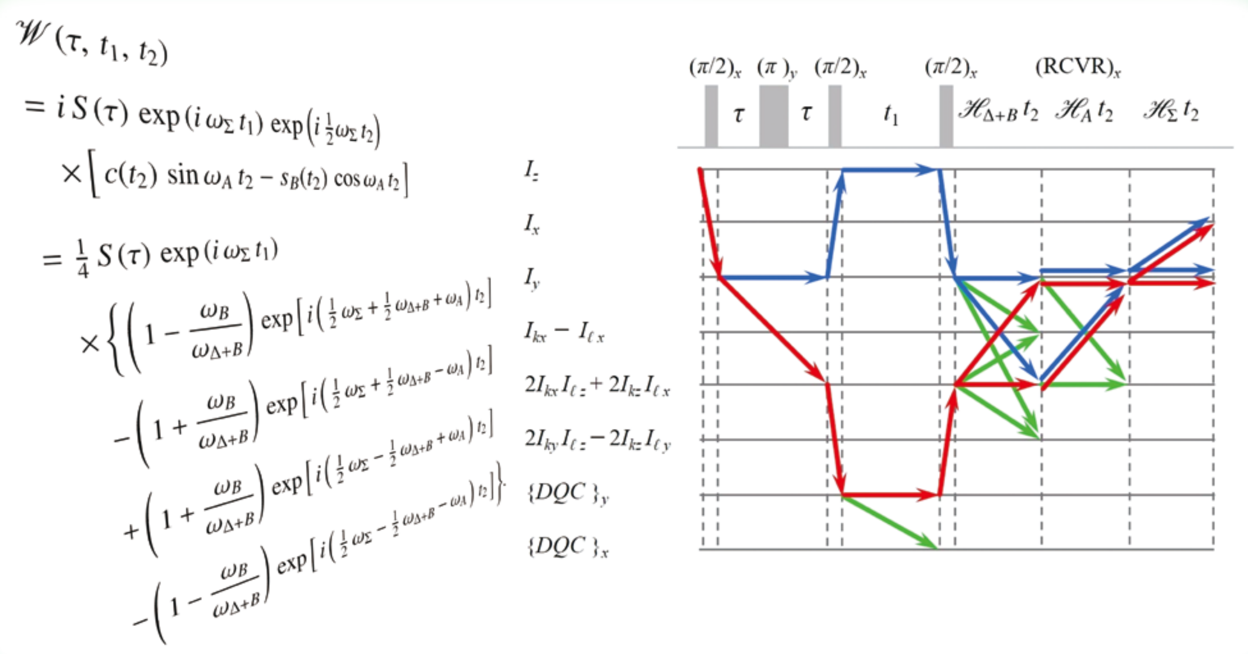
NMR

Bulletin of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

Vol.11 No.1 August 2021

http://www.nmrj.jp

会長メッセージ　池上貴久
Ernst博士追悼文　永山國昭、小林祐次
総説論文：解説　中井利仁、竹内　恒、松木　陽
NMR講座：NMR基礎講座　田中秀幸
NMR講座：NMR史点描　寺尾武彦
2019年度学会顕彰
2020年度学会顕彰
会員便り：海外学会参加報告　徳永裕二



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

表紙の図

（株）JEOL RESONANCE　中井 利仁先生

“密度演算子からプロダクトオペレーターへ

～溶液および固体MAS NMRにおける強く結合したスピン系に

適用できるプロダクトオペレーター理論を中心として～“より

NMR

Bulletin of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

Vol. 11 No.1

August 2021

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

CONTENTS

●会長メッセージ
今の状況をむしろ今後に活かして …… *4*
池上 貴久

●Ernst博士追悼文
わが生涯の師Richard R. Ernst博士を悼む …… *6*
永山 國昭

Ernst先生のご逝去を悼む …… *12*
小林 祐次

●総説論文：解説
密度演算子からプロダクトオペレーターへ
～溶液および固体MAS NMRにおける強く結合したスピン系に
適用できるプロダクトオペレーター理論を中心として～ …… *14*
中井 利仁

NMRを用いた動的構造解析への取り組みと創薬への展開 …… *27*
竹内 恒

高磁場・極低温　動的核分極（DNP）法 ―装置と方法論の開拓と応用― …… *35*
松木 陽

●NMR講座：NMR基礎講座
測定の不確かさ評価についての初歩 …… *45*
田中 秀幸

●NMR講座：NMR史点描
第二次世界大戦とNMR開発（上） …… *50*
寺尾 武彦

●2019年度学会顕彰
若手ポスター賞
第58回NMR討論会（2019）若手ポスター賞について …… *54*

最優秀若手ポスター賞（JEOL RESONANCE賞）
微結晶の三次元磁場配向機構を備えたin situ固体NMRプローブの開発 …… *56*
門間 啓

磁場掃引を用いたSWIFT法 …… *58*
小林 洋太

優秀若手ポスター賞（大陽日酸賞）
免疫応答に関与するHOIL-1Lによる直鎖型ダイユビキチンの認識機構 …… *62*
石井 公貴

若手ポスター賞（2社合同賞）
半整数四極子核の DNP-NMR 信号取得の高速化 …… *64*
永島 裕樹

NMRを用いた定量的なグルタミン分解速度の解析 …… *66*
小倉 立己

●2020年度学会顕彰

顕彰者

2020年度　学会顕彰 …… *68*

特別講演者

「*in situ*動的構造」からみたタンパク質の機能解明 …… *69*

嶋田 一夫

進歩賞

「進歩賞」について …… *70*

若手ポスター賞

第59回NMR討論会（2020）若手ポスター賞について …… *71*

最優秀若手ポスター賞（JEOL RESONANCE賞）

固体NMRによる内向きプロトンポンプロドプシンSchizorhodopsinの
レチナール結合サイトの構造解析 …… *73*

但馬 聖也

優秀若手ポスター賞（大陽日酸賞）

固体DNP-NMRによる高分子担持触媒の構造解析 …… *77*

田中 真司

若手ポスター賞（2社合同賞）

分子動力学法を用いた核スピンシングレット状態の緩和時間計算 …… *79*

本山 誠

Rapid Scan Nuclear Quadrupole Resonance …… *83*

日部 雄太

Adiabatic Pulseを用いた溶媒信号抑制パルスの開発および固体NMR測定への応用 …… *87*

岡部 遼太郎

光受容タンパク質GAFドメインにおける発色団のプロトン化状態の解析 …… *89*

小泉 太貴

piRNAの生成に関与する RNA elementの二次構造解析 …… *93*

髙瀬 直美

●会員便り：海外学会参加報告

64th Annual Meeting of Biophysical Society参加報告書 …… *95*

徳永裕二

会長メッセージ

今の状況をむしろ今後に活かして

日本核磁気共鳴学会会長
池上 貴久
ikegamit@yokohama-cu.ac.jp

これほど新型コロナウィルスの影響が長引くとは思いも寄りませんでした。この1年半の自粛により、講義、会議、ミーティングなどはことごとくオンラインになりました。最初は慣れなかったこのようなオンライン形式にもだんだんと余裕が出始め、場合によってはオンラインの方が効率がよい場合もあることに気づきました。しかし、失ったことも多かったように思います。人類が社会性をもった動物に進化して以来ずっと、お互い顔を見合わせながら、そして微妙な雰囲気を読み取りお互いの距離を常に測りながら、コミュニケーションを取ってきました。これらはビデオ会議でも幾分かは可能であるものの、やはり実際の対面にはかなわないと痛感した1年半でした。このような中で昨年11月に高崎でNMR討論会（若松馨先生主催）が開けたことは、今から考えると奇跡であったかもしれません。この会議がもう一週間遅ければ、おそらく中止になっていたことでしょう。懇親会もなく座席も数メートル離れた状況でしたが、顔を直に見るということに感動した方も多かったのではないかと思います。

さて、今年度の特筆すべきことは、藤原敏道先生が中心となって準備中の第22回ISMAR（International Society of Magnetic Resonance Conference）が8月に開催されることです。この会議はISMARだけでなく、内藤晶先生が中心となって開催される第9回AP-NMR（Asia-Pacific NMR Symposium）、片平正人先生が中心の第60回NMR討論会、および、第60回電子スピンサイエンス学会も合わせた合同開催です。多くの努力の末に招致に成功した国際会議がオンラインになったことは少し残念ではありますが、もちろん利点もあります。それはその参加料の安さでしょう。ふつう国際学会といえば7～8万円の参加料に加え、飛行機代、ホテル代など、かなりの費用がかさみます。なかなか多くの学生さんに参加・発表してもらうわけにはいきません。しかし、今回のオンライン開催ではなんと1万円です（ただし早期申し込み）（学生は現時点でも6,000円）。是非この機会を活用していただければと思います。

この国際会議はリモートとなりましたが、実際のNMRの測定にもリモートが導入されつつあります。つまり、サンプルだけがNMR装置のある場所に郵送されてきます。そして、人がそのサンプルをサンプルチェンジャーのような装置にセットします。後は、インターネットを通して遠くのユーザーがNMR装置を操作します。このような方法は例えばシンクロトロンなどでは普通に行われていたのですが、NMRに関する限りあまり聞かれませんでした。しかし、いよいよこれが浸透しそうな気配が見え始めました。この方法は遠くの、例えば海外のユーザーでも別の場所のNMR装置を使えるようになること、その場所に出向かなくてもよいので臨機応変に予定が組めること、その結果、より大量のサンプルが測定できることなど、かなりの利点が考えられます。これまでは例えば企業ユーザーと大学NMRとの接触は限られていましたが、このリモート操作を導入することによりかなり拡大することでしょう。また、リモート操作の導入は上記のようなことばかりではなく、教育面でも威力を発揮します。これまでの座学セミナーに加えて、NMR装置を使いながら実践的な技術の伝授や交換ができるのです。しかも、大勢に対して同時にです。

今のような極端な状況は一時的であることを期待しますが、たとえコロナが解決したとしても、いちど利点を知ってしまったオンライン（リモート）は今後むしろ拡大を続けるように思います。上にあげた測定法や教育手段だけでなく、企業の宣伝方法も変わっていくことでしょう。これまでのブースや紙面広告による従来の手段はある一定レベルで残りますが、よりインターネット情報を媒体として活用した、もしかすると見たこともないような手段へと移っていくかもしれません。静

止画は動画となり、二次元（平面）は三次元（立体）となり、これらの情報の流れが高速になっていくでしょう。ある地点で新旧がバランスをとるでしょうが、その平衡点はまだまだ先にあるように思います。NMRを通して何とか全員が今すでに起こっている、そして今後も続いていくこの変革に残されずについていき共に発展していきたいと願うばかりです。

2021年（令和3年）文月

Ernst博士追悼文

わが生涯の師Richard R. Ernst博士を悼む

N-EMラボラトリーズ株式会社 最高科学技術顧問
永山 國昭
nagayama@nips.ac.jp

Richard R. Ernst博士は、1933年スイスWinterthur生まれ、1956年ETH Zürichの化学科を卒業、兵役の後ETH Zürichの大学院に入り、1962年物理化学における核磁気共鳴（NMR）に関する研究で学位を得た。1963年Varian Associatesに入社し、Fourier-transform NMR（FT-NMR）やnoise decouplingなどの技術を開発した。1968年ETH Zürichに戻り、1968年講師、1970年助教、1972年准教授、1976年正教授となり、1998年退職。1968年からは、液体状態および固体NMRの方法論的開発研究グループ長を務め、2次元NMR（2D-NMR）や種々のパルス技術を開発した。医療用磁気共鳴トモグラフィー（MRI）の開発に貢献し、Kurt Wüthrichとの共同研究では、溶液中の生体高分子のNMR構造決定法の開発にも貢献した。特にFT-NMRおよび2D-NMR手法の発見に対し「高分解能NMR分光学の方法論的開発への貢献」として1991年ノーベル化学賞が授与された。原著、総説を含め発表論文数は約350である。（ETH：Eidgenössische Technische Hochschule）

©Matthias Ernst, Zürich

1. はじめに

NMRから離れて30年、NMR学会への寄稿を再びこのような形で行う日が来るとは。本年6月4日に他界されたErnst博士（以後氏名の尊称省略）の業績を紹介する機会を追悼の形で設けていただいた会長はじめ関係者の皆さんに感謝申し上げます。

私は（当時31歳）1976年から1979年にかけ東大（本郷）からETH Zürichに留学した。Ernst（当時43歳）とWüthrich（当時38歳）が始めた共同研究の最初の博士研究員として、2D-NMRの蛋白質への応用研究に着手するためである。修士1年の時に出会ったFT-NMR論文[1]の衝撃以来私淑していたErnstと肩を並べ研究ができたことは、その後の私の人生と研究に決定的な影響を与えたと言える。1979年帰国以後、Ernstとは多様な局面で交差した。その交流軌跡を描くことで彼の研究と人となりを浮き彫りにしてみたい。彼が科学のみならず芸術、思想など多面的な知の巨人であったことを描いてみたい。

2. チューリッヒ時代

1972年のモスクワ国際生物物理学会で初めて出会ったWüthrichからETH Zürichへの留学招待状が届いたのは1975年秋だった。Ernstと開始する共同研究における2D-NMR応用研究への招待だった。1968年以来Ernstに学びたいと思っていた私は喜び勇んでOKの返事を送る。しかし不安が持ち上がった。送られてきた2D-NMRの草稿が全く理解不能だったのである。後に2次元法のバイブルとなるその論文[2]はスピンオペレーターの時間発展方程式で埋め尽くされており、しかも聞いたことも見たこともない面妖な2次元スペクトルとおぼしきものが図として散りばめられている。しかしErnstの魅力の前に不安はかき消され、私は11月26日チューリッヒ空港に降り立つ。そしてその日から大容量データを扱う蛋白質対象2D-NMRのソフト開発が怒涛の如く始まった（**図1**参照）。その顛末はNMR百科事典第1巻に詳しい[3]。

受領日：2020年6月28日

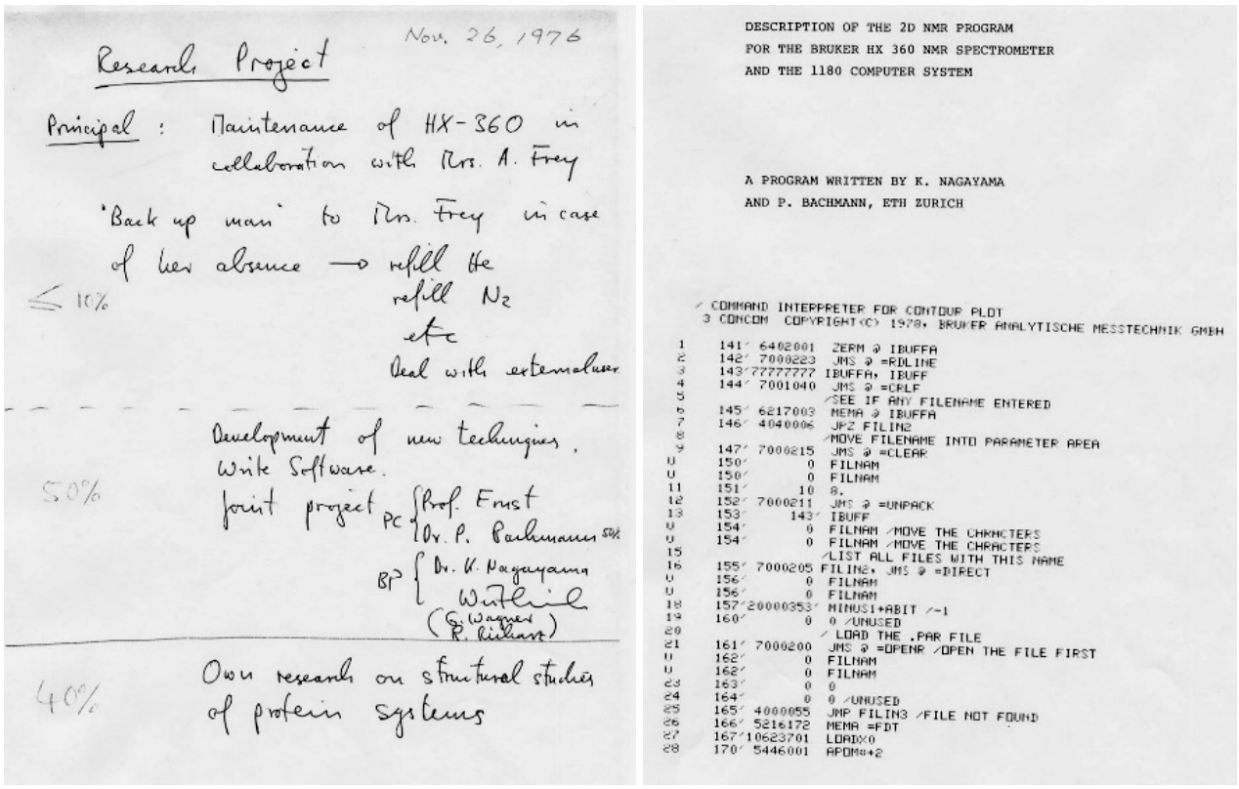


図1　到着日に渡された企画書（左）とアセンブラーで書かれた2次元NMR用プログラム（右）。このプログラムはNOESY実験にもAnil Kumarにより活用された。

チューリッヒでの3年間は私と家族にとり夢の時間だった。研究に関しては12報の論文（内第1著者8報）を量産し、家族にとっては週末のスイス国内旅行があった。日本で有名な観光どころ（アイガー、インターラーケン、ジュネーブ、バーゼル、ベルン、マッターホルン、ルツェルン、ローザンヌなどなど）は全て訪れた。しかもほとんど日帰りで。スイスの高速道路は全てフリーしかも極めて運転しやすい。さらに長年苦しんできた私の脊髄内腫瘍からの解放（チューリッヒ大整形外科正教授執刀）で今の永山家の存続もある。

ここでノーベル賞に革命的とうたわれた2D-NMRのどこがそうなのか、手を抜かないで説明したい。しかし30年のNMR研究ブランクは、1976年当時とおなじくバイブル論文[2]の解読をほぼ不可能にしている。そこで1992年に書いた多数のErnstノーベル化学賞紹介記事の中から物理学会誌に載った硬派の記事[4]およびノーベル賞講演[5]を引用することでその責を果たすことにしたい。物理学会誌の記事自体も今では読解困難で果たして私の手になるものなのか疑いたくなるのだが。長い引用となる。

『チューリッヒ工科大学の化学科を終え、引き続き物理化学のH.Primas教授の下でNMRの研究を始める（1957 ～ 1962）。当時、Primasは久保－富田の磁気緩和の論文を受け、ランダム変調を受ける量子力学系の密度行列を線形応答を超えて求める理論に展開していた。この理論の実践としてクリーンな実験が設定できる、スピン系の確率入力応答の研究を行ったのがErnstである。……

FT-NMRのアイデアはすでに先鞭があったが、当時IBMの大型コンピュータを2日間使って約1,000点のフーリエ変換で得たスペクトルは、歴史的出来事と言ってよい。この方法はNMR感度を大幅に改善し、水素核に加え炭素13核が化学の対象となる。強いラジオ波入力の典型であるパルス入力に対し、本来非線形応答を示すNMRが線形系の計測原理に従うことはやはり意外であった。事実、後に「2次元FT-NMR」が出るまで多重パルス入力のNMR応答の解析は、その非線形性故に混乱を極めたのである。……

1968年にチューリッヒに戻ってから、彼は積年の雑音入力NMRの実験を発表する。私にとって二度目の衝撃であった。しかし、彼は強い雑音入力のNMR応答が学位論文の範囲で説明できないと知り、研究を続行する。非線形応答の魔物をどう退治するのか、

ここから彼の第二の革命が生まれる。……

2D-NMRはスペクトル表示の枠組みとして驚異的に多産である。要するに種々のパルス入力により、スピンハミルトニアンを解剖できることを2D-NMR法は明らかにした。通常FT-NMRを知ったものは複雑なスペクトルを色々なデータ解析技術（フィルター、波形分析、最小二乗法）で簡易化しようと試みるだろう。時間域信号はフーリエ変換の際に種々の操作を許す自由さがある。これをデータ取り込み後処理という。しかし非線形応答自体は事後処理ではどうあがいても解明できない。

対象系のハミルトニアン自体、またはスピン動力学自体に強引に割り込み、それを解析しやすい形に変形したほうがよい。すなわち、2D-NMRはデータ取り込み前処理をスピン系の力学にほどこす。スピン系の緩和はゆっくりしているので、外場による操作はマイクロ秒、ミリ秒のパルスで可能となる。スピンを20数年いじっていると、これがいかに此の世と隔絶された彼岸であるか思い知る。複雑なスピン系の動力学は彼により演算子形式で整理され、即、2D-NMRの基礎となった。……

Ernstの学風は私には抗しがたい誘惑である、その完全性、論理性、ピクチャーの具体性、新概念の独特の香り、どれを取っても美しい。彼はチベットの仏教絵画にひかれている。私は彼の全体系の絵画性にひかれている。どうしてこのような学問が生まれるのか。スイスの美しい自然か。ヨーロッパの学問伝統か。多分それらの全てであり、将来を見通した感性と才能の織物なのだろう。』

ここで上記引用の最後の文章に出てくる絵画性について、彼がNMRの難しい量子力学演算子の定式化を誰にでも直観的に分かるようにどれほど長い時間をかけ絵画化（アート化）したか、その苦闘の跡を1992年のノーベル賞講演[5]より引用図解したい。

私はFT-NMR計測の背後にある数理に引かれたが、Ernstにとり線形系原理のそれは自明であったろう。むしろNMRが対象とする核スピン系の非線形応答というその先を見ていたはずである。そのためには核スピン系の錯綜する非線形応答を解明しなければならない。その解明が結局2D-NMRにつながるのだが、そのために彼は直観的で透徹した計測法の図解を行った。ノーベル賞

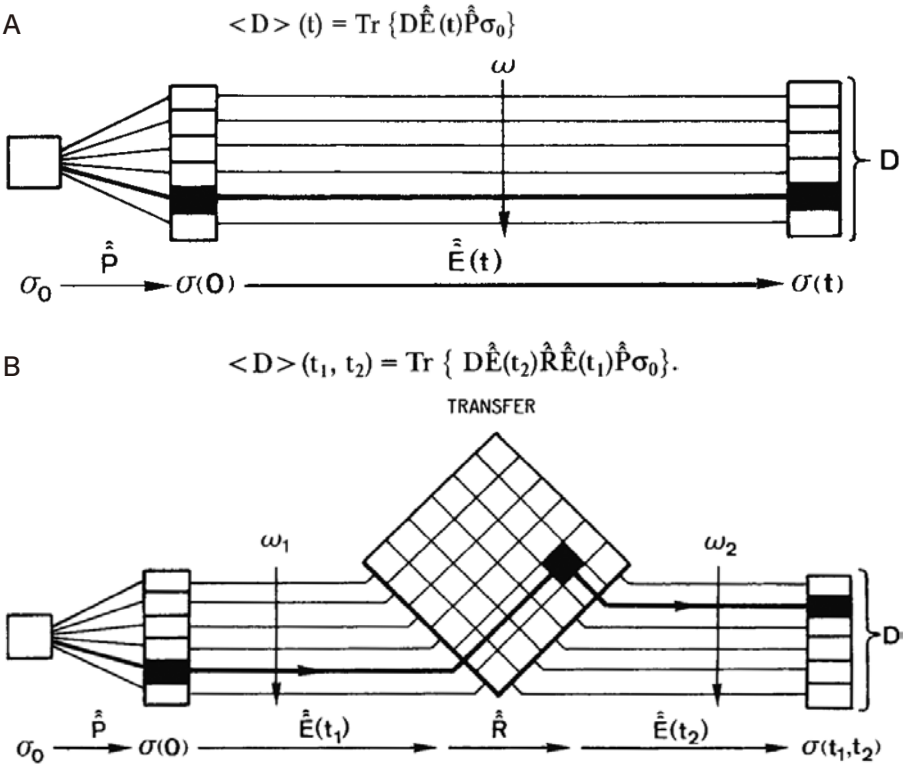


図2　Ernstが苦闘の末生み出したスピン系量子力学計測の“science and art”[5]
A. 1D-NMR（FT-NMR）の計測：超演算子定式（上）のErnst流図解（下）（文献5図1より）
B. 2D-NMRの計測：超演算子定式（上）のErnst流図解（下）（文献5図6より）
Copyright © The Nobel Foundation 1991

講演から引用した2つの図を見ているとその苦闘が見えてくる。

数理をアート化するFT-NMRの図解（**図2A**）には、時間域（t）と周波数域（ω）の統合の工夫が見られFTに対する深い理解をうかがわせる。この統合俯瞰は**図2B**の2D-NMR図解でさらに深化し、2次元スペクトルが何を表すのか、transfer matrix（中央の碁盤目）として視覚化されている。スピン演算子（オペレーター）の可視化でもあり、私はそこにErnst独自の世界、絵画性とも言うべき“science and art”の美を感じるのだが。

後で述べるErnstのアートへの深い造詣を考えると、彼が350を超える原著・総説の最後を“Science and Art”[6]で締めくくったのは必然だったように思える。

3. 過渡期

スイスから帰国の4年後私は東大から日本電子に移籍する。藤原敏道や山崎俊夫などの俊才を得て多次元NMRに取り組み多くの成果を得ている。そんな中で1991年Ernstノーベル化学賞のニュースを聞いた。

翌年スイスAsconaで記念シンポジウムが開催され、私は多次元NMRをひっさげ久しぶりに古巣に戻り昔の仲間との旧交を暖めた。その日本電子も1993年に去り再び東大に籍を移した。

4. 岡崎時代

さらに1996年駒場東大から岡崎の生理研に移籍したが、1996年と1997年の2年間は併任となり東京と岡崎の間を新幹線で往復した。その数は200回に上っただろう。私はこれをNMRから次の研究地を探索するチャンスと捉え、2時間半の新幹線を書斎として使うことにした。無論普通車では静謐を望めない。そこでグリーン車を指定した。当時も多分今も東京－豊橋間の各駅新幹線にわざわざグリーン車を予約する人は稀である。誰もいないグリーン車のしかも荷物置き場がある一番前の席に着き、学生時代の講義ノートを並べた。もちろん誰も文句は言わない。この書斎作戦は功を奏し次の研究分野、電子顕微鏡（特にTEM＝transmission electron microscopy）にたどり着いたのである。

FT-NMR論文からもらった啓示は2つある。まず時間域信号と周波数域信号がFTで結ばれること。もう一つは線形系において入力信号同士の線形関係は出力に転送されること。RFパルスは多数の周波数の和なので、その入力応答は、出力である多数の周波数の応答すなわちスペクトルを与えることになる。ところで顕微鏡光学系の2つのレンズによる結像は2回のフラウンホーファー回折を模倣し、フラウンホーファー回折はFTの数理に擬せられるので、結像は2回のFTに対応することになる。これを見出した時が転向点であった。顕微鏡原理がFTを多用していることに勇気を得、特に蛋白質構造解析への可能性を秘めるTEMに的を絞ることにしたのである。私の中のNMRとTEMを結ぶ細い糸はErnstに由来し、ほどなく位相板TEMという金鉱を掘り当てることになる[7]。

図3　1992年スイスAsconaで開かれたErnst受賞記念シンポでの談笑風景。Bodenhausen参加。

引用した物理学会のErnst紹介記事中にも書いたが、Ernst論文からはアートの香りが漂う。チューリッヒ時代に自宅を訪問した時に圧倒された壁一面のチベット仏教絵画（タンカ）を思い出し、そのころたまたま主宰していたロレアル色の科学と芸術賞（1995～2006）の審査委員をお願いした。最後の5年間は毎年彼と会い応募作品の審査で極上の時間を共有できた。2004年11月にはロレアル色の科学と芸術賞祝賀会の基調講演「チベット仏教絵画に見る科学と芸術」をお願いしたのだが、200枚近い極彩色のスライドを駆使し、タンカの歴史、宗教性、年代測定など幅広い紹介を行い、聴衆に大きな感動を与えた。「これがノーベル賞科学者の余技なのかと」（もちろん余技ではなく彼はタンカの世界最大級の収集家でもある[6]）。彼のアート感覚は素晴らしく講演に用いられるスライドはどれも芸術作品である。**図4**は彼の基調講演から引いたスナップショット。

Ernstはその11月、日本に20日間ほど滞在し、

10近い講演をこなしている。その中の一つが総研大15周年記念基調講演で、「科学者の社会的責任――ヨーロッパ人の思い」につき話をした。その中で「多数ある地球規模の問題につき、長期的な観点で対応できるのは科学者だけ」と科学者の責任を喚起した。科学的誠実さが地球問題にまで踏み込んでいると感銘を受けた。

しかし彼からは巧まざる人間性を感じることもある。東京から岡崎に新幹線で同道した時のこと、駅ホームで彼は私の注意を足元に向けた。なんと左右異なる靴を履いているのである。多数の講演で注目を浴びる時の人である。普通ならデパートなどで靴を新調するだろう。しかし彼はその間違いがスイス出国以来だと嬉しそうに宣言するのであった。その時ほど彼の人間を強く感じたことはない。

Ernst-Wüthrich共同研究の第1号博士研究員である私は、Ernstのノーベル賞単独受賞の報に接したとき嬉しさと共になぜ単独受賞かとの疑念を抱いたのを思い出す。1998年の定年後、Ernstがほとんど研究から手を引きタンカ研究や科学と社会問題発信に集中していったのは、やはり、Wüthrichへの配慮、彼に道を譲ったためではなかったか（無論スイス流の徹底した平等感覚の故かもしれないが）。2002年のWüthrichノーベル化学賞受賞の報を誰より喜んだのはErnst本人だと思う。それは長い間両師への宙ぶらりんな思いから解放されほっとした当時の私の心情でもあるのだが。

図4　Ernstのタンカ作画風景

最後にErnstに会ったのは2011年3月、私の生理研退職記念シンポジウムの時である（**図5**）。3.11東日本大震災の4日後の綱渡りの開催だったが、東京から離れた名古屋の地ということもあり、Ernst、Wüthrich両師はぎりぎりのタイミングでスイスから駆け付けてくれた（二人には今でも頭が下がる）。Ernstは講演で私の2D-NMRに対する貢献を述べたが、それ以上にNMRからTEMへの私の転身に過分の評価を与えてくれた。「私は君のように研究分野を替え成功する科学者を特に好ましく思う」。私は35年前のErnstとのディスカッションを思い出し長年の宿題を終えたような気分にとらわれた。

5. 生涯の師とは何か？

パルスFT-NMRは、私に生涯の研究伴侶FTを紹介し、NMRからTEMに転身するマジカルパワーを与えてくれた。では2D-NMR、特に高次元化はTEMにおいて何を意味するのか？その答えがわかったのは、5年前、70歳の声を聴いたときである。答えは4次元顕微鏡（Four-dimensional electron microscopy＝4D-EM）。

4D-EMには2つの版がある。4D-STEM（走査（scanning）TEM）版と4D-TEM版。前者は1979年に提案されているが、後者は、4次元相反定理を通じ2016年に見いだされた[7]。ここで言う4次

図5　永山退職記念シンポジウム、2011年3月、名古屋

元は、パルスレーザー励起電子銃を用いたいわゆる高速4D-EMの4次元（3次元空間＋1次元時間）の意ではなく、2次元光源面＋2次元検出面の含意である。

通常の2D-TEMでは、結像過程がありモノの像が2次元検出面上に一度に生成する。他方、通常の2D-STEMでは、結像は行われず収束電子線をモノ上走査することでいわば人為的に像を構成する。モノを通過した収束電子線は放射状に広がりながら検出面に到達するが、無論すべての電子線を捕捉したのでは、強度の一様なのっぺらぼうな像しか生まれない。通常10kV以上の高加速の電子線は、観察対象となるような薄いモノには吸収されないからである。そこで電子線捕捉範囲を制限することになるのだが、ここに2次元相反定理が登場する。それは、2D-STEMにおける光軸上点検出像は、2D-TEM像を与えることを主張する。無論現実には適度な広がりを持つ面検出器が使用されるが、ほとんどの電子は棄却されるのである。この不思議なSTEM-TEM等価性に何か矛盾を感じつつ長い間やり過ごしていたのだが、次元を拡大することで氷解した。それが4次元相反定理であった（顕微鏡光学系に対するErnst流（**図2**）の実空間と周波数空間の統合俯瞰によりこの定理は導かれた）。4D-TEMでは、光源面が4D-STEMの検出面に対応するので、TEM像の各点に対応する光源面依拠2次元像は4D-STEM 2次元検出像に帰着するのである。実験上の制約を度外視すれば、4D-STEMと4D-TEMは理論的に等価である。

ところで4D-EMでは、本来光軸上に固定されるべき光源を2次元光源面で走査し、各走査点に対応する2次元画像データをコンピューター中に保持し、仮想的に実空間と周波数空間で張る4次元像空間をコンピューター中に生成する。これは2D-NMRにおける2次元の生成法と同じである。2D-NMRでは、時間域2次元がRFパルスを挟みいわば操作的（コンピューター構成的に）に定義される。これにより対象スピンハミルトニアン中のスピンを可視化できた。その美しさは、対象が持つ非線形性をRFパルスで縦横無尽に切り刻み誰にでも理解可能な作品として人々に提供するところにあった。物理学会誌に載った難解な記事の意味するところはそういうことである。

残念ながら4D-EMには、2D-NMRが持つこの美しさがない。というのは、4D-EMはあくまで線形イメージングであり、対応関係はFT-NMR止まり、RFパルスに対応するような対象の非線形性に切り込む能動的関与がないからである。4D-EMの長所は追加の周波数次元を操作し、位相板なしに同等の位相コントラストを回復できるところにある。それにより位相板が持つ負の局面（電子線ロス）を回避し感度向上を図るところにある。Ernstが2D-NMRで示した高次元化の啓示はこうして4D-EM、特に私の場合4D-TEMに伝承された[7]。私のRichard R. Ernstへの尊敬と敬慕の気持ちは尽きない。

合掌

（2021年6月25日、永山國昭）

文　献

[1] R.R. Ernst and W.A. Anderson, “Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance”, Rev. Sci. Instr. 37, 93-102 (1966).

[2] W.P. Aue, E. Bartholdi and R.R. Ernst, “Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance”, J. Chem. Phys. 64, 2229-2246 (1976).

[3] K. Nagayama, “The First Protein Two-Dimensional (2D) NMR”, Encyclopedia NMR vol.1 (2007) online.

[4] 永山国昭, “1991年度ノーベル化学賞”, 日本物理学会誌, 47, 65-66 (1992).

[5] Richard R. Ernst, “Nuclear Magnetic Resonance Fourier Transform Spectroscopy”, Nobel Lecture, December 9, 1992, Nobel Prize.org. Nobel Prize Outreach AB 2021. Sat. 26 Jun 2021. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1991/ernst/lecture/>

[6] Richard R. Ernst, “Science and Art – My Two Passions”, Science and Art: The Painted Surface (Eds. A. Sgamellotti, B. G. Brunetti and C. Miliani), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-27 (2014).

[7] Kuniaki Nagayama, “A profile of Kuniaki Nagayama; Encounters and leaps in a transborder journey through biophysics”, Biophysical Reviews, 12, 193-199 (2020).

Ernst博士追悼文

Ernst先生のご逝去を悼む

大阪大学工学研究科
小林 祐次
yuji.kobayashi@bio.eng.osaka-u.ac.jp

私が阪大の蛋白研で学生であった1970年ころFT-NMRが高分解能NMRの分野でも実用化され始め、生体関連の分野では固相重合によるペプチド合成法などが開発され、NMR測定に供せられる程度の量の核酸や蛋白質のモデル物質を得ることが可能になりつつあった。また超伝導磁石を用いたVarianの220 MHzが京大工学部に、Brukerの270 MHzが東大理学部に導入され稼働を始めていた。生理活性ペプチドの構造解析に100 MHzの装置で苦労していた我々にそれらを利用することが許され、その感度の高さとシグナルの分離の良さを実感させられた。全国共同利用研究所でもあった蛋白研にもぜひ高磁場NMRを設置したいという機運が高まりつつある中で、日本における貿易摩擦が顕在化し、諸外国から外貨減らしを要請された政府が外国製品の輸入を奨励する時期と幸運にも一致していた。70年代の終わりには蛋白研でBruker WM360 wide boreの購入が、続いてHeガス回収装置・液体ヘリウム供給装置の購入が認められ、私がそれらの運用を担当することになった。日本のBruker社は発足したばかりでユーザーのトレーニングを行う体制にはなかった。Brukerは高分解能NMRのハード、ソフトの両面でスイスの子会社（Spektrospin）を通してETHと緊密に提携して共同開発していた。この分野にほとんど経験の無かった私は新規ユーザーのトレーニングをかねてETHでの海外研修を希望したところ、Ernst研をホストとする海外研修が認められた。デモ機すら存在しない状態でかつマシンタイムも十分ではないので、Spektrospin社で出荷前の装置を使って実習することになった。Ernst研に留学しておられた永山さんは既に帰国しておられたが、Ernst研の助教授であって、新設される日本Brukerの責任者となる準備をしておられたBartholdi博士が私の世話役を担ってくださることになった。私の持参した環状生理活性ペプチドを用いてまさに二次元NMRの夜明けを試作中のNMRのソフトとハードを用いて解析できる幸運に興奮した。このような素晴らしい機会を与えて下さったErnst先生に心から感謝している次第である。

更に発注した装置が稼働することを確認するという使命を帯びていたが、大口径の360 MHzのNMRといったBruker社にとっても初めての装置で、Oxford社が磁場の製作に時間を要した為に私の滞在も長引き、結局4か月のあいだ最新最強の施設をErnst研、Wüthrich研と二大中心が揃ったZürichで楽しむという望外の幸せを味わわせて頂くことに成った。

1981年の第20回NMR討論会ではErnst先生が二次元NMR分光法とその応用の最近の発展について特別講演された。その頃になると幸い私も二次元NMRのポリペプチドへの適用と題して京極先生、永山さん達と共同で発表できていたが、その学会の合間に世話人であった荒田先生から、“Ernst先生がチベット仏教に関係する展覧会を見に行きたいと云っておられるが付き合って貰えないか？”との相談を受けた。私が古い仏像などを見るのを趣味にしていることを知っての事であった。私一人では自信がないので誰かErnst先生と親しい人と一緒ではどうかと相談して、結局個人的に近いとなると永山さんだと云うことになった。上野の博物館辺りならありそうだけれど、そのような展覧会がそのころ行われていることはなかった。Ernst先生に情報源を尋ねたところ滞在中のホテルでJapan Times誌の催物欄で見つけたとのことであった。電話して調べたところ聞いたこともないお寺であったが永山さんと三人で出かけることにした。行って見ると展覧会といっても、お寺の住職のご子息であり米国でインド仏教などを研究しておられる方が撮られた、チベット高原のヒマラヤ山脈や民族文化を紹介する写真展を超えるものではなく、Ernst先生が興味を持っておられる曼荼羅等の古美術など特にチベット仏

受領日：2021年6月30日

教に関する展示ではなかった。しかしErnst先生はヒマラヤの山岳写真を見てその山の名前や位置関係をすらすら口にされた。写真を見ながら説明して下さるお話の端々から密教に根差す文化芸術についての先生の造詣の深さを感じさせられた。私の外国人観光客に対する奈良や京都の日頃の浅薄な観光案内を反省した次第であったが、先生の一面を紹介する一文としてこのエピソードを紹介した。

その後、1991年ノーベル賞を受賞されたのちの2011年横浜でのNMR討論会では分光学におけるフーリエ変換の重要性と題して講演をされたが、その中でチベット仏教で重要な曼荼羅を描くのに用いられた顔料のラマン分光を用いた解析を例に話された。講演のあと私達が奈良女大の中沢さん達と行っている、膠などのコラーゲンを始めとする考古学的資料や文化財に含まれる蛋白質の質量分析を中心とした研究のこと等を話し合ったが、貴重な文化財等の資料の調査に際して常にどこまで非侵襲で行えるかが最重要課題であることを強調されるErnst先生の対象に対する深い思い入れが現れて印象深かった。東寺の立体曼荼羅を何時かご案内することになっていたが実現する事無くお亡くなり非常に残念に思っている。

合掌

総説論文：解説

密度演算子からプロダクトオペレーターへ
～溶液および固体MAS NMRにおける強く結合したスピン系に適用できるプロダクトオペレーター理論を中心として～

(株)JEOL RESONANCE
中井 利仁
tnakai@jeol.co.jp

§1. はじめに

NMR の勉強を始めて多くの人が出くわすのはおそらく、「スピンは上向きと下向きしかないのに、なぜ 90°パルスで横磁化が作れるのだろう」という素朴な疑問ではないだろうか。あるいは、「スピンの上向き状態は RF 照射によって一瞬で下向き状態に遷移するのに、なぜ磁化は 10 μs といった時間をかけてゆっくり回転するのだろう」という深刻な悩みかも知れない。これらの懊悩の原因はミクロ (スピン) とマクロ (巨視的磁化) の混同にある。

ミクロからマクロを導いた結果は密度演算子[1]で表され、これを扱いやすくしたものがプロダクトオペレーター[2,3]である。後者の算法を習得すればパルス系列を理解できるが、本稿ではその背後にある密度演算子に思いを馳せてみたい。そうすることにより、プロダクトオペレーターが磁化の回転などを記述できる理由が理解できるようになるだろう。また、コヒーレンスという専門用語を自信を持って日常的に使えるようになるだろう。さらに本稿では、溶液および固体 MAS NMR における強く結合したスピン系に適用できるよう拡張したプロダクトオペレーターの理論[4]を紹介する。

§2. 密度演算子とプロダクトオペレーター

一種類のスピン 1/2 核が多数含まれているマクロな系を考える。スピン系の統計的状態は密度演算子 ρ で記述され、2×2 の密度行列で表すことができるとされている。密度行列はたとえば、

$$\rho = \begin{pmatrix} 1/2 & 1/2+1/2i \\ 1/2-1/2i & -1/2 \end{pmatrix}, \tag{1}$$

のようなものである。この行列にはスピン演算子 I_x、I_y、I_z に対応する行列、

$$I_x = \begin{pmatrix} 0 & 1/2 \\ 1/2 & 0 \end{pmatrix}, \quad I_y = \begin{pmatrix} 0 & 1/2i \\ -1/2i & 0 \end{pmatrix}, \quad I_z = \begin{pmatrix} 1/2 & 0 \\ 0 & -1/2 \end{pmatrix}, \tag{2}$$

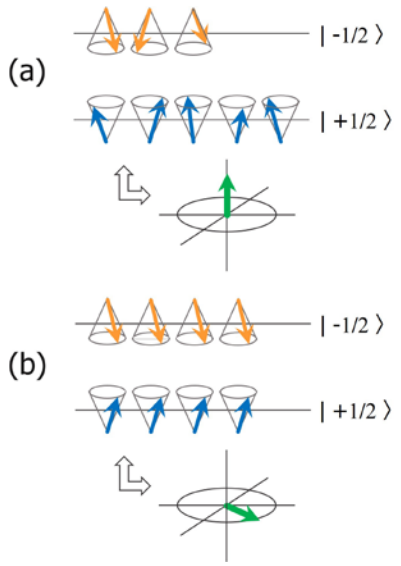
が含まれることが分かる。つまり、密度演算子は、

$$\rho = I_x + I_y + I_z, \tag{3}$$

であり、マクロなスピン系が磁化 I_x、I_y、I_z を持つことを表している。すなわち、密度演算子がスピン演算子と同じタイプの成分を含んでいれば、対応する磁化がスピン系に含まれると解釈するのである。式(1)の密度行列の意味は分かりにくいが、式(3)は直感的に理解できる。これがプロダクトオペレーターの基本的なアイデアである。

式(2)におけるミクロなスピンに対する演算子が式(3)ではマクロな磁化を表しているが、ミクロからマクロへの統計操作は密度演算子に含まれている。このスキームを図 1 に示す。平衡状態では上向きと下向きスピン状態の占拠数差から縦磁化が生じるが、スピンの位相が揃う必然性はない。つまり、それぞれのスピンの状態が持つ位相因子が揃うのはエントロピーを極端に小さくすることであって自然には起こりそうにないため、集団平均として横磁化は現れない (図 1(a))。一方、スピンの位相が揃っている場合、平均として横磁化が発生する (図 1(b))。このようにスピン系に対して統計操作を行なった結果が密度演算子で表される。また、「位相の揃い」のことをコヒーレンスと呼ぶ。

図 1



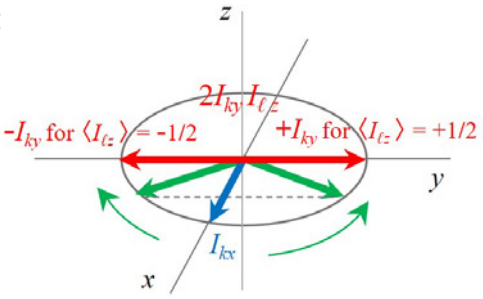
受領日：2020年10月31日　編集委員：野村薫・池上貴久

二種類のスピン k および ℓ から成る系を考えるとプロダクト (積) が生じる。プロダクトオペレーターに触れたことがある人はアンチフェーズ磁化 $2I_{ky}I_{\ell z}$ というのを聞いたことがあるだろう。まさにこれが I_{ky} と $I_{\ell z}$ の積である。ただし、I_{ky} と $I_{\ell z}$ は「住む世界 (存在する空間)」が違うので通常の掛け算はできず、次に示す直積 ($\otimes$) という演算を行なう。

$$
\begin{aligned}
2I_{ky}I_{\ell z} &= 2\begin{pmatrix} 0 & 1/2i \\ -1/2i & 0 \end{pmatrix} \otimes \begin{pmatrix} 1/2 & 0 \\ 0 & -1/2 \end{pmatrix} \\
&= \begin{pmatrix} 2\times 0 \times \begin{pmatrix} 1/2 & 0 \\ 0 & -1/2 \end{pmatrix} & 2\times 1/2i \times \begin{pmatrix} 1/2 & 0 \\ 0 & -1/2 \end{pmatrix} \\ 2\times(-1/2i) \times \begin{pmatrix} 1/2 & 0 \\ 0 & -1/2 \end{pmatrix} & 2\times 0 \times \begin{pmatrix} 1/2 & 0 \\ 0 & -1/2 \end{pmatrix} \end{pmatrix} \\
&= \begin{pmatrix} 0 & 0 & 1/2i & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1/2i \\ -1/2i & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1/2i & 0 & 0 \end{pmatrix}.
\end{aligned}
\tag{4}
$$

このような行列の形では意味が分かりにくいので、オペレーター I_{ky} と $I_{\ell z}$ の直積 $I_{ky}\otimes I_{\ell z}$ を用いてアンチフェーズ磁化を $2I_{ky}I_{\ell z}$ と表し、スピン ℓ の状態 $|\, m_{\ell z} = +1/2 \,\rangle$ に対して磁化 $+I_{ky}$ を、$|\, m_{\ell z} = -1/2 \,\rangle$ に対して $-I_{ky}$ を意味すると解釈するのである (図 2)。

図 2



§3. コヒーレンスの時間変化と NMR 信号

プロダクトオペレーターを使うと、スピン k の磁化 I_{kx} が化学シフト周波数 ω_k で回転することは、

$$
I_{kx} \longrightarrow I_{kx}\cos\omega_k t + I_{ky}\sin\omega_k t, \tag{5}
$$

と表され、I_{kx} がスピン k と ℓ の J 結合によって $I_{\ell z}$ の状態 $|\, \pm 1/2 \,\rangle$ に対応した二手に分かれて回転する (アンチフェーズ磁化が発生する; 図 2) ことは、

$$
I_{kx} \longrightarrow I_{kx}\cos\pi J t + 2I_{ky}I_{\ell z}\sin\pi J t, \tag{6}
$$

で表現される。これらは密度演算子 ρ が従う Liouville 方程式、

$$
\frac{d\rho(t)}{dt} = -i\,[\,\mathscr{H}, \rho(t)\,], \tag{7}
$$

に由来する。ここで $[\,,\,]$ は交換関係を表し、$\mathscr{H}$ はスピン系のエネルギーを与えるハミルトニアン、

$$
\mathscr{H} = \omega_k I_{kz} + \omega_\ell I_{\ell z} + 2\pi J\, I_{kz}I_{\ell z}, \tag{8}
$$

である。式(7)を解くことは難しいように思われるが、次式が解であることは代入すれば分かる。

$$
\rho(0) \xrightarrow{\mathscr{H}\, t} \rho(t) = e^{-i\mathscr{H}t}\rho(0)\, e^{+i\mathscr{H}t}. \tag{9}
$$

ただし、$\rho(0)$は始状態であり、式(5)、(6)で言えば I_{kx} である。ここで、演算子の指数関数は、

$$
e^{+i\mathscr{H}t} = 1 + (i\mathscr{H}t) + \frac{1}{2!}(i\mathscr{H}t)^2 + \frac{1}{3!}(i\mathscr{H}t)^3 + \cdots, \tag{10}
$$

という意味であり、式(9)は、

$$
\begin{aligned}
\rho(t) = \rho(0) &+ (-it)\,[\mathscr{H}, \rho(0)\,] + \frac{(-it)^2}{2!}\Big[\mathscr{H}, [\mathscr{H}, \rho(0)\,]\Big] \\
&+ \frac{(-it)^3}{3!}\Big[\mathscr{H}, \Big[\mathscr{H}, [\mathscr{H}, \rho(0)\,]\Big]\Big] + \cdots,
\end{aligned}
\tag{11}
$$

となる (Baker-Campbell-Hausdorf の公式; BCH の公式[3])。式(11)は、ハミルトニアン $\mathscr{H}$ と始状態 $\rho(0)$ の交換関係が求められれば、どのような終状態 $\rho(t)$ に変化するかが分かるということを教えている。

