

NMR

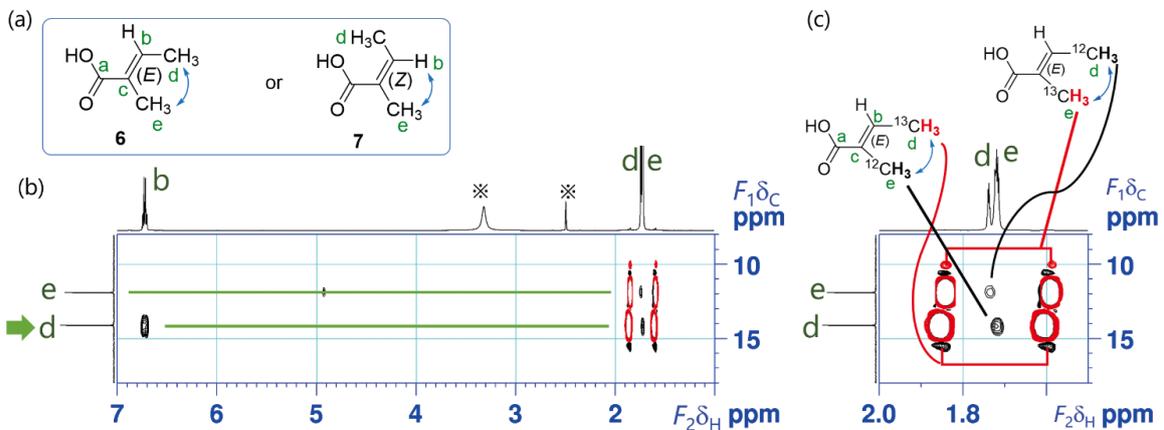
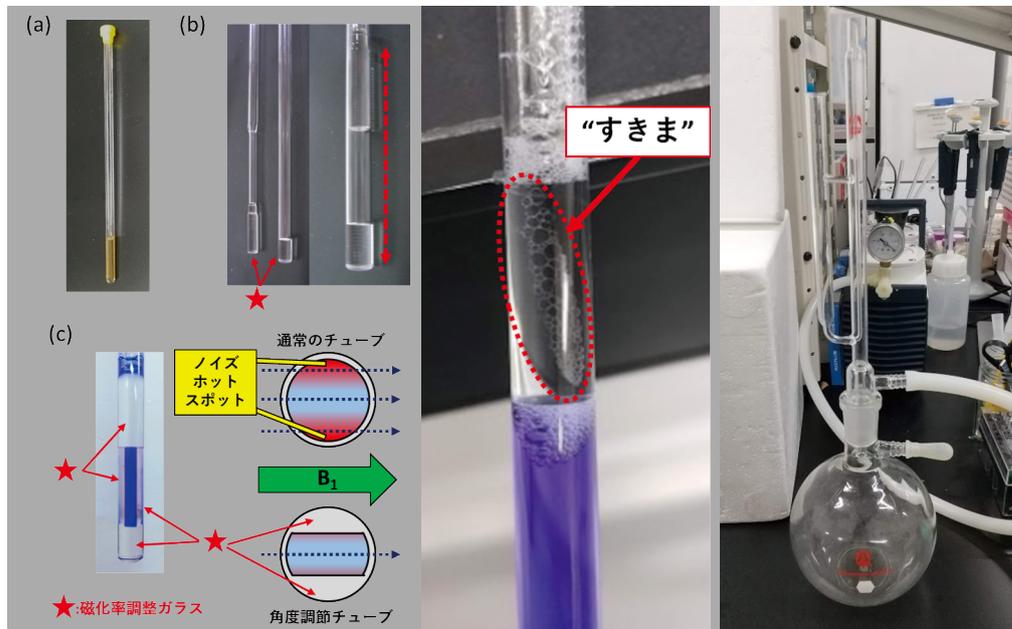
Bulletin of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan



Vol.14 No.1 August 2024

<http://www.nmrj.jp>

会長メッセージ 木川隆則
巻頭エッセイ 右手浩一
総説論文：解説 川村 出
総説論文：解説 幸福 裕
NMR講座：NMR基礎講座 福士江里
NMR講座：NMR基礎講座 宮ノ入洋平
会員便り：研究室便り 山本泰雅
会員便り：海外学会参加報告 上出友哉



表紙の図

(上)：大阪大学蛋白質研究所 宮ノ入洋平 先生

“溶液NMR測定のTips：サンプルチューブ編”より

(下)：北海道大学大学院農学研究院 福士江里 先生

“未知化合物 X の構造を推定せよ
エックス

—低分子化合物の溶液NMRによる構造決定演習—(第二回)”より

広告掲載一覧

(申し込み先着順)

NMRプラットフォーム
(文科省 先端研究基盤共用促進事業)

ブルカージャパン 株式会社

株式会社 シゲミ

日本電子 株式会社

大陽日酸 株式会社

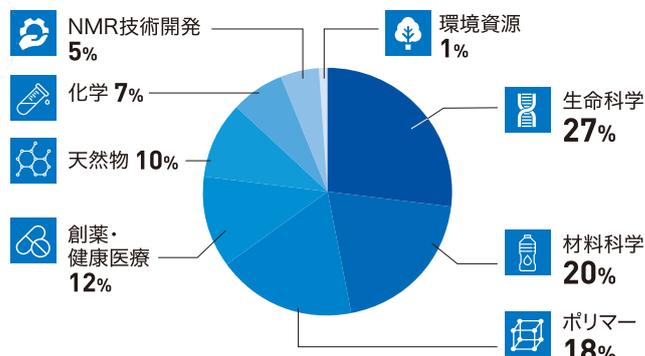
株式会社 エルエイシステムズ

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。

先端的NMR研究基盤の設備・技術・人材のネットワークにより 我が国全域の研究開発の促進・イノベーション創出に貢献します

NMRプラットフォームは、北海道大学、東北大学、東京大学、理化学研究所、横浜市立大学、生命創成探求センター、大阪大学、広島大学の8機関がプラットフォームを構築し、先端的なNMR設備を産官学の皆様に広くご利用いただくことを目的としています。

NMRプラットフォームは、様々な分野で利用されています。



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

北海道大学

- 食や健康など幅広い生命科学研究を中心に支援
- 溶液・固体・半固体に対応の最新のプローブ



溶液 固体 半固体
極低温プローブ オートサンプリング 高速MAS DX対応
60MHz/600MHz/800MHz

東北大学

- 3台の高磁場溶液NMR
- サンプルチェンジャーによる多検体自動測定



溶液
極低温プローブ オートサンプリング DX対応
600MHz/800MHz

東京大学

- 膜タンパク質などにも適用可能な独自の測定技術
- 独自の動的構造平衡解析技術



溶液
極低温プローブ
600MHz/800MHz

理化学研究所

- 世界最大規模のNMRラインナップ
- 安定同位体標識技術



溶液 固体
極低温プローブ オートサンプリング 高速MAS DX対応
400MHz/600MHz/700MHz/
800MHz/900MHz

横浜市立大学

- 世界最高レベルの超高磁場LC-NMR装置
- 日本最高レベルの超高磁場固体NMR装置



溶液 固体
極低温プローブ オートサンプリング 高速MAS DX対応 LC-NMR
500MHz/600MHz/700MHz/
800MHz/950MHz

生命創成探求センター

- 800MHz溶液NMR
- 糖タンパク質の安定同位体標識技術



溶液
極低温プローブ DX対応
800MHz

大阪大学

- 最高性能の溶液NMR装置群と¹⁹F化合物ライブラリーによるスクリーニング
- 超高感度DNP-NMR装置



溶液 固体
極低温プローブ オートサンプリング 高速MAS DNP
400MHz/500MHz/600MHz/700MHz/
800MHz/950MHz

広島大学

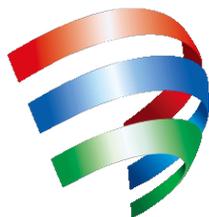
- 異方性核スピンや核スピン緩和を利用した構造解析
- 半固体試料NMR構造解析



溶液 固体 半固体
極低温プローブ DX対応
400MHz/500MHz/600MHz/700MHz

文部科学省

「先端研究基盤共用促進事業（先端研究設備プラットフォームプログラム）」



NMR PLATFORM



<https://nmrpf.jp/>

次世代型超伝導磁石 Ascend Evo

Ascend Evoシリーズに 600MHz が登場

- 400、500MHzと 同じサイズ
- 磁石の小型化により設置環境を選ばない
- 液体ヘリウム充填量の軽減
- 最大保持期間 365日

Ascend Evoシリーズの特徴

- コイルの小型化
 - ✓ 液体ヘリウム容量の増加
 - ✓ 液体ヘリウムの保持期間の延長
- クライオ設計の改良と磁石の小型化
 - ✓ 必要天井高の低減
 - ✓ 重量の軽減
 - ✓ ヘリウム蒸発量の低減
- シムの改良
 - ✓ 立ち上げ作業の短縮
 - ✓ 磁石の長期安定化



ENC 2024でリリースされたAscend Evo 600 (上)
従来型とAscend Evo 1.0GHzのサイズ比較 (下)



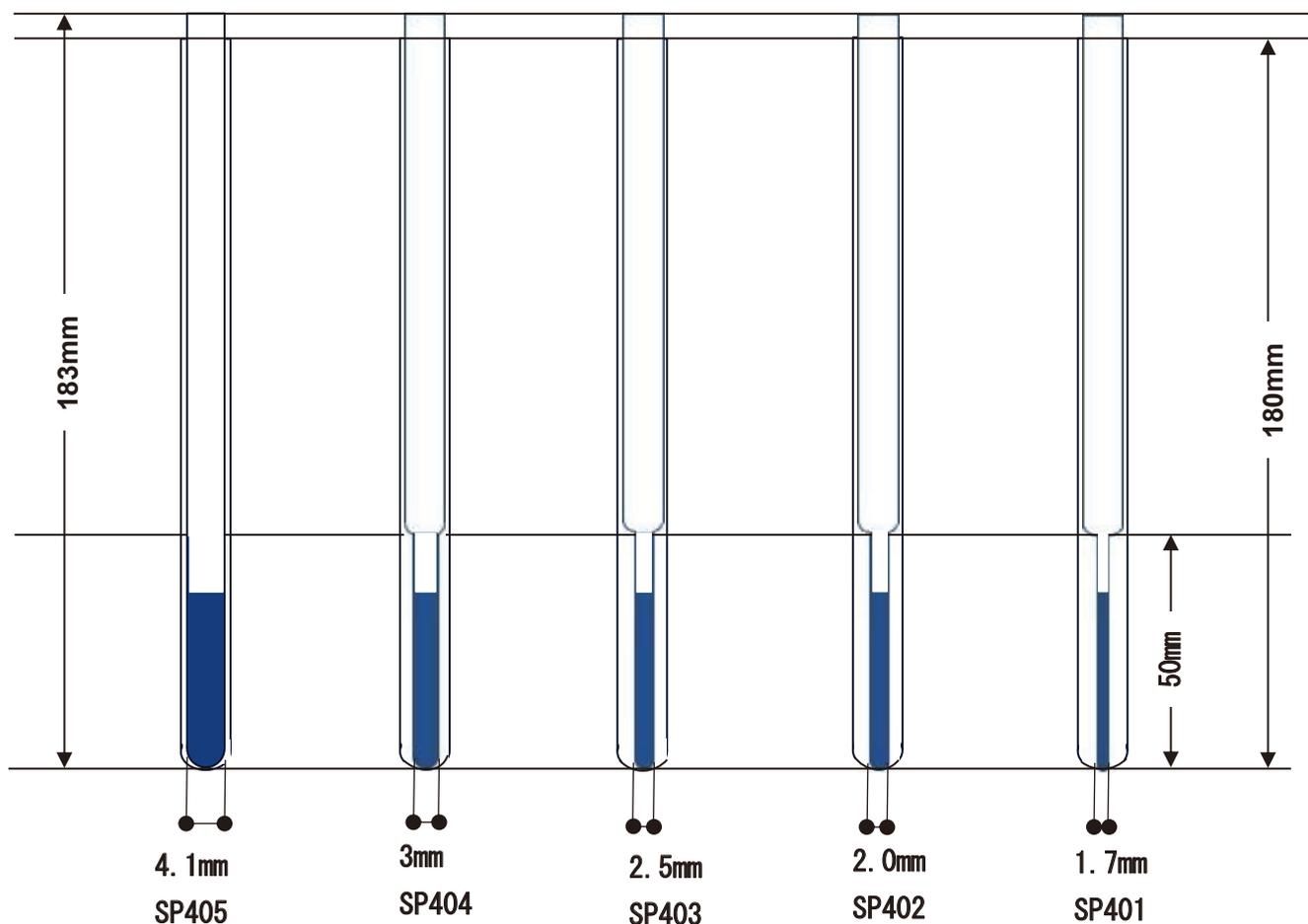
Bruker at ENC 2024
Ascend Evo Series
リーフレットダウンロード



