi: 10.1039/9781782623946.
- [4] Luchinat, C., and Parigi, G., (2010) Paramagnetic systems in biochemistry: Solution NMR studies, In: Harris, R. K., and Wasylshen, R. E., eds., *Encyclopedia of NMR*, vol.6, pp 3317–3323. John Wiley, Chichester. doi: 10.1002/9780470034590.emrstm1088.
- [5] Kato, K., and Yamaguchi, T., (2015) Paramagnetic NMR probes for characterization of the dynamic conformations and interactions of oligosaccharides, *Glycoconj. J.* **32**, 505–513. doi: 10.1007/s10719-015-9599-1.
- [6] Ardá, A., and Jiménez-Barbero, J., (2018) The recognition of glycans by protein receptors. Insights from NMR spectroscopy, *Chem. Commun.* **54**, 4761–4769. doi: 10.1039/C8CC01444B.
- [7] Liu, S., Meng, L., Moremen, K. W., and Prestegard, J. H., (2009) Nuclear magnetic resonance structural characterization of substrates bound to the alpha-2,6-sialyltransferase, ST6Gal-I, *Biochemistry*, **48**, 11211–11219. doi: 10.1021/bi9015154.
- [8] Canales, Á., Mallagaray, Á., Berbis, M. Á., Navarro-Vázquez, A., Domínguez, G., Cañada, F. J., André, S., Gabius, H.-J., Pérez-Castells, J., and Jiménez-Barbero, J., (2014) Lanthanide-chelating carbohydrate conjugates are useful tools to characterize carbohydrate conformation in solution and sensitive sensors to detect carbohydrate-protein interactions, *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 8011–8017. doi: 10.1021/ja502406x.
- [9] Henry, B., Desvaux, H., Pristchepa, M., Berthault, P., Zhang, Y. M., Mallet, J. M., Esnault, J., and

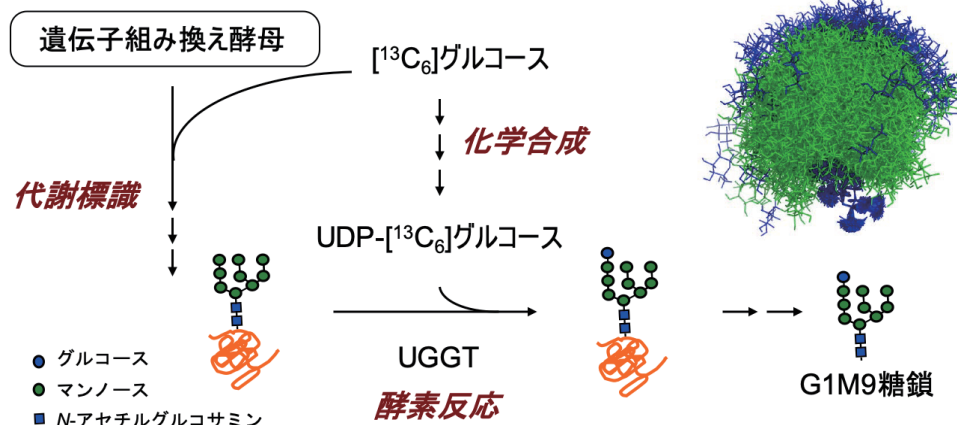


図4  $^{13}\text{C}$ 標識を施したG1M9糖鎖の調製法と、動的立体構造解析から導かれたG1M9糖鎖のコンフォマー 260個の重ね合わせ。文献22, 23より改変。



- Sinay, P., (1999) NMR study of a Lewis(X) penta-saccharide derivative: solution structure and interaction with cations, *Carbohydr. Res.* **315**, 48–62. doi: 10.1016/S0008-6215(98)00301-2.
- [10] Kurihara, K., Matsuo, M., Yamaguchi, T., and Sato, S., (2018) Synthetic approach to biomolecular science by cyborg supramolecular chemistry, *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, **1862**, 358–364. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.11.002.
- [11] Nodet, G., Poggi, L., Abergel, D., Gourmala, C., Dong, D., Zhang, Y., Mallet, J.-M., and Bodenhausen, G., (2007) Weak calcium-mediated interactions between Lewis X-related trisaccharides studied by NMR measurements of residual dipolar couplings, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 9080–9085. doi: 10.1021/ja0711056.
- [12] Yan, G., Yamaguchi, T., Suzuki, T., Yanaka, S., Sato, S., Fujita, M., and Kato, K., (2017) Hyper-assembly of self-assembled glycoclusters mediated by specific carbohydrate-carbohydrate interactions, *Chem. Asian J.* **12**, 968–972. doi: 10.1002/asia.201700202.
- [13] Kato, K., Yagi, H., and Yamaguchi, T., (2018) NMR characterization of the dynamic conformations of oligosaccharides, In: Webb, G. A., eds., *Modern Magnetic Resonance, 2nd ed.*, pp 737–754, Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-28275-6\_35-1.
- [14] Otting, G., (2010) Protein NMR using paramagnetic ions, *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 387–405. doi: 0.1146/annurev.biophys.093008.131321.
- [15] Yamamoto, S., Yamaguchi, T., Erdély, M., Griesinger, C., and Kato, K. (2011) Paramagnetic lanthanide tagging for NMR conformational analyses of N-linked oligosaccharides, *Chem. Eur. J.* **17**, 9280–9282. doi: 10.1002/chem.201100856.
- [16] Yamamoto, S., Zhang, Y., Yamaguchi, T., Kameda, T., and Kato, K., (2012) Lanthanide-assisted NMR evaluation of a dynamic ensemble of oligosaccharide conformations, *Chem. Commun.* **48**, 4752–4754. doi: 10.1039/c2cc30353a.
- [17] Zhang, Y., Yamaguchi, T., Satoh, T., Yagi-Utsumi, M., Kamiya, Y., Sakae, Y., Okamoto, Y., and Kato, K., (2015) Conformational dynamics of oligosaccharides characterized by paramagnetism-assisted NMR spectroscopy in conjunction with molecular dynamics simulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **842**, 217–230. doi: 10.1007/978-3-319-11280-0\_14.
- [18] Satoh, T., Yamaguchi, T., and Kato, K., (2015) Emerging structural insights into glycoprotein quality control coupled with N-glycan processing in the endoplasmic reticulum, *Molecules*, **20**, 2475–2491. doi: 10.3390/molecules20022475.
- [19] Kamiya, Y., Yanagi, K., Kitajima, T., Yamaguchi, T., Chiba, Y., and Kato, K., (2013) Application of metabolic <sup>13</sup>C labeling in conjunction with high-field nuclear magnetic resonance spectroscopy for comparative conformational analysis of high mannose-type oligosaccharides, *Biomolecules* **3**, 108–123. doi: 10.3390/biom3010108.
- [20] Yamaguchi, T., Sakae, Y., Zhang, Y., Yamamoto, S., Okamoto, Y., and Kato, K., (2014) Exploration of conformational spaces of high-mannose-type oligosaccharides by an NMR-validated simulation, *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 10941–10944. doi: 10.1002/anie.201406145.
- [21] Yamaguchi, T., and Kato, K., (2018) Molecular dynamics of gangliosides, *Methods Mol. Biol.* **1804**, 411–417. doi: 10.1007/978-1-4939-8552-4\_20.
- [22] Suzuki, T., Kajino, M., Yanaka, S., Zhu, T., Yagi, H., Satoh, T., Yamaguchi, T., and Kato, K., (2017) Conformational analysis of a high-mannose-type oligosaccharide displaying glucosyl determinant recognised by molecular chaperones using NMR-validated molecular dynamics simulation, *ChemBioChem*, **18**, 396–410. doi: 10.1002/cbic.201600595.
- [23] Zhu, T., Yamaguchi, T., Satoh, T., and Kato, K., (2015) A hybrid strategy for the preparation of <sup>13</sup>C-labeled high-mannose-type oligosaccharides with terminal glucosylation for NMR study, *Chem. Lett.* **44**, 1744–1746. doi: 10.1246/cl.150898.
- [24] Suzuki, T., Yanaka, S., Watanabe, T., Yan, G., Satoh, T., Yagi, H., Yamaguchi, T., and Kato, K., (2019) Remodeling of the oligosaccharide conformational space in the prebound state to improve lectin-binding affinity, *Biochemistry*, in press. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00594.



山口 拓実 (やまぐち・たくみ)

2008年 東京大学大学院 工学系研究科 博士課程修了 博士 (工学)

2008年 自然科学研究機構 分子科学研究所 助教

2015年 北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科 准教授

2016年より 同 先端科学技術研究科 准教授

2019年より 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 客員准教授を兼任

# 多糖類の構造研究におけるNMRの有用性

苫小牧工業高等専門学校 応用化学・生物系

甲野 裕之

kono@tomakomai-ct.ac.jp

## 1. はじめに

多糖類、特にセルロースやキチン(図1)といった動植物骨格を形成する構造多糖類は天然に存在する最も豊富な有機化合物であり、古代から近代に至るまで、紙をはじめその特性を活かした利用がなされてきた。現代社会では合成高分子(プラスチック)が主流となり、材料としての構造多糖の利用は凋落しつつあったが、化石燃料の枯渇、地球温暖化、マクロプラスチックに代表される環境問題により、生分解性、生体適合性、環境適合性という構造多糖の特長が再評価された。例えば、数10 $\mu$ 径の繊維であるセルロースやキチンを物理・化学的に開繊し、数nm径にまで微細化したナノファイバーは超高強度軽量素材として世界的な研究トレンドとなっている。さらに有機化学やバイオテクノロジーとの融合による生体・医療材料への展開が活況を呈している。

多糖類の機能化、物性制御に関する研究は現在もなお活発に行われているが、その物性と機能発現に関する構造的解明については、蛋白質や核酸の構造研究に比べて後手に回っている。その理由として、構成糖(モノマー)の構造類似性、結合位置とアノマーに起因するグリコシド結合の多様性といった一次構造決定の難しさがある。さらに多数の水酸基による高次構造形成、結晶・非結

晶の混在によって生じる構造不均一性を明らかにする必要があるため、多糖類の正確な構造情報取得では多くの克服すべき困難が伴う。多糖類の構造研究における最も強力な解析手法はNMRであり、構造-機能相関、動的ダイナミクスを明らかにできる解析ツールとして君臨している。本稿では筆者が過去に探究したセルロースの結晶構造に関する研究に触れた後、最近検討を行ったセルロース誘導体の分子構造解析と抗腫瘍活性と $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-グルカンの秩序-無秩序転移構造に関する研究を通じ、多糖類科学におけるNMRの有用性を紹介する。

## 2. 固体NMRを用いたセルロース結晶構造解析

セルロースはグルコースが $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-グリコシド結合した直鎖状の高分子であり、その重合度は天然セルロースで200~1000程度である。グルコース残基の2, 3, 6位水酸基は分子内・分子鎖間水素結合によって固定され、分子鎖と平行に整列して結晶化している。キチンもまたセルロースと同様の結晶構造を有している。セルロース結晶には多くの多形が存在し、天然セルロースはI型と呼ばれている。I型結晶は1913年にX線により発見され<sup>[1]</sup>、その後様々なモデル構造が提案されたが、何れも実験事実と相反することから、長期

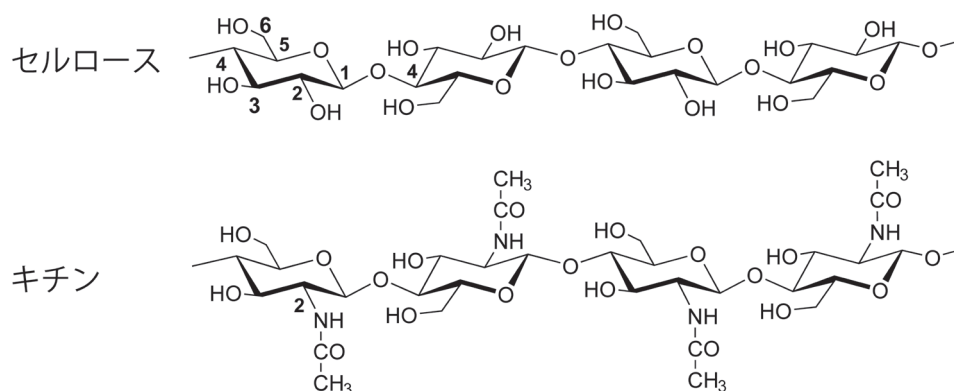


図1 代表的な構造多糖類であるセルロース(木質主成分)とキチン(甲殻類外骨格主成分)の一次構造。直鎖構造であり、隣接分子鎖との水素結合によって繊維状の高次構造を形成する。

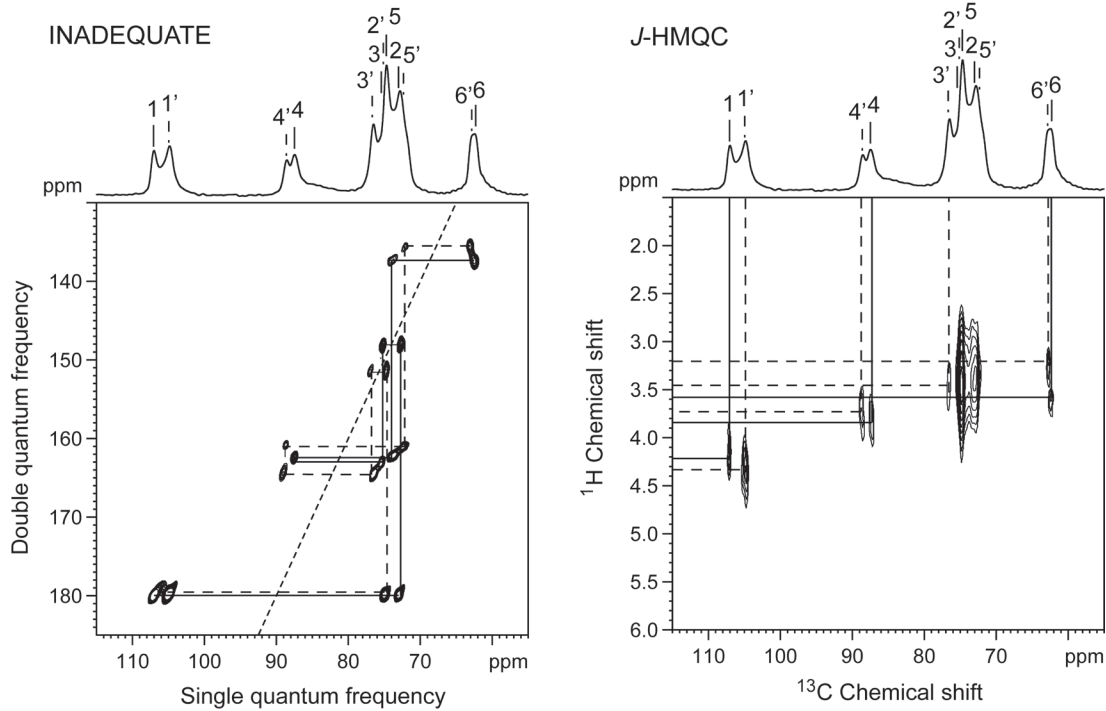


図2 再生セルロース（一度溶解して再生したセルロース）結晶の固体 $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  INADEQUATEおよび $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  J-HMQCスペクトル<sup>[7]</sup>。実線と点線で示した二種類のコンフォメーションが異なるグルコース残基が等価に存在している。二種類の天然セルロース $I_\alpha$ と $I_\beta$ も二種類のグルコース残基から構成されている。

に渡る論争が続いた（現在も！）。1984年にCP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルによってI型結晶は二つの結晶（ $I_\alpha$ と $I_\beta$ ）の混晶であることが立証された<sup>[2,3]</sup>、高等植物は $I_\beta$ がリッチであり、海藻や微生物は $I_\alpha$ がリッチであることが明らかになった<sup>[2]</sup>。純粋な $I_\alpha$ や $I_\beta$ を持つ生物種は存在せず、正確な結晶構造は明確化されていなかった。

筆者は20年近く昔、ブルカーバイオスピ（株）に所属しており、ある長期出張の際に会社のWB 300 MHzとサンプルチェンジャーを用いて、 $I_\alpha$ と $I_\beta$ がリッチなセルロース試料を用いて $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  INADEQUATE<sup>[4,5]</sup>にトライした。「天然存在比」では無理だろう…とは思いつつ、7mm径サンプルローターに試料を可能な限り充填し、各試料約一週間（！）の積算を仕掛けた。入社後、真っ先にフーリエ変換すると、ノイズの中に二種類のグルコース残基の相関ネットワークが表れていた（この時の感動はその後、経験していない…）。その結果、 $I_\alpha$ と $I_\beta$ は共に異なるコンフォメーションを持つ二種類のグルコース残基が等価で存在することが明らかになった（図2）<sup>[6~8]</sup>。さらに $^{13}\text{C}$ 標識グルコースをセルロース生産菌に与えて得られる $^{13}\text{C}$ 標識セルロース<sup>[9,10]</sup>が得られるようになり、固体二次元 $^{13}\text{C}$  NOESYや $^{13}\text{C}$  RFDRによる炭素-炭素間距離を見積もった。その結

果、 $I_\alpha$ の二種類の残基は同一分子鎖で交互に配列し、 $I_\beta$ の二種類の構成残基は独立した分子鎖を形成していることが明らかになった<sup>[11,12]</sup>。同時期に別の研究グループが放射光X線回折や中性子線回折による結晶構造の精密化を検討し、筆者らの知見と一致した結晶モデルが提案され、現在に至っている<sup>[13,14]</sup>。しかし何故、 $I_\alpha$ と $I_\beta$ が混在するのか？、生物種によって割合が異なるのか？という疑問に対する明快な解は得られておらず、セルロース生合成機構に関する研究が継続されている。また天然セルロース結晶と再生セルロース結晶中における分子鎖配列の方向性に関しても論争が続いている。

### 3. 溶液 NMR を用いたセルロース誘導体の置換基分布状態の解明

現在、世界的なバイオマス研究が隆盛し、セルロース誘導体が低環境負荷な材料として再認識されつつある。セルロースの誘導体化はその水酸基に限定されるため、その誘導体はエステルとエーテルである。代表的なセルロースエーテルはメチルセルロースやカルボキシメチルセルロースであり、増粘剤、バインダー等として食品や医薬品として広く使用されている。またエステル類では極めて透明度が高いアセチルセルロースが光学フィ

ルムやフィルターとして応用されている。

セルロース誘導体物性を決定する構造的指標は置換度 (DS) であり、セルロースの 2, 3, 6 位水酸基のうち、一残基あたり平均何個置換されているかを示す値である。完全置換体の場合、 $DS=3$  となる。近年、不溶性のセルロースを溶解可能なイオン液体等の溶媒が報告され、溶解状態での誘導体化が可能となった。その結果、誘導体物性を従来の DS だけでは説明できない現象が報告されている。例えば、セルロースを固体状態の不均一系で合成したメチルセルロースは  $DS=1.3 \sim 2.0$  で水溶性を示し、 $DS > 2.5$  でクロロホルム可溶となる。一方、溶解した完全均一誘導体化して得ら

れるメチルセルロースの場合、 $DS > 0.9$  で水溶性を示す。つまり諸物性が 2,3,6 位置換基の分布状態や構成残基組成によって影響を受けることが確認された<sup>[15]</sup>。

しかしセルロース誘導体では、未置換および置換状態の異なる最大 8 種類の構成残基がランダムに分布しており、置換基分布状態を正確に決定することは困難である (図 3)。各残基は置換数と位置が僅かに異なるだけであり、各種分析法により各構成残基を定性・定量することが困難である。NMR を用いた方法として、酵素や酸による加水分解の後、生じたオリゴマーを解析する方法が報告された。しかし DS が高い誘導体に対して

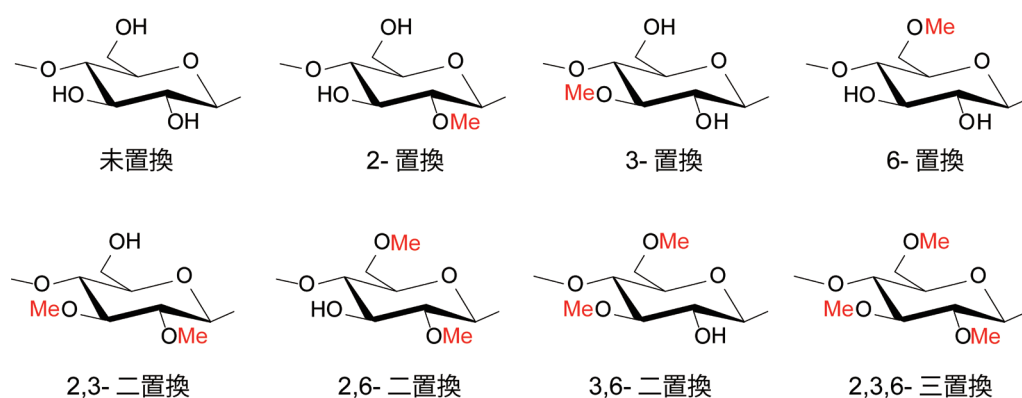


図 3 メチルセルロースに含まれる 8 種類の構成残基 (モノマー)。各残基はランダムにグリコシド結合をして分子鎖を形成している。

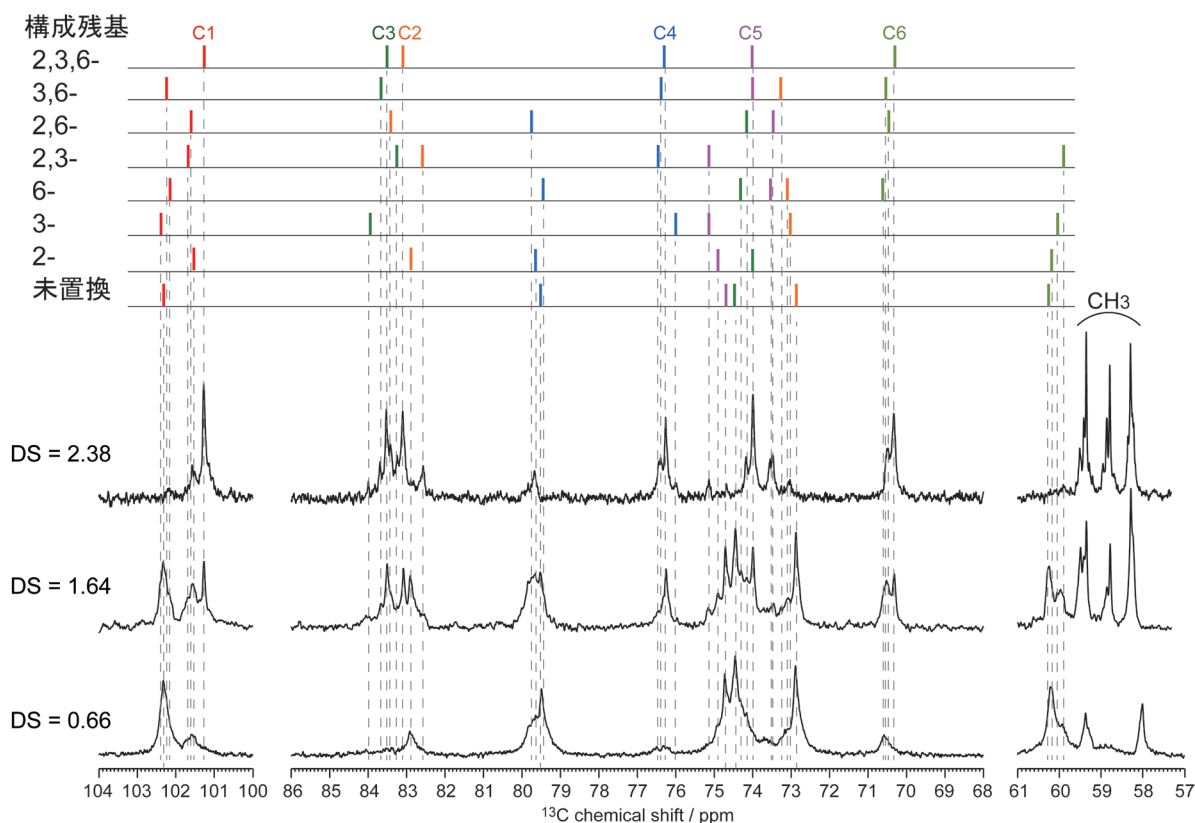


図 4 置換度 (DS) が異なるメチルセルロースの溶液  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルと 8 種類の構成残基の  $^{13}\text{C}$  化学シフト<sup>[16]</sup>

は酵素分解が進行せず、酸加水分解はグリコシド結合よりもエステル置換基が優先的に分解するため、有効な分析手段ではない。

そこで単一セルロース誘導体の全8種類のモノマー組成を明らかにする方法論を構築する目的で、各種二次元NMR法による構成残基の化学シフト帰属を検討した。糖鎖構造解析における定法である $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ 二次元測定では相関の重複と幅広い線形から構造情報が得られないため、 $^{13}\text{C}$ 共鳴線の帰属に重点を置いた。まず $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-TOCSYスペクトル上で展開している各残基骨格(炭素6個と水素7個)の $7 \times 6 = 42$ 個の格子状相関を抽出し、その後HSQC、Edited H2BC、HMBC等による各原子核の帰属を進めた。単一のDSの試料では相関重複が複雑であるため、DSが異なる複数試料に対して解析を行い、全ての構成残基の帰属が達成できた(図4)<sup>[16]</sup>。

メチルセルロースの他、エチルセルロース<sup>[17]</sup>、カルボキシメチルセルロース<sup>[18~20]</sup>等のセルロースエーテルや酢酸セルロースエステル<sup>[21]</sup>について同様の評価を行ったところ、分子鎖方向に対して隣接する二つの残基によって、各構成残基の

化学シフトは変化しないことが確認された。つまり各残基の化学シフトは隣接の配列状態にかかわらず、全て同一の化学シフトである。また各構成残基の $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$ 化学シフトは2, 3, 6位の置換基効果の加成性だけで説明できることも確認された。一方、置換基の化学シフトに関しては、メチル基といった立体的に小さな置換基の場合のみ置換基効果の加成性が成立するが、置換基鎖長が僅かに長く、負電荷を有しているカルボキシメチルセルロースでは加成性が成立しない<sup>[20]</sup>。よって置換基の化学シフトは置換基間相互作用による置換基のコンフォメーション変化を鋭敏に反映していることが実験的に確認された。

帰属が達成できれば定量操作(波形分離や積分)、緩和解析を通して様々な情報が得られる。反応の進行に伴う各残基組成の変化を明らかにするために、不均一反応でDSが異なるメチルセルロース試料を合成し、各試料の定量 $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルを取得した。共鳴線に対して積分および波形分離を適用して、置換基の分布状態を解析した。その結果、DS変化に対する2, 3, 6位の置換基分布( $\text{DS}_2$ ,  $\text{DS}_3$ ,  $\text{DS}_6$ )と各構成残基のモル分率

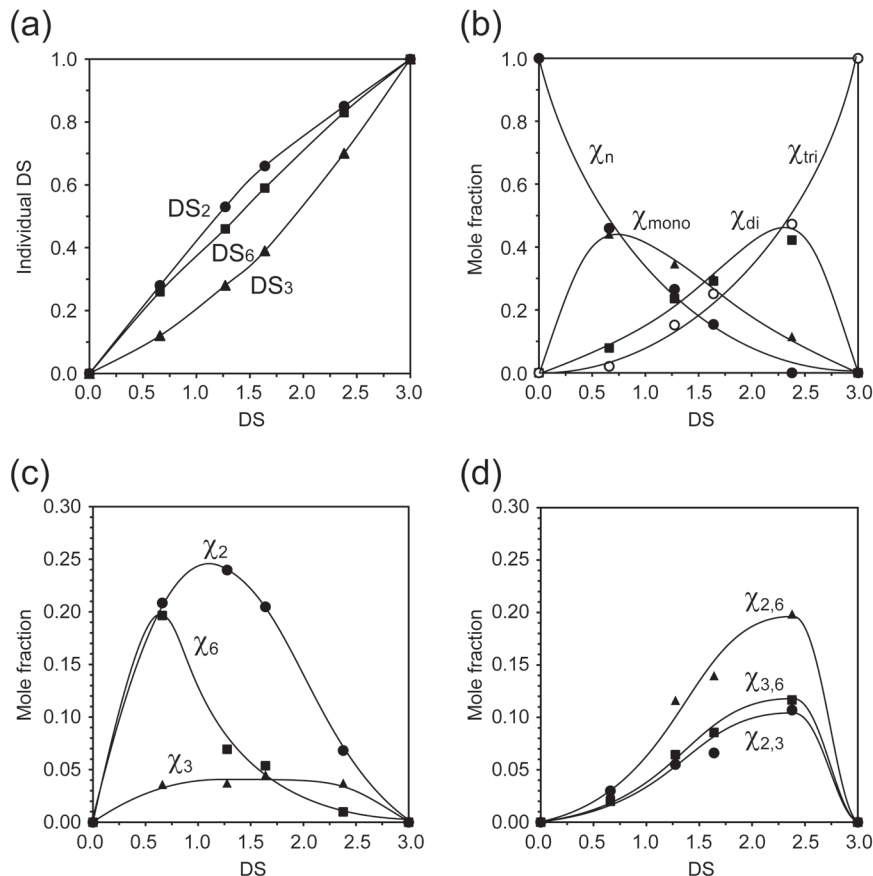


図5 不均一反応によって得られたメチルセルロースの置換基分布<sup>[16]</sup>。各DSに対する(a) 2, 3, 6位置換基分布状態変化、(b) 未置換、一置換、二置換、三置換残基のモル分率( $\chi$ )変化、(c) 三種類の一置換残基の $\chi$ 変化、(d) 三種類の二置換残基の $\chi$ 変化。

( $\chi$ ) をプロットすると、誘導体化の反応メカニズムが明らかになった(図5)<sup>[16]</sup>。例えば置換基分布はつねに  $DS_2 > DS_6 \gg DS_3$  の順であり、各水酸基の求核性は  $-\text{OH}(2) > -\text{OH}(6) \gg -\text{OH}(3)$  ということがわかる。これはアノマー炭素から距離的に近い2位水酸基が高く分極していることを反映しており、一般的に反応性の高い一級(6位)水酸基よりも置換されやすいことを示していた。また構成残基のモル分率( $\chi$ )の変化では、反応初期( $DS < 1$ )においては2位もしくは6位が置換された一置換モノマーが急激に生成し、3位一置換モノマーは殆ど生成しないことが確認された。反応中期( $1 < DS < 2$ )では二置換体が生成し、2,6位二置換が優先的に生成した。しかし2,3位と3,6位二置換体が高い割合で存在していることから、反応初期と比べて反応中期では3位水酸基の反応性が向上したと言える。この変化はセルロースの高次構造変化、すなわち置換反応の進行による分子間・分子内水素結合の切断が、未置換セルロース水酸基の反応性を変化させたと考えられることができる。一方、均一系で合成したメチルセルロースに対して同様の解析を行うと、3位水酸基の反応性が不均一系と比較して飛躍的に向上していた。つまりセルロース溶媒や水酸基間での水素結合が置換基分布や残基組成に強い影響を及ぼしていることが立証された。現在も各種反応条件と詳細な置換基分布状態を徹底的に解明し、同時に分布状

態と諸物性との関係性について解析を進めている。

帰属という観点からは、 $^{13}\text{C}$  標識試料<sup>[10, 2, 23]</sup>を用いれば簡便かつ短時間で帰属が達成できる。上述のセルロース生産菌を用いて合成した完全 $^{13}\text{C}$  標識セルロースを誘導体化し、 $^{13}\text{C}$  検出二次元NMRスペクトルを測定すれば良い。 $^{13}\text{C}$  標識セルロースより合成したカルボキシメチルセルロース( $DS = 0.91$ )では主鎖骨格が標識されており(図6)、INADEQUATEスペクトルから未置換残基と3種類の一置換グルコース残基の相関ネットワークが容易に帰属できた(図7)。さらに $^{13}\text{C}$  TOCSY,  $^{13}\text{C}$  COSYといった $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  二次元NMRも適用でき、一般的な $^1\text{H}$  共鳴線帰属と同様な方法で骨格炭素の $^{13}\text{C}$  共鳴線帰属が可能である<sup>[24]</sup>。

#### 4. $\beta$ -(1→3, 1→6)-グルカンの高次構造と秩序—無秩序転移の解明

セルロースはグルコースが $\beta$ -(1→4)-グリコシド結合した直鎖状高分子であり、分子間水素結合によって繊維状に配列した高次構造を形成している。一方、グルコースが $\beta$ -(1→3)-結合した主鎖を持つ多糖は $\beta$ -(1→3)-ファミリーと呼ばれ、螺旋構造を取るものが多い。 $\beta$ -(1→3)-グルカンはキチンと結合して細菌、真菌、酵母、キノコなどの細胞壁を構成している構造多糖である。 $\beta$ -(1→3)-ファミリーの中で、 $\beta$ -(1→3)-主鎖に $\beta$ -

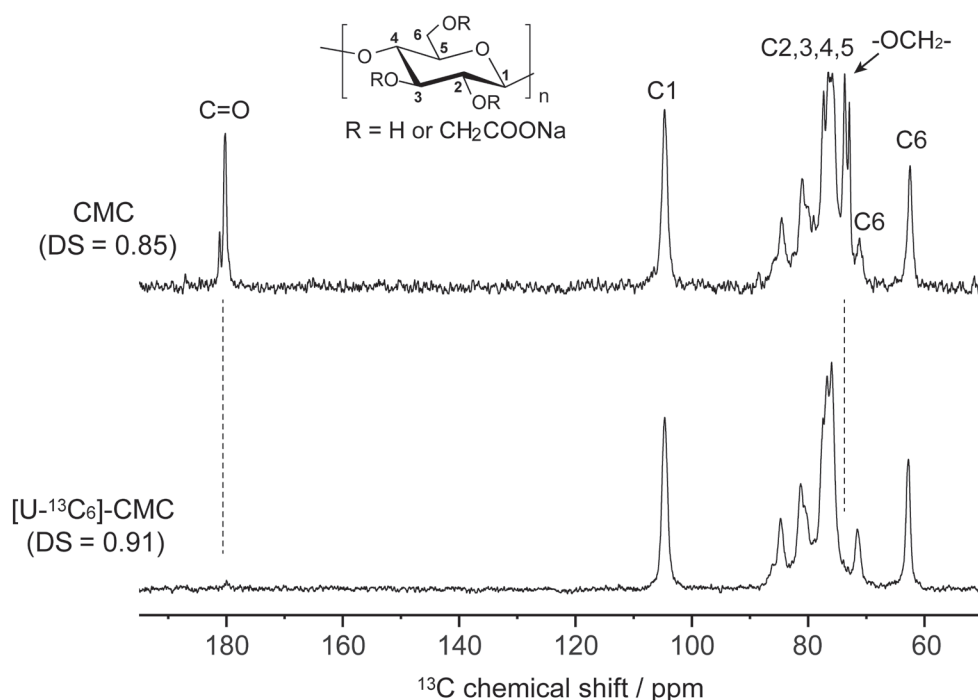


図6 天然セルロース(上)と $^{13}\text{C}$ 標識セルロース(下)から合成したカルボキシメチルセルロースの $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル<sup>[24]</sup>。標識試料ではセルロース炭素のみが標識されている。

(1→6)-結合の分岐側鎖を持つβ-(1→3, 1→6)-グルカンには腫瘍免疫賦活作用を持つものが多い。抗がんという視点で、シイタケ子実体のレンチナン、スエヒロタケ由来のシゾフィランが医薬品として研究開発されていた。しかし抽出が煩雑であるため、極めて高価なものであった。

ある種の黒酵母はβ-(1→3)-グルカンを高効率

で菌体外に生産するが、水不溶性のため低分子化による可溶化が困難という理由から産業利用が行われてこなかった。最近、穏やかな水熱処理を適用することで黒酵母β-グルカンの可溶化が可能となり、伊藤忠製糖(株)により「KBG」として市場化された(図8)<sup>[25]</sup>。KBGの一次・高次構造とその構造転移現象の解明に溶液・固体NMRが効

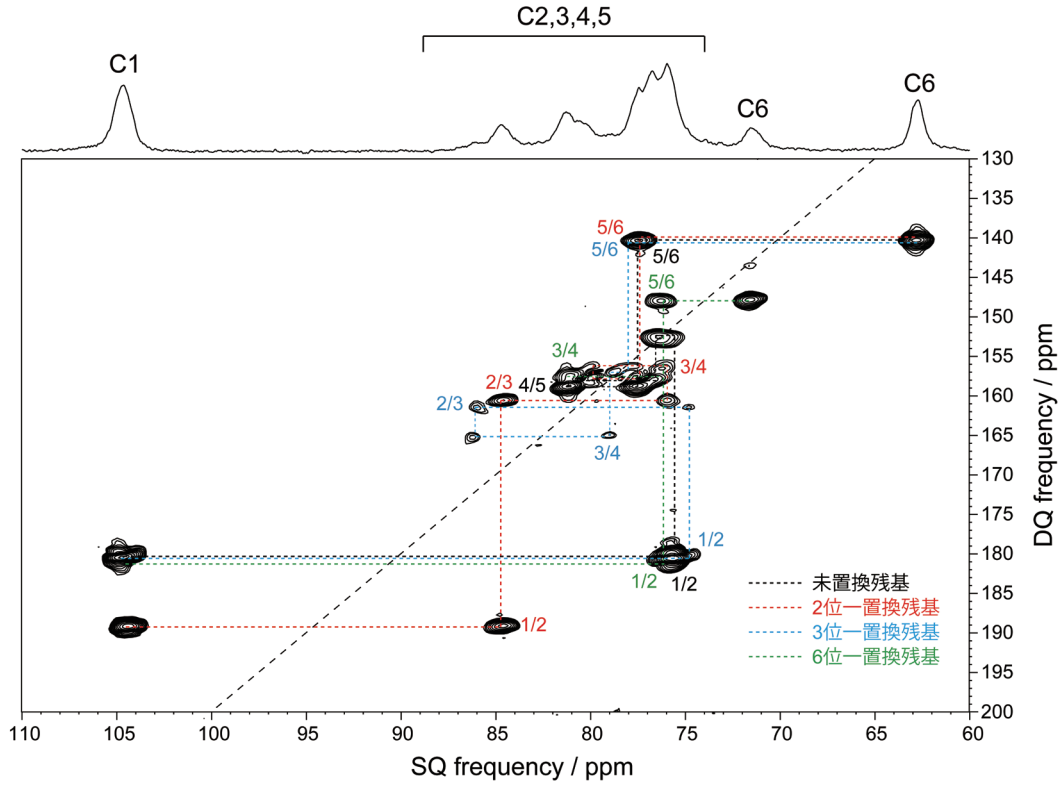


図7 セルロース骨格を<sup>13</sup>C標識したカルボキシメチルセルロース(DS=0.91、図6下)の<sup>13</sup>C INADEQUATEスペクトル<sup>[24]</sup>。四種類の構成残基の相関ネットワークが確認できる。

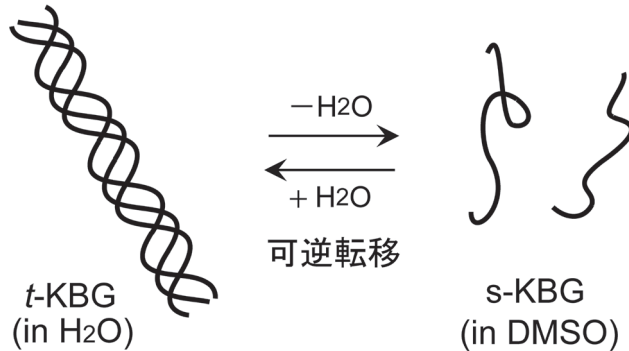
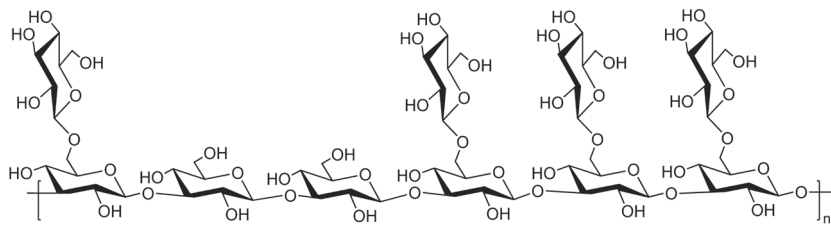


図8 NMRによって明らかにされた黒酵母β-(1→3, 1→6)-グルカン「KBG」の繰返し単位構造(上)とその高次構造に関する秩序-無秩序転移現象(下)

果を發揮した。

一次構造決定はDMSO- $d_6$ に溶解したKBGに対して行い、セルロース誘導体同様に $^{13}\text{C}$ 共鳴線の帰属に重点を置いた。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-TOCSY測定から構造中に10種類のグルコース残基が検出され、その後HSQC、Edited H2BC、HMBCスペクトルで全ての $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 共鳴線の帰属が確定した。 $^1\text{H}$  NOESYによって残基配列を決定し、その一次構造は $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-主鎖6残基毎に4残基の $\beta$ -

(1 $\rightarrow$ 6)-グルコース分岐を持つ繰返し構造であることが明らかになった(図8)<sup>[26]</sup>。既知の $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-グルカンと比較してKBGの側鎖分岐度(67%)は突出しており、側鎖間でのスタッキングで高次構造を形成していないと予想した。しかしD $_2$ O中では線形が急激に広幅化したことから、溶媒のDMSO- $d_6$ /D $_2$ O混合比を変化させたところ、D $_2$ Oが70(v/v)%以上では何らかの高次構造を形成し、構造転移することが確認された(図

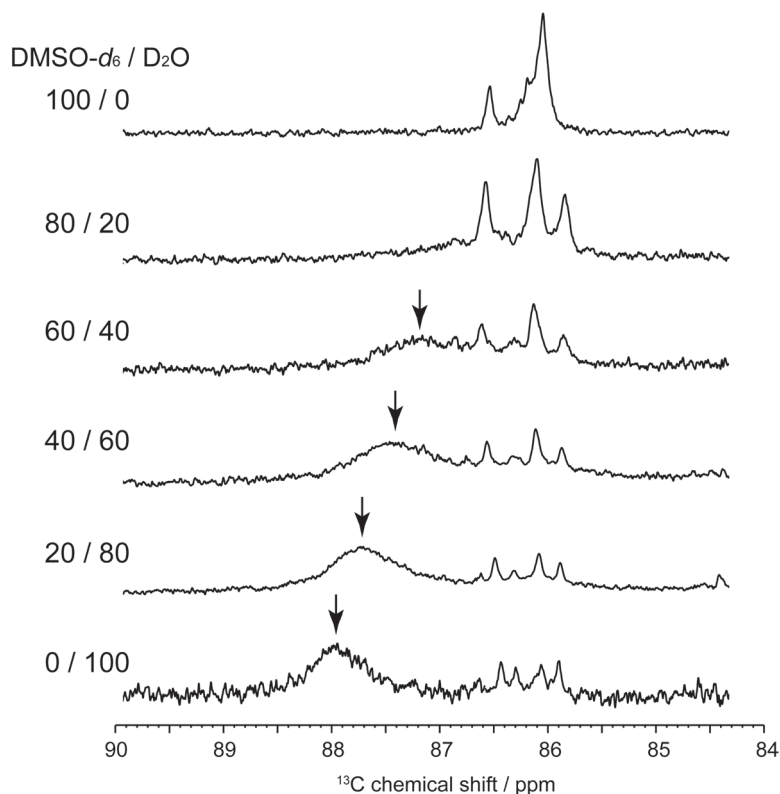


図9 DMSO- $d_6$ /D $_2$ O溶媒混合比を変化させて測定したKBGの $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル(C3主鎖領域)<sup>[27]</sup>。D $_2$ Oの割合が上昇するに伴い、溶解度が低下し、運動性の低い三重螺旋構造(矢印)の共鳴線強度が向上する。

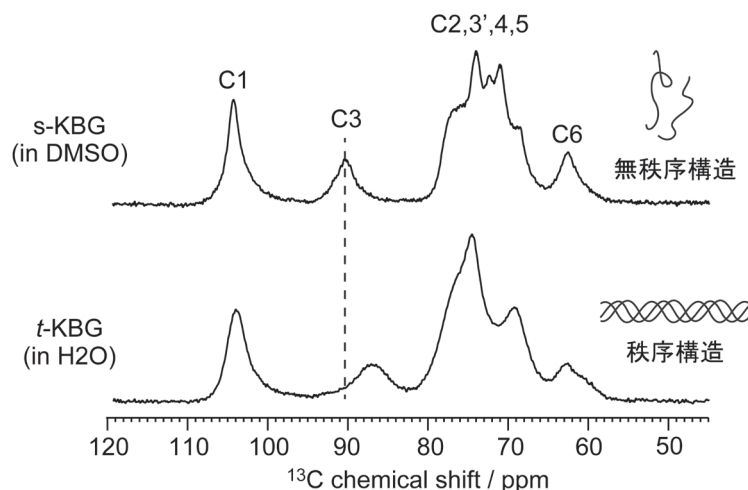


図10 DMSO(上)および水(下)から凍結乾燥したKBGのCPMAS  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル。ランダムコイル(無秩序構造)から三重螺旋(秩序構造)形成に伴って、主鎖C3の化学シフト変化が伴う。帰属のC3'は側鎖を示す。



9)<sup>[27]</sup>。そこで水とDMSOにそれぞれ溶解したKBGを凍結乾燥し、固体NMRによる高次構造解析を行った。

水およびDMSOから凍結乾燥したKBGのCPMASスペクトルでは主鎖C3共鳴線で5ppm変化しており、主鎖骨格の構造変化が示唆された。さらに $T_1$ 緩和時間より水から凍結乾燥したKBGはDMSO試料よりも運動性が低下しており、特に主鎖C1とC3の $T_1$ はDMSO試料の三倍程度であった。これは高次構造形成によって $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-主鎖グリコシド結合の運動性が極端に拘束されていることを示していた。また $T_{1\rho}$ 値の増大も水から乾燥したKBGでは確認され、分子鎖全体としての運動性が低下していることが明らかになった。並行してWAXS、SAXSによる解析を進めた結果、KBGは水中において三本鎖三重螺旋構造を形成し、そのピッチ長は1.82nmであった。また各分子鎖は主鎖6残基(繰返し構造単位)で1回螺旋していた。水中の三重螺旋構造はDMSO添加に伴い、DMSO濃度が約70%で螺旋構造が崩壊し、ランダムコイル化する。またランダムコイルは水を添加することで一部三重螺旋へ可逆的に転移することがNMRによって明らかにされた。主鎖3残基毎に1残基の側鎖を持つシゾフィラン(分岐度33%)の三重螺旋構造とKBG(分岐度67%)三重螺旋構造の緩和時間を比較した結果、KBG三重螺旋の構造安定性が示唆され、回折データの半値幅からもKBG三重螺旋のピッチ方向における構造安定性が確認された。よって三重螺旋は側鎖間の水素結合によって安定化しており、分岐度の高いKBGの方がより構造安定な三重螺旋を形成していることが明らかになった。以上のように、溶液NMRと固体NMRの活用によって、構造未知多糖の一次構造と高次構造の全貌が明らかにできる。

## 5. おわりに

多糖類や複合糖質は構造の複雑さが故に、「多糖のNMRは複雑すぎて情報が得られない」と仰られる研究者に出会うこともある。しかし、溶液・固体ともに二次元展開することで構造情報が浮かび上がってくることが多い。さらに緩和解析などを取り入れることで、結晶・非結晶や多糖特有の結晶多型や構造転移現象を明らかにすることができる。NMRは構造情報はもちろん、動的情報を得る上で他の分析機器の追隨を許さない、唯

一無二の分析装置である。今後もNMRの特長を活かした多糖類研究を進め、同時にNMRの有効性とその素晴らしさを伝えていきたいと考えている。

## 謝 辞

本稿で述べた研究の一部は近藤修啓氏・平林克樹博士(伊藤忠製糖(株))、尾形慎博士(福島高専)の協力によって行われた。この場をお借りして感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] Nishikawa, S. and Ono, S., (1913) Transmission of X-rays through fibrous, lamellar and granular substances. *Proc. Math. Phys. Soc. Tokyo* **7**, 131–138.
- [2] Atalla, R. H. and Vanderhart, D. L., (1984) Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* **223**, 283–285.
- [3] VanderHart, D. L. and Atalla, R. H. (1984) Studies of microstructure in native celluloses using solid-state carbon-13 NMR. *Macromolecules* **17**, 1465–1472.
- [4] Lesage, A., Bardet, B., and Emsley, L. (1999) Through-bond carbon-carbon connectivities in disordered solids by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 10987–10993.
- [5] Verel, R., van Beek, J. D., and Meier, B. H. (1999) INADEQUATE-CR experiments in the solid state. *J. Magn. Reson.* **140**, 300–303.
- [6] Kono, H., Erata, T., and Takai, M. (2003) Determination of the through-bond carbon-carbon and carbon-proton connectivities of the native celluloses in the solid state. *Macromolecules* **36**, 5131–5138.
- [7] Kono, H., Numata, Y., Erata, T., and Takai, M. (2004)  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  resonance assignment of mercerized cellulose II by two-dimensional MAS NMR spectroscopies. *Macromolecules* **37**, 5310–5316.
- [8] Kono, H., Numata, Y., Erata, T., and Takai, M. (2004) Structural analysis of cellulose triacetate polymorphs by two-dimensional solid-state  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation NMR spectroscopies. *Polymer* **45**, 2843–2852.
- [9] Kono, H., Yunoki, S., Shikano, T., Fujiwara, M., Erata, T., and Takai, M. (2002) CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR study of cellulose and cellulose derivatives. 1. Complete assignment of the CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of the native cellulose. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 7506–7511.
- [10] Kono, H., Erata, T., and Takai, M. (2002) CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR study of cellulose and cellulose derivatives. 2. Complete assignment of the  $^{13}\text{C}$  resonance for the ring carbons of cellulose triacetate polymorphs. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 7512–7518.
- [11] Kono, H. and Numata, Y. (2004) Two-dimensional spin-exchange solid-state NMR study of the crystal structure of cellulose II. *Polymer* **45**, 4541–4547.
- [12] Kono, H. and Numata, Y. (2006) Structural investigation of cellulose I $_{\alpha}$  and I $_{\beta}$  by 2D RFDR NMR spectroscopy: determination of sequence of magnetically inequivalent D-glucose units along cellulose chain. *Cellulose* **13**, 317–326.