式(8)のハミルトニアン全体を指数とする代わりに、ハミルトニアンのうち互いに交換可能な (交換関係の計算結果が 0 である) 部分を別々に扱うことができる。これは演算子 P、Q に対する式、

$$
[\,P, Q\,] = 0 \;\Leftrightarrow\; e^{P+Q} = e^P e^Q = e^Q e^P, \tag{12}
$$

から導出される。式(8)のハミルトニアンでは 3 つの項が互いに交換可能であるため、まず第 1 項だけを取り出して扱う。$\rho(0) = I_{kx}$ とすると、

$$
\begin{aligned}
&[\,\omega_k I_{kz}, I_{kx}\,] = i\,\omega_k I_{ky}, \\
&\Big[\omega_k I_{kz}, [\,\omega_k I_{kz}, I_{kx}\,]\Big] = \Big[\omega_k I_{kz}, i\,\omega_k I_{ky}\Big] = \omega_k^2 I_{kx}, \\
&\Big[\omega_k I_{kz}, \Big[\omega_k I_{kz}, [\,\omega_k I_{kz}, I_{kx}\,]\Big]\Big] = \Big[\omega_k I_{kz}, \omega_k^2 I_{kx}\Big] = i\,\omega_k^3 I_{ky}, \\
&\cdots,
\end{aligned}
\tag{13}
$$

となる (交換関係は式(2)を使って行列に通常の掛け算を行なうなどすれば計算できる)。式(13)では I_{kx} と I_{ky} が交互に現れ、このおかげで式(11)は、

$$
\begin{aligned}
\rho(t) &= I_{kx} + (-it)\,\Big(i\,\omega_k I_{ky}\Big) \\
&\quad + \frac{(-it)^2}{2!}\Big(\omega_k^2 I_{kx}\Big) + \frac{(-it)^3}{3!}\Big(i\,\omega_k^3 I_{ky}\Big) + \cdots \\
&= I_{kx}\left[1 - \frac{(\omega_k t)^2}{2!} + \cdots\right] + I_{ky}\left[\omega_k t - \frac{(\omega_k t)^3}{3!} + \cdots\right] \\
&= I_{kx}\cos\omega_k t + I_{ky}\sin\omega_k t,
\end{aligned}
\tag{14}
$$

となり、式(5)が導かれる。同様にして、式(6)は J 結合を表す部分ハミルトニアン $2\pi J\, I_{kz}I_{\ell z}$ と I_{kx} の交換関係から導出できる。式(8)における $\omega_\ell I_{\ell z}$ は式(5)、

(6)の I_{kx}、I_{ky}、$2I_{ky}I_{\ell z}$ と交換可能であるため、これらの時間変化をもたらさず、無視することができる。

式(8)の全ハミルトニアンによる磁化 I_{kx} の時間変化は、式(5)、(6)を続けて適用することで計算される。式(12)より、式(5)と(6)の順番はどちらが先でも良いが、式(5)を後で計算する方が簡単である。

$$\begin{aligned} I_{kx} &\xrightarrow{2\pi J\, I_{kz}I_{\ell z}\, t} I_{kx}\cos\pi Jt + 2I_{ky}I_{\ell z}\sin\pi Jt \\ &\xrightarrow{\omega_k I_{kz}\, t} \left(I_{kx}\cos\omega_k t + I_{ky}\sin\omega_k t\right)\cos\pi Jt \\ &\qquad +2\left(I_{ky}\cos\omega_k t - I_{kx}\sin\omega_k t\right) I_{\ell z}\sin\pi Jt \\ &= I_{kx}\cos\omega_k t\,\cos\pi Jt + I_{ky}\sin\omega_k t\,\cos\pi Jt \\ &\qquad +2I_{ky}I_{\ell z}\cos\omega_k t\,\sin\pi Jt - 2I_{kx}I_{\ell z}\sin\omega_k t\,\sin\pi Jt. \end{aligned} \tag{15}$$

この式のうち、第 3、4 項は実は計算しなくて良い。すなわち、横磁化 I_{kx}、I_{ky} を観測したものが NMR 信号であるから、式(15)の第 1、2 項だけを考えれば良いのである。磁化 I_{kx} と I_{ky} の期待値 (式(15)にどれだけ磁化が含まれているかを表す演算子の係数) をそれぞれ実部と虚部とすると、信号の表式は、

$$\begin{aligned} &\langle I_{kx}\rangle + i\langle I_{ky}\rangle \\ &= \cos\omega_k t\,\cos\pi Jt + i\,\sin\omega_k t\,\cos\pi Jt \\ &= \tfrac{1}{2}\exp[\,i(\omega_k+\pi J)\,t\,] + \tfrac{1}{2}\exp[\,i(\omega_k-\pi J)\,t\,], \end{aligned} \tag{16}$$

と求められる。最後の式変形には Euler の公式、

$$\begin{aligned} e^{i\theta} &= \cos\theta + i\,\sin\theta, \\ \cos\theta &= \tfrac{1}{2}\left(e^{+i\theta}+e^{-i\theta}\right), \quad \sin\theta = \tfrac{1}{2i}\left(e^{+i\theta}-e^{-i\theta}\right), \end{aligned} \tag{17}$$

を用いた。このように、信号の表式を得るには観測時の状態のうち、I_{kx} と I_{ky} の項だけが必要である。つまり、慣れればどの項が続く時間変化で最終的に観測量 I_{kx}、I_{ky} になるかが分かり、計算を省略できる。これもまたプロダクトオペレーターの利点である。式(16)をフーリエ変換すると、スペクトルに共鳴線が $\omega_k \pm \pi J$ の位置に現れることが分かる。

一方、RF パルスによる磁化の変化は、たとえば $\pi/2$ パルスを x および y 方向にかけた場合、

$$I_{kz} \xrightarrow{-\frac{\pi}{2}I_{kx}} I_{ky}, \qquad I_{kz} \xrightarrow{-\frac{\pi}{2}I_{ky}} -I_{kx}, \tag{18}$$

のように表される。つまり、磁化は時計回りに (負回転で、左ねじ回りで) 回転し、式(18)の $\pi/2$ に付けたマイナスは負回転であることを表している。化学シフトによる横磁化の回転も本来は時計回りであるが、式(5)では反時計回りになっている。これは化学シフトを基準となる周波数からのオフセットとして表しているためである。つまり、式(8)は Larmor 回転系でのハミルトニアンであり($\omega_k/2\pi$ = 100 kHz など)、実験室系でのハミルトニアンは ω_k の項にマイナスがついて磁化の回転は時計回りになる ($\omega_k/2\pi$ = 100 MHz など)。同時に、上向きスピン状態 $|+1/2\rangle$ は下向きスピン状態 $|-1/2\rangle$ よりも低いエネルギーになる（ここでは ^{1}H や ^{13}C のように磁気回転比が正のスピンを想定している)。

§4. 強く結合したスピン系におけるコヒーレンスの時間変化と NMR 信号[4]

式(8)で示したハミルトニアンは、いわゆる「弱く結合したスピン系」(その意味は後述する) という近似を用いたもので、本来のハミルトニアンは、

$$\mathscr{H} = \omega_k I_{kz} + \omega_\ell I_{\ell z} + 2\pi J\,\mathbf{I}_k\cdot\mathbf{I}_\ell, \tag{19}$$

で与えられる[1]。このハミルトニアンによって磁化がどのように時間変化するかを明らかにしよう。そのためには密度演算子に立ち返り、§3 の流れに沿って考えれば良いように思われる。

まず、式(19)のハミルトニアンがどのような交換可能な部分ハミルトニアンに分けられるか考える必要がある。なぜならば、式(19)の 3 つの項は互いに交換可能ではないからである。式(19)の第 3 項の内積は次のように書き換えられる。

$$\begin{aligned} \mathbf{I}_k\cdot\mathbf{I}_\ell &= I_{kx}I_{\ell x} + I_{ky}I_{\ell y} + I_{kz}I_{\ell z} \\ &= \tfrac{1}{2}(I_{k+}+I_{k-})\,\tfrac{1}{2}(I_{\ell+}+I_{\ell-}) \\ &\quad +\tfrac{1}{2i}(I_{k+}-I_{k-})\,\tfrac{1}{2i}(I_{\ell+}-I_{\ell-}) + I_{kz}I_{\ell z} \\ &= I_{kz}I_{\ell z} + \tfrac{1}{2}(I_{k+}I_{\ell-} + I_{k-}I_{\ell+}). \end{aligned} \tag{20}$$

ただし、

$$\begin{aligned} I_{k+} &= I_{kx} + iI_{ky}, \qquad I_{k-} = I_{kx} - iI_{ky}, \\ I_{\ell+} &= I_{\ell x} + iI_{\ell y}, \qquad I_{\ell-} = I_{\ell x} - iI_{\ell y}. \end{aligned} \tag{21}$$

つまり、式(20)の第 1 項 (A 項) だけでなく、第 2 項 (B 項、フリップフロップ項) を新たに考える必要がある。この項が化学シフトの項の I_{kz} とも $I_{\ell z}$ とも交換しないことが計算によって分かる。$I_{kz} + I_{\ell z}$ のようにまとめればフリップフロップ項と交換可能になるが、$I_{kz} - I_{\ell z}$ という項を補う必要があり、これらを考慮すると式(19)のハミルトニアンは、

$$\begin{aligned} \mathscr{H} &= \tfrac{1}{2}(\omega_k+\omega_\ell)(I_{kz}+I_{\ell z}) \\ &\quad +\tfrac{1}{2}(\omega_k-\omega_\ell)(I_{kz}-I_{\ell z}) \\ &\quad +2\pi J\,I_{kz}I_{\ell z} + 2\pi J\,\tfrac{1}{2}(I_{k+}I_{\ell-}+I_{k-}I_{\ell+}) \\ &= \tfrac{1}{2}\omega_\Sigma(I_{kz}+I_{\ell z}) + \omega_A 2I_{kz}I_{\ell z} \\ &\quad +\tfrac{1}{2}\omega_\Delta(I_{kz}-I_{\ell z}) + \tfrac{1}{2}\omega_B(I_{k+}I_{\ell-}+I_{k-}I_{\ell+}), \end{aligned} \tag{22}$$

と書き換えられる。ただし、

$$\omega_\Sigma = \omega_k + \omega_\ell, \qquad \omega_\Delta = \omega_k - \omega_\ell,$$
$$\omega_A = \pi J, \qquad \omega_B = 2\pi J, \tag{23}$$

と定義した。式(22)の第 4 項 (フリップフロップ項) は第 1、2 項と交換可能であるが、第 3 項とは交換可能ではない。それゆえ、式(22)のハミルトニアンを交換可能な部分ハミルトニアンに分けると、

$$\begin{aligned}
&\mathscr{H} = \mathscr{H}_\Sigma + \mathscr{H}_A + \mathscr{H}_{\Delta+B},\\
&\mathscr{H}_\Sigma = \tfrac{1}{2}\omega_\Sigma (I_{kz} + I_{\ell z}), \qquad \mathscr{H}_A = \omega_A 2I_{kz}I_{\ell z},\\
&\mathscr{H}_{\Delta+B} = \tfrac{1}{2}\omega_\Delta (I_{kz} - I_{\ell z}) + \tfrac{1}{2}\omega_B (I_{k+}I_{\ell-} + I_{k-}I_{\ell+}),
\end{aligned} \tag{24}$$

となる。$\mathscr{H}_{\Delta+B}$ はこれ以上、分けることができず、このまま扱う必要がある。

固体 MAS NMR では、$\mathscr{H}_{\Delta+B}$ は最低次の近似で、

$$\begin{aligned}
\mathscr{H}_{\Delta+B} = {}& \tfrac{1}{2}\omega_\Delta (I_{kz} - I_{\ell z}) + \tfrac{1}{2}\omega_B (I_{k+}I_{\ell-} + I_{k-}I_{\ell+})\\
&+\tfrac{i}{2}\omega_{\Delta\times B} (I_{k+}I_{\ell-} - I_{k-}I_{\ell+}),
\end{aligned} \tag{25}$$

と表されることが分かっており[4]、第 3 項は 2 つのスピンの化学シフト異方性の方向が一致しない限り $\omega_{\Delta\times B}$ がゼロにならず、化学シフト差と双極子結合の交差項と呼ばれる。溶液では $\omega_{\Delta\times B}$ をゼロとして扱えるため、以下では包括的な式(25)を使う。

式(24)、(25)の 3 つの部分ハミルトニアンそれぞれによる磁化の時間変化を §3 で示した手続きに従って求めてみる。そのうち、$\mathscr{H}_\Sigma$ および $\mathscr{H}_A$ による時間変化は比較的容易に求められ、

$$\begin{aligned}
&I_x = I_{kx} + I_{\ell x} \xrightarrow{\mathscr{H}_\Sigma t} I_x \cos\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma t + I_y \sin\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma t,\\
&I_y = I_{ky} + I_{\ell y} \xrightarrow{\mathscr{H}_\Sigma t} I_y \cos\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma t - I_x \sin\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma t,
\end{aligned} \tag{26}$$

および、

$$\begin{aligned}
&I_x \xrightarrow{\mathscr{H}_A t} I_x \cos\omega_A t + (2I_{ky}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell y}) \sin\omega_A t,\\
&2I_{ky}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell y}\\
&\quad\xrightarrow{\mathscr{H}_A t} (2I_{ky}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell y}) \cos\omega_A t - I_x \sin\omega_A t,\\
&I_y \xrightarrow{\mathscr{H}_A t} I_y \cos\omega_A t - (2I_{kx}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell x}) \sin\omega_A t,\\
&2I_{kx}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell x}\\
&\quad\xrightarrow{\mathscr{H}_A t} (2I_{kx}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell x}) \cos\omega_A t + I_y \sin\omega_A t,
\end{aligned} \tag{27}$$

となる。式(26)、(27)では $2I_{kx}I_{\ell z}+2I_{kz}I_{\ell x}$ のようにまとめて時間変化を表しているが、必要に応じてそれぞれの項の時間変化を表すことは容易であろう。

一方、$\mathscr{H}_{\Delta+B}$ による時間変化を求めることは困難と思われる。実際、$\mathscr{H}_{\Delta+B}$ と I_{kx} の交換関係は、

$$[\mathscr{H}_{\Delta+B}, I_{kx}] = +\tfrac{i}{2}\omega_\Delta I_{ky} - \tfrac{i}{2}(\omega_B + i\omega_{\Delta\times B}) 2I_{kz}I_{\ell y}, \tag{28}$$

となり、2 つの演算子 I_{ky}、$2I_{kz}I_{\ell y}$ が現れる。さらに $\mathscr{H}_{\Delta+B}$ と I_{ky} および $2I_{kz}I_{\ell y}$ の交換関係を考えると収拾がつかなくなりそうである。そこで試しに I_{kx} の代わりに I_{k+}の交換関係を計算してみると、

$$[\mathscr{H}_{\Delta+B}, I_{k+}] = +\tfrac{1}{2}\omega_\Delta I_{k+} - \tfrac{1}{2}(\omega_B - i\omega_{\Delta\times B}) 2I_{kz}I_{\ell+}, \tag{29}$$

のように再び 2 つの演算子が生じるものの、I_{k+}がくり返し現れることが分かる。そこで、$\mathscr{H}_{\Delta+B}$ と $2I_{kz}I_{\ell+}$の交換関係を計算すると、

$$[\mathscr{H}_{\Delta+B}, 2I_{kz}I_{\ell+}] = -\tfrac{1}{2}(\omega_B + i\omega_{\Delta\times B}) I_{k+} - \tfrac{1}{2}\omega_\Delta 2I_{kz}I_{\ell+}, \tag{30}$$

となり、式(29)と併せると、I_{k+}と $2I_{kz}I_{\ell+}$は $\mathscr{H}_{\Delta+B}$ との交換関係に関して閉じていると言える。これ以上は §3 を踏襲できないが、次の定理[6] を使える。

$$\begin{aligned}
&\begin{cases} [\mathscr{H}, P] = \alpha P + \beta Q,\\ [\mathscr{H}, Q] = \gamma P + \epsilon Q, \end{cases}\\
&\Leftrightarrow\ e^{-i\mathscr{H}t}\begin{vmatrix} P\\ Q\end{vmatrix} e^{+i\mathscr{H}t}\\
&= \left[\begin{vmatrix} P\\ Q\end{vmatrix}\left(\cos\lambda t - i\frac{\alpha-\epsilon}{2\lambda}\sin\lambda t\right) - \begin{vmatrix} Q\\ P\end{vmatrix} i\frac{\beta}{\lambda}\sin\lambda t\right]\\
&\quad\times \exp\left(-i\frac{\alpha+\epsilon}{2}t\right).
\end{aligned} \tag{31}$$

ただし、

$$\lambda = \sqrt{\tfrac{1}{4}(\alpha-\epsilon)^2 + \beta\gamma}. \tag{32}$$

この定理を式(29)、(30)に適用すると、$\mathscr{H}_{\Delta+B}$ による I_{k+}と $2I_{kz}I_{\ell+}$の時間変化を求めることができる。

$$\begin{aligned}
&\begin{vmatrix} I_{k+}\\ 2I_{kz}I_{\ell+}\end{vmatrix} \xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\,t} e^{-i\mathscr{H}_{\Delta+B}t}\begin{vmatrix} I_{k+}\\ 2I_{kz}I_{\ell+}\end{vmatrix} e^{+i\mathscr{H}_{\Delta+B}t}\\
&= \begin{vmatrix} I_{k+}\\ 2I_{kz}I_{\ell+}\end{vmatrix}\left(\cos\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}t - i\frac{\omega_\Delta}{\omega_{\Delta+B}}\sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}t\right)\\
&\quad+\begin{vmatrix} 2I_{kz}I_{\ell+}\\ I_{k+}\end{vmatrix}\left(i\frac{\omega_B - i\,\omega_{\Delta\times B}}{\omega_{\Delta+B}}\sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}t\right).
\end{aligned} \tag{33}$$

ただし、

$$\omega_{\Delta+B} = \sqrt{{\omega_\Delta}^2 + {\omega_B}^2 + {\omega_{\Delta\times B}}^2}, \tag{34}$$

である。同様にして、I_{k-}、$I_{\ell+}$、$I_{\ell-}$の時間変化が求められ、磁化 I_x の $\mathscr{H}_{\Delta+B}$ による時間変化が定式化される。

$$
\begin{aligned}
I_x = I_{kx} + I_{\ell x} &= \tfrac{1}{2}(I_{k+} + I_{k-}) + \tfrac{1}{2}(I_{\ell+} + I_{\ell-}) \\
\xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\, t}\ & I_x \cos\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}\, t \\
& + (I_{ky} - I_{\ell y})\, \frac{\omega_\Delta}{\omega_{\Delta+B}} \sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}\, t \\
& - (2I_{ky}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell y})\, \frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}} \sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}\, t \\
& - (2I_{kx}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell x})\, \frac{\omega_{\Delta\times B}}{\omega_{\Delta+B}} \sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}\, t.
\end{aligned}
\tag{35}
$$

すなわち、$\mathscr{H}_{\Delta+B}$ によって磁化 I_x は 4 種類のコヒーレンスに分岐 (fan out) する。

その他のコヒーレンスの $\mathscr{H}_{\Delta+B}$ による時間変化は、係数を、

$$
\begin{aligned}
c(t) &= \cos\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}t, \quad s_\Delta(t) = \frac{\omega_\Delta}{\omega_{\Delta+B}} \sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}t, \\
s_B(t) &= \frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}} \sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}t, \quad s_{\Delta\times B}(t) = \frac{\omega_{\Delta\times B}}{\omega_{\Delta+B}} \sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}t,
\end{aligned}
\tag{36}
$$

と定義すると、

$$
\begin{aligned}
I_x \xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\, t}\ & I_x\, c(t) \\
& + (I_{ky} - I_{\ell y})\, s_\Delta(t) \\
& - (2I_{ky}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell y})\, s_B(t) \\
& - (2I_{kx}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell x})\, s_{\Delta\times B}(t), \\
I_{ky} - I_{\ell y} \xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\, t}\ & (I_{ky} - I_{\ell y})\, c(t) \\
& - I_x\, s_\Delta(t) \\
& - (2I_{kx}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell x})\, s_B(t) \\
& + (2I_{ky}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell y})\, s_{\Delta\times B}(t), \\
2I_{ky}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell y} \xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\, t}\ & (2I_{ky}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell y})\, c(t) \\
& + (2I_{kx}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell x})\, s_\Delta(t) \\
& + I_x\, s_B(t) \\
& + (I_{ky} - I_{\ell y})\, s_{\Delta\times B}(t), \\
2I_{kx}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell x} \xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\, t}\ & (2I_{kx}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell x})\, c(t) \\
& - (2I_{ky}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell y})\, s_\Delta(t) \\
& + (I_{kx} - I_{\ell x})\, s_B(t) \\
& - I_x\, s_{\Delta\times B}(t),
\end{aligned}
\tag{37}
$$

および、

$$
\begin{aligned}
I_y \xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\, t}\ & I_y\, c(t) \\
& - (I_{kx} - I_{\ell x})\, s_\Delta(t) \\
& + (2I_{kx}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell x})\, s_B(t) \\
& - (2I_{ky}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell y})\, s_{\Delta\times B}(t), \\
I_{kx} - I_{\ell x} \xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\, t}\ & (I_{kx} - I_{\ell x})\, c(t) \\
& + I_y\, s_\Delta(t) \\
& + (2I_{ky}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell y})\, s_B(t) \\
& + (2I_{kx}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell x})\, s_{\Delta\times B}(t), \\
2I_{kx}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell x} \xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\, t}\ & (2I_{kx}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell x})\, c(t) \\
& - (2I_{ky}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell y})\, s_\Delta(t) \\
& - I_y\, s_B(t) \\
& + (I_{kx} - I_{\ell x})\, s_{\Delta\times B}(t), \\
2I_{ky}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell y} \xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\, t}\ & (2I_{ky}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell y})\, c(t) \\
& + (2I_{kx}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell x})\, s_\Delta(t) \\
& - (I_{kx} - I_{\ell x})\, s_B(t) \\
& - I_y\, s_{\Delta\times B}(t),
\end{aligned}
\tag{38}
$$

とまとめることができる。すなわち、「四つ組」のコヒーレンスが $\mathscr{H}_{\Delta+B}$ によって互いに移り合う。式(37)、(38)で固体 MAS 特有の交差項 $\omega_{\Delta\times B}$ に由来する $s_{\Delta\times B}(t)$ をゼロとすれば溶液に対する式になり、3 種類のコヒーレンスに分岐することになる。こうして、式(26)、(27)、(37)、(38)を使うことによって溶液および固体 MAS NMR におけるコヒーレンスの時間変化を包括的に評価することができる。

3 つの部分ハミルトニアン $\mathscr{H}_\Sigma$、$\mathscr{H}_A$、$\mathscr{H}_{\Delta+B}$ による時間変化が明らかになったので、全ハミルトニアン $\mathscr{H}$ による時間変化を求めることができる。まず、$\mathscr{H}_{\Delta+B}$ による時間変化を表す式(35)に続けて式(27)を適用して $\mathscr{H}_A$ による時間変化を求めると、

$$
\begin{aligned}
I_x \xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\, t} \xrightarrow{\mathscr{H}_A\, t}\ & \\
& \Big[I_x \cos\omega_A\, t + (2I_{ky}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell y}) \sin\omega_A\, t \Big] \\
& \quad \times \cos\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}\, t \\
& + \Big[(I_{ky} - I_{\ell y}) \cos\omega_A\, t - (2I_{kx}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell x}) \sin\omega_A\, t \Big] \\
& \quad \times \frac{\omega_\Delta}{\omega_{\Delta+B}} \sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}\, t \\
& - \Big[(2I_{ky}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell y}) \cos\omega_A\, t - I_x \sin\omega_A\, t \Big] \\
& \quad \times \frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}} \sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}\, t \\
& - \Big[(2I_{kx}I_{\ell z} - 2I_{kz}I_{\ell x}) \cos\omega_A\, t + (I_{ky} - I_{\ell y}) \sin\omega_A\, t \Big] \\
& \quad \times \frac{\omega_{\Delta\times B}}{\omega_{\Delta+B}} \sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}\, t.
\end{aligned}
\tag{39}
$$

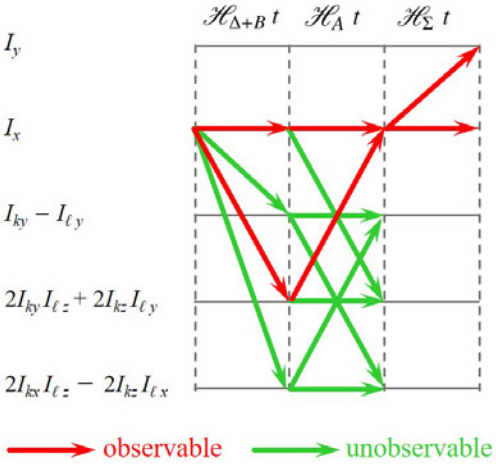
さらに、式(26)を使って $\mathscr{H}_\Sigma$ による時間変化を求める。観測量 I_x と I_y に至る項だけを計算すると、

$$
\begin{aligned}
I_x \xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}\, t} \xrightarrow{\mathscr{H}_A\, t} \xrightarrow{\mathscr{H}_\Sigma\, t}\ & \\
& \Big(I_x \cos\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma\, t + I_y \sin\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma\, t \Big) \\
& \times \Big(\cos\omega_A\, t \cos\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}\, t \\
& \qquad + \frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}} \sin\omega_A\, t \sin\tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B}\, t \Big),
\end{aligned}
\tag{40}
$$

となる。最後まで計算してみると、式(35)、(39)の

多くの計算が不要であることに気がつく。必要最小限の計算を行なうには、始状態の磁化 I_x がどのように分岐して終状態の観測量 I_x、I_y に至るかという道筋を視覚化することが手助けになる。ただし、広く使われているコヒーレンスパス[2,3] はコヒーレンスの次数だけを示すものであり、必要な計算を取捨選択するためには具体的な演算子を書き出してグラフ化し、図 3 のように工夫したダイアグラムを描くと便利である。

図 3



時間領域における NMR 信号の表式は、式(16)と同様、式(40)に Euler の公式 (式(17))を適用して、

$$\begin{aligned}
&\langle I_x\rangle + i\langle I_y\rangle \\
&= \frac{1}{4}\left(1-\frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}}\right)\exp\left[i\left(\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma + \tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B} + \omega_A\right)t\right] \\
&+\frac{1}{4}\left(1+\frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}}\right)\exp\left[i\left(\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma + \tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B} - \omega_A\right)t\right] \\
&+\frac{1}{4}\left(1+\frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}}\right)\exp\left[i\left(\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma - \tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B} + \omega_A\right)t\right] \\
&+\frac{1}{4}\left(1-\frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}}\right)\exp\left[i\left(\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma - \tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B} - \omega_A\right)t\right],
\end{aligned} \tag{41}$$

と求められる。この式をフーリエ変換すると 4 つの共鳴線の周波数が、

$$\begin{aligned}
&\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma \pm \tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B} \pm \omega_A \\
&= \tfrac{1}{2}(\omega_k + \omega_\ell) \\
&\quad \pm \tfrac{1}{2}\sqrt{(\omega_k-\omega_\ell)^2 + (2\pi J)^2 + \omega_{\Delta\times B}{}^2} \pm \pi J,
\end{aligned} \tag{42}$$

共鳴線の相対強度が、

$$1 \pm \frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}} = 1 \pm \frac{2\pi J}{\sqrt{(\omega_k-\omega_\ell)^2 + (2\pi J)^2 + \omega_{\Delta\times B}{}^2}}, \tag{43}$$

で与えられるスペクトルが現れることが分かる。溶液 NMR では、固体特有の交差項 $\omega_{\Delta\times B}$ をゼロとすると、いわゆる AB パターン[1] を示すことになる。スピン結合 $2\pi J$ が化学シフトの差 $\omega_k - \omega_\ell$ に比べて充分小さい場合、共鳴周波数が $\omega_k \pm \pi J$ および $\omega_\ell \pm \pi J$ で強度が等しい共鳴線 (double doublets) が現れる。このような系を「弱く結合したスピン系 (AX 系)」と呼ぶ。これに対して、スピン結合の大きさ $2\pi J$ が化学シフトの差 $\omega_k - \omega_\ell$ と同程度か大きい系を「強く結合したスピン系 (AB 系)」と呼ぶ。また、$\omega_k - \omega_\ell = 0$ の場合 (A_2 系)、AB パターンの外側の 2 つの共鳴線の強度 $1 - \omega_B/\omega_{\Delta+B}$ はゼロになるとともに内側の 2 つの共鳴線の周波数は一致する。これは化学シフト等価なスピン間の J 結合が観測されないことを意味する。特筆すべきことに、固体 MAS NMR では双極子結合などを反映した $\omega_{\Delta\times B}$ のために、化学シフト差 $\omega_k - \omega_\ell$ がゼロであっても強度 $1 - \omega_B/\omega_{\Delta+B} = 1 - 2\pi J/[(2\pi J)^2 + \omega_{\Delta\times B}{}^2]^{1/2}$ はゼロにならず、外側の 2 つの共鳴線は消えない。すなわち、化学シフト等価なスピンに対しても J 結合がスペクトルに反映される[6,7]。

§5. スピンエコーと INADEQUATE[4]

コヒーレンスの時間変化の応用としてスピンエコーの効果を示そう。初期磁化 I_y に対して、遅延時間 τ の後、π パルスを y 方向に印加し、さらに τ を設けた $\tau - (\pi)_y - \tau$ という時系列の間の変化は、複合回転 (composite rotation)[2,3] の考えを使って、

$$\begin{aligned}
I_y &\longrightarrow I_y C(\tau) - (2I_{kx}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell x})S(\tau), \\
2I_{kx}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell x} &\longrightarrow (2I_{kx}I_{\ell z} + 2I_{kz}I_{\ell x})C(\tau) + I_y S(\tau),
\end{aligned} \tag{44}$$

と計算される[4]。ただし、係数は、

$$\begin{aligned}
&C(\tau) \\
&= \left[c(\tau)^2 + s_\Delta(\tau)^2 - s_B(\tau)^2 - s_{\Delta\times B}(\tau)^2\right]\cos 2\omega_A\tau \\
&\quad + \left[2\,c(\tau)\,s_B(\tau) + 2\,s_\Delta(\tau)\,s_{\Delta\times B}(\tau)\right]\sin 2\omega_A\tau, \\
&S(\tau) \\
&= \left[c(\tau)^2 + s_\Delta(\tau)^2 - s_B(\tau)^2 - s_{\Delta\times B}(\tau)^2\right]\sin 2\omega_A\tau \\
&\quad - \left[2\,c(\tau)\,s_B(\tau) + 2\,s_\Delta(\tau)\,s_{\Delta\times B}(\tau)\right]\cos 2\omega_A\tau,
\end{aligned} \tag{45}$$

と求められる。式(44)は、スピンエコーが 4 つのコヒーレンスのうちスピン k および ℓ の入れ替えに関して対称な磁化およびアンチフェーズ磁化を残し、反対称なコヒーレンスをキャンセルすることを示している。ただし、弱く結合したスピン系と違って、係数 $s_\Delta(\tau)$ と $s_{\Delta\times B}(\tau)$ に含まれる ω_Δ、$\omega_{\Delta\times B}$、

$\omega_{\Delta+B}$のために、スピンエコーは化学シフトの効果を完全にはリフォーカスしない。これに対して溶液における弱く結合したスピン系では、$s_{\Delta\times B}(\tau)=0$、$s_B(\tau)=0$、$c(\tau)^2+s_\Delta(\tau)^2=1$ ゆえ、$C(\tau)$ および $S(\tau)$ はそれぞれ $\cos 2\pi J\tau$ および $\sin 2\pi J\tau$ に帰着し、スピンエコーは化学シフトの影響を除去する。

強く結合したスピン系に対するスピンエコーの応用例として、INADEQUATE (Incredible Natural Abundance DoublE QUAntum Transfer Experiment)[8] パルス系列を考える。この測定では 2 スピン系で発生する二量子コヒーレンス (Double Quantum Coherence; DQC) から移行する信号だけが観測される。2 次元パルス系列は $(\pi/2)_x-\tau-(\pi)_y-\tau-(\pi/2)_x-t_1-(\pi/2)_\varphi-(t_2)_\psi$ と表される (図 4)。最後の $\pi/2$ パルスの位相 φ とレシーバの位相 ψ の組み合わせを $\{\varphi,\psi\}=\{x,x\}$、$\{y,-y\}$として測定した信号を加算することによって、スピン結合がない孤立した 1 スピン系に由来する信号を除去することができる。

これまでに得たコヒーレンスの時間変化の式を逐次適用し、また図 4 のようなコヒーレンスの時間変化を表すダイアグラムを利用して必要な計算を取捨選択して実行すると、$\varphi=x$ に対して、

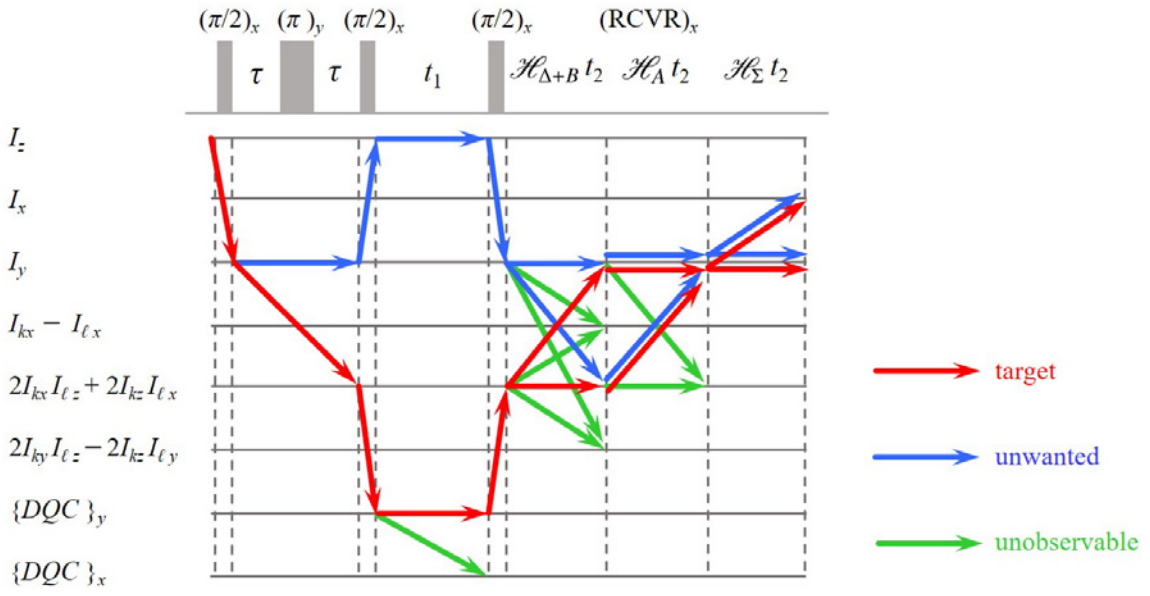
$$
\begin{aligned}
&I_z \xrightarrow{-\frac{\pi}{2}I_x} I_y \\
&\xrightarrow{\mathscr{H}\tau} \xrightarrow{-\pi I_y} \xrightarrow{\mathscr{H}\tau} I_y C(\tau)-(2I_{kx}I_{\ell z}+2I_{kz}I_{\ell x})S(\tau) \\
&\xrightarrow{-\frac{\pi}{2}I_x} -I_z C(\tau)-(2I_{kx}I_{\ell y}+2I_{ky}I_{\ell x})S(\tau) \\
&\qquad = -I_z C(\tau)-2\{DQC\}_y S(\tau)
\end{aligned}
$$

$$
\begin{aligned}
&\xrightarrow{\mathscr{H}t_1} -I_z C(\tau) \\
&-\left(2\{DQC\}_y\cos\omega_\Sigma t_1-2\{DQC\}_x\sin\omega_\Sigma t_1\right)S(\tau) \\
&= -I_z C(\tau) \\
&\quad -(2I_{kx}I_{\ell y}+2I_{ky}I_{\ell x})\cos\omega_\Sigma t_1\ S(\tau) \\
&\quad +(2I_{kx}I_{\ell x}-2I_{ky}I_{\ell y})\sin\omega_\Sigma t_1\ S(\tau) \\
&\xrightarrow{-\frac{\pi}{2}I_x} -I_y C(\tau) \\
&\qquad +(2I_{kx}I_{\ell z}+2I_{kz}I_{\ell x})\cos\omega_\Sigma t_1 S(\tau) \\
&\qquad +(2I_{kx}I_{\ell x}-2I_{kz}I_{\ell z})\sin\omega_\Sigma t_1 S(\tau) \\
&\xrightarrow{\mathscr{H}_{\Delta+B}t_2} \\
&-\left[I_y c(t_2)+(2I_{kx}I_{\ell z}+2I_{kz}I_{\ell x})s_B(t_2)\right]C(\tau) \\
&+\left[(2I_{kx}I_{\ell z}+2I_{kz}I_{\ell x})c(t_2)-I_y s_B(t_2)\right]\cos\omega_\Sigma t_1 S(\tau) \\
&\xrightarrow{\mathscr{H}_A t_2} \\
&-I_y\left[c(t_2)\cos\omega_A t_2+s_B(t_2)\sin\omega_A t_2\right]C(\tau) \\
&+I_y\left[c(t_2)\sin\omega_A t_2-s_B(t_2)\cos\omega_A t_2\right]\cos\omega_\Sigma t_1 S(\tau) \\
&\xrightarrow{\mathscr{H}_\Sigma t_2} \left(I_y\cos\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma t_2-I_x\sin\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma t_2\right) \\
&\times\Big\{-\left[c(t_2)\cos\omega_A t_2+s_B(t_2)\sin\omega_A t_2\right]C(\tau) \\
&\quad +\left[c(t_2)\sin\omega_A t_2-s_B(t_2)\cos\omega_A t_2\right]\cos\omega_\Sigma t_1 S(\tau)\Big\}.
\end{aligned}
\tag{46}
$$

ここで二量子コヒーレンスは、

$$
\begin{aligned}
\{DQC\}_x &= \tfrac{1}{2}(I_{k+}I_{\ell+}+I_{k-}I_{\ell-}) = \tfrac{1}{2}(2I_{kx}I_{\ell x}-2I_{ky}I_{\ell y}), \\
\{DQC\}_y &= \tfrac{1}{2i}(I_{k+}I_{\ell+}-I_{k-}I_{\ell-}) = \tfrac{1}{2}(2I_{kx}I_{\ell y}+2I_{ky}I_{\ell x}),
\end{aligned}
\tag{47}
$$

図 4



と定義され[2,3]、式(46)の中で示したように、全ハミルトニアン $\mathscr{H}$ によって時間 t_1 の間に周波数 ω_Σ だけで時間変化し、J 結合の影響を受けない[4]。

一方、$\varphi = y$ に対してコヒーレンスの時間変化を計算すると、式(46)における $C(\tau)$ と $S(\tau)$ に比例する 2 つの項が同符号になる。この結果、位相の組み合わせ $\{\varphi, \psi\} = \{x, x\}$、$\{y, -y\}$ を用いて測定した信号を加算すると、時間 t_1 で縦磁化 I_z になっている項 ($C(\tau)$ に比例する項) がキャンセルされ、t_1 で二量子コヒーレンスである項 ($S(\tau)$ に比例する項) だけが残る。さらに、時間 t_1 における位相検波 (t_1-quadrature phase detection; t_1-QPD)によって式(46)の $\cos\omega_\Sigma t_1$ 成分とは別に $\sin\omega_\Sigma t_1$ 成分が得られ、データ処理によって指数因子 $\exp(i\omega_\Sigma t_1)$ がもたらされる[4]。最終的な信号の表式は次のようになる。

$$
\begin{aligned}
&\mathscr{W}(\tau, t_1, t_2) \\
&= iS(\tau)\exp(i\omega_\Sigma t_1)\exp\left(i\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma t_2\right) \\
&\quad\times\left[c(t_2)\sin\omega_A t_2 - s_B(t_2)\cos\omega_A t_2\right] \\
&= \tfrac{1}{4}S(\tau)\exp(i\omega_\Sigma t_1) \\
&\quad\times\left\{\left(1-\frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}}\right)\exp\left[i\left(\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma + \tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B} + \omega_A\right)t_2\right]\right. \\
&\qquad-\left(1+\frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}}\right)\exp\left[i\left(\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma + \tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B} - \omega_A\right)t_2\right] \\
&\qquad+\left(1+\frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}}\right)\exp\left[i\left(\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma - \tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B} + \omega_A\right)t_2\right] \\
&\qquad\left.-\left(1-\frac{\omega_B}{\omega_{\Delta+B}}\right)\exp\left[i\left(\tfrac{1}{2}\omega_\Sigma - \tfrac{1}{2}\omega_{\Delta+B} - \omega_A\right)t_2\right]\right\}.
\end{aligned}
\tag{48}
$$

この式を時間 (t_1, t_2) に関して 2 次元フーリエ変換すると、2 次元周波数平面 (F_1, F_2) における共鳴線は F_1 次元では二量子遷移の周波数 $\omega_\Sigma = \omega_k + \omega_\ell$ の位置に、F_2 次元では共鳴周波数が式(41)と同じで信号強度が正負互い違いに現れることになる。

式(48)は INADEQUATE スペクトルにおける信号強度が式(45)で表された係数 $S(\tau)$ に支配されることを示しており、遅延時間 τ を変数とする $S(\tau)$ は二量子コヒーレンスの励起関数と呼ばれる。一般に関数 $S(\tau)$ は J 結合の値だけでなく、化学シフト等方値の差 ω_Δ、固体 MAS 試料における異方的化学シフトの差と双極子結合の交差項 $\omega_{\Delta\times B}$ に依存する。Hz 単位の変数 δ と κ を、

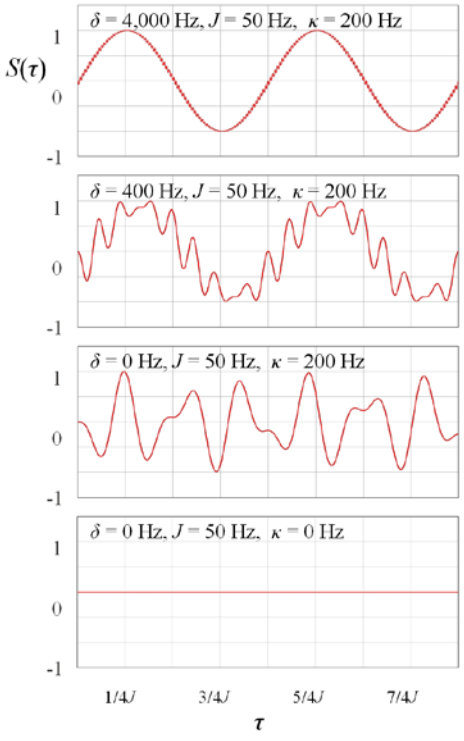
$$
\omega_\Delta = 2\pi\delta, \qquad \omega_{\Delta\times B} = 2\pi\kappa,
$$
$$
\omega_{\Delta+B} = 2\pi\sqrt{\delta^2 + J^2 + \kappa^2}, \tag{49}
$$

と定義すると、二量子コヒーレンスの励起関数は、

$$
\begin{aligned}
S(\tau) &= \frac{1}{\delta^2 + J^2 + \kappa^2} \\
&\times\left[\delta^2 + \left(J^2 + \kappa^2\right)\cos\left(2\pi\sqrt{\delta^2 + J^2 + \kappa^2}\,\tau\right)\right]\sin 2\pi J\tau \\
&- \frac{J}{\sqrt{\delta^2 + J^2 + \kappa^2}}\sin\left(2\pi\sqrt{\delta^2 + J^2 + \kappa^2}\,\tau\right)\cos 2\pi J\tau \\
&- \frac{\delta\kappa}{\delta^2 + J^2 + \kappa^2}\left[1 - \cos\left(2\pi\sqrt{\delta^2 + J^2 + \kappa^2}\,\tau\right)\right]\cos 2\pi J\tau,
\end{aligned}
\tag{50}
$$

と書き換えることができる。図 5 に δ、J、κ の値のいくつかの組み合わせに対して、遅延時間 τ の関数として $S(\tau)$ の挙動を示す。一般に $S(\tau)$ は複雑な形で振舞うが、弱く結合したスピン系 ($\delta \gg J, \kappa$) で $S(\tau)$ は $\sin 2\pi J\tau$ に還元され、$\tau = 1/4J$、$3/4J$、$5/4J$、$7/4J$、… で絶対値が最大になる。一方、溶液測定 ($\kappa = 0$) において化学シフトが等しい ($\delta = 0$) スピンに対して励起関数 $S(\tau)$ は恒等的にゼロになり、INADEQUATE 信号は現れない。これに対して固体 MAS 測定 ($\kappa \neq 0$) では、化学シフト等方値が等しい ($\delta = 0$) スピンに対しても $S(\tau)$ はゼロにならない。この結果、2 次元固体 MAS INADEQUATE スペクトルでは $F_1 = 2F_2$ の対角線上に自己相関信号が現れる (スペクトル例は後で示す)[9,10]。さまざまな遅延時間 τ を用いて測定した自己相関信号の強度を図 5 のような理論曲線でシミュレートすることにより、J 結合の値を決定することができる。すなわち、溶液 NMR スペクトルには化学シフト等価なスピン間の J 結合が原理的に現れないが、固体 MAS INADEQUATE 測定ではそのような J 結合の値が決定できることになる。

図 5



§6. 直交座標系に基づいたプロダクトオペレーターの利用

前節までに解説した理論[4]では、直交座標系で規定される標準的なプロダクトオペレーターを使って、強く結合したスピン系の時間変化を表せることを示した。その一方で、従来の理論[2,3]が弱く結合したスピン系を仮定していることは、これまで明確に説明されて来なかった。この仮定は想定しているハミルトニアン(式(8)と式(19)の違い)から当然であるが、物理的意味としてはたとえばアンチフェーズ磁化 $2I_{ky}I_{\ell z}$ を考えれば理解できる。§2で $2I_{ky}I_{\ell z}$ はスピン ℓ の状態 $|m_{\ell z}=\pm1/2\rangle$ に対応して磁化 $\pm I_{ky}$ を表すことを説明した。しかし、強く結合した2スピン系の4つの固有状態のすべてが $|\pm1/2\,\pm1/2\rangle=|m_{kz}=\pm1/2\rangle\otimes|m_{\ell z}=\pm1/2\rangle$ という直積状態で表されるわけでなく、4つのうち2つの固有状態は $c_1|+1/2\,-1/2\rangle+c_2|-1/2\,+1/2\rangle$ という一次結合で与えられる。それゆえ、強く結合したスピン系に対しては、固有状態間のコヒーレンスに直結した遷移演算子[3,11]を用いた定式化が図られることがある。その場合、直交座標系において印加される RF パルスの取り扱いが複雑になる。しかし、固有状態という「呪縛」はあくまでもミクロな2つのスピンに対するものであり、マクロなスピンの集団に対して定義される密度演算子は固有状態にとらわれる必要はない。言い換えれば、密度行列の表現基底はどのようなものであってもよい。したがって、マクロな系では直交座標系に基づいたスピン演算子の直積として $2I_{ky}I_{\ell z}$ というコヒーレンスが存在する。一般に、マクロな AB スピン系の統計的状態を表すために、AX スピン系に対して使われて来た標準的なプロダクトオペレーターを用いて理論を拡張することに何ら問題はないのである。多くの NMR 研究者は直交座標系に根ざした従来のプロダクトオペレーターに慣れており、拡張した理論を受け入れやすいと考えている。

§7. 「四つ組」のコヒーレンスと四元数

強く結合したスピン系に対して標準的なプロダクトオペレーターを用いることにより、コヒーレンスの時間変化は従来と異なる結果になる。特に、化学シフト差と双極子結合のフリップフロップ項から成る $\mathscr{H}_{\Delta+B}$ による時間変化(式(35)、(37)、(38))では、コヒーレンスが最大4つに分岐する。この4という数字は何に由来するのであろうか。答は、式(9)のようにひとつのハミルトニアン(エルミート演算子)の指数関数によって導かれる時間変化がひとつの回転に対応し、3次元空間における回転変換の自由度が4であることに由来する。すなわち、回転は1つの回転角と回転軸方向を示す3つの射影成分や Hamilton の四元数(しげんすう)[12]で表される。図6のように、方向余弦を示す単位ベクトル (ξ,η,ζ) を回転軸方向、φ を回転角とすると、回転は4次元ベクトルで表される四元数、

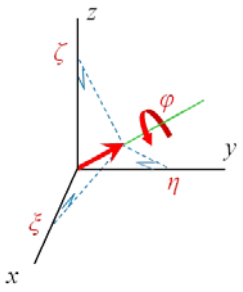
$$\vec{q}=\left(\cos\tfrac{1}{2}\varphi,\ \xi\sin\tfrac{1}{2}\varphi,\ \eta\sin\tfrac{1}{2}\varphi,\ \zeta\sin\tfrac{1}{2}\varphi\right), \tag{51}$$

を用いて、

$$|1\rangle\longrightarrow\cos\tfrac{1}{2}\varphi|1\rangle+\xi\sin\tfrac{1}{2}\varphi|i\rangle +\eta\sin\tfrac{1}{2}\varphi|j\rangle+\zeta\sin\tfrac{1}{2}\varphi|k\rangle, \tag{52}$$

と表される。ここで、$|i\rangle$、$|j\rangle$、$|k\rangle$ は四元数虚数単位である(複素数における虚数単位 i に相当する)。式(52)は式(35)と同じ形式をしており、強く結合した2スピン系におけるコヒーレンスの時間変化が四元数で表されることを具体的に示している。