5mmφ同軸NMRチューブセット

サンプルとロック溶媒を混合できないなど、別々のガラスに分けて測定したい場合、同軸試料管を使用するとサンプルの出し入れなどで煩わしさがありました。本セットを使用することで、パストツールが入れやすくなりました。また、スペーサは必要なく、5mmφ用のキャップをかぶせることができます。

通常の5mm管との組み合わせの他に、薄肉タイプの5mm管と組み合わせ外管内のポリウムを上げることができます。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。



P.N.	Inner Tube Stem O.D.	Outer Tube I.D.	Inner Tube Volume 40mm high	Outer Tube volume (When setting with an inner tube and an outer tube) 40mm
SP-401	1.7mm	4.22mm	45uL	459uL(Thin wall Outer Tube)
SP-402	2mm	4.22mm	70uL	425uL(Thin wall Outer Tube)
SP-403	2.5mm	4.22mm	113uL	355uL(Thin wall Outer Tube)
SP-404	3mm	4.22mm	194uL	270uL(Thin wall Outer Tube)
SP-405	4.1mm	4.22mm	317uL	55uL(Thin wall Outer Tube)
SPT-401	1.7mm	4.545mm	45uL	547uL(Ultra Thin wall Outer Tube)
SPT-402	2mm	4.545mm	70uL	512uL(Ultra Thin wall Outer Tube)
SPT-403	2.5mm	4.545mm	113uL	442uL(Ultra Thin wall Outer Tube)
SPT-404	3mm	4.545mm	194uL	257uL(Ultra Thin wall Outer Tube)
SPT-405	4.1mm	4.545mm	317uL	142uL(Ultra Thin wall Outer Tube)

よりユーザーフレンドリーに、より安心安定な装置に・・・

NMRメーカー初！

NMR用冷媒蒸発抑制装置

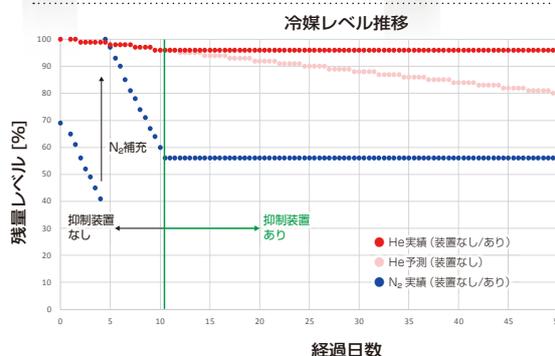
昨今の液体ヘリウムへの不安・心配解消へ



主な特長

- 軽量・省スペースながら、1台で液体ヘリウム、液体窒素の蒸発を制御
- 冷媒補充作業の頻度・費用を大幅低減し、装置の稼働時間を最大化
- 冷媒入手難等によるNMR装置の運転停止リスクを低減
- 新設計により冷凍機振動を十分に抑制し、スペクトルへの影響を最小化
- 既設NMRマグネットへの後付け可能

設置前後での冷媒レベル推移一例



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

タンパク質合成キット

無細胞くん[®]



「無細胞くん」は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製品です。

迅速・簡便なタンパク質合成

テンプレートDNAを加えて、インキュベートしていただくだけで、タンパク質を1-16時間で合成できます。PCRで調製した直鎖状DNAもご使用いただけます。

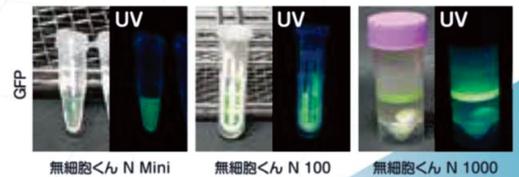
多様なタンパク質合成

細胞内タンパク質、分泌系タンパク質、膜タンパク質の合成にご使用いただけます。

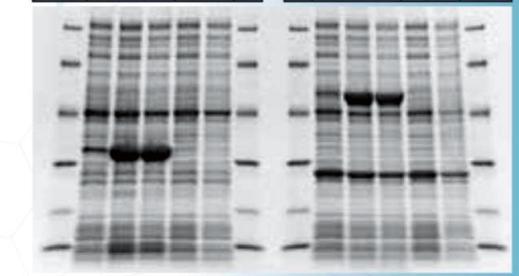
高いタンパク質合成量

(社内実施例)
GFP 4~5 mg/mL (無細胞くん N 100, N1000: キット付属の専用透析デバイスで反応)
350 µg/mL (無細胞くん N Mini: 市販のチューブで反応)

「無細胞くん N」シリーズのタンパク質合成量



Sample kit	Marker	N Mini	N 100	N 1000	N Mini	N 100	Marker	N Mini SS	N 100 SS	N 1000 SS	N Mini SS	N 100 SS	Marker
	GFP							BAP					
	Blk							Blk					



名称	UniProt ID (start a.a. - end a.a.)	備考
GFP (緑色蛍光タンパク質)	—	—
BAP (大腸菌由来アルカリホスファターゼ)	P00634	細胞外、Disulfide bondあり

製品番号	製品名	反応スケール	膜タンパク質合成用添加剤対応	安定同位体標識	数量	標準価格
A235-0300	無細胞くん N Mini	50 µL反応 × 20回分	○	×	1キット	18,000
A236-0301	無細胞くん N 100	100 µL反応 × 8回分	◎	×	1キット	29,000
A237-0302	無細胞くん N 1000	1000 µL反応 × 1回分	◎	×	1キット	29,000
A238-0303	無細胞くん N Mini SS	50 µL反応 × 20回分	○	×	1キット	23,000
A239-0304	無細胞くん N 100 SS	100 µL反応 × 8回分	◎	×	1キット	32,000
A240-0305	無細胞くん N 1000 SS	1000 µL反応 × 1回分	◎	×	1キット	32,000
A183-0242	無細胞くん Start	100 µL反応 × 6回分	○	◎	1キット	35,000
A29-0059	無細胞くん SI	1000 µL反応 × 1回分	○	◎	1キット	57,500
A173-0230	無細胞くん SI(PEG不含有)	1000 µL反応 × 1回分	○	◎	1キット	57,500
A89-0126	無細胞くん SISS	1000 µL反応 × 1回分	○	◎	1キット	67,000
A241-0307	無細胞くん SISS(PEG不含有)	1000 µL反応 × 1回分	◎	◎	1キット	67,000
A226-0290	膜タンパク質合成添加剤 Set A				1キット	23,000

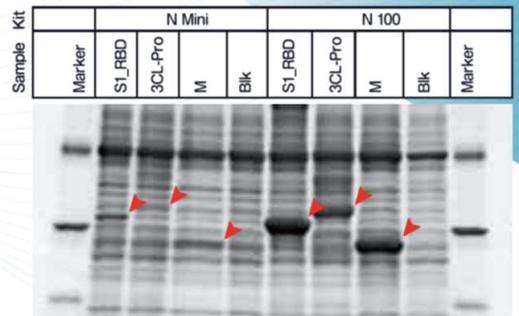
表示価格(円)に消費税は含まれておりません。

受託合成

無細胞タンパク質合成技術を用いた受託合成も承ります。詳細は弊社ホームページの専用フォームをご覧ください。



SARS-CoV-2ウイルス タンパク質合成



名称	UniProt ID (start a.a. - end a.a.)	備考
S1_RBD	P0DTC2 (319-541)	細胞外、Disulfide bondあり
3CL_Pro	P0DTD1 (3264-3569)	細胞内、Protease
M	P0DTC5 (1-222)	膜タンパク質

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

〒220-8561 神奈川県横浜市西区みなとみらい4-6-2
みなとみらいグランドセントラルタワー7F
TEL.045-872-1823 (SI代表) FAX. 045-872-1825

●資料のご請求は、大陽日酸までお気軽にご用命ください。

メールアドレス Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp

ホームページアドレス <https://stableisotope.tn-sanso.co.jp>



大陽日酸
The Gas Professionals

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



MASローター
(1.2mm - 7.5mm)



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
(1.3mm - 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. **14** No.1

August 2024

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

CONTENTS

- 会長メッセージ
日本核磁気共鳴学会会員の皆様へ 3
木川 隆則

- 巻頭エッセイ
合成高分子の溶液NMR(1980 ~ 2024) 4
右手 浩一

- 総説論文：解説
固体NMRによる微生物型ロドプシンのレチナールの構造解析 6
川村 出
脂質二重膜中における膜タンパク質の動的構造解析 14
幸福 裕

- NMR講座：NMR基礎講座
未知化合物 X^{エックス}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— (第二回) 21
福士 江里
溶液NMR測定 Tips：サンプルチューブ編 32
宮ノ入 洋平

- 会員便り：研究室便り
東京大学薬学部 生命物理化学教室 41
山本 泰雅

- 会員便り：海外学会参加報告
Euromar 2024 渡航記 43
上出 友哉

日本核磁気共鳴学会会員の皆様へ

日本核磁気共鳴学会 会長

木川 隆則

kigawa@riken.jp

核磁気共鳴 (NMR) は、物理、化学、生物学、医学、農学、薬学などの広範な領域で重要な役割を果たす必須の計測法です。高磁場化、高感度化、自動化などの機器開発や技術的発展、それに基づく新たな利用が実現され、近年では、創薬、代謝物動態、新世代電池の解析など、イノベーションに直接つながる領域への利用も広がり、分野の発展は現在も続いています。

日本核磁気共鳴学会は、NMRの研究者に加えて機器メーカーや試料調製、解析サービスなどを提供する企業も参加する学会として、コミュニティの中心的役割を果たしてきました。学会の中心的な活動であるNMR討論会は多様な会員が交流する場を提供し、新たなアプローチを生み出すきっかけとなることで、分野の継続的な発展と拡大に貢献してきました。討論会は本年度で第63回を迎え、最新の研究成果の発表や最新技術・機器の展示に加え、若手研究者の顕彰やチュートリアルもおこない、人材育成にも貢献しています。

若手研究者に対する支援は学会の基本的な柱の一つです。若手研究者渡航奨励金、NMR討論会における若手ポスター賞、そして進歩賞を設けて、分野の今後の発展に貢献する若手研究者を支援してきましたが、これらを強化することにより、急務となっている次世代人材の育成を促進していきます。分野の認知度のさらなる向上や他のコミュニティとの交流・連携の促進も重要です。特に本分野では、学際的な研究や異分野との協調・連携がこれまで分野を活性化させ発展させ

ており、新技術の開発や幅広い分野での課題解決への貢献が期待されます。学会が発行する機関誌は、これら活動において重要な役割を果たします。今期は担当理事を新設し、アクセシビリティの向上を目指して新たな公開方法などを検討し活性化を図ります。

日本のNMRコミュニティの代表として、海外コミュニティとの協力も学会の重要な役割の一つです。NMR討論会での海外研究者の招致による国際交流に加えて、国際会議の日本での開催は、日本NMR界の発展と国際的な位置づけを強固なものにします。国際磁気共鳴会議ISMAR、生体系のICMRBS、アジアオセアニア地区のAPNMRといった代表的な会議の招致と開催において、当学会が重要な役割を果たします。

近年、大量のデータや新世代AIを活用した技術開発とそれによる新規知見の獲得が進みつつあります。NMR分野ではこれまでも、NMRスペクトルの処理、化学シフトデータベースの構築・活用、生体高分子の立体構造決定において、データと情報科学の積極的な活用を進めてきましたが、今後は従来とは異なるレベルでデータや情報技術を活用していくことにより、分野のさらなる発展と課題解決が期待されます。

変化が激しい時代にあっても、NMR学会は日本におけるNMRのコミュニティの中心として会員の活動を支援し、分野の発展に貢献していきたいと考えています。

合成高分子の溶液NMR(1980～2024)

徳島大学名誉教授

右手 浩一

ute@tokushima-u.ac.jp

昨年、横須賀芸術劇場にて開催された第62回NMR討論会で、藤原敏道会長(当時)とともに功労者講演をさせていただいた。藤原会長、ならびに、討論会の世話人を務められた浅野敦志教授に改めて御礼を申し上げたい。

私事であるが、本年3月に徳島大学を定年退職した。母校であり、1985～2006年まで教員として在籍した大阪大学も含めて44年を、私はNMRとともに過ごしたことになる。合成化学の研究室では永久磁石のCW NMRが一般的だった時代に、電磁石のFT NMRを使った研究課題を恩師に与えられたことが私の出発点になった。以後、超伝導磁石への転換や多種多様なパルスプログラムの発展、情報処理技術の驚異的進歩を身をもって体験してきた。それぞれの時代で最先端のNMRを好きなだけ使える機会を得たことは、研究者として本当に恵まれていたと思う。

私は、アニオン重合による高分子合成から研究の道に入ったので、自分たちの合成したポリマーの化学構造(末端基、異種結合、立体規則性、共

重合組成、共重合モノマー連鎖など)の決定と定量にNMRをとことん利用してきた。合成・天然の有機化合物や生体高分子は、多くの場合、単一の化学種として分離精製できるのに対し、合成高分子は多数の化学種の複雑な混合物である。そのNMRスペクトルを特別な工夫なしに測定した場合、化学構造に関する平均値が観測されるにすぎない。これでは、広い分布をもつ合成高分子の挙動や物性を理解するのに不十分である。この課題へのアプローチとして私が携わったLC-NMRやDOSYなどの溶液NMR技術が今後さらに熟成されて、高分子材料の研究開発に飛躍的進歩をもたらすことを願っている。