- [13] Langan, P., Sukumar, N., Nishiyama, Y., and Chanzy, H. (2005) Synchrotron X-ray structures of cellulose I<sub>β</sub> and regenerated cellulose II at ambient temperature and 100 K. *Cellulose* **12**, 551–562.
- [14] Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., and Langan, P. (2002) Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I(α) from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14300–14306.
- [15] Kono, H., Oka, C., Kishimoto, R., and Fujita, S. (2017) NMR characterization of cellulose acetate: mole fraction of monomers in cellulose acetate determined from carbonyl carbon resonances. *Carbohydr. Polym.* **170**, 23–32.
- [16] Kono, H., Fujita, S., and Tajima, K. (2017) NMR characterization of methylcellulose: Chemical shift assignment and mole fraction of monomers in the polymer chains. *Carbohydr. Polym.* **157**, 728–738.
- [17] Kono, H. (2017) Determination of mole fractions of ethyl-cellulose-containing monomers by NMR. *Carbohydr. Res.* **445**, 51–60
- [18] Kono, H. (2013) <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shift assignment of the monomers that comprise carboxymethyl cellulose. *Carbohydr. Polym.* **97**, 384–390.
- [19] Kono, H., Oshima, K., Hashimoto, H., Shimizu, Y., and Tajima, K. (2016) NMR characterization of sodium carboxymethyl cellulose: Substituent distribution and mole fraction of monomers in the polymer chains. *Carbohydr. Polym.* **146**, 1–9.
- [20] Kono, H., Oshima, K., Hashimoto, H., Shimizu, Y., and Tajima, K. (2016) NMR characterization of sodium carboxymethyl cellulose 2: Chemical shift assignment and conformation analysis of substituent groups. *Carbohydr. Polym.* **150**, 241–249.
- [21] Kono, H., Hashimoto, H., and Shimizu, Y. (2015) NMR characterization of cellulose acetate: chemical shift assignments, substituent effects, and chemical shift additivity. *Carbohydr. Polym.* **118**, 91–100.
- [22] Yunoki, S., Osada, Y., Kono, H., and Takai, M. (2004) Role of ethanol in improvement of bacterial cellulose production: analysis using <sup>13</sup>C-labeled carbon sources. *Food Sci. Technol. Res.* **10**, 307–313.
- [23] Kono, H., Erata, T., and Takai, M. (2003) Complete assignment of the CP/MAS <sup>13</sup>C NMR spectrum of cellulose III<sub>I</sub>. *Macromolecules* **36**, 3589–3592.
- [24] Kono, H., Anai, H., Hashimoto, H., and Shimizu, Y. (2015) <sup>13</sup>C-Detection two-dimensional NMR approach for cellulose derivatives. *Cellulose* **22**, 2927–2942.
- [25] Hirabayashi, K., Kondo, N., and Hayashi, S. (2016) Characterization and enzymatic hydrolysis of hydrothermally treated β-1,3-1,6-glucan from *Aureobasidium pullulans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 206–212.
- [26] Kono, H., Kondo, N., Hirabayashi, K., Ogata, M., Totani, K., Ikematsu, S., and Osada, M. (2017) Two-dimensional NMR data of a water-soluble β-(1→3, 1→6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* and schizophyllan from *Schizophyllum commune*. *Data in Brief* **15**, 382–388.
- [27] Kono, H., Kondo, N., Hirabayashi, K., Ogata, M., Totani, K., Ikematsu, S., and Osada, M. (2017) NMR spectroscopic structural characterization of a water-soluble β-(1→3, 1→6)-glucan from *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydr. Polym.* **174**, 876–886.



甲野 裕之 (こうの・ひろゆき)

1994年 北海道大学工学部卒業  
 1996年 北海道大学大学院工学研究科修士課程修了  
 1996～1997年 北海道総合研究機構工業試験場研究員  
 2000年 北海道大学工学研究科博士課程中退  
 2001年～2007年 ブルカーバイオスピン株式会社  
 2003年 博士(理学・北海道大学)取得  
 2007年 苫小牧高専 准教授  
 2019年 苫小牧高専 教授 現在に至る

# 磁場配向NMR —反磁性体の磁場応答を利用した構造解析—

京都大学大学院農学研究科

久住 亮介

r\_kusumi@kais.kyoto-u.ac.jp

## はじめに

NMRは、強磁場下における核スピンの振る舞いを巧みに利用した分析法である。NMRでは磁場強度が強いほど感度や分解能が高くなるため、超電導磁石 (SCM) を用いた磁場発生が主流である。強磁場下では、反磁性体も磁場に応答する。磁場強度は1 GHz級の超強磁場NMRで23.5T、汎用の400 MHz NMR用SCMでも9.4Tであり、反磁性体の磁場応答を引き出すのに十分な強さである。そのような強磁場を使用するNMRにおいて、磁場応答、特に磁場配向を活用した構造・ダイナミクス解析がこれまでに多数行われてきた。NMRにおける種々の相互作用のうち、化学シフト相互作用、双極子相互作用、間接スピン相互作用、および四極子相互作用 (四極子核の場合) は異方性を有している。これらは溶液中の分子など等方条件下であれば等方化されるが、磁場配向した分子であれば双極子相互作用や化学シフトの異方性の情報を抽出できるようになり、構造・ダイナミクスについての有用な知見を得ることが可能となる。本稿では、磁場配向を利用したNMR解析“磁場配向NMR”について、磁場配向の基本的な原理を踏まえつつその代表的な活用例を示すとともに、著者らが近年取り組んでいる動的磁場を利用した高度な配向制御とそのNMRへの応用事例を紹介したい。なお、液晶などを用いた磁場配向NMR<sup>[1~5]</sup>や反磁性体の磁場応答<sup>[6]</sup>、動的磁場による磁場配向<sup>[7,8]</sup>については多くの優れた成書・総説があり、本稿でも大いに参照させていただいた。詳細を学びたい方はぜひ目を通してほしい。

## 磁場配向の条件：

### 磁化率異方性、磁気エネルギー、配向時間

物質を磁場配向させるためには、まずその物質が外部磁場に対して異方性を有している必要がある。異方性には磁化率の異方性と形状異方性がある。

結晶は、磁化率異方性を有するものの典型である。最も対称性の高い立方晶は磁気的にも等方であるが、一軸性結晶 (六方晶、三方晶、正方晶) や二軸性結晶 (直方晶、単斜晶、三斜晶) は磁化率異方性を有している。磁化率の異方性は2階の磁化率テンソル $\chi$ で表され、一軸性結晶では3つの主値 ( $\chi_1, \chi_2, \chi_3$ ) のうち1つが異なり、二軸性結晶では3つとも異なる。 $\chi$ の主軸と結晶軸の対応関係は結晶系により決まっており、例えば単斜晶では結晶の2回回転軸が主軸の1つと一致している<sup>[9,10]</sup>。液晶ドメインや高分子短繊維も磁化率異方性を有している。液晶ドメイン中では個々の分子が配向の秩序度を有するため、分子の磁化率異方性がドメインの異方性を通じて反映される。高分子短繊維では繊維軸方向に分子鎖が配向しているため、繊維軸方向とそれに直行する方向とで磁化率が異なる (それぞれ $\chi_{\parallel}$ および $\chi_{\perp}$ )。これらの磁化率異方性は化学結合の磁化率異方性に起因しており、結晶・液晶・繊維の固有の対称性により平均化された結果が各々の磁化率異方性を与えている。

一方、棒状や円盤状のような粒子は、物質固有の磁化率異方性に加えて形状異方性に基づく磁化率異方性を有している。これは、磁場印加により誘起される磁気モーメントの大きさが、磁場に対する粒子の方向に依存して変化することに起因している。

磁場配向は、磁場下で物質の得る磁気エネルギーが熱エネルギーなど他の競合エネルギーを凌駕する場合に顕著に現れる。正の一軸性の磁化率異方性 $\chi_a (= \chi_{\parallel} - \chi_{\perp} > 0)$ を持つ粒子に静磁場を印加したとすると、その粒子の磁場配向の駆動力は異方性磁気エネルギー

$$E = -\frac{\chi_a V B^2}{2\mu_0} \cos^2 \theta \quad (1)$$

で表される。 $B$ は磁束密度、 $\mu_0$ は真空の透磁率、 $V$ は体積、 $\theta$ は $\chi_{\parallel}$ 軸が $B$ となす角度である。磁

場配向は、磁気エネルギーのミニマムに磁化軸が束縛されるために生じると理解される。(1)式より、静磁場下では磁場方向に $\chi_{\parallel}$ 軸が束縛され、その束縛の程度は磁場強度、粒子の体積、および磁化率異方性が大きいほど強くなることが分かる。

エネルギーミニマムの谷が非常に深い、あるいは温度が十分に低い場合は谷周りでの熱ゆらぎは無視できるが、そうでない場合は配向ゆらぎを考慮しなければならない。一軸異方性粒子の静磁場配向の場合、平衡状態での配向角度の分布は、Boltzmann分布を用いて

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{\mu_0 k_b T}{\chi_a V B^2} \quad (2)$$

と表される。 $k_b$ はボルツマン定数である。許容する配向ゆらぎを $0.5^\circ$ 、 $\chi_a$ を $10^{-7}$ 、 $B$ を10T、温度を300Kとした場合、数 $\mu\text{m}$ 程度のサイズであれば有意に磁場配向することが分かる。

実際の磁場配向実験は、配向させたい粒子を媒体に均一分散させた状態で行う。したがって、磁場配向に要する時間 $\tau$ は媒体の粘度に依存する。配向時間 $\tau$ は、

$$\tau = \frac{6\mu_0 \eta}{F(D) \chi_a B^2} \quad (3)$$

で与えられる<sup>[11]</sup>。 $\eta$ は媒体の粘性係数、 $F(D)$ は粒子の形状因子である。粒子の回転を駆動する磁気トルクと回転の際に生じる粘性抵抗は共に粒子の体積に依存するため、配向時間は体積による影響を受けない。一方、粘性抵抗は粒子の形に大きく依存するため、配向時間は粒子の形状により変わってくる。 $\chi_a$ が $10^{-7}$ の球状の微粒子( $F(D) = 1$ )を粘度10Pa·sの媒体に分散させ、10Tの静磁場を印加する場合、8s程度で磁場配向が完了することが分かる。

### 静磁場配向下での残余異方性効果を利用した構造解析

通常、溶液中にある単分子では磁場下で得る磁気エネルギーに対して熱エネルギーが圧倒的に大きいため、磁場配向は起こらない。しかしながら、常磁性イオンが結合したミオグロビンや豊富な芳香族塩基に由来し大きな磁化率異方性を有する核酸などでは、単分子でも強磁場下で部分的に磁場配向する<sup>[12, 13]</sup>。その結果、溶液中など等方条件下では平均化されるはずの双極子相互作用や化学シフト相互作用もしくは四極子相互作用な

どの異方性が完全には消失せずに残り、それらを反映したスペクトルが得られる。このような微弱な配向下で残存する異方的相互作用は、残余双極子相互作用(RDC)や残余化学シフト異方性(RCSA)などと呼ばれている。

RDCなどの残余異方性効果は、解析対象そのものの磁場配向が困難であっても、試料調製を工夫することで観測することができる。1960年ごろには既に磁場配向した液晶のNMR<sup>[14]</sup>が測定されていたが、その後、水系のネマチック液晶相内に共存させたタンパク質も運動が異方的に束縛されて微弱ながら配向し、RDCが観測されることが見出された<sup>[15]</sup>。タンパク質の立体構造は主にNOEなどの短距離情報を基に計算されるが、通常の溶液NMRでは複合ドメイン間からなる高分子量タンパク質などの全体構造を決定することは難しい。しかしながら、RDCを観測できればNH結合などの磁場に対する相対的な方位という遠距離情報が利用可能となり、ドメイン間の相対配置や構造変化の情報を得ることが可能となる<sup>[16, 17]</sup>。これまでに、RDCによる遠距離情報を援用した構造解析により、様々なタンパク質のドメイン構造やその動的変化が解明されている<sup>[1, 17, 18]</sup>。

残余異方性効果は、液晶以外の“弱く”磁場配向する物質を配向剤として活用することでも観測できる。RDC・RCSA観測を可能とする異方性溶媒(磁場配向により溶質に異方的な測定環境を提供する溶媒)には、液晶相を形成するディスク状脂質二重膜のバイセル<sup>[19]</sup>のほか、繊維状バクテリアオファージPfl<sup>[20]</sup>や棒状ウイルス<sup>[21]</sup>、紫膜<sup>[22]</sup>などがある。バイセルはディスク面が磁場と平行になるよう配向するが、 $\text{Tm}^{3+}$ などのランタニドイオンを作用させて磁化率異方性を変化させることで磁場と垂直に配向させることができる<sup>[23]</sup>。また、脂質二重膜が形成する巨大なベシクルの磁場配向を利用すれば、磁場方向に対する化学シフトの振動パターンやPISEMA (Polarization Inversion Spin Exchange at the Magic Angle)<sup>[24]</sup>によるPISA (Polarity Index Slant Angle) wheelの観測<sup>[25, 26]</sup>などを通じて、膜に結合したペプチドの膜法線周りの回転運動やその配向情報を得ることも可能である<sup>[3]</sup>。なお、異方性溶媒を用いたRDC観測は、中～低分子有機化合物のコンフォメーション・コンフィグレーションの決定やエナンチオマーの区別、鏡像体過剰率の決定にも有効である<sup>[2]</sup>。この場合、水系ではなく有機溶媒系の

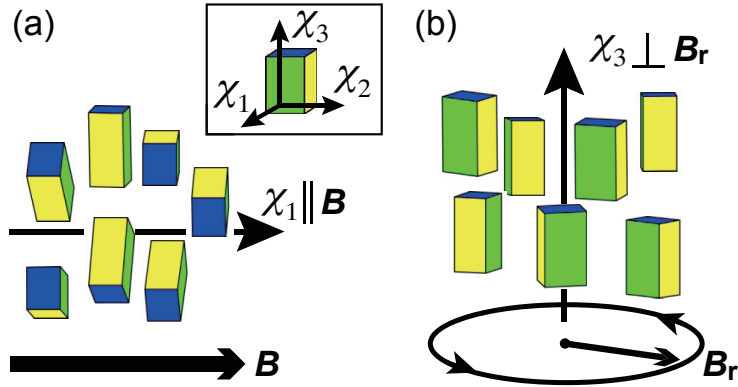


図1 (a) 静磁場下および (b) 回転磁場下における二軸性結晶の配向形態。二軸性結晶には直方晶（磁化軸と結晶軸が全て一致）を想定している。

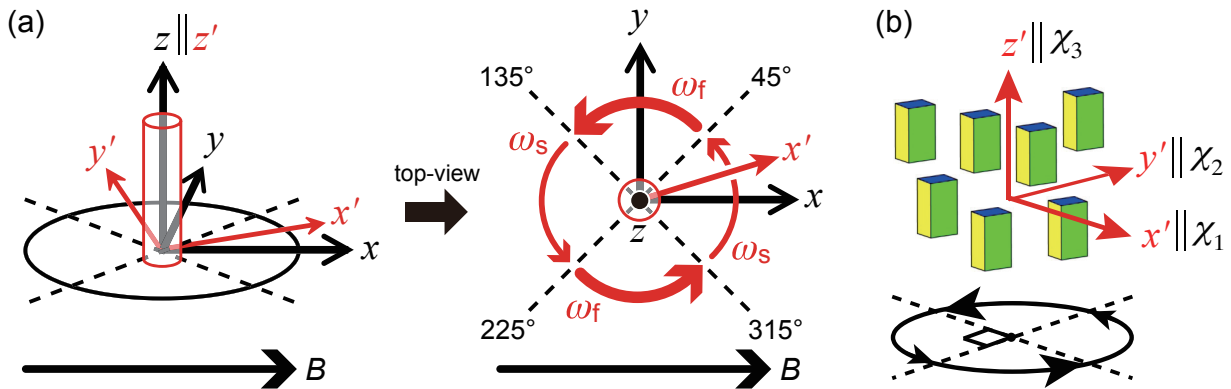


図2 (a) 周波数変調型の回転磁場（90°変調回転磁場、 $\omega_f > \omega_s$ ）と (b) 誘起される二軸性結晶（直方晶）の三次元配向。配向した結晶（磁化軸）は試料管とともに回転していることに注意。

リोटロピック高分子液晶などが有用であることが多い。

異方性溶媒を使用する場合の注意点として、配向度が高すぎると残余の異方性相互作用が強くなり、ピークが広幅化して解析が困難となる点が挙げられる。したがって、場合によっては濃度を変えるなどで配向度を微調整する必要がある。また、温度やpH、塩濃度、電荷、水系／有機系などの制約も考慮し、試料や目的にあった溶媒を適切に選択しなければならない。磁場配向性や温度・pH安定性、塩濃度耐性などを向上させた新しい異方性溶媒の開発も行われている<sup>[27~30]</sup>。

動的磁場による高次元異方化とNMRへの応用

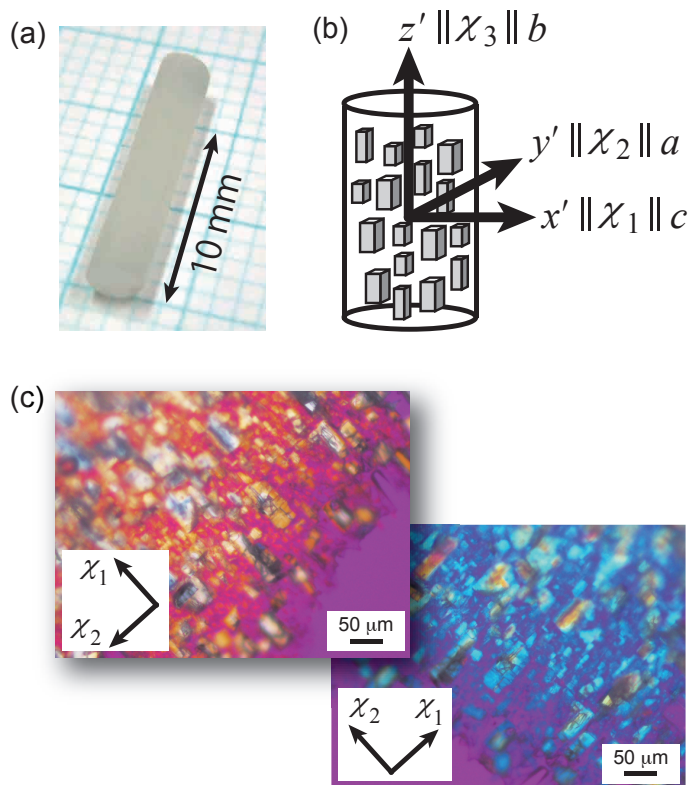
前項で紹介した残余異方性解析のための磁場配向は、全て静磁場下における一軸異方性粒子の一軸配向に分類される。対象が二軸性結晶（ $\chi_1 > \chi_2 > \chi_3$ ）であれば、動的磁場の利用により静磁場下とは異なる配向様式を付与することができる。図1に、二軸性結晶に静磁場および定速 $\omega$ で回転する回転磁場  $B_r$  ( $B \cos \omega t, B \sin \omega t, 0$ ) を印加した場合の配向形態をそれぞれ示す。静磁場

では $\chi_1$ 軸が静磁場と平行に一軸配向するが、一定速度以上の回転磁場下では磁気エネルギーが平均化され、磁化困難軸である $\chi_3$ 軸が回転面と垂直に一軸配向する。なお、回転速度 $\omega$ は、以下の条件

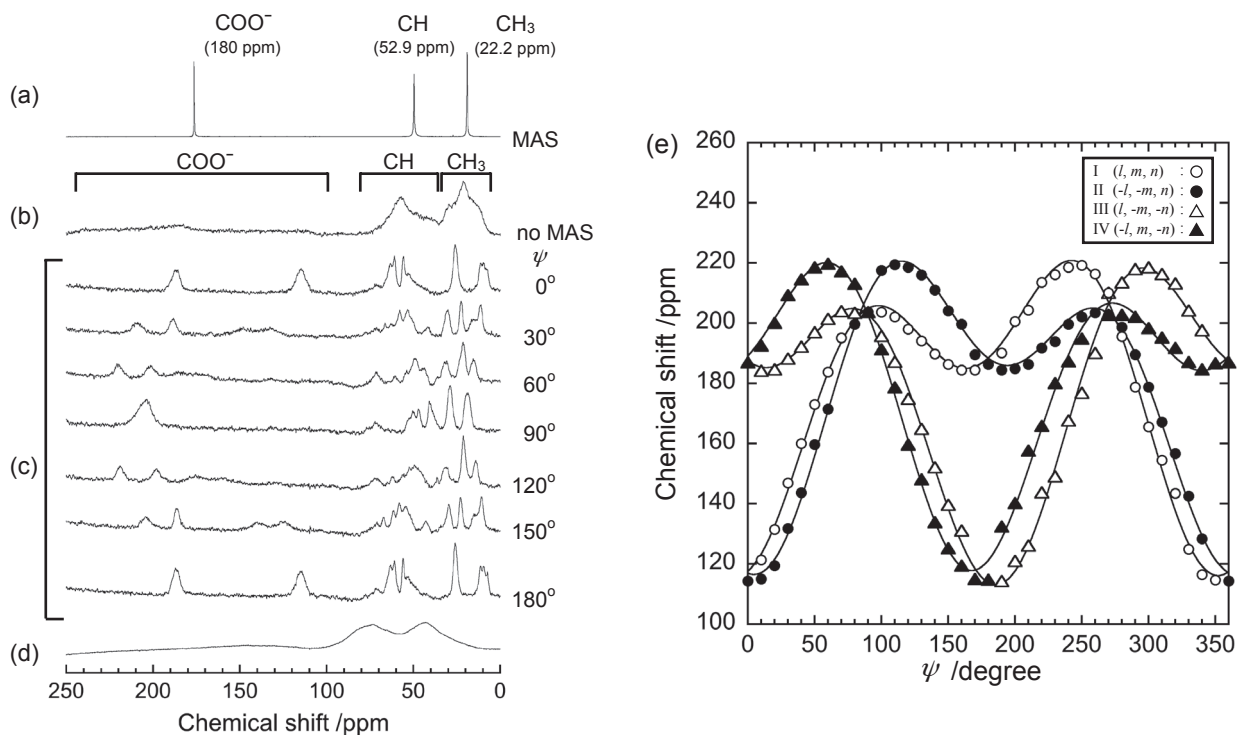
$$\omega \tau \gg 1/2 \tag{4}$$

を満たすよう十分速く設定する必要がある。この条件を Rapid Rotation Regime (RRR) と呼ぶ<sup>[8,31]</sup>。RRR条件が満たされない場合、 $\chi_1$ 軸が磁場に追従して回転してしまうため、 $\chi_3$ 軸を回転面に垂直な方向へと配向させるトルクが生じなくなる。

また、二軸性結晶の場合、磁場強度あるいは回転速度を変化させた変調磁場を用いることで、より高次元の配向を達成することができる。図2に、変調磁場の一つである周波数変調型の回転磁場（90°変調回転磁場）<sup>[32]</sup> と、それにより誘起される二軸性結晶の配向形態を示す。 $(x, y, z)$  および  $(x', y', z')$  は、それぞれ実験室座標系と試料管に埋め込まれた座標系（試料管座標系）を表しており、静磁場  $B$  は  $x$  軸と平行に位置している。動的磁場を印加する場合、実際の実験では強磁場 (SCM) を回転させることは困難なため、静磁場



**図3** 90°変調回転磁場により作製したL-アラニン擬単結晶の (a) 外観写真、(b) 磁化軸と結晶軸の対応関係<sup>[37]</sup>、および (c) 薄片についてクロスニコル下で得られた偏光顕微鏡写真。擬単結晶の形状は、固体NMR用の4 mm 試料管に合わせて設計してある。



**図4** L-アラニン微結晶粉末の (a) MAS 下および (b) 非MAS 下での固体<sup>13</sup>C CPスペクトルと、(c) L-アラニン擬単結晶および (d) 高分子マトリクス (UV硬化ポリマー) の固体<sup>13</sup>C CPスペクトル<sup>[37]</sup>。固体NMR測定は、MASプローブに擬単結晶の長軸 ( $\chi_3$  軸) がMAS軸に一致するよう挿入し、擬単結晶を10°ずつ回転させながら行なった。 $\psi$  は擬単結晶の回転角度を表す。擬単結晶のスペクトルからは、差スペクトルによりマトリクス由来の共鳴ピークを除いてある。(e) はカルボキシ基で観測された化学シフト振動パターン<sup>[37]</sup>。MAS軸周りでの測定のため、L-アラニン単位格子内にある4つの磁的に非等価な分子の振動パターンが観測されている。

下で試料側を回転させる。90°変調回転磁場の場合、試料管の変調回転は $\mathbf{B}$ に対して $x'$ 軸が315°傾いた方向から開始し、 $\omega_f$  (45°–135°および225°–315°)  $>$   $\omega_s$  (315°–45°および135°–225°) の条件で90°毎に回転速度を変調させる。この条件下では試料は $x'$ 軸方向で静磁場の影響を最も強く受けるため、磁化容易軸 $\chi_1$ が $x'$ 軸方向に配向する。一方、磁場はRRR条件下で試料管の回転面 $x'y'$ 上に広がって存在するため、磁化困難軸 $\chi_3$ が回転面と垂直な方向に配向する。その結果、残る中間軸 $\chi_2$ も配向することとなり、結晶の三次元配向が達成される。微結晶をあらかじめUV硬化モノマー中に懸濁させておき、三次元配向させた後にUV照射により媒体を固化すると、微結晶が三次元配向した複合体(擬単結晶)が得られる(図3参照)<sup>[32]</sup>。微結晶の三次元配向の成否や配向度、磁化軸と結晶軸の対応関係は、X線回折により確認できる。また、擬単結晶の形状や微結晶の配向方向は、試料管の形や置き方を変えることで自在に制御できる。なお、同様の三次元配向を誘起する変調磁場として、強度変調型の回転磁場<sup>[33, 34]</sup>や間欠回転磁場<sup>[35]</sup>、振動磁場<sup>[36]</sup>なども提案されている。

擬単結晶を活用したNMR法は、化学シフト異方性(CSA)など異方性相互作用の情報を抽出するための有力な手法である。従来法として、CSAすなわち化学シフトテンソルの精密な決定には単結晶の固体NMR(単結晶NMR)<sup>[38, 39]</sup>が用いられるが、測定には数mm程度の巨大な単結晶が要求される。数百 $\mu\text{m}$ 程度のサイズがあればマイクロコイル<sup>[40]</sup>やMASとの組み合わせ<sup>[41]</sup>により解析可能ではあるが、単結晶のセッティングの困難さや低感度などの課題もある。一方、擬単結晶法では8T程度の磁場があれば数 $\mu\text{m}$ ほどの微結晶であっても三次元的に磁場配向させることができ、擬単結晶のサイズや配向方向も配向時の試料容器を変えることで自在に制御することが可能である。また、図3(a)のような擬単結晶に内包させることのできる微結晶の体積は数mmの単結晶と同等以上であり、測定感度も十分高い。図4に、例として数十 $\mu\text{m}$ サイズのL-アラニン微結晶粉末から作製した擬単結晶(図3参照)の固体<sup>13</sup>C CP NMRスペクトルと得られた化学シフトの振動パターンを示す<sup>[37]</sup>。測定には汎用のMASプローブを使用している。粉末パターンと比較して共鳴ピークが先鋭化するとともに、磁場に対する擬単

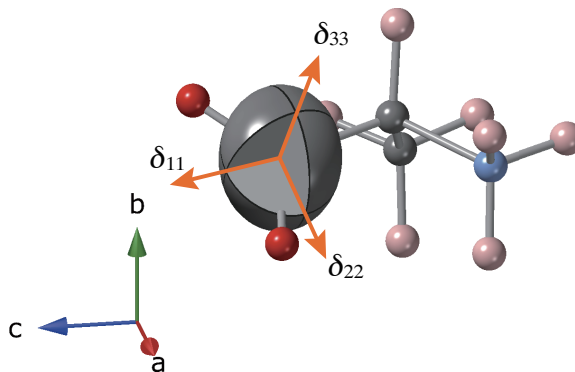


図5 擬単結晶の化学シフト振動パターンから決定したL-アラニンのカルボキシ基の<sup>13</sup>C化学シフトテンソル。単位格子内の4分子のうち、1( $l, m, n$ )のものを示してある。

結晶の方向( $\psi$ )に応じて化学シフトが変化する様子が分かる。観測された振動パターンより、化学シフトテンソルの主値および主軸方向を高精度で決定することに成功している(図5参照)。同手法は双極子核の化学シフトテンソル<sup>[37, 42, 43]</sup>だけでなく四極子核の電場勾配テンソル<sup>[44]</sup>の決定にも有効であることから、微結晶を活用する擬単結晶NMR法は多種多様な研究分野に応用できる可能性を有している。

#### おわりに

現在では1GHz(23.5T)を超える超強磁場NMR磁石の開発が進むとともに、800MHz(18.8T)クラスの強磁場NMRの利用も身近なものとなってきた。磁場配向を利用した構造・ダイナミクス解析が有効な物質の範囲もかなり拡大している。現在、著者らはNMRの磁場下で微結晶懸濁液の三次元配向が可能な磁場配向プローブの開発に取り組んでいる<sup>[45]</sup>。上述の擬単結晶の固体NMRでは微結晶を懸濁させる媒体の置換や固化が必要であり、試料の凝集や損傷(特にタンパク系)、固化に伴う配向の乱れ(線幅の広幅化)、希少試料の測定後の回収などの克服すべき課題がある。また、擬単結晶作製の超伝導磁石と試料配向装置も必要であり、時間的・経済的なロスも大きい。磁場配向プローブでは三次元磁場配向下にある微結晶懸濁体のin situ固体NMRが可能であり、上記の課題を一挙に解決できる。同プローブにより、例えば水系媒体中にて再結晶化させた微結晶から、異方性相互作用の情報を高精度で直接得ることができるかもしれない。なお、測定は媒体を固化せず懸濁液の状態で行うため、試料は実験後の遠心分離などにより容易に回収できると

見込まれる。三次元磁場配向のNMRの汎用化と解析対象の拡大を目指し、日々研究を続けている。磁場配向とNMRによる構造解析は、NMRの測定原理からして合理的で非常に相性の良い組み合わせである(と著者は感じている)。本稿が、読者の方々が磁場配向NMRに興味を持つきっかけになれば幸いである。

最後に、ここに示した擬単結晶の固体NMRについての成果は、京大農学研究科の木村恒久教授(現所属:福井工業大学)と木村史子博士(現所属:京都先端科学大学)および研究室の元学生諸氏と共同で得られたものである。この場を借りて御礼申し上げます。また、紹介した研究の一部は、JSPS科研費および物質・材料研究機構微細構造解析プラットフォームの支援を受けて実施された。単結晶ゴニオプローブの利用などで日頃からご協力いただいている物質・材料研究機構強磁場NMRグループの皆様、そして磁場配向プローブの開発で強力なお力添えをいただいている京大理学研究科の武田和行准教授と著者の研究室で現在奮闘中の門間啓氏にも、深く感謝致します。

#### 参考文献

- [1] Burnell, E.E. and de Lange, C.A. (2003) NMR of Ordered Liquids, Springer Netherlands.
- [2] Kummerlöwe, G. and Luy, B. (2009) Residual dipolar couplings as a tool in determining the structure of organic molecules, *Trends Anal. Chem.* **28**, 483–493.
- [3] Naito, A. (2009) Structure elucidation of membrane-associated peptides and proteins in oriented bilayers by solid-state NMR spectroscopy, *Solid State Nucl. Mag. Reson.* **36**, 67–76.
- [4] Harris, R.K. and Wasylishen, R.E. (2012) Encyclopedia of NMR, vol. 1, 5, and 9, John Wiley & Sons, Chichester, U.K.
- [5] Naito, A., Asakura, T., Shimada, I., Takegoshi, K., and Yamamoto, Y. (2018) Experimental Approaches of NMR Spectroscopy, Springer Singapore, Singapore.
- [6] 尾関 寿美男, 谷本 能文, 山口 益弘, 北沢 宏一 (2002) 磁気科学: 磁場が拓く物質・機能および生命科学のフロンティア, アイピーシー, 東京.
- [7] Kimura, T. (2015) Magnetically Oriented Microcrystal Arrays and Suspensions: Application to Diffraction Methods and Solid-State NMR Spectroscopy, in: Tamura, R. and Miyata, M. (Eds.) Advances in Organic Crystal Chemistry, pp. 167–186, Springer Japan.
- [8] Kimura, F. and Kimura, T. (2018) Magnetically textured powders—an alternative to single-crystal and powder X-ray diffraction methods, *CrystEngComm* **20**, 861–872.
- [9] Weiss, A., Witte, H., 徂徠 道夫 (1980) 磁気化学: 基礎と応用, みすず書房, 東京.
- [10] Nye, J.F. (1985) The groundwork of crystal physics, in: Nye, J.F. (Ed.) Physical properties of crystals: their representation by tensors and matrices, pp. 3–32, Clarendon Press, Oxford.
- [11] Kimura, T., Yamato, M., Koshimizu, W., Koike, M., and Kawai, T. (2000) Magnetic Orientation of Polymer Fibers in Suspension, *Langmuir* **16**, 858–861.
- [12] Tolman, J.R., Flanagan, J.M., Kennedy, M.A., and Prestegard, J.H. (1995) Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins: information for structure determination in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9279–9283.
- [13] Kung, H.C., Wang, K.Y., Goljer, I., and Bolton, P.H. (1995) Magnetic Alignment of Duplex and Quadruplex DNAs, *J. Magn. Reson. B* **109**, 323–325.
- [14] Saupe, A. and Englert, G. (1963) High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Oriented Molecules, *Phys. Rev. Lett.* **11**, 462–464.
- [15] Tjandra, N. and Bax, A. (1997) Direct Measurement of Distances and Angles in Biomolecules by NMR in a Dilute Liquid Crystalline Medium, *Science* **278**, 1111–1114.
- [16] Tjandra, N., Omichinski, J.G., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., and Bax, A. (1997) Use of dipolar  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  and  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  couplings in the structure determination of magnetically oriented macromolecules in solution, *Nature Struct. Biol.* **4**, 732–738.
- [17] Bax, A. (2003) Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics, *Protein Sci.* **12**, 1–16.
- [18] Tate, S. (2018) Protein Structure and Dynamics Determination by Residual Anisotropic Spin Interactions, in: Naito, A., Asakura, T., Shimada, I., Takegoshi, K., and Yamamoto, Y. (Eds.) Experimental Approaches of NMR Spectroscopy, pp. 601–636, Springer Singapore, Singapore.
- [19] Ottiger, M. and Bax, A. (1999) Bicelle-based liquid crystals for NMR-measurement of dipolar couplings at acidic and basic pH values, *J. Biomol. NMR* **13**, 187–191.
- [20] Hansen, M.R., Mueller, L., and Pardi, A. (1998) Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions, *Nature Struct. Biol.* **5**, 1065–1074.
- [21] Clore, G.M., Starich, M.R., and Gronenborn, A.M. (1998) Measurement of Residual Dipolar Couplings of Macromolecules Aligned in the Nematic Phase of a Colloidal Suspension of Rod-Shaped Viruses, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10571–10572.
- [22] Sass, J., Cordier, F., Hoffmann, A., Rogowski, M., Cousin, A., Omichinski, J.G., Löwen, H., and Grzesiek, S. (1999) Purple Membrane Induced Alignment of Biological Macromolecules in the Magnetic Field, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2047–2055.
- [23] Prosser, R.S., Hwang, J.S., and Vold, R.R. (1998) Magnetically Aligned Phospholipid Bilayers with Positive Ordering: A New Model Membrane System, *Biophys. J.* **74**, 2405–2418.
- [24] Ramamoorthy, A., Wei, Y., and Lee, D.-K. (2004) PISEMA Solid-State NMR Spectroscopy, in: Annual Reports on NMR Spectroscopy, vol. 52, pp. 1–52, Academic Press.
- [25] Marassi, F.M. and Opella, S.J. (2000) A Solid-State NMR Index of Helical Membrane Protein Structure and Topology, *J. Magn. Reson.* **144**, 150–155.
- [26] Wang, J., Denny, J., Tian, C., Kim, S., Mo, Y., Kovacs, F., Song, Z., Nishimura, K., Gan, Z., Fu, R.,



- Quine, J.R., and Cross, T.A. (2000) Imaging Membrane Protein Helical Wheels, *J. Magn. Reson.* **144**, 162–167.
- [27] Yamamoto, K., Pearcy, P., Lee, D.-K., Yu, C., Im, S.-C., Waskell, L., and Ramamoorthy, A. (2015) Temperature-Resistant Bicelles for Structural Studies by Solid-State NMR Spectroscopy, *Langmuir* **31**, 1496–1504.
- [28] Matsui, R., Uchida, N., Ohtani, M., Yamada, K., Shigeta, A., Kawamura, I., Aida, T., and Ishida, Y. (2016) Magnetically Alignable Bicelles with Unprecedented Stability Using Tunable Surfactants Derived from Cholic Acid, *ChemPhysChem* **17**, 3916–3922.
- [29] Isabettini, S., Liebi, M., Kohlbrecher, J., Ishikawa, T., Fischer, P., Windhab, E.J., Walde, P., and Kuster, S. (2017) Mastering the magnetic susceptibility of magnetically responsive bicelles with 3 $\beta$ -amino-5-cholestene and complexed lanthanide ions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 10820–10824.
- [30] 内田 紀之, 山口 芳樹, 海老名 保男, 佐々木 高義, 石田 康博, 相田 卓三 (2017) 磁場配向NMRにおける配向力, 温度安定性, 表面改質容易性を兼ね備えた新規配向剤, 第56回NMR討論会, L2-1.
- [31] Kimura, T. (2009) Orientation of Feeble Magnetic Particles in Dynamic Magnetic Fields, *Jpn. J. Appl. Phys.* **48**, 020217.
- [32] Kimura, T., Kimura, F., and Yoshino, M. (2006) Magnetic alteration of crystallite alignment converting powder to a pseudo single crystal, *Langmuir* **22**, 3464–3466.
- [33] Kimura, T. and Yoshino, M. (2005) Three-dimensional crystal alignment using a time-dependent elliptic magnetic field, *Langmuir* **21**, 4805–4808.
- [34] Yamaguchi, M., Ozawa, S., Yamamoto, I., and Kimura, T. (2013) Characterization of Three-Dimensional Magnetic Alignment for Magnetically Biaxial Particles, *Jpn. J. Appl. Phys.* **52**, 013003.
- [35] Yamaki, M., Horii, S., Haruta, M., and Shimoyama, J.-i. (2012) Rare-Earth-Dependent Tri-axial Magnetic Anisotropies and Growth Conditions in RE-Ba<sub>2</sub>Cu<sub>4</sub>O<sub>8</sub>, *Jpn. J. Appl. Phys.* **51**, 010107.
- [36] Nakatsuka, N., Yasuda, H., Nagira, T., and Yoshiya, M. (2009) Three-dimensional alignment of FeSi<sub>2</sub> with orthorhombic symmetry by an anisotropic magnetic field, *J. Phys.: Conf. Ser.* **165**, 012021.
- [37] Kusumi, R., Kimura, F., Song, G., and Kimura, T. (2012) Chemical shift tensor determination using magnetically oriented microcrystal array (MOMA): <sup>13</sup>C solid-state CP NMR without MAS, *J. Magn. Reson.* **223**, 68–72.
- [38] Fyfe, C.A. (1983) Solid State NMR for Chemists, C.F.C. Press, Guelph.
- [39] Sherwood, M.H. (1996) Chemical Shift Tensors in Single Crystals, in: Grant, D.M. and Harris, R.K. (Eds.) Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance, pp. 1322–1330, John Wiley & Sons, Chichester.
- [40] Kentgens, A.P.M., Bart, J., Bentum, P.J.M.v., Brinkmann, A., Eck, E.R.H.v., Gardeniers, J.G.E., Janssen, J.W.G., Knijn, P., Vasa, S., and Verkuiljen, M.H.W. (2008) High-resolution liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance of nanoliter sample volumes using microcoil detectors, *J. Chem. Phys.* **128**, 052202.
- [41] Kunath-Fandrei, G.H., Kelbaskas, L., Döring, D., Rager, H., and Jäger, C. (1998) Determination of the orientation of <sup>29</sup>Si chemical shift tensors using rotorsynchronized MAS NMR of single crystals: forsterite (Mg<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>), *Phys. Chem. Minerals* **26**, 55–62.
- [42] Kusumi, R., Kimura, F., and Kimura, T. (2015) Determination of <sup>31</sup>P Chemical Shift Tensor from Microcrystalline Powder by Using a Magnetically Oriented Microcrystal Array, *Crystal Growth Des.* **15**, 718–722.
- [43] Song, G., Kusumi, R., Kimura, F., Kimura, T., Deguchi, K., Ohki S., Fujito, T., and Shimizu, T. (2015) Single-crystal NMR approach for determining chemical shift tensors from powder samples via magnetically oriented microcrystal arrays, *J. Magn. Reson.* **255**, 28–33.
- [44] 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 (2016) 擬単結晶試料を用いた単結晶NMR法による四極子結合テンソルの解析, 第55回NMR討論会, P75.
- [45] Kusumi, R., Kadoma, H., Wada, M., Takeda, T. and Kimura, T. (2019) In situ solid-state NMR of a magnetically oriented microcrystalline suspension, *J. Magn. Reson.* **309**, 106618.



久住 亮介 (くすみ・りょうすけ)

2004年 京都大学農学部生物機能科学科 卒業

2006年 京都大学大学院農学研究科森林科学専攻博士前期課程 修了

2009年 京都大学大学院農学研究科森林科学専攻博士後期課程 修了

2009年 京都大学大学院農学研究科 助教着任

現在に至る

# 生体分子レオロジー NMRの開発と応用

京都大学大学院工学研究科分子工学専攻

森本 大智、菅瀬 謙治

morimoto@moleng.kyoto-u.ac.jp, sugase@moleng.kyoto-u.ac.jp

## 1. はじめに

アルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患に共通する病理学的特徴は、神経細胞に異常なタンパク質凝集体（アミロイド）が蓄積することである。これまで、アミロイドの物質的、構造学的特徴は深く研究されているが、その形成機序に関しては原子レベルの情報が不足している。そこで本研究では、NMR管内の試料に流体力学的な影響（剪断流）を加え、アミロイドが形成する「その場」を原子レベルかつリアルタイムで解析することの出来るレオロジー NMR法の開発を目指した。元々、レオロジー NMR法は、ポリマーのレオロジー研究のために開発された手法である<sup>[1]</sup>。これまで、既存のレオロジー NMR法を用いて、タンパク質試料を観察した例は報告されているものの<sup>[2]</sup>、NMR感度ならびに分解能が十分では無く、低濃度もしくは高分子量試料に対して適用が困難であった。そこで、本研究では、極低温プローブ装着のNMR装置に適用

できる新たなレオロジー NMR法を開発し、世界最高感度のレオロジー NMR法を構築した<sup>[3]</sup>。また、この手法を用いて、ヘキサユビキチンならびにSOD1のアミロイド形成の「その場」を原子分解能かつリアルタイムで観察することに成功した<sup>[3,7]</sup>。

## 2. 新規レオロジー NMR 装置の開発

既存のレオロジー NMR法では、NMR装置から電磁波照射とシグナル検出を担うプローブを脱着する必要がある<sup>[1,2]</sup>。しかし、多くの場合、生体分子を扱うNMR研究では、高感度プローブ（プレアンプが約20 Kまで冷やされた極低温プローブ）が用いられており、極低温プローブを脱着するためには数時間が掛かり、試料交換の度にプローブ脱着することは現実的では無い。そこで、本研究では、極低温プローブ装着したNMR装置で、プローブ脱着を必要としない簡便なレオロジー NMR法を開発した（図1）。

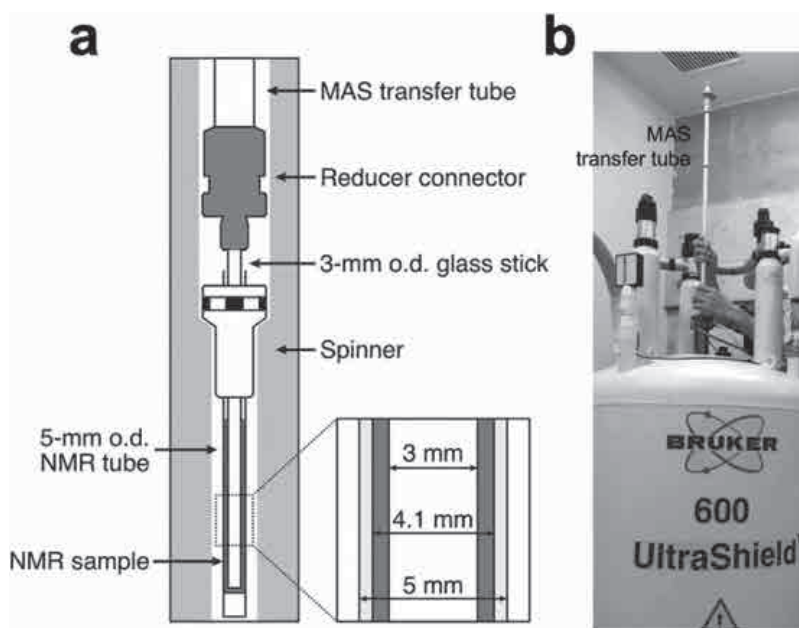


図1 開発した新規レオロジー NMR法

(a) 新規レオロジー NMR装置の平面概略図。(b) 極低温プローブ搭載600 MHz NMR装置に設置する様子。

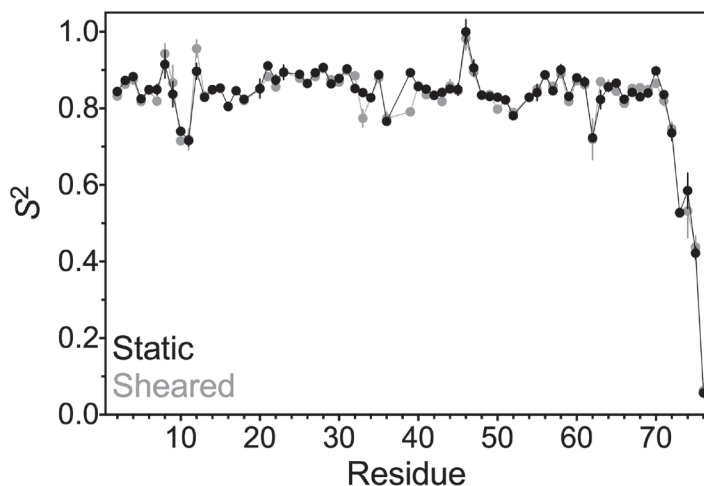


図2 剪断流の有無によるモノユビキチンのオーダーパラメータ  $S^2$  の比較  
黒：剪断流なし、灰色：剪断流あり (35 Hz)

本手法において、NMR 試料管は、広く使用されているシゲミ社製の外径5mm (内径4.1mm) のNMR 試料管を用いた。試料 (0.3mL) を入れたNMR 試料管をNMR装置に投入し、その後、外径3mm ガラス管を装着したMASトランスファーチューブ (Bruker社製) をNMR 試料管の中に挿入した (図1b)。MASトランスファーチューブは、固体NMR管をNMR装置に投入する際に使用する器具であり、その中心軸が正確にNMR装置の試料管投入口の中心と合うように作製されている。このようにして、NMR装置内に二重同心円管 (Couetteセル) を設置することが出来る (図1a)。設置時間は10分程度しか掛からず、従来の手法に比べ、プローブ脱着が不必要で非常に簡便な手法だと言える。

Couetteセル内の液体試料に剪断流を発生させる動力源として使用したのは、NMR装置の標準機能であるスピナー回転である。Bruker社のNMR装置であれば、ほとんどの装置で7から50Hzのスピナー回転機能が初めから備わっている。このスピナー回転を利用し、試料に一方方向の剪断流を与えることが出来る。本レオロジーNMR法は、レオロジーNMRとして世界最高感度・分解能を達成しており、タンパク質試料に適したレオロジーNMRシステムを構築することが出来た<sup>[3]</sup>。

### 3. NMR 感度および性能チェック

まず、新規に開発したレオロジーNMR装置のNMR感度および安定性の評価を行った。高感度ならびに装置の安定性が求められる縦緩和速度 ( $R_1$ )、横緩和速度 ( $R_2$ )、 $^{15}\text{N}$ 異種核オーバーハウ

ザー効果 (NOE) の測定を、剪断流がある場合とない場合で、モノユビキチン (分子量8.6kDa) について行った<sup>[3]</sup>。これらの測定値を用いて、オーダーパラメータ ( $S^2$ ) を算出したところ、二者はほぼ同じ高いクオリティーで測定することが出来ており、数値に差がほとんど無いことが分かった (図2)。これは、剪断流中でもタンパク質試料について、感度良くNMR測定出来ていることを示すと同時に、加えた剪断流 (スピナー回転周波数: 35Hz、平均剪断速度:  $680\text{ s}^{-1}$ ) では、モノユビキチンの立体構造にほとんど影響を与えなかったことを示す。モノユビキチンは構造安定性の高い頑丈な立体構造を有していることが知られているため、得られた結果は理にかなう。

### 4. アミロイド形成に伴う構造変化の観察

次に、剪断流によりアミロイドを形成するヘキサユビキチン (分子量51.4kDa) を用いて<sup>[4]</sup>、開発したレオロジーNMR装置内でタンパク質試料がアミロイドを形成し得るかどうか検証した。35Hzのスピナー回転による剪断流を一定時間与え続けたところ、ヘキサユビキチンはタンパク質線維を形成した (図3a)。この線維はアミロイド染色用色素であるチオフラビンTと結合し、強い蛍光を発したことから、ヘキサユビキチンはレオロジーNMR装置で発生させた剪断流によってアミロイドを形成したことが分かった。加えて、アミロイド形成中に、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQCスペクトルを連続的に測定したところ、指数関数的に全てのクロスピークの強度が減衰した。さらに、幾つかのクロスピークにおいて、アミロイド形成に伴う化学シフトに変化が見られた (図3b)。変化が観測さ

れたクロスピークに対応する側鎖は立体構造の表面上に位置しており、構造表面で、アミロイド形成に伴う構造変化や分子間相互作用が起きていることを示唆する。特筆すべきは、化学シフトが変化した側鎖にヘキサユビキチンに存在するプロリン側鎖が全て含まれていることである。これまでの研究で、プロリンのシストランス異性化がアミロイド形成において重要な役割を担っていることが報告されている<sup>[5]</sup>。したがって、ヘキサユビキチンのアミロイド形成においても、プロリンのシストランス異性化が深く関わっていることが示唆される。

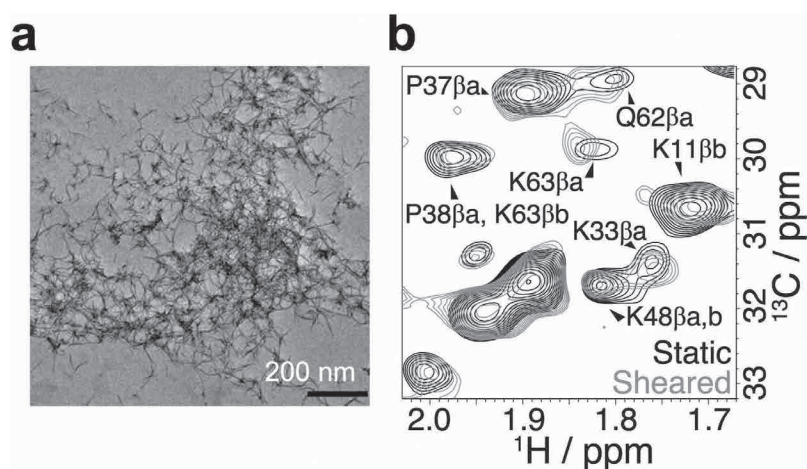
## 5. アミロイド形成のリアルタイム追跡

4では、高分子量タンパク質試料であるヘキサユビキチンのアミロイド形成を観察することができた。しかし、アミロイド形成では、より巨大な分子量を持つ線維前駆体（オリゴマーや前原線維）、そして線維を形成することが一般的であり、これらは通常、溶液NMR法で測定することは不可能である。そこで、本研究では、アミロイドに特異的に結合するチオフラビンTを利用し、線維前駆体ならびに線維の形成をリアルタイムで追跡することを試みた。チオフラビンTは低分子であり、線維前駆体や線維と結合した状態でもピークの化学シフト変化や新しいピークの出現として、その結合を評価することが可能である<sup>[6]</sup>。