図6



さらに興味深いことに、任意のハミルトニアンによる時間変化が回転を表す以上、どのようなスピン系に対しても何らかの「四つ組」のコヒーレンスを用いて時間変化を表すことができると考えられる。たとえば、スピン j、k および ℓ から成る3スピン系の統計的状態は8×8の密度行列で表される。観測量の時間変化に関与するプロダクトオペレーターは $I_x=I_{jx}+I_{kx}+I_{\ell x}$ や $4I_{jy}I_{kz}I_{\ell z}+4I_{jz}I_{ky}I_{\ell z}+4I_{jz}I_{kz}I_{\ell y}$ など多く存在するが、それらは密度演算子を表すための一種の可約表現基底であり、適切な一次結合を作ることによって4つの既約表現基底になる。すなわち、多スピン系に対する密度行列は簡約(ブロック対角化)することができ、得られた既約なコヒーレンスは式(35)のようにただ4種類の既約なコヒーレンスに分岐すると考えられる。

§8. INADEQUATE 結果の解析とくりこみ理論

ある種のゼオライト試料に対する ^{29}Si 固体 MAS Refocused-INADEQUATE 測定の結果を図7に示す。隣接する3つの Si サイトに対して $F_1=2F_2$ の対角線上に自己相関信号が現れている。Refocused 実験

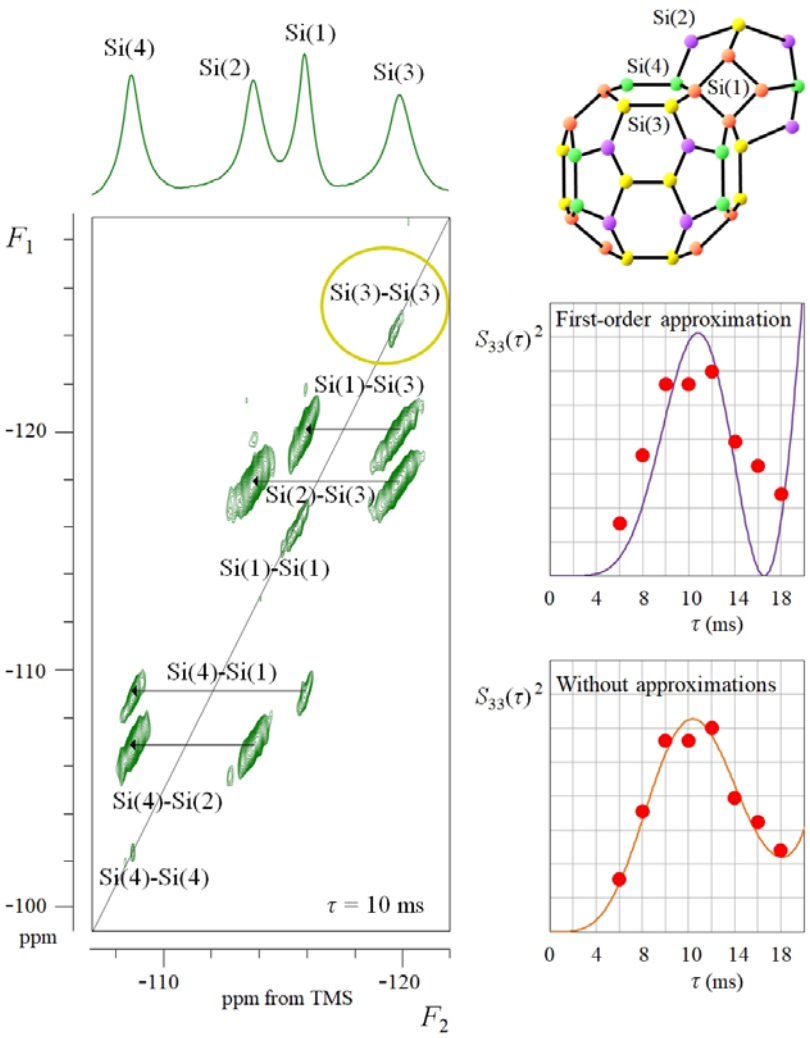
では信号強度が励起関数 $S(\tau)^2$ に従って変化するが、Si(3) サイトに対する測定結果 $S_{33}(\tau)^2$(赤丸) は式(50)を用いた最小二乗フィッティングの結果(紫色の線) と一致しない。これは式(25)のハミルトニアンが最低次の近似に基づくものであり、実際にはより高次の補正項が必要であることを意味する。詳細は他所[13] に譲るが、高次補正項の無限級数和を少数の変数にくりこみ、式(50)における δ、J、κ をそれぞれ δ_∞、J_∞、κ_∞と置き換えることによって近似のない励起関数の式を得ることができる。新たな式を用いたフィッティング結果 (オレンジ色の線) は測定結果をよく再現し、溶液 NMR では得られない J 結合の値が 12.5 Hz と決定された。

この手法は朝永–Schwinger によって考案されたくりこみ理論 (Renormalization theory)[14] に通じるものであり、その理論は「(無限に) 積もった物をじゅうたんの下に掃き入れる」(“Sweep the pileup under the rug”) と比喩的に言い表される。前節で述べたように、任意のスピン系の時間変化が有限個 (4 個以下) のコヒーレンスで表されることから、摂動補正項の無限級数和を少数の変数にくりこむ手法は NMR の諸局面に適用できると考えられる。

くりこみ理論は歴史的にはまず、素粒子物理学の基礎理論のひとつである量子電気力学における発散の問題を解決した。たとえば、電子の磁気モーメントの摂動計算ではいくつかの補正項が無限大になるが、充分に高次までの級数では正の無限大と負の無限大が打ち消し合って物理量が有限の値を取るとされている。それゆえ最初、朝永はくりこみの手法を Self-consistent subtraction method と呼んだ。くりこみ理論による g 値の計算結果は測定結果と 10 桁という高い精度で一致している[14]。

また、摂動展開は収束条件を特徴づける変数がある臨界値より少しでも小さい限り収束し、臨界値に一致すると唐突に発散するように思われる。しかし、たとえば固体 MAS INADEQUATE 測定では、試料回転速度を遅くして双極子結合などで与えられる交差項の大きさと一致させた途端に自己相関信号の強度 $S(\tau)$ が無限大になるはずはなく、また $S(\tau)$ を記述する理論が突然に破綻することは考えにくい。ここでも、くりこみ理論が摂動展開の収束を保証する。実際、くりこみ理論は物性物理学において、Wilson による二次相転移点の近傍温度での臨界現象の理論へと発展を遂げている[15]。

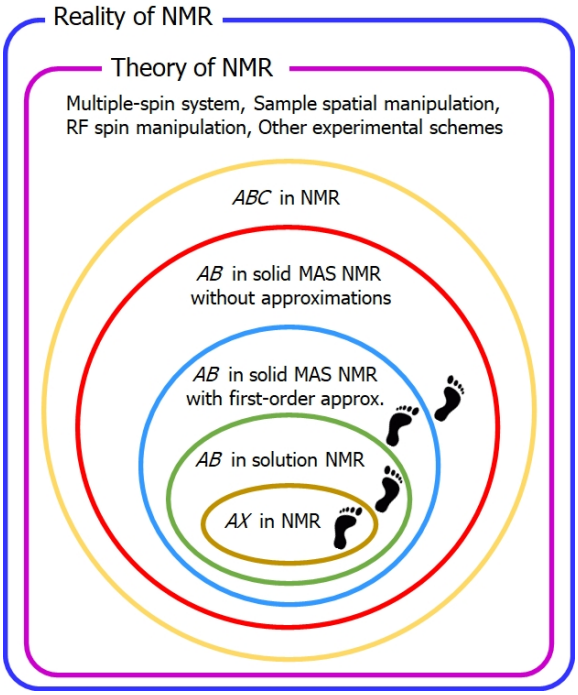
図 7



§9. 理論の位置づけ

本稿で紹介した固体 *AB* 系に対する理論、それが包含する溶液 *AB* 系、*AX* 系に対する理論、逆に固体 *AB* 系の理論を含むより一般的な理論や現実 (実験や観測の結果) の関係を図 8 に示す。

図 8



固体 *AB* 系に対する理論では双極子結合と化学シフト異方性の交差項をまず最低次 (1 次) の摂動近似で扱い、測定結果を説明するために近似のない理論が必要であることを示した。さらに *ABC* スピン系 (互いに強く結合した 3 スピン系) など、多スピン系に対しても理論展開が可能であることを示唆した。たとえば、^{1}H - ^{1}H 双極子結合ネットワークが問題となる ^{1}H 固体高分解能 NMR では ^{1}H - ^{1}H - ^{1}H の第 3 スピンが重要な役割を果たしており[16]、3 スピン系に対して拡張した理論が ^{1}H 固体高分解能 NMR を実現する上で鍵になると期待される。

通常、理論には有効な適用範囲が存在し、実験や観測によって示される現実はそのようなモデル理論の外に存在する。たとえば、新たな多重 RF パルス系列がパルスの不完全性などのために現実には有効でない場合は改良した方法論、すなわち外側に位置する新たな理論が必要になる。そのように漸次的に拡張された理論は、現実を正しく説明していた内包する理論と矛盾しない限り深慮に値し、実験結果によって証明される。本稿で解説した理論は最も適用範囲が狭い従来のプロダクトオペレーター理論から一歩また一歩と踏み出したという意義を持つ。

§10. ミクロとマクロと密度演算子

冒頭に指摘したように、NMR においてミクロとマクロは混同しやすい。これは初学者に限ったことではなく、第一線の研究者でさえもマクロなコヒーレンスを記述するのにミクロなスピンの固有状態にとらわれて不便な遷移演算子[3,11] を用いることがある。しかしその一方で、ミクロな状態を表すスピン演算子とマクロなコヒーレンスを表す密度演算子の類似性はプロダクトオペレーター理論の基本的なアイデアを与えている。ミクロなスピンとマクロな磁化が持つそのような類似性は古くは Feynman、Vernon、Hellwarth が明らかにしている[17]。彼らの研究では、ミクロなスピンに対する Schrödinger 方程式からマクロな磁化の挙動を記述する Bloch 方程式を導出している (FVH の定理)。

ミクロなスピンとマクロな磁化が類似していると言っても、両者はどこかで判然と区別されるように思われる。ミクロなスピンの集団がどれほど大きくなればマクロな磁化と見なせるか、いわゆる「量子の地平線」がどこにあるかを考えることは興味深い。一般にはミクロな存在から系を大きくすると外界からの攪乱によってコヒーレンスが失われ、それがマクロな性質を導くとされている。コヒーレンスが失われるこの過程はデコヒーレンスと呼ばれている[18]。物理的観測という外界からの攪乱によってミクロな波動関数が収縮することも同根であり、これもまたデコヒーレンスと呼ばれる。これらの過程はしばしば密度演算子を用いて議論され[18,19]、「Schrödinger の猫」などの量子力学における観測問題 (解釈問題) に一応の答を与える。このようなデコヒーレンス過程はミクロな対象の数を増やすにつれて漸次達成されるため、ミクロとマクロの間に明確な境界線、すなわち「量子の地平線」が存在するわけではないのである。

このような一般論に対して NMR の対象であるスピン系では、外界からの攪乱が極めて小さいためにマクロな系でもコヒーレンスが保たれ、それが磁化として観測される。逆にマクロな系からスピンの数を少なくして、たとえば数十個のスピンに対しても磁化を定義することができるであろう。その場合、RF パルスなどによって磁化は discrete にカクカクと回転することになり、スピンの数を増やすにつれて磁化の回転は徐々に滑らかになって行く。このような意味で、NMR におけるスピンはミクロとマクロを考える上で教育的な存在であると言えよう。

§11. おわりに

本稿ではまず密度演算子について説明し、プロダクトオペレーターで記述されるコヒーレンスの時間変化を明らかにした。従来の標準的なプロダクトオペレーター理論[2,3]から拡張した部分は、固体 MAS NMR における強く結合した 2 スピン系 (*AB* 系) にも適用可能とした点である[4]。著者が強く結合したスピン系のプロダクトオペレーター理論を考えたのは実はこれが初めてではない。以前の研究では溶液 NMR における *AB* 系[20] および *ABX* 系[21] を扱った。そこでは部分ハミルトニアン $\mathscr{H}_{\Delta+B}$ によって「四つ組」のコヒーレンスのそれぞれが「四つ組」のうちの 3 つに分岐することを見出した。当時はこの 4 という数字が何を意味するのか、またなぜ 4 つのコヒーレンスのうち 3 つだけが選ばれるのか理解できず、このことはずっと頭に引っ掛かっていた。本稿で説明したように、4 という数字はハミルトニアンによるコヒーレンスの回転変換の自由度にほかならないこと、一般には 4 種類すべてのコヒーレンスへの分岐が起こることを明らかにした。こうして 25 年以上 (！) の時を経て、「積年の悩み」が解決したのである。

著者が溶液 NMR における *AB* スピン系を調べることにしたきっかけは、静止した固体粉末試料を用いた同種スピン系に対する 2 次元粉末パターン測定の研究である[22-24]。たとえば ^{13}C - ^{13}C のように対標識した固体試料では、粉末中の微結晶の向きに応じて 2 つの ^{13}C が示す共鳴線が離れたり (*AX* 系になったり)、近づいたり (*AB* 系になったり) する。このような共鳴線の挙動を包括的に理論化するために、溶液試料における強く結合したスピン系に対して適用可能なプロダクトオペレーター理論を考案した。静止した粉末試料におけるスピン結合は溶液試料の *J* 結合に双極子結合を加えたものであり、溶液に対する理論と同じ形式でスペクトルを記述することができる。これに対して固体 MAS NMR では、試料回転によって変調された化学シフト異方性と双極子結合から交差項が生じ、溶液および固体静止 NMR の範疇に収まらないため、理論を拡張する必要があった。

一方、くりこみ理論に関しては、INADEQUATE 信号の強度変化 $S(\tau)$ をシミュレーションによって再現するために高次の摂動補正項を計算していたところ、摂動項の無限級数和を少数の変数に置き換えるというアイデアに至った。先行研究を調査してみると、朝永–Schwinger のくりこみ理論 (1947-1951 年発表、1965 年ノーベル賞)、Wilson の臨界現象の理論 (1971 年発表、1982 年ノーベル賞) という歴史的偉業に触れ、実に 70 年以上 (！) の周回遅れを経験することになった。

電磁気力、強い核力、弱い核力に対する理論はくりこみ可能であるが、重力理論はくりこみ可能でないことが 4 つの力の統一を阻んでいることはよく知られている。そのようなくりこみ可能性は摂動展開における高次項が有限個の「種類」(Feynman ダイアグラムにおける図形の種類) に分類されることに対応する。本稿では、スピン系のハミルトニアンから導かれる系の時間変化がつねにたった 4 種類 (以下) のコヒーレンスで表されることを示した。これは摂動計算したハミルトニアンが有限個の種類から成る項 ($\mathscr{H}_{\Delta+B}$ の場合、3 つの項) で表されることに由来し、NMR における種々の摂動理論がくりこみ可能であると考えている。多くの先達の研究に敬意を払う次第である。

最後に、新たな理論展開の契機になった固体 MAS INADEQUATE 測定[10] を提案して頂いた西山裕介博士に感謝する。また氏との私信を通じて、^{1}H 固体高分解能 NMR を考える上で、^{1}H - ^{1}H - ^{1}H スピン系の第 3 スピンが重要であることを学んだ。一方、四元数と回転変換の関係を教示して頂いた根本暢明博士にも深く感謝する。

参考文献

[1] Abragam, A., (1961) The Principles of Nuclear Magnetism. Clarendon Press; (1964) 核の磁性. 吉岡書店.

[2] Sørensen, O. W., Eich, G. W., Levitt, M. H., Bodenhausen, G., and Ernst, R. R., (1983) Product Operator Formalism for the Description of NMR Pulse Experiments. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectr.* **16**, 163-192.

[3] Ernst, R. R., Bodenhausen, G., and Wokaun, A., (1987) Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. Clarendon Press; (1991) エルンスト2次元NMR. 吉岡書店.

[4] Nakai, T., (2020) A Theoretical Study on a Novel Cartesian Product Operator Formalism Applicable to Strongly-Coupled Two-Spin 1/2 Systems in Solution-State and Solid-State MAS NMR Spectroscopy. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **93**, 1449-1458.

[5] Banwell, C. N., and Primas, H., (1963) On the Analysis of High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra. *Molec. Phys.* **6**, 225-256.

[6] Nakai, T., Challoner, R., and McDowell, C. A., (1991) Forbidden Nuclear Magnetic Resonance Transitions between Singlet and Triplet States in Spin-1/2 Systems in Rotating Solids. *Chem. Phys. Lett.* **180**, 13-18.

[7] Challoner, R., Nakai, T., and McDowell, C. A., (1991) *J* Coupling in Chemically Equivalent Spin Pairs as Studied by Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *J. Chem. Phys.* **94**, 7038-7045.

[8] Bax, A., Freeman, R., and Kempsell, S. P., (1980)

Natural Abundance 13C-13C Coupling Observed via Double-Quantum Coherence. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 4849-4851.
[9] Fayon, F., Massiot, D., Levitt, M. H., Titman, J. J., Gregory, D. H., Duma, L., Emsley, L., and Brown, S. P., (2005) Through-Space Contributions to Two-Dimensional Double-Quantum *J* Correlation NMR Spectra of Magic-Angle-Spinning Solids. *J. Chem. Phys.* **122**, 194313.
[10] 中井利仁, 西山裕介, (2015) 強い結合をもつスピン系に拡張した積演算子理論 ～化学シフト等価核間のINADEQUATE相関ピークの記述～. 固体NMR･材料フォーラム **57**, 43-44.
[11] Duma, L., Lai, W. C., Carravetta, M., Emsley, L., Brown, S. P., and Levitt, M. H., (2004) Principles of Spin-Echo Modulation by *J*-Couplings in Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR. *Chem. Phys. Chem.* **5**, 815-833.
[12] Conway, J. H., and Smith, D. A., (2003) On Quaternions and Octonions: Their Geometry, Arithmetic, and Symmetry. CRC Press.
[13] Nakai, T., (2021) Perturbation Approach for NMR Signals with Infinite-Order Corrections and its Application to Solid-State MAS INADEQUATE Spectra Exhibiting Auto-Correlation Peaks due to Chemically-Equivalent Spin Pairs: Analogy to Renormalization Theory. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **94**, 1156-1165.
[14] 江沢洋, 上條隆志, (2019) 物理学と数学 (江沢洋選集Ⅳ). 日本評論社.
[15] 江沢洋, 渡辺敬二, 鈴木増雄, 田崎晴明, (1994) くりこみ群の方法. 岩波書店.
[16] Duong, N. T., Raran-Kurussi, S., Nishiyama, Y., and Agarwal, V., (2020) Can Proton-Proton Recoupling in Fully Protonated Solids Provide Quantitative, Selective and Efficient Polarization Transfer ? *J. Magn. Reson.* **317**, 106777.
[17] Feynman, R. P., Vernon Jr., F. L., and Hellwarth, R. W., (1957) Geometrical Representation of the Schrödinger Equation for Solving Master Problems. *J. Appl. Phys.* **28,** 49-52.
[18] Schlosshauer, M., (2010) Decoherence: And the Quantum-To-Classical Transition. Springer.
[19] 町田茂, (1990) 基礎量子力学. 丸善.
[20] Nakai, T., and McDowell, C. A., (1993) INADEQUATE NMR Spectra of Extremely Strongly Coupled Spin Systems. *Molec. Phys.* **79**, 965-983.
[21] Nakai, T. and McDowell, C. A., (1994) Product Operator Theory for *ABX* Spin Systems and its Application to H-C-C INEPT NMR Experiments. *Molec. Phys.* **81**, 337-358.
[22] Nakai, T., and McDowell, C. A., (1994) Residual Chemical-Shift Effects in Spin-Echo NMR Powder Patterns of Homonuclear Dipolar-Coupled Spins. *Chem. Phys. Lett.* **217**, 234-238.
[23] Nakai, T., and McDowell, C. A., (1994) Characterization of Homonuclear Spin Pairs from Two-Dimensional Spin-Echo NMR Powder Patterns. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 6373-6383.
[24] Nakai, T., and McDowell, C. A., (1995) Determination of Spin Parameters Reflected in the Nuclear Magnetic Resonance Powder Patterns for Two Equivalent 31P Nuclei in Lawesson's Reagent. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **4**, 163-171.

中井 利仁（なかい・としひと）
京都大学理学部卒。同大学院理学研究科博士課程修了（理学博士）。ブリティッシュコロンビア大学助手、分子科学研究所非常勤講師、筑波大学講師、徳島大学助教授などを経て、日本電子株式会社（現 株式会社JEOL RESONANCE）入社（現職）。NIMS-JEOL計測技術ラボ研究員およびJST研究員（現職、兼任）。

総説論文：解説

NMRを用いた動的構造解析への取り組みと創薬への展開

産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門
竹内 恒
koh-takeuchi@aist.go.jp

はじめに

タンパク質を含む生体分子は生体内において、構造を柔軟に変化させ、他の生体高分子や代謝物などと複合体を形成することで機能を発揮する。そのため、生体分子の機能の理解には、動的構造解析が必須であり、生理条件において原子レベルでの動的構造解析が可能なNMR法の活用が極めて有効となる。溶液NMR法は水溶液中における生体分子の精緻な立体構造決定ができるだけでなく、生体分子の持つ構造平衡や、リガンドに対する結合に伴う構造変化、His残基に代表されるような互変異性、過渡的で弱い相互作用、天然構造非形成領域や液・液相分離など、動的なシステムを俯瞰的かつ定量的に解析することが可能であり、その機能の解明に貢献してきた。

生体分子の動的構造を解析するNMR法の力は、高分子への応用が始まった当初から注目されていた。例えば、BPTIタンパク質の分子内部に埋もれた芳香族環の反転が見出されたことで、タンパク質のもつ極めて動的な特徴の一端が解明された[1]。その後、NMR装置と解析技術の発展とともに、様々な生体分子への応用が展開され、今日では、Gタンパク質共役型受容体、イオンチャネル、キナーゼ、分子シャペロンなど、数多くの重要な生体分子の機能が、動的構造の観点から明らかにされるに至った（**図1**）[2～5]。

NMR法は、安定同位体標識により、タンパク質の動的特性を変化させることなく、原子分解能でタンパク質の動的構造を解析できる。この特性は、化学修飾を必要とする一分子計測などとは一線を画している。また、NMR法は、他の構造解析手法では検出することが困難な、1%程度しか存在しない僅かなタンパク質の構造状態も、平衡の中でその構造的特徴を明らかにすることが可

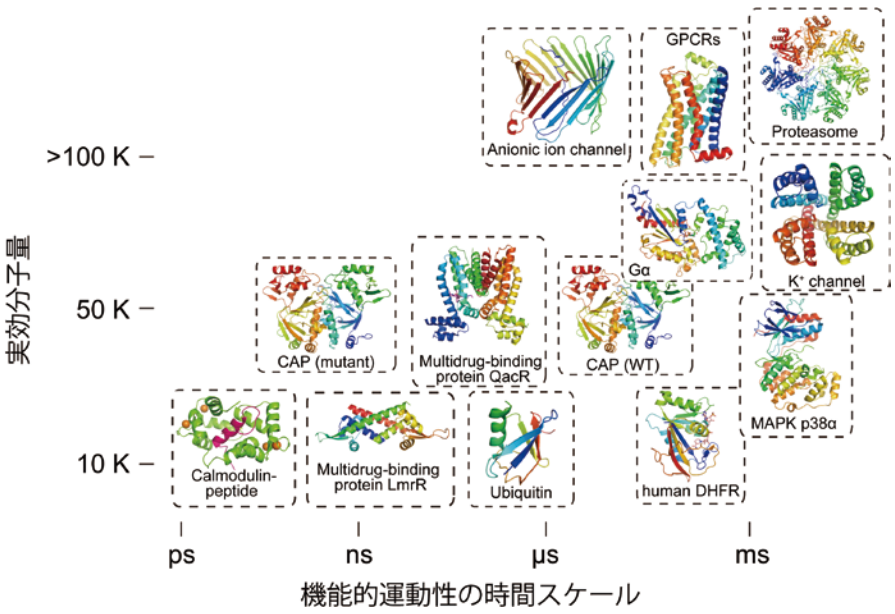


図1　タンパク質の機能的運動性の時間スケールと実効分子量：NMR法により明らかにされた機能的運動性の時間スケールと、測定が行われた系における（膜タンパク質の場合はミセルやナノディスクを含む）の見掛けの分子量を示す。図には、すでに明らかとなった機能的運動性の時間スケールのみが強調されているが、それ以外の運動性が機能に関連している可能性を排除するものではない。図は文献［21］より部分的に改変した。

受領日：2020年11月30日

能である。さらに、NMR法による運動性の定量的解析により、タンパク質の各状態の構造エントロピー変化を推定することも可能である。ここでは、我々が対象としてきた多剤結合転写因子の動的構造解析を中心に、生物学的に重要な系に対するNMR法の適用と、動的構造解析に基づいた創薬開発への貢献について概説する。

多剤耐性結合転写因子の動的構造解析

様々な化合物を認識し、細胞外に排出する多剤耐性システムは、すべての生物種に保存された最も基本的な防御機能であり、病原性バクテリアや癌における多剤耐性は、先進国においても医療分野における問題の一つである。多剤耐性システムは、大きさや形状の異なる様々な化合物を、高い親和性で認識してセンサーの役割を担う多剤結合転写制御因子（MDTR）と、MDTRにより発現量を制御され、化合物の排出を担う多剤排出ポンプから構成される。多くの場合、両者は共通の化合物を認識し、MDTRが認識された化合物を多剤排出ポンプが排出するシステムを構築している（図2A）。

MDTRが様々な化合物を認識するためには必然的にその立体構造を変化させなければならない。しかし、大きさや形状の異なる様々な化合物をどのようにして認識するのか？特異性の低さと高い親和性をどのようにして両立するのか？多様な化合物の認識を、転写制御という共通の機能ど

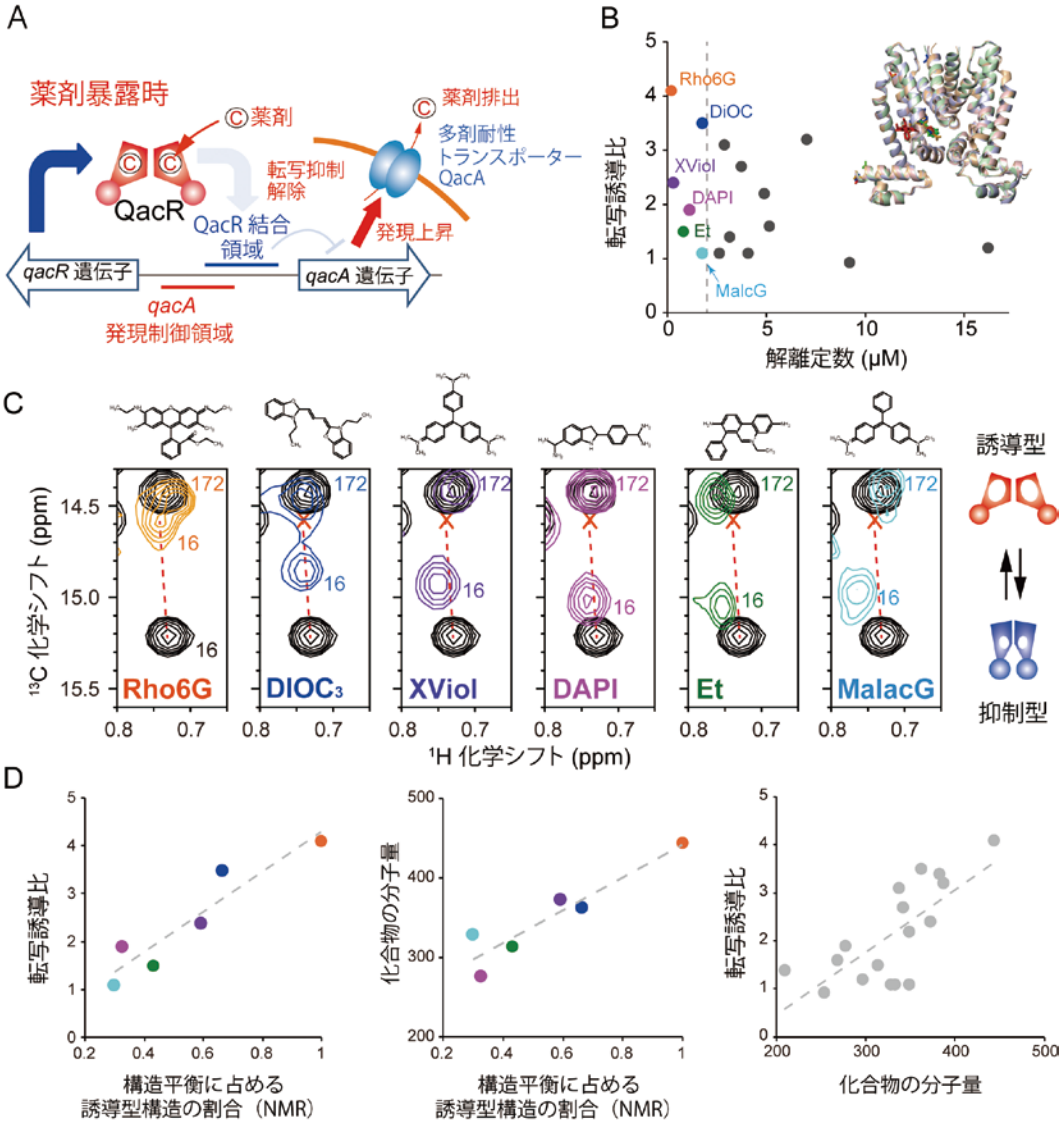


図2　動的構造解析に基づくQacRの多剤耐性制御機構。（A）QacRによる多剤耐性制御の模式図。QacRが化合物と結合することで転写抑制が解除される結果、QacAの発現が増大し、化合物の排出が促進される。（B）QacRを介する化合物の誘導比と親和性。挿入図にはRho6G（橙）、crystal Violet（XViol；紫）、Ethidium（Et；緑）、MalcG（水色）との複合体構造の重ね合わせを示す。（C）非標識状態および化合物結合状態のQacRのIle-16 δ1シグナル。（D）化合物結合に伴う化学シフト変化と化合物誘導比および化合物の体積との相関。図は文献［6］より部分的に改変した。

のように転換するのか？と言った機能の核心に関わる問いに対して、X線結晶構造解析を中心とするこれまでの研究は、十分な答えを与えてこなかった。筆者らは、これをMDTRが本質的に動的であることに起因すると考え、NMR法により動的構造解析を行うことで、その機能メカニズムに迫ることとした。

原核生物のMDTRは化合物結合部位とDNA結合部位を有する2量体タンパク質で、定常状態では多剤耐性遺伝子のオペレータ領域に結合して転写を抑制する。一方、様々な化合物との結合によりDNAから解離し、多剤耐性トランスポーターの発現を亢進する（**図2A**）。原核生物のMDTRは、3種のファミリーに大別できるが、それらは異なる立体構造と化合物認識機構を持つ。筆者らは、これらについて横断的な解析を行っているが、本稿では、TetRファミリーに属するQacRおよびPadRファミリーに属するLmrRを中心としに解説する。

QacRは、黄色ブドウ球菌由来であり、生物学的、構造生物学的に最もよく研究されてきたMDTRである。QacRは、多剤耐性トランスポーター QacAの発現を制御している（**図2A**）。遺伝学的解析により、QacRは定常状態でも一定量の発現を許容する一方、最大5倍程度のQacAの発現誘導が可能であることが示されている。QacRに結合・制御する化合物は多岐にわたり、20種以上の化合物が結合することが知られている。一方、QacRを介する転写誘導能は、化合物ごとに大きく異なっており、最もよく誘導を示すrhodamine6G（Rho6G）が4倍強と最大の発現誘導を示す一方で、全く誘導を示さないmalachite green（MalcG）のような化合物も存在する（**図2B**）。

QacRについては、DNAおよび化合物に結合した状態の構造が明らかになっている。DNA結合時の抑制型構造では多剤結合ポケットは400 Å^{3}程度と小さいが、化合物の結合はポケット1200 Å^{3}程度に拡張し、DNA結合ドメイン間の相対配置を変化させる。この誘導型構造への転換により、DNAへの結合が弱まる結果、転写抑制が解除され、QacAの発現が誘導される。しかしながら、化合物の発現誘導能が全く異なるのに、その複合体構造がほぼ同一であり（**図2B挿入図**）、発現誘導能の違いを構造的に説明できていない。そこで筆者らは、最も強い誘導を示すRho6Gと、全く誘導を示さないMalcGを含む、6種の化合物と結合した際のQacRの動的構造を、NMR法により解析することとした（**図2B**）。

図2Cには、化合物結合に伴うIle-16 δ1由来の^{1}H^{13}C相関シグナルを示す。Ile-16 δ1由来のNMRシグナルは、化合物結合に伴って^{13}C側に高磁場側にシフトしており、各種化合物の結合時のシグナルは非結合状態とRho6G結合状態を結んだ直線付近に分布している。Ile-16は、化合物結合に伴う構造変化をDNA結合部位に伝える境界領域に位置する残基であり、観測された化学シフト変化は、抑制型から誘導型への構造転換を反映している。ここで注目すべきなのは、化合物は類似の化学シフト変化を起こす一方で、その化学シフト変化量が異なる点である。これは2種類の構造間の速い平衡が存在し、その割合が異なる際に特徴的であり、QacRの場合、抑制型と誘導型との構造平衡が存在し、化学シフト変化が大きいほど、誘導型の割合が多いことを意味する。実際、**図2D左**に示すように、化学シフト変化量と転写誘導比は有意に相関しており、NMR法から明らかになった誘導型構造の割合が、転写誘導比を決めることが分かる。さらに、解析を進めると、構造平衡変化と化合物の体積が相関することが判明し（**図2D中央**）、大きな化合物ほど、活性構造をとる割合が大きくなり、高い転写誘導能を示すことが明らかとなった。なお、QacR-化合物複合体が、抑制型と誘導型の間の構造平衡を共有するならば、他の残基においても同様の化学シフト変化がみられるはずである。ここには示さないが、Ile-16以外の残基でも分子全体にわたって同様の化学シフト変化が見られており、上記モデルは支持されている。この点について、詳しくは原著論文を当たられたい[6]。また、構造解析を行わなかった化合物についても、化合物の体積と転写誘導能の間に有意な相関が見られたことから、化合物の大きさと誘導能との関係は、QacRと化合物の相互作用において広く当てはまることが明らかとなった（**図2D右**）。一方、オペレータDNAは、化合物とは逆向きの化学シフト変化を誘起し、構造平衡を抑制型に傾ける[6]。このことは、非結合状態においても、一定量のQacRは誘導型の構造を保持していることを意味する。化学シフト変化量から、非結合型のQacRの約25％は誘導型構造を取ると推算され、この値は、qacA遺伝子の*in vivo*での基底的な発現レベルと一致している。

Rho6G結合時に約4倍の発現誘導がなされることを含め、NMRによる動的構造解析により、生体におけるQacRの転写誘導活性が定量的に説明された[6]。

構造平衡による多様な化合物の認識は、MDTRに共通の特徴である。筆者らは異なるファミリーに属するLmrRが、ヘリックス間の角度を箸の様に変化させながら多様な化合物を挟み込むように認識することを見出している[7]。その際、LmrRもまた、非結合状態で複数の構造間の平衡にあった。このような相互作用は、鍵と鍵穴モデルを超えた動的な相互作用である。動的な相互作用としては、化合物が結合した後に構造変化する「誘導適合」はよく知られており、これは酵素の結合ポケットにおいて、反応の効率的な促進などに寄与している。一方、「構造選択」は、結合する前に構造平衡が存在し、結合時に特定の構造が選ばれ複合体を形成する機構であり、MDTRの化合物への結合はこちらに該当する。構造選択機構は、ヘモグロビンにおいてその存在が予測されていたものの、その構造的な証明はされてこなかった。しかし、近年のNMR技術の発展により、ユビキチンやキナーゼにおいてその存在が証明されるに至った[8, 9]。筆者らも、2014年に構造選択によるMAPキナーゼp38αへの高親和ATP結合機構を見出している[10]。すなわち、構造平衡の定量解析は、構造選択に基づくタンパク質の機能の理解に必須であり、今後、NMR法による定量的な動的構造解析技術の重要性はさらに高まってゆくと考えられる。

構造エントロピー：分子認識における速い運動性の役割

先に挙げたQacRやLmrRの構造平衡は、分子全体におよぶ構造変化を伴う。その様なタンパク質の協調的運動は、μs-msと比較的ゆっくりとした時間スケールを持つ。しかし、生体分子の機能においては、より速いps-ns時間スケールのランダムな運動が重要な場合がある。具体的には、タンパク質の相互作用において、速くランダムな運動が、構造エントロピーとして、結合親和性に寄与することが複数の系において示されている。

結合親和性を決定するギブス自由エネルギー（ΔG）は、エンタルピー項（ΔH）とエントロピー項（–T・ΔS）により記述される。構造エントロピーはこのエントロピー項の一部を構成するが、これはNMR法により実験的に決定されるオーダーパラメータ（S^2）から推定可能である[11]。構造エントロピーの絶対値は運動モードにより大きく異なることから、これを定量することは困難であるが、構造エントロピーの相対変化は、結合の前後で運動モードが変化しないことを仮定すると、合理的に推定できる[12～17]。カルモジュリンとペプチドとの相互作用においては、複数のペプチドが同様の相互作用様式で結合することが知られているが、ITCにより決定された分子間相互作用におけるエントロピー項の大きさは、ペプチドによって大きく異なる。結合に伴うエントロピー変化が、主にタンパク質の表面に存在する水和水の離脱に由来すると考える従来の見方に立つと、これは不思議な話である。Wandらはカルモジュリンのメチル基のS^2変化から、相互作用における構造エントロピーを計算すると、ITCにより決定された分子間相互作用のエントロピーのバリエーションをうまく説明できことを示している[17, 18]。また、複数のタンパク質の解析から、メチル基のS^2変化から分子全体の構造エントロピー変化を経験的に推定する手法も報告されている[19, 20]。

筆者らは、先に挙げたMDTRの一種LmrRにおいて、化合物結合時の構造エントロピーの増大が、リガンド親和性の向上に寄与することを報告している[7]。化合物がLmrRに結合すると、化合物結合ドメインとDNA結合ドメインの界面に位置する疎水コアにおいてメチル基の速い運動性が顕著に増大し、これらのサイトがアロステリックかつエントロピー的に結合に寄与していることが示された。運動性増大に伴う構造エントロピー利得は2–3kcal/molに相当し、MDTRが、低い特異性にもかかわらず高い親和性で化合物に結合することを説明する。LmrRは非結合状態で構造平衡を有し、化合物との結合により、その構造平衡は非結合状態とは異なる割合へと変化する。筆者らは、LmrRにおいて、化合物結合にともなう構造エントロピー利得が、化合物によって誘起された構造平衡の変化の大きさと相関することを見出しており、多様な化合物との結合を可能にする構造平衡が、構造エントロピーを介した高親和性相互作用と共役していることが明らかになった[21]。

NMRの動的構造情報の創薬における活用

上述のLmrRの例で明らかなように、タンパク質の運動性はその結合親和性や特異性に影響を与

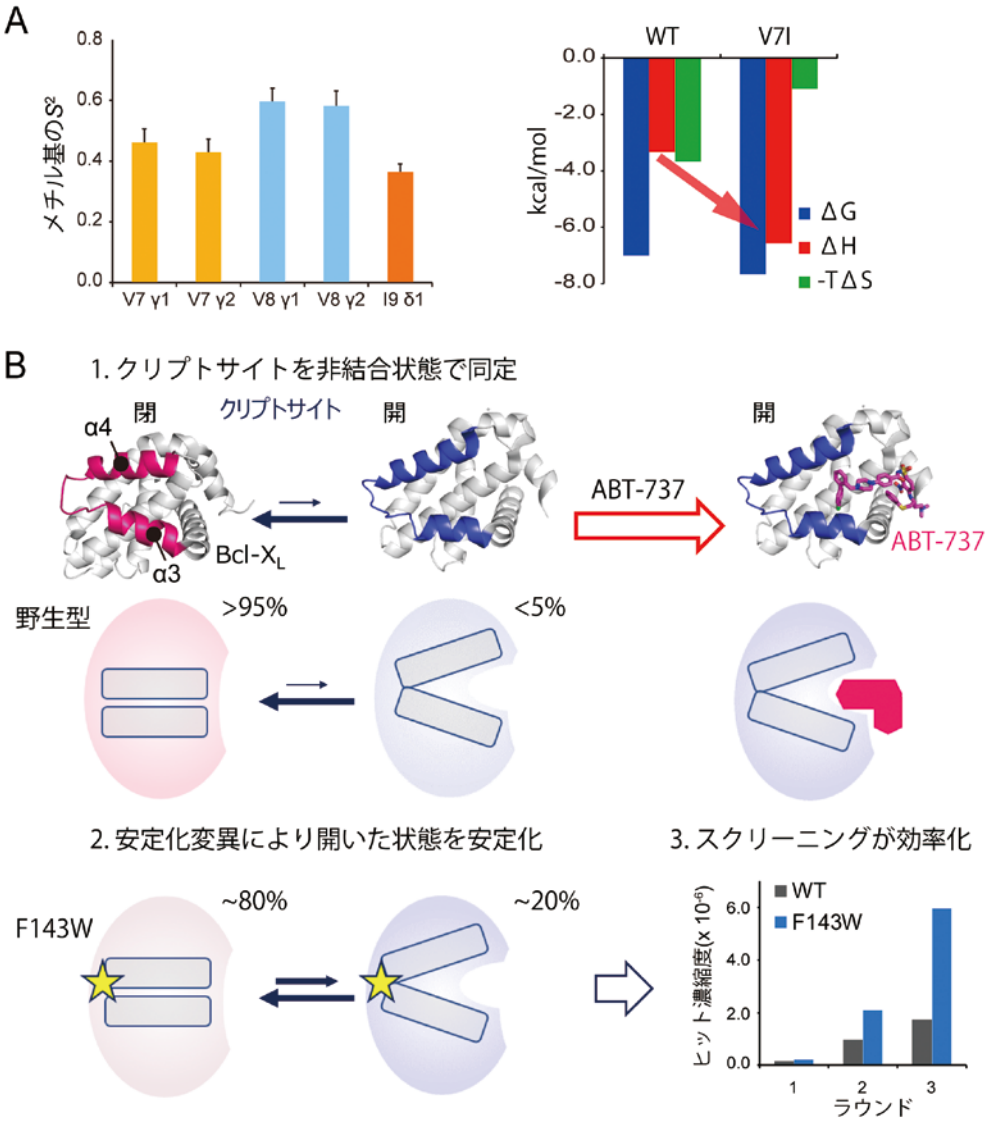


図3　NMRの動的構造情報の創薬への活用（A）FCT解析を利用したリガンドの構造最適化。FCT実験により決定されたメチル基のS^2値。結合界面のメチル基（Val-7, Ile-9）は、結合状態でもps-ns時間スケールの運動性を保持している（左）。運動性の高いメチル基に変異を導入することにより、親和性が改善される（右）。図は文献［22］より部分的に改変した。（B）NMRの動的構造情報による$Bcl\text{-}X_L$のクリプトサイトの同定とその活用。図は文献［25］より部分的に改変した。

えるため、創薬においても重要である。リガンドの標的結合状態での運動性はこれまでほとんど研究されていないが、運動性情報の利用は今後、薬剤の構造最適化など、創薬における重要な局面においてその役割を果たすと考えている。

筆者らは、MAPキナーゼp38αとリガンドペプチドの相互作用をモデル系として、交換系における禁断コヒーレンス遷移を観測する手法（Forbidden Coherence Transfer in Exchange System；Ex-FCT）を開発することで、結合したリガンドの運動性と空間相補性を同時に定量し、構造最適化に活用できることを示している[22]。本研究では、タンパク質の運動性解析に用いられてきたFCT法を交換系に拡張し[23]、親和性の弱いリガンドでも、同様の情報を得られるように工夫している。Ex-FCT法を、重水素化された受容体に結合したリガンドに適用すると、メチル基のps-ns運動性を定量できる。p38αとリガンドペプチドとの相互作用にEx-FCT法を適用したところ、興味深いことにp38αの結合ポケット内部に位置するVal-7 γおよびIle-9 δ1は、溶媒に露出したVal-8 γよりも顕著なps-ns運動性を示した（**図3A**）。すなわち、メチル基の運動性は、溶媒への露出とは必ずしも相関せず、結合面にあっても一定の運動性を保持している。ps-ns時間スケールでのVal-8 γの低い運動性は、p38αとリガンドとの間の水素結合ネットワークに関与する近位の水によりメチル基の動きが制限されたためと

考えられる。

FCT実験では、受容体の重水素化率を変化させることで、各メチル基のレセプターとの空間相補性を解析することが可能である。解析の結果、Val-7 γ2の空間相補性は最適ではなく、その周囲に隙間が存在することも明らかになった。その情報に基づいて、Val-7をより大きなIleに置換すると、元のペプチドと比較して親和性が約3倍に改善した（**図3A右**）。このように、Ex-FCT実験で得られる情報は、リガンドの構造最適化において、動的構造の観点から適切な部位を見つけるために活用できる。また、FCT法は、トリフルオロメチル（CF_3）にも拡張可能であり、そのような官能基を持つ低分子化合物にも適用可能であることを報告している[24]。

NMR法から得られる動的構造情報は、タンパク質の運動性を積極的に制御し、リガンドの探索を効率化することにも活用できる。クリプトサイトは、通常のポケットとは異なり、普段は閉じているが、リガンドが結合することで形成される隠れた創薬サイトである。クリプトサイトは従来、結合するリガンドが発見された後に明らかになっていたが、40%のヒトタンパク質にクリプトサイトが存在するという試算もあり、その活用が期待されている。特に、タンパク質・タンパク質相互作用（PPI）など、難しい標的に対する阻害剤はクリプトサイトを標的することが多く、クリプトサイトの活用により、創薬の幅が大きく広がることが期待される。

抗がん剤の標的あるBcl-X_Lもクリプトサイトを持つタンパク質の一例である。非結合状態のBcl-X_Lは広く浅い化合物が結合しにくい表面であるが、抗がん剤ABT-737は、Bcl-X_Lのα3/α4間に存在するクリプトサイトを開くことで、深く強く結合する（**図3B上段右**）。筆者らは、このように動的な創薬サイトであるクリプトサイトを、あらかじめ同定・活用できないかと考えた。特に、先にも述べた構造選択の考えに基づくなら、僅かながらクリプトサイトが開いた構造が存在し（**図3B上段中央**）、その開いた構造に化合物が結合しているとも考えられる。もしそうであるならば、クリプトサイトをアロステリック変異により開いた状態で安定化し、結合可能な構造を増やすことでスクリーニングを効率化することも可能になろう。

筆者らが非結合状態のBcl-X_Lの温度依存性解析を行った結果、温度を288 Kから308 Kに変化させると、一部のシグナルに化学シフト変化が見られた。その割合を定量した結果、非結合状態のBcl-X_Lに数%ではあるが、構造平衡の変化が検出された。この存在割合の低い異なる構造の存在は、緩和分散法によっても支持されている。さらに、温度依存性や緩和分散を示す領域は、ABT-737の結合に伴いアロステリックな化学シフト変化を示した領域と合致したことから、この低存在割合の構造は、クリプトサイトが開いた構造であると考えた[25]。

そこで次にクリプトサイトをアロステリック変異により開いた状態で安定化できないかを検討した結果、クリプトサイトの外にあるが、構造的に連動しているα5/α6境界面にF143W変異体を見出した。F143W変異体は、非結合状態において、WTの非結合状態とABT-737結合状態との間にシグナルを与え、その化学シフト値から、クリプトサイトの開口割合が約20%程度まで上昇していると考えられた。また、F143W変異体を用いたファージディスプレーにおいて、結合ペプチド濃縮効率はWTと比べて大幅に改善し（**図3B右下**）、得られたペプチドはWTのクリプトサイトに結合した。このように、NMR情報を指標した構造平衡の制御は、標的タンパク質のドラッガビリティを改善し、リガンド探索を効率化することが可能である。また、本研究の結果は、タンパク質構造の機能的な重要性と、その存在割合が必ずしも一致しないことを示している。今回の場合、機能性の高いクリプトサイトが開いた構造は、高々数%しか存在しなかった。この結果は、構造平衡の中で、僅かな機能性構造を捉えることのできるNMR解析の重要性を示していると考えられる。また、F143W変異体は、リガンドへの親和性は改善したものの、沈殿しやすい特性を持っていた。クリプトサイトが開いた構造は、疎水面が露出していることから、Bcl-X_Lは機能性部位をあえて隠すことで、機能性と安定性を両立させていると考えられる。

最後に

NMR法は実験条件の自由度が高いことから、固体NMRまで含めて考えると、その対象を限定されることが少ない。そのため、生きた細胞内での生体分子の動的構造や相互作用を解析することが可能であり、その機能と構造を同じ条件で直

接結びつける構造・機能相関解析を真の意味で実現しうる。また、創薬などの応用分野においても、その適用範囲は低分子化合物など、従来の創薬モダリティに限定されず、中分子医薬やバイオ医薬、核酸医薬など現在注目されている多様なモダリティにも敷衍できる。その際には、新たなNMR技術の開発がハード、ソフトの両面で必要とされる。例えば筆者らは近年、バイオ医薬の高次構造評価に資する^{15}N直接観測CRINEPT技術[26]や^{19}F^{13}C-TROSY技術[27]を開発したが、極低温プローブや高磁場NMR技術など、ハード面での技術革新がなくてはその実現が不可能であった。また、応用を志向して開発されたこれらの技術は、高度な重水素化を行えない多くの高分子量タンパク質にも適用可能であり、新たなNMR技術の開発は、基礎・応用の両面に貢献する。NMR法により提供される独自の構造情報は、その高い定量性により、X線結晶構造解析や極低温電子顕微鏡などの他の構造解析手法や計算機科学的手法とも統合できる。よって、今後、これらの構造解析技術との組み合わせにより、生物学的機能の理解と創薬への展開がさらに加速することが期待される。

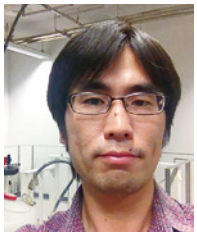
謝　辞

ここで紹介した研究の多くは、東京大学大学院・薬学系研究科 嶋田一夫先生の指導の下行われた。研究の推進は、横浜市立大学の高橋栄夫先生、ハーバード大学のGerhard Wagner先生、ダナファーバーがん研究所のHari Arthanari先生、第一三共RDノバーレ株式会社の半沢宏之博士、滝沢剛博士、中外製薬株式会社の鳥澤拓也博士奥出順也博士、産業技術総合研究所の水越弓子博士、徳永裕二博士、今井美咲さんほか共著者の皆さんとともに行われた。本研究は、日本学術振興会科学研究費、挑戦的研究（萌芽：18K19415）、新学術領域研究（研究領域提案型：20H04722）、基盤研究（B：20H03378）の援助を受けて行われた。

文　献

[1] K. Wuthrich, G. Wagner, NMR investigations of the dynamics of the aromatic amino acid residues in the basic pancreatic trypsin inhibitor. *FEBS letters* **50**, 265-268 (1975).
[2] I. Shimada, T. Ueda, Y. Kofuku, M. T. Eddy, K. Wüthrich, GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures. *Nature Reviews Drug Discovery* **18**, 59-82 (2019).
[3] K. Takeuchi, H. Takahashi, S. Kawano, I. Shimada, Identification and Characterization of the Slowly Exchanging pH-dependent Conformational Rearrangement in KcsA. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 15179-15186 (2007).
[4] M. Osawa, K. Takeuchi, T. Ueda, N. Nishida, I. Shimada, Functional dynamics of proteins revealed by solution NMR. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 660-669 (2012).
[5] R. Ishima, D. A. Torchia, Protein dynamics from NMR. *Nat Struct Biol* **7**, 740-743 (2000).
[6] K. Takeuchi, M. Imai, I. Shimada, Conformational equilibrium defines the variable induction of the multidrug-binding transcriptional repressor QacR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 19963-19972 (2019).
[7] K. Takeuchi, Y. Tokunaga, M. Imai, H. Takahashi, I. Shimada, Dynamic multidrug recognition by multidrug transcriptional repressor LmrR. *Scientific Reports* **4** (2014).
[8] O. F. Lange *et al.*, Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution. *Science* **320**, 1471-1475 (2008).
[9] K. A. Henzler-Wildman *et al.*, A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature* **450**, 913-916 (2007).
[10] Y. Tokunaga, K. Takeuchi, H. Takahashi, I. Shimada, Allosteric enhancement of MAP kinase p38α's activity and substrate selectivity by docking interactions. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 704-711 (2014).
[11] M. Akke, R. Brueschweiler, A. G. Palmer, NMR order parameters and free energy: an analytical approach and its application to cooperative calcium(2+) binding by calbindin D9k. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 9832-9833 (1993).
[12] M. Akke, Conformational dynamics and thermodynamics of protein-ligand binding studied by NMR relaxation. *Biochem Soc Trans* **40**, 419-423 (2012).
[13] A. J. Wand, The dark energy of proteins comes to light: conformational entropy and its role in protein function revealed by NMR relaxation. *Curr Opin Struct Biol* (2012).
[14] T. I. Igumenova, K. K. Frederick, A. J. Wand, Characterization of the Fast Dynamics of Protein Amino Acid Side Chains Using NMR Relaxation in Solution. *Chemical Reviews* **106**, 1672-1699 (2006).
[15] A. J. Wand, Dynamic activation of protein function: a view emerging from NMR spectroscopy. *Nat Struct Biol* **8**, 926-931 (2001).
[16] A. J. Wand, K. A. Sharp, Measuring Entropy in Molecular Recognition by Proteins. *Annu Rev Biophys* **47**, 41-61 (2018).
[17] K. K. Frederick, M. S. Marlow, K. G. Valentine, A. J. Wand, Conformational entropy in molecular recognition by proteins. *Nature* **448**, 325-329 (2007).
[18] M. S. Marlow, J. Dogan, K. K. Frederick, K. G. Valentine, A. J. Wand, The role of conformational entropy in molecular recognition by calmodulin. *Nat Chem Biol* **6**, 352-358 (2010).
[19] J. A. Caro *et al.*, Entropy in molecular recognition by proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 6563-6568 (2017).
[20] V. Kasinath, K. A. Sharp, A. J. Wand, Microscopic insights into the NMR relaxation-based protein

conformational entropy meter. *J Am Chem Soc* **135**, 15092-15100 (2013).
[21] Y. Tokunaga, T. Viennet, H. Arthanari, K. Takeuchi, Spotlight on the Ballet of Proteins: The Structural Dynamic Properties of Proteins Illuminated by Solution NMR. *Int J Mol Sci* **21** (2020).
[22] Y. Mizukoshi *et al.*, Improvement of Ligand Affinity and Thermodynamic Properties by NMR-Based Evaluation of Local Dynamics and Surface Complementarity in the Receptor-Bound State. *Angew Chem Int Ed Engl* **55**, 14606-14609 (2016).
[23] V. Tugarinov, R. Sprangers, L. E. Kay, Probing side-chain dynamics in the proteasome by relaxation violated coherence transfer NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* **129**, 1743-1750 (2007).
[24] Y. Tokunaga, K. Takeuchi, I. Shimada, Forbidden Coherence Transfer of 19F Nuclei to Quantitatively Measure the Dynamics of a CF3-Containing Ligand in Receptor-Bound States. *Molecules* **22** (2017).
[25] Y. Mizukoshi *et al.*, Targeting the cryptic sites: NMR-based strategy to improve protein druggability by controlling the conformational equilibrium. *Sci Adv* **6** (2020).
[26] Y. Tokunaga *et al.*, Structural Fingerprints of an Intact Monoclonal Antibody Acquired under Formulated Storage Conditions via 15N Direct Detection Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of Medicinal Chemistry* **63**, 5360-5366 (2020).
[27] A. Boeszoermenyi *et al.*, Aromatic 19F-13C TROSY: a background-free approach to probe biomolecular structure, function, and dynamics. *Nature Methods* **16**, 333-340 (2019).