高分子学会にNMR研究会という部会がある。この学会に設置された21の研究会のなかで測定法を冠した唯一の研究会であり、1980年に設立された。当初はアカデミア中心だったが、近年は産官学のメンバーが互いに協力して活動していることが運営委員の顔ぶれからも窺える。本年5月10日に開催された24-1 NMR研究会「ケモイン



JEOL FX-100 (1980～1986)



Varian Unity INOVA 750
(1996～2006)

JEOL GX-500 (1986～1996)

JEOL ECX-400P
(2007～2016)
JEOL ECZ-400S
(2016～)
JEOL ECA-500W
(2011～2024)



Bruker Avance NEO 400 (2020～)



私と私のグループが使ったNMR(最終講義の図表から)

「フォーマティクス入門」は、大阪開催にもかかわらず80名近い参加者を得て盛況だった。「ChatGPTを用いた数値解析プログラムの自動生成」と題する企業の若手研究者による導入から、最前線のアカデミア3氏による講演「実験化学者によるケモインフォマティクスの実践」、「ケモインフォマティクスにおける分子表現」、「分子記述子の設計と新規分子スキップフォールド探索」のあと、話題の名著「Pythonで始める機器分析データの解析

とケモメトリックス」の著者によるチュートリアルまで、バランスよく企画されたプログラムは知的刺激に溢れていた。高分子材料を含むマテリアルズインフォマティクス(MI)に対する産官学の関心は高く、その急速な発展から目が離せない。一方、NMRの実践に係わる立場からいえば、多様なMIアプリケーションのベースとなる良質なNMR実験を今後も地道に積み上げることが不可欠と感じた次第である。



右手 浩一 (うて・こういち)

1981年3月 大阪大学 基礎工学部 合成化学科 卒業
1985年8月 大阪大学 大学院基礎工学研究科 化学系専攻 博士後期課程 中途退学
1985年8月 大阪大学 基礎工学部 助手
1996年4月 大阪大学 基礎工学部 助教授
2007年1月 徳島大学 大学院ソシオテクノサイエンス研究部 教授
2024年3月 徳島大学 名誉教授

固体NMRによる微生物型ロドプシンのレチナールの構造解析

横浜国立大学大学院工学研究院

川村 出

kawamura-izuru-wx@ynu.ac.jp

1. はじめに

ロドプシンは可視光から近紫外光に応答する性質を持ち、7回膜貫通ヘリックス構造とその7番目のヘリックスGに保存されたリジン (Lys) 残基にプロトン化シッフ塩基結合を介して結合したレチナール発色団を持つ膜タンパク質である^[1] (図1)。ここでレチナールのプロトン化シッフ塩基部位をRPSB (retinal protonated Schiff base) とする。レチナールを持つ動物型ロドプシン・微生物型ロドプシンと呼ばれる分子群は、動物の色覚・視覚や微生物の光エネルギー産生・情報伝達などを担っている^[2]。このうち微生物型ロドプシンは発色団オールトランス型レチナールが光を吸収し、レチナールの光異性化反応がきっかけとなりタンパク質の立体構造変化が生じることで機能発現している。特に、光励起直後からいくつかの光中間体を経由して、元の状態に戻る光反応サイクルによって制御されている^[1]。微生物のメタゲノム解析により、多数のロドプシン遺伝子が発見され、イオンポンプ、イオンチャネル、信号伝達などの多様な機能および色が見られ、微生物型ロドプシンの分野で多様性が見出さ

れた^[3, 4]。また、緑藻由来のチャネルロドプシン (ChR) のイオン輸送能を利用して神経細胞の興奮・抑制を光で制御するツールとして、光遺伝学 (Optogenetics) の分野においてロドプシンは基盤的な役割を担っている^[5]。最近では近赤外領域に吸収を持つ新型のロドプシンが発見され、ますます拡大している^[6]。

ロドプシンはリガンドとして元々レチナールが共有結合しているため、他の膜タンパク質よりも熱安定性が高い特徴もあってか古くからNMRの適用が積極的になされ、1975年ごろ網膜の円盤状錐体外接の脂質成分の¹H緩和時間測定が初期の論文であった^[7]。また、1971年に高度好塩菌由来の光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシン (BR) が発見され^[1]、BRと脂質のみで構成された紫膜は高度好塩菌から容易に単離でき、取り扱いやすかったため、多くの生体系固体NMR研究者がBRを研究対象とした。J. Hertzfeld、R.G. Griffinらは¹³Cレチナールおよび¹⁵N Lys標識BRを作成し、暗順応状態でのall-trans型：13-cis、15-syn型=1：1を決定した^[8, 9]。また、サファイアローターに試料を充填し、低

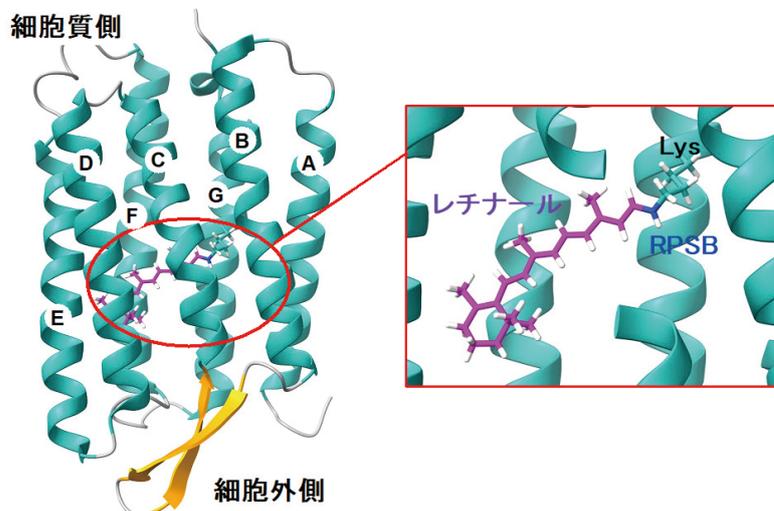


図1 微生物型ロドプシンの立体構造モデルとレチナール結合部位 (PDB 5ZIMを参照して作成)。

温条件下での照射によってバクテリオロドプシンの光中間体をトラップし、各光中間体のレチナールの化学シフトから光励起後のレチナールの構造変化を明らかにした^[10]。齊藤らはアミノ酸選択標識BRと水和膜試料を用いて、¹³C交差分極-マジック角回転 (CP-MAS) / シングルパルス励起-マジック角回転 (DE-MAS) の組み合わせや緩和時間測定によってBRの動的構造を明らかにした^[11, 12]。A. Wattsらはマジック角配向サンプルスピニング (MAOSS) を適用し、紫膜中におけるBR内部のレチナールの配向を明らかにした^[13]。内藤と著者らにおいては *In-situ* 照射固体 MAS NMR 装置を開発し、BRの *all-trans* 型と *13-cis*、*15-syn* 型それぞれの光中間体のその場観測に成功した^[14, 15]。その後、固体NMR技術のさらに目覚ましい発展により、DNPと照射を組み合わせた実験によってBR内部で起きるプロトンリレーのメカニズムが解明された^[16]。また、高速MAS条件での¹H-¹⁵N/¹³C実験によりタンパク質内部のプロトン化学交換サイトの存在が明らかとなった^[17]。

固体NMR分光法は、上記のようなBRを対象とした研究にとどまらず、様々な種類のロドプシンに広く適用されている。近年ではDNPによるプロテオロドプシン (PR) のカラースイッチ機構の解明^[18]、H/D交換によるアナベナセンサリーロドプシン (ASR) のアンフォールディング経路の探索^[19]、2次元NMRによる動物型ロドプシンの光活性中間体 (Meta II) におけるレチナール周囲のアミノ酸残基の構造変化^[20]などが報告された。

この稿では、特に固体NMRによって観測したRPSBの¹⁵N化学シフト値に焦点を当て、RPSBの

¹⁵N等方性化学シフト値とロドプシンの最大吸収波長 (図2 (a)、(b)) との関係性を調査した我々の研究内容について概説する。

2. ¹⁵N RPSB 化学シフトと最大吸収波長 (λ_{\max}) の関係性

RPSBの電子環境と微生物型ロドプシンの可視吸収との関係を調査するためには、 λ_{\max} と¹⁵N RPSB化学シフト値のプロットが有効である。J. Herzfeldらは *all-trans* レチニリデンブチル¹⁵Nイミン-ハロゲン化物をモデル化合物としたRPSB部位の¹⁵N等方化学シフト値を観測した。Cl⁻ (186.8 ppm) > Br⁻ (181.8 ppm) > I⁻ (174.8 ppm) の順に化学シフトが減少し、 λ_{\max} と線形関係を示した (図3 (a) 黒丸シンボル)。さらに¹⁵N化学シフト異方性 (CSA) についても対イオンサイズに依存してテンソル値が変化することを発見した^[8, 9]。この現象の最も妥当な説明はシッフ塩基プロトンとアニオン間の水素結合強度が低下し、アニオンサイズが大きくなるにつれてNH結合分極が影響を受けるといものである。他の要因がない場合、対イオンと強く水素結合したRPSBの¹⁵N信号はより低磁場側での共鳴となり (Cl⁻)、対イオンと弱く結合した信号はより高磁場で共鳴する (I⁻)。 ¹⁵N等方化学シフトと吸収極大の関係を利用して、RPSB-対イオン距離を推定することができる^[10]。微生物型ロドプシンの λ_{\max} はレチナールの電子基底状態 (S₀) と第一励起状態 (S₁) の間のエネルギー差によって決まる (図3 (b))。S₀において、レチナール発色団の正電荷はシッフ塩基に局在し、対イオンによって安定化されている^[1]。したがって、S₀のエネルギーレベルの安定

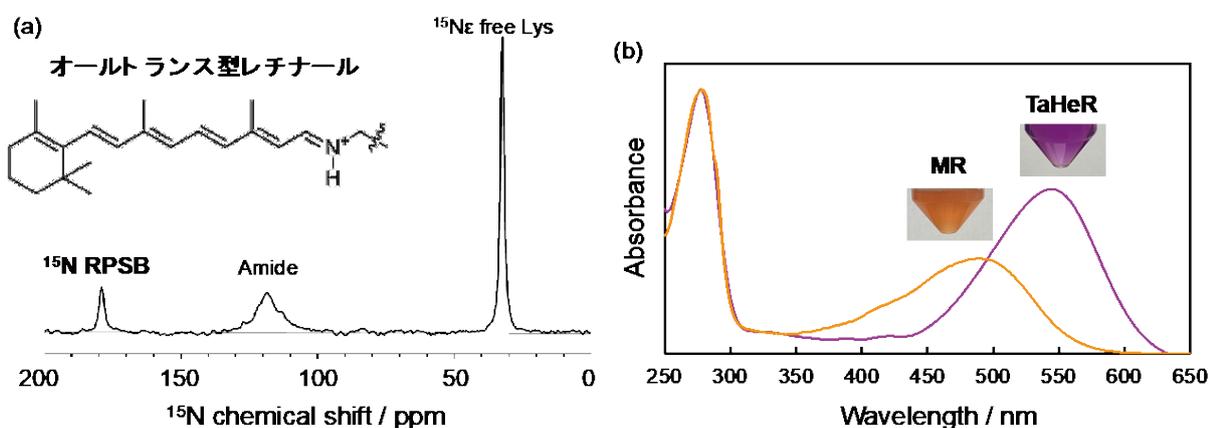


図2 (a) オールトランス型レチナール構造と¹⁵N Lys標識ロドプシンの典型的な¹⁵N CP-MASスペクトル。(b) ミドルロドプシン ($\lambda_{\max} = 490$ nm) とヘリオロドプシン ($\lambda_{\max} = 542$ nm) の紫外可視吸収スペクトルと精製時のタンパク質の写真。文献 [22] から許可を得て転載。

性に影響を与える要因としてRPSBと対イオン間の水素結合の強さが考えられ、対イオンがRPSBに近づき、水素結合強度に依存してRPSBは S_0 を安定化することで、 λ_{\max} はブルーシフトする。実際にBRで観測されたRPSB信号(168.8 ppm)と極大吸収波長(568 nm)はよい相関を示している。BRの結晶構造において、対イオン(Asp85とAsp212)と3つの水分子(W401、W402、W406)からなる五角形のクラスターを形成する(図4(a))^[21]。このうちW402はRPSBのプロトンの水素結合受容体として機能し、BRの ^{15}N RPSB化学シフト値の由来は主要な対イオンであるAsp85との間接的な相互作用によるものと考えられる。これはAsp85の変異体D85Nにおいて、D85Nのプロットが高磁場/長波長シフトすることからも