観察対象は、線維前駆体ならびにアミロイド形成が報告されている筋萎縮性側索硬化症（ALS）関連タンパク質SOD1を用いた。まず、SOD1溶

液にチオフラビンTを混在させ、開発したレオロジー NMR装置を用いて、30 Hzのスピンナー回転による剪断流を与えた。一定時間後に、溶液を観察したところ、ヘキサユビキチンと同様にSOD1もアミロイドを形成していることが分かった<sup>[7]</sup>。さらに、アミロイド形成中において、チオフラビンT由来の3.113 ppmのピークを追跡すると、アミロイド形成がない（剪断流がない）場合と比べ、顕著な化学シフト変化が観察された（**図4a**）。過去の報告から<sup>[6]</sup>、この化学シフト変化はチオフラビンTと線維が結合したことを示している。化学シフト変化は経時変化とともに大きくなり、ピークの強度も減少しており、これらはチオフラビンTが、化学シフト差の絶対値よりも交換速度が大きい、速い化学交換（fast exchange）で分子量の巨大な線維と弱く相互作用していると解釈できる。

また、3.550 ppm付近を調べると、アミロイド形成に伴い、新しいピークの出現が観察された（**図4b**）。先行研究により<sup>[6]</sup>、このピークはチオフラビンTと線維前駆体であるオリゴマーや前原線維との結合によるものである。ピークが新たに出現し、そのピーク強度が経時変化とともに増大することから、チオフラビンTが化学シフト差の絶対値よりも交換速度が小さい、遅い化学交換（slow exchange）で分子量のさほど大きくないオリゴマーや前原線維と強く相互作用していると考えられる。したがって、チオフラビンTはSOD1のアミロイド形成中に、線維前駆体とも結合していることが分かった。これらの結果より、チオフ



**図3** 剪断流によるヘキサユビキチンのアミロイド形成とそれに伴う構造変化の観察 (a) レオロジー NMR装置の剪断流によって形成したアミロイドの透過型電子顕微鏡画像。(b) 線維形成前後の<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQCスペクトル。黒：剪断流なし、灰色：剪断流を与えて16時間後（35 Hz）。ピークの化学シフト変化を比較するため灰色のスペクトルの等高線レベルを下げて表示している。

ラビンTのNMR信号を利用することで、巨大分子の線維前駆体や線維の形成をリアルタイムに追跡することが出来た<sup>[7]</sup>。

## 6. 結論および展望

本研究により、世界最高感度・分解能のレオロジーNMR法を構築することが出来た。従来法と比べ、簡便かつ安価に設置することが可能である。また、ヘキサユビキチンならびにSOD1のアミロイド形成を原子分解能かつリアルタイムに追跡することに成功し、それぞれ国際学術雑誌に掲載された<sup>[3, 7]</sup>。本レオロジーNMR法は、蛍光分光法や円二色性分光法などの既存のアミロイド形成解析手法に比べ、より分解能高くアミロイド形成を「その場」観察することが出来、研究がまだあまり進んでいないアミロイド形成初期段階や、細胞毒性の強い前駆体形成機序の解明に貢献でき

るであろう。また、材料化学や流体力学の分野においても、剪断流中の試料の変形ならびに挙動の変化を分解能高く追跡するツールとして有用であると考える。

現在、本レオロジーNMR法は、NMR感度ならびに分解能で世界最高を達成した。しかし、スピナー回転の回転数が制限されている点や、使用するNMR試料管が開放系になっており試料の蒸発が問題になる点など、改善要素が幾つも存在する。今後の展望として、より改良したレオロジーNMR法の開発ならびにより汎用的な手法開発に従事する予定である。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人島津科学技術振興財団、みずほ学術振興財団、服部報公会、豊田理化学研究所、

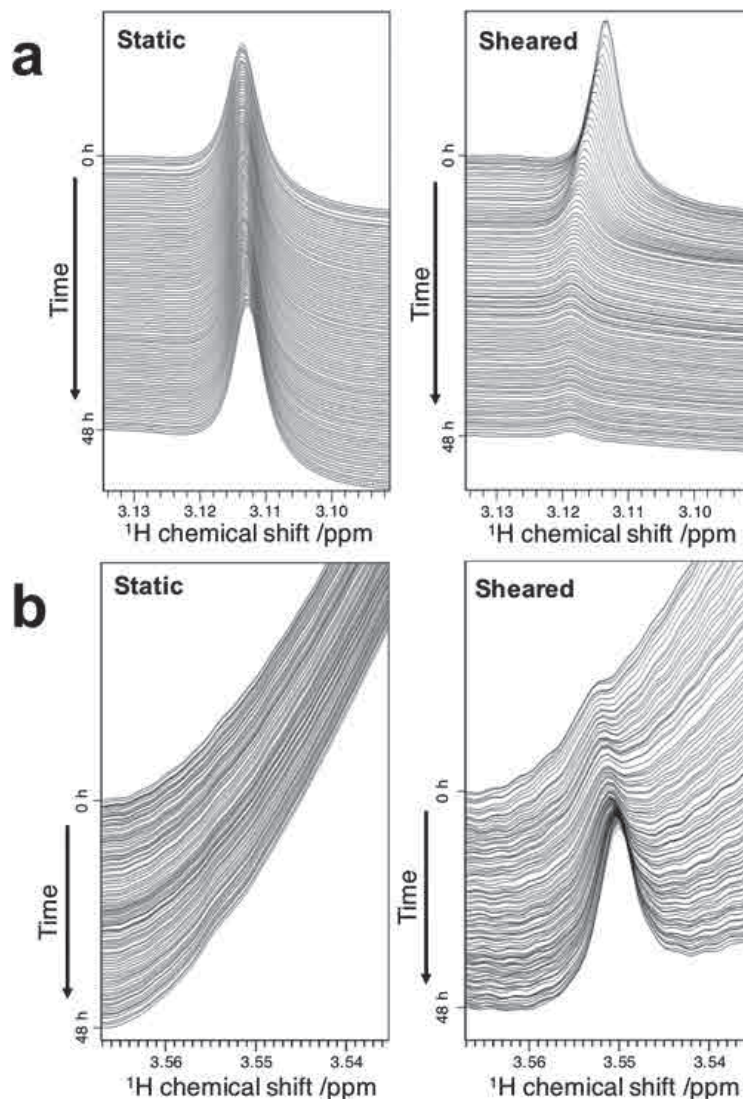


図4 アミロイド形成有無によるチオフラビンTの<sup>1</sup>H NMRスペクトルの比較  
(a) 線維との結合に伴うピーク移動および強度減少。(b) 線維前駆体との結合に伴う新たなピークの出現。左：剪断流なし、右：剪断流あり (30 Hz)

そして京都大学ジョン万プログラムに心より感謝申し上げます。また、本研究の新規レオロジーNMR法開発に対し、多大なる助言および指導を賜りましたIPFのUlrich Scheler博士、鳥取大学大学院工学研究科の河田康志教授、ブルカージャパン株式会社の山本昭彦氏に感謝致します。

## 引用文献

- [1] Nakatani, A. I., Poliks, M. D., and Samulski, E. T., (1990) NMR Investigation of Chain Deformation in Sheared Polymer Fluids. *Macromol.* **23**, 2686–2692.
- [2] Ohgo, K., Bagusat, F., Asakura, T., and Scheler, U., (2008) Investigation of structural transition of regenerated silk fibroin aqueous solution by Rheo-NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4182–4186.
- [3] Morimoto, D., Walinda, E., Iwakawa, N., Nishizawa, M., Kawata, Y., Yamamoto, A., Shirakawa, M., Scheler, U., and Sugase, K., (2017) High-Sensitivity Rheo-NMR Spectroscopy for Protein Studies. *Anal. Chem.* **89** (14), 7286–7290.
- [4] Morimoto, D., Walinda, E., Fukada, H., Sou, Y., Kageyama, S., Hoshino, M., Fujii, T., Tsuchiya, H., Saeki, Y., Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Iwai, K., Namba, K., Komatsu, M., Tanaka, K., and Shirakawa, M., (2015) The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates. *Nat. Commun.* **6**, 6116.
- [5] Jahn, T. R., M. Parker, J., Homans, S. W., and Radford, S. E., (2006) Amyloid formation under physiological conditions proceeds via a native-like folding intermediate. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13** (3), 195–201.
- [6] Robbins, K. J., Liu, G., Lin, G., and Lazo, N. D., (2011) Detection of strongly bound thioflavin T species in amyloid fibrils by ligand-detected  $^1\text{H}$  NMR. *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 735–740.
- [7] Iwakawa, N., Morimoto, D., Walinda, E., Kawata, Y., Shirakawa, M., and Sugase, K., (2017) Real-time observation of the interaction between thioflavin T and an amyloid protein by using high-sensitivity Rheo-NMR. *Int. J. Mol. Sci.* **18** (11), 2271.



菅瀬 謙治 (すがせ・けんじ)

1997年～2008年 財団法人サントリー生物有機科学研究所 研究員  
 2002年 博士(工学)(横浜国立大学)取得  
 2003年～2006年 The Scripps Research Institute, Research Associate  
 2008年～2011年 財団法人サントリー生物有機科学研究所 グループ長 主席研究員  
 2011年～2015年 公益財団法人サントリー生命科学財団生物有機科学研究所  
 グループ長 主席研究員  
 2015年～ 京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 准教授



森本 大智 (もりもと・だいち)

2011年～2014年 日本学術振興会特別研究員DC1  
 2014年 京都大学工学研究科研究員  
 2014年～ 京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 助教  
 2015年 博士(工学)(京都大学)取得

# 固体 $^2\text{H}$ NMRによる機能性材料中の分子運動の研究

金沢大学ナノマテリアル研究所

水野 元博

mizuno@se.kanazawa-u.ac.jp

## 1. はじめに

固体材料の機能には、物質内部の分子やイオンがつくる局所的な空間の構造やダイナミクスが大きく影響する。このため、機能性固体材料開発においては、局所構造や分子運動の詳細な解析に基づいた材料設計の重要性が高まっている。固体 $^2\text{H}$  NMRスペクトルは物質中の分子運動のモードや速さに応じて特徴的な線形を示し、これらを解析することによって分子ダイナミクスの詳細な情報が得られる<sup>[1~9]</sup>。 $^2\text{H}$  NMRの広幅スペクトルでは $10^4 \sim 10^7$  Hz程度の速さの分子運動の解析ができる。また、Quadrupolar Carr-Purcell-Meiboom-Gill (QCPMG) スペクトルからは、 $10^3$  Hzや $10^8$  Hzのオーダーの分子運動の情報も得ることができる<sup>[10]</sup>。常磁性物質においては、速い常磁性緩和により緩和時間から分子運動を解析することが困難な場合でも、スペクトルの解析により分子運動の情報を得ることが可能である<sup>[11~16]</sup>。固体 $^2\text{H}$  NMRスペクトルから分子運動の詳細な情報を得るには、スペクトルのシミュレーションを欠かすことができない。本稿では粉末試料の固体 $^2\text{H}$  NMRスペクトルの測定法・シミュレーション法を示し、これらの手法による金属有機構造体 (MOF) や高分子複合体など機能性材料中の分子運動の解析を紹介する。

## 2. 測定法

$^2\text{H}$  は核スピン $I=1$ であるから、核四極子相互作用による広幅なNMRスペクトルとなる。ここでは、試料のマジック角回転 (MAS) を使わない測定について述べる。図1 (a) と (b) に $^2\text{H}$  NMR広幅スペクトルの測定に用いる四極子エコー法と Quadrupolar Carr-Purcell-Meiboom-Gill (QCPMG) 法のパルス系列

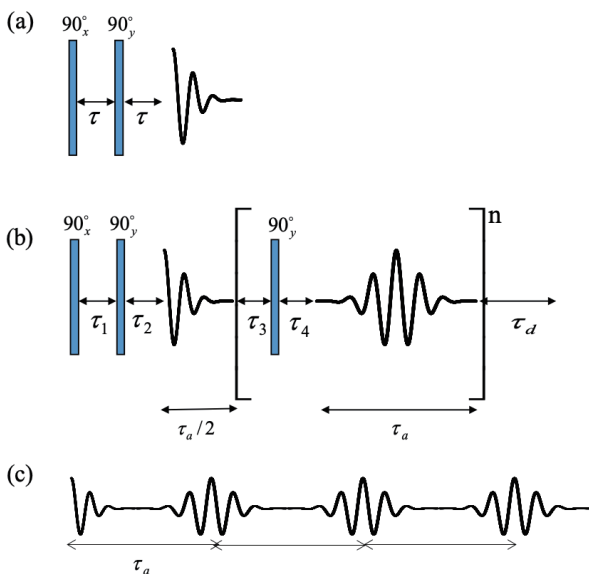


図1  $^2\text{H}$  NMRスペクトルの測定に用いるパルス系列とエコー信号。(a) 四極子エコー法、(b) QCPMG法、(c) QCPMG法で得られる信号。

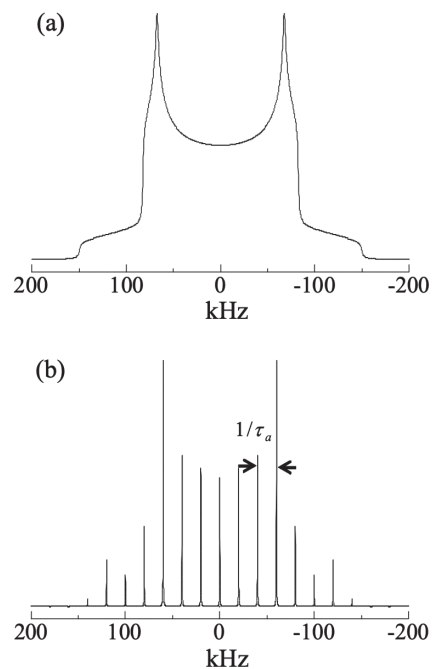


図2 分子運動が無いときの $^2\text{H}$  NMRスペクトルのシミュレーション ( $e^2Qq/h = 200$  kHz,  $\eta = 0.1$ )。 (a) 広幅スペクトル、(b) QCPMGスペクトル。

を示す<sup>[1~4, 10]</sup>。四極子エコー法では、エコー信号の後半部を検出してスペクトルを得る。QCPMG法では、エコー信号を繋ぎ合わせ、**図1** (c) のようなエコートレインをフーリエ変換することでスペクトルを得る。**図2**に分子運動が無いときの広幅スペクトルとQCPMGスペクトルを示す。ここで、 $e^2Qq/h$ は核四極子結合定数、 $\eta$ は非対称パラメータを表す。

常磁性試料の<sup>2</sup>H NMR広幅スペクトルの測定では、核四極子相互作用とともに常磁性相互作用が影響するため、**図3**のようなパルス系列を用いる。**図3** (a) のパルス系列 (Shift compensated quadrupole echo sequence) では、四極子エコー法に180°パルスを加えることで常磁性シフトによって減衰した信号成分を復活させる<sup>[1, 11, 12]</sup>。**図3** (b) のパルス系列 (Exorcycled quadrupole echo sequence) では、90°パルスの位相 ( $\phi$ ) 回しにより2つの90°パルスだけで (a) と同様のスペクトルを得ることができる<sup>[13]</sup>。ただし、(b) のパルス系列では信号強度は (a) を用いた場合の半分になる。

### 3. シミュレーション法

<sup>2</sup>H NMRスペクトルのシミュレーションでは、重水素核の各サイトでの周波数 $\omega_i$ 、スピンスピン緩和速度 $R_2$ 、サイト間のジャンプの速さ $k$ を取り入れる。反磁性物質の場合、サイト $i$ の周波数 $\omega_i$ は核四極子相互作用 $\omega_{Qi}$ に支配されており、

$$\omega_i = \pm\omega_{Qi} \tag{1}$$

と表すことができる。<sup>2</sup>H NMRでは化学シフト異方性は小さいために無視できることが多い。(1) 式の±は重水素核の2つの遷移 ( $m_I = -1 \Leftrightarrow m_I = 0$ ,  $m_I = 1 \Leftrightarrow m_I = 0$ ) に対応する。 $\omega_{Qi}$ は電場勾配の主軸座標に対する外部磁場の方向に依存する。 $\omega_{Qi}$ の計算では、核四極子相互作用 (電場勾配) の主軸座標系 ( $x_1, y_1, z_1$ ) と外部磁場 $B_0$ を $z$ 軸にとった実験室座標系 ( $x_L, y_L, z_L$ ) は分子運動を取扱うのに都合の良い分子座標系 ( $x_M, y_M, z_M$ ) を介した座標変換によって結び付けられる。座標変換にはウイグナーの回転行列 $D_{nm}^{(2)*}(\Omega)$ を用い、 $\omega_{Qi}$ は

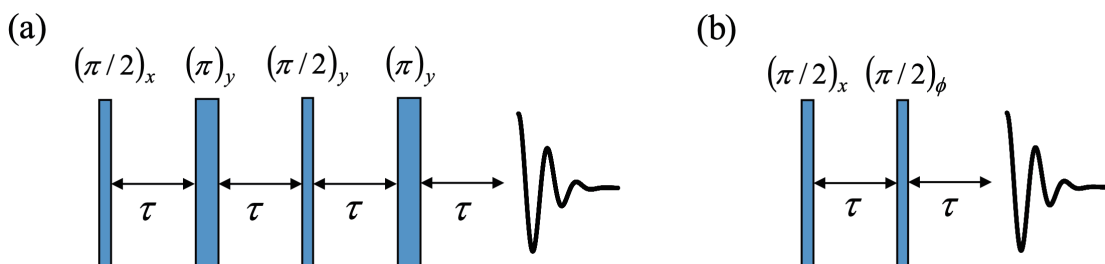
$$\left. \begin{aligned} \omega_{Qi} &= \sqrt{\frac{3}{2}} \sum_{n,m=-2}^2 D_{0n}^{(2)*}(\psi, \theta, \phi) D_{nm}^{(2)*}(\alpha_i, \beta_i, \gamma_i) T_{mQ}^{(2)} \\ T_{0Q}^{(2)} &= \sqrt{\frac{3}{8}} \frac{e^2Qq}{\hbar}, \quad T_{\pm 2Q}^{(2)} = \left(\frac{\eta}{4}\right) \frac{e^2Qq}{\hbar} \end{aligned} \right\} \tag{2}$$

で与えられる<sup>[1, 2, 4, 17]</sup>。ここで、( $\alpha_i, \beta_i, \gamma_i$ )はサイト $i$ での核四極子相互作用の主軸座標系と分子座標系を結び付けるオイラー角、( $\psi, \theta, \phi$ )は分子座標系と実験室座標系を結び付けるオイラー角である。 $e^2Qq/h$ は核四極子結合定数、 $\eta$ は非対称パラメータを表す。

常磁性物質の場合、 $\omega_i$ は常磁性相互作用を加えて、

$$\omega_i = \pm\omega_{Qi} - \sum_j \omega_{Dij} + \omega_{CSij} \tag{3}$$

と表される<sup>[1, 12~16]</sup>。ここで、 $\omega_{Dij}$ は $j$ 番目の不対電子スピンとサイト $i$ の重水素核スピンの磁気双極子相互作用の寄与、 $\omega_{CSij}$ はフェルミのコンタクトシフトの寄与を表す。 $\omega_{Dij}$ の計算では、磁気双極子相互作用の主軸座標系と実験室座標系は分子座標系を介した座標変換によって結び付けられ、以下のように表される。



**図3** 常磁性試料の<sup>2</sup>H NMRスペクトルの測定に用いるパルス系列。(a) Shift compensated quadrupole echo sequence、(b) Exorcycled quadrupole echo sequence.



$$\left. \begin{aligned} \omega_{Dij} &= \sum_{n=-2}^2 D_{0n}^{(2)*}(\psi, \theta, \phi) D_{n0}^{(2)*}(\alpha'_{ij}, \beta'_{ij}, \gamma'_{ij}) \omega_{pij} \\ \omega_{pij} &= \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right) \frac{2\gamma_D B_0 g^2 \mu_B^2}{3k_B T r_{ij}^3} S(S+1) \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

ここで、 $(\alpha'_{ij}, \beta'_{ij}, \gamma'_{ij})$  は磁気双極子相互作用の主軸座標系と分子座標系を結び付けるオイラー角である。 $\mu_0, \gamma_D, B_0, g, \mu_B, k_B, T, r_{ij}$  はそれぞれ真空の透磁率、重水素核の磁気回転比、静磁場の強さ、 $g$  因子、ボーア磁子、ボルツマン定数、絶対温度、不對電子スピンと重水素核スピンの距離を表す。

エコー信号は

$$G(t, \theta, \phi) = \mathbf{W} \cdot \hat{\mathbf{B}} \exp[\hat{\mathbf{A}}(t)] \exp[\hat{\mathbf{A}}(\tau)] \exp[\hat{\mathbf{A}}^*(\tau)] \cdot \mathbf{1} \quad (5)$$

で表される。 $\hat{\mathbf{A}}$  は行列で、対角成分は  $i\omega_i - k_{ii} - R_2$ 、非対角成分は  $k_{ij}$  となる。 $R_2$  はスピンスピン緩和速度、 $k_{ij}$  はサイト  $i$  とサイト  $j$  間のジャンプの速さを表す。また、 $N$ -サイトのジャンプにおいて  $k_{ii} = (N-1)k_{ij}$  である。 $\hat{\mathbf{A}}^*$  は  $\hat{\mathbf{A}}$  の複素共役を表す。 $\exp[\hat{\mathbf{A}}(\tau)] \exp[\hat{\mathbf{A}}^*(\tau)]$  はエコー信号が生成するまでの磁化の時間発展を表す。 $\mathbf{1}$  は全ての成分が1のベクトル、 $\mathbf{W}$  は各サイトの存在確率を表すベクトルである。 $\hat{\mathbf{B}}$  はRFパルスが有限の幅を持つことによる信号強度の補正のための行列である<sup>[4,5]</sup>。粉末試料のエコー信号は

$$G(t) = \int_0^{2\pi} \int_0^\pi G(t, \theta, \phi) \sin\theta d\theta d\phi \quad (6)$$

で与えられる。<sup>2</sup>H NMRスペクトルは  $G(t)$  をフーリエ変換することによって得られる。QCPMGのエコートレインは、(5) 式の計算後  $\hat{\mathbf{A}}^*$  と  $\hat{\mathbf{A}}$  の時間発展を交互に繰り返すことで得られる<sup>[10]</sup>。

#### 4. 金属有機構造体 (MOF) の解析

MOFは金属と有機配位子の自己集合化によって得られる、多孔質の配位ネットワーク構造をもつ材料で、ガス吸着や分離技術、センサーや触媒など様々な応用が期待されている。 $\{\text{Fe}(\text{pz})[\text{Pt}(\text{CN})_4]\}$  (pz = ピラジン) は図4のような細孔構造を有するスピントスオーバー錯体で、昇温時は309 K、降温時は

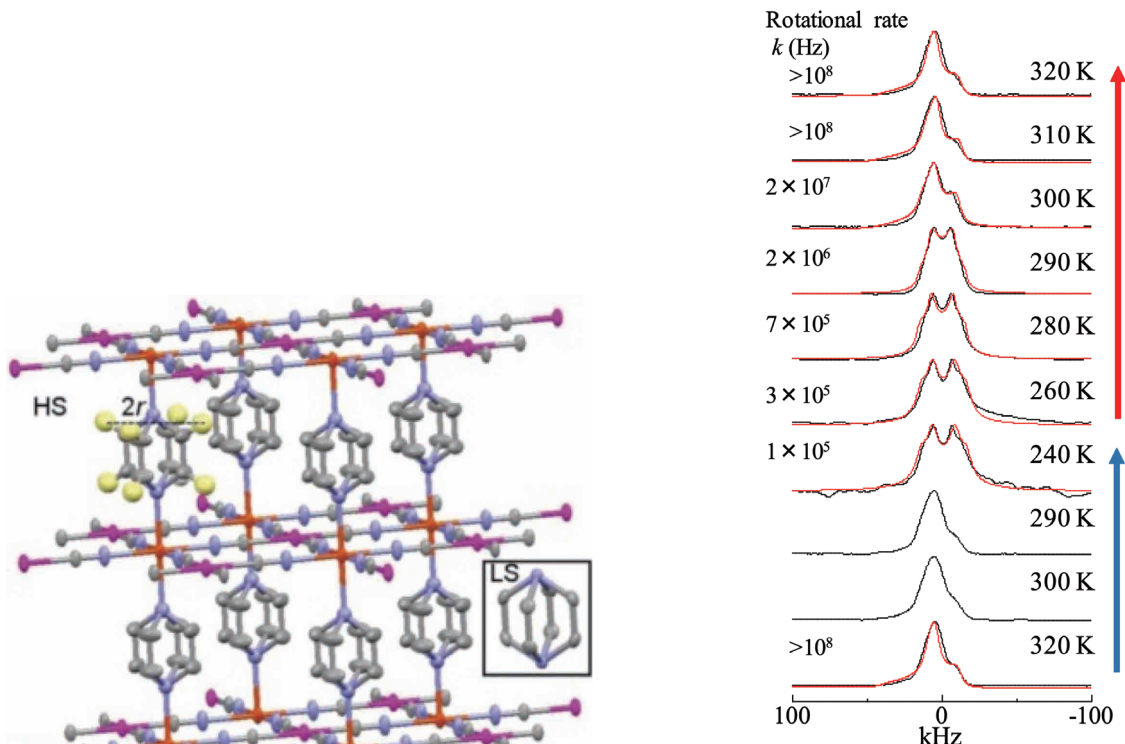


図4 {Fe(pz)[Pt(CN)4]} の結晶構造<sup>[18]</sup>

図5 {Fe(pz)[Pt(CN)4]} の<sup>2</sup>H NMR広幅スペクトル (共鳴周波数45.826 MHz)<sup>[18]</sup>

285 Kで一次相転移を起こす<sup>[18]</sup>。相転移点以下では反磁性の低スピン (LS) 状態、転移点以上では常磁性の高スピン (HS) 状態となる。ピラジン配位子は、**図4**のように、2つの配向方向でディスオーダーしている。<sup>2</sup>H NMRスペクトルを用いて、ピラジン配位子の運動性が調べられた。**図5**に<sup>2</sup>H NMR広幅スペクトルの温度変化を示す。測定ではピラジンの水素のみが重水素化された試料が用いられた。相転移点以下では四極子エコー法、相転移以上では**図3** (a) のパルス系列を用いている。黒線は実測スペクトル、赤線はシミュレーションスペクトルを示す。反磁性の低温相では、スペクトルは0 kHzを中心に対称な線形となったが、高温相では常磁性効果により非対称な線形となった。高温相では、X線結晶構造解析、磁化率の温度変化の結果を用いて常磁性相互作用  $\omega_{Dij}$  を計算し、スペクトルシミュレーションを行った。シミュレーションより、ピラジン配位子には、ディスオーダーのサイトを含めた4サイトの回転が起こっていることがわかった。**図5**の  $k$  は回転の速さを表す。低温相では  $k$  は活性化エネルギー 33 kJ/mol を有するアレニウス型の温度依存性を示した。高温相では、ピラジン配位子の回転運動は急激に速くなり、フリーローテーションに近い状態になっていると考えられる。Fe とピラジン配位子の距離は相転移で大きく変化し、高温相では著しく増大する。このような空間の広がりやピラジン配位子の回転速度の向上と連動している。ピラジン配位子の回転運動の向上はエントロピーの増大に繋がると考えられ、スピנקロスオーバー現象への関与が示唆される。

## 5. プロトン導電性高分子複合体の解析

ポリビニルホスホン酸 (PVPA) とイミダゾール (Im) の複合体 PVPA/ $x$ Im ( $x$  は PVPA の繰り返しユニットに対する Im のモル比) (**図6**) におけるプロトン伝導性とイミダゾールの回転運動との関係を<sup>2</sup>H NMR法によって解析した結果を示す<sup>[19]</sup>。PVPA/ $x$ Im は  $x$  の増加に伴いプロトン伝導度が増大し、 $x=2$  では、100°C 以上で  $10^3$  S/cm のオーダーのプロトン伝導率を示す<sup>[20]</sup>。<sup>2</sup>H NMR の測定試料は、Im の炭素と結合した水素のみを重水素化した PVPA/ $x$ Im- $d_3$  を用いた。**図7** に PVPA/2Im- $d_3$  における 30°C 以上での<sup>2</sup>H NMR スペクトルの温度変化を示す。広幅スペクトルは温度上昇に伴い、0 kHz 付近のシャープな成分の強度が増大していった。この結果は、複合体内で Im 分子の等方回転運動が起こっていることを示している。分子の等方回転運動を解析する簡便な方法として、正四面体の4サイト間のジャンプを仮定したシミュレーションを用いる。**図8** (a)、(b) に分子の等方回転運動の速さと<sup>2</sup>H NMR スペクトルの線

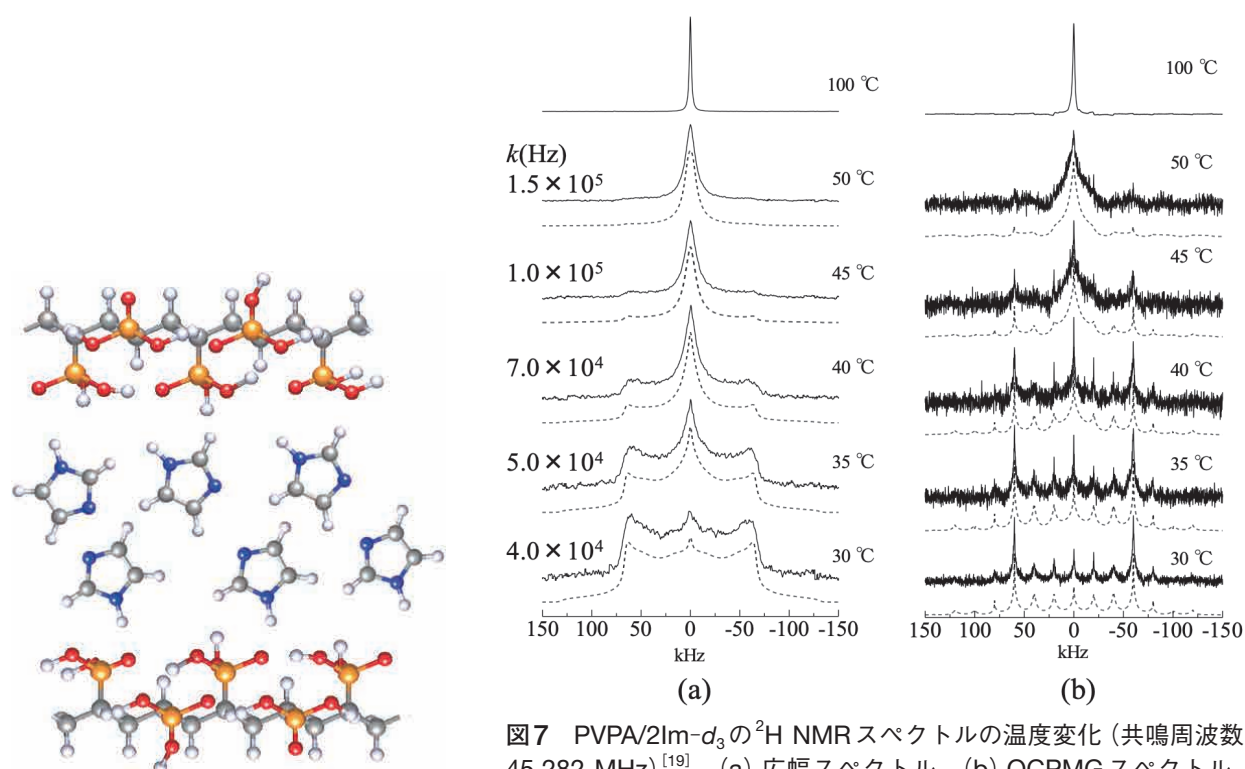


図6 PVPA/ $x$ Im.

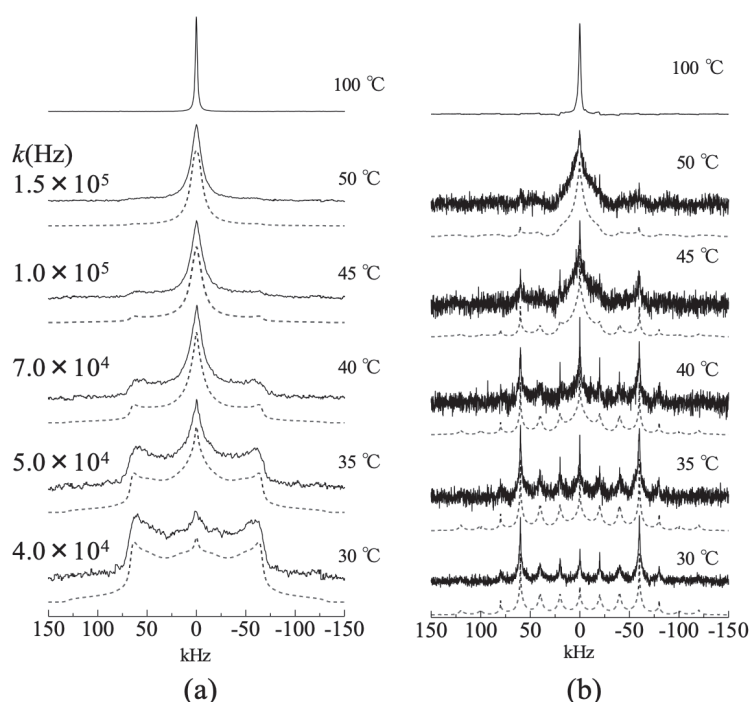


図7 PVPA/2Im- $d_3$  の<sup>2</sup>H NMR スペクトルの温度変化 (共鳴周波数 45.282 MHz)<sup>[19]</sup>。(a) 広幅スペクトル、(b) QCPMG スペクトル、破線: シミュレーション、 $k$ : 中間領域の等方回転運動の速さ。

形の関係を示す。図8 (a)、(b) のシミュレーションでは等方回転運動に正四面体の4サイト間のジャンプモデル ( $\beta' = 109.5^\circ$ ) を用い、 $e^2qQ/h = 176 \text{ kHz}$ 、 $\eta = 0$  とした。このシミュレーションでは  $50^\circ\text{C}$  のブロードな QCPMG スペクトルを再現することはできなかった。このブロードな QCPMG スペクトルの線形は、Im の回転運動に異方性が僅かに残っていることを示している。図8 (c) に Im の分子平面内の回転的振動による QCPMG スペクトルの線形変化のシミュレーションを示す。シミュレーションでは2サイトジャンプを仮定した。

QCPMG の実測スペクトルと比較すると PVPA/2Im- $d_3$  に Im の回転的振動成分が存在することがわかる。  $50^\circ\text{C}$  以下の実測スペクトルは単一の運動成分では再現することができず、図9のように、速い等方回転運動 ( $> 10^6 \text{ Hz}$ ) の成分、中間領域の速さ ( $10^4 \sim 10^5 \text{ Hz}$ ) で等方回転運動している成分、回転的振動のみが起こっている成分が存在することがわかる。ここで、中間領域の速さの等方回転運動のシミュレーションでは、僅かに残った異方性を再現するため、図8の  $\beta'$  を  $118^\circ$  として計算した。図7の破線は、これら3つの成分を重ね合わせたスペクトルのシミュレーションである。シミュレーションスペクトルのフィッティングにより、各温度で3つの成分の存在比と中間領域の速さで等方回転運動している成分の速さが見積もられた。

中間領域の速さの Im は  $30^\circ\text{C}$  以上で全体の9割以上を占める。速い等方回転運動の成分は0.2%以下であった。温度上昇と共に回転的振動成分が減少し、 $60^\circ\text{C}$  以上では PVPA/2Im の全ての Im が等方回転運動していることがわかった。PVPA/2Im のプロトン伝導率は低温から  $60^\circ\text{C}$  付近までは、温度上昇と共に急激に増大するが、 $60^\circ\text{C}$  以上では温度変化の傾きは緩やかになる。 $60^\circ\text{C}$  以下でプロトン伝導率の温度変化から活性化エネルギーを見積もると  $90 \text{ kJ/mol}$  程度になる。

この値は、中間領域の速さの Im の等方回転運動の活性化エネルギー ( $59 \text{ kJ/mol}$ ) よりもかなり大きい。これらの結果は、 $60^\circ\text{C}$  以下では複合体中に存在する運動性の低い Im が長距離のプロトン伝導の妨げになっており、温度上昇に伴うこれらの Im の運動性の向上がプロトン伝導性の向上に繋がっていることを示している。同様の解析を PVPA/1Im について行ったところ、PVPA/2Im のほうが PVPA/1Im よりも Im の等方回転運動が速く、回転的振動成分も少ないことがわかった。このような複合体内部の状態の違いが、プロトン伝導性の大きな違いの原因になっていると考えられる。上述の3成分による解析は、複合体内の運動状態の大枠を捉えるのに有効であるが、実際には、ポリマー試料においては内部構造に広

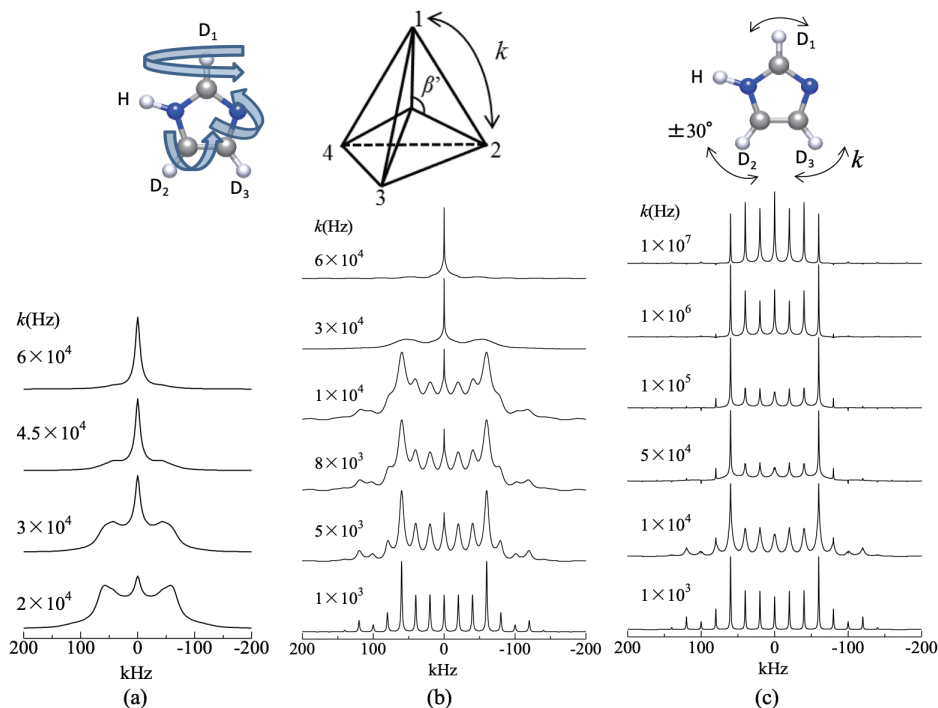


図8 分子運動による  $^2\text{H}$  NMR スペクトルの線形変化<sup>[19]</sup>。(a) 等方回転運動による広幅スペクトルの線形変化、(b) 等方回転運動による QCPMG スペクトルの線形変化、(c) 回転的振動による QCPMG スペクトルの線形変化。

い分布が存在し、Imの運動性にも広い分布があることが予想される。PVPA/xImの<sup>2</sup>H NMRスペクトルは等方回転運動の速さに分布を取り入れたシミュレーションでも再現することができる。図10 (a)、(b)は広幅スペクトル、(c)、(d)はQCPMGスペクトルである。シミュレーションではImの回転的振動を考慮していないので、QCPMGスペクトルの個々のピークのプロードニングは再現できていないが、それ以外は実測と良く一致している。<sup>2</sup>H NMRスペクトルの強度は分子運動の速さによって大きく変化する。図10 (e)に(b)と(d)のシミュレーションで用いた等方回転運動の速さの分布(i)、等方回転運動による信号強度の減衰因子(ii)、これらを取り入れたスペクトルの強度(iii)を示す。等方回転運動の速さが10<sup>4</sup> ~ 10<sup>6</sup> Hzの時、スペクトルの信号強度が著しく減衰することがわかる。そのため、実際には10<sup>4</sup> ~ 10<sup>5</sup> Hzの速さのImが最も多く存在しているにもかかわらず、スペクトルには、それよりも遅い

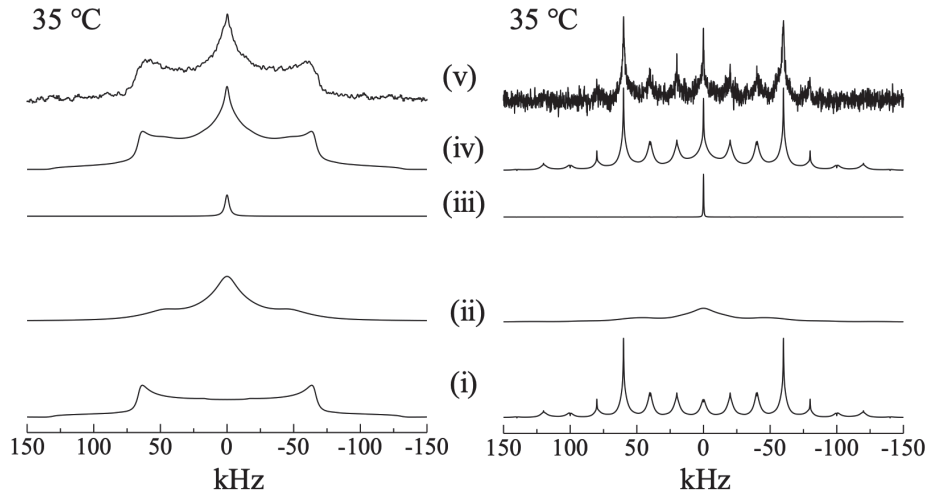


図9 3成分による<sup>2</sup>H NMRスペクトルのシミュレーション<sup>[19]</sup>。(i) 等方回転運動が起こってない回転的振動成分、(ii) 中間領域の速さの等方回転運動成分、(iii) 速い等方回転運動成分、(iv) (i) - (iii)の重ね合わせ、(v) 実測スペクトル。

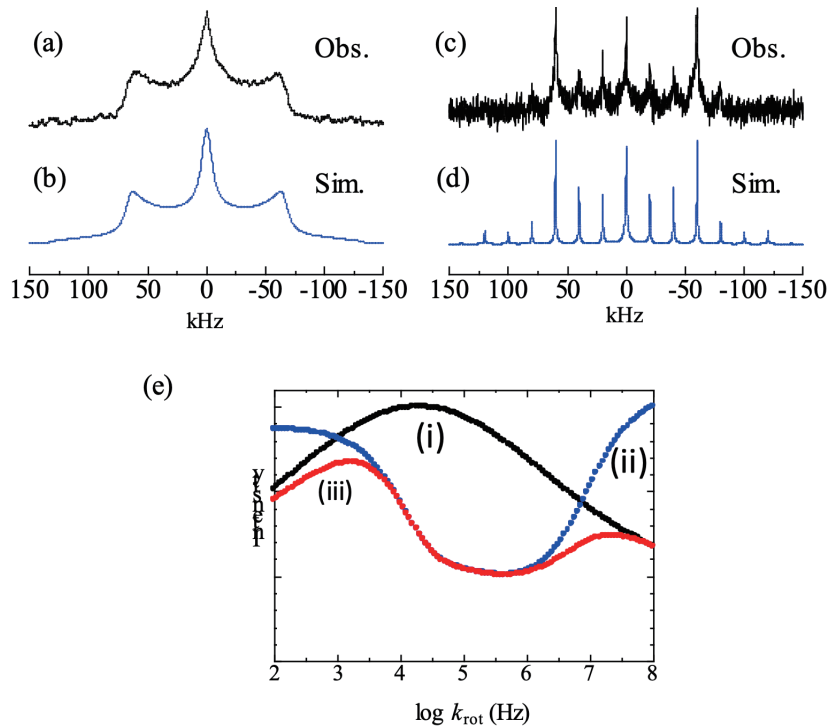


図10 PVPA/2Imの<sup>2</sup>H NMRスペクトル(35°C)と等方回転運動の速さに分布を取り入れたスペクトルシミュレーション<sup>[19]</sup>。(a) 広幅スペクトル(実測)、(b) 広幅スペクトル(シミュレーション)、(c) QCPMGスペクトル(実測)、(d) QCPMGスペクトル(シミュレーション)、(e) (i) 等方回転の速さの分布(ガウス分布)、(ii) 等方回転による信号強度の減衰因子の分布、(iii) (i)と(ii)を合わせた信号強度の分布。

( $\sim 10^3$  Hz) 成分と速い成分 ( $\sim 10^7$  Hz) が強調されている。

## 6. おわりに

固体 $^2\text{H}$  NMRスペクトルのシミュレーションを用いた解析により、反磁性物質だけでなく常磁性物質においても分子運動を解析できる。また、運動モードや速さに分布を取入れた解析も容易に行うことができるので、高分子材料等の解析にも有効である。是非、材料の物性研究に役立てて頂きたい。

## 謝 辞

本稿のMOFの研究は、京都大学北川進教授、九州大学大場正昭教授、九州大学楊井伸浩准教授との共同研究です。深く感謝いたします。

## 参考文献

- [1] Vold, R. R.: Deuterium NMR Studies of Dynamics in Solids and Liquid Crystals. In: Tycko, R. (ed.) Nuclear Magnetic Resonance Probes of Molecular Dynamics, pp 27-112. Kluwer Academic Publishers: Norwell, MA, (1994).
- [2] Vold, R. R., Vold, R. L.: Deuterium Relaxation in Molecular Solids. In: Warren, W. S. (ed.) Advances in Magnetic and Optical Resonance, Vol. 16, pp 85-171. Academic Press Inc, San Diego, (1991).
- [3] Schmidt-Rohr, K., Spiess, H.W.: Multidimensional Solid-State NMR and Polymers. Academic Press, London, (1994).
- [4] Greenfield, M. S., Ronemus, A. D., Vold, R. L., Vold, R. R., Ellis, P. D., Raidy, T. E.: J. Magn. Reson. **72**, 89-107 (1987).
- [5] Barbara, T. M., Greenfield, M. S., Vold, R. L., Vold, R. R.: J. Magn. Reson. **69**, 311-330 (1986).
- [6] Long, J.R., Ebelhauser, R., Griffin, R.G.: J. Phys. Chem. A **101**, 988-994 (1997).
- [7] Wittebort, R. J., Olejniczak, E. T., Griffin, R. G.: J. Chem. Phys. **86**, 5411-5420 (1987).
- [8] Hiyama, Y., Silverton, J. V., Torchia, D. A., Gerig, J. T., Hammond, S. J.: J. Am. Chem. Soc. **108**, 2715-2723 (1986).
- [9] Araya, T., Niwa, A., Mizuno, M., Endo, K.: Chem. Phys. **344**, 291-298 (2008).
- [10] Larsen, F. H., Jakobsen, H. J., Ellis, P. D., Nielsen, N. C.: Chem. Phys. Lett. **292**, 467-473 (1998).
- [11] Shiminovitch, D. J., Rance, M., Jeffrey, K. R., Brown, M. F.: J. Magn. Reson. **58**, 62-75 (1984).
- [12] Lin, T.-H., DiNatale, J. A., Vold, R. R.: J. Am. Chem. Soc. **116**, 2133-2134 (1994).
- [13] Antonijevic, S., Wimperis, S.: J. Magn. Reson. **164**, 343-350 (2003).
- [14] Mizuno, M., Hamada, Y., Kitahara, T., Suhara, M.: J. Phys. Chem. A **103**, 4981-4985 (1999).
- [15] Mizuno, M., Iijima, T., Suhara, M.: J. Phys. Condens. Matter **12**, 7261-7273 (2000).
- [16] Mizuno, M., Itakura, N., Endo, K.: Chem. Phys. Lett. **416**, 358-363 (2005).
- [17] Rose, M.E.: Elementary Theory of Angular Momentum. Wiley, New York, (1957).
- [18] Rodríguez-Velamazán, J. A., González, M. A., Real, J. A., Castro, M., Muñoz, M. C., Gaspar, A. B., Ohtani, R., Ohba, M., Yoneda, K., Hijikata, Y., Yanai, N., Mizuno, M., Ando, H., Kitagawa, S.: J. Am. Chem. Soc. **134**, 5083-5089 (2012).
- [19] Mizuno, M., Iwasaki, A., Umiyama, T., Ohashi, R., Ida, T.: Macromolecules **47**, 7469-7476 (2014).
- [20] Sevil, F., Bozkurt, A.: J. Phys. Chem. Solids **65**, 1659-1662 (2004).