竹内 恒（たけうち・こう）

1999年3月	東京大学・薬学部　卒業
2001年3月	同　大学院・薬学系研究科　修士課程　修了
2004年3月	同　大学院・薬学系研究科　博士後期課程　修了（博士（薬学））
2003年4月－2005年3月	学術振興会特別研究員（DC2→PD）
2005年4月－2010年3月	ハーバード大学医学部　博士研究員
2006年4月－2008年3月	学術振興会海外特別研究員
2010年4月－2013年3月	産業技術総合研究所　研究員
2013年4月－2017年3月	産業技術総合研究所　主任研究員
2014年10月－2018年3月	さきがけ研究員（兼務）
2017年4月－現在	産業技術総合研究所　研究グループ長

総説論文：解説

高磁場・極低温　動的核分極（DNP）法 ―装置と方法論の開拓と応用―

大阪大学蛋白質研究所
松木 陽
yoh@protein.osaka-u.ac.jp

はじまり

2005年の秋頃だったと思う。MIT、Bob Griffinからのメールだ。「DNPはとてもじゃないけど安定した技術とは言えない。まだ分光計の前に座ってDNPで構造生物学ができるなどとは想像しないでほしい。常に装置の機嫌が研究の進行を決めるし、その覚悟がないとうちに来ても困難に直面すると思う。それでもと言うなら来ても良いが、、」そういう内容だったと記憶している。いや、願ってもない。私としてはDNPのいわゆるNuts and Boltsを肌で習得したい。これが目的だったからだ。かくして2006年春から、ボストンでのDNP修行が始まった。

確かに。ジャイロトロンはもちろん、分光計もプローブも、acquisition/processingソフトも手作りで、使いながら日々問題を発掘しては更新していく。毎日ジャイロトロン管の真空漏れと戦い、マイクロ波がよく通らずにRFコイルを何度も巻き直した。Rick TemkinのジャイロトロンLabとは発振モードはどれが最適か？　試料管の材質と形状は？　DNPマトリクスの誘電率をサブミリ波領域で計れるか？　二週にいっぺんの会議が欠かせなかった。基本的に装置は「動いているうちが勝負」。装置がうまく走り始めると、今だ！とばかりに朝までかけて必要なデータを取り揃える。そんな状態だった。

そうこうして2009年春、蛋白研に舞い戻ってきた。藤原敏道研では、「DNPはもっと高磁場に行かないとだめだ！」というプロジェクトが始まっており、DNPが蛋白質のような多信号系の解析にもちゃんと使える技術になることを目指していた。ただ、B_0が10Tを超えると、ESRの励起にはもはやマイクロ波の領域を超え、発振・制御・伝送全てにおいて技術的に未発達の準光学系、いわゆるサブミリ波が必要になる。加えて、DNPの効率は理論上、磁場の上昇とともにガタ落ちなのが元からわかっている。なのに目標の実効感度利得ε_{tot}は従来NMRの1000倍だというではないか。けっこう大変な挑戦だと思った。［細かいことだが、以下の文章では、サブミリ波のオンとオフにおける信号強度比、いわゆるDNPエンハンスメントε_{DNP}と、冷却による利得（ε_{Curie}；キュリー効果）と常磁性分極剤によるクエンチや脱分極効果に起因する感度損失（ε_θ）を加味した実効感度利得$\varepsilon_{tot} = \varepsilon_{DNP}\ \varepsilon_{Curie}\ \varepsilon_\theta$を区別して言及する。］

事実、2009年に至っても、DNPの技術はまだまだの状態だった。観測例がある磁場は10年近くも$B_0 = 9.4$ Tで足踏みが続いていたし、実効感度利得ε_{tot}もリアルな蛋白質試料ではせいぜい数十倍だった。ジャイロトロンは周波数固定（263 GHz）で、DNP条件の最適化には超電導磁場掃引コイルを積んだ特注のNMR磁石が必要だった。試料温度は液体窒素をジャブジャブ使うわりに100 Kどまり。エキチのタンクが空になる時間を計算し、それが運悪く真夜中でも休暇中でも、3日に一度はタンクを継ぎ足しに来る必要があった。

次節以降に詳述するように、その後の蛋白研における我々の装置開発は、上記の問題の全てに大きな進歩をもたらした：2010年に$B_0 = 14.1$ TにおけるDNPを観測（初の超10 T DNP）[1]、その後16.4 Tでも観測した。磁場とともにガタ落ちのDNP効率はヘリウムを使う極低温DNP装置を開拓して克服した[2, 3]。また、サブミリ波の周波数を滑らかに変えられるジャイロトロンを開発してDNPに初めて応用した[4, 5]。これでNMR磁場を変えることなく（磁場掃引コイル不要！）ワンタッチでDNP条件を最適化できるようになった。極低温（20 K）MASも液体ヘリウムは一切使わず、高価なヘリウムを消費することなく、もちろん途中でガスを継ぎ足したりすることなく、何週間でも安定な連続測定ができるようになった[6, 7]。従来のNMRみたいに、多次元測定を複

受領日：2020年11月30日

数仕込んで、終わるまで何日でも放って置けるのだ。感度利得は蛋白質試料でも1000倍以上、0.2 μmolの非標識蛋白質試料で多次元測定ができる。考えられる限り感度利得と実用性の両立を突き詰め、超高感度多次元DNP-MAS-NMR法の基盤技術は揃ったと言える。今回、これらの努力に進歩賞という形で一定の評価を与えていただき、チームの一員として大変嬉しく思う。そこで、一つの区切りとして、以下に我々の16.4 T DNP装置と方法論の現況（2020年11月現在）をまとめることにする。

16.4 T 極低温 MAS DNP NMR 装置

サブミリ波の発振・伝送・制御システム

図1 (a) は蛋白研のB_0＝16.4 T（^{1}H周波数で700 MHz、e$^-$周波数で460 GHz）DNP装置のマグネット配置図である。二台の周波数可変ジャイロトロンとNMR磁石が準光学系伝送路（コルゲート導波管）で結ばれている。サブミリ波をガウス型ビームに成形し、内壁に波長の1/4程度（～0.16 mm）周期の凸凹（corrugation）のある導波路を用いるのが、伝送・制御の効率の点から最良という準光学系のセオリーに従っている。導波路はまずジャイロトロンのほぼ真上に向かって伸び、天井付近を水平に設置されている。途中、サブミリ波合成器（**図1 (a)**, inset）で、周波数の異なる二つのサブミリ波は一つになり、合成サブミリ波がNMRに向かう設計である。伝送路の総延長は最長15 mにもなるが、伝送効率はジャイロトロンの出力窓からNMR磁石までで60％以上ある。2009年当初、単なる銅の平滑パイプを伝送に用いたときは0.5％以下だったので、雲泥の感がある。サブミリ波のパワーと周波数は途中の直角ベンドミラー（マイターベンド）に設置したダイオードとミキサー（**図1 (b)**）で常時検出しており、これをもとに安定化や能動的制御を行う。パワーと周波数以外にも、2台のジャイロトロンの加速電圧、電子ビーム電流、チューブ真空度など、運転パラメータはすべて中央の制御PCで集中管理している。ジャイロトロンは真空管光源であるから、環境や冷却水の温度変化に出力も周波数も左右されやすく、これらのフィードバック長期安定化機構は多次元DNP–NMR測定のノイズ低減に必須であった。パワーの変動は電子ビーム電流を変化させる電子銃ヒーターに、周波数の変動は真空管ボディの電圧にPID制御の上フィードバックし安定化した（変動は0.5％以下）。

精密に安定化できるということは、自在に値を制御できることも意味する。**図2**に示すのは制御PCのスクリーンショットで、サブミリ波周波数（紫線）を460 GHz付近で10 MHzステップで増加させている様子を示す。やり方は、画面左中程のフィールドにターゲット周波数をタイプし、リターンキーを押すだけである。周波数スイッチの度、せいぜい数秒で周波数の切り替えが完了するから、60データ点くらいの滑らかなDNP周波数プロファイルが30–40分で取得できる（**図1 (c)**）。ボストンでは同様の測定は一日がかりだったのを思い出す[8]。もちろんNMR磁場を掃引するのと違い、磁石内の冷媒を失うこともないし、磁場を変えるたびにRF回路をチューニングし直す手間からも開放される。周波数プロファイルの計測は、DNP効率の最適化のみならず、新規分極剤や新規条件におけるDNP機構の解明に重要

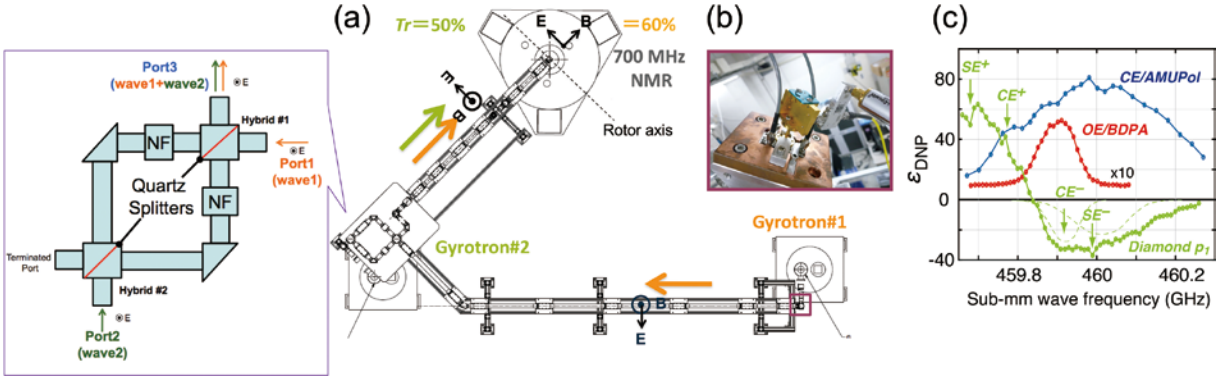


図1 (a)　阪大蛋白研の16.4 T DNP MAS NMR装置の磁石配置図とサブミリ波合成器の概念図（inset）。(b) マイターベンドに設置したサブミリ波ダイオードとミキサーで、サブミリ波のパワーと周波数を常時監視している。(c) 周波数可変ジャイロトロンなら、DNP周波数プロファイルが速くきれいに計測できる。バイラジカルを用いる交差効果（青）、モノラジカルのオーバーハウザー効果（赤）、ダイヤモンドp1-centerの固体効果・交差効果（緑）。60データポイントほどの滑らかな周波数プロファイルが30–40分で得られる。

で、これをいつでも気軽に実行できるのはユーザーの研究自由度に大きく寄与する。

サブミリ波発振のタイミングは半導体スイッチで電子の加速電圧をオン・オフすることで行う。パルスプログラムからマイクロ秒の分解能で制御できるようにしてあり、RFパルスと同期した多重サブミリ波DNP-NMRスキームを実行できる。例えば**図9**のように、空間選択的DNP測定に応用している。

閉回路・極低温ヘリウム試料回転DNPプローブシステム

多くの場合電子から核への分極移動効率（DNP効率）は外部磁場の上昇とともに急激に悪化するが、これはヘリウムを用いる「極低温MAS-DNP法」を開拓して克服した。温度の減少とともに電子スピンの熱平衡分極が上昇するし、電子・核スピン共に緩和が抑えられDNP効率自体が向上する効果などで、磁場上昇による損失を完全に補償し、それ以上の利得を実現できる。具体的には、従来の100 K-DNPで、磁場が9 Tから16.4 Tになると感度利得ε_{tot}は良くても1/3–1/4に低下するが、100 K-DNPに対して30 K-DNPで得られる感度利得は10倍以上である（**図5b**）。

極低温ヘリウムを使うMAS-NMRプローブシステムは1970年代から多くの研究室から開発例があるが、例外なく液体ヘリウムを蒸発させるか、液体ヘリウムに熱交換させるシステムであった。ヘリウムは現在枯渇の危機にあるし最近は特に高価なので、これらの方式はまったく実用にならない。その点、**図3**の閉回路ヘリウム試料回転システムは強力である（国内特許、米国特許）[6]。まず液体ヘリウムは一切使わない。ヘリウムガスを圧縮し、電気冷凍機（Gifford-McMahon式）で冷やしてプローブに送り込み、試料の冷却と回転に使う。現状、～180 L/minのヘリウムガス流を“on the fly”で室温から15 Kに冷やせる。プローブからの戻りガスは新たに入力されて来る室温ガス流と熱交換させることで室温に戻し、それから元の圧縮機に返す。こうすることで、限りのある冷却能力を最大限に活用、装置全体のサイズを抑えられる。またガスの圧縮、流量制御、フィルタリング、バッファリングなどにはすべて常温仕様の精度の高い機器が使えるようになる利点もある。ヘリウムガスは同じループをいつまででも回り続け、その間一切漏れたり消費されることがないため、このまま数週間（放っておけばもっと）に渡って連続運転可能である。運転コストは冷凍機の電気代だけで、極低温領域（15–40 K；GM冷凍機5台使用）では～¥900/hr、中温域（40–70 K；2台使用）で～¥350/hr、高温域（70–200 K；1台使用）で～¥180/hrである。ヘリウム雰囲気における検出系の電弧放電の問題は、パッシェンの法則を利用した新設計で回避し

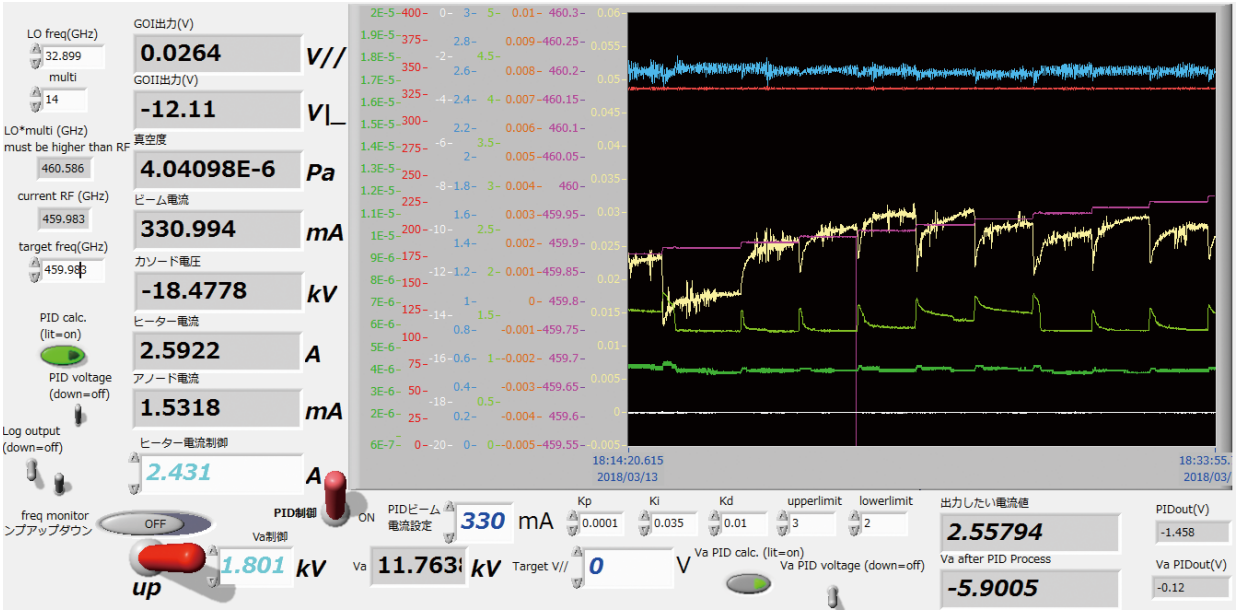


図2　ジャイロトロン制御画面。サブミリ波の周波数（紫線）は、画面左の”target freq（GHz）”にタイプするたびに変化し安定化される。周波数スイッチのタイミングでパワー（白）、アノード電流（黄緑）、チューブ真空度（緑）が多少変動するがすぐに落ち着く。電子ビーム電流（赤）も一定になるよう電子銃ヒーター出力（青）がPID制御されている。

た（国内特許）。試料の温度は20 Kから200 Kまでシームレスに可変で、従来の100 K-DNPの条件も含むし、もっと高温のDNP測定も可能である。運転コストは極低温領域（15–40 K）でさえ、現在popularな液体窒素ベースの外国製100 K-DNP装置の運転コストと同程度かそれ以下である。GM冷凍機の能力は年々向上し、より少ない冷凍機で低温が得られるようになっており、この比較は今ならもっと閉回路システム優位になるだろう。ちなみにヘリウムガスのボンベは14 m^3のものを一本購入すると、実験の繰り返し回数にもよるが、たいてい2–3ヶ月使えるので、コストとしては微々たるものである。

図4に示すのは、極低温での回転実績で、数年に渡る改良の過程がプロットされている。タービンを推すヘリウムジェットの速度向上、タービン形状やロータ外壁とベアリングステータ内壁間クリアランスの最適化を経て、現状、20 Kで8 kHz、30 Kで12 kHz回る（紫データ）。この過程で、試料管キャップが低温（＜40 K）で抜ける、地味だが致命的な問題を呈したが、低温ほどきつくなり、室温では抜けやすい特殊なキャップを開発（国内特許、米国特許）して克服した。このキャップはごく一般的な樹脂製で比較的安価であるし、室温ではダメージなく容易に抜き差しできるので、繰り返し使用に耐える優れものである。

試料冷却の手順も複雑ではない。最も効率が良いのは（i）測定の前の日、冷凍機をつけてから帰ることである。熱交換器を完全な室温から20 Kまで冷やすのには4–5時間かかるが、次の朝来ると完全に冷えている。一度冷えると数日は冷たいままなので、数日以内に次の測定があるならこの作業は不要になる。（ii）試料をセットしプローブを設置、冷却装置と接続したら、プローブ内、試料室や配管をヘリウムガスでパージする必要がある。減圧に続くヘリウムガス置換を数度繰り返

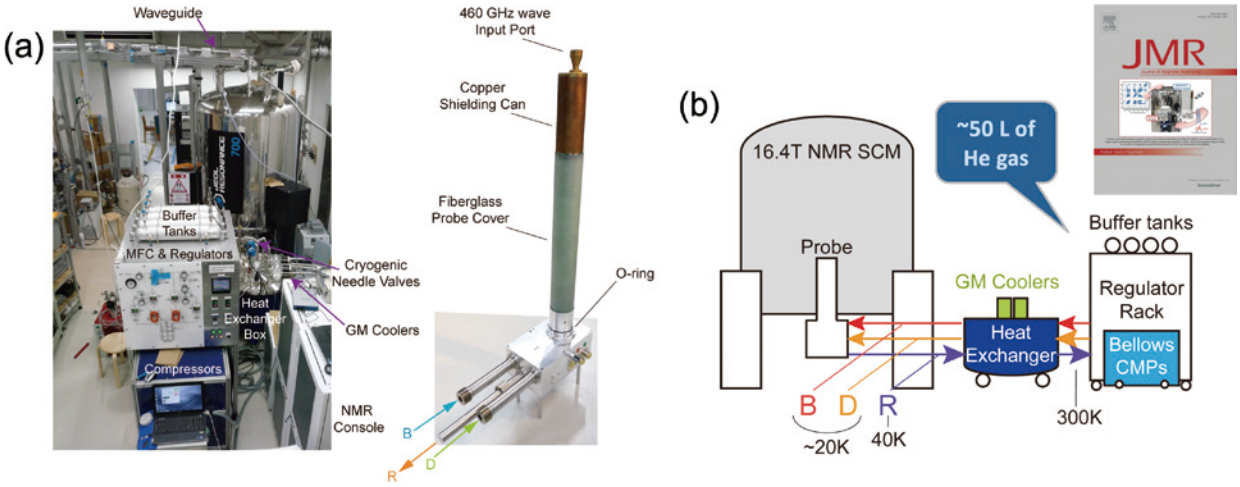


図3（a）　閉回路ヘリウム試料回転システムを含むシステムとプローブの外観。（b）閉回路システムの概念図。２系統のヘリウムガス流（B and D）をベローズポンプで圧縮し、GM冷凍機で冷却したのちプローブに送り試料の冷却と回転に使う。戻りガス（R）は貯蔵されることなく元のベローズポンプに戻り、同じループを回り続ける。

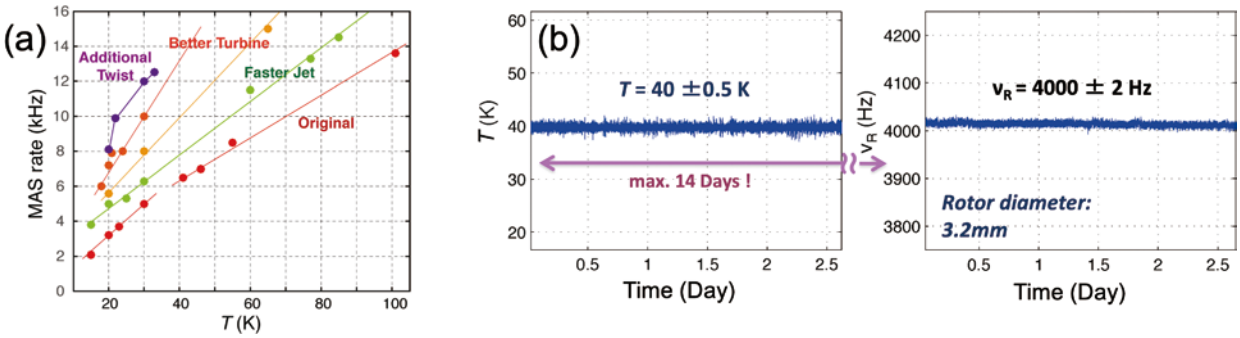


図4（a）　試料温度と回転数。閉回路ヘリウム試料回転システムで、DNP試料を詰めた3.2mm窒化ケイ素管を回している。JEOLの標準型ロータとMASモジュール（赤）から開発を始め、数年に渡る改良の成果がプロットされている。現状が紫のデータ。（b）温度と回転数の長期安定性。

す作業で、これは自動化されており（国内特許）5分ほど放っておくだけである。冷却装置自体は通常いつもヘリウムで満たされており、外気にさらされることはない。(iii) パージが済んだらシステムにヘリウムガスを数十リットル導入し、試料をゆっくり回転させつつ（例えば～2kHz)、冷却を開始する。30分ほどで、ベアリングガスの温度が～120Kになるので、(iv) ここで試料回転数を好きなところまで上げる。ここから冷却速度はグッと向上し、室温から30Kまで冷やすのにコミコミで1時間程度である。試料交換は現状、プローブのみ窒素ガスのパージで室温まで昇温し（～30分)、プローブを開けて試料を交換した後、上記の冷却手順 (ii) - (iv) を行う。再び測定を始めるまで、全行程で約2時間程度であるから、一日に数試料なら測定可能である。目下プローブを昇温せずに試料交換するシステムも製作中である。

2020年夏頃からは、試料回転用の極低温ヘリウムの戻りガスで、内蔵のプリアンプとデュプレクサを冷却できるDNPプローブもテスト中である。検出系の回路をスピナーガスで「ついでに」冷やすのであって、これを実行することに追加の運転コストは掛からない。生データは今後報告することにして、現状、熱雑音の低下などから信号雑音比は検出系を冷却しない場合と比べ3–4倍向上したことを記しておく。これは以下に示すDNPによる感度利得に相乗的に上乗せできる利得であり、究極的に高感度なMAS-DNP-NMR装置を実現する。

感度利得

高磁場・MAS条件下、すぐに応用に使える超高感度

極低温条件では、磁場の上昇で失われるDNP効率を完全に巻き返し、余りある利得があることは上でも触れた。**図5 (a, b)** は感度利得の温度依存性で、試料管内温度22Kにおいてε_{DNP}は約350に達し、実効感度利得ε_{tol}は1500に迫る。従来の100K-DNPのおよそ15倍の感度利得が得られることを示し、2009年当初から目標に掲げていた「1000倍高感度なNMR」も、めでたく実現したことになる。2020年11月現在、上記の極低温検出器によるノイズ低減とも組み合わせた感度利得ε_{tot} ε_{noise}は、従来の室温NMR比4500倍以上で、「高い磁場、高い感度利得」の両立を目指してきたMAS-DNPの近年史にプロットしてみても、その性能は突出していることがわかる（**図5 (c)**)。この周波数可変ジャイロトロンと閉回路極低温ヘリウムMASを組み合わせる先進的なDNP装置は共同研究・共同利用拠点装置として国内外の研究者はもちろん、共用プラットフォーム事業を通し

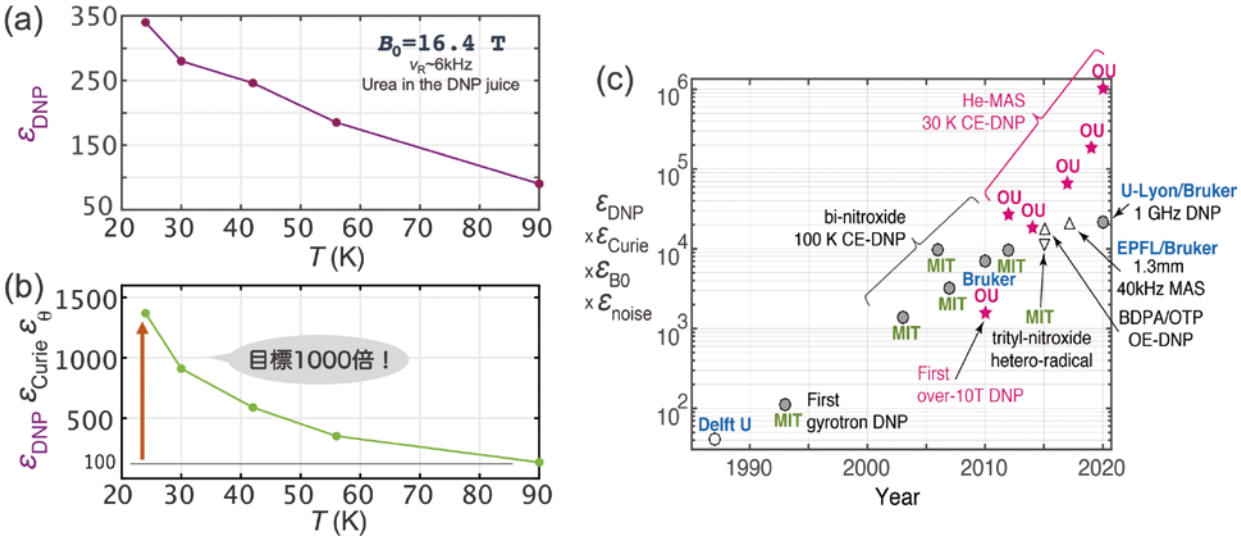


図5 (a)　DNPエンハンスメント（ε_{DNP}）の温度依存性。横軸は^{79}Brの緩和時間から計測したサブミリ波オン時の試料管内温度。(b) 実効感度利得ε_{tot}の温度依存性。試料は2M ^{13}C-ureaの重水素化グリセロール水溶液。分極剤は10mM AMUPol。全温度で試料回転数は6kHz。(c) MAS-DNP-NMRで得られる感度利得の近年史。報告したグループ名とともに特筆すべき点をアノテートしてある。高磁場化による利得（$\varepsilon_{B0}=B_0^{3/2}$)、熱雑音低減による利得（$\varepsilon_{noise}$）も縦軸に含めた。常磁性脱分極の効果$\varepsilon_\theta$は2008年以降に発見された現象で報告のない文献も多いこと、試料依存であり装置の能力と関係が低いことから除いてある。「OU」で示すのが我々、阪大蛋白研のデータ。EPFL=スイス連邦工科大ローザンヌ、U-Lyon=リヨン大、MIT=マサチューセッツ工科大、DelftU=デルフト大

て産業界からの利用にも開かれている[9]。また（株）JEOL RESONANCEから製品化もされたので、今後はより広いユーザーとアプリケーションに貢献できると期待される。製品第一号機はカリフォルニア大学サンタバーバラ校に納入され、目下、立上げ作業中である。

極低温でDNPを行うことの意義は、実際の研究の場面でよりはっきりする。現在のDNP法は多くの場合、分極剤からの超分極を^{1}H間のスピン拡散を通じて目的の分子に配るので、得られるエンハンスメントが系固有の縦緩和時間で制限される。具体的には、標準試料に用いられるウレアやプロリンはメチル基を持たず縦緩和（T_{1H}）が比較的長いため、高いエンハンスメントが出やすい。一方、現実の研究対象はそうは行かない。100 K-DNPの条件で最も緩和に効くのはメチル基の回転で、多くの有機分子に普遍的に存在するし、メチル基を一つも持たない蛋白質はほぼないだろう。調べてみると、多くの場合残基あたり0.3–0.5個のメチル基が含まれ、膜蛋白質の場合は0.7メチル基/残基を超えることもある。さらに言えば、結晶試料では分子のパッキングが密であるから、空間的にメチル基濃度が非常に高くなり超分極の拡散を強く制限する。これが原因で従来の100 K-DNPでは、膜蛋白質に得られる感度利得ε_{tot}は10倍のオーダーであるし、蛋白質、薬剤分子などを含む、メチル基を持つ分子の結晶試料では全く信号が増強しない一群の試料が存在する。高価な高磁場DNP装置を導入しても、現実の研究対象分子でエンハンスメントが出ないのでは大問題だろう。なら、極低温DNPならどうか。30 K付近ではメチル基の回転が一般に著しく低下し、超分極の拡散を正常化できる。実際、100 K-DNPでは全く信号が増強しないトリペプチドMLF（Met-Leu-Phe；残基あたり1.0個のメチル基）微結晶試料について、30 K-DNPではε_{tot}は150を超える[10]。**図6**は蛋白質の例で、0.2 μmol（1 mM溶液200 μLに相当）の非標識リゾチーム試料の30 KにおけるDNP増強^{13}Cスペクトルである。残基あたりおよそ0.5個のメチル基を有する蛋白質の結晶試料であるが、ε_{DNP}は150、ε_{tot}は500以上であった。完全重水素化とアミド^{1}Hのback exchangeを施すと、100 Kでも同程度のε_{DNP}が得られるとの報告があるが[11]、膜蛋白質が研究対象の場合、これを実現するのは単純ではない。その点、極低温DNPは試料に一切改変を加えることなく、現実的な緩和源を含んだより広範な分子系を超分極できるのが強みである。

応用法の開拓

高温近似の破れを利用する、空間選択的DNP

高磁場・極低温DNPの使いみちは、NMR信号を強くするだけにとどまらない。例えば、高磁場でスピンが強く分極すると、高次のスピン相関項（$2S_{1z}S_{2z}$）が通常のゼーマン項（S_z）に比べ無視できないくらい大きくなる（**図7**）。いわゆる「高温近似の破れ」であるが、昨年はこれを利用してスピン分極絶対値の空間分布を計測する方法を作った[12]。今年は同じ現象を、バルク部分から来る巨大な背景信号を除去し、超分極ドメインのみを選択的に観測する空間選択DNP法[10]に応用した（**図7**）。最近流行っているsurface-enhanced NMR spectroscopy（SENS）は物質の表面ゼーマン項をDNPで強調する方法で、無機材料に担持

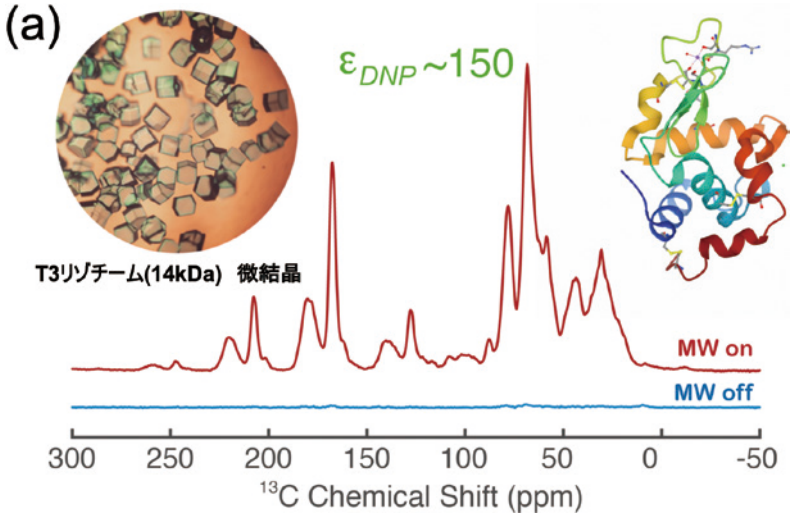


図6　非標識リゾチーム微結晶（0.2 μmol）の^{13}Cスペクトル。T = 30 K, ν_R = 8 kHz。

した表面有機物の高感度検出に有用だが、これは興味のないバルク部分にも、観測したい表面にも有機物が含まれる場合、うまくいかない。超分極が自由にスピン拡散するなら、超分極は興味のないバルク部にも一部伝わるし、バルク部^{1}H-^{13}Cの熱平衡ゼーマン分極（S_z）も合わせ巨大な背景信号となり、二重に見たいものと見たくないもののコントラストが低下する。これに対し、スピン相関項は超分極ドメイン（例えば物質の表面）でだけ顕著であり、これを選んで観測すれば、いわゆるSurface-Only Spectroscopy（SONS?）が可能だ。表面の研究に限らず、混沌の中にうまく分極源をspecificにデリバーできると、バックグラウンドフリーでそこだけ浮き出して見える、そんな使い方も可能だろう。

図8aに示すのは、トリペプチドMLF微結晶（直径約5 μm）の表面約0.1 μmを2次元二量子ー単量子（DQ-SQ）相関スペクトルの形で選択観測した例である。パルスシーケンスは、同種核のスピン相関項（$2S_{1z}S_{2z}$）を90°パルスひとつで多量子コヒーレンス（$2S_{1y}S_{2y}$）に変換する箇所が含まれており、興味深い[10]。二次元スペクトル（**図8a**）からはわかりにくいが、一本目のFIDのFTと、通常の^{13}C CPスペクトルを比べると（**図8b**）、結晶表面ではバルクの信号に比べ、部位特異的に小さな化学シフトの変化があることがわかる（**図8b**）。例えばC^{α}についてLeuとPheは0.07 ppmほど低磁場シフト、Metは0.04 ppmほど高磁場シフトしている。特に大きな変化（$\Delta\delta > 0.3$ ppm）はPheとMetの側鎖先端に認められ、これらは結晶中で互いにパッキングしているのがわかった。従来法DQSQデータの一本目FIDはCPとのシフト差を示さなかったから（$\Delta\delta < 0.01$ ppm）、この微弱なシフト変化はちゃんと物理的な意味を持つ。おそらく、結晶の表面では分子のパッキング・格子歪みがバルク部位と少し異なることを示唆しているだろう。

2台のジャイロトロンを同時に使う、空間選択的ロックイン検出

空間選択観測法がいろいろな場面で有用になるだろうことは想像できる。空間選択的高感度化ならもっとだろう。そこで最近、上で紹介した二台のジャイロトロンを同時に使える自由度を活かし、一つのやり方を考案した（**図9**）。クロス効果のDNPでは分極を上向き、下向きにエンハンスできるサブミリ波周波数が、^{1}Hのゼーマン周波数（我々の場合0.7 GHz）だけ離れて存在している。分極の立ち上げ期間中、この二箇所をそれぞれのジャイロトロンで交互に照射し、ジャイロトロンを切り替えるたびに、生まれる分極をその極性を追いかけるように位相反転したCPで^{13}Cに貯蓄する。これをだいたい1 msごとに数百回繰り返し、その後^{13}Cスペクトルを観測する。正と

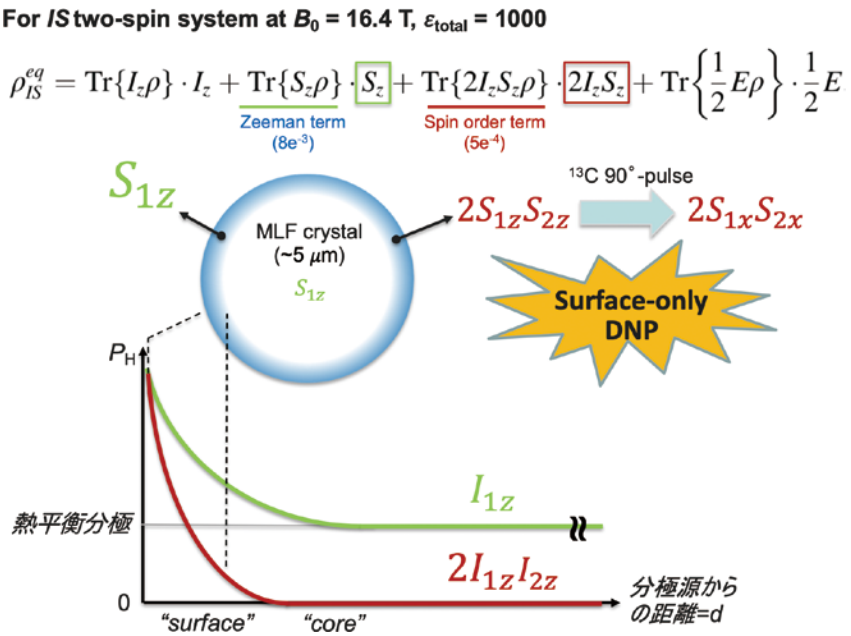


図7　16.4 Tで熱平衡の1000倍の分極が作れると、高次のスピン相関項の強度がもはや無視できない位大きくなる（高温近似の破れ）。このスピン相関項は超分極ドメインでだけ顕著な強度を持つ。これを感度向上以外の使いみち、空間選択的観測に利用できる。

負の分極は分極剤分子の周辺に自由拡散し、時間とともに打ち消し合うが、分極剤分子直近の空間だけは例外で、いつでもコヒーレントに上向き、下向きの分極生成が繰り返されることになる。この変化をロックイン検出のように位相反転CPで追いかけるわけで、これにより分極剤分子周辺にだけ超分極を蓄積できるだろう、こういうアイデアである。疎水的な分極剤を埋め込んだミセルを、^{13}C標識した溶質を含む水溶液中に分散するモデル系で検証したところ、分極剤周辺10–20 nm程度の空間に超分極が蓄積できることがわかった。

図10は、この方法を有機フィルム表面の薄層有機修飾の選択観測に使った例である。PETのベースフィルムの表面に、ナノメートルのアクリレート系混合有機修飾が入った「機能性フィルム」のモデル系である。分極はフィルム表面から染み込み、拡散するので、薄層修飾が薄い場合はPETベースの信号も一部エンハンスしてしまう。また、ベースフィルムは通常、表面修飾より二桁

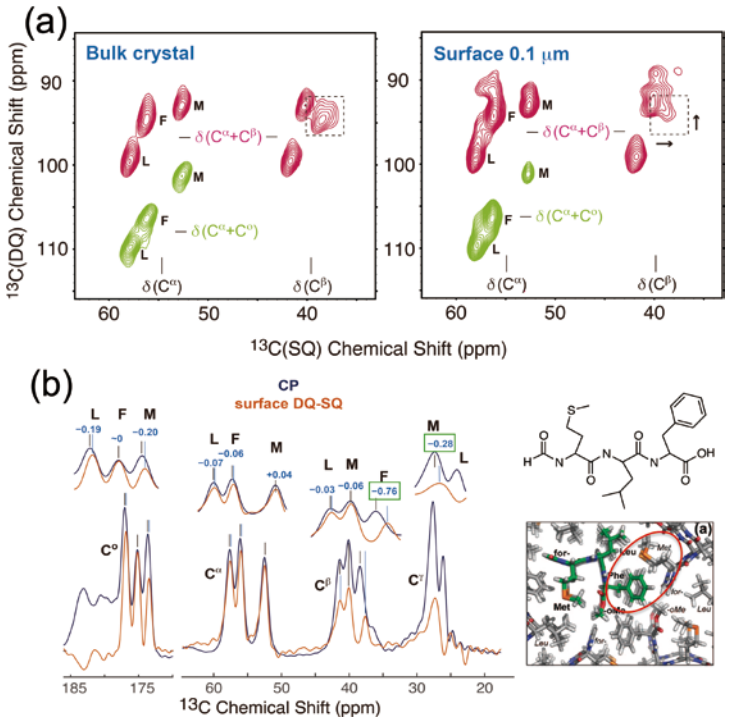


図8（a）　MLF結晶の従来法2D DQSQ相関スペクトル（左）と、表面選択的DQSQ（右）。（b）後者の一本目FIDをFTした1次元スペクトル（橙）と、CPスペクトル（黒）を比べると、部位特異的なシフト変化が明らかになる。

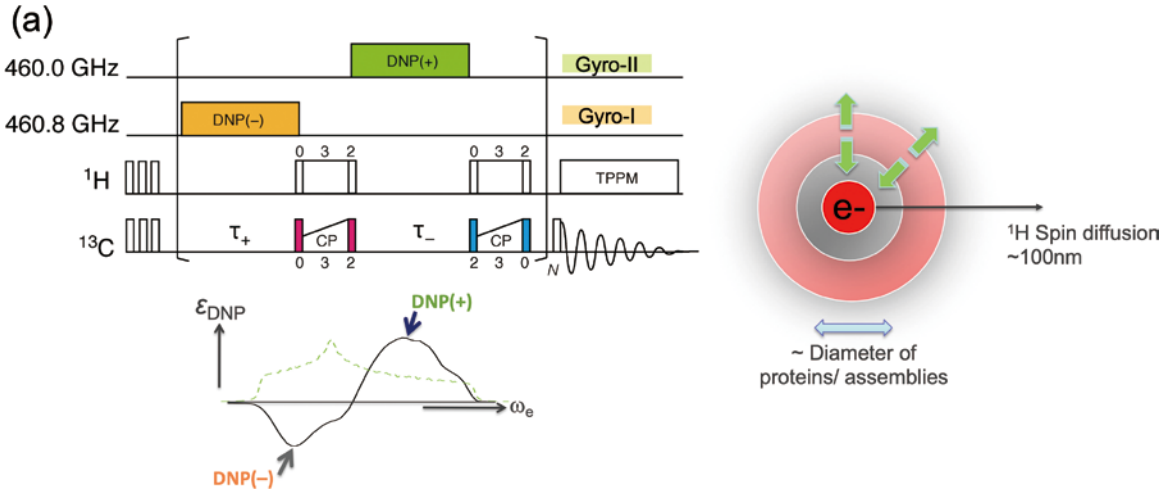


図9　ダブルジャイロトロンセットアップを使う空間選択的DNP測定。正と負の超分極を交互に励起し、ロックイン検出のように追いかけて^{13}C分極に蓄積する方法。分極剤分子の周辺の数十nm程度の空間が選択的に分極できる。

ほど大量に存在しているから、熱平衡分極した^{1}H-^{13}C部位が巨大な背景信号となり、見たい表面有機物質の微弱な信号を覆い尽くす（青いスペクトル）。対して、ジャイロトロン二台を駆使した空間選択ロックイン検出を応用すると、表面修飾からくる信号だけを高感度に検出できた（赤いスペクトル）。周波数可変ジャイロトロン2台からのサブミリ波を合成して使う、マニアックな実験は世界でも類を見ない。周波数スイッチの時間定数を変えて、選択空間を制御できるか、どのようにして、より強い分極を蓄積するか、数値解析的なアプローチを組み合わせるなど、まだ調べることは多いが、ユニークなDNP手法の一つであるし、応用法も複数あるだろう。

ふたたび、はじまり

この10年で、高磁場DNP法の装置と方法論の発展に貢献できたと思う。ただこれも次へのはじまりに過ぎない。スピン物理の精巧さとシンプルな美しさに惹かれ、多彩な磁気共鳴の技術自体に多大な関心を寄せてきたが、ここへ来て構造生物学への情熱がふつふつと湧いてきた。どちらかというと生命の混沌には辟易する方だったが、「混沌」が食べたり、増えたり、考えたりするのだから、高度な秩序の存在は疑いようがない。この混沌の中に一筋の秩序を見出す作業こそスリリングなパズルだと、なんとなくそう感じるようになってきた。だから、超分極核スピンを一つの武器にして、なんとか生物学の謎を一つでも解いてみたい。これが次の目標かと思う（まあ、言うのは簡単）。「核スピン超分極を、実際の研究現場で役に立つ状態、すなわち高磁場・マジック角試料回転（MAS）条件下で実現するのが特に重要だ」というスタンスで戦ってきた。その意味を証明していく作業でもあるだろう。

でも、もう半分はやっぱりスピン物理と磁気共鳴技術の発展に捧げたい。細胞内DNP法は長らく進展が止まっており、少し新しいアイデアが要るだろう。磁場掃引NMRがパルスNMRで花開いたのと同様、DNPはもっとコヒーレントなサブミリ波パルス列を使うパルスDNP法に脱皮しなければならない。技術的にはかなり重い課題だ。また、光を使うDNPもある。ラジオ波（10^{8}Hz）、サブミリ波（10^{11}Hz）、可視光（10^{14}Hz）と百万倍波長が違う3つの波を同時に操るDNP-NMRは、やり方がいろいろにあるだろう。想像力を養わないといけない。高い外部オーダ（スピン超分極）は高温近似の定式化を破り、スピンの内部オーダの存在を顕に感じさせた。双極子的に結合のない遠距離スピン間にも自発的な秩序・相関が生まれる。これらを検出したり、利用したりできるか（普通に考えたら無理だが）。一歩進む

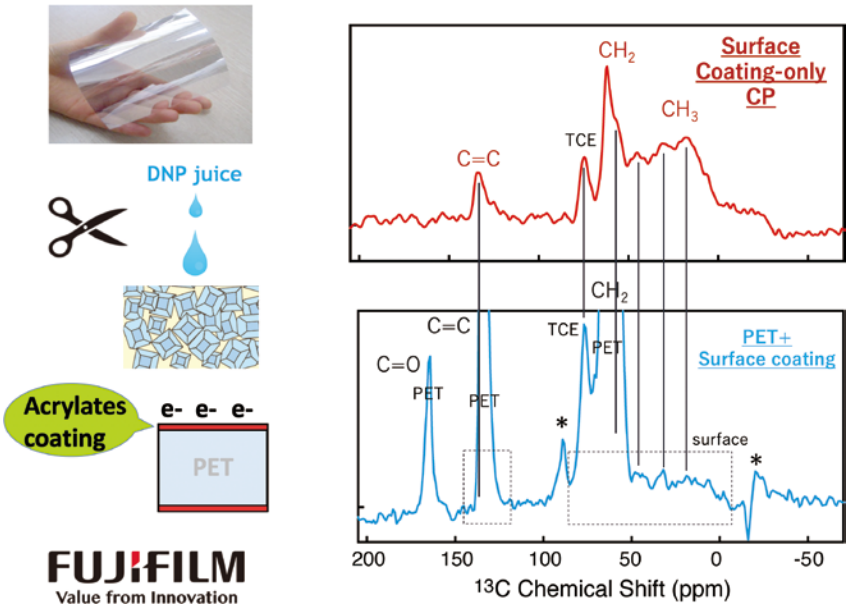


図10　ポリマーフィルム表面修飾の選択的高感度観測。DNP-enhanced CPスペクトル（青）と超分極ドメイン選択CPスペクトル＝"Surface-only DNP"（赤）。後者では分極剤周囲 ≲10 nm だけが高感度に観測される。従来の"Surface-enhanced DNP"では分極は自由に拡散し、基材（PET）からの巨大な背景信号が表面解析の邪魔になる（青）。B_0＝16.4 T, T＝90 K, ν_R＝13.3 kHz。

と、またその先に（茨の）道が複数見え始める。こうやって永遠と研究は続くのだろう。いつまで経っても、はじまり、が続くのだろう。

謝　辞

この研究は大阪大学、（株）JEOL RESONANCE、福井大学のチームが行った。また（株）クライオバック、Bridge 12 Technologies Inc.の卓越した技術力のもとに実現した。ここに篤く感謝申し上げたい。資金面では、科学技術振興機構 先端計測分析技術・機器開発プログラムと、文部科学省先端研究基盤共用促進事業による援助を受けた。成果を得るまでに時間を要する基盤的な計測装置・技術の開発に長らく投資されたことは特筆に値する。最後に、やはりボスの藤原敏道先生に感謝したい。海のように深い懐のおかげで、皆、自由な気風のなかで育っている。こういう雰囲気を大事にしてチームを盛り上げ、新たな挑戦を続けたい。

文　献

［1］ Matsuki Y., Takahashi H., Ueda K., Idehara T., Ogawa I., Toda M. Akutsu H. Fujiwara T., (2010) Dynamic nuclealear polarization experiments at 14.1 T for solid-state NMR, *PhysChemChemPhys* **12**, 5799–5803.

