



会長メッセージ 藤原敏道

巻頭エッセイ 若松馨、藤原敏道

NMR講座：NMR基礎講座 池上貴久、武田和行、拝師智之、福士江里

総説論文：解説 上田卓見、齋尾 智英、森本大智、岩原淳二、寺山慧、楊井伸浩

総説論文：トピックス 鳥澤拓也、横地政志

総説論文：NMR便利帳 金場哲平

NMR講座：NMR史点描 寺尾武彦

2022年度学会顕彰：進歩賞

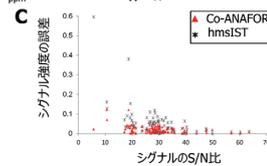
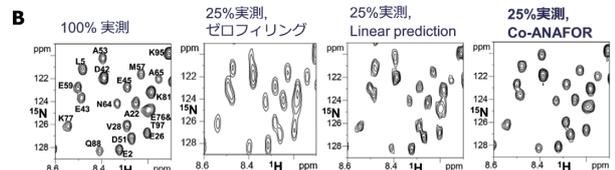
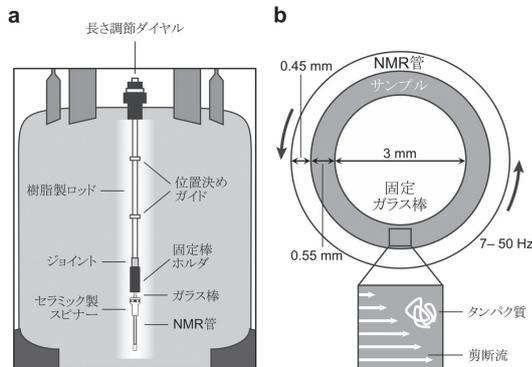
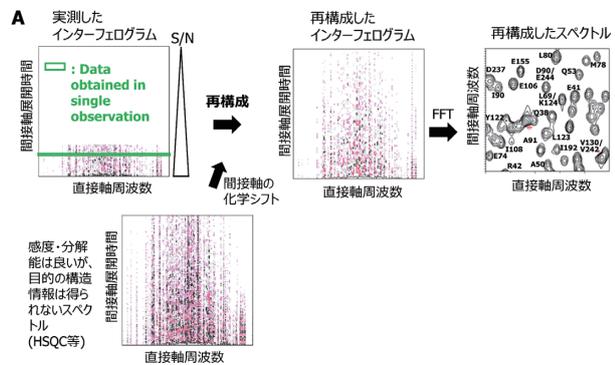
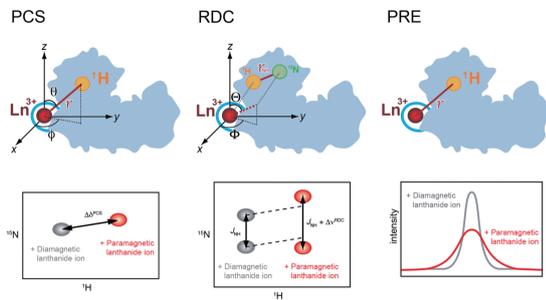
2023年度学会顕彰：進歩賞

2023年度学会顕彰：若手ポスター賞

会員便り：研究室便り 川越聡一郎、越野広雪、三島正規、梶弘典、橋本康博

会員便り：若手NMR研究会便り 山置佑大

会員便り：海外学会参加報告 Pooppadi Maxin Sayeesh、熊谷咲里、阪本知樹、宗月都



広告掲載一覧

(申し込み先着順)

大陽日酸 株式会社

NMRプラットフォーム
(文科省 先端研究基盤共用促進事業)

日本電子 株式会社

株式会社 シゲミ

ブルカージャパン 株式会社

Magritek

株式会社 エルエイシステムズ

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。

安定同位体標識化合物

Stable Isotope for Structural Biology

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

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いただけます。小スケール(0.1mL)反応を付属の微量透析カップで6回実施できます。発現量や可溶性の確認および条件検討用に最適です。

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

◎ PCRで調製した直鎖状DNAもご使用いただけます。

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

無細胞くん用 安定同位体標識アミノ酸・膜タンパク質合成用試薬

■ SAIL メチル・芳香族選択標識

製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
SAT2001	SAIL アミノ酸混合物水溶液	1mL	220,000
G07-0226	[δ 2- $^{13}\text{C}_3$, ^2H]Leu + [γ 1- $^{13}\text{C}_3$, ^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}N ,d	1mL	18,000
A40-0073	アミノ酸混合物水溶液-UL- ^{13}C , ^{15}N	1mL	30,000
A42-0075	アミノ酸混合物水溶液-UL- ^{13}C , ^{15}N ,d	1mL	35,000
A91-0128	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Arg-UL- ^{13}C , ^{15}N	1mL	20,000
A92-0129	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Leu-UL- ^{13}C , ^{15}N	1mL	20,000
A108-0145	アミノ酸混合物水溶液-SeMet	1mL	12,000

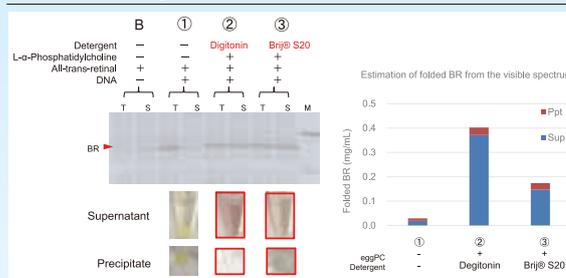
20種類のアミノ酸を含有しております。

■ 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 (Cosmos) ● 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 PLATFORM

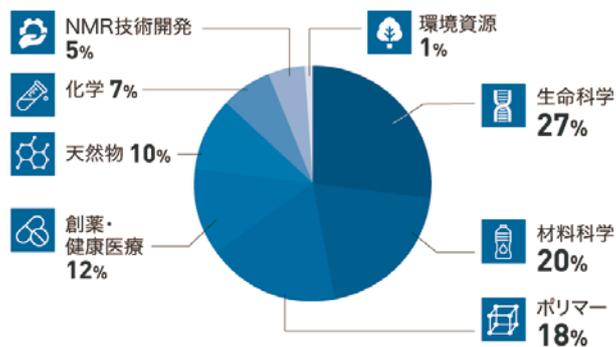


8機関がもつ先端的なNMR設備と関連技術を提供します

NMRプラットフォームを利用すると

- ◆ 特色ある全国の機関にワンストップでアクセスできます
- ◆ 各機関常駐の専門スタッフによるサポートがあります
- ◆ 遠隔操作・自動測定により、災害時・行動制限下での利用も可能です
- ◆ ヘリウム不足問題解消、大型機器導入・維持管理削減につながります

今まで利用された分野例



※2017-2021年の5年間に於ける理化学研究所NMR装置外部利用の課題数を元に計算

まずはお気軽にお問い合わせください

<https://nmrpf.jp/>



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。

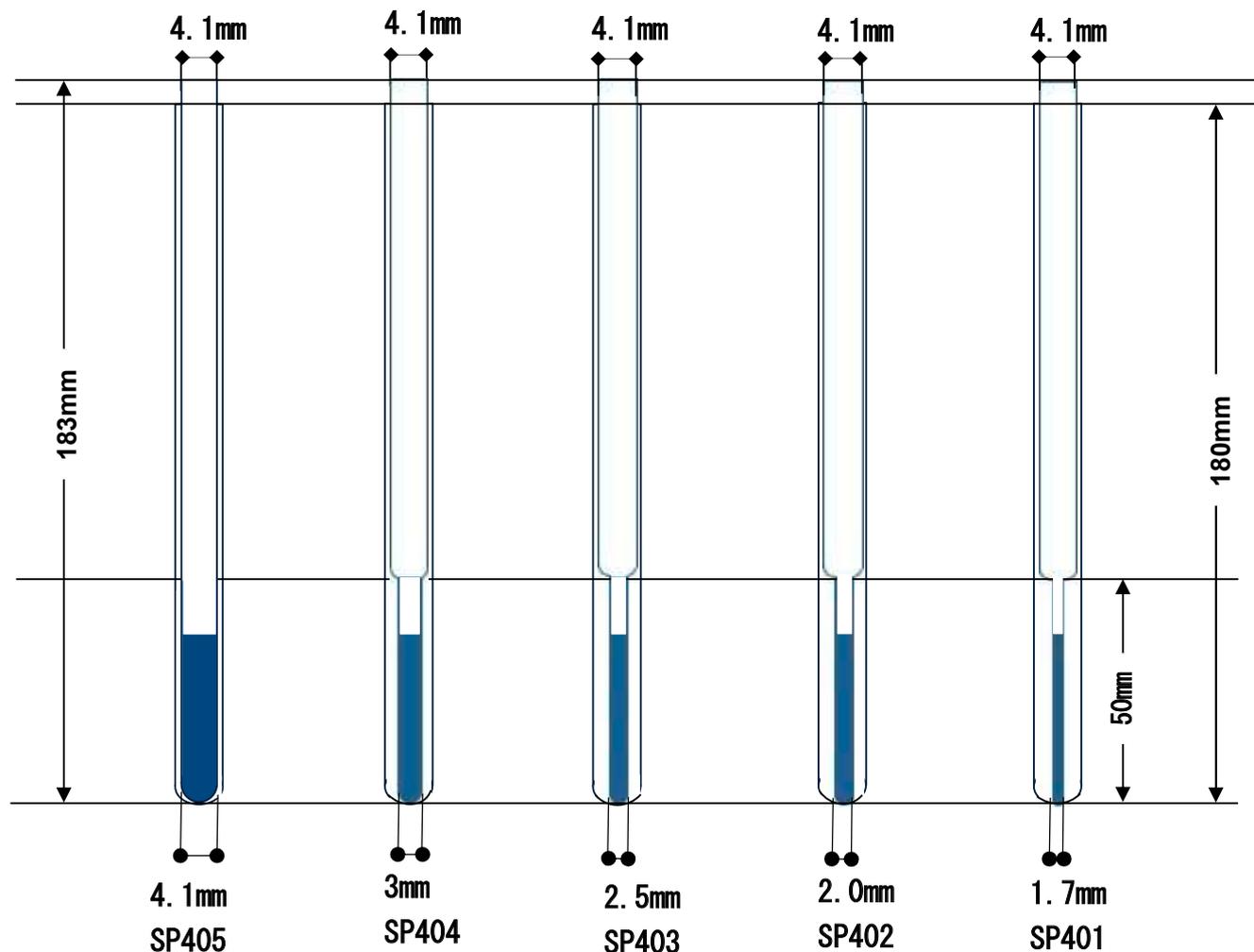
「理科学・計測機器事業」電子光学機器・分析機器・計測検査機器 「産業機器事業」半導体関連機器・金属3Dプリンター・成膜関連機器/材料生成機器 「医用機器事業」医用機器

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

卓上型FT-NMR Fourier80



- 冷媒不要の永久磁石を採用
- 実験台やドラフト内に設置可能
- 優れた線形、分解能、感度
- グラジエントパルス標準搭載

▶ 使用場面

- ・ 品質管理
- ・ 合成物の確認
- ・ 学生実験などの教育用

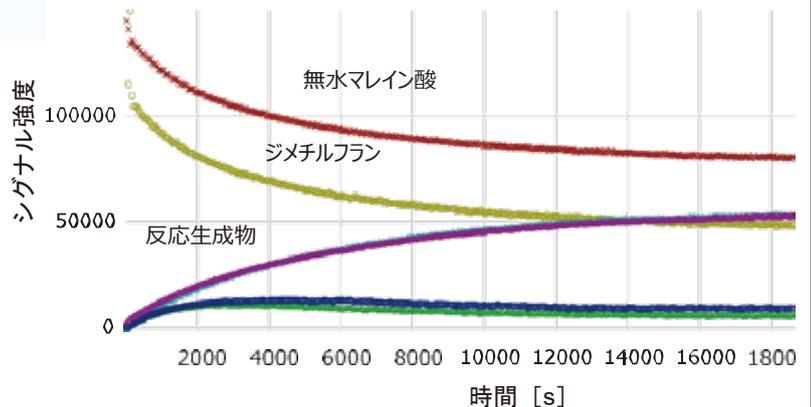
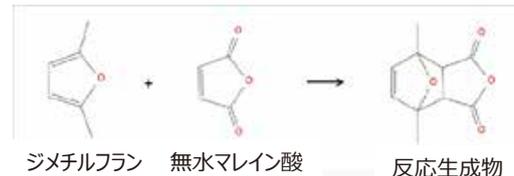
▶ オプション

- ・ 温度設定: 25°C ~ 60°C
- ・ 測定核種: ^1H , $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, $^1\text{H}/\text{X}$
※対応核種はお問い合わせください
- ・ 高分解能オプション: 0.11 %での線幅が15 Hz
- ・ ^1H 特化モデル: ^1H 保証感度 240 : 1以上

▶ フローシステム (Fourier RxnLab)

- ・ 口径の広い流入口 / 流出口
- ・ 耐圧 10 bar
- ・ 流量 ~4 ml/min
- ・ 特許取得済みの温度制御

Diels Alder 反応による生成物の反応モニタリング



ブルカージャパン株式会社

バイオスピン事業部
info.BBIO.JP@bruker.com
www.bruker.com

本社 (横浜営業所)
〒221-0022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町 3-9
TEL : 045-444-1390

大阪営業所
〒532-0004 大阪府大阪市淀川区西宮原 1-8-29
TEL : 06-6394-8989 テラサキ第2ビル 2F



Spinsolve 90 BENCHTOP NMR

ベンチトップNMRにおける画期的な卓越性を牽引



90 MHz Spinsolve BENCHTOP NMR SPECTROSCOPY

Spinsolve 90 Benchtop NMR は、これまで以上の高感度・高分解能を実現しながら、実験台に載せられるコンパクト性を維持しています。

Magritekの直感的操作性を持ち機能が充実したソフトウェアには、ボタン一つで実行できる最先端の多核スペクトロスコーピーメソッドが搭載されています。

これらのNMRシーケンスには、1D及び2Dメソッド (HSQC-ME, HMBC, COSY, TOCSY, ROESY, DEPT, NOAH, NUSなど) が含まれています。

また、日々のQC/QA作業やGxP操作のオプションモジュールもご準備しています。

Spinsolve 90は、スループットを高めるオートサンプラーや、化学反応をモニタリングするためのフローセルセットアップなどのオプションも使用でき、必要な場所で高品質のNMRデータを提供します。



<https://magritek.com/products/benchtop-nmr-spectrometer-spinsolve/spinsolve-90-mhz/>

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, サンプリ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)



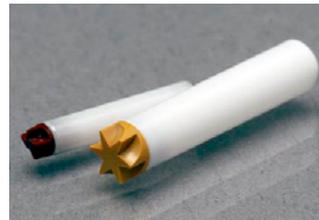
HXY Premium プローブ



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

NMR

*Bulletin of the Nuclear Magnetic
Resonance Society of Japan*

Vol. **13** No.2

March 2024

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

CONTENTS

●巻頭エッセイ 長くNMRの開発と応用にかかわって 藤原 敏道	67
●NMR講座：NMR基礎講座 NMR研究者へMRIの紹介：MRI装置開発の視点から 拝師 智之	69
未知化合物Xの構造を推定せよ —低分子化合物の溶液NMRによる構造決定演習— (第一回) 福士 江里	77
●総説論文：解説 NMRを用いた生体高分子表面周辺静電ポテンシャルの直接測定 岩原 淳二、外山 侑樹	86
分子生成AIによる分子設計と分子同定の試み 寺山 慧	93
光励起三重項を用いた生体分子の核スピン高偏極化 濱地 智之、楊井 伸浩	100
●総説論文：トピックス 製薬企業における創薬のための生体系NMRの活用戦略(中外製薬の場合) —最近の動向と将来の展望— 奥出 順也、鳥澤 拓也	110
BMRBおよびBMRBjの最近の動向 横地 政志	116
●総説論文：NMR便利帳 NOAH、UTOPIA-NMRによるNMR測定におけるタイムパフォーマンス向上 金場 哲平	127
●会員便り：研究室便り 京都大学 化学研究所 梶研究室 鈴木 克明、梶 弘典	131
旭化成株式会社 基盤技術研究所 村上 公也、橋本 康博	136
●2023年度学会顕彰：若手ポスター賞 第62回NMR討論会(2023)若手ポスター賞について	141
●2023年度学会顕彰：進歩賞 「進歩賞」について	143
●会員便り：海外学会参加報告 ISMAR 2023 参加報告書 熊谷 咲里	145
ISMAR 2023 参加報告書 阪本 知樹	146
Asia Pacific Nuclear Magnetic Resonance (APNMR) 2023 参加報告書 宗 月都	149
●NMR学会からのお知らせ 日本核磁気共鳴学会の決定事項 日本核磁気共鳴学会機関誌投稿規程 賛助会員名簿 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) 編集後記	150 152 154 155 156

長く NMR の開発と応用にかかわって

大阪大学蛋白質研究所

藤原 敏道

tjwr@protein.osaka-u.ac.jp

日本NMR学会では、長く寄与があった方へ定年退職などで区切りを迎える際に功労者講演を依頼している。私もこの講演をNMR討論会2023で行ったものとして、これまでのかかわりを振り返り、考えてみようと思う。

私は、学部生であった1979年から2023年まで、ほぼ毎年NMR討論会に参加した。この期間、研究者として生体機能を分子構造から解明することをめざし、その有力な実験法の一つとしてNMRの応用と開発を行った。NMR実験で得られるのは、対象試料のスペクトルやその変化だけである。これらを証拠として、測定対象の実体である分子構造を明らかにするという謎解きに興味を持ち努力した。このために、対象についてモデルを立て量子論など物理化学を応用して数値解析によりその解明に取り組んだ。また、得たい分子構造情報を明確にNMR現象として表示させるために、同位体標識試料の調製と組み合わせてパルス・ラジオ波照射で核スピン相互作用を制御する実験法の開発とその応用を行った。さらにNMR解析の能力を決める感度を千倍以上向上させる実験法の開発を行った。この開発研究では、高磁場低温で電子スピンを磁気共鳴により励起するので、大幅な装置の開発を要した。このために、交流のなかったテラヘルツ波や極低温など異分野にわたり産業界も含んだ多くの研究者と協力した。この過程では、グループ間の調整や資源の準備にも注力した。また長い期間にわたり、教育研究に関して組織運営にも携わった。これらを通じて考えたことを簡単に述べよう。

NMR 法はこれからも進歩し続ける

NMR実験法は、利用できる技術によりその解析能力が大きな制約を受けている。これら制約は科学技術の発展とともに取り除けるので、そのたびに今後も能力は絶えず向上するだろう。これまで、ラジオ波の制御、高磁場発生、高速な数値計

算処理、細胞と遺伝子制御を使った同位体標識は実験技術に取り入れられて、広く使われる先進的なNMR法を生み出してきた。既存技術がほぼ確立している領域の研究では、その改良で先端に追いつくよりも、新しい技術を導入して追い越す方が効率的で有用なことが少なくなかった。

NMR の重要性は特徴を生かして 役立つことになる

NMRは計測手段であり、それ自身興味深いのが目的ではない。計測対象を調べることが目的で重要であり、この需要に答えることに意義がある。これによって、ノーベル賞により評価され、高額な装置が広く導入されている。その対象や目的に関連する領域も日々進歩している。他の競合する計測・解析法も進み、より複雑な系の研究が重要になっている。多くの進んだ手法と共同して、NMR法の特徴を生かす環境は10年程度で大きく変化する。そのなかでNMRの役割と能力を見直し最適化して効率的に進めることが、死活的に求められている。

地域に生き世界と交わり伸びていく

高分解能NMRの応用と基礎研究には高額な超電導磁石などを要し、その設備普及は国の経済力に依存する。日本では1990年頃から欧米に近い状況になったと思える。若手から指導・評価者の広い階層で基礎と応用の分野で人材が揃うのには長期間を要する。これらのため、日本では人材的にも制約が残る。NMR討論会では、先進的な研究が国内から多く発表されているが、その数や分野の広がりには限られている。世界をリードして影響力のある成果を生み出すために、さらに海外に加えて日本で評価されるためにも、国際的な交流は重要だ。

変動する社会で進んでいく

NMRに関しても研究、学び、働く社会的環境

は大きく変化している。社会課題や広い意味での人権への配慮が求められ、これらへの責任のある対応は重要だ。コロナ渦での移動・会議制限、会議や実験に関するDX技術の発展、He不足、電気代の高騰、ジェンダー差別、研究倫理、知財・著

作権、ハラスメント被害、気候変動、地震、ウクライナやパレスチナの国際紛争などは、国内外のNMR研究者が直接係わることになり、学会や組織運営での対応や、研究実施に大なり小なり確実に影響してきた。

NMR研究者へMRIの紹介：MRI装置開発の視点から

国際医療福祉大学 成田保健医療学部 放射線・情報科学科

拝師 智之

tomoyuki.haishi@iuhw.ac.jp

1. はじめに

1973年に米国の化学者であるPaul Lauterbur博士によって生み出された核磁気共鳴イメージングMRI^[1, 2]は、NMRから分派したことは皆が知るところである。それから約50年の月日が経ち兄弟だと思っていた関係も“いとこ”くらいに離れてしまったのではないだろうか。これはこれら各分野間の研究者同士の学問的な交流にも当てはまるように思える。NMR装置は溶液用と固体用の差はあるがNMR試験管に入れた試料を計測することに最適化が進み、MRI装置は生きた人間の¹Hプロトン形態画像に緩和時間コントラストを付与することで画像診断装置として活躍している。NMR装置が拡散計測を行うときにGZ勾配磁場コイルを使用することはよく知られているが、MRIではこれに加えて、GXコイル、およびGYコイルを装備して使用している。この三軸勾配磁場コイル(3-axis gradient coil)は、数多の日本語による教科書で“傾斜”磁場コイルと記載されており、“傾斜”とは？と困惑の原因となっている(この違いの認識がMRI理解の越えるべき壁の一つである)。NMR装置でもパルスシーケンスをうまく調整すれば1Dプロファイル画像が取得可能である。MRIの理解には、その原理も装置も技術要素が多岐にわたるため、全容を理解するには良質な情報と果てしない時間が必要である。理工学系の先達が近くにいれば心強い。医療分野での解説文^[3, 4]は、冊数は多いものの医療系教育のバックグラウンドに合わせた記載になっており、理学部出身、工学部出身の研究者にとって物足りないかもしれない。今回、MRI業界での通説とともに、NMR学会参加などで聞いてきたNMRとMRIの間にある論点について、NMR研究者を聞き手として想定していくらかまとめた。

2. MRIの計測対象

MRIの計測対象核種は、日常的な計測時間の制

約からは¹Hプロトンのほぼ1択であろう。計測対象が患者である場合はジッと静止していただけるのは、10分から長くても30分間である。この時間で患者さんの診断画像を取得するための、数種類のコントラスト画像が収集できるように撮像プロトコルが組まれており、患者さんの様子を診て医師が決定する。この撮像を主に担当するのが国家資格である診療放射線技師^[5]である。もちろんMRIで放射線は使用しないが、人体の解剖学の訓練を厳しく受けて撮像対象を理解している技師さんは撮像が上手い。MRI業界の基礎研究者は¹H以外の核種を多核あるいは他核とよび様々な影響を考慮するとその感度は1,000倍悪いと理解している。研究用途のMRIでは、生体内の生理食塩水レベルの²³Na撮像^[6, 7]はおよそ1時間まで、超偏極された¹²⁹Xeガスなら数秒^[8]、リチウム電池の⁷Liは数分から数時間等^[9]、目的次第で計測感度と計測時間のバランスが合えば可視化することができる。生体内で¹⁹Fも計測^[10]できるが今後のアプリケーションの展開に期待したい。ご承知の通り¹Hプロトン以外の磁気回転比ガンマ(γ)は小さい。ほかには¹³C、³¹P^[11]、³⁵Cl、そして³⁹KはNMRとして興味があり信号は得られても感度が低く、MRIとして画像を得るためには高磁場磁石が無ければ厳しい戦いになるであろう。

NMR信号は静磁場強度 B_0 に曝らせた試料を、核スピンの集合体である核磁化 M の歳差運動周波数 ω_0 でファラデーの電磁誘導で検出したものであるから、その信号強度 S は、静磁場強度 $B_0 \times \omega_0 \propto B_0^2$ と言える。生体ノイズ N の寄与が大きいため、人体を計測する1.5~3 Teslaの領域では、信号対ノイズ比 $SNR \propto$ 静磁場強度 B_0 と医療系の教科書には記載されている。また、生体内で計測できる¹H核での計測時間 T と SNR の関係は、 $SNR \propto \sqrt{T}$ であることが知られている。得られたMRI画像をチェックして、 SNR を2倍上げなければ4倍積算の画像を取得する。いっぽうで、プ

ロトン以外の核種でのSNRと計測時間の関係が $SNR \propto \sqrt{T}$ になるかどうかは、時々NMRの研究者に聞いているが私が納得のいく説明は得られていない。スピン量子数が3/2の核種では、 T_1 緩和時間よりも計測繰返し時間TRが短い場合、信号強度への影響は単純ではなさそうである。

特定のアミノ酸や、たんぱく質がMRIで計測できないか?という質問を時々受ける。ひとつはMRスペクトロスコピー(MRS)^[12, 13, 14]と呼ばれる手法がある。主に脳内の計測体積を限定してNMR励起し、N-acetyl-aspartate (NAA)、creatine (Cr)、myo-inositol (Ins)、およびcholine (Cho)等の信号ピークを検出することができる。MRS Imaging^[15]あるいはCSI (Chemical Shift Imaging)は、MRSによる計測対象の分布を二次元的に計測してカラーマップ表示したものである。特に、水と脂質のケミカルシフトに注目している場合^[16]でもCSIとする場合がある。ほかにはCEST (Chemical exchange Saturation Transfer) イメージング法^[17, 18, 19]が提案されている。アミドプロトンを対象としたamid proton transfer (APT) イメージング、ヨード系造影剤イオパミドールを用いたIopamidol CEST、常磁性体金属を用いたpara CEST、さらにはamine CEST、gluco CESTなどがある。MRI造影剤としての標的薬はもちろん古くから研究されており、MRI分子イメージング^[20]というキーワードで多くの文献はヒットする。

3. 核スピンからブロッホ球としての核磁化、そしてボクセルへ

スピン量子数が1/2である ^1H プロトン核スピンは、多くのNMRの教科書にあるように磁気モーメントとみなすことができ、静磁場 B_0 (\uparrow)中に曝すとアップスピン“ \nearrow ”と、ダウンスピン“ \searrow ”にゼーマン分裂して、ボルツマン分布に従って熱平衡状態になる。 ^1H 核スピンは、静磁場 B_0 (\uparrow Z軸)から 54.7° あるいは 125.3° の方向を向くことがスピン量子数から求められる。これら核スピンの一つひとつが静磁場強度 B_0 と磁気回転比 γ (^1H 核: 42.58 MHz/Tesla)に従って、 $\omega = \gamma B_0$ の周波数で歳差運動することが知られている。 ω はそもそもラジアン [rad] であるが、便宜上は周波数 [MHz] で扱った方が便利なので、ここも初学者には?となる。教科書にはスピンの図として“ \uparrow ”“ \downarrow ”と完全に静磁場 B_0 に平行/反平行であるかのように示唆した矢印の記載の場合がある。

核スピンは便宜上、回転するコマ(独楽)にたとえると捉えやすい。コマには自転(スピン)と歳差運動(首振り運動)という二つの回転が存在するが、多くの場合で混同されている。自転するコマ(スピン)が重力との相互作用で首振り運動、つまり歳差運動すると考えるならば、 ^1H 核スピンの矢印は必ず静磁場 B_0 と直交する成分を持たねば外積は値を持たず、歳差運動はできない。静磁場 B_0 (\uparrow)から少し傾けた“ \nearrow ”“ \searrow ”との記述があると、静磁場と核スピンの相互作用によって共鳴周波数での歳差運動が発生するという意識があることが共感できて嬉しい。

生体内で水と脂質の数多の ^1H 核スピンに対して静磁場 B_0 が印加されていると、個々の核スピンは静磁場軸に直角な平面方向についてはランダムな方向を向きつつも、静磁場方向については少しだけボルツマン分布の差ができる。この結果、数多のスピンの集合体である“巨視的な核磁化 M_0 ”が発生する。静磁場 B_0 方向を向いた核磁化 M_0 は止まっているように見えても歳差運動周波数 ω_0 で回転している。 ^1H プロトンの核磁化 M_0 の可動範囲は、いわゆるブロッホ球で表現することができるが、ブロッホ球の定義では半径が1で規格化されている。一方で、MRIでの核磁化 M の大きさの最大値 M_0 は後述するボクセル体積の ^1H プロトン数に比例する。核磁化 M の取りうる値の範囲は、 $-M_0 \leq M < M_0$ となる。この核磁化の挙動は皆さんが良くご存じのように送信RFパルスによる回転座標系での歳差運動で、ブロッホ球のように、3次的に狙った方位に操作することができる。若干でも励起されれば核磁化 M は、 T_1 緩和機構(時間)に従って、熱平衡状態の核磁化 M_0 に戻っていく。核磁化を 90° RFパルスで、静磁場 B_0 に対して直角に倒した場合を横磁化、またその成分を横磁化成分と呼ぶ。横磁化成分の減衰が T_2 緩和機構(時間)である。この横磁化の捉え方の違いが、NMR屋とMRI屋の大きな違いではないか。また T_2^* 緩和時間(ティーツースター)への感覚についても、日頃から不均質なものを扱っているMRI屋は慣れがある。MRI屋は核磁化 M の横磁化成分の大きさだけでなく、その回転座標系での位相方向を常に意識している。MRIの説明として「核スピンの歳差運動周波数の違いによって位置を識別している」かのような記載が散見される。実際は図1に示すように「核磁化の歳差運動中心周波数における横磁化

MRIではどうやって 位置情報を付与しているのか？

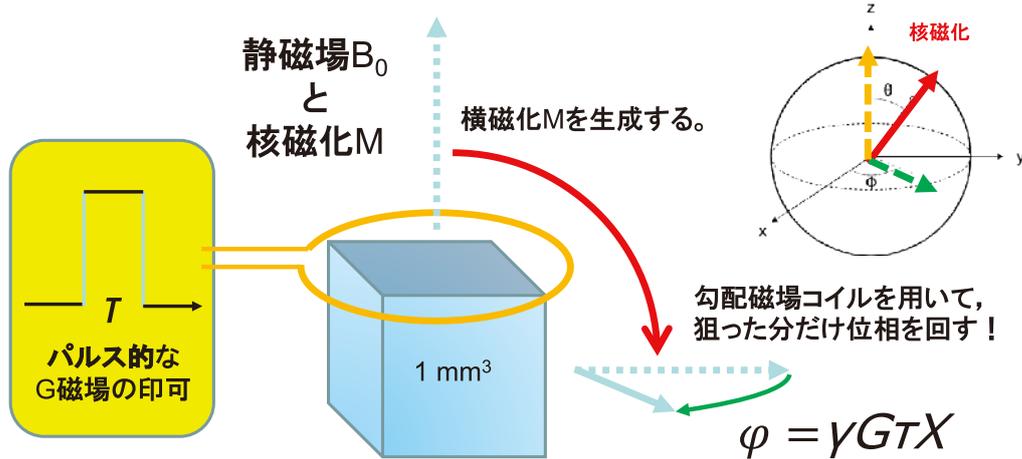


図1 MRIでの位置情報の付与は周波数というよりは位相である。MRIは1画素ずつに、横磁化の位相情報を付与している。T₂緩和時間程度の間、その位相情報を保持できる。位相情報の空間分布を2Dあるいは3Dフーリエ変換で、位置情報として取り出せる。

の“位相”によって位置を識別している」というほうがより正しい。MRIでは空間周波数情報を時間軸（つまり周波数軸）に巧妙に併せこんでいるためこのような誤解が生じているが極端に間違っているわけではないので簡易な説明として定着している。実際の細かいデータ収集手法については長くなるので本稿では避けるが、Edelsteinらが1980年に発見したSpin Warp法が、LauterburのZeugmatography手法からの大きなブレイクスルーであり、現在のMRIのフーリエイメージングの基礎となっている。

MRIは被写体の¹Hプロトン密度を信号の最大値とした、緩和時間の空間分布計測である。この分布を得るために、撮像パルスシーケンスの設計者は、被写体を画素数で刻んだボクセル(voxel)を考える。この各ボクセルは上述のブロッホ球とみなせることができる。ボクセルの数と各サイズは任意である。特段、ボクセル数が1でサイズが無限大(≦RFコイルの感度領域)の場合は、NMR計測と同様に位置を識別しないことになる。ボクセルの集合体を“画像マトリックス”と読んでおり、高速フーリエ変換の利便性から歴史的に2の階乗であることが多い。スライス選択励起の勾配磁場とRFパルスを用いて、被写体(256 mm)³の大きさのたとえば厚さ1 mmの部分だけをNMR励起することができるが、この励起された厚み部分を2次元的に256画素×256画素のマトリックスとして分割すると、1画素のサイズは(1 mm)³ということになる。¹H-MRIの

マイクロスコピック^[22]な空間分解能の限界は被写体のサイズを128等分するくらいで決まっており、1辺が4 mm位の大きさのものを撮像する場合で空間分解能は(31 μm)³となる。MRIとしてこの3D分解能を狙うのは大変で測定時間は数時間を軽く必要とする。いっぽうで2D分解能であれば静磁場強度にもよるが、(50 μm)²×0.5 mmの画像を5分程度で撮像できる。

4. 横磁化の歳差運動位相を識別する方法

静磁場B₀に垂直な核磁化Mの横磁化成分M_{xy}(M_x, M_y)は単純に2次元ベクトルと考えてよい。超電導磁石であれば核磁化を上方から覗いている感じである。一般的にM_{xy}(M_x, M_y)の実部(real)がM_x、虚部(imaginary)がM_yとされることが多いと思うが、実部と虚部は人間が計測の結果で都合に合わせて選びだすものであって、計測直後では得られている信号に核磁化の実部と虚部の違いはない。通常、横磁化の位相φは、 $-180^\circ \leq \phi \leq 180^\circ$ 以内で(計測者の希望からは)ズレている。NMR屋さんには0次位相補正(P0)と言えば伝わるかもしれない。ここで計測器として重要な点は、送信パルス波との受信された横磁化の位相関係が、計測の開始から終了まで把握できているという点である。このためには静磁場B₀は可能な限り均一かつ静止しているのが好ましいし、これに対応した周波数の高周波発振器はコヒーレントで送信側も受信側も途切れなく連続発振していなくてはならない。NMR/MRIのトランシーバ

をSDR等 (Software-defined radio)^[23] で自作する場合に、繰り返し時間TR (Time of Repetition) の切れ目で高周波発振を一旦停止させてしまっている場合がある。MRIのT₁強調画像を撮像する場合にはT₁緩和時間よりも短い時間で次の励起パルスを照射するため、コヒーレンスの道案内である発振器が途切れてしまえば、RF連続励起の定常状態が完全にコントロールできていることにはならないので注意したい。

ここでNMRのRFプローブの¹HチャンネルとNMR分光器との同軸接続ケーブルを思い出してほしい。昨今のNMR用RFコイルは送受信が兼用であり、相互接続の同軸ケーブルは1本である。つまり送信信号あるいは受信信号の実部も虚部も、同じ周波数で同時に伝送されている。送信側と受信側は時間で分割されている。RFコイルで検出された直後のNMR信号は高周波信号であり、高周波に搬送される形で、実部成分と虚部成分を保持している。私が学部生の時に物理の先生が「観測されたものが実部である。」と仰っていたのを憶えている。商用のNMR装置が出始めた時代では、AD変換器が非常に高価であったことなどを背景に、横磁化のベクトル成分M_{xy} (M_x, M_y) を完全同時に計測することができなかつたので、横磁化の実部が位相ズレなく計測できるように、充分に受信位相を0°と90°で順番に調整した後でそれぞれの本測定を開始したと聞いている。単純には受信側、あるいは送信側の経路長 (≒ケーブル長) を変えることなどで、送信位相や受信位相を固定的ではあるが調整することができる。電氣的に経路長を変える“位相シフター”という機器も存在していた。

上述の実部と虚部を計測する手法として、位相敏感検波 (Phase Sensitive Detection) やQPD

(Quadrature Phase Detection) という“単語”はNMRやMRIの教科書にほぼ必ず載っている。しかし現物を見ることはまずなく、じっくりこない。実際に使用するデバイスは“90°ハイブリッド”という小型の受動素子でよい。“90°ハイブリッド”は高周波の分配器であるが、**図2**に示すように波の重ね合わせの特徴を利用して、入力に対して位相が-90°および-180°回転したものが出力される。様々な方式があるが基本は、2つの分配された高周波出力に90°の位相差があり、出力電力はそれぞれ入力電力の50%になっている。原理は単純で、90°ハイブリッドとして狙った周波数の波長λの1/4の経路長、つまりλ/4波長で構成される回路を構成する。たとえばNMR周波数が300 MHzである場合、波長λは1mであるから、λ/4の経路長は25cmとなる。実際には25cmは扱うサイズとして大きく、金属導体内での波長短縮を考えると、もっと小さな回路が製造される。図中の長さは高周波としての経路長であると読んでいただきたい。経路長によって、90°位相差を生む受信信号の伝搬時間に速度にλ/4の分だけ違いが出てしまうが同軸ケーブル内の信号伝搬は光速であるため、25cmの移動時間は無視できるほど短く、NMR計測のデータを取りこぼすほどではない。ただしこの“90°ハイブリッド”のような受動素子は、波長λに依存した特性を持っているので、最適化された周波数以外での実部と虚部の直交性やゲインバランスは完全ではない。中間周波数IFという単語を聞いたことがあるだろう。すべてのNMR周波数で分光器としての最適化を行うことはできないので、分光器の設計者がIF周波数を定め、異なる周波数の高周波が、IF周波数を必ず経由するようにすることで性能を

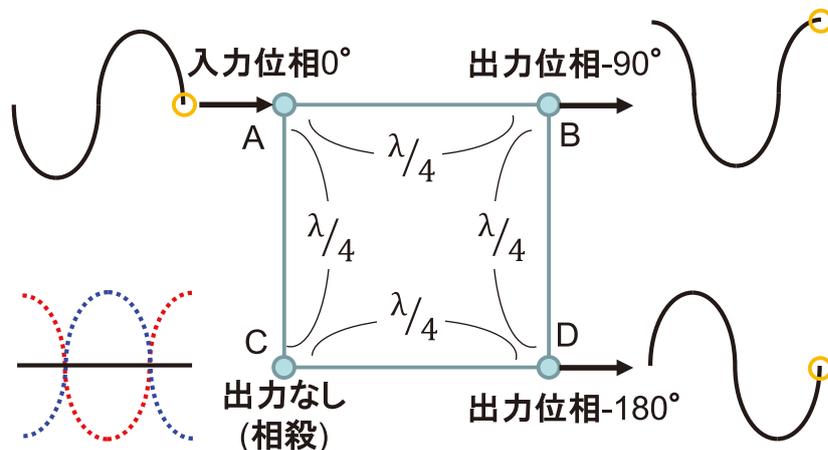


図2 QPDに用いる90°ハイブリッド：特定の高周波の波長λを考慮して伝搬経路を変えた回路を構成する。λ/4移動するごとにλ/4波長の位相遅れが発生する。

確保することができる。昨今のデジタル化時代に入って、このIF周波数の高周波信号を直接的に高速AD変換することができるようになってきている。

実部と虚部の弁別はデジタル無線機の進歩、具体的にはIF周波数を大きく上回るサンプリング速度でAD変換が可能となることで、新たな選択肢が生まれた。Nyquist周波数(定理)はご存じだと思う。弁別したい最も高い周波数をデジタル標本化する場合には、2倍以上の周波数でサンプリングしなさいというアレである。すでに90°ハイブリッドによって分岐されたNMR信号の実部と虚部は、ダブルバランストミキサーによって、周波数ダウンコンバートやアナログ検波してNMRスペクトルの地域幅まで落とし込み、AD変換で取り込めばよい。いっぽうで、既述したように高周波段、ここではIF周波数にまで持ってこられたNMR信号には1本の信号線の中に実部も虚部も含まれている。ここで、高速なデジタル分光器では、IF周波数のアナログNMR信号を、Nyquist周波数のさらに2倍の周波数、つまりIF周波数の4倍の速さで高速AD変換してデジタル標本化する。もしIF周波数が12.5 MHzであれば、高速AD変換のサンプリング周波数は50 MHzとなる。この標本化信号は、既述したように修正できる固定的な受信位相ズレはあるものの、**図3**に示すように、おおざっぱに言えば4点の繰り返しで①実部+、②虚部+、③実部-、④虚部-、が①②③④…①②③④の繰り返しで

現れる。高速なオシロスコープでしっかりとFIDの出だしを見てみると、励起RFパルスの位相、例えば90x、90yなどに応答してFIDの位相が応答することが分かる。NMR周波数の300 MHzなどを直接観測するオシロスコープは高価なので、IF周波数の12.5 MHz付近などが見られるのであれば、そちらの方が容易である。なお便宜上、**図3**では、①②③④を経るにつれてFID信号が減衰しているが、実際の高速AD変換(例えば50 MHz)ではこの間隔は非常に短く0.02 μ s以下であり、①を横磁化の M_x 、②を横磁化の M_y としてよい。データ点が膨大になるがデジタル標本化された後であるし、大部分が不要に見えても信号成分はSNR向上に使用できるので、あらゆるデジタルフィルタを駆使して、適切なデータを得ればよい。NMR計測ではここに0次位相補正、1次位相補正も含まれる。MRIではほとんどの場合で、**図4**に示すように生データ(左側)を高速フーリエ変換した後の、実部画像と虚部画像からの絶対値画像が作成される。まれに、実部と虚部の角度成分を反映した位相画像が作成されて、静磁場の不均一性や流速の計測に用いられる。

5. スペクトル帯域幅のためのデジタルフィルタ

NMR装置でもMRI装置でも、受信信号の周波数帯域幅についてはしっかり意識を持つ必要がある。NMRではスペクトル幅を規定するし、MRIでは画像周波数帯域幅となり画像SNRに直結す

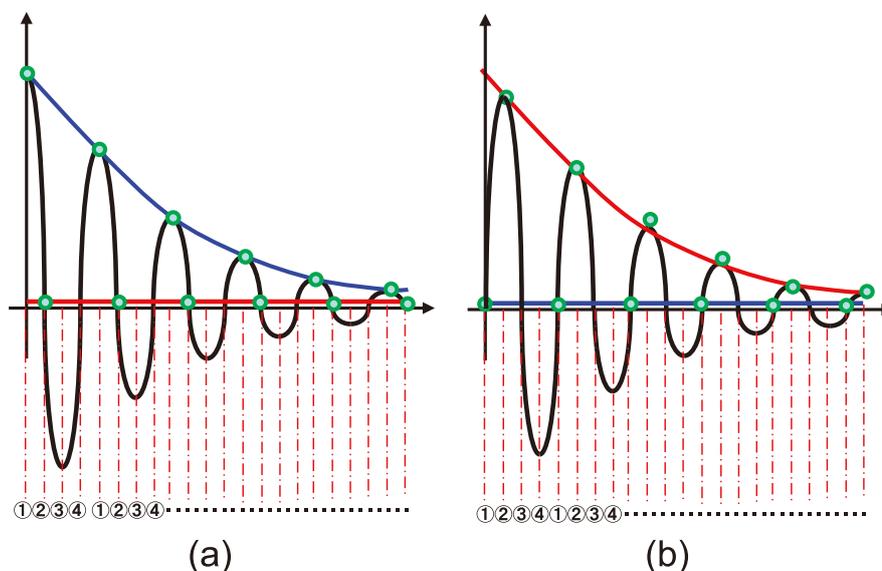


図3 高速デジタル分光器による搬送波周波数の4倍でのAD変換(\geq Nyquist周波数の2倍以上): FID取り込みのタイミングで(a)搬送高周波の山と位相が合った場合。(b)谷から山への中間で位相が合った場合。①実部+、②虚部+、③実部-、④虚部-、が①②③④の繰り返しで現れる。実際のサンプリングは非常に高速で①②の間にFIDによる信号減衰はない。

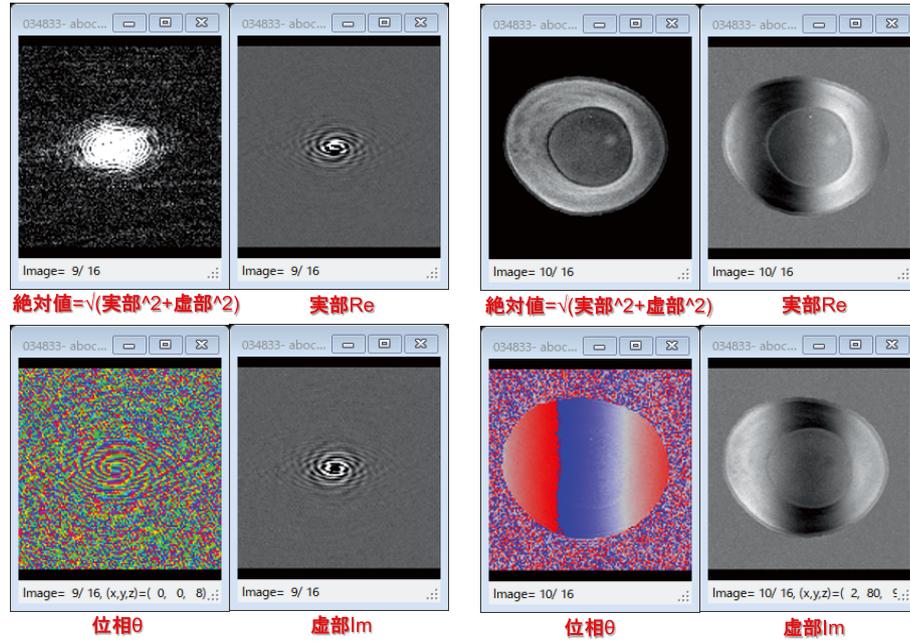


図4 MRIの生データと再構成画像(アボカド)：*実部と虚部は直交するベクトル成分。

FIRフィルタ・カーネル sinc関数(+/-2π)

