

NMR

Bulletin of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan



Vol.12 No.1 & 2 2022

<http://www.nmrj.jp>

会長メッセージ 藤原敏道

巻頭エッセイ 山本泰彦、竹腰清乃理

Freeman 博士追悼文 藤原敏道、中沢隆

総説論文：解説 攪上将規、西田紀貴、三好利一、梅垣いずみ、降旗一夫

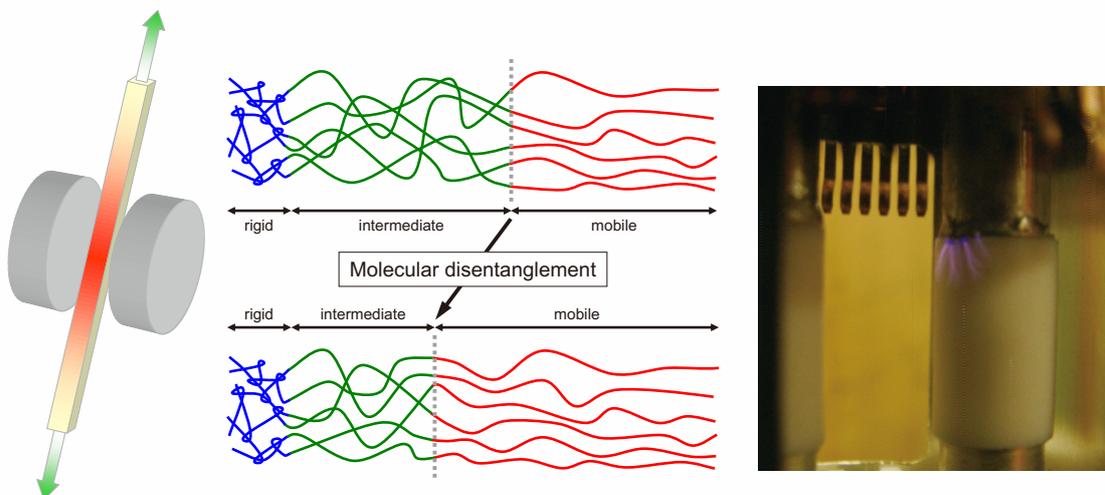
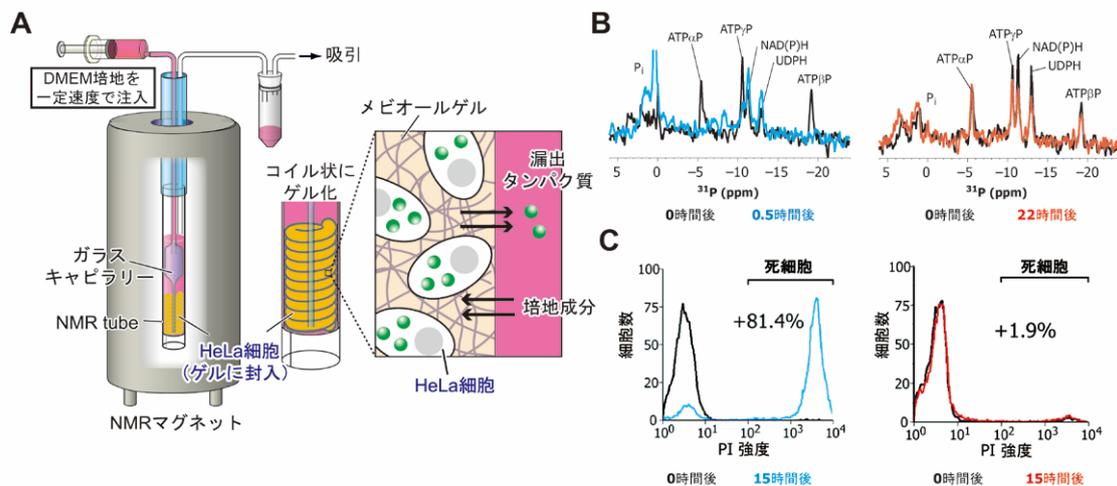
総説論文：NMR 便利帳 根本貴宏

研究論文：研究報告 三島正規、八木宏昌

2022年度学会顕彰：ポスター賞

会員便り：ISMAR-APNMR2021 報告 藤原敏道、大山貴子

会員便り：海外学会参加報告 金井典子



広告掲載一覧

(順不同)

株式会社 エルエイシステムズ

株式会社 CRYO SHIP

株式会社 シゲミ

大陽日酸 株式会社

日本電子 株式会社

株式会社 VARTEC

富士フイルム和光純薬 株式会社

ブルカージャパン 株式会社

NMR 共用プラットフォーム
(文科省 先端研究基盤共用促進事業)

本学会機関誌へのご賛助に対しまして、厚く御礼申し上げます。

固体NMR 分光計, アクセサリー

LAS

分光計, 各種プローブ, ローター, サンプルングツール等を取り揃えています。



Agilent/Varian T3プローブの正統派後継機



付替え可能な
プローブヘッド



Agilent用MASローター
(1.2mm - 9.5mm)



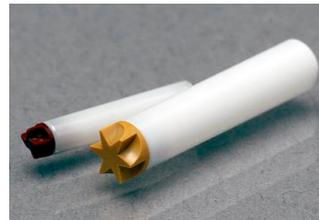
HXY Premium プローブ



MASコントローラー



Brukerプローブに準拠



Bruker用MASローター
(2.5mm - 7mm)



キャップリムーバー
(1.3mm - 4mm)



Oリング付きキャップ
(左: Kel-F, 右: Vespel)



幅広い温度可変範囲 や 拡散プローブなど



高温MASプローブ



Diffusionプローブ



各種 NMR分光計



LapNMR



SCOUT



REDSTONE

液体窒素蒸発防止装置 GMR/PMRシリーズ

製造元 株式会社エムアールテクノロジー

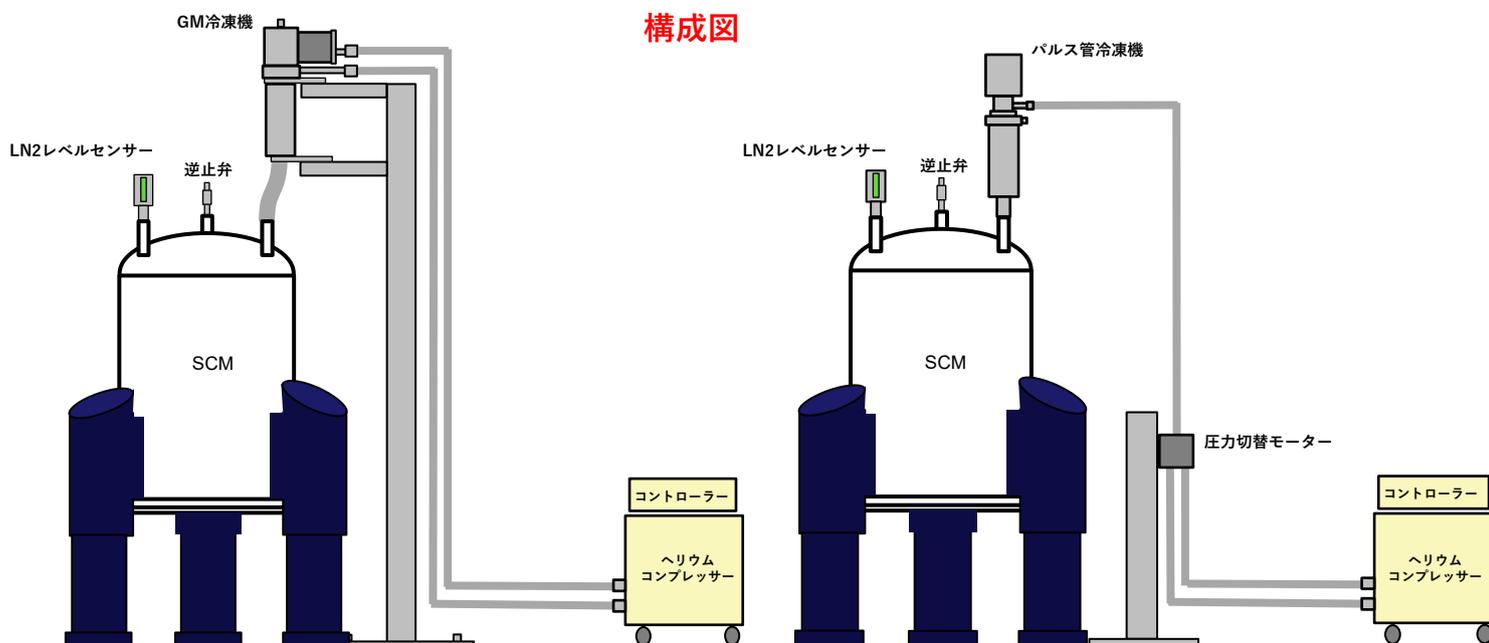
GMR



PMR



構成図



株式会社 CRYO SHIP

〒330-0854

埼玉県さいたま市大宮区桜木町1-266-3

TEL : 048-658-8763 FAX : 048-611-9773

URL : www.cryoship.co.jp



グループ会社

株式会社 センダガス

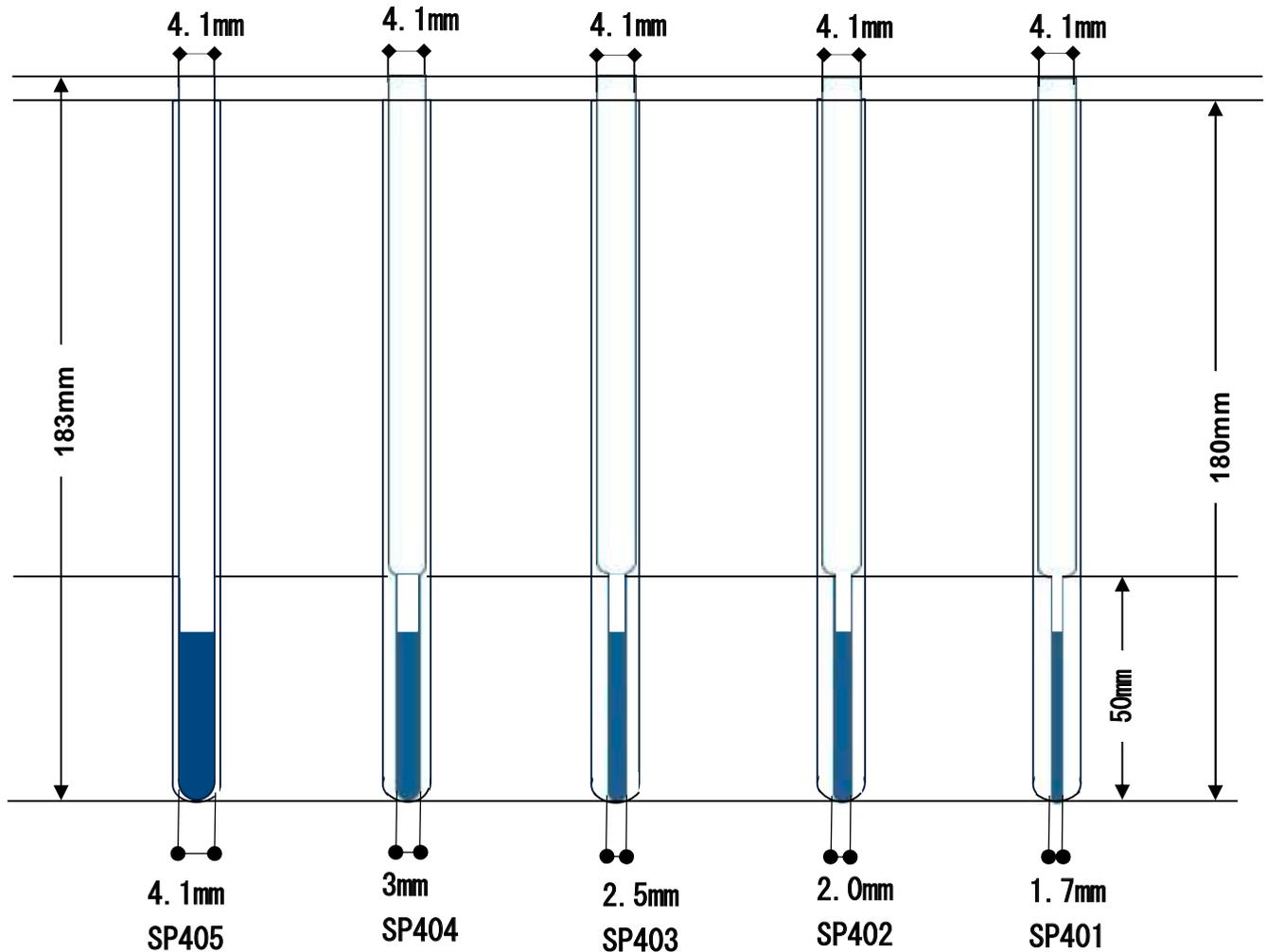
株式会社 エムアールテクノロジー

5mmφ 同軸NMRチューブセット

セット販売にいたしましたので、別々に購入する煩わしさがございません。

以前の同軸試料管よりパスツールが入れやすくなりました。スペーサーも必要ありません。

5mmφ用のキャップをかぶせることができます



外管 PS-001-7 (外径 5mm) とテフロンキャップ (CT-005) のセット販売です。

型式	全長	上部外径	下部長さ	下部外径	下部内径	下部内径公差	価格 1セット
SP-401	183mm	4.1mm	50mm	1.7mm	1.2mm	±0.01mm	5,850 円
SP-402	183mm	4.1mm	50mm	2mm	1.5mm	±0.01mm	5,850 円
SP-403	183mm	4.1mm	50mm	2.5mm	1.9mm	±0.01mm	4,850 円
SP-404	183mm	4.1mm	50mm	3mm	2.5mm	±0.01mm	4,850 円
SP-405	183mm	4.1mm	50mm	4.1mm	3.2mm	±0.01mm	4,850 円



株式会社 シゲミ

TEL: 042-624-2207 FAX: 042-622-0937

<http://www.shigemi.co.jp>

MAIL: info@shigemi.co.jp

安定同位体標識化合物

Stable Isotope for Structural Biology

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

無細胞タンパク質受託合成

細胞内タンパク質、分泌系タンパク質、膜タンパク質合成を承ります。
弊社HPの専用フォームより簡単にご依頼いただけます。

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



無細胞くん®

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



■ 無細胞くんStart特徴

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

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

◎ PCRで調製した直鎖状DNAもご使用いただけます。

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

無細胞くん用 安定同位体標識アミノ酸・膜タンパク質合成用試薬

■ SAIL メチル・芳香族選択標識

製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
SAT2001	SAIL アミノ酸混合物水溶液	1mL	220,000
G07-0226	[δ - $^{13}\text{C}_3$ - ^2H]Leu + [γ - $^{13}\text{C}_3$ - ^2H]Val + 18種重水素標識アミノ酸	1mL	120,000

■ 各種安定同位体標識アミノ酸

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

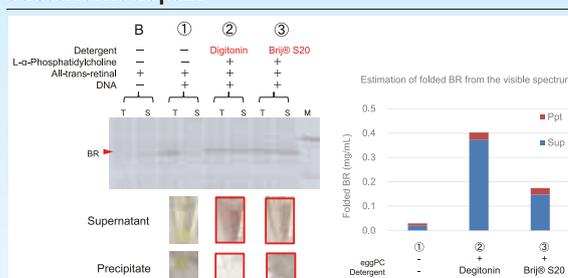
20種類のアミノ酸を含有しております。

■ 膜タンパク質合成用試薬

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

膜タンパク質 発現例

Bacteriorhodopsin



Purplish brown color represents proper folding of Bacteriorhodopsin.

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

核酸

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

培地

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

アミノ酸・ケト酸

- L-Amino Acids (^{13}C , ^{15}N , d) ● Algal Amino Acids (^{13}C , ^{15}N , d)
- α -Keto Acids (^{13}C , d)

その他

- Deuterated NDSB (Cambridge Isotope Laboratories)
- Lanthanide Tag
- Water- ^{17}O (10-90atom%) ● Pf1 NMR Cosolvent

※Biomolecular NMR専門カタログをご用意しておりますのでお気軽にお問い合わせください。

製造・総販売元 **大陽日酸株式会社** イノベーションユニット SI事業部

〒108-0014 東京都港区芝 5-30-9 藤ビル
 TEL.03-5439-5897 Fax.03-5439-5883
 メールアドレス Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
 ホームページアドレス <https://stableisotope.tn-sanso.co.jp>
 ●資料のご請求は、大陽日酸までお気軽にご用命ください。



NMR分析に光をもたらす…

最新型 NMR分光計 ECZ Luminous

ECZ Luminous G 400 MHz～1300 MHz

- 全ての拡張性に対応したハイエンドモデル
Foot printはECZの半分に！



ECZ Luminous R 400 MHz～600 MHz

- 600 MHzまでの高磁場に対応し、
溶液NMRだけでなく、
固体NMRまでを可能とした超小型分光計



ECZ Luminous S 400 MHz

- 溶液NMR専用のエントリーモデル



JEOL 日本電子株式会社

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

JEOLグループは、「理科学・計測機器」「産業機器」「医用機器」の3つの事業ドメインにより事業を行っております。

「理科学・計測機器事業」電子光学機器・分析機器・計測検査機器 「産業機器事業」半導体関連機器・金属3Dプリンター・成膜関連機器/材料生成機器 「医用機器事業」医用機器



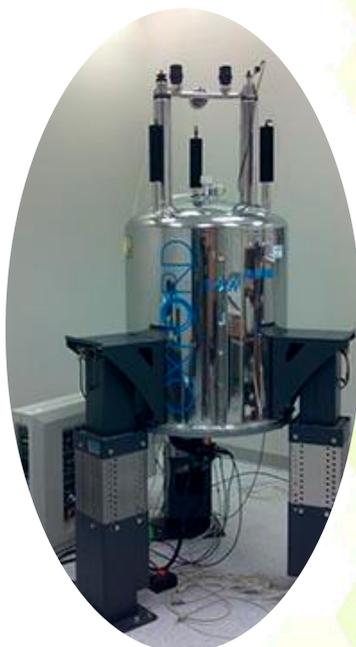
株式会社VARTECではNMR関連のサポートを営んでおります

*液体窒素蒸発防止装置
販売 / サポート

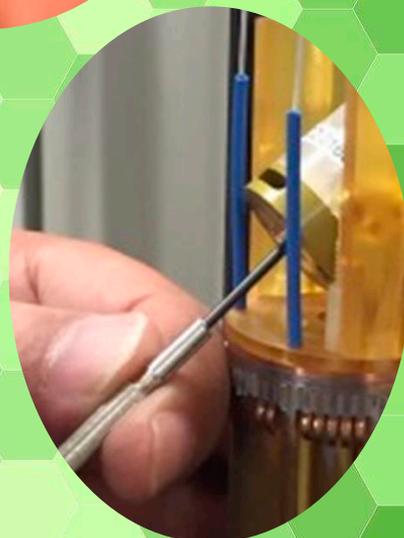
*移設作業 / 撤去 / 廃棄作業
重量物 NMR装置一式
永久磁石 など可



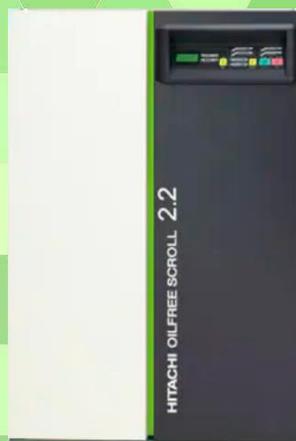
*プローブ修理
T3プローブ修理
コイル作成
調整・清掃作業



Total
Support



*Oxford社製マグネット
消磁 / 励磁



*コンプレッサー及びチラー 販売・メンテナンス

弊社では、NMR製品のトータルサポートを行っており、
NMR関連部品のカスタマイズ・開発も行っております。
全ての事業内容に対してお客様のニーズに合わせたご提案が可能です。
また、NMRや重量物の移設・廃棄も請け負い可能です。
ご相談等は下記URLよりお問い合わせください。

株式会社VARTEC

大阪府豊中市庄内宝町3-11-6
コムザオフィス南豊中107

<http://vartec-inc.com>

定量NMR用製品

NEW

器材

石英ネジロバイアル

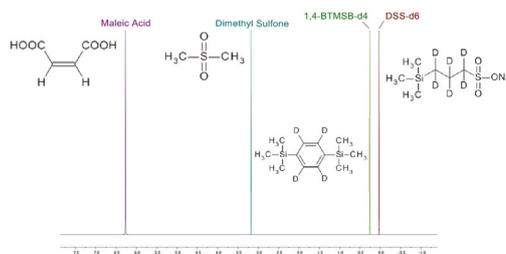
- 使いやすいネジロタイプ
- 金属不純物を含まず高感度分析に最適!



qNMR の試料調製に
最適な広口タイプ

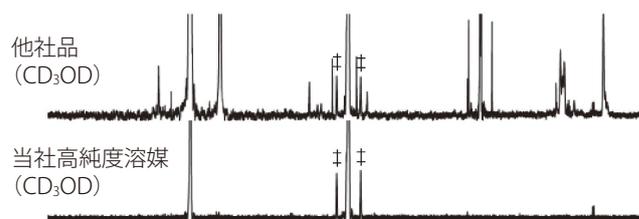
基準物質

- 認証標準物質から自社保証の全14製品をラインアップ!
- 様々な溶媒種、ケミカルシフトに対応!



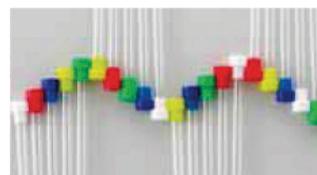
高純度 NMR 溶媒

- 化学純度の高い NMR 測定用溶媒
- 低水分値を保証!
- ^1H 、 ^{13}C 、 ^{19}F 、 ^{31}P NMR での低不純物含量を保証!



器材

- 広口タイプで使いやすい石英ネジロバイアル
- 外形幅や反り、真円度を保証した、NMR テストチューブ
- 低重量、低帯電性のアルミ秤量皿



**qNMR ウェビナー
オンデマンド配信中!**

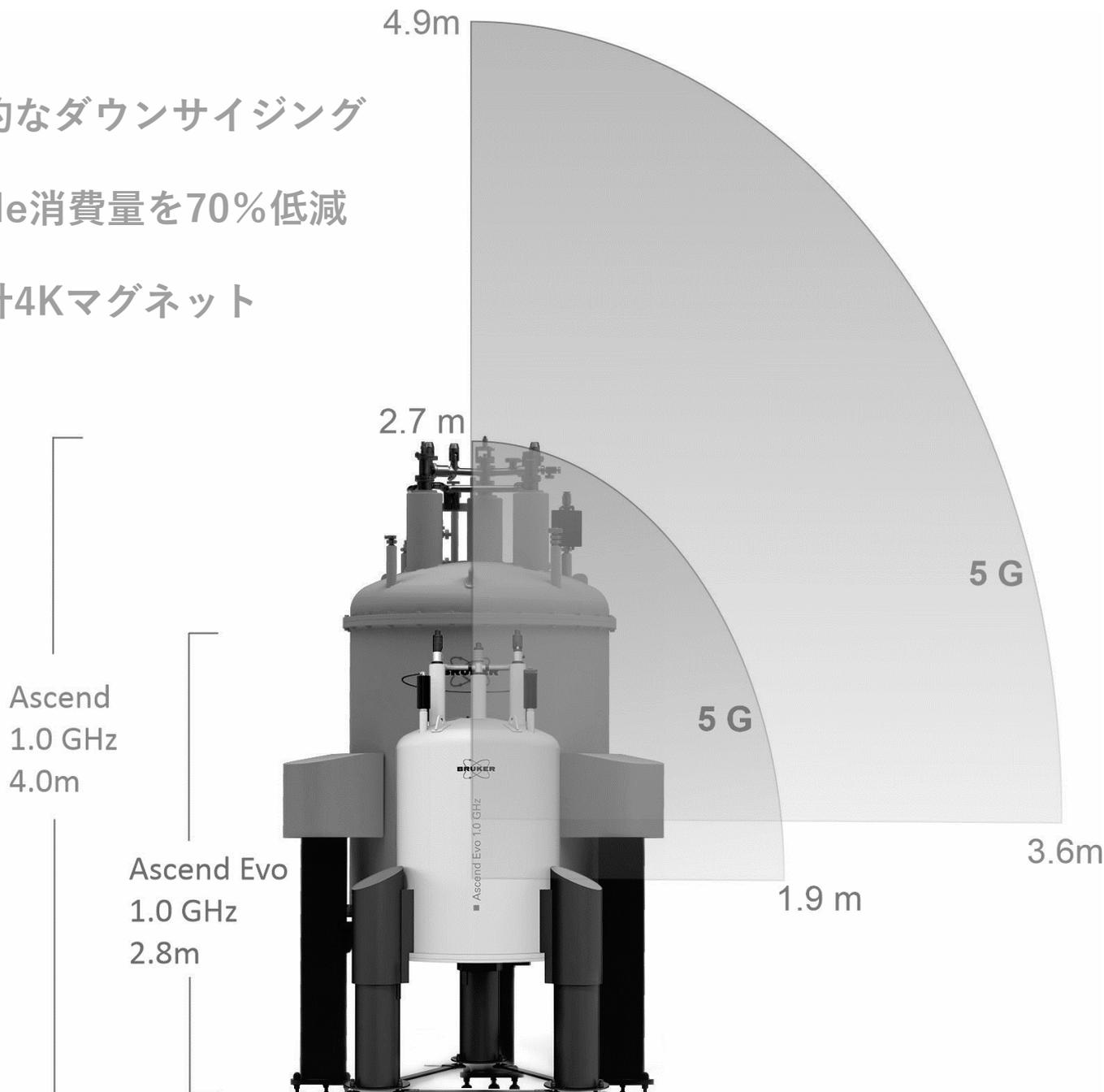
試料調製からデータ解析まで、qNMR の技術情報を動画でご視聴いただけます!