水野 元博 (みずの・もとひろ)

1987年 名古屋大学理学部化学科卒業  
 1992年 名古屋大学大学院理学研究科博士後期課程 修了 (博士 (理学))  
 1993年 金沢大学理学部助手  
 2002年 金沢大学理学部助教授  
 2007年 金沢大学大学院自然科学研究科准教授  
 2008年 金沢大学理工研究域物質化学系教授  
 2016年 金沢大学新学術創成研究機構教授  
 2018年 金沢大学ナノマテリアル研究所教授  
 現在に至る

# 天然物のNMR研究 — 立体化学決定および溶液中と膜中における配座解析

九州大学理学研究院

松森 信明

matsmori@chem.kyushu-univ.jp

## はじめに

日本核磁気共鳴学会では、当時の会長であった内藤晶先生を中心とした編集委員会によってNMR書籍の編集が行われ、2017年に「Experimental Approaches of NMR Spectroscopy」がSpringerから出版された。その第14章に松森と大阪大学村田道雄教授の共著で「NMR studies on natural product - Stereochemical determination and conformational analysis in solution and in membrane」とのタイトルの総説を執筆させて頂いた<sup>[1]</sup>。今回、その内容を本機関誌で紹介する機会を頂いた。タイトルからおわかりのように、当該総説はNMRの天然物への応用を扱っている。天然物のNMRと言えは天然物の単離および構造決定を予想されるかもしれないが、この総説ではそのような研究は扱わず、以下の二つの内容を紹介した。一つ目は、天然物中の鎖状部分に存在する不斉炭素の立体化学をNMRで決定する方法論、もう一つは脂質膜に作用する天然物の溶液および固体NMRでの構造解析である。異なる内容を無理やり一つの章に詰め込んだ感は否めないが、これは我々の研究の変遷を物語っている。以下にその変遷を交えて上記総説の内容を一部補足しながら簡単に紹介させて頂く。

## 天然物鎖状構造の立体化学決定

村田教授(当時助手)は、1980年代から90年代初頭にかけて東北大学安元研究室でシガトキシンやマイトトキシン(図1)といった非常に複雑な海洋天然物の単離および構造決定を行ってきた。それらの天然物の平面構造および環状部分の立体化学は当時天然物の分野で一般化してきた二次元NMRを駆使することで決定できたが、鎖状部分の立体化学は依然として決定困難であった。そこで、村田教授が東京大学の橋和夫教授の研究室で助教授を務めていた際に、当時博士課程の学生であった松森と一緒にJ-Based Configuration

Analysis (JBCA) 法を開発し、1999年に報告した<sup>[2]</sup>。この方法は、 $^3J_{HH}$ ばかりでなく、 $^2J_{CH}$ や $^3J_{CH}$ といった遠隔C-Hスピン結合定数の二面角依存性を用いることで(図1)、隣接した不斉炭素間やメチレンを挟んで存在する不斉間の相対的な立体関係を決定する方法である。詳細は当該総説<sup>[1]</sup>や原著論文<sup>[2]</sup>もしくは成書<sup>[3]</sup>をご覧頂くとして、この方法は先のマイトトキシンや<sup>[4]</sup>、当時単離構造決定したアンフィジノール3 (AM3、図1)などに適用することで有用性を示し<sup>[5]</sup>、現在に至るまで天然物鎖状部分の相対立体化学決定に汎用されている。

当該総説には記載しなかったが、JBCA法では立体化学帰属を誤った例もいくつか存在する。実はAM3もその一つである<sup>[6-8]</sup>。複数の配座が混合した場合、スピン結合定数は加重平均として観察される。JBCA法ではその値を解析することで原理的には配座混合系でも立体化学を決定できるが、やはり誤った解釈につながりやすい。そのような場合は、下に述べる別の立体化学決定法と併用することが望ましいであろう。AM3については、九州大学の大石徹教授によって合成化学的手法による立体化学の改訂がなされ、その全立体化学は最近確定した(図1)<sup>[8]</sup>。

一方、1980年代から90年代にかけて、ハーバード大学の岸義人教授は、鎖状天然物の立体化学を不斉合成した立体異性体とのNMR比較によって精力的に決定してきた。我々の報告と同時期に岸グループによって報告されたマイトトキシン側鎖部分の立体化学決定も一連の研究の一つである<sup>[9]</sup>。その膨大な研究の中から、岸教授は「鎖状構造に不斉炭素を有する天然物のNMRデータは、同じ立体化学を有する部分構造で再現できる。」との知見を得た。したがって、天然物の部分構造に相当するモデル化合物のすべての立体異性体を化学合成し、そのNMRデータをデータベース化しておけば、あとは天然物と比較する

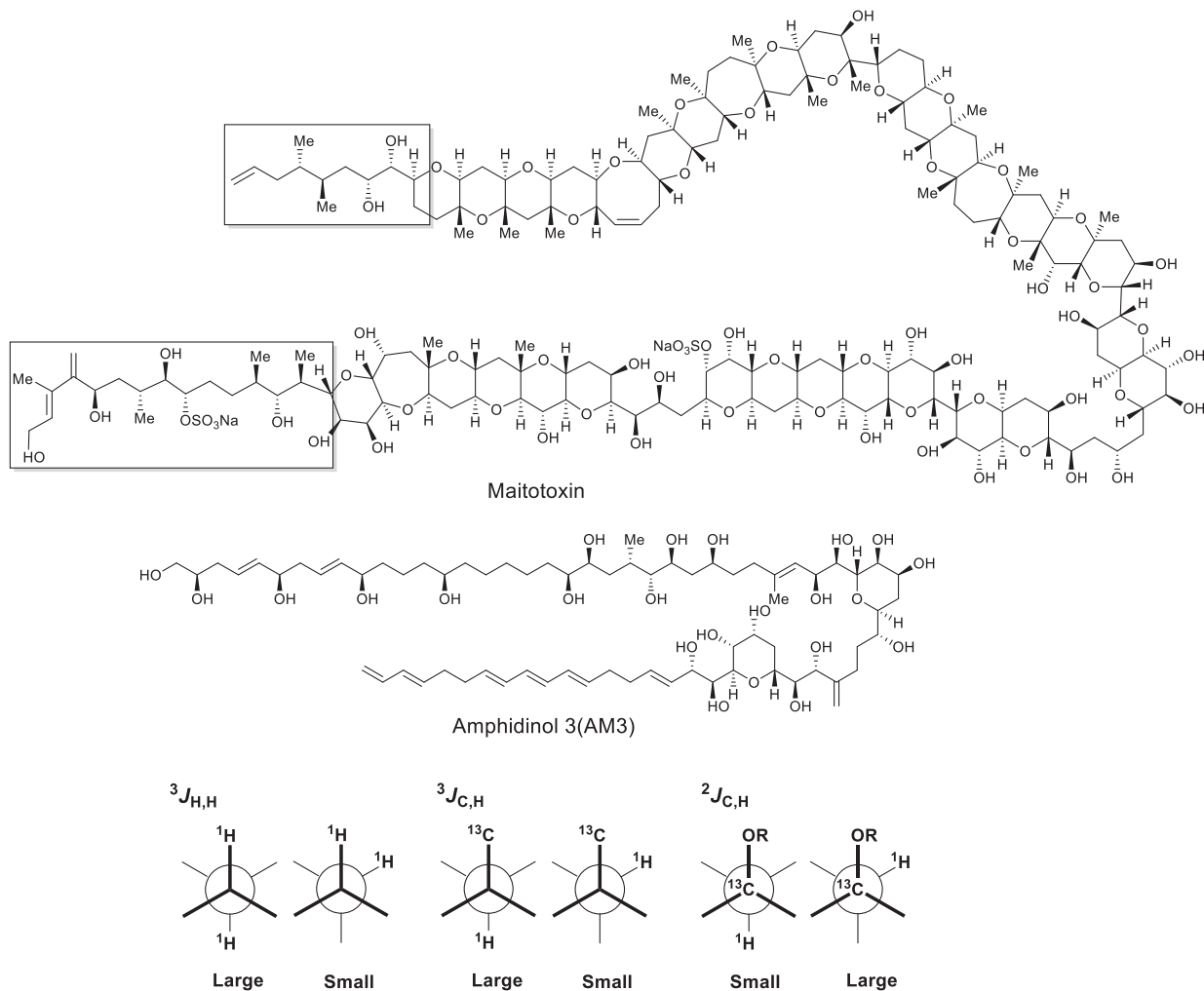


図1 (上) JBCA法を適用した海洋天然物のマイトトキシシンとアンフィジノール3 (AM3)。マイトトキシシンでは赤い四角で囲った部分に主に適用した。AM3は化学合成によって立体化学が訂正されており、ここには最終的に確定した立体構造を示す。(下) JBCA法で主に使用するスピン結合定数の二面角依存性。

だけで立体化学を決定することができる。これが universal NMR database (UDB) 法の骨子である<sup>[10]</sup>。例えば、図2に示す天然物の四角で囲った部分構造の相対立体化学を決定する場合、分子全体を合成する必要はなく、その部分構造を含むモデル化合物の立体異性体をすべて合成し、化学シフトやスピン結合定数を天然物と比較して立体化学を決定する。また、このようにしてモデル化合物のNMRデータを一度得ておけば、同様の部分構造を有する天然物はNMRデータを比較するだけで立体化学が決定できるのである。

これらの方法以外にもいくつか興味深い立体化学決定法が報告されている。化学シフトやスピン結合定数を量子化学計算で推定し、配座のポピュレーションで加重平均して天然物のNMRデータと比較する方法や、残余双極子などを用いて遠隔に存在する不斉炭素間の立体化学的關係を決定する方法などがそれである。それらも当該総説中に記載したので<sup>[1]</sup>、参照頂きたい。

このような天然物の立体化学決定を主な仕事にしていた際に、「なぜわざわざ立体化学を決定する必要があるのか」といった質問を生物系の先生によく尋ねられた。タンパク質や核酸では基本的に立体化学の決定を要しない故だと思われるが、立体異性体で物理化学的性質や生理作用が異なることは言を俟つまでもない。つまり、立体化学が異なる化合物は別物なのである。その意味で、立体化学までを同定して初めて天然物の構造決定が完了したと言える。

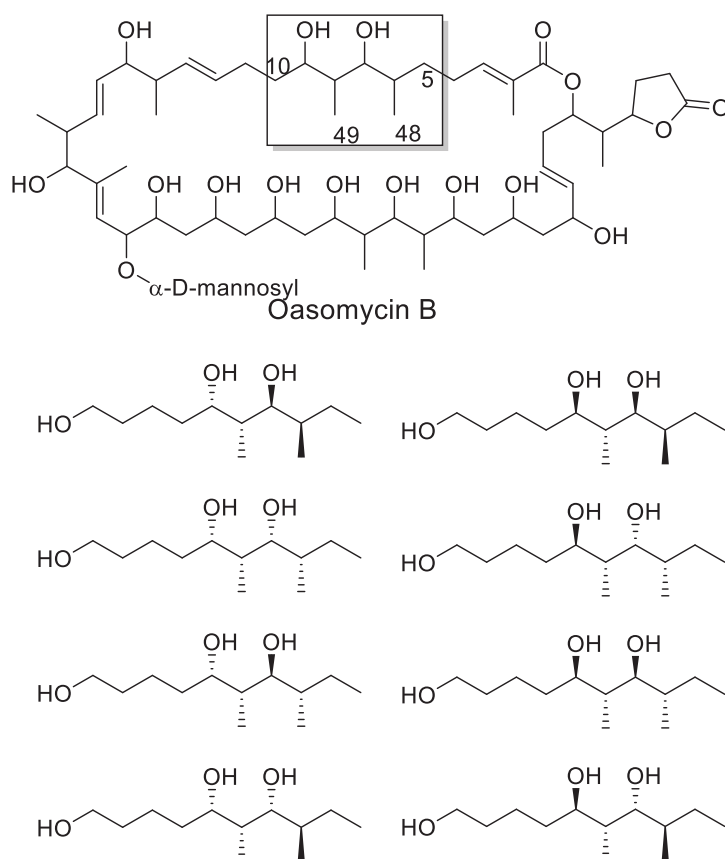
### 脂質膜に作用する天然物の溶液および固体 NMR 構造解析

1999年に大阪大学に教授として着任した村田教授は、松森を研究室のスタッフとして採用し、脂質膜に作用する天然物の膜中での複合体構造の解析を新たに開始した。この端緒となった天然物が上述のAM3である。我々が東大時代に所属していた橋研究室では、従来型の天然物化学に

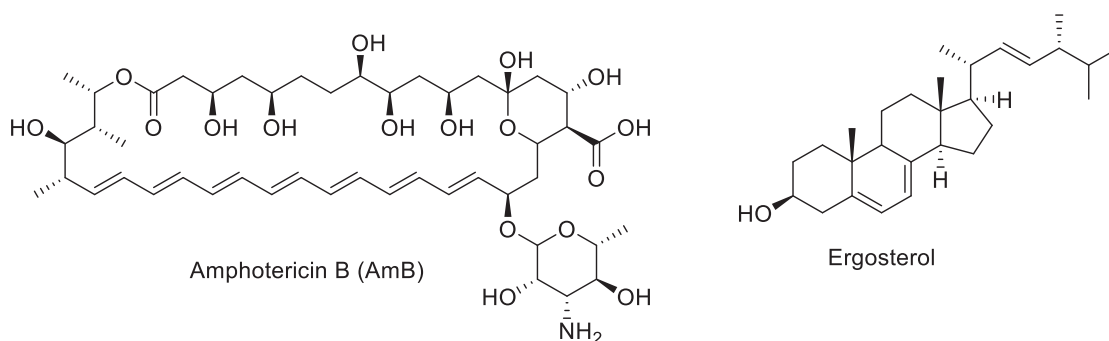
加えて、天然物の膜への作用についても研究していた。そこでの研究で、AM3が脂質膜に細孔を形成し、溶血活性や抗カビ活性を発揮することを見出した。しかし、AM3は渦鞭毛藻とよばれるプランクトンを培養して単離精製する必要があるため、入手は容易ではない。そこで、入手が容易でかつAM3同様に膜への細孔形成によって活性を発現するアンフォテリシンB (AmB、**図3**)に着目し、そのNMR解析を大阪大学で開始した。AmBは抗真菌薬として臨床で使用されている放線菌由来の天然物で、膜中で真菌膜に存在するエルゴステロール (**図3**) とともにイオンチャンネル複合体を形成し生理活性を発現すると

言われている。そこで我々は主に固体NMRの手法を適用し、その複合体構造の解析に挑戦した。具体的には、AmBやエルゴステロールを $^{19}\text{F}$ や $^{13}\text{C}$ で標識し、REDOR (Rotational Echo Double Resonance) 法<sup>[11]</sup>とよばれる異種核間の精密距離測定法を用いた分子間距離測定などを行った。こちらも詳細は当該総説を参照頂ければ幸いであるが<sup>[1]</sup>、一つだけ興味深い結果を紹介したい。

これまでAmBとエルゴステロールはhead-to-head型、つまりAmBの糖部分とエルゴステロールのヒドロキシ基が同じ方向で相互作用すると考えられてきた。我々は14位に $^{19}\text{F}$ 標識したAmBと26, 27位に $^{13}\text{C}$ 標識したエルゴステロールを化



**図2** Universal NMR database法の一例。四角で囲った部分の立体化学決定に際して、モデル化合物のすべての立体異性体を化学合成し、天然物とNMRデータを比較する。



**図3** アンフォテリシンB (AmB) とエルゴステロールの構造



学合成し、これらが膜中で近接していることを REDOR法で証明した(図4)。このことから、脂質膜中でのAmBとエルゴステロールの相互作用は、head-to-head型ばかりでなくhead-to-tail型も存在することを初めて明らかにした<sup>[12]</sup>。これらの標識体は培養による生合成もしくは有機合成で得たが、特に有機合成が極めて大きな役割を果たした。その意味で、本研究は有機化学とNMR、さらには脂質膜の生物物理といった複数の領域の融合によってはじめて可能となったプロジェクトと言える。

また、当時Voldらによって小型等方バイセルに膜作用性のペプチドを導入し、溶液NMRで構

造解析を行う研究が報告された<sup>[13]</sup>。そこで、その手法をAmBに適用すべく小型等方バイセルの研究にも着手した。バイセルについては改めて紹介するまでもないと思うが、長鎖リン脂質と短鎖リン脂質もしくは界面活性剤からなるディスク状の脂質会合体である(図5)。長鎖リン脂質の短鎖リン脂質もしくは界面活性剤に対する比が1以下になると、バイセルが小型化し等方的な運動をするため、膜に作用した化合物の溶液NMR観察が可能となる。残念ながらAmBを小型等方バイセルに導入するとNMRシグナルがほとんど観察されなくなったが、膜に作用して副作用を示す可能性が指摘されている抗生物質エリスロマイシン

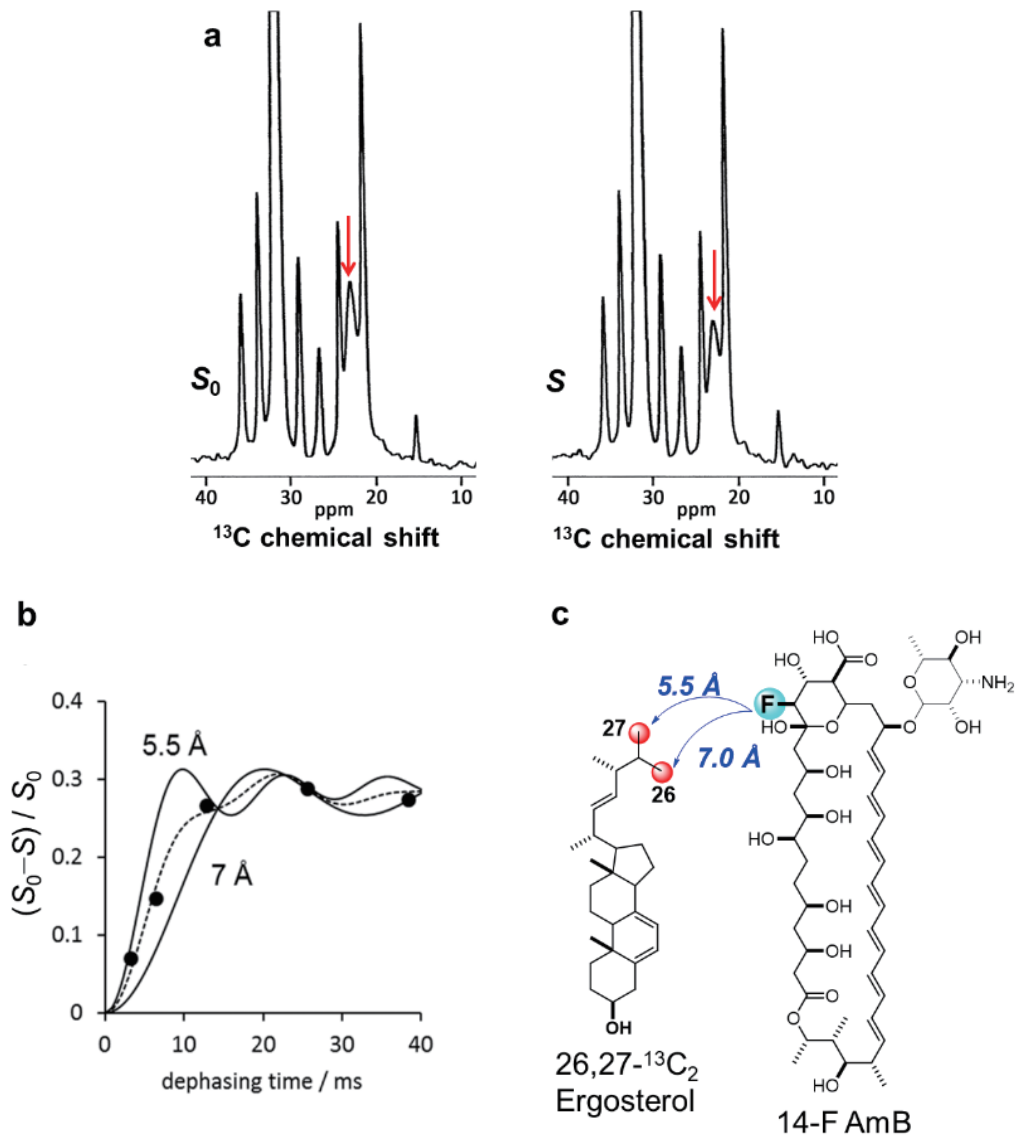


図4 (a) 14-F-AmB/26, 27-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>エルゴステロール/POPC (1 : 1 : 9) を水和したサンプルで測定した<sup>13</sup>C{<sup>19</sup>F}REDORスペクトル。S<sub>0</sub>は<sup>19</sup>F非照射スペクトル、Sは<sup>19</sup>F照射スペクトルを表す。赤矢印は26, 27-<sup>13</sup>C由来のシグナル。Sスペクトルでシグナル強度が減少していることから、これらの炭素がAmBのフッ素に近接していることがわかる。(b) 5.5および7.0ÅのREDOR理論曲線(実線)とそれらを1:1で混合した理論曲線(点線)。実測値は黒丸で示す。ここから<sup>13</sup>C-<sup>19</sup>F間の距離を5.5および7.0Åと見積った。(c) REDORから想定されるhead-to-tail型の相互作用。REDORの解析から、head-to-headとhead-to-tailが7:3の割合で共存することがわかった。

や<sup>[14]</sup>、海綿由来の環状ペプチドでステロール結合性を示すセオネラミドなどの膜中での構造をバイセルによって解析した(図5)<sup>[15]</sup>。これらの詳細についても当該総説中で紹介している<sup>[1]</sup>。

### 終わりに

このように、「Experimental Approaches of NMR Spectroscopy」第14章は、我々の天然物NMR研究のこの25年ほどの変遷(悪戦苦闘?)をたどる内容となっている。一方で、AmB研究の端緒となったAM3に関しては、入手や標識体調製の困難さにより、現時点で固体NMR解析はまだそれほど進んでいない。最近、九州大学の大石教授によってAM3全合成が達成されたので<sup>[16]</sup>、今後AM3標識体の調製が可能になれば、AmB同様に固体NMR測定によるステロール認識機構の解明につながると期待される。

また我々は脂質膜に作用する天然物ばかりでなく、スフィンゴミエリンなどの脂質そのものの膜中での動的挙動や配座の解析もNMRを用いて行っている。脂質も天然物ではあるが、上記総説には含めていない。この内容はすでに2017年の本機関誌に「脂質ラフトのNMR解析」として松

森が紹介しているので、興味があれば併せてご一読頂ければ幸いである。

### 参考文献

- [1] Matsumori N, Murata M. (2017) NMR studies on natural product - Stereochemical determination and conformational analysis in solution and in membrane. *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy* (Springer) pp 383-414.
- [2] Matsumori N, Kaneno D, Murata M, Nakamura H, Tachibana K. (1999) Stereochemical determination of acyclic structures based on carbon-proton spin-coupling constants. A method of configuration analysis for natural products. *J Org Chem* **64**, 866-876.
- [3] 岩下孝、楠見武徳、村田道雄 (2012)「NMR立体化学」講談社
- [4] (a) Sasaki M, Matsumori N, Maruyama T, Nonomura T, Murata M, Tachibana K, Yasumoto T. (1996) The complete structure of maitotoxin 1. Configuration of the C1-C14 side chain. *Angew. Chem. Int. Ed.* **35**, 1672-1675. (b) Nonomura T, Sasaki M, Matsumori N, Murata M, Tachibana K, Yasumoto T. (1996) The complete structure of maitotoxin 2. Configuration of the C135-C142 side chain and absolute configuration of the entire molecule *Angew. Chem. Int. Ed.* **35**, 1675-1678. (c) Matsumori N, Nonomura T, Sasaki M, Murata M, Tachibana K, Satake M, Yasumoto T. (1996) Long-range carbon-proton coupling constants for stereochemical assignment of acyclic structures in natu-

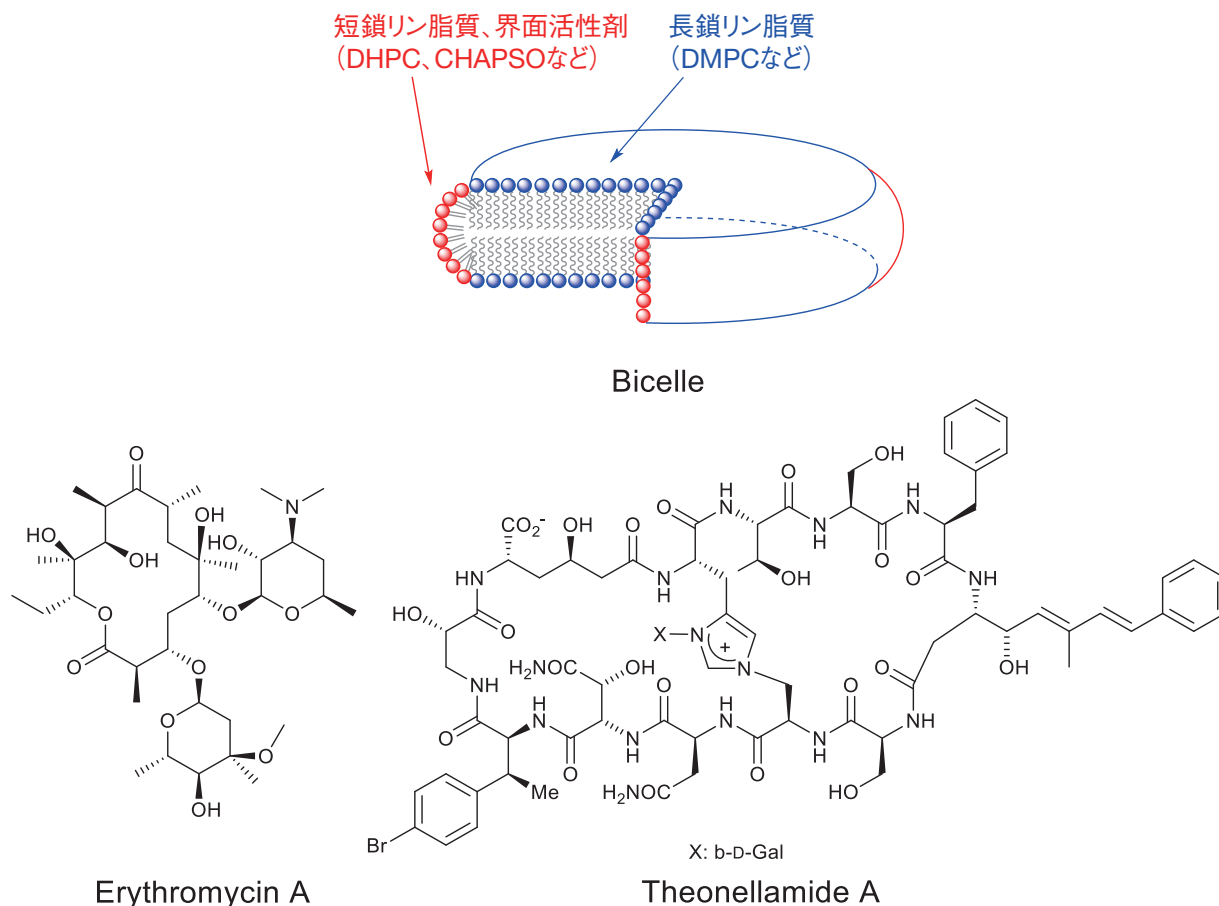


図5 バイセルの模式図と、バイセルに導入した天然物エリスロマイシンAおよびセオネラミドAの構造

- ral products: Configuration of the C5-C9 portion of maitotoxin. *Tetrahedron Lett.* **37**, 1269-1272.
- [5] Murata M, Matsuoka S, Matsumori N, Paul G.K, Tachibana K. (1999) Absolute configuration of amphidinol 3, the first complete structure determination from amphidinol homologues: Application of a new configuration analysis based on carbon-hydrogen spin-coupling constants. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 870-871.
- [6] Oishi T, Kanemoto M, Swasono R, Matsumori N, Murata M. (2008) Combinatorial synthesis of the 1,5-polyol system based on cross metathesis: Structure revision of amphidinol 3. *Org. Lett.* **10**, 5203-5206.
- [7] Ebine M, Kanemoto M, Manabe Y, Konno Y, Sakai K, Matsumori N, Murata M, Oishi T. (2013) Synthesis and structure revision of the C43 - C67 part of amphidinol 3. *Org. Lett.* **15**, 2846 - 2849.
- [8] Wakamiya Y, Ebine M, Murayama M, Omizu H, Matsumori N, Murata M, Oishi T. (2018) Synthesis and stereochemical revision of the C31-C67 fragment of amphidinol 3. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 6060 - 6064.
- [9] Zheng W, DeMattei JA, Wu J-P, Duan J J-W, Cook LR, Oinuma H, Kishi Y. (1996) Complete relative stereochemistry of maitotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 7946-7968.
- [10] (a) Kobayashi Y, Tan C-H, Kishi Y. (2001) Toward creation of a universal NMR database for stereochemical assignment: Complete structure of the desertomycin/oasomycin class of natural products. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2076-2078. (b) Higashibayashi S, Czechtizky W, Kobayashi Y, Kishi Y. (2003) Universal NMR databases for contiguous polyols. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14379-14393.
- [11] (a) Gullion T, Schaefer J. (1989) Rotational-echo double-resonance NMR. *J. Magn. Reson.* **81**, 196-200. (b) Gullion T, Schaefer J. (1989) Detection of weak heteronuclear dipolar coupling by rotational-echo double-resonance nuclear magnetic resonance. *Adv. Magn. Reson.* **13**, 57-83.
- [12] (a) Umegawa Y, Nakagawa Y, Tahara K, Tsuchikawa H, Matsumori N, Oishi T, Murata M. (2012) Head-to-tail interaction between amphotericin B and ergosterol occurs in hydrated phospholipid membrane. *Biochemistry* **51**, 83-89. (b) Nakagawa Y, Umegawa Y, Matsushita N, Yamamoto T, Tsuchikawa H, Hanashima S, Oishi T, Matsumori N, Murata, M. (2016) Structure of bimolecular complex between amphotericin B and ergosterol in membrane is stabilized by face-to-face Van der Waals interaction with their rigid cyclic cores. *Biochemistry* **55**, 3392-3402.
- [13] Vold RR, Prosser RS, Deese AJ. (1997) Isotropic solutions of phospholipid bicelles: a new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides. *J. Biomol. NMR*, **9**, 329-335.
- [14] (a) Matsumori N, Morooka A, Murata M. (2006) Detailed description on conformation and location of membrane-bound erythromycin A using small bicelle. *J. Med. Chem.* **49**, 3501-3508. (b) Matsumori N, Murata M. (2010) 3D structures of membrane-associated small molecules as determined in isotropic bicelles. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 1480-1492.
- [15] Cornelio K, Espiritu RA, Todokoro Y, Hanashima S, Kinoshita M, Matsumori N, Murata M, Nishimura S, Kakeya H, Yoshida M, Matsunaga S. (2016) Sterol-dependent membrane association of the marine sponge-derived bicyclic peptide theonellamide A as examined by <sup>1</sup>H NMR. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 5235-5242.
- [16] Wakamiya Y, Ebine M, Matsumori N, Oishi T. submitted.



松森 信明 (まつもり・のぶあき)

1992年 東京大学理学部化学科卒業  
 1997年 東京大学大学院理学系研究科化学専攻博士課程修了(橘和夫教授)  
 1997～1999年 東京大学大学院農学生命科学研究科生命工学専攻博士研究員(堀之内末治教授)  
 1999～2010年 大阪大学大学院理学研究科化学専攻助手、助教(村田道雄教授)  
 2000～2001年 MIT化学科在外研究員(Robert. G. Griffin教授)  
 2010～2014年 大阪大学大学院理学研究科化学専攻准教授(村田道雄教授)  
 2014年 九州大学大学院理学研究院化学部門教授、現在に至る。

# NMRによる生体高分子立体構造計算の基礎と最近の進展

首都大学東京理学研究科

池谷 鉄兵

tikeya@tmu.ac.jp

## 1. はじめに

1985年にNMRによるタンパク質の立体構造決定が報告されて以来<sup>[1]</sup>、NMRはX線結晶構造解析と並び、長らくタンパク質立体構造解析の主力手法のひとつとして、構造生命科学の発展に大きく貢献してきた。現在、Protein Data Bank (PDB) には、NMR法により決定された1万2千を超える構造が登録されている。近年、X線結晶構造解析の技術発展による簡素化・迅速化と、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) の目覚ましい進展により、立体構造決定はこうした手法で行い、NMRは滴定実験等の相互作用部位解析や、緩和解析などに限定した研究が増えてきている。実際、NMRによって決定された生体高分子のPDBへの登録数は、2007年を境に年々減少している。しかしながら、今なおX線結晶構造解析やcryo-EMでは解析の難しい生体高分子は数多く存在し、結晶構造が明らかにされた分子であっても溶液状態では明瞭な違いが見出された例も多数報告されている<sup>[2-3]</sup>。NMRを用いることで、より自然な溶液環境や細胞内環境で分子の立体構造解析も可能である<sup>[4-7]</sup>。このように、NMR立体構造解析法は、他の手法では補えられない固有の情報を検出できるという独自性は揺らいではない。一方で、言うまでもないが、NMRはX線結晶構造解析やcryo-EMのように分子の像を直接得られる手法ではないため、スペクトル中のピーク強度や化学シフト変化から、可能な限り有効な構造情報を抽出し、立体構造を再構成するという計算プロセス (立体構造計算) が必須である。NMRによる生体高分子の立体構造計算手法は、1990年代にその手法の基礎技術は確立しているが、現在も劇的ではないが着実に進歩しており、新たな手法を用いることでこれまで見えなかった溶液中のタンパク質の描像の観測に成功した例が多数報告されている。そこで本稿では、あらためてNMRによる生体高分子の立体構造決定についてまとめ、現状と今後の将来について考えてみる。特に、筆者が長年関わってきたCYANAプログラムを中心にNMR立体構造計算の基本的な流れをおさらいし、最近研究が活発ないくつかのユニークな立体構造決定法について紹介したい。

## 2. NMR 立体構造計算プログラム CYANA

CYANA<sup>[8-9]</sup> は、フラクフルトゲート大学教授Peter Güntert博士により、その前身であるDIANA、DYANAというソフトウェアを経由して、30年に渡り開発が進められてきたNMR立体構造計算のための統合パッケージである。現在、世界の数百を超える大学・民間企業で利用されており、生体系NMRの標準ソフトウェアの1つになっていると言える。筆者の知る限り、生体高分子の立体構造解析にはCYANA, ARIA<sup>[10]</sup>, Xplor-NIH<sup>[11]</sup>の3つのソフトウェアが世界で特に多く利用されていると思う。CYANAはその中でも、このソフトウェアを利用して得られた立体構造のPDBへの登録数が最も多く、文部科学省の「タンパク3000プロジェクト (2002-2006年)」のNMR解析における主力ソフトウェアとして利用された経緯から、日本での利用者も多い。筆者は、Güntert研究室に長く所属してCYANA開発の一部に携わり、現在もGüntert教授と密接な共同研究を続けていることから、本稿はCYANAを使った計算法に若干偏った話題になっている。

CYANAは、NMRスペクトルデータを直接読み込み、ピークピッキング、化学シフト帰属、NOESY帰属、立体構造計算、構造最適化計算までの一連の計算をすべて全自動で解析できるシステムを備えている。なかでも、化学シフトの自動帰属 (FLYAアルゴリズム)<sup>[12]</sup>、NOESY帰属 (CANDIDアルゴリズム)<sup>[13]</sup>、立体構造計算 (2面角系分子動力学計算; TAMM)<sup>[8]</sup>の解析モジュールは、最もよく利用されて

おり、データの質にもよるが、多くの場合、NMRの熟練者による手動解析と同等かそれ以上の解析結果を提供してくれる。計算速度も人手による解析に比べ格段に速いため（分子量20K程度のタンパク質の主鎖原子の自動帰属であれば15分程度）、データの質の評価や、手動解析の校正などに限定した使用でも試してみる価値はある。意外に知られていないようだが、CYANAはPCSやRDCのような配向・磁化率テンソルを決定できるモジュールも組み込まれており、他のソフトウェアを別途利用することなく、常磁性データ等も容易に計算に組み込むことができる。利用の詳細は、CYANA wiki ([http://www.cyana.org/wiki/index.php/Main\\_Page](http://www.cyana.org/wiki/index.php/Main_Page)) に主な仕様が記載されており、CYANAメーリングリストなどで他のユーザーと不具合や問題点を共有することも可能である。

### 3. NOE データの解釈

NOEから得られる距離情報は、現在でもなおタンパク質立体構造決定の最も有効なNMRデータである。ここでは、生体高分子の立体構造解析におけるNOEデータの利用について、従来法と近年開発された方法について、改めてまとめてみる。

よく知られているように、原子*i*と*j*の双極子相互作用により得られたNOEピーク強度 $I_{ij}$ と2つの原子間距離 $r_{ij}$ の最も単純な関係式は、補正定数 $\gamma$ を用いることで以下のように表せる。

$$I_{ij} = \gamma r_{ij}^{-6} \quad (1)$$

しかしながら、このモデルでは、スピン拡散や、分子全体の回転運動、分子の内部運動等を考慮しておらず、信号の重なりや水分子との相互作用、磁場の不均一性などのその他の実験エラーなどの曖昧さも省略された、かなり単純化した表現である。よって、NMR構造決定の多くの方法では、こうした原子間距離以外の不確かさを簡易的に取り込むために、ピーク強度を特定の距離範囲を持つ3つ程度の階級（短、中、長距離）に分類する近似を採用している。一方、CYANAでは、「一般的なタンパク質のNOEデータセットのピーク強度の中央値は、概ね4.0Å程度の原子間距離と一致する」という経験則から、データの中央値を4Åと任意に仮定し、補正定数 $\gamma$ を決定する。この $\gamma$ 値をもとに、ピーク強度から距離への校正を行っている。多くの場合、この2つの方法のような単純な近似を使用しても、十分な数の距離拘束があれば、個々のデータの曖昧さを補填し、かなり高精度の立体構造決定が可能である。一方で、十分な数のNOEデータを取得できない場合、もしくは得られた最終構造を最適化するには、スピン拡散と分子のダイナミクスを考慮して、NOEからより正確なプロトン間距離を取得する必要がある。その場合、スピン*i*と*j*の双極子相互作用によるNOEのクロスピーク強度 $I_{ij}$ は、以下のように修正される。

$$I_{ij} = I_0^j \exp(-R t_m) \quad (2)$$

ここで、 $t_m$ は混合時間、 $I_0^j$ は混合時間ゼロのときのスピン*j*のピーク強度、 $R$ はソロモン緩和行列を表す。行列の非対角要素である*i*と*j*スピン間の交差緩和率は以下のように表される。

$$R_{ij} = \frac{1}{4} (\gamma_H^2 \hbar)^2 (6J_{ij}(2\omega_H) - J_{ij}(0)) \quad (3)$$

ここで、 $\gamma_H$ はプロトン核の磁気回転比、 $\omega_H$ はプロトン核のラーモア周波数、 $\hbar$ は換算プランク定数、 $J_{ij}(\omega)$ はスペクトル密度関数を示す。分子の回転拡散運動を対称コマでモデル化できる場合は、スペクトル密度関数 $J_{ij}(\omega)$ は次のように記述される。

$$J_{ij}(\omega) = \frac{2}{5} \sum_{k=-2}^2 \frac{\tau_k}{1 + \omega^2 \tau_k^2} \frac{|Y_2^k(\theta_{ij}, \phi_{ij})|^2}{r_{ij}^6} \quad (4)$$

ここで、 $\tau_k$ は回転相関時間、 $Y_2^k$ は2次の球面調和関数を示す。分子の回転拡散を等方的運動とし内部運動がないモデルを用いると、スペクトル密度関数は次のように簡略化できる。

$$J_{ij}(\omega) = \frac{1}{4\pi^2} \frac{\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} \quad (5)$$

回転相関時間  $\tau_c$  は、NMR緩和測定などにより決定できるため、スピン拡散の補正により、緩和行列からピーク強度をより正確に推定することは可能である。

ARIA<sup>[10]</sup> は、Michael Nilgesらによって長年開発が続けられているタンパク質構造決定の標準ソフトウェアの1つである。ARIAでは、スペクトルの対角ピークの強度を混合時間  $t_m = 0$  でのピーク強度として、再帰計算することにより、近似緩和行列を迅速に計算できる<sup>[14]</sup>。

$$I(t_m) = (\mathbf{E} - \mathbf{R}\Delta t)^n I(0) \quad (6)$$

ここで、 $n\Delta t = t_m$  とし、 $E$  は単位行列を、 $I(0)$  はシステムの水素原子数分の要素を持つ対角行列を表す。Nilgesらは、80msの混合時間で測定したPHドメインのNOEデータセットに対して、構造計算の最終ステップでこの解析を実行した。この計算で得られた構造は、各種のタンパク質構造評価プログラムで高いスコアを示し、タンパク質構造としてより尤もらしい構造を得ることができたと報告している。

一方、Roland Riekらは、NOESY測定とデータ解析を見直すことで、NOEからより正確な距離情報を抽出できる方法、exact NOE (eNOE)<sup>[15~16]</sup> を提案している。この方法は、異なる混合時間で複数の3D HMQC-NOESY実験を実行して同種核の相互緩和率を決定し、剛体分子モデルに基づいて距離に変換する。タンパク質解析で最も一般的な3D NOESY-HSQCではなく、3D HMQC-NOESYを採用することで、対角ピークとクロスピークが同一の磁化経路を経て観測されるため、2つが同一の緩和過程と見なすことができる。解析対象を球状分子と仮定すると、プロトン間距離は、(4)式に速い内部運動を考慮した拡張モデルを用いて、 $t_m = 0$  を基準にしたNOEの相対ピーク強度から得られる交差緩和率と、主鎖<sup>15</sup>N核の  $T_1T_2$  緩和実験から得られる回転相関時間から、より正確に求めることができる。著者たちはこのモデルを用いて、<sup>15</sup>N-separated HMQC-NOESYから推定したユビキチン(Ub)の原子間距離を約0.07Åの実験誤差で得られたとしている。eNOEにより得られた距離情報は、Ubのほとんどの領域でX線構造と非常によく一致したが、ループ領域の一部で得られた距離が短く見積られる結果となった。著者たちは、この違いはcrystal packingによるアーティファクト、もしくはダイナミクスの寄与に起因すると議論している。最近、eNOEの解析アルゴリズムはCYANAにも実装されており、測定データさえ得られれば、その後の解析と立体構造計算は自動化されている。

eNOEでは、緩和の物理過程を可能な限り厳密に計算に組み込み、正確な距離情報をデータから引きだそうという試みである。この手法は、比較的分子量の小さい生体分子や、等方的な回転相関時間を持つ分子では容易に適用可能であるが、分子量が増大しシグナルの重なりが顕著になる試料では正確な距離の見積もりが難しくなる。Beat Vögeliらは150アミノ酸程度のタンパク質の構造解析にも応用できると報告しているが<sup>[17~18]</sup>、それでもシグナルの重なりが激しい試料では解析は困難となる。そこで、eNOEとは別の思想であり、不明な物理因子はひとまとめに実験エラーとして解析するベイズ推定を利用した立体構造計算が開発されている。これについては、次節で詳細に解説する。

#### 4. ベイズ推定を利用した立体構造計算

従来のNMR構造計算は、実験データに最も合う立体構造モデルを探索する最適化法の1つと言える。しかしながら、実験データには、分子の空間情報以外に、ダイナミクスなどの不確実な物理的要因と実験エラーによる様々な曖昧さが含まれる。例えば、(前述のように)NOEデータには、スピン拡散、ダイナミクス、溶媒との相互作用、信号のオーバーラップ、磁場の不均一性等に起因する不確実な情報が内在する。第3節で述べたような緩和行列を組み込んだモデル化を行えば、スピン拡散とダイナミクスをある程度解釈することが可能であるが、上記の不確実性因子をすべてモデル式に加えることはできない。先に述べたように、十分な構造情報を得られた際には個々のデータのエラーをある程度無視しても正確な構造を得ることができるが、溶液状態で不安定な試料や、溶解度が低いことでNMRの測定感度が低い試料など、容易には十分な質と量の実験測定値を得られない場合には、こうした不確実要因をモ

デルに取り込んだ別の手法が求められる。こうした状況から、Michael Nilgesらは、ベイズ推定に基づくNMR構造計算法 (inferential structure determination ; ISD)<sup>[19~20]</sup>を公表している。従来のNMR立体構造計算で用いられる最適化アプローチとは異なり、ベイズ推定では、説明変数を変数の存在確率分布の広がりとして解析する。例えば、従来の方法では説明変数 (NOEデータでは、(1)式の補正定数 $\gamma$ )はユーザー定義の値に固定されていたが、ベイズ推定ではMarkov chain Monte Carlo (MCMC) サンプリングによる統計モデリングからそれらを推定する。また、構造評価は、従来法で用いられる目的関数によるものとは異なり、ベイズ推定で得られる事後確率分布が指標になる。事後確率分布を使う利点の1つは、ユーザーが事前に定義した明示的な重み係数を使用せずに、サンプリングの中でデータの質に応じて事前確率と尤度の寄与を推定できる点にある。Nilgesらが提案したベイズ推定に基づく立体構造計算は、当時、非常に斬新であり、その後、この考え方は生体系NMRのみに限らず、X線小角散乱を用いた構造解析等、他の分野にも波及している<sup>[21~23]</sup>。我々も、ISDの基本的考え方を利用しつつ、これに改良を加えた手法を開発し、立体構造計算ソフトウェアCYANAにCYBAYモジュール<sup>[5,24]</sup>として実装した。以下に詳細を記載する。

従来法の目的関数 $T$ は、予測データと観測データの残差を表す $\chi^2$ 項、物理ポテンシャルエネルギー項 $E$ 、および重み係数 $w$ で構成される。

$$T(\theta) = \chi^2(\theta) + wE(\theta), \quad (7)$$

ここで、 $\theta$ は分子の立体構造座標を記述する2面角パラメータを示す。ベイズの定理の枠組みでは、目的関数は、構造アンサンブルで表される事後確率に置き換えることができる。

$$P(\theta|D) \propto P(\theta)P(D|\theta) \quad (8)$$

ここで、 $D$ は一般的な実験データを表す。現在の我々の手法では、NOEデータのみベイズ推論の枠組みで扱い、他のデータは従来の形式で処理される。尤度関数は対数正規分布で記述する。

$$I_{kl} = \frac{\gamma}{r_{kl}^6} \quad (9)$$

$$P(I|\theta) = \prod_{i=1}^n L(I_{k,l_i}|\theta) \quad (10)$$

$$L(I_{kl}|\theta) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}I_{kl}} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2} \ln^2\left(\frac{I_{kl}}{\mu}\right)\right) \quad (11)$$

ここで、 $I_{kl}$ と $r_{kl}$ はそれぞれスピン $k$ と $l$ から得られるNOE強度と距離、 $n$ はピークの数、 $\sigma$ は標準偏差、 $\mu$ はピーク強度の期待値となる。事前確率分布は以下の形で示す。

$$P(\sigma, \theta, \gamma) = P(\sigma)P(\theta)P(\gamma) \quad (12)$$

$$P(\theta) = \frac{1}{Z(\beta)} \exp(-\beta E(\theta)) \quad (13)$$

$$\begin{aligned} \sigma &\sim G[a, b] \\ \gamma &\sim LN[\mu_\gamma, \sigma_\gamma] \end{aligned}$$

ここで、 $a$ と $b$ はそれぞれガンマ関数 $G$ の形状とスケールのパラメータ、 $LN$ は対数正規分布、 $P(\theta)$ は分配関数 $Z$ と逆温度 $\beta$ を持つ分子構造の正準分布として記述できる。 $\sigma$ および $\gamma$ パラメータは、ギブスサンプラーによるMCMCによりサンプリングする。一方で、座標変数 $\theta$ はMDによりサンプリングする。このようなハイブリットな形でサンプリングを行う理由は、タンパク質の立体構造のサンプリングでは、共有結合による自由度の制限と、分子内部で原子がかなり密に詰まった充填構造のためにMCよりもMDの方がサンプリング効率が高いという報告に基づいている<sup>[25~26]</sup>。MDによるサンプリング

の目的関数  $T(\theta)$  は、物理ポテンシャル  $E(\theta)$  と、ギブスサンプラーによってサンプリングされた、 $\gamma$  および  $\sigma$  の尤度関数  $L(\theta, \gamma, \sigma)$  からなる。

$$T(\theta) = \beta E(\theta) + L(\theta, \gamma, \sigma) \quad (14)$$

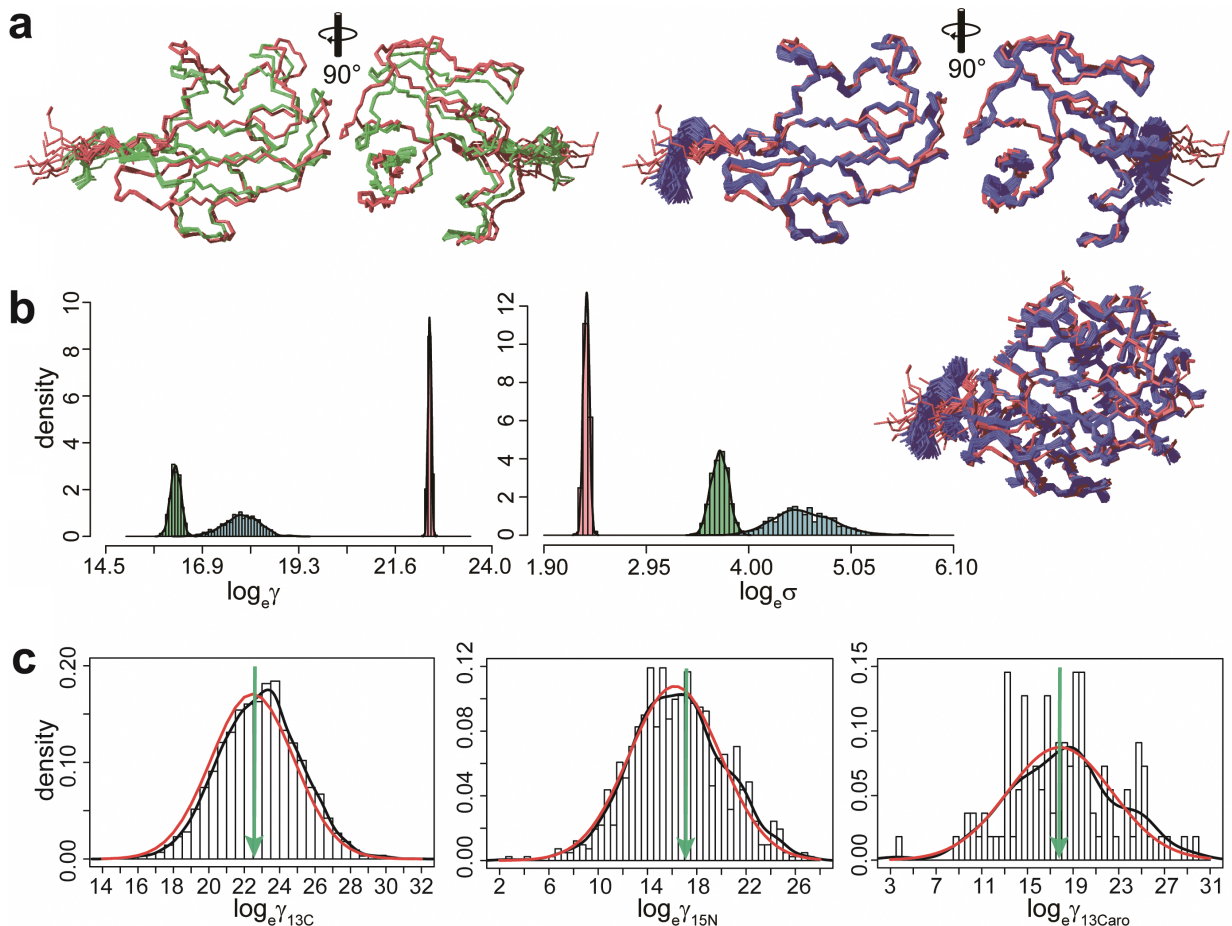
$$E(\theta) = \sum E_{dihedral} + \sum E_{vdw} + \sum E_{vdw14} + \sum E_{electro} + \sum E_{electro14} + \sum E_{GB}$$

$$L(\theta, \gamma, \sigma) = \frac{1}{2\sigma^2} \sum_{i=1}^n \ln \left( \frac{V_i r_i^6}{\gamma} \right)$$