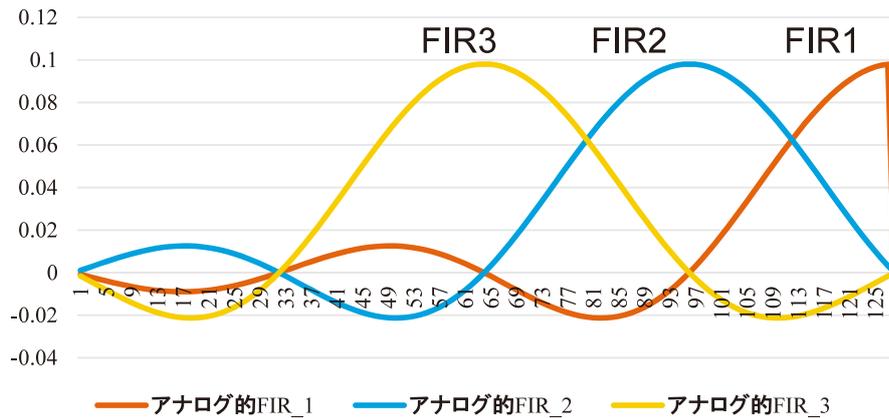


図5 FIRフィルタのカーネルの例。信号に対して時間軸で移動しながら内積をとることでフィルタの効果を得られる。

る。昨今のNMR装置でもMRI装置でも、大変に残念ながら、生信号を観測することが不可能もしくはかなり難しくなっている。科学者あるいはエンジニアの後進を育成するという視点でも、NMRでもMRIでも、生信号は“外付けのオシロスコープ”等で見られるようにしておくべきだと思う。

ここで、図5、6および7にエクセルで作成した疑似FID信号とそれにFIRフィルタ(FIR: finite impulse response)を作用させた信号波形の変化を描画した。図5はFIRフィルタのカーネルで、どれも同じsinc関数(+/-2π)であるが、時間軸上で重みの中心が異なる。サンプリングされたFID信号とFIRカーネルの内積を計算して、

時間軸上で1点のデータとし、これを時間軸で並べるとフィルタ処理されたFID信号となる。ここで“アナログ的”というのは発生したFIDに対する時間遅れの視点である。アナログフィルタの動作は非常に速いが受動素子ゆえに、なんらの受信信号変化よりも先には出力を反映することができない。特性が良いとして知られているFIRフィルタもアナログ送受信機に対して適用するとなると高性能なアナログフィルタという域を出ない。インパルス応答という指標があるが、時間軸に対して非対称な遅れとなって現れる。図6のFIDの発生のタイミングを注視していただきたい。ここでFIR_1はFIDの発生に対して時間遅れはなく

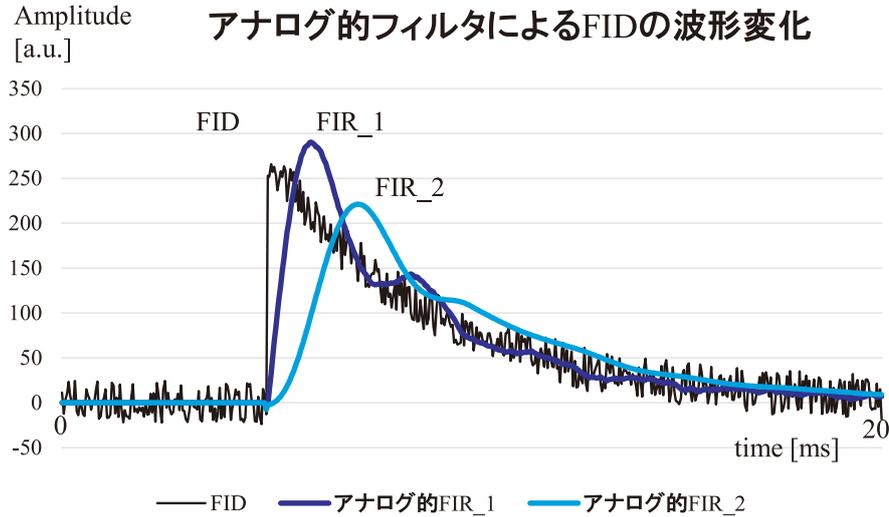


図6 アナログ的FIRフィルタのFIDへの適用。フィルタ特性によって、“時間遅れ”や“うねり”が発生する。

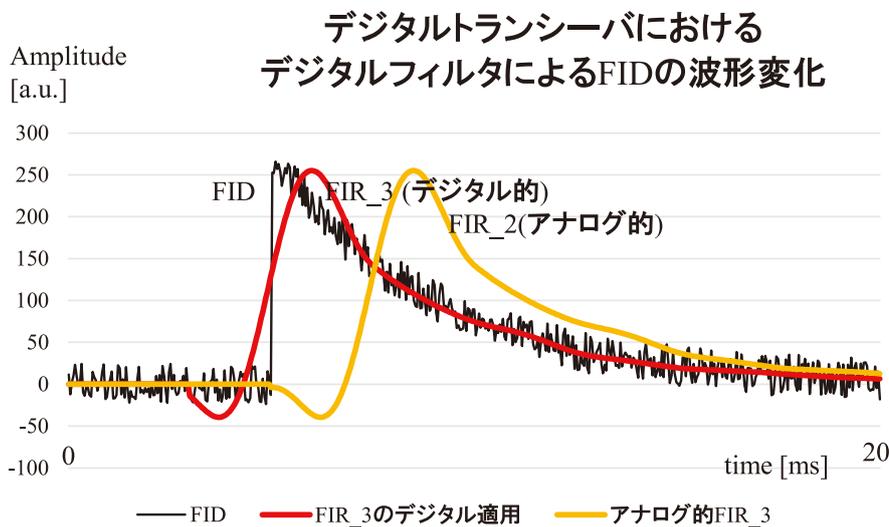


図7 デジタル分光器へのFIRフィルタの適用の一例。アナログ的FIRフィルタ(右)では時間遅れが発生していたがデジタル適用によって時間遅れのない、特性の良い、フィルタ動作が可能となる。

立ち上がっているがFIDの包絡線に強い“うねり(リングング)”が発生している。FIR₂はFIDの発生に対してやや遅れて立ち上がりFIDの包絡線に弱い“うねり”が発生している。図7の右側の波形はさらに時間遅れのあるFIR₃を作用させたものであるが、時間軸上で左右対称のアナログ的FIR₃を作用させることで、包絡線の“うねり”は減少している。しかしながらここまでFID波形の時間遅れが発生してしまうと実験の理解に差しさわりがあるかもしれない。ところが図7の左側の波形のように、このFIR₃をSDRソフトウェア無線機^[23]に到達したデジタル分光器の受信系に対して作用させると面白いことができる。SDRデジタル分光器は受信信号をほぼ常時取り込

んでいるので、時間軸に対して時間遅れなく対称型のFIRカーネルを作用させることができる。図7の左側のフィルタ後のFID波形では時間遅れもなく、包絡線の“うねり”も回避できる。データを取り込んだ後で落ち着いて信号処理ができるというのがSDRデジタル化の御利益である。アナログにしてもデジタルにしても、特にMRIでは、NMR信号に空間周波数情報を載せてMRI信号としており、フィルタによって信号位置の遅延が発生してしまうと、後処理に影響が出る。翻って、フィルタによる時間遅延が発生しかねないことを前提にMRI装置のハードウェアもソフトウェアも構築されているので、その時々柔軟な対応は可能である。

6. まとめ

NMR研究者とMRI屋との議論のなかで話題となったことを記載して試みた。書かなかったアプリケーションとして、たとえば“食品”はMRIの計測対象として非常に面白い。NMRと重なる部分でもあるだろう。研究対象として魅力的でもあるが、人間や試験管ほど大きさが決まっているわけでもなく、食品のサイズは非常に様々なので遂行には手間がかかる。例えば、スナック菓子の油分の可視化、コメや麺類の吸水、天然岩牡蠣の身入り、雲丹の身入り、高級ワサビの墨入り、高級果実への害虫の混入、等々あるが、頑張ればNMR/MRIは食品を高度に評価できる能力を持っている。いっぽうで計測器はやはり人間のためにあるものなので、多くの場合でコストが合わなければ、実用化されることはない。時代を振り返ればハードウェア、特に静磁場磁石のエポックが、分野にブレイクスルーをもたらしてきたことを思い出す。最近では、高温超電導磁石や片側NMR磁石などが、その可能性を持っていると信じたい。分光器への疑問点は、しぶとく、装置メーカーに問い合わせで自分の思い通りのデータが得られるようになるまで、追い求める姿勢を継続したいものである。

参考文献

- [1] P. C. LAUTERBUR, Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance, Nature volume 242, pages190–191 (1973).
- [2] Zhi-Pei Liang, Principles of Magnetic Resonance Imaging: A Signal Processing Perspective, 1999, ISBN: 978-0-780-34723-6.
- [3] 新津 守 (監修), MR・超音波・眼底 基礎知識図解ノート 第2版, 金原出版, ISBN-13: 978-4307071079.
- [4] 荒木力, 決定版 MRI完全解説 第2版, 学研メディカル秀潤社, ISBN-13: 978-4780908855.
- [5] 笹田久美子, 診療放射線技師になるには (なるには BOOKS), ペリかん社, ISBN-13: 978-4831515018.
- [6] Yusuke Nakagawa et al., ^{23}Na MRI Technique Unleashes New Approach for Diagnosing Diabetic Kidney Disease, Kidney360. 2023 May 1;4(5):582–590.
- [7] Michiru Kajiwara et al., Development of an Add-on ^{23}Na -MRI Radiofrequency Platform for a 1H-MRI System Using a Crossband Repeater: Proof-of-concept, Magnetic Resonance in Medical Sciences, Vol. 22 (2023), No. 1 pp. 103–115.
- [8] M. S. Albert et al, Biological magnetic resonance imaging using laser-polarized ^{129}Xe , Nature volume 370, pages199–201 (1994).
- [9] 拝師智之 et al., 「アルミラミネート型全固体リチウム二次電池の ^7Li -NMRイメージング法：正極、固体電解質、および Li 箔について」, 第55回NMR討論会予稿集 (広島), 2016.
- [10] Yosuke OTAKE, Double-tuned Radiofrequency Coil for ^{19}F and ^1H Imaging, Magnetic Resonance in Medical Sciences, 2014年13巻3号 pp. 199–205.
- [11] S. Eleff et al., ^{31}P NMR study of improvement in oxidative phosphorylation by vitamins K3 and C in a patient with a defect in electron transport at complex III in skeletal muscle, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, Vol. 81, pp. 3529–3533, June 1984, Medical Sciences.
- [12] 吉岡芳親, 「生体での磁気共鳴イメージング (MRI) と磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) の多様性」, 生産と技術 第65巻 第2号 (2013) .
- [13] C Stagg (EDT), Magnetic Resonance Spectroscopy: Tools for Neuroscience Research and Emerging Clinical Applications, Academic Press Inc 2014, ISBN : 9780124016880.
- [14] 日本磁気共鳴医学会プロジェクト研究, Proton MRSの臨床有用性コンセンサスガイド 2013 年度版, Proton MRSの臨床有用性検討会編, 2013年6月10日 .
- [15] 成瀬昭二, 磁気共鳴スペクトロスコピー画像, Med. Imag. Tech. Vol.11 No.1 March 1993.
- [16] Vandana Jahanv, Chemical shift imaging: An indispensable tool in diagnosing musculoskeletal pathologies, SA J Radiol. 2021; 25(1): 2061.
- [17] Jones CK et al., Amide proton transfer imaging of human brain tumors at 3T. Magn Reson Med 2006; 56 : 585–592.
- [18] B. Wu, An overview of CEST MRI for non-MR physicists, EJMNM Phys. 2016 Dec; 3(1): 19.
- [19] 奥知左智, Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) 法による脳腫瘍の画像診断, JJMRM 2021年41巻1号 p. 14–21.
- [20] 小島隆行, 臨床 MR 分子イメージング, MEDICAL IMAGING TECHNOLOGY Vol.27 No.5 November 2009.
- [21] W. A. Edelstein et al., Spin warp NMR imaging and applications to human whole-body imaging, Phys Med Biol. 1980 Jul;25(4):751-6.
- [22] Kazuki Kunieda et al., Brain structures of a human embryo depicted by MR microscopy with different contrasts, 03-08 June 2023, ISMRM & SMRT Annual Meeting & Exhibition. (3561).
- [23] トランジスタ技術編集部, RFワールド 22 らくらく！ SDR無線機入門【PDF版】, CQ出版社.



拝師 智之 (はいし・ともゆき) tomoyuki.haishi.mrtechnology@gmail.com

1996年 筑波大学第三学群基礎工学類卒業

1999年 株式会社エム・アール・テクノロジー (筑波大学ベンチャー) 発起人設立、同代表取締役 (~2020年)

2001年 筑波大学大学院工学研究科物理工学 博士 (工学)

2002年 慶應義塾大学経営管理研究科MBAコース 自主退学

2005年 ABQMR Inc. satellite-board (米国NM州ベンチャー企業)

2020年 国際医療福祉大学大学院 放射線・情報科学分野 教授 ~現在に至る

未知化合物^{エックス}Xの構造を推定せよ

—低分子化合物の溶液NMRによる構造決定演習— (第一回)

北海道大学大学院農学研究院

福士 江里

feria@agr.hokudai.ac.jp

はじめに

天然有機化合物や関連する合成化合物は、生体高分子や合成高分子などとはNMR解析のアプローチが異なり、これらと区別して低分子化合物といわれることがあります。その構造決定では、質量分析で分子式を求めたあと、各種次元(1D)、二次元(2D)NMR法を用いて平面構造と相対立体化学の決定を行います。試料は通常、¹³C、¹⁵Nも天然存在比です。

本連載では、低分子の未知化合物の構造を決定する道のりを一緒にたどっていきたいと思います。とても小さな分子をモデル化合物に選んでいますので、途中で構造がわかってしまうことがあります。大きな分子の部分構造をみているつもりになって解析・帰属していきます。毎回、後半に、クイズのスペクトルをのせますので、同様の手順で構造を推定してみてください。構造は、後日ニュースレターでお知らせします。

NMR測定はBruker Avance Neo 500 (¹H: 500 MHz)、またはJEOL ECZ400S (¹H: 400 MHz)で行う予定です。

マルトール(1)の構造決定

マルトール(1)(図1(a))はカラメルのような甘い香りのする有機化合物です。この構造が未知であると仮定して、推定していきます。1は立体化学を決める必要がありません。立体化学の推定は第二回以降に行います。

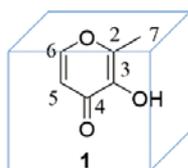
分子式がC₆H₆O₃とわかっているものとしま

す。分子式の各原子の数から不足水素指標(不飽和度、環と二重結合等価数)を計算します(図1(b))。C₆H₆O₃の不足水素指標は4です。この指標が4であることは、たとえば、二重結合が4個あり環がないこと、または二重結合3個と環が1個あること、…などを表しています。分子模型や紙の上に、分子式に従って原子を用意します(図1(c))。

一次元(1D)¹H-NMRスペクトル(図2)

化学シフトは、基準物質を入れずに溶媒由来のシグナルであわせることもできますが、重水の場合は温度等によってプロトンシグナルが移動してしまうため、図2は同じ温度で測定したTSP(Propionic-2,2,3,3-d₄ acid, 3-(trimethylsilyl)-, sodium salt)を外標準としてδ_H 0.00 ppmに合わせています。ピークテーブルには、ppmとHzで表示したピーク位置とそのピーク高の相対値を載せています。δ_H 4.76 ppmのシグナルは溶媒由来です。それ以外に左から積分比(ピークの面積比を赤色の曲線と数字で表示)1:1:3でダブルット(d)、ダブルット、シングレット(s)があります。それぞれメチン(CH)、メチン、メチル(CH₃)と推定できます。ここで解析できるシグナルについて、化学シフト(δ_H)と分裂様式(multiplicity, mul.)を書き出しておきます。構造がわからなければ解析できない部分があることも多いので、わかった時点で書き足していきます。

(a) 構造未知



(b)

分子式 C₆H₆O₃

$$\text{不足水素指標} = C + 1 - \frac{H - N}{2} = 4$$

(c) 原子を用意する

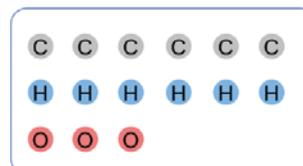


図1 (a) マルトール(1)の構造が未知であるものとして推定していく。(b) 分子式から不足水素指標を計算する。(c) 分子模型などで、必要な数の原子を用意する。

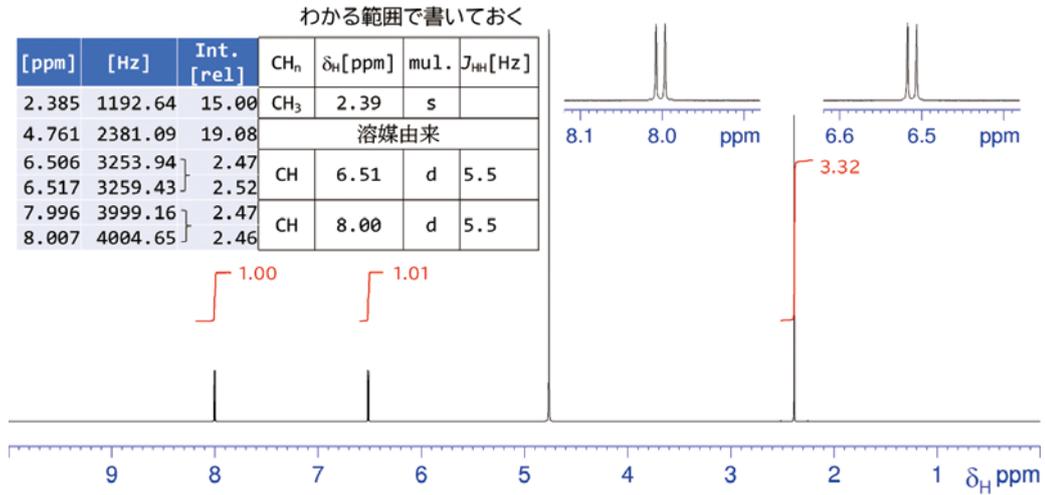


図2 1 (2 mg/D₂O) の¹H-NMRスペクトル (500 MHz、27°C)。δ_H (TSP) =0.00 ppm (外部標準)。わかる範囲で分裂様式などを書いておく。

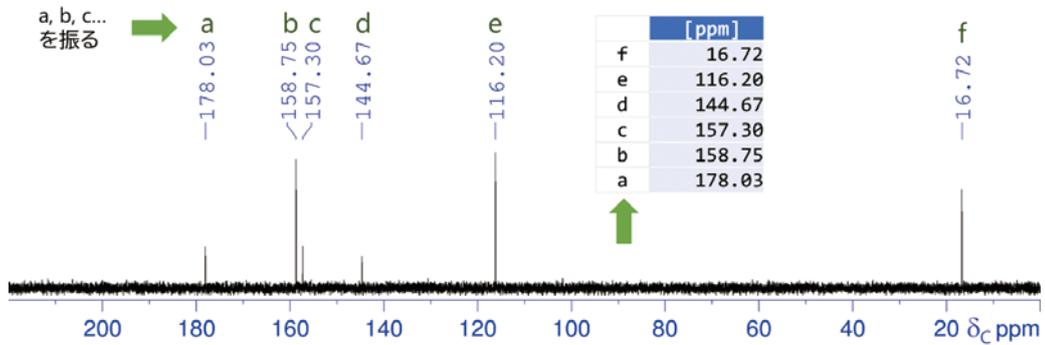


図3 1の¹³C-NMRスペクトル (126 MHz)。解析のために左から順にアルファベットを振る。

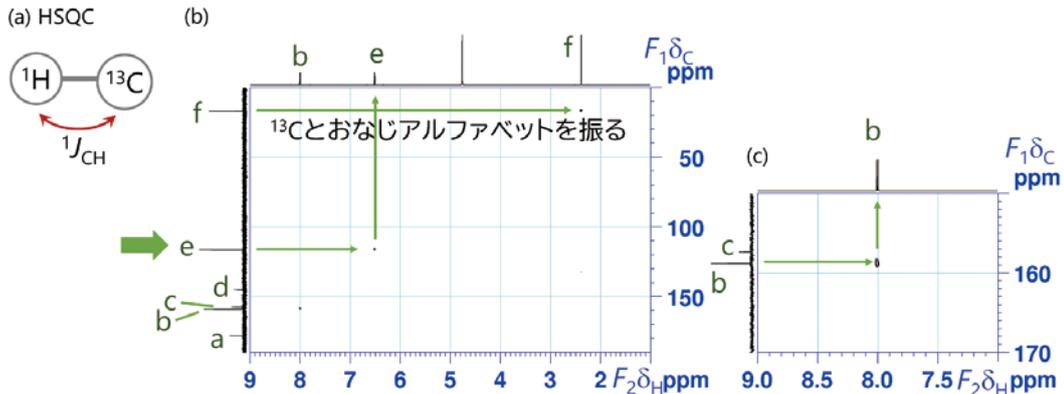


図4 (a) HSQCは直接結合するプロトンとカーボンを検出する。(b) 1のHSQCスペクトル。(c) 拡大図。プロトンに、直結するカーボンと同じアルファベットを振る。

1D ¹³C-NMR スペクトル (図3)

重水はカーボンがないため溶媒でδ_Cを補正することができません。図3はプロトンと同様に外部標準TSPをδ_C 0.0 ppmに合わせています。分子式どおり6個のカーボンシグナルが観測できています。これから行う解析のため、左から順にアルファベットを振っておきます。

二次元 (2D) HSQC スペクトル (図4)

HSQCは直接結合しているプロトンとカーボンに相関ピークを与えます(図4 (a))。メチルとメチンは正の、メチレンは負のピークで得られ、色分けして表示されます。メチルとメチンの区別はプロトンの積分比から行います。1のHSQCスペクトル(図4 (b))を使って、プロトンに、直結

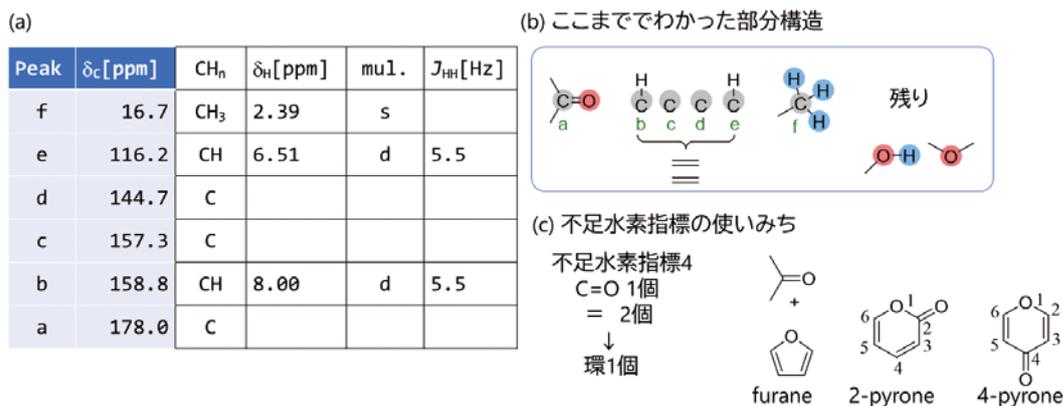


図5 ここまでの解析結果を整理する。(a) データテーブルを作る。(b) ここまででわかった部分構造と残りの原子で作る部分構造。(c) 不足水素指標の使い道を考える。

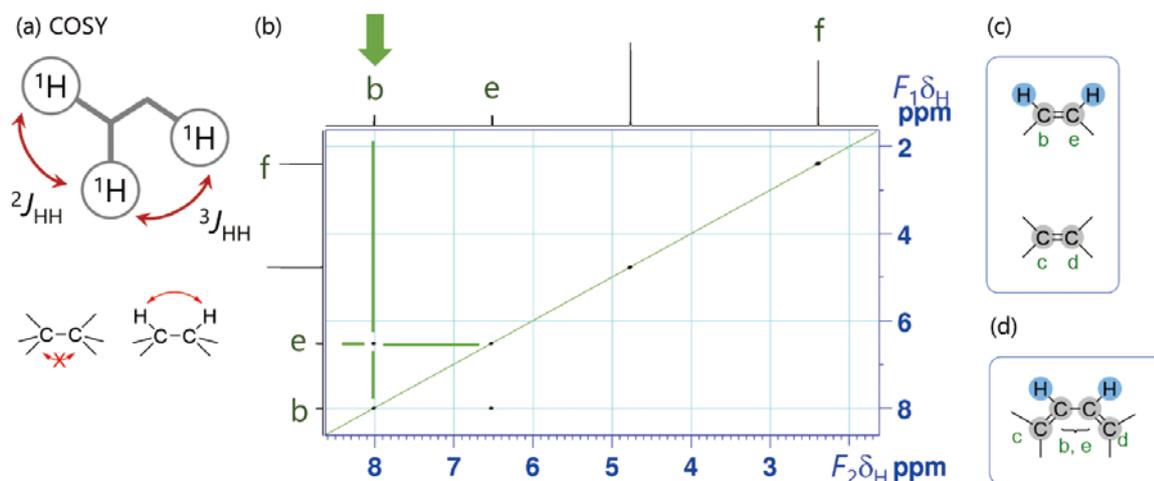


図6 (a) COSYでは J_{HH} カップリングのある2から3結合離れたプロトンどうしの相関が得られる。(b) 1のCOSYスペクトル。HSQCで振ったアルファベットを書き写す。(c)、(d) COSYから推定される部分構造。

するカーボンと同じアルファベットを振っていきます。1にはメチレンはなくすべての相関ピークが正で得られています。fのカーボン(C-f)が、積分比からメチル基と推定したプロトンに相関があるので、このプロトンにfと書きます。C-fはメチル基カーボンとわかります。化学シフトが近寄っている部分は拡大図(図4(c))を確認します。H-fと同様に、H-b、H-eのアルファベットが振られ、C-b、C-eがメチンカーボンであるとわかります。HSQC相関のないC-a、C-c、C-dは第四級炭素と推定できます。このようなCH₃、CH₂、CH、Cの区別(CH_n, n=0,1,2,3)は、一次元のDEPTスペクトル(90度と135度)で行うこともあります。

ここまでの情報を整理(図5)

カーボンのピークテーブルに、直結するプロトンの情報を書き足して整理しておきます(図5

(a))。ここでカーボンの化学シフトを小数点以下一桁に四捨五入しています。プロトン、カーボンの化学シフトから、C-aはカルボニルカーボンであることと、bからeの4個のカーボンで二重結合を二つ作ることが推定できます(図5(b))。残った酸素2個、水素1個で、水酸基とエーテル一つずつを推定します。

はじめに不足水素指標を4と求めていました。カルボニル一つ、二重結合二つを推定したので、残りの指標は1となり、環が一つあることとなります(図5(c))。いまある部分構造で環を作るには、フラン、2-ピロンまたは4-ピロンが良さそうです。フラン環は J_{HH} が小さいので除外し、また、C-aの δ_c が178.0ppmであることから4-ピロンを第一候補にします。

2D COSY スペクトル(図6)

COSYは2または3結合離れたプロトン-プロ

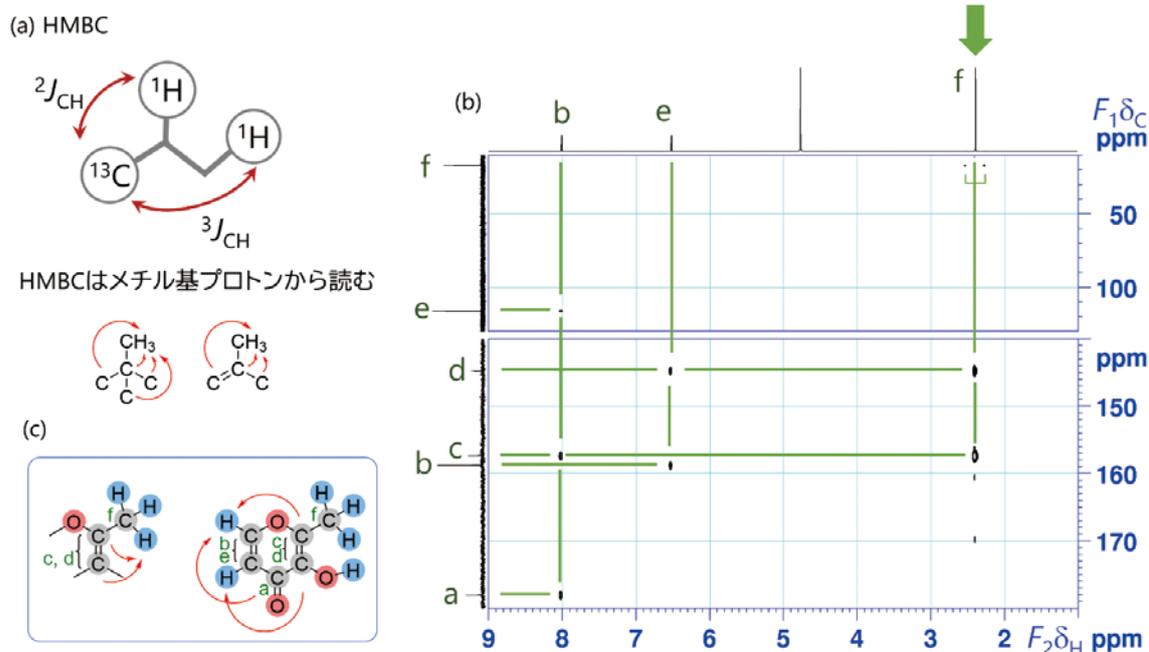


図7 (a) HMBCでは2から3結合離れたプロトンとカーボンに相関が得られる。メチル基があればメチル基プロトンから読み始める。(b) 1のHMBCスペクトル。HSQCで振ったアルファベットを書き写す。(c) これまでに分かっていた部分構造をHMBCでつなぐ。

トン間の J_{HH} カップリングを検出する手法です(図6(a))。4結合以上離れた遠隔カップリングが出ることもあります。低分子有機化合物の構造決定は ^{13}C が天然存在比のままの試料で行うことが多く、 J_{CC} カップリングを検出する測定を日常的には行えないため、COSYで3結合離れたプロトンどうしを検出することで、間接的に隣り合ったカーボンを推定します。

1のCOSYスペクトル(図6(b))ではH-bとH-eの間に相関ピークが得られています。1は 1H -NMRスペクトルだけでもこのカップリングが推定できます。すでにbからeの4個のカーボンで二重結合を二つ作ることを推定していました。C-bとC-eの二重結合とC-cとC-dの二重結合がある(図6(c))、またはC-cとC-dがC-bとC-eをはさむ部分構造(図6(d))が推定されます。図6(d)は4-ピロンにはない部分構造です。

2D HMBC スペクトル (図7)

HMBCは2または3結合離れたプロトン-カーボン間の遠隔 J_{CH} カップリング($^{LR}J_{CH}$)を検出する手法で(図7(a))、ヘテロ原子や第四級炭素を介した構造を組み立てることができます。4結合以上離れた相関が出ることもあります。 $^{13}C/^1H$ だけでなく $^{15}N/^1H$ も測定できます。HMBCスペクトルはメチル基プロトンから読みはじめます。メチ

ル基プロトンから2、3結合以内にある炭素は最大でも4個と少なく解析が容易で、また、メチル基の自由回転のおかげで $^{LR}J_{CH}$ の角度依存性による相関ピークの欠落がないからです。

1のHMBCスペクトル(図7(b))でメチル基プロトンH-fとC-fとの間に、大きなダブルレットがあります。このように $^1J_{CH}$ で分裂した直結ピークが現れることがあり、遠隔の相関ピークと誤って解析しないように注意します。H-fは他にはC-c、C-dにだけ相関があることから、図6(c)のようにC-c、C-dが二重結合を作っており、その一方にメチル基と酸素が結合していると推定します(図7(c))。図6(d)の部分構造は否定されます。すでに推定した4-ピロンにあてはめてカルボニルカーボンC-aおよび、C-bとC-eで作った二重結合を配置し、残っている第四級炭素C-cまたはC-dに水酸基を結合させます。

得られているHMBC相関から、cとd、bとeの帰属を入れ替えた同じ構造が推定されます。

検証と仕上げ (図8)

b、eの帰属に、 α/β 不飽和カルボニル化合物のプロトン、カーボンの化学シフトは α 位が小さく、 β 位が大きいという傾向を使い、これらとのHMBC相関からC-cとC-dも帰属できます。構造式にCOSY、HMBCの相関を書き入れ、平面

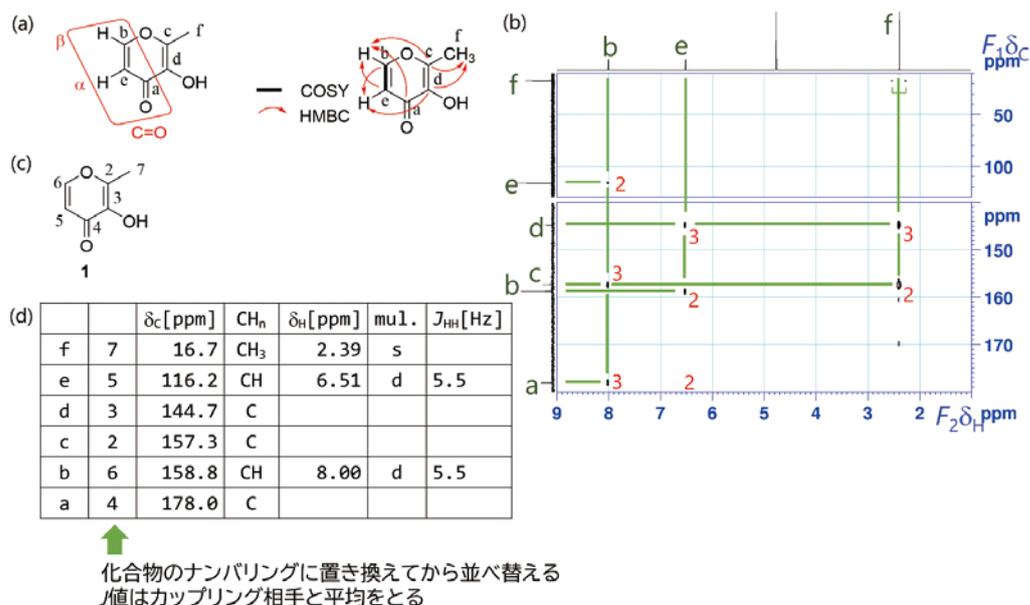


図8 検証と仕上げ。(a) 1のCOSY, HMBC相関。(b) HMBCスペクトルの検証。(c) 化合物のナンバリング。(d) データテーブルの仕上げ。

構造と矛盾がないか確認します(図8(a))。次にHMBCスペクトルに、3結合以内のプロトンとカーボンの結合数を記入します(図8(b))。 $^L R J_{CH}$ は小さくなることもあるので、C-a/H-eのように相関ピークのない位置に数字が書かれることがあります。逆に、4結合以上はなれているプロトンとカーボンにHMBC相関が出ている場合はその本数を記入したうえで、 $^L R J_{CH}$ が見えやすい位置関係であるか確認します。また、得られている相関ピークで他の構造を組むことができないかどうかも検討します。

最後にデータテーブルのアルファベットを化合物のナンバリング(図8(c))に置き換えて(図8(d))からナンバリング順に並べ替え、J値をカップリング相手との平均値として完成させます。

未知化合物 X の構造を推定せよ

ミッション1. 未知化合物2 (分子式C₇H₇NO₃, 2mg/methanol-d₄, 図9、10)。

ミッション2. 未知化合物3 (分子式C₆H₅NO₂, 2mg/

methanol-d₄, 図11、12)。

※印は溶媒由来のピークです。解答編を読みやすくするため、¹³C-NMRスペクトルに振るアルファベットをあらかじめ記入してあります。

参考

構造解析の手順、化学シフトやJ値などのデータはたとえば下記書籍にあります。

- ・シルバースタインら「有機化合物のスペクトルによる同定法(第8版)」東京化学同人
- ・プレシュら「有機化合物の構造決定」シュプリンガー・ジャパン
- ・福士江里・宗宮 創「これならわかる二次元NMR」化学同人
- ・福士江里「よくある質問NMRスペクトルの読み方」講談社サイエンティフィク

著者が執筆しているGC-MS・NMR室のWebサイトは引越作業中です。移転後のアドレスは<https://sites.google.com/elms.hokudai.ac.jp/ms-nmr/>



福士 江里 (ふくし・えり)

1987年 北海道大学農学部農芸化学科卒業

1989年 北海道大学大学院農学研究科修士課程農芸化学専攻修了

1989年 北海道大学大学院農学部 文部技官、GC-MS・NMR室勤務

1996年 博士(農学) 北海道大学

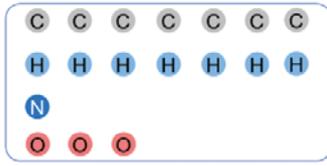
(改組等により所属名称および職名が数回変更)

2019年 北海道大学大学院農学研究院 技術専門員

(a) 未知化合物2の分子式は $C_7H_7NO_3$

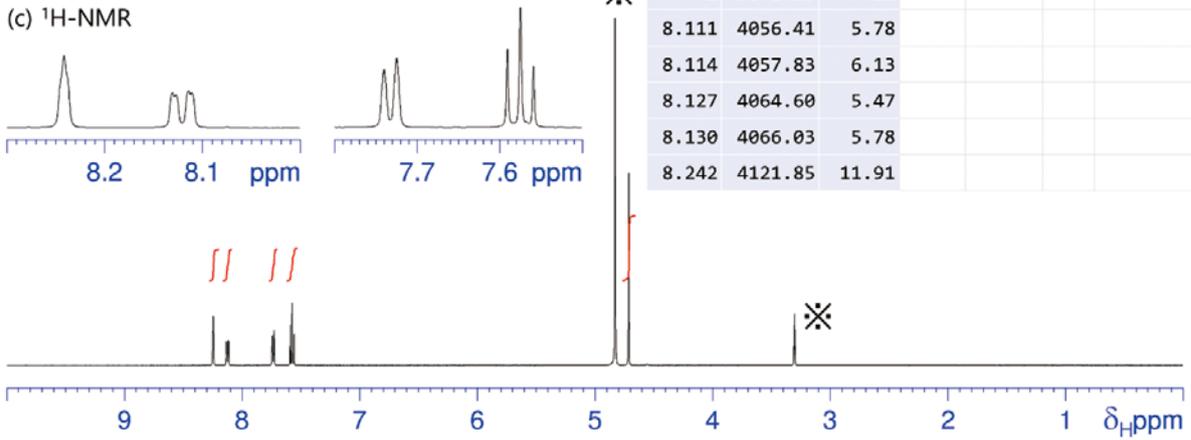
不足水素指標 = $C+1 - \frac{H-N}{2} = \square$

(b) 原子を用意する

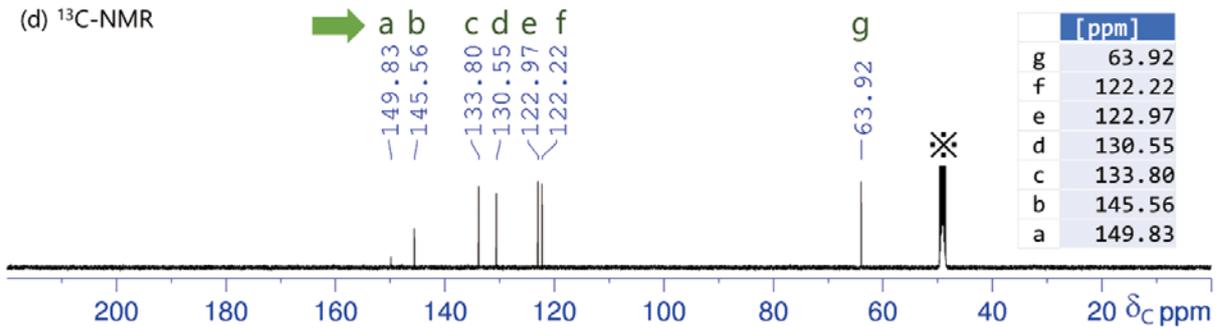


[ppm]	[Hz]	Int. [rel]	CH _n	δ _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
4.712	2356.81	46.09				
7.559	3780.28	7.54				
7.574	3788.17	15.00				
7.590	3796.11	9.68				
7.724	3862.92	8.46				
7.725	3863.59	8.48				
7.739	3870.56	7.08				
7.741	3871.23	7.11				
8.111	4056.41	5.78				
8.114	4057.83	6.13				
8.127	4064.60	5.47				
8.130	4066.03	5.78				
8.242	4121.85	11.91				

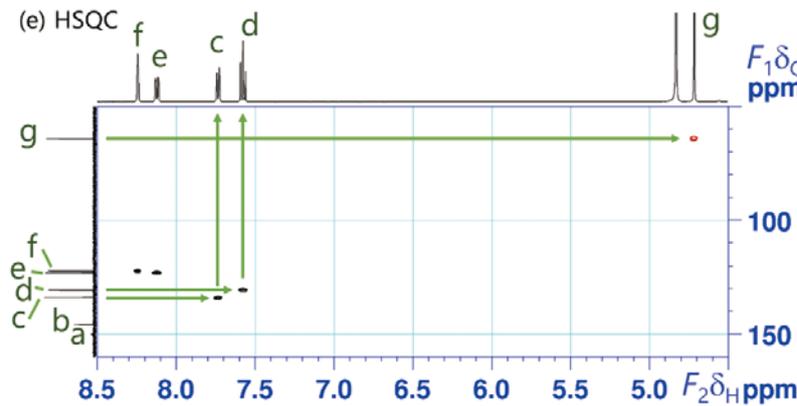
(c) ¹H-NMR



(d) ¹³C-NMR



(e) HSQC



(f) 拡大

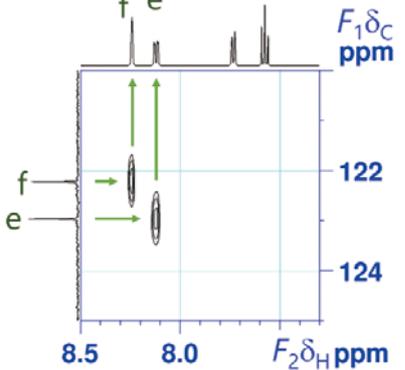


図9 未知化合物2 (2mg/methanol-d₄) の構造を推定してみよう。(a) 不足水素指標を計算しよう。(b) 原子を準備する。(c) ¹H-NMR スペクトル (500 MHz)。化学シフトと分裂様式を解析しよう。(d) ¹³C-NMR スペクトル (126 MHz)。(e) HSQC スペクトル。CH₃、CH は正 (黒)、CH₂ は負 (赤) で得られる。(f) (e) の拡大。プロトンに、直結するカーボンと同じアルファベットを振る。

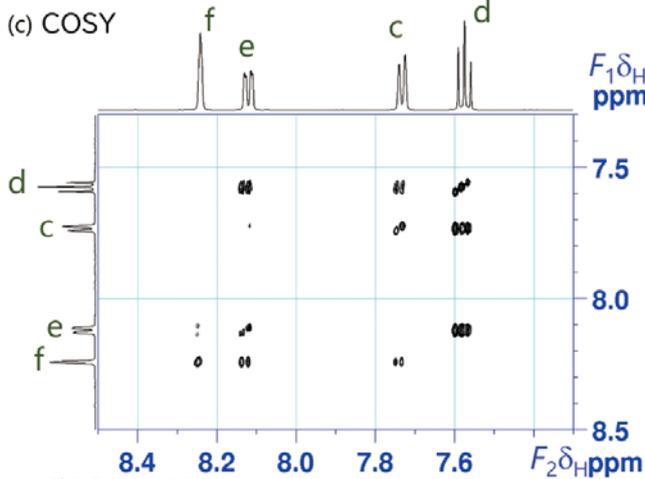
(a) データテーブル

	[ppm]	CH _n	δ _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
g	63.9				
f	122.2				
e	123.0				
d	130.6				
c	133.8				
b	145.6				
a	149.8				

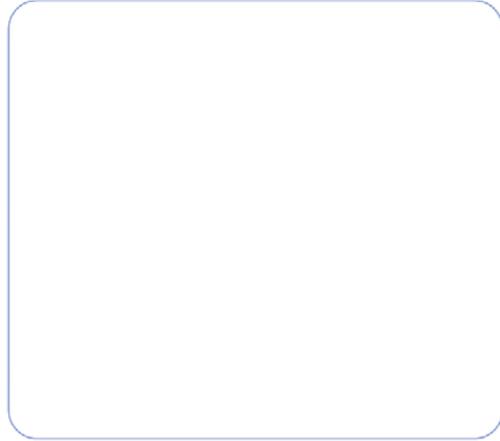
(b) ここまででわかった部分構造



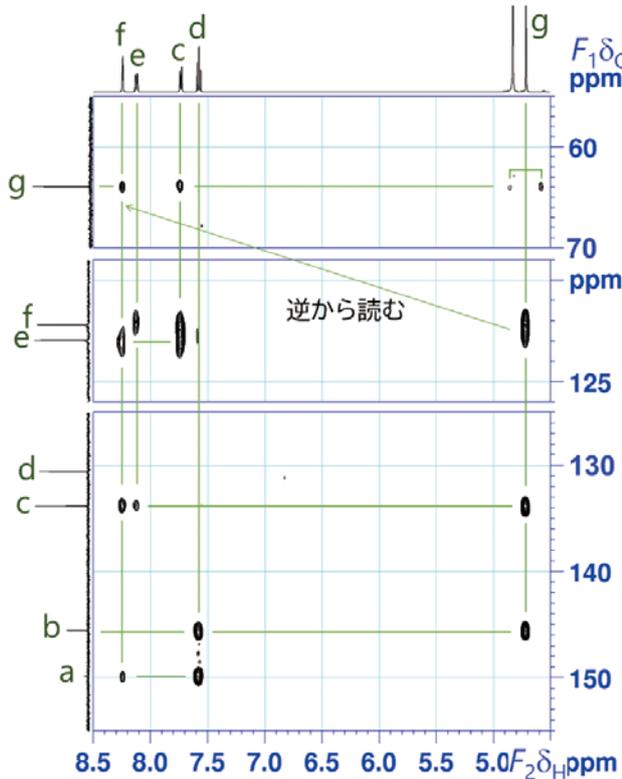
(c) COSY



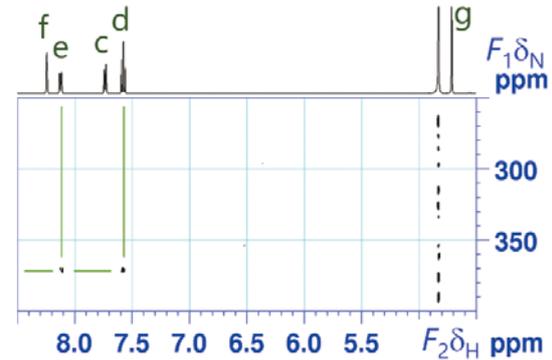
(d) COSYでわかる部分構造



(e) ¹³C/¹H HMBC



(f) ¹⁵N/¹H HMBC



(g) 推定構造

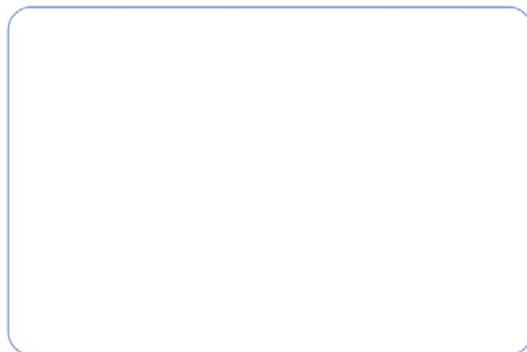
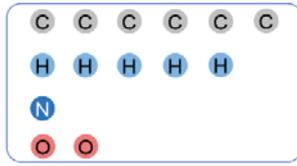