当社 HP トップ > 分析 > 分析手法で探す > 核磁気共鳴スペクトル測定 (NMR) > 定量 NMR (qNMR)
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/analysis/nmr/qNMR/index.html>



Ascend Evo 1 GHz Magnet

- 驚異的なダウンサイジング
- 液体He消費量を70%低減
- 新設計4Kマグネット



To learn more about our products
visit our website or e-mail us at:
info.bbio.jp@bruker.com

先端的なNMR設備と関連技術を提供



『NMRプラットフォーム』は我が国の研究開発基盤の持続的な維持・発展に貢献することを目指し、国内有数の先端的なNMR研究施設・設備を有する8機関でネットワークを構築しています。4つのNMR関連企業にも協力いただき、先端的なNMR設備と関連技術を幅広い分野の産学官研究者に対して提供しています。

<https://nmrpf.jp/>



NMR

*Bulletin of the Nuclear Magnetic
Resonance Society of Japan*

Vol. **12** No.2

February 2023

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

CONTENTS

●巻頭エッセイ	
NMR 研究遍歴と楽天主義	43
竹腰清乃理	
●Freemant 博士追悼文	
NMR 測定法に貢献された Ray Freeman 博士の追悼	45
藤原 敏道	
Ray Freeman 先生を偲んで	47
中沢 隆	
●総説論文：解説	
溶液 NMR ミュオンビームを利用したリチウムイオン電池研究	53
梅垣 いずみ、杉山 純	
溶液 NMR 天然有機化合物の構造解析	60
選択励起パルスの応用—二次元 NMR の homo-decoupling について	
降旗 一夫	
●研究論文：研究報告	
^{15}N NMR によるシアノバクテリオクロムのプロトン化状態の解析	69
永江 峰幸、青山 洋史、三島 正規	
解糖系酵素の環境適応的な反応制御による新たな代謝調節機構	75
八木 宏昌、葛西 卓磨、木川 隆則	
●2022 年度学会顕彰：若手ポスター賞	
第 61 回 NMR 討論会 (2022) 若手ポスター賞について	84
●会員便り：海外学会参加報告	
ANZMAG 2022 参加報告書	86
金井 典子	
●NMR 学会からのお知らせ	
1. 日本核磁気共鳴学会の決定事項	88
2. 日本核磁気共鳴学会機関誌投稿規程	90
3. 賛助会員名簿	92
4. 日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員会委員名簿 (2022-2023 年度)	93
5. 編集後記	94

NMR研究遍歴と楽天主義

京都大学名誉教授

竹腰 清乃理

takeyan@kuchem.kyoto-u.ac.jp

編集長から「なんでもよいので何か書け」との要請がありました。いまさらNMRのサイエンス話も面倒なので、J社のS氏が時々送ってくれる雑感エッセイ風のもので勘弁させていただきます。私は今年2022年の春に定年退官しました。不祥事が取り上げられることもなく（もちろんないんだけどね）無事に退職金もいただけて、老後の目処が立ったのですが、振り返るとNMR一本でやってきたようでも、専用路線のレールの上をまっすぐに走るようなわけにはいかず、いろいろじたばたと紆余曲折してきたよなあと思います。

はるか昔からどの世代も「我々の世代が一番苦労したんだ」と主張しますが、ご多分に漏れず私の世代も博士取得の頃（～1984）は悪名とどろく団塊の世代の方がポストを潰しまくってくれていて（いわゆるオーバードクター問題です）、Drといっても行き場所がなく（研究指導してくれた雑賀先生は一言「ないなあ～」）、カナダにポスドク修行に出ることになりました。学生時代にやっていた研究テーマは、「メチル基の束縛回転」という有機構造化学分野の話であり、NMRとの関わりは合成した試料の ^1H の T_1 の測定～解析でした。ということで、学生時代は緩和の理論をかなりきちんと勉強していました。自然な流れで「博士取ったら次は転移とか電気伝導などの物性を緩和を通して研究してみたい」などと意味不明なことを思っていたのですが、ポスドク先のボスのMcDowell先生からは「 T_1 はだめ。固体の高分解能NMRで新しいことをやれ (in English)」と若者の淡い希望は打ち砕かれました。

修士の頃に誰かに「研究者としてやっていくには少なくとも2本の柱、つまり、2つの研究の武器を身につけないといけない」的な忠告をいただいていたので、私は有機合成で試料を準備できることと、緩和の理解をそれらにあてていたつもりだったのですが、共に取り払われてしまい、困ったなあというわけです。素直な私はそこ

でMehring先生の教科書で固体NMRを勉強してNMRそのものの研究に方針変更したのですが、その時に緩和についての理解が役に立ちました、と言いたい！つまり、それまでやってきたことは無駄じゃなかったと言いたいのですが、実際に長年NMRの周りをうろついていると、緩和現象の理解が役に立つことが多かったのは事実です。

ここまで書いて小学生の頃に読んだ「少女パレアナ」というお話をなぜか思い出しました。パレアナの話は、協会から欲しかったお人形の代わりに松葉杖がプレゼントされるんだけど、「杖を使わなくてすむからうれしい」と喜ぶというキリスト教徒らしい話です。今では残念なことにこのような詭弁はポリアンナ（パレアナ）症候群～極端な楽天主義・現実逃避として引用されています。なぜこの話を思い出したかということ、今となってはMcDowell先生の指導～これからは固体高分解能NMRの時代だ～は良い忠告とわかるわけですが、その当時は困ったなあというのが素直な感情でした。でも、よい子の私はパレアナのように「これも神様の試練ね…（睫毛をパチパチ）」と納得して楽天的にやってなんとかなったわけです。

McDowell先生はお体が不自由だったので、もう一人のポスドクと交代で毎朝お迎えに行って車椅子→自動車（先生が運転）→車椅子で研究室にお連れするのが日課でした。ドライブ中に「What's new?」が先生の口癖(?)で、その場しのぎに調子の良いこと（こういうアイデアがあって準備中♪とか）を言って逃れるのですが、先生は悪魔の記憶力でマシントイムが終わった2週間後くらいに、あの話はどうなったとご下問があるので自然と英語での言い訳がうまくなり、論文書きに役に立ちました（嘘）。言い訳をひねり出しているときにアイデアも出てくるので良い刺激だったと感謝しています（嘘）。

日本に帰国しても外部要因による研究進路変更はその後も当然生じました。例えば、助手と

して北大理学部の引地研に雇ってもらったときには、古い溶液NMR（懐かしのGX-270）を使って固体高分子の研究を行うことになりました。ところが、GX-270のrfパルスの性能は溶液仕様で固体のパルス法には物足りないものだったので、まず装置の勉強～改良を余儀なくされました。日本電子の個性的な（表現を控えています）技術者さん達にいろいろ教えてもらいつつ、お箸より重いものを持ったことのない私が半田ごてを振り回すことになったわけで、論文には直接つながらなかったのですが、その後の研究の武器にハードの知識・経験が加わったことは大きかったです。それ以降も、研究場所やその時々々の研究テーマのはやり廃りに応じた研究費配分などなどの外部要因

で私の研究は遍歴することになるのですが、その時々々の環境でなんとか出来たのは、「暗いと不平を言うよりも、すすんであかりをつけましょう（by「心のともしび」）」って楽天的な精神のおかげなんでしょうね。こんなことを書いているとお前はキリスト教徒？と誤解されそうですが、私は無神論&無信教&無宗教者で神様仏様は困ったときにしか頼りません（きっぱり！）。

最後にパレアナに戻るんだけど、協会の送付リストの中に松葉杖が必要な子供はいなかったのかな？とか、もらった松葉杖はその後どうなったんだろう？などなど疑問があるので、もう一度読み返してみようかなあ。誰か紙の本買って送ってください。



竹腰 清乃理（たけごし・きよのり）

- 1979年3月 京都大学理学部化学科卒業
- 1984年3月 京都大学大学院理学研究科博士課程化学専攻修了（理学博士）
- 1984年4月 カナダ プリティッシュコロンビア大学博士研究員
- 1986年10月 米国 カリフォルニア大学バークレー校博士研究員
- 1987年11月 材料科学技術振興財団研究員
- 1988年8月 北海道大学高分子学科 助手
- 1993年7月 京都大学理学研究科大学院 助教授
- 2005年 日本核磁気共鳴学会会員
- 2006年10月 京都大学理学研究科大学院 教授
- 2022年3月 退官
- 2022年4月 京都大学先端イノベーション拠点 非常勤研究員（現職）

NMR測定法に貢献された Ray Freeman博士の追悼

大阪大学蛋白質研究所

藤原 敏道

tjwr@protein.osaka-u.ac.jp

パルスNMR測定法の開発に大きな貢献をしたRay Freeman博士が2022年5月1日に亡くなりました。博士は1932年に英国で生まれノッティンガムで育ち、1957年にオックスフォード大学で博士学位を多核NMR検出で得ました。その後、物理学者でNMR研究の大家A. Abragamら(フランス国立物理学研究所)の下でポストドク研究を行い、1959年に帰国して国立物理学研究所で二重共鳴高分解能NMR研究の後に、装置メーカーVarian社の研究部門(米国、Palo Alta)へ移り、12年間NMR測定法開発に係りました。1973年からオックスフォード大学の物理化学研究室で、パルスFT-NMR、2次元NMRの実験法開発を行い、今も広く利用される方法を多く発表しました。1987年からはケンブリッジ大学に移り1999年に退職されました。この過程で、M.H. Levitt、G. Morris、J. Keeler、A.J. Shaka、E. Kupce、Ad Bax、G. Bodenhausen、S. Wimperisなど多くのその後のNMR発展を担う研究者に共同研究を通じて影響を与えました。その貢献でISMAR賞を受賞しています。

Freemanが活躍した1980年代に、私は院生や若手研究者としてNMRを学ぶ立場で大きな影響を受けたことを思い出して、その印象を述べて追悼します。

後にノーベル賞受賞したR.R. Ernstら(スイス、Zurich)による最初の2次元NMR論文発表の1976年頃から始まる実験法の開発競争では、R.R. ErnstらとR. Freemanらのグループはライバルであったと思います。研究活動の年代が重なり1年の間隔も置かず亡くなられた両者は経歴も似ています。二人は、優れた分析NMR装置のメーカーであったVarian社で開発を行い、大学へ移ってもVarian社やBruker社と強い協力関係がありました。これは分析NMR実験法がハードウェア技術に依存して進み、その基本的先進的技術をメーカーは開発し蓄積しているため、それを活用

する研究者にとってメーカーでの経験は有利で学ぶことがあったからでしょう。

対照的なのは、学術としてのNMRの理解や説明法です。Ernstらは、量子物理学の一般的原理に基づいてリュービル方程式からNMRの現象を演繹して説明するアプローチを取っていました。これに対してFreemanらは、磁化ベクトルモデルから直観的にも分かりやすく単純化してセンス良く説明していたと思います。これは当時、感覚ではとらえられない本質から現象を説明するドイツ観念論と感覚できる現象がすべてだとするイギリス経験論を発展させた、それぞれの国柄を反映したものと納得していました。

Freemanのユーモアと感性は、開発した方法に名付ける頭字語にも現れています。NMRの実験法は、NOESY、CPMG、CPMAS、WAHUHAなど専門用語や開発者の頭文字を並べた無意味な頭字語で表すことが多かったでしょう。ErnstらのCOSY、SECSYは意図せず偶然の組み合わせと理解していました。状況が一変したのは、INADEQUATE、INEPT、WALTZ、TANGO、DANTE、EXORCYCLEなど、頭字語という制約の下で筋肉やラジオ波パルス列のリズム感、意味を感じる命名をFreemanらは多用して提案したことです。これは英国紳士のセンスを持つ大学教授だからこそと思いました。また、オックスフォードを舞台にする「不思議の国のアリス」の本にあるような、FreemanのNMR法の特徴を描いた挿絵は有名であり、彼のセンスを感じます。挿絵はENCなど学会発表で見た記憶がありますが、現在は『A Handbook of NMR』の本で見ることができます。

私の開発課題との関連では、JEOL社に勤務していた当時、新開発の高速精密周波数変換ユニットを利用して広帯域デカップリング法を設計することを上司の永山さんから提案されたことがあります。すでに、Freemanらは、彼ら一流の考

えでMLEV、WALTZ法をすでに発表していました。私は、JEOL顧問であったJ.S. WaughのJ-スケーリング計算理論を使い、デジタルハードウェア技術者の穴井さんらから技術情報を得て、超広帯域デカップリングパルスMPFを開発しました。この結果を、複合パルスデカップリング法の創始者Freemanらが最前列に座るNMR討論会1986で発表できたことは、名誉なことと思いました。

その10年後にFreemanがNMR討論会で招待講演された際には、Freeman研究室に留学されていた中沢先生の奈良のお宅で夕食をともにして、上品な紳士であると分かりました。

なお、ここではISMARのNews (<https://ismar.org/2022/05/14/ray-freeman-1932-2022/>)を参考として利用しました。

Ray Freeman 先生を偲んで

奈良女子大学名誉教授

中沢 隆

t.nakazawa@cc.nara-wu.ac.jp

本学会の Newsletter^[1]をはじめケンブリッジ大学の訃報^[2]や International Society of Magnetic Resonance (ISMAR) などの追悼記事^[3,4]で会員の皆様はご存知の通り、Ray Freeman 先生が昨年3月1日に逝去された。Freeman 先生の研究や人物像については既に広く知られており、磁気共鳴学会の会員でもない筆者がここで何事かを付け加えるものがあるとすれば、1995年の6月からわずか9ヶ月間ながらケンブリッジ大学の研究室でお世話になり、その後何度かの学会やシンポジウムで再会し、手紙や論文を通じて知った Freeman 先生に関連するいくつかの思い出しかない。なお、筆者が研究室を訪れた1日目に、「日本人は shy だから言いつらいとは思いますが、自分を Ray と呼ぶように」とのことだったので、以下は取返して Ray と記す。

Ray はダービーシャーの Long Eaton のご出身である。1932年生まれであるから享年は90歳になる。昨年に Richard Ernst が87歳で、Varian Associates で Ernst と共同で最初のパルス FT-NMR 装置を開発した Weston (Wes) Anderson も同じ2021年に93歳で亡くなっている。Ray をオックスフォード大学時代に指導した Sir Rex Richard は2019年に96歳で、またさらに若き Ray がパリで師事し、NMR のバイブルともいべき The principles of Magnetic Resonance^[5] の著者である Anatole Abragam は2011年に97歳で亡くなった。Ray にしてみれば NMR の発展と共に歩んできた師や同僚をここ数年で相次いで亡くしたことになる。その喪失感と寂しさは察するに余りある。それにしても NMR の創始者たちがほぼ例外なく80歳を超えても高度な知的活動を維持していたことに驚かざるを得ない。

Ray と日本

Ray は NMR 討論会を中心に、NMR 関係の学会に招待されて何度も来日している。ところが意外

なことに Ray のグループには世界中から研究者が集まっていたにも関わらず、日本人は極めて少ない。この追悼文の執筆者としては本来ならば Ray が常々 Mike と呼んで懐かしがっていた稲垣冬彦先生 (オックスフォード大学への留学以来か) が適任であったが、残念ながら2016年に若くして亡くなられてしまった。もう一人、北海道教育大学に在職中に Ray の研究室に滞在され、筆者にもケンブリッジ行きを勧めて下さった下山雄平先生にも触れなければならない。Ray によれば「Yuhei の英語はほとんど完璧だった」とのことで、同じ日本人として誇らしかった。生理学研究所 (岡崎) の亘弘先生のもとで筆者がポスドクとして二次元 NMR を使ってペプチドの溶液内構造を解析していた時、しばしば ESR の共同研究にいられていた下山先生と知り合ったのは1981年のことであった。その時以来の研究結果をまとめて1986年の第25回 NMR 討論会 (東京) で発表した時、Ray の演題は “Spatial Localization Techniques for *in vivo* NMR”^[6] であった (この時の座長が稲垣先生)。当時の筆者が知る Ray といえば、大学院生時代に¹³C 標識したタンパク質の縦緩和速度の測定に用いた反転回復法^[7] や、INEPT^[8] のような有機化合物の分子構造の摩訶不思議な解析法の開発者であったが、講演の内容が MRI に関連するものだったのに驚いた。当時 MRI の実用化に深く関わっておられた亘先生が熱心に聴講されていたのが印象に残っている。我が国の NMR の重鎮、荒田洋治先生 (2019年にご逝去) とは A Handbook of Nuclear Magnetic Resonance^[9] の翻訳や、後でふれるように学会活動を通じて交流があったらしい。

NMR の歴史と Ray

Ray が世界最初の市販のパルス・フーリエ変換 NMR 装置 (Varian XL-100 と CFT-20) を開発したことは、ケンブリッジに行く直前まで迂闊にも

筆者は知らなかった。以来、shim コイルの設計からフーリエ変換NMRに至る Varian Associates の様々な試みや、Varian 内での Wes Anderson や Ernst との関わりなどを、Varian VXR-400 を操作しながら、あるいは午後3時のお茶の時間などでの会話を通して初めて知った。1995年の夏、“Spin Choreography”^[10] を執筆中であった Ray は、時々実験室で研究の進行具合を見に現れた。装置の shim を合わせている時、sample spinning は Wes Anderson の師である Felix Bloch のアイデアであったことも教えてもらった^[11]。非常に贅沢な経験で忘れたことも多く、今から言えばメモを残しておくべきだった。1991年に Ernst がノーベル化学賞を受賞した時に有名になった、最初の FT-NMR の論文が *J. Chem. Phys.* に2度にわたって reject された背景の話も興味深かった。初期のフーリエ変換¹H NMR スペクトルの測定は数十分で済むが、取得した FID データのデジタル化から FT 計算に1日、さらにシグナルの位相を修正するのもう一日の計算が必要になるので、構造解析が目的の有機化学者には計算時間の長さが耐えられなかっただろうという話に、大学院で有機化学を専攻した筆者は初めて納得がいった。この話の詳細についての記憶は薄れてしまったが、幸い Ray の論文^[12] で確認できる。これを含めて Ray が最も好んで話題としたのが1960年代の Palo Alto における Varian Associates での思い出である。The Varian story と題する論文^[13] では、

“Conventional ‘Master of Business Administration’ (MBA) wisdom would have insisted that the new group should concentrate exclusively on design and construction of the first commercial NMR spectrometer, thus ensuring continued viability for the venture. But the fledgling Varian scientists enjoyed a remarkable freedom to be flexible in their choice of project. Unstructured ‘blue sky’ research is fun, although mostly restricted to a lucky few (pp. 80).”

と言うくらい、ここでの研究生生活を懐かしんでいる。Ray の研究室の心地良さの起源はここにあったのだろうかと思う。ところがやがて Varian 社は冬の時代を迎える。

“Agilent’s progressive withdrawal, first from medical imaging and then from high field NMR, represented the writing on the wall, but it still came as a shock and a bitter disappointment when they announced (on 14 October 2014) the immediate closure of their NMR business, essentially putting an end to the Varian era (pp. 84)^[13].”

と嘆いている。実際、Varian のユーザーの一人であった筆者にとっても寝耳に水の事態であった。どのような状況でも冷静沈着に対応して、文章にはユーモアの風味を加えることを決して忘れない Ray が shock とか bitter disappointment などという言葉を使うのはよほどのことに違いない。ただ、これで終わらせないのが Ray である。Varian 社の終焉を、ゲルマン諸部族との戦いで歴史的な敗北を喫した古代ローマ帝政の将軍 Quinctilius Varus の悲劇に擬えつつ、Varian 社の経営戦略や社会貢献を讃えている。Ray の文章は平易でかつ明快なことで定評があるが、時々さりげなく引用されている西洋の歴史や古典文学をうっかり見落とすと、そこに込められた深い意味を取り損なう恐れがある。

Acronym

古典といえば DANTE (Delays alternating with nutation for tailored excitation)^[14] がすぐに思い浮かぶ。一連の選択励起パルス (DANTE) により磁化ベクトルの先端が球体の+Z軸から表面をジグザグに移動する向きと、『神曲』の煉獄篇^[15] でダンテが師のヴェルギリウスと共に煉獄山を巡る岩場の坂を登って頂点の天国を目指す向きとが正反対であることを名前の由来としている^[14]。単なる語呂合わせや言葉遊びではなく、共通するイメージまで考えられていて、Handbook^[9] の Selective Excitation の項には煉獄山の挿絵まである。同じ論文^[14] では『神曲』の地獄篇からとった INFERNO (これも acronym!) も提案している。また何の acronym であるか忘れてしまったが、実験室には PANDORA と題する手作りの小冊子が備え付けられていた。「本物(?) の PANDORA の箱は開けると大変だけど、この booklet はとても便利だ」と教わった。

RF (radio frequency) をイニシャルとする Ray は acronym の名人であるが、それには一定のルー

ルに基づいている。Spin Choreography^[10]では特に

“I have waged a deliberate campaign to minimize the use of abbreviation and technical jargon, without carrying this to impossible extremes. The fact that the word jargon is derived from zircon, a common gemstone of little value, warns us to be wary of its overuse. The proliferation of NMR pulse sequences has encouraged the acronyms as a shorthand notation, where the full descriptions would be tedious and repetitious (Introduction).”

と、ことわっている。さらに巻末には適切な Acronymとして、

“Acronyms should be short, apt, descriptive and preferably amusing (Appendix: Acronyms).”

という条件があげられている。しかし、Ray といえどもこういった条件を満たすものを創造するのは簡単ではないようで、筆者らとの論文が accept された時の手紙 (1996年4月9日付) に

“Usually acronyms are very hard to find. This one (SATIS) came to me very suddenly in the bath (like Archimedes!) so it was probably preordained. We should not underestimate the importance of a name.”

と、書いている (ここでアルキメデスが出てくる場所に注目!)。SATISの意味は

“The program SATIS (symmetrization algorithm for treatment of INADEQUATE spectra) is available from the authors on request. In favorable cases, it should convert the sensitivity from inadequate to just about satisfactory.”^[16]

である。ここでも INADEQUATE がただの言葉遊びではなかったことに気付いた。

量子コンピューター

Ray が MRI について興味を持ったばかりでなく

実験もしていたことは1986年の第25回NMR討論会での講演からもわかるが、講演で初めて公表された研究も少なくない。1998に東京都立大学で開催された第18回生体系磁気共鳴国際会議(ICMRBS)の招待講演でRayの演題は確か“Spin Choreography”で、前半は核スピンを自由自在に練るテクニック(荒田先生は「舞う」と訳されていたと思う)、後半はこのテクニックの量子コンピューターへの利用についてであった。筆者は成田から新宿までの渋滞に巻き込まれた空港バスの中でその内容を聞いていたが、ほとんどの聴衆にとって初めて聞く話題であったと思われる。講演の後に「何でこの研究をしたのか」という意味の質問があり、この質問への回答は、“Just for fun!”であった。まさに“Unstructured ‘blue sky’ research is fun”である。量子コンピューターの実用化が世界的な重要課題の一つになっている現在から思うと、電磁誘導現象を発見したFaradayが「電気が何の役に立つのか」と質問をされた時に「まもなく税金がかけられるようになるでしょう」と答えた逸話を思い出す。Rayが量子コンピューターに興味を持った時期は、遅くとも1996年後半から1997年であろう。1997年に発表された量子コンピューターの論理回路^[17]にINEPT^[8]が用いられており、1998年にはRayの「古巣」のオックスフォード大学に設立されたばかりのCentre for Quantum Computationからも同様の原理に基づくアルゴリズム^[18]が提唱されている。量子力学や数学に堪能なRayが開発したINEPTやINADEQUATEが有機化合物の構造解析(有機化学は専門外だと言っていた)に、またINEPTがTROSYなど多次元NMRのパルス系列に組み込まれてタンパク質の立体構造解析に役立っているように、NMRのSpin Choreographyと量子コンピューターの相性の良さにRayが目撃したとしても不思議ではない。筆者がケンブリッジに滞在した1996年の2月末までにRayが量子コンピューターについて語ることはなかったので、この研究はICMRBSでの講演までの長くても3年以内に着手していたはずである。定年を前にして新しい研究に挑戦しようとする情熱と好奇心には驚くばかりである。次に述べる定年記念シンポジウムの講演で、Rayはシェークスピア劇“Much ado about nothing”(空騒ぎ)を題名に選んだ。様々なパルスを与え(much ado)たスピとその影響を受けるだけのもう片方のスピン(do

nothing) の組み合わせからなる2スピン系を用いた論理ゲートを構築するという、研究を始めてわずか1から2年で発表した論文^[19]の内容を単純化したものであった。当時まだ40代だった筆者がこの研究をもう少し早く、また深く理解していたら、化学者として量子コンピューターの「核スピン qubit」分子の設計で少しは貢献できたのではなかったのかと悔やんでいる。この講演で、量子コンピューターの実用化にはもっと qubitを増やさないといけないのでまだ多くの障害を乗り越えないといけないが、“It’s fun to try”と付け加えることを忘れないのがRayらしい。

定年とその後

1999年4月にRayの定年を記念するSpin Choreography: A Symposium in Appreciation of Ray Freemanがケンブリッジで開催された。世界17カ国の研究者が参加し、NMRの国際学会に遜色ない規模のこのシンポジウムは、Rayのこれまでの業績を讃える一方で、新しい測定法や固体NMR、生体内イメージングなど幅広い分野の4日間にわたるセッションからなっていた。最終日のセッションの後に撮った集合写真(図1)からわかる通り、Ernst、Wes AndersonをはじめRayの門下生、共同研究者だけでこの顔ぶれとなるとこ

ろが壮観である。写真撮影の後、夕方からシンポジウム参加者とその家族は1347年に設立されたPembroke Collegeを会場とするパーティーに集まった。このパーティーには普段はアメリカ、フランス、カナダ(?)と世界各国に分散しているAnne-MarieとRayご夫妻の家族も参加していた。当時86歳になるSir Rex RichardsのスピーチではRayのLincoln College(オックスフォード)での新入生時代のことから夫妻の馴れ初めまで飛び出して大いに盛り上がった。Anne-Marieは文学を専攻するフランスからの留学生だったそうである。

こうした記念行事ではたいてい定年後の計画が話題になるものであるが、この会では誰もRayが研究を続けることを信じて疑わないようであった。事実、その後はJesus Collegeの名誉フェローとしてĒriks Kupče(当時Varian、現Bruker UK Ltd.所属)と共同でNMRの研究を続け、定年後10年以上になる2010年にも論文がJACSに掲載されている^[20]。その間にもう一つの著書、“NMR in Chemistry and Medicine”^[21]を出版し、さらにNMRのウェブサイトwww.ray-freeman.orgを立ち上げている(2022年6月にJames Keelerが再建した)^[22]。

このシンポジウム以来、筆者はRayと会うことはなかったが、たまに少し詳しい近況報告をする



図1 Spin Choreography: A Symposium in Appreciation of Ray Freemanの集合写真。前列左から14、15番目がAnne-Marie, Ray Freeman夫妻。16番目がW. Anderson。最後列中央少し左寄りにR. Ernstの姿が見える。この写真は筆者の机の前に23年間掲げてあったので左右の額縁の影になっていた部分を残して褪色している。J. Keeler(前列右から11番目あたりでラグビージャージーを着ているM. Levittの右隣で長身)もオフィスに同じ写真を飾っているそうである。撮影場所はDepartment of Chemistryの正面玄関前。1999年4月10日、シンポジウム終了後に撮影(Eaden Lilley Photography, Cambridge)。

と、その倍以上の長さの手書きの返事がくるし、年末にはクリスマスカードが届く。定年になり自由な時間ができた筆者はケンブリッジに行こうかと思っていた矢先にコロナ禍で渡航できなくなってしまった。そうこうするうちに突然の訃報(池上先生経由で藤原先生からのメール)に、我が目を疑った。今はこの追悼文を書くことで、気持ちの整理をつけている。

1999年のシンポジウムにはポスターセッションもあり、その会場の一面にRay Freeman一門の系図(family tree)(図2)が掲示されており、各自勝手に自分の名前を書き込む仕組みであった。筆者も迷わずその末席を汚したが、大きなsubfamilyを擁する参加者もいたので、その系図には空白がほとんど残らなかった。Van De VenとHilbersが提案した系統樹型に直積演算子の時間発展を表すダイアグラム^[23]を基にRayが提案したスピンのfamily tree^[10]は、「スピン演算子の作用によって系統的に変化するスピン状態の時間発展」と「生物の系統樹(phylogenetic tree)と進化」を共通するtreeとevolutionで括った秀逸な命名の一つである。完成したfamily treeは写真に撮っておけばよかったのだが、残念ながら図2をもとに誰がどこに当てはまるかは読者のご想像に任せるしかない。Rayが築いた壮大な学問的系統がこの系図に凝縮しているように見えた。この系統の中で、Rayが愛したかつてのVarianでの

unstructured 'blue sky' research^[13]を楽しむ空気が脈々と受け継がれているのであろう。それがa lucky fewに限られなかったことはin Appreciation of Ray Freeman、すなわち「Rayに感謝する会」としたこのシンポジウムの盛会で証明されているように思う。Rayならばもっとうまく諭えるであろうが、9ヶ月という短い滞在期間にRayから与えられた様々な刺激(RFパルス)は以後27年間にわたって筆者の研究活動(スペクトル)に広く大きな影響を及ぼしている。筆者ばかりでなくRayにゆかりのある研究者には、Rayの記憶がこれからも長く生き続け、何世代にもわたって伝えられていくものと信じている。

謝辞

Spin Choreography: A Symposium in Appreciation of Ray Freemanの集合写真の使用を認めていただいた当時のオーガナイザーのJames Keeler博士(Head of Yusuf Hamied Department of Chemistry, University of Cambridge)に深く感謝いたします。同博士から紹介されたウェブサイト^[22]により、筆者は記憶の誤りを正したほか、元の記述の正確さをチェックすることができた。筆者にこの追悼文を書く機会を与えてくださった池上貴久先生やご校閲を賜りました野村 薫先生をはじめ日本核磁気共鳴学会に厚くお礼申し上げます。

$$I_z \xrightarrow{\phi \tilde{I}_y} I_z \cos \phi + I_x \sin \phi$$

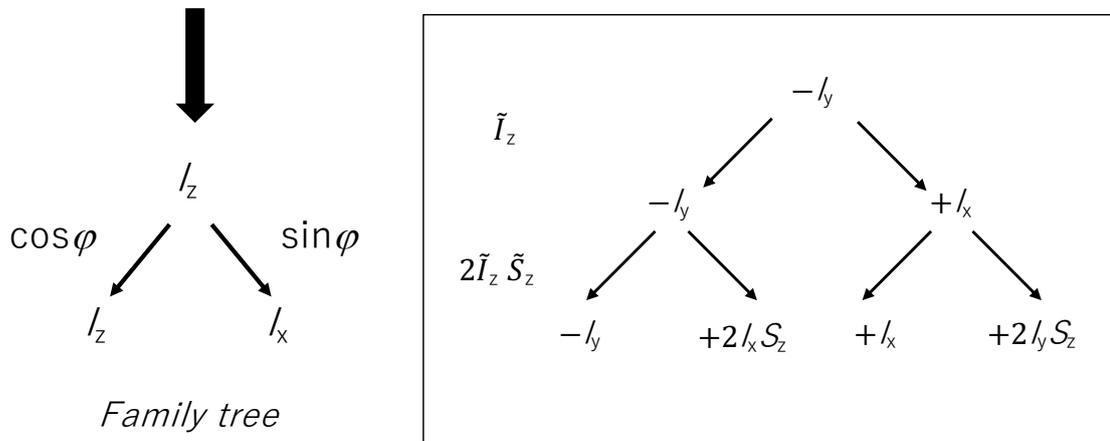


図2 直積演算子の時間発展の簡易表記法とfamily tree^[10]。Ray一門のfamily treeは、例えば四角で囲った右の図の頂点の $-I_y$ がRayで左下の $-I_y$ にA, Bax、右下の $+I_y$ にG. Morrisが来て、さらに頂点の $-I_y$ がからもういくつか下向きの矢印が出るという仕組みである。斜め上のW. AndersonからRayに矢印が降りてきていたように記憶している。最後はスペースがなくなって、矢印が真横や上に向く、あるいは長い曲線を描くカオス状態になった。