［2］ Matsuki Y., Ueda K., Ikeda R., Ogawa I., Nakamura S., Toda M. Anai T., Fujiwara T., (2012) Helium-cooling and -spinning dynamic nuclear polarization for sensitivity-enhanced solid-state NMR at 14 T and 30 K, *J. Magn. Reson.* **225**, 1-9.

［3］ Matsuki Y., Idehara T., Fukazawa J., Fujiwara T., (2016) Advanced instrumentation for DNP-enhanced MAS NMR for higher magnetic fields and lower temperatures, *J. Magn. Reson.* **264**, 107-115.

［4］ Matsuki Y., Ueda K., Idehara T., Ikeda R., Kosuga R., Ogawa I., Nakamura S., Toda M., Anai T., Fujiwara T., (2012) Application of continuously frequency-tunable 0.4 THz gyrotron to dynamic nuclear polarization for 600 MHz solid-state NMR, *J. Infrared. Milli. Waves* **33**, 745-755.

［5］ Matsuki Y., Fujiwara T., (2018) Advanced in high-field DNP methods, *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy*, Chapter 4, Springer.

［6］ Matsuki Y., Nakamura S., Fukui S., Suematsu H., Fujiwara T., (2015) Closed-cycle cold helium magic-angle spinning for sensitivity-enhanced multi-dimensional solids-sate NMR, *J. Magn. Reson.* **259**, 76–81.

［7］ Matsuki Y., Fujiwara T. (2019), Cryogenic platform and optimized sensititivy, *Handbook of High Field Dynamic Nuclear Polarization*,Chapter 9, Wiley.

［8］ Matsuki Y., Maly T., Ouari O., Karoui H., Le Moigne F., Rizzato E., Lyubenova S., Herzfeld J., Prisner T., Tordo P., Griffin R. G., (2009) Dynamic nuclear polarization using a rigid biradical, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 4996-5000.

［9］ Kanda T., Kitawaki M., Arata T., Matsuki Y., Fujiwara T., (2020) Structural analysis of coss-linked poly(vinyl alcohol) using high-field DNP-NMR, *RSC Adv.* **10**, 8039.

［10］ Matsuki Y., Sugishita T., Fujiwara T., (2020) Surface-only spectroscopy for diffusion-limited systems using ultra-low temprature DNP MAS NMR at 16.4 T, *J. Phys. Chem. C* **124**, 18609-18614.

［11］ Akbey U., Trent Franks W.,Liden A., Lange S., Griffin R. G., van Rossum B.-J., Oshkinat H., (2010) Dynamic nuclear polarization of deuterated proteins, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 1-5.

［12］ Sugishita T., Matsuki Y., Fujiwara T., (2019) Absolute ^{1}H polarization measurement with a spin-correlated component of magnetization by hyperpolarized MAS-DNP solid-state NMR, *Solid-State NMR* **99**, 20-26.

松木 陽（まつき・よう）

2003年3月　大阪大学理学研究科博士後期課程修了、理学博士
2003年4月　大阪大学蛋白質研究所、博士研究員
2006年4月　マサチューセッツ工科大学、客員研究員
2009年4月　大阪大学蛋白質研究所、助教
2018年4月　大阪大学蛋白質研究所、准教授（現職）

NMR講座：NMR基礎講座

測定の不確かさ評価についての初歩

産業技術総合研究所 計量標準総合センター
田中 秀幸
tanaka-hideyuki@aist.go.jp

1. はじめに

近年試験所認定制度の広まりに伴い、トレーサビリティの確保の要求とともに不確かさ評価の必要性についても分析化学分野にて広まりつつある。本稿では、不確かさの意味、基本的な算出法について解説する。

2.「不確かさ」とは

不確かさとは簡単に言うと、値に対する疑いの大きさのことである。測定値には必ず不確かさが存在する。例えばものさしで31.5 cmと測定した結果があったとすると、その値は完全に正しいわけではない。31.5 cmという結果は利用目的に対して十分な精確さがあるかどうかは別にして、必ずあいまいな部分が存在する。この例であれば、小数点2桁以下についての情報はなくなっている。さらに小数点以下1桁目の5という値も本当に正しいかどうかは場合によるだろう。その曖昧さを値として表したものが不確かさである。

この「不確かさ」はGuide to the Expression of Uncertainty in Measurement[1, 2]という文書によって定義や評価方法が定められている。また頭文字をとって、通称GUMと呼ばれている。このGUMは計測にかかわる世界的な8機関の共同文書として発行されており、ISO/IECのGuideとしても制定されている。

「不確かさ」の定義を紹介すると、「測定値に付随する、合理的に測定対象量に結び付けられ得る値の広がりを特徴づけるパラメータ。」である[3]。この定義を3つに分解して考えてみる。最初の部分は「測定値に付随する」というところである。これは、不確かさとは測定値に対して存在しているということを示している。測定値が存在していないと不確かさも存在しないということである。当たり前のようだが、ここで言いたいのは「不確かさは測定器には付随しない」ということである。よく天びんの不確かさ、というような言い方がされるが、実際には天びんには不確かさは付随しない。天びんで測定した値に不確かさが付くのである。また、一般に「天びんの不確かさ」といわれているものは、「天びんの校正の不確かさ」を表している。天びんの校正の不確かさとは、天びんは分銅を用いて校正を行う。この校正という作業は簡単に言うと、分銅の値を用いて天びんの目盛りに値付けを行うという行為である。校正の不確かさはこの値付けされた目盛りに対する不確かさであるので、「値に付随」しているわけである。よって、不確かさとは何らかの値が存在し、その値がどの程度信頼できるかを表す指標ということである。

次に「合理的に測定対象量に結び付けられ得る値」という部分である。これはきちんと定義され、測定方法、測定手順も妥当な測定を行えば、測定したいと思っている量を妥当に測ることができ、その測定の対象としている量の推定値が得られる、ということである。

最後に「値の広がりを特徴づけるパラメータ」の部分だが、これは、上記のように妥当な推定値が得られたとしても、その値は完全に正しいわけではなく、その値には曖昧さが存在している、ということを表しており、その曖昧さのことを「広がり」と呼んでいる。この「広がり」だがもう少し細かな意味を考えてみよう。測定値に曖昧さを与える要因として最初に考え付くのは「ばらつき」だろう。この「ばらつき」という用語にも定義がある。「測定値がそろっていないこと。また、ふぞろいの程度。」である[3]。つまり、繰返し測定等で値が変動するようなものである。またその他の曖昧さとして「かたより」もあるが、不確かさ評価においては、認識できるかたよりはすべて補正することを前提として評価を行うことになっているので、原則不確かさには含まれない。それ以外の曖昧さとしては、例えば、デジタル体温計で体温を測定したところ、37.2℃と表示されたと

受領日：2020年11月13日

しよう。不確かさ評価では、このような場合にも曖昧さが存在すると考える。つまり、測定値が37.2℃と表示されたとしてもそれは、37.200…℃を表しているわけではなく、単に体温が37.1500…℃から37.2499…℃の間に存在していることを示しているにすぎない。よってここにも曖昧さが存在する。不確かさ評価ではこのような知識の限界による曖昧さも考慮する。つまり、「広がり」とは「ばらつき」＋「知識の限界による曖昧さ」を表しているということである。

3. 不確かさ評価の原理

3.1　不確かさ評価手順

前節で説明した不確かさの定義を実現するための不確かさの評価方法についてここから解説する。

不確かさを評価するための手続きを順に示すと、

1. 不確かさを与える要因を特定する。
2. 特定した不確かさ要因によってどの程度値が不確かさを持つのか個別に評価する。
3. 個別に評価された不確かさを合成し、全体的な不確かさを求める。

となる。この不確かさ評価手順を順に解説する。

3.2　不確かさ要因の特定

不確かさは主に、「測定器」、「測定」、「測定対象」、「測定環境」が原因で引き起こされる。また、上記の4つの原因は独立ではなく、例えば、「測定」の最も基本的な不確かさ要因である繰返し性（併行精度）は細かく分解すると、繰返し測定を行っている期間中の測定器の変動、測定対象の変動、測定環境の変動も含まれているだろう。このように上記の原因は独立ではなく複合的に作用することもある。よって不確かさ要因を特定するときにはダブルカウントを避ける必要がある。ダブルカウントとは、ある不確かさ要因に既に含まれている不確かさの要素をまた別途不確かさ要因としてあげることをいう。これは不確かさの過大評価につながるので避けなければいけない。

またもう一つ重要なのは、小さな不確かさ要因はほとんど効かないため、無視してもよいということである。小さな要因を評価したところで、上記の3.で示した、不確かさの合成を行うと、結局結果に全く影響しなかったということがよくある。よって、効率よく不確かさ評価を行うためにも積極的に小さな要因を無視することを勧める。無視できる大きさかどうかの見極めは、例えば、こんなに不確かさが大きくはならない、という値を設定し、その値を用いて不確かさの合成をしてみればよい。大きく設定したにもかかわらず全く影響しないのであれば、評価する必要はない。

3.3　不確かさの大きさの評価

3.2で説明したように不確かさ要因を特定したら、次はその不確かさ要因から引き起こされる不確かさの大きさを評価する。GUMではその評価法が2種類規定されている。一つはタイプAの評価法、もう一つはタイプBの評価法である。これらの評価法によって求められた不確かさは標準偏差によって表される。この標準偏差によって表される不確かさのことを「標準不確かさ」と呼ぶ。

3.4　タイプAの評価法

タイプAの評価法とは、実際に測定を行い、データを取得し、そこから不確かさを求める手法である。つまり、測定データを得てその標準偏差によって不確かさを求めるという方法がタイプAの評価法である。

しかし、測定データを複数得て、そのデータの標準偏差を求めたものは通常標準不確かさには相当しない。なぜなら測定データを複数得た場合、測定の代表値として用いられるのは通常平均値だからである。ここで求められた標準偏差はあくまでも測定データがどの程度ばらつくのかを表しているものであり、報告される値、すなわち平均値がどの程度ばらつくかを表していないからである。平均値のばらつきとは何を意味するかというと、例えば、サイコロを5回振った平均値を求めることを考えると、サイコロを5回振り平均値を求めるという行為を複数回行うと、そのたびに異なる平均値が得られる。この平均値のばらつきが本来タイプA評価で求められた標準不確かさに相当する。

ただし、上記の方法では繰返し測定を何回も繰り返すという非常に非効率な測定を行わなければならないので、実際にはデータの標準偏差と平均値の標準偏差の間に以下の式（1）で示す関係が成立することを用いて評価する。

$$u = s(\bar{x}) = \frac{s(x)}{\sqrt{n}} \qquad (1)$$

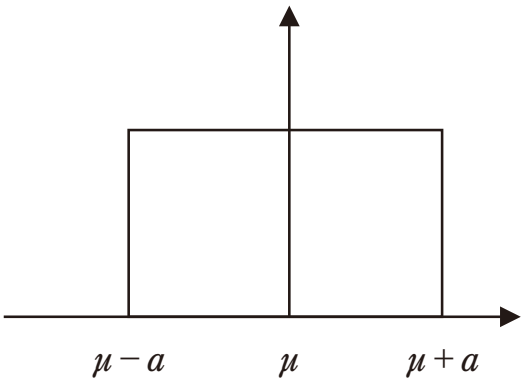


図1　矩形分布

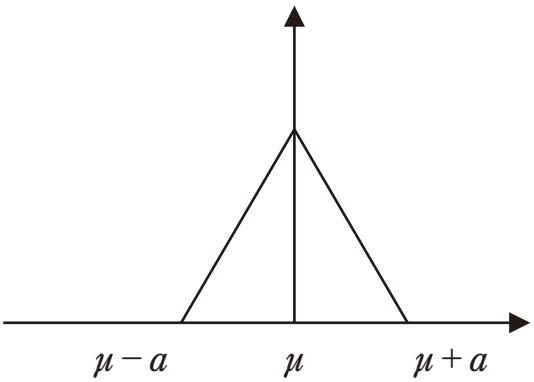


図2　三角分布

ここに、uは標準不確かさ、s( )は標準偏差、$\bar{x}$は平均値、xは測定値、nは繰返し回数を表す。

式の関係を用いれば、繰返し測定を一度行いデータの標準偏差を求めておけば、それを繰返し回数の平方根で割るだけで、平均値の標準偏差が求められ、それをタイプA評価で求めた標準不確かさと考えればよい。

3.5　タイプBの評価法

タイプBの評価法とはタイプA評価以外の手法すべてである。もしすべての不確かさの大きさを測定データから標準不確かさを求めることによって評価できるのであれば、タイプBの評価法は用いる必要はないが、通常それは難しい。なぜなら、例えば文献に載っている不確かさの大きさを引用したり、用いている測定器の校正の不確かさや標準物質の値の不確かさを校正証明書や標準物資の認証書から引用したり、実験するにはあまりにもコスト・時間・人手がかかり、これまでの知識・経験などから不確かさを評価したいことなどが必ず存在するからである。

タイプBの評価は、その不確かさ評価したいと考えている量の値の確率分布を推定することによって行う。確率分布とは非常に簡単に言うと、値がどのような形で分布しているのか、というその形のことである。タイプB評価で用いられる確率分布を**図1**、**図2**に示す。

図1の矩形分布はタイプB評価において最もよく用いられる分布である。意味するところは、($\mu \pm a$) の範囲内にすべての値が存在し、さらにその範囲内では同じ確率で値が存在する、というときに用いられる。つまり、メーカースペックや、規格値などから引用する値が$\pm a$以内に存在する、という証拠を持ってきて、さらに範囲内で同じ確率である、ということがわかっていれば利用できる。矩形分布は、デジタル表示の不確かさ、つまり、デジタル体温計で37.2℃と表示されたとき、この値は、(37.20 ± 0.05) ℃の範囲内で矩形分布すると考えることが妥当だろう。

次に**図2**に示す三角分布だが、矩形分布と同じく、($\mu \pm a$) の範囲内にすべての値が存在しているが中心にいくほど確率が高く、端にいくほど確率が低くなる分布である。分析化学ではたまに使われる分布で、メスフラスコなどの標線の読み取りを行う計量器を用いた場合の読み取りの不確かさを求める際の確率分布として用いられることがある。ただし、標線読み取りは必ず三角分布を用いなければならないということではない。多くの事例では**図1**の矩形分布を用いている。この確率分布の選択は、評価者にゆだねられ説明責任を伴う。

ただし矩形分布が用いるときとして、値が矩形分布に従っている、という以外に、($\mu \pm a$) の範囲内にすべての値が存在しているということは分かるが、どの確率分布に従っているか、ということがわからないとき、というものがある。これは前述のGUM[1, 2]の4.3.7に説明がある。つまり、矩形分布を用いた場合であれば、範囲についてはもちろん説明責任はあるが、確率分布の形状に関しては未知のままでよい。

さて、矩形分布と三角分布を仮定した場合の標準偏差は、矩形分布については、分布の半幅aを$\sqrt{3}$で割ったもの、三角分布については、$\sqrt{6}$で割ったものになる。このようにタイプB評価で肝となるのは、何らかの情報から値の存在範囲を知ることである。それがわかれば適切な確率分布を設定し、標準不確かさを求めることができる。

もう一つタイプB評価で重要なのは、校正証明書等から不確かさを引用する場合である。これについては、不確かさの拡張のところで解説する。

3.6　感度係数

タイプA、B評価を用いて標準不確かさをすべて求めた後に、不確かさの合成を行うが、その前に一つやらなくてはならないことがある。それは単位をそろえることである。

例えば、金属棒の長さをマイクロメータで測定しているとすると、測定の繰返しや、マイクロメータの校正の不確かさはもちろん長さの単位で表されている。しかし、金属棒は温度変化により伸び縮みするはずである。よって、温度の不確かさが必要である。しかし温度の不確かさは○○℃として表記されているはずであり、このままでは長さの単位で表記されている不確かさと合成できない。よって、この程度温度が変化すれば、この金属棒はこの程度伸び縮みする、というように単位の換算が必要である。この換算で用いられる係数のことを感度係数と呼ぶ。上記の例では、感度係数は金属棒の線膨張係数と金属棒の長さの積が相当する。

3.7　不確かさの合成

感度係数をかけることによって、すべての標準不確かさが最終的に報告する値の単位と等しくなる。これで標準不確かさを合成することができる。標準不確かさの合成は式 (2) を用いる。

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + \cdots + u_i^2 + \cdots + u_n^2} \quad (2)$$

ここに各u_iが標準不確かさであり、u_cが合成標準不確かさと呼ばれる、最終的に報告する値に対する標準不確かさである。

式は、統計でいう分散の加法性を用いている。この合成方法が、本稿の最初に触れた小さな不確かさ要因は無視してもよいということに繋がっている。例えば、大きな不確かさ要因が1とし、その1/10の大きさの要因を合成すると、

$$\sqrt{1^2 + 0.1^2} = 1.0049\cdots \quad (3)$$

となる。不確かさは最終的に報告するときには多くとも有効数字2桁という決まりがあるため、式 (3) は結局1.0という値になり小さな要因は無視しても差し支えないことがわかる。

3.8　不確かさの拡張

合成標準不確かさは最終的に報告する値のばらつきを表しているが、そもそも標準偏差とは、いわば「ばらつきの平均値」を表している。しかし、これまで誤差等で用いられてきた測定結果がどの程度信用できるのか、という指標は、(値±範囲) という形で表記されている場合が非常に多い。しかし、合成標準不確かさは範囲を示していないため、範囲を示すための値へ変換する。そのためには正規分布の性質を用いる。測定値はほとんどの場合中心極限定理と呼ばれるものによって、正規分布をしているとみなすことができる。そうであれば、標準偏差を2倍することによって、約95％が含まれる範囲を求めることができる。これを式 (4) に示す。

$$U = ku_c \ (k = 2) \quad (4)$$

ここに、Uは測定結果が約95％含まれる範囲を示す拡張不確かさと呼ばれる最終的に結果として報告する不確かさであり、kが包含係数と呼ばれる合成標準不確かさの倍数である。この値は上記のように通常2が用いられる。

逆に校正証明書から不確かさを引用する際には、校正証明書に記載されている拡張不確かさを包含係数で割ることによって、合成標準不確かさに戻す、つまり標準偏差に変換してから自身の評価に組み入れればよい。

4. おわりに

非常に急ぎ足であるが、簡単に不確かさの概略を解説した。相当部分が概略であるので、定量NMRを用いている人はぜひ参考文献[4]を利用していただきたい。これには、定量NMRの精度管理のために簡易的な不確かさ評価法を一部用いた手法が解説されており、実際に定量NMRで測定している方々にはわかりやすいだろう。特に、不確かさをさらに知るためには自身で計算することが重要であるのでチャレンジしてみてほしい。

参考文献

[1] BIPM, ISO, IEC OIML, IUPAP, IUPAC, IFCC, ILAC, JCGM 100 Evaluation of measurement data – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, (2008), Bureau international des poids et mesures.
[2] 今井秀孝、測定における不確かさの表現のガイド［GUM］ハンドブック、(2018)、日本規格協会.
[3] JIS Z8103計測用語、(2019)、日本規格協会.
[4] 「qNMRプライマリーガイド」ワーキンググループ、qNMRプライマリーガイド、(2015)、共立出版.

田中 秀幸（たなか・ひでゆき）
2000年3月、筑波大学大学院工学研究科修了、博士（工学）。2000年4月通商産業省工業技術院計量研究所入所。2001年4月（独）産業技術総合研究所に改組。現在、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 計量標準総合センター 工学計測標準研究部門 データサイエンス研究グループ 研究グループ長。入所から一貫して測定データ処理特に不確かさ評価・試験所間比較における統計的手法の研究・普及に従事。

NMR講座：NMR史点描

第二次世界大戦とNMR開発（上）

京都大学
寺尾 武彦
terao@beige.plala.or.jp

第二次世界大戦は言うまでもなく科学が史上最悪の形で利用された戦争だった。それに比べるとはるかに小さな出来事ではあるが、逆に戦争が科学に影響を与えたのも事実である。軍事研究にほとんどのリソースを奪われ、発展がまったく停滞した分野もあれば、軍事研究で発達した技術のおかげで戦後飛躍的発展を遂げた分野もある；その影響の大きさは分野間で大きく異なるばかりでなく、地域差がきわめて大きい。戦争の影響を語るうえでは、NMRは特別な分野と言えよう：歴史を俯瞰してみれば、1938年にRabiが分子線NMRに、1940年にBlochが中性子線磁気共鳴の実験にそれぞれ成功し、1936, 42年にはGorterが失敗したものの固体でのNMRを試みたことによって、凝縮系のNMRは戦時中まさしく胎動期の最中にあったと言えるからだ。したがって、凝縮系NMRの誕生が良かれ悪しかれ戦争の影響を大きく受けるのは必定だった。ここに凝縮系NMR開発に関わったアメリカやヨーロッパの研究者たちが戦下のどのような状況でどのように行動し、何をきっかけにその開発に関わったのか、そしてそれがどのように成功または失敗に繋がったのかを纏めておくのも多少の意義があろう。すでに本コラムで述べた内容を含め、範囲をNMRの周辺にまで広げて述べてみたい。

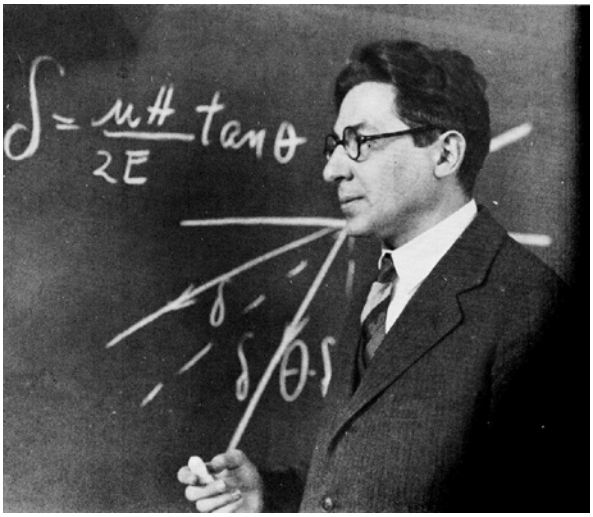


図1　Isidor I. Rabi（1898 ～ 1988）

まずは凝縮系NMR開発成功の現場となったアメリカの話から。コロンビア大学で分子線実験を行なっていたRabiは1933年にナチスが政権を獲得した後のヨーロッパにおける深刻な政情に大変心を痛めていた。ナチス・ドイツは彼の恩師シュテルンを初め多くのユダヤ系科学者を追放し、1939年にはポーランド、1940年にはフランスを侵略した。さらに1939年に核分裂が発見されるとドイツが原子爆弾を開発するのではないかという危惧が生じた。Rabiは強力なドイツ軍に対抗し、アメリカを守るために何かをしたいという気持ちに突き動かされた。それは、ヨーロッパからの亡命者を含めたアメリカの多くの科学者ーとくに物理学者ーが共通して抱く思いだったと思われる。Rabiは、第二次世界大戦が始まった次の年1940年の11月初旬に、マサチューセッツ工科大学（MIT）の放射線研究所に移動した；MIT放射線研究所は、同年10月に軍用レーダーを開発するために設立された研究所である。彼はニューヨークを離れた日から5年間、一度もコロンビア大学にも自宅にも戻らずに放射線研究所で働き続ける。Rabiは、移動後すぐに指導力を発揮して成果を挙げ、副所長に任命された。

そのRabiの下で、1941年の1月から、基礎開発グループの長としてレーダー開発に従事したのが当時28歳のPurcellだった；彼はこの3年11ヶ月後に凝縮系NMRの開発に成功することになる。Purcellはハーバード大学の物理学科で1938年に球状コンデンサーによる荷電粒子のビームの収束性の理論的実験的研究によりPhDを取得したのち、同物理学科のインストラクターになり、戦前のハーバードのサイクロトロンを完成させ、核物理の最初の実験を行った直後のことだった。彼の指導教官だったBainbridgeに頼まれ、一緒に放射線研究所での軍事研究に参加したのだっ

受領日：2020年12月7日

た。

PurcellはRabiらが行った研究について何も知らなかった。しかし、4年以上しばしばRabiと接触し、Rabiの学生やポスドクだったMillman、Ramsey、Zacharias、Torreyの部屋を回っているうちに彼らが分子線で行った研究について十分に学び、共鳴の方向で何ができるか考えるようになった。Purcellはハーバード・スクエアの近くに住んでいて、5年間毎日研究所に歩いて通っていたが、彼のオフィスにはめったに立ち寄らずに傍を通り過ぎていたほどレーダーの仕事に没頭していた。マイクロ波の波長は、分解能を上げるため、10 cm Sバンドから3 cm Xバンドへ、さらに1.25 cm Kバンドに短縮された。製作されたレーダーのテストは建物の屋上からボストン、ケンブリッジのいろんな建物を対象に行われた。しかし、Kバンドでは感度と到達距離が日によって変化した。この謎に対する説明はvan Vleckによってなされた、“春が来たから”と：水分子の回転エネルギー準位間に1.28 cmで最大の吸収を持つ遷移があり、空気中の水蒸気がKバンドの信号を弱めたのだった。この経験がPurcellに2準位系の吸収について深く考察するきっかけを与えた。そのアウトプットの一つがNMRだったのである。

1945年8月に終戦を迎えると大概のメンバーは元に戻りそれぞれの研究を再開した。しかし、Purcellを含む50余名は、放射線研究所で蓄積されたマイクロ波の研究成果を叢書として纏めるために居残ることを要請された；それは1944 年の秋にRabiが立ち上げたプロジェクトだった。1945年9月、Purcellは同じく居残り組であるTorreyとPoundに、暇な時間に3人で磁場中においた固体の原子核によるラジオ波エネルギーの共鳴吸収を検出する試みを行うことを提案した。彼は叢書のために、水蒸気によるマイクロ波の吸収についての記事を書く中でこの考えを持つに至った。9月のある暑い日、3人はマサチューセッツ通りのよく行く小さなレストランでランチした。Purcellは、凝縮系で核スピンによるラジオ波電力の共鳴吸収を検出できる可能性について、Rabi研究室出身のTorreyに意見を求めた。Torreyは、そのときは、2つのエネルギー準位間の占拠数の差は小さくてラジオ波から吸収されるエネルギーはきわめてわずかだと思い、悲観的な反応を示した。しかし、その日の夜にもう一度考え計算してみると検出できそうな結果が得られて彼は興奮した。次の朝一番にPurcellのオフィスを訪れ、前日のマイナス思考を詫び、検出が可能であることを示す計算を見せた。Purcellは“じゃあ、やろう”と言った。メインの仕事は本を書くことであり、このプロジェクトはあくまで副業として夜に行った。この“ムーンライト・プロジェクト”はさまざまな苦労を伴いながらも、その年の12月に成功裏に終わった。

図2　Edward M. Purcell（1912 ～ 1997）

PurcellがNMR開発を手掛けるきっかけとなった出来事は、Rabiらから共鳴について学んだうえで、Kバンドのマイクロ波が水蒸気に吸収される現象を観測したことだった。それ以来2準位系の吸収について深く考えるようになったPurcellは、叢書のための記事を書く中で、固体中の原子核によるラジオ波の共鳴吸収の検出を試みたい、と思うに至った。そして放射線研究所で出会ったTorreyとPoundという優秀な協力者を得てNMR開発に成功したのだった。研究のきっかけを掴むところから論文の投稿（1945年12月24日）まで開発のすべての過程が放射線研究所内で完結している。PurcellらによるNMR開発はまさに軍事研究の申し子であったといえる。

もう一人のNMRの開発者であるBlochは、1928年、ライプチッヒ大学4年生（22歳）のとき、Heisenbergの指導の下で、誕生したばかりの量子力学を金属に適用し、電気伝導性のメカニズムを解明するという歴史的成果を挙げてPhDを取得した。それ以来、超伝導や強磁性などの固体理論の分野で、次々と後世に残る成果を上げて時代の寵児となった。1933 年ヒットラーが政権に就

くと、ユダヤ人だったBlochは難を逃れるためにライプチッヒを離れ、1934年4月にスタンフォード大学の准教授となった。1933年にSternにより陽子と重陽子の磁気能率が測定されて以来、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強い関心を抱いていたBlochは、研究方向を大転換した：彼は1940年にAlvaretz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。しかし、中性子の磁気モーメントの測定精度は、当時の標準的な磁場測定法であるフリップ・コイル法の精度で制限され、加成性について明確な結論が下せなかった。中性子の磁気モーメントを精度良く決定するためには、磁場を高精度で測定する何らかの方法が必要だった。

1942年にマンハッタン計画がスタートした。Blochは研究仲間のOppenheimerに請われてこれに参加した。核分裂で放出される中性子のエネルギー分布を決める仕事をスタンフォードの中性子源を用いて行ったのち、1943年夏ロスアラモスで爆縮についての研究を行った。3, 4ヶ月後、自分の役割は果たしたと思ったのとあまりにもミリタリーな雰囲気に嫌気がさしたので、MITの放射線研究所とともに軍事研究のために設立されたハーバードの電波研究所に移った。終戦近くになって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始めた。Blochは近くに住むRabiと磁場測定の精度向上について議論した。Rabiは、コロンビアに戻ったら、水素の原子線共鳴で永久磁石の磁場を測定してそれをスタンフォードに送る、それで中性子の磁気共鳴と比較できる、と提案した。Blochは、そのやり方は複雑でリスクが大きいように思え、自分たちで較正できないか考え続けた。高度な分子線共鳴装置を作ることもしたくなかった。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Blochは考えた。

図3　Felix Bloch（1905 ～ 1983）

1945年春のある日、Blochは列車でシカゴに向かった。その退屈な長旅の途中、ふとアイデアがひらめいた：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気的に検出する方法を思いついたのだった。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：静磁場方向に沿った熱平衡磁化を共鳴周波数をもつラジオ波磁場で向きを変えて横磁化を作れば、その静磁場回りの回転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、その観測には通常のラジオの受信技術が使えるのではないか、と着想したのだった。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。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行った。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。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。

Blochにとって軍事研究から得たベネフィットは、なんといっても彼の知識や経験に欠けていた最後のピースであるラジオ波技術を習得したことだった。それは装置を製作するうえで役立ったという次元ではなく、検出法を発想するうえで決定的な役割を果たしたのだった。ラジオ波技術の習得無しではPurcellと同時期にNMRの検出に成功することは不可能であっただろう。

凝縮系NMRが開発されて間もなく90°パルスとスピンエコーを発見して、NMR法に史上最大の革新をもたらしたHahnも、Purcell、Blochと同様に軍事研究に参加したことによる恩恵を受けていた。Hahnは、1943年にパデュー大学大学院物理学科に進んだが、1年後に徴兵された。最初はロスアラモスでマンハッタン計画に参加することになっていたが、その頃結婚し、それを伝えると配偶者と同居できる宿舎が無いという理由で採用取り消しとなった。代わって海軍でレーダー

とソナーに携わることになった。その経験を経てHahnはパルスに興味を持ち始めた。海軍を除隊になったのち、イリノイ大学で博士研究を始めた。海軍での経験を買われてベータトロンの発明者であるKerstの助手になったが、ベータトロンの電源など様々な装置を作ることに明け暮れ、エレクトロニクス技術者として埋没してしまいそうに思った。ビッグサイエンスに特に興味があったという訳ではなく、1948年に学位を取るために別の分野に移ることを決意した。

Hahnは広範囲に興味を持つ理論家のBartlettに博士研究のテーマについて相談にのってもらったところ、彼はHahnにBlochの核誘導の論文を読むことを勧めた。Hahnはそれを読んで興味をもち、NMRをやることに決めた。急ピッチでハーバードの定常法のNMR装置のコピーを作ったものの、彼は当初、作り上げた装置で何を測定したいか分からなかった。当時のイリノイの物理学科には新しいNMRの分野で学位論文を指導してくれる専門家は誰もいなかった。ただプロトンの信号を見ているだけで幸せだった。しかし、ほどなく空間的に回転する磁場中の分子線における核磁化のラービ振動（ニューテーション）を理論的に取り扱ったSchwingerの論文に出会った。それを読んで、プロトンのニューテーションを観測することに決めた。この実験はラジオ波パルスを加えるという点でHahnの興味を引いたのだった。このラジオ波をパルス状に照射するという試みは単にニューテーションを観測することに留まらなかった。Hahnはほどなく、90°パルスおよびスピンエコーを発見し、パルスNMR法を確立させてNMRの世界を一変させる結果を生んだのである。

当時、パルス技術は特殊であり、その技術を身に付けていなければ、Hahnは核スピン系にラジオ波パルスを照射するという発想はしなかった、と思われる。Hahnは、たまたま海軍でレーダーとソナーに携わったことから、パルス技術に親しみ、それに興味を抱いた。それが偉大な成果をもたらす大きな要因となったのだった。

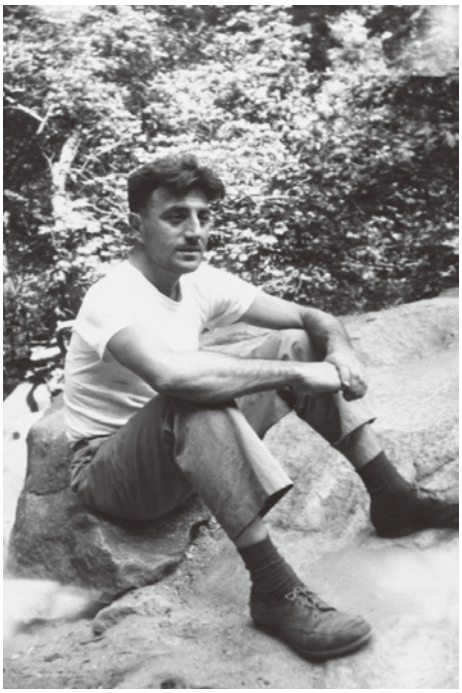


図4　Erwin L. Hahn（1921～2016）

（次号に続く）

主な参考文献

［1］ Rigden, J. S. (2000) Rabi: Scientist and Citizen, Cambridge, MA and London, Harvard University Press.
［2］ Pound, R. V. (2000) Edward Mills Purcell, *Biographical Memoirs* **78**, 183–205.
［3］ Pound, R. V. (1996) Early days in NMR, *Encyclopedia of NMR*, **1**, 541–547.
［4］ Bloch, F. (1971) Opening Lecture, *Proceedings of the Fourth International Symposium on Magnetic Resonance*, 1, Rehovot and Jernsalem.
［5］ Hofstadter, R. (1994) Felix Bloch, *Biographical Memoirs*, **64**, 34–71.
［6］ Hahn, E. L. (1996) Pulsed NMR—A Personal History, *Encyclopedia of NMR*, **1**, 373–378.

図の出典

図1.　https://www.sciencephoto.com/contributor/aip/
図2, 3.　https://www.fossilhunters.xyz/hydrogen-atom/edward-m-purcell-and-felix-bloch.htm
図4.　https://www.ismrm.org/the-transformative-genius-of-erwin-hahn/

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。

2019年度学会顕彰：若手ポスター賞

第58回NMR討論会（2019）若手ポスター賞について

今年度の『若手ポスター賞』には、25名の応募があり、最優秀若手ポスター賞として2名、優秀若手ポスター賞として1名、若手ポスター賞として2名を顕彰しました。これらポスター賞にはJEOL RESONANCE社と大陽日酸社からのご厚志による副賞の授与もおこないました。若手ポスター賞の歴史や応募資格など、詳しくは第58回NMR討論会（2019）のホームページ「若手ポスター賞」（https://www.nmrj.jp/NMR2019/poster.html）を御参照下さい。

選考にあたっては、まず25名の応募者について、研究内容や評価者の人数などを考慮し、「溶液」、「固体バイオ」、「高分極」「方法論」の4つのグループに分けました。さらに、「溶液」は人数が多いためにA、Bの2グループに分け、各グループ毎の応募者数を5人としました。グループ毎に評価者として、日本核磁気共鳴学会の評議員5名を利益背反にならないように振り分けました。規定の選考方針に基づいて応募者の要旨・ポスター・発表の3項目を評価し、総合点を5点満点で採点しました。各審査員が担当の5名の応募者について総合点＝5を1名、4を1名、3を3名という目安で採点していただき、審査員5人の総合点の合計を各応募者の評価としました。

評価が最も高く同一となった2名を最優秀若手ポスター賞として選び、賞状を授与し、副賞としてJEOL RESONANCE賞と記念の楯を贈りました。ついで、優秀若手ポスター賞1名に賞状を授与し、副賞として大陽日酸賞と記念の楯を贈りました。さらに2名の若手ポスター賞受賞者を選び、副賞として2社合同賞を学会長より贈りました。

■最優秀若手ポスター賞（JEOL RESONANCE賞）

門間 啓（京都大学大学院 農学研究科）

「微結晶の三次元磁場配向機構を備えたin situ固体NMRプローブの開発」

小林 洋太（京都大学大学院 理学研究科）

「磁場掃引を用いたSWIFT法」

■優秀若手ポスター賞（大陽日酸賞）

石井 公貴（京都大学大学院 工学研究科）

「免疫応答に関与するHOIL-1Lによる直鎖型ダイユビキチンの認識機構」

左から木川*、門間、小林、石井、永島、小倉、加藤学会長

*第58回NMR討論会世話人

選考委員代表：竹腰清乃理・山本一彦

■若手ポスター賞（2社合同賞）

永島 裕樹（産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター）

「半整数四極子核の DNP-NMR 信号取得の高速化」

小倉 立己（慶應義塾大学 先端生命科学研究所）

「NMRを用いた定量的なグルタミン分解速度の解析」

各賞担当理事　竹腰 清乃理、山本 泰彦

2019年度最優秀若手ポスター賞（JEOL RESONANCE賞）

YP12

微結晶の三次元磁場配向機構を備えた in situ 固体 NMR プローブの開発

○門間 啓[1]，久住 亮介[1]，和田 昌久[1]，木村 恒久[1]，武田 和行[2]
1 京都大学大学院　農学研究科
2 京都大学大学院　理学研究科

In situ solid-state NMR probe for three-dimensional orientation of microcrystals in a liquid medium

○Hiroshi Kadoma [1], Ryosuke Kusumi [1], Masahisa Wada[1], Tsunehisa Kimura [1], Kazuyuki Takeda [2]
1 Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan
2 Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan

A probe for measuring solid-state NMR of a Magnetically Oriented Microcrystal Suspension (MOMS) was developed. In this probe, the sample tube is rotated slowly (≤100 rpm) about an axis perpendicular to the static magnetic field ($\boldsymbol{B}_0$). Under such a rotating magnetic field, microcrystals in a liquid medium are *aligned* by a torque arising from the anisotropic bulk magnetic susceptibility of the crystal. When the rotation is modulated, e.g., temporally stopped at the $\boldsymbol{B}_0$ direction every 180° rotation, three-dimensional orientation of the microcrystals is achieved (3D-MOMS). Single-crystal rotation patterns were obtained from the 3D-MOMS of L-alanine microcrystals by solid-state CP measurements triggered in synchronous with the sample-tube rotation. The process of three-dimensional magnetic alignment was also studied by monitoring the spectral changes during continuous application of the modulated sample rotation.

1. 緒言

固体NMRでは，一般にMASにより共鳴ピークを先鋭化させて測定する．しかしながら，MAS下では化学シフトの異方性が平均化されるため，化学シフトテンソルを完全な形で抽出し精密なレベルでの局所構造解析に応用することは困難である．化学シフトテンソルの決定手法として単結晶NMR法[1–3]があるが，数mmサイズの巨大な単結晶が得られない物質には適用が困難である．我々はこれまでに，微結晶の三次元磁場配向体(擬単結晶，Magnetically Oriented Microcrystal Array (MOMA))[4]に単結晶NMR法を適用し，微結晶粉末から化学シフトテンソルを決定する手法を提案してきた[5]．しかしながら，この擬単結晶法では測定試料を配向固定用の媒体(紫外線硬化モノマーなど)に均一に分散させるプロセスが不可欠であるため，凝集しやすいナノサイズの結晶や損傷を受けやすいタンパク質・生体化合物などへの応用が困難であった．

そこで本研究では，固体NMRの強磁場を活用して微結晶懸濁体の三次元磁場配向を達成しつつ，媒体を固化させることなくそのままの状態での固体NMR測定が可能な磁場配向プローブを設計・作製した．作製したプローブにより磁場配向微結晶懸濁体(Magnetically Oriented Microcrystal Suspension (MOMS))のin situ固体NMR測定を行うとともに，微結晶の三次元磁場配向の進行に伴う固体NMRスペクトルの形状変化を観測した．

三次元磁場配向、異方性相互作用、固体NMRプローブ開発

○かどま ひろし[1]，くすみ りょうすけ[1]，わだ まさひさ[1]，きむら つねひさ[1]，たけだ かずゆき[2]

2. 実験

磁場配向プローブは，微結晶の三次元磁場配向を達成するため，試料管の長軸を静磁場と直交させた状態で変調回転させる機構とした．変調回転の駆動はステッピングモーターにより行なうこととした．超電導磁石(300 MHz, 7.05 T)およびrfパルス照射のためのパワーアンプにはJEOL CMX300 Infinityのものを使用し，測定はFPGA集約型OPENCORE NMR分光計[6]を用いて行った．試料管に封入したL-アラニン微結晶(<20 μm)の懸濁液(20 wt%)をプローブ内にセットし，間欠型の変調回転(15 rpmで180°回転させ，$\boldsymbol{B}_0$方向で1 s停止)を施しながら固体^{13}C CP測定を行なった．CPのコンタクトタイムおよび待ち時間はそれぞれ1 msおよび6 sとし，積算回数は2048とした．三次元配向した微結晶は試料管に追随して回転しているため，光センサーにより試料管の回転とパルスシーケンスを同期させて特定のタイミングで rfパルスを照射し，B_0と磁化容易軸(χ_1)方向(回転開始時における静磁場方向)のなす角が異なる一連のスペクトルを収集した．また，カルボキシル炭素を^{13}Cラベル化したL-アラニンの微結晶懸濁液を用いて積算回数1回の条件で同様の実験を行い，変調回転下にて微結晶の三次元配向化が進行する過程をリアルタイムで観測した．

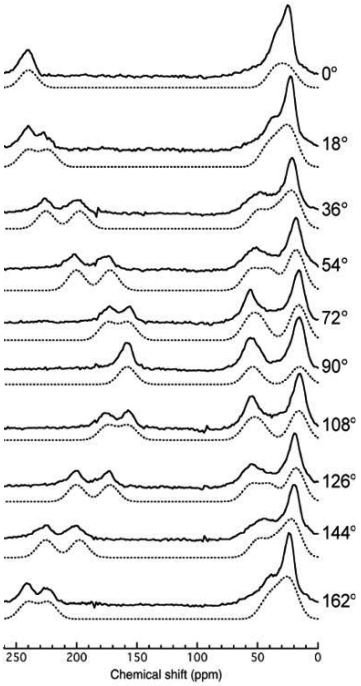


Fig. 1 ^{13}C CP spectra of L-alanine microcrystals in a suspension under the modulated rotating magnetic field. The spectra simulated from the single-crystal data[3] are also shown as dashed lines.

3. 結果・考察

Fig. 1に，変調回転下で得られたL-アラニン微結晶懸濁体の^{13}C CPスペクトルを示す．rfパルスの照射のタイミングを変化させるにつれて各共鳴ピークの発現位置が連続的に変化しており，その変化のパターンはシミュレーションの結果（点線）と良く一致した．この結果は，通常はmmサイズの単結晶でのみ得られる振動パターンが，磁場配向プローブを用いることで，液状媒体中にある数十μmサイズの微結晶からでも観測可能になったことを示している．Fig. 2には，微結晶の三次元磁場配向化が進行する過程をシングルスキャンで観測し得られた一連のスペクトルを示してある．静磁場下で一軸配向していた微結晶が，変調回転磁場の印加時間が経過するにつれて三次元配向が進行し，スペクトルパターンが変化する様子が分かる．この結果から，L-アラニン微結晶では概ね10分程度で三次元配向化が完了することが分かった．

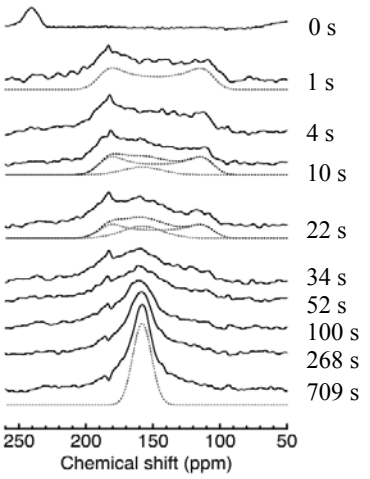


Fig. 2 ^{13}C CP spectra of L-alanine microcrystals being oriented in a suspension under the modulated rotating magnetic field.

参考文献

[1] C. A. Fyfe, *Solid State NMR for Chemists* (1983).
[2] D.L. Sastry et al., *Carbohydr. Res.* **165**, 161 (1987).
[3] A. Naito et al., *J. Chem. Phys.* **74**, 3190 (1981).
[4] T. Kimura et al., *Langmuir* **22**, 3464 (2006).
[5] R. Kusumi et al, *J. Magn. Reson.* **223**, 68 (2012).
[6] K. Takeda, *J. Magn. Reson.* **192**, 218 (2008).

2019年度最優秀若手ポスター賞（JEOL RESONANCE賞）

YP21

磁場掃引を用いたSWIFT法

○小林洋太，竹腰清乃理，武田和行
京都大学大学院 理学研究科 化学専攻

Sweep Imaging with Fourier Transformation (SWIFT) implemented by magnetic-field sweep

○Youta Kobayashi, K. Takegoshi, and Kazuyuki Takeda
Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

SWIFT (SWeep Imaging with Fourier Transformation) is an MRI technique with unique features such as fast and quiet imaging, and compatibility with nuclei having short T_2. In SWIFT, rf irradiation is applied in such a way that the resonance of the spins is swept over in the presence of stationary magnetic-field gradient. Here, we report a variant of the SWIFT method, in which the magnetic field is swept over by employing an extra coil, whereas in original SWIFT, the frequency of the excitation signal is swept. Since the frequency is fixed throughout the measurement, the proposed approach is compatible with highly sensitive signal detectors with a limited bandwidth. Examples of such include a cryogenically cooled probe and Electro-mechano-optical (EMO) NMR.