図10 2のデータの続き。(a) ここまでの解析結果を整理しよう。(b) ここまでで推定できる部分構造を書いてみよう。(c) COSYスペクトル。アルファベットを書き写す。(d) COSYでわかる推定構造を書いてみよう。(e) ¹³C/¹H HMBC。(f) ¹⁵N/¹H HMBC。(g) アルファベットを書き写す。構造を推定し、COSY、HMBCの相関を検証しよう。

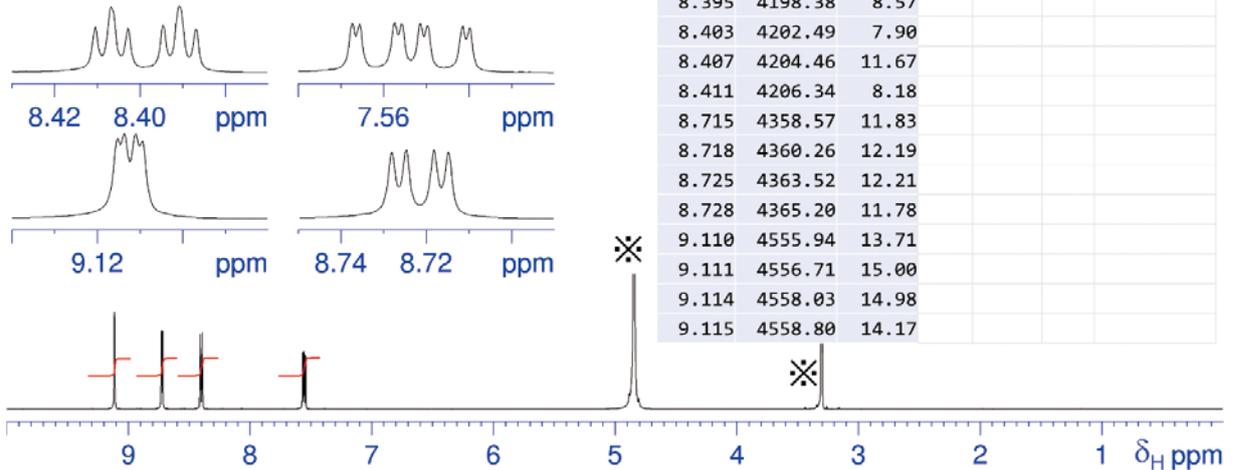
(a) 未知化合物3の分子式は $C_6H_5NO_2$

$$\text{不足水素指標} = C + 1 - \frac{H - N}{2} = \boxed{}$$

(b) 原子を用意する

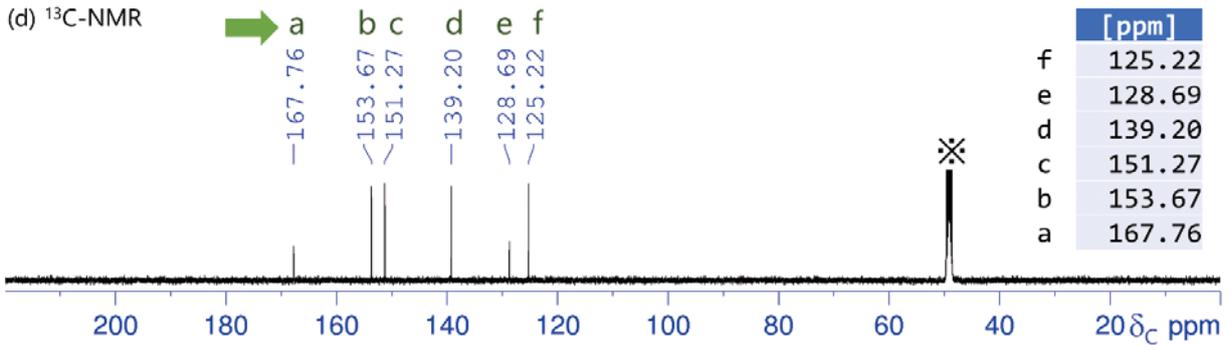


(c) 1H -NMR (500 MHz)



[ppm]	[Hz]	Int. [rel]	CH _n	δ _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
7.540	3770.92	8.03				
7.542	3771.77	8.38				
7.550	3775.88	8.49				
7.552	3776.72	8.84				
7.556	3778.88	8.75				
7.558	3779.72	9.01				
7.566	3783.83	8.71				
7.567	3784.67	8.92				
8.387	4194.53	7.82				
8.391	4196.50	11.96				
8.395	4198.38	8.57				
8.403	4202.49	7.90				
8.407	4204.46	11.67				
8.411	4206.34	8.18				
8.715	4358.57	11.83				
8.718	4360.26	12.19				
8.725	4363.52	12.21				
8.728	4365.20	11.78				
9.110	4555.94	13.71				
9.111	4556.71	15.00				
9.114	4558.03	14.98				
9.115	4558.80	14.17				

(d) ^{13}C -NMR



(e) HSQC

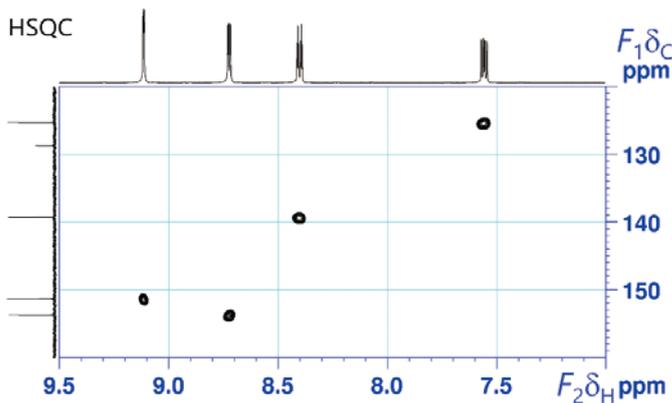


図11 未知化合物3 (2mg/methanol- d_4) の構造を推定してみよう。(a) 不足水素指標を計算しよう。(b) 原子を準備する。(c) 1H -NMR スペクトル (500 MHz)。(d) ^{13}C -NMR スペクトル (126 MHz)。(e) HSQC スペクトル。カーボンにアルファベットを書き写し、直結するプロトンにカーボンと同じアルファベットを振ろう。

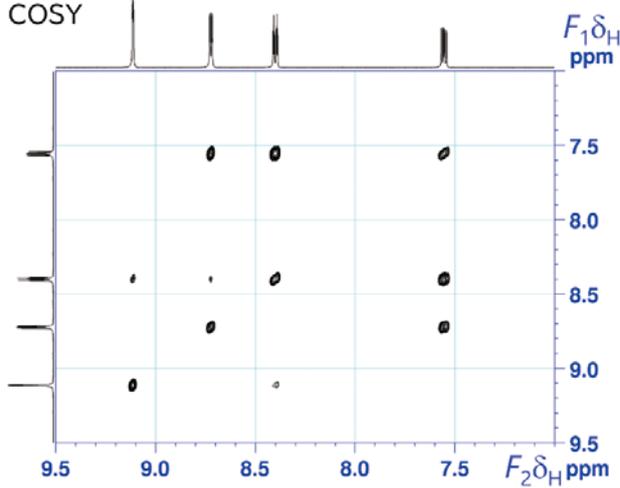
(a) データテーブル

	δ_c [ppm]	CH _n	δ_H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
f	125.2				
e	128.7				
d	139.2				
c	151.3				
b	153.7				
a	167.8				

(b) ここまででわかった部分構造



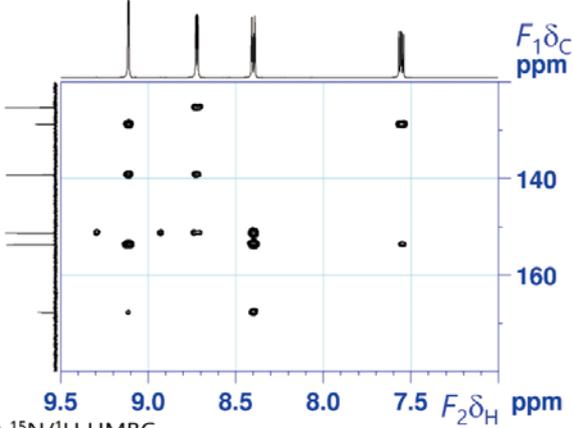
(c) COSY



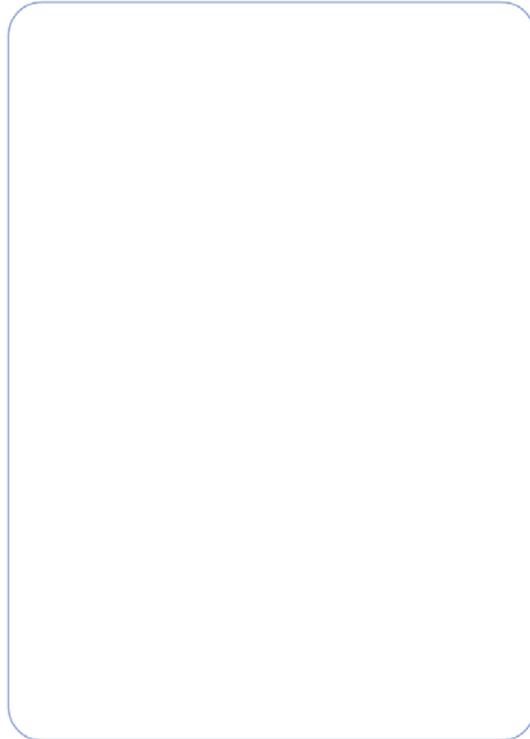
(d) COSYでわかる部分構造



(e) ¹³C/¹H HMBC



(g) 推定構造



(f) ¹⁵N/¹H HMBC

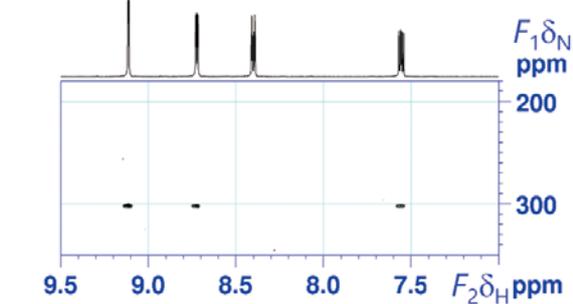


図12 3のデータの続き。(a) ここまでの解析結果を整理しよう。(b) ここまでで推定できる部分構造を書いてみよう。(c) COSYスペクトル。アルファベットを書き写そう。(d) 部分構造を推定しよう。(e)、(f) ¹³C/¹H および ¹⁵N/¹H HMBC。カーボンとプロトンにアルファベットを書き写そう。(g) 構造を推定し、COSY、HMBCの相関を検証しよう。

NMRを用いた生体高分子表面周辺静電ポテンシャルの直接測定

¹University of Texas Medical Branch, ²理化学研究所 生命機能科学研究センター

岩原 淳二¹、外山 侑樹²

j.iwahara@utmb.edu, yuki.toyama@riken.jp

1. はじめに

生命における分子間相互作用の複雑なネットワークには静電力が関与し、生体高分子の構造と機能に影響を与える。タンパク質と核酸の結合、酵素触媒作用、液-液相分離 (liquid-liquid phase separation; LLPS) などの多様な生物学的過程において、静電相互作用は重要な役割を果たしている。静電相互作用エネルギーの正確な評価は、タンパク質工学や医薬品設計の成功の鍵とも見なされている。従来、生体高分子の静電ポテンシャルは、3次元構造に基づく計算化学的な研究の対象であった。近年、核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance; NMR) 法の新規実験方法論の開発に

より、この状況は変わりつつある。この新規手法では、3次元構造情報を使用せずに生体高分子の静電ポテンシャルを定量的に算出することが可能であり、また生体高分子の多くの残基について網羅的かつ同時に、分子表面周辺の静電ポテンシャルを測定することができる点において優れている^[1](図1A)。本稿では、本手法から得られる実効表面周辺静電ポテンシャル (effective near-surface electrostatic potential) を「 ϕ_{ENS} 電位」と略称し、そのNMRによる測定手法を「 ϕ_{ENS} 法」と称する。この新規の実験方法論は、静電ポテンシャルの理論計算モデルの妥当性を実験的に検証することを可能とし^[1-5]、生体高分子の会合や

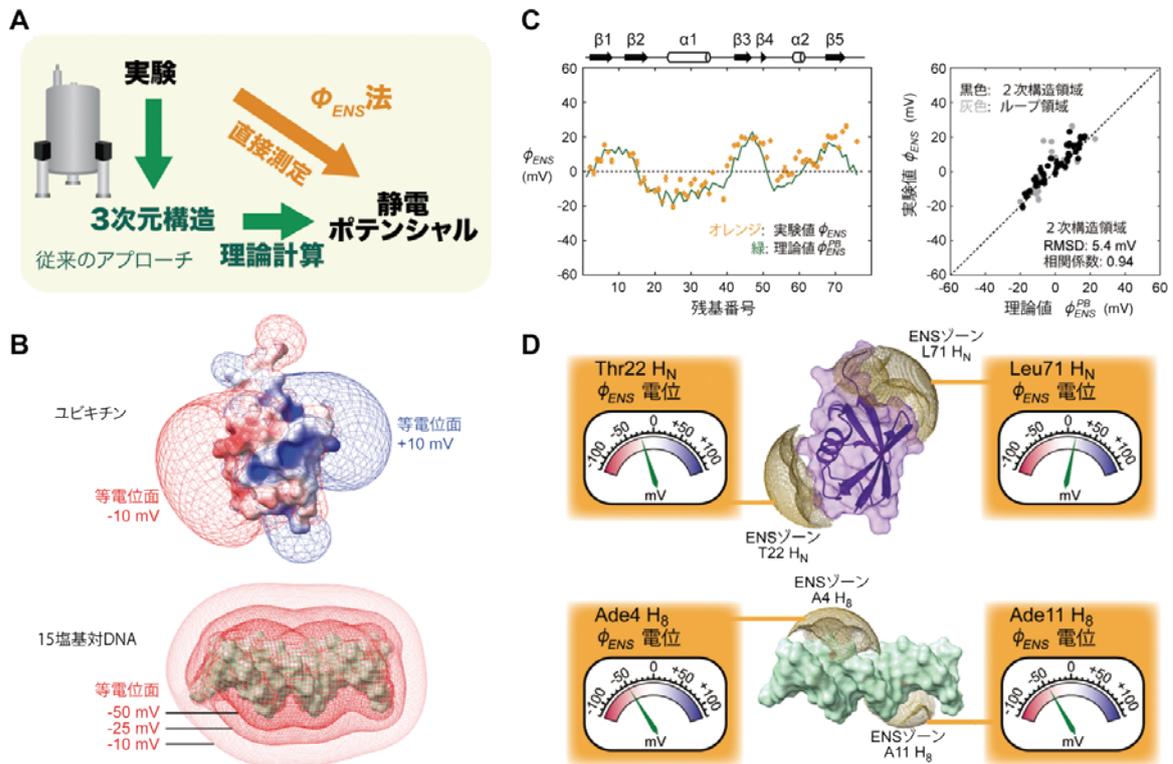


図1 NMRによる静電ポテンシャルの直接測定。(A) 生体分子周囲の静電ポテンシャルを分析するための従来のアプローチ(緑)と新しいアプローチ(オレンジ)。(B) ポアソン-ボルツマン方程式から計算されたユビキチンおよび15塩基対DNA周囲の静電ポテンシャル。(C) ユビキチンの主鎖¹H_N核について測定された ϕ_{ENS} 電位。実験値(オレンジ)および式2からの理論値(緑)との比較を示す。参考文献^[1]からの引用。(D) ϕ_{ENS} 電位の物理的意味。各 ϕ_{ENS} 電位は、観測される¹H核のENSゾーン(茶色)内の平均静電ポテンシャルを表す。ユビキチンと15塩基対DNAに関する例をいくつか示す。

液-液相分離など、さまざまな分子過程の静電的側面を研究するために応用することができる^[1,5-9]。いわゆる天然変性タンパク質 (intrinsically-disordered protein ; IDP) など、構造的に柔軟な生体分子への応用は特に有用である^[5-9]。表1に ϕ_{ENS} 法の応用例および関連文献をまとめる。この総説では ϕ_{ENS} 法の原理および応用を簡単に紹介したい。

2. NMR による静電ポテンシャル測定の原理

生体高分子周囲の空間内で電荷を帯びた低分子およびイオンは、静電相互作用の影響を受け

表1 ϕ_{ENS} 法の応用例

応用	参考文献
・ 静電ポテンシャル理論モデルの検証	1-5
・ 分子間相互作用の静電的側面	1, 7, 8
・ 生体高分子静電相互作用へのイオンの影響	1, 4, 8
・ 相分離における静電相互作用の役割	7, 8
・ 変性タンパク質の静電的性質	5-9
・ 核酸の静電ポテンシャル	3
・ 構造アンサンブルの評価	1, 5

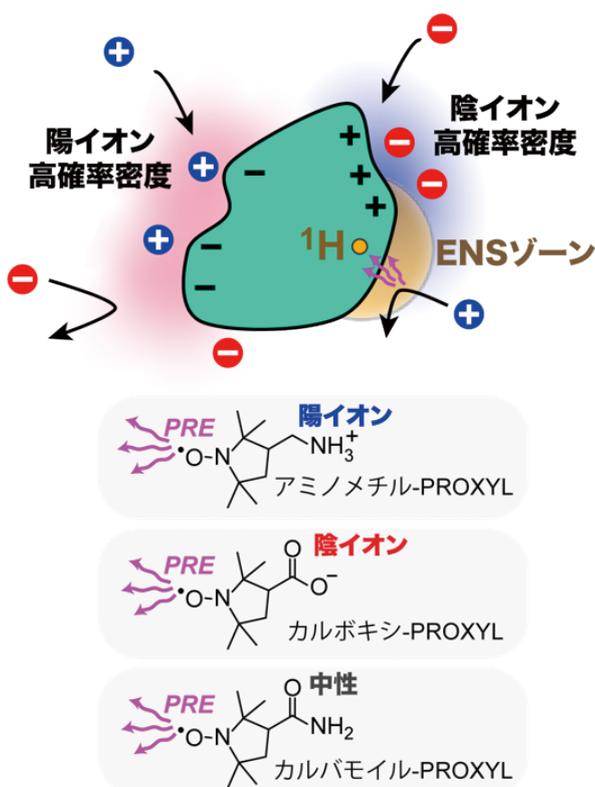


図2 ϕ_{ENS} 法に用いられる常磁性共溶質の例。 ϕ_{ENS} 法では、異なる電荷を持ち、同じ化学骨格をもつ常磁性共溶質の空間分布の違いが静電ポテンシャルにより規定されることを利用する。これらの化合物に共通のPROXYL基における疎水性相互作用は、静電ポテンシャル測定に影響を及ぼさない^[1,4]。

ることで不均一に分布する。そして溶液中での溶質分子の拡散過程を考えた場合、生体高分子周囲空間における電荷を帯びた溶質分子の存在確率分布は、局所的な静電ポテンシャルに依存する。したがって、分子表面における電荷を帯びた溶質分子の分布を定量することができれば、これを利用して生体高分子表面周囲の静電ポテンシャルを得ることが原理的に可能である。我々の手法は、溶液中において拡散する常磁性共溶質から生じる常磁性緩和促進 (paramagnetic relaxation enhancement ; PRE) (生体高分子のNMR分光では一般的に溶媒PREと呼ばれる) を利用することで、分子表面周囲の静電ポテンシャルを実験的に測定することを可能とする。¹H横磁化の溶媒PRE速度 (Γ_2) は、常磁性共溶質を含むサンプルと含まない対照サンプルを使用して、¹H横緩和速度の差分から比較的容易に測定することができる。 ϕ_{ENS} 法では、溶媒PREが分子表面周囲の静電ポテンシャルおよび常磁性共溶質の電荷に依存することを利用し、異なる電荷を持つ2つの類似した常磁性共溶質から生じる溶媒PREを比較することで、 ϕ_{ENS} 電位を決定する。 ϕ_{ENS} 電位は次のように定義される^[1]。

$$\phi_{ENS} = \frac{k_B T}{(z_b - z_a)e} \ln \left(\frac{\Gamma_{2,a}}{\Gamma_{2,b}} \right) \quad [1]$$

この式において、 $\Gamma_{2,a}$ および $\Gamma_{2,b}$ は同じ濃度での常磁性共溶質aおよびbから生じる溶媒PREの速度、 z はそれらの電荷の価数を表し、 e は素電荷、 k_B はボルツマン定数、 T は温度である。溶媒PRE速度は、観測される¹H原子核近傍の実効表面周囲空間 (effective near-surface zone : ENSゾーン) に一時的に滞在する常磁性共溶質に支配されることから、算出される ϕ_{ENS} 電位はENSゾーン内の平均静電ポテンシャルに相当する^[1] (図1D)。詳細は文献^[1]を参照してほしい。

ϕ_{ENS} 法で用いられる常磁性共溶質の例を図2に示す。これらはアミノメチル基、カルボキシ基、あるいはカルバモイル基で修飾された2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl nitroxide (PROXYL) 誘導体で、中性pHにおいて価数 z が異なる (それぞれ $z = +1, -1, および 0$)。多くの場合、正と負に帯電した常磁性プローブの組み合わせが、最も正確な ϕ_{ENS} 電位を与える^[9]。しかしながら、例えば核酸のように強く帯電した生体高分子の場合、同符号で帯電した常磁性共溶質

から生じる溶媒PREが静電的反発のため十分な大きさで観測されず、正確な ϕ_{ENS} 電位の測定が困難となる場合がある。このような場合には、中性の常磁性共溶質 ($z=0$) を含む組み合わせを使用することで、正確な ϕ_{ENS} を算出することが可能である^[3, 5, 6]。PROXYLは、タンパク質の疎水性表面と相互作用することが知られており^[10-12]、これらの非静電相互作用もまた溶媒PREに寄与しうる。しかしながら、各PROXYL誘導体間を比較した場合、その構造類似性のために非静電相互作用の寄与は同じであると近似することができ、これらの寄与は Γ_2 の比 ($\Gamma_{2,a}/\Gamma_{2,b}$) を算出することにより相殺される^[1, 4]。したがって式 [1] は、非静電相互作用からは影響を受けることなく、正確な静電ポテンシャルの大きさを反映することが特筆すべき点である。

3. 3次元構造から予測される ϕ_{ENS} 電位と静電ポテンシャル理論計算値の評価

NMRを用いて実験的に算出された ϕ_{ENS} 電位は、生体高分子の3次元構造から予測できるため、静電ポテンシャルの理論計算値と直接的な比較を行うことが可能である (図1B, C)。 ϕ_{ENS} 電位を予測する方法の一例として、生体高分子の原子座標、および周囲の3次元空間内の各格子点における静電ポテンシャルの分布を用いた、以下の計算式が挙げられる^[1, 2]。

$$\phi_{ENS}^{PB} = -\frac{k_B T}{2e} \ln \left(\frac{\sum_i \rho_i r_i^{-6} \exp[-\frac{e\phi_i}{k_B T}]}{\sum_i \rho_i r_i^{-6} \exp[\frac{e\phi_i}{k_B T}]} \right) \quad [2]$$

ここで、 ϕ_i はポアソン-ボルツマン (PB) 方程式の解から得られる分子周辺の3次元空間内の格子点*i*における静電ポテンシャル、 r_i は観測する¹H原子核から格子点*i*までの距離、 ρ_i は格子点*i*がアクセス可能であるかどうかを表し、1 (アクセス可能) または 0 (アクセス不可) のいずれかの値をとる係数である。ユビキチンを例とした場合、式 [2] を用いて予測された ϕ_{ENS} 電位 (ϕ_{ENS}^{PB}) と、実験で得られた ϕ_{ENS} 電位とは、2乗平均平方根偏差 (root-mean-square deviation ; rmsd) として5mV程度の一一致を示していることが確認された^[1]。図1Cの実験はイオン強度30mMの条件で行ったものであるが、同様の実験をより高いイオン強度の条件 (130mM) で行い、理論からの予測値 ϕ_{ENS}^{PB} と比較すると、興味深いことに理論値は実験値よりもイオン強度の影響を大きく見積もる傾向が観測

された。これは、ポアソン-ボルツマン方程式において考慮されていない、高イオン強度におけるイオン相関効果などを反映していると考察している。この点において、 ϕ_{ENS} 法は静電ポテンシャルの理論計算の妥当性を評価するうえでも有用であると考えられる。

式 [2] は常磁性共溶質分子内の電荷と不対電子が、生体高分子周辺で同じ空間分布を示すと仮定している。しかしながら、PROXYL誘導体の荷電部分と不対電子は分子の反対側に位置するため、この仮定は必ずしも有効ではない可能性がある。特に、生体高分子表面の電荷分布によっては、観測¹H原子核に対する各常磁性共溶質分子の相対配向が等価とはならないことが予想される。これらの常磁性共溶質の分子構造と配向相関は、式 [2] では考慮されていない。Chenらは、常磁性共溶質の原子モデル、および溶媒を含む全原子分子動力学 (molecular dynamics ; MD) 計算のトラジェクトリに基づき、相対配向を考慮したデータ処理を行うことによって、 ϕ_{ENS} 電位の実験データをより正確に予測できることを示した^[4]。ただ、現時点ではこの計算法は非常に時間がかかり、今後の改善が期待される。

4. 天然変性タンパク質および相分離への応用

ϕ_{ENS} 法は3次元構造情報を必要としないため、特定の立体構造を形成しないIDPの静電的性質の解析に特に有用である。なかでも近年、IDP同士が会合することで生じるLLPSが、細胞内の物質輸送や酵素反応の制御など、多様な生理機能を担うことが明らかとされつつあり、LLPSの分子実体であるIDP同士の相互作用機構、そのなかで静電相互作用が果たす役割は大きな注目を集めている^[13]。ここでは、RNA代謝の制御を担うCAPRIN1タンパク質の天然変性領域 (intrinsically disordered region ; IDR) に、 ϕ_{ENS} 解析を応用した例を紹介する^[7, 8] (図3)。CAPRIN1は生理的pHにおいて+13と高度に正に荷電した配列であることを特徴とし、ATPや高濃度の塩存在下でLLPSを生じ、CAPRIN1が高濃度に集積した凝集相を形成することが明らかとなっていた。そこで、ATP依存的なCAPRIN1のLLPS過程と、CAPRIN1の静電ポテンシャルがどのように関連しているのかを、 ϕ_{ENS} 解析を活用することで明らかにすることを目指した。ATP非存在下で、LLPSが生じていない条件下においては、アルギニン残基を多

く含む領域周囲で正の ϕ_{ENS} 電位が観測されており、静電反発によって分子会合が抑制された状態にあることが分かった(図3A, 3C [I])。ここにATPを添加すると、正に荷電した領域の ϕ_{ENS} 電位はATP濃度、およびATP/CAPRIN1モル比が増大するにしたがって減少していくことが示された(図3A, 3C [II])。これは、負に帯電したATPがアルギニン残基と結合することで正電荷を中和し、非静電相互作用を介した分子間相互作用を相対的に促進していることを示唆する^[7]。また、CAPRIN1凝集相をNMRにより直接観測することで得られた ϕ_{ENS} 電位は、ほぼ分子全体にわたって中性の値を示しており、凝集相内では分子間の静電反発が高度に抑制されていることが分かった(図3B, 3C [III])。興味深いことに、ATP濃度が90 mMの条件では表面電荷が反転して ϕ_{ENS} 電位が負の値をとり、結果として凝集相の溶解が生じていることが示された(図3A, 3C [IV])。これらの結果は、IDPが担う相分離の分子機構を理解するうえで、 ϕ_{ENS} 法から得られる静電ポテンシャルの定量的な比較が、非常に有効であることを実証するものである。CAPRIN1以外にも、LLPSにおいて静電相互作用が重要な役割を果たす例が数多く知られている。例えば、細胞核内では多くの転写調節因子が相分離を介して共凝集するが、その過程の選択性はタンパク質配列中に局在する電荷パターンによって支配される^[14]。今

後も ϕ_{ENS} 法を活用することで、液-液相分離の静電的側面について、より深い洞察が得られることが期待される。

Okunoらは、フォールドした天然状態、および変性状態との平衡にあるdrkN SH3ドメインに ϕ_{ENS} 法を適用した^[5]。drkN SH3ドメインの ϕ_{ENS} 電位の分布を両状態で比較したところ、変性状態は天然状態に比べて、残基間の ϕ_{ENS} 電位の分布がより狭いことが分かった。これは、変性状態のdrkN SH3ドメインがさまざまな構造をとることにより、見かけ上の電荷分布が平均化したことを反映していると考えられる。筆者らは、タンパク質の変性状態を対象としたレプリカ交換MD計算に基づき ϕ_{ENS} 電位を予測し、実験的に測定された ϕ_{ENS} 電位と予測値がよく一致したことをもとに、これを立証した。この結果は、変性状態におけるMD計算の妥当性を支持するとともに、他のNMR実験データ(化学シフト、residual dipolar coupling [RDC] など)と同様に、 ϕ_{ENS} 電位データもIDP/IDRの構造アンサンブルの実験的検証に利用可能であることを示唆する。

5. 静電ポテンシャルに関する他の手法との比較および利点

我々がNMRで静電ポテンシャルを直接測定する以前から、電子-電子二重共鳴(electron-electron double resonance [ELDOR])法、蛍光分

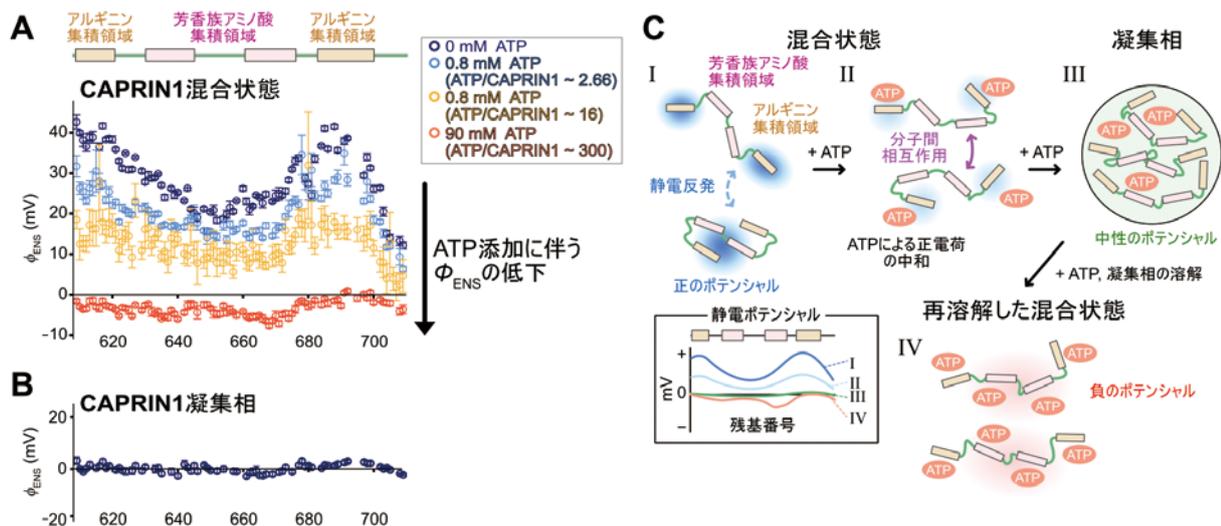


図3 ATPにより誘起されるLLPS過程におけるCAPRIN1分子表面周辺の ϕ_{ENS} 電位の変化^[7]。(A) LLPSを生じていないCAPRIN1混合状態の ϕ_{ENS} 電位のプロット。ATP濃度、およびATP/CAPRIN1モル比の上昇に伴い、CAPRIN1周囲の ϕ_{ENS} 電位は徐々に減少する。ATP濃度をさらに90 mMまで増加させると、 ϕ_{ENS} 電位が負に転じて、凝集相の溶解が生じた。(B) 3 mM ATP存在下で形成したCAPRIN1凝集相の ϕ_{ENS} 電位のプロット。分子全体にわたりほぼ0 mVの中性の値を示す。凝集相内では、各CAPRIN1分子に約5個のATP分子が結合していると考えられる。(C) ATP依存性LLPSの各過程における、CAPRIN1静電ポテンシャルの変化および分子間相互作用の変化の模式図。参考文献^[7]からの引用。

光法、システイン修飾反応速度論が、静電ポテンシャルの推定に使用されてきた^[15-17]。しかし、これらの方法では、各サンプルから1つの静電ポテンシャル値しか得られないため、様々な部位で静電ポテンシャルを測定するには複数のサンプルを準備する必要がある。それとは対照的に、 ϕ_{ENS} 法では多数の部位での静電ポテンシャルを同時に測定することができる。例えば、76残基のタンパク質であるユビキチンの場合、2種類の常磁性共溶質をそれぞれ含むサンプルと、含まない対照サンプルを準備することで、150以上の異なる部位での ϕ_{ENS} を算出することが可能である^[1, 2]。また、 ϕ_{ENS} 法は生体分子の化学修飾を必要としないことから、修飾の影響を考慮せず広範な溶液条件に適用することが容易である。さらに上述したように、 ϕ_{ENS} 電位は3次元構造情報に基づいた理論計算値との直接的な比較が容易であることもまた、他の手法と一線を画する利点として挙げられる。

極低温電子顕微鏡(クライオEM)は、原理的には、原子散乱因子に関連する静電ポテンシャルを直接的に提供する^[18]。しかし、クライオEM静電ポテンシャルマップからは、生体分子表面周辺の外部空間の静電ポテンシャルについて、定量的な情報を得ることはできない。また、放射線損傷の影響が排除できないため、クライオEM静電ポテンシャルマップを定量的に解析することが実際には困難である^[18]。これとは対照的に、NMRを利用した ϕ_{ENS} 法では、生理的条件下における生体分子表面周辺の外部空間の静電ポテンシャルの値を、定量的に算出することが可能である(図1を参照)。したがって、現在のところ、溶液NMRを利用した ϕ_{ENS} 法が、静電ポテンシャルを定量的に測定するうえで、最も強力な実験法であるといえる。

6. 振動分光法との比較

振動Stark効果(vibrational Stark effect; VSE)分光法は、共有結合の振動遷移データから外部電場を測定するため用いられる^[19]。この手法を適用するには、他のシグナルとは波数の異なる赤外(IR)シグナルを示す共有結合を観測することが望ましい。したがって、天然タンパク質には存在しないニトリル $C\equiv N$ 結合やアルデヒド/ケトン $C=O$ 結合を、化学修飾、アンバー終止コドンを利用した非天然アミノ酸導入、またはリガンド結合により導入することで、VSE解析に用いられ

てきた。部位特異的な¹³C標識を利用した¹²C-¹³C差スペクトルの解析も、特定部位のVSE解析に有用である^[20]。またアルデヒド基の場合、 $C=O$ 結合と $C-D$ 結合を2つの振動プローブとして同時に使用することにより、外部電場の配向を解析することができる^[21]。Boxerらは、VSE分光法から得られた電場と、野生型および変異型酵素の酵素反応速度を比較することで、静電場が直接的に酵素触媒過程を促進することを実証した。

VSE分光法から得られる情報は、 ϕ_{ENS} 法から得られる情報とは本質的に異なる。VSE分光法では、IRで観測対象となる共有結合に影響を与える外部電場を測定する一方、 ϕ_{ENS} 法ではNMRで観測対象となる¹H原子核に近い局所的な外部空間の平均静電ポテンシャルを測定する。電場 F は、静電ポテンシャル ϕ の勾配(gradient)($\partial/\partial x, \partial/\partial y, \partial/\partial z$)に-1を掛けたものである。価数が z の電荷の場合、電気力は zeF であり、静電エネルギーは $ze\phi$ である。つまりVSE法は電気力に関連する情報を与えるのに対し、 ϕ_{ENS} 法は静電エネルギーに関連する情報を与える。したがって、これら2つの手法は生体高分子の静電的性質に関して相補的な情報を与えるといえる。

7. 今後の課題

NMRを利用した静電ポテンシャルの直接測定に関して、今後の課題として改善すべき点はいくつか挙げられる。そのひとつは、図2に示したPROXYL誘導体が生化学・生物物理実験で汎用されるdithiothreitol (DTT)などの還元剤を含む条件下では使用できないことである。これは、還元剤がPROXYLと反応し、常磁性緩和測定に必要なPROXYL中の不対電子を電子対に変換し無効化することに起因する。また上述したように、図2に示された各化合物は異なる電気双極子を持つため、生体高分子周辺の電場に対して異なる分子配向を示し、不対電子と¹H核間の距離の確率分布、ひいては ϕ_{ENS} 電位の値に影響することも問題である^[4]。これらの課題を解決することで、NMRによる静電ポテンシャルの直接測定は、より幅広い系に適用可能になり、得られる ϕ_{ENS} 電位の正確性も向上すると考えられる。その目的のために、新たな常磁性共溶質を利用した ϕ_{ENS} 法を現在開発中である。

8. まとめ

最近の方法論の進歩により、生体高分子の多数の部位での静電ポテンシャルをNMR実験で直接測定することが可能になった。我々が ϕ_{ENS} 法と呼ぶこの手法は、3次元構造情報を必要としないため、特にIDP/IDRが関与する分子間または分子内の静電相互作用の寄与を定量的に理解するうえで有用である。一般的に静電相互作用は、タンパク質の構造安定性や、タンパク質間相互作用、リガンド相互作用などの熱力学および速度論的特性に影響を与えることが知られていることから、 ϕ_{ENS} 法はこれらのような静電相互作用の役割について、より定量的な解析への道を切り開くものである。また、 ϕ_{ENS} 法は静電ポテンシャルの理論計算の妥当性を検討するうえでも、重要な知見を与える。今後も、溶液NMRを利用した静電ポテンシャル測定法は、タンパク質の翻訳後修飾、液-液相分離、核酸や薬物との相互作用など、生命科学でその重要性が明らかとされている様々な現象への応用が広がることが期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究に際し、米国National Institutes of Health (Grant R35-GM130326: 岩原)、Welch Foundation (Grant H-2104-20220331: 岩原)、日本学術振興会海外特別研究員制度(外山)、上原記念生命科学財団海外留学助成(外山)から支援を受けました。CAPRIN1の研究は筆者(外山)がトロント大学Lewis E. Kayグループに在籍時に実施したものです。研究を共に遂行したDrs. Lewis E. Kay, Julie D. Forman-Kay, Atul K. Rangaduraiに感謝申し上げます。また、Binhan Yu, Montgomery Pettittの各氏から数多くの協力を得ました。感謝申し上げます。

引用文献

- [1] Yu B, Pletka CC, Pettitt BM, Iwahara J (2021) De novo determination of near-surface electrostatic potentials by NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2104020118.
- [2] Yu B, Pletka CC, Iwahara J (2022) Protein Electrostatics Investigated through Paramagnetic NMR for Nonpolar Groups. *J Phys Chem B* 126:2196-2202.
- [3] Yu B, Wang X, Iwahara J (2022) Measuring Local Electrostatic Potentials Around Nucleic Acids by Paramagnetic NMR Spectroscopy. *J Phys Chem Lett* 13:10025-10029.
- [4] Chen C, Yu B, Yousefi R, Iwahara J, Pettitt BM (2022) Assessment of the Components of the Electrostatic Potential of Proteins in Solution: Comparing Experiment and Theory. *J Phys Chem B* 126:4543-4554.
- [5] Okuno Y, Schwieters CD, Yang Z, Clore GM (2022) Theory and Applications of Nitroxide-based Paramagnetic Cosolutes for Probing Intermolecular and Electrostatic Interactions on Protein Surfaces. *J Am Chem Soc* 144:21371-21388.
- [6] Toyama Y, Rangadurai AK, Kay LE (2022) Measurement of $1H\alpha$ transverse relaxation rates in proteins: application to solvent PREs. *J Biomol NMR* 76:137-152.
- [7] Toyama Y, Rangadurai AK, Forman-Kay JD, Kay LE (2022) Mapping the per-residue surface electrostatic potential of CAPRIN1 along its phase-separation trajectory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119:e2210492119.
- [8] Toyama Y, Rangadurai AK, Forman-Kay JD, Kay LE (2022) Surface electrostatics dictate RNA-binding protein CAPRIN1 condensate concentration and hydrodynamic properties. *J Biol Chem* 299:102776.
- [9] Kaushik Rangadurai A, Toyama Y, Kay LE (2023) Practical considerations for the measurement of near-surface electrostatics based on solvent paramagnetic relaxation enhancements. *J Magn Reson* 349:107400.
- [10] Okuno Y, Szabo A, Clore GM (2020) Quantitative Interpretation of Solvent Paramagnetic Relaxation for Probing Protein-Cosolute Interactions. *J Am Chem Soc* 142:8281-8290.
- [11] Petros AM, Mueller L, Kopple KD (1990) NMR identification of protein surfaces using paramagnetic probes. *Biochemistry* 29:10041-10048.
- [12] Pintacuda G, Otting G (2002) Identification of protein surfaces by NMR measurements with a paramagnetic Gd(III) chelate. *J Am Chem Soc* 124:372-373.
- [13] Alberti S, Gladfelter A, Mittag T (2019) Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell* 176:419-434.
- [14] Lyons H, Veetil RT, Pradhan P, Fornero C, De La Cruz N, Ito K, Eppert M, Roeder RG, Sabari BR (2023) Functional partitioning of transcriptional regulators by patterned charge blocks. *Cell* 186:327-345.e328.
- [15] Lu J, Kobertz WR, Deutsch C (2007) Mapping the Electrostatic Potential within the Ribosomal Exit Tunnel. *J Mol Biol* 371:1378-1391.
- [16] Meltzer RH, Lurtz MM, Wensel TG, Pedersen SE (2006) Nicotinic acetylcholine receptor channel electrostatics determined by diffusion-enhanced luminescence energy transfer. *Biophys J* 91:1315-1324.
- [17] Shin YK, Hubbell WL (1992) Determination of electrostatic potentials at biological interfaces using electron-electron double resonance. *Biophys J* 61:1443-1453.
- [18] Marques MA, Purdy MD, Yeager M (2019) Cryo-EM maps are full of potential. *Curr Opin Struct Biol* 58:214-223.
- [19] Fried SD, Boxer SG (2015) Measuring Electric Fields and Noncovalent Interactions Using the Vibrational Stark Effect. *Acc Chem Res* 48:998-1006.
- [20] Schneider SH, Kozuch J, Boxer SG (2021) The Interplay of Electrostatics and Chemical Positioning in the Evolution of Antibiotic Resistance in TEM beta-Lactamases. *ACS Cent Sci* 7:1996-2008.

- [21] Zheng C, Mao Y, Kozuch J, Atsango AO, Ji Z, Markland TE, Boxer SG (2022) A two-directional vibrational probe reveals different electric field orientations in solution and an enzyme active site. *Nat Chem* 14:891-897.