ここで、 $E_{dihedral}$ 、 $E_{vdw}$ 、 $E_{vdw14}$ 、 $E_{electro}$ 、 $E_{electro14}$ 、 $E_{GB}$  はそれぞれ、二面角、van der Waals、1-4 van der Waals、静電相互作用、1-4 静電相互作用、および一般化ボルン (GB)<sup>[27]</sup> による水モデル相互作用のエネルギー項を示す。NOE シグナルの重なりがある場合のいわゆる ambiguous NOE の距離拘束の場合、距離  $r_i$  は以下の式で表す。

$$\bar{r} = \left( \sum_{j=1}^m r_{k,l_j}^{-6} \right)^{-1/6} \quad (15)$$

ここで  $m$  はシグナルの重なり数を示す。座標変数のサンプリング計算では、Cartesian MD よりも長い



**図1** ベイズ推定を用いた立体構造決定。既知のユビキチン構造をもとにNOEデータをシミュレーションし、性能評価を行った。(a) CYANAによる従来法(緑)とベイズ推定法(青)による立体構造計算、それぞれから得られた構造を参照構図(PDB 1D3Z, 赤)に重ね合わせた図。上の図は、主鎖原子(N, C<sup>α</sup>, C<sup>β</sup>)のみを、右下の図は側鎖原子も含めた構造を表示している。(b) <sup>13</sup>C-separated NOESY (赤)、<sup>15</sup>N-separated NOESY (緑)、<sup>13</sup>C-separated aromatic NOESY (青) スペクトルに対応するピーク強度の $\gamma$ と $\sigma$ 値の分布。(c) <sup>13</sup>C-, <sup>15</sup>N-, and <sup>13</sup>C-separated aromatic NOESY スペクトルのピーク強度の $\gamma$ 値の分布。黒線は、シミュレーションデータを作成したときに仮定した $\gamma$ 値の分布、赤はベイズ法が予測した分布を示し、緑の矢印は従来法のCYANAが推定した値を示す。



ステップサイズが扱えることでエネルギー最小構造に速やかに到達できる2面角系MD (TAMD)を採用している。力場関数には、MDプログラムAmber<sup>[28]</sup>のCartesian力場のものを2面角系に最適化した分子力場を使用し、水モデルには一般化ボルン(GB)モデル<sup>[27]</sup>を採用した。こうして、正確な分子力場と水モデルは、より尤もらしい事前確率分布を生成するため、データが不足する際にはこれを補うことができる。また、TAMDを採用することによって最適構造により短時間で到達できる。

ここでは本手法の性能を、ユビキチン(Ub, PDB ID: 1D3Z)の立体構造から人工的に作成したNOEピークリストで検証した。比較のために、我々が従来法として利用しているCYANA-OPALp構造精密化計算<sup>[29]</sup>も同様に実行した。任意の $\gamma$ 値と $\sigma$ 値を仮定し、Ub構造からシミュレーションデータの<sup>13</sup>C-separated、<sup>15</sup>N-separated、<sup>13</sup>C aromatic-separated NOESYスペクトルのピークリストを作成した。ピーク強度には様々な物理因子や実験ノイズが含まれていると仮定し、ピーク強度に標準偏差 $\sigma$ の正規分布によって与えられるランダムノイズを加えている。具体的には、3種類のNOEピークの強度の統計値が、それぞれ $22.87 \pm 2.29$ 、 $16.46 \pm 3.75$ 、および $18.14 \pm 4.67$ になるように設定した。ここでは、CYBAYによる計算で、これらの設定値を正確に予測し、正しい立体構造を得ることができるかを検証する。図1は、従来法と本手法の2つの方法で推定されたNOEスペクトルの補正定数 $\gamma$ の分布と、タンパク質の立体構造を示す。ベイズ計算は、従来のsimulated annealing法による構造サンプリングとは異なり、広い関数空間をより効率的にサンプリングするためにレプリカ交換モンテカルロ法(REXMC)によるサンプリングを採用している。図1b, cから、ベイズ推定により3種類すべてのスペクトルにおいて個々のパラメータをかなり正確に予測できていることが分かる。従来法のCYANA計算では、 $\gamma$ の値は一意的スカラーとして表されるため、 $\sigma$ は計算されない。先に述べたように、CYANAではピークリスト中の強度の中央値を $4.0 \text{ \AA}$ と仮定して $\gamma$ 値を決定する。CYANAによって推定された $\gamma$ 値もかなり単純な仮定にもかかわらず良い一致を示しているが(図1c、緑の矢印)、CYBAYによる計算では事前に設定したピーク強度の元の分布をほぼ完全に再現できている。また従来法では、初期値の異なる複数の構造を生成し(多くの場合100構造)、その中から目的関数値の低い上位10もしくは20構造を選び出しこれを最終構造とするのに対し、ベイズ推定ではREXMCにより広い関数空間サンプリングすることができ、これにより生成された事後確率分布が最終的な構造アンサンブルとなる。図1aにREXMCにおける最低温度のレプリカから得られた構造のうち20%をランダムに選択し表示した。構造はよく収束しており、従来の立体構造計算では、参照構造に対する主鎖・側鎖のRMSD値が1.94および $2.13 \text{ \AA}$ だったのに対し、CYBAYによる計算ではRMSD値がそれぞれ $0.72 \text{ \AA}$ と $1.05 \text{ \AA}$ と、元の構造にかなり近い構造が得られている。これは、ベイズ推定のアプローチが、データが不足する、または不完全なピーク強度を持つデータセットに対しても堅牢であり、従来法よりも高精度の立体構造決定が可能であることを示している。

## 5. PRE、PCS、RDC由来の遠距離情報と、

### 複数コンフォメーションを仮定したアンサンブル構造決定

高分子量タンパク質の立体構造決定では、NOEと化学シフトから得られる近距離情報の組み合わせのみでは、正確な全体構造を得ることは難しくなる。近年は、磁場配向材料を用いたresidual dipolar coupling (RDC)、常磁性効果を利用したparamagnetic relaxation enhancement (PRE)、pseudocontact shift (PCS)といった遠距離情報と併用することが一般的になりつつある。すでに述べたように、CYANAには、常磁性データを効率的に解析するモジュールが組み込まれており、これらのデータを取り込んだ立体計算は比較的容易に行うことができる。常磁性効果のタンパク質解析への応用については、本会誌においても理化学研究所の八木宏昌博士の基礎講座<sup>[30]</sup>で原理を含めた詳細が記載されており、詳しくはそれらを参考にさせていただきたい。ここでは、上記の遠距離情報を立体構造計算という観点で、従来法よりも効率的にデータを利用しているユニークな計算手法をいくつか紹介したい。

NMR立体構造解析は、長い間可能な限り収束した構造、すなわちランダムな初期値から複数の構造を生成した際に、常に同一の局所構造に纏まる条件を模索してきた。もしタンパク質が内部運動を持たない剛体と仮定できるのであれば、収束した構造はデータの質と量を担保していることと同義となるため、構造決定の精度の指標とできた。しかしながら、タンパク質などの生体高分子の多くは、実際に

は大きく揺らいでおり、その揺らぎが分子機能に関与していることが多い。したがって、過度に収束した構造を得ることは、むしろ自由な内部運動を持つ分子の溶液状態と矛盾するという懸念が常に残されていた。NMRデータは、溶液中の分子のアンサンブル構造を観測しているはずであることから、過度に収束した構造は、データに含まれる揺らぎの情報をあえて捨てていたのかもしれない。溶液NMRの強みである溶液中での分子の自然な状態を観測しようとするのであれば、データに含まれる揺らぎ・内部運動の情報を忠実に再構成した立体構造決定が望ましい。また、X線結晶構造解析などにより蛋白質複合体と単体構造とで大きな構造の違いが観測された場合、その生成過程機構を理解することも分子の立体構造と機能の関連を知る手掛かりとなる。例えば、生体高分子の構造変化過程は、*induced fit*と*conformational selection*という大きく2つのモデルが提案されている<sup>[2]</sup>。*Induced fit*は、相互作用による分子の立体構造変化は相手分子が結合した後に起こるとするモデルであり、*conformational selection*は、単体構造のアンサンブルに事前に内在していた少数構造が、相互作用相手の分子との結合により大多数の構造として露わになるというモデルである。多くの場合、この2つの機構は、どちらか一方の過程のみというよりは、両方が同時に起こっていると考えられている。こうした機構を詳細に理解するためには、まず少数構造を検出できる技術が必要となる。こうした溶液中の複数構造をアンサンブルとしてとらえようとする決構造決定法を、ここではアンサンブル構造解析と呼ぶこととする。アンサンブル構造解析は、特にMarius Cloreや岩原淳二博士らによって主にPREを用いた手法が提案されている。彼らのいくつかの報告のうち、マルトース結合タンパク質 (MBP)<sup>[31]</sup>とカルモジュリン (CaM)<sup>[32]</sup>の例について紹介する。

MBPは、N末端 (NTD) とC末端ドメイン (CTD) の2つのドメインで構成され、これらは、*apo*型 (*open*) とマルトトリオースと結合した*holo*型 (*close*) で異なる相対配置をそれぞれ持っていることがX線結晶構造解析により明らかになっている (図2a)。RDCやX線小角散乱 (SAXS) のデータから、*holo*型 MBPは、結晶構造と同一の単一構造であることが示されている。*apo*型と*holo*型それぞれでドメイン間のPREを観測すると、*holo*型のドメイン配向は結晶構造とよく一致するが、*apo*型はデータと矛盾があり、溶液構造と結晶構造とでドメイン配向が異なることが示唆された。従来法の立体構造計算を用いるとPREデータだけを満たす単一構造を得ることはできるが、この構造はRDCデータとは矛盾するた

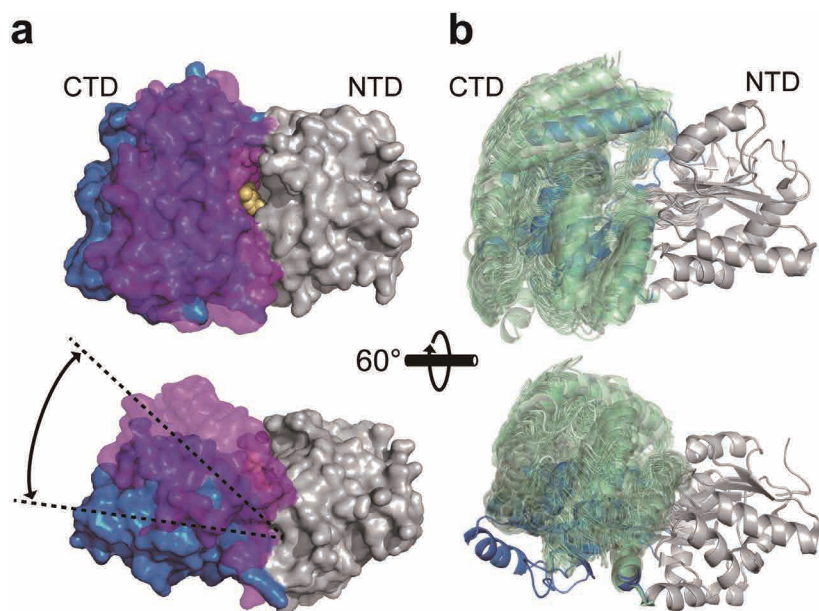


図2 MBPの立体構造。(a) *apo*型 (PDB 1OMP) と*holo*型 (PDB 3MBP) MBPを重ね合わせたタンパク質表面図。NTDドメインは灰色で、CTDドメインは赤半透明 (*holo*型) と青 (*apo*型) で描画している。*holo*型は、マルトトリオース (黄色、球体モデル) が結合したことにより、*close*構造となっている。下図は、分子を60°回転して描画した構造であり、CTDドメインのNTDに対する配向が変化していることが分かる。(b) アンサンブル構造決定により得られた50個の代表構造 (PDB 2V93) と*apo*型結晶構造。*apo*型溶液アンサンブル構造を緑半透明で、*apo*型結晶構造を青で表示している。

め (RDCのR因子は14%から24%に増加した)、一意に構造を決定する従来法は最適な解析法でないことが分かる。そこで、著者たちはXplor-NIHに新たに実装したアンサンブル構造計算法をMBPの立体構造解析に適用した (図2b)。残差を計算するためのPREの推定値は、ドメイン間が開いたopen構造 (結晶構造と同一構造) とマイナー構造とで異なる重みで平均化した値を計算する。計算の結果、存在確率約5%のマイナー構造を持つモデルがPREの実験値と良く一致した。得られたapo型MBPのマイナー構造は、open構造と比較してヒンジ部分が約33°回転した部分的に閉じたドメイン配向を持っていた (図2b)。PREデータには、apo型MBPのopen構造と部分的に閉じた構造間の動的平衡の情報が含まれていることが分かる。2つの状態間の交換時間スケールの下限值は、異核種  $\{^1\text{H}\} -^{15}\text{N}$  NOE計測から20ns程度、緩和分散法から20  $\mu\text{s}$ 程度と見積もられていた。MBPのマイナー構造は、マルトトリオースが結合したことによって閉じたholo型と類似しているが完全には一致していない。これは、マイナー状態として存在する部分的に閉じた状態の構造が、マルトトリオースが近づいた際にholo型へ速やかに遷移可能な状態になっていると著者たちは推測している。holo型の構造は、完全に閉じた構造となっているため、マルトトリオースがMBPの結合領域に近づける空間領域はない。一方で、apo型においてholo型に近い構造でかつ、マルトトリオースが結合領域に近づける遷移状態を持つことで、マルトトリオースとの相互作用と、スムーズな構造変化を同時に達成していると結論づけている。このことは、MBPの構造変化機構は、conformational selectionとinduced fitが同時に起こることで、より効率的な機構になっているのだらうと筆者らは述べている。

Cloreらは同一の手法を、カルモジュリンタンパク質 (CaM) にも適用している<sup>[32]</sup>。MBPと同様に、CaMはN- (NTD) およびC- (CTD) 末端ドメインで構成され、2つのドメインは短い柔軟なリンカーで結合している。結合ペプチドが存在しない場合、カルシウム結合型CaM (CaM-4Ca<sup>2+</sup>) は、2つのドメインが互いに独立に運動し、open構造を示している (図3a, b)。CaM-4Ca<sup>2+</sup>にペプチドが結合すると、NTDとCTDがペプチド周りに固定され、堅固でコンパクトなclose構造となる (図3c)。PDBに登録されているCaM-4Ca<sup>2+</sup>の立体構造を調べると、すべての結晶構造は、 $\alpha$ ヘリックスからなるリンカー領域により、ドメイン間距離が約40Å離れたダンベル型構造 (図3a, bと同様な構造) になっている。一方で、蛍光やSAXS測定からは2つのドメイン間はよりコンパクトな構造になっていることが示唆されており、NMR緩和解析およびRDC, PCSデータからはリンカーの中心残基 (77~81) のダイナミクスはかなり大きな運動を持っていることが分かっていた。しかしながら、NTDとCTDの直接的な接触を示すドメイン間NOEは観測されないことから、溶液中ではclose構造とopen構造が一定の時間スケールで平衡状態になっていると推定されていた。そこで、著者たちはPREと複数状態を仮定したアンサンブル構造解析を利用してCaM-4Ca<sup>2+</sup>の存在確率分布を可視化することを試みている。計算の結果、伸びた状態の構造が約90%、縮まった状態の構造が10%となるアンサンブル構造が得られた。10%の縮まった構造は、ペプチドが結合した際のclose構造とは完全に一致していなかったが、その半分の5%はペプチド結合型close構造とかなり類似した構造をとっていた。こうしてPREの解析から、ペプチドが結合していないCaM-4Ca<sup>2+</sup>においても、close型に近い縮まった構造を有することで、ペプチドとの効率的な結合とその後の構造変化を促進していると推定された。CaMのリンカーは生物種で高度に保存されておりその長さは常に一定であることが分かっている。Cloreらは、別の論文で、PRE測定から、過渡的なドメイン間相互作用は、野生型から1アミノ酸伸ばしたリンカーを人工的に作成した際に、最大になり、それよ

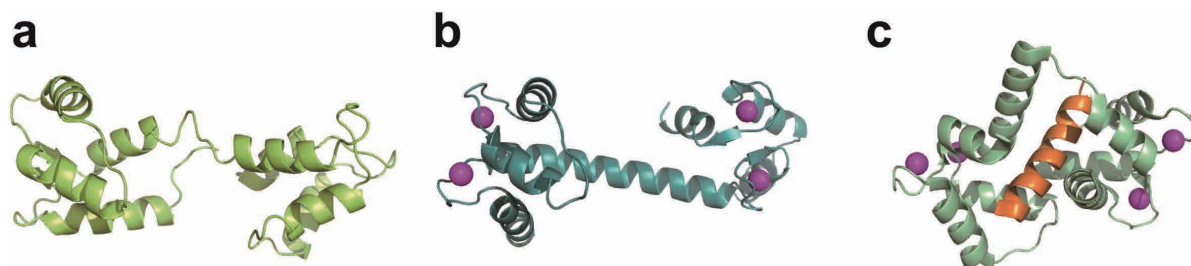


図3 CaMの立体構造。(a) Ca<sup>2+</sup>-free CaM (PDB 1CFD)。(b) CaM-4Ca<sup>2+</sup> (PDB 1CLL)。(c) CaM-4Ca<sup>2+</sup>-MLCKペプチド複合体 (PDB 1CDL)。Ca<sup>2+</sup>を紫で、MLCKをオレンジで表示している。

り長いまたは短い長さに対しては減少することを示している<sup>[33]</sup>。こうした結果は、CaMの機能を発揮するために、リンカー構造はかなり最適化されていると筆者らは考察している。

以上、MBPとCaMの2つのドメイン間の平衡構造の解析は、X線結晶構造解析によるopen型とclose型の2つの立体構造情報だけでは、大きな構造変化を伴う相互作用認識機構を十分理解することは難しいということを示唆している。PREやRDCのような遠距離情報とアンサンブル構造解析は、タンパク質の構造と機能の関係に新しい知見をもたらしている。

## 6. PRE、PCS、RDC等の遠距離情報を利用した天然変性タンパク質 (IDP) の構造解析

よく知られているようにIDPは、単独状態では特定の折り畳み構造を持たないが、他の分子と特異的に相互作用した際に、特定の立体構造に折り畳まれ、固有の機能を発現していると考えられている。一方で、単独状態のIDPの構造も全く規則性がないのではなく、空間内で特定の存在確率からなるアンサンブル構造をとっていると考えられている。この存在確率分布を可視化することは、IDPの分子認識機構を詳細に理解し、未知の機能を推定するために欠かせない情報になると考えられている。しかしながらこれまで、かなり広い構造空間で揺らぐIDPのアンサンブル構造を決定することは困難であった。複数のグループは、こうしたIDPの構造解析手法として、あらかじめ膨大な数の立体構造を集めた構造プールを作成し、その中から実験データに合う構造の組み合わせを選ぶことで、IDPのアンサンブル構造の可視化を試みている(図4)。現在までにIDPの代表構造アンサンブルを再構成する最適化計算手法は複数提案されている。主なプログラムとして、ENSEMBLE<sup>[34]</sup>、ASTEROIDS<sup>[35]</sup>、EOM<sup>[36,37]</sup>、MES<sup>[38]</sup>、SES<sup>[39]</sup>などがあり、最適化のアルゴリズムには、ENSEMBLEはモンテカルロシミュレーションでアニーリング(MC-SA)法を、ASTEROIDS、EOM、MESは遺伝的アルゴリズム(GA)法、SESは直交マッチング追跡(MP)法を採用している。いずれの手法も、最初に何らかの計算手段で様々なコンフォメーションを含む構造群のプールを作成し、そこからランダムに複数構造を選択するというアプローチをとっている。選択された複数構造から予想される平均のPREやRDC値が実験値と近い値となれば、溶液中でのIDPの立体構造分布を反映した構造群を得られたと仮定することができる。この手法の成功の鍵は、初めに用意する構造集団のプールに、タンパク質の立体構造空間を大まかに網羅できる十分な数の構造を用意できるか?という点と、そこから実験値をうまく再現する最適な数と種類の構造群を選び出すことができるか?という問題を、効率よく計算できるアルゴリズムの開発にある。選び出す構造の数は、初めの段階では不明なため、少ない数から徐々に構造数を増やしながら実験値との一致度を検証する。例えば、最近提案されたMPGA法では、構造プールからのサンプリングにMP法とGA法を組み合わせたアルゴリズムを用いることで、より効率的な構造サンプリングが可能であるとしている<sup>[40]</sup>。このアルゴリズムを機械的刺激の感知(メカノセンシング)に関わるIDPタンパク質p130CasDの構造アンサンブル解析に適用している。p130CasDは細胞外マトリックス-細胞間の接着装置である接着斑のメカノセンサーである。細胞に外力が加わることで接着斑に存在するp130Casが伸張すると、p130CasD中のYXXPモチーフにあるチロシン残基(Tyr)がリン酸化され、細胞内シグナル伝達の下

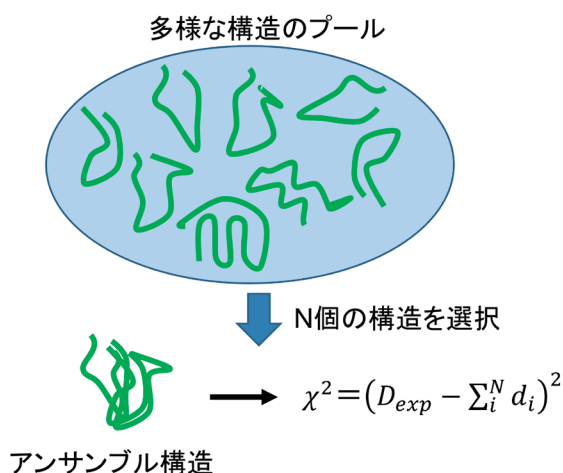


図4 IDPアンサンブル構造解析の模式図。初めに、可能な限り分子構造空間を網羅していると推定される構造群の初期プールを作成する。プールからN個の構造を選び出し、N個の構造から逆計算される推定値の平均と、計測値( $D_{\text{exp}}$ )を比較することで、最適な構造の組み合わせを選び出す。

流に情報が伝わる。計算では、MPGAを使ったp130CasSDのアンサンブル構造の決定から、外力が加わっていないときのN末端領域(1-60)は、比較的収縮した構造を取っているのに対し、C末端領域(240-306)は伸びた構造を取っていることが分かった。このことは、外力が加わらない際には、リン酸化キナーゼタンパク質SrcがN末端領域のリン酸化部位にアクセスできず、リン酸化が阻害されているが、外力が加わることでこの領域が伸張され、リン酸化部位が露出するためにSrcがこの領域をリン酸化可能になるという機構の存在を示唆している。このようにアンサンブル構造解析は、他の手法では構造解析が難しいIDPの構造の分布をモデル化し、構造ベースの機能解析のツールとして有効であるということを示している。

## 7. Solvent PRE

ここでは、今後のタンパク質構造解析において有効性が期待されている solvent PRE (sPRE) について取り上げる。常磁性データを観測するためには、不対電子をもつイオンや原子が必要である。一方で多くの場合、解析対象とするタンパク質は常磁性金属の結合能を持たないため、PRE測定には常磁性金属結合タグをタンパク質表面に付加する必要がある。しかしながら、目的の位置に常磁性タグを結合するためには、部位特異的にタンパク質に新たなシステイン残基(Cys)、もしくは非天然アミノ酸を導入する必要がある。また、天然のタンパク質表面にすでにCysが複数存在する場合、タグの結合部位を一か所に限定するために、それらを別のアミノ酸に置換する必要がある。こうしたアミノ酸変異は、蛋白質構造の不安定化もしくは全体構造を大きく歪める可能性を否定できず、自然な状態のタンパク質を観測するという観点で問題となる。また、高分子量タンパク質では、構造解析に必要な十分な構造情報の取得のために複数の変異タンパク質を作成しなければならない点も、より広い生命科学分野への技術普及の妨げとなっている。そこで、常磁性タグをタンパク質に共有結合せずに、単純に溶媒中に混ぜるだけでPREを観測する試みが注目を集めている。この手法は、solvent PRE (sPRE) と呼ばれる。sPREを利用した立体構造解析は、球状タンパク質に限らず、IDP<sup>[41]</sup>、膜タンパク質<sup>[42]</sup>、タンパク質複合体<sup>[43, 44]</sup>の研究に応用されている。sPREを利用した構造解析は、近年はChun Tangらによって特に精力的に研究が進められており、sPREに適したプローブの開発も進んでいる。これまでのsPRE測定では、MRI造影剤としても知られているGd<sup>3+</sup>-DTPA-BMAがプローブとして用いられてきた(図5a)。しかしながら、このプローブは配位結合部位を8カ所しか持たずGd<sup>3+</sup>の結合電子の一部がキレートタグに配位していないため、この位置に水分子が配位してしまう。これにより、この水分子が強く緩和され、この緩和された水分子の<sup>1</sup>Hが蛋白質主鎖の<sup>1</sup>H<sup>N</sup>と交換すると、理論値と比較して極端に強いsPRE値となってしまふと報告している。一方で、Tangらが開発したTTHA-TMA Gd<sup>3+</sup>プローブは10箇所の配位部位があるため、水分子がGd<sup>3+</sup>と配位する余地がなく、水分子の水素と直接的なPREが起きないため、理論値とかなり近い値のPREを得られると述べている(図5b)<sup>[45]</sup>。これにより、sPRE値から各原子のタンパク質内部への埋もれ度を正確に見積もることができるため、この情報をタンパク質構造決定の拘束条件として利用することができる。sPREの理論値は、Solomon-Bloembergen-Morgan方程式を体積積分することによ

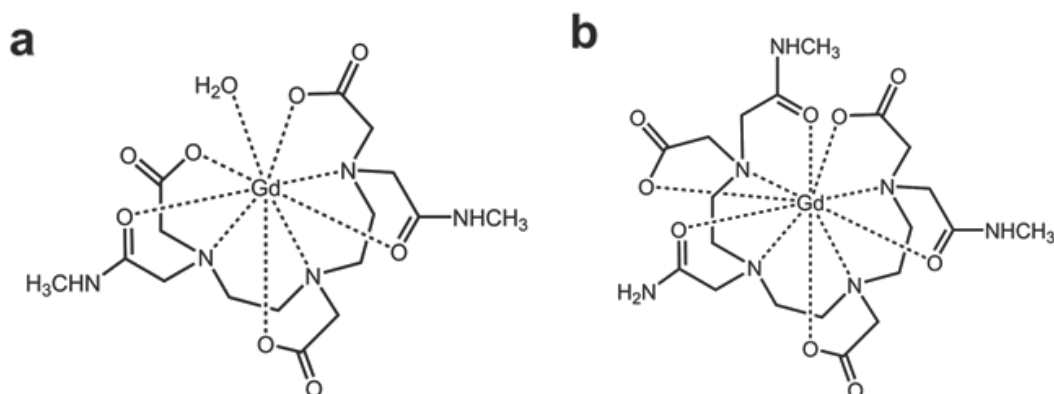


図5 (a) Gd<sup>3+</sup>-DTPA-BMA プローブの化学構造。(b) TTHA-TMA Gd<sup>3+</sup> プローブの化学構造。DTPA-BMA では、Gd<sup>3+</sup> の1箇所に水分子が配位している。

り求めることができ、著者たちは、計算の簡略化のために、格子点間に一定の間隔を置いてタンパク質構造の周りに立方格子を構築する離散的な格子モデルを用いている。タンパク質中のsPRE効果は以下のように定義される。

$$\Gamma_2 = \sum_n k \cdot r^{-6} \quad (16)$$

ここで、 $r$ は任意のスピンと格子点との距離、 $k$ は常磁性溶媒の濃度、温度、溶媒粘度などの不確定要因を校正する補正定数である。Xplor-NIHでは(16)式をタンパク質表面上の常磁性プローブの寄与のみ考慮した、より単純なモデル式として目的関数に組み込んでいる。タンパク質表面を三角形パッチにより表現したモデルで記述すると、以下ようになる。

$$\Gamma_2 = -\frac{k'}{9} \sum_i \frac{a_i \mathbf{n}_i \cdot \mathbf{r}_i}{|\mathbf{r}_i|^6} \quad (17)$$

ここで、 $k'$ は補正定数、 $a_i$ は*i*番目の三角形パッチの面積、 $\mathbf{n}_i$ はタンパク質表面の法線ベクトル、 $\mathbf{r}_i$ は対象となるスピンと*i*番目の三角形パッチを結ぶベクトルを表す。タンパク質表面近傍に存在する常磁性プローブがsPREに最も寄与するということを考慮すれば、この近似でも十分うまく実験値を再現できるとしている。Xplor-NIHには上記関数が組み込まれた構造サンプリングモジュールPSolPotが実装されており、sPRE値由来の拘束条件を満たす立体構造を得ることができる。筆者らは、テストケースとして、sPRE関数項を導入したGB1の立体構造計算を行った<sup>[46]</sup>。TALOS+<sup>[47]</sup>により得られた2面角拘束と、Xplor-NIHに実装されている知識ベースの拘束条件<sup>[48]</sup>、およびsPREの拘束を評価関数として構造計算を行ったところ、解となる参照構造に対するタンパク質主鎖原子のRMSD値は、1.67Åであり、sPREがかなり有効に働くことを示している。この例は小さな球状タンパク質GB1(56アミノ酸)のデータに対して行ったものであり、より高分子量のタンパク質の解析には、おそらくsPREのみのデータでの立体構造決定は難しいであろう。それでも、アミノ酸変異を入れることなく、溶液に常磁性プローブ

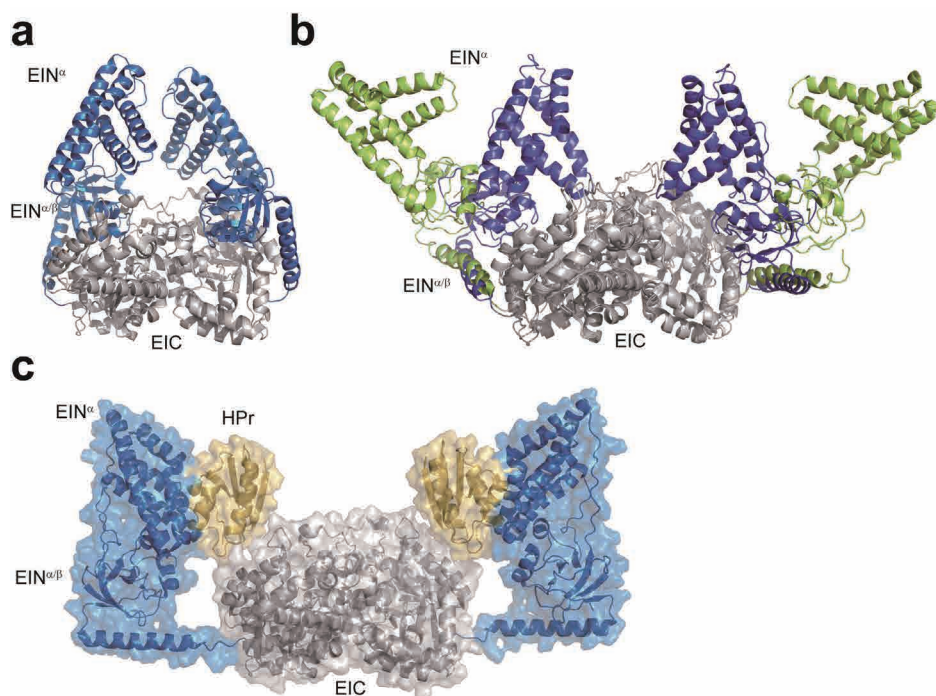


図6 Enzyme I (EI) の立体構造。(a) 大腸菌由来のリン酸化EI 蛋白質の立体構造 (PDB 2HWD)。EIN ドメインは青で表示している。(b) 黄色ブドウ球菌由来のEI 蛋白質の立体構造。リン酸化EI 中間体 (EIN ドメイン：緑) とフリー型EI (EIN ドメイン：紫) をEIC ドメイン (灰色) を基準に重ね合わせている。(c) SASとRDCのハイブリッド立体構造計算により得られたEI-HPr複合体の構造。EIC ドメイン (灰色) に合わせて構造を比較すると、EIN ドメインの配向位置が、それぞれの構造 (a, b, c) で大きく異なっていることが分かる。

を混ぜるだけで測定できるというのは魅力的であり、他の実験データと組み合わせることで、今後は立体構造決定の有力な手法となると予想している。

## 8. 小角散乱データと NMR データを利用したハイブリッド立体構造計算

NOEや化学シフトを利用する従来のNMR構造決定は、近距離情報を集めてグローバル構造を決定するため、データの不足やノイズの影響が大きい場合、得られた最終構造が十分正確であるか評価することは簡単ではない。これは、特に、重水素化を必要とする高分子量タンパク質の解析において、<sup>1</sup>H核の数の減少により距離情報が著しく不足する場合に顕著となる。RDC、PRE、およびPCSなどの長距離情報を用いればこの問題をある程度回避できるが、100kDaを超える分子の解析では、メチル基選択標識試料を用いる必要があり、この場合タンパク質中の部分構造の情報に限定され、全体構造を得ることはできない。こうした問題を解決するため、いくつかのグループは、NMRデータをX線小角散乱(SAXS)や中性子散乱(SANS)のデータと組み合わせることにより、NMRデータからの部分構造と小角散乱(SAS)からの全体構造を取得し、より信頼度の高い構造決定を行うハイブリッドNMR構造決定を開発している<sup>[49, 50 ~ 51]</sup>。

溶液中での回転拡散運動が等方性の分子では、X線または中性子ビームに対する分子のすべての方向で平均散乱強度が観察される。散乱強度は一般的にデバイ方程式で表される。

$$I(q) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f_i(q) f_j(q) \frac{\sin(qr_{ij})}{qr_{ij}} \quad (18)$$

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$$

ここで、 $\lambda$ はビームの波長、 $2\theta$ は散乱角、 $r_i$ は原子 $i$ の原子座標、 $N$ はシステム内の原子数、 $f_i$ は原子構造因子を示し、SASデータのターゲット関数は、 $\chi^2$ 検定の表記で記述する。

$$\chi^2 = \frac{1}{N_d - 1} \sum_{k=1}^{N_d} \left[ \frac{I_{\text{exp}}(q_k) - c_k I_{\text{pred}}(q_k)}{\sigma(q_k)} \right]^2 \quad (19)$$

ここで、 $N_d$ はデータポイントの数、 $\sigma$ はデータの標準偏差、 $I_{\text{exp}}$ は散乱強度の実測値、 $I_{\text{pred}}$ は立体構造から推定される散乱強度、 $c_k$ はスケール係数である。原子構造因子 $f_i$ は、任意の原子核にある電子分布のフーリエ変換を示す。原子構造因子は計算の簡素化のために、一般的にスカラーとして定義される、もしくは溶媒補正モデルで記述される。

$$f_i(q) = f_{v,i}(q) - f_{s,i}(q) \quad (20)$$

ここで、 $f_{v,i}$ および $f_{s,i}$ は、それぞれ真空および溶媒中の原子構造因子を示し、以下のように記述される。

$$f_{v,i}(q) = \sum_{i=1}^4 a_i \exp(-b_i(q/4\pi)^2) + c$$

$$f_{s,i}(q) = \rho V \exp(-q^2 V^{2/3} / 4\pi)$$

ここで、 $a_i$ 、 $b_i$ 、 $c$ は特定の原子のCromer-Mann係数、 $V$ は溶媒体積を表す。ここでの立体構造計算の中では、(19)式とNMRデータ由来の構造情報を拘束条件としてMD法により最適構造を探索する。これにより、例えばマルチドメインタンパク質の構造解析において、NMRデータからは各ドメイン内のローカル構造情報を取得し、SASデータよりドメイン間の相対配置を決定する、という構造解析が可能となる。

Marius Cloreらは、最近このハイブリッド立体構造計算をNMR構造解析においては、かなりの高分子タンパク質であるEnzyme I (EI)の解析に適用した<sup>[52]</sup>。EIは、2つのドメイン(EINとEIC)で構成される約128kDaのダイマーであり、ヒスチジン含有リン酸転移タンパク質(HPr)との複合体では、その分子量は約146kDaにもなる。EINドメインはさらに2つのサブドメイン $\alpha$ と $\beta$ に分かれている(図6a)。

$EIN^{\alpha/\beta}$  はリン酸転移の触媒部位を含み、 $EIN^{\alpha}$  はHPrと相互作用する。異なる生物種由来の3つのEIの結晶構造を比較すると、EICドメインはほぼ同一であったが、 $EIN^{\alpha/\beta}$ サブドメインに対する $EIN^{\alpha}$ の相対的なドメイン配向が大きく異なっていた(図6a, b)。この違いの原因を明らかにするため、著者たちは、RDC、X線小角・広角散乱(SAXS・WAXS)、および中性子小角散乱(SANS)を使用して、溶液中のドメイン配向構造を解析した。構造計算の初期構造として、リン酸化された全長EIタンパク質の結晶構造(PDBID:2HWG)と、溶液NMRにより決定されたEIN-HPr複合体中のEINドメイン(PDBID:3EZA)を用いた。EINおよびEICドメインの内部構造は剛体として固定し、ドメイン間のリンカー領域のみに自由度を与えて、RDCおよびSASデータから得られた拘束条件とともにsimulated annealing(SA)法により最適構造を探索した。得られた構造は、3つの結晶構造のいずれとも一致せず、観測された散乱データと、結晶構造から逆計算された推定散乱データの間の残差はかなり大きかった(図6b)。これらの結果から、著者たちは、結晶構造中の $EIN^{\alpha}$ と $EIN^{\alpha/\beta}$ の間のドメイン配向はcrystal packingによるアーティファクトにより、溶液中とは大きく異なった構造であったと結論づけている。このことは、マルチドメインタンパク質のドメイン間の相対配置の解析には、X線結晶構造解析だけでなく、NMRとX線・中性子散乱を活用したハイブリッド法が非常に有効であることを示している。NMRデータと小角散乱とのハイブリッド法は、Xplor-NIHに実装されており、一般ユーザも利用可能であることから、今後の他の応用研究への広がり期待できる。

## 10. おわりに

本稿では、主に溶液NMRにおける立体構造計算とデータ解析法について、特に計算アルゴリズムに焦点を当てて基礎と最近の進歩について解説した。最新の溶液NMR立体構造解析は、標準的なX線結晶構造解析のような手法では捕らえることのできなかつた大きな分子運動を含む構造アンサンブルを再構成し、可視化することに成功している。こうした構造情報は、生体高分子の機能をより深く理解する上で極めて有益な知見となるはずである。特に、運動性が大きくNMR以外では原子分解能での解析が難しい生体高分子(IDP、マルチドメインタンパク質、RNAなど)の解析において、その特徴を大いに生かすことができるだろう。こうした大きな運動性を伴った生体分子は、実は生命活動の要となる重要因子であることも多い。したがって、ここで挙げたNMR構造計算法やデータ解析技術を活用することで関連分野の研究が進めば、NMRの構造生命科学への貢献はむしろこれから一層高まっていくと期待している。一方で、NMRによる生体分子解析の別の問題点は、データ処理が煩雑で時間のかかりすぎる点にある。X線結晶構造解析やcryo-EMがこれだけ大きな広がりを見せている理由の一つは、自動化技術の進展による寄与も大きいと思う。計算手法の進展という観点において、自動化技術は生体系NMR計測の全般に渡って、上記2つの分析法に比べて大きく遅れているのが現状であろう。複雑な分子を効率よく解析し、研究の速度を加速させることが求められる現在において、NMR解析の自動化という観点の研究はさらに重要になってくるだろう。今回紹介できなかったが、自動帰属プログラム<sup>[12, 53]</sup>や機械学習を利用した自動ピーク識別プログラム<sup>[54~55]</sup>も改良が加えられ、着実に自動化の精度も向上している。近年の計算機性能やデータ駆動科学の驚くべき進歩を考慮すれば、NMRによる構造解析も近い将来にかなりの部分が自動化されていくことを期待したい。本稿で紹介したようなNMRが持つ固有の情報を効率よく引き出す解析法の進展と、自動化による研究速度の加速によって、NMRは生命科学分野の研究に一層広く活用される技術に発展すると信じている。

## 11. 謝 辞

本稿を執筆するにあたり、首都大学東京理学研究科の伊藤隆教授から有益な助言をいただいた。この場をお借りして感謝いたします。

### 参考文献

- [1] Williamson, M. P., Havel, T. F., Wüthrich, K., Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by 1H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.* 1985, 182 (2), 295-315.
- [2] Clore, G. M., Interplay between conformational selection and induced fit in multidomain protein-



- ligand binding probed by paramagnetic relaxation enhancement. *Biophys. Chem.* 2014, 186, 3-12.
- [3] Ikeya, T., Ban, D., Lee, D., Ito, Y., Kato, K., Griesinger, C., Solution NMR views of dynamical ordering of biomacromolecules. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2018, 1862 (2), 287-306.
- [4] Sakakibara, D., Sasaki, A., Ikeya, T., Hamatsu, J., Hanashima, T., Mishima, M., Yoshimasu, M., Hayashi, N., Mikawa, T., Wälchli, M., Smith, B. O., Shirakawa, M., Güntert, P., Ito, Y., Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy. *Nature* 2009, 458 (7234), 102-105.
- [5] Ikeya, T., Hanashima, T., Hosoya, S., Shimazaki, M., Ikeda, S., Mishima, M., Güntert, P., Ito, Y., Improved in-cell structure determination of proteins at near-physiological concentration. *Sci. Rep.* 2016, 6, 38312.
- [6] Theillet, F. X., Binolfi, A., Bekei, B., Martorana, A., Rose, H. M., Stuiver, M., Verzini, S., Lorenz, D., van Rossum, M., Goldfarb, D., Selenko, P., Structural disorder of monomeric alpha-synuclein persists in mammalian cells. *Nature* 2016, 530 (7588), 45-50.
- [7] Tanaka, T., Ikeya, T., Kamoshida, H., Suemoto, Y., Mishima, M., Shirakawa, M., Güntert, P., Ito, Y., High Resolution Protein 3D Structure Determination in Living Eukaryotic Cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2019, 58 (22), 7284-7288.
- [8] Güntert, P., Mumenthaler, C., Wüthrich, K., Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* 1997, 273 (1), 283-298.
- [9] Güntert, P., Automated NMR protein structure calculation. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* 2003, 43 (3-4), 105-125.
- [10] Rieping, W., Habeck, M., Bardiaux, B., Bernard, A., Malliavin, T. E., Nilges, M., ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics* 2007, 23 (3), 381-382.
- [11] Schwieters, C. D., Kuszewski, J. J., Tjandra, N., Clore G. M., The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J. Magn. Reson.* 2003, 160 (1), 65-73.
- [12] Schmidt, E., Güntert, P., A new algorithm for reliable and general NMR resonance assignment. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134 (30), 12817-12829.
- [13] Herrmann, T., Güntert, P., Wüthrich, K., Protein NMR Structure Determination with Automated NOE Assignment Using the New Software CANDID and the Torsion Angle Dynamics Algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* 2002, 319 (1), 209-227.
- [14] Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W., Nilges, M., Correction of spin diffusion during iterative automated NOE assignment. *J. Magn. Reson.* 2004, 167 (2), 334-342.
- [15] Vögeli, B., Segawa, T. F., Leitz, D., Sobol, A., Choutko, A., Trzesniak, D., van Gunsteren, W., Riek, R., Exact distances and internal dynamics of perdeuterated ubiquitin from NOE buildups. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131 (47), 17215-17225.
- [16] Vögeli, B., Kazemi, S., Güntert, P., Riek, R., Spatial elucidation of motion in proteins by ensemble-based structure calculation using exact NOEs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012, 19 (10), 1053-1057.
- [17] Vögeli, B., Orts, J., Strotz, D., Chi, C., Mingos, M., Wälti, M. A., Güntert, P., Riek, R., Towards a true protein movie: a perspective on the potential impact of the ensemble-based structure determination using exact NOEs. *J. Magn. Reson.* 2014, 241, 53-59.
- [18] Nichols, P. J., Born, A., Henen, M. A., Strotz, D., Orts, J., Olsson, S., Güntert, P., Chi, C. N., Vögeli, B., The Exact Nuclear Overhauser Enhancement: Recent Advances. *Molecules* 2017, 22 (7), 1176.
- [19] Rieping, W., Habeck, M., Nilges, M., Inferential structure determination. *Science* 2005, 309 (5732), 303-306.
- [20] Habeck, M., Nilges, M., Rieping, W., Bayesian inference applied to macromolecular structure determination. *Phys. Rev. E* 2005, 72 (3), 031912.
- [21] Voelz, V. A., Zhou, G., Bayesian inference of conformational state populations from computational models and sparse experimental observables. *J. Comput. Chem.* 2014, 35 (30), 2215-2224.
- [22] MacCallum, J. L., Perez, A., Dill, K. A., Determining protein structures by combining semireliable data with atomistic physical models by Bayesian inference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2015, 112 (22), 6985-6990.
- [23] Shevchuk, R., Hub, J. S., Bayesian refinement of protein structures and ensembles against SAXS data using molecular dynamics. *PLoS Comput. Biol.* 2017, 13 (10), e1005800.
- [24] Ikeya, T., Ikeda, S., Kigawa, T., Ito, Y., Güntert, P., Protein NMR Structure Refinement based on Bayesian Inference. *J. Phys. Conf. Ser.* 2016, 699, 012005.
- [25] Northrup, S. H., McCammon, J. A., Simulation methods for protein structure fluctuations. *Biopolymers* 1980, 19 (5), 1001-1016.
- [26] Yamashita, H., Endo, S., Wako, H., Kidera, A., Sampling efficiency of molecular dynamics and Monte Carlo method in protein simulation. *Chem. Phys. Lett.* 2001, 342 (3-4), 382-386.
- [27] Baker, N. A., Improving implicit solvent simulations: a Poisson-centric view. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005, 15 (2), 137-143.
- [28] Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M. C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J., Kollman, P., A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* 2003, 24 (16), 1999-2012.
- [29] Koradi, R., Billeter, M., Güntert, P., Point-centered domain decomposition for parallel molecular dynamics simulation. *Comput. Phys. Commun.* 2000, 124 (2-3), 139-147.
- [30] 八木宏昌, 常磁性効果の基礎と生体高分子解析への応用. *NMR* 2017, 8, 64-70.
- [31] Tang, C., Schwieters, C. D., Clore, G. M., Open-to-closed transition in apo maltose-binding protein observed by paramagnetic NMR. *Nature* 2007, 449 (7165), 1078-1082.
- [32] Anthis, N. J., Doucleff, M., Clore, G. M., Transient, sparsely populated compact states of apo and calcium-loaded calmodulin probed by paramagnetic relaxation enhancement: interplay of conformational selection and induced fit. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133 (46), 18966-18974.
- [33] Anthis, N. J., Clore, G. M., The length of the

- calmodulin linker determines the extent of transient interdomain association and target affinity. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135 (26), 9648-9651.
- [34] Krzeminski, M., Marsh, J. A., Neale, C., Choy, W. Y., Forman-Kay, J. D., Characterization of disordered proteins with ENSEMBLE. *Bioinformatics* 2013, 29 (3), 398-399.
- [35] Salmon, L., Nodet, G., Ozenne, V., Yin, G., Jensen, M. R., Zweckstetter, M., Blackledge, M., NMR characterization of long-range order in intrinsically disordered proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 (24), 8407-8418.
- [36] Bernado, P., Mylonas, E., Petoukhov, M. V., Blackledge, M., Svergun, D. I., Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129 (17), 5656-5664.
- [37] Tria, G., Mertens, H. D., Kachala, M., Svergun, D. I., Advanced ensemble modelling of flexible macromolecules using X-ray solution scattering. *IUCr* 2015, 2 (Pt 2), 207-217.
- [38] Pelikan, M., Hura, G., Hammel, M., Structure and flexibility within proteins as identified through small angle X-ray scattering. *Gen. Physiol. Biophys.* 2009, 28 (2), 174-189.
- [39] Berlin, K., Castaneda, C. A., Schneidman-Duhovny, D., Sali, A., Nava-Tudela, A., Fushman, D., Recovering a representative conformational ensemble from underdetermined macromolecular structural data. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135 (44), 16595-16609.
- [40] Liu, W., Liu, X., Zhu, G., Lu, L., Yang, D., A Method for Determining Structure Ensemble of Large Disordered Protein: Application to a Mechanosensing Protein. *J. Am. Chem. Soc.* 2018, 140 (36), 11276-11285.
- [41] Oktaviani, N. A., Risor, M. W., Lee, Y. H., Megens, R. P., de Jong, D. H., Otten, R., Scheek, R. M., Engchild, J. J., Nielsen, N. C., Ikegami, T., Mulder, F. A., Optimized co-solute paramagnetic relaxation enhancement for the rapid NMR analysis of a highly fibrillogenic peptide. *J. Biomol. Nmr* 2015, 62 (2), 129-142.
- [42] Piai, A., Fu, Q., Dev, J., Chou, J. J., Optimal Bicelle Size q for Solution NMR Studies of the Protein Transmembrane Partition. *Chemistry* 2017, 23 (6), 1361-1367.
- [43] Madl, T., Güttler, T., Gorlich, D., Sattler, M., Structural analysis of large protein complexes using solvent paramagnetic relaxation enhancements. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2011, 50 (17), 3993-3997.
- [44] Öster, C., Kosol, S., Hartmüller, C., Lamley, J. M., Iuga, D., Oss, A., Org, M. L., Vanatalu, K., Samoson, A., Madl, T., Lewandowski, J. R., Characterization of Protein-Protein Interfaces in Large Complexes by Solid-State NMR Solvent Paramagnetic Relaxation Enhancements. *J. Am. Chem. Soc.* 2017, 139 (35), 12165-12174.
- [45] Gu, X. H., Gong, Z., Guo, D. C., Zhang, W. P., Tang, C., A decadentate Gd(III)-coordinating paramagnetic cosolvent for protein relaxation enhancement measurement. *J. Biomol. Nmr* 2014, 58 (3), 149-154.
- [46] Gong, Z., Schwieters, C. D., Tang, C., Theory and practice of using solvent paramagnetic relaxation enhancement to characterize protein conformational dynamics. *Methods* 2018, 148, 48-56.
- [47] Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., Bax, A., TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. Nmr* 2009, 44 (4), 213-223.
- [48] Bermejo, G. A., Clore, G. M., Schwieters, C. D., Smooth statistical torsion angle potential derived from a large conformational database via adaptive kernel density estimation improves the quality of NMR protein structures. *Protein Sci.* 2012, 21 (12), 1824-1836.
- [49] Grishaev, A., Wu, J., Trehwella, J., Bax, A., Refinement of multidomain protein structures by combination of solution small-angle X-ray scattering and NMR data. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127 (47), 16621-16628.
- [50] Gabel, F., Simon, B., Sattler, M., A target function for quaternary structural refinement from small angle scattering and NMR orientational restraints. *Eur. Biophys. J.* 2006, 35 (4), 313-327.
- [51] Schwieters, C. D., Suh, J. Y., Grishaev, A., Ghirlando, R., Takayama, Y., Clore, G. M., Solution structure of the 128 kDa enzyme I dimer from *Escherichia coli* and its 146 kDa complex with HPr using residual dipolar couplings and small- and wide-angle X-ray scattering. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 (37), 13026-13045.
- [52] Venditti, V., Schwieters, C. D., Grishaev, A., Clore, G. M., Dynamic equilibrium between closed and partially closed states of the bacterial Enzyme I unveiled by solution NMR and X-ray scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2015, 112 (37), 11565-11570.
- [53] Lee, W., Bahrami, A., Dashti, H. T., Eghbalian, H. R., Tonelli, M., Westler, W. M., Markley, J. L., I-PINE web server: an integrative probabilistic NMR assignment system for proteins. *J. Biomol. Nmr* 2019, 73 (5), 213-222.
- [54] 小林直宏, 生体系NMRの解析ツール (機械学習と自動化). *NMR* 2017, 8, 94-98.
- [55] Kobayashi, N., Hattori, Y., Nagata, T., Shinya, S., Güntert, P., Kojima, C., Fujiwara, T., Noise peak filtering in multi-dimensional NMR spectra using convolutional neural networks. *Bioinformatics* 2018, 34 (24), 4300-4301.