参考文献

- [1] 藤原敏道「NMR測定法に貢献されたRay Freeman博士の追悼」日本核磁気共鳴学会 https://www.nmrj.jp/pdf/nl/20220530_1082_1.pdf
- [2] A. Bax, M. Levitt. Ray Freeman, 1932-2022 (Posted by Grzesiek, S.) ISMAR, May 14, 2022. <https://ismar.org/2022/05/14/ray-freeman-1932-2022/>
- [3] Yusuf Hamied Department of Chemistry. Professor Ray Freeman, 1932-2022. Wednesday, May 11, 2022. <https://www.ch.cam.ac.uk/news/professor-ray-freeman-1932-2022>
- [4] J. Keeler, G. A. Morris. Ray Freeman, 1932-2022. *J. Magn. Reson.* **341**, 107248 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2022.107248>
- [5] A. Abragam. The Principles of Magnetic Resonance. Oxford University Press. (1961).
- [6] R. Freeman. Spatial localization techniques for *in vivo* NMR. 第25回NMR討論会講演要旨集, L6 (1986).
- [7] R. Freeman, H. D. W. Hill. Spin-lattice relaxation in high-resolution NMR spectra of carbon-13. *J. Chem. Phys.* **53**, 4103-4105 (1970).
- [8] G. A. Morris, R. Freeman. Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 760-762 (1979).
- [9] R. Freeman. A Handbook of Nuclear Magnetic Resonance, Longman, 1987. 邦訳: 坂口 潮, 嶋田 一夫, 荒田洋治「NMRハンドブック」共立出版 (1991). 原書第2版は1997年発行.
- [10] R. Freeman. Spin Choreography. Oxford University Press (1998).
- [11] M. H. Frey, R. Crouch. NMR innovation: a manufacturer's perspective in analytical advances and new applications. (2018). <https://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/353286-NMR-Innovation-A-Manufacturer-s-Perspective-on-Analytical-Advances-and-New-Applications/>
- [12] R. Freeman. The Fourier transform revolution in NMR spectroscopy. *Anal. Chem.* **65**, 743A-753A (1993).
- [13] R. Freeman, G. A. Morris. The Varian story. *J. Magn. Reson.* **250**, 80-84 (2015).
- [14] G. A. Morris, R. Freeman. Selective excitation in Fourier transform nuclear magnetic resonance. *J. Magn. Reson.* **29**, 433-462 (1978).
- [15] ダンテ・アリギエーリ (平川祐弘訳)「神曲 煉獄篇」河出文庫 (2009).
- [16] T. Nakazawa, H. Sengstschmid, R. Freeman. Enhancement of INADEQUATE spectra according to symmetry criteria. *J. Magn. Reson. A* **120**, 269-273 (1996).
- [17] N. A. Gershenfeld, I. L. Chuang. Bulk spin-resonance quantum computation. *Science* **257**, 350-356 (1997).
- [18] H. K. Cummins, J. A. Jones. Nuclear magnetic resonance: a quantum technology for computation and spectroscopy. *Contemporary Physics* **41**, 389-399 (2000).
- [19] N. Linden, H. Barjet. R. Freeman. An implementation of the Deutsch-Jozsa algorithm on a three-qubit NMR quantum computer. *Chem. Phys. Lett.* **296**, 61-67 (1998).
- [20] Ě. Kupče, L. E. Kay. R. Freeman. Detecting the "Afterglow" of ^{13}C NMR in proteins using multiple receivers. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 18008-18011 (2010).
- [21] R. Freeman. Magnetic Resonance in Chemistry and Medicine. Oxford University Press (2003).
- [22] <http://www-keeler.ch.cam.ac.uk/freeman/>
- [23] F. J. M. Van De Ven, C. W. Hilbers. A simple formalism for the description of multiple-pulse experiments. Application to a weakly coupled two-spin ($I = 1/2$) system. *J. Magn. Reson.* **54**, 512-520 (1983). (文献9のProduct Operatorの項ではfamily treeをevolution treeと呼び、文献: J. Y. Lallemand. École d'Été sur la Spectroscopie en Deux Dimensions. Orléans, France (1984)を引用している。)
- [24] The Academic Family Tree (<https://academicfamilytree.org>) におそらくシンポジウムのオリジナル版とは独立にfamily treeが加えられた (<https://academicfamilytree.org/chemistry/tree.php?pid=51839>)。図1に見られるシンポジウムの参加者とは、最近急増した現役世代のために顔ぶれが相当異なっているが雰囲気は似ていないこともない。

ミュオンビームを利用した リチウムイオン電池研究

¹高エネルギー加速器研究機構、²総合科学研究機構

梅垣 いづみ¹、杉山 純²

umegaki@post.kek.jp

1. はじめに

持続可能な社会を実現するための17の目標 (SDGs: Sustainable Development Goals) のひとつに、“9. エネルギーをみんなに”と“12. つくる責任 つかう責任”がある^[1]。前者では、石油や石炭などの一次エネルギーではなく、二酸化炭素を排出しないグリーンエネルギーや酸素と水を材料とした燃料電池によって発電した電力を、世界中どこにいても安価に安定的に享受できることが求められる。蓄電はこれを実現するために重要な役割を果たすと期待されている。

リチウム (Li) イオン電池は、蓄電池として重要な役割を既に果たしている。私たちの生活の身の回りの家電やノートパソコンはもとより、航空機や自動車にも搭載されている。このLiイオン電池の安全性をより高め、より効率のよい電池を開発するために、日夜研究がなされており、その一環として量子ビームを用いた研究も盛んに行われている。私たちは特に、ミュオンの「透過性」と「スピン偏極度」に着目して、ミュオンスピン回転緩和 (μ SR: muon spin rotation and relaxation) 法により、電極活物質中のLiイオンの拡散について研究してきた。加えて、負ミュオン (負電荷を持つミュオン) を照射して発生する、ミュオン特性X線のエネルギーが高いことに着目

し、Liイオン電池内部のLi観測に取り組んできた。ここでは、ミュオンビームを活用して進めてきた、Liイオン電池の研究について紹介したい。

2. Li イオン電池と課題

Liイオン電池の基本構成は、①正極、②負極、③セパレータ、④電解液である。正極と負極がセパレータを挟んで対峙していて、その間をLiイオンが電荷担体として往復し、外部回路に電流が流れる (図1)。したがって、Liイオン電池が効率よく電気を蓄え供給するためには、Liイオンが電池の内部で円滑に移動する必要がある。

電極中でLiの著しい偏りは局所的な過充電・過放電となり、電極の平均の電圧値とは異なるため、電池全体の容量低下などの劣化につながる。したがって、Liイオンの電極内分布や流れを非破壊で捉えたいとの要望がある。また、Liイオン電池の不適切な使用により、電極中のLiイオンが還元されて金属として析出することがある。これは、電池の熱安定性を低下させるので、析出条件や析出状態を非破壊で知りたいとの要望もある。

3. Li イオンの拡散係数

電池の活物質中のLiイオンの動きやすさを示すのが自己拡散係数 (D_{Li}) である。多くのLiイオン電池の材料では、 $D_{Li} = 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$ 程度である。これはどのくらいの動きやすさかという、粒径 $10 \mu\text{m}$ の活物質の表面にLiが到達してから、約10分で活物質中心に到達する、つまり、10分程度で充電するための物質条件となる (図2 (a) (b))。

Liイオンの拡散現象を捉えるのに適切な時間窓を有しているのが μ SRである。 μ SRの時間窓は D_{Li} に換算すると、 $10^{-13} - 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$ の領域に開いており、中性子準弾性散乱では感度の無い遅い現象を捉えられる^[2]。電池材料では多くの場合、磁性元素 (例えばCoやNi, Mn, Fe) を含むため、高

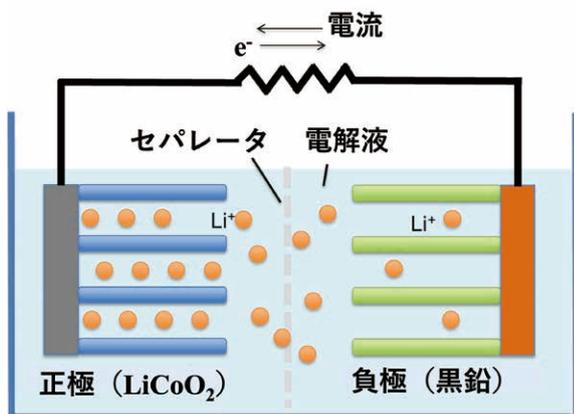


図1 リチウムイオン電池の概略図

磁場印加が測定に必須の固体NMRでは、磁性によるスピン格子緩和がイオン拡散による変化を隠してしまう。より一般的な電気化学測定による拡散係数測定は、電極のサイズや電池のセル、測定条件などに強く依存するため、材料固有の値を求められない。

μ SRによる拡散測定の対象は、粉末、電極シート^[2]、薄膜^[3]、ラミネート型Liイオン電池、固体電池、と形状によらない。

4. μ SR法による拡散現象の測定

ミュオンは素粒子の一種で、正か負の素電荷とスピン1/2を有する。以下では、世界最大強度のミュオンビームを供給する大強度陽子加速器施設(J-PARC)を例に紹介する。加速された陽子を炭素に照射すると核反応によりパイオン(パイ粒子)が生成する。このパイオンは直ちにミュオンとニュートリノに崩壊する。正(負)電荷を持つパイオンから崩壊するのが正(負)ミュオンである。通常の μ SRでは「表面ミュオン」と呼ばれる、静止したパイオンから崩壊した正ミュオン(エネルギーは4.1MeV、運動量28.6MeV/c)を用いる。表面正ミュオンのスピンは運動方向と反平行に100%揃っている。これを完全偏極していると呼称する。NMRやESRでは、スピン偏極を実現するために外部磁場を印加するが、 μ SRではその必要がない。すなわち零磁場中でも内部磁場を検出できることは、 μ SRの大きな特長である。この正ミュオンが試料に打ち込まれると、原子やイオンとの衝突により徐々に運動エネルギーを失い、最終的には試料内の最もポテンシャルエネルギーの低い箇所止まる。ミュオンの飛程は150–200mg/cm²で、密度1g/cm³の試料の場合、1.5–2mmの厚さで停止する。

Liイオン電池の正極材料にはLiと遷移金属の

複合酸化物が用いられることが多い。入射された正ミュオンは酸素近傍に停止する。その位置で、ミュオンのスピンがLiをはじめとする各原子の核磁場が形成する内部磁場を感じる。ミュオンスピンはその内部磁場の大きさに比例した周波数で歳差回転する。歳差回転の周波数[Hz]と内部磁場[T]の比例係数は磁気回転比(γ_μ)と呼ばれ、 $\gamma_\mu/(2\pi) = 13.553$ [kHz/Oe] = 135.53 [MHz/T]である。比較的大きな値なので、核磁場のような小さな内部磁場の変化でも容易に捉えることができる。ちなみに、NMRでよく利用される水素(¹H)の場合は、 $\gamma_\mu/(2\pi) = 42.58$ [MHz/T]である。ミュオンは平均寿命2.2マイクロ秒で、陽電子とニュートリノに崩壊する。崩壊の際に、ミュオンのスピンの向きに陽電子を選択的に多く放出する。そこで、崩壊陽電子の時空間分布を検出することで、ミュオンスピンの向きの時間変化を知ることができる。つまり、入射時に完全偏極していたミュオンのスピン偏極度の時間変化を抽出できる。実際には、ミュオンの寿命による指数緩和を打ち消すために、前後の検出器による崩壊陽電子の計測数の差を和で割って得られる「非対称性」の時間変化を扱う。

物質内の磁場は「電子磁場」と「核磁場」の足し合わせである。一般に前者は後者より桁違いに大きいので、両者に起因するミュオンスピンの回転を明瞭に区別できる。⁷LiのスピンはI=3/2(⁶LiのそれはI=1)なので、Liを含む正極活物質中の核磁場をガウス分布するランダム磁場とみなせる。ミュオン位置での分布幅は、典型的には数[G]程度である。この場合に零磁場中の μ SRで得られる非対称性の時間スペクトルは、非対称性が時間と共に減少して最小値に到達した後、増加して初期値の1/3まで回復する。これは零磁場中でのスピン緩和を予言した静的な「久保–鳥谷

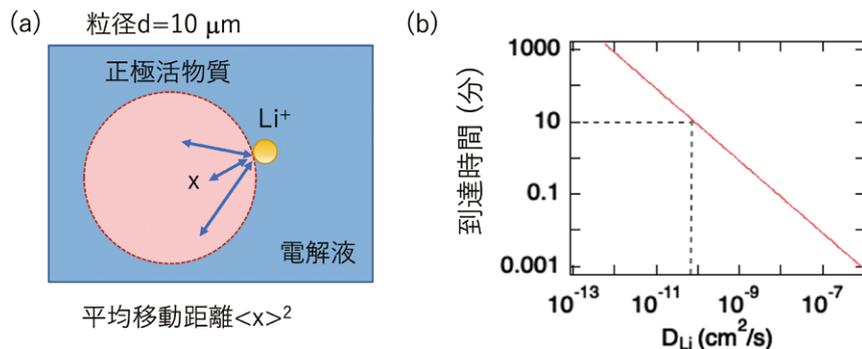


図2 (a) 正極活物質にLiイオンが接触してから中心まで到達する時。(b) Liイオンの自己拡散係数と到達時間の関係。

部」関数で説明できる。核磁場を形成するLiイオンが動き出すと、ミュオンの感じる内部磁場が徐々に均一化して、非対称性の時間変化は小さくなる。このような内部磁場の変化を調べることで、Liイオンの拡散係数を導出する。

5. Li イオン電池の電極材料の拡散係数

正極材料の拡散測定に関する報告例は多いので、ここでは負極材料中のLiイオン拡散を μ SR法で調べた結果を説明する^[4]。Liイオン電池の負極には黒鉛が用いられることが多い。黒鉛負極に充電すると黒鉛の層間にLiイオンがインターカレートするが、その際に $C_{12}Li$ や C_6Li のような階層構造を形成する。満充電状態では負極全体が C_6Li になる[図3(a)]。

実際のLiイオン電池の負極は、銅箔に黒鉛が塗工されたシートである。これに充電反応でLiイオンを電気化学的に挿入して、 C_6Li と $C_{12}Li$ に組成を調整した。これらのシート電極を μ SR測定を試料とした。 C_6Li あるいは $C_{12}Li$ に入射されたミュオンは、炭素とC-H結合的な安定結合状態にあることが、第一原理計算で予測された(図3(d)-(f))。得られた μ SRスペクトルを図4(a)(b)に示す。50Kの零磁場 μ SRスペクトルは、静的な久保-鳥谷部関数に従うので、Liイオンもミュオンもいずれも動いていない。核磁場相当の縦磁場(LF=5G, 10G)、つまり入射時のミュオンスピと平行な外部磁場を印加すると、緩和が小さくなる(図4(a))ことから、ミュオンが感じている内部磁場は核磁場相当であることがわかる。核スピを有する炭素は天然存在比で

1%程度しかないので(表1)^[5]、ミュオンの感じる核磁場を担うのはLiである。温度を上昇させると、零磁場 μ SRスペクトルの時間変化(緩和)は抑制され、その挙動は動的な久保-鳥谷部関数で良く説明された。これはLiイオンが運動していることを示す(図4(b))。各温度の μ SRスペクトルを解析して、磁場分布幅 Δ と磁場揺動速度 ν の温度依存性を得た(図4(c)(d))。

低温では磁場分布幅 Δ は $0.22 [\mu s^{-1}]$ (2.58Gに相当)でほぼ一定だが、250K付近から温度上昇とともに Δ は減少する。これは運動による先鋭化と呼ばれ、拡散頻度が增大することによって、ミュオンが感じる内部磁場が均一化されることに起因する。実際に、拡散頻度の増大は ν の増加とし観測された。

シート電極の集電体である銅箔の影響については、予め銅箔単体の μ SRスペクトルを測定し、シート電極の μ SRスペクトルから差し引いて除去した。

磁場揺動速度 ν 、ジャンプ距離 s で拡散するLiイオンの自己拡散係数は、経路ごと($i=1, 2, \dots, n$)の足し合わせとして以下のように表わされる^[6];

$$D_{Li} = \sum_i^n \frac{1}{N_i} Z_i s_i^2 \nu \quad (1)$$

N はサイト数、 Z はサイトの非占有確率を表している。 C_6Li の結晶構造から、ジャンプ拡散の経路を仮定する。最近接のLiサイトはすべて埋まっているので、格子間位置($s_1 = 2x\sqrt{3}/2 \times 4.29/3 \text{ \AA}$, $N_1 = 6$)へのジャンプである。このようにして、 C_6Li のLiイオンの自己拡散係数を各温

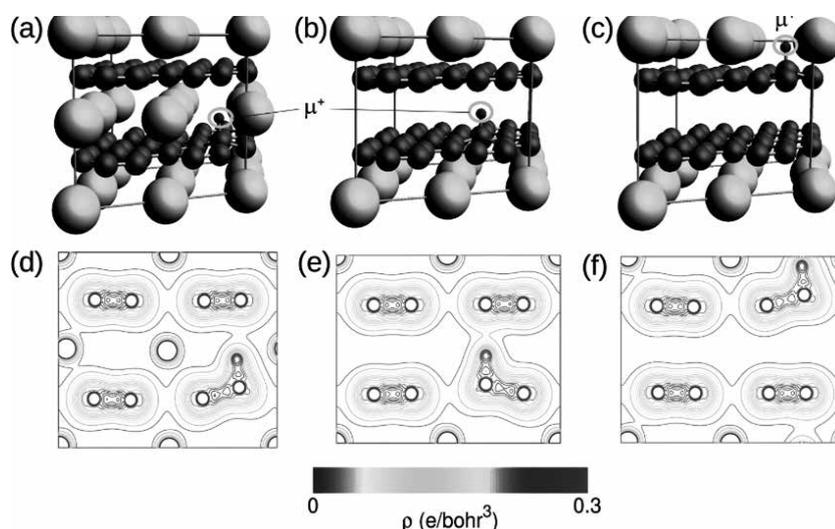


図3 (a) C_6Li 、(b)(c) $C_{12}Li$ の結晶構造。(d)-(f) 第一原理計算のポテンシャルエネルギーの結果。Copyright 2017 Phys. Chem. Chem. Phys.

度で求めた。

図5に示すように、250 K以上で自己拡散係数は大きく増加した。これは高磁場 μ SR^[7] や固体NMR^[8] の結果とも整合する結果だった。自己拡散係数の温度依存性から、熱活性化エネルギーは $E=270$ meVと求められた。 $C_{12}Li$ の自己拡散係数はより低温から温度とともに増加した。これは階層構造の相違を反映しているらしい^[9]。

Liイオンの自己拡散係数を調べることは、その電池材料の潜在的なLiの動きやすさの指標を求めるだけでなく、電池反応に関わる面積^[10] やキャリア濃度^[11]、拡散経路^[12]などの情報を提供してくれる。最近では動作状態の電池内の電極中のイオン拡散を測定することも可能となった^[13,14]。さらに関心があれば論文を参照されたい。

6. 負ミュオンを用いた μ^- SR

正ミュオンは結晶格子内の最も静電ポテンシヤ

表1 LiとCの核磁気モーメント^[5]

		天然存在比 (%)	核スピン	核磁気モーメント ($/\mu_N$)
Li	⁶ Li	7.59 (4)	1	0.8220467
	⁷ Li	92.41 (4)	3/2	3.256424
C	¹² C	98.93 (8)	0	0
	¹³ C	1.07 (8)	1/2	0.702411

ルが低い位置にいて、低温では安定である。しかし、ある温度以上ではミュオン自身が拡散し始める。従って、拡散種がミュオンであるかLiイオンであるか(あるいは両者か)を知ることが重要である。

このために、物質中で原子核に捕獲される負ミュオンを用いた μ^- SRを用いる^[15]。Li以外の負ミュオンを捕獲したミュオン原子は、材料の分解温度まで安定で動かない。つまり、負ミュオンは原子位置に停止して、Liの核磁場を感じる。ミュオン位置が異なるために、 μ^- SRで求める Δ は μ^+ SRの結果とは異なる。しかし、Liの動的な挙動は同様と期待される。実際、 $LiMnPO_4$ ^[16]と $Li_4Ti_5O_{12}$ ^[17]の内部磁場を μ^+ SRと μ^- SRで調べ、内部磁場の動的な挙動の主因がLiイオンの拡散に起因することを明らかにした。

負ミュオンのスピン偏極度は、原子核に捕獲される際に15%以下まで低下する。このために、 μ^- SRで μ^+ SRと同程度の精度の結果を得るためには、36倍以上の統計が必要となる。そこで拡散種の同定には μ^- SRを利用し、自己拡散係数の温度依存性の詳細については μ^+ SRを用いるハイブリッド測定を実施している。

ここで必要な測定時間について言及しておく。電池材料中のLiイオン拡散の詳細を調べる場合は、10–20マイクロ秒程度までスピン偏極の時間変化を見る必要がある(図4(a)(b))。すると零磁場と縦磁場を印加した測定に1–2時間程度かか

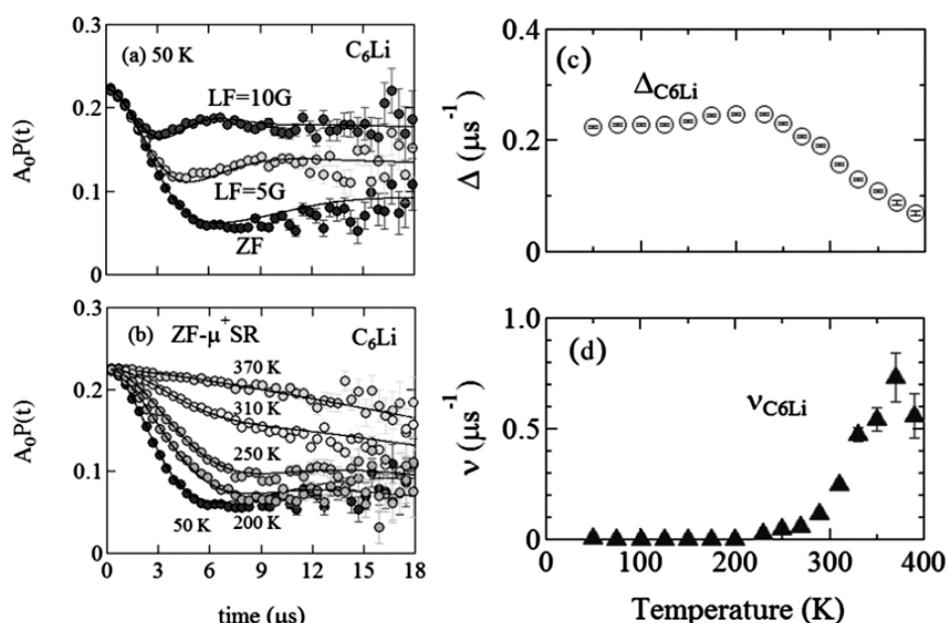


図4 C_6Li の (a) 50 Kでのゼロ磁場、縦磁場5 G、10 Gの μ SRスペクトル。(b) ゼロ磁場下の μ SRスペクトルの温度変化。(c) Δ と (d) ν の温度変化。Copyright 2017 Phys. Chem. Chem. Phys.

る。一方、横磁場（入射ミュオンスピンと垂直な磁場）を印加して得られる回転スペクトルを測定すれば、10マイクロ秒以下の短い時間領域の結果から必要なパラメータの概略を得られる。両手法を併用することで測定時間の短縮を図れる。最近では、温度等の試料環境を変化させながら測定した μ SRデータを全て蓄積し、後から必要な部分のみを必要な統計量で切り出すtransient手法も開発された。これにより、イオン拡散の変化を捉えることも可能となった^[18]。

7. ミュオン特性X線によるLiの検出

負ミュオンを用いた元素分析手法も電池研究に適用しているのでぜひ紹介したい。最近、金属Li析出を非破壊で検出することができた^[19]。電池の不適切な使用等により析出した金属Liが電池の熱安定性を低下させることがある。中古電池のリユース促進のために、非破壊で金属Liを捉えることが求められている。

負ミュオンは物質中で原子核に捕獲される過程でミュオン特性X線を放出する。これは元素に固有のエネルギーを有していて、元素分析に用いることが可能である。そのエネルギーが蛍光X線の約200倍高いことから、Li ($K\alpha$ 線)のエネルギーが18.7 keVになり(表2)、試料から抜け出て検出が可能となる。

さらに、負ミュオンの捕獲率（原子核への捕獲

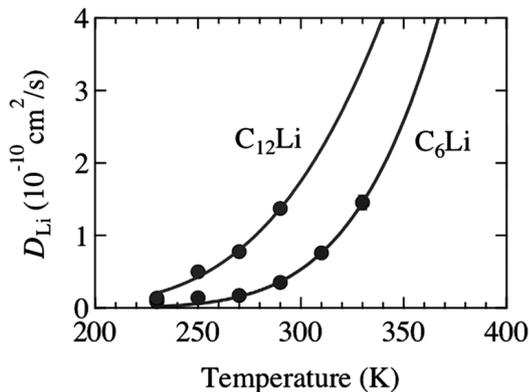


図5 C_6Li と $C_{12}Li$ の自己拡散係数 D_{Li} の温度依存性。Copyright 2017 Phys. Chem. Chem. Phys.

表2 LiとCのミュオン特性X線と蛍光X線のエネルギー

	ミュオン特性X線	蛍光X線
Li	18.7 keV	< 0.1 keV
C	75 keV	0.28 keV

されやすさ)の違いを利用して、金属リチウム析出に感度のある測定が可能である。この捕獲率を表す物理量である、クーロン原子捕獲率は、満充電状態の負極(C_6Li)においては、炭素1個あたりにLiに捕獲される比率が $A(Li, C) = 0.12 \pm 0.03$ と見積もられた。これは充電負極中では多くの負ミュオンがLiよりも炭素に捕獲されることを示している。実際、 C_6Li では、炭素がモル比でLiの6倍多く存在している、かつ捕獲率に上記のような差があるため、信号強度として比較すると、金属Liのほうが約50倍の高い信号強度が得られる。結果として、負極中のLiには感度が低く、金属Liに感度の良い検出法が可能となる(図6)。最近では、あらかじめ金属Liを析出させたラミネート型Liイオン電池^[20]や、充放電条件下^[21]の金属Li析出の非破壊検出に成功している。

8. 結び

Liイオン電池の電池材料中のLiイオン拡散やそれに関連する物理量を調べるのに正負のミュオンを用いた μ SRが有用であることを紹介した。負ミュオンを用いた元素分析は、使用后電池のリユースにつながる安全のための研究において活用が期待される。

最後に、ミュオンビームを利用できる施設の紹介をしておく。本文中で紹介したJ-PARCのMLF(物質・生命科学実験施設)^[22]では、 μ SRによるLi拡散測定、 μ^- SR測定、ミュオン特性X線元素分析のいずれも実施可能である。

国内のミュオンビームが利用できる施設には、大阪大学の核物理研究センター(RCNP)がある^[23]。J-PARCがパルスミュオンビームなのに対

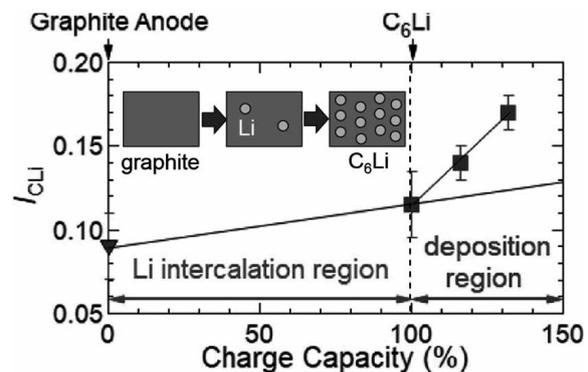


図6 ミュオン特性X線の信号と充電容量の関係。充電領域(0-100%)と金属リチウムが析出する領域(100%以上)。100%以上で、金属リチウム析出が検出された。

して、RCNPでは直流ミュオンビームである。直流ビームでは連続した時間構造を活かして1マイクロ秒以下のより速い時間を調べるのに力を発揮するため、10マイクロ秒程度まで高統計で測定する必要がある、 μ SR測定によるLiイオン拡散測定には適さない。一方で、ミュオン特性X線測定は計測速度が高く(J-PARCではパルスのタイミング毎に測定)、さまざまな利用が進んでいる。

謝辞

本研究を進めるにあたり多くの協力を得ました。特に、(株)豊田中央研究所の野崎洋、原田雅史、川内滋博、樋口雄紀、近藤康仁、KTHのMartin Månsson、KEKの反保元伸、竹下聡史、土居内翔伍、三宅康博、大阪大学の二宮和彦、国際基督教大学の久保謙哉、ISISのM. Telling、S. P. Cottrellの各氏に感謝します。本研究は科研費JP26286084、JP23108003、18H01863、JP20K21149、22H03875の助成を受けました。