岩原 淳二 (いわはら・じゅんじ)

1993年 東京大学薬学部製薬化学科 卒業
 1998年 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
 1998年～2002年 University of California Los Angeles 博士研究員
 2002年～2007年 米国National Institutes of Health 研究員
 2007年～2012年 University of Texas Medical Branch, Assistant Professor
 2012年～2017年 University of Texas Medical Branch, Associate Professor
 2017年～ University of Texas Medical Branch, Professor



外山 侑樹 (とやま・ゆうき)

2015年 東京大学大学院薬学系研究科薬科学専攻
 博士後期課程修了 (博士・薬科学)
 2015年～2018年 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム 特別研究職員
 2018年～2019年 東京大学薬学系研究科 特任研究員
 2019年～2022年 トロント大学 博士研究員
 2022年～ 理化学研究所 生命機能科学研究センター 研究員

分子生成 AI による分子設計と分子同定の試み

横浜市立大学 生命医科学研究科

寺山 慧

terayama@yokohama-cu.ac.jp

1. はじめに

近年、深層学習を活用した分子生成・最適化手法が注目を集めており、分子材料設計・創薬などの分野での応用が期待されている。深層ニューラルネットワークを用いた生成モデル^[1, 2]や文字列処理に特化した手法^[3, 4]、拡散モデル^[5]による生成手法などが提案され、バイズ最適化や強化学習^[6]を組み合わせた方法も特定の性質を持つ分子を探索する手段として活用されている。最近では、深層学習を用いずに、進化的アルゴリズムなどの最適化手法を導入する手法^[7, 8]も再評価されつつある。これらの分子生成手法は機械学習・深層学習の進展とともに高度化が進み、非現実的な分子の生成を回避しつつ、より現実的な分子の生成が可能になってきている^[9]。

著者らはこれまで、強化学習を用いた分子生成手法 ChemTS^[10] およびその改良版 ChemTSv2^[11] (以下本稿では一部を除き ChemTS で統一する) を提案し、現実的な分子生成・最適化を目指して様々な手法開発・工夫を行ってきた。ChemTS は、Recurrent Neural Network (RNN)^[12] と呼ばれるある種の生成モデルと、囲碁 AI AlphaGo で有名になった Monte Carlo tree search^[13] と呼ばれる強化学習のアルゴリズムを組み合わせることにより、目標とする物性・特性を満たす分子を生成する手法である。これまでに ChemTS を用いて、色素^[14, 15]、蛍光分子^[16]、エレクトレット^[17]、薬候補分子^[18, 19] 等の設計を試みており、そのうちの一部の合成・検証に成功している。

本稿では、ChemTS の基本的な仕組みを解説し、ChemTS による分子設計と合成例について紹介する。特に、未知分子の NMR スペクトルを探索目標に置くことで、分子の同定に ChemTS を利用することができる。この手法 (NMR-TS²⁰) についても紹介する。

2. ChemTS による分子生成の仕組み

ChemTS による分子生成手法の基本的な仕組みを簡単に紹介する。ChemTS は、SMILES 記法により分子を文字列として表現することで、「望ましい分子の生成問題」を「適切な文字列の生成問題」として扱う。SMILES 文字列を学習・生成するために、RNN^[12] を用いて n 文字 (より正確には SMILES の原子種) 目までの文字列情報から n+1 文字目を予測するモデル^[3] を構築する。RNN の学習は特定の分子データセットに対し行われ、そのデータセットに含まれる分子に類似した分子を生成できるように訓練が行われる。望ましい特性を持った分子を生成するために、図 1 に示すように、訓練した RNN を用いて MCTS に基づく探索を行う。SMILES の文字 (原子種) をノードとして扱い、RNN への入力文字を親ノード、予測された文字を子ノードとすることで探索木を構築していく。探索は、(a) UCB スコア^[13] に基づいて有望な子ノードを再帰的に選択し、次に伸ばす葉ノードを選び、(b) RNN を用いて次の文字を複数予測し子ノードとして追加、(c) RNN を用いて分子を補完して完成させ、評価関数に従って分子を評価、(d) 評価値の情報を探索木に伝搬、という 4 つの手順を繰り返すことで実施される。特に (c) の手順に関して、探索木は分子の断片情報を保持しており、多くの場合断片では分子の良し悪しの評価が難しいため、ある程度の分子の大きさになるまで (設定した終端記号 (ex. Υ n) が出るまで) RNN による補完を行う。MCTS の全体像としては、評価関数によって有望だと判断された方に枝を伸ばして積極的に深く探索を試み、望みが薄い枝はあまり深く探索せずに、効率的な探索を実現している。なお、探索の初期構造は設定可能であり、全くのゼロから、あるいは分子構造と伸長させる部位を指定することで分子の途中から生成が可能である。探索の仕方も調整可能であり、(a) の UCB スコア中の探索パラメータ C を大きく

することで、生成分子の多様性を重視した広く浅い探索が実施される。一方で、Cを小さくすることで有望な分子を狭く深く探索する。アルゴリズムの詳細についてはChemTS^[10]、ChemTSv2^[11]を参照されたい。

ChemTSを用いた分子設計において最も重要なのは、(c) 評価関数のパートである。生成した分子が目的の特性を持っているか否かを正確に推定できれば、MCTSのアルゴリズムに従って、望む分子に漸近していくことができる。この評価については、ルールベースの判定、教師あり学習に基づく予測モデル、量子化学・分子動力学シミュレーションによる特性推定など様々な方法が利用可能である。特に著者らは量子化学シミュレーションに基づいて分子評価を行うために、ChemTSで生成された分子(SMILES文字列)のみから様々な物性を全自動で計算するシステムQCforever^[21]を開発している。QCforeverは、内部でGaussianあるいはGAMESSを呼び出すこと

により図2中に示すような様々な物性を自動的に計算可能である。QCforeverは、整理された物性値データのみを返すため、ChemTSのような分子生成手法との連携に適した実装になっている。ただし、量子化学計算に限らず分子評価のための計算時間が長すぎるとChemTSによる探索が十分に進まない。そのため、推定精度と計算コストのバランスを取る必要がある。また、現実的な分子の設計を試みる際には、複数の項目を同時に考慮すべき状況(多目的最適化)も多いと思われる。以下では、具体的な複数項目の考慮の例についても合わせて説明する。なお、最新版のChemTSv2では後述のDscore^[22]をはじめとした多目的最適化用の関数を各自が簡単に用意できるようになっている^[11]。

3. ChemTS による分子設計例

ChemTSの応用例として、色素、蛍光分子、薬候補分子の設計について紹介する。まず、Sumita

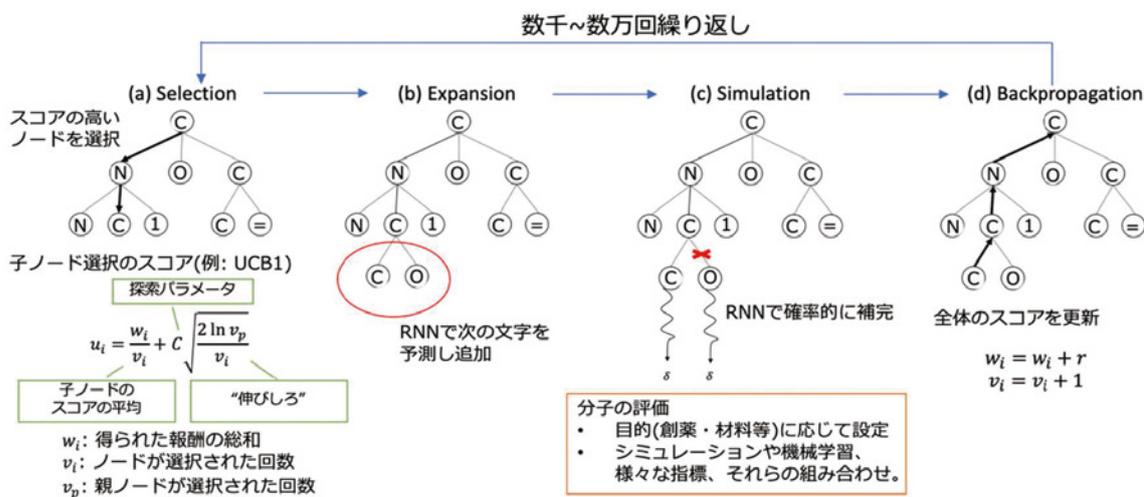


図1 モンテカルロ木探索(MCTS)に基づく分子生成手法ChemTSの模式図。

(a)–(d)を多数繰り返すことで、望みの特性を持つ方向に探索木を成長させつつ、分子を探索する。

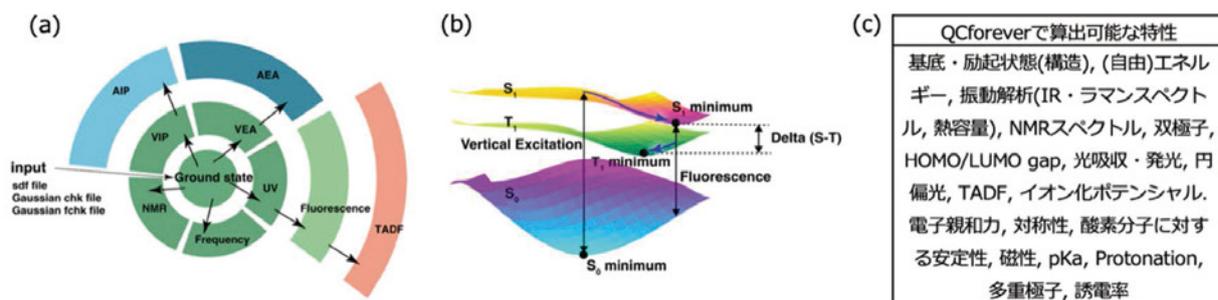


図2 QCforeverによる量子化学計算に基づく分子の特性計算の全体像 (a)。SDF形式やSMILES記法による分子を入力として、様々な物性を統一かつまとめて計算可能。(b) 光物性の計算の模式図。(c) QCforeverで算出可能な特性のリスト。

et al.^[14]では、特定の光の吸収波長を持つ分子(色素)を目標に、比較的小さな分子の生成が実施された。RNNの学習にはPubChemQC^[23]の分子データを利用した。評価関数としては、Time-Dependent Density Functional Theory (TD-DFT)計算による吸収波長の計算値を用いて、目標の波長に近ければ値の大きくなる評価関数が用いられている。TD-DFTの計算にはGaussian 16^[24]を用いており、計算レベルはB3LYP/3-21G*である。これらの条件で分子生成を試みたところ、生成分子が小さいこともあり、他の制約がなくとも目標値に近い分子が生成でき、**図3 (a)**に示すように実際に購入・合成された分子が目標値と近い吸収波長を持つことが確認された。

また、蛍光を発する新規分子の生成・合成も試みられている^[16]。ここでは、ZINCデータベース中の水素・炭素・窒素・酸素のみで構成される分子データセットをRNNで学習させ、DFT計算による光の吸収・蛍光波長および強度を基にスコア関数を定義し、蛍光を持つ分子の生成を行っ

ている。合成可能な分子を生成するために、合成容易性を測る手法Synthetic Accessibility score (SAscore)^[25]が一定値を超えないように評価関数が設定されている。また、DFT計算(B3LYP/3-21G*)に基づく蛍光の評価は計算コストが高いため、ChemTSの探索の並列化が行われている。計1,024コアのCPUを用いた5日間程度の計算により新規蛍光分子を設計し(**図3 (b)**)、実際に合成した結果蛍光分子であることが確認された。

さらに、創薬研究への応用例として、ドッキングシミュレーションを用いた分子設計(SBMolGen)^[18]や選択的阻害剤の設計^[19]も試みられている。SBMolGenでは、創薬ターゲットとなるタンパク質のポケットに対し強く結合すると期待される分子を、ドッキングシミュレーション手法rDock^[26]とChemTSを組み合わせることで探索する。SBMolGenでは、ZINCデータセット^[27]中の約25万個の分子を学習したRNNが用いられており、生成された分子はrDockを用いてドッキングしたのち結合親和性スコアを計算している。スコアを向上させ

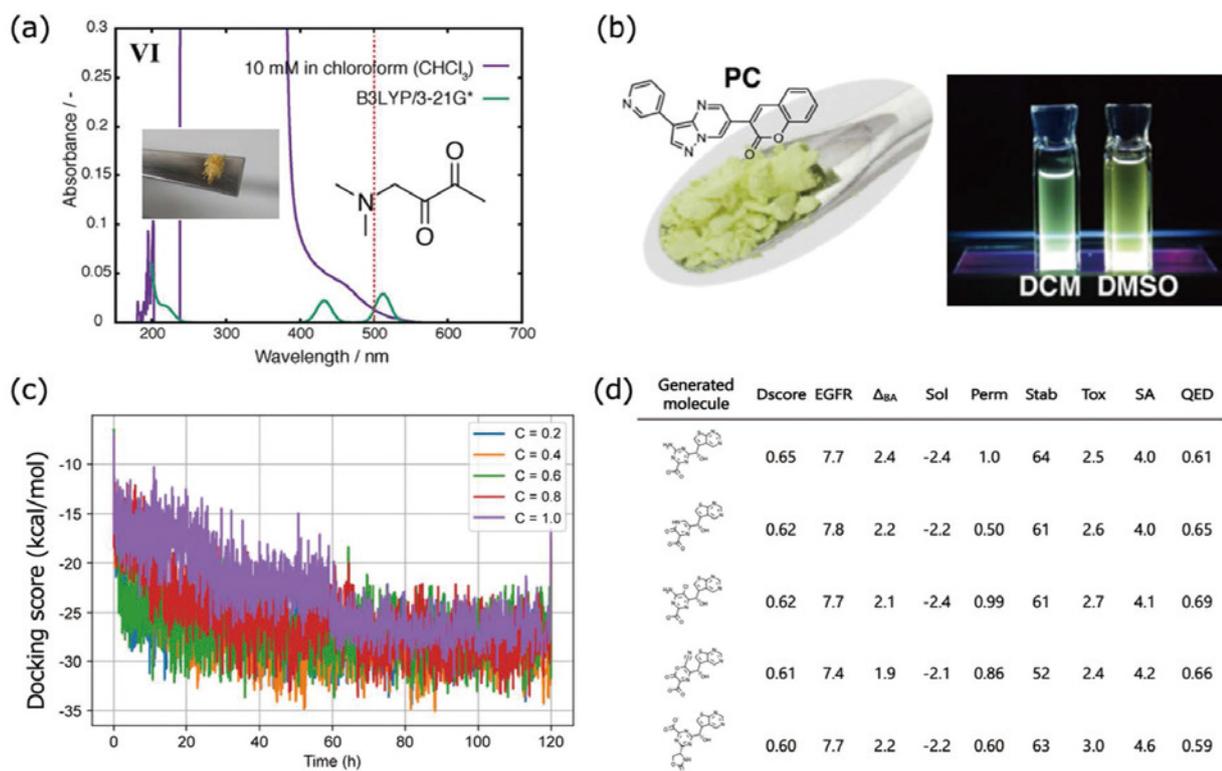


図3 ChemTSによる分子の設計例。(a) ChemTSで探索された500 nm付近で光を吸収(第一励起)する分子。文献^[14]より改変して引用。(b) ChemTSで設計された新規蛍光分子と紫外線下で蛍光を示す様子。文献^[16]より改変して引用。(c) SBMolGenによるcyclin-dependent kinase 2 (CDK2) タンパク質に対する分子生成の様子。時間が経つにつれてdockingスコアの向上(小さいほど強い結合)が見られる。文献^[18]より改変して引用。(d) 選択的阻害剤の設計を行なった例。Dscoreはすべての要素を加味したスコア、標的分子はepidermal growth factor receptor (EGFR)である(数値はpIC50の予測値)。 Δ_{BA} は他のタンパク質との活性予測値の差であり、対数で2つまり100倍程度の差が出ていることを示している。Solは溶解度、Permは膜透過性、Stabは代謝安定性、Toxは経口毒性、SAはSA score、QEDは薬らしさの指標。文献^[19]より引用。

るように分子を探索することで、強い結合能をもつ分子を生成できると期待される。評価関数は、rDockの結合親和性に加えて、創薬でよく用いられる薬らしさの指標であるrule of five、およびSAscoreを考慮して設計されている。生成実験の結果は、図3(c)に示すようにドッキングスコアが順調に向上(低い方が結合親和性が高いことを示す)し、SBMolGenにより活性が期待できる分子の設計が可能であることを示された。

選択的阻害剤を設計するためには、標的タンパク質への活性のみが高く、他のタンパク質に対する活性を抑える必要がある。そのためYoshizawa *et al.*^[19]では、9種類の類似度の高いタンパク質を用意し、一つだけ活性が高くなるような分子の設計が可能か検証した。活性評価については機械学習による予測モデルを利用している。また同時に、創薬上重要な毒性や合成可能性等の特性も機械学習を用いて評価し、全部で18項目の同時最適化を試みた。目的関数としては、全ての項目を一定程度満たすように、各項目の重み付き積Dscore^[22]を設定した。その結果、ターゲットタンパク質の活性予測値のみを向上させ、創薬上重要な特性も許容可能な範囲に収まる分子の設計に成功した(図3(d))。ただし、活性やその他の特性についてはあくまで機械学習による予測値であり、実験による検証が望まれる。

4. NMR-TS: 分子生成モデルによる分子同定の試み

NMRスペクトルによる分子の同定は、最も基本的かつ有用なNMRの活用法である。現状では、分子の同定には専門家の知識と判断が欠かせないが、機械学習・AIを活用して自動的に分子の同定が可能になれば省力化・客観性の担保につながると期待される。そこで、ChemTSの枠組みを用いて自動的に分子の同定を行う手法NMR-TSの開発と検証を行った。

NMR-TSの枠組みを説明する。図4にNMR-TSの全体像を示す。まず、NMR-TSは与えられた未知分子の¹Hスペクトルの情報に対し、全く同じ¹Hスペクトルを持つ分子を生成することで分子の同定を試みる。なお、この研究で用いられるスペクトルはすべてDFT計算に基づく計算値である。NMR-TSは、生成した分子に対してDFT計算に基づきスペクトルを計算し、未知分子のスペクトルとの類似度を算出する。ここで、NMRのシグナルは分裂したり、多少のノイズが乗ることが想定されるため、ロバストな類似度評価が求められる。そこで本研究では、スペクトルの分布を「山」と見立て、「山の土」を移動させて別の「山」に一致させるための最短コストを計算するWasserstein distance^[28](最適輸送距離とも呼ばれる)を導入した。この距離指標を用いること

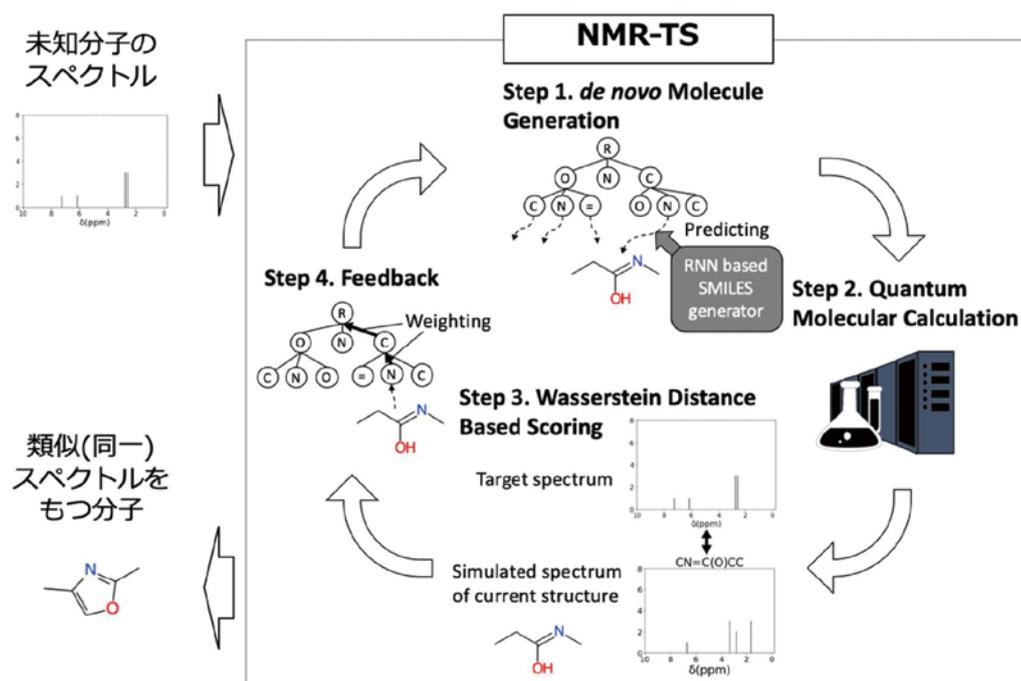


図4 NMR-TSによる未知分子の同定の全体像。未知分子の¹Hスペクトルを入力とし、スペクトルの類似した分子の生成を行うことで分子の同定を試みる。Zhang *et al.*^[20]の図1を改変して引用。

で多少のノイズやブロードニングの違いを吸収できると期待される。しかし実際には Wasserstein distance のみでは十分に類似した分子の生成は難しかったため、さらに炭素と水素の数を考慮した以下の Wasserstein Score (WS) を定義した。

$$WS(M_g, M_t) = 1 - \tanh(WD(M_g, M_t) + \alpha \text{Penalty}(M_g, M_t)) \quad (1)$$

$$\text{Penalty}(M_g, M_t) = |C(M_g) - C(M_t)| + |H(M_g) - H(M_t)| \quad (2)$$

ここで、 M_g と M_t は未知分子と生成した分子、 WD は Wasserstein distance を表す。 $C(M)$ と $H(M)$ は分子 M のもつ炭素と水素原子の数をそれぞれ示しており、個数のズレを表すペナルティ項 (Penalty) の強度を調整するためにパラメータ α が用意されている。本研究では $\alpha = 0.5$ に固定した。なお、炭素と水素原子の数は質量分析など他

の解析から得られることを想定し、ペナルティ項で考慮した。WS は 0 から 1 の値を取り、1 に近いほど類似していることを示す。NMR-TS では WS が 1 に近くなるように分子の生成を行うことで分子の同定を試みる。

手法の有効性を確認するために、水素・炭素・窒素・酸素のみからなる比較的小さな 9 つの分子の同定が可能か検証した。RNN モデルの学習には、PubChemQC データベースから入手した 9,766 個の分子を用いている。図 5 に 9 つのテスト用分子に対して同定を試みた結果を示す。ここでは、初期構造は与えずに探索を実施した。探索の条件によって結果は異なるが、最も良い条件では 9 個中 6 つの分子の同定に成功した。

ここまでの説明で明らかのように、NMR-TS には様々な限界がある。まずスペクトル情報はすべて計算値であり、実際に実験データで利用するためには実測値とすり合わせる必要がある。実測値

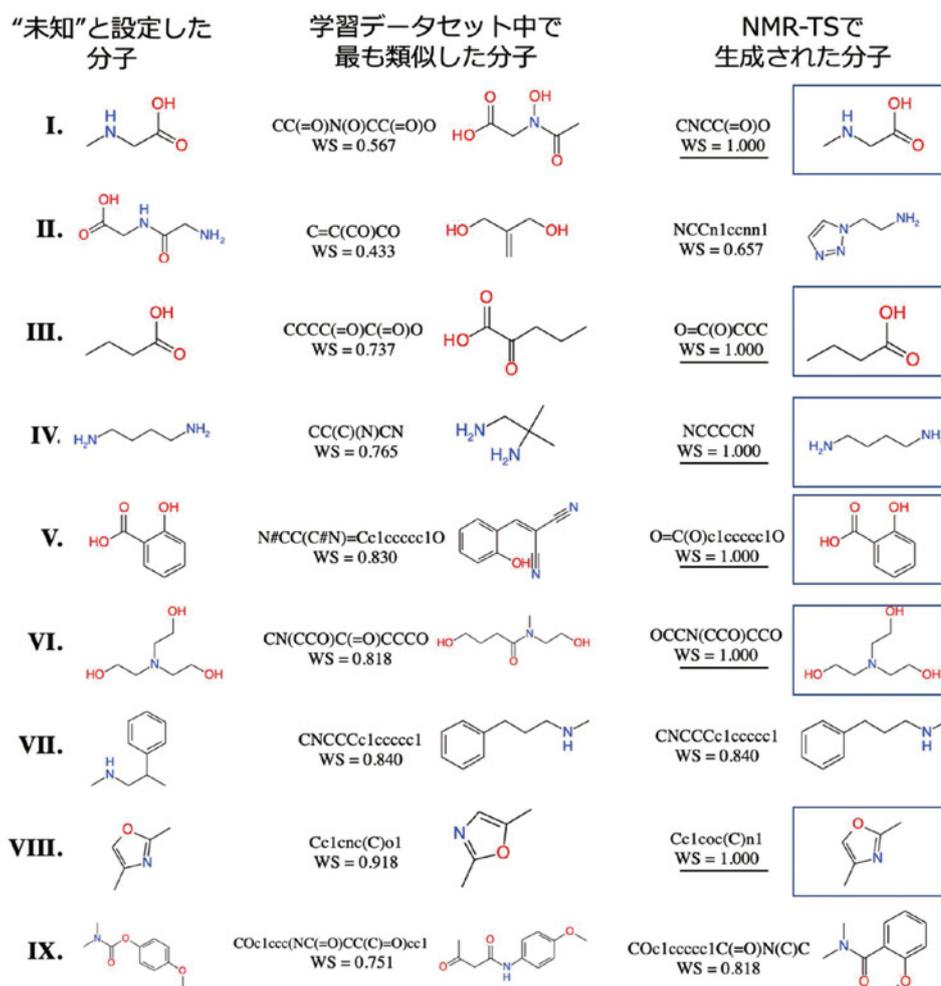


図 5 NMR-TS による検証例。左列に未知と設定した分子、真ん中の列に学習データセット (未知と設定した分子は含まない)、右列に NMR-TS で生成された最も WS が高い分子を示す。四角で囲った分子は分子の同定に成功している。Zhang *et al.*^[20] の図 4 を改変して引用。

であっても、Wasserstein distanceによる類似度評価自体は有効であると期待されるが、検証は必要である。また、この研究でテストした分子でも同定に失敗することはあり、窒素や酸素等他の元素の数の情報やペナルティ項内の重み付けの調整など手法の改善が求められる。ここでは¹Hスペクトルのみで探索を実施しているが、他のスペクトル情報を取り込むことで探索精度を向上させられる可能性もある。さらに、量子化学計算のコストも無視できない。このように様々な課題はあるものの、分子生成手法による分子同定という方法論自体は検証できたと考えられる。

5. 終わりに

分子生成モデルを用いて分子の同定を試みるアプローチはNMR-TS以降にも報告されている。例えば、NMR-TSでは量子化学計算に基づくスペクトルの計算で生成した分子の類似度を判断していたが、Sridharan *et al.*^[29]ではグラフニューラルネットワークを用いてNMRスペクトルの類似度評価を行なっている。重原子が10個以下の分子に対して、上位3つの候補中に約80%の確率で正しい分子構造を生成できるとしている。ほかにも、スペクトルデータと分子式から分子構造を直接推定するニューラルネットワークモデル(CMGNet³⁰)、混合物のNMRスペクトルに対し分子の同定を行う深層学習ベースの手法^[31]も提案されている。今後も分子生成手法や深層学習を用いたNMRデータへのアプローチは発展していくものと期待される。

最後に、ChemTS (特に最新版のChemTSv2)のコードについてはgithubで公開しており、本稿で解説した分子生成・同定のための評価関数についても公開している。またQCforeverもgithubで公開しており、ChemTSに限らず分子の物性計算に利用可能である。ご興味を持たれた方は分子設計や同定を試していただければ幸いです。

謝辞

本稿を執筆する機会を設けて頂いた理化学研究所の菊地淳チームリーダーと、本稿で紹介した研究の共著者の皆様にこの場を借りて感謝申し上げます。また、本原稿を査読頂いた旭化成株式会社の橋本康博様には多数の有益なコメントをいただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

引用文献

- [1] Gómez-Bombarelli, R. *et al.* Automatic chemical design using a data-driven continuous representation of molecules. *ACS Cent. Sci.* **4**, 268–276 (2018).
- [2] Jin, W., Barzilay, R. & Jaakkola, T. Junction tree variational autoencoder for molecular graph generation. in *Proceedings of the 35th International Conference on Machine Learning* 2323–2332 (2018).
- [3] Segler, M. H. S. *et al.* Focused Molecule Libraries for Drug Discovery with Recurrent Neural Networks. *ACS Cent. Sci.* **4**, 120–131 (2018).
- [4] Dollar, O. *et al.* Attention-based generative models for de novo molecular design. *Chem. Sci.* **12**, 8362–8372 (2021).
- [5] Hoogeboom, E. *et al.* Equivariant Diffusion for Molecule Generation in 3D. in *Proceedings of the 39th International Conference on Machine Learning*, 8867–8887 (2022).
- [6] Olivecrona, M. *et al.* Molecular de-novo design through deep reinforcement learning. *Journal of Cheminformatics* **9**, 48 (2017).
- [7] Jensen, J. H. A Graph-based genetic algorithm and generative model/Monte Carlo tree search for the exploration of chemical space. *Chem. Sci.* **10**, 3567–3572 (2019).
- [8] Nigam, A., Pollice, R. & Aspuru-Guzik, A. Parallel tempered genetic algorithm guided by deep neural networks for inverse molecular design. *Digit. Discov.* **1**, 390–404 (2022).
- [9] Rasmussen, M. H., Seumer, J. & Jensen, J. H. Toward De Novo Catalyst Discovery: Fast Identification of New Catalyst Candidates for Alcohol-Mediated Morita–Baylis–Hillman Reactions. *Angew Chem. Int. Ed.* **62**, e202310580 (2023).
- [10] Yang, X. *et al.* ChemTS: an efficient python library for de novo molecular generation. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **18**, 972–976 (2017).
- [11] Ishida, S. *et al.* ChemTSv2: Functional molecular design using de novo molecule generator. *WIRES Comput. Mol. Sci.* **13**, e1680 (2023).
- [12] Cho, K. *et al.* Learning Phrase Representations using RNN Encoder–Decoder for Statistical Machine Translation. in *Proceedings of the 2014 Conference on Empirical Methods in Natural Language Processing* 1724–1734 (2014).
- [13] Browne, C. B. *et al.* A survey of monte carlo tree search methods. *IEEE T. Comp. Intel. AI.* **4**, 1–43 (2012).
- [14] Sumita, M. *et al.* Hunting for Organic Molecules with Artificial Intelligence: Molecules Optimized for Desired Excitation Energies. *ACS Central Science* **4**, 1126–1133 (2018).
- [15] Fujita, T. *et al.* Understanding the evolution of a de novo molecule generator via characteristic functional group monitoring. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **23**, 352–360 (2022).
- [16] Sumita, M. *et al.* De novo creation of a naked eye-detectable fluorescent molecule based on quantum chemical computation and machine learning. *Sci. Adv.* **8**, eabj3906 (2022).
- [17] Zhang, Y. *et al.* Discovery of polymer electret material via de novo molecule generation and functional group enrichment analysis. *Appl. Phys. Lett.* **118**, (2021).
- [18] Ma, B. *et al.* Structure-Based de Novo Molecular Generator Combined with Artificial Intelligence

- and Docking Simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **61**, 3304–3313 (2021).
- [19] Yoshizawa, T. *et al.* Selective Inhibitor Design for Kinase Homologs Using Multiobjective Monte Carlo Tree Search. *J. Chem. Inf. Model.* **62**, 5351–5360 (2022).
- [20] Zhang, J. *et al.* NMR-TS: de novo molecule identification from NMR spectra. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **21**, 552–561 (2020).
- [21] Sumita, M. *et al.* QCforever: A Quantum Chemistry Wrapper for Everyone to Use in Black-Box Optimization. *J. Chem. Inf. Model.* **62**, 4427–4434 (2022).
- [22] Cummins, D. J. & Bell, M. A. Integrating Everything: The Molecule Selection Toolkit, a System for Compound Prioritization in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **59**, 6999–7010 (2016).
- [23] Nakata, M. & Shimazaki, T. PubChemQC project: a large-scale first-principles electronic structure database for data-driven chemistry. *J. Chem. Inf. Model.* **57**, 1300–1308 (2017).
- [24] Frisch, M. J. *et al.* *Gaussian 16 (Revision A)*. (Gaussian, Inc., 2016).
- [25] Ertl, P. & Schuffenhauer, A. Estimation of synthetic accessibility score of drug-like molecules based on molecular complexity and fragment contributions. *J. Cheminform.* **1**, 8 (2009).
- [26] Ruiz-Carmona, S. *et al.* rDock: A Fast, Versatile and Open Source Program for Docking Ligands to Proteins and Nucleic Acids. *PLoS Comput. Biol.* **10**, e1003571 (2014).
- [27] Irwin, J. J. *et al.* ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 1757–1768 (2012).
- [28] Villani, C. *et al.* *Optimal transport: old and new*. vol. 338 (Springer, 2009).
- [29] Sridharan, B. *et al.* Deep Reinforcement Learning for Molecular Inverse Problem of Nuclear Magnetic Resonance Spectra to Molecular Structure. *J. Phys. Chem. Lett.* **13**, 4924–4933 (2022).
- [30] Yao, L. *et al.* Conditional Molecular Generation Net Enables Automated Structure Elucidation Based on ¹³C NMR Spectra and Prior Knowledge. *Anal. Chem.* **95**, 5393–5401 (2023).
- [31] Wei, W. *et al.* Deep Learning-Based Method for Compound Identification in NMR Spectra of Mixtures. *Molecules* **27**, (2022).



寺山 慧 (てらやま・けい)

2011年3月 京都大学総合人間学部卒業
 2013年3月 京都大学大学院人間・環境学研究科修士課程修了
 2016年3月 京都大学大学院人間・環境学研究科にて博士(人間・環境学)取得
 2016年4月 東京大学大学院新領域創成科学研究科特任研究員
 2018年4月 理化学研究所革新知能統合研究センター特別研究員および京都大学大学院医学研究科特定助教
 2020年4月 横浜市立大学 大学院生命医科学研究科 准教授

光励起三重項を用いた生体分子の核スピン高偏極化

九州大学大学院工学研究院

濱地 智之、楊井 伸浩

yanai@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

1. はじめに

動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization ; DNP) は電子スピンの偏極状態をマイクロ波照射によって核スピンへ移行し、高感度なNMR、MRIを実現する手法である。DNPは1953年にOverhauserによって金属中の伝導電子をマイクロ波で飽和させることで核スピンを偏極することができるという理論提唱された後^[1]、CarverとSlichterらによって実験的に実証された^[2]。その後、固体高分解能測定用のMASと組み合わせたMAS-DNP^[3]や、偏極した固体サンプルを素早く溶解して高感度な溶液NMRを測定するDissolution-DNP^[4]の開発によりその応用範囲が拡大してきた。しかし、DNPでは熱平衡状態の電子スピン偏極を用いるため、偏極増大倍率の最大値は磁気回転比の比によって制限される ($\gamma_e/\gamma_H \sim 660$ 、 $\gamma_e/\gamma_C \sim 2640$)。したがって、実用的に必要な核スピン偏極率 (数%～数十%) を得るためには電子スピン偏極率がほぼ100%に達する高磁場・極低温条件が必要になる。

それに対して、電子スピンとして特に光励起三重項電子スピンを用いるDNP (triplet-DNP) は、非平衡状態の電子スピン偏極率を利用するため、低磁場・室温で核スピン偏極状態を実現できる^[5-9]。例えば、*p*-ターフェニル中にドーブされたペンタセンは光励起によって最低励起一重項状態を生成した後、スピン選択的な系間交差、内部転換を経てスピン副準位が偏極した最低励起三重項状態を生成する。この偏極率は磁場中で73%という高い値をもつ^[10]。1980年にDeimlingらにより、マイクロ波を用いた三重項電子スピンから核スピンへの偏極移行が初めて報告され^[5]、1990年にWenckebachらによって熱平衡状態電子スピンを用いた場合の理論限界 (660倍) を超える5,500倍の増感倍率が達成された^[6]。その後、2000年に飯沼らがペンタセンをドーブしたナフタレン単結晶を用いて0.3T、77Kで 8×10^4 倍の増感

倍率 (^1H スピン偏極率 $\sim 32\%$) を報告した^[11]。また、2004年には武田らによって、ペンタセンをドーブしたナフタレン単結晶を用いて0.3T、105Kでペンタセンの三重項偏極率73%に迫る70%の ^1H スピン偏極率が達成された^[12,13]。さらに、立石らによりペンタセンをドーブした*p*-ターフェニル単結晶を用いて室温、0.3Tで34%の ^1H スピン偏極率が達成された^[8]。近年ではtriplet-DNPの実用化に向けた研究が精力的に行われており、根来らはDissolution triplet-DNPを開発し^[14,15]、高感度な溶液NMRによってサリチル酸とタンパク質の結合を観測することに成功した^[16]。

しかし、triplet-DNPによって偏極移行が可能な対象物質の多くは、疎水的な偏極源であるペンタセンと相溶性のよい芳香族分子に限られている。Triplet-DNPの応用範囲をさらに拡大するためには、高感度MRIに重要な水やピルビン酸といった親水性生体分子の偏極を可能にすることが望まれている。当グループでは、新規な偏極源材料の開発を通じて疎水的な偏極源から水や親水性生体分子への偏極移行に取り組んできた。本解説では、triplet-DNPの原理に触れながら、水やピルビン酸のNMR増感について当グループの研究を中心に紹介する。

2. Triplet-DNP による核スピン偏極

Triplet-DNPは、パルスレーザーによって最低励起三重項状態の電子スピン偏極を生成した後、磁場を掃引しながらマイクロ波を照射するというIntegrated Solid Effect (ISE) シーケンスによって核スピンへと偏極が移行される^[17,18] (図1A)。静磁場 B_0 において電子スピンと核スピンはそれぞれ $\omega_{e0} = -\gamma_e B_0$ 、 $\omega_{I0} = -\gamma_I B_0$ のラーモア歳差周波数をもつ。パワー B_1 、周波数 ω_{mw} のマイクロ波を照射するとき、 ω_{mw} で回転する回転座標系において電子スピンは減衰した実行磁場 (式1) の周りに $\omega_{\text{eff}} = -\gamma_e B_{\text{eff}}$ の周波数で歳差運動する^[6]。

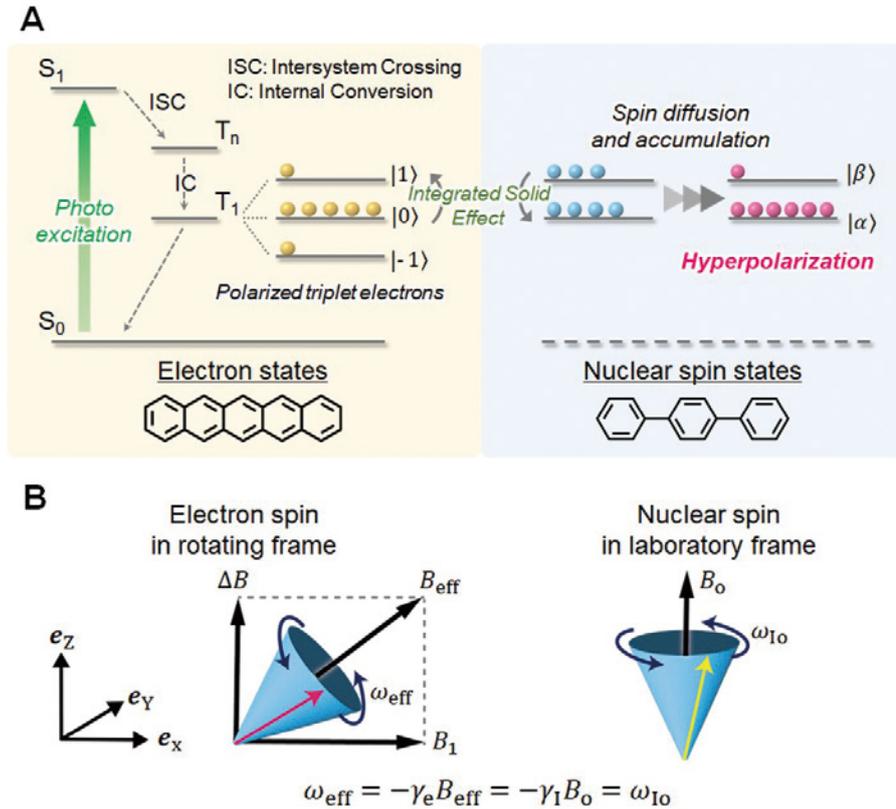


図1 Triplet-DNPによる核スピンの高偏極化。(A) Triplet-DNPのスキーム。
(B) 電子スピンと核スピンの歳差周波数のマッチング。

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \sqrt{2}B_1\mathbf{e}_x + \Delta B\mathbf{e}_z \quad (1)$$

B_1 の係数 $\sqrt{2}$ は、スピン量子数 S 、磁気的スピン量子数 m_s の $m_s \rightarrow m_s'$ 遷移におけるラビ周波数の係数に由来する(式2)。

$$\langle m_{S'} | S_+ | m_S \rangle = \sqrt{S(S+1) - m_{S'}m_S} \quad (2)$$

適切なマイクロ波のパワーと周波数を選ぶことで、回転座標系における電子スピンと実験室座標系における核スピンの歳差周波数を合わせることができ、偏極を交換することができる(式3、図1B)。

$$\omega_{\text{eff}} = -\gamma_e B_{\text{eff}} = -\gamma_I B_0 = \omega_{I0} \quad (3)$$

光励起三重項電子スピンのESRスペクトルは超微細相互作用と磁場に対する異なる分子配向によってブロード化するため、一度にすべての電子スピンパケットに対して(式3)を満たすことができず、偏極移行効率が悪い。そこでISEシーケンスでは、できるだけ多くの電子スピンを偏極移行に利用するためにマイクロ波照射と同時に磁場を掃引する。磁場掃引は、電子スピンの \mathbf{B}_{eff} に追従できるように ω_{eff} よりも十分に遅くする必要がある(断熱条件)。したがって、光励起三重項電子

スピンの偏極寿命は2-3 μs 以上であることが望ましい。

電子スピンから核スピンへ偏極が移行された後、偏極状態は核スピン間にはたらく双極子相互作用のフリップフロップ項を通じて固体全体に拡散する。ISEシーケンスによる偏極移行と核スピン間のスピン拡散を繰り返すことで、核スピンの偏極した固体を得ることができる。スピン拡散速度が十分に早く、ISEシーケンス間に核スピン偏極が固体全体で平均化される場合、核スピン偏極の時間発展はISEシーケンスの繰り返し周波数によって決まる。核スピンのスピン格子緩和時間 T_1 が無視できない場合、ISEシーケンスを繰り返すうちに核スピンの偏極蓄積と偏極緩和が平衡に達する。ISEシーケンスによる ^1H 核スピン偏極率 $P(t)$ の時間発展は次のように記述される(式4)。

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}P(t) &= \frac{1}{T_b}[P_e - P(t)] - \frac{1}{T_1'}[P(t) - P_{\text{th}}] \\ &\sim \frac{1}{T_b}[P_e - P(t)] - \frac{1}{T_1'}P(t) \quad (4) \\ T_b &= \frac{\rho_H}{R\eta\xi\rho_e} \frac{1}{T_1'} = \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_{1\text{laser}}} \end{aligned}$$

ここで、 T_b はビルドアップ時定数で、 ρ_H 、 ρ_e

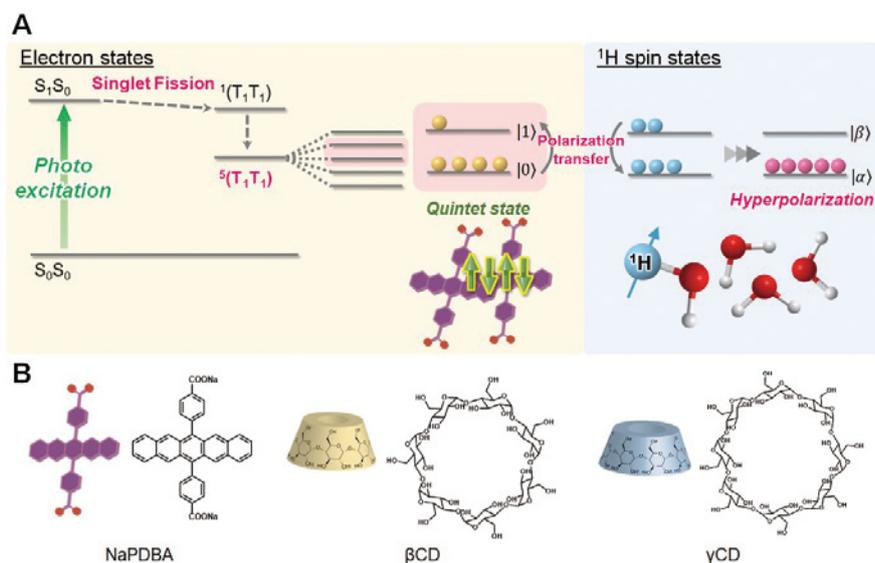


図2 SFによるスピン偏極五重項状態を用いた水分子の高核偏極化。(A) NaPDBA ダイマーのSFによって生成した五重項状態のスピン偏極が水分子の ^1H 核スピンへ移行される模式図。(B) NaPDBA, β CD, γ CDの構造式。

はそれぞれ ^1H 核スピンと電子スピンの密度、 R はISEシーケンスの繰り返し周波数、 η は偏極移行に用いられる電子スピンの割合、 ξ は偏極移行効率である。また、 T_1' は三重項電子スピンによる ^1H 核スピンの常磁性緩和を考慮したスピン-格子緩和時間で、 T_1 , $T_{1\text{laser}}$ はそれぞれレーザー照射なし、ありにおける ^1H 核スピンのスピン-格子緩和時間である。 P_e , P_{th} はそれぞれ電子スピンの偏極率、 ^1H 核スピンの熱平衡状態における偏極率である。 P_{th} は十分に小さいため、微分方程式の解は次のように記述される(式5)。

$$P(t) = \frac{P_e}{1 + \frac{T_b}{T_1'}} \left[1 - \exp \left\{ - \left(\frac{1}{T_1'} + \frac{1}{T_b} \right) t \right\} \right] \quad (5)$$

よって、最終偏極率は

$$P_{\text{fin}} = \frac{P_e}{1 + \frac{T_b}{T_1'}} \quad (6)$$

で表され、高い核スピン偏極率を達成するためには長い T_1 を有するマトリックスを用いることが望ましい。

3. Singlet Fission によって生じる偏極電子スピンを用いた水分子の偏極

Singlet Fission (SF) は分子性材料において1つの一重項励起子から2つの三重項励起子を生成する光変換プロセスである^[19]。また、SFの過程で形成される2つの三重項励起子ペアは $^1(\text{TT})$ 、 $^3(\text{TT})$ 、 $^5(\text{TT})$ というスピン相関状態をとる。こ

のようなSFの特徴のうち、これまでは「多重励起子生成」という点が注目され、SFの応用先としては光エネルギー収支の向上による太陽光発電の高効率化が主流であった。一方で、「三重項ペアのスピン相関状態」という量子状態を応用する研究は十分に探索されてこなかった。

そこで我々のグループでは、SF過程で生じる三重項電子スピンペアのうち最大の多重度である五重項状態のスピン偏極を用い、水分子中の ^1H 核スピンのDNPに成功した^[20](図2A)。五重項状態は「色素間配向」と「色素ペアと磁場間の配向」を制御することで $^5(\text{TT})_0$ 状態に100%偏極した状態を形成でき^[21]、ペンタセンモノマーの三重項電子スピン偏極率(74%)を上回るため、DNP効率の改善が期待される。また、五重項状態の $^5(\text{TT})_0 \rightarrow ^5(\text{TT})_{\pm 1}$ 遷移のラビ周波数は三重項状態の $T_0 \rightarrow T_{\pm 1}$ 遷移よりも $\sqrt{3}$ 倍高いため、より弱いマイクロ波パワーで核スピン偏極を実現することができる^[22](式2)。

SFを起こすためには2分子以上の分子集合が必要であるが、分子がマクロスコピックに凝集すると電子偏極を水分子へと移行することができない。そこで本研究では水溶性ペンタセン誘導体 sodium 4,4'-(pentacene-6,13-diyl) dibenzoate (NaPDBA)(図2B)を用い、水-グリセロール混合溶媒中におけるシクロデキストリンとの超分子相互作用により、NaPDBAの集合状態を系統的に制御した。超高速ポンププローブ過渡吸収