【背景】

MRI 撮像法の一つである Sweep Imaging with Fourier Transformation (SWIFT)[1]は、T_2 が短くエコー法では困難な系でも適用でき、また撮像が高速かつ騒音が少ないといった利点を持っている。SWIFT 法 (Fig. 1(a)) では、照射するパルスの振幅と周波数を共に変調させながら断続的に励起と観測を行うが、照射ラジオ波の周波数を掃引するため、共振回路の周波数特性による影響や、帯域幅の制限を受ける。本研究では、励起パルスの周波数ではなく、静磁場を掃引する SWIFT 法 (Fig. 1(b)) を提案する。これにより、極低温の高 Q 値プローブや、Electro-mechano-optical (EMO) NMR[2]のような、高感度が期待されるが狭帯域の観測法を用いても、傾斜磁場コイルと、静磁場掃引コイルを実装することにより MRI 撮像が可能になる。

【磁場掃引 SWIFT の理論】

磁場掃引 SWIFT において励起はラジオ波強度 $\omega(t)$ と磁場オフセット $\Delta B(t)$ の 2 関数によって特徴付けられる。ΔB の効果を位相に押し込めると、励起は

$$x(t) = \omega(t) \cdot \exp\left[i \int \left(-\gamma \Delta B(t)\right) \mathrm{d}t\right] \quad (1)$$

と単一の関数で表せる。励起に対応する回転座標系、すなわち回転速度が可変な回転座標系でのスピンの応答 $r(t)$ は、

$$r(t) = h(t) \otimes x(t) \quad (2)$$

MRI、SWIFT、Electro-mechano-optical (EMO) NMR

○こばやしようた、たけごしきよのり、たけだかずゆき

となる。ここで、$h(t)$ はパルス NMR における FID、すなわち回転速度が一定の回転座標系での応答に相当し、$\otimes$ は convolution を表す。式(2) をフーリエ変換することにより、convolution は積になる。

$$R(\omega) = H(\omega)X(\omega) \tag{3}$$

ここで $R(\omega)$、$H(\omega)$、および $X(\omega)$ はそれぞれ $r(t)$、$h(t)$、および $x(t)$ にフーリエ変換をほどこした関数である。ここからスペクトル $H(\omega)$ が

$$H(\omega) = \frac{R(\omega)}{X(\omega)} = \frac{R(\omega)X^*(\omega)}{|X(\omega)|^2} \tag{4}$$

により得られる。

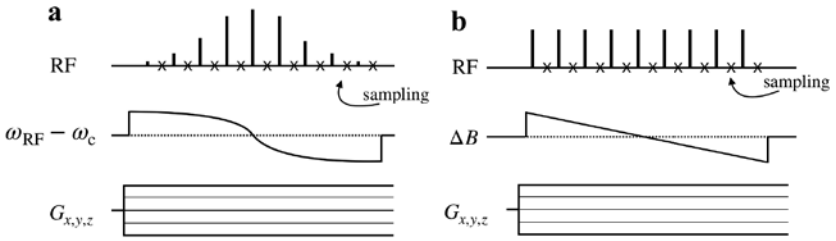


Fig. 1. Sequences for **a.** the original version of SWIFT, and **b.** field-swept SWIFT

磁場掃引 SWIFT におけるデータ処理の一連の流れを Fig. 2 に示す数値計算により得た図を用いて説明する。スピン系が線幅 100 Hz のローレンツ型共鳴線を示す場合、12.8 ms の間に磁場をオフセット 0.185 ～ −0.185 mT の範囲で線形に掃引しながら強度一定のラジオ波で励起を行うと、Fig. 2(a) のような信号 $s(t)$ が得られる。$x(t)$ に対する応答 $r(t)$ は、

$$r(t) = s(t) \cdot \exp\left[-i \int \left(-\gamma \Delta B(t)\right) \mathrm{d}t\right] \tag{5}$$

によって求められる (Fig. 2(b))。この $r(t)$ をフーリエ変換した $R(\omega)$ (Fig. 2(c)) を、さらに $X(\omega)$ で除算すれば、 $H(\omega)$ に相当するスペクトル (Fig. 2(d)) が得られる。

この手法をイメージングに応用するためには、従来の SWIFT 法と同様に、様々な組み合わせの x、y、z の 3 方向の傾斜磁場の存在下で測定を行い、back-projection 法などによって画像の再構成を行えばよい。

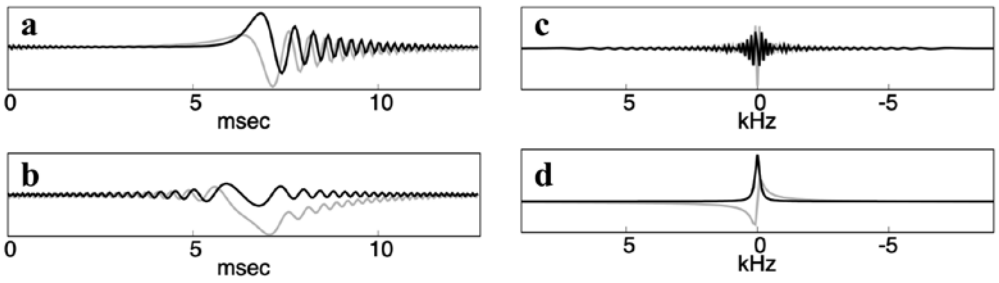


Fig. 2. a. Calculated response $s(t)$ of a ^{1}H spin system having a Lorentzian resonance line with a width of 100 Hz to an rf excitation with a constant amplitude in the presence of a linear field sweep over 0.37 mT during 12.8 ms. **b**. $r(t)$ calculated from Eq. (5), and **c**. its Fourier transformation $R(\omega)$. **d.** The spectrum $H(\omega)$ obtained using Eq. (4). Dark and light lines represent the in-phase and quadrature components of the complex signals.

【MRI プローブの製作と MRI 画像】

Fig. 3. A homemade MRI probe equipped with x, y, z-field gradient coils and an additional field-sweep coil.

直径 18 mm、長さ 12 mm のソレノイドコイルを用いて 200 MHz で共振する LC 回路を製作した。そこに 3 方向に勾配磁場をかけるためのコイルと z 方向に磁場掃引を行うためのコイルを円筒に巻きつけ、ワイドボア超伝導マグネットに挿入可能なプローブを製作した(Fig. 3)。

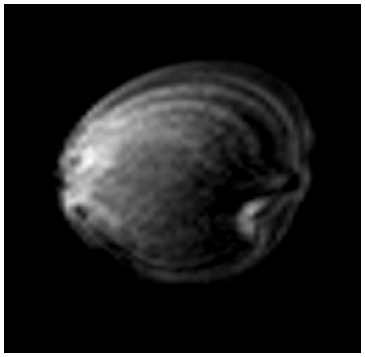


Fig. 4. ^{1}H image of a delaware grape obtained with the conventional spin echo imaging sequence.

この自作の MRI プローブと自作の分光計を用いて、200 MHz の静磁場で通常の MRI 測定に用いられるスピンエコーイメージングを行った。 Fig. 4 は選択励起パルスによってデラウェアぶどうの厚み 0.6 mm を撮像したものである。自作プローブとシステムが正常に動作していることが確認できた。

【磁場掃引 SWIFT の予備実験と結果】

内径 9 mm のガラス球に入れた 0.1 mol/L 硫酸銅水溶液に対し、Fig. 1(b) に示すシーケンスを傾斜磁場をかけずに、0.37 mT の範囲を 12.8 ms で磁場掃引して行ったところ、Fig. 5(a) に示す信号 $s(t)$ が得られた。これを前述の手順でデータ処理することで Fig. 5(b) に示すスペクトル $H(\omega)$ を得た。これは、1-pulse NMR 実験によって得られたスペクトル (Fig. 5(c)) に相当する。線幅が太いのは磁場掃引に用いる磁場の不均一性のためであり、磁場掃引用コイルを適切にデザインすることで解決可能である。以上から、提案する磁場掃引型励起法により信号取得が適切にできることが実証された。

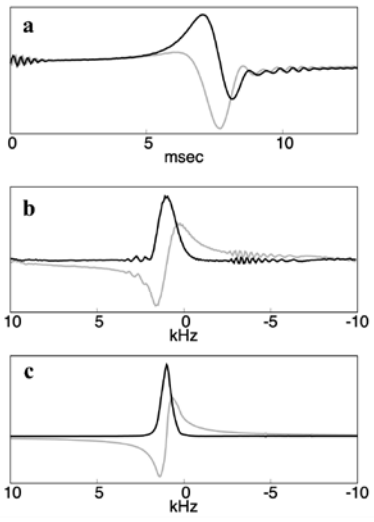


Fig. 5. a. Response $s(t)$ of ^{1}H spins in 0.1 mol/L aqueous solution of $CuSO_4$. **b.** The spectrum $H(\omega)$ obtained from the response. **c.** A spectrum obtained from a 1-pulse experiment. Dark and light lines represent the in-phase and quadrature components of the complex signals.

次に、一方向にさまざまな強度の傾斜磁場を与えたまま、同様の測定を行った (Fig. 6(a))。これらの信号から得られたスペクトル (Fig. 6(b)) は傾斜磁場方向のスピンの分布の投影を表している。またスペクトルを逆フーリエ変換して得られた時間領域の信号 (Fig. 6(c)) は

$$h(t) = \int M(\vec{r}) \exp\left(i\gamma \vec{G} \cdot \vec{r} t\right) \mathrm{d}t = \int M(\vec{r}) \exp\left(i\vec{k} \cdot \vec{r}\right) \mathrm{d}t \qquad (6)$$

で表される。ここで $M(\vec{r})$ は撮像する物体の核磁化分布である。三方向の傾斜磁場 $\vec{G}$ をさまざまに組み合わせてデータを取得することで、極座標系において k 空間を放射状に充填し、それを直交座標系に再配置し、多次元フーリエ変換を行うことで、もとの $M(\vec{r})$ を反映した画像を得ることができる。

従来の周波数掃引型の SWIFT で Fig. 6 と同等のデータを取得するためには、10 kHz 程度の帯域幅が必要となる。一方、今回の磁場掃引型の実験において要求される検出系の帯域幅は 10 kHz よりずっと狭い。[2] で報告された、ラジオ周波数の信号を光に変換する EMO NMR の検出帯域幅は約 100 Hz であり、従来の MRI 手法に適用することが困難であるが、磁場掃引型 SWIFT は EMO NMR との親和性が高いことが期待できる。

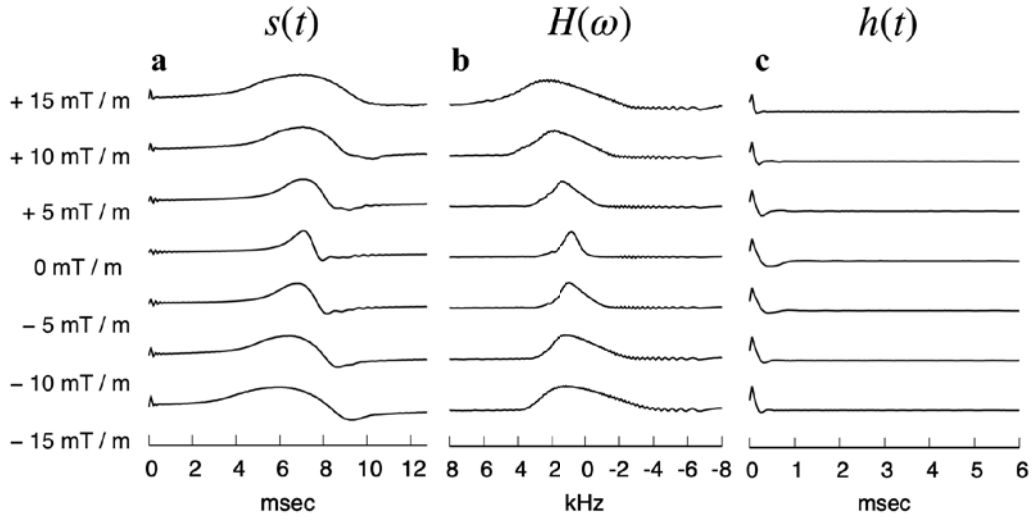


Fig. 6. a. Responses $s(t)$ of ^{1}H spins in aqueous solution of $CuSO_4$ in a spherical glass with an inner diameter of 9 mm under application of magnetic-field gradient along the coil axis for various strengths, whence the spectrum $H(\omega)$ and the FID $h(t)$ were calculated, as shown in **b** and **c**.

【謝辞】

本研究は JSPS 科研費 基盤研究(A)「光検出磁気共鳴イメージング」(18H04165)の助成を受けて実施された。

References

[1] D. Idiyatullin, C. Corum, J.-Y. Park, M. Garwood, *J. Magn. Reson.* **181** (2006) 342–349.

[2] K. Takeda, K. Nagasaka, A. Noguchi, R. Yamazaki, Y. Nakamura, E. Iwase, J.M. Taylor, K. Usami, *Optica* **5** (2018) 152–158.

2019年度優秀若手ポスター賞（大陽日酸賞）

YP3

免疫応答に関与するHOIL-1Lによる直鎖型ダイユビキチンの認識機構

○石井公貴[1]，ヴァリンダエリック[2]，岩川直都[1]，森本大智[1]，菅瀬謙治[1]，白川昌宏[1]

[1]京都大学大学院　工学研究科

[2]京都大学大学院　医学研究科

Recognition mechanism of linear di-ubiquitin by HOIL-1L in immune responses

○Naoki Ishii [1], Erik Walinda[2], Naoto Iwakawa[1], Daichi Morimoto[1], Kenji Sugase[1], and Masahiro Shirakawa[1]

[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University.*

[2]*Graduate School of Medicine, Kyoto University.*

Nuclear factor-κB (NF-κB) activation is crucial for immunity and inflammation. In the activation pathway, linear polyubiquitin chains conjugated by the linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) are specifically recognized by Npl4 zinc finger (NZF) domain of HOIL-1L and the specific recognition is critical for the NF-κB activation. Recently, the crystal structure of the NZF domain/linear di-ubiquitin (M1-Ub_2) complex has been reported; however, to understand the recognition mechanism in detail, it is necessary to obtain structural properties of the NZF domain in solution. In this study, we determined the solution structure of the free NZF domain by using NOE and RDC restraints. Also, the relaxation dispersion experiments showed that Distal-Ub of M1-Ub_2 primarily binds the NZF domain and Proximal-Ub of M1-Ub_2 subsequently binds the NZF domain.

【緒言】

ユビキチンと呼ばれるタンパク質は、単量体同士が結合することでポリユビキチンを形成する。さらに、ポリユビキチンは単量体間の結合様式によって8種類に分類され、その種類によってタンパク質分解やDNA修復、シグナル伝達など、関わる生理機能が異なる。その中でも直鎖型ポリユビキチンは、E3酵素(LUBAC)のサブユニットであるHOIL-1LのNZFドメインと特異的に結合することで、NF-κBという転写因子を活性化させる。NF-κBは免疫応答やアポトーシスなどの多様な生命現象に関与している転写因子であり、その活性の異常が生じると、自己免疫疾患やガンをはじめとする様々な疾患が起こることが知られており、創薬のターゲットとして注目されている。これまでにX線結晶構造解析によって、NZFドメインによる直鎖型ダイユビキチン(以後、M1-Ub_2と略す)による複合体の結晶構造が報告され、M1-Ub_2は、2つのユビキチンユニット(Distal-Ub

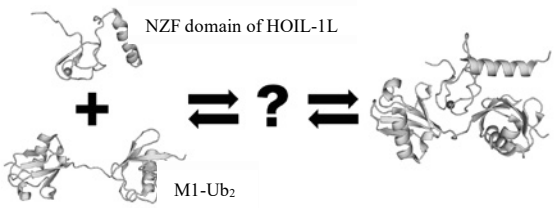


Fig.1 Specific recognition mechanism between the NZF domain and M1-Ub_2.

NF-κB、直鎖型ユビキチン鎖、タンパク質間相互作用

○いしいなおき、ヴぁりんだえりっく、いわかわなおと、もりもとだいち、すがせけんじ、しらかわまさひろ

及びProximal-Ub)を用いてNZFドメインと結合することが明らかになった(Sato et al, 2011)。しかし、その分子認識の詳細な過程は明らかになっていない。そこで本研究では溶液中でのNZFドメインによるM1-Ub_2の認識機構を原子レベルで解明することを目指す(Fig.1)。溶液NMR法を用いて遊離型NZFドメインのNMRシグナルの帰属を行い、各オーバーハウザー効果(NOE)ならびに残余双極子カップリング(RDC)データにより溶液構造を決定した。また、NMR緩和分散法の結果から、M1-Ub_2のユビキチンユニットごとにNZFドメインとの結合選択性が異なることが示唆された。

【実験・結果】

(1)遊離型NZFドメインの溶液構造解析

はじめに、連鎖帰属法により遊離型NZFドメインのNMRシグナルの帰属を行い、その帰属結果とNOE及びRDCから得られた距離・角度制限情報を元に、CYANAを用いて、遊離型NZFドメインの構造決定を行なった。その結果、Proximal-Ubとの結合に関与するαヘリックス領域が、NZFドメインとの結合によって構造変化を起こすことが示唆された(Fig.2)。

Fig.2 Conformational change from free (black) to bound (gray) form of the NZF domain.

(2)M1-Ub_2とNZFドメインの結合の速度論的解析

次に、NMR緩和分散法によって、M1-Ub_2とNZFドメインの結合を速度論的に解析した(Fig.3)。等温滴定型カロリメトリー(ITC)によって決定した解離定数を元にNMR緩和分散法によって得られたパラメータを解析すると、Distal-Ubの方がProximal-Ubよりも解離速度定数が小さく、NZFドメインとより選択的に結合することが示唆された。したがって、NZFドメインは結合選択性を利用することで、同一のタンパク質から成る2つのユビキチンユニットを区別しながら、M1-Ub_2を認識していると考えられる。

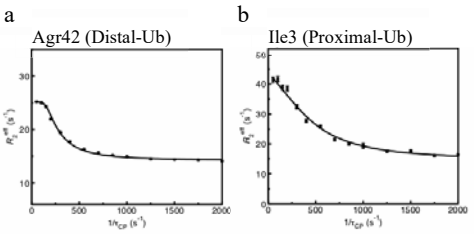


Fig.3 ^{15}N R_2 relaxation dispersion profiles for (a) Arg42 of Distal-Ub and (b) Ile3 of Proximal-Ub.

(3)M1-Ub_2とNZFドメインの特異的認識モデル

今回の結果から、以下のような認識モデルを提案する。まず、M1-Ub_2のDistal-UbのみがNZFドメインと結合する過渡的な中間構造を形成する。そして、NZFドメインの構造変化に伴い、Proximal-UbがNZFドメインと結合し、最終的な結合状態に至ると考える(Fig.4)。

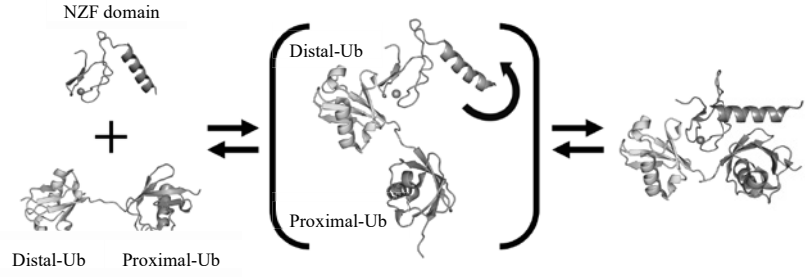


Fig.4 Recognition mechanism between M1-Ub_2 and NZF domain.

Reference

Sato, Y. *et al.* Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex. PNAS. (2011)

2019年度若手ポスター賞（2社合同賞）

YP11

半整数四極子核のDNP-NMR信号取得の高速化

○永島裕樹[1*]，Julien Trébosc[2,3]，今喜裕[1]，佐藤一彦[1]，Olivier, Lafon[2,4*]，Jean-Paul Amoureux[2,5,6*]

1 産業技術総合研究所　触媒化学融合研究センター

2 リール大学, CNRS, Central Lille, ENSCL, Univ. Artois, UMR 8181, UCCS

3 リール大学, CNRS,-2638, Fédération Chevreul

4 Institut Universitaire de France

5 ブルカーバイオスピン

6 理研 NMR研究開発部門

Speeding up DNP acquisition of half integer quadrupolar nuclei

○Hiroki Nagashima[1*], Julien Trébosc[2,3], Yoshihiro Kon[1], Kazuhiko Sato[1], Olivier Lafon[2,4*], Jean-Paul Amoureux[2,5,6*]

1 Interdisciplinary Research Center for Catalytic Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

2 Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, ENSCL, Univ. Artois, UMR 8181, UCCS

3 Univ. Lille, CNRS-2638, Fédération Chevreul

4 Institut Universitaire de France

5 Bruker Biospin

6 Riken NMR Science and Development Division

We have optimized the transfer of magnetization from ^{1}H to quadrupolar nuclei for indirect DNP experiments. Three different sequences for such a transfer exist presently: CPMAS, PRESTO and *D*-RINEPT-SR4$^{2}_{1}$. *D*-RINEPT-SR4$^{2}_{1}$ works well at ultra-fast MAS, but not at the moderate spinning speeds encountered with DNP (ν_R = 10-15 kHz). This small efficiency is mainly associated to the large losses related to ^{1}H-^{1}H interactions. We have introduced three changes in this *D*-RINEPT scheme that resulted in 16-fold improvement in its efficiency for ^{27}Al of γ-alumina. In the case of transfers with long-distances and/or low-γ nuclei, the new sequence is also much more efficient than PRESTO and direct DNP: as an example, it multiplies by 3.9 the signal of ^{17}O for Al-O-Al species of γ-alumina and by 5.5 that of ^{95}Mo for MoO_3 supported on TiO_2 with respect to PRESTO sequence. On this unlabeled sample, we have analyzed in details its surface structure using DNP-enhanced NMR ^{17}O, ^{95}Mo and ^{47,49}Ti data.

動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization, DNP) 法はNMRの感度向上手法の中で最も有力な手法の一つであり、低温の試料回転 (LT-MAS) により達成するMAS-DNPは現在最も実用的に成功している[1]。これまで^{13}C、^{15}N、^{29}Siなどのスピン1/2核に多く適用されてきたMAS-DNPであるが、四極子相互作用を有する (S > 1/2) 原子核 (四極子核) に対して、汎用的に使用されているとは言えない。しかしながら、周期表の73%が四極子核であり、多くの重要な材料に含まれる。四極子核は感度が低いものが多く、MAS-DNPの適用が望まれる。

固体DNP-NMR、半整数四極子核、D-RINEPT

○ながしま ひろき，とれぼすく じゅりあん，こん よしひろ，さとう かずひこ
らふぉん おりびえ，あむるー じゃんぽーる

分極移動法の課題

MAS-DNPでは^{1}Hから観測核に分極移動をして信号を取得するIndirect DNP法で達成されることがほとんどである。四極子核の場合、CPMASを実施するためには、低RF磁場が必要になるため、R^3（$\nu_1 = n*\nu_R$, n = 1 or 2）の条件を避けなければならない。また、励起帯域が狭くなってしまうこと、スペクトルの形状が歪むこと、そもそもC_Qが大きくなるとスピンロックが困難になるなどの不利な点がある。そのため、四極子核のDNP測定は観測しやすい^{27}Alなどに制限されてきた。一方で、スピンロックの必要がないPRESTOが提案されているが[2]、低周波数核や^{1}Hと観測核との距離が長いと分極移動効率が大幅に低下する。

本研究では同じくスピンロックの必要のないD-RINEPTに着目した[3]。D-RINEPTに使用されるRecoupling パルスの$SR4_1^2$はRF磁場の不均一性、RF offset、CSAにロバストであり、Dipolar truncationが生じない利点がある。しかしながら、$SR4_1^2$のRF磁場条件は$\nu_1 = 2*\nu_R$と低く、Recouplingと同時に^{1}H-^{1}H decouplingをよく達成するには、高速回転($\nu_R \geqq 40$ kHz) が必要であった。また、D-RINEPTでは化学シフト、CSAの発展を再収束させるために、Recouplingパルス間に90度、180度パルスとDelayを設けなければならず、このDelayの間に^{1}H-^{1}H dipolar couplingの影響によって信号が減衰してしまう。MAS-DNPでは高速回転を達成することは低温測定の制約 (約100 K) により厳しいため、汎用の3.2mm DNP プローブでの12.5 kHz以下の試料回転でシーケンスが機能することが必要となる。

新規 D−RINEPT の開発

$SR4_1^2$のR element をTanh/Tanパルスに変更し、A(adiabatic) $SR4_1^2$とすることで、RF磁場条件の制約をなくし、より大きなRF磁場を使用可能にした[4]。これにより低速回転 (ν_R = 12.5 kHz) での^{1}H-^{1}H decouplingの性能を大幅に改良することに成功した。一方、Recouplingパルス間のDelayにはCW decouplingを照射することで、^{1}H-^{1}H dipolar coupling による信号の減衰を抑えることに成功した。CW decouplingの位相は、^{1}Hへの90、180度パルスとA$SR4_1^2$により生み出されたHeteronucler dipolar couplingによる密度演算子の発展を阻害しないように設定しなければならない。

^{27}Al , ^{17}O (γ-Al_2O_3) と ^{17}O, ^{95}Mo , ^{47,49}Ti (MoO_3-TiO_2) の観測

γ-Al_2O_3 の ^{27}Al の信号を用いて新規 D-RINEPT の性能を確認した。旧 D-RINEPT からは 16 倍もの感度向上が確認された。さらに低周波数核の場合において、新規 D-RINEPT の性能を確認するため、γ-Al_2O_3 の ^{17}O (Al-O-Al の信号) と、10%wt MoO_3-TiO_2 の ^{95}Mo の測定を実施した。上記の信号取得は Indirect-DNP 法としては初めてである。実際の信号検出は分極移動後に QCPMG を組み込んで達成された。結果、新規 D-RINEPT は PRESTO-III と比較して、γ-Al_2O_3 の ^{17}O (Al-O-A の信号) に対して 3.9 倍、10%wt MoO_3-TiO_2 の ^{95}Mo に対して 5.5 倍の感度で信号を取得することができた。これは Heteronucler dipolar coupling が小さくなるほど、新規 D-RINEPT は優位であることを示している。また、^{17}O Direct DNP と比較しても、およそ 6.7 倍の感度で信号が得られた。さらに発表では同じく新規 D-RINEPT によって、MoO_3-TiO_2 の ^{17}O, ^{47,49}Ti のスペクトルを得ることに成功したので報告する。

References

[1] A. G. M. Rankin, et al, *Solid. State Nucl. Magn. Reson.* 101, 116 (2019)

[2] F A. Perras, et al, *J. Am. Chem. Soc. 137* (26), 8336–8339 (2015)

[3] R. Giovine, et al, *J. Magn. Reson.* 299, 109-123 (2019)

[4] H. Nagashima. et al, *Solid. State Nucl. Magn. Reson.* 94, 7 (2018)

謝辞

本研究はNEDO (Grant No. P16010)の助成を受けて実施されました。

2019年度若手ポスター賞（2社合同賞）

YP9

ＮＭＲを用いた定量的なグルタミン分解速度の解析

○小倉　立己[1, 2]，若山　正隆[1]，曽我　朋義[1]，冨田　勝[1]
1慶應義塾大学　先端生命科学研究所
2（公財）庄内地域産業振興センター

Quantitative analysis of Glutamine degradation using NMR

○Tatsuki Ogura [1, 2], Masataka Wakayama [1], Tomoyoshi Soga [1], Masaru Tomita [1]
1 Institute of Advanced Biosciences, Keio University
2 Shonai Regional Industry Promotion Center

Glutamine (Gln) is known as an unstable compound and converts to pyroglutamate (pGlu) in water solvent. Gln degradation speed is depended on temperature, pH, and ion strength. However, quantitative analysis of Gln degradation was little information. In this study, we investigated the quantitative analysis of Gln degradation using ^{1}H nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR). 100 mM Gln solution dissolved in 600 µL of 10 mM DSS-d_6 / D_2O solution was prepared, and acquired to ^{1}H-NMR and ^{1}H-^{1}H COSY using 600 MHz NMR at 25, 30, 35, 40 °C for 10 days. Gln degradation and pGlu production speeds became faster at 40 °C compared to 25 °C. In opened NMR tube condition; air exchanging condition, Gln degradation was two times speed up compared to pGlu production speed. It is suggested that air exchanging affects to Gln degradation speed.

【序論】近年の分析技術の向上により、核磁気共鳴（NMR）や質量分析計（MS）を用いた微量成分の分析が実施できるようになり、生体内における多くの代謝系について定性的・定量的な変動解析が可能となった。グルタミン（Gln）は生体反応の重要な窒素源となるアミノ酸であり、多くの代謝系に関与していることが知られている[1]。しかしGlnは溶液状態では不安定な物質であり、アミノ基が脱離してピログルタミン酸（pGlu）へと変化してしまうため、規格の定められた試薬の販売がなく、定量分析を行うには都度試薬調整を行う必要がある[2]。Gln分解は温度やpHによってその速度が変化することが知られているが[3]、pGlu生成速度や気相変動との関係性を評価した研究はほとんど報告されていない。本研究では定量NMR法を用い、温度を変化させたGln溶液の分解反応の定量解析を行い、Gln分解に関与するファクターの解析を実施した。また気相変動による影響を調べるため、NMR管上部を開孔状態にしたGln分解反応の評価も行った。

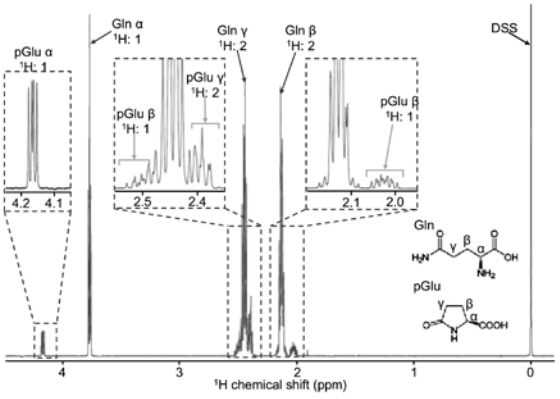


図 1. Gln および pGlu の ^{1}H-NMR

定量NMR、ピログルタミン酸、温度安定性

○おぐら　たつき、わかやま　まさたか、そが　ともよし、とみた　まさる

【方法】富士フィルム和光純薬からGln試薬を購入し、600 µLの10 mM DSS-d$_6$/D$_2$O溶液に8.77 mg溶解させ100 mMのGln溶液を作成した。作成したGln溶液をφ5 mm NMR管へと充填し、Jeol製600 MHz NMRにセットし、10日間^{13}Cデカップリング^{1}H-NMR測定を行った。測定は装置内温度を25、30、35、40°Cにセットした状態にし、緩和時間60秒、積算8回の条件で約13時間ごとに測定を行った。開孔状態のサンプルは、NMR管のキャップにφ1 mmの穴を開けた状態で測定を行った。また各測定において同時に^{1}H-^{1}H COSY測定を行い、ピークの同定に用いた。得られたデータはDelta（ver. 5.2.1, Jeol製）を用いて解析し、各ピークの積分値から定量NMR法を用いた定量分析を行った。

【結果と考察】^{1}H-^{1}H COSY測定からGlnおよびpGluのピークの同定を行った結果、Glnは2.17, 2.46, 3.77 ppmが、pGluは2.02, 2.39, 2.58, 4.17 ppmが対応するピークだった。また^{1}H-NMRピークの分裂状態とHMDBのデータから、各ピークと分子構造の対応付けを行った（図1）。異なる温度条件におけるGln及びpGlu濃度の経時変化を解析した結果、Gln減少速度とpGlu生成速度は温度が高くなるに従い速くなる傾向が確認され、1：1の割合で変化していた（図2）。25 °Cにおける開孔、未開孔サンプルの経時変化を確認した結果、未開孔サンプルはGln分解速度：pGlu生成速度＝1：1であったのに対し、開孔サンプルはGln分解速度：pGlu生成速度＝2：1となっていた。上記の結果から、気相の交換が起こる条件ではGlnの分解動態は変化し、pGlu以外の成分が生成されているのではないかと考えた。

本会では、気相・液相比の変化によるGln分解動態への影響評価についても併せて議論する予定である。

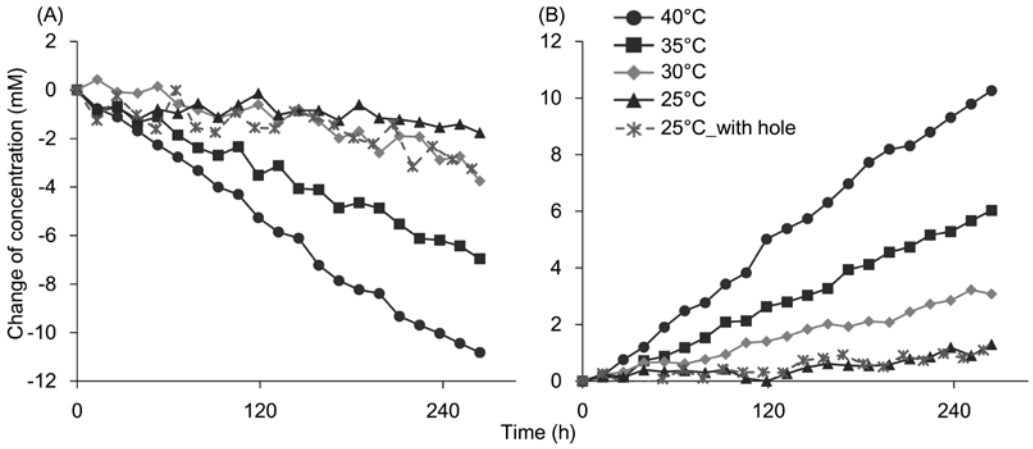


図2. Gln分解及びpGlu生成の経時変化量解析。(A)Gln分解，(B)pGlu生成。
各ピークの定量値を平均し、初期濃度からの変化量を算出。

参考文献

1. Labow et. al., World Journal of Surgery, 24, 1503-1513 (2000)
2. Purwaha et. al., Analytical Chemistry, 86, 5633-5637 (2014)
3. Arii et. al., European Journal of Pharmaceutical Sciences, 9, 75-78 (1999)

2020年度　学会顕彰

NMR 討論会特別講演者

嶋田 一夫　　理化学研究所

進歩賞

竹内 恒　　産業総合研究所
「NMRによる動的構造生物学の推進と創薬への応用」
松木 陽　　大阪大学蛋白質研究所
「高磁場・極低温DNP用装置、方法論の開発と応用」

若手ポスター賞

最優秀若手ポスター賞 ＜JEOL RESONANCE賞＞
但馬 聖也　　横浜国立大学

優秀若手ポスター賞 ＜大陽日酸賞＞
田中　真司　　産業技術総合研究所

若手ポスター賞
小泉 太貴　　東京都立大学
髙瀬 直美　　千葉工業大学
日部 雄太　　京都大学
岡部 遼太郎　　東京工業大学
本山 誠　　大阪大学

2020年度学会顕彰：特別講演者

「*in situ* 動的構造」からみたタンパク質の機能解明

理化学研究所　生命機能科学研究センター 生体分子動的構造研究チーム
嶋田 一夫

膜タンパク質は生体内において重要な役割を果たすとともに最大の創薬標的タンパク質である。X線結晶構造解析および極低温電子顕微鏡法は、膜タンパク質の機能メカニズムの解明に大きく貢献してきたが、これらの手法で得られる立体構造は基本的に静的なスナップショットであり、膜タンパク質が実際に機能している*in situ*での動的な構造や分子間相互作用を必ずしも反映しない。一方、我々は核磁気共鳴法（NMR）を用いて、*in situ*でのタンパク質の動的構造情報を得られるというNMRの特徴を最大限いかして、生物学的に重要なタンパク質、細胞接着因子、Gタンパク質共役受容体（GPCR）、イオンチャネルなどの機能解明を行ってきた。一般に、NMRを用いて膜タンパク質のような高分子量タンパク質の機能解明を行う場合、その高分子量性に由来するNMR測定制限および膜タンパク質の不安定性がボトルネックとなる。申請者はこれらの問題を解消するための新規測定法および試料調製法を開発し、開発された方法論を用いて、生物学的に重要な系において動的構造および相互作用の観点よりそれらの機能解明に成功してきた[1～6]。

本講演では、我々の取ってきた戦略および最近の成果に関して発表する。

参考論文

[1] Ichio Shimada, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Matthew T. Eddy, and Kurt Wüthrich "GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures." *Nat. Rev. Drug Discov.* 18(1), 59-82 (2019).

[2] Koh Takeuchi, Misaki Imai, and Ichio Shimada "Conformational equilibrium defines the variable induction of the multidrug-binding transcriptional repressor QacR" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 116(40): 19963-19972 (2019) .

[3] Hanaho Kano, Yuki Toyama, Shunsuke Imai, Yuta Iwahashi, Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa1, and Ichio Shimada "Structural mechanism underlying G protein family-specific regulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel" *Nat. Commun.* 10(1): 2008 (2019).

[4] Yuki Toyama, Hanaho Kano, Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, and Ichio Shimada "Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses" *Nat. Commun.* 8: 14523 (2017).

[5] Noritaka Nishida, Hiromi Sumikawa, Masayoshi Sakakura, Nobuhisa Shimba, Hideo Takahashi, Hiroaki Terasawa, Ei-ichiro Suzuki, Ichio Shimada "Novel Collagen-Binding Mode of the VWA Domain Determined by a Transferred Cross-Saturation Experiment" *Nat. Struct. Biol.* (2003) 10, 53-58.

[6] Hideo Takahashi, Tamiji Nakanishi, Keiichiro Kami, Yoji Arata and Ichio Shimada "A Novel NMR Method for the Determination of the Interface of Large Protein-protein Complexes" *Nat. Struct. Biol.* (2000) 7, 220-223.

「進歩賞」について

当学会は2020年度より、若手研究者を顕彰することによって、人材育成を通じてNMR分野の発展に資することを目的とする「進歩賞」を創設しました。本賞の受賞対象者は「NMRに関する研究成果が特に優れ、将来性が十分期待される45歳未満の本会一般会員」です。

2020 年度 選考の経緯

まずは理事会で推挙された5名の評議員と各賞担当理事からなる選考委員会を設立しました。そして、選考委員会の各審査員が応募書類をもとに、コメントも記述した形で10点満点で絶対評価を行いました。点数は、10点（非常に優秀）／8点（優秀）／6点（標準）／4点（やや力不足）／2点（力不足）を基準としました。

選考委員会審査員（五十音順、敬称略）
相沢智康（北大）
石井佳誉（東工大）
野村　薫（サントリー生科財団）
廣明秀一（名古屋大）
水野元博（金沢大）

その後、2020年7月17日、上記の審査員全員および山本泰彦理事（各賞担当理事、選考委員会委員長）、神田大輔理事（各賞担当理事、ただしオブザーバ）、池上貴久会長（オブザーバ）で選考委員会（オンライン）を開き、審査の妥当性などについてさらに詳しく総合的に議論しました。

その結果、2020年度（第一回目）の受賞候補者は下記の2名に決まり、その後の理事会での承認を経て決定されました。結果は8/21のニュースレターにて本会員全員に配信されました。誠におめでとうございました。

（順不同）
竹内 恒 氏（Koh Takeuchi）（産業技術総合研究所）
松木 陽 氏（Yoh Matsuki）（大阪大学蛋白質研究所）

上記の受賞者にはNMR討論会（高崎）にて受賞講演を行っていただきました。さらに、会期中の表彰式にて、表彰状および後援企業の「日本電子株式会社」「ブルカージャパン株式会社」からご厚志の報奨金と盾の副賞が贈られました（**写真**）。

進歩賞授与規定の詳細につきましては、HPおよび冬に発刊予定の同誌巻末をご覧ください。

八島秀仁*、竹内恒、池上学会長
*ブルカージャパン株式会社 バイオスピン事業部長

穴井孝弘*、松木陽、池上学会長
*株式会社JEOL RESONANCE代表取締役社長

2020年度学会顕彰：若手ポスター賞

第59回NMR討論会（2020）若手ポスター賞について

今年度の『若手ポスター賞』には、17名の応募があり、最優秀若手ポスター賞として1名、優秀若手ポスター賞として1名、若手ポスター賞として5名を顕彰しました。これらポスター賞にはJEOL RESONANCE社と大陽日酸社からのご厚志による副賞の授与もおこないました。若手ポスター賞の歴史や応募資格など、詳しくは第59回NMR討論会（2020）のホームページ「若手ポスター賞」(https://www.nmrj.jp/NMR2020/posteraward.php）を御参照下さい。

選考にあたっては、まず17名の応募者について、研究内容や評価者の人数などを考慮し、「溶液生体」5名、「固体応用」4名、「高感度化」4名、「測定法」4名の4つのグループに分けました。グループ毎に評価者として、日本核磁気共鳴学会の評議員5名程度を利益背反にならないように振り分けました。規定の選考方針に基づいて応募者の要旨・ポスター・発表の3項目を評価し、総合点を10点満点で採点しました。各審査員が担当の応募者について、標準的得点を6点として採点していただき、審査員の総合点の平均値を各応募者の評価としました。

評価が最も高い1名を最優秀若手ポスター賞として選び、賞状を授与し、副賞としてJEOL RESONANCE賞と記念の楯を贈りました。ついで、優秀若手ポスター賞1名に賞状を授与し、副賞として大陽日酸賞と記念の楯を贈りました。さらに5名の若手ポスター賞受賞者を選び、副賞として2社合同賞を学会長より贈りました。

■最優秀若手ポスター賞（JEOL RESONANCE賞）

但馬 聖也（横浜国立大学大学院 理工学府）

「固体NMRによる内向きプロトンポンプロドプシンSchizorhodopsinのレチナール結合サイトの構造解析」

■優秀若手ポスター賞（大陽日酸賞）

田中 真司（産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター）

「固体DNP-NMRによる高分子担持触媒の構造解析」

奥側左から池上学会長、穴井[*1]、折笠[*2]。手前左から高瀬、小泉、岡部、日部、本山、田中、但馬

[*1] 株式会社JEOL RESONANCE代表取締役社長

[*2] 大陽日酸メディカル事業本部SI事業部長

選考委員代表：山本一彦・藤原敏道

■若手ポスター賞（2社合同賞）

本山 誠（大阪大学大学院 基礎工学研究科）

「分子動力学法を用いた核スピンシングレット状態の緩和時間計算」

日部 雄太（京都大学大学院 理学研究科）

「Rapid Scan Nuclear Quadrupole Resonance」

岡部 遼太郎（東京工業大学生命理工学院）

「Adiabatic Pulseを用いた溶媒信号抑制パルスの開発および固体NMR測定への応用」

小泉 太貴（東京都立大学大学院 理学研究科）

「光受容タンパク質GAFドメインにおける発色団のプロトン化状態の解析」

髙瀬 直美（千葉工業大学 生命科学専攻）

「piRNAの生成に関与するRNA elementの二次構造解析」

各賞担当理事　藤原敏道、山本泰彦

2020年度最優秀若手ポスター賞（JEOL RESONANCE賞）

P36Y 固体NMRによる内向きプロトンポンプロドプシン Schizorhodopsinのレチナール結合サイトの構造解析

○但馬　聖也[1]，神取　秀樹[2]，井上　圭一[3]，川村　出[1]
1 横浜国立大学　大学院理工学府
2 名古屋工業大学
3 東京大学

Structure of retinal chromophore in Schizorhodopsin as studied by solid-state NMR

○Seiya Tajima [1], Hideki Kandori[2], Keiichi Inoue[3], Izuru Kawamura[1]
1 Yokohama National University, Graduate School of Engineering Science
2 Nagoya Institute of Technology
3 The University of Tokyo

Schizorhodopsin (SzR) found from Asgardarcheota is a light-driven inward proton transporter. SzR has a unique Phe-Ser-Glu (FSE) motif around retinal, which motif is related to the function of rhodopsin. Moreover, SzR has Tyr71 on the extracellular side of the protonated Schiff base unlike typical rhodopsins, and the Y71F mutation induces a large blueshift and decreases pump activity. Here, we conducted solid-state NMR measurements of SzR embedded into POPC/POPE membrane and revealed the structure of hydrogen network around retinal in SzR. ^{15}N NMR signal of protonated Schiff base in Y71F mutant appeared at lower resonance than WT-SzR1 and ^{15}N NMR signals of Arg67 in Y71F disappeared. Our results indicated that Y71F mutant has a stronger interaction between Asp184 and protonated Schiff base and perturbs the hydrogen bond network involving Arg67. We showed that the Tyr71 plays an essential role in color tuning and the pump activity.

【緒言】

ロドプシンとはシッフ塩基結合を介してタンパク質に結合したレチナールを発色団として持つ7回膜貫通型タンパク質である。ロドプシンは光吸収によりレチナールが異性化し、それをきっかけにしてタンパク質の立体構造が変化することで、イオンポンプやシグナル伝達など様々な機能を発現する。近年では数多くの微生物型ロドプシンが発見され、どのような機能を発現するかはレチナール結合サイトの構造の違いが要因の一つとされる。

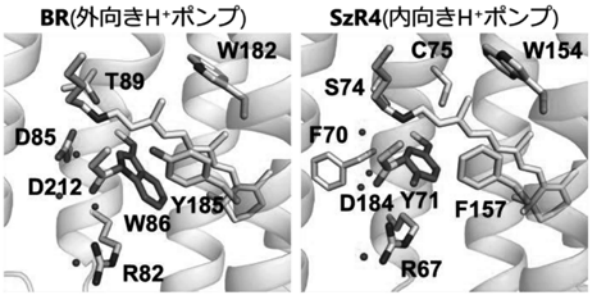


Fig. 1 Structure of the retinal binding site in BR (left) and SzR4 (right)[2].

固体NMR、7回膜貫通型タンパク質、プロトン化シッフ塩基

○たじま　せいや、かんどり　ひでき、いのうえ　けいいち、かわむら　いずる

シゾロドプシンSchizorhodopsin(SzR)ファミリーはアスガルド属古細菌から見つかった微生物型ロドプシン群であり、最初に調べられたSzR1をはじめとして、SzRは細胞内側にプロトンをポンプする[1]。SzRはSer-Phe-Glu (SFE)モチーフを持ち、従来の外向きプロトンポンプロドプシンBRや内向きプロトンポンプロドプシンPoXeRなどいずれのロドプシンタンパク質と比べてレチナール周辺のアミノ酸配列が大きく異なっている。また、SzRは従来の内向きプロトンポンプより極めて輸送活性が高く、神経科学などで重宝される光遺伝学の新たなツールとしても期待されている。

一方でどのような機構で内向きにプロトンを輸送するのかは不明である。本研究では、細胞膜に埋め込んだSzRの固体NMR測定を実施し、SzRのレチナール結合サイトの構造解析を行った。特にSzRのシッフ塩基の細胞側に存在するTyr71に着目した。この理由は他の微生物型ロドプシンはこの位置にトリプトファンを持ち、SzRにユニークなアミノ酸残基である。また、SzR1と相同性の高いSzR4の結晶構造が発表された[2]。この変異体Y71Fではレチナールの極大吸収波長が約20 nmほど短波長シフトし、内向きH^+輸送活性が大幅に減少する。本研究では野生型SzRとその変異体Y71Fの固体NMRスペクトルを比較し、レチナール結合サイトの構造変化を調べ、Tyr71が水素結合ネットワークの維持において重要な役割を有することを示した。

【実験手法】

大腸菌発現系によりU-^{15}N, [ζ-^{13}C]Tyr, [^{13}C14, ^{13}C20]Retinal-野生型SzR1およびSzR4、U-^{15}N, [14,20-^{13}C]Retinal-SzR1-Y71F変異体を発現・精製した。この際、プロトン化シッフ塩基の^{15}N信号とHisのイミダゾール環のピロール型窒素の信号との重なりを避けるために、Hisはリバース標識(非標識)している。次にPOPG:POPE=1:3の混合脂質膜を準備し、タンパク質と脂質をモル比1:20で再構成し、水和した膜試料を直径4.0 mmのジルコニア製MASローターにパッキングした。固体NMR測定では^{15}Nおよび^{13}C CP-MAS法とDARR法を用いた。測定にはBruker Advance III 600 MHzで4.0 mm E-free ^{1}H-^{13}C-^{15}N三重共鳴プローブを用いてMAS周波数10 kHz, プローブ設定温度5 ℃にて全て暗状態で測定を行った。^{13}Cはアダマンタンを40.48 ppm (DSS), ^{15}Nの基準はNH_4Clを38.34 ppmとした。

【結果・考察】

① <u>レチナールの構造</u>

まず^{13}C CP-MAS法とDARRにより、野生型SzR1 レチナールのC20は15.8 ppmに、C14は124.4 ppmにピークが現れた。レチナールのC14, C20はレチナールの配座によってピーク位置に影響し、SzR1の13-*trans*, 15-*anti*型であることが示唆された。対して、Y71F変異体ではレチナールのC20が15.2 ppmに、C14が124.8 ppmに野生型とほぼ同じ化学シフト値を示し、Y71F変異によってレチナールの構造は大きく変化しないことが分かった。

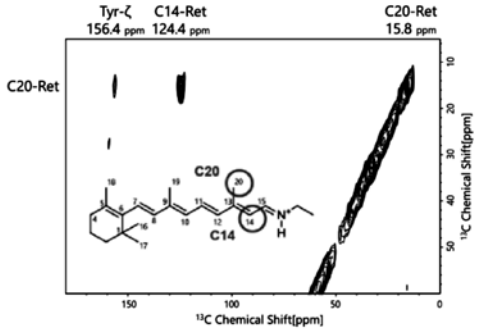


Fig. 2 DARR of [ζ-^{13}C]Tyr, [14,20-^{13}C]Retinal-labeled wild-type SzR1(Mixing time: 500 ms)

② Tyr71の水素結合様式

Fig. 2には野生型SzR1の^{13}C DARRスペクトル(混合時間 500 ms)を示す。レチナールのC14とC20との交差ピークに加えて、Tyr Cζとの交差ピークが156.4 ppmに観測された。この混合時間では長距離の^{13}C炭素間の交差ピークを示す[3]。結晶構造によると[2]、レチナールの14位と20位とともに7 Å以内に存在するTyr CζはTyr71しかないため、このピークをTyr71と帰属した。TyrのCζ位の化学シフト値はTyrの水素結合様式に鋭敏に影響を受ける[4]。チロシンの水酸基が水素結合ドナーとして強く作用している場合には約160 ppmに、チロシンが水素結合していないまたは水素結合アクセプターとして働く場合には約156 ppmにピークが現れる。そのため、SzR1のTyr71は水素結合アクセプターとして作用していると考えられる。

③ レチナールのプロトン化シッフ塩基の化学シフト

^{15}N CP-MASでは、野生型SzR1のシッフ塩基(SB)のピークは163.1 ppmに現れた。シッフ塩基の化学シフト値はロドプシンの極大吸収波長と一定の相関があり、光吸収が長波長側にシフトするにつれて高磁場シフトする[5]。また、プロトン化シッフ塩基結合を持つレチナールのモデル化合物はアニオンサイズと相関を持ち(Fig. 4 点線)、右上側にプロットが位置する場合は対イオン相互作用が弱く、左下側に存在する場合は対イオン相互作用が強くなる傾向にある。SzR1の化学シフト値と極大吸収波長をプロットしたところ、プロトン化シッフ塩基とその対イオンとして考えられるAsp184間の相互作用が他の微生物型ロドプシンよりも弱いことが示唆された。これはSzR4でも同様の傾向であった。

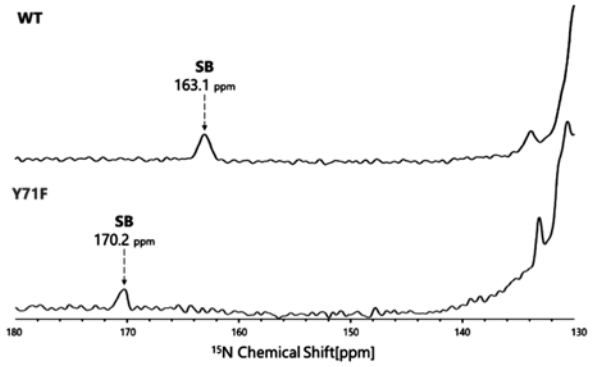


Fig. 3 ^{15}N NMR signals of protonated Schiff base of wild-type SzR1(above) and Y71F mutant (below).