^{15}N RPSB信号は対イオンとの相互作用に敏感であることがわかる^[10]。

3. 微生物型ロドプシンの ^{15}N RPSB化学シフト

上述した ^{15}N RPSB化学シフトと λ_{\max} の関係を参考にして、我々はこれまでに10以上の微生物型ロドプシンの固体NMR実験を実施してきた^[22]。脂質膜に埋め込まれた状態の ^{15}N -Lysine標識ロドプシンを準備することで、レチナルが結合した ^{15}N RPSBのNMR信号を効率的に観測することができる。図2(a)において、 ^{15}N CP-MASによって観測されたRPSBの典型的な ^{15}N 等方NMR信号を改めて確認する。側鎖Lysineの ^{15}N および主鎖アミドの ^{15}N 信号と比べて、RPSBの信号は孤立して現れるため、 ^{15}N CP-MASによるピー

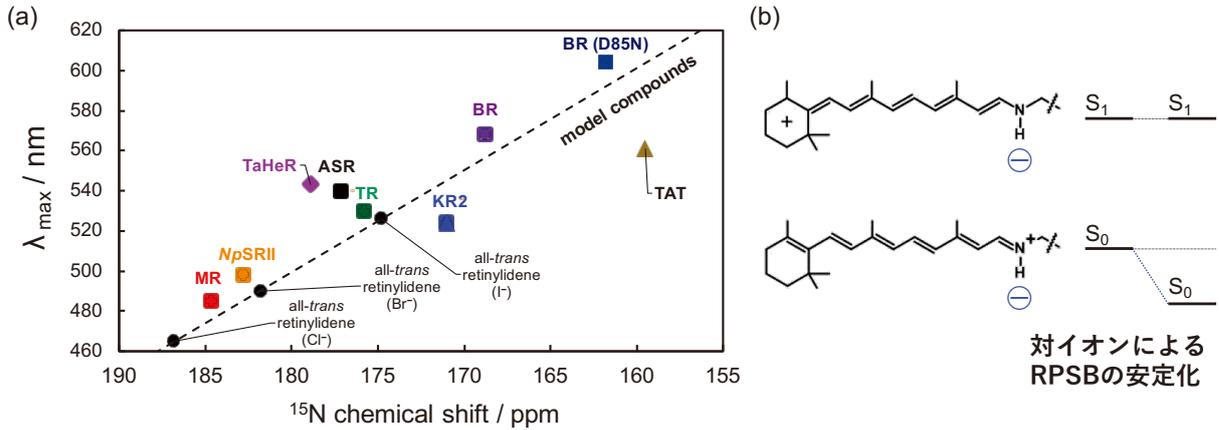


図3 (a) 微生物型ロドプシンの ^{15}N RPSB化学シフト値と極大吸収波長のプロット図。黒丸と点線はモデル化合物のプロット(Cl⁻, Br⁻, I⁻)と線形関係。(b) プロトン化 Schiff 塩基部位を有するオールトランス型レチナルの電子の基底状態と第一励起状態のエネルギーギャップ。

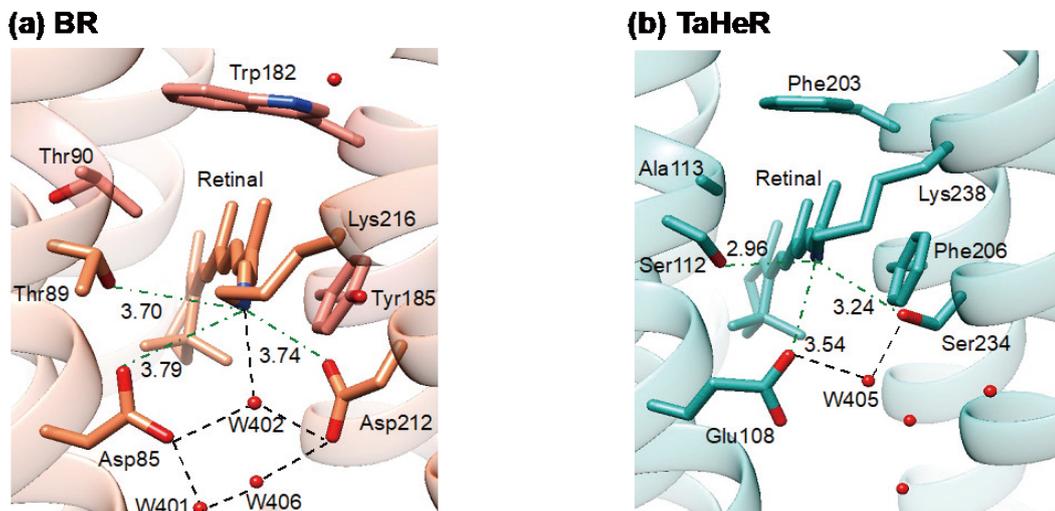


図4 (a) BR (PDB: 1C3W) と、(b) TaHeR (PDB: 6IS6) のレチナル結合部位。文献 [29] から許可を得て転載。

クの観測・帰属が容易である。また、ほとんどのロドプシタンパク質が長時間のNMR測定に耐えるほど、熱的に安定であるため十分な積算が可能である。 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 共鳴周波数600/60MHzの分光計を利用した場合、良好なSN比を得るために、4.0mmのジルコニアローターに $^{15}\text{N}\epsilon$ -Lysine標識タンパク質およそ8mgをパッキングし、278Kの設定温度・9kHz以上のMAS周波数条件で15,000回以上の積算が目安として必要である。 ^{15}N 化学シフト異方性(CSA)を含むサイドバンドパターンを取得するためには、低速MASを800–2,500Hzの範囲に設定する。なお、タンパク質はあらかじめ紫外可視吸収スペクトルから極大吸収波長 λ_{max} を確認し(図2(b))、タンパク質を含むローターは測定前の不要な光反応を避けるために2日間冷暗所に保管する。

まず、高度好塩好アルカリ性菌 *Natronomonas pharaonis* 由来のセンサーロドプシン II (NpSRII)、*Haloquadratum walsbyi* のミドルロドプシン (MR)、好熱菌由来ロドプシン (TR) のプロットは線形関係とよく一致し、これらの信号はBRよりも低磁場側で観測された(図3(a))^[23–25]。典型的な微生物型ロドプシン分子は250アミノ酸残基程度で3,500以上の原子で構成されているが、そのうちのたった一つの化学シフトによってロドプシンの吸収波長を表現できるという点は大変興味深い。一方で、一部のロドプシンはこの線形関係に従っていない。この傾向からの逸脱は、RPSBの窒素原子のユニークな電子環境を特定する手がかりを与える。これにはレチナルポリエン鎖の二重結合のねじれや、レチナル近傍の極性アミノ酸による影響などの追加要素の寄与を示している。

α プロテオバクテリアから発見されたTATロドプシンのRPSBの pK_a 値は約7と他のロドプシンよりも著しく低い(通常は $\text{pK}_a > 11$)^[26]。TATロドプシンのNMR信号は、我々が測定した微生物ロドプシンのなかで最も高磁場側で検出されたことから^[26]、RPSBと対イオンの間の水素結合が弱く、BRと比較して S_0 状態が不安定化していることを示しており、このことがTATの非常に低い pK_a 値の一因と考えられる。しかし、BRとTATロドプシンの λ_{max} 値の差が7nm程度であり、両者の S_0 – S_1 エネルギーギャップにはあまり差はない。RPSB–対イオン相互作用の強さ以外の要素、例えばレチナルポリエン鎖のねじれやレチナル近傍の極性/芳香族アミノ酸の存在な

ども影響している可能性があるため、今後もさらなる調査が必要である。

このほかにトレンドから外れるものとしてTaHeRとKR2について説明する。

4. 古細菌由来ヘリオロドプシン (TaHeR)

ヘリオロドプシン (HeR) は、膜の反転トポロジーによりN末端が細胞内側を向いている新しいロドプシンファミリーに分類される^[27]。微生物および動物ロドプシンとの配列同一性は低く(<15%)、これらのタイプとは系統的に異なっている^[27]。2018年に古細菌由来のヘリオロドプシン *Thermoplasmatales archaeon* (TaHeR) が発見されて以来、機能的な探究が行われているにもかかわらず、その機能は依然として不明である。図4でBRと比較すると、TaHeRのレチナル結合サイトは特徴的である。TaHeRの結晶構造からRPSBの周囲の水素結合半径内に水分子が存在しないため、BRとは異なりヘリックスCの対イオンであるGlu108とRPSBの間で直接水素結合を形成している(図4(b))^[28]。TaHeRの ^{15}N RPSB等方化学シフト値(178.9ppm)は対イオンと強い水素結合を示唆しているが、対イオンとの水素結合だけの作用ではない^[29]。TaHeRにはRPSBを挟む2つのセリン残基(Ser 112とSer 234)がある。これらはRPSBの電子密度に劇的な変化を引き起こす可能性がある。低速MAS周波数での ^{15}N CP-MASによる実験によって ^{15}N CSAを得ることで、RPSB窒素周辺の局所電子環境を推定することができる(図5(a))。主軸($\delta_{11}, \delta_{22}, \delta_{33}$)の割り当ては、既報を参考として図5(b)に示されている^[30, 31]。スペクトルのデコンボリューションおよび2,150Hzの低速MASでのサイドバンドパターンのフィッティングにより、TaHeRの ^{15}N 化学シフトテンソルの主値は $\delta_{11} = 58.9 (\pm 4)$ 、 $\delta_{22} = 202.9 (\pm 4)$ 、および $\delta_{33} = 274.9 (\pm 4)$ ppmを得た(図5(b))。モデル化合物の δ_{22}/δ_{33} はハロゲン化物イオン依存的に変化し、シッフ塩基窒素の電子環境が単一の支配的な要素、すなわちRPSB窒素と対イオンの水素結合の強さによって影響されることを示唆している^[8, 9]。BRおよび緑色光吸収プロテオロドプシン(GPR)もこれと同様の傾向を示す^[9, 10, 32]が、TaHeRのプロットはこの関係から大きく逸脱した^[29]。特に、レチナルポリエン平面に垂直な軸として特徴付けられる δ_{33} 値は、BRおよびGPRと比較して

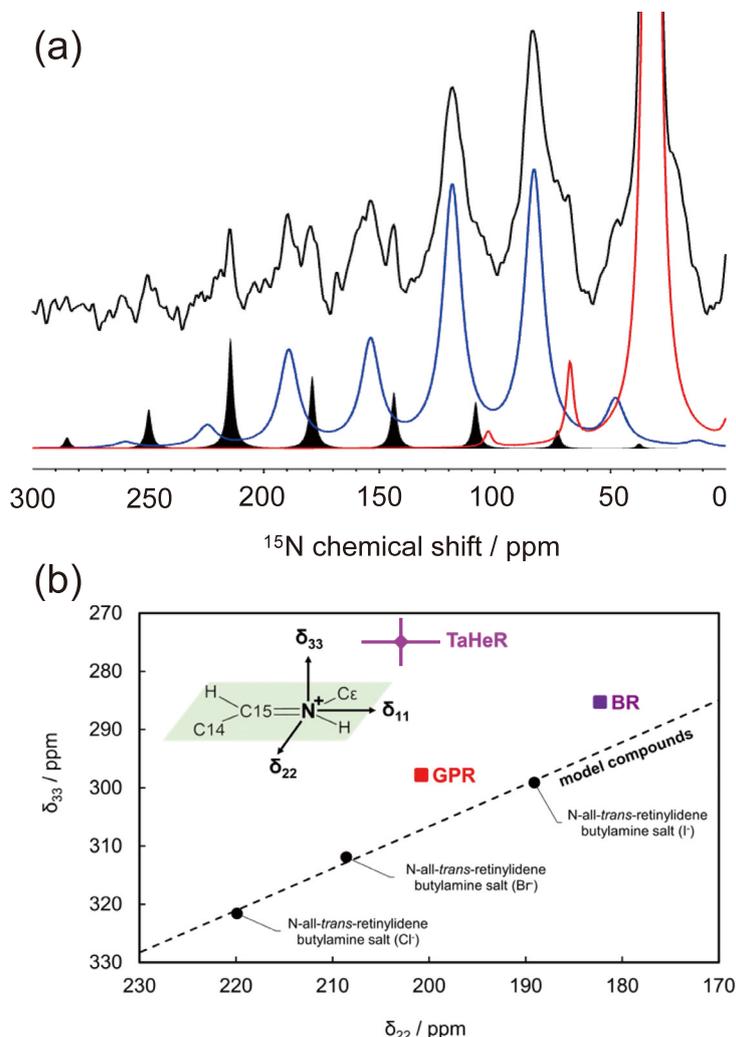


図5 TaHeRのRPSB ^{15}N 化学シフト異方性(CSA)解析。(a) 低速MASスペクトル(上段: 黒色)、フィッティングスペクトル(黒: RPSB、青: 主鎖、赤: Lysine側鎖)。(b) δ_{22}/δ_{33} プロット。点線はモデル化合物のハロゲン化物対イオン依存性。 ^{15}N 主軸系の表示。文献 [29] から許可を得て転載。