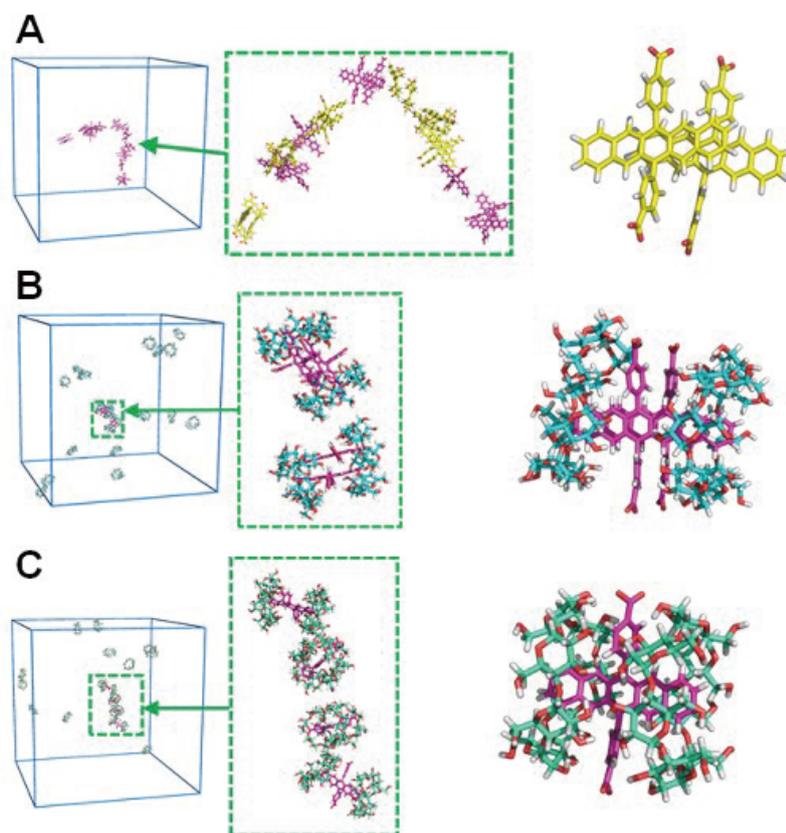


図3 水-グリセロール混合溶媒中におけるMDシミュレーション ((A) NaPDBA、(B) NaPDBA- β CD、(C) NaPDBA- γ CD)。

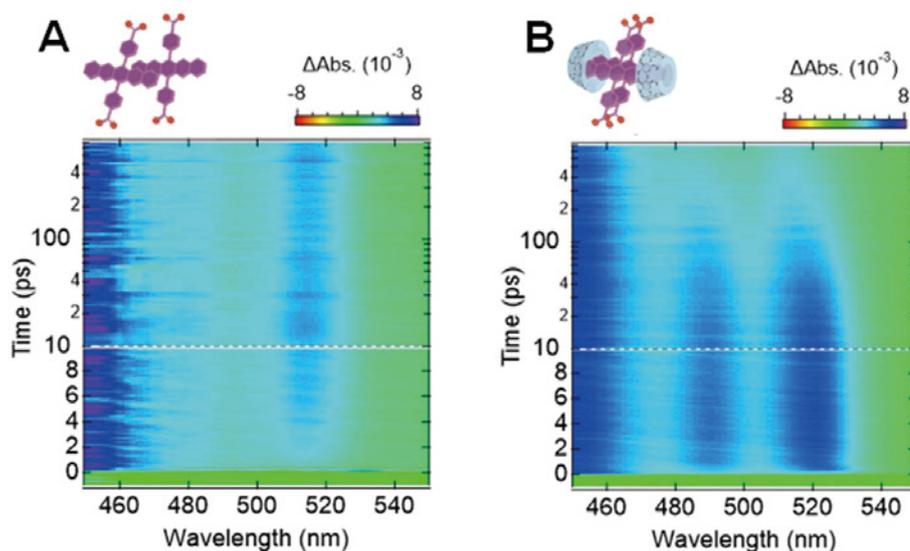


図4 フェムト秒ポンププローブTASによって得られた2次元プロット ((A) NaPDBA、(B) NaPDBA- γ CD)。

(Transient Absorption Spectroscopy ; TAS) と時間分解EPR (TrEPR) により、SF過程とスピン偏極した五重項状態の生成が確認された。さらに、DNP効率の磁場依存性とマイクロ波パワー依存性から、五重項状態のスピン偏極が水分子中 ^1H 核スピンへ移行されたことを確認した。

まず、MDシミュレーションや吸収スペクトル、NMR測定により、水-グリセロール混合溶媒 ($v/v=5/5$) 中におけるNaPDBAの分子集合状態を評価した。図3はそれぞれNaPDBAのみ、NaPDBA : β -cyclodextrin (β CD)=1 : 5、NaPDBA : γ -cyclodextrin (γ CD)=1 : 5を水-グ

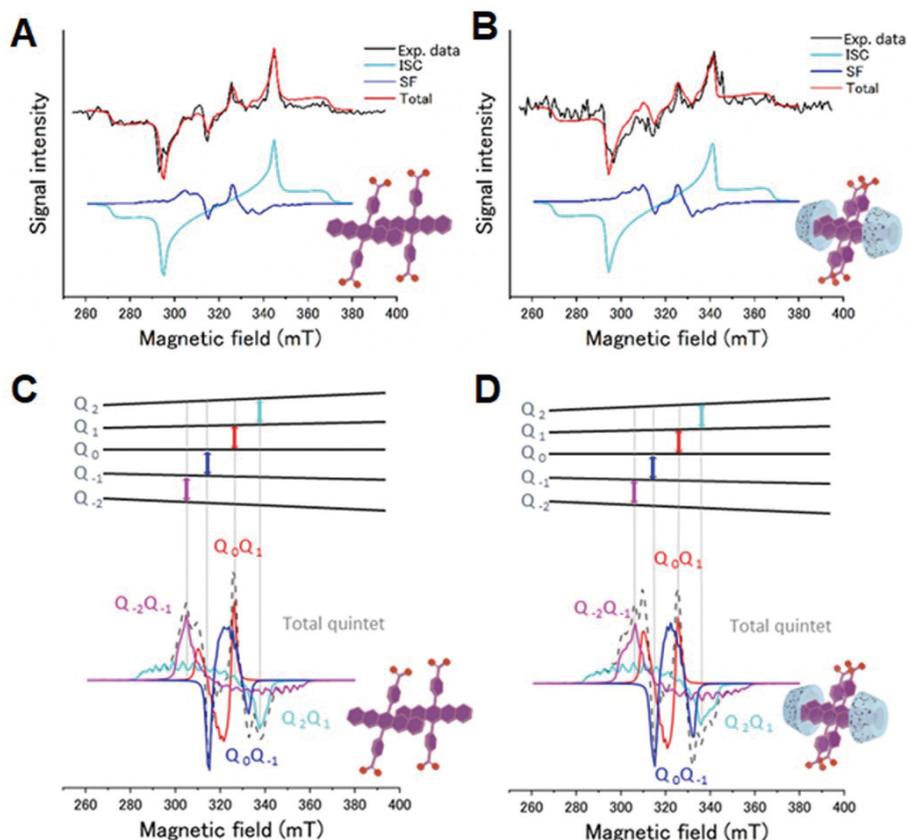


図5 (A), (B) 時間分解ESRスペクトル ((A) NaPDBA、(B) NaPDBA- γ CD)。(C), (D) スペクトルシミュレーション ((C) NaPDBA、(D) NaPDBA- γ CD)。

リセロール中に配置したときのMDシミュレーションである。NaPDBAのみでは複数のNaPDBAダイマーと少数のモノマー、NaPDBA- β CDでは1:2の超分子構造、NaPDBA- γ CDでは2:2の超分子構造が形成されることが分かった。

次に、フェムト秒ポンププローブTASによりSF過程を確認した。図4はそれぞれ143 KにおけるNaPDBAのみとNaPDBA- γ CDのTASである。NaPDBAダイマーを形成しているNaPDBAのみのサンプルとNaPDBA- γ CDのサンプルでは、 \sim psオーダーでペンタセンの $T_1 \rightarrow T_n$ 遷移が出現し、これはSF過程における高速な $S_1S_0 \rightarrow {}^1(TT)$ 過程を反映している^[23]。一方で、NaPDBA- β CDのサンプルではそのような吸収がほとんど観測されなかった。

さらに、TrEPR測定によってスピン偏極した五重項状態を確認した(図5)。図5A, Bはそれぞれ143 KにおけるNaPDBAのみとNaPDBA- γ CDのTrEPRスペクトルである。シミュレーションの結果、 ${}^5(TT)_0$ に偏極したスピン状態が形成されていることが確認された(図5C, D)。一方で、NaPDBA- β CDでは五重項に基づくシグナルは得られなかった。TASとTrEPR測定の結果、

NaPDBAのみとNaPDBA- γ CDがSF過程によって偏極した五重項を形成していることが明らかになり、これはNaPDBAのみとNaPDBA- γ CDが安定なペンタセンダイマーを形成するというMDシミュレーションの結果とよく合致している。

最後に、 ${}^5(TT)_0$ に偏極した五重項状態を用いて0.63 T, 100 Kの条件下で水分子中 1H 核スピンのDNPを行った(図6)。NaPDBAのみでは熱平衡状態に対して20倍(偏極率0.01%)、NaPDBA- γ CDでは6.5倍(偏極率0.004%)の 1H -NMRシグナル増感が得られた(図6A, B)。DNP効率の磁場プロファイルにより、 1H -NMRシグナルの増強は五重項の ${}^5(TT)_0 \rightarrow {}^5(TT)_{\pm 1}$ 遷移に由来することが確認された(図6C, D)。また、磁場を ${}^5(TT)_0 \rightarrow {}^5(TT)_1$ 遷移に合わせてDNP効率のマイクロ波パワー依存をプロットしたところ、最適なマイクロ波パワーは $T_0 \rightarrow T_1$ 遷移の場合よりも $1/\sqrt{3}$ 倍に減少した(図6E)。これらの結果から、五重項状態の偏極した電子スピンを用いたDNPを実証した。

4. 超分子化学を利用した

ピルビン酸 ${}^{13}C$ 核スピンの高偏極化

DNPにおいて最も重要な生体分子プローブは

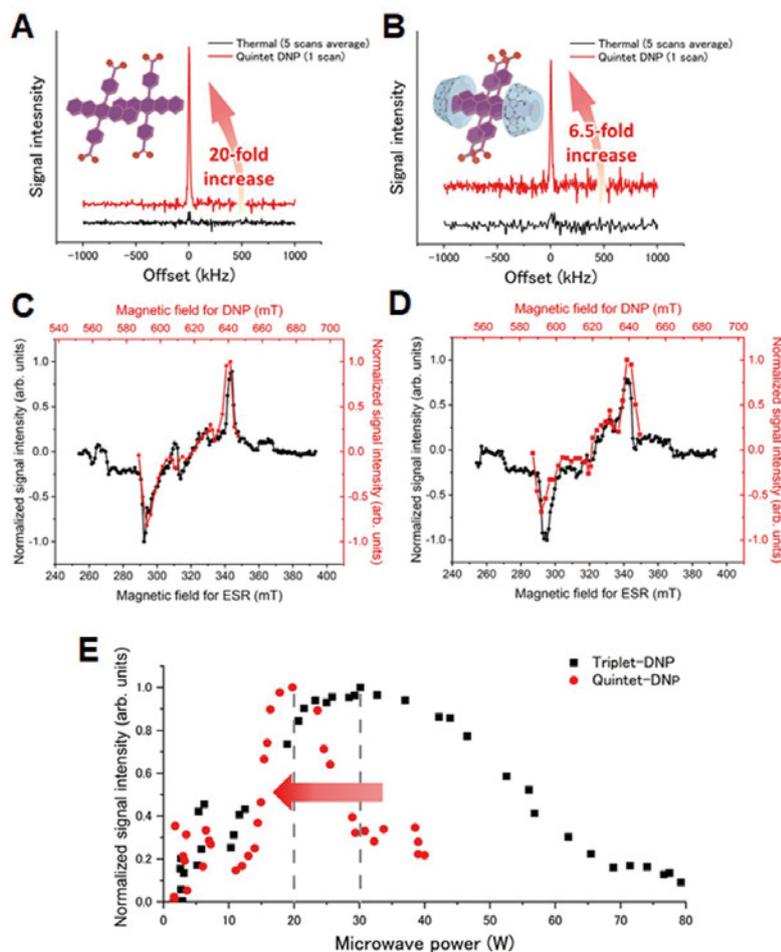


図6 (A), (B) 偏極した五重項を用いたDNP後(赤線)と熱平衡状態(黒線)における ^1H -NMRスペクトル((A) NaPDBA、(B) NaPDBA- γ CD)。(C), (D) DNP後に得られたシグナル強度の磁場依存(赤線)と対応するESRスペクトル(黒線)((C) NaPDBA、(D) NaPDBA- γ CD)。(E) DNPによるシグナル増強のマイクロ波パワー依存。

ピルビン酸である。ピルビン酸は生体内代謝の中心に位置し、その代謝速度は様々な疾患に関連しているため、ピルビン酸の代謝を追跡することで生体内の病状解析が可能である^[24]。特に、Dissolution-DNPではすでに超偏極 [^{13}C] ピルビン酸を用いた生体内の ^{13}C -MRIに成功しており、ピルビン酸→乳酸の代謝速度を解析することでがんの部位を特定するといった治験が世界中で行われている^[25]。しかし、Dissolution-DNPは高磁場・極低温といった過酷な実験条件を必要とすることから、装置が高価かつ煩雑なものとなり、汎用的に用いられるためには大きな課題がある。

Triplet-DNPは低磁場・高温条件で核偏極が可能のため、低コストで超偏極 [^{13}C] ピルビン酸を用いた ^{13}C -MRIを提供することが可能となると期待される。しかし、これまでtriplet-DNPによる ^{13}C 核スピンの高偏極化は

-ターフェニルや芳香族カルボン酸といった芳香族分子に限られていた^[8,26]。これはtriplet-DNPの偏極源であるペンタセンは極めて疎水的であり、ペンタセンを分散

可能なマトリックスは疎水的な分子に限られるためである。そのため、親水的な生体分子プローブであるピルビン酸中に疎水的なペンタセンを分散させることは困難であり、triplet-DNPによる [^{13}C] ピルビン酸の高偏極化は達成されていなかった。

そこで我々のグループは偏極源とピルビン酸の相溶性を向上させるため、水溶性偏極源 NaPDBAと β CDの超分子形成に着目した。超偏極 [^{13}C] ピルビン酸は生体内投与によって希釈されるため、dissolution-DNPでは高濃度の [^{13}C] ピルビン酸を一度に偏極する必要がある^[24]。水溶性偏極源であるNaPDBAを用いたとしても、一般的に用いられるマトリックスであるDNP juice ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}/\text{Glycerol-}d_8 = 1/3/6, \text{v/v/v}$)^[24]において1.5Mという高濃度なピルビン酸ナトリウム (NaPyr) が共存している場合、凝集してしまう。しかし、DNP juice中でNaPDBAが β CDと1:2の超分子錯体を形成していると、1.5MのNaPyrが共存しているにもかかわらずNaPDBA- β CDが分散することを発見した。

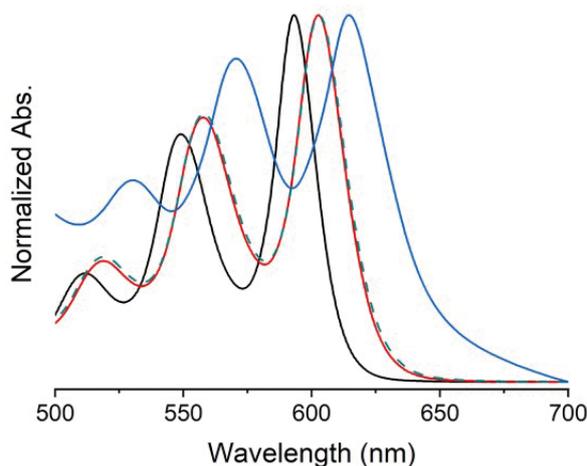


図7 NaPDBAの吸収スペクトル。(黒線)メタノール中のNaPDBA、(赤線)DNP juice中のNaPDBA、(青線)NaPyrが共存したDNP juice中のNaPDBA、(緑点線) β CDとNaPyrが共存したDNP juice中のNaPDBA。

その結果、NaPDBAが生成する光励起三重項電子スピンの偏極を $[1-^{13}\text{C}, d_3]$ NaPyrの ^{13}C 核スピンへ移し、増強した $[1-^{13}\text{C}, d_3]$ NaPyrの ^{13}C -NMRを観測することに成功した^[27]。

まず、吸収スペクトルからDNP juice中のNaPDBAの分散性を評価した(図7)。黒線はメタノール中で分子分散したNaPDBA、赤線はDNP juice中のNaPDBA、青線は1.5 MのNaPyrが共存したDNP juice中のNaPDBA、緑点線は β CDとNaPyrが共存したDNP juice中のNaPDBAの吸収スペクトルである。セクション3でも解説したように、DNP juice中でNaPDBAは会合体を形成するため、メタノール中よりもレッドシフトする。1.5 MのNaPyrが添加されるとさらにレッドシフトし、マクロスコピックな凝集が起きていることが示唆された。一方で、1.5 MのNaPyr、5 mMの β CDが共存している場合、NaPDBAの吸収スペクトルはDNP juice中のスペクトルとほとんど一致していることから、 β CDの添加によってNaPDBAの分散性が改善されたことが分かった。さらに、DNP juice中におけるNaPDBAのMDシミュレーションの結果から、1 mMのNaPDBA、5 mMの β CDはDNP juice中で1:2の超分子錯体を形成し、1.5 MのNaPyrが共存している場合であってもこの超分子錯体が安定に存在していることが分かった。

次に、NaPDBAの光励起三重項電子スピンの偏極を時間分解ESR測定によって評価した。図8はDNP juiceガラス固体中のNaPDBAのESRスペクトルである。1.5 MのNaPyrが共存する場

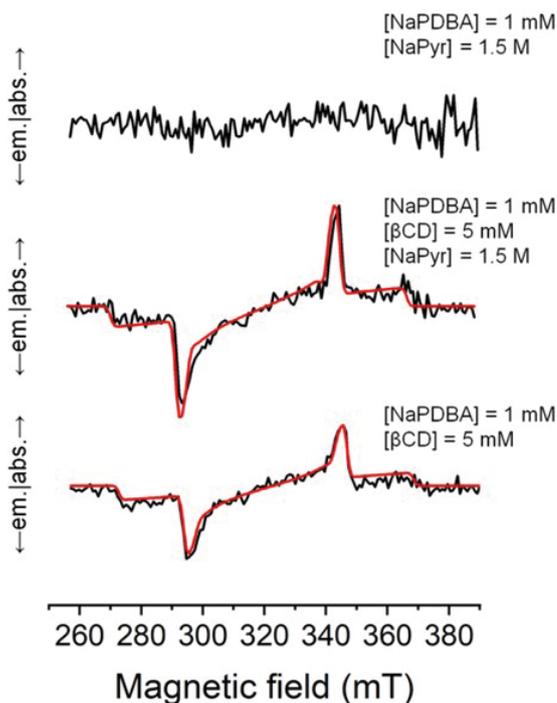


図8 NaPDBAのESRスペクトル。(上段)1.5 MのNaPyrを含むときのNaPDBA、(中段)1.5 MのNaPyr、5 mMの β CDを含むときのNaPDBA、(下段)5 mMの β CDを含むときのNaPDBA。

合、三重項電子スピンの偏極に基づくシグナルがほとんどないことから、NaPDBAが凝集し、電子スピン偏極が速やかに失活していることが分かる^[28,29]。一方で、5 mMの β CDを添加すると三重項電子スピンの偏極に基づくシグナルが得られた。このスペクトルは1 mMのNaPDBAと5 mMの β CDのみを含むDNP juiceガラス中のスペクトルとほとんど一致していることから、高濃度にNaPyrを含むDNP juice中であってもNaPDBAは β CDとの超分子相互作用によって分散していることが分かった。

次に、NaPyrが高濃度に存在するDNP juice中において、NaPDBA- β CDが生成する三重項電子スピンの偏極をDNP juice中の ^1H 核スピンを経由して $[1-^{13}\text{C}, d_3]$ NaPyr中の ^{13}C 核スピンへと移行した(図9)。図9Aは1 mMのNaPDBA、5 mMの β CD、1.5 Mの $[1-^{13}\text{C}, d_3]$ NaPyrを含むDNP juiceガラスを用いて0.64 T、100 Kの条件下でtriplet-DNPを行った際に得られた ^1H NMRスペクトルである。熱平衡状態のスペクトルと比較することで、増感倍率は174倍(偏極率0.04%)となった。次に、高偏極化した ^1H 核スピンはramped-amplitude cross-polarization (RAMP-CP)^[30]によって $[1-^{13}\text{C}, d_3]$ NaPyr

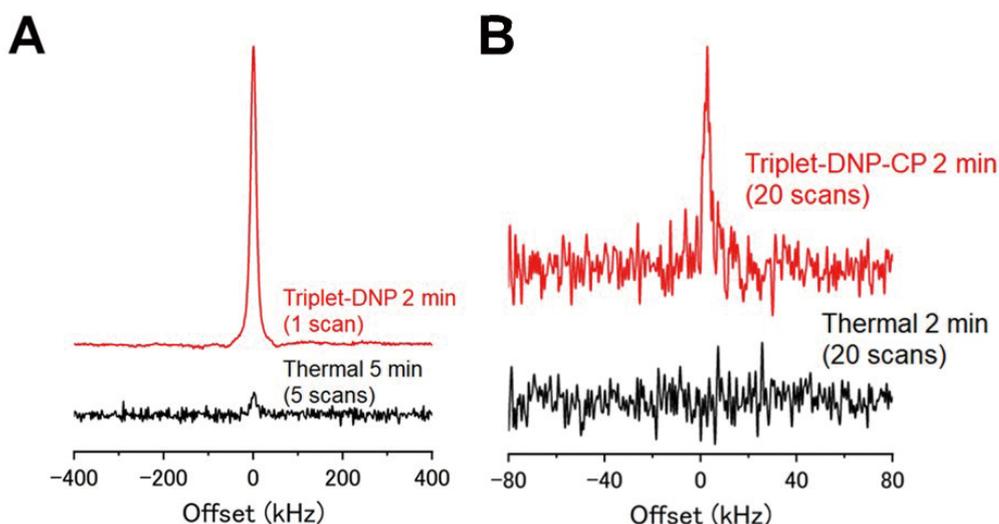


図9 1.5Mの $[1-^{13}\text{C}, d_3]\text{NaPyr}$ を含むDNP juice中においてNaPDBA- β CDを用いたtriplet-DNP。(A) Triplet-DNP後(赤線)と熱平衡状態(黒線)における ^1H -NMRスペクトル。(B) Triplet-DNPによって偏極した ^1H 核スピンを用いたRAMP-CP後(赤線)と熱平衡状態の ^1H 核スピンを用いたRAMP-CP後(黒線)の ^{13}C -NMRスペクトル。

中の ^{13}C 核スピンへ移行された(図9B)。その結果、増感した $[1-^{13}\text{C}, d_3]\text{NaPyr}$ に基づく ^{13}C -NMRが得られ、室温下で測定した熱平衡状態の ^{13}C -メタノールとの信号強度を比較することで増感倍率は122倍(偏極率0.007%)と計算された。

5. 終わりに

本解説では、光励起三重項状態の偏極電子スピンを用いて水やピルビン酸といった生体分子を高核偏極化させるための材料開発について紹介した。偏極水はタンパク質構造解析や薬物スクリーニングに有用であり、高核偏極 ^{13}C -ピルビン酸は高感度な ^{13}C -MRI癌診断を行うための重要な生体分子プローブである。Triplet-DNPは穏和な条件下で核偏極が可能のため、今回の研究成果を基に広範な研究・医療機関に高感度NMR/MRIを提供することに繋がっていくと期待される。このような実用化に向けて残された課題は偏極率のさらなる向上と装置開発である。現状、本研究で得られた ^{13}C -ピルビン酸中 ^{13}C 核スピン偏極率~0.007%は、高磁場NMR(18.8T)における ^{13}C 核スピン偏極率0.002%と同程度である。また、十分に長い T_1 を保つために100Kの条件が必要である。偏極率向上のために、近年ペンタセン誘導体をドーブしたアモルファス材料を用いて0.64T, 100Kの条件下で10%に迫る偏極率が達成された^[31]。また、ペンタセンをドーブした p -ターフェニルのマイクロ結晶をポリマー中で磁場に対

して配向させることで、0.39T、室温下で単結晶に匹敵する偏極率11%が達成された^[32]。アモルファスやポリマーはピルビン酸といったターゲット分子を導入することができるため、ターゲット分子への偏極移行効率を改善することで室温下で10%オーダーの偏極率を達成することが可能になると考えられる。一方、装置開発に関しては、dissolution triplet-DNPによってたんぱく質と薬剤分子の結合を観測したことが報告された^[15,16]。偏極源の構造最適化やdissolution triplet-DNP装置開発を組み合わせることで、偏極した水分子やピルビン酸を用いた高感度NMR/MRIの実装が可能になると期待される。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究の一部はJSTさきがけ「量子技術を適用した生命科学基盤の創出」領域、JST創発的研究支援事業、日本学術振興会科学研究費、新日本先進医療研究財団、積水化学自然に学ぶものづくり研究助成プログラムの援助を受け、川嶋優介博士、山内朗生氏、西村亘生博士、中島悠真氏、藤原才也博士、坂本啓太氏、河野宏徳博士、君塚信夫教授と共に実施された。共同研究においてTriplet-DNPのセットアップは理化学研究所の立石健一郎博士、上坂友洋博士に、超高速分光は九州大学の宮田潔志准教授、笠僚宏氏、田村徹氏、西郷将生博士、恩田健教授に、MDシミュレーションは北里大学の佐藤俊輔氏、

渡辺豪教授に、ESRシミュレーションは神戸大学の小堀康博教授により実施された。ここに厚く御礼申し上げる。

引用文献

- [1] Overhauser AW. Polarization of Nuclei in Metals. *Phys. Rev.* **92**, 411–415 (1953).
- [2] Carver TR, Slichter CP. Experimental Verification of the Overhauser Nuclear Polarization Effect. *Phys. Rev.* **102**, 975–980 (1956).
- [3] Hall DA, Maus DC, Gerfen GJ, Inati SJ, Becerra LR, Dahlquist FW, Griffin RG. Polarization-enhanced NMR spectroscopy of biomolecules in frozen solution. *Science* **276**, 930–932 (1997).
- [4] Ardenkjaer-Larsen JH, Fridlund B, Gram A, Hansson G, Hansson L, Lerche MH, Servin R, Thaning M, Golman K. Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10158–10163 (2003).
- [5] Deimling M, Brunner H, Dinse KP, Hauser KH. Microwave-Induced Optical Nuclear Polarization (MI-ONP). *J. Magn. Reson.* **39**, 185–202 (1980).
- [6] Henstra A, Lin T-S, Schmidt J, Wenckebach WT. High dynamic nuclear polarization at room temperature. *Chem. Phys. Lett.* **165**, 6–10 (1990).
- [7] Inuma M, Takahashi Y, Shake I, Oda M, Masaike A, Yabuzaki T, Shimizu HM. Proton polarization with p-terphenyl crystal by integrated solid effect on photoexcited triplet state. *J. Magn. Reson.* **175**, 235–241 (2005).
- [8] Tateishi K, Negoro M, Nishida S, Kagawa A, Morita Y, Kitagawa M. Room temperature hyperpolarization of nuclear spins in bulk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7527–7530 (2014).
- [9] Nishimura K, Kouno H, Kawashima Y, Orihashi K, Fujiwara S, Tateishi K, Uesaka T, Kimizuka N, Yanai N. Materials chemistry of triplet dynamic nuclear polarization. *Chem. Commun.* **56**, 7217–7232 (2020).
- [10] Sloop DJ, Yu HL, Lin TS, Weissman SI. Electron spin echoes of a photoexcited triplet: Pentacene in p-terphenyl crystals. *J. Chem. Phys.* **75**, 3746–3757 (1981).
- [11] Inuma M, Takahashi Y, Shaké I, Oda M, Masaike A, Yabuzaki T, Shimizu HM. High Proton Polarization by Microwave-Induced Optical Nuclear Polarization at 77 K. *Phys. Rev. Lett.* **84**, 171–174 (2000).
- [12] Takeda K, Takegoshi K, Terao T. Dynamic Nuclear Polarization by Electron Spins in the Photoexcited Triplet State: I. Attainment of Proton Polarization of 0.7 at 105 K in Naphthalene. *J. Phys. Soc. Jpn.* **73**, 2313–2318 (2004).
- [13] Takeda K, Takegoshi K, Terao T. Dynamic Nuclear Polarization by Electron Spins in the Photoexcited Triplet State: II. High Polarization of the Residual Protons in Deuterated Naphthalene. *J. Phys. Soc. Jpn.* **73**, 2319–2322 (2004).
- [14] Negoro M, Kagawa A, Tateishi K, Tanaka Y, Yuasa T, Takahashi K, Kitagawa M. Dissolution Dynamic Nuclear Polarization at Room Temperature Using Photoexcited Triplet Electrons. *J. Phys. Chem. A* **122**, 4294–4297 (2018).
- [15] Kagawa A, Miyanishi K, Ichijo N, Negoro M, Nakamura Y, Enozawa H, Murata T, Morita Y, Kitagawa M. High-field NMR with dissolution triplet-DNP. *J. Magn. Reson.* **309**, 106623 (2019).
- [16] Miyanishi K, Sugiki T, Matsui T, Ozawa R, Hatanaka Y, Enozawa H, Nakamura Y, Murata T, Kagawa A, Morita Y, Fujiwara T, Kitagawa M, Negoro M. Protein–Ligand Interaction Analyses with Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Enhanced by Dissolution Triplet Dynamic Nuclear Polarization. *J. Phys. Chem. Lett.* **14**, 6241–6247 (2023).
- [17] Henstra A, Dirksen P, Wenckebach WT. Enhanced dynamic nuclear-polarization by the integrated solid effect. *Phys. Lett. A* **134**, 134–136 (1988).
- [18] Takeda K. *Triplet State Dynamic Nuclear Polarization*. VDM Verlag Dr. Müller (2009).
- [19] Smith MB, Michl J. Singlet Fission. *Chem. Rev.* **110**, 6891–6936 (2010).
- [20] Kawashima Y, Hamachi T, Yamauchi A, Nishimura K, Nakashima Y, Fujiwara S, Kimizuka N, Ryu T, Tamura T, Saigo M, Onda K, Sato S, Kobori Y, Tateishi K, Uesaka T, Watanabe G, Miyata K, Yanai N. Singlet fission as a polarized spin generator for dynamic nuclear polarization. *Nat. Commun.* **14**, 1056 (2023).
- [21] Tayebjee MJY, Sanders SN, Kumarasamy E, Campos LM, Sfeir MY, McCamey DR. Quintet multiexciton dynamics in singlet fission. *Nat. Phys.* **13**, 182–188 (2017).
- [22] Bayliss S, Weiss L, Krafft F, Granger D, Anthony J, Behrends J, Bittl R. Probing the wave function and dynamics of the quintet multiexciton state with coherent control in a singlet fission material. *Phys. Rev. X* **10**, 021070 (2020).
- [23] Sanders SN, Kumarasamy E, Pun AB, Trinh MT, Choi B, Xia J, Taffet EJ, Low JZ, Miller JR, Roy X, Zhu XY, Steigerwald ML, Sfeir MY, Campos LM. Quantitative Intramolecular Singlet Fission in Bipentacenes. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 8965–8972 (2015).
- [24] Keshari KR, Wilson DM. Chemistry and biochemistry of ¹³C hyperpolarized magnetic resonance using dynamic nuclear polarization. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 1627–1659 (2014).
- [25] Nelson SJ, Kurhanewicz J, Vigneron DB, Larson PE, Harzstark AL, Ferrone M, van Criekinge M, Chang JW, Bok R, Park I, Reed G, Carvajal L, Small EJ, Munster P, Weinberg VK, Ardenkjaer-Larsen JH, Chen AP, Hurd RE, Odegardstuen LI, Robb FJ, Tropp J, Murray JA. Metabolic imaging of patients with prostate cancer using hyperpolarized [¹⁻¹³C] pyruvate. *Sci. Transl. Med.* **5**, 198ra108 (2013).
- [26] Kagawa A, Negoro M, Ohba R, Ichijo N, Takamine K, Nakamura Y, Murata T, Morita Y, Kitagawa M. Dynamic nuclear polarization using photoexcited triplet electron spins in eutectic mixtures. *J. Phys. Chem. A* **122**, 9670–9675 (2018).
- [27] Hamachi T, Nishimura K, Sakamoto K, Kawashima Y, Kouno H, Sato S, Watanabe G, Tateishi K, Uesaka T, Yanai N. Triplet Dynamic Nuclear Polarization of Pyruvate via Supramolecular Chemistry. *ChemRxiv preprint* (2023) DOI: 10.26434/chemrxiv-2023-9rkjf.
- [28] Bizzaro W, Yarmus L, Rosenthal J, Berk NF. EPR linewidth of triplet excitons in molecular crystals. II. Tetracene. *Phys. Rev. B* **23**, 5673–5675 (1981).

- [29] Jaegermann P, Plato M, von Maltzan B, Möbius K. Time-resolved EPR study of exciton hopping in porphyrin dimers in their photoexcited triplet state. *Mol. Phys.* **78**, 1057–1074 (1993).
- [30] Metz G, Wu XL, Smith SO. Ramped-Amplitude Cross Polarization in Magic-Angle-Spinning NMR. *J. Magn. Reson., Ser A* **110**, 219–227 (1994).
- [31] Sakamoto K, Hamachi T, Miyokawa K, Tateishi K, Uesaka T, Kurashige Y, Yanai N. Polarizing agents beyond pentacene for efficient triplet dynamic nuclear polarization in glass matrices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **120**, e2307926120 (2023).
- [32] Kagawa A, Kusumi R, Nagase R, Morishita Y, Miyanishi K, Takeda K, Kitagawa M, Negoro M. Triplet-DNP in magnetically oriented microcrystal arrays. *J. Magn. Reson.* **351**, 107439 (2023).



濱地 智之 (はまち・ともゆき)

2020年4月 九州大学大学院工学府応用化学専攻修士課程入学

2022年4月 九州大学大学院工学府応用化学専攻博士後期課程進学

2022年4月 日本学術振興会特別研究員DC1採用



楊井 伸浩 (やない・のぶひろ)

2011年 3月 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 博士(工学)取得

2011年 4月 JSPS海外特別研究員 イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校

2012年11月 九州大学大学院工学研究院応用化学部門 助教

2014年10月 JSTさきがけ「分子技術と新機能創出」領域 研究者(兼任)

2015年10月 九州大学大学院工学研究院応用化学部門 准教授

2018年10月 JSTさきがけ「量子技術を適用した生命科学基盤の創出」領域 研究者(兼任)

2022年 4月 JST創発的研究支援事業 研究者

2023年10月 JST CREST「量子・古典の異分野融合による共創型フロンティアの開拓」領域
研究代表者

製薬企業における創薬のための生体系 NMR の活用戦略 (中外製薬の場合) —最近の動向と将来の展望—

¹中外製薬株式会社 研究本部 タンパク質科学研究部 1グループ

²中外製薬株式会社 研究本部 タンパク質科学研究部 部長

奥出 順也¹、鳥澤 拓也²

okude.junya76@chugai-pharm.co.jp

torizawatky@chugai-pharm.co.jp

はじめに

我々が2016年に本機関誌に寄稿した解説^[1] (2015年当時の状況) から2024年現在に至る中外製薬株式会社の創薬における生体系NMRの位置づけの変遷を本稿でお伝えしたい。奥出は生体系NMRで学位取得後、2015年に新卒で中外製薬に入社したため、この8年間の状況変化と並行して奥出の中外製薬での生体系NMR研究者としての8年間のキャリアもお伝えすることができるのではないかと考えた。この製薬企業での研究者としてのキャリアが、現在すでに製薬企業で活躍されている(生体系NMR研究者に限らず)創薬研究者の方々や、これから製薬企業で研究者を志す学生の方々へのキャリアの参考となれば幸甚である。

企業研究者としてスタート (抗体創薬へのNMR適用から中分子創薬へのNMR適用へ)

2015年当時、我々は生体分子のNMRやX線結

晶構造解析等の立体構造解析、表面プラズモン共鳴 (SPR) 等の分子間相互作用解析の機能を有するグループに所属していた。鳥澤がマネージャー (現場に近く一般的な研究員よりも権限を持っており、かつ研究所全体を見渡しやすい研究者)、新入社員として奥出が現場で実験を進める研究者という2人体制でNMR活動を進めていた。

この当時、現在、臨床開発が進められているスイッチ抗体 (図1) の創薬が進められており、鳥澤が整備した創薬現場でも使える抗体の安定同位体技術^[1] を用いて、低分子であるスイッチ分子が抗体に結合し、さらに抗原が結合するメカニズムを、生体系NMRを用いて研究することで、より良い抗体の取得に貢献できるのではないかと考え、実験を進めた。これは創薬の現場で他の研究員から依頼を受けたものではなく、生体系NMRで得られるデータが創薬に貢献できるのではないかと考え我々が提案したものである。このように

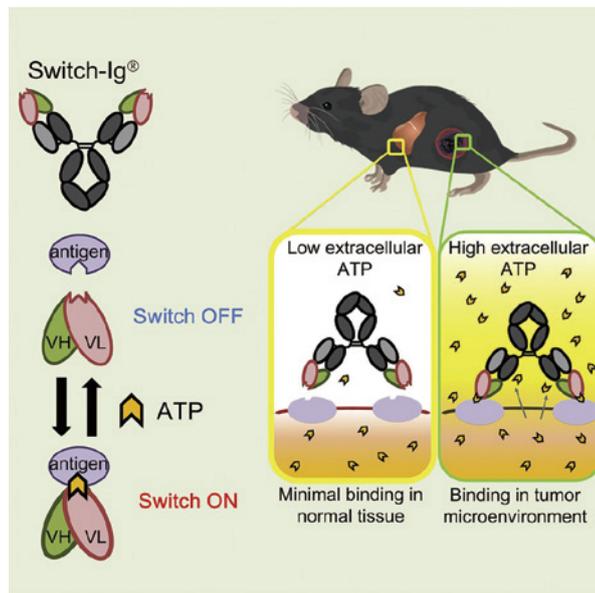


図1 スイッチ抗体が癌特異的に作用するメカニズム。文献^[12]より抜粋。

中外製薬では科学的な根拠や実験データに基づいた提案であれば、現場の意見が尊重されるカルチャーが醸成されており、これこそが中外製薬が新規の医薬品を創出することができる源泉となっている。ここで詳細を伝えることはできないが、スイッチ分子によるFabのCDR領域の構造平衡の制御が、抗原結合に対する選択性に重要であることを示すことができた。その内容をISMAR-APNMR2021合同会議でポスター発表した。さらにX線結晶構造解析機能や分子間相互作用機能のメンバーと連携して、選択性の高いスイッチ抗体を取得するための鑄型抗体として、どのような性質を有している抗体が適しているのかをタンパク質科学的に明らかにし、特許化した^[2]。これは現在タンパク質科学研究部で進めているIPS活動(Integrated Protein Scienceの略、一般的にはIntegrative Structural Biologyと言われている活動に近いが、タンパク質科学研究部では構造解析機能のみならずタンパク質調製機能、分子間相互作用解析機能、質量分析機能、計算科学機能を有しているため構造生物学に縛られずタンパク質科学としている)(図2)の第一号案件である。この時、どのようなIPS手法が創薬に活用できるかをグループ内でベンチマーク調査活動をしていた。奥出はタンパク質の形状を時間分解能で解析できる原子間力顕微鏡(AFM)も調査を担当し、タイミングよく開催されていた金沢大学で開催されたAFM夏の学校にも参加した。専門性が異なる手法を学べたことは非常に良い経験であった。

この頃、抗体創薬以外にも、中分子化合物を取得するmRNAライブラリ技術が開発され、中分子創薬プロジェクトが立ち上がりつつあった^[3]。

その頃のほぼすべての中分子創薬プロジェクトにおいて、ヒット化合物を取得するためのRNAディスプレイ法に用いる標的タンパク質分子の調製業務に携わった。タンパク質を調製するだけでなく、調製したタンパク質の2次元NMRスペクトルを片っ端から取得した(もちろんタンパク質は安定同位体で標識されている)。ヒット化合物取得に用いるタンパク質の立体構造を担保するこの活動を通して、中分子創薬で要求される“良いタンパク質”を調製することが、ヒット化合物の取得の成否にかかわることを、身をもって経験した。また特定のドメインに結合するバインダーを取得する際、そのドメイン単独では生化学的な手法で活性を評価できない場合、調製したドメインタンパク質が正しいフォールディングを有していることを評価するためにNMR解析により立体構造を担保するという意味でも有効であると感じた。さらに、あらかじめNMRスペクトルを取得しておくことで、ヒット化合物が取得されてきた際に、結晶構造解析に先んじて標的タンパク質に対するヒット化合物の結合部位を同定し、創薬プロジェクトに提供することができた(ただし、後述するが、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析が成熟しつつある現在では、標的タンパク質分子の分子量にもよるが、クライオ電子顕微鏡による構造解析のスピード(タンパク質があればモデル構築まで1カ月も必要としない)には、これまでのNMR測定、解析を多少自動化した程度では到底勝てない)。上述のように複数の中分子創薬プロジェクトに携わった経験ができたため、奥出が中分子創薬プロジェクトのプロジェクトリーダーを任されるに至った。プロジェクトリーダーとし

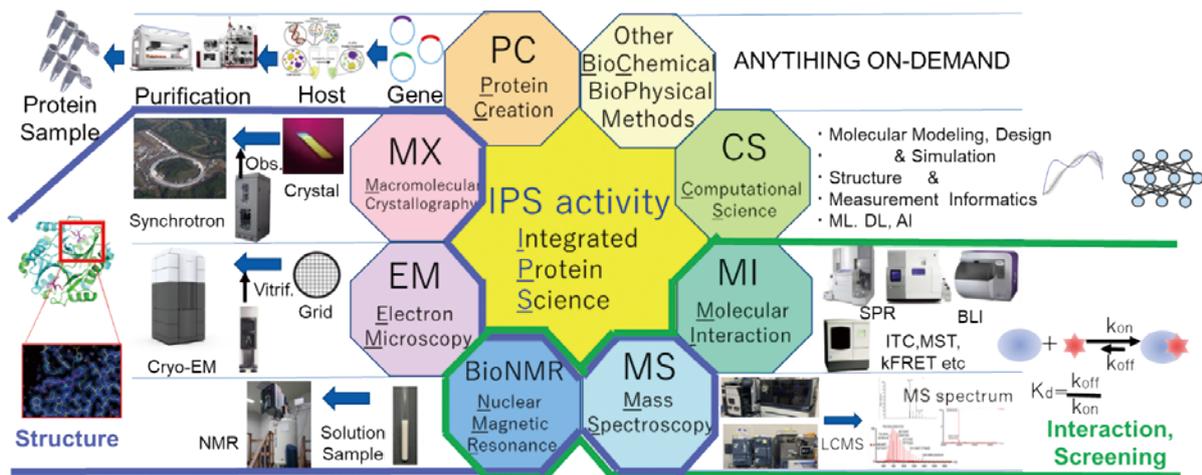


図2 Integrated Protein Science (IPS) 活動の概要

て、自身の専門性以外の学問領域を理解し、化学や薬理のプロジェクトリーダーとともにチームをまとめる経験、特にチームビルディングを学べたことは非常に良い経験となった。

クライオ電子顕微鏡による単粒子解析の急成長

前項で述べたように所属グループにて2015年から2016年にIPS手法のベンチマーク調査活動を進めていた。クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析もその調査対象の一手法であった。2018年には、イギリスではクライオ電子顕微鏡を共用利用するため複数の製薬企業から構成されたコンソーシアムが立ち上げられ、またメガファーマがクライオ電子顕微鏡を導入し始めていた。そのため、中外製薬でもクライオ電子顕微鏡に詳しい研究機関との共同研究を開始し、共同研究先で技術習得を推進した。2年間の共同研究を通して、いくつかの膜タンパク質や可溶性タンパク質の立体構造解析を高分解能で解析することができた。そして、本稿の読者でご存知の方もいらっしゃるかもしれないが、中外製薬は国内製薬企業で初めてクライオ電子顕微鏡のスクリーニング機（加速電圧200kV）を2021年に導入した（図3）。クライオ電子顕微鏡による立体構造解析で成果を出すことができ、その成果を基に経営層へのボトムアップ的な提案により、クライオ電子顕微鏡の社内導入につながったことは非常に喜ばしい流れを作れたと考えている。現在も奥出は生体系NMRを主とした業務を行うとともに、クライオ電子顕微鏡を

用いた構造解析業務も行っている。両方の業務に携わっている者として、感じていることを次に記載したい。上述したように、クライオ電子顕微鏡を用いた立体構造解析が発展途上で、主に結晶構造解析により化合物と標的タンパク質の構造解析をしていた時は、結晶化に難航することもあり、生体系NMRを用いて化合物添加前後でのNMRスペクトルを比較して、化合物の結合部位を同定することで創薬プロジェクトに貢献することができた。一方、クライオ電子顕微鏡による構造解析が成熟に向かいつつある現在、精製やアッセイに用いるタグがあるタンパク質サンプルでも立体構造解析ができ、さらに一度グリッド作成条件（直径3ミリのグリッドにサンプルを乗せ、余分な水分を除いた後、液化エタンで瞬間凍結する）が確立されると、タンパク質試料と混ぜる化合物を変えるだけで、化合物と標的タンパク質との複合体の立体構造が複数得られる。そのため、一度この立体構造解析スピードに到達すると他手法は太刀打ちすることは難しいケースが多くなる。将来的には、クライオ電子顕微鏡構造がさらに高分解能化されれば、立体構造解析業務が順にX線結晶構造解析からクライオ電子顕微鏡に置き換わるのではないかと推測する。そのようななかで、生体系NMRでしかできない標的として、柔軟性の高い生体分子である天然変性タンパク質やRNAが挙げられる。また、これまでの標的タンパク質での創薬活動において生体系NMRが活躍するとしたら、タンパク質の運動性がカギなのではない



図3 社内に導入した加速電圧200kVのクライオ電子顕微鏡装置

かと我々は考えている。例えば、膜タンパク質の一種であるGタンパク質共役型受容体(GPCR)について考えてみたい(奥出はGPCRのNMR解析で学位を取得したこと^[4]、医薬品の約30%がGPCRを標的としていることから、今回例として挙げた)。GPCRはinactive状態、partially active状態、fully active状態の平衡にあり、アゴニストが結合するとactive状態に平衡が偏り、三量体Gタンパク質G $\alpha\beta\gamma$ が結合する。その後、活性化したG α とG $\beta\gamma$ がGPCRから解離し、下流にシグナルが伝達される(図4)。アゴニスト創製のためのStructure-Based Drug Design(SBDD)を考えた場合、クライオ電子顕微鏡による立体構造解析の第一ターゲットとなるのは、アゴニストにより活性化されたGPCRに三量体Gタンパク質G $\alpha\beta\gamma$ が結合した複合体である。この構造を用いて、アゴニストのaffinityを上げることができるかもしれないが、おそらくefficacyを制御することは難しいのではないかと思う。クライオ電子顕微鏡の単粒子解析でよく使われる解析ソフトであるcryoSPARCに搭載されている3D variability analysis^[5]やcryoDRGN^[6]などの解析からタンパク質分子の運動性や各構造の存在割合を同定することができるが、高分解能情報を与える粒子の中での解析であるため、必ずしも生理的な条件を反映しているわけではない。生体系NMRにより取得されるinactive状態、partially active状態、fully active状態の存在割合や各状態の溶液構造情報^[7]を拘束条件、クライオ電子顕微鏡構造を初期構造として分子動力学計算(これもIPS活動の一例である)を実施することで、これまでよりも高次の創薬ができるのではないかと考えている。このように他の立体構造解析機能と競合的に張り合うのではなく、IPS活動のようにうまく協働して、必