また、極大吸収波長が短波長シフトしたY71F変異体では170.2 ppmに現れ、野生型より7 ppmほど低磁場側であった。そのため、Y71F変異体では野生型と比較して対イオンであるAsp184がシッフ塩基に近づき、シッフ塩基と対イオンの相互作用が強まったことが示唆された。これによって、レチナールと周辺アミノ酸残基との相互作用が変化したことが考えられるため、周辺アミノ酸残基のNMR信号を解析した。

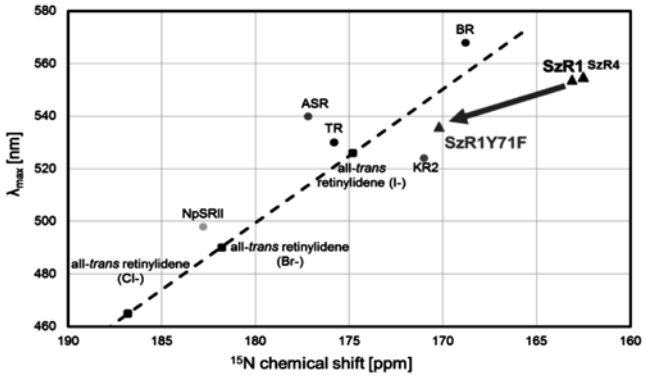


Fig. 4 Relationship between the ^{15}N chemical shifts and the maximum absorption wavelengths.

④ Arg67の周辺との相互作用

野生型のSzR1ではArgのη位のピークは71.4 ppmに加え、高磁場側の66.9 ppmと低磁場側の74.8 ppmに分裂した2つのピーク(Wing Peak)も観測された。Wing PeakはArgのグアニジル基の$N\eta_1$と$N\eta_2$が周辺残基との相互作用により等価でなくなるために現れる[6]。このようなwing peakはBRやKR2などのロドプシンにおいても観測されている。対して、Y71F変異体ではFig. 5に示すようにWing Peakは観測されなかった。そのため、Y71F変異によって、これに関わるArg67など周辺の水素結合ネットワークが変化し、Asp184がプロトン化シッフ塩基(pSB)に近づく変化が固体NMRで観測されたと考えられる(Fig. 6)。固体NMRで観測したレチナールのシッフ塩基や周辺の水素結合ネットワークの変化は内向きプロトンポンプ活性に関与していることが明らかとなった。

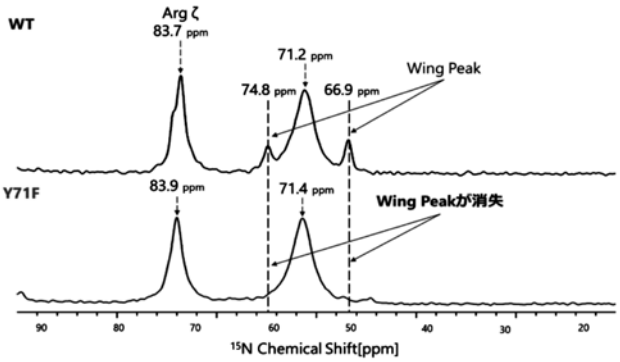


Fig. 5 A comparison of Arg $^{15}N\zeta$ and $^{15}N\eta$ NMR signals between wild-type SzR1(above) and Y71F (below).

【結論】

本研究では光駆動型内向きプロトンポンプSzR1の固体NMR測定により、SzR1のレチナールシッフ塩基近傍に存在するTyr71がシッフ塩基やその周辺残基との水素結合ネットワークを支える残基であることを示し、このことがSzR1の波長制御や内向きプロトンポンプ機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。

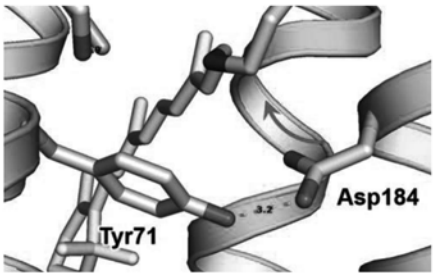


Fig. 6 View of the retinal-binding site of SzR1. The possible movement of Asp184 approaching pSB due to the Y71F mutation is shown by a pink arrow.

【参考文献】

[1] K. Inoue et al. (2020) Schizorhodopsins: A family of rhodopsins from Asgard archaea that function as light-driven inward H^+ pumps. *Sci. Adv.* 6, eaaz2441.

[2] A. Higuchi et al. (2020) Crystal structure of schizorhodopsin reveals mechanism of inward proton pumping. BioRxiv, https://doi.org/10.1101/2020.07.28.224907

[3] K. Takegoshi et al. (2001) $^{13}C-^{1}H$ dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chem. Phys. Lett.* 344, 631−637

[4] J. Herzfeld et al. (1990) Solid-state carbon-13 NMR study of tyrosine protonation in dark-adapted bacteriorhodopsin. *Biochem.*, 29, 5567-5574

[5] J.G. Hu et al., (1997) The predischarge chromophore in bacteriorhodopsin: a ^{15}N solid-state NMR study of the L photointermediate. *Biochem.,* 36, 9316-9322

[6] A.T. Petkova et al., (1999) Arginine Activity in the Proton-Motive Photocycle of Bacteriorhodopsin:Solid-State NMR Studies of the Wild-Type and D85N Proteins. *Biochem.*, 38, 1562-1572

2020年度優秀若手ポスター賞（大陽日酸賞）

P28

固体DNP-NMRによる高分子担持触媒の構造解析

○田中 真司[1]，小川 敦子[1]，中島 裕美子[1]，佐藤 一彦[1]
1産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター

DNP-enhanced solid-state NMR spectroscopy for structural characterization of polymer-supported catalysts

○Shinji Tanaka [1], Atsuko Ogawa [1], Yumiko Nakajima [1], Kazuhiko Sato [1]
1 Interdisciplinary Research Center for Catalytic Chemistry, AIST

While solution-state NMR has been widely utilized for the development of molecular catalysts, solid-state NMR has been sparsely applied for the analysis of solid-state catalysts due to low sensitivity. In recent decades, dynamic nuclear polarization (DNP) enhanced solid-state NMR spectroscopy has enabled the detailed structural characterizations of solid materials. DNP-NMR of catalyst species on inorganic supports was achieved using biradical polarizing agents, which induce a polarization transfer via cross-effect under microwave irradiation. For catalysts supported on organic polymers, however, non-porous structure prevents the effective distribution of biradical species over the sample, resulting in the insufficient signal enhancement. We have recently developed the rational guideline for DNP sample preparation from insoluble organic polymers. Herein we further studied on this guideline and demonstrated that DNP-NMR is a powerful tool for the structural characterization of catalyst species supported on organic polymer.

触媒は、均一系（分子触媒）と不均一系（固体触媒）に大別することができる。これらのうち、後者は再利用性の高さや分離・除去の容易さから実用面で好適とされている。しかし、固体触媒の分析手法は分子触媒と比較して限定されており、確かな構造解析に基づく触媒の改良が困難であった。溶液 NMR は分子触媒の開発において不可欠な分析ツールであるのに対し、固体 NMR の固体触媒への活用例は限られていた。固体触媒の活性点は試料全体の重量に対し少量であるため、一般的な固体 NMR では十分なシグナル感度を得ることができないことが一因と考えられる。近年、動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization; DNP) を利用する固体 NMR が、固体材料の高感度解析手法として注目されている [1]。DNP-NMR では、適切なラジカル化合物共存下、強力なマイクロ波照射により電子スピンから原子核への分極移動を引き起こすことで、^{1}H 核において最大で 660 倍の感度向上が見込まれる。特に、安定ビラジカル分子を偏極剤として用いる交差効果 (Cross-effect) による DNP-NMR が大きく発展を遂げており、固体担持型触媒の構造解析に応用されてきた。しかし、シリカやアルミナなどの無機物への適用例は数多いものの、架橋型ポリスチレン等の高分子担体への適用例は限られていた。高分子担体は酸塩基耐性の高さから精密有機合成で幅広く用いられる材料であり、DNP-NMR による高感度構造解析手法を確立することで更なる発展に寄与できると考えた。

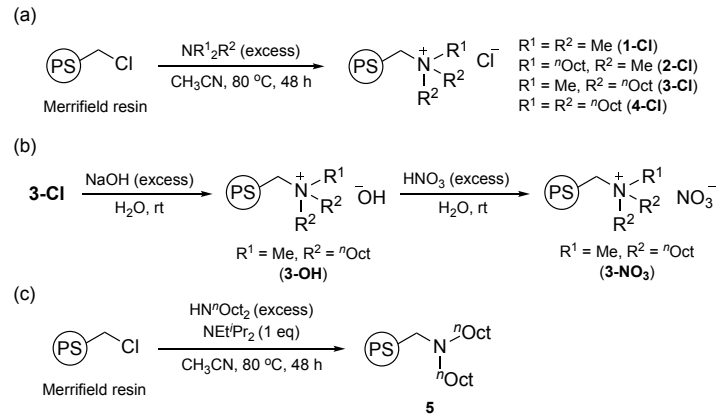
我々はこれまでに、不溶性高分子材料の DNP-NMR 測定プロトコルとして、各サンプルの有機溶媒への膨潤度からサンプル調製の最適条件を予測する方法を報告した [2]。また一方で、エポキシ樹脂原料として有用なグリシジルエステルを、アンモニウム塩触媒によるエステル交換反応で効率的に合成する手法を報告している [3]。今回、本触媒系を高分子担持型へと発展させるにあたり、

DNP-NMR、担持型触媒、高分子材料

○たなかしんじ、おがわあつこ、なかじまゆみこ、さとうかずひこ

DNP-NMR による精密構造解析が極めて有用であることを実証したので報告する。

市販のメリフィールド樹脂と三級アミンの反応から 4 種類の触媒 (**1-Cl**, **2-Cl**, **3-Cl**, **4-Cl**) を調製した (Scheme 1a)。また、**3-Cl** のアニオン交換反応により、**3-OH** と **3-NO$_3$** を調製した (Scheme 1b)。さらに、比較として三級アミン触媒 **5** を調製した (Scheme 1c)。これらの担持型触媒は、通常の固体 ^{13}C CPMAS NMR により、メリフィールド樹脂のクロロメチル基の減少とアルキル基の導入を確認できるが、シグナルの広がりと重なりから N 周りの化学的環境を明確化することは困難であった。そこで、DNP-NMR による天然存在比での ^{15}N 核観測を試みた。それぞれの触媒に対し、1,1,2,2-tetrachloroethane (TCE) と dimethyl sulfoxide (DMSO) 中での膨潤度を測定した結果、**1-Cl** は DMSO 中で良好な膨潤度を示し、**4-Cl** と **5** では TCE 中が良好であった。**2-Cl**, **3-Cl**, **3-OH**, **3-NO$_3$** は、TCE と DMSO のどちらにも良い膨潤度を示した。膨潤度測定の結果に基づき、偏極剤溶液として AMUPol/DMSO-d$_6$ と TEKPol/TCE のいずれかを選択し、DNP ^{15}N CPMAS NMR 測定を行った。結果の一部を Figure 1 に示した。**2-Cl** は第 4 級アンモニウムに由来するシグナルが 57.5 ppm に一種類観測され、**3-Cl** と **3-NO$_3$** については低磁場側にショルダーを含むシグナルがそれぞれ 62.5, 62.2 ppm に観測された。また、**3-NO$_3$** の硝酸イオンに帰属できるシグナルが 378.8 ppm に観測され、アニオン交換が良好に進行していることが裏付けられた。一方、**5** では 30~67 ppm の間に複数のシグナルが観測され、NMR 測定温度 (103 K) において複数のコンフォマーが存在することが示唆された。アルキルアンモニウム塩は塩基性条件で三級アミンへと分解し易いことが知られているが、本測定により、触媒調製が想定通りに進行していることを明確に確認できた。これらの触媒を用いたグリシジルエステル合成反応や、触媒活性種、劣化化学種の DNP-NMR 観測についても併せて報告する。



Scheme 1. Preparation of PS-supported quaternary ammonium salts and tertiary amine from Merrifield resin (a) (b) preparation of **3-OH**, **3-NO$_3$**, and **3-NO$_3$-15N** by anion exchange reaction of **3-Cl**, (c) preparation of PS-supported tertiary amine **5**.

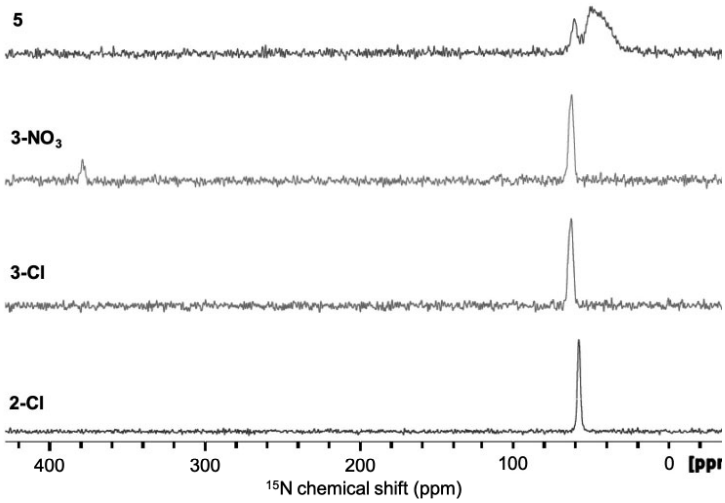


Figure 1. DNP ^{15}N CPMAS NMR of **2-Cl**, **3-Cl**, **3-NO$_3$**, and **5**.

謝辞：この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託業務 (JPNP16010) の結果得られたものです。

1. Griffin, R. G. *et al. J. Chem. Phys.* **2008**, *128*. 052211. 2. Tanaka, S. *et al. Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 3184-3190. 3. Tanaka, S. *et al. ACS Catal.* **2018**, *8*, 1097-1103.

2020年度若手ポスター賞（2社合同賞）

P58Y 分子動力学法を用いた核スピンシングレット状態の緩和時間計算

○本山　誠[1]，宮西　孝一郎[1]，根来　誠[2]，一条　直規[1]，
香川　晃徳[1,2,3]，水上　渉[2]，北川　勝浩[1,2]
1 大阪大学大学院基礎工学研究科
2 大阪大学先導的学際研究機構　量子情報・量子生命研究センター
3 JST さきがけ

Prediction of singlet lifetimes using molecular dynamics method

○Makoto Motoyama[1], Koichiro Miyanishi[1], Makoto Negoro[2], Naoki Ichijo[1], Akinori Kagawa[1,2,3], Wataru Mizukami[2], Masahiro Kitagawa[1,2].
1 Graduate School of Engineering Science, Osaka University
2 Quantum Information and Quantum Biology Center, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University
3 JST, PRESTO

Dissolution Dynamical Nuclear Polarization (DNP) has been applied for a variety of fields including chemistry, biology, and medical science. However, some of these applications are limited by the lifetime of the nuclear spin polarization. To prolong the lifetime, molecular units which have the long longitudinal relaxation time have been developed and the nuclear singlet state, which is decoherence-free against the dipolar relaxation between the spin pairs, has been studied experimentally and theoretically. Here, we predict the lifetimes of the nuclear spin polarization using molecular dynamics method (MD) and quantum chemistry simulations. To achieve precise calculations, we take the components such as intramolecular and intermolecular dipolar interaction, chemical shift anisotropy and spin rotation interaction into account. In particular, the relaxation rate of intermolecular dipolar interactions is precisely calculated using MD method for various solvents and the calculated values agree with experimental values on the same order.

【概要】

DNP によって高偏極化したサンプルを水溶液で高速に溶かして高偏極化溶液を作る溶解 DNP 技術によって、高感度な化学反応のセンシングや生体内 MRI が実現されている[1,2]。これらの応用先をさらに広げるために、長寿命な核スピン偏極を持つ物質の探索やシングレット状態を用いた核スピンの長寿命化が実験・理論の両面から研究されている。シングレット状態はシングレットスピンペア間の双極子相互作用によって緩和せず、その他の相互作用による緩和にも耐性を持つことが知られている[3]。そのためシングレット状態の緩和時間予測を行うには、分子内のその他の核スピンとの双極子相互作用(intraDD)、化学シフト異方性(CSA)、スピン回転緩和(SR)、溶媒分子との双極子相互作用(interDD)、など縦緩和時間の計算では影響の小さかった相互作用の緩和レートを高い精度で計算する必要がある[4]。これらの相互作用緩和時間の計算は、多くの場合量子化学計算で得られる溶質分子の情報を元にして行われ、interDD の効果は無視されるか簡素なモ

緩和時間計算、量子化学/分子動力学計算、シングレット状態

○もとやま まこと、みやにし こういちろう、ねごろ まこと、いちじょう なおき、
かがわ あきのり、みずかみ わたる、きたがわ まさひろ

デルで見積もられるのみであった。本研究において我々は量子化学計算だけでなく、分子動力学法を用いることで溶質分子と溶媒分子との位置関係を顕わに考慮した高精度な緩和時間計算を行った。

【理論】

核スピン緩和が時間に依存した摂動$H_1(t)$によって引き起こされる場合を考える。時間依存しないハミルトニアンH_0における相互作用系において、実験室座標系での核スピンの時間発展は下記のマスター方程式で表される。

$$\frac{d}{dt}\tilde{\rho}(t) = -\int_0^{\infty} \overline{\left[\tilde{H}_1(t),\left[\tilde{H}_1(t+\tau),\tilde{\rho}(t)\right]\right]} d\tau = \boldsymbol{\Gamma}\tilde{\rho}(t) \tag{1}$$

上線はアンサンブル平均、チルダはH_0における相互作用系、$\tilde{\rho}(t)$は時刻tにおける密度行列、$\tilde{H}_1(t)$は時刻tにおける各相互作用ハミルトニアン、$\boldsymbol{\Gamma}$ はリウヴィル形式での緩和超演算子を表す。特に、スピンペアがシングレット状態のとき、密度行列とペア間の双極子相互作用ハミルトニアンは可換であるため右辺が 0 となり、緩和しない状態となっている。(1)式を解くにあたって、下記に示すようなハミルトニアンを球面調和関数で表したものを用いる。

$$[H_1^{\Lambda}(t)]^L = c^{\Lambda} \sum_{m=-l}^{l} (-1)^m [A_{lm}^{\Lambda}(t)]^L [T_{l-m}^{\Lambda}(t)]^L \tag{2}$$

Λは相互作用の種類を表し、l は相互作用の種類によって 1 または 2 の値を取る。c^{Λ}は相互作用の種類によって決まる係数、A(t)はハミルトニアンの分子運動によって変化する部分、T はスピン演算子を含む分子運動によって変化しない部分である。[・]^{L}は座標系を実験室系にとる事を表している。(2)式を用いることで、(1)式は(3)式となる。

$$\boldsymbol{\Gamma} = -c^{\Lambda 2} \sum_{m=-l}^{l} \sum_{m'=-l'}^{l'} (-1)^m [T_{l-m}^{\Lambda}]^L \left[T_{l'm'}^{\Lambda}\right]^L \times \int_0^{\infty} G_{ll'mm'}^{\Lambda}(\tau)\, e^{-i\omega\tau} d\tau, \tag{3}$$

$$G_{ll'mm'}^{\Lambda}(\tau) = \overline{[A_{lm}^{\Lambda}(t)]^L \left[A_{l'm'}^{*\Lambda}(t+\tau)\right]^L} \tag{4}$$

緩和時間を求めるには、分子運動による相関関数$G_{ll'mm'}^{\Lambda}(\tau)$を計算する必要がある。そこで(5)式を用いて各相互作用ハミルトニアンの主軸系 P へ座標変換を行う。

$$[A_{lm}^{\Lambda}(t)]^L = \sum_{p=-l}^{l} \left[A_{lp}^{\Lambda}(t)\right]^P D_{pm}^{l}\left(\Omega_{PL}(t)\right) \tag{5}$$

$\Omega_{PL}(t)$は実験室座標と主軸座標間のオイラー角、$D_{pm}^{l}(\Omega_{PL}(t))$はウイグナーの回転行列である。(5)式を用いて(4)式を計算すると以下のようになる。

$$G_{ll'mm'}^{\Lambda}(\tau) = \sum_{p=-l}^{l} \sum_{p'=-l'}^{l'} \overline{\left[A_{lp}^{\Lambda}(t)\right]^P \left[A_{l'p'}^{*\Lambda}(t+\tau)\right]^P D_{pm}^{l}\left(\Omega_{PL}(t)\right) D_{p'm'}^{l'}\left(\Omega_{PL}(t+\tau)\right)} \tag{6}$$

更に、相関が指数関数的に減衰するという仮定とウイグナーの回転行列の直交性を用いて(6)式は以下のように変形できる。

$$G_{ll'mm'}^{\Lambda}(\tau) = \frac{\delta_{ll'}\delta_{mm'}}{2l+1} \sum_{p=-l}^{l} \left[A_{lp}^{\Lambda}(t)\right]^P \left[A_{lp}^{*\Lambda}(t)\right]^P exp\left(-\tau/\tau_l^{\Lambda}\right) \tag{7}$$

この(7)式における相関時間τ_l^{Λ}を、分子動力学法を用いて溶質分子と溶媒分子との位置関係を顕わに考慮して計算を行っていく。特に、本研究では重水、メタノール、アセトン、ジメチルスルホキシドなどのいくつかの溶媒における各分子内相互作用の相関時間τ_l^{Λ}と溶媒との双極子相互作用による相関時間$\tau_l^{interDD}$を、分子動力学法を用いて求め、緩和時間の正確な計算を行った。

【計算手法】

今回行った計算のフローチャートをFig.1(a)に示す。本研究では、量子化学計算としてGaussian16、DALTON、分子動力学法としてAmber18を用いた。初めにGaussian16を用いて計算対象分子の構造最適化を行う。汎関数及び基底関数はB3LYP/6-31G*を用いた。その構造情報からGaussian16を用いてMP2/aug-cc-pVTZで化学シフトテンソルの計算を行い、DALTONを用いてB3PW91/6-31G*でスピン回転テンソルの計算を行った。分子動力学法に関しては、力場としてleaprc.protein.ff14SB及びleaprc.gaffを用い、温度293Kでエネルギー最小化、NPT計算、NVT計算、NVE計算を順に行った。水以外の溶媒に関しては簡単のため重水素化されていないモデルを使用し、水に関してはTIP4P及びSPC/HWを使用した。(4)式に示す相関のアンサンブル平均を計算するために、相関のない複数のデータセットを準備した。具体的には、Fig.1 (b)に示すように500 psごとにNVT計算の結果を用いてNVE計算の結果を行った。得られた50個のデータセットから、(4)式に示す相関のアンサンブル平均を計算し、その結果を指数関数フィッティングすることで分子運動による相関時間τ_l^{Λ}を求めた。

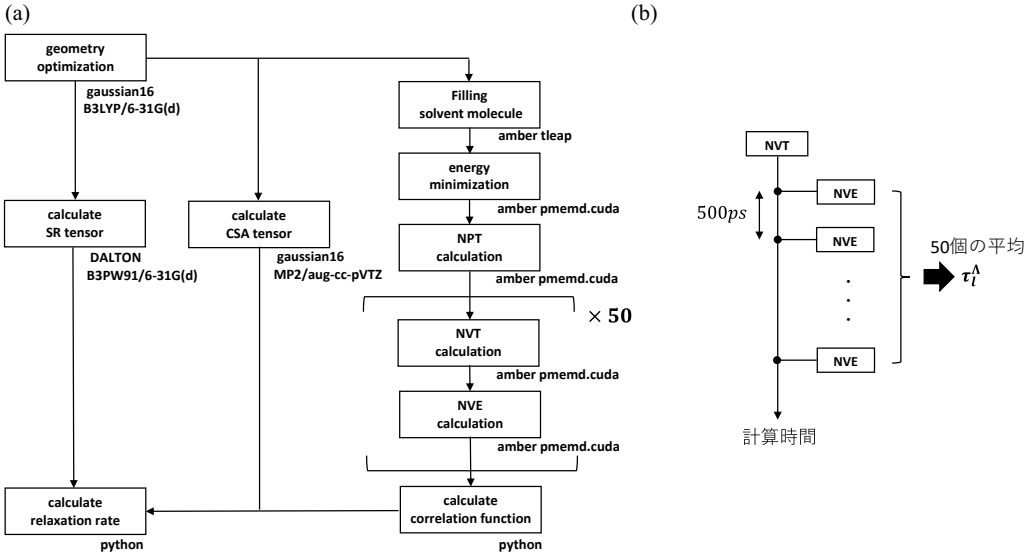


Fig.1 (a) Flowchart for relaxation time calculation. (b) Flowchart of NVT and NVE calculation for correlation time τ_l^{Λ} estimation.

【計算結果・考察】

これまでに報告されているプロトンスピンの縦緩和時間(T_1)およびシングレット状態の緩和時間(T_S)の実験結果と上記の計算手法で行ったシミュレーション結果を Table.1 に示す。本研究室で得られた 4-クロロ安息香酸(PCBA)の実験結果[5]に対しては、T_1、T_sの両方が誤差 47%以内で計算することが出来た。また、DMSO 中の 2-クロロアクリロニトリル(CAN)に関しては誤差 33%以内であった。一方、D_2O中の CAN の緩和時間は 218%の誤差となった。この原因として、CAN の様な軽い分子の運動においては、衝突する溶媒分子の質量の違いによる影響が大きくなると考えられる。そこで軽水(TIP4P)ではなく重水用のパラメータ(SPC/HW)を用いて緩和時間を計算したところ、誤差 27%まで改善することができた。また、緩和時間の溶媒依存性を調べるために、重水、メタノール、アセトン、ジメチルスルホキシドの 4 種類の溶媒で緩和時間が実測されている 3-クロロチオフェン-2-カルボン酸(Cl-TC) [8]の緩和時間を計算した。その結果、縦緩和時間は最大 20%の誤差、シングレット状態の緩和時間は最大 47%の誤差で計算することができた。Fig.2 に各溶媒における緩和レートの内訳を示す。この図からシングレット状態での緩和においては溶媒分子との双極子相互作用による影響が大きいことが分かる。

本研究では分子動力学法を用いて緩和時間の溶媒依存性を考慮することで、様々な分子に対して縦緩和時間とシングレット状態の緩和時間の推定が可能なことを示した。今後、この手法を用いた長い寿命を持つ分子の探索や、溶媒中での他の分子との相互作用を考慮した新規の計算手法の開発を行っていく予定である。

Table 1 Experimental and calculation value of relaxation time

		Exp.		Calc.	
molecule	solvent	$T_1[s]$	$T_S[s]$	$T_1[s]$	$T_S[s]$
PCBA	D2O(TIP4P)	5.3[5]	15[5]	6.7(+26%)	22(+47%)
CAN	DMSO	7.75[6]	141[6]	5.20(-33%)	187(+33%)
CAN	D2O(TIP4P)	—	109[7]	16.7	347(+218%)
CAN	D2O(SPC/HW)	—	109[7]	6.0	138(+27%)
Cl-TC	Methanol	32.8[8]	236[8]	29.5(-10%)	348(+47%)
Cl-TC	Acetone	47.0[8]	183[8]	44.4(-6%)	262(+43%)
Cl-TC	DMSO	11.9[8]	134[8]	10.2(-14%)	117(-13%)
Cl-TC	D2O(TIP4P)	18.2[8]	132[8]	14.5(-20%)	75.4(-43%)

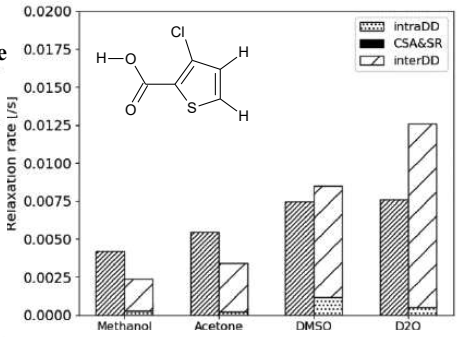


Fig.2 The individual contributions of relaxation rate for Cl-TC in each solvent.

本研究は、戦略的創造研究推進機構（CREST）、科学技術振興機構（JST）の支援を受けて行われた。

References

[1] Buratto, Roberto, *et al.* ChemMedChem **9** (2014): 2509-2515.
[2] Golman, Klaes, and Mikkel Thaning. Proc Natl Acad Sci USA **103** (2006): 11270-11275.
[3] Levitt, Malcolm H. Annu Rev Phys Chem **63** (2012): 89-105.
[4] Pileio, G. Long-lived Nuclear Spin Order. The Royal Society of Chemistry (2020).
[5] Miyanishi, Koichiro, *et al.* Quantum Sci. Technol. **5** (2020): 025004.
[6] Carravetta, Marina, and Malcolm H. Levitt. J. Am. Chem. Soc. **126** (2004): 6228-6229.
[7] Pileio, G. J. Chem. Phys.**134** (2011): 214505.
[8] Kiryutin, Alexey S, *et al.* ChemPhysChem **20** (2019): 766-772.

2020年度若手ポスター賞（2社合同賞）

P42Y Rapid Scan Nuclear Quadrupole Resonance

○日部　雄太[1]，野田　泰斗[1]，竹腰　清乃理[1]，武田　和行[1]
1 京都大学大学院理学研究科 化学専攻

Rapid Scan Nuclear Quadrupole Resonance

○Yuta Hibe[1], Yasuto Noda[1], K. Takegoshi[1], Kazuyuki Takeda[1]
[1] *Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University*

Nuclear quadrupole resonance (NQR) provides information as to the electronic structure in materials of chemical interest through the electric field gradient tensor at a nuclear spin with its spin quantum number greater than 1/2. A major challenge in NQR is finding unknown resonance frequencies, which often distribute over a wide range. Towards time-efficient survey of NQR signals, we bring in this study rapid scan and frequency-comb excitation together, so that the frequency range over the probe bandwidth is scanned in a single run of the sequence. The gaps arising during excitation as a result of comb modulation can serve as windows for data sampling. This approach offers much more efficient protocol compared to traditional frequency stepping approaches.

［序論］

核四極子共鳴(NQR)はゼロ磁場下で固体物質中の$I > 1/2$の原子核(四極子核)において、四極子相互作用によるエネルギー分裂に対応する共鳴周波数から電場勾配に関する情報を取得する手法である。四極子核を持つ元素は周期表の約7割を占め、多くの重要物質に含まれている。NQRは強くて均一かつ安定な磁場を必要とせず、四極子核周りの電子状態に関する有用な情報が得られる。

しかし、NQRにおいて未知の共鳴周波数を探索することは難しい。Interleaved subspectrum sampling (ISS)[1]法を用いて、緩和による磁化回復の時間中に他の領域を捜査して効率的に信号を探索することもできるが、それでも照射周波数を次々と変えながら実験を行う必要がある。

本研究で我々は、プローブの共振帯域内における共鳴条件の有無を一度の実験で判別することを可能にする効率的なNQR信号の探査手法を提案する。以下に詳述するこの手法のポイントは、SWIFT MRI[2]法に用いられているhyperbolic secant (HS) pulse[3]によるラピッドスキャン励起と、励起帯域の拡張のための周波数コム[4]を組み合わせること、および周波数コム生成のために時間領域に生じるパルス間のギャップを活用してデータ取得を行うことにある。

［手法］

コム変調HSパルス

周波数掃引幅がΔFの$1/n$(nは整数)で与えられるHSパルス$g_1(t)$は任意の実数μと$\beta = (1/2\mu)(\Delta F/n)$を用いて

$$g_1(t) = \omega_{\max}[\mathrm{sech}(\beta t)]^{1-i\mu} \quad (1)$$

で与えられ、振幅$\omega_1(t)$および変調周波数$\Delta\omega(t)$はそれぞれ

$$\omega_1(t) = \omega_{\max}\,\mathrm{sech}(\beta t), \quad \Delta\omega(t) = \mu\beta\tanh(\beta t) \quad (2)$$

Nuclear Quadrupole Resonance (NQR), Rapid Scan NQR, 周波数掃引

○ひべ　ゆうた、のだ　やすと、たけごし　きよのり、たけだ　かずゆき

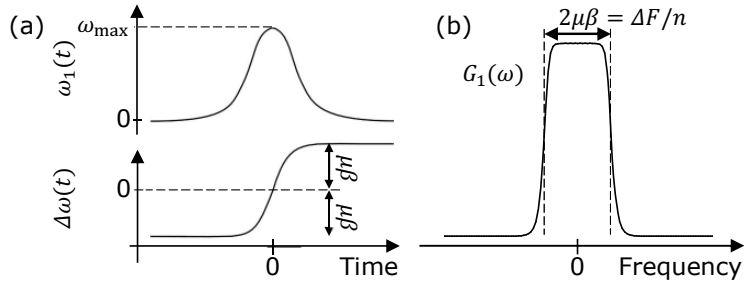


Fig. 1 (a) The profile of the amplitude $\omega_1(t)$ and frequency $\Delta\omega_1(t)$ of a HS pulse $g_1(t)$. (b) Fourier transformation $G_1(\omega)$ of $g_1(t)$.

で表される[3](Fig. 1 a)。例として$\mu = 5$の場合に$g_1(t)$をフーリエ変換して得られる励起関数$G_1(\omega)$をFig. 1bに示す。周波数の掃引を断熱条件が破れる程度に速く行うことで、ラピッドスキャンによる磁化の励起が可能となる。

HSパルス$g_1(t)$を周期Tのコム関数$\delta_T(t) = \sum_{k=-\infty}^{\infty}\delta(t-kT)$で変調して得られるパルス$g_2(t) = \delta_T(t)\cdot g_1(t)$の励起関数$G_2(t)$は、積のフーリエ変換がそれぞれのフーリエ変換の合成積であることを用いて

$$G_2(t) = \delta_{2\pi/T}(\omega) * G_1(\omega) \tag{3}$$

で表される。$2\pi/T = \Delta F/n$となるようにTを選べば、$G_1(\omega)$が周期的に複製されて周波数領域をくまなくカバーする励起関数となる(Fig. 2左)。実際は、δ関数の代わりに有限の幅t_pをもつ励起を行うことになる。この時の変調関数は幅t_pの矩形関数$\sqcap\left(t/t_\mathrm{p}\right)$を用いて$\sqcap\left(t/t_\mathrm{p}\right) * \delta_T(t)$と表され、励起パルス$g_3(t)$および励起関数$G_3(t)$は

$$g_3(t) = \left[\sqcap\left(t/t_\mathrm{p}\right) * \delta_T(t)\right]\cdot g_1(t) \tag{4}$$

$$G_3(\omega) = \left[\mathrm{sinc}\left(\omega t_\mathrm{p}/2\right)\cdot\delta_{2\pi/T}(\omega)\right] * G_1(\omega) \tag{5}$$

となる(Fig. 2右)。このようにコム変調を用いて、ラピッドスキャン励起を$\Delta F/n$おきに同時に行い、共振回路の全帯域を励起することができる。

Coarse survey

コム変調を行うことにより生じる送信器の出力がオフの期間を、ラピッドスキャンのデータサンプリングに用いることができる。その帯域幅は$1/T = \Delta F/n$であるため、周波数領域で信号は折り返して見える。結果として、プローブの帯域幅ΔFにおける共鳴の有無を判別することができる。信号が検出された場合にのみ、次に述べるfine surveyによって共鳴周波数を決定する実験を行えばよい。

Fine survey

周波数コムHSパルスによって出来た横磁化を利用する。得られたラピッドスキャン信号の最も大きい部分を横磁化が最大であると仮定し、その部分で周波数コムHSパルスを打ち切

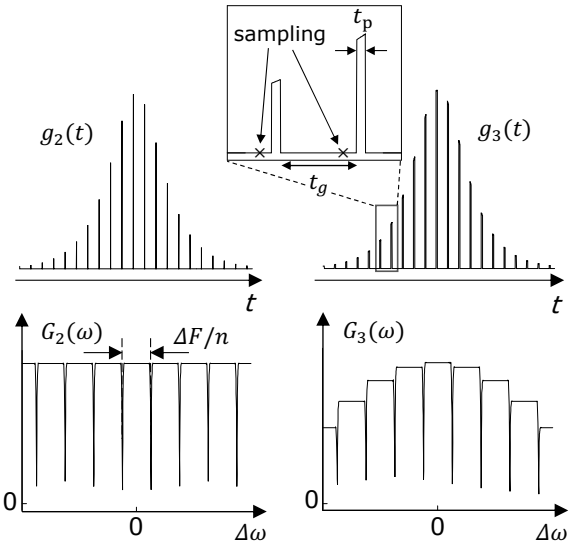


Fig. 2 (left) The profiles of $g_2(t)$ and $G_2(\omega)$. (right) The profiles of $g_3(t)$ and $G_3(\omega)$. The inset shows timings of data sampling.

り、直後にFID信号を取り込む。その際のサンプリング間隔を$1/\Delta F$以下にすれば信号の折り返しはなくなる。したがって共鳴周波数を決定することができる。

プローブの帯域幅を超える周波数帯を探索したい場合にも、上記の手法を利用することが可能である。興味のある周波数帯をプローブの帯域幅程度の大きさの部分に区切り、プローブのチューニングを合わせて順番にcoarse surveyを行う。ラピッドスキャン信号が現れたら、fine surveyに切り替えてFIDを取得してフーリエ変換を行えば共鳴周波数を決定できる。

［実験条件］

本手法を用いたNQR周波数の探索法を実証するために、塩素酸カリウム($KClO_3$)の^{35}Cl、酸化銅(I)(Cu_2O)の^{63}Cuと^{65}Cuを対象としたNQR実験を行った。これらの核のスピン量子数はいずれも3/2であり、77 Kでそれぞれ単一の周波数28.953 MHz[5]、26.704 MHz[6]、24.714 MHz[6]で共鳴することが知られている。また測定のために、直径12 mm、長さ12 mm、5.5巻きのコイルを用いて、23.08–32.37 MHzでインピーダンス整合が取れるプローブを自作した。プローブの帯域幅は24–27 MHzにおいては約400 kHz、28.9 MHzにおいては約500 kHzであった。

Coarse surveyでは、掃引周波数が50 kHzのHS関数に周期$T = 20$ μs、パルス幅$t_\mathrm{p} = 2$ μs、ギャップ$t_\mathrm{g} = 18$ μsのコム変調を適用した励起を行い、500点のデータサンプリングを行った。また、fine surveyにおいては、サンプリング間隔を1 μs、サンプリング点数を2048とした。積算間の待ち時間は1秒に設定した。すべての実験は試料とプローブを液体窒素に入れて温度77 Kで行った。

［結果・考察］

$KClO_3$の^{35}Cl NQRについて、周波数掃引中心の共鳴周波数からのオフセットが0、50 kHzだった時のラピッドスキャン信号をFig. 3 (a), (b)に示す。オフセット50 kHzの信号は、折り返しによりオフセット0の信号と同様のふるまいを示した。次に同じシーケンスを途中まで実行して、ラピッドスキャン信号が最大になった時間(Fig. 3 (a), (b)破線)で励起を打ち切り、十分短いサンプリング間隔でFIDを取得した。Fig. 3 (c), (d)に示すように、共鳴周波数を正しく反映したFID信号が得られた。

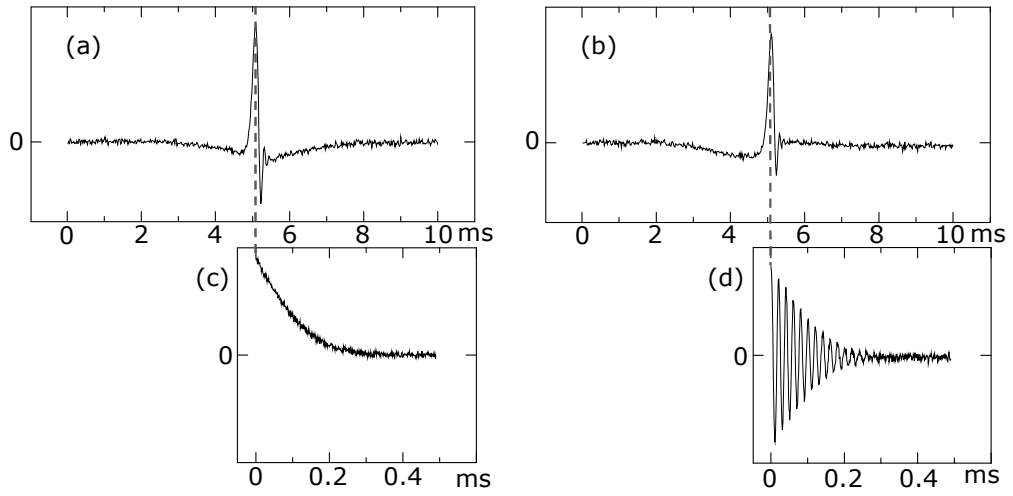


Fig. 3 Rapid scan ^{35}Cl NQR signals with frequency offsets of (a) 0 kHz and (b) 50 kHz obtained in the coarse survey mode by acquiring the signal during the gaps of the comb-modulated HS excitation. (c, d) Corresponding FID signals obtained in the fine survey mode by aborting rapid scan at $t = 5.1$ ms (dash line) and then immediately starting acquisition with a dwell time of 1 μs.

次に、共鳴周波数からの掃引中心のオフセットを、0、±10、±50、±100、±150、±200 kHzに設定し、同様の測定を行ってフーリエ変換した結果をFig. 4に重ねて示す。Fig. 2右に示した励起関数に対応した強度で信号が観測された。これより、共鳴周波数が帯域幅内にあれば、スピンを励起して共鳴周波数を決定できることが示された。

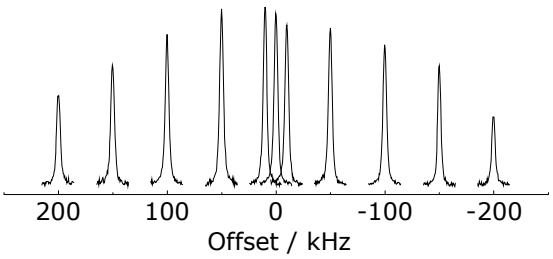


Fig. 4 ^{35}Cl NQR spectra of $KClO_3$ obtained with frequency offsets of 0, ±10, ±50, ±100, ±150, ±200 kHz.

Cu_2Oの^{63}Cuおよび^{65}Cu NQRにおいては、24-27 MHzの帯域で信号の探索を行った。プローブの帯域幅が400 kHzであったため、プローブのインピーダンスマッチングと周波数掃引の中心を24.2+0.4m MHz (m=0,1,…,7)に合わせ、それぞれについてcoarse surveyを行った結果、m=1,6の帯域で信号が検出された。次にそれ以外の帯域における探索は打ち切って、m=1,6の場合についてfine surveyを行った。得られたFIDをフーリエ変換して得られたNQRスペクトルをFig. 5に示す。得られた２つの共鳴周波数は26.706 MHzと24.713 MHzであり、信号の強度比は2:1であった。^{63}Cuと^{65}Cuの天然存在比が69.17%と30.83%であり、四極子モーメントが−22.0 fm^{2}と−20.4 fm^{2}である[7]ことから、前者を^{63}Cu、後者を^{65}Cuと帰属した。

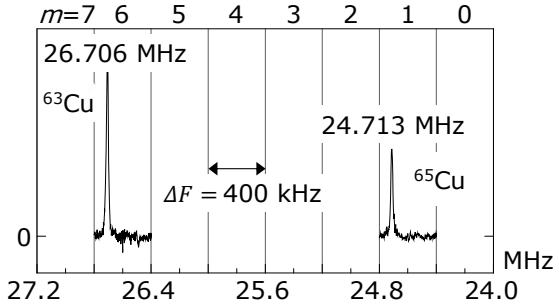


Fig. 5 ^{63}Cu and ^{65}Cu NQR spectra of Cu_2O obtained by proposed method.

［結論］

本研究において我々は、周波数コムを組み合わせたHS pulseをNQR周波数の探索に用いることで、プローブの帯域幅内に存在するNQR周波数を正確に決定し、さらに広範囲に複数の共鳴周波数が存在しても、少ない探索回数で共鳴周波数を決定できることを実証した。この手法をNQR周波数が未知の物質に対して適用することで、周波数探索の時間を大幅に短縮し、物質の局所構造や物性を知る手法としてNQRがより広く用いられるようになることが期待される。

［謝辞］

本研究は、JSPS科研費(18H01941)の助成を受けて行われた。

References

[1] H. Scharfetter, M. Bödenler and D Narnhofer, *J. Magn. Reson.* 286 (2018), 148–157.
[2] D. Idiyatullin, C. Corum, J. Y. Park and M. Garwood, *J. Magn. Reson.* 181 (2006), 342–349.
[3] M. S. Silver, R. I. Joseph and D. I. Hoult, *Phys. Rev. A* 31 (1985), 2753–2755.
[4] A. M. Waeber *et al.*, *Nat. Phys.* 12 (2016), 688–963.
[5] T. Kushida, G. B. Benedek and N. Bloembergen, *Phys. Rev.* 104 (1956), 1364–1377.
[6] H. W. Wijn and J. L. Wildt, *Phys. Rev.* 150 (1966), 200–201.
[7] R. K. Harris *et al.*, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001), 1795–1818.

2020年度若手ポスター賞（2社合同賞）

P52Y Adiabatic Pulseを用いた溶媒信号抑制パルスの開発および固体NMR測定への応用

松永　達弥[1]，○岡部　遼太郎[2]、石井　佳誉[1, 2]
1理化学研究所放射光科学研究センターNMR研究開発部門
2東京工業大学生命理工学院

Development of solvent suppression pulse with adiabatic pulse and application for biological solid-state NMR experiments

Tatsuya Matsunaga [1], ○Ryotaro Okabe[2], Yoshitaka Ishii[1,2]
1 NMR Science and Development Division, RSC, RIKEN
2 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

^{1}H-detecting solid-state NMR (SSNMR) has become prevalent for ultrafast magic-angle spinning (UFMAS) with 60 kHz or faster sample spinning. In UFMAS, ^{1}H signal of solvent molecules can be an obstacle to 1H NMR analysis of protein. Currently, a series of saturation pulses is irradiated before magnetization transfer for ^{1}H detection to suppress solvent signal. However, effect of the conventional solvent suppression method is inadequate because of strong dependency on factors such as RF frequency. In this research, we developed a new method for solvent suppression of SSNMR experiment with adiabatic pulse. The new solvent suppression shows robustness against chemical shift difference. It enables us to achieve suppressing ^{1}H signal of multiple solvents at one time. We demonstrated the new solvent suppression though calculation and ^{1}H MAS NMR measurement. Furthermore, we worked on application of the new method to acquire high-resolution signal from biological sample.