著しく減少した。これは、上述したTaHeRの ^{15}N RPSBの電子環境に対する周囲のセリン残基による直接的な影響と考えられる。ヘリオロドプシンファミリーにおいてよく保存されているセリン残基であるため、ヘリオロドプシンの機能を理解するうえで重要な固体NMRデータである。

5. 光駆動ナトリウムイオンポンププロドプシン (KR2)

海洋性細菌である *Krokinobacter eikastus* 由来の細胞外向き光駆動型 Na^+ ポンププロドプシン (KR2) は脂質膜中で五量体を形成し、 Na^+ 結合部位がプロトマー間の細胞外界面に位置している^[33~35](図6(a))。KR2の結合部位の Na^+ ($K_d = 11.4\text{ mM}$) がバッファー溶液中のアルカリ金属イオンに依存して、プロトン輸送機能に切り替わる^[33]。またKR2の熱安定性が低下し^[36]、KR2の細胞外 Na^+

結合部位とレチナール結合部位の間のアロステリックな調節が示唆されている^[37]。特にヘリックスAに存在し Na^+ 結合部位近くにあるHis30は分子間相互作用に関与するとともに、H30A変異体は NaCl 溶液中であっても光駆動型 H^+ ポンプ活性を示すが、他のアルカリ金属イオン溶液中ではイオンポンプ活性は示さない^[33]。

KR2の ^{15}N RPSB化学シフトは、この場合の対イオンであるヘリックスCのAsp116との相互作用に影響を受けている^[38]。野生型KR2とH30A変異体の間で ^{15}N RPSB信号を比較すると、両方のRPSB信号は存在するアルカリ金属イオンに応じて変化し、少なくとも Na^+ が結合している場合には高磁場側に信号が観測された^[39]。これは、 Na^+ 結合部位の構造変化がRPSBの対イオンであるAsp116との相互作用を調節していることを

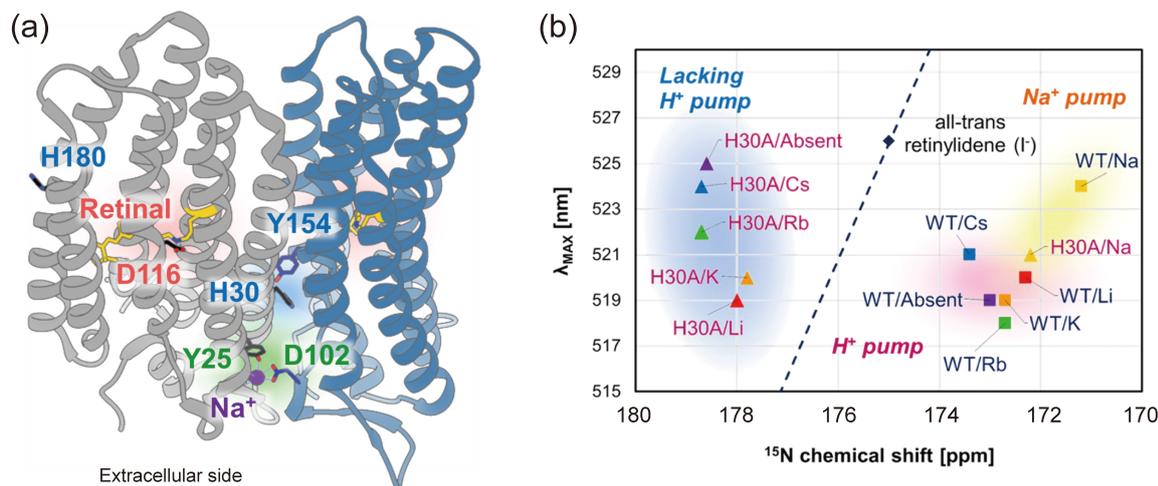


図6 (a) KR2の結晶構造(2つのプロトマーを表示)。細胞外に Na^+ 結合サイト、ヘリックスAにHis30の位置、レチナルとAsp116の位置などを表示。(b) KR2の ^{15}N RPSB化学シフト値と極大吸収波長の関係図。青背景群はイオンポンプ活性なし、黄色群は Na^+ ポンプ活性あり、ピンク背景群はプロトンポンプ活性あり。文献[39]から許可を得て転載。

示唆するものである。さらに、100 mM NaClおよびCsCl溶液中におけるH30Aの ^{15}N RPSB信号は、それぞれ172.1 ppmおよび178.4 ppmで現れ、6 ppm以上の差が生じた^[39]。 λ_{max} と ^{15}N 化学シフトの相関図に Na^+ ポンプ、 H^+ ポンプ、およびポンプ活性なしにプロットを分類することができた(図6(b))。なお、H30AのCsCl条件下では、光中間体の生成がほとんど見られないため、H30Aの対イオンAsp116がRPSBに接近することで、RPSBとAsp116の間に強い静電相互作用が生じていると考えている。

6. 終わりに

本稿では微生物ロドプシンのRPSBの ^{15}N 化学シフトと最大吸収波長との関係について概説した。固体NMR分光法は、細胞膜環境中のタンパク質のRPSBの電子環境を調査するための強力なツールであり、微生物ロドプシンの多様な色と機能の理解に貢献するものである。今後の研究では、さらに多くの微生物ロドプシンのNMR信号と λ_{max} の相関を調査し、ロドプシンの分子レベルでの構造-機能相関を明らかにするとともに、それを基にした新しいロドプシンの設計や機能改変への貢献が期待される。

謝辞

本総説で行った研究の一部は科研費 基盤研究B (JP 18H02387)、学術変革領域A 超越分子システム (JP 21H05229)、CREST (JPMJCR21B2) などの支

援を受けて実施された。山口伸子氏から研究室へご支援をいただいたこと深く感謝申し上げます。

研究をご指導いただいた横浜国立大学 内藤 晶名誉教授に深く感謝申し上げます。微生物型ロドプシンの共同研究者として、名古屋工業大学 神取秀樹 教授、岡山大学 須藤雄気 教授、東京大学物性研 井上圭一 准教授、富山大学 沖津貴志 准教授に感謝申し上げます。また、重田安里寿 博士、槇野義輝 博士をはじめとした共に研究を進めてくれた多くの学生に感謝いたします。

引用文献

- [1] O.P. Ernst, D.T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L.S. Brown, H. Kandori, Microbial and animal rhodopsins: Structures, functions, and molecular mechanisms, *Chem. Rev.* **114**, 126-163 (2014).
- [2] K. Kojima, Y. Sudo, Convergent evolution of animal and microbial rhodopsins, *RSC Adv.* **13**, 5367-5381 (2023).
- [3] O. Finkel, O. Beja, S. Belkin, Global abundance of microbial rhodopsins, *ISME J.* **7**, 448-451 (2013).
- [4] A. Rozenberg, K. Inoue, H. Kandori, O. Beja, Microbial rhodopsins: The last two decades, *Annu. Rev. Microbiol.* **75**, 427-447, (2021).
- [5] K. Deisseroth, P. Hegemann, The form and function of channelrhodopsin, *Science*, **357**, eaan5544 (2017).
- [6] A. Rozenberg, I. Kaczmarczyk, D. Matzov, J. Vierock, T. Nagata, M. Sugiura, K. Katayama, Y. Kawasaki, M. Konno, Y. Nagasaka, M. Aoyama, I. Das, E. Pahima, J. Church, S. Adam, V. A. Borin, A. Chazan, S. Augustin, J. Wietek, J. Dine, Y. Peleg, A. Kawanabe, Y. Fujiwara, O. Yizhar, M. Sheves, I. Schapiro, Y. Furutani, H. Kandori, K. Inoue, P. Hegemann, O. Beja, M. Shalev-Bernami, Rhodopsin-bestrophin fusion proteins from unicellular algae form gigantic pentameric ion channels, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **28**, 592-603 (2022).

- [7] M. F. Brown, G. P. Miljanich, L. K. Franklin, E. A. Dratz, ^1H -NMR studies of protein-lipid interactions in retinal rod outer segment disc membranes. *FEBS Lett.* **70**, 56-60 (1975).
- [8] G.S. Harbison, J. Herzfeld, R.G. Griffin, Solid-State Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance Study of the Schiff Base in Bacteriorhodopsin, *Biochemistry* **22**, 1-5 (1983).
- [9] H.J.M. De Groot, G.S. Harbison, J. Herzfeld, R.G. Griffin, Nuclear Magnetic Resonance Study of the Schiff Base in Bacteriorhodopsin: Counterion Effects on the ^{15}N Shift Anisotropy, *Biochemistry* **28**, 3346-3353 (1989).
- [10] J. G. Hu, B. Q. Sun, A. T. Petokova, R.G. Griffin, J. Herzfeld, The predischarge chromophore in bacteriorhodopsin: A ^{15}N solid-state NMR study of the L photointermediate, *Biochemistry* **36**, 9316-9322 (1997).
- [11] H. Saitô, S. Tuzi, S. Yamaguchi, M. Tanio, A. Naito, Conformation and backbone dynamics of bacteriorhodopsin revealed by ^{13}C -NMR *Biochim. Biophys. Acta -Bioenergetics.* **1460**, 39-48 (2000).
- [12] K. Yamamoto, S. Tuzi, H. Saitô, I. Kawamura, A. Naito, Conformation and dynamics changes of bacteriorhodopsin and its D85N mutant in the absence of 2D crystalline lattice as revealed by site-directed ^{13}C NMR. *Biochim. Biophys. Acta -Biomembranes* **1758**, 181-189 (2006).
- [13] C. Glaubitz, A. Watts, Magic angle-oriented sample spinning (MAOSS): A new approach toward biomembrane studies, *J. Magn. Reson.* **130**, 305-316 (1998).
- [14] I. Kawamura, N. Kihara, M. Ohmine, K. Nishimura, S. Tuzi, H. Saitô, A. Naito, Solid-State NMR Studies of Two Backbone Conformations at Tyr185 as a Function of Retinal Configurations in the Dark, Light, and Pressure Adapted Bacteriorhodopsins, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1016-1017 (2007).
- [15] A. Shigeta, Y. Otani, R. Miyasa, Y. Makino, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, A. Naito, Photoreaction pathways of bacteriorhodopsin and its D96N mutant as revealed by *in-situ* photo-irradiation solid-state NMR, *Membranes* **12**, 279 (2022).
- [16] Q. Z. Ni, T. V. Can, E. Daviso, M. Belenky, R. G. Griffin, J. Herzfeld, Primary transfer step in the light-driven ion pump bacteriorhodopsin: An irreversible U-turn revealed by dynamic nuclear polarization-enhanced magic angle spinning NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 4085-4091 (2018).
- [17] D. Friedrich, F. N. Brunig, A. J. Nieuwkoop, R. R. Netz, P. Hegemann, H. Oschkinat, Collective exchange processes reveal an active site proton cage in bacteriorhodopsin, *Commun. Biol.* **3**, 4 (2020).
- [18] J. Mao, X. Jin, M. Shi, D. Heidenreich, L. J. Brown, R. C. D. Brown, M. Lelli, X. He, C. Glaubitz. Molecular mechanisms and evolutionary robustness of a color switch in proteorhodopsins. *Sci. Adv.* **10**, eadj0384 (2024).
- [19] P. Xiao, D. Bolton, R. A. Munro, L. S. Brown, V. Ladizhansky, Solid-state NMR spectroscopy based atomistic view of a membrane protein unfolding pathway, *Nat. Commun.* **10**, 3867 (2019).
- [20] N. Kimata, A. Pope, O. B. Sanchez-Reyes, M. Eilers, C. A. Opefi, M. Ziliox, P. J. Reeves, S. O. Smith, Free backbone carbonyls mediate rhodopsin activation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 738-743 (2016).
- [21] N. Hasegawa, H. Jonotsuka, K. Miki, K. Takeda, X-ray structure analysis of bacteriorhodopsin at 1.3 Å resolution. *Nat. Commun.* **14**, 1056 (2023).
- [22] S. Kumagai, I. Kawamura, Solid-state NMR of the retinal protonated Schiff base in microbial rhodopsins, *Magn. Reson. Lett.* **4**, 200132 (2024).
- [23] I. Kawamura, H. Seki, S. Tajima, Y. Makino, A. Shigeta, T. Okitsu, A. Wada, A. Naito, Y. Sudo, Structure of a retinal chromophore of dark-adapted middle rhodopsin as studied by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Biophys. Physicobiology.* **18**, 177-185 (2021).
- [24] Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Nishio, K. Ohsawa, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, N. Kamo, A. Ramamoorthy, A. Naito, An active photoreceptor intermediate revealed by *in situ* photoirradiated solid-state NMR spectroscopy, *Biophys. J.* **101**, L50-L52 (2011).
- [25] T. Shionoya, M. Mizuno, T. Tsukamoto, K. Ikeda, H. Seki, K. Kojima, M. Shibata, I. Kawamura, Y. Sudo, Y. Mizutani, High Thermal Stability of Oligomeric Assemblies of Thermophilic Rhodopsin in a Lipid Environment, *J. Phys. Chem. B.* **122**, 6945-6953 (2018).
- [26] S. Arikawa, T. Sugimoto, T. Okitsu, A. Wada, K. Katayama, H. Kandori, I. Kawamura, Solid-state NMR for the characterization of retinal chromophore and Schiff base in TAT rhodopsin embedded in membranes under weakly acidic conditions, *Biophys. Physicobiology.* **20**, e201017, (2023).
- [27] A. Pushkarev, K. Inoue, S. Larom, J. Flores-Urbe, M. Singh, M. Konno, S. Tomida, S. Ito, R. Nakamura, S. Tsunoda, A. Philosof, I. Sharon, N. Yutin, E. Koonin, H. Kandori, O. Béjà, A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics, *Nature* **558**, 595-599 (2018).
- [28] W. Shihoya, K. Inoue, M. Singh, M. Konno, S. Hososhima, K. Yamashita, K. Ikeda, A. Higuchi, T. Izume, S. Okazaki, M. Hashimoto, R. Mizutori, S. Tomida, Y. Yamauchi, R. Abe-Yoshizumi, K. Katayama, S. Tsunoda, M. Shibata, Y. Furutani, A. Pushkarev, O. Béjà, T. Uchihashi, H. Kandori, O. Nureki, Crystal structure of heliorhodopsin, *Nature* **574** (2019) 132-136.
- [29] S. Suzuki, S. Kumagai, T. Nagashima, T. Yamazaki, T. Okitsu, A. Wada, A. Naito, K. Katayama, K. Inoue, H. Kandori, I. Kawamura, Characterization of retinal chromophore and protonated Schiff base in Thermoplasmatales archaeon heliorhodopsin using solid-state NMR spectroscopy, *Biophys. Chem.* **296**, 106991 (2023).
- [30] J. F. Hinton, P. L. Guthrie, P. Pulay, K. Wolinski, G. Fogarasi, Ab initio quantum mechanical calculation of the nitrogen chemical-shift tensor of the imine moiety of benzylideneaniline and analogs of all-*trans*-retinylidenebutylimine, *J. Magn. Reson.* **96**, 154-158 (1992).
- [31] C.J. Hartzell, M. Whitfield, T.G. Oas, G.P. Drobny, Determination of the ^{15}N and ^{13}C chemical shift tensors of L- ^{13}C alanyl-L- ^{15}N alanine from the dipole-coupled powder patterns, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5966-5969 (1987).
- [32] N. Pflieger, M. Lorch, A.C. Woerner, S. Shastri, C. Glaubitz, Characterisation of Schiff base and chromophore in green proteorhodopsin by solid-state NMR, *J. Biomol. NMR.* **40**, 15-21 (2008).