要な新たな知見を得ることこそが、創薬活動には非常に重要になると感じている。

NMR 機能メンバーの増員とグループの再編成

中外製薬は2021年より新たな成長戦略であるTOP I 2030を策定し、研究開発のアウトプット倍増を進めている。その流れを受け、生体系NMR機能メンバーも現場で実験を進める研究者が1名の状態から幸運なことに執筆当時で3名に増員した。生体系NMRに関する専門家による議論も高いレベルで量を伴うようになってきたが、質・量ともに更なる向上を目指している。さらに研究本部内における生体系NMRの認知度もこれまでにかなり高まってきており、リガンド結合部位同定にとどまらず創薬プロジェクトの様々な課題(「結晶構造のような静的な構造では見ている現象を説明できないため、タンパク質の運動性情報を取得して欲しい」、「細胞を用いたアッセイとcell-freeアッセイで化合物の活性に違いがあるため、構造的に必要な細胞の要素を知りたい」など)の解決にNMR解析で取り組めないかという相談が非常に増えている。人とマシンタイムのリソースを効果的に活用するには、生体系NMRを扱う研究者が複数ある創薬課題のなかでどれがNMRでしか解決できないものかを見極め、それを解決するためにはどのようなNMR手法がよいかを常に判断しなければならない。日々NMR解析を行っている読者はご存じの通り、NMRでは解析対象(ligand-basedやProtein-basedなど)も解析手法(溶液構造解析、相互作用解析、運動性解析など)も数多く存在し、課題解決のアプローチは星の数ほどある。このアプローチの選択には、研究者の経験やそれによって培われたセンスに大きく依存すると思う。社歴が上がってくるとグループや部

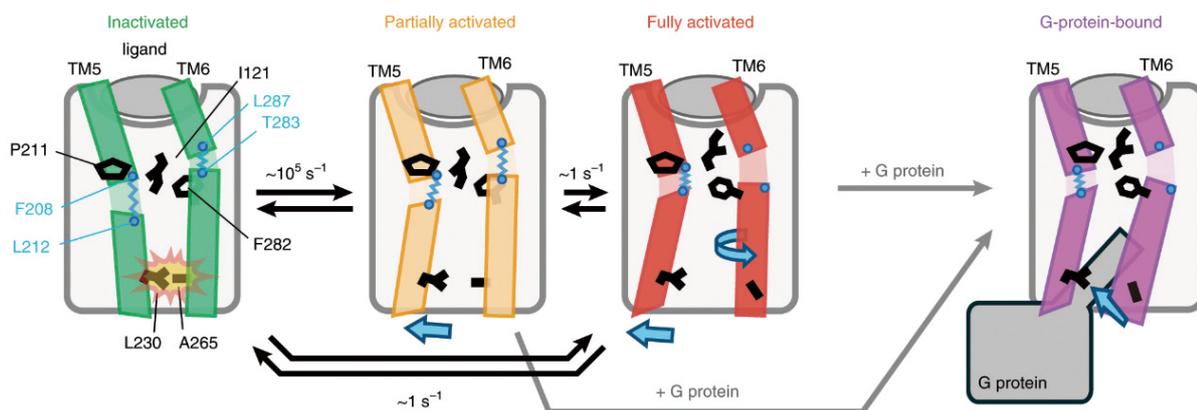


図4 Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に存在する構造平衡。文献^[7]より抜粋。

の運営業務が増え、自身で手を動かして実験をする機会が減り、研究補助員の方に多くの実験を依頼しなければならない。そのため、運営業務が少なく社歴が浅い間に、自身で手を動かし多くの経験を積むことをタンパク質科学研究部では強く推奨されている。この大事な時間を今後の研究人生への投資と思い、鍛錬してくれることを後進には願っている。

少し話は変わるが、当タンパク質科学研究部はこれまでタンパク質調製機能と立体構造解析・分子間相互作用解析・計算科学機能の2グループ体制であったが、2023年よりタンパク質調製機能2グループ、立体構造解析機能・計算科学機能、相互作用解析機能、質量分析機能の5グループ体制となった。抗体や中分子、低分子に限らず薬のタネを取得するには、ほぼすべての場合に単離精製したタンパク質試料が必要であり、創薬の最上流において最も重要であるため、タンパク質科学研究部に所属するメンバーのうち半分近くがタンパク質調製を担えるメンバーである。さらに患者さんに投与する医薬品にまで薬のタネを育てるには、取得されてきた薬のタネが標的タンパク質とどのような親和性で結合するのか、どのような部位で結合するのかを明らかにする必要がある、これらの活動もタンパク質科学研究部が担っている。上述したように単機能だけでなく複数機能で協働して、単機能では明らかにすることができなかった生命現象を明らかにするIPS活動も積極的に推進し、創薬プロジェクトに対して新たな切り口を提案している。このようにタンパク質科学研究部は創薬の上流に置いて非常に重要な役割を果たしていることをご理解いただけたかと思う。上述した部内の再編に伴い、生体系NMR機能はもともとX線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡などの立体構造解析機能と同じグループであったが、他の立体構造解析機能に比べ安定同位体標識の手法や試料数(全く同じ分子で標識パターンが異なるだけの試料を多数調製するなど)の特殊性や、NMRデータからタンパク質調製法へのフィードバックへの掛けやすさから、タンパク質調製機能と同じグループに所属する体制へシフトした。このようなグループ体制は執筆当時でまだ1年近くと始まったばかりであるが、NMR測定に供するタンパク質調製に関してタンパク質調製機能のメンバーとより密接に議論して、より“良いタンパク質”を取得するなど、これまで以上に

良い影響をもたらしているのではないかと思う。

将来の展望

最後のまとめとして将来の展望を記したい。クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析やAlphaFold2に代表されるようなAI技術の急速な発展により、生体系NMRの活用場面やNMRスペクトルを取得した後の解析のありかたにおいて再考が迫られている。活用場面に関しては、通常の希薄溶液でのリガンド-タンパク質相互作用解析にとどまらず、リガンド-タンパク質複合体中のリガンドやタンパク質のエントロピーに着目した運動性解析や、より生体内に近い条件でのNMR解析、他の立体構造解析手法では取り組みが難しい天然変性タンパク質やRNAのNMR解析などが創薬現場で求められてくるのではないかと想像する。中分子は低分子と比較して柔軟性が高いため、通常低分子の創薬で行われるX線結晶構造やクライオ電子顕微鏡のような静的構造をベースとしたSBDDではある程度までは化合物の最適化ができるかもしれないが、より良い化合物を創製するには生体系NMRを用いた運動性解析が重要なのではないかと思う。このデータをもとに、化合物の標的結合によるエントロピーロスを抑える合成展開を提案したり、標的結合によるエントロピーゲインを促進する合成展開を提案するなどのより発展的な創薬もできるのではないかと期待を膨らませたい。より生体内に近い条件でのNMR解析においても、化合物が細胞内タンパク質と反応する場合は細胞質のみではなく、細胞膜上であったり液-液相分離(LLPS)中であったりと様々で、それらの環境を模した条件で構造解析できるのは生体系NMRだけではないかと思う。生体環境を近似した条件でも生体環境を完全に模倣できないのであれば、in-cell NMRという選択肢もあるかと思う。

次にNMRデータの解析に関しても考えたい。生体系NMR解析を日頃から行っている読者の皆様はご存じの通り、NMRスペクトル取得を1つとっても解析対象の分子量が大きくなるほど時間がかかり、シグナルの帰属などそのスペクトルを手作業で解析するのはさらに時間がかかる。そのため、測定時間や解析時間の短縮化が必要である。生体系NMRにおけるAI技術の適用は他の分野・技術と比較して実装が遅れていると感じていたが、近年生体系NMRにおけるAI技術の適用に関する論文が増えている。深層学習を用いて低

積算スペクトルを denoising して高感度スペクトルを得てマシンタイムの節約をしたり^[8]、Peter Güntert先生らが開発されたARTINAによりシグナル帰属や溶液構造決定を自動化する技術^[9~11]がその一例である。これら技術に関しては社内に取り込み、実際のプロジェクト推進に適用していきたいと考えている。また、中外製薬はデジタルトランスフォーメーションにも力を入れており、データサイエンスを専門とする研究員が多く在籍している。彼らと協働して、公知となっているAI技術とは別に“AI×生体系NMR”技術を開発し、これまでにない価値を創薬プロジェクトに提供し、革新的な医薬品の提供に貢献していきたいと考えている。

これまで将来の展望に関して記載した。しかしながら、昨今の破壊的イノベーションにより研究のあり方に変革が求められているように、これから先もさらなる変革が求められ、今回記載した内

容もすぐに時代遅れとなるであろう。このような時代において、我々製薬企業の研究員は世の中の動向を素早くキャッチアップし、進化していかなくてはならない。

引用文献

- [1] 創薬における生体系NMRの位置づけ：中外製薬(株)の場合を中心に、鳥澤拓也, NMR学会機関誌編集室 編 7 11-18, 2016
- [2] MTA 依存的に抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子及び当該抗原結合ドメイン取得用ライブラリ (WO2020189748A1)
- [3] Atsushi Ohta et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2023)
- [4] Junya Okude et al., *Angewandte. Chem. Int. Ed.* (2015)
- [5] Ali Punjani & David J. Fleet, *J. Struct. Biol.* (2020)
- [6] Ellen D. Zhong et al., *Nat. Methods* (2021)
- [7] Shunsuke Imai et al., *Nat. Chem. Biol.* (2020)
- [8] Ke Wu et al., *Anal. Chem.* (2021)
- [9] Piotr Klukowski et al., *Nat. Commun.* (2022)
- [10] Henry Wetton et al., *Front. Mol. Biosci.* (2023)
- [11] Piotr Klukowski et al., *Sci. Adv.* (2023)
- [12] Futa Mimoto et al, *Cell Reports* (2020)



奥出 順也 (おくで・じゅんや)

2015年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了(嶋田一夫研究室)、在学時はGタンパク質共役型受容体(GPCR)の活性化機構に着目したNMR解析に従事
2015年～現在 中外製薬株式会社にて研究員として勤務、入社時から生体系NMRやクライオEMを用いた創薬研究に従事



鳥澤 拓也 (とりざわ・たくや)

2001年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了(嶋田一夫研究室)、在学時は紫外線損傷DNAに結合する抗体、修復酵素のNMRを中心とした手法による機構解明に従事
2001-2005年 科学技術振興機構にて研究員として勤務(甲斐荘正恒研究室)、SAIL法によるタンパク質のNMR解析法開発に従事
2005-2014年 中外製薬にて研究員
2014-2015年 同社主任研究員として勤務、生体系NMRを用いた創薬に従事
2016年 同社にて蛋白質構造解析グループ
2019年 蛋白質科学グループのマネジャーとして勤務、立体構造解析手法全般、分子間相互作用解析全般の統括業務に従事
2023年 タンパク質科学研究部の部長として勤務、上記の統括業務に加え、タンパク質調製、質量分析のグループも加えた創薬のタンパク質科学領域全般の統括業務に従事、現在に至る

BMRBおよびBMRBjの最近の動向

蛋白質研究奨励会

横地 政志

yokochi@protein.osaka-u.ac.jp

1. はじめに

NMRは物質を分析するための最も汎用性の高い分析法の一つであり、原子核をレポーターとして利用している。今日まで、希望する結果に応じて試料の調製方法や測定手段の改良が進み、固体および液体状態の生体高分子の構造やダイナミクス、相互作用、そして小分子代謝産物の同定、混合物の組成、さらには天然物の構造がNMR法を用いて明らかにされている。一般的に、実験データの解析に基づいて考察された成果は研究論文として公表される。近年では、研究に使用された実験データ、解析手法も普く共有しておくことで、特定の研究分野に限らず、異なる分野の研究者や技術の組み合わせによる進展も期待されている^[1]。生体高分子のNMR研究分野において、Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB, <https://bmr.io>) は、実験データや解析データの保存・共有において、国際的な情報基盤の役割を果たしてきた^[2]。1988年にJohn Markley博士とEldon Ulrich博士によって設立されたBMRBは、NMRに関連する各種の電子データを継続的に収集している。2007年にはWorldwide Protein Data Bank (wwPDB) の一員として活動を開始し、NMR法によって解明された立体構造情報をPDBに登録する際に、BMRB IDに関連づけられたNMR実験データ（化学シフト、構造制限情報、ピークリストなど）の登録が必須化された^[3]。現在は、BMRBは米国コネチカット大学ヘルスセンター (UConn Health) のJeffrey Hoch博士が率いている。また、2002年にBMRBグループの衛星サイトとして位置づけられるBiological Magnetic Resonance Data Bank Japan (BMRBj, <https://bmrj.pdbj.org>) の前身が大阪大学に設立され、NMR実験データの登録受付サービスや、BMRBに蓄積されたデータの独自の検索サービスを提供している^[4]。現在では、BMRBjは登録受付システムの設計と開発にも深

く関与している。本稿では、BMRBグループの最新の進展に焦点を当て、NMR分野におけるデータ駆動型研究の現状を考察したいと思う。

2. BMRB コアアーカイブ

2.1 データ形式

BMRBに保管されているデータは、マスターフォーマットであるNMR-STAR形式^[5]で配布される。NMR-STARは、1990年代にHallらによって提案されたSTARフォーマット^[6]を基にしている。STARフォーマットは、構造生物学のさまざまな領域でデータを格納するために応用されている。例えば、結晶学データを記述するCIF^[7]、PDBの原子座標を記述するPDBx/mmCIF^[8]、小角散乱のデータを記述するsasCIF^[9]、EMDB^[10]のメタデータ (3DEM)、AlphaFold DB^[11]の蛋白質構造予測 (ModelCIF) の記述のために利用されている。それぞれのSTARフォーマットは、辞書と呼ばれるデータ構造を規定するファイルが存在し、STARファイルで使用するカテゴリー、データアイテムなどが定義されている。BMRBが管理している最新のNMR-STAR V3.2辞書は、100以上のカテゴリーに6,500以上の定義済みデータアイテムで構成されている。これらのカテゴリーを用いて、分子アセンブリの定義、試料条件、実験の定義、引用文献を含む関連情報などの基本的なメタデータに加えて、化学シフト、相互作用の動力学パラメータ、緩和解析パラメータ、距離制限、二面角制限情報、Residual dipolar coupling (RDC)、Paramagnetic relaxation enhancement (PRE)、Chemical shift anisotropy (CSA)、Small angle X-ray scattering (SAXS)、ピークリストなどの実験結果や解析結果を記述することが可能である。

STARフォーマットの一般的な特徴として、Key-Value形式とテーブル形式の両方をサポートしており、大きなデータを記述する場合でも視認

性が損なわれない点がある、また、リレーショナルデータベースとの親和性が高く、同じカテゴリーグループに属している互に関連するデータは、セーブフレームと呼ばれる一つのブロックにまとめられる仕組みが備わっている。

NMR-STARは、PDBx/mmCIFと同じIUPAC原子命名法^[12]に準拠しており、Chemical Component Dictionary (CCD)^[13]に登録されているモノマー残基やリガンドに関して、原子名はPDBとBMRBの間で互換性がある。別の言い方をすれば、NMR分野で広く使用されている擬似原子名は、曖昧さのないIUPAC/CCD標準に準拠するよう変換される。しかし、同じメチル基やメチレン基に属する水素原子などの特定の原子群は、通常一つの共鳴線として観測されるため、NMR特有の擬似原子名は共鳴線を同定する際には非常に都合が良い。このため、NMR-STARの化学シフトのテーブルは、CCDの定義する原子名と登録者によって定義された原子名を並記している。

一方で、立体構造決定に使用された構造制限情報の記録法について、NMR研究者、解析ソフトウェアの開発者、データベース管理者の間で合意形成がない状態がしばらく続いていた。結果的に、異なるNMR構造解析ソフトウェア間の互換性は確立されておらず、PDBに登録されたNMR構造とその計算に使用された構造制限情報を比較検証する試みは長らく実現しなかった^[14]。2015年に、wwPDBのNMR Validation Task Forceは、この問題を解決するため、主要なNMR解析ソフトウェア開発者を集め、新たに擬似原子の命名則を定め、各利害関係者の要求を満たすNMR Exchange Format (NEF) を策定した^[15]。NEFは、NMR-STARと同様にSTARの派生フォーマットであり、NMR-STARと比べて記述可能なデータの種類(分子アセンブリ、化学シフト、距離制限、二面角制限、RDC、ピークリスト)は限られているものの、軽量なフォーマットおよび辞書で定義されており、実装が容易になっている。なお、NEFは、NEF-STARのサブセットとして機能するため、これらの2つのフォーマットの間で相互変換が可能である。

このようにSTARフォーマットは構造生物学分野において一般的な標準フォーマットと見なしても差し支えないが、NMR-STAR形式で記述されたデータが分野外の研究者にも利用しやすくなるように、BMRBjはNMR-STARデータをウェブ

標準のJSON (JavaScript Object Notation)、XML (Extensible Markup Language)、RDF (Resource Description Framework) 形式を開発し、BMRBグループ全体で共有、配布している^[16]。これら3つの拡張形式はいずれも相互運用性が高く、データの読み取り、変換、検索に必要とされる標準ライブラリーやツールが整備されており、登録されたNMRデータの再利用促進が期待できる。

2.2 登録状況

wwPDBの各パートナーは、検索可能性、アクセシビリティ、相互運用性、再利用性のFAIR原則^[17]を遵守しつつ、NMRに関連する実験データをBMRBコアアーカイブとして定義して維持管理している^[18]。BMRBコアアーカイブの主要なデータは帰属された化学シフトで占められているが、緩和速度、化学交換、カップリング定数などの解析情報も含んでいる。2023年11月現在、BMRBコアアーカイブには15,352件のエントリが存在する。これとは別に、Maybridgeフラグメントライブラリから主に選ばれた小分子化合物に関して、1,732件の哺乳類代謝産物や、薬物様分子に関するスペクトルデータベースが存在する。

NMR構造のPDBエントリー数は、2000年代に急速に増加し、2007年に増加速度のピークを迎えたが、2010年代に入ると横ばいかやや減少する傾向が見られる。2016年には、Cryo-EM法で解明されたPDBエントリー数がNMRのそれを上回った。一方で、NMR実験データのBMRBへの登録件数は2020年のCOVID-19/SARS-Cov-2の影響による減少から回復した後、増加傾向が続き2022年の年間登録件数は、1,000件を超えており2000年代の年間登録件数のピークを超えた(図1-1)。この傾向は、NMRの適用が構造決定から相互作用解析などの異なる方向に移行したことで、BMRBの登録システムがBMRBdep^[2]に更新されてから、関連するエントリーの登録が簡便になったことが関連していると考えられる。実際、登録された化学シフトの内訳を調査すると、近年のメチル基や芳香族の平均帰属率が減少していることも、この仮説を裏付けている(図1-2)。

3. 登録システム (Data-In)

BMRBは、4つの異なるNMRデータ登録システムを運用している(図2)。OneDep^[19]は、生

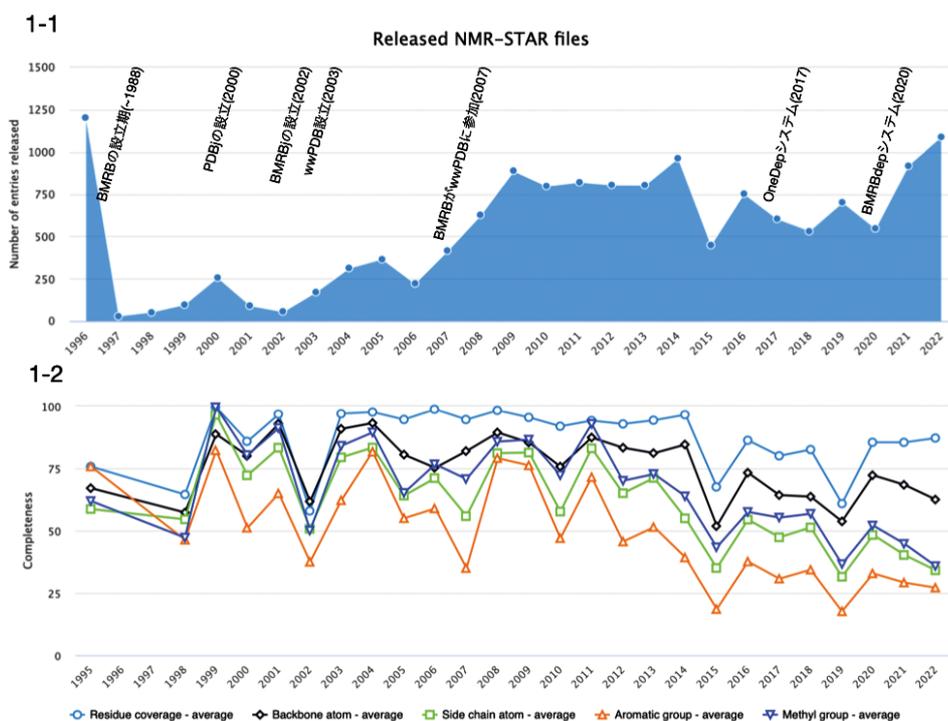


図1 1-1は、BMRBエントリーの各年の公開数の推移。1-2は、各年に公開されたBMRBエントリーにおける化学シフトの平均帰属率の推移。シアンは全ての配列に対して何らかの原子が帰属された残基数の平均被覆率を示し、黒は主鎖原子、緑は側鎖原子、オレンジは芳香族原子、紺はメチル基それぞれの平均帰属率を示す。

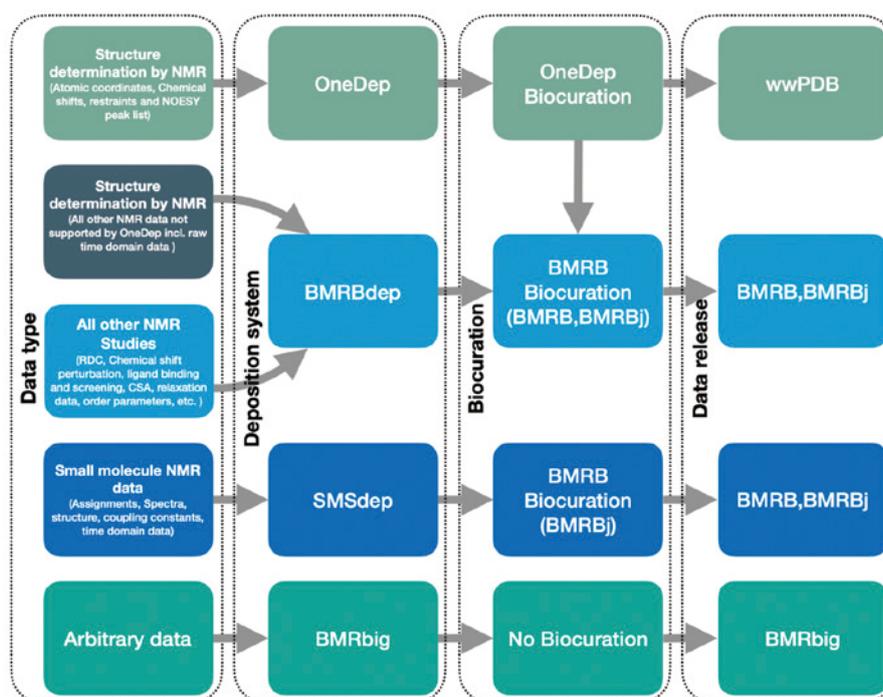


図2 BMRBグループが関わる4つの登録システムにおけるデータの経路

体高分子鎖 (24残基以上のアミノ酸、または4塩基以上の核酸) を含むNMR構造を登録するために用いられる。OneDepは、wwPDBの各パートナーにより管理されており、原子構造、化学シフト、制限情報、NOESYピークリストを受け入れる。登録されたエントリーにはPDB IDとBMRB

IDが同時に付与される。BMRBdepは、OneDepで扱っていないNMRの実験、解析データの登録を受け入れており、結果はNMR-STARファイルに変換される。RCSB PDB^[20] および PDB^[21] のOneDepシステムで登録されたNMR構造のNMR実験データの処理はBMRBが担当し、PDB^[4] お

よびPDBc^[22]の場合はBMRBjがそれぞれ担当している。SMSDep^[21]は、wwPDBの登録基準を満たさない小分子鎖、リガンド、天然物について、NMRを用いて決定された立体構造、化学シフト、制限情報、ピークリストを受け入れている。PDBx/mmCIFあるいはPDB形式の原子構造ファイルも、実験データ部分のNMR-STARファイルと同様にBMRB IDが付与され、BMRBサイトで配布される。BMRbig^[21]は、あらゆるNMR実験データを受け入れているが、他の登録システムとは異なり、必ずしもBMRBによるアノテーションが行われない特徴がある。BMRbigの主な用途として、大規模な研究プロジェクトにおいて、NMR分光計からBMRbigに直接送信して、実験データを逐次整理しておくことで、プロジェクト公開時のデータ共有の迅速化を図ることが想定されている。BMRbigでは、全てのデータファイルがバージョン管理され、公開後もデータファイルの追加、更新が可能である。

ハイブリッド法で決定された生体高分子の立体構造について、OneDepは、X線などの結晶回折法(MX)、Cryo-EM法、NMR法、または3つの方法のうちいずれかを組み合わせたハイブリッド法(Integrative/Hybrid Method; I/HM)で決定された立体構造だけを受け入れている。一方、たとえNMR法をI/HMの手法の一つとして用いていたとしても、クロスリンク、小角散乱、質量分析、プロテオミクス、バイオインフォマティクスなどの事前知識を組み合わせることで構造決定したモデルについては、PDB-Dev^[23]に登録することが推奨されている。これは、OneDepを介してI/HMで使用された一部の実験データが欠落することにより、I/HM構造モデルの妥当性を再検証することができなくなる状況を回避するためである。現在、この問題に関する判断は、研究者の倫理的判断に頼っている。wwPDBとしては、今後I/HMの各実験手法の検証技術が確立できれば、OneDepとPDB-Devの統合、既存のPDB-DevエントリーにPDB IDを付与する可能性を議論している。

3.1 OneDep

OneDepシステムは、wwPDBパートナーにより共同で維持管理されており、BMRBjはNMRデータ登録受付を、BMRBは主に立体構造モデルとNMR実験データの間の整合性を評価するwwPDB検証レポート^[24]の作成をそれぞれ担当し

ている。2020年以降、OneDepでは、化学シフト、距離制限、二面角制限、RDC、NOESYピークリストなど、すべてのNMR実験データを1つのNMR-STARまたはNEFのいずれかのNMR統合ファイルを用いた登録が可能になり、NMR統合ファイルを利用して登録されたエントリーに限って、wwPDB検証レポートにNMR restraint analysisのセクションが追加され、距離制限や二面角制限の違反に関する詳細な統計が記載されるようになった(図3)。wwPDBは、NMR-STAR/NEF形式での単一ファイルによる登録を推奨している。

一方で、2023年春からOneDepは、AMBER^[25]、BIOSYM、CHARMM^[26]、CNS^[27]、CYANA^[28]、DYNAMO/TALOS^[29]/PALES^[30]、GROMACS^[31]、ISD^[32]、ROSETTA^[33]、SYBYL、XPLOR-NIH^[34]のソフトウェア固有の形式のファイルの各種制限情報を登録時にNMR-STAR/NEFに変換できるようになり、新たに登録される全てのNMRエントリーについて、完全なwwPDB検証レポートが生成されるようになった。同時に、特定の条件を満たした既存のPDBエントリーの構造制限情報もNMR-STAR/NEFに変換して配布している。既存の方法^[35]に比べて、はるかに多くのNMR構造決定ソフトウェアに対応し、PRE、PCS、CSAを含むほとんどのNMR実験由来の構造制限情報が扱えるようになった。新しいNMR統合データファイルのアーカイブは、フォーマットが標準化されていることに加えて、PDBx/mmCIFファイルの原子座標と完全な対応が保証されているため、NMR実験データの相互運用性、再利用性が大きく向上している。これらは構造モデルの妥当性評価手法やより高精度なNMR構造決定ソフトウェアの開発のための良質な機械学習の基盤となり得ると、筆者は期待している。なお、従来のソフトウェア固有の形式のファイルを複数選択するPDB登録について、移行期間を設けたうえで、将来廃止する予定である。

3.2 BMRBdep

BMRBとBMRBjは、立体構造決定を伴わないあらゆるNMRデータを登録するためのシステムBMRBdepを運用している。BMRBdepシステムは、2020年に従来のADIT-NMR^[36]に代わり導入され、登録者の使い勝手が大きく向上している。例えば、(1) NMR-STAR辞書を元にして入力値の

8.1 Conformationally restricting restraints (i)

Description	Value
Total distance restraints	1118
Intra-residue ($ i-j =0$)	399
Sequential ($ i-j =1$)	303
Medium range ($ i-j >1$ and $ i-j <5$)	139
Long range ($ i-j \geq 5$)	269
Inter-chain	0
Hydrogen bond restraints	8
Disulfide bond restraints	0
Total dihedral-angle restraints	82
Number of unmapped restraints	0
Number of restraints per residue	16.4
Number of long range restraints per residue ¹	3.8

8.2.1 Average number of distance violations per model (i)

Distance violations less than 0.1 Å are not included in the calculation.

Bins (Å)	Average number of violations per model	Max (Å)
0.1-0.2 (Small)	30.2	0.2
0.2-0.5 (Medium)	72.7	0.5
>0.5 (Large)	67.3	10.02

9.1.1 Bar chart : Distribution of distance restraints and violations (i)

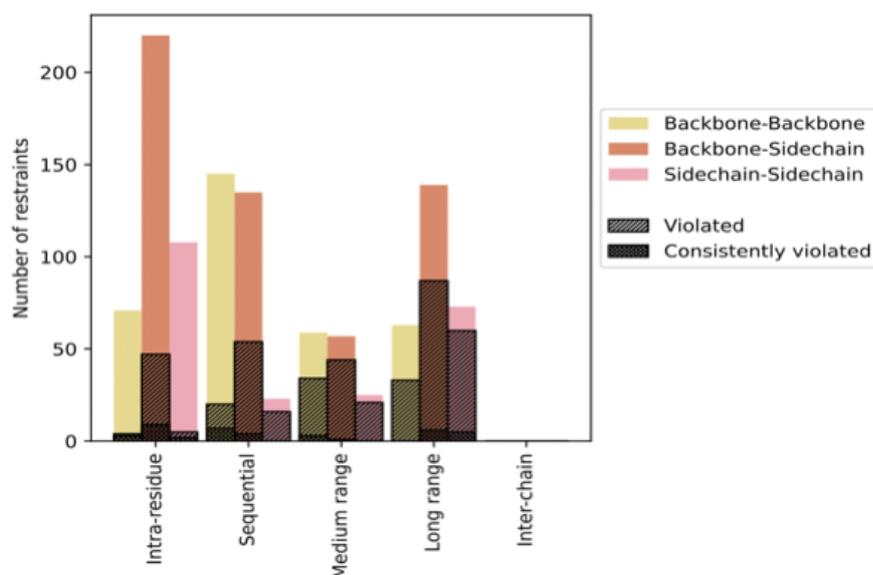


図3 wwPDB検証レポート (PDB ID: 8E9E) のNMR restraint validationの各セクションの表示例。§ 8.1は、構造制限情報の統計。§ 8.2.1は、モデルごとの距離制限違反の平均数。§ 9.1.1は、距離制限情報に対する違反数の割合を示すグラフ。網掛けの黒いバーは、いずれかのモデルで違反した距離制限情報の数、塗りつぶした黒いバーは、全てのモデルで違反した距離制限情報の数を表している。

チェック・自動補完が可能。(2) セッションの逐次保存、オフラインでも登録作業の継続が可能。(3) アップロードしたNMR-STARファイルからメタデータの自動抽出。(4) 任意の時点でエントリーの複製が可能なので、関連するエントリーを複数登録する際には、一部のメタデータを変更するだけで簡単に連続登録できるという特徴がある。

3.3 SMSDep

前述のようにwwPDBには、生体分子のポリマー長に基づく登録基準があり^[37]、SMSDepは、この基準を満たさない小分子鎖（特に24残基を満たさないペプチド鎖）やリガンドなどのNMR構造の登録先となっている。これは、低分子化合物のX線結晶構造がCambridge Structural Database

(CSD)^[38]に登録が促される理由と同じである。なお、ペプチド鎖が24残基未満であっても、それが生物学的に重要と広く認識されている場合、主要引用論文の受理を条件にして、例外的にPDBへの登録が認められることがある。この判断に迷いが生じた場合、まずOneDepに登録に必要なデータをアップロードして、PDBアナーターに直接問い合わせて頂きたい。SMSDepはBMRBjだけが運用しており、構造の検証およびNMR実験データのアノテーションもBMRBjが担当している。

4. Web サイト、ツール (Data-Out)

4.1 BMRB、BMRBjのWebサイト、ツール

BMRBとBMRBjは、共通のBMRBコアアーカイブに基づいているが、それぞれ独自のサービスを提供している。BMRBは、NMR-STAR V3.2辞書などのNMR-STARの利用普及に関わる情報、BMRB API^[2]を介したNMR-STARの検索サービス、これまでに登録された化学シフトの統計情報、専門的な解析ツール、様々なコンバータやPyNMRSTAR^[2]パーサー、さらにNMRbox^[39]と呼ばれるNMR解析ソフトウェアのリポジトリなど、NMR研究者を支える幅広いサービスを提供している。一方、BMRBjは、Web標準技術およびNEFなどのコミュニティ主導の技術に焦点を当て、BMRBコアアーカイブの再利用と相互運用性の向上を目指したサービスを提供している。その成果は、BMRBjの検索サービスに具現化されており、NMRデータの視覚化や関連するデータベースを横断して得られる多岐にわたる情報を検索結果として表示することにつながっている^[40]。以下では、最近のBMRBグループの取り組みのいくつかを紹介する。

4.2 NMR-STAR/NEF統合データの

エコシステムの構築

2023年11月現在、PDBに登録された約4,000件のNMRエントリーに関する化学シフトと構造制限情報が、NMR-STARとNEFの2つの形式に変換されて公開している。BMRBjは、PDBアーカイブの過去のNMRデータの再処理、OneDepに新規登録時に行われるNMR実験データの統合データフォーマットへの変換、OneDep上のNMRデータの可視化、wwPDB検証レポートの作成、そしてPDBとBMRB双方のアノテーショ

ン処理のシステム開発を主導しており、NMR-STAR/NEF統合データファイルによるエコシステムを構築した。次の段階では、(1)多くのNMR構造解析ソフトウェア間でNEFファイル相互交換性の検証作業、普及活動を継続すること。(2)ソフトウェア固有の形式で書かれたピークリストに関して、これをNMR-STAR/NEFファイルに統合すること。(3)wwPDB検証レポートに、RDCを用いた構造検証情報を追加すること。(4)OndDepが従来のソフトウェア固有の形式のファイルの受け入れを廃止する事態に備えて、NMR統合データファイルへの変換サービスを提供することを検討している。

BMRBjは、これまでに開発したOneDepのソフトウェアパッケージ^[41]を応用してNMRデータ登録のアノテーション処理の自動化に成功し、登録者との対話的なコミュニケーションツールを提供している (図4)。

4.2 PyNMR-STAR、BMRB API

PyNMR-STARはBMRBによって開発されたNMR-STAR/NEF用のPythonパーサーであり、BMRB、BMRBj、OneDepシステム内部で多用している。NMR-STARに準拠したファイルの生成、編集に欠かせないライブラリであるので、新たにNMR-STAR/NEFを用いたソフトウェアを開発に取り組む際の最適な選択肢である。BMRB APIは、BMRBコアアーカイブのREST APIであり、問い合わせた結果がJSON形式で返されるため、外部からBMRBコアアーカイブを利用するnightshift^[42]のようなアプリケーションの構築に役立てられている。

4.3 NMRbox

NMRboxは、様々な分野のNMRに関連する解析ソフトウェアやツールを収集し、これらを動作させるためのUConn Healthの計算機クラスターおよびストレージ環境を提供している。現在、NMRスペクトル解析、構造予測、構造決定、構造検証、RDC解析、緩和解析などの分野において、計261種類のNMR解析ソフトウェアが網羅され、仮想マシン環境で動作を試すことが可能である。各プログラムに要求されるライブラリの依存関係、ソフトウェア使用許諾について利用者が気にする必要はない。代替ソフトウェアを簡単に試して比較することも可能である。NMRソフ

トウェアの開発者にとっても、例えば研究室を離れてもソフトウェアの更新を続けたり、インターネット上からプログラムが失われるリスクを回避できるために、NMRboxを利用することは有益であると考えられる。もしNMRの解析ソフトウェアを公表した場合は、NMRboxからのリポジトリ追加の招待に応じて頂けると幸いである。

4.4 ALATISで標準化した小分子のNMRスペクトルデータベース

BMRBは、分子量が1000 Da未満の低分子有機化合物のNMRスペクトルデータベースを提供している。代謝物の1D NMRスペクトルを定量する場合、通常はBMRBやHMDB^[43]などの参照となるスペクトルデータベースと比較することになるが、共鳴線の帰属に関しては、化学シフトが溶媒環境により変化することや、磁場に誘起された分子のわずかな異方的な配向分布の結果、スピンスピン結合定数が磁場強度によって変化することを考慮する必要がある^[44]。さらにスペクトルデータベースに登録された化合物を他の情報源(例: PubChem、ChEBI)と相互参照するためには、分子固有の識別子が必要であり、原子名もデータベースに依存せず一意に識別できたほ

うが望ましい。BMRBのNMRスペクトルデータベースは、ALATISシステム^[45,46]を活用し、立体化学を特定した低分子を固有のInChi文字列で一意に識別して、各原子名を再現可能なALATIS原子命名法に基づいて標準化を済ませた1,200以上の低分子のスペクトルおよび解析結果で構成されている。また、650以上の標準的な小分子スペクトルについては、GISSMOシステム^[47,48]を使用して、任意の磁場強度でスペクトルのシミュレーションが可能である。なお、HMDBもBMRBと同様にALATISシステムを基盤としているので両者には互換性がある。

GISSMOサーバーは、混合物状態の1D NMRスペクトルの自動ピーク解析を実行することが可能である。実験のNMRスペクトルを正確にモデル化するために、スピン系行列が適切にモデル化され、その行列を使用して任意の磁場強度のスペクトルをシミュレーションできる。GISSMOによってモデル化されたすべてのエントリは、NMR-STARおよびNMRメタボロミクス分野での標準であるNMRReDATAデータ形式^[49]で配布している。また、NMRスペクトルデータベースで測定されたBRUKER形式の生データ(FID)について、BMRBjは、NMRメタボロミクス分野の

NMR data deposition: D_1300021678, BMRB ID: 36418, PDB ID: 7ELK

Please respond to BMRBj annotator's comments in the return mail and check that the data content here is correct. Major NMR data issues must be done via the OneDep system.

PMID of the primary citation:

Release BMRB entry 36418 with citation update

① You can submit a release request for this entry using the button above, only if the entry status is **On Hold**. Please respond to the BMRBj annotator's comments at first.
 ② To release your entry without PMID, you need to contact us directory through the return mail from BMRBj annotator.

BMRB: 36418		Solution structure of Terfa derived from Danio rerio	
		Dep_release_code	RELEASE NOW
7ELK		Entry status	rt - Returned to Author
		Entry authors	Yun, J., Kim, M., Lee, W.
		Submission date	2021-04-11
		Accession date	2021-04-30
		Author return date	2023-06-16
		Onhold date	na (WWPDB)
		Release date	na
		Citation (in preparation)	Solution structure of Terfa derived from Danio rerio Kim, M., Yun, J., Lee, W.

[View return mail from BMRBj annotator](#)

図4 登録者本人のみがアクセス可能で、BMRBjのアノテーション結果を確認できるWebページの様子。PubMed IDを入力し、緑のボタンを押すことで、引用文献を更新してBMRBエントリーを公開する要請ができる。このページの底部には、注意事項やエラーメッセージ、様々な統計情報が提供される。

コミュニティーが提案している nmrMR形式^[50]に変換して配布している。このように、BMRB、BMRBjの両グループは、NMRコミュニティーが主導する標準技術の普及について連携して取り組んでいる。

5. 議論

設立から現在まで27年の間、BMRBはオープンデータの原則に則り、BMRBコアアーカイブを維持してきた。この活動によって、NMR研究者は研究論文で使用した実験データを永続的に保管できており、NMRデータの標準化の恩恵を享受している^[51]。現在も、BMRBグループは構造制限情報のフォーマット分断に伴う再利用性や相互運用性の問題解決に積極的に取り組んでいる。BMRBコアアーカイブは、これまで数多くのNMR解析ソフトウェアの発展を促した一方、BMRB自身もその成果を取り入れてアーカイブを補強、拡張している。また、NMRに関連するソフトウェアのリポジトリ (NMRbox) や生データの共有の環境 (BMRbig) を提供することでNMRコミュニティーに還元しようとしている。NMRコミュニティーの研究が活発であり、生成された実験データの再利用の価値が認識されることによって、BMRBの存在意義を見出すことができるため^[52]、今後もBMRBはNMRコミュニティーと協力しながら共に進んでいくと確信している。

6. 終わりに

繰り返しになるが、2023年春に公開されたNMR-STAR/NEF統合データファイルのアーカイブは、NMRで構造決定された原子座標モデルと照らし合わせて機械学習することで、構造モデルの妥当性評価技術や高精度なNMR構造決定ソフトウェアの進展につながるのではないかと期待している。フォーマットが統一され、大量の構造制限情報が揃った本年は、NMR構造解析分野におけるデータ駆動型研究を始めるのにまたとない良い機会ではないかと思われる。

7. 謝辞

本稿に関する研究は、BMRBjグループの藤原敏道先生、児嶋長次郎先生、宮ノ入洋平先生、岩田武史研究員、PDBjグループの栗栖源嗣先生の多大な貢献により遂行することができました。こ

の場をお借りして厚く御礼申し上げます。なお、本稿の内容は、コネチカット大学のJeffrey C. Hoch博士らが率いるBMRBグループの研究成果を含んでいます。

引用文献

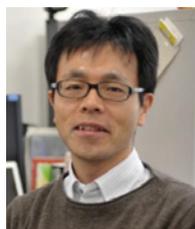
- [1] Gymrek, M., & Farjoun, Y. Recommendations for open data science. *GigaScience*, 5, 22 (2016).
- [2] Hoch, J. C., Baskaran, K., Burr, H., Chin, J., Eghbalnia, H. R., Fujiwara, T., Gryk, M. R., Iwata, T., Kojima, C., Kurisu, G., Maziuk, D., Miyanoiri, Y., Wedell, J. R., Wilburn, C., Yao, H., & Yokochi, M. Biological Magnetic Resonance Data Bank. *Nucleic acids research*, 51(D1), D368–D376 (2023).
- [3] Markley, J. L., Ulrich, E. L., Berman, H. M., Henrick, K., Nakamura, H., & Akutsu, H. BioMagResBank (BMRB) as a partner in the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB): new policies affecting biomolecular NMR depositions. *Journal of biomolecular NMR*, 40(3), 153–155 (2008).
- [4] Bekker, G. J., Yokochi, M., Suzuki, H., Ikegawa, Y., Iwata, T., Kudou, T., Yura, K., Fujiwara, T., Kawabata, T., & Kurisu, G. Protein Data Bank Japan: Celebrating our 20th anniversary during a global pandemic as the Asian hub of three dimensional macromolecular structural data. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 31(1), 173–186 (2022).
- [5] Ulrich, E. L., Baskaran, K., Dashti, H., Ioannidis, Y. E., Livny, M., Romero, P. R., Maziuk, D., Wedell, J. R., Yao, H., Eghbalnia, H. R., Hoch, J. C., & Markley, J. L. NMR-STAR: comprehensive ontology for representing, archiving and exchanging data from nuclear magnetic resonance spectroscopic experiments. *Journal of biomolecular NMR*, 73(1–2), 5–9 (2019).
- [6] Gryk M. R. Deconstructing the STAR File Format. Presented at Balisage: The Markup Conference 2021, Washington, DC, August 2–6 (2021)
- [7] Brown I. D. CIF (Crystallographic Information File): A Standard for Crystallographic Data Interchange. *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*, 101(3), 341–346 (1996).
- [8] Westbrook, J. D., Young, J. Y., Shao, C., Feng, Z., Guranovic, V., Lawson, C. L., Vallat, B., Adams, P. D., Berrisford, J. M., Bricogne, G., Diederichs, K., Joosten, R. P., Keller, P., Moriarty, N. W., Sobolev, O. V., Velankar, S., Vornrhein, C., Waterman, D. G., Kurisu, G., Berman, H. M., ... Peisach, E. PDBx/mmCIF Ecosystem: Foundational Semantic Tools for Structural Biology. *Journal of molecular biology*, 434(11), 167599 (2022).
- [9] Kachala, M., Westbrook, J., & Svergun, D. Extension of the sasCIF format and its applications for data processing and deposition. *Journal of applied crystallography*, 49(Pt 1), 302–310 (2016).
- [10] wwPDB Consortium. EMDB-the Electron Microscopy Data Bank. *Nucleic acids research*, online printing (2023)
- [11] Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy,