池谷 鉄兵 (いけや・てっぺい)

2003年 東京大学大学院農学生命科学研究科博士後期課程修了 博士 (農学)

2003年 産業技術総合研究所、ドイツフランクフルトゲーテ大学等で博士研究員

2010年 首都大学東京 理学研究科 助教 現在に至る

# ESRの基礎と応用

ブルカージャパン株式会社 バイオスピ事業部

原 英之

hideyuki.hara@bruker.com

## 1. はじめに

電子スピン共鳴 (ESR = Electron Spin Resonance) 法とは、ラジカル (不対電子) を持つ試料に磁場中でマイクロ波放射し、マイクロ波とラジカルの間で起こる吸収共鳴の現象を示す。この現象は強磁性体においても観測されるが、ESRの多くの対象物が常磁性体であるため電子常磁性共鳴 (EPR = Electron Paramagnetic Resonance) とも呼ばれる。ESRの最初の信号は1945年にロシアの科学者Zavoiskyによって観測された<sup>[1]</sup>。これは核磁気共鳴 (NMR = Nuclear Magnetic Resonance) 現象の発見とほぼ同時期である。

ESRでは用途によって用いるマイクロ波の周波数が異なる。最も一般的に使用されているESR分光計はマイクロ波の周波数が約9GHz (X-バンド) であり、この時の共鳴磁場は約0.35Tとなる。同じ磁気共鳴現象を利用している核磁気共鳴 (NMR) とは観測対象が異なるものの、基本的な原理は同じである。

## 2. ESR と NMR の違い

ESRとNMRの違いは電子スピンを観測するか、核スピンを観測するかの違いである。核スピンのには様々な核種があるが、最も簡単なプロトン (水素原子) について比較してみる。まず、電子スピンと核スピンはともに同じ電荷を持つが符号が異なる。電子スピンは負の電荷を、核スピンは正の電荷を持つ。しかしこの違いは分光法的には大きな意味を持たない。もう一つの違いは電子と核 (プロトン) では質量が大きく異なることである。電子の方が約2,000倍軽い。この質量比がESRとNMRのスペクトルの性質を大きく異なるものにする。まずこの違いにより電子スピンの磁気モーメントの大きさが核スピンに比べて極めて大きくなる。磁気モーメントが大きいほど感度が高くなる。実際の磁気モーメントの違いは658倍であり、これがそのままESRとNMRの感度差と

なる。

しかしながら、磁気モーメントが大きいことは緩和時間が短いことを示す。特に遷移金属などでは緩和時間が極めて短く (ms以下) なる。緩和時間は線幅、スペクトル幅に大きく影響を与えるため、金属の種類によっては数百ガウスもの線幅となることもある。これはNMRに換算すると数十万ppmに相当する。この線幅やスペクトル幅の違いが、ESRとNMRの測定法にも影響を与える。すなわちCW (Continuous Wave) 法とPulse法 (FT法) の違いである。数十万ppmの範囲に観測される信号をパルスで励起することは困難であり、また緩和時間も極めて速いため観測も困難である。NMRはパルス照射が行われるが、ESRでは現在でも主流はCW法、すなわち磁場掃引が必要となっている。得られる情報に関してもNMRでは主に構造解析の手段として用いられることが多いが、ESRでは観測されるラジカルは反応過程で観測されることが多いため、反応解析に用いられることが多い。まれに構造解析として用いられることもあるものの、あくまで観測ラジカル周辺の構造解析に限られる。しかしながら、このことは逆に反応系において注目したい部分のみを観測できるメリットでもある。またESRでは磁場がNMRに比べて小さく、試料にアクセスしやすいため、光、温度、電極など反応を起こしながらの測定が得意な分光法でもある。図1にESRとNMRの違いを表にまとめたものを示す。

## 3. ESR法で得られるパラメーター

### 3.1 g値

スピンをもつ電子に磁場を与えるとエネルギー準位がわかる現象をゼーマン分裂と呼ぶ。この分裂の大きさは磁場の大きさに比例し、その比例定数をg値と呼ぶ。このときエネルギー差は

$$h\nu = g\beta H \quad (1)$$

で表される。ただし、 $h$ はプランク乗数、 $\nu$ はマ

マイクロ波周波数、 $\beta$  はボーア磁子、 $H$  は磁場を示す。磁場  $H$  に対して (1) 式を満たすマイクロ波 ( $\nu$ ) を印可したときに「共鳴」の現象が起き、ESR 信号が観測される。電子スピン周辺の核スピンにも同様の核のゼーマン分裂がおこる。しかしこの大きさは電子のゼーマン分裂に比べて小さく、通常は無視できる。 $g$  値はおおよそ 2 の値をとる定数であり、この値はラジカル種や電子配列によって変化する。完全な自由電子であればこの値は  $g = 2.0023$  となる<sup>[2]</sup>。有機ラジカルなどでは  $g$  値はほぼ 2 に近い値で等方的な値となるが、金属イオンや金属錯体、原子番号の大きな N、O、S などのラジカルではスピン軌道相互作用が大きくなるために  $g$  値は 2 からずれた値となり、また、異方的な値となる。この  $g$  値は NMR の化学シフトと同様の意味を持ちラジカル種の特定に重要な要素である。

### 3.2 超微細相互作用

観測している電子スピンは、周辺の核スピンとの相互作用を受け、ESR 信号に変化をもたらす。この相互作用を超微細相互作用と呼ぶ。この超微細相互作用を観測することによって、試料の分子や錯体を構成する原子の数や原子の同定、さらに不対電子からの距離などの情報が得られる。スペクトルは核スピン  $I$  に対して  $(2I+1)$  の分裂を示す。さらに同種の核が  $N$  個ある場合にはそれぞれ  $(2NI+1)$  のスペクトルの分裂を示し、それぞれの信号強度は  $(1+x)^N$  の 2 項展開の係数に比例する。例えばメチレン基 ( $-\text{CH}_2-$ ) があれば、2 個の等価なプロトンによりスペクトルは 1:2:1 の 3 つに分裂する。これは NMR でいうところの  $J$  カップリングの様なふるまいを示す。固体などでは異方的な超微細相互作用が観測されることもあり、この場合分裂はもっと複雑なものとなる。

### 3.3 ゼロ磁場分離

2 つ以上の電子スピンがある場合、それらのスピン間の距離が近いと式 (2) で示されるような双極子相互作用が働く。

$$H_D = D (S_z^2 - \frac{1}{3} \mathbf{S}^2) + E (S_x^2 - S_y^2) \quad (2)$$

この相互作用による分裂は微細構造と呼ばれ、定数  $D$ ,  $E$  で表される。またこの相互作用は外部磁場には無関係であるためゼロ磁場分裂とも呼ばれる。この状態は光励起状態や遷移金属など、電子スピンの 1 以上の時にみられる。

## 4. 装置の構成<sup>[3]</sup>

一般的な X-band (9 GHz) の ESR 装置は図 2 のように電磁石、マイクロ波ブリッジ、空洞共振器、分光器から構成されている。

### 4.1 電磁石

ESR ではマイクロ波の周波数は固定して磁場を掃引することによって信号の観測を行う。一般的な X-band の ESR では 0.35 T の磁場を中心に信号が観測される。磁場は電磁石を用いて 0-1 T 程度まで掃引できるようになっている。

### 4.2 マイクロ波ブリッジ

マイクロ波は周波数が高いために通常の電子回路とは異なり、マイクロ波専用の回路 (立体回路) を用いている場合が多い。マイクロ波の発信から検出までをつかさどっているのがマイクロ波ブリッジと呼ばれる装置である。マイクロ波は通常ガンダイオードによって発信を行う。共振器でマイクロ波は吸収現象を起こし、その後検波ダイオードで検出される。ここで検波された後信号は分光器で処理される。

	ESR	NMR
周波数	例) 9GHz	例) 500MHz
磁場	0.35T(電磁石)	11.7T(超電導磁石)
CW/FT	CW(FT)	FT
試料の形状	溶液、固体	溶液 (固体)
試料管	例) $\phi 5\text{mm}$	例) $\phi 5\text{mm}$
観測対象	電子 (不対電子)	核 $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{19}\text{F}$ , .....
感度	良い	悪い

図1 ESRとNMRの違い

### 4.3 空洞共振器

ESRの検出プローブには空洞共振器が多く用いられている。試料は空洞共振器内に挿入され観測する。この共振器にマイクロ波を閉じ込め、試料にマイクロ波磁場を照射する。NMRの様に検出コイルは存在せず、共振器の壁と天井(上下)部分がコイル(LC回路)の役目を果たす。試料で吸収されたマイクロ波はブリッジ内のマイクロ波検波ダイオードで検波される。

### 4.4 分光器

分光器はマイクロ波ブリッジで検波された後のラジオ波成分の信号の処理を行うロックインアンプや磁場制御ユニット、変調ユニットからなる。磁場変調法はESR法特有の信号の観測方法であり、電磁石の(直流)磁場に通常100kHzの交流磁場を印可して検出する。この交流磁場は共振器に装着された変調コイルによって発生させる。この変調法を用いることによってマイクロ波の吸収信号を高感度で観測することが可能となる。磁場変調法によって検出される信号はNMRで観測される積分型(吸収型)とは異なり、微分型の波形となる。

## 5. 測定方法

ESRで観測されるラジカルは、反応性が高く極めて短寿命なものや、そもそも観測試料にラジカ

ルが存在しない場合も多い。そのためESRではスピラベル法やスピントラップ法を用いることで観測対象を広げている。

### 5.1 スピラベル法<sup>[4]</sup>

スピラベル法とは、ラジカルを含む化合物(スピラベル剤)を高分子もしくは膜中や膜内に取り込ませたり溶液内に混在させたりして、その運動性や濃度などの情報をESRスペクトルで観測する方法である。タンパク質など本来ラジカル種を持たない試料中の構造や運動性の情報を観測することが可能である。特定のスピラベル剤はシステインに特異的に結合する性質を持つため、タンパク質の任意の2か所をシステインに変異させ、ここにスピラベル剤を結合させることでスピラベル間の相互作用を見積もることができる。

### 5.2 スピントラップ法

スピントラップ法とは、ヒドロキシルラジカル(OH $\cdot$ )やスーパーオキシド(O $_2^{\cdot-}$ )など非常に反応性が高く、ラジカルの寿命が短いために、そのままではESRで観測することが困難なラジカルをスピントラップ剤に補足させて、間接的にESR信号を観測する方法である。トラップされたラジカルは比較的安定でありESR観測が容易になる。またトラップされたラジカルに特有の線形

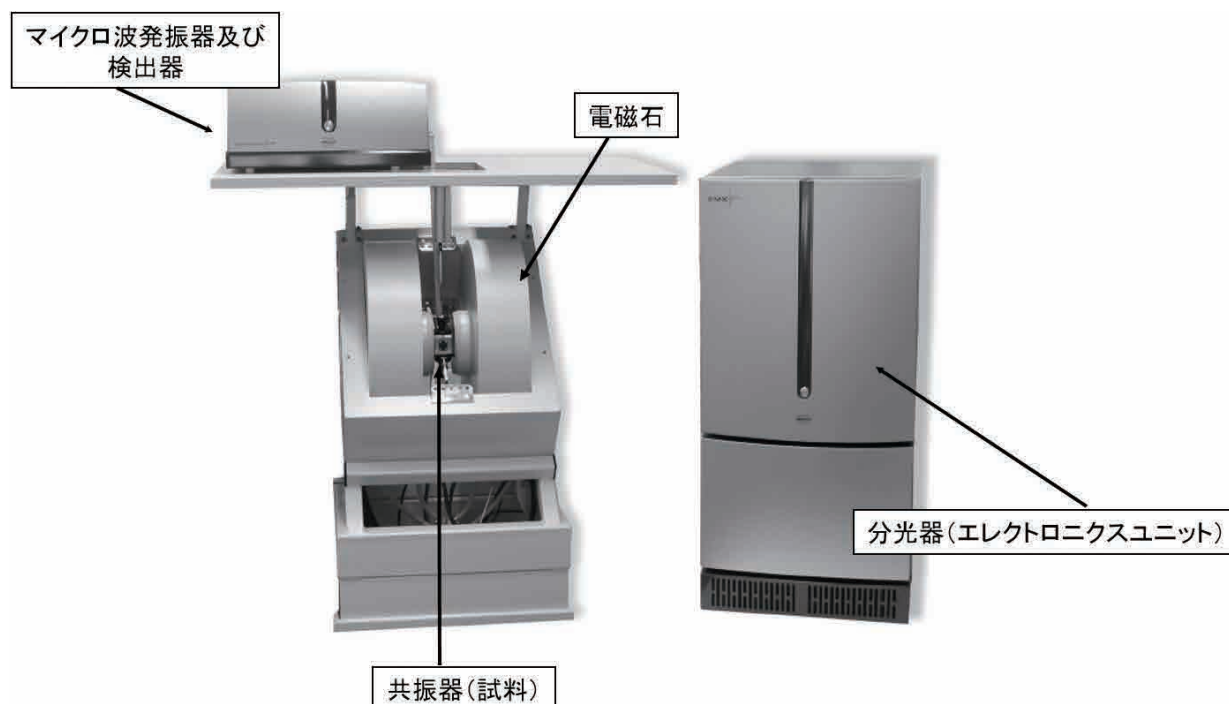


図2 ESR装置外観

を示すために、ラジカルの同定も可能である。この手法は、医学、薬学分野で活性酸素 (ROS) や活性窒素 (RNS) の評価、ラジカル反応追跡などに用いられる。

## 6. ESR の応用分野

ESR法は現在様々な分野で用いられている。ここでは各分野における測定の一例を紹介する。

### 6.1 材料分野

材料分野では、ダイヤモンド、光ファイバーの

欠陥、半導体の不純物および欠陥の検出などに多く用いられている。特にシリコン基板のESR測定は古くからなされてきた。最近ではリチウムイオン電池中のリチウムの評価や高分子の重合、劣化反応解析などに多く用いられている。図3はシリコン太陽電池基盤の光励起ESR信号である。シリコン基板に含まれている不純物であるリン、ヒ素が観測されている。リンおよびヒ素の核スピンの影響によってESRスペクトルはそれぞれ4本、2本観測されている。また中心には伝導電子由来の信号も観測されている。

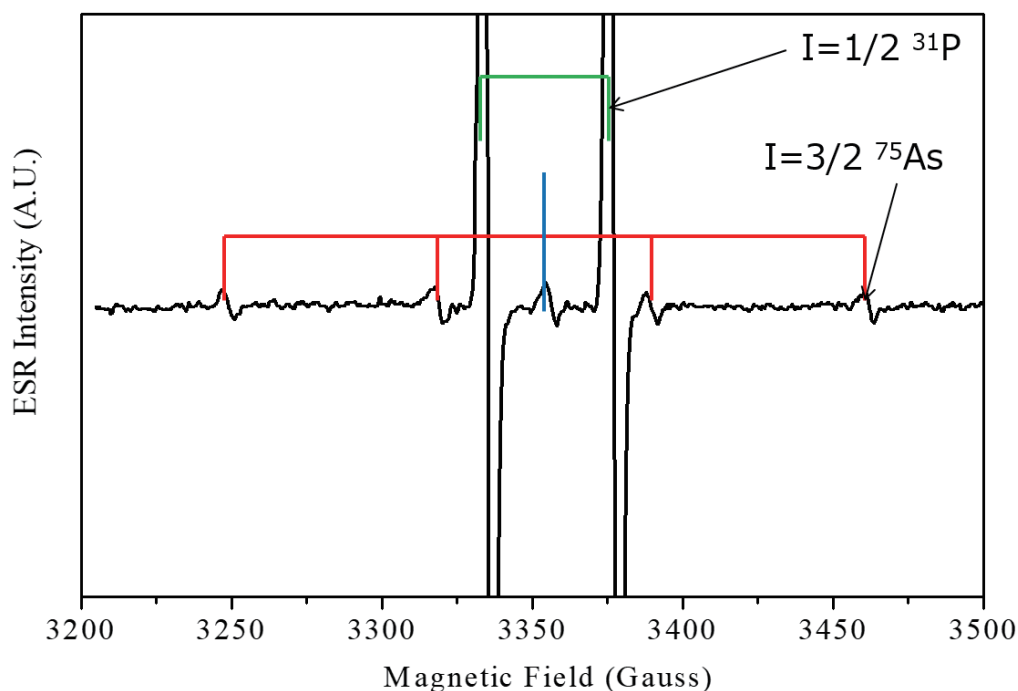


図3 シリコン太陽電池の光励起ESR信号

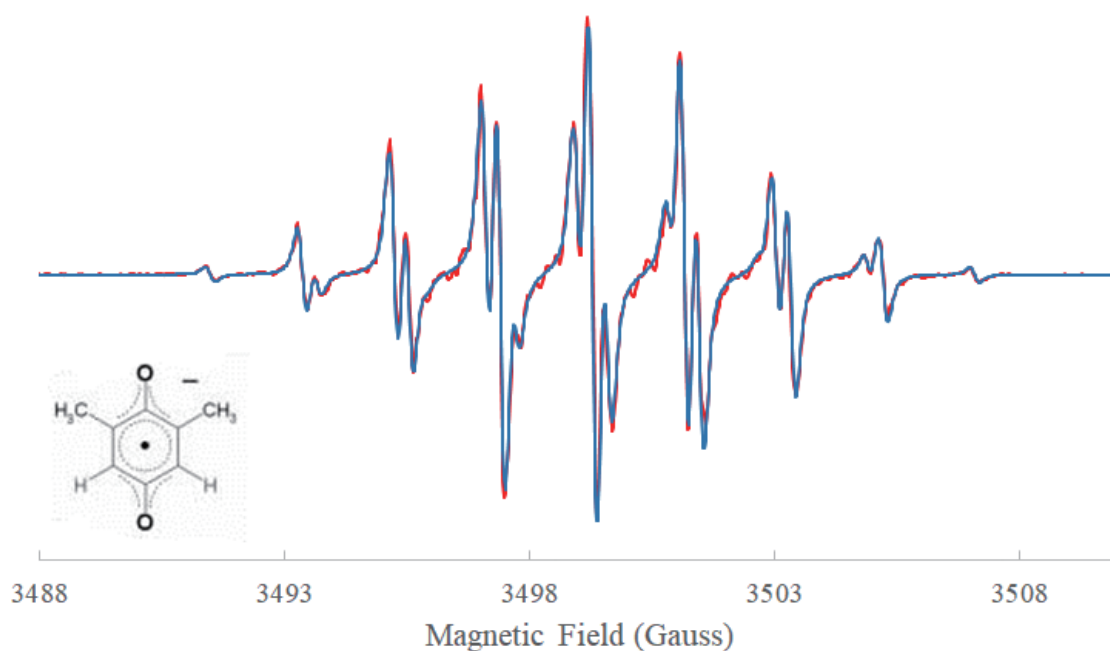


図4 電解セルで測定された2,6-ベンゾキノンアニオンのESRスペクトル(電圧=-1.4V)

## 6.2 化学分野

化学分野では、ラジカル重合反応、有機金属錯体、分子の3重項状態の観測などに用いられている。化学反応系ではラジカルの移動が関与しているため、ESR測定の対象となる事項が多い。また、様々な反応系を組むことが得意な装置であり、光、熱、応力、電圧などを反応追跡しながらの観測事例も多い。図4は2,6-ベンゾキノンを用いて-1.4Vで観測されたアニオンラジカルである。電解セルを用いることでサイクリックボルタンメトリー(CV)観測を行いながらESR測定を行うことが可能である。2つのメチル基の6つの等価なプロトンおよびベンゼン環上の2個の等価なプロトンにより21本のESR信号が観測されている。

## 6.3 医学・薬学分野

活性酸素(ROS)や活性窒素(RNS)はヒトの老化や動脈硬化など様々な病気を引き起こす原因といわれており、ROSやRNSを消去させる抗酸化物質に注目が集まっている。ラジカル捕捉剤を

主成分とする医薬品なども開発されている。またSOD (superoxide dismutase) 測定なども多く行われている。

図5は脳保護剤(フリーラジカル消去剤)として用いられているエダラボンによるヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )の消去反応の例である。図5(a)はフェントン反応によって生成させたヒドロキシルラジカルとスピントラップ剤DMPOを加えて反応させたときのESR信号である。図5(b)はこの溶液にエダラボンを加えたときのESR信号である。溶液中のヒドロキシルラジカルに対し、DMPOとエダラボンの競争反応により、エダラボンがヒドロキシルラジカルを消去したことを示す。このように活性酸素種と医薬品、生体関連物質との関係についてESRとスピントラップ剤を用いる方法が広く行われている。

## 6.4 生物分野

生物分野ではタンパク質の構造解析や運動性の観測などをスピントラップ法を用いて観測されている。また生体中の常磁性金属イオン、錯体など

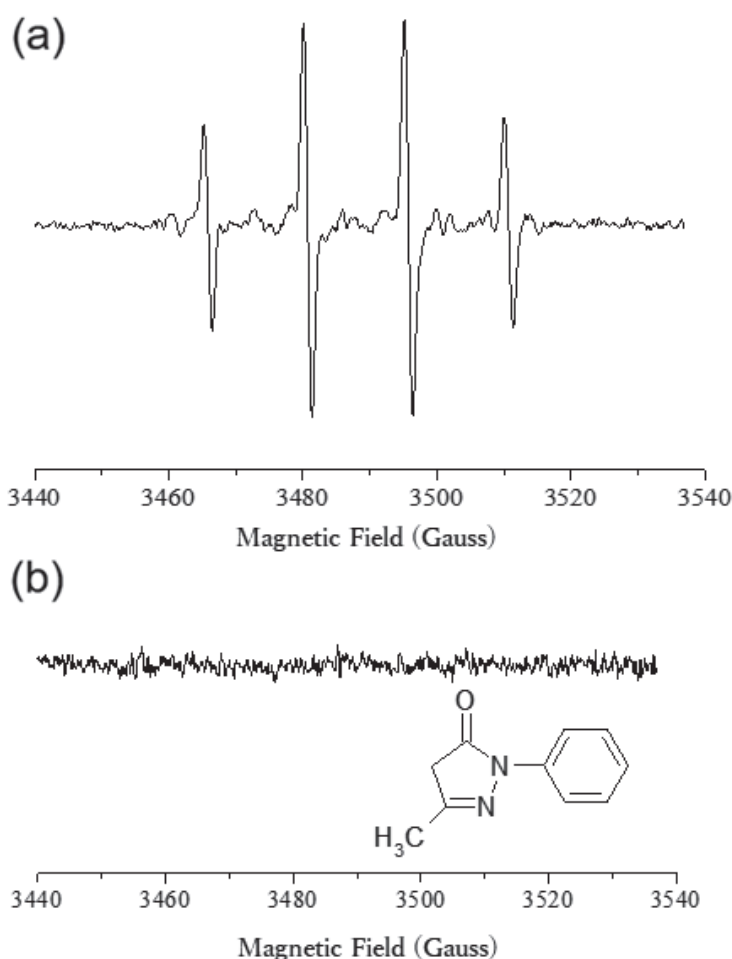


図5 (a) DMPO-OHラジカル (b) エダラボンによって消去されたOHラジカル

の構造解析にも用いられている。図6はタンパク質の2か所にスピラベル剤を結合させたときのESRスペクトルを示す。ラベル間の距離が遠い場合は、線幅はシャープであるが(a)、近くなるとスピンの相互作用が働きブロードとなる(b)。この線幅の広がりからラベル間距離の測定が可能である。ESRでは電子スピン間の相互作用を検出できるためにNMRよりも長距離(20 Å程度)の影響を観測することが可能である。

## 6.5 食品分野

食品分野では食品の抗酸化や油脂の酸化劣化の測定、照射食品の評価などに用いられている。特に植物油は食品加工の様々な所で使用されており、植物油の劣化現象は食品加工のうえで大きな問題となっている。図7は5種類のオリーブオイルについて酸化の度合いを過酸化価法(PV)とESR法で比較した図である。オリーブオイルにスピントラップ剤PBNを加え70度で強制酸化

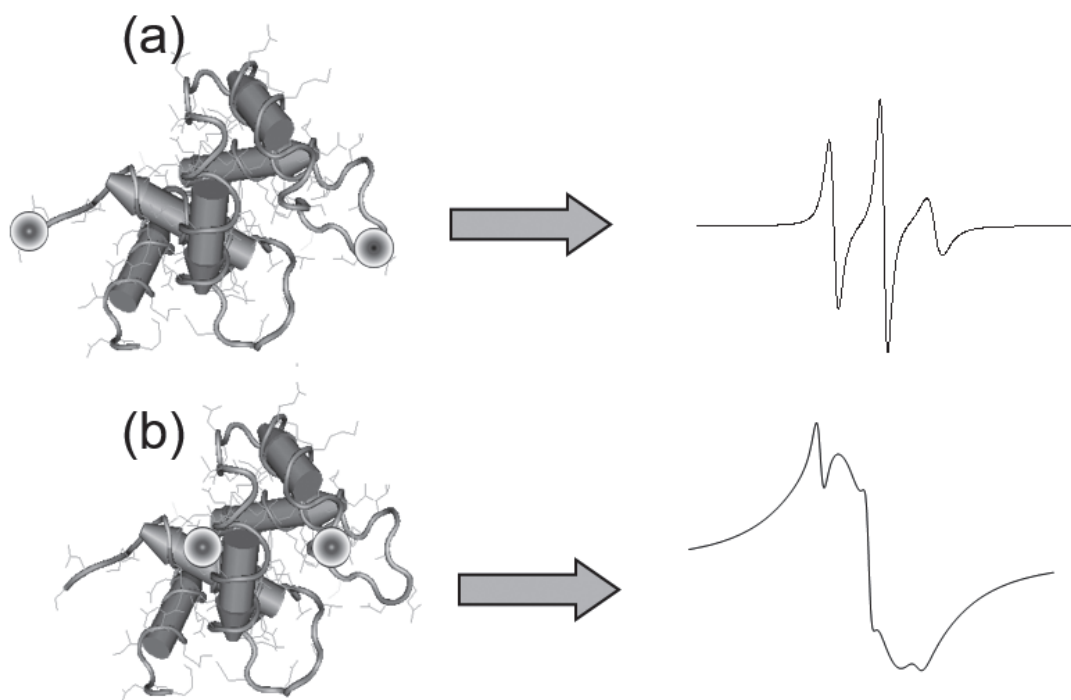


図6 タンパク質にスピラベルした時のESRスペクトル。(a) 2点間距離が遠い時、(b) 2点間距離が近い時

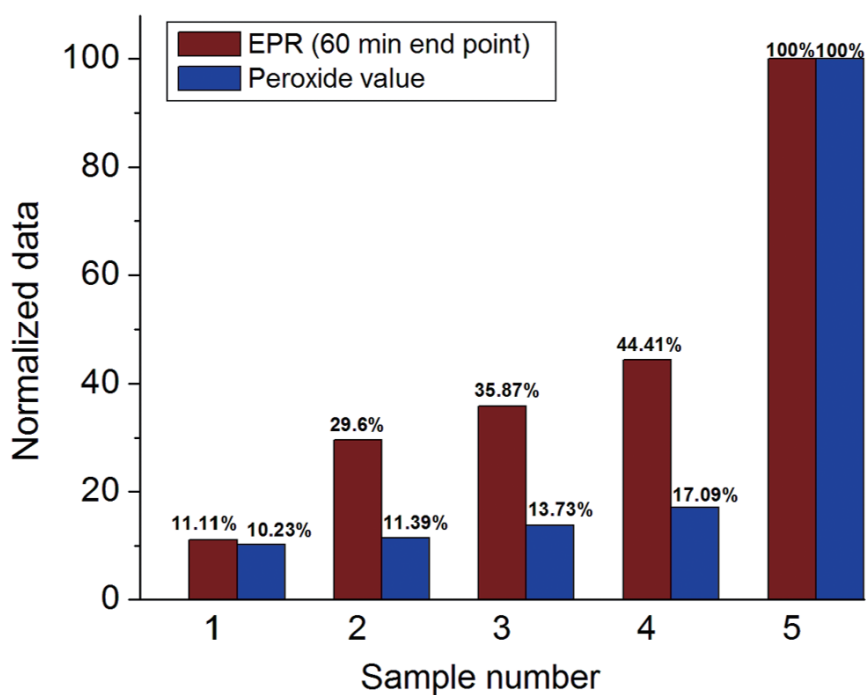


図7 過酸化価(PV)法とESR法の酸化評価の比較



させ、60分後にESR信号強度を観測した。PV法ではほとんど差が出ない試料でもESR法では明確に差が観測されている。これはESR法では過酸化ラジカルだけではなく、すべての酸化ラジカルについて観測しているためであり、PV法よりも感度のよい測定法といえる。さらに、最近では小型のESRを用いたLC-ESRなどの研究も行われている。これはLCで食品の成分を分離し、その直後にESRを測定することで、食品の各成分の抗酸化力などを求める手法である。

## 7. おわりに

本稿ではESRの測定法の中でもCW法での測定法について述べてきたが、このほかにも核スピンの相互作用を検出するENDOR (Electron Nuclear Double Resonance) 法やラジカルの空間分布を観測するESRイメージングなどがある。

さらに、NMRと同様にパルスESRを用いたFT-ESR装置もあり、これにより緩和時間や電子・核スピン間の相関など、より構造情報を得られる観測が可能である。特にタンパク質の距離情報では最大100Åほどの情報を得ることができる。今後様々な分野や場所において、NMRと同様にESRが用いられることを期待する。

## 参考文献

- [1] Zavoisky E. (1945) Spin-magnetic resonance in paramagnetics, *J. Phys. USSR*, **9**, 211m245.
- [2] J. E. Bolton and J. R. Bolton (1972), *Electron Spin Resonance Elementary Theory and Applications, Chap. 1, (McGraw-Hill, New York)*.
- [3] アルガー 著 磯部太郎 監訳 (1973) 電子スピン共鳴, p.344 (吉岡書店).
- [4] P. G. Fajer (2000) "Electron Spin Resonance Spectroscopy Labeling in Peptide and Protein Analysis", *Encyclopedia of Analytical Chemistry R.A. Meyers (Ed.) p.5725 John Wiley & Sons Ltd, Chichester*.



原 英之 (はら・ひでゆき)

1998 関西学院大学大学院理学研究科修了 (理学博士)

1998 - 1999 TDK株式会社 磁性材料事業本部

1999 - ブルカージャパン株式会社、バイオスピン事業部、アプリケーション部

## 封筒の裏

京都大学

寺尾 武彦

terao@beige.plala.or.jp

Einsteinの妻Elsaがウィルソン山天文台に招かれた。「この大きな最新の望遠鏡が宇宙の究極の姿を明らかにしようとしているのです」と誇らしげに説明されて彼女が言うには、「夫は同じことを使い古しの封筒の裏でやっていますよ」<sup>i</sup>。見事な返したが、Einsteinでなくても誰しも咄嗟の思い付きや計算を身近にある紙切れ一往々にして封筒の裏—に書きつけた経験があるのではないだろうか。英語で“封筒の裏の計算”(back-of-the-envelope calculation)といえ、当該の問題に見当をつけるために封筒の裏などで行なう大まかな計算を意味し、それは科学者がよくやるステレオタイプな行為と思われるようだ。実際、科学の研究においては浮かんだアイデアの成否を概算で確かめることがしばしば必要となる。ここでは封筒の裏で行なった概算が歴史的实验の端緒を開いた例を2,3挙げたい。

第二次世界大戦も終盤になったころ、ハーバードの電波研究所で軍事研究を行っていたBlochは、レーダーの妨害手段を研究する傍ら、磁場を精度良く測定する方法を考えていた。陽子、重陽子、中性子の各磁気モーメントの間に加成性が成立するかどうかに関心を抱いていたBlochは、1940年にAlvarezと共に中性子線共鳴法を開発し、中性子の磁気モーメントを測定することに成功した。磁場は当時の標準的な方法であるフリップ・コイル法で測定したが、その精度はかなり低かった；したがって、中性子の磁気モーメントの決定精度は低く、加成性について明確な結論が下せなかったのだ<sup>ii</sup>。Rabiらが開発した分子線共鳴を磁場測定に使うのも一つの方法に違いないが、そんな高度な装置は作りたくなかった。共鳴を検出する別の、望むらくはもっと簡単な方法を見つけたい、と考えていた。

1945年春のある日、Blochは列車でシカゴに向かった。そのまったく退屈な長旅の途中、ふとアイデアがひらめいた<sup>iii</sup>：核の磁気共鳴を、分子線

法とは大きく異なり、凝縮系の試料を用いて電磁的に検出する方法を思いついたのだった<sup>[1]</sup>。Blochは、この時点でGorterおよびZavoiskyが電子回路への影響で磁気共鳴を検出しようとした試みは知らなかったが、軍事研究でラジオ波技術を身に付けていたことが幸いした：ラジオの通常の受信技術を用いて、共鳴によって引き起こされる核磁化の運動を、試料を囲むコイルに誘起される起電力として、観測できるのではないかと着想したのである。それは、磁気共鳴の本質は磁気モーメントの方向を変えることにある、という古典的・動的・視覚的な猫像をもっていたBlochならではの発想であった<sup>iv</sup>。しかし、果たしてその誘導起電力は実際に観測可能な大きさなのだろうか。Blochは手持ちの封筒の裏に粗っぽい計算を始めた：まず、試料は1ccの水とし、数千ガウスの磁場中で水の陽子が作る平衡磁化を求めた；次にコイルの寸法、巻数、Q-値を適当に仮定し、その磁化の回転がコイルに誘起する起電力を計算した<sup>v</sup>。得られた結果は熱雑音の大きさをはるかに凌いだ；Blochは非常に興奮した。それはBlochが凝縮系でのNMR法の開発を目指す決心をした歴史的瞬間だった。長い間、何か見落としていることがありはしないか、緩和時間が長すぎることはないか、と心配して考察や計算を繰り返し、ようやくうまくいくはずだと感じた。戦争が終わってスタンフォードに戻ったBlochは、直ちに準備を始め、翌年1月に水の陽子の信号観測に成功した。

レーザーとレーザーを發明したTownesがレーザーを開発する決意を固めたのも封筒の裏で計算したときだった<sup>[3,4]</sup>。1948年にコロンビア大学の准教授となったTownesは、軍事研究で身に付けたマイクロ波技術を生かして分光法の研究を行っていた。そのうちに分光的興味と軍からの要請で波長1mm以下の電磁波の発振を目指すようになった。しかし当時の技術でミリ波用の真空

$$\text{Thus } \bar{\omega} = \frac{2\pi\mu}{R} \times 46 = \frac{2\pi\mu}{R} \times 92$$

Then

The induced signal is (with  $N = \text{no of turns}$ )  
 $\mu = 4.3 \times 10^{-7}$ ;  $R = 4$   
 $N = 8$   
 $\omega = 2\pi \times 8.5 \times 10^7$

$$V = \frac{300 N \omega \bar{\omega}}{c}$$

$$= 10^{-8} \times 8 \times 2\pi \times 8.7 \times 10^6 \cdot \frac{2\pi \cdot 4.3 \times 10^{-7}}{4} \times 92$$

$$= 2700 \times 10^{-88} = 2.7 \times 10^{-5}$$

With a  $Q = 100$  we should get for the signal

$$V_S = QV = 2.7 \times 10^{-3} = \underline{\underline{2.7 \text{ millivolts}}}$$

$$= \underline{\underline{2.7 \text{ millivolts}}}$$

Better method of calculation see p. 116!!!

図1 1945年夏にBlochが書いたノートの一部<sup>[2]</sup>。NMR信号の大きさが見積もられている。同年春に封筒の裏に行なった計算を基にしているものと思われる。

管や共振器などを作ることは不可能であり、彼は分子を使って発振・増幅する可能性を探り始めた。しかし、分子の集団を放置すると、分子は必ず高エネルギー状態よりも低エネルギー状態に多く分布する；したがって、エネルギー差の周波数をもつ電磁波を照射しても放出エネルギーは吸収エネルギーを下回り、増幅作用は起きない。これは熱力学第二法則の結果なのだ。いつもここで思考は止まっていた。

1951年4月26日、Townesはミリ波の実現を目指す会議に出席するためワシントンに来ていた。早朝に目覚めたTownesは付近の公園まで散歩した。空は晴れ渡り、人気のない静かな公園にはアザレアの花が咲き誇っていた。ベンチに腰掛け、これまでの経過を振り返った。突然、ひらめきが起きた：「待てよ！熱力学第二法則は熱平衡を仮定している。この法則に従わなければならないことはない！もし、何らかの手段で、エネルギー準位間に熱平衡を破って反転分布を実現すれば、誘導放出により発振・増幅が起こるのではないか<sup>vi</sup>」。アンモニア分子に慣れ親しんでいたTownesは、その反転二重項状態間の遷移<sup>vii</sup>に目をつけた。さらに、Rabiの研究室にいる何人もの友人を通して分子線について熟知していた彼は、アンモニア分子のビームに勾配電場をかけて高エネルギー状態の分子のみを選択することを思い付



図2 ベンチに腰をかけた封筒の裏で計算しているTownesの像。彼の故郷であるサウスカロライナ州グリーンビルにあるフォールズ・パークに設置されている。図の出典：<https://www.flickr.com/photos/42084480@N00/2652482930>

いた。ポケットから封筒を取り出し、必要とするエネルギーを出力するために要求される分子数を計算した。すぐに共振器が必要であることが分かった。最初に自然放出によって共振器中に電磁波が生じると、それが共振器中を往復するうちに励起状態にある分子と衝突して次々に誘導放出を起こす。壁での反射による損失は生じるが、計算してみると誘導放出による増幅がなんとかこの損失に打ち勝つことがわかった。困難は多々予想されるもののうまくいきそうで、Townesはわくわ

くした。彼らは、周囲からそんなことは不可能だからやめるように、という忠告や勧告を受けながらも実験を続け、1954年4月にアンモニア・メーザーによる電磁波の発振・増幅に成功した。

“封筒の裏”はデジタルの世の中になった現在においても有用なアイテムであり続けているようだ。英国のスーパーダイエレクトリックス社のHighgateは、2016年に神経系を義肢に繋ぐインターフェイスを開発するために吸水性高分子に添加物を加えて導電性を高める実験を行なった。すると奇妙なことが起こった。そこで彼は封筒の裏に静電容量を大雑把に計算してみた。そんなバカな！と思ったという；計算値は、本来考えられる値の100倍だった。自分が計算ミスをしたのだと思ったという。彼は、誘電率が既存の電解質の1,000倍から1万倍もある素材を偶然見つけたのだ<sup>[6,7]</sup>。この素材を使えば従来よりはるかに大きな電力を貯蔵できるスーパーキャパシタを作れる可能性があり、電気自動車や電力システムへの応用が期待されている。

Purcellには上記のようなエピソードは残されていない；しかし、NMRの開発のみならず幾多のきわめて創造性の高い研究を行なった彼が、“封筒の裏の計算”を数えきれないほど行なったであろうことは想像に難くない。教育者としても高い評価を得ていたPurcell<sup>viii</sup>は、1983年1月に始まった*American Journal of Physics*の“封筒の裏”という名の教育的なコラムの編集を担当した。毎月3題、物理の広い分野から数行の数値計算で解ける問題を出題し、次の号に教育的で洞察に満ちた解を与えた。この連載は翌年7月で終了し、以後散発的に1988年まで出題された。学生の封筒の裏計算の能力を鍛えようとしたPurcellのこの試みは、その後、単行本の出版<sup>[8]</sup>や大学のカリキュラムへの導入<sup>ix</sup>などの形で継承されている。これらの試みが実を結び、第二、第三のBlochやTownesが現れることを期待したい。

## 付録

### Purcellのコラム“封筒の裏”の問題例<sup>x</sup>

封筒の裏計算の練習は学生にとって大きな意味があり、大学教育に積極的に取り入れられるべきだと思われる。参考のため以下にいくつかの問題を掲載し、一言二言コメントしたい。

1) もし、ティーカップが核子を通さない材料でできているとすれば、その中に絶対零度で最

大何個の中性子を入れることができるか。プロトンならどうか。

- 2) 長さ1kmの銅線が6Vの電池に繋がれている。伝導電子が回路を一周するに要する時間を求めよ。
- 3) 10  $\mu$ Kに冷却された雪片を普通の永久磁石で持ち上げることができるか。
- 4) これまでに生産されたすべての紙を使って地球の陸地を覆うことができるか。
- 5) 海洋潮汐への月の影響の太陽の影響に対する比は約7/3である。この事実と今まで目にしてきたことを何でも使って月と太陽の平均密度の比を求めよ。

Blochも自分の計算結果に驚いたが、これらの問題の答を知って驚くことが多い：問題1の答は、中性子は $10^{16}$ 個入るが、プロトンは1個しか入らない；2の答は、約1年5ヶ月。物理現象は、理論式で理解するだけでは不十分であり、数値計算して初めて実感できるということを改めて知らされた。問題3では、普通の永久磁石が0.1T/cm程度の磁場勾配を十分与えられると判断できることが要求されている。なお、この問題の解答では、核スピン系が反強磁性(磁化:0)を示さないことを確認している。問題4は、茫漠として取りつく島もないような問題であるが、これを解くには、なんとか手掛かりを見つけ、合理的な仮定と推論を重ねて答を導き出す能力が求められる。このタイプの概算はしばしばフェルミ推定<sup>xi</sup>と呼ばれる。問題5は、月と太陽の見かけの大きさがほぼ同じである事実が使えることに気付けば解けるという面白い問題である。

このコラムの問題はかなり高度だが、列車の中や公園のベンチで素手で解くとするとさらにハードルが高くなる：物理法則や物理量の定義とその単位について正確に記憶していることに加えて、さまざまな物理定数を覚えていることが要求される。BlochやPurcellはおそらく、日頃からかなり頻繁に数値計算していて自然に概数が頭に入っていたのであろう。

## 注

- i 1917年当時、Einsteinは、宇宙は膨張も収縮もしない静的な存在だと考えていた。しかし一般相対性理論に基づく重力場の方程式は膨張する解を与えるので、斥力として働く宇宙項を付け加えた。この項が重力の効果を相殺し、静的な解が得られることを封筒の裏で計算を行なって確認したのであった。このエピソードには続きがある：その

- 12年後、Hubbleが宇宙の膨張を発見したのである。やはり、理論の成否を確かめるためにも、高価な実験装置や巨大望遠鏡に投資することに大きな価値があるのだ。1931年2月3日、Einsteinはウィルソン山天文台の図書室に集まった記者たちを前に会見を行ない、自分の静的宇宙論を放棄し、ビッグバン宇宙モデルを支持することを表明した。(ビッグバン宇宙論、新潮社) ちなみに、Einsteinは宇宙項の導入を「生涯最大の過ち」としたが、1998年に超新星の観測結果から宇宙の膨張は加速していることがわかり、宇宙項は再評価されるに至っている。
- ii Rabiらが分子線法で決定した陽子、重陽子の磁気モーメントの値はそれぞれ  $\mu_p/\mu_N=2.785\pm 0.02$ 、 $\mu_d/\mu_N=0.855\pm 0.006$  であり、Blochらによる中性子の磁気モーメントの値は  $\mu_n/\mu_N=-1.935\pm 0.02$  であった。Rabiらの値ももちろん磁場測定の影響を含む。Blochらは、最終的にはNMR開発後、陽子と重陽子の共鳴および陽子と中性子の共鳴をそれぞれ同一磁場で測定し、さらに陽子のNMRとサイクロトロン共鳴を同一磁場で測定することにより、 $\mu_p$ 、 $\mu_d$ 、 $\mu_n$ の絶対値を精度よく決定した。その結果、加減性からの若干のずれが認められた。
- iii アイデアを得た場所については諸説あるが、ここではBloch自身の記述<sup>[1]</sup>に従っておく。
- iv 一方、Purcellは磁気共鳴の本質は2準位系における吸収であるという量子論的・分光学的描像をもっていた。
- v 具体的な計算は、Blochのものとは若干異なるだろうが、Abragamの教科書に載っている。
- vi Townesは、主に、PurcellとPoundが反転分布を実現して負温度の概念を提唱したNMRの論文<sup>5</sup>からインスピレーションを得た。ただし、Purcellらの実験では、反転分布による誘導放出のエネルギーがあまりにも小さく、増幅作用はまったく起きない。
- vii 遷移周波数は約23.9GHz、対応する波長は約1.26cmであり、最初の目標であった1mm以下の波長とは大きく離れてしまっている。
- viii 物理教育に貢献した米国の教育者を毎年一人選ん

で贈られるエールステッド・メダルを1968年に受賞している。

- ix 例えば、スタンフォード大学では“Back of the Envelope Physics”と“Science on the Back of the Envelope”という二つの授業が行なわれている。
- x すべての問題と解答は、*American Journal of Physics*のwebページ (<http://web.mit.edu/rhprice/www/Readers/backEnv.html>) に纏めて掲載されている。
- xi 名称は、この類の概算を得意としたEnrico Fermiに由来する。彼がシカゴ時代に学生によく出題した「シカゴに何人のピアノ調律師がいるか」という問題が有名。

#### 引用文献

- [1] Bloch, F. (1971) Opening Lecture. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Magnetic Resonance, Rehovot and Jerusalem 1*.
- [2] Hahn, E. L. (1985) Felix Bloch and Magnetic Resonance. *Bull. Magn. Reson.* 7, 82.
- [3] Townes, C. H. (1999) How the Laser Happened: Adventures of a Scientist. Oxford.
- [4] "Rosa Parks Biography – Academy of Achievement" Academy of Achievement. 26 Feb. 2010. Web. 3 June 2014. <http://54.198.197.222/autodoc/page/tow0int-1>.
- [5] Purcell, E. M. and Pound, R. V. (1951) A Nuclear Spin System at Negative Temperature. *Phys. Rev.* 81, 279-280.
- [6] Alternative to traditional batteries moves a step closer after exciting progress in supercapacitor technology. *Univ, Bristol, Press release* issued: 27 February 2018. <http://www.bris.ac.uk/news/2018/february/supercapacitor.html>.
- [7] Katwala, A. (2018) A fluke breakthrough could be the missing link for an electric car age. *Wired* 1 March. <https://www.wired.co.uk/article/superdielectrics-supercapacitor-electric-car-battery>.
- [8] 例え ば、Swartz C. (2003) Back-of-the-Envelope Physics. Johns Hopkins；園田英徳訳 (2013)「物理がわかる実例計算 101選」講談社.