【Background of the Research】

試料回転速度が60 kHzを超えるultrafast Magic Angle Spinning (UFMAS)は低磁気回転比核（^{13}C, ^{15}N）スペクトルだけでなく、^{1}Hスペクトルの高分解能化が可能である。UFMAS下の高分解能^{1}H NMRは生体分子の解析など幅広く応用されている。しかし、高分解能^{1}H NMRには、必要な信号に加えて不要な信号も検出されてしまうという問題がある。タンパク質をはじめとした固体生体分子サンプルの精製や保管の際使用される水や有機溶媒がその一例である。この溶媒分子に由来する^{1}H信号はタンパク質の^{1}H NMR測定を行う際に障害となってしまう。したがって、固体NMRにおいて溶媒の^{1}H信号を抑制する手法が重要である。

タンパク質の^{1}H固体NMR測定で溶媒信号を抑制する際には、溶液NMRで使用されるsuppression pulseを照射する手法が採用されている。従来の手法では一定強度のパルス磁場をかけ続けるcontinuous wave (CW)照射や、2種類のCWを組み合わせたMISSISSIPPI[1]がsuppression pulseとして用いられてきた。溶液NMRではこれらの既存のパルス系列にグラジエントコイルによる傾斜磁場を組み合わせる事で信号減衰を速めている。しかし、固体NMR装置ではグラジエントコイルが使えないため、溶媒NMRに比べて信号減衰の効率が悪い。一般的に固体試料の磁化緩和速度が溶液試料のものと比べて速いことも、溶媒信号の抑制を妨げる要因となりえる。また、強力なパルスを長い時間照射することでRFコイルに対する負担が大きくなるため、できる限りsolvent suppression pulseの照射時間と強度を抑えることが望ましい。

solid-state NMR, protein analysis, solvent suppression

まつなが　たつや、○おかべ　りょうたろう、いしい　よしたか

昨年度の本討論会で、固体NMRのための溶媒信号抑制手法としてSuppression of Liquid with Adiabatic Pulse (SLAP)の開発を報告した。本発表では既存手法との比較を通して固体NMR測定における溶媒信号抑制の新手法の有効性を検証する。従来手法の問題点の多くはパルスの組み合わせから生じるRF 不均一性による磁化のリフォーカスと、最適な照射オフセット周波数が異なる溶媒の^{1}Hごとに受ける有効磁場のばらつきにあると考えられる。SLAPはadiabatic pulse[2] (Fig.1)を用いることにより、既存の手法よりもRF inhomogeneityによる磁化のリフォーカスが起こりにくいようなパルス系列となっている。また、adiabatic pulseはCW pulseに比べてoffset周波数の影響を受けにくく、複数種類の溶媒が存在する場合でも安定した信号抑制効果が見込まれる。

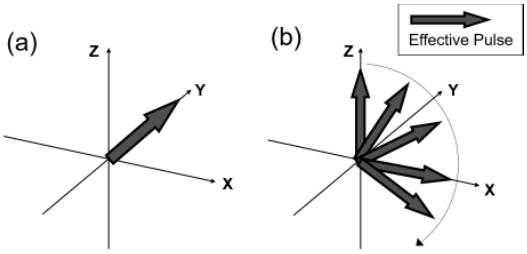


Fig.1. Schematic of CW pulse (a) and adiabatic pulse (b) to rotate magnetization around y axis.

【Methods and Results】

1. Solvent suppression pulse照射に際した磁化の強度変化のシミュレーション

RF 不均一性の存在下での磁化の減衰効果を検証するため、suppression pulseによる磁化減衰のシミュレーションを行った。パルス照射時間に対する磁化の強度変化を数値計算により求めた。これにより、solvent suppression pulseを照射した際の溶媒の^{1}H磁化の挙動を追跡した。既存手法であるMISSISSIPPIを用いた際にはパルス照射位相を切り替える操作により周期的に磁化のリフォーカスが起こることが確認された。一方で、適切な条件のもとでSLAPを用いた場合には溶媒の^{1}H磁化をより効果的に分散させることで可能であり、溶媒由来の^{1}H信号の抑制に寄与することが確認された。磁化の緩和の効果を無視した条件でSLAPが溶媒^{1}H磁化を減衰する効果を計算で示すことにより、実際の^{1}H MAS NMR実験でもSLAPが優位に機能するということを裏付けることができた。

2. タンパク質サンプルの固体NMR測定による新規solvent suppression pulseの評価

60-70 kHzのUFMAS条件下でタンパク質のサンプルに対して^{1}H検出 ^{1}H-^{13}C 相関固体NMRスペクトルを取得し、各種suppression pulseによる溶媒信号を抑制する効果を比較した。Suppression pulseの効果が弱い場合には、タンパク質サンプルに含まれるH_2Oや有機溶媒のMethyl ^{1}H由来の信号が消えずにスペクトルに現れた。一方で新規手法によるsolvent suppressionが機能する場合には、長くて強力なパルスを照射しなくてもスペクトル中の溶媒の信号は効果的に抑えられていることが確認できた。

新しいsolvent suppression pulseの照射条件を最適化することにより、生体分子の多次元NMR測定に対する応用範囲の拡大を試みた。固体NMR測定に際して感度が低いため溶媒やバックグラウンド由来の^{1}H信号を排除が困難で^{1}H観測での信号の解析が難しいタンパク質由来のサンプルから必要なデータを効率よく取得する方法を検討した。

参考文献

[1] Zhiheng Yu et al., “NIH Public Access” 377, no. 2 (2009): 364–77

[2] J Baum, R. Tycko, and A. Pines, “Broadband Adiabatic,” Physical Review A 32, no. 6 (1985): 3435–47.

2020年度若手ポスター賞（2社合同賞）

P14Y 光受容タンパク質ＧＡＦドメインにおける発色団のプロトン化状態の解析

○小泉太貴[1]，会津貴大[1]，宮ノ入洋平[2]，伊藤隆[1]，広瀬侑[3]，三島正規[1]
[1]東京都立大学大学院 理学研究科
[2]大阪大学　蛋白質研究所
[3]豊橋技術科学大学大学院　工学研究科

Analysis of protonation state of chromophore in GAF domain of photoreceptor protein

○Taiki Koizumi[1], Takahiro Aizu[1], Yohei Miyanoiri[2], Yutaka Ito[1], Yuu Hirose[3], Masaki Mishima[1]
[1]*Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University*
[2] *Institute for protein research, Osaka University*
[3] *Department of Environmental and Life Sciences, Toyohashi University of Technology*

A cyanobacterium synthesizes a photosynthetic pigment which absorbs red light under red-light condition. Conversely, under green-light condition, a photosynthetic pigment which absorbs green light is synthesized. This phenomenon is called “complementary chromatic acclimation”. RcaE protein, a photosensor protein, plays a central role phosphorylating transcriptional factors in a wavelength dependent manner. To elucidate the molecular mechanism of the structural change due to light absorption of RcaE, we are working on NMR structural analysis and X-ray crystallography of RcaE red light absorption form (Pr) and green light absorption form (Pg). We would like to discuss the findings obtained regarding the three-dimensional structure and the protonation state of the chromophore.

<序論>

ある種のシアノバクテリアは，効率よく光を受容するために，赤色光下では，赤色光を吸収し，逆に緑色光下では，緑色光を吸収する光合成色素を合成する。この現象は，補色順化と呼ばれ，光受容タンパク質であるRcaEタンパク質が，転写調節タンパク質を波長依存的にリン酸化することで制御されている。RcaEは705アミノ酸残基からなるマルチドメインタンパク質であり，色素結合GAFドメインやC末端にはヒスチジンキナーゼドメインを持つ(Fig.1)。また，RcaEは光吸収を担うGAFドメインのシステイン残基がテトラピロール発色団の１つであるフィコシアノビリン(PCB)とチオエーテル結合で結合しており(Fig.1)，赤色光/緑色光をそれぞれ吸収することでPCBのピロール環の１つに*cis-trans*異性化（*EZ*異性化）を引き起こし(Fig.2)，RcaE全体に対しても構造変化を及ぼすと考えられている[1]。また，RcaEタンパク質は他のCBCR（シアノバクテリオクロム）や植物のフィトクロムとは異なり，発色団であるPCBとタンパク質の相互作用におけるプロトン化・脱プロトン化が光吸収メカニズムに関与することが示唆されている（Fig.3）。そこで，私たちは未だ解明されていないプロトン化・脱プロトン化による光吸収メカニズムの解明を目的とし，赤色光吸収型（Pr）と緑色光吸収型（Pg）に対して溶液NMRを用いた解析や，X線結晶構造解析を行っている。そこで，立体構造と発色団のプロトン化状態について得られた知見について議論したい。

光受容タンパク質，構造解析，溶液NMR

○こいずみ たいき，あいづ たかひろ，みやのいり ようへい，いとう ゆたか，ひろせ ゆう，みしま まさき

<実験>

・溶液NMRによるRcaEタンパク質の解析

大腸菌の発現系を用いて安定同位体標識したRcaE GAFドメインとPCBの共発現，精製を行い，赤色光照射下，緑色光照射下において，以下の一連の測定から蛋白質側の帰属を行った。2D ^{1}H ^{15}N HSQC，3D-HNCACB，3D CBCA(CO)NH，3D HN(CA)CO，3D HNCO，3D C(CO)NH，3D H(CCO)NH，4D HC(CO)NH，2D CT ^{13}C HSQC，3D ^{13}C edited NOESY，3D ^{15}N edited NOESY, 3D HNHB，3D HN(CA)HB，3D HCGCBCO， 2D CGCBCO。

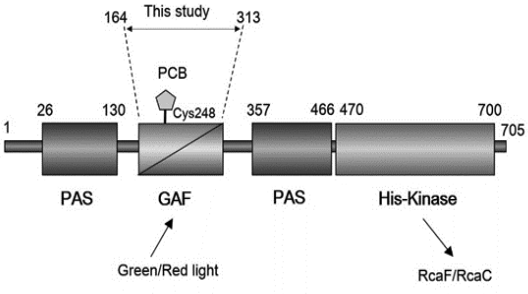


Fig.1 Domain organization of RcaE

・X線結晶構造解析によるRcaEタンパク質の立体構造解析

発色団であるPCBとRcaEタンパク質の立体構造情報の取得を目的にX線結晶構造解析に取り組んだ。大腸菌の発現系を用いてRcaE GAFドメインとPCBの共発現，精製を行い，サンプルを調製した。赤色光、緑色光を照射し、それぞれ暗所下で結晶化のスクリーニング実験を行い，Pr条件で結晶を得た。

・発色団PCBとRcaEタンパク質のプロトン化・脱プロトン化メカニズムの解明

発色団であるPCBとの相互作用やPCBの構造を調べるため，PCBの前駆体である^{13}C,^{15}N標識の5-aminolevulinic acidを培地に添加することで,PCB選択的標識（タンパク質側が非標識）の試料を得た。発色団であるPCBの側面からプロトン化・脱プロトン化メカニズムを解明するため，赤色光吸収型においてpHタイトレーションを行い，それぞれのpHにおいて1D ^{15}Nスペクトルを測定した。^{13}C,^{15}N標識PCBの^{15}Nの1D測定はクライオBBFOを用いて行った。

次に，RcaEタンパク質の側面からプロトン化・脱プロトン化のメカニズムを解明するために，グルタミン酸217(Glu217)に着目し，研究に取り組んだ。グルタミン酸217は緑色光吸収型（Pg）において側鎖が「COOH」の中性状態で存在していると考えられる（Fig.2）。帰属を確定するために，グルタミン酸217の変異体作成と共に，Glu217を残し，他のグルタミン酸を変異させた変異体の作成に取り組んだ。その際，電荷を持った状態を保つため，アスパラギン酸への変異体作成を行った。また，E217側鎖カルボキシル基のp*K*aを決定するために， pHタイトレーションを行った。カルボキシの観測には,クライオDCHプローブとTCIプローブを用いて^{13}C直接観測のCGCBCO測定を行った。通常のプロトン励起・プロトン観測よりも,構造的な揺らぎ等で引き起こされる交換による信号の減衰の影響が少ない点で有効な測定法であると考えている。また^{13}COの直接観測であるため，^{13}Caliphaticに対する同種核デカップリングを導入することで, 分裂のない信号として分離の良い観測を行った。

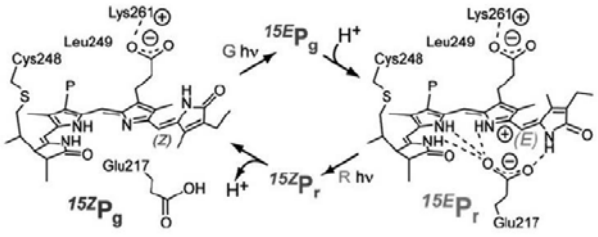


Fig.2 Conformational changes of PCB by light irradiation.

Proposed mechanism of photochromic photocycle deduced from the biochemical assay and homology model [1].

<結果>

・溶液NMRによるRcaEタンパク質の立体構造解析

赤色光吸収型，緑色光吸収型それぞれにおいて，ピークの分離の良い2D-^{1}H ^{15}N HSQC スペクトルを得ることに成功した(Fig.4)。緑色光吸収型において主鎖の帰属を行い，約98%のアミノ酸残基の帰属に成功した。また，側鎖の帰属を行い，約95%の側鎖シグナルの帰属に成功した。解析によって得られた距離情報，角度情報を利用し構造計算を行った。その結果，RcaEタンパク質の立体構造を取得することに成功した。また，赤色光吸収型においても主鎖の帰属を行い，約96%のアミノ酸残基の帰属に成功した。また，側鎖の帰属を行い，約96%の側鎖シグナルの帰属に成功した。また,PCB選択標識のサンプルで^{1}H-^{15}N HSQCを測定した結果,それぞれ１つの信号が観測された(Fig.5)。

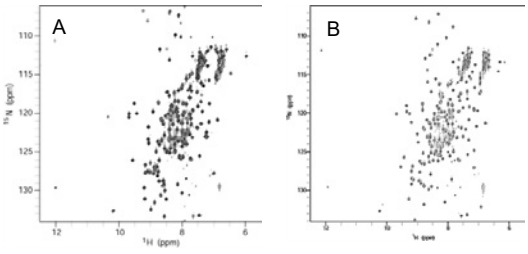


Fig.4 ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of RcaE GAF

A : RcaE GAF in Pr state B : RcaE_GAF Pg in state

0.45 mM RcaE dissolved in 50 mM K-phosphate (pH 6.9), 50 mM KCl was measured at 303K.

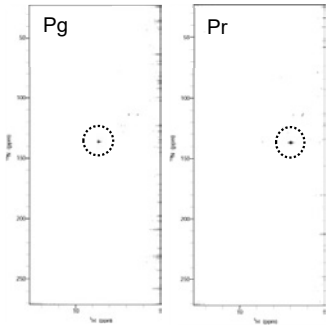


Fig.5 ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of RcaE GAF (^{13}C,^{15}N PCB selectively labeled sample)

Both states have one N-H signal of PCB marked with dotted circle.

・X線結晶構造解析によるRcaEタンパク質の立体構造解析

赤色光吸収型（Pr），1.67Åの高分解能の結晶構造解析から，PCBのコンフォメーションを議論するのに十分な原子モデルが得られた。RcaEタンパク質のPCBではC15-C16の二重結合がE型であったが，C15でsyn型であり，全体的にコンパクトな点が特徴的である (Fig. 6)。しかし，緑色光吸収型（Pg）においては結晶を取得することが出来ず，構造情報を取得することが未だ出来ていない。

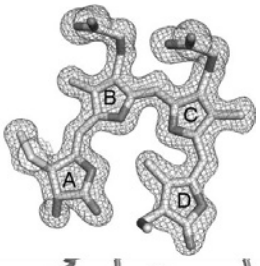


Fig.6 Electron density map of PCB

Clear map provided *E* configuration and *syn* conformation around C15=C16.

・発色団であるPCBとRcaEタンパク質のプロトン化・脱プロトン化メカニズムの解明

PCBを選択的に^{13}C,^{15}Nでラベルしたサンプルを用いて，^{1}H-^{15}N HSQCを測定した結果，赤色光吸収型，緑色光吸収型のそれぞれにおいて，一つのN-Hシグナルのみが観測された(Fig.5)。このシグナルは化学シフト[2)]からD環由来と考えている。

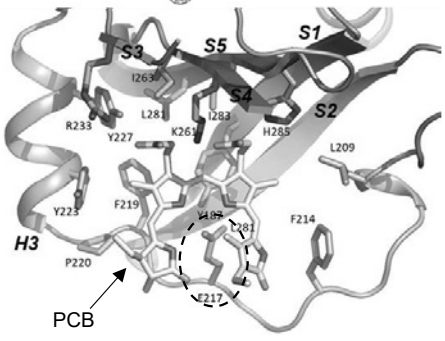


Fig.7 Interaction site between RcaE and PCB.

The side chain carboxyl group of Glu217 forms a hydrogen bond with NH of PCB. Glu217 is shown in a dotted circle.

1D-^{15}Nスペクトルを測定し， pH7.5の赤色光吸収型(Fig.8A)と緑色光吸収型 (Fig.8B)のスペクトルを比較した結果、緑色光吸収型 (Fig.8B)にのみ,260 ppm付近にPCBのB環由来と考えられる脱プロトン化した状態（N=C）の信号を取得することに成功した。そこで，pH10の強制的に脱プロトン化した状態の赤色光吸収型において緑色光吸収型 (Fig.8B)と同様のスペクトルを観測することに成功し（Fig.8C），プロトン化・脱プロトン化の光吸収メカニズムへの寄与を直接的に取得することに成功した。

また、側鎖が電荷を失った「COOH」形で存在すると示唆されるGlu217のp*K*aを決定する為に，^{13}C detection CGCBCO (^{13}Caliphatic decoupling[3])を用いた。また、3D C(CO)NH, 3D/4D HC(CO)NH, 3D HCGCBCOから、グルタミン酸側鎖の帰属を行った（Fig.9）。

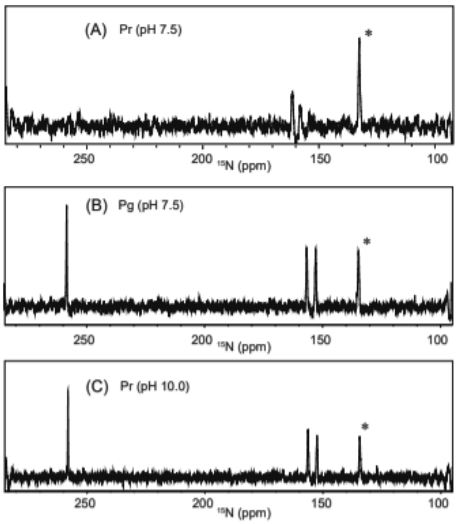


Fig.8 1D^{15}N spectra of RcaE GAF (^{13}C,^{15}N labeled PCB)

The amide signals around 130-160 ppm correspond to NH moiety, and the signal around 260 ppm corresponds deprotonated -N=C- moiety.

<展望>

今後は，赤色光照射下における緑色光吸収型（Pg）においてもRcaEのGAFドメイン，PCBの構造を明らかにする必要がある。緑色光吸収型は極めて溶解度高く,結晶性を高めることが結晶化に重要と思われる。そこで，結晶化を促進するMBPタグを新たに導入した発現系の構築を行い，結晶構造の取得に取り組む予定である。

また，赤色光吸収型のpH 10において観測されたB環由来と考えられるシグナルの帰属を確定させるため，PCBの部位特異的なラベル体を用いて測定を行いたい。また，結晶構造によって示唆されたRcaEとPCB間の水素結合の直接観測も試みる。

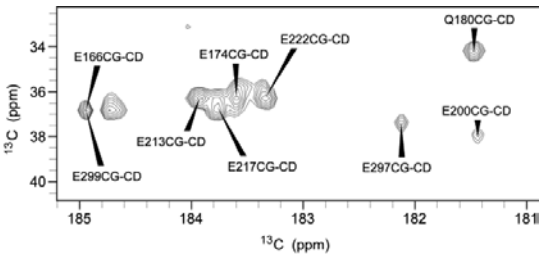


Fig.9 Assignments of CO side chain of the glutamic acids.

A selected region of ^{13}Caliphatic-decoupled ^{13}C-detection CGCBCO.

<参考文献>

1) Hirose, Y et al., *PNAS* (2013), 110, 13
2) Rockwell, N et al., *Biochemistry* (2015) 54, 2581 3) Ying. J et al., *J Magn Reson*. (2014) 241: 97.

<謝辞>

^{13}C同種核デカップリングの導入はBrukerの金場哲平博士にアドバイスを頂きました。本研究におけるNMR測定の一部は，文部科学省先端研究基盤教養促進事業「NMR 共用プラットフォーム」(理研横浜)を利用しました。また，発色団であるPCBの1D -^{15}Nの測定に関しては大阪大学蛋白質研究所の「NMR共同利用研究課題」を利用しました。RacEタンパク質の結晶構造取得に関しては，名古屋大学シンクロトロン光研究センター シンクロトロン光利用研究部門の永江峰幸助教にご協力いただきました。

2020年度若手ポスター賞（2社合同賞）

P38Y

piRNAの生成に関与するRNA elementの二次構造解析

○高瀬 直美[1]，石津 大嗣[2,3]，平形 樹生[2]，塩見 美喜子[2]，河合 剛太[1]
[1]千葉工業大学，[2]東京大学，[3]慶応義塾大学

Secondary structure analysis of the RNA element involved in the piRNA biogenesis

○Naomi Takase[1], Hirotsugu Ishizu[2,3], Shigeki Hirakata[2], Mikiko C. Siomi[2], Gota Kawai[1]
[1] Chiba Institute of Technology, [2] University of Tokyo, [3] Keio University

PIWI-interacting RNA (piRNA) is known to repress transposons in germ cells. In *Drosophila* the *Traffic jam* mRNA carries piRNA in its 3' UTR and a *cis* element (*tj-cis* element), which is also located in the 3' UTR, is involved in the piRNA biogenesis. It was demonstrated that the *tj-cis* RNA (100 nt) corresponding to the *tj-cis* element consists of two structural domains, 5'-half (50 nt) and 3'-half (50 nt). In the present study, the secondary structure of a 47 nt RNA (SL-123, a part of 5'-half) was analyzed by the NMR method. It was suggested that the structure of each stem loop was stablized by the interaction between stem loops.

序論

PIWI-interacting RNA（piRNA）は，生殖細胞に特異的な小分子RNAであり，トランスポゾンの発現を抑制している．本研究では，ショウジョウバエのpiRNA をコードしている*traffic jam*（*tj*）遺伝子の3'-UTRに存在する領域（Fig. 1， *tj-cis* element）に着目し[1]，その構造と機能の解析を進めている．*tj-cis* elementに対応する100残基のRNAを*tj-cis* RNAと呼び，NMR法を用いた二次構造の解析により，構造決定することを目的としている．

これまでの解析から，*tj-cis* RNAは5'側の領域に3つのステムループ構造，3'側の領域にシュードノット構造を持つ，2つの構造ドメインからなることが示唆された．そこで今回は，5'側の3つのステムループ（SL-123，Fig. 2）に着目し，さまざまな断片を作製し，二次構造および立体構造の解析を進めた．

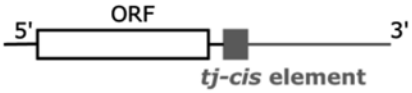


Fig. 1. *tj-cis* element

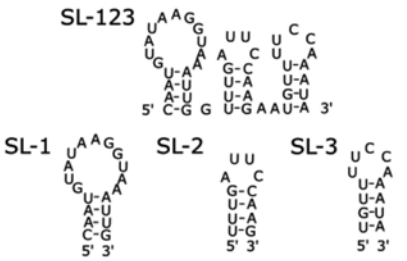


Fig. 2. *tj-cis* element の 5'側の領域に推定された各ステムループの推定二次構造

piRNA，*cis*-element，secondary structure

○たかせなおみ，いしづひろつぐ，ひらかたしげき，しおみみきこ，かわいごうた

方法

全長配列から，SHAPE法によるデータやvsfold5を用いて予測した二次構造予を元に，RNAの断片化を行った．RNAの二次構造をさまざまな断片のNMRスペクトルと比較することによって推定する手法は，すでにいくつかのRNAで成功を収めている[2,3]．

試料は，ジーンデザイン社および北海道システム・サイエンス社に委託して化学合成した．安定同位体標識アミダイトユニットを大陽日酸社から購入し，北海道システム・サイエンス社に委託して残基特異的に導入した．測定には，600 MHz NMR分光計（Avance600，Bruker Biospin)を用いた．

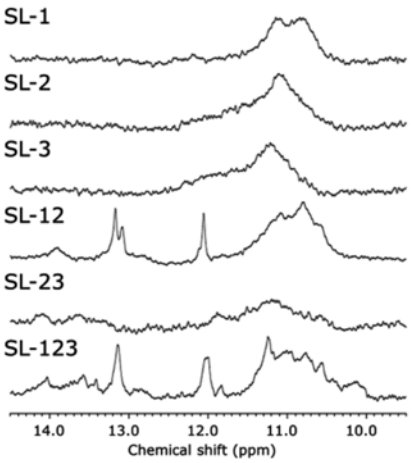


Fig. 3. イミノプロトンスペクトル

結果

【3つのステムループそれぞれの二次構造解析】

イミノプロトンスペクトルを比較したところ，設計した各ステムループ単体とステムループがつながった断片ではシグナルが異なっていることが分かった（Fig. 3）．しかし，各ステムループについて，塩基とリボースのシグナルを連鎖帰属した結果，SL-2とSL-3については予測されているステム構造が形成さていることがわかった．SL-1については，ループ部分にもG-Aミスマッチを含む4つの塩基対が形成されていることが示唆された．

【各ステムループの立体構造解析】

各ステムループのNMRスペクトルの解析によって得られた情報を元に立体構造計算を行った．その結果，SL-1, SL-2およびSL-3の立体構造が得られた．次に，立体構造計算によって得られた構造を元に，AMBERによるMDシミュレーションを行った結果，各ステムループ構造の安定性を確認できた．

考察

各ステムループ単体ではイミノプロトンのシグナルもあまり観測されないため，構造が安定ではないことが考えられる．しかし，SL-12においてイミノプロトンシグナルが観測されたことから，SL-1とSL-2のループ間の相互作用や末端部分が相互作用し，構造が安定化している可能性が考えられた．同様なシグナルがSL-123でも観測されている．今後は，作製した各ステムループの構造モデルをつないだモデルのMDシミュレーションを行ない，各ステムの安定性の解析を試みる．

参考文献

1) Ishizu, H. et al., *Cell Reports* **12**, 429-440 (2015).
2) Okui, S. et al., *J. Biochem*, **159**, 341–350 (2016).
3) Ohyama, T., et al., *Nucleic Acids Res.* (2020). (doi: **10**.1093/nar/gkaa598)

会員便り：海外学会参加報告

64th Annual Meeting of Biophysical Society 参加報告書

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター
徳永 裕二
tokunaga.y@aist.go.jp

渡航者は、2019年度第2回募集の日本核磁気共鳴学会・若手研究者渡航助成金（以下、若手渡航助成）を拝受し、2020年2月15日～19日の期間に米国はサンディエゴにて開催された64th Annual Meeting of the Biophysical Society（以下、BPS2020）にて研究発表および情報収集を行った。以下にこれらの内容を報告する。

序　文

1984年2月2日に生を受けた渡航者は、応募資格35歳以下である日本核磁気共鳴学会・若手研究者渡航助成金への応募時に35歳であり、渡航の二週間前には36歳を迎えた。ボクサーは前日計量後にエネルギーを蓄え、一回り大きくなって試合に臨むが、対照的にapprox. 40には体力の衰えは隠せない。精神ばかりは若々しく臨もうとStay hungry, stay foolishを心に唱えてかの国に上陸した渡航者を迎えたのは、果たしてStaypineapple hotelであった（**図1A**）。食べ放題のパイナップルクッキーにてhungry精神は早々に打ち砕かれ（**図1B**）、生来のfoolishのみを引き連れての参加となったことは、本レポートを読むことでご確認いただけることと想像する。

参加学会および渡航先について

西海岸は留学先には適さない、何となれば気候温暖の故に若者をして遊興に耽らしめるからである（**図2**）、とは、かつてある先達がものした論考である。こうした揶揄をよそに、今日のサンディエゴは生物学研究の一大拠点を形成し、その中心たるスクリプス研究所はProf. Peter WrightおよびProf. Kurt Wüthrichを擁する。このことを反映し、当地では世界最大の生物物理学の会合であるBPSがボストンと交互に開催されている（**図3**）。

若手渡航助成によるBPSへの参加は渡航者が初と思われるため、BPSについて簡単にご紹介したい。公式サイトによれば、BPSは1958年に発足した（初回会合は先立つ1957年。本邦でも後を追うように日本生物物理学会が1960年に発足している）。当時、第二次世界大戦における同分野および関連技術の発達を背景として、生物学への物理学的アプローチの必要性を痛感していた米国生理学会所属の有志4名が、約2年をかけて立ち上げたという。初代presidentは望遠鏡を顕微鏡に持ち替えた元天文学者であったということも影響してか、本学会においては各種顕微鏡技術の活躍が特に目立った。

BPS2020の参加人数は約7,000名と公表されて

図1　A. Staypineapple hotel外観。B. 食べ放題パイナップルクッキー。砂糖が眩い。

ニュースレター掲載日：2020年4月28日

いる。これは日本分子生物学会年会と同等の数である。ただし、この数は米国にて開催される他の生物学関連の学会と比較すると数分の1ほどの小規模であり、それ故に参加者同士がintimateである点がアピールされている。つまりは生物学関連の学会の規模が、日本と比較して数倍、大きいということである（**図4**）。人数に関して、ひとつ不思議に感じたこと。パラレルセッションは最大8テーマの同時進行であるため、単純な割り算では1テーマあたり800人超が詰めかけることが想定される。ところが、実際の聴衆の数はその4分の1ほどではないかと、渡航者の目には映った。西海岸のバミューダ・トライアングルともいうべき現象であるが、次回ボストン大会を待ち、再現性を確認したい。座席を贅沢に使用できるという意味ではメリットともいえる。

若手渡航助成の礎を築かれた故京極好正先生は、日本生物物理学会において1986–87年度期に会長を務められた。また、2018–2019年期には、Prof. Angela GronenbornがBPSのPresidentを務めておられる。いずれの先生もNMRを中心に据えながらも、NMR以外の物理化学的アプローチに造詣が深い点で共通している。故京極先生におかれては初期に赤外分光を専攻されWatson-Crick塩基対が安定に形成される熱力学的根拠を示すなど記念碑的な業績を残された（Kyogoku et al, *BBA* (1969)）。Prof. Gronenbornにおかれては X線結晶構造解析や電子顕微鏡解析を併用した学際的な研究からHIVウイルスの構造生物学的研究に多大な貢献をされている（Perilla and Gronenborn, *Trends Biochem Sci* (2016) など）。これらのことにも象徴されるように、NMRの学際的活用を強く認識できるという観点からも、若手研究者のBPS年会への参加は核磁気共鳴学会にとって有意義であると、渡航者は考えている。

図2　LAX-SA間はAmtrakで移動。往路では2時間の到着遅延と度重なるホーム変更のアナウンスがあり、本邦の新幹線のクオリティの高さを再認識させた。それでも、ヤシの木がプラットフォームを縁取る風景は「まあ西海岸だし」と思わせる寛容の精神を涵養する。

図3　BPS2020の会場であるサンディエゴ・コンベンションセンター。背中側はすぐ市街であり、最初の建物は酒場である。ホテルから会場へのアクセスも頗る良好。

学会内容報告

シンポジウム、プラットフォーム、およびワークショップは最大8テーマのパラレルセッションにて進行され、計105テーマを数えた。渡航者において便宜上、これらを**図5**のように分類した。

①膜および膜タンパク質

26件と最大であった。これは物質輸送および情報伝達の始点として果たす生理的な重要性、および創薬標的としての膜タンパク質の重要性に加えて、技術的な進歩、一例を挙げれば極低温電子顕微鏡（cryo-EM）の分解能向上などにより、取

図4　最終日に片付けの進むポスター会場（研究内容の保護の観点からポスター掲示中の撮影は遠慮した）。国内の学会に比してボードの垂線方向の距離が広く取られており、快適であった。学会員の推薦を発表要件とすることで発表件数が適度に絞られているためか。

扱いの難しい膜タンパク質を対象とした研究において機能制御メカニズムを説明しうるだけの質・量を備えたデータの取得が可能となってきたことを反映したものと考えられる。

②分子および分子マシナリ

24件設定された。内訳を見たとき、天然変性タンパク質（Intrinsically disordered proteins; IDPs）のセッションが4件含まれることは注目に値する。特定の立体構造を持たないIDPの構造的研究にはNMRが活用されるため、NMRの専門学会では複数のIDPのセッションが設けられることは珍しくない。一方、生物物理の学会にてIDPに少なからぬセッションが割り当てられていることの背景には、液－液相分離（Liquid-liquid phase separation；LLPS）の研究が国際的に活発化していることがある。LLPSは文字通り液相と液相の間の分離であり、水と油であれば自然なことであるが、興味深いことに細胞の中で水と水が互いに組成を異にして分離し独特の機能場を形成する現象を指す。多くの場合、天然変性タンパク質／領域およびRNAなどが高密度に集合し、液滴相を形成する。脂質膜のように熱力学的な解釈が単純な境界で隔てられた古典的なオルガネラの対立概念として捉えられ、その形成原理および構成要素の種類は未知のところが多い。生物学的な意義については総説（e.g., de Oliveira et al, *Adv Protein Chem Struct Biol*（2020））に譲るが、単に現象論としてではなく生命現象および疾病を理解および制御するために不可欠な研究対象として位置づけられていることが重要といえる。また、上記の総説は冒頭でSchrödinger博士の『生命とは何か』を引用し、「新しい構成要素ではなく、ありふれた構成要素の新しい振舞いこそが生命を理解する鍵である」との理念が具現化された対象としてLLPSを位置付けており、生物物理学会にて特にLLPSが注目されることにはこうした背景もあろう。

LLPSの研究においてはNMRが活用されている（総説Murthy and Fawzi, *J Biol Chem*（2020）など）。この領域では、NMRは関連分子の*in vitro*での挙動を高い構造分解能にて解析する目的に使われる傾向がある。具体的には、LLPSを形成する条件および形成しない条件における立体構造の違いを化学シフト変化として捉える、LLPSを形成するタンパク質および核酸の分子間相互作用部位を決定する、などである。このようにNMRが使われた研究のうち、BSP2020ではProf. Yuh Min Chook（関連文献*Cell*（2018））およびProf. Markus Zweckstetter（関連文献*Nat Commun*（2019）など複数）の講演を拝聴した。いずれの研究も、液滴の形成を見る、大きさを測る、構成要素の出入りを定量するなどの目的にて顕微鏡観察像をメインツールとして用いると同時に、NMRを用いて構成タンパク質の残基分解能の情報を取得することで、分子機構の理解を深めていることに特徴がある。LLPSは構成要素となるタンパク質および核酸が探索されている段階であり、各論的な研究が多い中で、Prof. Zweckstetterらによる*Nat Commun*（2019）は、LLPSを構成するタンパク質／領域に共通する正の帯電傾向に着目し、塩基性アミノ酸として特にLysが好まれる傾向があること、塩基性アミノ酸の種類がLLPSの物性に与える影響、およびLys残基に固有のアセチル化修飾を介してLLPS形成能が細胞コンテクスト依存的に制御されうることなど、LLPSに通底する原理を明らかとした点で重要な研究といえる。また、ゲル状に濃縮された液滴相においては、そこに含まれるタンパク質に由来するシグナルを溶液NMRにて観測することが難しい場合もある。これに対し、Prof. Galia T Debelouchinaら（関連文献*Angew Chem Int Ed*（2019））はMAS固体NMRを適用し、INEPTとCPを併用することでゲル中において運動性を保持するアミノ酸と固定度の高いアミノ酸を観測し分け、LLPS形成に寄与するアミノ酸残基を同定する方法論を提示することで、LLPS研究にてNMRを活用する幅を

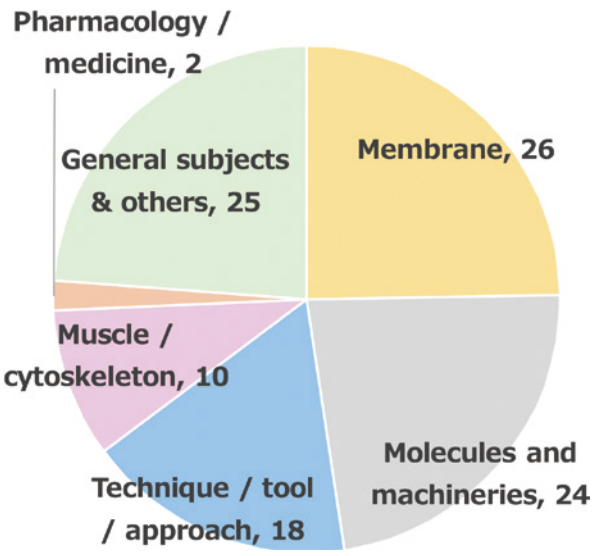


図5　セッションの分類・内訳

広げた。

他にdynamics and allostery, fuzzy interactions, shape shiftingなど、立体構造および相互作用の可塑性をテーマとした分子論的セッションが5件含まれており、NMRを活用した研究も頻見された。ただし、ポスター発表も含めると、生体分子の構造可塑性研究については分子動力学計算を用いた研究が非常に多かった。この観点で、Prof. Lindorff-Larsenは、NMRを含む実験データと分子動力学計算を相補的に利用することの意義を説いており、関連文献*Science*（2018）は概念から具体例まで参考になる。

③技術、ツールおよびアプローチ

18件設定された。ここには上述のcryo-EMも含まれる。最も存在感を示したのは3件のセッションを設けた超解像顕微鏡（Super resolution microscopy；SRM）といえる。SRMは2014年のノーベル化学賞を皮切りに、原理・特徴を異にする複数の手法が派生するとともに市販の顕微鏡が出回るにおよび、今日の隆盛に至っている。SRMの理論的な分解能は最高で約10nmであり、細胞内におけるタンパク質の1分子分解能での観測にも適用されている。NMRと比較すると、in-cell NMRはタンパク質の立体構造の特徴を原子分解能で捉えることができ、空間分解能の観点でSRMと相補性を持つ。このことから、今後これらの技術を併用した研究が増加することを期待する。ただし、NMRにおいては通常、不均一な細胞内の集団平均を観測しているため、1分子系のデータとの統合的解釈には慎重を要する。一方、SRMは観察対象となる分子等への蛍光標識を必要とすることから、拡散速度や相互作用など蛍光標識の影響が懸念される解析においては、より侵襲性の低いNMRのデータは重宝されるであろう（ただし、渡航者が把握できた限りでは、BPS2020においてin-cell NMRを積極的に利用した研究は1件に留まった）。

④筋肉および細胞骨格

10件。若手が誇れる数少ない要素でもあることから、独立に分類した。筋肉の収縮機構の研究は日本人研究者の貢献が大きい分野のひとつである。また、「名取の階段」に象徴されるように生物学においてミクロとマクロが合流する端緒となった領域とも捉えられる。

⑤薬学・医学的観点における生物物理学のアプローチ

マイノリティではあったが、渡航者の所属と研究内容を考慮し独立に分類した。BPS2020においては、この分野は情報学・計算科学が大半を占めていた。NMRは、これらの提示する結論を個別の対象にて実験的にサポートするばかりでなく、NMR主導の研究事例から計算科学等の解析で見落とされている概念およびパラメータを提示することにより同分野の質的向上に貢献できるものと考える。

当該セッションにおいて、渡航者はProf. Dorothee Kernの講演を聴く機会を初めて得た。噂に聞く、聴衆をダンスホールに誘う類まれな講演スタイルは健在であった。セッションのテーマ設定に沿った内容として、相同性が高く立体構造も非常によく重なる2種類の創薬標的キナーゼにおいて、抗癌剤に対する感受性が1,000倍も異なることの動的構造基盤を解明した研究（Agafonov et al, *Nat Struct Mol Biol*（2014）；少し古いが）の紹介に一部の時間が割かれていた。一方、Prof. Kernの発表の主要部は、セッションの課題からはやや逸れたものであったが、渡航者は興味深く拝聴したため、以下に紙幅を割いて紹介したい。

Prof. Kernの代表的な研究の一つは、アデニル酸キナーゼにおいて酵素活性と相関する構造運動性を報告した研究（*Nature*（2007））であろう。当時から、進化的視点、その生物がその生物たりえるタンパク質構造的な根拠を追究されてきたように思う。近年はタンパク質キナーゼの研究にも力を入れていることから（*Nat Struct Mol Biol*（2014）, *Science*（2015）など）、同分野の一人として渡航者も注目してきた。今回の講演は最新の*Science*（2020）の内容を主体に構成された。ここでは、癌関連キナーゼを題材として、分子間相互作用とアロステリの進化的視点からの切り分けが試みられた。

当該研究は、タンパク質のアロステリック制御の進化的起源を明らかとすることを目的とし、ヒト由来タンパク質キナーゼAurora A（以下kinase；K）とそのアロステリック活性化因子TPX2（以下regulator；R）を解析対象としてタンパク質科学的研究を行ったものである。実は、本論文では一度もNMRが使われない。にもかかわらず、変異体設計の観点などから、NMR研究にも活用を期待できる内容を含んでおり、一読の価

値ありと考える。本研究において得られた結論は、(1) RのKに対する結合は、Rが進化的に出現した時には既に最適なものであった。これに対し、(2) RによるKのアロステリック活性化は、Rが出現して以降、進化とともに長い時間をかけて、主にK側のアミノ酸組成の変化に伴い徐々に増強された、というものである。

まず、筆者らはKおよびRの進化系統樹を作成することにより、進化的にKはRに先行して出現したことを示した。さらに、祖先配列再構成法を用いることにより、KおよびRそれぞれについてヒト型のアミノ酸配列に進化する途中の複数の“分岐点”における配列を推定した。これらのリコンビナントタンパク質を調製することで、アロステリック制御の進化的起源を明らかとするための実験材料とした。本研究では、Kの祖先配列としてRの出現前後のものを2配列ずつ（R出現前：K1, K2および後：K3, K4）準備し、これらの間の対比を示すことにより結論を説得力のあるものとしている（RについてはR1およびR2の2種類の祖先配列を用いている）。この材料を用い、まず、Kがいずれも自己リン酸化活性、自己リン酸化に依存した基質リン酸化活性を保持し、後者については異なる世代間で定性的に同等であることを示した。このことは、Kは最初期から自己リン酸化活性に基づく機能制御を有してきたことを意味する。次に、Kに対するRの親和性を総当り的に測定した。この結果、すべてのRは、K3, K4, およびKに対して解離定数10 nM前後の高親和性結合を形成するのに対し、R出現前の祖先であるK1およびK2に対しては10分の1以下の親和性しか示さなかった。このことが結論（1）の主たる論拠となる。さらに、Rの結合に伴うKのアロステリックなキナーゼ活性上昇を総当り的に測定した。この結果、すべてのRはR出現前のK1およびK2の活性を強めず、R出現後のK3, K4, およびKの活性を増強した。注目すべきことに、Kの進化が進むほど、すなわちK3＜K4＜Kの関係にてアロステリック増強は度を増した。一方、あるKに対するRの寄与は、R1 ～ R2 ～ Rであった。これらのことが結論（2）の論拠となる。私見となるが、以上の事実は、分子間結合という機構は10 ～ 20 kcal/molのエネルギーを要するため、いちどきに半ば偶発的に獲得されたのに対し、アロステリック制御機構は、平衡の制御と考えればその10分の1ほどのエネルギーで行われることから、点変異によって生じるわずかな分子内／分子間結合の変化が蓄積しやすく、長い時間をかけて最適化されえた（恐らくは現在も途中である）ものと解釈できるであろうか。このことは、点変異により生じる疾病が、しばしば構造平衡の変化を分子機構とする可能性を暗示しており、NMRを用いた動的構造解析の有効性を指摘すると考えられる。

（＊アミノ酸点変異が疾病を惹起する分子機構については様々な仮説が取り沙汰されており（Stefl et al, *J Mol Biol* (2013) など）、上記考察は分子間結合とアロステリの特徴を見比べた場合の試論に留まることを申し添えておく）

最後に、アロステリック制御に寄与するKの構造部位を同定する目的にて、R結合およびアロステリック制御を獲得するK2からK3への進化に伴い置換された25個のアミノ酸残基に着目した。これらのアミノ酸を、K4以降およびアイソフォームAurora B（同様にアロステリック制御を受ける）にて保存される15個と残り10個に分類し、K2にこれら2セットのアミノ酸変異をそれぞれ導入した結果、前者のみがK3と同等のR親和性およびRによるアロステリック活性増強を獲得した。このことより、アロステリック制御を担うアミノ酸構成は、ひとたび獲得された後は失われずに維持され、かつさらなる変異により増強されてきたことが分かり、アロステリック制御が生存に不可欠な役割を果たしていることが強く示唆された。以上の結果は、Rの出現に伴う分子間結合を介して獲得された共局在化という強力な優位性を“足場”として、アロステリック制御がKの変異を介して時間をかけて伸長してきたことを示しており、広く受け入れられている2遺伝子の共進化とは一線を画するモデルを提示した。なお、渡航者は*Nat Struct Mol Biol* (2014) および昨年のNMR討論会において報告したように、キナーゼのアロステリック制御についての研究を行っており、「アロステリック制御は本当に必要なのか？単に強く結合すれば十分ではないのか？」という問いに実験データを以て答えることに難儀してきた。上記で示された結果は、進化がアロステリック制御を残し、強めてきたことを示すことでその不可欠性を示唆するとともに、責任残基を絞り込むことによって結合とアロステリック制御を切り分けて実験的検証を行うための材料を与えてもいる。

今後、KをK1 ～ K4にて置換することによる表現型の変化を調べる研究が行われ、Aurora Aにおけるアロステリック制御の生理的意義が問われることとなろう。また、当然ながら、獲得されたアミノ酸点変異群とアロステリック制御の間のミッシングリンクについて、溶液NMRを駆使して微視的かつ動的な機構が明らかとされることを期待する。

渡航者の発表

渡航者はポスター発表を行った（口頭発表を申請したが採択されず）。本研究では、ストレス下で機能するMAPK p38αが、ストレス下の細胞内で生じる生理的環境の変化に応じて酵素活性を調節することを見出すとともに、その構造機構として環境変化が直接誘起するp38αの構造平衡の変化を明らかとした。本結果は、原子分解能の動的構造情報、弱い相互作用の定量的な解析、および幅広い溶液条件でのデータ取得など、溶液NMRの長所の上に成り立っており、結論の生物学的意義のみならず、NMRの利点を他分野の生物物理学者に理解してもらう意味でも有意義なものと考えていた。しかしながら、実際にはNMRとは無関係という研究者に聞いてもらう機会を得られなかったことは、無念であった。やはり、聴衆がNMR関係者に限定されない口頭セッションにて発表すべきと考えられる。ポスターからのピックアップ演題を見る限り、下世話ではあるがIFの高いジャーナルへの近著がある研究が採択されやすいように見受けられた。今後、参加を検討される若手の方の参考になれば幸いである。一方、渡航者と同じくp38α, ÌNMR研究に取り組む研究者2名が訪ねてきてくれたことは僥倖であった。氏らと結んだ友好関係はもちろんのこと、競合するグループの人的動向やactivityをそれとなく把握できたことも収穫であった。

蛇　足

学術調査を目的とした渡航中の身ではあるとはいえ、渡航先の文化的側面に触れることで現地の人々の考え方について知るところも大きいと考えれば、現地にて些かのアルコール飲料（周波数ロック用に添加する重水と同程度の濃度）を嗜んだことは目的に適うと、渡航者は考える。この際、あるバーの壁に掲げられた以下の但し書を目にした。

－ *Bar rules* －

1. Bartender is always right.

2. If bartender is wrong, see rule-1.

BartenderをDataに置き換えれば実験科学における基本的態度が導かれる。こうした判断の枠組みが酒場にまで裾野を広げていることに、畏敬の念を抱いた。

謝　辞

渡航者が発表した研究は、渡航者の所属チームを主宰する竹内恒博士、横浜市立大学生命医科学研究科の高橋栄夫教授、および東京大学大学院薬学系研究科の嶋田一夫教授の多大なるご支援およびご指導の下に遂行された。この場をお借りして先生方に感謝を申し上げる。

なお、同研究は科研費『研究活動スタート支援：16H07473』および『若手研究（B）：17K15083』の補助を受けて遂行された。

渡航者がBPS2020への参加を検討した際、同学会の素晴らしさを説き、参加を後押ししてくださった3名の先輩方にも御礼を申し上げたい（2名は日本核磁気共鳴学会会員ではないという事情などから、お名前の記載は控えさせていただく）。ご高説に違わずエキサイティングな学会であった。

末筆となり恐縮であるが、若手渡航助成を創設し、その原資を与えてくださった、故京極好正先生および故阿久津政明氏、またご家族およびご関係者の皆様に厚く御礼申し上げる。助成を採択してくださった加藤晃一・日本核磁気共鳴学会会長、池上貴久・若手研究者渡航費助成金選考委員長、および選考委員の先生方にも深謝申し上げる。

結　語

もし自分や親類が今日、鬼籍に入るとして、その遺産を各々の道の後進のために使うことを選択できるであろうか（寄付に価する財産があれば、という仮定のもとでの話である）。私のような俗物には、yesと即答することはできそうにない。

東京市市長（関東大震災後の復興）、満州鉄道総裁など多くの功績で知られる後藤新平は、死の床においてこのように語ったと伝えられる。

金を残して死ぬ者は下だ、仕事を残して死ぬ者は中だ、人を残して死ぬ者は上だ

本助成金を創設された方々は、人を残すこと、

若手を育成することに投資をしてくださった。ITとAIの華やかなる今日、人が人に伝えられること、遺せるものは何か、そのことまで教えていただいたように思う。

帰路のAmtrakにて、シニアになりつつある我が身をカリフォルニア沖に沈む夕日に重ねて、まずは年相応の蓄財を誓いつつも、日本国側から見ればこれは朝日であると、若手に対して責任を持つべきシニアの夜明けを新しい気持ちで迎えた次第である（**図6**）。

核磁気共鳴学会の諸兄におかれては、若輩者への引き続きのご指導・ご鞭撻をお願い申し上げる。

図6　沈む夕日は昇る朝日でもある。若手期の終焉はfoldingではなくaliasingである。

NMR

Bulletin of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

Vol.11 No.1

2021 年 8 月 31 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 3-11-15-6F
TEL：03-3238-1689　FAX：03-3238-1837