参考文献

- [1] SDGsについては国連のウェブサイトを参照：
https://www.unic.or.jp/activities/economic_social_development/sustainable_development/2030agenda/
- [2] Sugiyama, J., Mukai, K., Ikedo, Y., Nozaki, H., Månsson, M., Watanabe, I., Li Diffusion in Li_xCoO_2 Probed by Muon-Spin Spectroscopy *Phys. Rev. Lett.* **103**, 147601 (2009).
- [3] Sugiyama, J., Nozaki, H., Umegaki, I., Mukai, K., Miwa, K., Shiraki, S., Hitosugi, S., Suter, A., Prokscha, T., Salman, Z., Lord, J. S., Månsson, M., *Phys. Rev. B* **92**, 014417 (2015).
- [4] Umegaki, I., Kawauchi, S., Sawada, H., Nozaki, H., Higuchi, Y., Miwa, K., Kondo, Y., Månsson, M., Telling, M., Coomer, F.C., Cottrell, S.P., Sasaki, T., Kobayashi, T., Sugiyama, J., Li-ion diffusion in Li intercalated graphite C6Li and C12Li probed by μ^+ SR, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 19058 (2017).
- [5] <https://www.webelements.com>.
- [6] R. J. Borg and G. J. Dienes, An Introduction to Solid State Diffusion (Academic Press, San Diego, 1988), Chap. 3, pp. 53-77.
- [7] Chakhalian, J. A., Kiefl, R. F., Dunsiger, S. R., MacFarlane, W. A., Miller, R., Sonier, J. E., Fischer, J. E., Evidence for local moment formation around a positive muon in graphite, *Phys. Rev. B* **66**, 155107 (2002).
- [8] Langer, J., Epp, V., Heitjans, P., Mautner, F. A., Wilkening, M., Lithium motion in the anode material LiC_6 as seen via time-domain ^7Li NMR, *Phys. Rev. B*, **88**, 094304 (2013).
- [9] Umegaki, I., Higuchi, Y., Nozaki, H., Kondo, Y., Oka, H., Makimura, Y., Forslund, O. K., Månsson, M., Cottrell, S. P., Sugiyama, J., Battery Materials Research with Muon Beam, *JPS Conf. Proc.* **25**, 011009 (2019).
- [10] Sugiyama, J., Mukai, K., Harada, M., Nozaki, H., Miwa, K., Shiotsuki, T., Shindo, Y., Giblin, S. R., Lord, J. S., Reactive surface area of the $\text{Li}_x(\text{Co}_{1/3}\text{Ni}_{1/3}\text{Mn}_{1/3})\text{O}_2$ electrode determined by μ^+ SR and electrochemical measurements, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 10402 (2013).
- [11] Nozaki, H., Harada, M., Ohta, S., N. H. Jalarvo, Mamontov, E., Watanabe, I., Miyake, Y., Ikedo, Y., Sugiyama, J., Diffusive Behavior of Li Ions in Garnet $\text{Li}_{5+x}\text{La}_3\text{Zr}_x\text{Nb}_{2-x}\text{O}_{12}$ ($x = 0-2$), *J. Phys. Soc. Jpn.* **82**, SA004 (2013).
- [12] Sugiyama, J., Mukai, K., Nozaki, H., Harada, M., Månsson, M., Kamazawa, K., Andreica, D., Amato, A., Hillier, A. D., Antiferromagnetic spin structure and lithium ion diffusion in Li_2MnO_3 probed by μ^+ SR, *Phys. Rev. B* **87**, 024409 (2013).
- [13] Ohishi, K., Igarashi, D., Tatara, R., Umegaki, I., Koda, A., Komaba, S., Sugiyama, J., Operando Muon Spin Rotation and Relaxation Measurement on LiCoO_2 Half-Cell, *ACS Appl. Energy Mater.* **5**, 10, 12538-12544 (2022).
- [14] McClelland, I., Booth, S. G., ElShinawi, H., Johnston, B. I. J., Clough, J., Guo, W., Cussen, E., J., Baker, P. J., Corr, S. A., In Situ Diffusion Measurements of a NASICON-Structured All-Solid-State Battery Using Muon Spin Relaxation, *ACS Appl. Energy Mater.* **4**, 2, 1527-1536 (2021).
- [15] Sugiyama, J., Umegaki, I., Matsumoto, M., Miwa, K., Nozaki, H., Higuchi, Y., Noritake, T., Forslund, O. K., Månsson, M., Cottrell S.P., Koda A., Ansaldo, E. J., Brewer, J. H., Desorption reaction in MgH_2 studied with in situ μ^+ SR Sustainable Energy and Fuels., **3**, 956 (2019).
- [16] Sugiyama, J., Forslund, O. K., Nocerino, E., Matsumura, N., Papadopoulos, K., Sassa, Y., Cottrell, S. P., Hillier, A. D., Ishida, K., Månsson, M., Brewer, J. H., Lithium diffusion in LiMnPO_4 detected with μ^\pm SR, *Phys. Rev. Research* **2**, 033161 (2020).
- [17] Umegaki, I., Ohishi, K., Nakano, T., Nishimura, S., Takeshita, S., Koda, A., Ninomiya, K., Kubo, M. K., Sugiyama, J., Negative Muon Spin Rotation and Relaxation Study on Battery Anode Material, Spinel $\text{Li}_4\text{Ti}_5\text{O}_{12}$, *J. Phys. Chem. C*, **126**, 25, 10506-10514 (2022).
- [18] 西村昇一郎他, 日本物理学会 第75回秋季大会.
- [19] Umegaki, I., Higuchi, Y., Kondo, Y., Ninomiya, K., Takeshita, S., Tampo, S., Nakano, H., Oka, H., Sugiyama, J., Kubo, M. K., Miyake, Y., Nondestructive High-Sensitivity Detections of Metallic Lithium Deposited on a Battery Anode Using Muonic X-rays, *Anal. Chem.* **92**, 12, 8194-820.
- [20] 梅垣いづみ他, 日本物理学会 第76回年会.
- [21] Umegaki, I., Tampo, M., Miyake, Y., Sugiyama, J., 15th International Conference of Muon Spin Rotation, Relaxation and Resonance, 2022.
- [22] J-PARCのウェブサイト：<https://j-parc.jp/c/index.html>
- [23] 大阪大学 核物理研究センター (RCNP) のウェブサイト：<https://www.rcnp.osaka-u.ac.jp>

**梅垣 いづみ** (うめがき・いづみ)

2007年3月 東京都立大学 理学部物理学科卒業
2009年3月 東京工業大学 理工学研究科修士課程修了
2010年4月 学振特別研究員 (DC2)
2012年4月 (株) 豊田中央研究所 研究員
2021年8月 高エネルギー加速器研究機構 助教

**杉山 純** (すぎやま・じゅん)

1979年 名古屋大学 理学部 化学科卒業
1981年 名古屋大学 工学部 結晶材料工学専攻 修士課程修了
1992年 名古屋大学 博士 (工学)
1981年-2019年 (株) 豊田中央研究所 研究員
1989年-1993年 国際超電導産業技術研究センター 超電導工学研究所 主任研究員
2016年-2019年 学術システム研究センター 専門研究員 (工学系科学)
2019年- 総合科学研究機構 中性子科学センター サイエンスコーディネーター

天然有機化合物の構造解析

選択励起パルス応用 --- 二次元NMRのhomo-decouplingについて

東京大学農学生命科学研究科

降旗 一夫

furihata@iam.u-tokyo.ac.jp

近年の天然有機化合物の世界では、新規生理活性物質の探索とNMRによる構造決定という研究スタイルの勢いが低下しつつある中で、不斉炭素有する鎖状有機化合物の相対立体配置を決めることが重要な流れとなってきている。鎖状構造のスピ結合定数は、単結合の軸の回転運動により平均化されるため、立体化学の議論には使用できないと考えられてきた。高磁場NMRの普及により複雑な化合物が構造決定されるようになると、ほとんどの鎖状構造のプロトン-プロトンのスピ結合定数 J_{HH} は2Hz程度と10Hz程度に大別されることがわかってきたものの、立体構造の決定に J_{HH} が用いられることはなく、相対立体配置の決定にはアセトナイド化などの反応を行うことが一般的であった。

1995年の松森らによるオカダ酸^[1]、1996年の佐々木、松森らによるmaitotoxin^[2,3]の構造解析の報告において、 J_{HH} に加えlong-range J_{CH} を併用することにより、化学反応を経ずに鎖状構造の相対立体配置を決定できることが示された。しかし、こうした J_{HH} やlong-range J_{CH} を用いた構造解析が行われるようになって、複雑なプロトン-プロトンのスピ結合の解析は容易ではなく、 J_{HH} を如何にして効率よく観測するかは依然として重要な課題であった。

これまでに、COSY法を利用してプロトン-プロトンのスピ結合定数を観測する方法としてDQF-COSY、E-COSYなどの方法が報告されてきたが、これらの方法によっても、multipletに分裂したクロスピークからプロトン-プロトンのスピ結合を解析することは非常に困難であった。例えば、ポリケタイド抗生物質には-CH-CH(CH₃)-CH-といった部分構造を多く有する化合物が存在する。このメチル基の付け根のメチンプロトンはメチル基との分裂に加え、隣接プロトンとの分裂によりブロードなmultipletのシグナルとなる。そのため、このメチンプロトンのスピ結合の解

析は困難であった。また、メチル基の付け根のメチン炭素は不斉炭素であることが多く、この炭素に結合した置換基の相対立体配置の解析には、この炭素に結合した隣接プロトンからのスピ結合の観測は重要なポイントになっていた。

この複雑に分裂したメチンプロトンを解析する方法として、メチル基のプロトンをdecouplingして、そのメチンプロトンの分裂を単純化すれば解析は可能になる。こうした方法は1D-NMRではよく使われる方法となっている。しかし、こうした、homo-decouplingによる1D-NMRでのスペクトル解析はしばしば困難であり、まして、二次元のNMRではスピ結合を観測する目的で使用されることはなかった。そこで、このメチンプロトンのスピ結合を解析する方法として、二次元NMRのCOSY法にhomo-decouplingを導入し、プロトン-プロトンのスピ結合を観測する方法を検討した。一つは新しくBASHD (band selective homo decoupling)- J -resolved COSY法^[4]であり、もう一つはMDEC (multi-frequency-homo-decoupling)- J -resolved COSY法^[5]である。さらに、これらにDPFGSE (double pulsed field gradient spin echo)法による選択励起を組み合わせたDPFGSE-MDEC- J -resolved-COSY法^[5]も試みた。これらのパルス系列の検討、および複雑に分裂したプロトンの解析への応用について述べる。

二次元COSY法のhomo-decouplingパルス

図1に(a) J -resolved-COSY法、(b) BASHD (MDEC)- J -resolved-COSY法、(c) DPFGSE-MDEC- J -resolved-COSY法のパルス系列を示す。

これらの方法のポイントはCOSYスペクトルにおいて、スピ結合を解析するために、 F_1 軸のresolutionを高めることと、目的とするシグナルを同時に複数decouplingしmultipletシグナルを単純化することである。

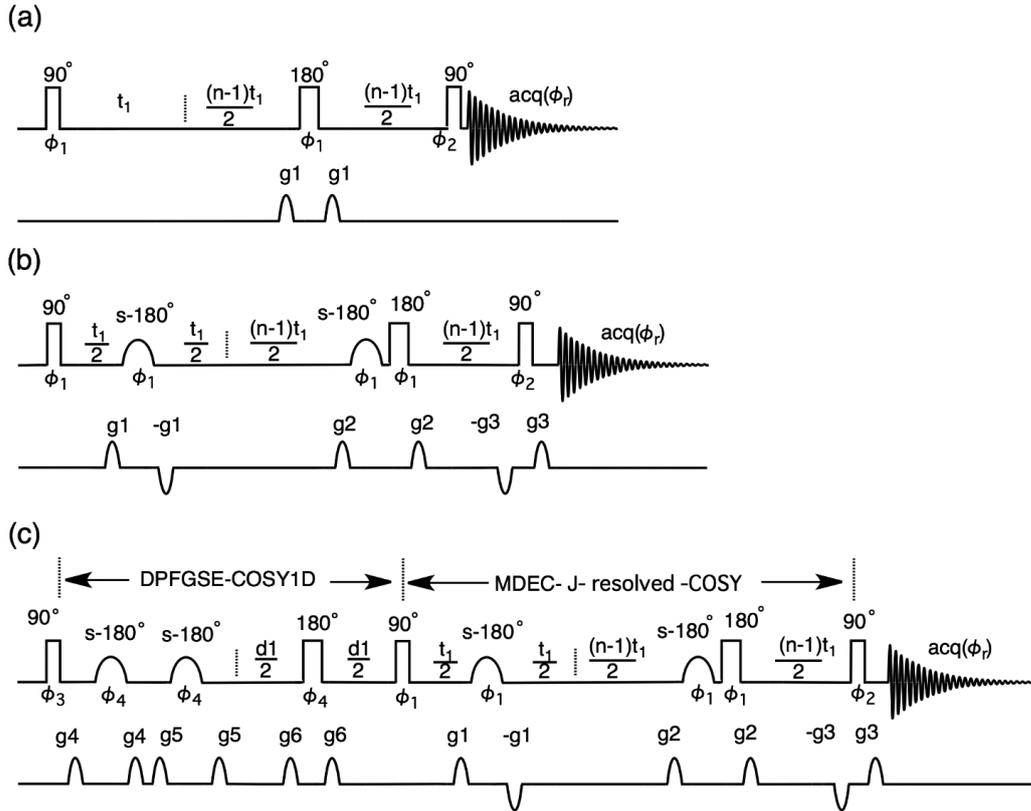


図1 パルス系列

(a) *J*-resolved(scaled)-COSY

$\Phi 1 = x, x, y, y, -x, -x, -y, -y$ $\Phi 2 = x, y, -y, x, -x, -y, y, -x$ $\Phi r = x, x, y, y, -x, -x, -y, -y$
 $g1 =$ field gradient = 3.5 (G/cm), duration = 1 ms $n =$ scaling factor

(b) BASHD-*J*-resolved-COSY

$\Phi 1 = x, x, y, y, -x, -x, -y, -y$ $\Phi 2 = x, y, -y, x, -x, -y, y, -x$ $\Phi r = x, x, y, y, -x, -x, -y, -y$
 $g1, g2, g3 =$ field gradient = 3.5 : 5.0 : 2.2 (G/cm), duration = 1 ms
 $n =$ scaling factor

(c) DPGSE-MDEC-*J*-resolved-COSY

$\Phi 1 = 2(x, x, -x, -x), 2(y, y, -y, -y)$
 $\Phi 2 = x, x, -x, -x, y, y, -y, -y, -y, y, y, x, x, -x, -x$
 $\Phi 3 = 2(-y, y, y, -y), 2(x, -x, -x, x)$ $\Phi 4 = 2(-y, -y, y, y), 2(x, x, -x, -x)$
 $\Phi r = 2(x, -x, -x, x), 2(y, -y, -y, y)$
 $g1, g2, g3, g4, g5, g6 =$ field gradient, $n =$ scaling factor, $d1 = 1/2 J_{HH} \cong 60$ ms
 Gradient strength $g1 \sim g6 = 3.5 : 5.0 : 2.2 : 3.6 : 4.0 : 4.5$ (G/cm), duration = 1 ms

基本となる (a) の *J*-resolved COSY法は、通常の COSY法に、*J*-scaling pulse ((*n*-1) *t*₁-180-(*n*-1) *t*₁) を導入することで、クロスピークのスピ結合を *F*₁方向に *n*倍に展開した形で得るものである^[6~8]。通常、COSY法の *t*₁maxの設定は200~300msec程度で、*F*₁方向でスピ結合を観測するには digital resolutionが不十分である。*F*₁軸において、スピ結合 *J*による分裂を観測するためには、*t*₁maxを1/*J*のオーダーを超えるように設定しなければならない。*J* = 2 Hzを観測するためには *t*₁maxを500msec以上に設定し、digital resolutionを2 Hz以下とする。*J*-resolved COSY法においても同様で、*n t*₁maxがスピ結合定数1/*J*を超えるように scaling factor (*n*)を設定する。

その結果、クロスピークは、スピ結合定数の実際の値の *n*倍の幅で *F*₁方向に分裂し、低い digital resolutionでも分離して観測することができる。

クロスピークの *F*₁方向の化学シフト位置とスピ結合の分裂幅は、以下のように、パルス系列中の *t*₁, (*n*-1) *t*₁/2, および (*n*-1) *t*₁/2における展開の和となり、その結果、*F*₁軸方向についてスピ結合が scale upした形の COSYスペクトルが得られる。

化学シフト

$$t_1 + (n-1) t_1/2 - (n-1) t_1/2 = t_1$$

スピ結合 (プロトン)

$$t_1 + (n-1) t_1/2 + (n-1) t_1/2 = n t_1$$

この J -resolved COSY法を複雑な化合物の解析に応用するため、まず、homo-decouplingによるスピン系の単純化を検討した。まず、二次元NMRの ω_1 homo-decoupling法として知られているBASHD (band-selective homonuclear decoupling) pulse^[9, 10]を導入して BASHD- J -resolved COSY法を作成した(図1 (b))。

BASHD法はband-selectiveパルスを用いて、一定の範囲をdecouplingするものである。ここではメチル基に注目し、メチル基に結合したメチンプロトンを観測するために、メチル基シグナルの全領域をdecouplingする。しかし、この領域にメチンやメチレンプロトンが観測されている場合には、そのメチンやメチレンプロトンをもdecouplingしてしまうのは避けられない。

メチル基が分散して観測されている場合は、個々のメチル基を一つ一つ選択的にdecouplingすることが望まれる。このような、homo-decouplingは、1D-NMRにおいてはdouble resonance、triple resonance実験が行われてきた。また最近では観測パルスと同じ発信機のもとでdecouplingするMDEC (multi frequency homonuclear decoupling)^[11]法が報告された。このようなMDEC法を取り入れて、二次元NMRにおいて、個別に数カ所を同時にhomo-decouplingする方法がMDEC- J -resolved-COSY法である。このパルス系列は、単にBASHDパルスをMDECパルスに置き換えたものであり、どのプロトンをどのようにdecouplingするかが問題である。

BASHDまたはMDECの選択パルスにより、選択的な ω_1 homo-decouplingが行われるしくみは次の通りである。

COSY法の t_1 の展開時間の中心に選択的180°パルスを導入し目的とするプロトンを反転させると、このパルスを受けたプロトンは t_1 の展開期の終わりでrefocusする。その結果、180°パルスを受けたプロトンと180°パルスを受けなかったプロトンとの間はdecouplingされる。一方、 t_1 の展開期に続く J -resolved法での $(n-1)t_1$ の展開期におけるhomo-decouplingは、中心に選択的180°パルスとhard 180°パルスを同時に導入する。選択的180°パルスとhard 180°パルスの両方を受けたプロトンは0°パルスを受けることになり、 $(n-1)t_1$ の展開期の終わりでdefocusする。一方、hard 180°パルスだけを受けたプロトンは、スピ

ン結合では J -modulationを受け、化学シフトではrefocusする。その結果、0°パルスを受けたプロトンと180°パルスを受けたプロトンの間のスピン結合が選択的にdecoupleされ、それ以外のプロトンとのスピン結合は J -scalingが起きる。

このようにして、 J -resolved-COSYの t_1 および $(n-1)t_1$ の展開時間の中で、選択的180°パルスを受けたプロトンのhomo-decouplingが実行される。

さらに、homo-decouplingに加えて、選択励起によるスペクトルの単純化も検討した。選択励起法として、DPFGSE (double pulsed field gradient spin echo) 法^[12]を用いた1D-NMR法は非常に有力であり、DPFGSE-COSY-1D^[13]、DPFGSE-NOESY-1Dなどが知られている。このDPFGSE法を、二次元NMRのMEDEC- J -resolved-COSY法に応用し、DPFGSE-MDEC- J -resolved-COSY法を作成した(図1 (c))。DPFGSEの選択励起パルスはMDECの選択励起パルスと同一に設定する。パルス系列の最初の励起90°パルスと第二の90°パルスの位相を90°シフトし、選択励起したメチル基の磁化をメチンプロトンに移動させ、MEDEC- J -resolved COSYで測定すると、メチル基に結合したメチンプロトンのみがhomo-decouplingされて観測される。

以上のパルス系列での測定に先立ち、実験で用いた選択パルスについて検討した。

図2は(a) SEDUCE pulse^[14]と(b) RE-BURP pulse^[15, 16]の励起範囲とその形状をDPFGSE-1D-NMRにより表示したものである。励起範囲を15 Hzに設定したときのSEDUCE pulseのパルス幅は57.8 msecであるが、RE-BURP pulseでは325 msecと長くなる。SEDUCE pulseの励起形状はgauss関数形であり、なめらかなシグナルの立ち上がりを示す。一方、RE-BURPの励起形状は矩形に近く、選択性が高い。ここに示すように、MDEC- J -resolved COSY法には、横緩和 T_2 によるシグナルの減衰を抑えるため、パルス幅の短いSEDUCE pulseを使用した。また、BASHD- J -resolved-COSY法では励起範囲が400 ~ 500 Hzと広いと、選択性を重視して、RE-BURPパルスを使用した。SEDUCEあるいはRE-BURPどちらのパルスでも、パルス幅を短くするために、励起範囲をできるだけ広く設定することが望ましい。選択的に狭い範囲を励起する場合は、パルス幅が

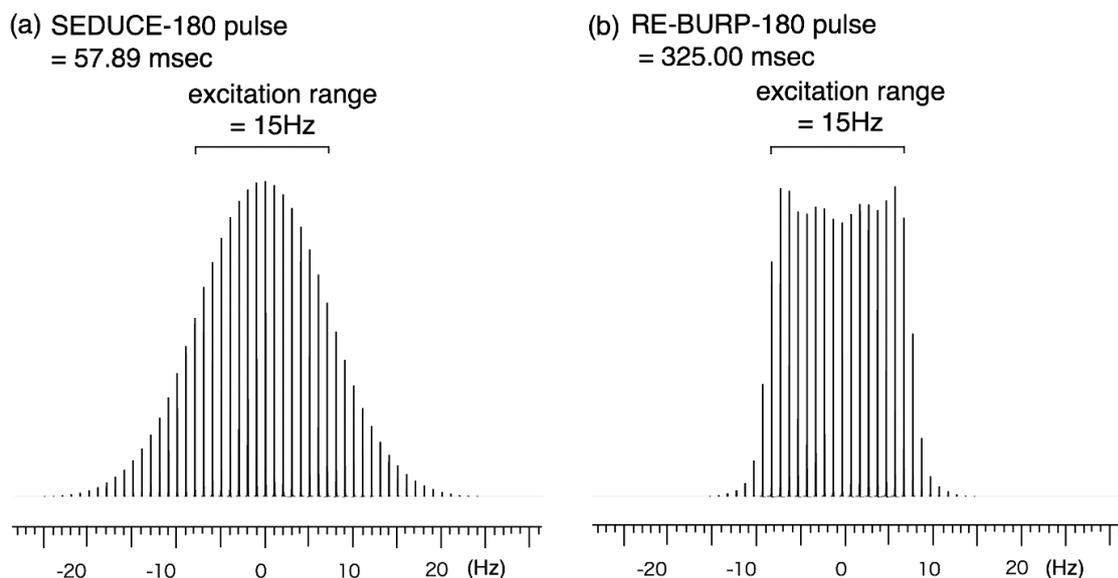


図2 DPFGE-1D-NMRによる (a) SEDUCE, (b) RE-BURP の選択的パルスの励起形状。励起範囲：15 Hz、SEDUCEのパルス幅：57.89 μ sec、RE-BURPのパルス幅：325.0 msec、観測範囲：15 Hz、共鳴 offset：1 Hz ステップの可変、サンプル：99.8% D₂O-0.2% H₂O。

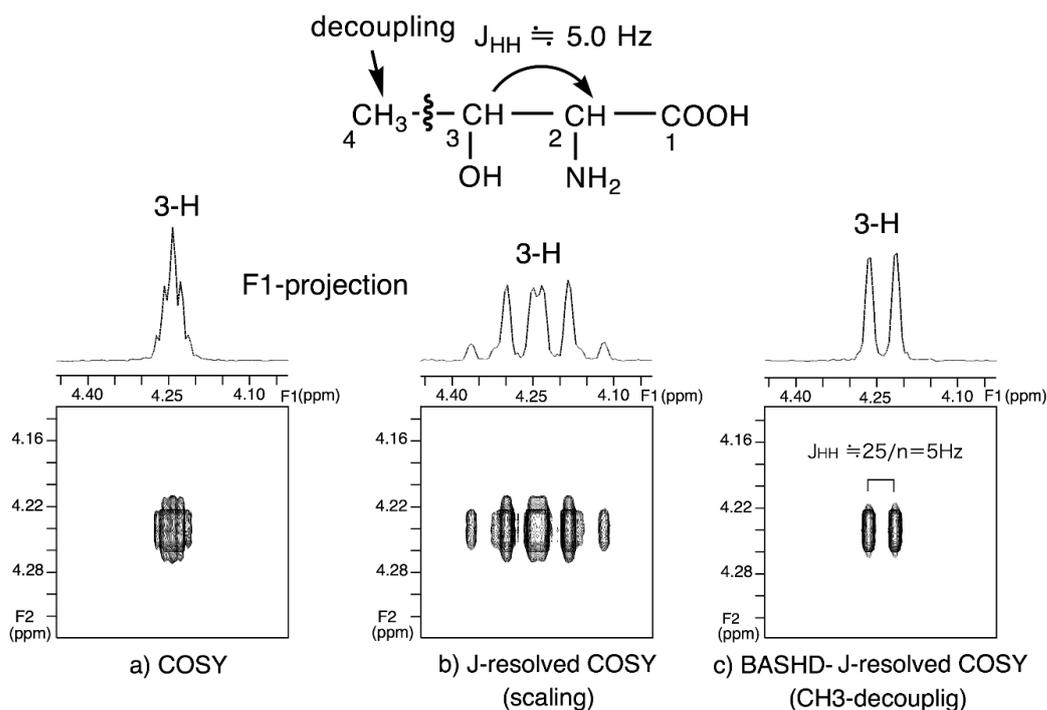


図3 Threonineの (a) COSY, (b) J-resolved-COSY, (c) BASHD-J-resolved COSY スペクトル (500 MHz)。Resolution ; $F_1 = 4.9$ Hz、 $F_2 = 2.4$ Hz、scaling factor (n) = 5。

長くなり、その分 T_2 によるシグナルの減衰、感度の低下が避けられない。

ThreonineのBASHD-J-resolved COSYのクロスピーク

メチル基に隣接するメチンプロトンのある threonine を用い、(a) 通常の COSY、(b) J-resolved COSY、(c) 4位のメチル基を decoupling した BASHD-J-resolved COSY を測定した (図3)。そ

れぞれメチンプロトン H3 部分の拡大スペクトルと、 F_1 軸に projection を示している。(a) の COSY スペクトルでは multiplet の分裂幅に対して F_1 軸と F_2 軸の resolution が不足しているため、クロスピークは団子状となりスピ結合定数を観測することはできない。(b) の J-resolved COSY スペクトルでは F_1 軸の resolution が高まっており、スピ結合による分裂が観測されたが、解析には至らない。(c) の BASHD-J-resolved COSY スペク

トルでは、4位のメチル基プロトンを decoupling したところ、H3の multiplet のクロスピークは doublet として観測され、H2-H3のスピ結合定数の解析が可能となった。このように BASHD-*J*-resolved COSY法は、スピ結合定数を scale up し、さらに multiplet を decoupling して単純化することで、スピ結合の解析を容易にすることができる。

Monazomycin への応用

– BASHD-*J*-resolved COSY スペクトル

ポリケタイドの環状マクロライド化合物である monazomycin (図4) は、NMRによる構造決定が困難で、全相対立体配置はいまだ決定されていない。その要因のひとつに、¹H-NMRスペクトルで化学シフトが重なりあったメチル基が多いことと、メチル基が結合したメチンプロトンがブロードな multiplet であるためスピ結合定数が解析できないことがあげられる。この問題を解決するため、BASHD-*J*-resolved COSYを測定した(図5)。decoupling に用いた選択パルスは、パルス幅を短くするため、照射範囲をシグナルのない領域を含めて0.30 ppm から1.15 ppm (425 Hz) と設定し、パルス幅11.3 msec のRE-BURPパルスを使用した。図5に示すように、選択的パルスで励起した decoupling 領域では、*F*₁軸にシグナルが現れないことが見てとれる。一方、メチル基の付け根のメチンプロトン領域では、*F*₂軸において、メ

チル基とメチンプロトンの decoupling されたクロスピークがしっかり観測されている。

図6は monazomycin の COSY (a)、*J*-resolved COSY (b)、BASHD-*J*-resolved COSY (c)、図5の拡大) の *F*₁ 軸のメチンプロトンと *F*₂ 軸のメチル基のクロスピーク領域の拡大スペクトルである。(a) の COSY スペクトルでは *F*₁ 軸の分解能が足りず、ブロードな multiplet のクロスピークを与えており、スピ結合の解析は困難である。(b) の *J*-resolved COSY スペクトルでは *F*₁ 軸の分解能を十分上げることができたが、クロスピークが複雑なため解析には至らなかった。(c) の BASHD-*J*-resolved COSY スペクトルでは、メチル基を decoupling した結果クロスピークが単純化されている。メチル基に結合したメチンプロトン全てが観測でき、6個は triplet (H8, H14, H30, H32, H38, H48) と4個は double-doublet のクロスピーク (H18, H24, H40, H46) となっている。H32とH38のクロスピークが重なり、このクロスピークを直接解析することはできなかったが、それぞれ隣接する H31とH39のクロスピークからスピ結合定数が得られた。

ここで得られた *J*_{HH} と、selective COSY-*J*-resolved HMBC^[17] スペクトルから得られた *J*_{CH} の値を用いて、C45-C46, C46-C47 bond に関する相対立体化学を決定した。

これらの結合についての Newman 投影図を図4に示す。

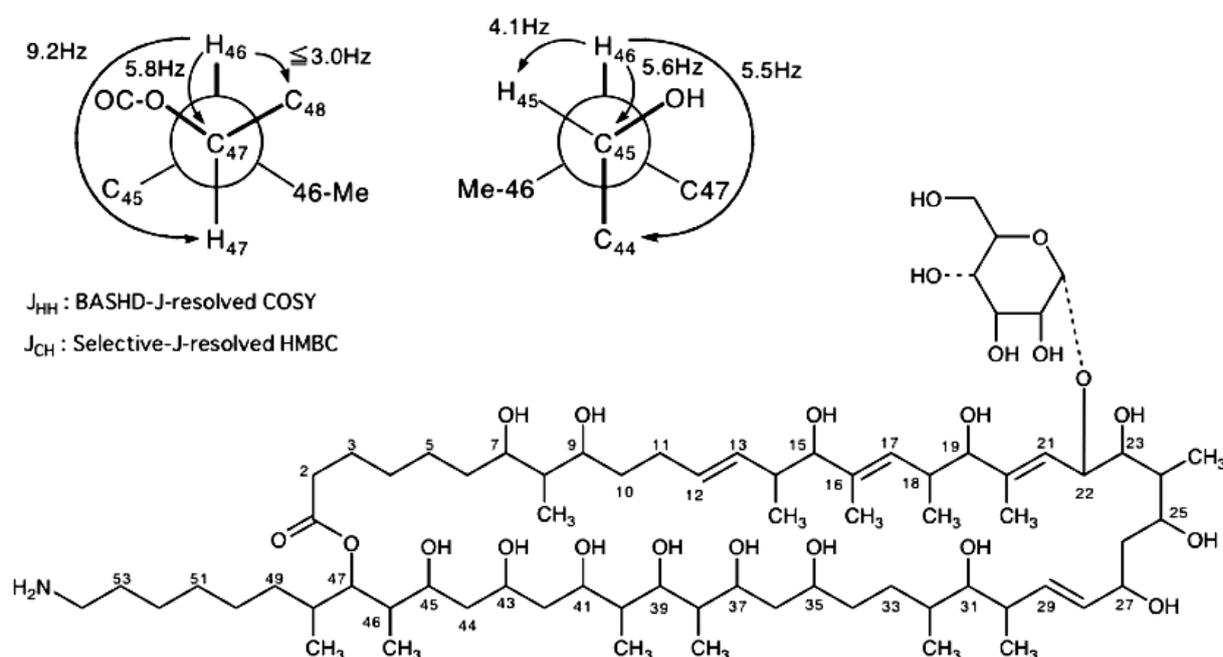


図4 Monazomycinの構造とC45-C46とC46-C47のそれぞれの結合のNewman投影図。³*J*_{HH}はBASHD-*J*-resolved COSYから、¹*J*_{CH}はSelective-COSY-*J*-resolved HMBCから求めた値。