- E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M.,... Velankar, S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research*, 50(D1), D439–D444 (2022).
- [12] Markley, J. L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C. W., Kaptein, R., Sykes, B. D., Wright, P. E., & Wüthrich, K. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids—IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the standardization of data bases of protein and nucleic acid structures determined by NMR spectroscopy. *European journal of biochemistry*, 256(1), 1–15 (1998).
- [13] Westbrook, J. D., Shao, C., Feng, Z., Zhuravleva, M., Velankar, S., & Young, J. The chemical component dictionary: complete descriptions of constituent molecules in experimentally determined 3D macromolecules in the Protein Data Bank. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(8), 1274–1278 (2015).
- [14] Montelione, G. T., Nilges, M., Bax, A., Güntert, P., Herrmann, T., Richardson, J. S., Schwieters, C. D., Vranken, W. F., Vuister, G. W., Wishart, D. S., Berman, H. M., Kleywegt, G. J., & Markley, J. L. Recommendations of the wwPDB NMR Validation Task Force. *Structure (London, England : 1993)*, 21(9), 1563–1570 (2013).
- [15] Gutmanas, A., Adams, P. D., Bardiaux, B., Berman, H. M., Case, D. A., Fogh, R. H., Güntert, P., Hendrickx, P. M., Herrmann, T., Kleywegt, G. J., Kobayashi, N., Lange, O. F., Markley, J. L., Montelione, G. T., Nilges, M., Ragan, T. J., Schwieters, C. D., Tejero, R., Ulrich, E. L., Velankar, S.,... Vuister, G. W. NMR Exchange Format: a unified and open standard for representation of NMR restraint data. *Nature structural & molecular biology*, 22(6), 433–434 (2015).
- [16] Yokochi, M., Kobayashi, N., Ulrich, E. L., Kinjo, A. R., Iwata, T., Ioannidis, Y. E., Livny, M., Markley, J. L., Nakamura, H., Kojima, C., & Fujiwara, T. Publication of nuclear magnetic resonance experimental data with semantic web technology and the application thereof to biomedical research of proteins. *Journal of biomedical semantics*, 7(1), 16 (2016).
- [17] Wilkinson, M. D., Dumontier, M., Aalbersberg, I. J., Appleton, G., Axton, M., Baak, A., Blomberg, N., Boiten, J. W., da Silva Santos, L. B., Bourne, P. E., Bouwman, J., Brookes, A. J., Clark, T., Crosas, M., Dillo, I., Dumon, O., Edmunds, S., Evelo, C. T., Finkers, R., Gonzalez-Beltran, A.,... Mons, B. The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Scientific data*, 3, 160018 (2016).
- [18] wwPDB consortium. Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic acids research*, 47(D1), D520–D528 (2019).
- [19] Young, J. Y., Westbrook, J. D., Feng, Z., Sala, R., Peisach, E., Oldfield, T. J., Sen, S., Gutmanas, A., Armstrong, D. R., Berrisford, J. M., Chen, L., Chen, M., Di Costanzo, L., Dimitropoulos, D., Gao, G., Ghosh, S., Gore, S., Guranovic, V., Hendrickx, P. M. S., Hudson, B. P.,... Burley, S. K. OneDep: Unified wwPDB System for Deposition, Biocuration, and Validation of Macromolecular Structures in the PDB Archive. *Structure (London, England : 1993)*, 25(3), 536–545 (2017).
- [20] Burley, S. K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chen, L., Crichlow, G. V., Duarte, J. M., Dutta, S., Fayazi, M., Feng, Z., Flatt, J. W., Ganesan, S. J., Goodsell, D. S., Ghosh, S., Kramer Green, R., Guranovic, V., Henry, J., Hudson, B. P., Lawson, C. L., Liang, Y.,... Zardecki, C. RCSB Protein Data Bank: Celebrating 50 years of the PDB with new tools for understanding and visualizing biological macromolecules in 3D. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 31(1), 187–208 (2022).
- [21] Varadi, M., Anyango, S., Appasamy, S. D., Armstrong, D., Bage, M., Berrisford, J., Choudhary, P., Bertoni, D., Deshpande, M., Leines, G. D., Ellaway, J., Evans, G., Gaborova, R., Gupta, D., Gutmanas, A., Harrus, D., Kleywegt, G. J., Bueno, W. M., Nadzirin, N., Nair, S.,... Velankar, S. PDBe and PDBe-KB: Providing high-quality, up-to-date and integrated resources of macromolecular structures to support basic and applied research and education. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 31(10), e4439 (2022).
- [22] Xu, W., Velankar, S., Patwardhan, A., Hoch, J. C., Burley, S. K., & Kurisu, G. Announcing the launch of Protein Data Bank China as an Associate Member of the Worldwide Protein Data Bank Partnership. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology*, 79(Pt 9), 792–795 (2023).
- [23] Burley, S. K., Kurisu, G., Markley, J. L., Nakamura, H., Velankar, S., Berman, H. M., Sali, A., Schwede, T., & Trewhella, J. PDB-Dev: a Prototype System for Depositing Integrative/Hybrid Structural Models. *Structure (London, England : 1993)*, 25(9), 1317–1318 (2017).
- [24] Gore, S., Sanz García, E., Hendrickx, P. M. S., Gutmanas, A., Westbrook, J. D., Yang, H., Feng, Z., Baskaran, K., Berrisford, J. M., Hudson, B. P., Ikegawa, Y., Kobayashi, N., Lawson, C. L., Mading, S., Mak, L., Mukhopadhyay, A., Oldfield, T. J., Patwardhan, A., Peisach, E., Sahni, G.,... Kleywegt, G. J. Validation of Structures in the Protein Data Bank. *Structure (London, England : 1993)*, 25(12), 1916–1927 (2017).
- [25] Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr, Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., & Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1668–1688 (2005).
- [26] Brooks, B. R., Brooks, C. L., 3rd, Mackerell, A. D., Jr, Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K.,... Karplus, M. CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of computational chemistry*, 30(10), 1545–1614 (2009).
- [27] Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., & Warren, G. L. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallog-*

- raphy, 54(Pt 5), 905–921 (1998).
- [28] Würz, J. M., Kazemi, S., Schmidt, E., Bagaria, A., & Güntert, P. NMR-based automated protein structure determination. *Archives of biochemistry and biophysics*, 628, 24–32 (2017).
- [29] Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., & Bax, A. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *Journal of biomolecular NMR*, 44(4), 213–223 (2009).
- [30] Zweckstetter M. NMR: prediction of molecular alignment from structure using the PALES software. *Nature protocols*, 3(4), 679–690 (2008).
- [31] Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B., & Lindahl, E. (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(7), 845–854 (2013).
- [32] Rieping, W., Nilges, M., & Habeck, M. ISD: a software package for Bayesian NMR structure calculation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(8), 1104–1105 (2008).
- [33] Leaver-Fay, A., Tyka, M., Lewis, S. M., Lange, O. F., Thompson, J., Jacak, R., Kaufman, K., Renfrew, P. D., Smith, C. A., Sheffler, W., Davis, I. W., Cooper, S., Treuille, A., Mandell, D. J., Richter, F., Ban, Y. E., Fleishman, S. J., Corn, J. E., Kim, D. E., Lyskov, S.,... Bradley, P. ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods in enzymology*, 487, 545–574 (2011).
- [34] Schwieters, C. D., Bermejo, G. A., & Clore, G. M. Xplor-NIH for molecular structure determination from NMR and other data sources. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 27(1), 26–40 (2018).
- [35] Tejero, R., Snyder, D., Mao, B., Aramini, J. M., & Montelione, G. T. PDBStat: a universal restraint converter and restraint analysis software package for protein NMR. *Journal of biomolecular NMR*, 56(4), 337–351 (2013).
- [36] Ulrich, E. L., Akutsu, H., Doreleijers, J. F., Harano, Y., Ioannidis, Y. E., Lin, J., Livny, M., Mading, S., Maziuk, D., Miller, Z., Nakatani, E., Schulte, C. F., Tolmie, D. E., Kent Wenger, R., Yao, H., & Markley, J. L. BioMagResBank. *Nucleic acids research*, 36(Database issue), D402–D408 (2008).
- [37] wwPDB Deposition Policies and wwPDB Biocuration Procedures, <https://www.wwpdb.org/documentation/policy>
- [38] Groom, C. R., Bruno, I. J., Lightfoot, M. P., & Ward, S. C. The Cambridge Structural Database. *Acta crystallographica Section B, Structural science, crystal engineering and materials*, 72(Pt 2), 171–179 (2016).
- [39] Maciejewski, M. W., Schuyler, A. D., Gryk, M. R., Moraru, I. I., Romero, P. R., Ulrich, E. L., Eghbalnia, H. R., Livny, M., Delaglio, F., & Hoch, J. C. NMRbox: A Resource for Biomolecular NMR Computation. *Biophysical journal*, 112(8), 1529–1534 (2017).
- [40] Kinjo, A. R., Bekker, G. J., Wako, H., Endo, S., Tsuchiya, Y., Sato, H., Nishi, H., Kinoshita, K., Suzuki, H., Kawabata, T., Yokochi, M., Iwata, T., Kobayashi, N., Fujiwara, T., Kurisu, G., & Nakamura, H. New tools and functions in data-out activities at Protein Data Bank Japan (PDBj). *Protein science : a publication of the Protein Society*, 27(1), 95–102 (2018).
- [41] wwPDB GitHub repository: py-wwpdb_utils_nmr, https://github.com/wwPDB/py-wwpdb_utils_nmr
- [42] Fucci, I. J., & Byrd, R. A. nightshift: A Python program for plotting simulated NMR spectra from assigned chemical shifts from the Biological Magnetic Resonance Data Bank. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 31(1), 63–74 (2022).
- [43] Wishart, D. S., Guo, A., Oler, E., Wang, F., Anjum, A., Peters, H., Dizon, R., Sayeeda, Z., Tian, S., Lee, B. L., Berjanskii, M., Mah, R., Yamamoto, M., Jovel, J., Torres-Calzada, C., Hiebert-Giesbrecht, M., Lui, V. W., Varshavi, D., Varshavi, D., Allen, D.,...Gautam, V. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic acids research*, 50(D1), D622–D631 (2022).
- [44] Jokisaari, J., Kantola, A. M., & Vaara, J. Magnetic field-induced effects on NMR properties. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)*, 281, 1–6 (2017).
- [45] Dashti, H., Westler, W. M., Markley, J. L., & Eghbalnia, H. R. Unique identifiers for small molecules enable rigorous labeling of their atoms. *Scientific data*, 4, 170073 (2017).
- [46] Dashti, H., Wedell, J. R., Westler, W. M., Markley, J. L., & Eghbalnia, H. R. Automated evaluation of consistency within the PubChem Compound database. *Scientific data*, 6, 190023 (2019).
- [47] Dashti, H., Westler, W. M., Tonelli, M., Wedell, J. R., Markley, J. L., & Eghbalnia, H. R. (2017). Spin System Modeling of Nuclear Magnetic Resonance Spectra for Applications in Metabolomics and Small Molecule Screening. *Analytical chemistry*, 89(22), 12201–12208 (2017).
- [48] Dashti, H., Wedell, J. R., Westler, W. M., Tonelli, M., Aceti, D., Amarasinghe, G. K., Markley, J. L., & Eghbalnia, H. R. Applications of Parametrized NMR Spin Systems of Small Molecules. *Analytical chemistry*, 90(18), 10646–10649 (2018).
- [49] Pupier, M., Nuzillard, J. M., Wist, J., Schlörer, N. E., Kuhn, S., Erdelyi, M., Steinbeck, C., Williams, A. J., Butts, C., Claridge, T. D. W., Mikhova, B., Robien, W., Dashti, H., Eghbalnia, H. R., Farès, C., Adam, C., Kessler, P., Moriaud, F., Elyashberg, M., Argyropoulos, D.,... Jeannerat, D. NMReDATA, a standard to report the NMR assignment and parameters of organic compounds. *Magnetic resonance in chemistry : MRC*, 56(8), 703–715 (2018).
- [50] Schober, D., Jacob, D., Wilson, M., Cruz, J. A., Marcu, A., Grant, J. R., Moing, A., Deborde, C., de Figueiredo, L. F., Haug, K., Rocca-Serra, P., Easton, J., Ebbels, T. M. D., Hao, J., Ludwig, C., Günther, U. L., Rosato, A., Klein, M. S., Lewis, I. A., Luchinat, C.,... Neumann, S. nmrML: A Community Supported Open Data Standard for the Description, Storage, and Exchange of NMR Data. *Analytical chemistry*, 90(1), 649–656 (2018).
- [51] Markley, J. L., & Westler, W. M. Biomolecular NMR: Past and future. *Archives of biochemistry and biophysics*, 628, 3–16 (2017).
- [52] Markley, J. L., Akutsu, H., Asakura, T., Baldus,

M., Boelens, R., Bonvin, A., Kaptein, R., Bax, A.,
Bezsonova, I., Gryk, M. R., Hoch, J. C., Korzhnev,
D. M., Maciejewski, M. W., Case, D., Chazin, W.
J., Cross, T. A., Dames, S., Kessler, H., Lange, O.,

Madl, T.,... Yokoyama, S. In support of the BMRB.
Nature structural & molecular biology, 19(9), 854–
860 (2012).

**横地 政志 (よこち・まさし)**

1996年 3月 明治大学理工学部物理学科卒業
1998年 3月 明治大学基礎理工学専攻博士前期課程修了 (理学修士)
1998年 4月 科学技術振興事業団 技術員
2002年 6月 北海道大学大学院薬学研究院 研究員
2007年 7月 北海道大学大学院先端生命研究科学院 研究員
2012年 11月 大阪大学蛋白質研究所 研究員
2022年 10月 蛋白質研究奨励会 研究員

NOAH、UTOPIA-NMRによるNMR測定における タイムパフォーマンス向上

ブルカージャパン株式会社バイオスピン事業部アプリケーション部

金場 哲平

tepei.kanaba@bruker.com

1. はじめに

低分子有機化合物のNMR解析では1D ^1H 、 ^{13}C 測定や2D ^1H - ^1H COSY、TOCSY、NOESY、2D ^1H - ^{13}C HSQC、HMBCなど複数のNMR測定を実施し、それらスペクトルを総合的に解析していくことで構造決定を行います。これら一連のNMR測定を行うためには長い時間が必要になります。一連のNMR測定の時間を短縮することはNMR装置のマシントイムの効率を向上させるために重要となります。NMR測定時間の短縮方法として様々な手法が開発されてきましたが、本稿ではNOAH (NMR by ordered acquisition using ^1H detection)^[1-3]とUTOPIA-NMR (unified time-optimized interleaved acquisition NMR)^[4]と呼ばれる方法について解説します。

NOAH、UTOPIA-NMRでは複数のNMR測定が一つのパルスシーケンスで実行されます。つまりこれらの測定法においては複数のNMR測定が一回の繰り返し待ち時間で実行されることとなります。通常のNMR測定では一回の積算ごとに繰り返し待ち時間、すなわち磁化が熱平衡状態に戻る縦 (T_1) 緩和のための待ち時間 (図1のrelaxation delay) をとる必要があります。一般的なNMRのパルスシーケンスの時間が数ミリ~数百ミリ秒程度であるのに対し、縦緩和の待ち時間は数秒のオーダーに設定します。よってNMR測定時間の全体において緩和の待ち時間は非常に大きなウェ

イトを占めていることとなります。同じサンプルについて複数のNMR測定を行う場合、各測定ごとに緩和の待ち時間を設定することになりますが、NOAH、UTOPIA-NMRでは一度の緩和の待ち時間で複数のNMR測定を行うことにより全体のNMR測定時間の短縮を試みています (図1)。

2. NOAH

NOAHはNMR by ordered acquisition using ^1H -detectionの略で2017年にKupčeらによって発表された方法です。名前に ^1H -detectionとあるように複数の ^1H 検出の2D測定を一つのパルスシーケンスとして実行します。このような測定を実現するため、NOAHにおけるそれぞれの2D測定のパルスシーケンスには工夫が凝らされています。一般的に低分子有機化合物の2D NMR測定に用いられているパルスシーケンスではグラジエントパルスを用いて観測したい ^1H 磁化成分のみを取り出し、そのNMR信号を観測しています (例： ^1H - ^{13}C HSQC測定においては ^{13}C に直接結合している ^1H の磁化)。観測に寄与してほしくない磁化成分、すなわちバルクの ^1H 磁化 (例： ^1H - ^{13}C HSQC測定においては ^{12}C に結合している ^1H の磁化)はグラジエントパルスによってXY平面上でdephaseされており、NMR測定において観測不可能な状態になっています。このdephaseされているバルクの ^1H 磁化の中には他の種類のNMR測定においては観測に使用したい ^1H 磁化成分が含まれています (例えば ^1H - ^{12}C - ^{13}C の ^1H 磁化成分はHMBCの観測に必要)。そのため、もし一般的な2D測定のパルスシーケンスを単純に複数つないで測定を行った場合には、後ろの測定で観測したい磁化はすでにdephaseされておりその感度は著しく低下することとなります。NOAH技術を用いた連続2D測定のパルスシーケンスではこのバルクの ^1H 磁化が前半のシーケンスの途中でZ方向に保持されるようにデザインされています。Z磁化は

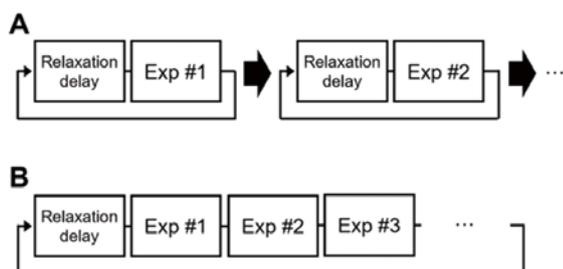


図1 NOAH、UTOPIA-NMRによるNMR測定時間の短縮 通常のNMR測定 (A)とNOAH、UTOPIA-NMRにおけるNMR測定 (B)の模式図

グラジエントパルスの影響を受けませんし、また横磁化よりも長くコヒーレンスが維持されやすいです。保持されているバルクの¹H磁化を用いて続く別の2D測定を直ちに開始する、というのがNOAHのパルスシーケンスの基本的な原理です。

NOAHの単純な例として、2D ¹H-¹³C HSQCと2D ¹H-¹³C HMBCをつないだパルスシーケンスを図2に示します。こちらのパルスシーケンスを通して磁化の挙動について具体的に考えてみます。図2Bの前半部分がNOAHで用いられている典型的なHSQCのシーケンス、後半部分がHMBCのシーケンスです。どちらもEcho-Antiechoタイプのシーケンスです。通常のEcho-AntiechoタイプのHSQCのシーケンスではコヒーレンス選択のためのグラジエントパルスが t_1 展開期の後に挿入されますが、NOAHで用いているHSQCのシーケンスでは展開期の前後に二つに分けて挿入されています。このような形でも¹³Cに直接結合している¹Hの磁化成分を選択することは可能です。それ以外のバルクの¹H磁化の挙動を図2Cにベクトルモデルを用いて示します。グラジエントパルス

が照射される部分に着目しますと $f \rightarrow g$ 、 $h \rightarrow i$ の間にそれぞれ G_1 のグラジエントパルスが照射されます。この間バルクの磁化はXY平面上にありますのでこれらグラジエントパルスの影響を受けます。しかし間に¹Hの180度パルスがありこの部分はグラジエントエコーとなっているため、この二つのグラジエントの影響は打ち消されます。また G_2 のグラジエントパルスが照射される時にはバルクの¹H磁化はZ方向を向いています(図2Cのl)。そのためバルクの¹H磁化はこのグラジエントパルスの影響を受けません。最終的にHSQCのパルスシーケンス終了時にはバルクの¹H磁化はグラジエントパルスの影響を受けていない状態でZ方向に保持されていることとなります。このバルクの¹H磁化にはHMBCの検出に使用する¹Hの磁化成分も含まれています。よってこの直後にHMBCのパルスシーケンスを開始することができます。なお図2BではHMBC部分についてもNOAHタイプのシーケンスを示しています。そのためHMBCシーケンスの直後にCOSY等の別のシーケンスをつなぐことも可能です。さ

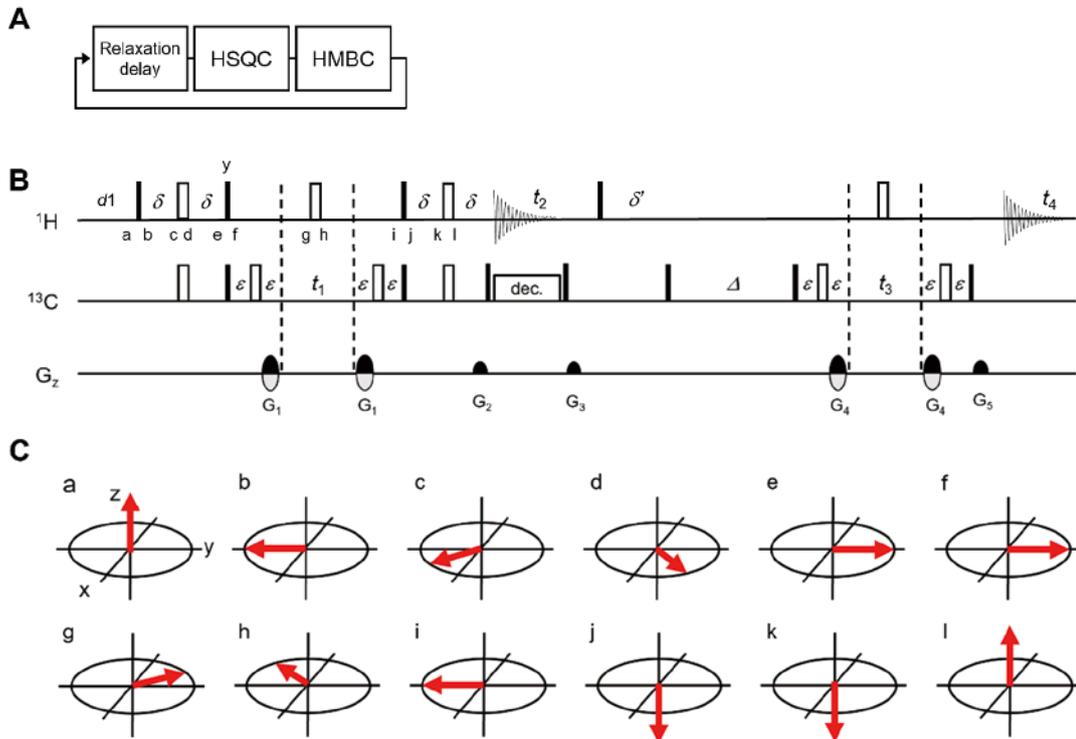


図2 NOAH HSQCとHMBC測定のパルスシーケンス (A) NOAHでのHSQCとHMBC測定の模式図。(B) パルスシーケンスの模式図。図中の黒塗りの四角形は90度パルス、白塗りの四角形は180度パルスを表す。位相が示されていないパルスは位相xとなる。 d_1 は繰り返し待ち時間 (relaxation delay)、 δ は $1/4J_{CH}$ 、 δ' は $1/2J_{CH}$ 、 Δ は $1/2J_{CH}$ (long range) に対応するディレイとなる。また t_1 、 t_2 はHSQCシーケンスの展開時間と取り込み時間、 t_3 、 t_4 はHMBCの展開時間と取り込み時間を表す。 t_1 、 t_3 ポイントのインクリメントは同時に行う。グラジエントパルス G_1 、 G_2 、 G_3 、 G_4 、 G_5 の強度はそれぞれ ± 40 G/cm、 20.1 G/cm、 ± 6.6 G/cm、 40 G/cm、 20.1 G/cmとなる。Echo-Antiechoセレクションのために一つの t_1 、 t_3 ポイントについて G_1 、 G_4 の符号を変更した二つのFIDを取得する。(C) 図2Bのa-lにおけるバルクの¹H磁化の挙動を示す。

らにCOCONOSY^[5]の手法を組み合わせることでHSQC→HMBC→COSY→NOESYという4種類の測定を一度に行うようなパルスシーケンスも存在します。

3. UTOPIA-NMR

UTOPIA-NMRは2016年にViegasらによって発表されました。NOAHでは複数の¹H検出の2D測定を組み合わせる測定を行っていましたが、UTOPIA-NMRと呼ばれる測定では異なる核種で検出を行う複数の測定を一つのパルスシーケンスで実行します。Viegasらの論文においては3D (¹H, ¹H, ¹⁵N) NOESY TROSY (¹H検出)と¹³C-¹³C FLOPSY (¹³C検出)の組み合わせなど、安定同位体標識されたタンパク質サンプルに適用する測定がメインとして報告されています。同論文において低分子有機化合物のサンプルに適用可能な2D ¹H相関測定と1D ¹³C測定を組み合わせる測定も報告されており、本稿ではこちらについて紹介します。

UTOPIA-NMRの例として2D ¹H-¹H NOESYと1D ¹³C (inverse gated ¹H decoupling) を一つの実験として測定するパルスシーケンスを図3に示します。最初の2D NOESYでは¹Hの磁化を観測し、続く1D ¹³C測定では¹³Cの磁化を観測します。2D NOESYのパルスシーケンスの間、¹³Cの磁化はずっとZ方向を向いており、グラジエントパルスの影響も受けません。そのため2D NOESYのシー

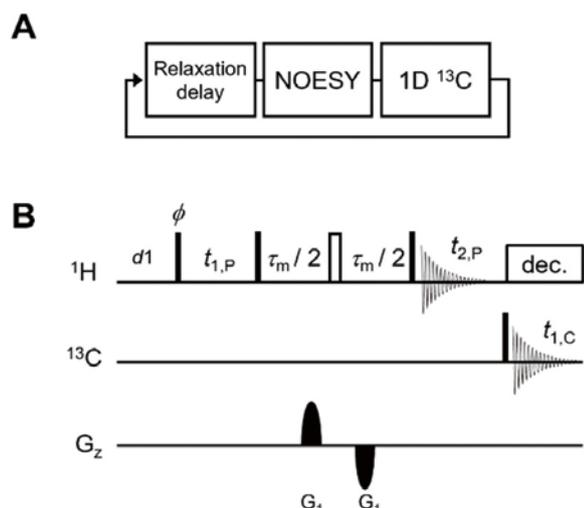


図3 UTOPIA-NMR、2D NOESYと1D ¹³C測定のパルスシーケンス (A) UTOPIA-NMRでの2D NOESYと1D ¹³C測定のパルスシーケンスの模式図。(B) パルスシーケンスの模式図。図中の位相φは{x, -x}、 $t_{2,P}$ におけるレシーバーの位相は{x, -x}となる。また τ_m はNOESYの混合時間を表す。 $t_{1,P}$ 、 $t_{2,P}$ はNOESYにおける展開時間と取り込み時間、 $t_{1,C}$ は1D ¹³C測定における取り込み時間を表す。グラジエントパルス G_1 の強度は20 G/cmとなる。

ケンスの後にただちに1D ¹³Cのパルスシーケンスを開始することができます。またこちらのシーケンスのサイクル数は{2D NOESYの積算回数}×{F1軸(間接観測軸)のポイント数}になります。このサイクル数が1D ¹³C測定にとっての積算回数にあたります。¹H検出の測定に比べ¹³C検出の測定は一般的に感度が非常に低くなりますが、2Dの¹H相関測定と1D ¹³C測定を組み合わせることで積算回数のバランスもとれていることとなります。こちらで紹介しました2D NOESYと1D ¹³Cの測定は、パルスシーケンスとしては単純な部類になると思います。しかしこの測定では一回の測定で異なる核種のFID直接検出を行うこととなりますのでレシーバーユニットを複数搭載したNMR分光計など、特殊な構成の装置が必要です。

4. NOAH、UTOPIA-NMRでの測定例

NOAH、UTOPIA-NMRのパルスシーケンスを用いて測定を実行した例を図4に示します。測定サンプルには有機低分子化合物のストリキニーネを用いました。NOAHでのHSQCとHMBC測定の繰り返し待ち時間は1.5秒、積算回数は2回、F₂軸(直接観測軸)のポイント数は1,024、F₁軸のポイント数は128に設定しました。またHSQCには¹³C multiplicity-editedタイプのシーケンスを用いました。この実験の測定時間は8分でした。HSQC、HMBCを同じ条件で別個に実行するとそれぞれ7分程度かかります。NOAHで測定を行うことにより測定時間をおおよそ半分に短縮することができました。UTOPIA-NMRでは2D NOESYにおける繰り返し待ち時間を3秒、混合時間を1秒、積算回数を4回に設定し、F₂軸のポイント数を2,048、F₁軸のポイント数を128に設定しました。この時の1D ¹³Cの積算回数は4×128=512になります。また1D ¹³C測定におけるポイント数は65,536に設定しました。こちらの条件での測定時間は約50分でした。同じ条件でNOESY、1D ¹³Cを別々に測定する場合、それぞれ40分前後の時間が必要になります。こちらの実験についてもUTOPIA-NMRにより測定時間を半分程度に短縮することができました。

5. 最後に

本稿ではNOAH、UTOPIA-NMRについて解説しました。これらの手法を使用することにより低分子有機化合物の構造決定に使用する一連の

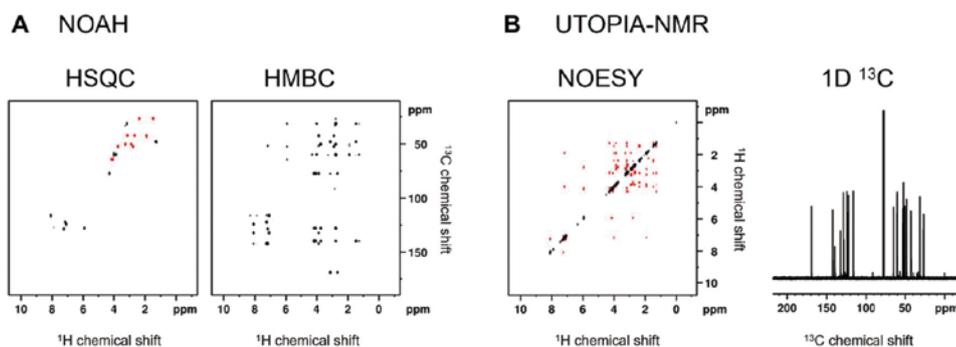


図4 NOAH、UTOPIA-NMRを用いて測定したNMRスペクトル (A) NOAHのシーケンスで測定を行った2D ^1H - ^{13}C HSQC、2D ^1H - ^{13}C HMBCスペクトル。(B) UTOPIA-NMRのシーケンスで測定を行った2D NOESY、1D ^{13}C スペクトル。これらの測定には400MHz AVANCE NEO分光計、室温2重共鳴プローブを用いた。

NMR測定にかかる時間を大幅に短縮することができます。またNOAH、UTOPIA-NMRによる複数のNMRスペクトルの同時取得には測定時間短縮以外のメリットもあります。例えばサンプルが不安定な場合、従来法を用いて複数のNMR測定を順番に実行するとサンプルの経時変化によりスペクトルごとにピークの化学シフトが変化してしまうことがあります。このほか、NMR実験によってはスピロックやデカップリングによってサンプルの実温度がわずかに上昇することがあり、これもNMRスペクトルごとの化学シフトの変化を誘発します。このような各NMRスペクトルにおける化学シフトの変化はNMR解析の妨げとなります。NOAH、UTOPIA-NMRによるNMR測定では一つのパルスシーケンスで複数のNMRスペクトルを測定するため、スペクトル間における化学シフトの変化を抑える効果があります。

本稿で紹介しましたNOAHやUTOPIA-NMRを使用したNMR測定を行うには専用のパルスシーケンス、もしくは特殊な装置構成が必要になります。NOAHの測定では様々な2D測定の組み合わせが可能です。それを実行するためにはその組み合わせごとのパルスプログラムが必要です。最近では実行したい測定の組み合わせを選択することによりNOAHのパルスプログラムを自動生成するサイトが公開されているようです^[6]。また

UTOPIA-NMRの実行に必要なマルチレシーバーを搭載したNMR装置についても、以前は台数が少なかったのですが近年では広く普及しているように思います。より身近にNOAHやUTOPIA-NMRの測定を実行できるようになってきておりますので、もしご興味のある方はこれらの測定をお試しいただければと思います。

引用文献

- [1] Kupče, Ě. & Claridge, T.D.W. NOAH: NMR Supersequences for Small Molecule Analysis and Structure Elucidation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 11779-11783 (2017)
- [2] Kupče, Ě. & Claridge, T.D.W. New NOAH modules for structure elucidation at natural isotopic abundance. *J. Magn. Reson.* **307**, 106568 (2019)
- [3] Yong, J.R.J., Hansen, A.L., Kupče, Ě. & Claridge, T.D.W. Increasing sensitivity and versatility in NMR supersequences with new HSQC-based modules. *J. Magn. Reson.* **329**, 107027 (2021)
- [4] Viegas, A., Viennet, T., Yu, T.Y., Schumann, F., Bermel, W., Wagner, G. & Etzkorn, M. UTOPIA NMR: activating unexploited magnetization using interleaved low-gamma detection. *J. Biomol. NMR* **64**, 9-15 (2016)
- [5] Haasnoot, C.A.G., van de Ven, F.J.M. & Hilbers, C.W. COCONOSY. Combination of 2D correlated and 2D nuclear overhauser enhancement spectroscopy in a single experiment. *J. Magn. Reson.* **56**, 343-349 (1984)
- [6] Yong, J.R.J., Kupče, Ě. & Claridge, T.D.W. Modular Pulse Program Generation for NMR Supersequences. *Anal. Chem.* **94**, 2271-2278 (2022)



金場 哲平 (かなば・てっぺい)

2013年 首都大学東京 (現: 東京都立大学) 大学院理工学研究科分子物質化学専攻博士後期課程 修了

2013年 首都大学東京理工学研究科 研究員

2014年 ブルカー・バイオスピニング株式会社 (現: ブルカー・ジャパン株式会社) 契約社員

2016年 ブルカー・バイオスピニング株式会社 入社 現在に至る

京都大学 化学研究所 梶研究室

京都大学 化学研究所
鈴木 克明、梶 弘典
kaji@scl.kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

我々が所属している京都大学化学研究所は30の研究室から構成されており、化学を中心に、物理、生物、インフォマティクスに関する基礎研究をベースとした先駆的、先端的研究を進めています。また、協力講座として、京都大学のすべての理系研究科と連携しており（すなわち、化学研究所は理系の広い研究分野を網羅しており）、学際的な研究、新規分野の開拓を進めています。

そのなかで、我々の研究室は有機エレクトロルミネッセンス（有機EL）に関わる諸現象を、分子・電子のレベルから理解するとともに、高性能有機ELデバイスの実現を目指し、研究を進めています。

当研究室には現在、9名の教員・スタッフ、4名の博士課程学生、6名の修士課程学生、1名の学部学生が在籍しています。学部学生は毎年1-2名の4回生が配属され、修士課程には内部進学を含め各学年2-3名の学生が配属されます。また、ここ数年は毎年1-2名、博士後期課程に進学する学生がいます。彼らは、基礎を重視しながら自主的に、また、意欲的に研究を進めてくれています。

2. 当研究室の装置群 — NMR を中心として

現在、当研究室では、Bruker Avance III 800 MHz（溶液・固体兼用）、600 MHz（溶液専用）、400 MHz（固体専用）、Avance NEO 600 MHz（固体専用）、Avance NEO 400 MHz DNP-NMR（固

Avance III 800 MHz



Avance III 600 MHz



Avance III 400 MHz



Avance NEO 600 MHz



ECA 600 MHz



Avance NEO 400 MHz DNP-NMR



- | Avance III 800 MHz | Solids |
|---|---|
| • TXI 5 mm | • 4 mm ^{15}N - ^{31}P /H |
| • BBO 5 mm | • 3.2 mm ^{163}W - ^{23}Na /H |
| • BBO10 mm | • 2.5 mm ^{13}C - ^{31}P / ^{15}N - ^{29}Si /H |
| • Diff30 | • 1.3 mm ^{15}N - ^{31}P /H |
| • CPTCI 5mm (Cryoprobe) | • Static: 5mm ^{13}C , ^{79}Br , ^{31}P , ^{15}N /H |
| Avance NEO 600 MHz | |
| • 0.7 mm ^{15}N - ^{31}P /H | |
| • 1.3 mm ^{15}N - ^{31}P /H- ^{19}F | |
| • 3.2 mm ^{15}N - ^{31}P /H | |
| • 3.2 mm ^{15}N , 2H/ ^{13}C /H | |
| Avance III 400 MHz | |
| • 4 mm ^{15}N - ^{31}P /H | |
| • 4 mm ^{15}N - ^{29}Si / ^{13}C /H | |
| • 2.5 mm ^{15}N - ^{13}C / ^{19}F -H | |
| • 7 mm ^{15}N - ^{31}P /H | |
| • Static: 5mm ^{15}N / ^{13}C /H | |
| Avance NEO DNP-NMR | |
| • 3.2 mm ^{15}N - ^{31}P /H | |
| • Static 5 mm ^{15}N - ^{31}P /H (光照射) | |
| • Static 5 mm ^{15}N - ^{31}P /H (電流励起) | |

図1 梶研究室管理下にあるNMR装置とプローブ群

体専用)、JEOL ECA 600MHz (溶液専用) の計6台のNMR装置を管理しています(図1)。それぞれの装置には、標準的なプローブに加えて、cryoプローブ、diffusionプローブ、0.7mm、1.3mm、2.5mm、3.2mm、4mm、7mm MASプローブ、5mm staticプローブ、照射プローブ、電流励起プローブ等、特徴のある充実したプローブ群が備え付けられています。

これらのNMR装置に加え、各種分光光度計、有機デバイス作製および評価装置、有機合成関連装置、ワークステーション等を設置しており、有機ELの基礎から応用にわたる研究を一貫して行うことができる、という点が大きな特徴となっています。

3. 研究活動

上述の通り、我々の研究室では主に有機ELデバイスに関する研究を行っています。有機ELは、電気(電荷)を光に変換する新しいデバイスです。先人たちが、基本的に絶縁体である有機物質に電流を流すという研究を始めたとき、その基礎研究の重要性が理解されなかったことは容易に想像できます。しかし、それ以降の基礎、応用両面での進展により、現在では、スマートフォン、テレビ、コンピュータ用ディスプレイ、さらには車載用といった、様々な局面での実用化が大きく花開きつつあります。一方、有機ELデバイスにおける「電荷輸送や発光」の詳細に関する基礎科学は未開拓な状況で、「有機分子がデバイス中でどのような構造をとっているのか」といったことすら明確にされていません。

このような状況のもと、当研究室では、有機ELデバイスに関わる諸現象を、実験および計算の両面から基礎的に理解すること、また、優れた特性を有する有機ELデバイスを実現すること、を目的として、「有機発光材料のハイスループット開発と高性能有機ELデバイスの実現」^[1~8]、「精密量子化学計算に基づく発光過程の定量的予測と基礎的理解」^[9~11]、「マルチスケールシミュレーションに基づく電荷輸送過程の定量的予測と基礎的理解」^[12~15]、「有機ELのNMR解析」^[16~28]の4つを柱として研究に取り組んでいます。

今回、これらの研究を概説することにより、なぜNMR解析が必要か、その重要性を理解していただいたうえで、最近の我々のNMR研究の一端を紹介させていただきます。

3.1 ハイスループットスクリーニングによる優れた有機発光材料の設計・開発と高効率有機ELデバイスの実現

発光材料の開発に関しては、従来の蛍光材料では起こり得なかった、三重項励起子から一重項励起子への変換(逆項間交差、RISC)が可能な新規熱活性化遅延蛍光(TADF)材料の開発に力を入れています。物理化学ベースのスクリーニングにより、有機ELデバイス内で生じた励起子を100%の効率で光に変換することに2015年に成功し^[1]、それ以来、高効率な青色発光材料や高速なRISCを示す材料など、世界最高性能を示す材料の実現に成功してきました^[2~8]。最近では、マテリアルズ・インフォマティクスを利用することにより、さらなる高性能スクリーニング、広大な化学空間での材料探索へと展開を進めています。

3.2 発光に関する速度定数の定量的予測と発光現象の包括的理解

また、最近では、定量的な電子遷移速度定数予測法を開発し、輻射(蛍光、りん光)および無輻射失活、内部転換、項間および逆項間交差といった、発光に関わるすべての電子遷移に対する速度定数、また、量子収率を定量的に予測することに成功しています^[9~11]。これにより、実験をすることなく計算のみによる定量的予測が可能になるとともに、あらゆる時間スケールにおける励起子の時間発展を定量的かつ包括的に把握することが可能となりました。

この速度定数予測法は、有機ELのみでなく、様々な分野での応用が可能です。例えば、アルツハイマー病発症の原因と言われている、アミロイドβペプチドの凝集を抑制する新規光触媒の開発に本手法を用いています。この新規光触媒が凝集を抑制する触媒として機能すること、また、スイッチング機能により、副作用が従来の触媒と比べて大幅に軽減されることを理論面から確証することに成功しています(東大、金井先生、三ツ沼先生との共同研究。論文投稿中)。

3.3 マルチスケール電荷輸送シミュレーション

これら、分子レベルでの開発・解析に加え、量子化学計算、分子動力学法、動的モンテカルロ法を併用したマルチスケールシミュレーションにより、非晶凝集系における分子配向や電荷移動度を、可変パラメータを一切用いることなく定量的

に予測することにも成功しています^[12~15]。この研究により、非晶凝集系における電荷の輸送挙動を分子レベルで明らかにすることも可能になります。現在、この研究を進展させ、計算機の中で有機ELデバイスそのものを再現する、*in silico*有機ELの開発に向けて、研究を進めています。

3.4 有機ELのNMR解析

上述の量子化学計算、マルチスケールシミュレーションにより、有機デバイスに関する電子・分子レベルでの極めて詳細な基礎的知見を計算面から得ることが可能となっています。一方、その微視的レベルでの知見を実験的に得ることはいまだ困難な状況にあります。その一つの理由は、有機ELデバイス中では、発光や電荷輸送を担う有機分子が非晶状態にあり、その構造が未解明なためです。もちろん、そのような解析にはNMRが最適であることから、我々は実験面からのアプローチとして、NMRをベースとした基盤構築を進めています^[16~28]。例えば、有機ELに用いられる分子の発光特性を、²⁷Al、¹³C NMR、また、MQMAS測定により明らかにしています^[16, 18, 19]。また、GIPAW計算により、さらに詳細な解析を

行っています^[23, 24]。デバイスの劣化に関しては、溶液NMR、特に、DOSY測定により、その原因を分子レベルで解明しています^[26]。デバイス中での構造解析としては、非晶膜にもかかわらず、分子の配向がランダムではなく特定の方向に優先的に配向していることを、DNP-NMRにより、分布を含めて定量的に解明することに成功しています^[27]。下記には、最近の研究例を1つ紹介します。

3.5 DNP-NMRによる発光分子の コンホメーション解析

有機ELでは、注入された電荷（正孔と電子）が再結合することにより励起子が生成し、その輻射失活により光を得ます。この時、一重項励起子 (S_1) と三重項励起子 (T_1) が25% : 75%の比率で生成しますが、従来の蛍光材料を用いたデバイスでは T_1 は熱として失活するため、全励起子のうち最大でも25%しか光に変換することができませんでした。しかし、最近、 S_1 - T_1 間のエネルギー差 (ΔE_{ST}) を小さくすることにより、室温での熱エネルギーで T_1 から S_1 への逆項間交差 (RISC) を起こさせることが可能となりました (図2a)。これは熱活性化遅延蛍光 (TADF) と呼

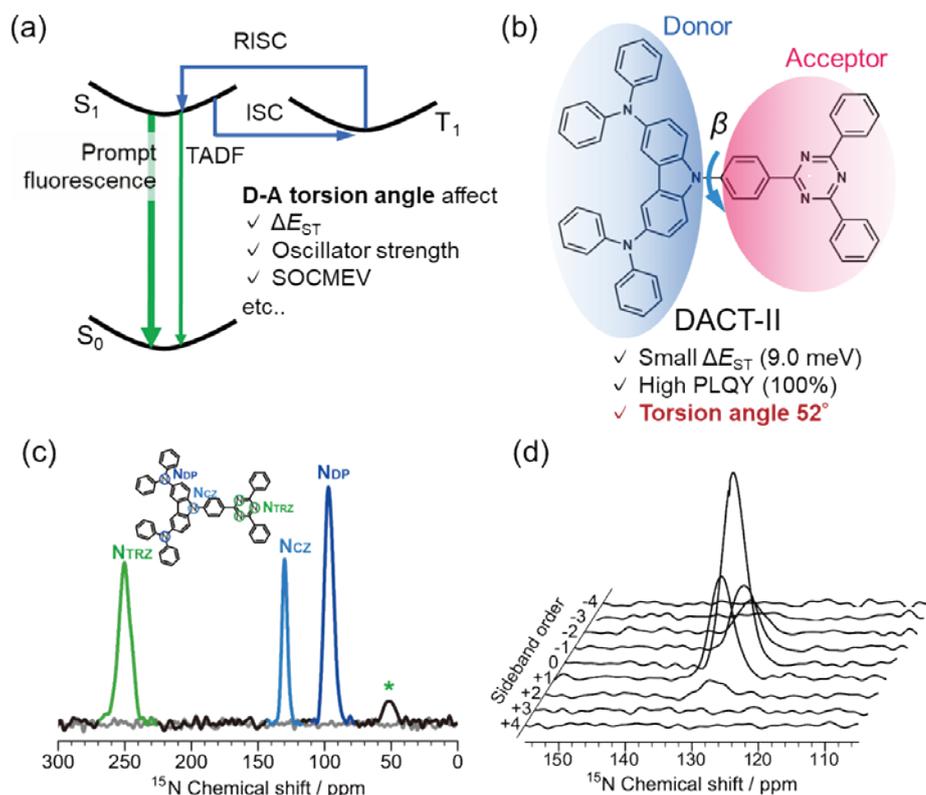


図2 DNP-NMRによるTADF分子のコンホメーション解析。(a) TADFの概念図。(b) 解析に用いたDACT-IIの分子構造。(c, d) DNP-NMRによる天然存在比試料での1Dおよび2D (xCSA) ^{15}N NMRスペクトル。

ばれ、2015年には、**図2b**に示したDACT-IIと名付けた分子により、励起子を100%光に変換できることが実験的に示されました^[1]。

従来の有機材料では不可能であったRISCを可能にするためには ΔE_{ST} をできるだけ小さくする必要がありますが、それは、分子におけるHOMOとLUMOを空間的に分離することにより可能となることが理論的に示されています。そのため、TADF分子はこれまで、電子ドナー性セグメント(D)と電子アクセプター性セグメント(A)を結合させることにより設計されてきました。DACT-IIもその構造を有しています。このD-A結合型分子において、D-A間のねじれ角 β はHOMOとLUMOの重なりを変化させるため、結果として ΔE_{ST} を大きく左右することになります。さらに β は、RISCに対するもう一つの支配因子であるスピン軌道相互作用に加え、S₁のエネルギー準位や振動子強度にも大きく影響するため、RISCのみならず発光色や発光量子収率の支配因子にもなっています。したがって、この β を定量的に解析することは、TADF分子およびデバイス特性の理解に極めて重要です。しかし、分子はデバイス中で非晶状態にあるため、その解析は困難でした。このような状況のもと、我々は、最近、DNP-NMRを用いることにより、同位体標識を行うことなく、このねじれ角 β の平均値が非晶膜内において52°であると、定量的に決定することに成功しました^[28]。現在、分布を含めた、さらに精密な解析を行いつつあります。

4. 最後に

以上、有機ELの概説からはじめ、最後に、有機非晶薄膜中における、一つのねじれ角の定量的かつ選択的測定に成功した例を紹介させていただきました。

今回は、我々の研究室を紹介する機会を頂き、誠にありがとうございました。こここのところ、材料設計や理論計算に力を入れてきましたが、それらに通りの道筋がついたため、再び、NMRに注力していきたいと考えています。我々の研究に興味がおありの方は、是非、お声がけください。

謝辞

研究全体に関し、研究室のスタッフ、学生各位に深く感謝します。また、共同研究に携わっていただいた方々に深く感謝申し上げます。現在、我々は、JSPS科研費JP20H05840, JP20H05837(学術変革領域研究「動的エキシトン」)、Core-to-CoreプログラムJPJSCCA20220004の助成により研究を進めています。ここに感謝の意を示します。