- [33] K. Inoue, H. Ono, R. Abe-Yoshizumi, S. Yoshizawa, H. Ito, K. Kogure, H. Kandori, A light-driven sodium ion pump in marine bacteria, *Nat. Commun.* **4**, 1610-1678 (2013).
- [34] M. Shibata, K. Inoue, K. Ikeda, M. Konno, M. Singh, C. Kataoka, R. Abe-Yoshizumi, H. Kandori, T. Uchihashi, Oligomeric states of microbial rhodopsins determined by high-speed atomic force microscopy and circular dichroic spectroscopy, *Sci. Rep.* **8**, 8262 (2018).
- [35] I. Gushchin, V. Shevchenko, V. Polovinkin, K. Kovalev, A. Alekseev, E. Round, V. Borshchevskiy, T. Balandin, A. Popov, T. Gensch, C. Fahlke, C. Bamann, D. Willbold, G. Büldt, E. Bamberg, V. Gordeliy, Crystal structure of a light-driven sodium pump, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 390-396 (2015).
- [36] H. Kato, K. Inoue, K.R. Abe-Yoshizumi, Y. Kato, H. Ono, M. Konno, S. Hososhima, T. Ishizuka, M. R. Hoque, H. Kunitomo, J. Ito, S. Yoshizawa, K. Yamashita, M. Takemoto, T. Nishizawa, R. Taniguchi, K. Kogure, A.D. Maturana, Y. Iino, H. Yawo, R. Ishitani, H. Kandori, O. Nureki, Structural basis for Na⁺ transport mechanism by a light-driven Na⁺ pump, *Nature*. **521**, 48-53 (2015).
- [37] A. Otomo, M. Mizuno, K. Inoue, H. Kandori, Y. Mizutani, Allosteric Communication with the Retinal Chromophore upon Ion Binding in a Light-Driven Sodium Ion-Pumping Rhodopsin, *Biochemistry* **59**, 520-529 (2020).
- [38] A. Shigeta, S. Ito, K. Inoue, T. Okitsu, A. Wada, H. Kandori, I. Kawamura, Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Structural Study of the Retinal-Binding Pocket in Sodium Ion Pump Rhodopsin, *Biochemistry* **56**, 543-550 (2017).
- [39] A. Shigeta, S. Ito, R. Kaneko, S. Tomida, K. Inoue, H. Kandori, I. Kawamura, Long-distance perturbation on Schiff base-counterion interactions by His30 and the extracellular Na⁺-binding site in *Krokinobacter* rhodopsin 2, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 8450-8455 (2018).



川村 出 (かわむら・いずる)

2007年3月 横浜国立大学 大学院工学府 機能発現工学専攻 博士(工学)取得
 2007年4月 横浜国立大学 大学院工学研究院 研究教員
 2009年9月 グェルフ大学 客員研究員
 2012年1月 横浜国立大学 大学院工学研究院 機能の創生部門 助教
 2013年4月 横浜国立大学 大学院工学研究院 機能の創生部門 准教授
 2024年4月 横浜国立大学 大学院工学研究院 機能の創生部門 教授

脂質二重膜中における膜タンパク質の動的構造解析

東京大学・大学院薬学系研究科

幸福 裕

happy@nmrlab.f.u-tokyo.ac.jp

序

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR)・イオンチャネル・トランスポーターをはじめとする膜タンパク質は、細胞内外の情報伝達など、様々な生理機能に関与しており、主要な創薬標的分子でもある^[1]。近年の、X線結晶構造解析および極低温電子顕微鏡解析の発展により、多くの膜タンパク質の精密な立体構造が明らかになってきたが、それらの静的な立体構造のみでは、膜タンパク質の機能を十分に理解するには至っていない。例えば、GPCRには、異なるシグナル伝達強度 (薬効度) を示すリガンドが存在するが (図1 (a))、不活性型・活性型のX線結晶構造のみでは、GPCRに特徴的な薬効度が発現する機構は説明できない^[2]。生理的条件に近い水溶液中において、生体分子の動的性質を維持したまま、その構造が解析できる核磁気共鳴 (NMR) 法は、膜タンパク質の機能を動的構造の観点から解明することができる点で有効である。しかしながら、GPCRをはじめとする真核生物由来の膜タンパク質は、大腸菌での発現が困難であることが知られており、構造生物学的な解析が可能なスケールで活性を保持した

状態で発現をおこなうには、昆虫細胞または哺乳動物細胞が必要である。このことから、GPCRなど真核生物由来膜タンパク質のNMR解析例は、細胞内領域にトリフルオロメチル基を化学修飾により導入し、¹⁹F-NMRで解析した例^[3]などに限られており、膜貫通領域の動的構造をNMR法により解析することは困難であるとされていた。

1. NMR法を用いたGPCRの動的構造の検出

我々は、昆虫細胞発現系におけるメチオニンメチル基の安定同位体標識法を新規に開発し、溶液NMR法を用いて、GPCRの一種である β_2 -アドレナリン受容体 (β_2 AR) の膜貫通領域の動的構造を解析した^[4]。 β_2 ARの膜貫通領域には9残基のメチオニンが存在し、そのうちM82・M215・M279は不活性型・活性型のX線結晶構造で大きく構造が変化する領域に存在する (図1 (b))。シグナルを最も強く流す完全作動薬およびシグナルをほとんど流さない逆作動薬結合状態で β_2 ARの¹H-¹³C SOFAST-HMQCを解析することで、活性化にともなうM82・M215・M279の化学シフト変化を観測することに成功した (図2 (a))。この

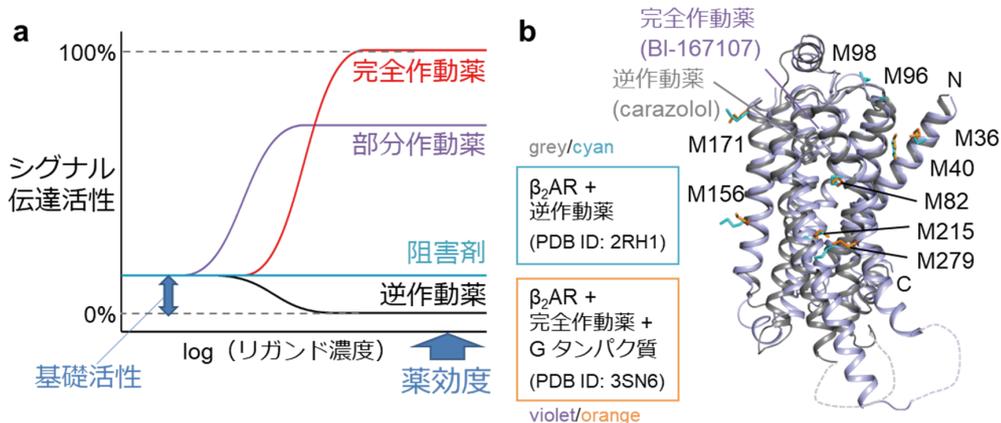


図1 GPCRのシグナル伝達活性とX線結晶構造

(a) GPCRに様々なリガンドが結合した条件でのシグナル伝達活性。

(b) GPCRの一種である β_2 ARのX線結晶構造。シグナルを流さない逆作動薬が結合した構造と、シグナルを流す完全作動薬およびGタンパク質が結合した状態の構造を重ね合わせて示す。またメチオニンの分布を側鎖のスティック表示にて示す。

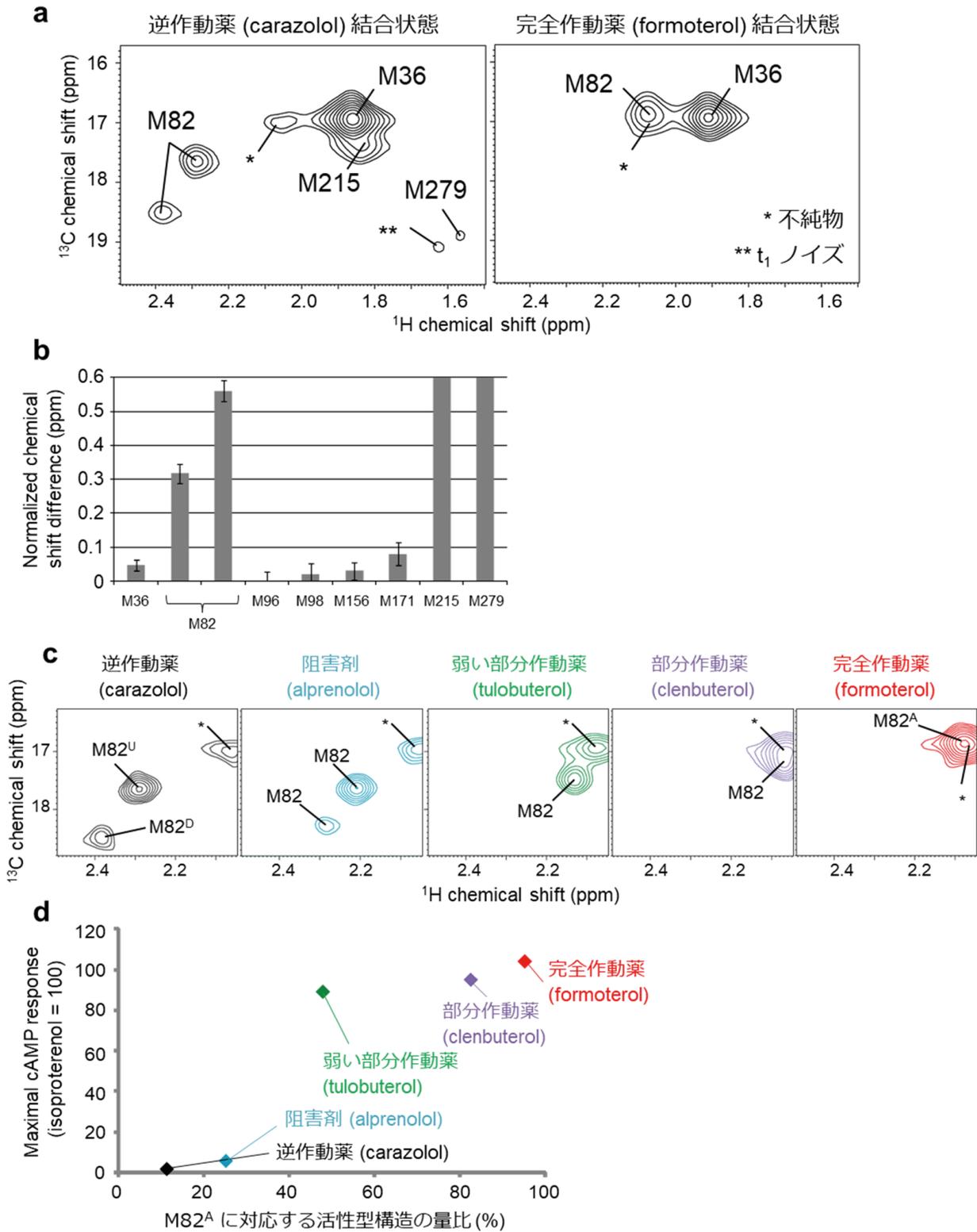


図2 薬効度の異なる様々なリガンドが結合したβ₂ARのNMR解析

- (a) 逆作動薬または完全作動薬が結合したβ₂ARの¹H-¹³C SOFAST-HMQCスペクトル。この解析では、β₂ARに²H標識は導入していないことから、¹H-¹³C HMQCではなく、¹H-¹³C SOFAST-HMQCを用いた。β₂ARにはM96T/M98T/M156L/M171S変異が導入されている。
- (b) 逆作動薬結合状態と完全作動薬結合状態のメチオンメチル基の化学シフト差。
- (c) 様々な薬効度が異なる状態のM82メチル基由来のNMRシグナル。逆作動薬結合状態で観測される2個のM82のNMRシグナルは、構造の異なる2種類の不活性化状態に対応することから、これらを高磁場(upfield)、低磁場(downfield)側のシグナルという意味で、それぞれM82^U、M82^Dと名付けた。また、完全作動薬結合状態で観測される1個のM82のNMRシグナルは、活性化(active)状態に対応することから、これをM82^Aと名付けた。
- (d) NMRスペクトルから計算される活性化型構造の割合とシグナル伝達活性の相関。いずれも文献[4]より改変。