図6 (c) で、H46のメチンプロトンは9.2Hzと4.1Hzのdouble-doubletとなっている。H46-H47のスピ結合定数が9.2Hzであるとすでに判っているので、H46-H45は4.1Hzでスピ結合して

おり、gaucheの関係にあるとわかる。H46に対する45-OHとC44の関係については、H46-C44の間のlong-range $J_{CH} = 5.5\text{Hz}$ から、これらがantiの関係にあると判明した。また、H46位のプロ

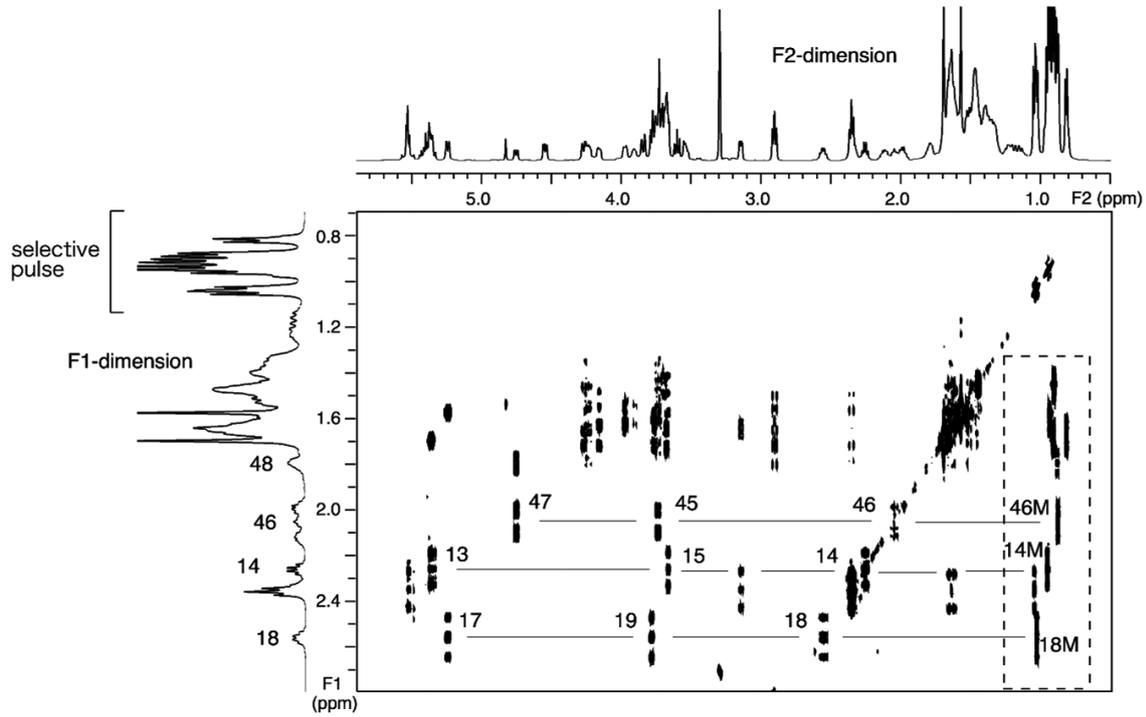


図5 MonazomycinのBASHD- J -resolved-COSYスペクトル。(500 MHz)

$F_1 \times F_2 = 2850 \times 2850$ (Hz)、 $t_1 \times t_2 = 512 \times 1024$ (point)、scans = 16。

RE-BURP 180 pulse = 11.3 ms (0.30 ppm-1.15 ppm)、scaling factor = 5、 $nt_1\text{max} = 900$ ms。

点線は図6に示す拡大領域。選択的decoupling範囲はF1の1D-NMRに示す。

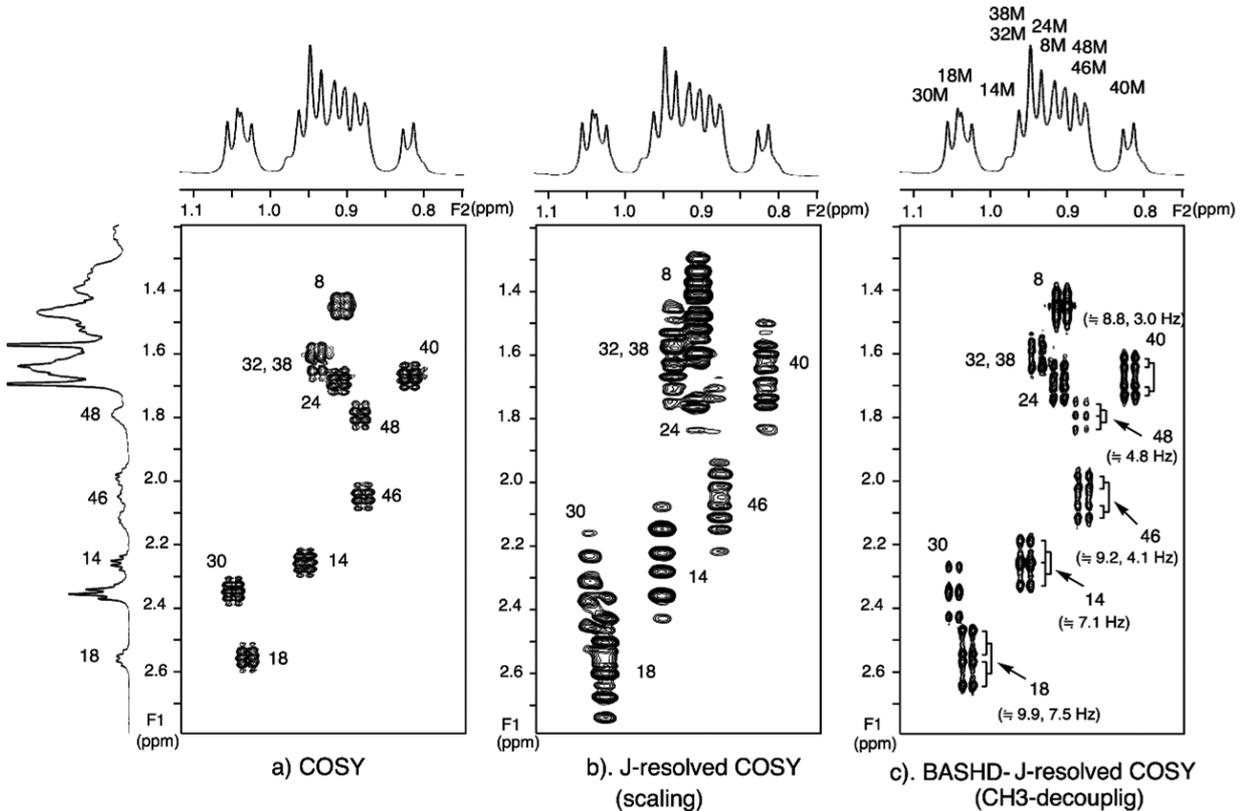


図6 Monazomycinの (a) COSY、(b) J -resolved COSY、(c) BASHD- J -resolved-COSYの拡大スペクトル。

トンとC45、C47、C48の間のスピン結合定数は ${}^2J_{C45H46} = 6.6\text{ Hz}$ 、 ${}^2J_{C47H46} = 5.8\text{ Hz}$ 、 ${}^3J_{C48H46}$ は3 Hz以下であることから、H46位のプロトンに対して45-OHがgaucheの相対配置をとっていることが判明した(図4)。

MDEC-*J*-resolved-COSY法のportmicinへの応用

Portmicin (図7) はmonazomycinとは異なりメチル基のシグナルは分散し、さらに他のプロトンとも重なって観測されている。このような場合、BASHD-*J*-resolved-COSY法で、メチル基領

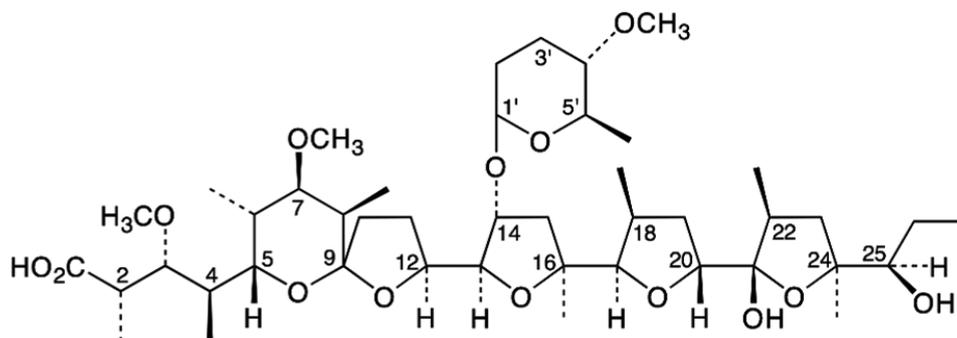


図7 Portmicinの構造。

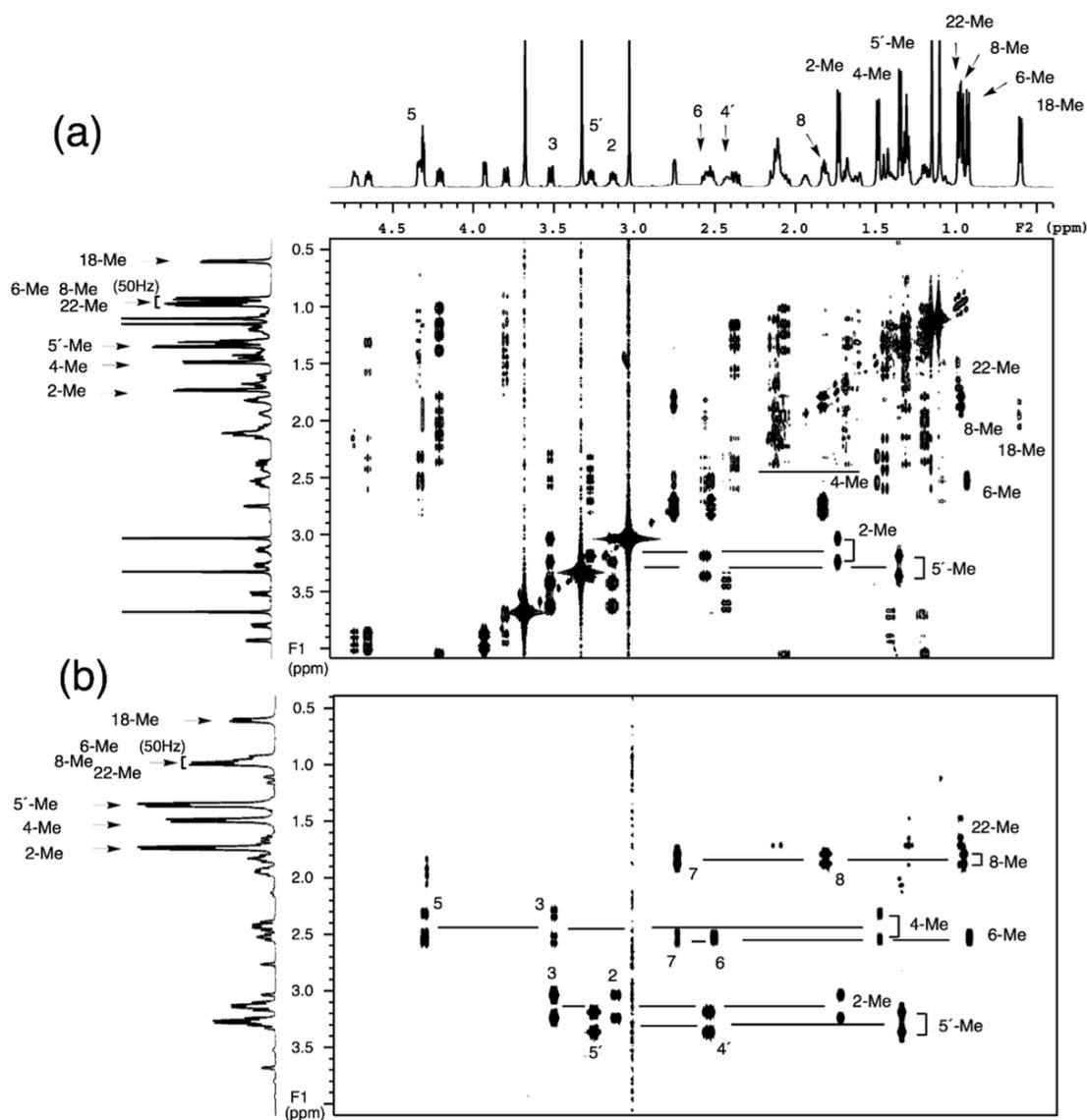


図8 Portmicinの(a) MDEC-*J*-resolved COSYと(b) DPGSE-MDEC-*J*-resolved COSY スペクトル、(500 MHz)。 $F_1 \times F_2 = 2500 \times 2500$ (Hz)、 $t_1 \times t_2 = 512 \times 2048$ (point)、scans = 16、scaling factor = 10、 $n_{t_1 \max} = 900$ ms、SEDUCEパルス幅 = 52.90 ms (15 Hz)。

域全体を広く励起することは得策ではない。むしろ個々のメチル基をターゲットにしたhomodecouplingが望まれる。そこで、portmicinのメチル基それぞれをdecouplingするMDEC-*J*-resolved COSYを測定した。図8はportmicinの(a) MDEC-*J*-resolved COSYスペクトルと(b) DPGFSE-MDEC-*J*-resolved COSYのスペクトルを示す。

δ_{H} 0.60 ppmから2.00 ppmに観測される7個のdoubletメチル基のうち0.93 ppm, 0.96 ppm, 1.03 ppmの3個のメチル基は化学シフトが近いので、まとめてBASHD法(50 Hz)で照射し、残る4個をそれぞれ15 Hzの範囲のMDEC法で照射した。しかし解析したい範囲には、目的のクロスピークに加えて、他の多くの*J*-resolved COSYピークが観測され、スペクトルが煩雑になっている。そこで、(b) DPGFSE-MDEC-*J*-resolved COSY法によりメチル基をDPGFSE法により選択的に励起し、同じメチル基プロトンを選択的にdecoupleした。その結果、目的のメチルプロトンとメチンプロトンのクロスピーク以外が消失し、単純なスペクトルが得られた。

(b)の F_2 軸の1.00 ppm付近の拡大スペクトルは図9に示す。H6のメチンプロトンのクロスピークから、H5-H6, H6-H7のスピ結合が両方

とも1.8 Hzであることがわかった。Portmicinのスピロケタール環上のH5はaxialであることがすでにわかっているので、H5-H6のスピ結合1.8 Hzから、H5, H6がgaucheの関係、すなわちH6がequatorialに位置していると判明した。また、H6-H7のスピ結合1.8 Hzより、これらがgaucheの関係にあり、7位のO-CH₃がH5とNOEを与えていることから、H7はequatorialに位置していることがわかった。同様に、H8のメチンプロトンのクロスピークからH7-H8のスピ結合4.0 Hzが得られ、これらがgaucheの関係にあり、H8と6-Me間のNOEから、H8がaxialに位置すると結論した。

まとめ

天然有機化合物の立体化学の研究においては、プロトンNMRにおいて、個々のプロトンのスピ結合定数を検出することが重要である。

このスピ結合を検出する方法として、decouplingを二次元NMRに応用した、BASHD-*J*-resolved COSY法、MDEC-*J*-resolved COSY法を紹介した。*J*-resolved COSY法は F_1 軸の分離能を高めるため、プロトン-プロトンの J_{HH} 値の解析が容易となる。そして、この方法にBASHD法及びMDEC法を導入して、プロトン-プロトンの

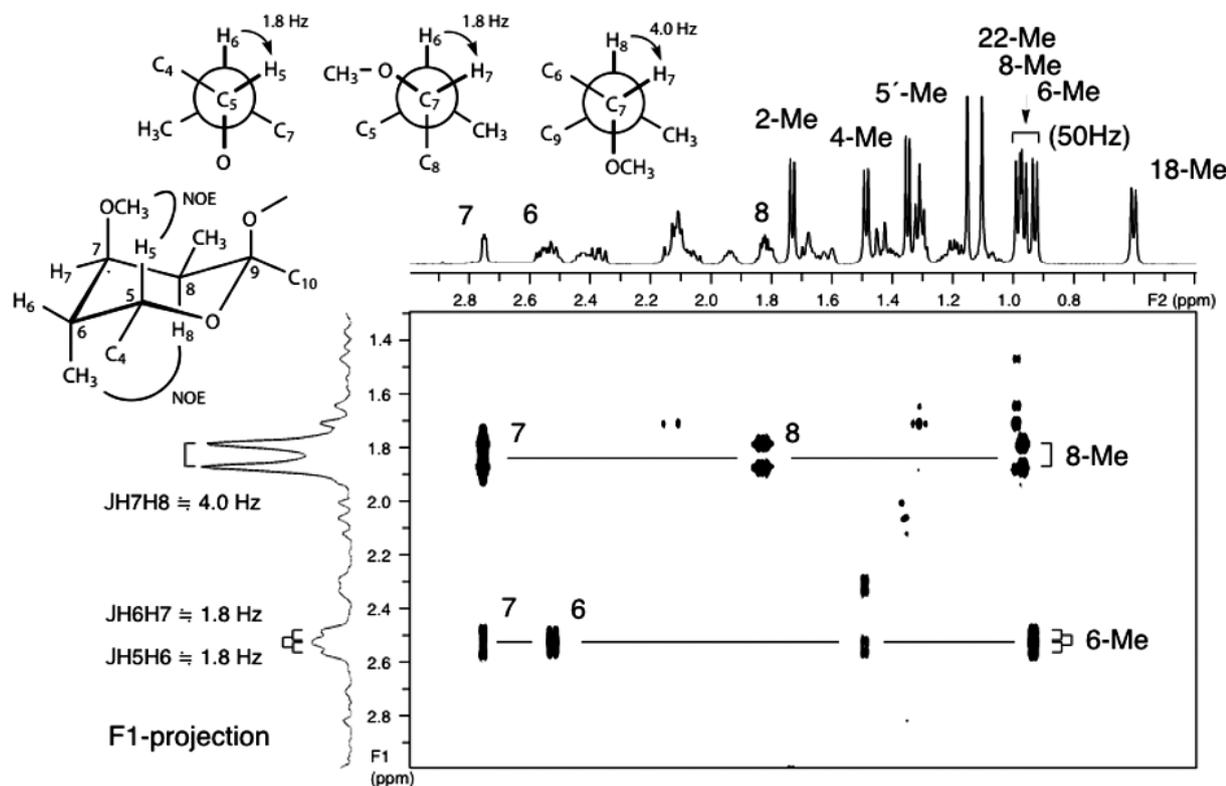


図9 PortmicinのDPGFSE-MDEC-*J*-resolved COSY(図8(b))の拡大スペクトルとC5-C6、C6-C7、C7-C8のNewman投影図。 F_1 次元はprojectionスペクトルである。

homo decouplingを可能にした。この方法により複雑な multiplet プロトンは単純化され、プロトン-プロトンの J_{HH} 値の観測は容易となった。これらの方法を monazomycin および, portmicin に応用しその有効性を明らかにした。

BASHD- J -resolved COSY と MDEC- J -resolved-COSY 法および, DPFGE-MDEC- J -resolved COSY 法は、メチル基の付け根のメチンプロトンという限られたスピン系に応用したが、multiplet に分裂したメチンプロトンにおいて、プロトン-プロトン J_{HH} を如何に観測するかという問題の一つの解決法を示した。

Selective pulse としては、複数のメチル基を同時に励起してもスピン結合にも、化学シフトにも影響されず、位相が揃い、なおかつ、シグナルの選択性が高いことが重要である。ここでは RE-BURP と SEDUCE を使用した。この方法で使用する照射磁場は、励起範囲が狭く高い選択性が要求される。そして、測定にあたっては、隣接プロトンへの照射磁場の漏れを最小にし、off resonance を避けることや、照射磁場同士が干渉し合うことを避けることが重要である。また照射パルスが長くなるため、 T_2 による S/N の低下は避けられないので注意が必要である。

参考文献

- [1] Matsumori, N., Murata, M. and Tachibana, K., Conformational analysis of natural products using long-range carbon-proton coupling constants: Three-dimensional structure of okadaic acid in solution. *Tetrahedron* **51**, 12229-12238 (1995).
- [2] Matsumori, N., Nonomura, T., Sasaki, M., Murata, M., Tachibana, K., Satake, M. and Yasumoto, T. Long-range carbon-proton coupling constants for stereochemical assignment of acyclic structures in natural products: Configuration of the C5-C9 portion of maitotoxin. *Tetrahedron Lett.* **37**, 1269-1272 (1996).
- [3] Sasaki, M., Matsumori, N., Maruyama, T., Nonomura, T., Murata, M., Tachibana, K. and Yasumoto, T. ChemInform Abstract: The complete structure of maitotoxin. Part 1: Configuration of the C1-C14 side chain. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 1672-1675 (1996).
- [4] Furihata, K. and Tashiro, M. BASHD- J -resolved-COSY: a new method for measuring proton-proton spin coupling constants of multiplet signals. *Magn. Reson. Chem.* **50**, 713-716 (2012).
- [5] Furihata, K. and Tashiro, M. DPFGE-MDEC- J -resolved COSY: An efficient method for selectively measuring proton-proton spin coupling constants of the multiplet signals. *Magn. Reson. Chem.* **56**, 1183-1187 (2018).
- [6] Hosur, R. V., Ravikumar, M. and Sheth, A. Resolution enhancement by ω_1 chemical-shift scaling in two-dimensional homonuclear correlated spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **65**, 375-381 (1985).
- [7] Krishnamurthy, V. V., Excitation-Sculptured Indirect-Detection Experiment (EXSIDE) for Long-Range CH Coupling-Constant Measurement. *J. Magn. Reson. A* **121**, 33-41 (1996).
- [8] Furihata, K. and Seto, H. J -resolved HMBC, a new NMR technique for measuring heteronuclear long-range coupling constants. *Tetrahedron Lett.* **40**, 6271-6275 (1999).
- [9] Brüschweiler, R., Griesinger, C., Sørensen, O. W. and Ernst, R. R. Combined Use of Hard and Soft Pulses for ω_1 Decoupling in Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **78**, 178-185 (1988).
- [10] Krishnamurthy, V. V. Application of semi-selective excitation sculpting for homonuclear decoupling during evolution in multi-dimensional NMR. *Magn. Reson. Chem.* **35**, 9-12 (1997).
- [11] Espindola, A. P., Crouch, R., DeBergh, J. R., Ready, J.M., and MacMillan, J. B. Deconvolution of complex NMR spectra in small molecules by multi frequency homonuclear decoupling (MDEC). *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 15994-15995 (2009).
- [12] Hwang T. L. and Shaka, A. J. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *J. Magn. Reson. A* **112**, 275-279 (1995).
- [13] Berger, S. NMR techniques employing selective radiofrequency pulses in combination with pulsed field gradients. *Prog. NMR Spectrosc.* **30**, 137-156 (1997).
- [14] McCoy, M. A. and Mueller, L. Selective decoupling. *J. Magn. Reson. A* **101**, 122-130 (1993).
- [15] McCoy, M. A. and Mueller, L. Nonresonant effects of frequency-selective pulses. *J. Magn. Reson.* **99**, 18-36 (1992).
- [16] Green, G. and Freeman, R. Band-selective radiofrequency pulses. *J. Magn. Reson.* **93**, 93-141 (1991).
- [17] Furihata, K. and Tashiro, M. Selective COSY- J -resolved-HMBC, a new method for improving sensitivity of cross peaks of methine proton signals attached to a methyl group. *Magn. Reson. Chem.* **50**, 409-414 (2012).



降旗 一夫 (ふるはた・かずお)

1973年3月 東京都立大学を卒業

1973年5月 東大応用微生物研究所に入所、GX-400-NMRに従事

1989年10月に東大農学部に移籍、以後2015年までNMR (AM-600、ALPHA-600) の維持に寄与。2015年から2022年11月現在まで、学術専門職員として奮闘中。

¹⁵N NMRによるシアノバクテリオクロムのプロトン化状態の解析

東京薬科大学 薬学部

永江 峰幸、青山 洋史、三島 正規

mmisima@toyaku.ac.jp

1. はじめに

本稿ではNMRによる窒素 (¹⁵N) の直接観測によって、シアノバクテリアの光センサータンパク質 (シアノバクテリオクロム、CBCRと呼ばれる) がもつ発色団であるフィコシアノビルン (Phycocyanobilin, PCB) のNH基のプロトン化状態を解析した最近の研究について紹介する。この系ではNH基のHと溶媒プロトンの交換が速く、NMRにおける武器ともいえるプロトン観測が困

難であったが、窒素 (¹⁵N) を直接観測することで明確な解析を行うことに成功した。

2. シアノバクテリオクロム

シアノバクテリオクロム (CBCR) は、シアノバクテリアがもつフィトクロム様の光センサータンパク質で、シアノバクテリアの環境応答において中心的な役割を果たす。その構造は、N末端側にPASドメインとGAFドメインを持ち、C末端

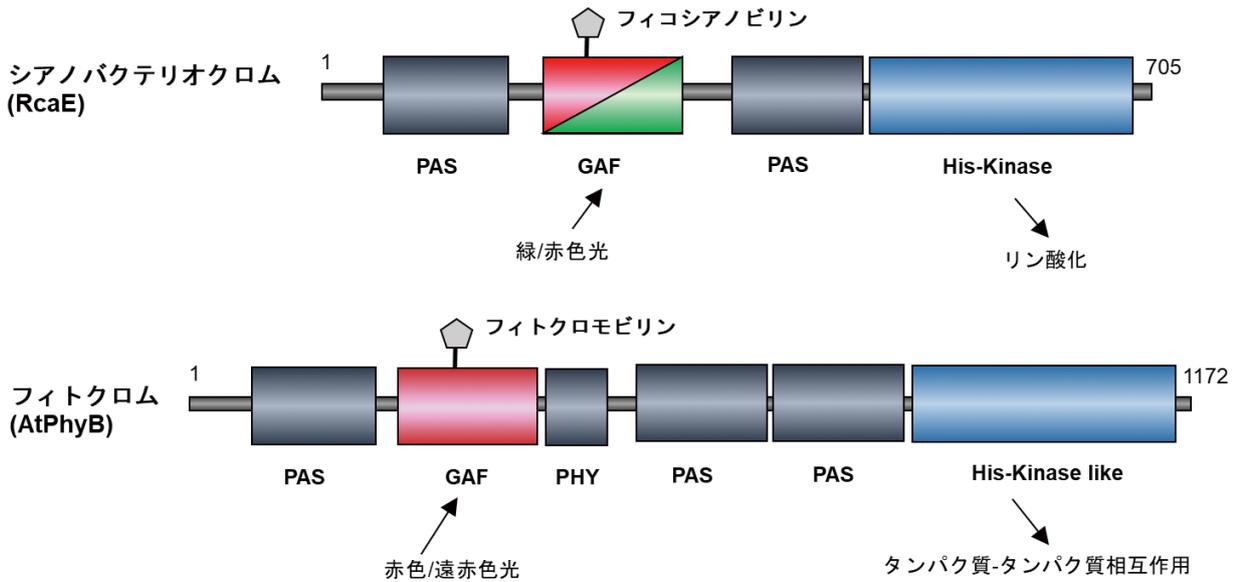


図1 シアノバクテリオクロムとフィトクロムのドメイン構造

シアノバクテリオクロムの代表的なタンパク質であるRcaE (上) と、フィトクロムの代表的なタンパク質であるシロイヌナズナのPhyB (下)。

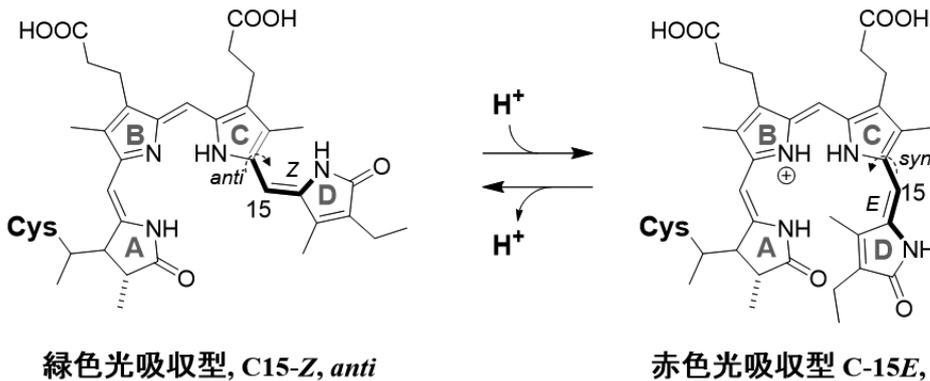


図2 シアノバクテリオクロム (RcaE) の光変換におけるPCB (フィコシアノビルン) の構造変化

側にヒスチジンキナーゼドメインを持つ点が特徴である(図1)。GAFドメインには、発色団としてPCBがシステイン残基に対してチオエーテル結合で共有結合しており、光を感知する。即ち、特定の波長の光吸収によってPCBのC15位の二重結合がZ体とE体(C15-Z/C15-E)の間で構造変換を起こす(図2)^[1]。また、この構造変換を光変換と呼ぶ。CBCRは高等植物の光センサータンパク質としてよく知られるフィトクロムとともに、フィトクロムスーパーファミリーを構成しているが、フィトクロムタンパク質では赤色光吸収型と遠赤色光吸収型の間で光変換を受けるの 비해、CBCRではその吸収波長は幅広く、近紫外光から遠赤色光にまで及ぶ^[2]。