文 献

- [1] Kaji, H., *et al.*, *Nat. Commun.*, 6, 8476 (2015)
 - [2] Suzuki, K., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 15231 (2015)
 - [3] Wada, Y., *et al.*, *Appl. Phys. Lett.*, 107, 183303 (2015)
 - [4] Miwa, T., *et al.*, *Sci. Rep.*, 7, 284 (2017)
 - [5] Wada, Y., *et al.*, *Adv. Mater.*, 30, 1705641 (2018)
 - [6] Wada, Y. *et al.*, *Nature Photon.*, 14, 643 (2020)
 - [7] Kusakabe, Y., *et al.*, *Front. Chem.*, 8, 530 (2020)
 - [8] Ren, Y., *et al.*, *Appl. Phys. Express*, 14, 071003 (2021)
 - [9] Shizu, K. & Kaji, H. *J. Phys. Chem. A*, 125 9000 (2021)
 - [10] Shizu, K. & Kaji, H. *Commun. Chem.*, 5, 53 (2022)
 - [11] Shizu, K., *et al.*, *J. Phys. Chem. A*, 127, 439 (2023)
 - [12] Suzuki, F., *et al.*, *J. Mater. Chem. C*, 3, 5549 (2015)
 - [13] Uratani, H., *et al.*, *Sci. Rep.*, 6, 39128 (2016)
 - [14] Suzuki, F., *et al.*, *Sci. Rep.*, 8, 5203 (2018)
 - [15] Kubo, S. & Kaji, H. *Sci. Rep.*, 8, 13462 (2018)
 - [16] Kaji, H., *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 44, 3706 (2005)
 - [17] Kaji, H., *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 401, 246 (2005)
 - [18] Kaji, H., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 4292 (2006)
 - [19] Nishiyama, Y., *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 471, 80 (2009)
 - [20] Kaji, H., *et al.*, *Appl. Phys. Lett.*, 98, 113301 (2011)
 - [21] Fukushima, T., *et al.*, *Appl. Phys. Lett.*, 99, 223301 (2011)
 - [22] Nishiyama, Y., *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 556, 195 (2013)
 - [23] Suzuki, F., *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 117, 18809 (2013)
 - [24] Suzuki, F., *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 605, 1 (2014)
 - [25] Fukushima, T., *et al.*, *J. Polym. Sci., PartB: Polym. Phys.*, 57, 266 (2019)
 - [26] Fukushima, T., *et al.*, *AIP Adv.*, 5, 087124 (2015)
 - [27] Suzuki, K., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 14842 (2017)
 - [28] Suzuki K. & Kaji, H. *J. Am. Chem. Soc.*, 145, 16324 (2023)
- 以下、概説をご参考まで。
- [29] 鈴木不律、梶 弘典 日本核磁気共鳴学会機関誌4巻 p. 87 (2013)
 - [30] 鈴木創、福島達也、梶 弘典『化学と工業』67巻4号 (2014)
 - [31] 梶 弘典 応用物理 86巻3号 p. 220 (2017)
 - [32] 梶 弘典 高分子 第68巻12月号 p. 664 (2019)

**鈴木 克明** (すずき・かつあき)

2007年 3月 京都大学 総合人間学部 卒業
2009年 3月 京都大学大学院 人間・環境学研究科 相関環境学専攻 博士前期課程修了
2012年 3月 京都大学大学院 人間・環境学研究科 相関環境学専攻 博士後期課程修了
京都大学博士 (人間・環境学)
2012年 4月 京都大学大学院 人間・環境学研究科 博士研究員
2013年 4月 京都大学大学院 化学研究所 博士研究員
2016年 3月～現在 京都大学 化学研究所 助教

**梶 弘典** (かじ・ひろのり)

1989年 3月 京都大学工学部 工業化学科 卒業
1991年 3月 京都大学大学院 工学研究科 工業化学専攻 修士課程 修了
1994年 3月 京都大学大学院 工学研究科 工業化学専攻 博士課程 所定の研究指導認定
京都大学博士 (工学)
1994年 4月 京都大学 化学研究所 助手
1998年 4月～1999年 3月 文部省在外研究員 (米国Massachusetts大学客員研究員)
2002年 11月～2005年 10月 科学技術振興事業団さきがけ研究 (秩序と物性領域) 研究員
兼任
2003年 4月 京都大学 化学研究所 助教授 (2007年4月より准教授)
2009年 4月～現在 京都大学 化学研究所 教授

旭化成株式会社 基盤技術研究所

旭化成株式会社 基盤技術研究所

村上 公也、橋本 康博

murakami.kcg@om.asahi-kasei.co.jp

hashimoto.yv@om.asahi-kasei.co.jp

1. はじめに

旭化成株式会社 基盤技術研究所は、コーポレートR&Dである研究・開発本部に属する「分析科学」と「計算科学」をコア技術とする研究所である。近年は「データ科学」を第3のコア技術の柱として成長させることで、演繹的、および帰納的両アプローチの融合による物質設計のtransformationを目指している。旭化成の主要製造拠点である、川崎（神奈川県）、富士（静岡県）、守山（滋賀県）、鈴鹿（三重県）、水島（岡山県）、延岡（宮崎県）にラボをかまえ、全旭化成グループに対する、新規開発における物質・材料設計や、製造トラブルにおける根本原因究明、製造改善などにおける原理原則（サイエンス）のアプローチでの貢献がミッションである。

さて、数年前よりマテリアルズインフォマティクス（MI）が脚光を浴びており、企業での開発アプローチが大きく変わろうとしている。そのなかで、分析・計算部門の役割も大きく変わろうとしている。MIは、「原料&プロセスデータ」と「性能データ」の相関を機械学習・ディープラーニング等のデータ科学でモデル化し、最適性能を発現しうる「原料&プロセス条件」を統計・帰納的に探し出す手法である。ただし、その最適条件がベスト性能を発現できる理由（原理原則）に対しては解を与えてくれない。そこで「原料&プロセスデータ」⇔「物質構造」⇔「性能」のように、物質構造も含めた演繹的アプローチに資する情報プラットフォームの構築が重要となる。

物質構造は化学構造・高次構造・モルフォロジーなど階層的で複雑な“アナログ情報”である。構造を定量的に定義づけすることすら難しい場面が多い。ここでNMRなどの分析科学の重要な出番となる。NMRスペクトルなどの分析データは複雑な構造情報を含むデジタルデータである。種々分析スペクトルデータを組み合わせる

ことによって網羅的な物質構造情報の“デジタル蓄積”が可能となる。そしてデータ科学との融合により、“物質構造特徴量bank構築”へとつながる。さらに、性能発現の担い手である「物質構造情報」を「原料・プロセス情報」や「性能情報」と紐づけることにより、マテリアルサイエンスのデジタルでの形式知化や蓄積につながる。

一方、計算科学については、データ科学との融合により、in-silico設計（計算機のみでのMI材料設計）のアプローチが可能になる。実験系MIでの律速となる広い空間でのデータ取得が可能になり、計算科学が“データ生成機能”という新たな機能を獲得することになる。

このような分析・計算科学とデータ科学の融合により、“物質特徴量Bank化機能”、“データ生成機能”、“材料設計機能”、そして“サイエンスデジタル蓄積機能”、という非従来型価値提供へと変容をとげていくことになる。すなわち、製造業における、イノベーション創出のDX（デジタルトランスフォーメーション）の根本的な基盤となる。

このような変容、とくに“物質特徴量Bankからの物質設計”という観点において、「いままで観えなかったものを観えるようにする」NMRの重要性がますます増していく。一番の魅力は、実に多種多様な“NMR計測&解析技術（理論的アプローチ）”により、一次構造や高次構造から動的情報まで、微量・複雑・網羅的な物質情報を引き出すことができることである。一方で、初心者でも気軽に素早く取得できるルーチンNMR（¹H-NMR、TD-NMRのような）においても、性能の異なる多数サンプルのNMRデータから、データ科学による演繹的アプローチによる情報取得が可能である。人による解析アプローチでは気づくことの難しい、ちょっとした“ショルダー”、“ピークのふくらみ”などの性能への寄与などの

情報抽出が得意である。①従来からの1点モノの精緻な演繹的データ解析に加えて、②多量ルーチンデータからの帰納的解析——の両輪が我々製造業にとって重要となる。②については、ハイスループット測定技術や、取得した大量データの自動解析がイノベーションの源泉となる。

我々基盤技術研究所において、上記の活動ができていのかどうかはさておいて(苦笑)、われわれ分析技術のtransformationにより、イノベーションの“やりかた”を革新していこうという想いで、日々悩みながら模索・挑戦している。ぜひ同じ分析をなりわいとする専門家同士で、いろいろ悩み相談をさせて頂ければ幸いである。

2. 研究対象と保有 NMR 装置の利用法

弊社の事業はマテリアル領域、住宅領域、ヘルスケア領域の3つからなっており、マテリアル領域だけでも石油化学製品、電解槽、電子材料、水処理膜、エンジニアリング樹脂等の幅広い製品を扱っている。我々の研究所が扱う材料も同様に幅広い。NMR解析の対象に限定しても、低分子化

合物、無機材料、タンパク質、高分子材料等を扱っており、構造同定、組成解析、相互作用解析、分子運動性解析等に取り組んでいる。これらを可能とするために我々は役割が異なる複数の装置を保有している。表1に我々の保有装置と主な用途を示し、図1に富士のラボにおけるNMR室の様子を示す。守山を除く各拠点に溶液NMR装置または固・液両用の汎用NMR装置を配して現場でのタイムリーな分析を可能としている。ルーチン測定用装置については研究所外にも開放し、材料開発者自身でのNMR利用も可能としている。一方で用途を限った応用機は主に富士に集約している。高感度溶液NMR装置は高分子鎖の分岐や末端などの微小な構造が材料物性に及ぼす影響の解明に用いられている。高磁場NMR装置は主に四極子核の測定に用いており、機能発現部位の構造解析を通じた触媒設計の改良や無機コンクリート材料の強度や耐久性の向上等を図っている。汎用固体NMR装置については不溶物の組成解析のほか、高分子材料の高次構造解析を通じて製造条件変更時の材料の構造変化の解明や、明らかになった構造と材料物性との相関解明等に使用

表1 基盤技術研究所の保有装置およびその主な利用法

保有拠点	分類	メーカー	磁場強度 (MHz)	位置づけ	主な用途
川崎	汎用	JEOL	500	固体、溶液	有機構造解析
		JEOL	500	固体、溶液	有機構造解析
富士	溶液	JEOL	400	汎用機	有機構造解析
		Bruker	600	クライオ(高感度)	有機微量解析
	固体	JEOL	700	高磁場 固体、溶液	無機化学構造解析
		Bruker	500	汎用機 固体	高分子固体構造
		緩和 拡散	Bruker	20	卓上、緩和測定専用
鈴鹿	溶液	JEOL	400	拡散測定専用	イオン拡散評価
水島	溶液	JEOL	400	汎用機	有機構造解析
	汎用	Bruker	400	汎用機	有機構造解析
延岡	溶液	Bruker	500	固体、溶液	有機構造解析
	溶液	Bruker	400	溶液	有機構造解析



図1 富士のNMR室の外観と保有装置

している。緩和測定専用の卓上NMR装置には高磁場固体NMR装置のようなスペクトル解析ができない欠点はあるものの、スループットよく大量の試料が測定でき、試料間比較が容易であるため、高磁場NMR装置とは使い分けて活用している。拡散測定用装置は基盤技術研究所保有装置のなかでも特徴的な装置であり、以前にも本誌においてその活用例を紹介した^[1]。磁場勾配ユニットが付属しており、後述するセパレータ中のイオン拡散のような、液体単独での拡散より遅い拡散現象をとらえることができる。これらの装置群を活用し、時に他の分析手法やデータ科学技術と組み合わせながら我々は課題解決に取り組んでいる。

3. NMR を利用した材料開発事例

本報では、拡散測定用装置の新規活用例と近年新たに取り組んでいるデータ科学との組み合わせ例の2つを紹介したい。

弊社の製品の1つに、リチウムイオン電池内で電極同士の接触による短絡を防ぐための部材であるセパレータがある。これはポリオレフィンを主成分とした高分子多孔質膜であるが、安全性向上のためにこれに無機層を塗工した無機塗工セパレータがある。一方で電池に求められる特性は安全性以外にも数多くあり、その中の1つとして出力特性が挙げられる。セパレータは両極の絶縁を保ちながら同時にイオンを透過させる役割も担っており、多孔質膜のどの部分がイオン拡散のボトルネックであるか解明することは出力特性の向上に向けて非常に重要な意義を持つ。

そこで我々は、未塗工膜の単膜とこれに無機層を塗工した多層膜に電解液をしみこませ、パルス磁場勾配NMR法 (Pulsed-field Gradient Spin-Echo NMR, PGSE NMR) により各層におけるLiイオンの拡散係数を算出することで、ボトルネック箇所の特特定を試みた。短い Δ ($\Delta=20$ ms) を用いて各層内の拡散係数を評価した結果を図2に示す。無機層中のLiイオンの拡散係数はポリオレフィン層中のものよりも高く、塗工層がイオン拡散のボトルネックとはなっていないことが確認できた。次に、各層間の界面が拡散のボトルネックとなっている可能性について検証するため、交換NMR測定を実施した。交換NMRスペクトルと各成分の帰属および模式図を図3に示す。相関を移動する成分が交換ピークとして検出されている。我々は複数の多層膜についてこれらの解析を

実施し、交換ピークの大きさが出力特性と関連すること、つまり層間の界面におけるイオン拡散速度の制御が電池性能の制御に重要であることを解明し、さらなる材料開発へ貢献した。

ついで、データ科学との組み合わせ例について紹介する。詳細について開示できず恐縮であるが、高分子化合物を主成分とし、複数のオイルや添加剤が含まれる他社製品がある。その中に含まれる添加剤の同定が設計思想の解明にとって極めて重要であるが、着目する添加剤群の多くが炭化水素系のほぼ類似の化学構造をとっており、かつそれが非常に複雑なために明確に化学構造を決定できない問題がある。そこで我々は、従来行ってきた分離分析と肉眼での判別だけでなく、機械学習による類似度評価を行って添加剤構造をNMRスペクトルによって定義づけ (すなわちデジタル化) するとともに、添加剤同定の省力化および高速化を図った。まず、添加剤の標品約100種を入手のうえ、¹H NMRや他いくつかの分析手法を用いて網羅的にこれらの分析データを取得した。その後、これらのデータの特徴量抽出を行って未知試料の解析データとの類似度比較を可能とした。一連のデータ登録が完了した後に標品の添加剤を使用した複雑な組成の他社製品模擬品を作製し、その抽出物の分析データと標品のデータの類似度比較から添加剤同定が可能か検証した結果、高い確率で結果が合致することを確認した。本検

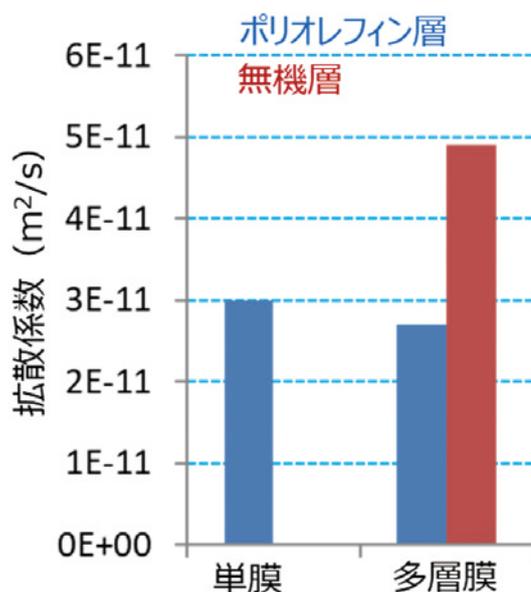


図2 ポリオレフィン膜単層からなる膜と塗工した無機層を含む多層膜における各層中のLiイオンの拡散係数

討を通じて、構造決定が難しい複雑な化合物でもNMRスペクトルによるデジタルな構造定義づけが可能となり、データ科学との組み合わせが可能となることが確認できた。これにより、①デジタルデータと物性との相関解析が可能となる、②従来の化学式によるものだけでなく多変量解析等にかけた際の構造の類似度の定量評価も新たに同定手法に加わる、といった利点を得られるようになった。加えて、NMRスペクトルには微小成分も含めて数多くの情報が含まれているため、これを直接機械学習にかけることで人間が見落としていた微小ピークやわずかなショルダーの違いといったごくわずかな違いが物性発現・プロセス制御のキー成分である事例もその後の検討で判明するようになった。このように、データ科学との組み合わせによりこれまでの材料開発の仕組みが今後大きく変わっていく可能性がある。データを短時間で大量に取得、あるいは既存データを有効に活用できれば材料開発の加速が期待できる。今後、従来から取り組まれている新規分析技術の開発に加えて、標品のデータベース整備、短時間での大量データ取得技術振興、簡易評価装置の開発等、一企業では難しい取組みについてアカデミアでの取組みを期待するとともに、うまく産学連携を図ることでアカデミアの成果の社会実装へ貢献していきたい。

4. おわりに

本報で紹介したのはごく一部であるが、我々はNMRならではの情報抽出と、他手法/他技術との組み合わせに日々取組み、原理原則(サイエンス)のアプローチを通じた材料開発の加速を図っている。今後NMR技術がどのような方向に発展していくのか、それによりどのような新たな「NMRならではの」が生まれてくるのか、諸先生方のご助言も仰ぎつつ日々考え、今後の貢献に繋げていきたい。また、NMR技術がどんな技術と組み合わせることによってどのような付加価値がでるのか、これからNMRに関わってこられる若手研究者の皆さんや他分野の専門家の方々との今後の共創も楽しみにしたい。

謝辞

PGSE-NMRによる検討は旭化成株式会社 堀池 則子氏により実施されたものです。NMRとデータ科学との組み合わせに関する検討は旭化成株式会社 半村和基氏および鈴木孝氏により実施されたものです。感謝申し上げます。

引用文献

- [1] 橋本 康博, 森川 卓也, 吉野 彰, 磁場勾配NMR法の展開 ~電池材料中のイオン拡散挙動を評価する~, 日本核磁気共鳴学会機関誌, Vol.6, 11-22 (2015).

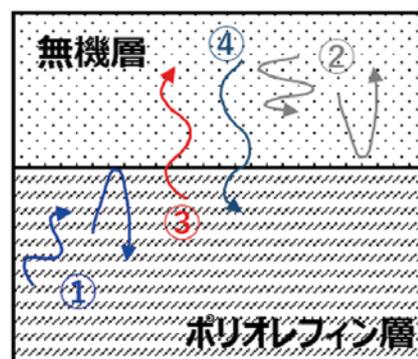
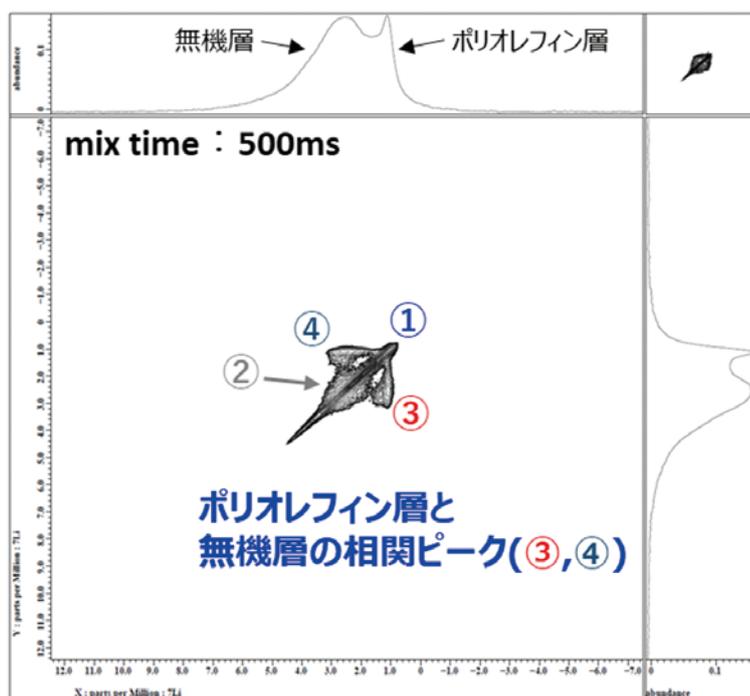


図3 多層膜中の電解液のLiイオンに着目した交換NMRスペクトルと各成分の帰属および模式図。①ポリオレフィン層にとどまっている成分、②無機層にとどまっている成分、③ポリオレフィン層から無機層へ移動した成分、④無機層からポリオレフィン層へ移動した成分。



村上 公也 (むらかみ・きみや)

- 2011年 東京工業大学大学院 物質科学専攻 修士課程修了
- 2011年 旭化成株式会社 基盤技術研究所
- 2017年 Daramic, LLC R&D Scientist (派遣)
- 2018年 旭化成株式会社 基盤技術研究所



橋本 康博 (はしもと・やすひろ)

- 1993年 北海道大学大学院 農学研究科林産学専攻 修士課程修了
- 1993年 旭化成株式会社 基盤技術研究所
- 1996年 ペンシルバニア大学 派遣研究員
- 1998年 オックスフォード大学 派遣研究員
- 2001年 博士号取得 (薬学 北海道大学)
- 2011年 旭化成株式会社 新事業企画開発室 新事業戦略グループ 主幹研究員
- 2014年 旭化成株式会社 基盤技術研究所 高分子解析グループ長
- 2017年 旭化成株式会社 基盤技術研究所 技術部長
- 2021年 旭化成株式会社 理事 基盤技術研究所長

2023年度学会顕彰：若手ポスター賞

第62回NMR討論会(2023) 若手ポスター賞について

今年度の『若手ポスター賞』には、29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4名を顕彰しました。これらポスター賞には、昭光サイエンス社と太陽日酸社からのご厚志による副賞の授与もおこなわれました。若手ポスター賞の趣旨や応募資格など、詳しくは第62回NMR討論会(2023)のホームページ「若手ポスター賞」(<https://www.nmrj.jp/NMR2023/posteraward.html>)を御参照下さい。

選考にあたっては、まず29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3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ように補正し、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、副賞として昭光サイエンス・太陽日酸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、副賞としてそれぞれ太陽日酸賞、昭光サイエンス賞と記念のトロフィーを贈りました。さらに4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 村上*¹、岩田*²、小林、林、Techit、藤原、熊谷、河端、上出

*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：昭光サイエンス・大陽日酸賞）

P92Y 上出 友哉（かみでともや） 京都大学 大学院理学研究科
磁気配向微結晶の¹⁴N NMR

■優秀若手ポスター賞（副賞：大陽日酸賞）

P86Y 河端 夏輝（かわばた なつき） 群馬大学
針状強磁性体を用いた ex-situ 固体 NMR による高分子薄膜材料のイメージング法の開発

■優秀若手ポスター賞（副賞：昭光サイエンス賞）

P58Y 熊谷 咲里（くまがい さり） 横浜国立大学 大学院理工学府
固体 NMR による TaHeR のレチナール近傍の His23 と His82 の構造解析

■若手ポスター賞（副賞：2 社合同賞） 4 件

P26Y 一條 梨花（いちじょう りか） 千葉工業大学
フルオロキノロン化合物と RNA との相互作用解析：隣接する塩基対の影響の解析

P96Y TRITRAKARN Techit（とりとらかーん てしと） 東京工業大学 工学院
最適ソレノイドコイル形状に基づく NMR/MRI プローブ評価のための新しい統一指標

P12Y 林 成一郎（はやし せい ちろう） 九州大学
SH3 ドメインのフォールディングを 2 状態平衡条件でアミノ酸残基特異的に解析する

P16Y 小林 航（こばやし わたる） 千葉大学 大学院薬学研究院
In-Cell NMR 法を用いた動的構造解析に基づく Rac1 の細胞内活性制御機構の解明

各賞担当理事 竹内 恒、松木 陽

「進歩賞」について

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

2023年度選考の経緯

今年度は4名の応募があり、理事会で推挙された5名の審査員と各賞担当理事からなる選考委員会を組織いたしました。審査は、審査員が応募書類をもとに過去2年間の審査形式にならって10点満点で絶対評価を行いました。その際の点数の基準は、10点（非常に優秀）／8点（優秀）／6点（標準）／4点（やや力不足）／2点（力不足）としました。各選考員にはコメントも付していただきました。

選考委員会審査員（五十音順、敬称略）

相沢 智康（北海道大学）

大澤 匡範（慶應義塾大学）

武田 和行（京都大学）

平野 桐子（ブルカージャパン株式会社）

三島 正規（東京薬科大学）

各審査員の審査結果を得て、2023年7月11日、審査員全員および竹内 恒（各賞担当理事、選考委員会委員長）、松木 陽（各賞担当理事、オブザーバ）、藤原 敏道（学会長、オブザーバ）で選考委員会（オンライン）を開き、さらに詳しく総合的に議論をしました。その結果、選考委員会は2023年度（第4回目）の受賞候補者として2名の方を選出し、理事会に報告しました。

その後理事会での承認を経て、下記の2名の受賞者が決定されました。選考結果は2023年8月4日ニュースレターにて本会員全員に配信されました。本当におめでとうございます。

2023年度進歩賞受賞者（順不同、敬称略）

川村 出（横浜国立大学）

幸福 裕（東京大学）

上記の受賞者には第62回NMR討論会（横須賀）にて受賞講演を行っていただきました。さらに、会期中の表彰式にて、表彰状および後援企業の「日本電子株式会社」「ブルカージャパン株式会社」からのご厚志の報奨金と盾の副賞が贈られました（写真）。

進歩賞授与規定の詳細につきましては、HPをご覧ください。



左から藤原 敏道 学会長、川村 出氏、幸福 裕氏、八島 秀仁氏*¹、末松 浩人氏*²

*1 ブルカージャパン株式会社 バイオスピニング事業部 事業部長

*2 日本電子株式会社 NM事業ユニット ユニット長

ISMAR 2023 参加報告書

横浜国立大学 大学院理工学府 修士2年
熊谷 咲里

この度、日本核磁気共鳴学会の2023年度第1回若手研究者渡航奨励金のご支援をいただき、2023年8月20日～25日にオーストラリアのブリスベンで開催されたInternational Society of Magnetic Resonance (ISMAR) 2023に参加し、研究発表をいたしました。本奨励金により、国際学会に参加させていただいたことを、日本核磁気共鳴学会会長 藤原敏道先生、若手研究者渡航奨励金選考委員長 加藤晃一先生をはじめ、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様に心より感謝申し上げます。

本学会の開催地であるブリスベンは、日中の気温が21℃前後であり、乾燥した過ごしやすい気候でした。高層ビルが並ぶ都会的な雰囲気と、ブリスベン川周辺の豊かな自然が共存する環境下で5日間を過ごしました。2032年夏季オリンピック開催地に内定したこともあり、新しい地下鉄の開通など、都市開発が進められていました。

私は「Solid state NMR study of zinc bound *Thermoplasmales archaeon heliorhodopsin*」という題目でポスター発表を行いました。近年新たに発見された微生物由来の膜タンパク質が金属イオン

結合時に検出される特異的な信号を解析し、未だ不明である機能の解明に貢献すべく、研究を進めています。また、今までの種が有する極大吸収波長とプロトン化シッフ塩基のNMR信号との間の相関から逸脱するユニークな特徴についても報告しました。発表では、海外の研究者の方々に参加していただき、試料調製および測定条件、固体NMRスペクトルの解析方法や結合部位の候補などについての質問・コメントをいただくことができました。また、これまで自分自身の研究で行ったことの無かったESR法の利用やMDシミュレーションによる構造解析など、新たな研究方針を模索するきっかけになりました。

世界各国から集結した磁気共鳴研究者による口頭発表は大変興味深く、たくさんの学びがありました。なかでも、MITのProf. Mei Hongによるアルツハイマー病などの脳神経疾患に深く関係するタウの凝集メカニズムを固体NMRにより解析した研究発表に感銘を受けました。様々なNMR測定手法を駆使しながら構造解析を行ったデータを、40分間を通して生き生きと発表されている姿に圧倒されました。また、UNSW Mark Wainwright Analytical

CentreのDr. Aditya Rawalによる固体NMRを用いた様々な昆虫やクモ類から採取した絹繊維の構造を比較することで表現型の可塑性についての理解を深める報告も印象に残っています。クイズやジョークを交えながら聴衆全体を引き付ける発表スタイルに惹き込まれました。

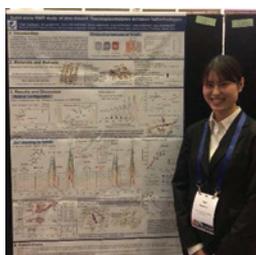
初めて国外開催の国際学会に参加し、最先端の研究者の方々に向けて自分の研究成果を発表できたことは、貴重な経験になりました。世界中の研究者と交流・議論する中で受けた刺激を今後の研究活動に生かし、精進したいと思います。



学会会場にて (Brisbane Convention & Exhibition)



ブリスベンの街並み



ポスター会場にて

ISMAR 2023 参加報告書

京都大学大学院 エネルギー科学研究科 博士3年
阪本 知樹

この度、日本核磁気共鳴学会2023年度 第1回若手研究者渡航奨励金によるご支援を頂きましたことを日本核磁気共鳴学会会長 藤原敏道先生、若手研究者渡航奨励金選考委員長 加藤晃一先生、故京極好正先生、故阿久津政明様、並びに審査や今回の学会参加に関して多大なるご支援をいただきました日本核磁気共鳴学会関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

私は本奨励金を賜りまして、2023年8月20日から25日、ブリスベンにて開催されましたInternational Society of Magnetic Resonance (ISMAR) 2023で研究発表を行って参りました。以下は6日間にわたって開催されました本国際会議の参加報告となります。

気 候

夜や朝は少し肌寒く、日中は少し汗ばむくらいの、全体を通してとても過ごしやすい気候でした。真冬と聞いていたため、どれくらい寒いのだろうと少し怖い気持ちがありました。日本でいうと5月や10月くらいの気候に相当すると感じました。

本国際会議は川沿いに位置するBrisbane Convention & Exhibition Centreで開催され、この美しい川沿いの街で初めての国際会議に参加することができることを非常にうれしく思いました。



写真左：ブリスベンの町並み

写真右：Brisbane Convention & Exhibition Centre

本国際会議は3つのprize lecture、13のplenary lecture、75のinvited lecture、およそ100件のPoster Presentationから構成されていました。初日である8月20日の日曜日、現地協会の方によるアボリジニ方式のパフォーマンスを含む歓迎セレモニーから始まりました。このような開会式から始まる学会参加は初めてで、これが国際学会かと思ひ、わくわくする気持ちと、ここで発表をするんだという緊張感が走りました。

その後、3件のprize lectureが始まりました。Ad Bax先生、Ajoy Ashok先生のご講演と続き、なかでもSongi Han先生(カリフォルニア大学サンタバーバラ校)のご講演「The Shape of Water on ActiveSurfaces」に圧倒されました。生体分子の構造形成や相互作用を正確に捉えるために最も基本的で重要な分子である水分子の力学的、構



開催初日、開会式直前

造的、熱力学的な性質を様々なNMR測定（動的核偏極、交差緩和、NMRだけでなくEPRも）によって特徴づけるという内容でした。

国際会議全体を通して、NMRだからこそアクセスできる、分子の、オングストロームの分解能の根源的でダイナミックなふるまいを捉えようとする情熱を感じることができ、その空気は非常に刺激的でした。また、AlphaFold2などの立体構造予測ソフトや機械学習、MDなどの実験以外の手法と組み合わせていくことが今後のNMR研究において重要であることが数多くの講演（Ad Bax先生のA look at the past and a glimpse at the future of biological NMR、Xue Yi先生のVisualizing base pair stability and dynamics in RNA using NMR spectroscopy and MD simulationsをはじめとした数多くの講演）で協調されていました。

いつも論文で名前をお見掛けすることしか叶わなかった国外の先生方（緩和分散測定においてAd Bax先生、Arthur Palmer先生、Xue Yi先生、核酸分野においてJunji Iwahara先生、Micheal Sattler先生、In-cell NMR測定においてFrancois-Xavier Theillet先生）のご講演を聞くことができました。

発表

私は3日目のポスターセッションで「Analyzing Dynamics of Base-Pair Opening in DNA Triplex Structures under Molecular Crowding Environment」というタイトルで発表を行いました。核酸が実際に働く細胞内は分子込み合い環境であり、このような環境では核酸の構造や熱力学的な特性が希薄溶液環境とは異なることが報告されています。しかし、このような環境下における核酸分子“そのもの”が持つダイナミックなふるまい（スナップショットでは見えない蠢きのようなもの）に与える影響はほとんど知られていません。

本研究では核酸の機能発現の基本的な要素の一つである鎖どうしの対合や開裂の速度を特徴づける塩基対の開閉運動^[1~4]に着目して研究を行いました。標的とする核酸には、相同組み換えタンパク質の標的となりゲノムの不安定性や多様性の創出^[5]、フリードライヒ運動失調症の発症（フラタキシン遺伝子のイントロン中のGAA配列の繰り返し数が増加することに起因する三重鎖構造の形成による発現量の低下が発症原因）^[6]との関わりが指摘されているDNA三重鎖構造を選びました。こ

のDNA三重鎖構造は私たちがin-cell NMR法^[7~11]を用いて生きたヒト細胞内で原子分解能での構造形成を世界で初めて示した^[12]構造のひとつでもあります。

今回は、分子込み合い環境を再現する試薬（Ficoll 70およびPEG 20）を用いて構築した系内におけるDNA三重鎖構造の塩基対の開閉運動を、塩基対中のイミノプロトンと系中の水プロトンの交換速度の解析やR1 ρ 緩和分散測定によって特徴付けました。分子込み合い環境では、排除体積効果の増加、水分子の活量低下などが核酸分子の振る舞いに影響を与える要因として考えられます。Ficoll 70およびPEG20はそれらの効果をそれぞれ再現することを想定して研究に用いました。

本研究では、これらの効果がDNAの三重鎖構造そのものには大きな影響は与えず、しかし、鎖全体の熱安定性、塩基対ごとの安定性、塩基対の開閉運動のカイネティクスには影響を与えることを見出しました。

NMRを用いた原子分解能の解析により、鎖全体に及ぼす影響は残基ごとに及ぼす影響の総和であることを見出し、その中でも全体の傾向に反する影響を受ける残基も見出すことができました。これらの結果は、機能発現のために、実際の細胞内でのみ姿を現す残基の存在を想像させます。また、実際の細胞では排除体積効果の増加や水分子の活量低下に加えて特異的、非特異的に相互作用するタンパク質も存在による影響により、まだ見出されていない（鎖の分解能での振る舞いを観察するだけでは見えてこない）核酸分子のダイナミックで多様な（残基ごとの塩基対の安定性や局所的なコンフォメーション変化が起点となる）機能発現が数多く存在していることを想像させます。

本学会での発表は、初の国外での発表ということもあり英語でのディスカッションに大きな不安がありましたが、皆様丁寧に聞いていただき、また、国内から参加されていた先生方（竹内先生、齋尾先生、北沢先生をはじめとした様々な先生方）に勇気づけるお言葉も頂き、終えることができました。渡航全体を通して、サイエンス、語学力、コミュニケーションや心構えの面など様々な課題を見つけることができ、またその課題に対する意見や解決策なども数多く頂き、考え見つけなおす機会となる、ものすごく実りの多い出張となりました。

さいごに

本学会で発表した研究は、博士課程学生として所属する研究室である京都大学エネルギー理工学研究所 片平研究室で行われた研究です。指導教員である片平正人教授には素晴らしい研究環境を与えていただき、その遂行にあたって的確な助言をいただきましたことを心より御礼申し上げます。また同研究室の永田崇准教授、山置佑大助教には試料調製、NMR測定などの実験操作をはじめ、データ解析などあらゆる面で研究生活を指導し支えてくださいましたことに多大な感謝の意を表します。また、データ解析やNMR装置の維持管理にご協力いただきました近藤敬子研究員（現京都大学 エネルギー理工学研究所附属カーボンネガティブ・エネルギー研究センター特定准教授）、NMR装置の維持管理にご協力いただきました才村正幸技術職員に感謝致します。そして、片平研究室の皆様、研究以外の様々な面においても支えていただきましたことを深く感謝致します。そして本研究は『特別研究員奨励費：22J11061』の補助を受けて遂行されました。

最後に、本渡航で得た経験を、今後私がNMR研究者として日本核磁気共鳴学会において貢献するための力とし、日本核磁気共鳴学会のさらなる発展に貢献できるようさらなる研鑽を続けて参ります。改めまして、日本核磁気共鳴学会2023年度 第1回若手研究者渡航奨励金によるご支援を頂き ISMAR2023にて研究発表をする機会を頂きましたことを、日本核磁気共鳴学会会長 藤原敏道先生、若手研究者渡航奨励金選考委員長 加藤晃一先生、故京極好正先生、故阿久津政明様、並びに今回の学会参加に関して多大なるご支援をくださいました日本核磁気共鳴学会関係者の皆様に重ねて厚く御礼申し上げます。ありがとうございました。

参考文献

- [1] Bei Liu, Honglue Shi, Atul Rangadurai, Felix Nussbaumer, Chia-Chieh Chu, Kevin Andreas Erharter, David A. Case, Christoph Kreutz, and Hashim M. Al-Hashimi, A quantitative model predicts how m6A reshapes the kinetic landscape of nucleic acid hybridization and conformational transitions. *Nat. Commun.*, 2021, 12, 5201.

- [2] Honglue Shi, Bei Liu, Felix Nussbaumer, Atul Rangadurai, Christoph Kreutz, and Hashim M. Al-Hashimi, NMR Chemical Exchange Measurements Reveal That N6-Methyladenosine Slows RNA Annealing. *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141, 19988-19993.
- [3] Atul Rangadurai, Honglue Shi, Yu Xu, Bei Liu, Hala Abou Assi, John D. Boom, Huiqing Zhou, Isaac J. Kimsey, and Hashim M. Al-Hashimi, Measuring thermodynamic preferences to form non-native conformations in nucleic acids using ultraviolet melting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2022, 119, e2112496119.
- [4] Ayako Furukawa, Erik Walinda, Kyohei Arita, Kenji Sugase, Structural dynamics of doublestranded DNA with epigenome modification. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49 (2), 1152-1162.
- [5] Guliang Wang and Karen M. Vasquez, Dynamic alternative DNA structures in biology and disease. *Nor. Rev Genet.* 2023, 24, 211-234.
- [6] Moganty R Rajeswari, DNA triplex structures in neurodegenerative disorder, Friedreich's ataxia, *J. Biosci.* 2012, 37, 519-532.
- [7] Omar Eladle, Yudai Yamaoki, Keiko Kondo, Takashi Nagata, Masato Katahira, Complex Formation of an RNA Aptamer with a Part of HIV-1 Tat through Induction of Base Triples in Living Human Cells Proven by In-Cell NMR. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24 (10), 9069.
- [8] Omar Eladle, Yudai Yamaoki, Keiko Kondo, Takashi Nagata, Masato Katahira, Detection of interaction between an RNA aptamer and its target compound in living human cells using 2D in-cell NMR. *Chem. Commun.*, 2023, 59, 102-105.
- [9] Yudai Yamaoki, Takashi Nagata, Keiko Kondo, Tomoki Sakamoto, Shohei Takami, Masato Katahira, Shedding light on the base-pair opening dynamics of nucleic acids in living human cells. *Nat. Commun.*, 2022, 13, 7143.
- [10] Yudai Yamaoki, Ayaka Kiyoshi, Masayuki Miyake, Fumi Kano, Masayuki Murata, Takashi Nagata, Masato Katahira, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, 20, 2982-2985.
- [11] Yudai Yamaoki, Takashi Nagata, Tomoki Sakamoto, Masato Katahira, The first successful observation of in-cell NMR signals of DNA and RNA in living human cells. *Biophys. Rev.*, 2020 12, 411-417.
- [12] Tomoki Sakamoto, Yudai Yamaoki, Takashi Nagata, Masato Katahira, Detection of parallel and antiparallel DNA triplex structures in living human cells using in-cell NMR. *Chem. Commun.*, 2021, 57, 6364-6367.

会員便り：海外学会参加報告

Asia Pacific Nuclear Magnetic Resonance (APNMR) 2023 参加報告書

東京工業大学大学院生命理工学院生命理工学系 修士1年

宗月都

日本核磁気共鳴学会
NMR
2024
13巻

この度、日本核磁気共鳴学会2023年度第一回若手研究者渡航奨励金によるご支援を受けて、APNMR2023 (Asia Pacific Nuclear Magnetic Resonance, Taipei, 6-9 September 2023) に参加致しました。本助成金によりNMRの国際学会に参加させて頂いたことを、日本核磁気共鳴学会会長藤原敏道先生、若手研究者渡航奨励金選考委員長加藤晃一先生、故京極好正先生と故阿久津政明様、ご家族の皆様、並びに日本核磁気共鳴学会関係者の方々に心より御礼申し上げます。

この学会は、台湾の台北市のNational Bio technology Research Park (NBRP) で令和5年9月6日～9日に開催された、溶液及び固体状態の生体分子や物質のNMR法の開発や応用、またMRIやESRも含めた幅広い研究分野に関する国際学会です。2005年に横浜で第一回が開催されて以来数年に一度開催されており、今回は台湾、日本、韓国等のアジア諸国中心に300人以上の参加者が集まりました。

私は、『Efficient $^{13}\text{C}\alpha$ - ^{13}CO selective magnetization transfer under ultra fast MAS for multi-dimensional solid-state NMR』という題目でポスター発表を行いました。高次元NMRにおいて課題となっている $^{13}\text{C}\alpha$ 核と ^{13}CO 核の間での選択的磁化移動効率を、超高速MAS条件下で上

昇させるためのパルス手法としてSemi selective Adiabatic Homonuclear CP (SSAH-CP) を開発しました。MAS速度90kHzの条件、サンプルに56残基を有するモデルタンパク質のGB1を使用し、標準的に使われるDREAM法と比較して平均約1.7倍の感度上昇を達成しました。ポスターセッションでは、10名以上の方と議論することができ、今後の自分の研究に活かせるような質問や助言をたくさん頂きました。また、他の方の講演やポスターセッションを通じて、NMR手法に関する研究やNMR装置を改良する研究等、最先端の研究に触れることができました。特に、Tata Institute of fundamental researchのVipin先生の芳香族側鎖と脂肪族側鎖を区別するためのpulse sequencesに関する研究や、京都大学の修士2年の上出さんの ^{14}N の四極子相互作用の影響を減らす装置に関する研究が非常に興味深かったです。今回参加したAPNMR2023では、日本の研究者の方々だけでなく、海外の研究者の方々との交流ができ今後の研究生活において非常に良い刺激になったと感じました。

最後に、私のAPNMR2023への参加にご支援いただいた日本核磁気共鳴学会に重ねてお礼を申し上げます。

日本核磁気共鳴学会の決定事項

2023年度 通常総会

日 時：2022年11月7日（火）11：45～12：45

会 場：横須賀芸術劇場 大ホール

出席者：106名 委任状：83名 合計189名

- 開会の辞
- 会長挨拶（藤原）
- 第62回 NMR 討論会（2023）世話人（浅野）挨拶
- 事業報告
- 2022 年度収支決算の承認
- 2023 年度中間報告の承認
- 2024 年度収支予算案の承認
- 2024 年度役員（評議員（2024-2025））の選任
- 第63回 NMR 討論会（2024）世話人（相沢）挨拶
- 内藤晶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	2021年 9月30日	2022年 9月30日	2023年 9月30日
正会員	388	390	381
学生会員	98	137	134
名誉会員	12	12	13
賛助会員	7	7	8
合計	505	546	536

*定足数 [一般会員381名 (2023年9月30日現在)]
/5 = 76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（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

評議員（2022-2023）

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
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）

2023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、会長、副会長が選出、承認された。

評議員 (2024-2025)

池上 貴久	横浜市立大学
池谷 鉄兵	東京都立大学
石井 佳誉	東京工業大学
梶 弘典	京都大学
片平 正人	京都大学
加藤 晃一	自然科学研究機構
児嶋長次郎	横浜国立大学
佐藤 一	ブルカージャパン株式会社
楯 真一	広島大学
鳥澤 拓也	中外製薬株式会社
野田 泰斗	京都大学
野村 薫	サントリー生命科学財団
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	理化学研究所

池上、石井、加藤、野村、宮ノ入 (2024-2025 理事) 会長：木川、副会長：浅野

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。2000字以内、1ページ。

・巻頭エッセイ

主にNMR討論会特別講演者からの寄稿。NMR学会、NMR討論会との関わりなどについてのエッセイ。2000~4000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。6000~12000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。8000~16000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。4000~8000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。4000~8000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。4000~6000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。4000~10000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ニュース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。2000~4000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。2000~6000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。4000~8000字、2~4ページ (図、表を含む)。

原稿作成要領

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

・原稿は、表題、執筆者氏名・所属、本文、引用文献、表、図の順番にまとめ、1つのファイルとして提出して下さい。

・巻頭エッセイ、解説、トピックス、研究報

告、NMR基礎講座、技術レポート、NMR便利帳の執筆者は、略歴と顔写真のファイルを提出してください。

- ・ 図は、TIF, JPG, PDFファイルで 600 dpi 以上の解像度で作成してください。
- ・ 図、表には、番号を付すと共に、それぞれの説明を記入してください。
- ・ 引用文献は、次を参考にして書式を統一して下さい。

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

Magritek

令和6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	
栃尾 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	東北大学	

編集後記

NMR学会機関誌Vol. 13をお届けします。当巻は例年以上に多岐に渡った内容になっており、NMRの可能性が感じられる機関誌に仕上がりました。執筆者の先生方にはお忙しい中、時間を捻出してご執筆頂いたこと、また、査読者の先生方にもそれに応じて丁寧に査読していただいたことに心より感謝いたします。今年のNMR討論会は札幌で開催されますが、それにちなんで北大の福士先生に数回に渡った構造推定の演習をお願いいたしました。“未知化合物 X (エックス) の構造を推定せよ”では最後にミッションが課せられていますが、Xの構造は近日中にニュースレターでお知らせしますので、お時間が許せばそれまでに是非クリアして下さい。また、本機関誌には多くの企業や団体様から広告料をお寄せいただいておりますが、最近冊子体の希望者が減ってきたことを踏まえてVol.13では、(1) 機関誌HPに広告協賛企業、団体様のロゴを掲載する、(2) PDF版では冬号だけでなく夏号でも広告を掲載する、(3) 広告が目立つよう目次ページの前に配置する、という試みを行い、少しでも広告が皆様の目に留まるようにしました。まだ、どのような広告の形が効果的なのか模索している段階ですので、もしいいアイデアがありましたら機関誌編集委員にご提案いただけたら幸いです。

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、関口房江氏、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くださった企業、団体様には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。

2024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.13 No.1 & 2**

2024年3月12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