とき、9残基のメチオニンのうち、溶媒または脂質側に向けた4残基のメチオニンを変異することで、シグナルの縮重を回避し、スペクトルを簡略化することが、詳細な解析に有効であった。逆作動薬および完全作動薬結合状態のM82の化学シフトは、それぞれ逆作動薬結合型の2種類のX線結晶構造^[5, 6]、完全作動薬とGタンパク質結合型のX線結晶構造^[7]の特徴とよく合致していた。薬効度が異なる様々なリガンドが結合した状態で β_2 ARの ^1H - ^{13}C SOFAST-HMQCを解析したところ、M82・M215・M279の化学シフトは薬効度と相関する連続的な変化を示した(図2(b))。この結果は、 β_2 ARの膜貫通領域がシグナル伝達を誘起しない2種類の不活性型構造と、シグナル伝達を誘起する活性型構造の平衡状態にあることを示唆する。スペクトルから推測される活性型構造の量比は、各リガンドの薬効度とよく相関することから、平衡状態における活性型構造の量比がシグナル伝達活性を規定することがわかる(図2(c))。以上の結果から、GPCRにおける様々な強度での薬効度の発現が、膜貫通領域における動的平衡により決定されることがはじめて明らかになった。

2. 昆虫細胞発現系における高度な安定同位体標識法

以上の研究において、GPCRの膜貫通領域の動的構造の重要性が明らかになった一方で、GPCRを界面活性剤のミセルに可溶化した状態で解析をおこなっており、生理的な環境である脂質二重膜中での解析ではないという課題があった。ナノディスク^[8]は、アポリポタンパク質変異体である膜骨格タンパク質(membrane scaffold protein; MSP)で、直径10nm程度の脂質二重膜を安定化させるものであり、水溶性が高く単分散であることから、溶液NMR法での解析に適している(図3)。そこで、GPCRをナノディスクに再構成し、溶液NMR法による解析をおこなうこととした。

リポソームと比較すると小さいとはいえ、例えばGPCRを再構成したナノディスクのストークス径から計算した実効的な分子量は約300kDaにもなることから、溶液NMR測定においてはNMR測定感度の低下は大きな課題となる。このような分子量領域においても高感度NMR解析を可能にする技術として、メチルTROSY法がある^[9]。メ

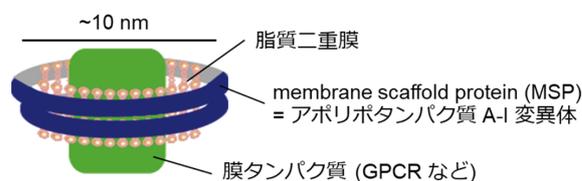


図3 ナノディスクの模式図

チルTROSY法の適用においては、観測するメチル基を選択的に ^1H - ^{13}C 標識するとともに、その周囲の水素原子を ^2H 標識することが高感度化に必要である。 ^2H 標識率については、高ければ高いほどよいものの、 β_2 ARのメチオニン残基について、NMR測定感度をシミュレーションした結果では、70%またはそれ以上に ^2H 標識することができれば、感度の大幅な向上が期待できることがわかる(図4(a))。しかしながら、昆虫細胞発現系においては、アミノ酸選択的な ^{13}C または ^{15}N 標識、および、高コストではあるものの均一 ^{13}C ^{15}N 標識などは報告されていた^[10]一方で、高度な ^2H 標識については報告されていなかった。これは、昆虫細胞は、大腸菌や酵母とは異なり、限られた炭素源・窒素源から構成されたいわゆる最小培地では生育せず、多くのアミノ酸を含む富栄養培地を必要とすること、および高濃度の重水が昆虫細胞にとって毒性を示すという性質により、安定同位体標識のハードルがきわめて高いことが要因であった。そこで、我々は、メチルTROSY法が適用可能な昆虫細胞発現系における、高度な ^2H 標識を確立することとした^[11]。

安定同位体標識の戦略としては、アミノ酸の大半を欠乏させた昆虫細胞培地を用い、これに市販の ^2H 標識藻類由来アミノ酸混合物および比較的安価な ^2H 標識アミノ酸を添加することを考えた。NMR解析をおこなうには、一定濃度のタンパク質試料が必要であることをふまえ、発現量の低下を引き起こすような重水はあえて添加しないこととした。安定同位体標識条件の確立においては、様々な組成のアミノ酸を様々なタイミングで添加した条件で検討をおこない、最適な条件を探索した。具体的には、20種類のアミノ酸を含む低分子量タンパク質であるチオレドキシンをモデルタンパク質として選択し、その標識率と発現量を指標に標識条件の最適化をおこなった。最適化した条件においては、チオレドキシンの発現量は非標識条件の50-70%と十分であった。標識率については、15種類のアミノ酸について、 ^2H 標識

が導入されていることが確認できた(図4(b))。特に、膜貫通領域に高頻度で存在しているロイシン・バリン・イソロイシン・フェニルアラニン・スレオニンのすべての水素原子、およびチロシン・システイン・トリプトファンの一部の水素原子については、約90%の ^2H 標識率が達成できたことから、GPCRを含む膜タンパク質一般のNMR解析において、十分な標識率が達成できたと判断した。驚くべきことに、トランスアミナーゼにより容易に引き抜かれるであろう α 位についても、 ^2H 標識率は多くのアミノ酸で高いことがわかった。この発見は、 ^2H 、 ^{15}N 標識アミノ酸を用いたGPCRの標識、および主鎖アミド基のTROSY解析への展開にもつながっている^[12]。

3. 脂質二重膜中における GPCR の動的構造解析

昆虫細胞発現系においても、十分な ^2H 標識率が達成できたことから、実際にナノディスクの脂質二重膜中における $\beta_2\text{AR}$ のNMR解析に適用す

ることとした^[11]。上記のチオレドキシソを用いた条件検討から、昆虫細胞におけるタンパク質の発現量は、標識するアミノ酸の数が多くなるにつれて、低下する傾向があることがわかった。そこで、 $\beta_2\text{AR}$ の発現時には、実際にメチオニンメチル基の周辺に存在する10種類のアミノ酸に限って、 ^2H 標識をおこなうこととした。メチオニンメチル基を ^{13}C 標識した $\beta_2\text{AR}$ 、メチオニンメチル基を ^{13}C 標識し、さらに周囲の10種類のアミノ酸を ^2H 標識した $\beta_2\text{AR}$ について、ナノディスクの脂質二重膜に再構成し、 ^1H - ^{13}C HMQC測定をおこなった。その結果、 ^2H 標識をおこなっていない条件では、M36のメチル基に由来するNMRシグナルのみが観測されたのに対し、 ^2H 標識をおこなった条件では、5残基すべてのメチオニン由来のNMRシグナルを十分な感度で観測できた(図4(c))。NMRシグナルのS/Nを考慮すると、 ^2H 標識を導入することで、メチルTROSY法の効果などにより、NMRシグナルの測定感度は5倍

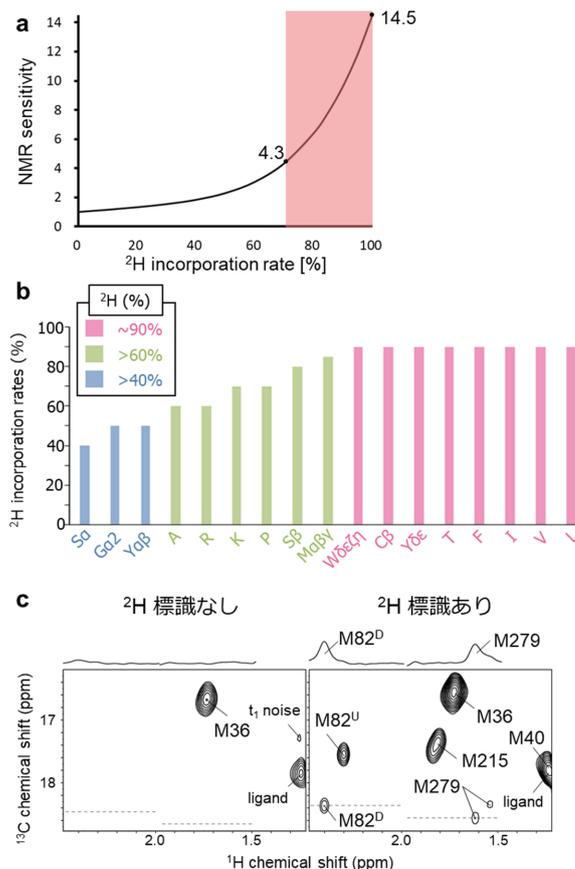


図4 昆虫細胞発現系における ^2H 標識

(a) $\beta_2\text{AR}$ のM82メチル基のNMRシグナル強度を様々な ^2H 標識率にてシミュレーションした結果。

(b) 昆虫細胞発現系における最適化した ^2H 標識条件における各アミノ酸残基の ^2H 標識率。

(c) ナノディスクに再構成した $\beta_2\text{AR}$ の ^1H - ^{13}C HMQCスペクトル。左は ^2H 標識をおこなっていないもの、右はACFILMTVWYの ^2H 標識をおこなったもの。 ^2H 標識を導入した試料については、 ^1H - ^{13}C SOFAST-HMQCよりも ^1H - ^{13}C HMQCを用いることが適切であると考え、両方の試料について ^1H - ^{13}C HMQCを用いた。

(b)と(c)は文献[11]より改変。

以上に上昇したことがわかった。この結果から、昆虫細胞発現系で発現したGPCRについても、 ^2H 標識をおこなうことにより、実効的な分子量が 300 kDa にもおよぶ高分子量でも NMR 解析が可能であると結論した。

ナノディスクの脂質二重膜に再構成した $\beta_2\text{AR}$ について、薬効度が様々に異なるリガンドが結合した状態で、NMR 解析をおこなった (図 5 (a))。その結果、不活性型構造に対応する逆作動薬結合状態、活性型構造に対応する完全作動薬結合状態での化学シフトから、界面活性剤ミセル中と脂質二重膜中で、 $\beta_2\text{AR}$ の立体構造に大きな違いはないことがわかった。一方で、部分作動薬結合状態の NMR シグナルについては、線形および化学シフトに大きな違いが観測された。このことは、界面活性剤ミセル中と脂質二重膜中の両方で、いずれも不活性型構造と活性型構造の平衡が存在する

ものの、平衡にある各状態の量比や、その間の交換速度に大きな違いがあることを意味している (図 5 (b))。このことは、 $\beta_2\text{AR}$ をはじめとする GPCR の動的構造を、生理的条件に近い脂質二重膜中で解析することの重要性を示している。実際に、界面活性剤ミセル中よりも脂質二重膜中の平衡パラメータの方が、様々な化合物が結合した状態のシグナル伝達活性をより定量的に説明できる^[11]。また、脂質二重膜中の GPCR の構造平衡のタイムスケールが、実験的に明らかになったことも意義がある。GPCR の下流のシグナル伝達については、例えば G タンパク質依存的な内向き整流性カリウムチャネルの開口が 200 msec 以内に起こるなど、その活性化は迅速に起こることが知られている^[13]。このことは、GPCR の活性化がそれよりも速いタイムスケールで起こることを示唆しているが、そのような速い活性化を実験的に