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。

# 錯体結晶の固体NMR

徳島大学大学院社会産業理工学研究部

犬飼 宗弘

inukai.munehiro@tokushima-u.ac.jp

## 1. 配位高分子・金属有機骨格体

持続可能な社会を実現するために、環境やエネルギーに関する諸問題の解決が強く望まれている。それら諸問題を解決する材料として、金属イオンと有機配位子から組み上がる配位高分子 (CP: Coordination polymer) や金属有機骨格体 (MOF: Metal organic framework) と呼ばれる錯体結晶が、近年注目を浴びている (図1)<sup>[1~2]</sup>。CP/MOFは、無数のナノ孔を有している結晶性固体であり、従来のポーラス材料であるゼオライトや活性炭にはない巨大な比表面積、多様性、柔軟な結晶構造などの特徴がある。機能面において、二酸化炭素、水素、メタン等の環境・エネルギーに関わるガス種に対して優れた分離・吸着能が報告されており、吸着・分離材料として研究・開発が盛んに行われている。また、高いプロトン伝導性を示すCPも数多く報告されており、燃料電池の電解質として検討されている。

機能の向上や新たな機能発現を目指した材料合成において、CPの構造解析は必要不可欠である。一般的なCPは結晶性が高く、5–50 μmほどの単結晶を得ることができる。そのため、ほとんどのCPの結晶構造は、単結晶X線回折 (XRD:

X-ray diffraction) によって得ることができる。一方、結晶骨格内部の空隙に含まれた溶媒や気体分子などのゲスト分子は高い運動性を有しているため、X線回折を得ることができず、他の解析方法を用いる。例えば、熱重量分析 (TGA: Thermogravimetric analysis) によるゲスト分子の簡易的な定量測定、吸着等温測定による気体分子の吸着量の評価、交流インピーダンス測定によるイオンや電子伝導度測定などが挙げられる。しかしながら、それらの解析法で得られることは、試料全体に関するバルクな情報であり、空隙内部におけるナノレベルの情報ではない。

他の分光・計測法と比較すると、固体NMRは非結晶の構造・運動性の解析を得意とし、空隙内部のゲスト分子の解析例が、数多く報告されている<sup>[3~5]</sup>。近年では、CPの結晶骨格の固体NMR解析も盛んに行われている<sup>[6~8]</sup>。単結晶X線回折で得られる結晶構造は、あくまで平均構造である。そのため、金属イオンや配位子の構造欠陥、構造の乱れ、固溶性、運動性等の解析において、固体NMRは強力な解析方法となる。我々が取り組んできたCPの固体NMR解析を例に、固体NMRの使い所を紹介する。

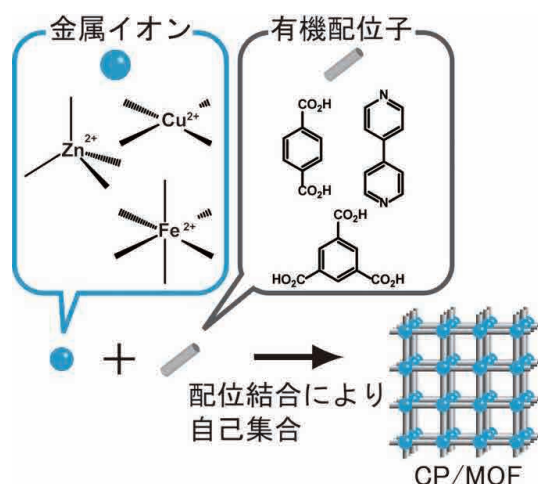


図1 金属イオンと有機配位子から組み上がる配位高分子/金属有機骨格体 (CP/MOF)

## 2. プロトン伝導性 CP と固体 NMR 解析

プロトンが固体中で高速拡散するプロトン伝導体は、燃料電池の固体電解質としての応用が期待されており、プロトン輸送の場として、配位高分子が注目され始めている<sup>[9~11]</sup>。中でも、低中温域 (100–200°C) において高い伝導度を示す配位高分子が報告されており、排熱を利用した車載用などの燃料電池への応用が検討されている。配位高分子にプロトン伝導能を発現させる方法として、①水、アミン分子、酸性の分子などのプロトン伝導を引き起こすプロトンキャリアを空隙に含浸させる、②運動性の高い酸性部位を配位高分子の結晶構造に組み込む、などの方法が提案されて

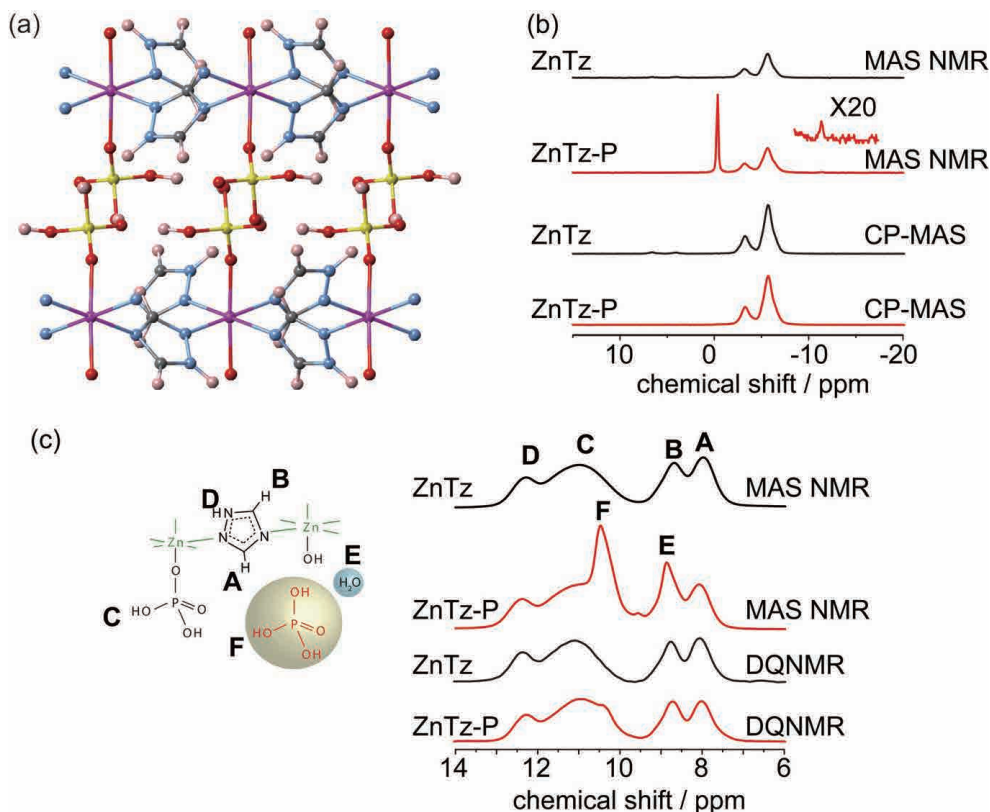


図2 (a) ZnTzの結晶構造。紫：Zn、黄：P、赤：O、青：N、黒：C、薄桃：Hを示す。(b) 室温における $^{31}\text{P}$  CP-MASとMAS NMRスペクトル。(c) ZnTz-P中の模式図と室温における超高速 $^1\text{H}$  MAS NMRスペクトル(回転速度：70 kHz)とDQNMRスペクトル。外部標準試料としてアダマンタンを用い1.87 ppmに合わせることでTMS基準とした。A-Fの $^1\text{H}$  NMR信号は模式図中のA-Fの化学種由来。

いる。単結晶X線回折によって得られる平均結晶構造と、固体NMRによる運動性解析を組み合わせることで、CPの静的・動的構造を得ることができる。一般的に、高速で運動しているプロトン中性子・X線回折を利用した従来法で水素の位置・運動を精密に解析することは極めて困難である。超高速MAS NMRで得られる $^1\text{H}$ 高分解能スペクトルから、プロトンそのものの位置・運動を観測できる点も固体NMRの使い所となる。

研究例：無加湿環境下で高いプロトン伝導性を示すCP<sup>[12]</sup>

リン酸を結晶骨格に有する二次元シート状のCP  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2(\text{C}_2\text{N}_3\text{H}_3)_2]_n$  (図2 (a)、ZnTzと呼ぶ)<sup>[13]</sup>は、その配位したリン酸基の回転が駆動源となり、プロトンがリン酸間を移動する。このCPに構造欠陥を作り、リン酸を埋め込んだCPを合成した(ZnTz-Pと呼ぶ)。得られたZnTz-Pは、ZnTzと比べて1万倍以上の高いプロトン伝導能( $4.6 \text{ mS cm}^{-1}$ @150°C)を示した。固体NMRを用いて、局所構造・運動の解析、および伝導機構を考察した。

結晶構造内に閉じ込めたリン酸を $^{31}\text{P}$ 交差分極マジック角回転法(CP-MAS)と単一パルス励起法(MAS NMR)によって解析した。2つのスペクトルを比較すると、ZnTz-PのMAS NMRスペクトルにおいて0 ppmと-11.4 ppmに非配位の $\text{H}_3\text{PO}_4$ と $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ に起因するピークを確認できた(図2 (b))。この2つのピークがMAS NMRスペクトルのみで現れたことから、液体に近い高い運動性を有していると考えられる。超高速MAS NMRにより、プロトン伝導の経路となる水素結合ネットワークのダイナミクスを調べた。図2 (c)に、 $^1\text{H}$  MAS NMRとDouble quantum correlation NMR(DQNMR)スペクトルを示す。これに $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  double CP, 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQNMR,  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  HMQCの結果を組み合わせることにより、それぞれのピークを図のように帰属させた。ZnTz-PのDQNMRスペクトルにおいて、8.9 ppmと10.5 ppmに追加ピークが確認できた。 $^{31}\text{P}$  NMRの結果と組み合わせると、これらのピークは、プロトンキャリアとなり得る非配位の $\text{H}_3\text{PO}_4$ や $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 、合成時に取り込まれた $\text{H}_2\text{O}$ に起因すると考えられる。また興味深いことに、ZnTz-Pの

スピン-格子緩和時間 ( $T_1$ ) を見積ったところ、ZnTzと比較して、全てのピークの $T_1$ が短かった。運動性の高いプロトンキャリアを結晶内にドーピングすることで、水素結合ネットワークが緩み、プロトンが全体的に動きやすくなったとことが、高いプロトン伝導度を引き起こした機構であると考えられる。

### 3. ガラス状 CP と固体 NMR 解析

CP/MOFのボトルネックとして、成形性に劣る点が挙げられる。ガスの分離膜や電解質膜などのデバイスへの応用を考えたとき、CPを高圧プレスし、錠剤にする方法がこれまで取られているが、割れやすく、任意の形状に成形することが難しい。この問題を解決する方法として、メルトクエンチによるガラス状CPが注目されている。CPを融点以上に加熱し、液体状態のCPを急冷することで、ガラス状CPを得ることができる<sup>[14~15]</sup>。ガス吸着能を示すマイクロポラスを有するガラス状CPも報告されており<sup>[16]</sup>、機能性ガラス状

CPは応用展開の可能性を広げる重要なトピックの一つである。しかしながら、非結晶のため構造解析が難しくなり、固体NMR解析のみで構造の詳細を決めることは困難である。このような難解な構造を理解するためには金属周辺の配位環境・配位結合の周期性・有機物の配置の構造情報は必須であり、広域X線吸収微細構造測定 (EXAFS)・X線2体相関分布関数 (PDF) 解析・距離相関NMRなどを組み合わせることにより、ガラス状CPの構造に迫ることが可能となる。

研究例：ゲスト分子が吸着可能な空隙とプロトン伝導能を両立するガラス状CP<sup>[17]</sup>

2次元シート  $[\text{Zn}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)]^-$ 、及びシート間の水素化した5-chloro-1H-benzimidazole ( $\text{ClbimH}^+$ )、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 、 $\text{MeOH}$ から組み上がる結晶性CPを合成した(図3(a))。交流インピーダンス測定、および吸着等温測定において、プロトン伝導性と $\text{H}_2\text{O}$ や $\text{MeOH}$ などの溶媒吸着を示した。結晶構造から、シート間に位置する非配

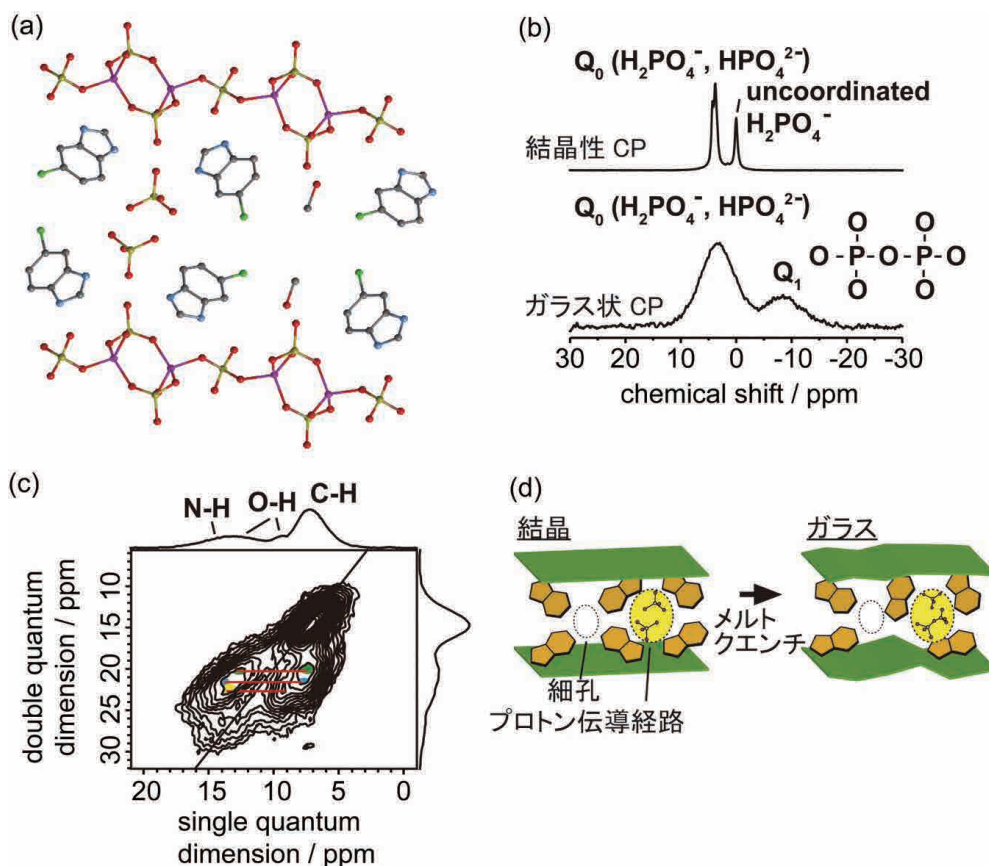


図3 (a)  $[\{\text{Zn}_2(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)\}(\text{ClbimH}^+)_2 \cdot (\text{H}_2\text{PO}_4^-) \cdot (\text{MeOH})_n]$ の結晶構造。紫：Zn、黄：P、赤：O、青：N、黒：Cを示す。水素は省略している。(b) 室温における $^{31}\text{P}$  CP-MASスペクトル。(c) 室温におけるガラス状CPの超高速 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQNMNMRスペクトル(回転速度：70 kHz)。O-HとC-H(緑)、N-HとC-H(青)、N-HとO-H(黄)は、それぞれの相関を示している。(d) ガラス状CPの概略図。緑は $\text{Zn}^{2+}$ とリン酸から組み上がる2次元シートを表している。



位の $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 間でプロトンが輸送し、シート間の $\text{MeOH}$ を除去したあとが、ゲスト分子の吸着サイトであることが考えられる。この結晶性CPを融点以上の $150^\circ\text{C}$ で加熱し、急冷することで薄茶色の半透明な化合物を得た。XRD測定からブロードなパターン、およびDSC測定からベースラインシフトが確認できたことから、得られたCPはガラスであることが明らかとなった。ガラス状CPは、結晶性CPと同様に $\text{H}_2\text{O}$ や $\text{MeOH}$ の吸着を示し、 $1.2\text{ mS cm}^{-1}$  ( $130^\circ\text{C}$ 、相対湿度=0%)、 $0.12\text{ mS cm}^{-1}$  ( $25^\circ\text{C}$ 、相対湿度=98%)のプロトン伝導を示した。

次に、非結晶化した2次元シートの構造をEXAFS、シート間の分子構造を固体NMR測定によってそれぞれ調べた。EXAFSによって得られた動径分布関数は、結晶性CPのものと類似しており、第1、第2配位圏内に $\text{Zn-O}$ や $\text{Zn-P}$ が存在することが確認できた。ガラスの構造は、亜鉛とリン酸から組み上がる非結晶性の2次元シート状であることが予想される。

$^{31}\text{P}$  CP-MAS NMRにより、プロトン伝導経路となるシート間の非配位 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ の構造を調べた。 $-8\text{ ppm}$ と $3.2\text{ ppm}$ 付近に、2次元シートに配位子しているリン酸とピロリン酸に帰属できるピークを確認した(図3(b))。融解中に非配位のリン酸が脱水反応を起こし、2量体化したと考えられる。加えて、2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQ-NMRスペクトルにより、2次元シートとシート間分子の相関が確認できたことから(図3(c))、ClbimHがシート間に分散していると予想できる。ClbimHがシート間の柱の役割を果たし、その隙間にゲスト分子が吸着できる細孔が存在していると考えている(図3(d))。以上、EXAFSと固体NMR測定を組み合わせることにより、ガラス状CPの構造解析を行い、プロトン輸送経路と空隙に関する考察を行った。

## まとめ

ここ数年、固体NMRを用いたMOFの構造解析はますます増えており、この分野において標準的な測定になりつつある<sup>[18~19]</sup>。配位子に $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ などが含まれており、金属イオンも $^{67}\text{Zn}$ 、 $^{25}\text{Mg}$ 、 $^{27}\text{Al}$ などのNMRアクティブな核スピンのことから、配位高分子は固体NMR向けの試料でもある。結晶構造のなかに潜む運動や局所構造の変化が、プロトン伝導能やガス貯蔵・分離能

などのさまざまな機能と密に相関があることが分かかってきており、固体NMRはそれらの情報にアクセスできる有力な手法となっている。超高速MAS NMRや動的核分極(DNP) MAS<sup>[20~21]</sup>などの最新のNMR技術を駆使したMOFの構造解析の研究例も報告されており、MOF解析において固体NMR解析の重要度は、今後より増していくことを予想している。

## 参考文献

- [1] Yaghi, O. M., O'Keeffe, M., Ockwig, N. W., Chae, H. K., Eddaoudi, M., Kim, J. (2003) Reticular synthesis and the design of new materials. *Nature* **423**, 705-714.
- [2] Kitagawa, S., Kitaura, R., Noro, S. (2004) Functional Porous Coordination Polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 2334-2375.
- [3] Horike, S., Matsuda, R., Kitaura, R., Kitagawa, S., Iijima, T., Endo, K., Kubota, Y., Takata, M. (2004) Motion of methanol adsorbed in porous coordination polymer with paramagnetic metal ions. *Chem. Commun.* **19**, 2152-2153.
- [4] Ueda, T., Kurokawa, K., Omichi, H., Miyakubo, K., Eguchi, T. (2007) Phase transition and molecular motion of cyclohexane confined in metal-organic framework, IRMOF-1, as studied by  $^2\text{H}$  NMR. *Chem. Phys. Lett.* **443**, 293-297.
- [5] Uemura, T., Horike, S., Kitagawa, K., Mizuno, M., Endo, K., Bracco, S., Comotti, A., Sozzani, P., Nagao, M., Kitagawa, S. (2008) Conformation and Molecular Dynamics of Single Polystyrene Chain Confined in Coordination Nanospace. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6781-6788.
- [6] Horike, S., Matsuda, R., Tanaka, D., Matsubara, S., Mizuno, M., Endo, K., Kitagawa, S. (2006) Dynamic Motion of Building Blocks in Porous Coordination Polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 7226-7230.
- [7] Kong, X., Deng, H., Yan, F., Kim, J., Swisher, J. A., Smit, B., Yaghi, O. M., Reimer, J. A. (2013) Mapping of Functional Groups in Metal-Organic Frameworks. *Science* **341**, 882-885.
- [8] Inukai, M., Tamura, M., Horike, S., Higuchi, M., Kitagawa, S., Nakamura, K. (2018) Storage of  $\text{CO}_2$  into Porous Coordination Polymer Controlled by Molecular Rotor Dynamics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 8687-8690.
- [9] Horike, S., Umeyama, D., Kitagawa, S. (2013) Ion Conductivity and Transport by Porous Coordination Polymers and Metal-Organic Frameworks. *Acc. Chem. Res.* **46**, 2376-2384.
- [10] Yamada, T., Otsubo, K., Makiura, R., Kitagawa, H. (2013) Designer coordination polymers: dimensional crossover architectures and proton conduction. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6655-6669.
- [11] Yoon, M., Suh, K., Natarajan, S., Kim, K. (2013) Proton Conduction in Metal-Organic Frameworks and Related Modularly Built Porous Solids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 2688-2700.
- [12] Inukai, M., Horike, S., Itakura, T., Shinozaki, R., Ogiwara, N., Umeyama, D., Nagarkar, S., Nishi-

- yama, Y., Malon, M., Hayashi, A., Ohhara, T., Kiyonagi, R., Kitagawa, S. (2016) Encapsulating Mobile Proton Carriers into Structural Defects in Coordination Polymer Crystals: High Anhydrous Proton Conduction and Fuel Cell Application. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 8505-8511.
- [13] Umeyama, D., Horike, S., Inukai, M., Itakura, T., Kitagawa, S. (2012) Inherent proton conduction in a 2D coordination framework. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12780-12785.
- [14] Umeyama, D., Horike, S., Inukai, M., Itakura, T., Kitagawa, S. (2015) Reversible Solid-to-Liquid Phase Transition of Coordination Polymer Crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 864-870.
- [15] Bennett, T. D., Yue, Y., Li, P., Qiao, A., Tao, H., Greaves, N. G., Richards, T., Lampronti, G. I., Redfern, S. A. T., Blanc, F., Farha, O. K., Hupp, J. T., Cheetham, A. K., Keen, D. A. (2016) Melt-Quenched Glasses of Metal-Organic Frameworks. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3484-3492.
- [16] Zhou, C., Longley, L., Krajnc, A., Smales, G. J., Qiao, A., Erucar, I., Doherty, C. M., Thornton, A. W., Hill, A. J., Ashling, C. W., Qazvini, O. T., Lee, S. J., Chater, P. A., Terrill, N. J., Smith, A. J., Yue, Y., Mali, G., Keen, D. A., Telfer, S. G., Bennett, T. D. (2018) Metal-organic framework glasses with permanent accessible porosity. *Nat. Commun.* **9**, 5042.
- [17] Inukai, M., Nishiyama, Y., Honjo, K., Das, C., Kitagawa, S., Horike, S. (2019) Glass-phase coordination polymer displaying proton conductivity and guest-accessible porosity. *Chem. Commun.* **55**, 8528-8531.
- [18] Witherspoon, V. J., Xu, J., Reimer, J. A. (2018) Solid-State NMR Investigations of Carbon Dioxide Gas in Metal-Organic Frameworks: Insights into Molecular Motion and Adsorptive Behavior. *Chem Rev* **118**, 10033-10048.
- [19] Wong, Y. T. A., Martins, V., Lucier, B. E. G., Huang, Y. (2019) Solid-State NMR Spectroscopy: A Powerful Technique to Directly Study Small Gas Molecules Adsorbed in Metal-Organic Frameworks. *Chemistry* **25**, 1848-1853.
- [20] Rossini, A. J., Zagdoun, A., Lelli, M., Canivet, J., Aguado, S., Ouari, O., Tordo, P., Rosay, M., Maas, W. E., Copéret, C., Farrusseng, D., Emsley, L., Lesage, A. (2012) Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Solid-State NMR Spectroscopy of Functionalized Metal-Organic Frameworks. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 123-127.
- [21] Kobayashi, T., Perras, F. A., Goh, T. W., Metz, T. L., Huang, W., Pruski, M. (2016) DNP-Enhanced Ultrawideband Solid-State NMR Spectroscopy: Studies of Platinum in Metal-Organic Frameworks. *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 2322-2327.



犬飼 宗弘 (いぬかい・むねひろ)

2002年3月 信州大学理学部物理科学科 卒業

2008年9月 大阪大学大学院基礎工学研究科システム創成専攻博士後期課程  
単位取得退学

2009年3月 博士(理学 大阪大学) 取得

2008年10月 京都大学大学院医学研究科 流動研究員

2009年4月 京都大学大学院理学研究科 特定研究員

2011年1月 京都大学(WPI)物質-細胞統合システム拠点 特定研究員

2014年10月 徳島大学大学院社会産業理工学研究部 講師(現在に至る)

# 室蘭工業大学におけるNMRの利用状況

室蘭工業大学 大学院工学研究科、環境調和材料工学研究センター(兼務)

馬渡 康輝

mawatari@mmm.muroran-it.ac.jp

## 1. はじめに

室蘭は、西には2008年にG8サミットが開催されたカルデラ湖の洞爺湖、東には国内有数の温泉地である登別があり、地図上では、札幌と函館を結んだ直線のほぼ中間に位置する。室蘭工業大学の前身にあたる室蘭高等工業学校が1939(昭和14)年に設置され、5年後に室蘭工業専門学校と改称、1949(昭和24)年に北大付属土木専門部と統合して室蘭工業大学が設置された。2004(平成16)年には国立大学法人室蘭工業大学となり、「創造的な科学技術で夢をかたちに」の理念のもと、天然の良港と鉄鋼業を中心として発展したもののづくりのまちである室蘭の特性に多くを学びつつ、それらを生かした教育と研究を展開している。2009(平成21)年に設立60周年を迎えたことを機に、頭文字の「M」と「∞(無限大)」をモチーフとした大学のロゴマークが一新された(図1)。設立70周年を迎えた今年、工学部から理学の要素を強くした理工学部へ学部改組された。物事の本質を掴む観点から、本学のNMRに対する重要性が更に高まってきている感触を装置管理者の一人として実感している。

著者が室蘭工大に着任した2007年当時、本学は270MHz NMRを一台のみ保有していた。幸いなことに、数年後には500MHzの導入が決まり、入れ替わりで270MHzはその任を終えた。その数年後に、設置している建物の改修工事が開始さ

れたため、一度消磁し、連結した隣の棟に移設した。再始動後は大きなトラブルもなく、順調に稼働して現在に至っている。プローブは溶液5mm、10mm、3.2mm固体、低周波の4本保有している。現在9研究室がユーザー登録しており、装置稼働率が非常に高い。大多数が5mmプローブでの溶液<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C測定であり、いくつかの研究室はプローブ交換して使用している。本学の研究におけるNMRの利用分野は多岐にわたる。本稿では、いくつかのユーザー研究室の研究内容とともに各研究がNMRをどのように利用しているのか簡単に紹介させていただく。

## 2. 本学 NMR ユーザーの研究紹介

中野英之研究室では、光機能を有する新しい有機化合物の設計・合成と物性・機能の解明に関する研究を進めており、合成した新規化合物を同定するうえでNMRは欠かせない。また、最近では光照射に伴ってどのような反応が進行しているのかを確認するためにもNMRを活用している。たとえば、新規化合物CSB-5の結晶粉末をガラス基板に擦り付けて作製したアモルファス膜に光を照射し続けると、膜の発光色が橙色から緑色に徐々に変化することを見い出し、光照射後の試料のNMR測定により、膜中で[2+2]光環化付加反応等が進行することに基づいて発光色が変化することを明らかにした。結晶状態では光反応が進行しないため、結晶膜をひっかいて文字を書き込んだ部分のみ発光色が変化する発光パターンを作製できる(図2)<sup>[1]</sup>。

庭山聡美研究室では、有機合成化学を主とする研究を行っており、合成した有機化合物の構造決定にNMRは無くてはならぬものである。当研究室では環境に最も優しい溶媒である水を主溶媒として、一般に安価で市販されているか安価で大量に合成できることで知られている対称化合物、特に対称ジエステルの実用的な高選択的モノ加水分



図1 室蘭工業大学のロゴ

解反応の研究を行っている(図3)。さらにその生成物を天然物や高分子合成に応用している。それらの反応生成物の構造決定の際にNMRを利用している。

飯森敏文研究室では、磁気光学機能を有する液体材料の合成と物性評価に関する研究を進めている。最近、テトラクロロ鉄(III)錯体アニオンを含む磁性イオン液体が、優れた磁気光学効果を示すことを見出した<sup>[2]</sup>。磁性イオン液体は図4に示すようにイミダゾリウムカチオンと鉄(III)錯体アニオンから構成され、実験に用いる試料は塩化イミダゾリウムと塩化鉄を混合して作成している。合成の確認においてNMRを用いる場合があるが、試料は常磁性のためNMRスペクトルの測定には専門知識を要する。本学はNMR測定に関する技術的な相談が可能な環境とサポート体制が整っている。そのため専門外の研究者でも実験を支障なく行うことができ、合成の確認に活用している。

上井幸司研究室では、天然資源から医薬品や

機能性食品のシーズとなる機能性物質の探索とその誘導体を基盤とした生物機能解明に関する研究を進めており、機能性物質の構造決定やそれらのターゲットタンパク質との相互作用解析にNMRが強力な武器となっている。最近では、アルツハイマー病の病因の一つとされるアミロイド $\beta$ (A $\beta$ )の凝集を阻害する物質に注目し複数の北海道に自生する植物の抽出エキスより活性物質単離・構造決定し、その作用機構の解析をNMRにより進めている(図5)<sup>[3]</sup>。また、活性物質の探索にSTD-NMRシグナルを指標とする評価法の可能性を検討中である。

本学のNMRユーザー内で唯一の建築系の研究室である金志訓研究室では、コンクリートやセメントの研究にNMRを用いている。コンクリートはセメントと水の水和反応をベースに、粗骨材および細骨材との混合によって凝固し、構造物として強度を発現する。セメントの水和反応から生成されるC-S-H(Calcium Silicate Hydrate)は、コンクリートの強度発現に重要な役割をするが、非

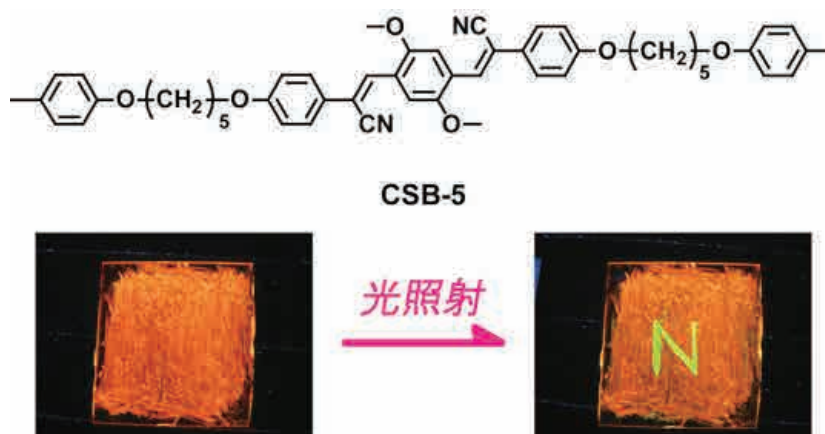


図2 CSB-5結晶膜の発光の様子。膜にしばらく450nmの光を当て続けると、ひっかいた部分だけ発光色が変化する(励起光:365nm)

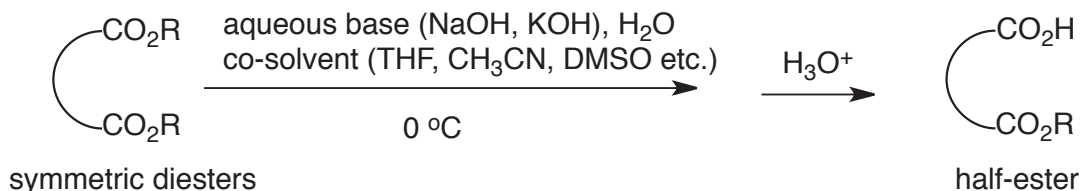


図3 対称ジエステルの実用的な高選択的モノ加水分解反応

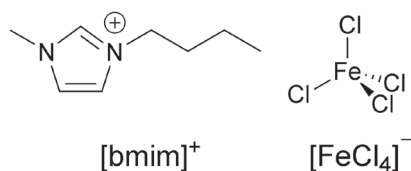


図4 優れた磁気光学効果を示す磁性イオン液体の分子構造

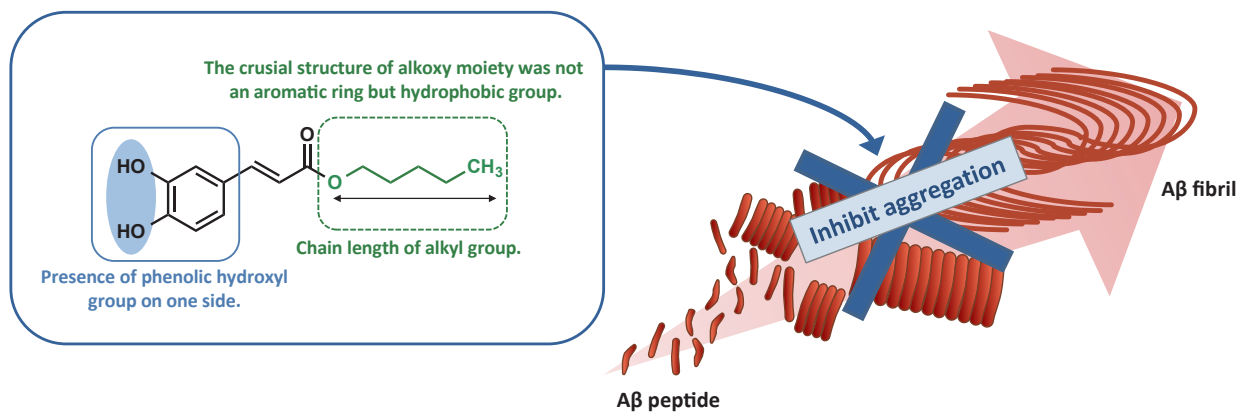
Critical functional groups in rosmarinic acid derivatives for A $\beta$  aggregation inhibitory activity

図5 シソ科植物の代表的A $\beta$ 凝集阻害物質ロスマリン酸誘導体の構造活性相関。フェノール性水酸基と疎水性側鎖構造が活性発現に重要である

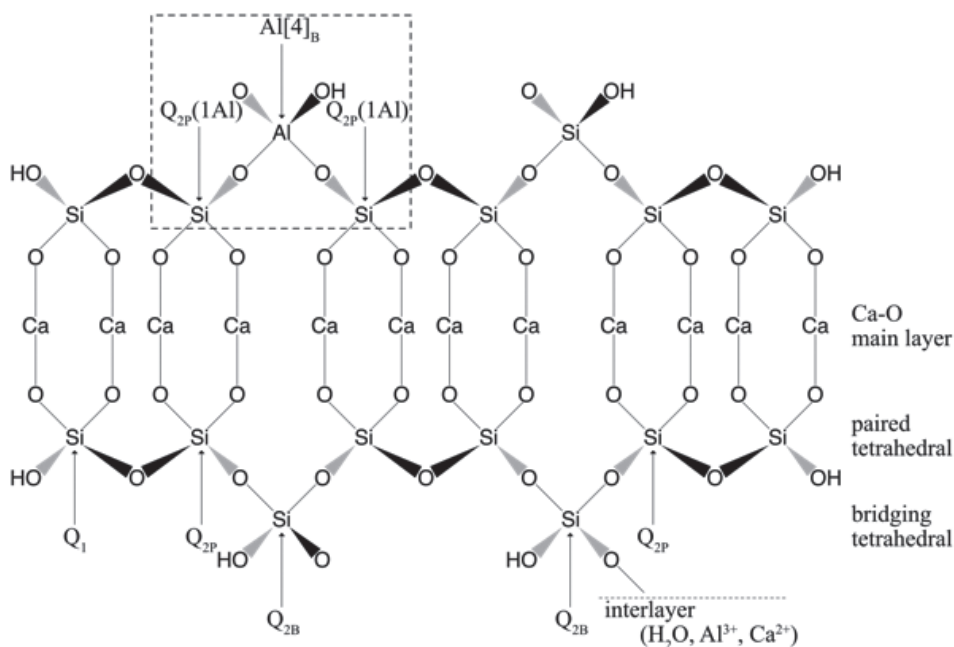


図6 Schematic representation of a single layer in the crystal structure for C-S-H

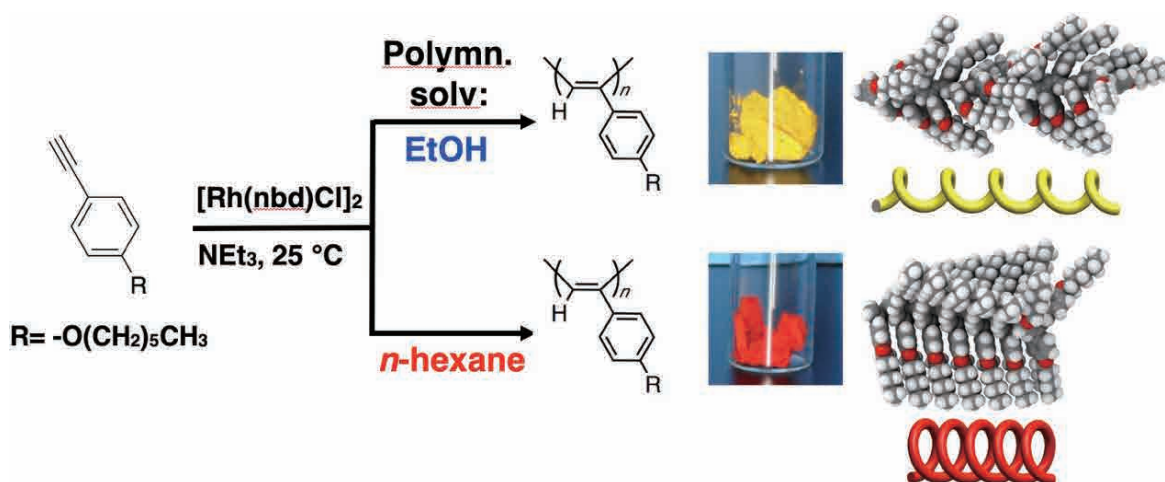


図7 一置換芳香族アセチレンモノマーの重合で得られるらせんポリマーの色彩の重合溶媒依存。黄色い場合は伸びたらせん、赤い場合は縮んだらせん

結晶物質（アモルファス）になっており、XRDなどの測定からは分析が困難である。そこで、 $^{29}\text{Si}$  固体NMRが建築材料分野で広く使われており、セメント系材料のC-S-H挙動変化に関する研究を行なっている（図6）。例えば、火災から被害を受けたコンクリートを対象として、再水和反応による強度回復とC-S-Hの変化挙動の関係性を比較定量評価し、また、環境配慮型セメントの反応メカニズムを明らかにする基礎研究も行なっている。

筆者の馬渡康輝研究室では、 $\pi$ 共役系らせんポリマーの一つである一置換ポリアセチレンの研究を進めている。これは、一置換アセチレンモノマーのロジウム錯体触媒による重合反応によって合成できる。このポリマーが固体状態で示す色彩が、用いる重合溶媒の種類によって大きく変化することを見出した。一種類のモノマーから合成されるにも関わらず、色の違いが生じる現象について興味を持ち、その制御を目指した分子構造の検討を続けている。現時点では、色彩の変化はらせんの伸縮の程度の差に起因すると解釈している（図7）<sup>[4]</sup>。NMRは、新規に合成したモノマーの同定に利用し、またポリマーの構造解析では、溶液中での $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$ のVT測定によるらせんの伸縮速度の評価、らせんポリマーを形成するモノマー連鎖の解析、さらに固体状態で生じる色の違いとポリマー構造の違いを解析するために固体 $^{13}\text{C}$ を測定している。

### 3. おわりに

本学のNMRユーザーの研究内容の一端を紹介させていただいた。これらの研究をすすめるにあたり不可欠なNMRであるが、装置維持管理では課題が多い。特に、近年のヘリウム供給の状況を横目に、ヘリウム回収機を有していない本学では、大変心苦しいが気化分をすべて大気放出している。次回の装置更新時には、再凝縮装置を備えた装置が導入されることを個人的に希望してい

る。もちろんその実現には、NMRを有効に活用した成果を継続して出していかなければならないことは言うまでもない。室蘭には、水平線が円弧を描いて見える「地球岬」、歩くと音がする「鳴り砂」のイタンキ浜、最近では白鳥大橋と工場夜景が観光スポットに紹介されている。食では、室工大生はもちろん市民の活力源となっている、玉ねぎを挟んだ豚串焼きに洋がらしを組み合わせる「室蘭やきとり」、筆者も札幌から室蘭に移って初めて知った「室蘭カレーラーメン」など、独特の文化が培われてきている。その中にある本学の学生らは、自らを個性的と評し、それを強みに変えて各業界へ挑戦を続けている。我々教員も負けずにオリジナリティのある研究を進めていこうと意気込んでいる。本稿の読者の皆様が室蘭工業大学に対して興味を持っていただき、これが縁で本学との新たなお付き合いがうまれることを祈念している。最後に、本稿の執筆にあたり、本学ユーザーの先生方から研究紹介文をご提供頂いた。この場を借りて感謝申し上げる。

### 引用文献

- [1] Kaneko, R., Sagara, Y., Katao, S., Tamaoki, N., Weder, C., Nakano, H., (2019) Mechano- and Photoresponsive Behavior of a Bis(cyanostyryl) benzene Fluorophore. *Chem. Eur. J.*, **25** (24), 6162-6169.
- [2] Iimori, T., Abe, Y., (2016) Magneto-optical Spectroscopy of the Magnetic Room-temperature Ionic Liquid 1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrachloroferrate. *Chem. Lett.* **45**, 347-349.
- [3] Taguchi, R., Hatayama, K., Takahashi, T., Hayashi, T., Sato, Y., Sato, D., Ohta, K., Nakano, H., Seki, C., Endo, Y., Tokuraku, K., Uwai, K., (2017) Structure-activity relations of rosmarinic acid derivatives for the amyloid  $\beta$  aggregation inhibition and antioxidant properties. *Eur. J. Med. Chem.* **138**, 1066-1075.
- [4] Tabata, M., Mawatari, Y., (2017) Emerging  $\pi$ -Conjugated Stretched and Contracted Helices and their Mutual Conversions of Substituted Polyacetylenes Prepared using an Organo-rhodium Catalyst. *Polym. Rev.* **57**, 65-88.



馬渡 康輝（まわたり・やすてる）

2005年3月 北海道大学大学院工学研究科分子化学専攻 修了 博士（工学）  
 2005年4月 北海道大学大学院工学研究科 博士研究員  
 2007年1月 室蘭工業大学教育研究等支援機構（研究支援）助手  
 2010年1月 室蘭工業大学大学院工学研究科 助教  
 2013年2月 室蘭工業大学環境調和材料工学研究センター 兼務  
 2019年8月 室蘭工業大学大学院工学研究科 准教授

## 第20回若手 NMR 研究会開催報告

自然科学研究機構 分子科学研究所／生命創成探究センター 助教

谷中 冴子

saeko-yanaka@ims.ac.jp

### はじめに

2019年8月2日(金)～4日(日)の3日間、「第20回若手NMR研究会」を開催しました。若手NMR研究会は、毎年合宿形式で開催されており、全国から学生や若手の研究者が集まります。NMRを用いた研究の基礎から応用まで幅広く学ぶだけでなく、研究者同士の交流も目的としています。ここでは実行委員を代表して、今年度の研究会のご報告を致します。

### 開催にあたって

今年の若手NMR研究会は、自然科学研究機構生命創成探究センター／分子科学研究所の矢木真穂助教と私で実行委員を務めました。また会期中の運営に関しては、実行委員に加え、生命創成探究センターおよび名古屋市立大学大学院薬学研究科の加藤晃一研究室のメンバーが担当しました。

今年は、三河湾を見渡す「ホテルたつき」(愛知

県西浦市)を会場としました。開催決定から多くの先生方にお声がけをさせていただき、その結果、総勢64名の研究者・学生に参加いただくことができました。また多数の企業や学会から協賛や後援をいただきました。

今年の研究会は第20回の記念すべき会であったこともあり、企画準備に気合が入りました。生体分子の構造解析において昨今大きな潮流となっている Integrative approach を踏まえて、NMR研究のアイデンティティーを見つめ直す機会となればと考えて準備を行いました。NMR関連の講演に加えて、高速原子間力顕微鏡、電子顕微鏡、分子動力学計算、量子ビーム溶液散乱、中性子結晶構造解析など、様々な手法の専門家をお呼びし、手法の枠を超えた研究交流を目指しました。多くの先生方から講演の快諾をいただき、最終的に以下のようなプログラムに決定しました。(敬称略)



写真1 ホテルたつきにて撮影した集合写真

8月2日(金)

基調講演:

生命創成探究センター 加藤晃一先生

一番勝負:

名古屋大学 内橋貴之先生

「高速原子間力顕微鏡:

触って見るタンパク質の動き」

横浜国立大学 児嶋長次郎先生

「NMR構造とは何か?

—集団平均の長所と短所—」

講演:京都大学 片平正人先生

「抗プリオン・抗アルツハイマー性RNAアプタマーの構造/機能解析及び核酸のin-cell NMR」

8月3日(土)

二番勝負:

京都大学 杉山正明先生

「溶液散乱で探る生体高分子の構造とダイナミクス」

京都大学 星野大先生

「高分解能溶液NMRによるタンパク質の動的構造解析」

三番勝負:

生命創成探究センター 奥村久士先生

「分子動力学シミュレーションでわかること、わからないこと」

首都大学東京 池谷鉄兵先生

「溶液NMRデータを用いた蛋白質立体構造計算」

四番勝負:

生理学研究所 村田和義先生

「クライオ電顕によるバイオイメージング」

千葉大学 西田紀貴先生

「NMRとクライオ電顕を用いた細胞質ダイニンの親和性制御機構の解明」

五番勝負:

分子科学研究所 中村彰彦先生

「中性子/X線結晶構造解析で(重)水素はどう見える?」

産業技術総合研究所 竹内恒先生

「溶液NMRにおける水素に頼らない構造研究」

講演:

京都大学 森本大智先生

「バイオレオロジー NMR法の開発と応用」

広島大学 吉村優一先生

「試料に応じたNMR測定手法の選択」

理化学研究所 八木宏昌先生

「NMRで細胞の中を観る、細胞の調子を診る」

大阪大学 宮ノ入洋平先生

「新しい安定同位体標識技術を利用した高分子量蛋白質の動態構造解析法の開発」

8月4日(日)

企業セミナー:ブルカー・ジャパン株式会社(佐藤一様)

企業セミナー:日本電子株式会社(笹川拓明様)

企業セミナー:株式会社シゲミ(室岡太郎様)

企業セミナー:太陽日酸株式会社(星野誠様)

基礎講義:

横浜市立大学 池上貴久先生

「ベクトルモデルだけでは駄目なのか?」



写真2 今年が目玉企画の一つ、NMR五番勝負:様々な手法の専門家との対談はとても刺激的でした



## 会期中の様子

会の冒頭は、日本核磁気共鳴学会の会長である生命創成探究センターの加藤晃一先生の基調講演で始まりました。故・荒田洋治先生とのエピソードの中にあつた「陰翳礼讃」の紹介においては、既存の価値に迎合せず、新しい概念を生み出していくことの大切さを学ぶことができました。また、近年勃興しつつある「研究界の産業革命」について問題提起がありました。研究プロジェクトが大型化する今日において、若手研究者がどのようなスタンスで研究と向き合うべきかについて考えさせられました。この問題意識は今回の目玉企画であるNMR五番勝負にも通ずるものでありました。

その後、NMR五番勝負と講演へと会は進行していきました。五番勝負においては高速原子間力顕微鏡、電子顕微鏡、分子動力学計算、量子ビーム溶液散乱、中性子結晶構造解析の専門家の方々にそれぞれの手法のフロンティアについてご紹介いただきました。そのうえで、NMRを専門とする先生方に、他の手法を意識したときにNMRが際立つところを交えてご講演いただきました。各セッション、お二人の番勝負に登壇いただいた先生の講演の後に質疑応答を行いました。多くの番勝負において、それぞれの手法のメリット・デメリットが語られ、対する手法とNMRとのコラボレーションによって、相乗的な効果が期待できることが浮き彫りとなりました。講演においてはNMRによる最新の研究成果に議論が盛り上がり

また、今回はじめての試みとして、パネルディスカッションの時間を設けました。「Integrative structural biologyの中で、NMRがいかにかアイデンティティを示していくのか」ということをテーマに議論を行いました。NMRが生体分子の構造解析に使われるようになり、多次元NMRのパルスプログラムが盛んに開発されてきた時代に比べると、NMRは成熟した技術となってきました。そして、クライオ電子顕微鏡や高速原子間力顕微鏡が隆盛を誇る中で、NMRがどう対して行けばよいのかを悩ましく思うという学生の声もフロアから聞かれました。しかし、NMRにはNMRにしかない良さがあります。特に、児嶋長次郎先生からは、網羅性、定量性、再現性、時間細工性、非破壊性において、特に優れているとのコメントが有りました。そして、番勝負の中でも述べられたように、様々な手法とのコラボレーションにおいて、NMRが生きてくるのであると思います。企業の方々からもNMR研究のあり方についてコメントやご意見を多数いただきました。議論の最後に差し掛かって、量子ビーム溶液散乱の専門家である杉山正明先生から、印象的なコメントが有りました。NMRの将来を考える場にこれだけの人が集まって議論できる事自体が素晴らしいことだという趣旨の発言でした。技術的に成熟したNMRであるからこそその新しい展開が今後期待できるのではないかという結論に達し、白熱した議論のうちにパネルディスカッションは幕を閉じました。

懇親会においては、研究者同士の交流が活発に



写真3 パネルディスカッション中の様子：白熱した議論がかわされました



写真4 ポスター発表の様子



写真5 懇親会の様子：夜遅くまで話に花が咲きました。

行われました。初日の夕食後には恒例の研究室紹介が行われ、参加者のアイデアを凝らした発表に会場は盛り上がりました。研究室紹介を皮切りに、懇親会では学生、ポスドク、教員、企業からの参加者の皆さんが入り混じって、大いに盛り上がりました。

### 第20回研究会を振り返って

第20回若手NMR研究会は、多くの方々のご協力の下で盛会のうちに終えることができました。ご参加いただきました皆様、ご講演いただいた方々、協賛企業や後援学会、また会場とさせてい

ただいたホテルたつきの皆様に、この場をお借りして心よりお礼申し上げます。

最後に、次回の第21回若手NMR研究会は京都大学 森本大智先生が中心となり開催される予定となっております。ご参加、ご講演、ご宣伝等、引き続き当研究会にお力をお貸しいただければ幸いです。

第20回若手NMR研究会ホームページ  
<https://groups.ims.ac.jp/organization/seimei/20thNMRHP/index.html>

## EUROISMAR 2019参加報告書

京都大学工学研究科分子工学専攻博士後期課程2年

西澤 茉由

nishizawa.mayu.85a@st.kyoto-u.ac.jp

この度、日本核磁気共鳴学会の令和元年度第1回若手研究者渡航費助成の支援を受け、2019年8月25日から8月30日までの6日間、ドイツのベルリンで開催されたEUROISMAR 2019に参加致しました。本助成金により海外におけるNMRの国際学会に参加させていただいたことを、故京極好正先生と故阿久津政明様ならびにご家族の皆様、株式会社エルエイシステムズ、日本核磁気共鳴学会加藤晃一会長、若手研究者渡航費助成金選考委員長・池上貴久先生をはじめとする関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

開催地であるベルリンでは日中の気温が30度前後のうだるような暑さであり、湿気はないものの例年とは異なるようで、日本から暑さを連れてきてしまったのではと錯覚してしまうような気候でした。オープンセレモニーではNMRとEPRの歌がジャズテイストで演奏され、これが海外学会なのか！と初めての海外学会の雰囲気に大いに感動いたしました。このように素敵な音楽から始まった欧州最大規模のNMR学会である本会ですが、今年はISMARと合同で開催さ

れ、口頭発表やポスター発表を含め700題を超える発表が行われました。口頭発表の中で特に印象的だったのはPeter Wright先生のTAZ1に対するHIF-1 $\alpha$ 及びCITED2の結合競合性、Markus Zweckstetter先生のTauタンパク質の液-液相分離、Phil Selenko先生のin-cell NMR法の歴史およびエレクトロポレーションの細胞導入条件の検討、Ulrich Scheler先生のRheo-NMR法を用いたポリマーの動的解析、Fabien Ferrage先生の二磁場NMR分光法などでした。多くの論文でお名前を拝見してきた著名な先生方の講義を生で聴くことができ、とても充実していました。

ポスター発表は開催2日目の14-16時、3日目の14-16時と2日間に分けて行われました。報告者は“weak interaction between ATP and proteins”と題したポスターを発表致しました。近年、生体内のエネルギーの貯蔵や供給、運搬を仲介するアデノシン三リン酸(ATP)がタンパク質の線維化を阻害することが明らかにされました<sup>[1]</sup>。また、ATP濃度の低下と神経変性疾患に関連性があることが報告されたことから<sup>[2]</sup>、ATPの線維化阻



写真1 会場の様子

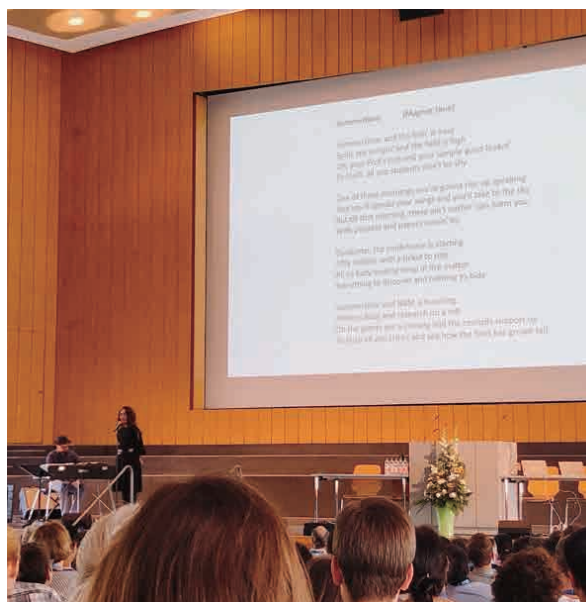


写真2 オープニングセレモニーの様子



写真3 ポスター会場の様子



写真4 ベルリンケバブ

害能の分子基盤の解明は、神経変性疾患の治療法開発に重要な知見となることが期待されます。標的タンパク質との非共有結合性の相互作用により、ATPは線維化の阻害能を持つと考えられますが、なぜ阻害能を持つのか、相互作用に選択性や特異性があるのかは不明です。そこで私の研究では、溶液NMR、剪断流を与えながらリアルタイム測定が可能なRheo-NMR法、固体NMR法を用いてATPと標的タンパク質との相互作用を原子レベルで解析し、線維化の阻害機構を解明することを目的としています。事前にintroductionからdiscussionまで丸々発表原稿を覚えたのと裏腹に、聴者の方々からは全部の説明はいらぬ、端的に結論を説明してほしい、質問だけでいい、といった声も多く、国内学会と海外学会との違いを感じました。結合強度はどのくらいなのか、どのようにしてNMRで線維化過程を追うことができるのか、他のヌクレオチドは調べたのかといったご質問も多々頂き、ポスターセッションの前後で

英語でのコミュニケーションの実力が向上したのではないかと考えております。もっと英語が話せたら上手く伝える事ができるのにと悔しい場面もあったため、帰国後の課題としてこれから精進して参りたいと思います。また、発表を聞いていただいた方が最後に「あなたの研究面白いね」とお声がけしてくださった際には、研究者として今一度やりがいと感動を覚えました。本学会で得た知見などを、自分の研究や研究室でのディスカッションに取り入れるべく、論文や講義に対するアンテナを日常から張っていきたいと思います。最後に、貴重な機会を与えてくださいました日本核磁気共鳴学会に重ねて御礼申し上げます。

#### References

- [1] Patel, A., et al., ATP as a biological hydrotrope. *Science*, **356**, 753-756 (2017).
- [2] Pathak, D., et al., The role of mitochondrially derived ATP in synaptic vesicle recycling. *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 22325-22336 (2015).