CBCRは、さらに発色団のC15-Z/C15-E変換に対応する吸収光の波長に基づいてサブファミリーに分類される。例えば赤/緑のサブファミリーは完全にプロトン化された発色団を持っており、A環とD環間の配向の捻じれによって極大吸収波長の変化が引き起こされることが知られている^[3]。一方、興味深いことに、緑/赤のサブファミリーに属する代表的なタンパク質であるRcaEの光変換では、脱プロトン化されたC15-Z緑色吸収型と、プロトン化されたC15-E赤色吸収型をとることが示唆されており、“Protochromic

photocycle”と名付けられている^[4]。RcaEのGAFドメインの紫外可視吸収スペクトルに対してpHタイトレーションを行うと、pHに依存して極大吸収波長が変化する(図3)。

3. RcaE の構造

RcaEのProtochromic photocycleを理解する基盤として、立体構造の知見は重要である。そこで筆者らは、LEDを用いた光照射によって、赤色光吸収型と緑色光吸収型のRcaEのGAFドメイン(以降RcaE-GAFと表記)を調製し、結晶化を行った。まず赤色光吸収型の1.63Å分解能でのX線結晶構造解析に成功し^[5]、また、ごく最近、N末端側のリンカーヘリックスを延長させることにより二量体化するコンストラクトを用いて、緑色光吸収型での結晶化と、1.75Å分解能でのX線結晶構造解析に成功した(投稿中)。

一般にPCBの構造は、C15原子での*syn/anti*の立体配座およびZ/Eの立体配置によって特徴づけることができる(図2)。RcaE-GAFのPr型構造では、PCBの二重結合はC15-Eであったが、その配座は、*syn*配座をとっていた。この*syn*型の発色団を持つフィトクロムスーパーファミリーのタンパク質はRcaE-GAFが最初の報告であった。一方、詳細は割愛するが、緑色光吸収型での結晶構

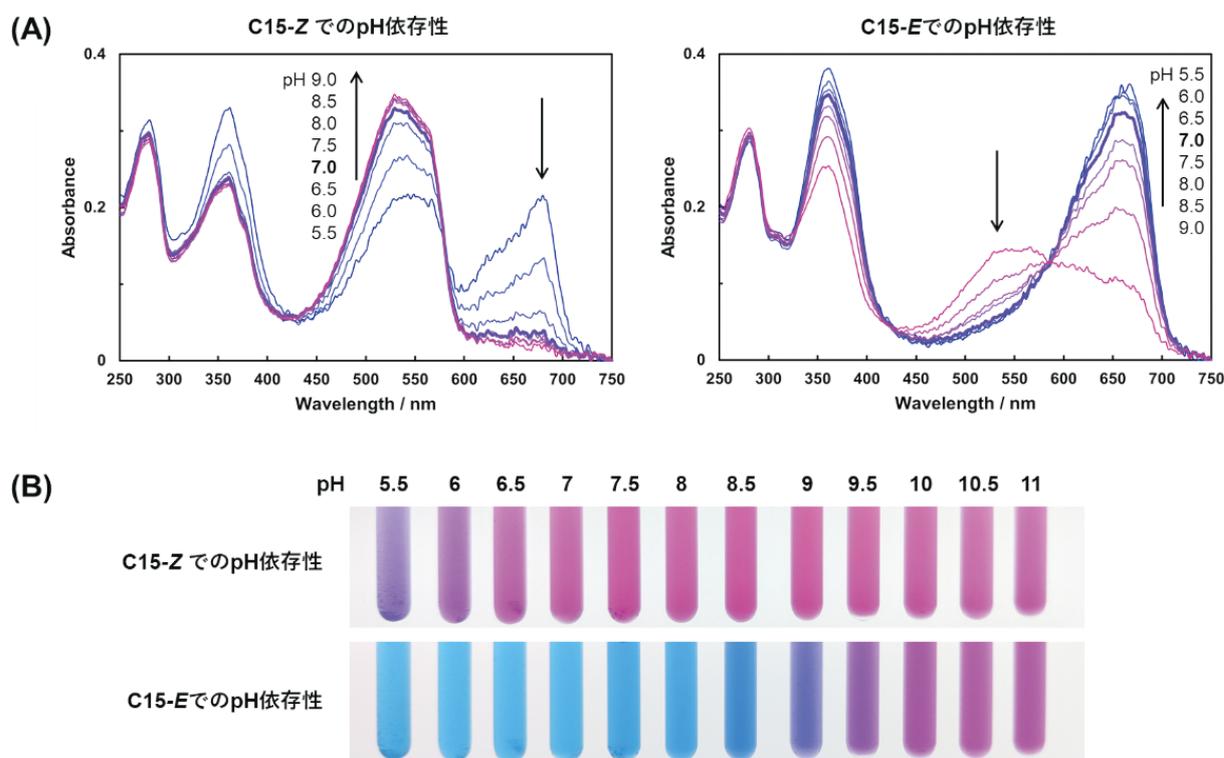


図3 RcaEの光吸収のpH依存性

C15-Zの状態でのUV-VisスペクトルのpH依存性(A、左)と、C15-Eの状態でのUV-VisスペクトルのpH依存性(A、右)。肉眼でのサンプルの色のpH依存性。C15-Zの状態(B、上)とC15-Eの状態(B、下)。

造では、C15-Z, *anti*型をとることを見出しており(図2)、光変換に伴い、二重結合に関する配置Z/Eだけでなく、配座*syn/anti*もともに同時に入れ替わるのもRcaEのみに見られる特徴である。またPCBは全体的に、GAFドメインによって形成される疎水性の環境にあり、Glu217がPCBと相互作用する唯一の酸性残基でPCBのA環、B環、C環の窒素原子と水素結合を形成していた(図4)。

4. 穴あきバケツ

RcaE-GAFの分子内部を調べたところ^[6]、S2-S3ループの残基Leu209およびPhe214側鎖と、C環およびD環の横に約200Å^[3]の比較的大きな空隙が存在していた。そして、この空隙内部には水分子が水素結合によって、一般的にPentagon waterと呼ばれる五角形のクラスターを形成しており、このクラスターは分子外部の溶媒領域へと繋がっていた(図5)。Pentagon waterは、他のタンパク質においても疎水的な分子表面で観測されることがあるが^[7]、筆者らの知る限りRcaE-GAFで観測されたような内部に水分子を持つ空隙は、他のフィトクロムスーパーファミリーのタンパク質ではこれまでに報告されていない。興味深いことに、Pentagon waterの一部は発色団PCBのNH基と水素結合しているGlu217のカルボキシ基と水素結合を形成していた(図5)。筆者らは、ループ構造(S2-S3 loop)が水分子のクラスターを内包し、その水素結合ネットワークが一方ではGlu217を介してPCBに、もう一方ではタンパ

ク質外部へとつながる(図5)この構造的特徴を、分子内部のPCBに対して水(分子)が抜ける、あるいは入ることができることから「穴あきバケツ」と名付けた^[5]。

また最近決定した緑色光吸収型のRcaE-GAFのX線結晶構造から、S2-S3ループはβ-ストランド構造をとり、タンパク質コア部分とβ-シートを形成することで、水分子が完全に締め出されることが明らかになっている。すなわち、赤色光吸収型ではPCB近傍に水分子が内包されているが、緑色光吸収型では、PCB近傍に水分子が存在しない。

5. ¹⁵N 直接観測による NMR

生体高分子のX線結晶構造解析からは、通常、水素の位置を決定できない。我々はPCBのプロトン化状態を評価するためにNMR法を用いた。生体高分子の解析に用いられるNMR法は、次元測定にせよ、二次元以上の多次元NMR測定にせよ、励起と観測を感度の良い¹H核で行うことが多い。そのためプロトン化状態を解析する目的として本来NMR法は相性のよい分光法のように思える。まず我々は、タンパク質側が非標識でPCBのみ同位体標識を施したRcaE-GAF試料を調製した。これは「非標識」のM9最小培地を用いて、タンパク質の発現誘導を行う直前にPCBの生合成前駆体である「5-アミノレブリン酸(¹⁵N標識体)」を取り込ませることにより可能である^[8,9]。NMR測定には2D ¹H-¹⁵N HSQC測定を用いた。しかし、赤色光吸収型および緑色光吸収

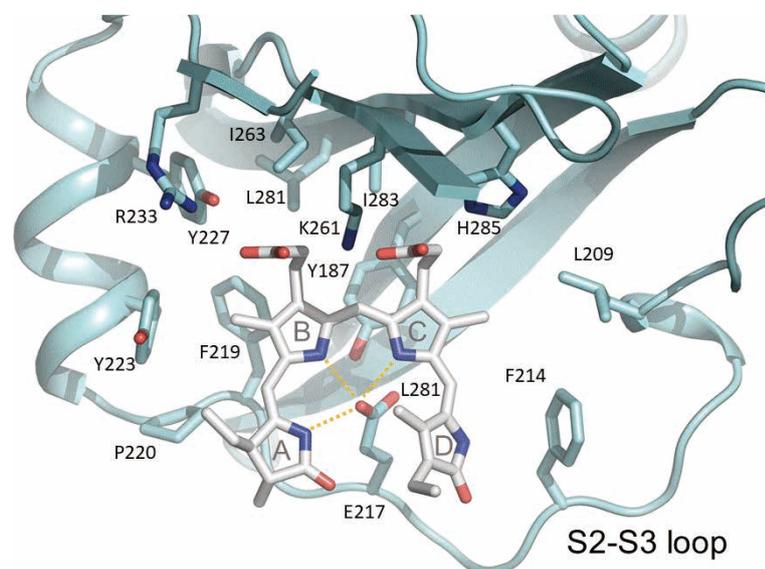


図4 赤色光吸収型でのX線結晶構造
GAFドメイン内でのPCB近傍のみを示す。水素結合は点線(黄色)で示す。

型の両者のスペクトルでPCBのピロール環のNH基由来の信号は1つしか観測されなかった。すべてのNH基の窒素原子がプロトン化していればA～D環由来の4つの信号が観測されるはずであるし、1か所のみがプロトン化されていないならば、3本の信号が見えるはずである。これはPCBの

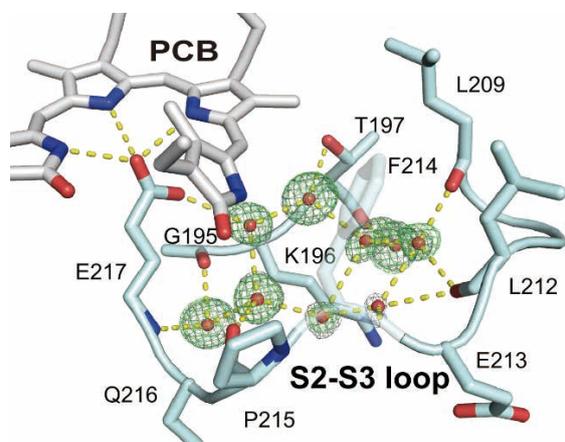
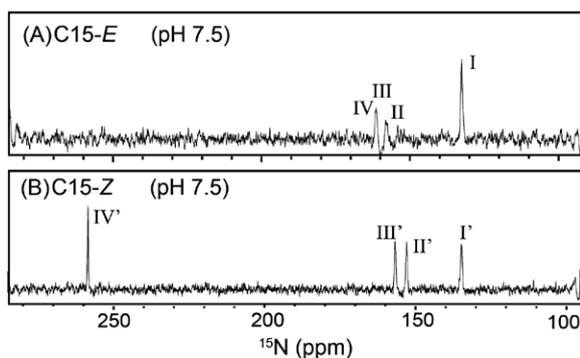


図5 S2-S3ループ内側に取り囲まれた水和水素結合を点線(黄色)で示す。

光変換

1D ^{15}N NMR



塩基性条件下

1D ^{15}N NMR

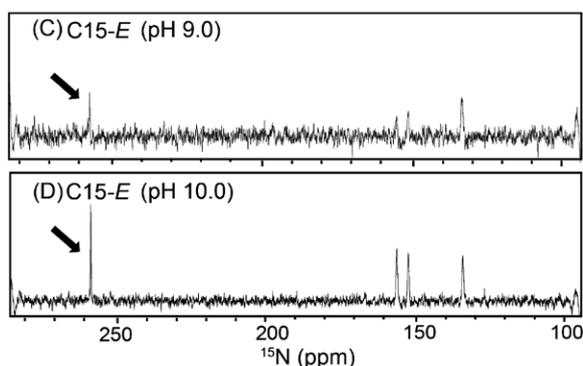


図6 PCBを選択的に ^{15}N 標識したRcaE-GAFドメインの ^{15}N NMRスペクトル
C15-E(赤色光吸収型)のスペクトル(A)とC15-Z(緑色光吸収型)のスペクトル(B)。C15-Eの状態ではpHを塩基性にし、強制的に脱プロトン化させたときのスペクトルを(C)と(D)に示す。それぞれpH 9.0とpH 10.0である。

NH基のHが溶媒の H^+ と交換する現象、すなわちHの脱着が極めて速く、NH基由来の信号が失われたものと推測された。プロトン励起かつプロトン観測である2D ^1H - ^{15}N HSQCでは ^1H から ^{15}N へスカラーカップリングを利用して磁化を移動させ、 ^{15}N 核の化学シフトの展開を行ったのち ^{15}N から ^1H へと磁化を戻すが、 ^1H の交換の速い対象では磁化移動を行う際に磁化が消失してしまう。通常このような場合は、温度を下げることにより交換を遅くさせて観測を試みるが、RcaEでは測定温度を303 Kから283 Kに下げても信号が現れることは無かった。 ^1H を観測に使うという点で ^1H 観測のNMR法がプロトン化状態の解析に相性が良いかという点、必ずしもそうではないといえよう。

そこで、 ^1H から ^{15}N への磁化移動を必要としない極めてシンプルな1次元測定である1D- ^{15}N 実験によって ^{15}N 信号の直接検出(^{15}N 励起、 ^{15}N 観測)を行った。 ^{15}N は磁気回転比がおおよそ ^1H の1/10であることから、その直接観測(1D- ^{15}N 実験)は原理的に極めて感度が低く、タンパク質のような生体高分子を対象に用いられたことはほとんどない。

感度の低さを克服するため、我々は、異種核用コイル(こちらを ^{15}N にセット)が内側に設置された極低温プローブを測定に使用した。このようなデザインのプローブは主に低分子有機化合物の測定を想定して導入されることが多いが、これをタンパク質の測定に用いた。その結果、1 mM程度のRcaE-GAF試料に対して、303 K、10時間程度の測定で、赤色光吸収型において4つの ^{15}N 信号(I, II, III, IV)を、緑色光吸収型においても4つの ^{15}N 信号(I', II', III', IV')を観測することに成功した(図6AおよびB)。赤色光吸収型のI, II, III, IVの化学シフトは、130 ~ 160 ppmである。緑色光吸収型のI', II', III'の化学シフトは、130 ~ 160 ppmで、IV'の化学シフトは258.1 ppmである。化学シフトで130 ~ 160 ppmに現れる信号はプロトン化されたシッフ塩基に対応する一方、緑色光吸収型にのみ観測された大きく低磁場シフトした信号IV'の化学シフト258.1 ppmは、脱プロトン化されたシッフ塩基に対応する。したがって、赤色光吸収型ではPCBの全ての窒素原子がプロトン化されており、緑色光吸収型では3つの窒素原子がプロトン化し、1つの窒素原子が脱プロトン化されていることを示している。

さらに pH 9.0 および pH 10.0 の条件下で、RcaE-GAF を C15-E 状態のまま、光変換をしないで 1D- ^{15}N 測定を行なった。興味深いことに、pH 9.0 と pH 10.0 の C15-E 状態においても、約 258 ppm に低磁場シフトした信号が明瞭に観測された (図 6C および D)。この実験結果は、pH 7.5 における C15-Z 状態の 258.1 ppm の NMR 信号が、脱プロトン化した PCB からの信号であることを裏付けている。

ここで ^{15}N 信号の帰属が出来れば、A 環～D 環の 4 つの窒素原子のうちどれがプロトン化または脱プロトン化されているかを特定できるが、現段階では NH や NC 関連の情報がないため、実験的に ^{15}N 信号の実験的な帰属はできていない。QM/MM 計算による ^{15}N NMR スペクトルのシミュレーションでは、B 環での脱プロトン化を仮定したときに最も良く実測のスペクトルを再現したことから B 環で脱プロトン化が起こるものと考えている^[5]。

5. PCB の完全な帰属を目指して

PCB の ^{15}N の帰属に加えて、PCB の ^{13}C の完全な帰属が得ることで、 ^{13}C の化学シフトの情報が π 電子共役系に関する有力な情報を与えることから、緑/赤色光吸収における極大吸収波長の変化を理解する上で大変有力な情報をもたらすことが期待できる。 ^{13}C を帰属するための測定に関しても、異種核 (^{13}C) 内巻きの極低温プローブの利用は解析の大きな助けになるであろう。しかしながら、PCB の均一な標識体を用いた解析では、そのスペクトルの複雑さ、また帰属の足掛かりになる情報が少ないという点から帰属作業が容易でない。

そこで筆者らは、PCB が選択的に部分 ^{13}C 標識された試料の調製に取り組んだ。M9 最小培地に、PCB 生合成の前駆体として添加する 5-アミノレブリン酸を選択的部分標識することで、PCB も選択的部分標識体として得る事ができる。当初、既報による合成法に従って部分標識された 5-アミノレブリン酸の合成に取り組んだが収率が十分とは言えなかったため、パラジウムとシクロヘキシルホスフィンを触媒とする福山カップリングを用いて合成法を改良し、十分な収量を得る事に成功した (投稿中)。現在、選択的部分 ^{13}C 標識を帰属の足掛かりとして、完全な PCB の帰属を進めている。

まとめ

^{15}N 直接観測による NMR 測定から、RcaE では、発色団 PCB の NH 基の窒素原子が、すべてプロトン化状態にある赤色光吸収型から、光変換により緑色光吸収型になる際に、脱プロトン化 (場所はおそらく B 環) が起こっていることが明らかになった。このプロトンの行先は水素結合を形成している Glu217 のカルボキシ基と考えるのが妥当であろう。このカルボキシ基は、穴あきバケツ構造の水素結合ネットワークを介してタンパク質の外側と繋がっている点も興味深い。PCB の脱プロトン化をもたらす一つの要因としては、緑色光吸収型ではタンパク質の構造変化により水分子の通り道が塞がれて、発色団 PCB の周りが極めて疎水的になるために脱溶媒和効果 (desolvation effect)^[10, 11] によりイオン型で存在できなくなるためと考えている。近年の NMR の高感度化により、生体高分子を対象とした場合 (すなわち濃度をあまり高くすることができない NMR 試料) で、かつ、 ^1H そのものを捉える事が困難であっても、 ^1H に関する情報を「異種核側」から取得することが可能となってきたことから、X 線結晶構造解析では得られないプロトン化/脱プロトン化の情報を得ることが可能である。光受容体の発色団に限らず、酵素の活性部位など、様々な対象についてプロトン化/脱プロトン化状態を異種核の直接観測によって同定することは、生体高分子の機能を理解するうえで大変意義深い。

謝辞

NMR 測定では、以下の方々にご協力いただきました。またマシントイムは以下の事業により提供していただきました。長島敏雄氏 (NMR 共用プラットフォームの最先端利用開発課題 PF18-01-R-018、理化学研究所)、宮ノ入洋平准教授 (NMR 共同利用研究 NMRCR-21-05、大阪大学)、伊藤隆教授 (東京都立大学)、神野智司氏 (株式会社 CRYO SHIP)。この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Rockwell, N. C., Su, Y. S. & Lagarias, J. C. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837-858 (2006).
- [2] Fushimi, K. & Narikawa, R. Cyanobacteriochromes: photoreceptors covering the entire UV-to-visible spectrum. *Curr Opin Struct Biol* **57**, 39-46 (2019).

- [3] Xu, X. *et al.* Structural elements regulating the photochromicity in a cyanobacteriochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 2432-2440 (2020).
- [4] Hirose, Y. *et al.* Green/red cyanobacteriochromes regulate complementary chromatic acclimation via a protochromic photocycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 4974-4979 (2013).
- [5] Nagae, T. *et al.* Structural basis of the protochromic green/red photocycle of the chromatic acclimation sensor RcaE. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118** (2021).
- [6] Jurcik, A. *et al.* CAVER Analyst 2.0: analysis and visualization of channels and tunnels in protein structures and molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics* **34**, 3586-3588 (2018).
- [7] Teeter, M. M. Water structure of a hydrophobic protein at atomic resolution: Pentagon rings of water molecules in crystals of crambin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6014-6018 (1984).
- [8] Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lim, S., Lagarias, J. C. & Ames, J. B. Characterization of Red/Green Cyanobacteriochrome NpR6012g4 by Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: A Protonated Bilin Ring System in Both Photostates. *Biochemistry* **54**, 2581-2600 (2015).
- [9] Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lim, S., Lagarias, J. C. & Ames, J. B. Characterization of Red/Green Cyanobacteriochrome NpR6012g4 by Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: A Hydrophobic Pocket for the C15-E, anti Chromophore in the Photoproduct. *Biochemistry* **54**, 3772-3783 (2015).
- [10] Robinson, A. C., Castaneda, C. A., Schlessman, J. L. & Garcia-Moreno, E. B. Structural and thermodynamic consequences of burial of an artificial ion pair in the hydrophobic interior of a protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 11685-11690 (2014).
- [11] Kougentakis, C. M., Skerritt, L., Majumdar, A., Schlessman, J. L. & Garcia-Moreno E, B. The properties of buried ion pairs are governed by the propensity of proteins to reorganize. *bioRxiv*, 2020.2002.2003.932012 (2020).



永江 峰幸 (ながえ・たかゆき)

2012年3月 名古屋大学 大学院工学研究科 学生物工学専攻 博士後期課程修了(博士(工学))
 2012年4月 名古屋大学 大学院工学研究科 中核の研究機関研究員
 2014年4月 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 博士研究員
 同6月 名古屋大学 シンクロトロン光研究センター 特任助教
 2016年4月 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 特任助教
 2019年4月 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 助教
 2022年4月 東京薬科大学 薬学部 助教



青山 洋史 (あおやま・ひろし)

2003年3月 岐阜大学大学院 工学研究科物質工学専攻 博士後期課程修了(博士(工学))
 2003年4月 科学技術振興機構 研究員
 2006年1月 理化学研究所 研究員
 2006年8月 東京大学 助教
 2011年4月 東京薬科大学 講師
 2013年4月 東京薬科大学 准教授



三島正規 (みしま・まさき)

2001年3月 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 分子生物学専攻 博士後期課程修了(博士(バイオサイエンス))
 2001年4月 横浜市立大学(木原記念生命科学振興財団) 博士研究員
 2001年12月 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 助手
 2006年4月 東京都立大学(首都大学東京) 理学研究科(理工学研究科) 准教授
 2007年2月-10月 日本学術振興会海外特別研究員 派遣先 欧州分子生物学研究所(EMBL Heidelberg)
 2021年4月 東京薬科大学 薬学部 教授

解糖系酵素の環境適応的な反応制御による 新たな代謝調節機構

理化学研究所 生命機能科学研究センター
八木 宏昌、葛西 卓磨、木川 隆則
hiromasa.yagi@riken.jp

1. はじめに

「代謝」というと、こういったイメージを思い浮かべるだろうか？ 新陳代謝、基礎代謝、薬物代謝など、様々な場面で使われる「代謝」とは、一般的には古いものが新しいものへ次々と入れ替わることを意味する。もう少し科学的な言い方をすれば、生物が生命活動を維持するために、外部から取り入れた有機物などを分解してエネルギーを獲得したり、あるいはそのエネルギーを使って物質を合成したりする一連の化学反応のことを指す。代謝は私たちの生活と密接に関わっており、例えば代謝の異常は、糖尿病、脂質異常症（高脂

血症）、肥満といった様々な生活習慣病の原因となることも知られている。

代謝の中で最も有名なものの一つに解糖系代謝がある（図1A、B）。解糖系は、食事などで体内に取り込んだデンプン等の分解によって生じるグルコース（ブドウ糖）を、10段階の連続した酵素反応によってピルビン酸に変換する代謝経路であり、その過程で高エネルギー通貨であるアデノシン三リン酸（ATP）を合成する。ほぼ全ての生物種に共通に存在し、その代謝量（解糖流量）は細胞内外の環境によって厳密に制御されると考えられている。例えば、細胞が酸素呼吸を行う場合、

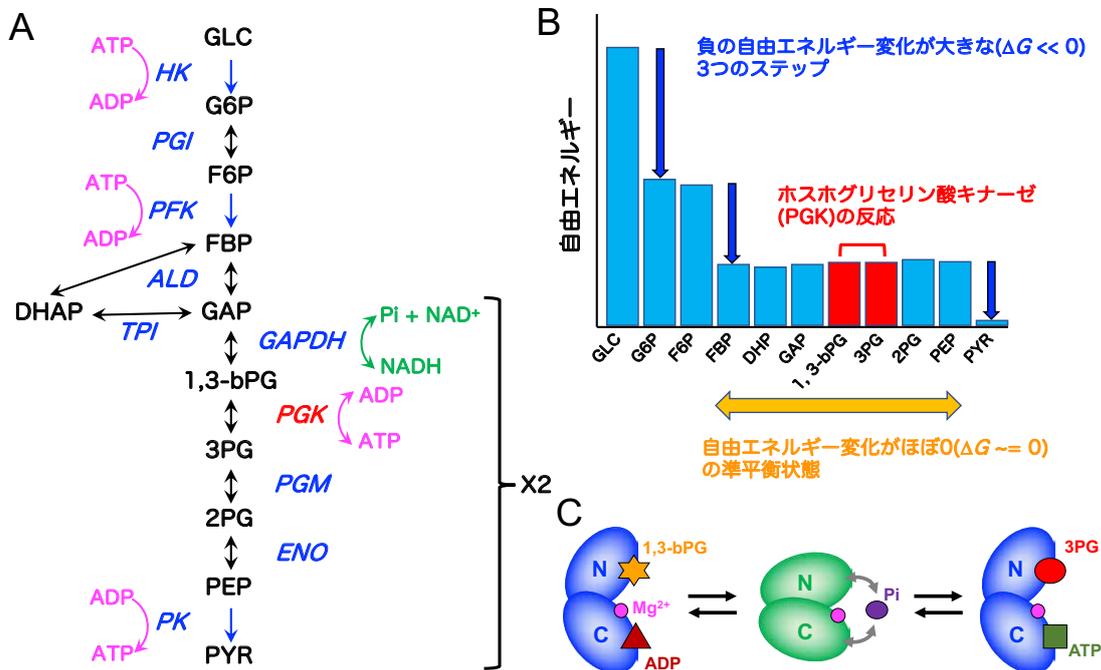


図1 解糖系とホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)

A: 解糖系代謝の模式図。片側矢印は不可逆反応、両端矢印は可逆反応を示す。B: 解糖系の各過程における反応自由エネルギーの模式図。C: PGKの反応機構模式図。N末ドメインにホスホグリセリン酸 (1,3-bPGおよび3PG)、C末ドメインにヌクレオチド (ADPおよびATP) が結合する。略語: GLC: グルコース、G6P: グルコース6-リン酸、F6P: フルクトース6-リン酸、FBP: フルクトース1,6-ビスリン酸、DHAP: ジヒドロキシアセトンリン酸、GAP: グリセルアルデヒド3-リン酸、1,3-bPG: 1,3-ビスホスホグリセリン酸、3PG: 3-ホスホグリセリン酸、2PG: 2-ホスホグリセリン酸、PEP: ホスホエノールピルビン酸、PYR: ピルビン酸、HK: ヘキソキナーゼ、PGI: ホスホグルコースイソメラーゼ、PFK: ホスホフルクトキナーゼ、ALD: アルドラーゼ、TPI: トリオースリン酸イソメラーゼ、GAPDH: グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、PGK: ホスホグリセリン酸キナーゼ、PGM: ホスホグリセリン酸ムターゼ、ENO: エノラーゼ、PK: ピルビン酸キナーゼ、ADP: アデノシン二リン酸、ATP: アデノシン三リン酸、NAD⁺: ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (酸化型)、NADH: ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (還元型)、Pi: 無機リン酸。

ピルビン酸はミトコンドリア内に輸送され、クエン酸回路を介して酸化リン酸化によってATPが合成される。酸素呼吸は、グルコース1分子から36分子のATPが合成される非常に効率の良いエネルギー獲得経路である。一方、細胞が酸素を利用できない条件では、ピルビン酸はミトコンドリア内には輸送されず、細胞質中で乳酸へと変換される(乳酸発酵)。この場合、酸素呼吸ができないので、ATP合成の多くは解糖系が賄うことになる。ただし、解糖系は2分子のATPしか合成できないので、必要なエネルギー量を得るためには、解糖系を活性化させ解糖流量を増加させる必要がある。効率の悪いエネルギー獲得過程であるが、呼吸を必要としないため瞬発的にエネルギーが必要な時のエネルギー源となる。腕立て伏せなどの筋トレをした際、筋肉に乳酸がたまったことを経験された方も少なくないだろう。またある種のガン細胞では、酸素があるにもかかわらず解糖流量が増加し、多くのATPが解糖系から合成されるワールブルグ効果と呼ばれる現象も知られている^[1]。一般的に、こうした解糖系の活性制御は、一連の酵素反応のうち自由エネルギー変化が大きく、自発的に反応が進む3つの不可逆反応過程(ヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ)で行われていると考えられてきた^[2]。しかし近年、自由エネルギー変化が小さい準平衡状態に存在する可逆反応を触媒する酵素も代謝恒常性やエネルギー獲得に関与していることが示唆されてきた(図1B)^[3]。

2. ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)

PGKは解糖系において7番目の酵素反応を担当し、1,3-ビスホスホグリセリン酸(1,3-bPG)が持つリン酸基の一つをADPに受け渡し、3-ホスホグリセリン酸(3PG)とATPを合成する。またグルコースを産出する糖新生ではこの逆反応が進む。つまり、両方向へのリン酸転移反応を可逆的に触媒する準平衡状態に位置する酵素である(図1A-C)。PGKはN末ドメインとC末ドメインが中央のヒンジヘリックスでつながった構造をしており、N末ドメインにホスホグリセリン酸、C末ドメインにヌクレオチドが結合し、反応時にはドメイン間の相対配置が開構造から閉構造に変化する(図1C、図2A)^[4]。PGKの反応機構に関しては、生化学実験で得られた反応時定数や基質結合定数を様々な基質結合状態で解かれた結晶構造に

落とし込むことで理解されてきた^[5]。しかしながら、これまで行われてきた生化学実験および多くの結晶構造は生理状態からかけ離れた条件下で解析されており、必ずしも生体内で起こる反応機構を正しく反映しているとは限らない。また、細胞内において、どのように活性が制御されるのかは全く理解されてこなかった。PGKは直接ATPを産出する酵素であるから、その活性制御は細胞中のATP濃度に大きく依存するはずである。事実、細胞中のATP/ADP濃度([ATP]/[ADP])比の減少にともない、グリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)と共役したPGKの累積反応自由エネルギーが増加するという報告^[3]や、[ATP]/[ADP]比がPGKの反応方向をコントロールする^[6]という報告もある。そこで私たちは、生理条件下で解析可能な溶液NMRと実際の細胞中で解析可能なin-cell NMRの手法を使い、細胞中におけるヒト由来のPGK(hPGK)の反応制御機構の解明と、さらにそれが解糖流量に与える影響を検証することにした。

3. 生理条件下における基質結合協同性

hPGKは分子量45kDaのモノマータンパク質であり、NMR解析にとって比較的大きな観測対象のため、イソロイシン残基(Ile)の δ 位メチル基を選択的¹H/¹³C標識し^[7]、メチルTROSY法^[8,9]を使って解析を進めた(図2A, B)。hPGKに含まれる19個のIle残基の信号をアミノ酸置換法によって全て帰属した後、3PG, MgADP, MgAMPPNP(ATP非加水分解アナログ)の基質結合実験を行った^{注1}。その結果、C末ドメインに結合するMgADPでは、基質結合サイト近傍に位置するIle-370の信号が大きくシフトし、また同様にMgAMPPNPにおいても主にC末ドメインに含まれるIle残基の信号に摂動が観測された。一方、N末ドメインに結合する3PGでは、結合サイトから遠いC末ドメインに含まれるIle残基の信号にまで影響がおよび、特にIle-367の信号に大きな摂動が観測され、アロステリックな構造変化が示唆された(図2C)。したがって、全てのIle残基の化学シフト変化量を使い、それぞれの基質のhPGKに対する解離定数を求めた。その結果、解離定数は塩濃度に大きく影響されることがわか

注1 PGKの反応にはMg²⁺イオンが必須であるため、ADPおよびAMPPNPの滴定の際は等濃度のMg²⁺イオンを加えている。

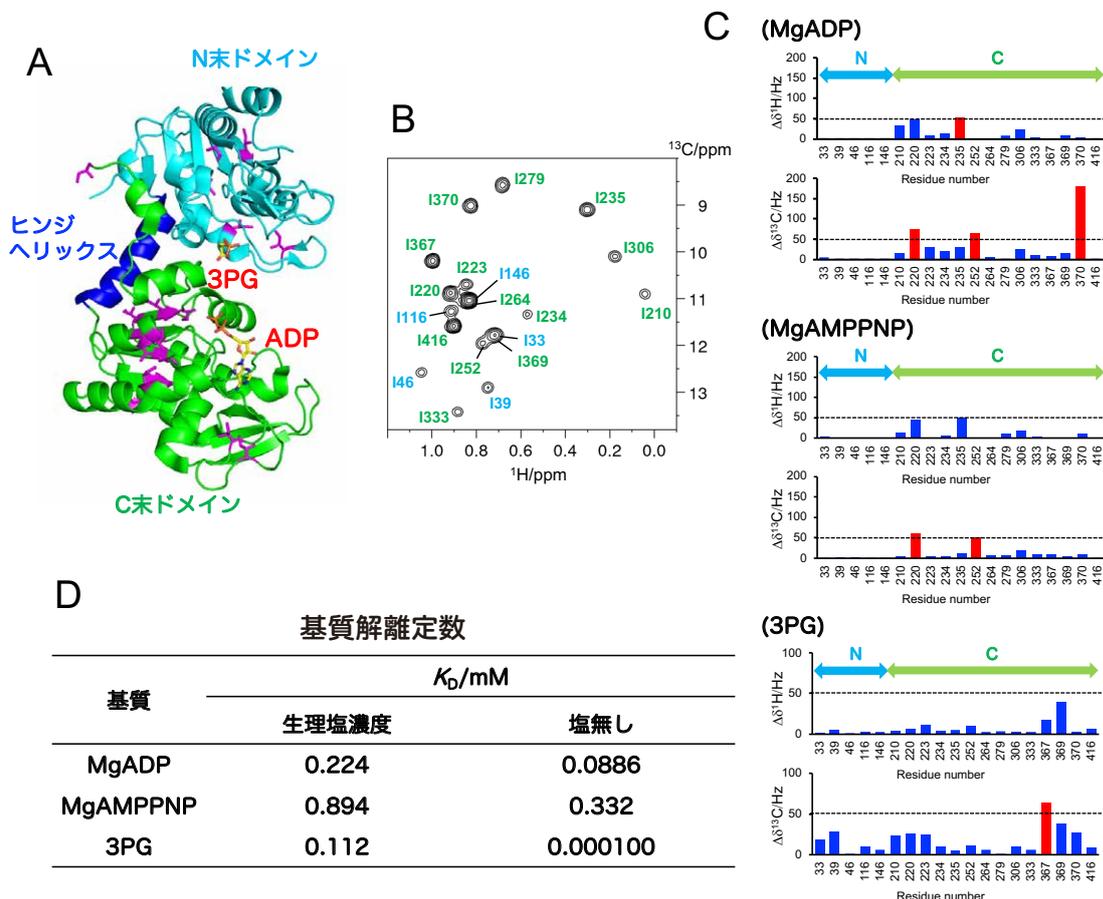


図2 NMRによるhPGKの基質結合解析

A; hPGKの結晶構造 (PDB ID = 2XE7)。N末ドメインをシアン、C末ドメインを緑、ヒンジヘリックスを青、イソロイシン残基 (Ile) をマゼンタで表示した。B; Ileの δ 位メチル基選択 ^{13}C 標識hPGKの ^1H - ^{13}C HMQC (メチルTROSY) スペクトル。Ile残基の信号帰属 (N末、C末ドメインに色分けして表示; A参照) と共に表示した。C; 基質滴定によるIle残基の化学シフト変化。PGKに対し30等量のMgADP、60等量のMgAMPPNPおよび20等量の3PGを加えた時の ^1H と ^{13}C の化学シフト変化量を各残基に対してHz単位でプロットした。50Hz (破線) を超える化学シフト変化は赤色バーで示した。D; 各基質のhPGKに対する解離定数。生理塩濃度 (25 mM HEPES, pH 7.2, 120 mM KCl, 5 mM KPi) と塩無し (25 mM HEPES, pH 7.2) 条件下におけるそれぞれの基質の K_D 値を比較した。

り、特に生理塩濃度下の3PGの解離定数は塩を含まない溶媒中と比べ1000倍程度高くなることが判明した (図2D)。なお、PGKのもう一つの基質である1, 3-bPGは、水溶液中で非常に不安定で急速に加水分解するため、基質滴定実験に至らなかったことを断っておく。

さて、ヌクレオチドと3PGの解離定数が分かったところで次なる疑問は、それらの結合はお互いに何かしら影響し合うのだろうか、ということである。そこで、3PGとMgADPおよび3PGとMgAMPPNPの共基質滴定実験を行った。ここでは、3PG滴定によって高磁場シフトするIle-367の信号変化に注目する。3PGを加えていない時の化学シフト値を3PG非結合状態、またPGKに対し20当量加えた際の化学シフト値を3PG結合状態と定義する (図3A)。まず、MgADPが予め結合した状態で3PG滴定を行った場合、3PG結合状態の化学シフト値に達するにはMgADPが

結合していない時と比べ、3倍程度多くの3PG量が必要であることが分かった。逆に3PGが既に結合した状態でMgADP滴定を行うと、Ile-367の信号は低磁場シフト、つまり3PG非結合状態の化学シフト値に向かって変化する様子が観測された。一方、MgAMPPNPが結合した状態で3PG滴定を行った結果、3PG結合状態の化学シフト値を超えてさらに高磁場シフトし、同様な変化は3PG結合状態でのMgAMPPNP滴定においても観測された。興味深いことに、安定した閉構造を形成する反応中間体 (Transition State Analog: TSA 複合体) の化学シフト値は、3PG非結合状態と結合状態の化学シフト値を結んだ延長線上に観測されている。つまり、hPGKは3PGとMgAMPPNPが同時に結合することで閉構造にシフト (あるいは閉構造の割合が増加) することを意味している。このように、ヌクレオチドと3PGの結合には何らかの協同性があることが示唆されたので、全て

のIle残基の化学シフト変化量を図3Bで示した4状態基質結合モデルにフィッティング(グローバル化学シフトフィッティング)し、基質滴定中に4状態全ての基質結合状態の割合が変化することを考慮にいたした“exact analysis”^[10]を用いて結合協同性因子(α)を算出した。ここでもし $\alpha > 1$ であれば正の結合協同性、一方 $\alpha < 1$ であれば負の結合協同性を示す。その結果、MgADPと3PGでは α の値が0.448となり、両者の結合には負の協同性があることが分かり、またMgAMPPNPと3PGでは $\alpha = 1.36$ となり、これらには正の結合協同性を持つことが判明した(図3C)。これらのことは、MgADPがhPGKに結合していると3PGの結合力は2倍程度弱くなり、逆にMgAMPPNPが結合している場合は、結合していない時と比べ、1.4倍程度強くなることを示している。では、こ

うした基質結合協同性がhPGKの反応機構にどのような影響を与えているのだろうか。

4. 基質結合協同性による hPGK の活性制御

その疑問を解決するため、hPGKの酵素反応を試験管内で再現しリアルタイム計測することにした。前述の通り、1, 3-bPGは水溶液中で非常に不安定で化学合成で得ることが困難なため、PGKの一つ前の酵素反応を担当するGAPDHとのカップリング反応をデザインし(図4A)^[11]、反応産物である3PGのNMR信号をヌクレオチド濃度が異なる条件で測定した。その結果、MgADP濃度がhPGK濃度に対し3倍過剰にある場合では、フリー状態の3PG信号が観測された。このことは、MgADPと3PGの負の結合協同性が3PGのhPGKからの解離を促進していることを示している。一

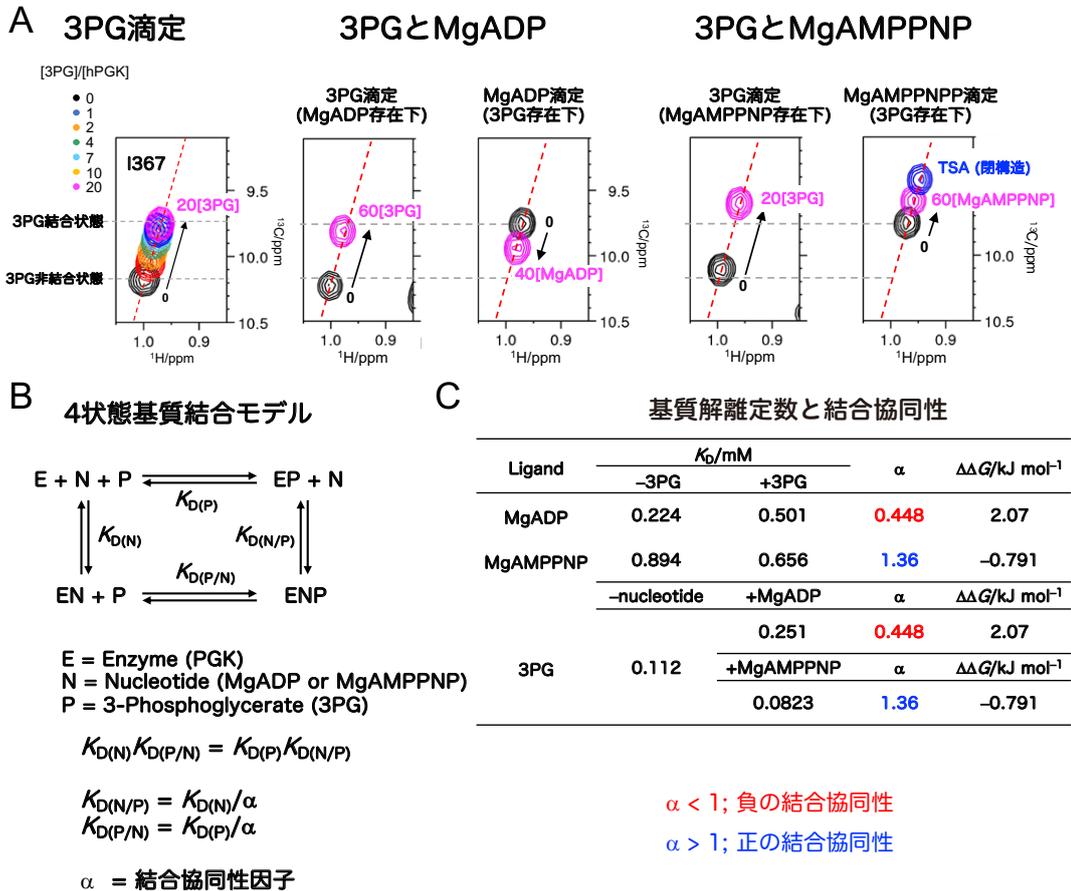


図3 基質結合協同性解析

A; 基質滴定によるIle-367の化学シフト変化。3PG滴定により3PG非結合状態の化学シフト値から高磁場(右上)シフトし、およそ20等量加えたところで3PG結合状態の化学シフト値に達した(左図)。MgADPが結合している場合、3PG結合状態の化学シフト値に達するにはおよそ60等量の3PGを要した(左から2番目)。3PGが結合している場合、MgADP滴定により3PG結合状態の化学シフト値にある信号は3PG非結合状態の化学シフト値にむかい低磁場(左下)シフトした(左から3番目)。MgAMPPNPが結合している場合、20等量の3PG滴定は3PG結合状態の化学シフト値を超えてさらに高磁場シフトした(右から2番目)。同様な化学シフト変化は3PGが結合した場合のMgAMPPNP滴定でも観測された(右図)。3PG結合状態と非結合状態の化学シフト値を結ぶ線を赤破線で示した。TSA複合体形成時の信号を青で表示した。B; 4状態基質結合モデル。C; グローバル化学シフトフィッティングで求めた α 値と基質解離定数。3PGが結合している時のMgADPおよびMgAMPPNPの K_D 値、またMgADPおよびMgAMPPNP結合している時の3PGの K_D 値は α 値から計算した。

方、上記条件に加えMgAMPPNP濃度がhPGK濃度に対し20倍過剰にある条件下では、3PG信号はフリーとhPGK結合型の混合状態として観測され、MgAMPPNPと3PGの正の結合協同性が3PGのhPGKからの解離を一部抑制する働きを示すことが判明した(図4B)。

さらに、こうした反応制御が実際の細胞内で行われているかを検証するため、バイオリアクターを活用したin-cell NMR計測を行い(図5A)^[12, 13]、異なる細胞内ATP濃度におけるhPGKの基質結合状態を観測した。バイオリアクターはin-cell NMR計測中の細胞に新鮮な培地を常に供給するシステムで、バイオリアクターを使用しない場合では細胞内ATP量が30分程度で枯渇するのに対し、バイオリアクターを使用すると、細胞内

ATP量は数時間保たれることが知られている^[13]。エレクトロポレーション法(図5A)^[12]によってHeLa細胞内に導入したhPGKは細胞質中に均一に分布することを確認した後、in-cell NMR計測を行った。その結果、バイオリアクターを使わない場合、つまりATP枯渇状態におけるin-cell NMRスペクトルはin vitroにおけるMgADP結合型スペクトルとよく一致し、3PGが結合していない状態であることが判明した。一方、バイオリアクターを使った場合、すなわち通常状態では、部分的に3PGが結合したin-cell NMRスペクトルが観測され、前述した試験管内での解析結果とよく一致する結果となった。これらの結果から、hPGKは、ATP合成を促進すべき状況ではADP結合状態を増やして合成反応を進め、そうでない

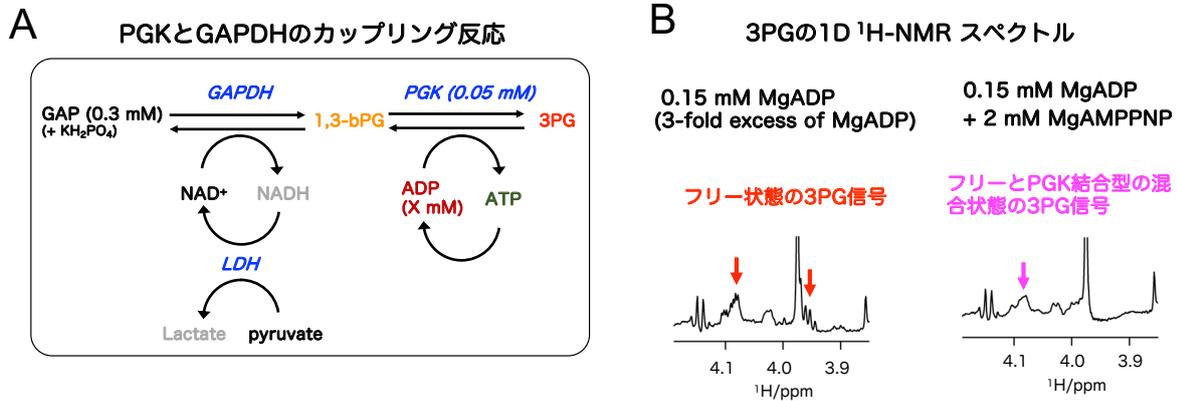


図4 hPGK反応のリアルタイム計測

A; 乳酸脱水素酵素(LDH)によるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)再生系と共役したhPGKとGAPDHのカップリング反応。B; 3PGの1D ¹H-NMRスペクトル。

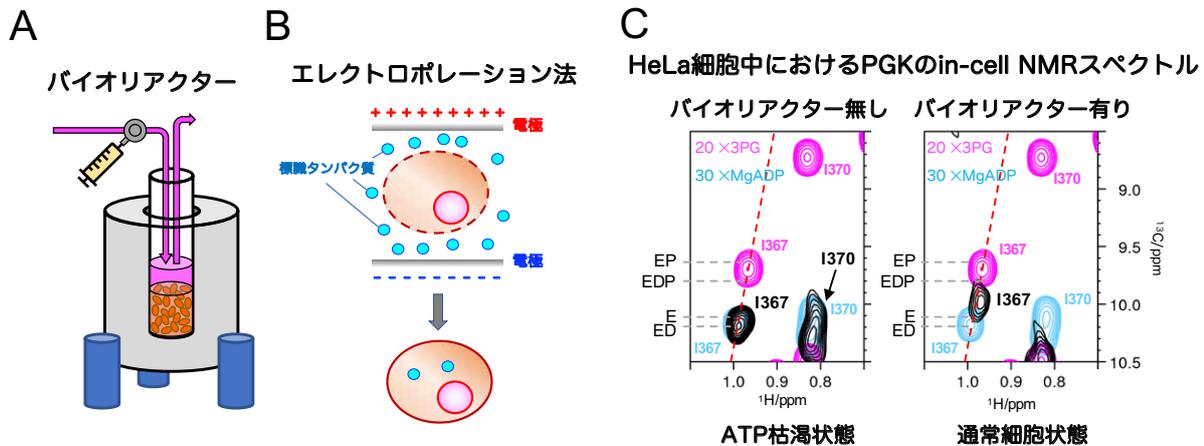


図5 hPGKのin-cell NMR計測

A; バイオリアクター概念図。実際の測定では、培地灌流によって細胞がNMR試料管から流れないように、細胞をアルギン酸ビーズで包埋している^[12]。B; エレクトロポレーション法概念図。電気パルスによって細胞膜に形成された一時的な細孔を介して目的タンパク質が細胞内に導入される。C; hPGKのin-cell NMRスペクトル。In-cell NMRスペクトル(黒)をMgADP結合状態(シアン)および3PG結合状態(マゼンタ)のin vitroスペクトルと重ねて表示した。E, ED, EP, EDPはそれぞれ、基質非結合状態、MgADP結合状態、3PG結合状態、MgADPと3PGが同時に結合した状態の化学シフト値を示す。

場合は3PGをある程度結合させることで合成反応が進みすぎないように自身の反応を制御していることを示唆している (図5B)。

5. ATP 濃度に依存した hPGK の 基質結合状態変化

このようにして明らかになった基質結合協同性とhPGKの反応制御の関係をより定量的に理解するため、それぞれの基質の解離定数、ならびに結合協同性因子 (α) の値をもとに、[ATP]/[ADP] 比に対する様々な基質結合状態の割合をシミュレーションにより推定した (図6A)。一般的に哺乳

乳細胞の [ATP]/[ADP] 比は1 ~ >100程度の範囲で変化すると考えられているため^[6, 14]、[ATP]/[ADP] = 1の時に飢餓状態、[ATP]/[ADP] = 100の時に通常状態と定義した。まず飢餓状態では、大半の割合がADP結合状態によって占められることが判明した。この状態は、1, 3-bPGの結合を待っている状態、すなわち順方向への反応が活性化される状態にあることを示している。今仮に、基質結合協同性がない (すなわち $\alpha = 1$) と仮定すると、飢餓状態におけるADP結合状態の割合は減少し、逆にADPと3PGが同時に結合した状態の割合が増加することになり、順方向への

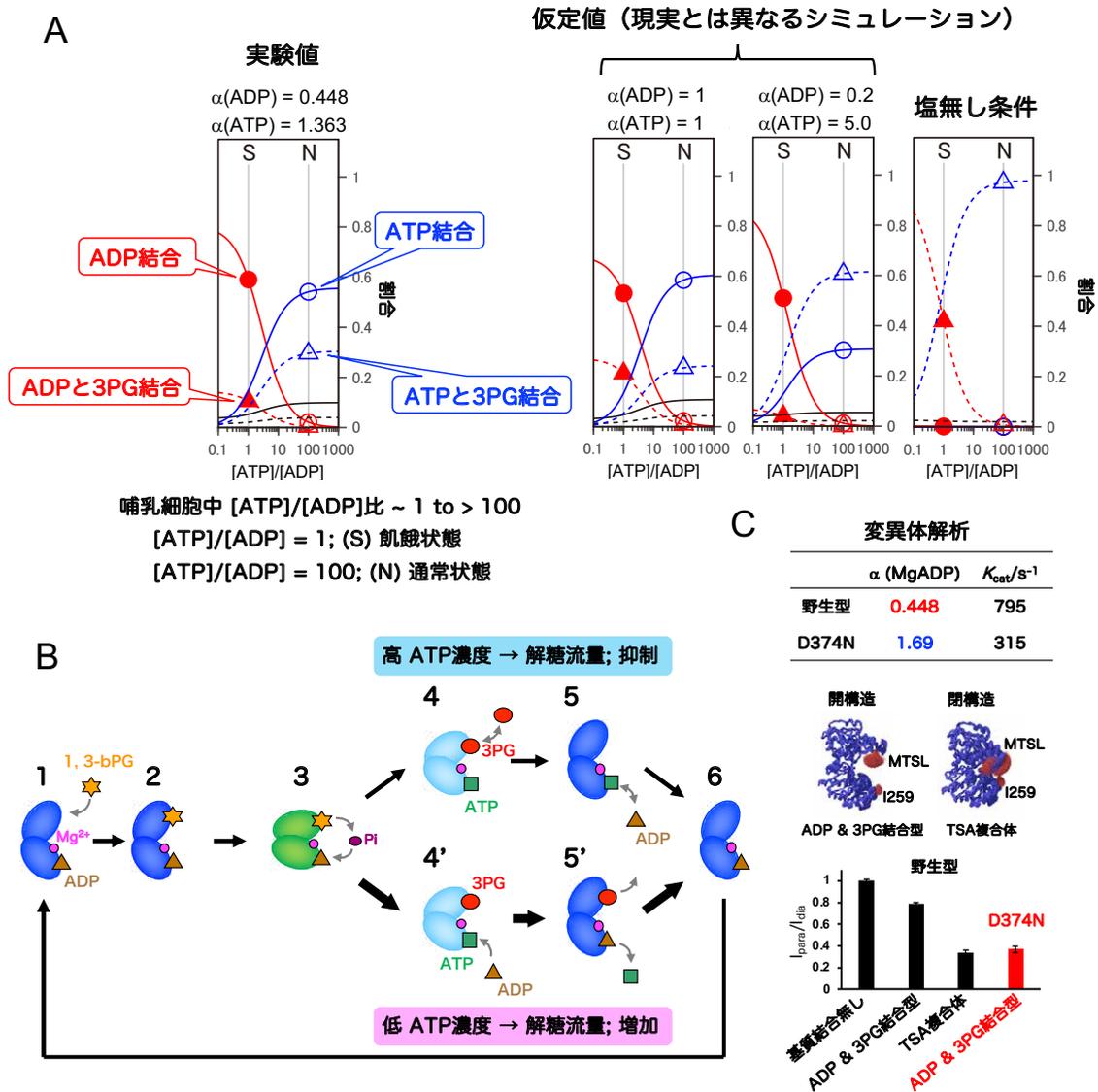


図6 細胞内ATP濃度に呼応したhPGKの反応制御機構

A; [ATP] / [ADP] 比に対する基質結合状態の割合変化。ADP 結合状態とADPと3PGが同時に結合した状態の割合変化を赤実線と赤破線、ATP結合状態とATPと3PGが同時に結合した状態の割合変化を青実線と青破線、基質非結合状態と3PG結合状態の割合変化を黒実線と黒破線で表示した。実験値、結合協同性がないと仮定した ($\alpha = 1$) 場合、結合協同性が実験値よりも強いと仮定した ($\alpha(\text{ADP}) = 0.2, \alpha(\text{ATP}) = 5.0$) 場合、および塩無し条件下で求めた K_D 値を使った場合のシミュレーション結果を表示した。B; 本研究より提唱したhPGKの反応スキーム。C; 常磁性緩和 (PRE効果) を利用したhPGKの構造変化解析。N末ドメインに常磁性MTSLタグを導入しC末ドメインに導入したIle残基の信号強度変化を観測した。野生型ではTSA複合体で強いPRE効果が見られたのに対し、ADPと3PGに正の結合協同性が見られたD374N変異体では、ADPと3PGが同時に結合した状態において野生型のTSA複合体と同程度のPRE効果が観測された。

反応が進みにくくなる。つまり、ADPと3PGの負の結合協同性は順方向への反応促進に寄与していることを示している。一方通常状態では、ATP結合状態とATPと3PGが同時に結合した状態で占められており、ほとんどのhPGKはATP結合状態であることが判明した。もし仮に、基質結合協同性が実験値よりも強いと仮定すると、ATPと3PGが同時に結合した状態の割合がATP結合状態の割合を上回ってしまい、順方向への反応が過度に抑制されてしまうことが考えられる。さらに重要な点は、塩を含まない溶媒中で決定した解離定数を用いた場合、飢餓状態でのADP結合状態はほぼ無くなり、また通常状態は、ATPと3PGが同時に結合した状態でほぼ100%占められ、順方向、逆方向ともに反応が進まなくなってしまうという結果となった。つまり、今回明らかになった結合協同性を利用した反応制御は、生理条件下で最適に発揮できるよう精密にチューニングされていると言ってもいいだろう。

6. PGKの活性制御による解糖流量調整機構

以上、これまで述べてきた結果をもとに、私たちは細胞内[ATP]/[ADP]比に呼応したhPGKの反応機構を図6Bのように提唱した^[15]。ADP結合状態に1,3-bPGが結合すると反応が進みATPと3PG結合状態が形成される。ここでATP濃度が高い場合にはATPと3PGの正の結合協同性により3PGの解離が一部阻害され、その結果、解糖流量が制限される。ここで重要な点は解糖流量

の制御は一部であり、決して止まってはいないということである。このことが、ミトコンドリア内で行われる酸化リン酸化によるエネルギー生産を可能にしている。一方、ATP濃度が低い場合は、結合したATPは素早くADPと置き換わり、ADPと3PGの負の結合協同性が3PGの解離を促し、その結果解糖流量を増大させ、解糖系によるエネルギー生産を促進する。一方、活性部位においてMg²⁺イオンと直接結合するアスパラギン酸374をアスパラギンに置換したD374N変異体は、野生型とは異なりADPと3PGが強い正の結合協同性を示すことがわかった。さらに常磁性効果(PRE効果)を使った解析から、この変異体はADPと3PGが同時に結合すると反応中間体で形成される閉構造を安定化することが明らかになった(図6C)。しかしながら、その酵素活性は野生型に比べて6割程度減少する。つまり、酵素反応時に形成される閉構造は素早く開放される必要があり、ADPと3PGの負の協同性は、酵素のターンオーバーを円滑に進ませるための重要な要素であると言える。

ところで、本研究で明らかになった基質結合協同性の持つ結合自由エネルギー差($\Delta\Delta G$)は、およそ $-0.8 \sim 2 \text{ kJ/mol}$ という非常に小さなものであった。しかしながら、PGKは準平衡状態の反応を触媒するため、このような小さなエネルギー差でも解糖流量を大きく制御することができる。逆に、エネルギー差が小さいが故に基質の合成・分解の両方向への触媒反応が可能であるとも言え

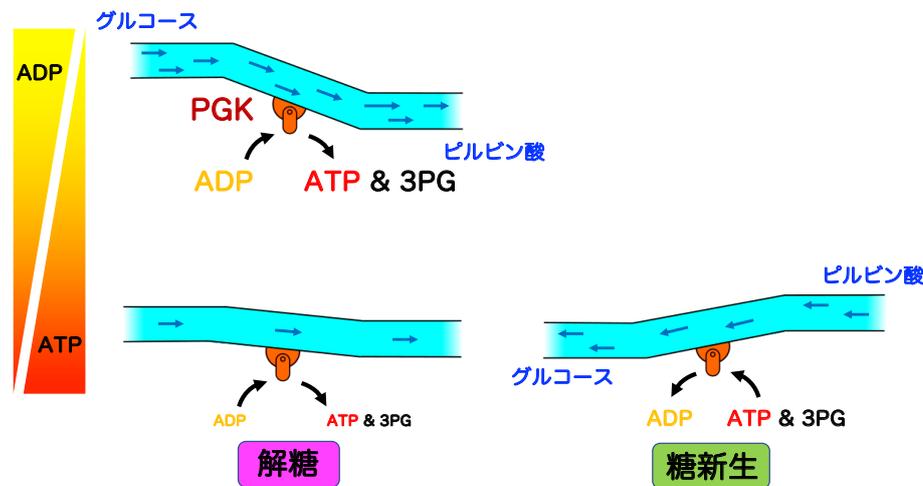


図7 ATP濃度に依存したPGKの反応制御による解糖流量調節

細胞中のATP濃度が高い場合(通常状態、下段)は、3PGとATPの正の協同性から3PGの解離が抑えられ、解糖流量を抑制する。細胞中のATP濃度が低い場合(ATP枯渇状態、上段)は、反応終了後に生じたATPがADPと素早く置き換わり、ADPと3PGの負の協同性が3PGの解離を促進し解糖流量が増加する。一方、逆反応である糖新生はATP濃度が高い場合のみに起こりうる。基質結合協同性の非常に小さな結合自由エネルギー差の違いが両方向へのフレキシブルな代謝制御を可能にする。

る(図7)。基質結合の協同性を利用した制御機構はこれまでも例があり、例えばプロテインキナーゼAの触媒サブユニット(PKA-C)は、ATPとペプチド(原料)の間に正の結合協同性があり、ADPとリン酸化ペプチド(生産物)の間に負の結合協同性がある^[16]。一方、Srcキナーゼは、原料側に負の結合協同性、生産物側に正の結合協同性を持つ^[17]。ただしこれらの酵素は、一方向へのリン酸転移反応を触媒する酵素であるため、原料側か生産物側か、どちらか一方を反応の律速過程としておけば制御機構が成り立つ。これらに対しPGKは両方向への反応を触媒する酵素であるため、どちらか一方を律速過程にしてしまうと逆反応が進まなくなってしまう。したがって、今回明らかにした制御機構は、両方向への反応を触媒する酵素にとって非常に効率的なタンパク質レベルでの反応制御機構であると考えられる。このことは、解糖系の制御には、これまでに多数の報告がある遺伝子発現の制御に基づく酵素量の増減による調節に加え、酵素自身に内在する新たな調節機構の存在を示すものである。

7. おわりに

今回明らかにしたPGKによる解糖流量の調整機構はこれまで考えられてこなかった準平衡状態の酵素反応がもたらすものであった。興味深いことに、PGKを含む準平衡状態に存在する酵素カスケードは、独立栄養生物と考えられている原始細胞に既に存在しており、ここでは解糖の逆反応である糖新生を担っていたと考えられている^[18]。現在でもこの酵素カスケードは、グルコース枯渇時に主に肝臓等で行われる糖新生に利用されており、両方向への触媒反応を環境適応的に調整していることが考えられる。では、他の酵素もPGK同様それぞれ独立して代謝調整を行うのか、あるいはそれらが協調することによって代謝制御を行うのだろうか? 現段階では不明である。さらに近年、解糖系酵素は低酸素条件下で過渡的な集合体を形成して解糖系代謝を向上させることが明らかになった^[19, 20]。解糖系に関する研究の歴史は古く、ともするともはや終わった学問と考えられていた風潮もあった。しかしながら、こうした新たな概念の発見により、その図式は大きく変わりつつある。これまで考えられてきたミカエリス・メンテン型の酵素反応の記述だけでは表現仕切れないことは明らかであり、今後、従来の常識に囚

われない表現・理解が求められる。折しも今年2022年はOtto Meyerhofが代謝研究でノーベル生理学・医学賞を受賞してから100周年にあたる年であり、解糖系代謝を見直してみる良い時期にきているかもしれない。

謝辞

本稿で述べた研究成果は東京都立大学理学部の池谷鉄兵准教授との共同研究によるものです。また本研究成果の一部は、フランス、ストラスブール大学からサマーインターンシップ実習生として当研究チームに1ヶ月あまり滞在したElisa Rioual氏とともに行ったものです。この場をお借りして感謝いたします。本研究は、科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業CREST(構造生命: JPMJCR13M3) および理化学研究所運営費交付金(生命機能科学研究、RIKEN Pioneering Project「Dynamic Structural Biology」, 「Biology of Intracellular Environments」)による支援を受けて行われました。

参考文献

- [1] Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-314 (1956).
- [2] Berg, J.M., Tymoczko, J. & Stryer, L. Glycolysis and gluconeogenesis. In *Biochemistry. 5th edition.* 644-698 (W H Freeman, 2002).
- [3] Park, J.O. *et al.* Near-equilibrium glycolysis supports metabolic homeostasis and energy yield. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 1001-1008 (2019).
- [4] Zerrad, L. *et al.* A spring-loaded release mechanism regulates domain movement and catalysis in phosphoglycerate kinase. *J. Biol. Chem.* **286**, 14040-14048 (2011).
- [5] Vas, M., Varga, A. & Gráczner, E. Insight into the mechanism of domain movements and their role in enzyme function: example of 3-phosphoglycerate kinase. *Curr. Protein Pept. Sci.* **11**, 118-147 (2010).
- [6] Veech, R.L., Lawson, J.W., Cornell, N.W. & Krebs, H.A. Cytosolic phosphorylation potential. *J. Biol. Chem.* **254**, 6538-6547 (1979).
- [7] Gardner, K. & Kay, L.E. Production and incorporation of ¹⁵N, ¹³C, ²H (¹H- δ 1 methyl) isoleucine into proteins for multidimensional NMR studies. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7599-7600 (1997).
- [8] Tugarinov, V., Hwang, P.M., Ollerenshaw, J.E. & Kay, L.E. Cross-correlated relaxation enhanced ¹H-¹³C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 10420-10428 (2003).
- [9] Ollerenshaw, J.E., Tugarinov, V. & Kay, L.E. Methyl TROSY: explanation and experimental verification. *Magn. Reson. Chem.* **41**, 843-852 (2003).
- [10] Velazquez-Campoy, A., Goñi, G., Peregrina, J.R. & Medina, M. Exact analysis of heterotropic interactions in proteins: Characterization of cooperative ligand binding by isothermal titration calorimetry.

- Biophys. J.* **91**, 1887-1904 (2006).
- [11] Ikemoto, A., Bole, D.G. & Ueda, T. Glycolysis and glutamate accumulation into synaptic vesicles. Role of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 5929-5940 (2003).
- [12] Inomata, K., Kamoshida, H., Ikari, M., Ito, Y. & Kigawa, T. Impact of cellular health conditions on the protein folding state in mammalian cells. *Chem. Commun.* **53**, 11245-11248 (2017).
- [13] Kubo, S. *et al.* A gel-encapsulated bioreactor system for NMR studies of protein-protein interactions in living mammalian cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 1208-1211 (2013).
- [14] Traut, T.W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell. Biochem.* **140**, 1-22 (1994).
- [15] Yagi, H., Kasai, T., Rioual, E., Ikeya, T. & Kigawa, T. Molecular mechanism of glycolytic flux control intrinsic to human phosphoglycerate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118** (2021).
- [16] Wang, Y. *et al.* Globally correlated conformational entropy underlies positive and negative cooperativity in a kinase's enzymatic cycle. *Nat. Commun.* **10**, 799 (2019).
- [17] Foda, Z.H., Shan, Y., Kim, E.T., Shaw, D.E. & Seeliger, M.A. A dynamically coupled allosteric network underlies binding cooperativity in Src kinase. *Nat. Commun.* **6**, 5939 (2015).
- [18] Xavier, J.C. *et al.* The metabolic network of the last bacterial common ancestor. *Commun. Biol.* **4**, 413 (2021).
- [19] Miura, N. *et al.* Spatial reorganization of *Saccharomyces cerevisiae* enolase to alter carbon metabolism under hypoxia. *Eukaryot. Cell* **12**, 1106-1119 (2013).
- [20] Yoshimura, Y. *et al.* Small-scale hypoxic cultures for monitoring the spatial reorganization of glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol. Int.* **45**, 1776-1783 (2021).



八木 宏昌 (やぎ・ひろまさ)

1995年3月 横浜国立大学工学部物質工学科卒業
 1997年3月 横浜国立大学大学院工学系研究科物質工学専攻修士課程修了
 2000年3月 横浜国立大学大学院工学系研究科物質工学専攻博士課程修了 博士(工学)
 2000年4月-2000年8月 横浜国立大学 博士研究員
 2000年9月-2008年3月 大阪大学蛋白質研究所 助手・助教
 2008年4月-2012年12月 オーストラリア国立大学 博士研究員
 2013年1月-2015年3月 モナッシュ大学(オーストラリア) 博士研究員
 2015年4月-2018年3月 理化学研究所生命システム研究センター 研究員
 2018年4月- 理化学研究所生命機能科学研究センター 研究員



葛西 卓磨 (かさい・たくま)

2001年3月 東京大学理学部生物化学科卒業
 2003年3月 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻修士課程修了
 2006年3月 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻博士課程修了 博士(理学)
 2006年4月-2008年7月 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター リサーチアソシエイト
 2008年8月-2011年3月 理化学研究所生命分子システム基盤研究領域 特別研究員
 2011年4月-2013年3月 理化学研究所生命分子システム基盤研究領域 研究員
 2013年4月-2018年3月 理化学研究所生命システム研究センター 研究員
 2016年10月-2020年3月 科学技術振興機構 さきがけ研究者(兼務)
 2018年4月- 理化学研究所生命機能科学研究センター 研究員



木川 隆則 (きがわ・たかのり)

1989年3月 東京大学理学部生物化学科卒業
 1991年3月 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻修士課程修了
 1994年3月 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻博士課程修了 博士(理学)
 1994年4月-2001年4月 理化学研究所細胞情報伝達研究室 研究員
 2001年5月-2008年3月 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター チームリーダー
 2008年4月-2013年3月 理化学研究所生命分子システム基盤研究領域 副領域長
 2013年4月-2018年3月 理化学研究所生命システム研究センター チームリーダー
 2018年4月- 理化学研究所生命機能科学研究センター チームリーダー

第61回NMR討論会(2022) 若手ポスター賞について

今年度の『若手ポスター賞』には、41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2名、若手ポスター賞として6名を顕彰しました。これらポスター賞には、大陽日酸社と昭光サイエンス社からのご厚志による副賞の授与もおこなわれました。若手ポスター賞の歴史や応募資格など、詳しくは第61回NMR討論会(2022)のホームページ「若手ポスター賞」(<https://www.nmrj.jp/NMR2022/poster.html>)を御参照下さい。

選考にあたっては、まず41名の応募者について、登録された研究領域や評価者の人数などを考慮し、以下の5つのグループに分け、グループごとの応募者と審査員の比がなるべく均等になるように配置しました。その上で、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1演題につき、約3名の利益相反の無い評価者により、総合点を10点満点で採点しました。その際、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がグループごとで大きく開かない様に補正し、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、副賞として大陽日酸・昭光サイエンス賞と記念のトロフィーを贈りました。ついで、優秀若手ポスター賞2名に賞状を授与し、副賞として昭光サイエンス賞と大陽日酸賞と記念のトロフィーを贈りました。さらに6名の若手ポスター賞受賞者を選び、2社共同の副賞を贈りました。受賞者のお名前、所属、発表題目は以下の通りになります。



左から 折笠*¹、宋、鈴木、富樫、安藤、藤原学会長、金子、櫻林、岩田*²、張、畑、飯塚

*¹太陽日酸メディカル事業本部 SI事業部長

*²昭光サイエンス株式会社 代表取締役社長

■最優秀若手ポスター賞（副賞：太陽日酸・昭光サイエンス賞）

P14Y 櫻林 修平（さくらばやし しゅうへい） 大阪大学蛋白質研究所
CGGリピート結合薬剤ナフチリジンダイマーによるDNA認識機構のNMR解析

■優秀若手ポスター賞（副賞：昭光サイエンス賞）

P20Y 畑 友輝（はた ゆうき） 日本製鉄株式会社 技術開発本部 先端技術研究所 解析科学研究部
酸素同位体および高感度固体¹⁷O NMRによる石炭の酸化反応機構解析

■優秀若手ポスター賞（副賞：太陽日酸賞）

P10Y 張 仲良（Zhang Zhong-Liang） 大阪大学蛋白質研究所
Improvement of Dynamic Nuclear Polarization Efficiency Using Modulated Microwave

■若手ポスター賞（副賞：2社合同賞） 6件

P52Y 飯塚 友菜（いいずか ともな） 北海道大学生命科学院
スギ及びセイヨウイトスギ花粉由来GRPアレルゲンの立体構造解析

P66Y 金子 舜（かねこ しゅん） 理化学研究所生命機能科学研究センター
ミューオピオイド受容体のアロステリックモジュレーターによる活性化機構の解明

P18Y 鈴木 里佳（すずき りか） 横浜市立大学大学院生命医科学研究科
光照射溶液NMR技術を用いたプロトンポンプ型ロドプシンRxRの暗状態および光班のサイクル中間体における構造特性解析

P68Y 安藤 考史（あんど う たかみ） 東京都立大学大学院理学研究科化学専攻
常磁性NMRを用いたマルチドメイン蛋白質GRB2の立体構造解析

P74Y 富樫 直之（とがし なおゆき） 東京都立大学大学院理学研究科化学専攻
GMPPNP結合型K-RasG12VとRgl2-RBDの相互作用解析

P24Y 宋 子豪（Song Zihao） 北海道大学生命科学院ソフトマター専攻
Application of benchtop NMR for metabolomics study of Inflammatory Bowel Diseases using DSS-induced colitis model mice

各賞担当理事 伊藤 隆、竹内 恒

ANZMAG 2022 参加報告書

横浜国立大学 理工学府 博士課程後期3年

金井 典子

kanai-noriko-ht@ynu.jp

2022年度第二回若手研究者渡航費助成のご支援を頂き、2022年12月4日～8日にオーストラリアで開催されたThe Australian and New Zealand Society for Magnetic Resonance (ANZMAG) 2022に参加・発表致しました。まずは、日本核磁気共鳴学会会長 藤原敏道先生、若手研究者渡航費助成金選考委員長 河合剛太先生をはじめ、故京極好正先生、故阿久津政明様、ならびにご家族と関係者の皆さまに心より感謝申し上げます。

本学会が開催されたのは、メルボルンから車で1時間半ほどの周囲を山で囲まれたMarysvilleというとても小さな街です。メインストリートには、宿泊先兼学会会場となったホテルのほかに、パン屋さんと数件の雑貨屋、スーパーマーケットと一軒のパブしかないという静かで穏やかな場所でした。2009年の大規模な山火事で街の90%の建物が消失し、多くの方が犠牲になった悲しい過去をもつMarysvilleですが、地元の方々の努力により、建物は再建され、街中には色鮮やかなオウムがたくさんおり、その面影は記念碑でのみ感じることができました。

私は、博士課程後期の後半1年半を Western

Sydney University (WSU) の Prof. Bill Price の研究グループに研究留学している身で、今回のANZMAGでの発表は2019年の修士課程の時以来、3年ぶり2回目でした。前回のポスター発表は、横浜国立大学で行った固体NMRを使ったコーヒー豆の脂質と多糖の構造解析について、今回はWSUでの研究内容となるMRIを使ったエマルションの安定性に関する緩和と拡散イメージングについて口頭発表を行いました。前回と今回のANZMAGでの発表内容は全く違いますが、実は繋がっています。修士課程では、農業・食品廃棄物由来のセルロースナノファイバー (CNF) を分離する技術とその構造解析を固体NMRで行い、博士課程ではCNFをエマルションの乳化安定剤として利用する研究を行っています。今回の発表では、高分解能MRIを用いて白濁したエマルションのマイクروسケールでの乳化破壊の過程(凝集、合一など)の可視化および緩和時間画像 (T_1 map、 T_2 map)、拡散係数画像 (ADC map) を構築することで、水-CNF-油の複雑な系からなるエマルションのダイナミクスを解明することを目的としました。

15分間の発表後には、6人もの方から質問を頂きました。そのうち2人から質問の上昇した、MRIパルス励起によるエマルションへの影響(温度上昇や振動など)は、これまで考慮したことのない点でした。およそ24時間かかる一連のMRI実験中において、取得画像から判断するとパルスの影響はないと思うと答えましたが、今後注視すべき事項であると感じました。また、セッション終了後に質問をしてくださる方もいた他、数人の方から“Good talk!”と直接声をかけていただき、自分の発表に興味を持って聴いていただけたことが大変嬉しかったです。

5日間を通して行われた、世界中から集まった磁気共鳴研究者による口頭発表は非常に刺激的で、多くの学びがありました。身振り手振り、複



[左図] 公園に集まる King parrot と Cockatoo、[右上] 街の至ることで見られたクリスマスの飾りつけ、[右下] パブの絶品ビアバターフィッシュアンドチップス。



自身の発表の様子（質疑応答時）

数あるスクリーンを交互に指し示しながら聴衆全体を引き付ける発表態度、磁気共鳴研究者ならではの失敗談、（数分に一度入る）ジョークなど、各々独自の発表スタイルをもち、それが研究者ご本人の人柄を表しているようで、魅力的で興味深い発表をたくさん聴くことができました。特に印象深かったのは、Plenaryで発表されたMITのProf. Mei Hongです。 ^{19}F を含む標識ペプチド、タンパク質を巧みに使用することで ^1H - ^{19}F や ^{13}C - ^{19}F 距離を固体NMRで測定し、これをインフルエンザウイルスのM2タンパク質やSARS-CoV-2ウイルスのエンベロープタンパク質Eの膜

貫通ドメインの構造決定に応用した最近の研究についての内容でした。数多くの定量的な情報を含みながらも、一度も(!)止まることなく、40分間エネルギーに話される姿に圧倒されました。

2年ほどはオンラインでの学会が多かったため、対面開催となった今回の学会ではブレイクタイムでの研究者同士の活発な話し合いや著名な研究者と会話ができる学会の醍醐味を実感することができました。今回の経験を糧に今後も研究に精進していこうと思います。

日本核磁気共鳴学会の決定事項

2022年度 通常総会

日 時：2022年11月8日(火) 11:50～12:20

会 場：高知県立県民文化ホール オレンジホール

出席者：108名 委任状：86名 合計194名

- 開会の辞
- 会長挨拶(藤原)
- 第61回NMR討論会(2022)世話人(山田)挨拶
- 事業報告
- 2021年度収支決算の承認
- 2022年度中間報告の承認
- 2023年度収支予算案の承認
- 2023年度役員(評議員(2023-2024))の選任
- 第59回NMR討論会(2023)世話人(浅野)挨拶
- 朝倉哲郎先生を名誉会員に推戴(藤原)
- その他
- 閉会の辞

会員数

会員種別	2020年 9月30日	2021年 9月30日	2022年 9月30日
正会員	415	388	390
学生会員	126	98	137
名誉会員	12	12	12
賛助会員	7	7	7
合 計	560	505	546

*定足数[一般会員390名(2022年9月30日現在)]
/5=78名

*資料に基づき全て承認された。

役員名簿

2022年度現役役員名簿(会長* 副会長**)

評議員(2021-2022)

相沢 智康	北海道大学
浅野 敦志	防衛大学校
芦田 淳	日本電子株式会社
伊藤 隆	東京都立大学
河合 剛太	千葉工業大学
川村 出	横浜国立大学

菊地 淳	理化学研究所
北原 亮	立命館大学
齋尾 智英	徳島大学
菅瀬 謙治	京都大学
武田 和行	京都大学
朽尾 豪人	京都大学
内藤 晶	横浜国立大学
半沢 宏之	第一三共RDノバーレ(株)
山本 泰彦	筑波大学

伊藤、浅野、河合**、北原、山本(2021-2022理事)

評議員(2022-2023)

池谷 鉄兵	東京都立大学
石井 佳誉	東京工業大学
片平 正人	京都大学
加藤 晃一	自然科学研究機構
児嶋長次郎	横浜国立大学
佐藤 一	ブルカーージャパン株式会社
嶋田 一夫	理化学研究所
高橋 栄夫	横浜市立大学
竹内 恒	東京大学
楯 真一	広島大学
藤原 敏道	大阪大学
三島 正規	東京薬科大学
宮ノ入洋平	大阪大学
矢澤 宏次	日本電子株式会社
山田 和彦	高知大学

石井、竹内、藤原*、加藤、片平(2022-2023理事)

会計監査2022-2023(継続)

廣明 秀一	名古屋大学
山口 秀幸	味の素株式会社

2022年度の選挙、通常総会により、下記の評議員が選出、承認、新評議員会、新理事会により、下記の理事、副会長が選出、承認された。

評議員(2023-2024)

相沢 智康	北海道大学
-------	-------

浅野 敦志	防衛大学校
芦田 淳	日本電子株式会社
大澤 匡範	慶應義塾大学
木川 隆則	理化学研究所
坂本 泰一	千葉工業大学
齋尾 智英	徳島大学
菅瀬 謙治	京都大学
武田 和行	京都大学
西田 紀貴	千葉大学
西山 裕介	日本電子株式会社
平野 桐子	ブルカージャパン株式会社
松木 陽	大阪大学蛋白質研究所
八木 宏昌	理化学研究所
谷中 冴子	九州大学
山内 一夫	沖縄科学技術大学院大学

相沢、浅野、木川**、武田、松木 (2023-2024 理事)

日本核磁気共鳴学会機関誌投稿規程

(2022年10月22日改訂)

日本核磁気共鳴学会機関誌 (NMR学会誌) は、主にNMRに関する情報を公開し、会員の皆様の学術交流を目的とした会員サービスを提供します。NMR学会誌では、学会依頼記事、学術記事、NMR学会報告を掲載します。会員の皆様からは、学術記事、および、NMR学会報告の投稿を歓迎します。投稿原稿の採択の可否は、編集委員の査読結果をもとに編集委員会で決定します。掲載された著作物の著作権は、本学会に帰属するものとします。

原稿は下に示す原稿作成要領を参考に作成し、NMR学会ホームページのトップページ (<http://www.nmrj.jp/index.php>) にあるNMR学会誌ページの原稿投稿フォームから投稿して下さい。図や表を他の文献から引用して使用する場合には、投稿前に著作権所有者から使用許可を得た上で、原稿投稿フォームから原稿と共に使用許可書 (PDF) を提出して下さい。

原稿の分類

●学会依頼記事

(会長メッセージ、巻頭エッセイ、等)

・会長メッセージ

NMR学会会長からのメッセージ。2,000字以内、1ページ。

・巻頭エッセイ

主にNMR討論会特別講演者からの寄稿。NMR学会、NMR討論会との関わりなどについてのエッセイ。2,000～4,000字、1～2ページ (図表を含む)。

●学術記事 (研究論文、総説論文、NMR講座、等)

・研究論文：研究報告

会員が単著あるいは共著 (非会員でも可) で投稿するオリジナル研究報告。6,000～12,000字、3～6ページ (図、表を含む)。

・総説論文：解説

著者の研究成果および関連分野の現状の分かりやすい解説。8,000～16,000字、4～8ページ (図、表を含む)。

・総説論文：トピックス

数年以内に発展した新しいNMRの展開につ

いてのミニレビュー。4,000～8,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

・総説論文：技術レポート

NMRの装置や測定方法の開発に関するレポート。4,000～8,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

・総説論文：NMR便利帳

NMR実験に便利な装置 (ハードウェア) や実験方法・解析 (ソフトウェア) の工夫、安全衛生 (磁場、高圧、高電圧、酸欠、毒物劇物) などに関する分かりやすい解説。4,000～6,000字、2～3ページ (図、表を含む)。

・NMR講座：NMR基礎講座

主にNMR討論会のチュートリアル講演者などによるNMRの基礎の解説。4,000～10,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

●NMR学会報告 (学会顕彰、会員便り、等)

・会員便り：海外学会参加報告

主に、若手研究者渡航費助成金受領者による寄稿。NMRニューズレターとして公開される報告書でも可。会員からの寄稿も歓迎します。2,000～4,000字、1～2ページ (図、表を含む)。

・会員便り：NMR研究室便り

主にNMRを使って研究を行っている大学や公的機関、企業の開発室が、研究テーマ、構成員、特徴など、研究室の内容を紹介する。2,000～6,000字、1～3ページ (図、表を含む)。

・会員便り：若手NMR研究会便り

若手NMR研究会の主催者による研究会報告、参加者の報告、講演者の要旨の寄稿。4,000～8,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

原稿作成要領

・和文は明朝体、英文はTimesのフォントを用い、表題は14ポイント、本文は12ポイントで、docまたはdocxファイルで作成して下さい。

・原稿は、表題、執筆者氏名・所属、本文、引

用文献、表、図の順番にまとめ、1つのファイルとして提出して下さい。

- ・ 巻頭エッセイ、解説、トピックス、研究報告、NMR基礎講座、技術レポート、NMR便利帳の執筆者は、略歴と顔写真のファイルを提出してください。
- ・ 図は、TIF, JPG, PDFファイルで600 dpi以上の解像度で作成してください。
- ・ 図、表には、番号を付すと共に、それぞれの説明を記入してください。
- ・ 引用文献は、次を参考にして書式を統一して下さい。

[1] Javkhlantugs, N., Naito, A. & Ueda, K. Molecular dynamics simulation of bonbolitin II in the dipalmitoylphosphatidylcho-

line membrane bilayer. *Biophys. J.* **101**, 1212-1220 (2011).

- [2] 内藤 晶, 光センサータンパク質の情報伝達機能. *化学* **66**, 68-69 (2011).
- [3] Saito, H., Ando, I. & Naito, A. *Solid State NMR Spectroscopy for Biopolymers. Principles and Applications*. 1-464 (Springer, 2006).

本文中には引用箇所の右肩に角括弧を付けた数字で示して下さい。

2012年10月22日制定

2014年9月30日改訂

2021年8月5日改訂

2022年10月21日改訂

賛助会員名簿

味の素株式会社

株式会社シゲミ

ジャパン スーパーコンダクタ テクノロジー株式会社

昭光サイエンス株式会社

大陽日酸株式会社

日本電子株式会社

ブルカージャパン株式会社

令和5年2月現在の本学会賛助会員は、上記の通りです。
本学会の事業への御賛助に対しまして、厚く御礼申し上げます。

日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員会委員名簿 (2022-2023 年度)

委員長	野村 薫	サントリー生命科学財団
副委員長	相沢 智康	北海道大学
	西山 裕介	日本電子株式会社
池上 貴久	横浜市立大学	
池谷 鉄兵	東京都立大学	
川村 出	横浜国立大学	
菊地 淳	理化学研究所	
児嶋長次郎	横浜国立大学	
齋尾 智英	徳島大学	
佐藤 一	ブルカージャパン株式会社	
枳尾 尚哉	理化学研究所	
鳥澤 拓也	中外製薬株式会社	
橋本 康博	旭化成株式会社	
福士 江里	北海道大学	
松木 陽	大阪大学	
三島 正規	東京薬科大学	
村上 美和	京都大学	

編集後記

NMR学会機関誌Vol. 12をお届け致します。昨年度から始まった、年2回刊行の体制を2年目で早速崩さないように、夏、冬が終わらないうちに刊行することを目標に編集作業を行って参りました。若干春めいてきてはいるものの、無事本日、冬号と合併号を発行することが出来ました。Vol.12では、討論会予稿集や学会HPと重複している若手ポスター賞受賞者の要旨や規約等を削除し、その分を学術的な記事に回し内容の充実を図りました。冬号ではNMRの周辺技術であるミュオン分析の専門家の先生方にもご執筆いただくという新しい試みも行いました。お忙しい中時間を捻出してご執筆下さった著者の先生方、査読者の先生方、快くこちらからの依頼をお引き受けいただいたことに感謝いたします。お陰様で読み応えのある機関誌に仕上がりました。ただ、読者の皆様の楽しみの一つでもある研究室便りを、Vol.12には一本も掲載できなかったことが心残りです。Vol.13では研究室便りを充実させる予定ですので、是非ご期待下さい。

最後になりましたが、株式会社クバプロ 松田國博社長、阿部美由紀氏、株式会社プロアクティブ 中住美穂氏、広告掲載にて資金を援助して下さった企業様には、NMR学会機関誌発行に向けて多大な御尽力を賜りました。編集委員を代表しまして厚く御礼申し上げます。

2023年2月

日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員長 野村 薫

NMR*Bulletin of the Nuclear Magnetic
Resonance Society of Japan***Vol.12 No.1 & 2**

2023年2月28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