# 8<sup>th</sup> Asia-Pacific NMR Symposium 2019 参加報告書

理化学研究所環境資源科学研究センター 特別研究員

朝倉 大河

Taiga.asakura@riken.jp

この度、日本核磁気共鳴学会の令和元年度第1回若手研究者渡航費助成の支援を受け、2019年7月3日から6日の期間シンガポール共和国で開催されたAP-NMR Symposium 2019に参加致しました。本助成金により海外におけるNMRの国際学会に参加させていただいたことを、故京極好正先生と故阿久津政明様ならびにご家族の皆様、株式会社LAシステムズ、日本核磁気共鳴学会 加藤晃一会長、若手研究者渡航費助成金に関して細やかに対応して下さった池上貴久先生をはじめ関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

本学会が開催されたシンガポールは東南アジアの中心部に位置し、貿易の栄えた歴史背景から街並みや行き交う人々からは多様で熱気溢れる印象を受けました。会場となったNanyang Technological Universityは2018年の世界大学ランキングでは11位を獲得した名門大学であり、近代的な建物と200haの広さには圧倒されるばかりでした。

本学会では100近くの口頭講演と100近くのポスター発表が行われ、その中では私は“Machine-learning Based Growth Modeling of Fishes



写真1 ポスター発表会場

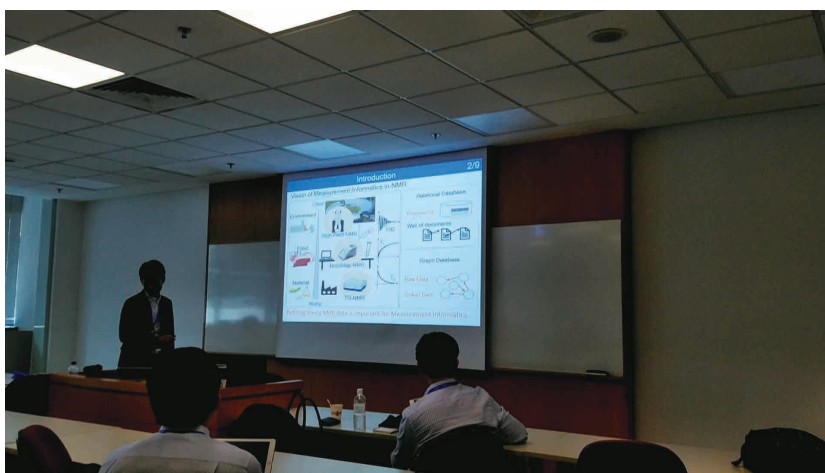


写真2 口頭発表会場

and Integrated Analysis of NMR Profiles and Environmental Factors” という演題でポスター発表を行いました。水産養殖においてNMRの実用的な応用を目指す本発表において、メタボロミクスと深層学習の組み合わせについては多くの関心を得て、有意義な議論を交わすことができました。同様に水産分野での応用に関してはPusan National University, Suhkmann Kim 先生研究室に所属するSeonghye Kim氏とSeohee Ma氏がそれぞれイシダイとエビの感染症についてHR-MAS NMRによって健康体と感染症の判別が可能であることを示していました。残念ながらポスター周囲でお会いすることができず、議論には至りませんでした。彼らの今後の動向について着目していこうと考えております。

メタボロミクスの分野ではNanyang Technological UniversityのYulan Wang先生がB型肝炎ウイルス治療においてGlutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase 1 および choline kinase  $\alpha$  が指標となることを示し、The University of New South WalesのCaroline Rae先生からは脳の代謝情報を得るためのEdited  $^1\text{H}$ -MRSによる情報の最適化など行うなど、多く方によってNMRが仮説を得るための強力なツールであるが示されていま

した。

その他興味深い話題として、東京大学の西田紀貴先生はNMR管内の嫌気環境を克服した新しいバイオリクターシステムについて開発し、それらによって細胞内タンパク質-タンパク質複合体の結合表面の同定について示していました。5時間を超える生きた細胞の計測に関して、自身の研究に(例えば魚卵などに)応用できるのではないかと、大変刺激となりました。また、Kunming Institute of BotanyのTao Huang先生は、試料から直接抽出された混合物から物質を帰属するための新しいアルゴリズムについて発表がありました。HSQC、H2BC、高分解ピュアシフトHSQCの特徴を活かした物質帰属は高精度の帰属が可能で、NMRの特性を十分に発揮することが帰属において重要性を持つことが感じられました。

本発表では多くの方々と議論させていただき、口頭発表は大変勉強となり学会期間を大変有意義に過ごすことができました。また今後、本学会で集めた情報・応用などを自身の研究に取り入れるべく、詳細や動向について追跡し、NMR研究の向上・発展に貢献できるよう尽力いたします。最後に、貴重な機会を与えてくださいました日本核磁気共鳴学会に重ねて御礼申し上げます。

## 日本核磁気共鳴学会の決定事項

## 2018年度 通常総会 議事次第

2018年9月6日(木)未明に発生した北海道胆振東部地震の影響により、9月18日正午に予定していた通常総会をメール総会にて実施した。

## 総会次第

1. 開会の辞
2. 会長挨拶
3. 第57回NMR討論会(2018)世話人挨拶
4. 事業報告
5. 2017年度収支決算の承認
6. 2019年度収支予算案の承認
7. 2019年度役員(評議員(H31-H32))の選任
8. 日本核磁気共鳴学会会則の改訂
9. 第58回NMR討論会(2019)世話人挨拶
10. その他
11. 閉会の辞

## 会員数

会員種別	2016年 9月30日	2017年 9月30日	2018年 8月31日
正会員	436	428	427
学生会員	147	125	124
名誉会員	12	12	12
賛助会員	8	7	7
合計	603	572	570

## 2018年度現役役員名簿

## 会長(2018-2019)

加藤 晃一 自然科学研究機構

## 理事 会長(\*) 副会長(\*\*)

加藤 晃一\* 自然科学研究機構

池上 貴久\*\* 横浜市立大学

浅野 敦志 防衛大学校

伊藤 隆 首都大学東京

片平 正人 京都大学

河合 剛太 千葉工業大学

神田 大輔 九州大学

嶋田 一夫 東京大学

竹腰清乃理 京都大学

## 会計監査(2018-2019)

鈴木 悠 福井大学

武藤 裕 武蔵野大学

## 評議員(2018-2019)

池上 貴久 横浜市立大学

大木 進野 北陸先端科学技術大学院大学

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

金橋 康二 新日鐵住金(株)

小林 直宏 大阪大学

嶋田 一夫 東京大学

竹内 恒 産業技術総合研究所

竹腰清乃理 京都大学

楯 真一 広島大学

堤 遊 ブルカージャパン(株)

出村 誠 北海道大学

枳尾 尚哉 帝京大学

西村 善文 横浜市立大学

野村 薫 サントリー生命科学財団

半沢 宏之 第一三共RDノバール(株)

廣明 秀一 名古屋大学

## 評議員(2017-2018)

浅野 敦志 防衛大学校

伊藤 隆 首都大学東京

河合 剛太 千葉工業大学

川村 出 横浜国立大学

木川 隆則 理化学研究所

菊地 淳 理化学研究所

北原 亮 立命館大学

神田 大輔 九州大学

佐藤 一 ブルカー・バイオスピン(株)

武田 和行 京都大学

枳尾 豪人 京都大学

西山 裕介 日本電子(株)

松木 陽 大阪大学  
 三島 正規 首都大学東京  
 村田 道雄 大阪大学  
 山田 和彦 高知大学

ご協力いただきまして、どうもありがとうございました。

日本核磁気共鳴学会  
 会長 加藤晃一

## 事業報告

- I. 現時点での会員数
- II. 活動報告と方針の提案

### ●2017年度

1. 第56回NMR討論会(2017)
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8巻の発行
5. その他

### ●2018年度

1. 第57回NMR討論会(2018)
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9巻の発行
5. その他

### ●2019年度(方針)

1. 第58回NMR討論会(2019)
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10巻の発行
5. その他

## 日本核磁気共鳴学会役員

2019年度の評議員が選出、承認された。

### 評議員(2019-2020)

相沢 智康	北海道大学
伊藤 隆	首都大学東京
河合 剛太	千葉工業大学
川村 出	横浜国立大学
木川 隆則	理化学研究所
菊地 淳	理化学研究所
北原 亮	立命館大学
神田 大輔	九州大学
菅瀬 謙治	京都大学
西山 裕介	(株) JEOL RESONANCE
松木 陽	大阪大学
三島 正規	首都大学東京
矢澤 宏次	(株) JEOL RESONANCE
山口 秀幸	味の素(株)
山田 和彦	高知大学
山本 泰彦	筑波大学

2019年度選出の新評議員から新理事(追加分)が選出された結果、2019年度の理事は以下のように決定した。2018年12月1日(土)開催の第9期第3回理事会にて役員選挙担当理事より報告がなされた。会計監査は2018年度より継続する。

## 2018年度 通常総会 議事録

日本核磁気共鳴学会  
 正会員 各位

10月4日までにメールにて実施いたしました総会についてのご報告です。

一般会員(正会員)数が427名(8月31日現在)であるのに対し、表決権行使が99名、委任状9名の合計108名の「出席」により成立し、承認99名によりすべての議題が承認されました。

理事 会長(\*) 副会長(\*\*)

加藤 晃一*	自然科学研究機構	(2018-2019)
池上 貴久**	横浜市立大学	(2018-2019)
伊藤 隆	首都大学東京	(2019-2020)
片平 正人	京都大学	(2018-2019)
河合 剛太	千葉工業大学	(2019-2020)
木川 隆則	理化学研究所	(2019-2020)
神田 大輔	九州大学	(2019-2020)
嶋田 一夫	東京大学	(2018-2019)
竹腰清乃理	京都大学	(2018-2019)
山本 泰彦	筑波大学	(2019-2020)



## 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。

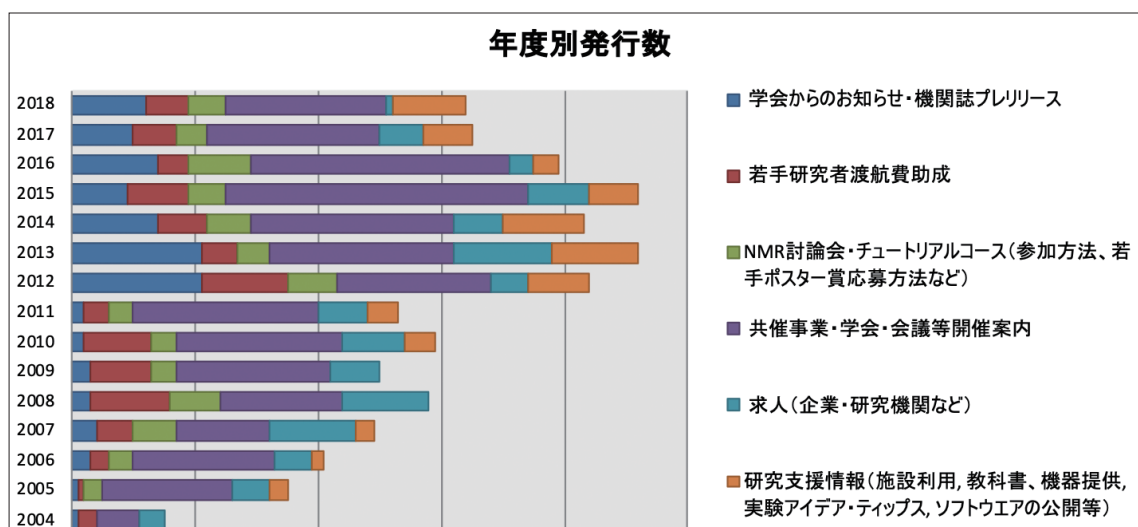
### ◎バックナンバーの閲覧方法

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.865-926 (2018年4月～2019年3月)



## ニュースレター投稿規定

本ニュースレターは日本核磁気共鳴学会会員相互のNMRに関する情報交換の場を提供するものです。会員からの情報提供(投稿)を随時受け付けます。お送りいただいた原稿は、原則として無審査で掲載しますが、NMRに無関係のものや公序良俗に反するなど本レターに不適切と理事会で判断したものは掲載不可とします。なお文責は投稿者にあり、本学会はレターの内容に起因するトラブルには一切責任を負わないものとします。

投稿ご希望の方は投稿規定をご覧いただき、原稿(PDF)を指定送付先(※)までお送りください。

### [1] ニュースレターの内容について

#### ▶学会からのお知らせ・学会誌新着情報

学会・学会事務局から会員への連絡事項。日本核磁気共鳴学会機関誌の新着情報。

#### ▶若手研究者渡航費助成

若手研究者渡航費助成金(旧:京極記念基金)により参加された方の報告書。

#### ▶NMR討論会・チュートリアルコース

NMR討論会の発表・参加案内。チュートリアルコースの参加案内。若手ポスター賞応募方法など。

#### ▶共催事業・学会・会議等開催案内

講演会・研究会のお知らせ。国際会議の開催案内、参加報告(内容・感想等)。研究室の訪問者による小規模セミナー等で部外者参加を歓迎される場合など。

#### ▶求人

企業、研究機関等からの求人情報。博士研究員・教官等の公募案内。

#### ▶研究支援情報

施設利用、教科書(※1)、機器提供(※2)、その他NMRに関する研究支援情報(※3)。

※1:新刊書の書評、最近読んだ興味深い論文の紹介。

※2:新製品情報(新製品の紹介は賛助会員に限らせて頂きます)。不用物品情報(譲り受け等の交渉に関しては直接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ください。3行目に所属・名前を書いてください。一行あけ、5行目から本文を書き始めてください。フォントは角ゴシック体、サイズはタイトル16ポイント、他はすべて12ポイントとしてください。原稿(PDF)はそのまま本学会ホームページに掲載します。

▶送付:原稿(PDF)はメール添付ファイルで指定送付先(※)へお送りください。メールのタイトルは“ニュースレター”としてください。

※指定送付先 [kyoumei\\_postman@sci.hokudai.ac.jp](mailto:kyoumei_postman@sci.hokudai.ac.jp) (2017年4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 会員は別に定める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。

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することができる。

第10条 本会には、次の役員 (理事、評議員) および会計監査をおく。

1. 理事 10名以内 (会長、副会長各1名を含む)  
ただし、会長の理事任期が3年目になる場合は11名以内。

2. 評議員 35名以内 (理事を含む)

3. 会計監査 2名

第11条 役員は一般会員の中から一般会員の投票により選出され、総会で承認を得るものとする。理事は役員の内選により決定する。会長、副会長は理事の内選による。会計監査は役員 (理事、評議員) 以外の一般会員の中から一般会員の投票により選出される。役員の内選は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持って

- 決する。ただし、可否同数のときは議長がこれを決する。一般会員は総会における議決権の行使を他の出席者に書面をもって委任することができる。
- 第20条** 評議員会は会長がこれを招集して議長となる。評議員会は年1回以上これを開く。ただし、理事会が必要と認めた場合はこれを開かなければならない。
- 第21条** 評議員会は2分の1以上の出席がなければ開くことができない。ただし、出席者に書面をもって委任することができる。評議員会の議事は出席者の過半数の同意をもって決し、可否同数の場合は議長がこれを決する。
- 第22条** 理事会は会長がこれを招集して議長となる。理事会は会則に定めてある事項ならびに総会および評議員会の執行について議決する。
- 第23条** 理事会は3分の2以上の出席がなければ開くことができない。理事会の議事は出席者の過半数の同意をもって決し、可否同数の場合は議長がこれを決する。ただし、理事会に出席できない理事はあらかじめ通知された事項について書面をもって議決に加わることができる。理事会があらかじめ通知していない事項について可決した場合は、これを欠席理事に通知しその賛否を求め、理事会の決議とすることができる。
- 第24条** 理事会は年1回以上開催するものとする。
- 第25条** 本会の会計年度は4月1日に始まり、翌年3月31日に終わる。
- 第26条** 本会則の施行についての細則は別に定め、その変更は理事会の議決を経る。
- 第27条** 本会則の変更ならびに本会の解散は総会の議決を経る必要がある。
- 第28条** 本会則は、2001年11月15日より施行する。
- 第29条 付 則**
- 2004年4月から3年間は経過措置として、役員  
の半数の任期を3年とすることができる。
- 2001年11月15日  
日本核磁気共鳴学会総会議決
- 2002年4月1日  
制定
- 2002年11月7日  
改定
- 2003年11月26日  
改定
- 2008年11月12日  
第10条 評議員数、および第11条 会長の非  
連続選出について  
改定
- 2009年11月11日  
第10条、第11条、第12条  
改定
- 2016年11月17日  
第11条  
改定
- 2017年11月14日  
第8条  
改定
- 2018年9月18日  
第8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条** 会員の会費は次の通りとする。

一般会員 年額 7,000円

学生会員 年額 1,000円

賛助会員 年間 一口以上（一口 50,000円）

### 第2章 総会

**第3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  
なければならない。

**第4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  
なければならない。

### 第3章 役員を選出

**第5条** 毎年役員を半数を改選する。役員および  
会計監査の候補者は次のものの中から一般会員  
の投票によって選ぶ。

1. 立候補した一般会員

2. 一般会員が推薦した一般会員（以下会員推薦候補者）
3. 理事会が推薦した一般会員（以下理事会推薦候補者）
4. 会計監査と役員を兼ねることはできない。
- 第6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7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8条 本学会に学会機関誌編集委員会をおく。

#### 第9条

1. 学会機関誌編集委員長は会長が理事または評議員の中から指名し、理事会の承認をもって決定する。
2. 編集委員長が理事以外から選出された場合には、会長は第6条に基づき編集委員長を幹事に任命する。

第10条 学会機関誌編集委員は編集委員長が評議員から過半数を、残りを会員の中から指名し、理事会の承認をもって決定する。

第11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12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 〒650-0034 神戸市中央区京町83番地 三宮センチュリービル3F(株)プロアクティブ内

第13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14条 本細則の変更は理事会の議決による。

第15条 本細則は、2001年11月15日よりこれを実施する。ただし、本会発足時、第1回の役員を選出および幹事の承認は総会で行うものとし、それらの任期は2004年3月31日までとする。

2001年11月15日

日本核磁気共鳴学会総会議決

2002年4月1日

制定

2002年11月6日

改定

2003年6月21日

改定

2003年11月25日

改定

2005年6月25日

改定

2007年5月12日

改定

2008年4月29日

第5条-3 非選出期間の設定ならびに文言の修正。

第11条 プロアクティブの移転に伴う住所の変更。

改定

2008年11月11日

第6条 幹事の選出、任期について

改定

2009年3月21日

第4条、第5条

改定

2012年11月7日

第5章 第7, 8, 9条 学会機関誌編集委員会の定義について追加

改定

2013年3月17日

第5章 第10条 学会機関誌編集委員の定義について追加

改定  
2014年3月9日  
第5章 第9条と第10条の内容を交換  
改定  
2017年11月13日  
第11条 プロアクティブの移転に伴う住所の  
変更。  
改定  
2018年7月21日  
第1章 第2条 会費の定義について追加  
改定  
2018年7月21日  
第5章 第9条および第10条の内容を修正追加  
改訂

### 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、得票数のもっとも多

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研究会便り

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600dpi以上の

解像度で作成してください。

- ・ 図、表には、番号を付すと共に、それぞれの説明を記入してください。
  - ・ 引用文献は、次を参考にして書式を統一して下さい。
- 1) Javkhlantugs, N., Naito, A. and Ueda, K., (2011) Molecular dynamics simulation of bonbolitin II in the dipalmitoylphosphatidylcholine membrane bilayer. *Biophys. J.* **101**, 1212-1220.
  - 2) 内藤 晶 (2011) 光センサータンパク質の情報伝達機能. 化学 **66**, 68-69.
  - 3) Saito, H., Ando, I. and Naito, A., (2006) Solid State NMR Spectroscopy for Biopolymers. Principles and Applications. pp. 1-464, Springer, Dordrecht.



## 賛助会員名簿

ブルカージャパン 株式会社

株式会社 JEOL RESONANCE

太陽日酸 株式会社

株式会社 シゲミ

味の素 株式会社

ジャパン スーパーコンダクタ テクノロジー 株式会社 (JASTEC)

昭光サイエンス 株式会社

令和元年11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まして、厚く御礼申し上げます。

## 日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員会委員名簿 (2018-2019年度)

委員長	池上 貴久	横浜市立大学
副委員長	児嶋長次郎	横浜国立大学
	橋本 康博	旭化成
委員	浅野 敦志	防衛大学校
	三島 正規	首都大学東京
	野村 薫	サントリー生命科学財団
	北原 亮	立命館大学
	福士 江里	北海道大学
	村上 美和	京都大学
	西山 裕介	JEOL RESONANCE
	山田 和彦	高知大学
	川村 出	横浜国立大学
	小林 直宏	大阪大学
	栃尾 尚哉	帝京大学

## 編集後記

NMR学会の機関誌 Vol.10 をお届けいたします。

当巻ではいつもとは異なり、若手ポスター賞に関する記事（選考経緯報告や受賞者の要旨）がございません。これは2018年度のNMR討論会が北海道胆振東部地震により残念ながら札幌で開催できなかったためです。その分を補う意味もあり、別の記事3編を「研究報告」として加えました。ちょうど当学会が内藤晶先生を中心としたNMR書籍編集委員会を置き、書籍“*Experimental Approaches of NMR Spectroscopy* (Springer)”を出版した直後でしたので、その中の著者3名に日本語でのダイジェストを執筆して頂きました。この記事の機会に同書籍にもご興味をもって頂けますと幸いです。お陰様をもちまして、例年のページ数とほぼ同じ容量、そして質を保つことができたのではないかと思います。ご参考までに広告を除いた各巻のページ数を以下に示します（第1巻：146，第2巻：63，第3巻：177，第4巻：154，第5巻：146，第6巻：109，第7巻：128，第8巻：135，第9巻：130，第10巻：137ページ）。

いつものことながら、当巻にも多くの企業や団体様から広告をお寄せ頂きました。こちらからの依頼がだんだんと事務的になってしまい、後から出来上がった冊子体の山を見て、その有り難さをしみじみと感じる次第です。

これもいつものことですが、各記事が非常にきれいにフォーマットされていることにお気づきかと思えます。私はこれまで存じませんでしたが、株式会社クバプロの編集ご担当の方々は、どうも各記事の参考文献の番号の順番までチェックされているようでした。校正刷りをみて、その指摘事項に驚かれた著者も多かったのではと思います。今回は発刊が大幅に遅れることを覚悟していたのですが、特別のお願いを受け入れていただき、このような形で何事も無かったかのように発刊にこぎつけることができました。

最後になりましたが、たいへん興味深い記事を寄稿して下さった著者の先生方、郵送などにご協力いただいた事務局（株式会社プロアクティブ）の方々、短時間にもかかわらず細かく査読していただいた編集委員の皆様には厚くお礼申し上げます。

2019年 霜月3日

核磁気共鳴学会誌 編集委員長 池上貴久

**NMR**

**BULLETIN OF THE NUCLEAR  
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN**

**Vol.10**

2019年 11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

# 固体NMRアクセサリ

# LAS

各種プローブ、ローター、サンプリングツール等を取り揃えています。

Revolution NMR, LLC

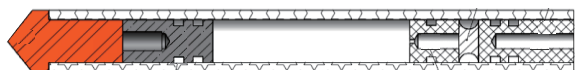
Equipment You Trust  
From People You Know

Agilent/VarianおよびCMXプローブに完全互換



MASモジュール  
(自作プローブ用)

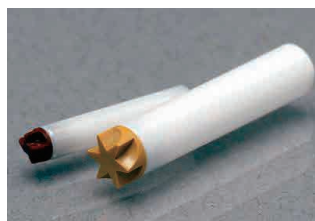
Agilent用MASローター  
(1.2mm - 9.5mm)



液体サンプル測定用スペーサー

ROTOTEC  SPINTEC

Brukerプローブに準拠



Bruker用MASローター  
(2.5mm - 7mm)



キャップリムーバー  
(1.3mm - 4mm)



Oリング付きMASキャップ  
(左: Kel-F, 右: Vespel)

 PHOENIXNMR  
Elevating your science

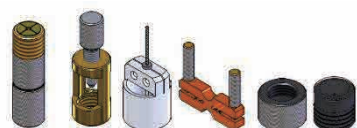
Agilent/Varian T3プローブの正統派後継機



プローブヘッド



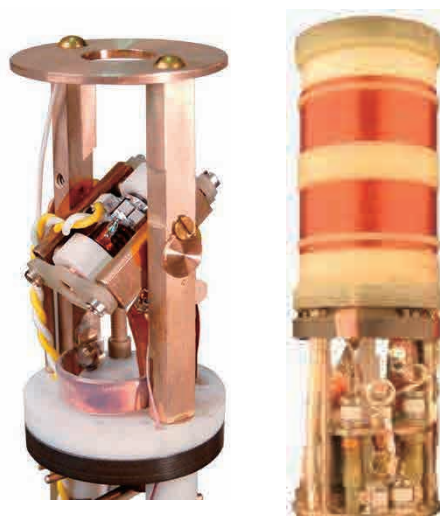
MASコントローラー



FastMASサンプリングツール

 DOTY  
SCIENTIFIC

高温MASプローブ、Diffusionプローブ

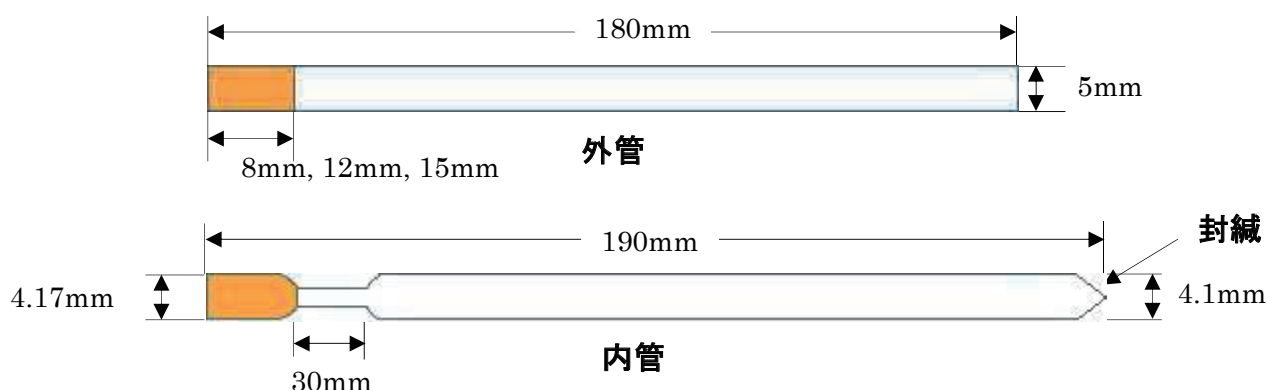


株式会社エルエイシステムズ

〒110-0005 東京都台東区上野1-11-5 時計会館ビル1F

TEL : 03-5812-5311 E-mail : support@las.jp URL : https://www.las.jp

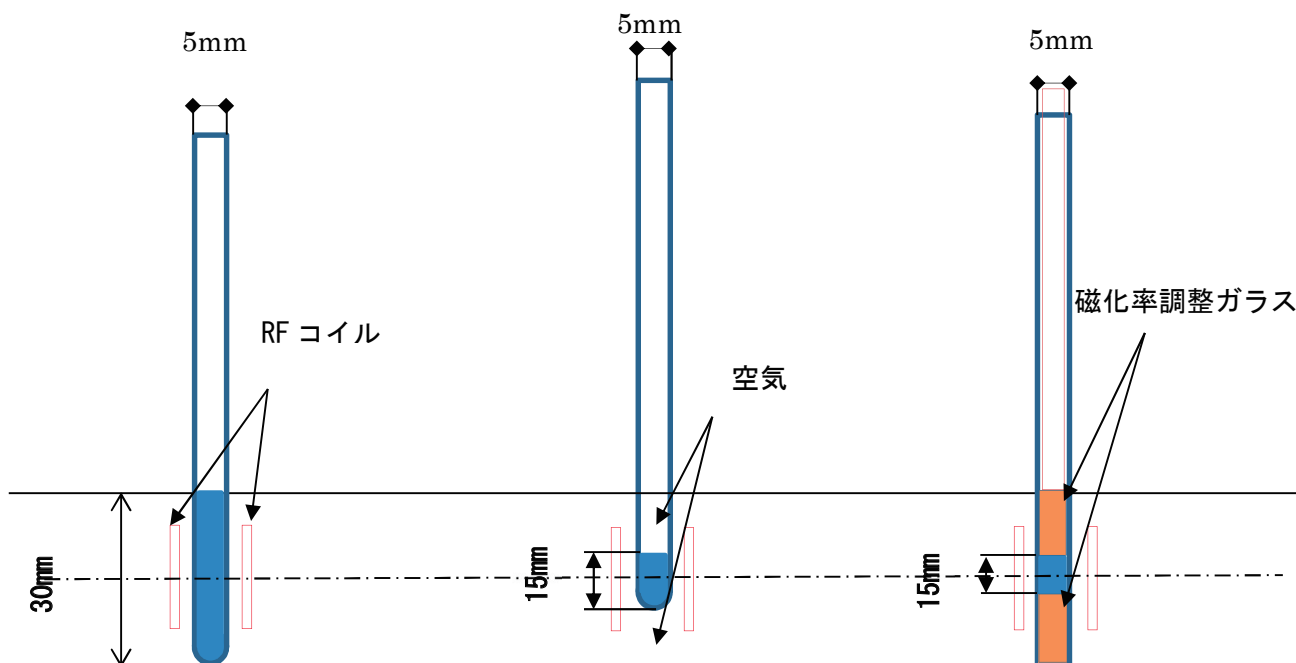
# Aceton-d<sub>6</sub> 用対称形マイクロサンプルチューブ



5mm サンプルチューブ

5mm サンプルチューブ

対称形マイクロサンプルチューブ



## 5mmφ用プローブでの測定例

5mmφサンプルチューブにシムが十分調整可能な液高に注入。	5mmφサンプルチューブに濃度を上げるために溶媒を減らしたが、液高が低いためシム調整できない。	5mmφ対称マイクロ形サンプルチューブに5mmφサンプルチューブの半分の量注入。シム調整問題なし。
液高：30mm	液高：15mm	液高：15mm
量：410 μL	量：210 μL	量：210 μL

2.5mm・3mm・5mm・8mm・10mmのラインアップがあります。

平成21年度「日本化学会科学有効賞」受賞製品

電話 042-624-2207  
FAX 042-622-0937



株式会社 シゲミ

<http://www.shigemi.co.jp>  
mail:shigemi-corp@nifty.com

# 安定同位体標識化合物

## Stable Isotope for Structural Biology

大陽日酸は多次元NMRでの構造解析に必須な安定同位体標識化合物を高品質・お求めやすい価格で販売しております。

### New! 無細胞タンパク質受託合成

無細胞タンパク質合成技術を用いた受託合成を開始しました。  
細胞内タンパク質、分泌系タンパク質、膜タンパク質発現を承ります。

- 鋳型DNA設計・作製
- 条件検討試験
- 発現・可溶性確認試験
- 中量・大量スケール合成

### 無細胞くん®

理化学研究所の高度な無細胞タンパク質合成技術をキット化したしました。大腸菌抽出液を用いており、抗体や膜タンパク質などをはじめ各種タンパク質を迅速・簡便に大量合成し、高効率に安定同位体標識できます。



#### ■ 無細胞くんStart New!

##### 特徴

無細胞タンパク質合成をお手軽にお試しいただけます。小スケール(0.1mL)反応を付属の微量透析カップで6回実施できます。発現量や可溶性の確認および条件検討用に最適です。

製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格(円)
A183-0242	無細胞くんStart	1キット (0.1mL反応×6回分)	-80℃	28,000
A89-0126	無細胞くんSI SS	1キット (1mL反応×1回分)	-80℃	65,000
A29-0059	無細胞くんSI	1キット (1mL反応×1回分)	-80℃	55,000

◎ PCRで調製した直鎖状DNAもご使用いただけます。

国立研究開発法人 科学技術振興機構「産学共同シーズイノベーション化事業」の支援を受け、開発された製品です。

### 無細胞くん用 安定同位体標識アミノ酸・膜タンパク質合成用試薬

#### ■ SAIL メチル・芳香族選択標識

製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
SAT2001	SAIL アミノ酸混合物水溶液	1mL	220,000
G07-0226	[ $\delta$ - $^{13}\text{C}_5$ - $^2\text{H}$ ]Leu+ [ $\gamma$ - $^{13}\text{C}_5$ - $^2\text{H}$ ]Val + 18種重水素標識アミノ酸	1mL	120,000

#### ■ 各種安定同位体標識アミノ酸

製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
A107-0144	アミノ酸混合物水溶液-UL-d	1mL	25,000
A39-0072	アミノ酸混合物水溶液-UL- $^{15}\text{N}$	1mL	15,000
A41-0074	アミノ酸混合物水溶液-UL- $^{15}\text{N}$ ,d	1mL	18,000
A40-0073	アミノ酸混合物水溶液-UL- $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$	1mL	30,000
A42-0075	アミノ酸混合物水溶液-UL- $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ,d	1mL	35,000
A91-0128	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Arg-UL- $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$	1mL	20,000
A92-0129	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Leu-UL- $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$	1mL	20,000
A108-0145	アミノ酸混合物水溶液-SeMet	1mL	12,000

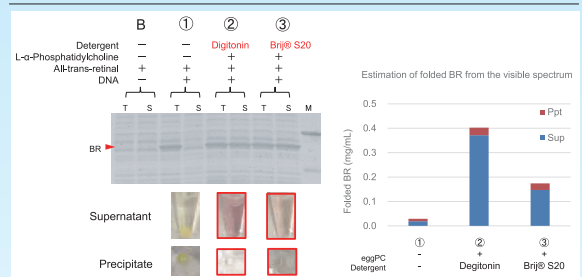
20種類のアミノ酸を含有しております。

#### ■ 膜タンパク質合成用試薬

製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
A226-0290	膜タンパク質合成用添加剤 Set A	1キット	20,000

#### 膜タンパク質 発現例

##### Bacteriorhodopsin



Purplish brown color represents proper folding of Bacteriorhodopsin.

#### 用途例

- ◎ スクリーニング用多検体発現、細胞毒性タンパク質発現、変異体発現
- ◎ 多次元NMR、クライオ電子顕微鏡、X線回折、中性子線回折等による構造解析用タンパク質発現
- ◎ 質量分析用安定同位体標識タンパク質発現

#### 核酸

- **New!** 10%, 20% Phosphoramidites ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , d)
- NTPs / NMPs ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , d) ● RNA-DNAオリゴマ合成

#### 培地

- D-Glucose ( $^{13}\text{C}$ , d) ● Salts ( $^{15}\text{N}$ , d)
- Deuterium Oxide 99.9atom%

#### アミノ酸・ケト酸

- L-Amino Acids ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , d) ● Algal Amino Acids ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , d)
- $\alpha$ -Keto Acids ( $^{13}\text{C}$ , d)

#### その他

- **New!** Lanthanide Tag
- Water- $^{17}\text{O}$  (10-90atom%) ● Pf1 NMR Cosolvent

※ 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>



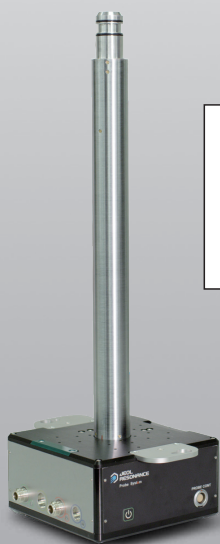
**大陽日酸**  
The Gas Professionals

# 溶液 NMR の操作性を 固体 NMR の世界に!

## Automated solid state NMR system

固体試料測定に溶液プローブの使い勝手と操作性をもたらす  
新開発のAUTOMASプローブとローターキャリアは、これまで  
固体NMR測定にハードルを感じていた溶液NMRユーザーに  
とってブレークスルーとなる画期的なシステムです。

既存のオートサンプルチェンジャーの機能と、溶液プローブと共通の  
オートチューニングユニットが使える、溶液NMRのように固体NMRの  
連続自動測定が可能です。オートサンプルチェンジャーやオート  
チューニングユニットを各々に用意することなく、溶液と固体の試料  
測定が行えます。



AUTOMAS プローブ

AUTOMAS PROBE



ローターキャリアー

ROTORCARRIER



本社・昭島製作所 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2 TEL:(042)543-1111(大代表) FAX:(042)546-3353  
www.jeol.co.jp ISO 9001・ISO 14001 認証取得

JEOLグループは、「理科学・計測機器」「産業機器」「医用機器」の3つの事業ドメインにより事業を行っております。  
「理科学・計測機器事業」電子光学機器・分析機器・計測検査機器 「産業機器事業」半導体関連機器・産業機器 「医用機器事業」医用機器

不純物確認試験や定量試験に最適な重溶媒！

# 高純度NMR溶媒

NMR測定に影響する不純物を低減した化学純度の高いNMR測定用溶媒です。

本製品は水分と軽水素溶媒以外のシグナル※1を認めません。

※1……ベースラインの強度差の30%以上のシグナルを指します。

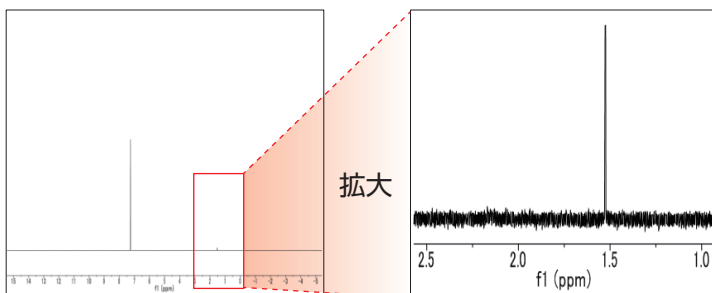
## 製品概要

製品規格（クロロホルム-d,99.8%（高純度）の場合）

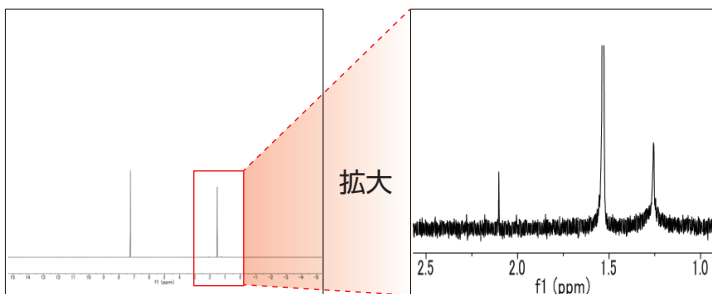
試験項目	規格値
外観	無色透明の液体
水分	0.003%以下
重水素化率	99.8%以上
含量（GC）	99.9%以上
不純物（NMR）（ <sup>1</sup> H）	試験適合
不純物（NMR）（ <sup>13</sup> C）	試験適合
不純物（NMR）（ <sup>31</sup> P）	試験適合
不純物（NMR）（ <sup>19</sup> F）	試験適合

## <sup>1</sup>H NMR チャート例

■ 当社クロロホルム-d, 99.8%（高純度）



■ 他社品



## クロロホルム-d

	当社	他社品
水分	0.003% 以下	0.0015%（成績値）規格：0.01%以下
含量	99.9% 以上	99%以上
不純物（NMR）（ <sup>1</sup> H）	試験適合	1.25, 1.51, 2.10ppm 付近に不純物ピークあり
不純物（NMR）（ <sup>13</sup> C）	試験適合	—
不純物（NMR）（ <sup>31</sup> P）	試験適合	—
不純物（NMR）（ <sup>19</sup> F）	試験適合	—





## 構造生物学研究を変える 1.2 GHz NMR

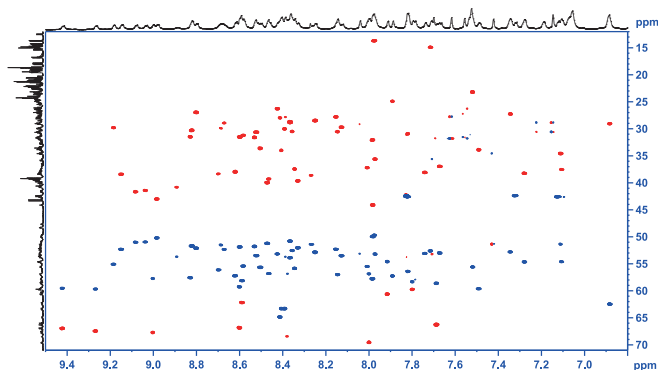


Fig. 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  plane of 3D BEST-TROSY HNCOCACB  
0.5 mM Ubiquitin  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , 3 mm TCI CryoProbe

### 世界初の安定で均質な Ascend 1.2 GHz NMR 磁石

高分子量のタンパク質や変性タンパク質、その複合体は、NMRスペクトルの狭い領域に多くのシグナルが観測されるために、解析が困難でした。1.2 GHz NMRの威力で、これまでの限界が変わります。

For more information please visit: [www.bruker.com](http://www.bruker.com)

ブルカージャパン株式会社

バイオスピン事業部

[info.bbjo.jp@bruker.com](mailto:info.bbjo.jp@bruker.com)

本社（横浜営業所）

〒221-0022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9

TEL : 045-444-1390

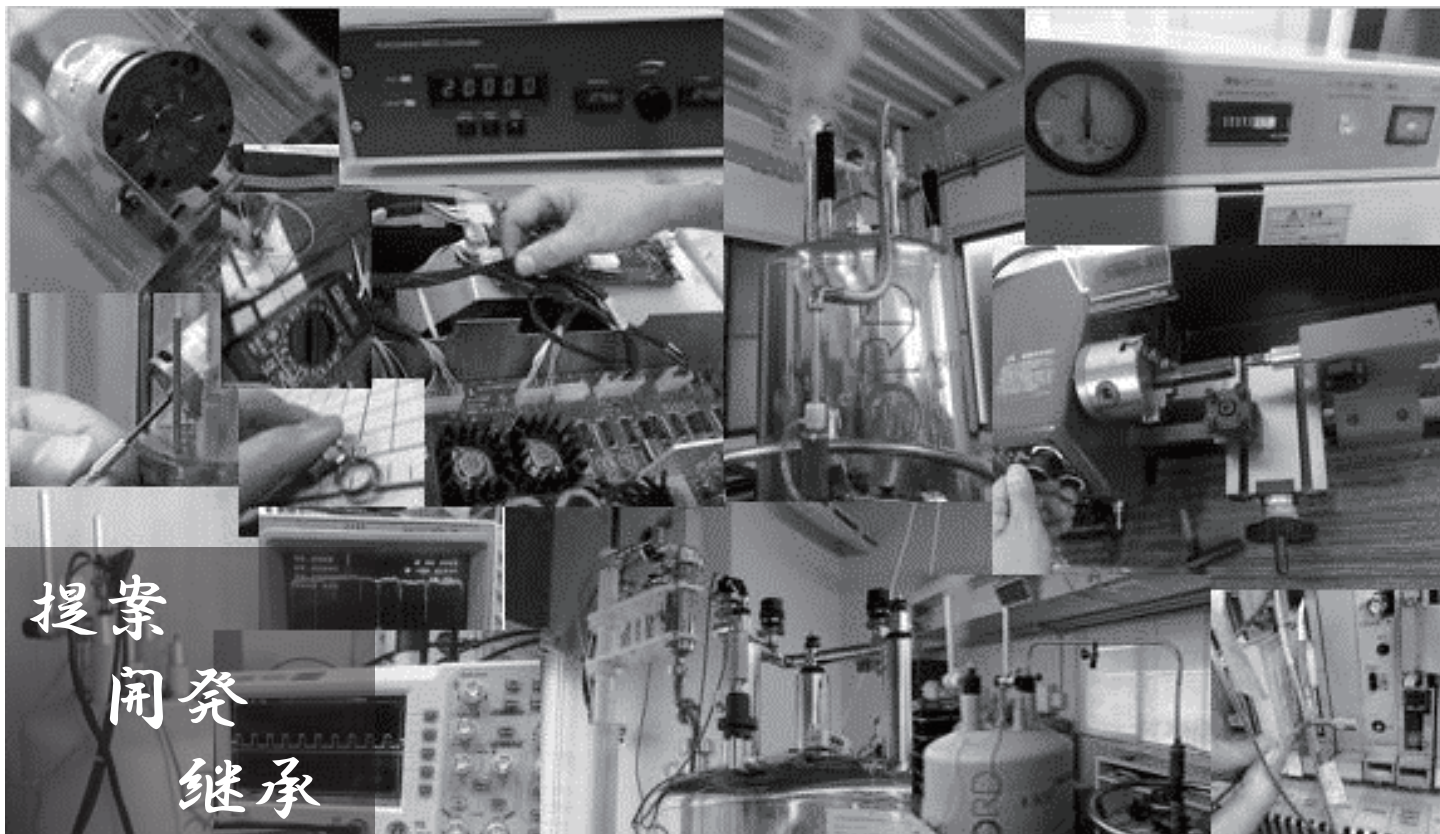
大阪営業所

〒532-0004 大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29 テラサキ第2ビル2F

TEL : 06-6394-8989

Innovation with Integrity

NMR



# 提案 開発 継承

株式会社VARTECではNMR関連のサポートを営んでおります。

## \* NMRサポート / プローブ修理

点検・修理・液体ヘリウム充填作業。移設作業+移設前後の点検・メンテナンス対応  
撤去・廃棄作業などに迅速に対応致します  
プローブ修理例) T3プローブ修理・清掃作業など

## \* Oxford社製マグネット / DNP装置 (HyperSense) サポート

弊社はオックスフォード社と代理店契約を結んでいます。  
マグネットの励磁・消磁 (600MHzまで) やDNP装置の点検等対応可能です

## \* 高圧ガス販売・供給作業

事業一環として高圧ガス販売をしています。  
液体ヘリウム・ヘリウムガス・液体窒素・窒素ガス ※その他要相談  
NMRマグネットへの冷媒充填作業と合わせて依頼を承っております。  
作業後の簡易点検も含まれます。

## \* 液体窒素再凝縮装置 販売・サポート

## \* コンプレッサー及びチラー 販売・メンテナンス

## \* NMR消耗品販売

シゲミ製NMRサンプルチューブ取扱

NMR関連部品のカスタマイズ・NMR関連部品の開発も行っております。  
弊社では現在、固体用サンプルのDriveTipや温度制御装置、回転検知装置などの  
作成に取り組んでいます。  
全ての事業内容に対してお客様のニーズに合わせたご提案が可能です。  
ご相談等は下記URLよりお問い合わせください。



VARTEC

Various Technology Succession

株式会社VARTEC

大阪府吹田市広芝町8-12第3マイダビル304

<http://vartec-inc.com>



文部科学省  
先端研究基盤共用促進事業（共用プラットフォーム形成支援プログラム）  
**NMR共用プラットフォーム ご利用案内**

NMR共用プラットフォームでは、参画機関が保有する  
NMR装置を産業界・アカデミアに開放しています。

各機関の情報や、応募方法等の詳細  
はWebサイトをご覧ください

URL : <http://nmrpf.jp/>

◆ご利用前の相談も随時、承ります。

NMR共用プラットフォーム

検索



各機関では、このほか独自の利用枠を設けております。

**“最先端”装置・技術を核として、“開発”と“利用”を橋渡しし、“知”を蓄え“人”を育てます**

## 北海道大学

北日本最大のNMR施設が皆様を支援します！

- ・食品・農林水産を含む、幅広い産業利用実績！
- ・利用相談・技術支援を専門スタッフが担当！
- ・インターネット教材や実習コースなど、各種NMR教育プログラムも充実！



800MHz溶液NMR  
ランタニドプローブ



600MHz固体NMR  
高速MAS、FG-MAS



装置実習、  
教育プログラム

## 理化学研究所

豊富な実績と経験があります

- ・材料、天然物、生体分子など幅広い試料の溶液・固体NMR測定可能！
- ・タンパク質の発現から解析までの技術支援！
- ・NMR初心者大歓迎！まずは無料トライアル！



900MHz固体NMR  
高速MAS



NMR立体構造解析  
パイプライン



世界最大規模の台数を有するNMR棟

NMRのプロフェッショナルが  
豊富な経験に基づいて、皆様の研究をサポートいたします。

## 大阪大学

世界最大級・最高性能装置群を擁する西の拠点

- ・西日本からのアクセス良好！
- ・高磁場NMRで高分解能スペクトル！
- ・<sup>19</sup>Fライブラリを使ってスクリーニング！
- ・高磁場DNPで高感度NMR測定！



700MHzDNP固体NMR  
高速MAS



950MHz溶液NMR



400MHz溶液NMR  
<sup>19</sup>Fスクリーニング

## 横浜市立大学

世界最高レベルの共用装置群

- ・通常の溶液NMRに加え、LC-NMR、固体NMR、オートサンプラー測定により多くの企業の成果に活用された豊富な実績！<sup>19</sup>Fも最高レベルで測定可能！
- ・NMRリモート測定も対応可能！



950MHz溶液NMR  
LC-NMR、固体NMR



800MHz溶液NMR  
最大480本オートサンプラー



700MHz溶液LC-NMR  
最大16本オートサンプラー  
CryoTCI-Fプローブ装備

### 参画機関

- ◎代表機関 国立研究開発法人理化学研究所
- 実施機関 公立大学法人横浜市立大学  
国立大学法人大阪大学  
国立大学法人北海道大学
- 協力機関 日本電子株式会社、ブルカージャパン株式会社

NMR共用プラットフォームポータルサイト  
URL : <http://nmrpf.jp/>

## 広告掲載一覧

(順不同)

株式会社 エルエイシステムズ

株式会社 シゲミ

大陽日酸 株式会社

日本電子 株式会社

富士フイルム和光純薬 株式会社

ブルカージャパン 株式会社

株式会社 VARTEC

NMR共用プラットフォーム  
(文科省 先端研究基盤共用促進事業)

本学会機関誌へのご賛助に対しまして、厚く御礼申し上げます。