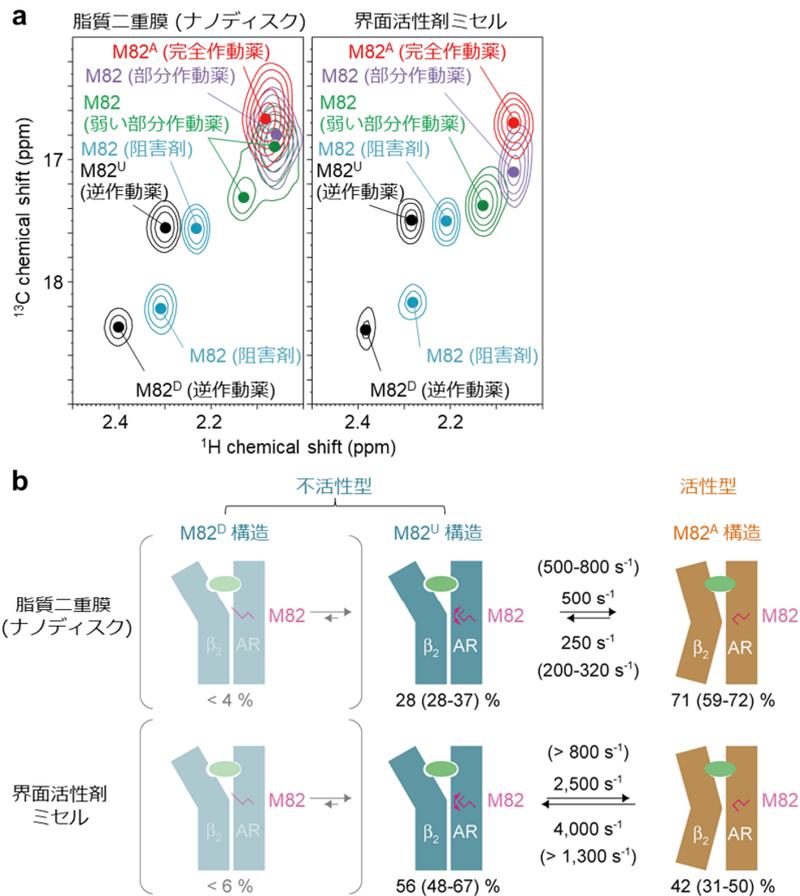


図 5 脂質二重膜と界面活性剤における $\beta_2\text{AR}$ の動的構造の違い

(a) 薬効度が異なる様々なリガンドが結合した $\beta_2\text{AR}$ の ^1H - ^{13}C HMQC スペクトルの重ね合わせ。M82 メチル基由来の NMR シグナルについて示す。左はナノディスクに再構成したもの、右は界面活性剤ミセル中のもの。
 (b) ナノディスクと界面活性剤ミセルにおける構造平衡の違い。弱い部分作動薬が結合した状態における NMR スペクトルから算出された各状態の量比およびその間の交換速度を示す。NMR スペクトルと合致するパラメータの中央値および範囲 (括弧内) を示す。M82^D、M82^U、M82^A 構造は、それぞれ逆作動薬結合状態で観測される NMR シグナル M82^D、M82^U および完全作動薬結合状態で観測される NMR シグナル M82^A に対応する構造を示す。

いずれも文献 [11] より改変。

観測したデータはなかった。 β_2 ARの膜貫通領域の構造平衡がmsecのタイムスケールであることは、GPCRの迅速な活性化をはじめて実験的に示したことになる。

4. 昆虫細胞発現系における安定同位体標識法の応用と今後の展望

以上の研究により、それまでは困難であると考えられていた、GPCRをはじめとする真核生物由来膜タンパク質の、脂質二重膜中での溶液NMR解析への道が開かれた。最近では、脂質二重膜中の β_2 ARが、GPCRキナーゼによりリン酸化され、さらにシグナル伝達に関わるタンパク質であるアレスチンが結合した状態についても、NMR観測に成功している^[14, 15]。また、 β_2 ARと比較すると、多くのGPCRは昆虫細胞での発現量が少ないことが知られており、NMR解析のハードルは高いが、²H標識によりNMR測定感度が向上したことで、多くのGPCRのNMR解析も可能となる。これにより、例えば μ オピオイド受容体に対して、モルヒネよりも副作用が少ない鎮痛薬として着目されているoliceridineが結合した状態のNMR解析から、oliceridineがGタンパク質を介したシグナル伝達を強く誘起し、アレスチンを介したシグナル伝達をあまり誘起しない機構が明らかとなった^[16]。また、本手法は、GPCR以外の膜タンパク質へも有効であり、実際に我々は、ナノディスクの脂質二重膜中でのリガンド依存性カチオンチャネルの活性化機構の解明にも成功している^[17]。この過程で、我々はメチオニンメチル基だけでなく、アラニンメチル基についても、トランスアミナーゼ阻害剤を添加することで、メチルTROSY法を用いた解析に十分な標識率が達成できることを見出した^[18]。複数のアミノ酸残基のプローブを組み合わせることで、分子内の様々な部位の構造変化を同時に解析可能になったことが、本解析においては有効であった。

現在市販されている医薬品の約半数は膜タンパク質を標的としているが、ヒト由来の膜タンパク質のほとんどは、これまで、NMR解析がされてこなかった。今後は、さらなる技術革新により、このような高難度の標的膜タンパク質についても、溶液NMR解析が可能になり、近年著しい発展をとげている極低温電子顕微鏡技術などと組み合わせることで、構造とダイナミクスの両面から機能解明が進展すると期待される。一方で、ヒト

の膜タンパク質の多く、特にイオンチャネルやトランスポーターなどの高分子量膜タンパク質については、昆虫細胞発現系を用いても十分な収量が得られないことも多い。このような場合には、哺乳細胞発現系を用いることが有効であることが、報告されている^[19]。我々は、昆虫細胞で培ってきた安定同位体標識技術が、哺乳細胞発現系にも拡張できることを見出しており、本技術を使用することで、溶液NMR法の応用範囲がさらに広がることを期待している。

謝辞

本稿の研究は、東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室・嶋田一夫教授（現名誉教授・理研BDRチームリーダー・広島大副学長）の指導の下で行った。この場を借りて、感謝申し上げます。また、共同研究者である、同研究室の竹内恒教授、上田卓見准教授（現・大阪大教授）、スタッフ、学生に感謝申し上げます。また、本稿の本研究は、日本学術振興会・科学研究費（23H04055、21H02410、20K21473、19H04946、17H04999、16H01353、15K18843）等の支援を受けておこなわれた。

引用文献

- [1] Rask-Andersen, M., Almen, M.S. & Schiöth, H.B. Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 579-590. (2011).
- [2] Hendrickson, W.A. Atomic-level analysis of membrane-protein structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 464-467. (2016).
- [3] Liu, J.J., Horst, R., Katritch, V., Stevens, R.C. & Wüthrich, K. Biased signaling pathways in β_2 -adrenergic receptor characterized by ¹⁹F-NMR. *Science* **335**, 1106-1110. (2012).
- [4] Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Maeda, M., Tsujishita, H. & Shimada, I. Efficacy of the β_2 -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nat. Commun.* **3**, 1045. (2012).
- [5] Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K. & Stevens, R.C. High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-1265. (2007).
- [6] Hanson, M.A., Cherezov, V., Griffith, M.T., Roth, C.B., Jaakola, V.P., Chien, E.Y.T., Velasquez, J., Kuhn, P. & Stevens, R.C. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 angstrom structure of the human β_2 -adrenergic receptor. *Structure* **16**, 897-905. (2008).
- [7] Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Zou, Y.Z., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae,

- P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skinotitis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K. & Kobilka, B.K. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549-555. (2011).
- [8] Bayburt, T.H., Grinkova, Y.V. & Sligar, S.G. Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Lett.* **2**, 853-856. (2002).
- [9] Tugarinov, V., Hwang, P.M., Ollerenshaw, J.E. & Kay, L.E. Cross-correlated relaxation enhanced ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 10420-10428. (2003).
- [10] Vajpai, N., Strauss, A., Fendrich, G., Cowan-Jacob, S.W., Manley, P.W., Grzesiek, S. & Jahnke, W. Solution conformations and dynamics of ABL kinase-inhibitor complexes determined by NMR substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib. *J. Biol. Chem.* **283**, 18292-18302. (2008).
- [11] Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Mizumura, T., Suzuki, S. & Shimada, I. Functional dynamics of deuterated β_2 -adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 13376-13379. (2014).
- [12] Imai, S., Yokomizo, T., Kofuku, Y., Shiraishi, Y., Ueda, T. & Shimada, I. Structural equilibrium underlying ligand-dependent activation of β_2 -adrenoreceptor. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 430-439. (2020).
- [13] Bunemann, M., Bucheler, M.M., Philipp, M., Lohse, M.J. & Hein, L. Activation and deactivation kinetics of α_{2A} - and α_{2C} -adrenergic receptor-activated G protein-activated inwardly rectifying K^+ channel currents. *J. Biol. Chem.* **276**, 47512-47517. (2001).
- [14] Shiraishi, Y., Natsume, M., Kofuku, Y., Imai, S., Nakata, K., Mizukoshi, T., Ueda, T., Iwaï, H., & Shimada, I. Phosphorylation-induced conformation of β_2 -adrenoceptor related to ARrestin recruitment revealed by NMR. *Nat. Commun.* **9**, 194. (2018).
- [15] Shiraishi, Y., Kofuku, Y., Ueda, T., Pandey, S., Dwivedi-Agnihotri, H., Shukla, A.K. & Shimada, I. Biphasic activation of β -arrestin 1 upon interaction with a GPCR revealed by methyl-TROSY NMR. *Nat. Commun.* **12**, 7158. (2021).
- [16] Okude, J., Ueda, T., Kofuku, Y., Sato, M., Nobuyama, N., Kondo, K., Shiraishi, Y., Mizumura, T., Onishi, K., Natsume, M., Maeda M., Tsujishita H., Kuranaga T., Inoue M. & Shimada I. Identification of a conformational equilibrium that determines the efficacy and functional selectivity of the μ -opioid receptor. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 15771-15776. (2015).
- [17] Minato, Y., Suzuki, S., Hara, T., Kofuku, Y., Kasuya, G., Fujiwara, Y., Igarashi, S., Suzuki, E., Nureki, O., Hattori, M., Ueda T. & Shimada I. Conductance of P2X_4 purinergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 4741-4746. (2016).
- [18] Kofuku, Y., Yokomizo, T., Imai, S., Shiraishi, Y., Natsume, M., Itoh, H., Inoue, M., Nakata, K., Igarashi, S., Yamaguchi, H., Mizukoshi T., Suzuki E-I., Ueda T. & Shimada I. Deuteration and selective labeling of alanine methyl groups of β_2 -adrenergic receptor expressed in a baculovirus-insect cell expression system. *J. Biomol. NMR* **71**, 185-192. (2018).
- [19] Goehring, A., Lee, C.-H., Wang, K.H., Michel, J.C., Claxton, D.P., Bacongus, I., Althoff, T., Fischer, S., Garcia, K.C. & Gouaux, E. Screening and large-scale expression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Nat. Protoc.* **9**, 2574-2585. (2014).



幸福 裕 (こうふく・ゆたか)

2009年3月、東京大学・大学院薬学系研究科・博士後期課程修了、博士(薬学)。同年4月、社団法人日本バイオ産業情報化コンソーシアム・研究員、2011年4月、東京大学大学院薬学系研究科・特任研究員。2014年4月、同・特任助教。2019年6月、同・助教。2024年6月、同・講師。

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— (第二回)^[1]

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

第一回におこなった、未知化合物の平面構造推定の手順を振り返ってみましょう (図19)。

- (1) 分子模型または紙の上に分子式の数だけ原子を用意する
- (2) 直結するカーボンとプロトンに、解析のためのアルファベットを振る
- (3) J_{HH} により部分構造を組む
- (4) 遠隔 J_{CH} により部分構造をつなぎ合わせる

以上のように平面構造を決めたあとに、今回は、立体化学の決定を行います。また、プロトンの化学シフトが重なり合って、スペクトルが読めない場合に使える測定法を紹介します。

シズカオールC (5) はチャラン科植物フタリシズカから単離構造決定されました^[2] (図20)。3、5、6員環が並んだリンドナン型セスキテルペンユニットが二量化して、さらにエステル化されています。チャラン科のフタリシズカおよびヒトリシズカからは、似たようなセスキテルペン二、三量体のエステル化物が得られています。5にはチグリン酸 (6) が結合しており、今回はこの6をモデル化合物に選びました。6には二重結合についての立体異性体アンゲリカ酸 (7) があり、これらの区別もNMRで行います。

今回も後半に二つの化合物のクイズのスペクトルをのせました。異性体がなくとも、非等価なジメチルやメチレンプロトンがあれば、その立体化学を帰属してください。解答例は、後日ニュースターでお知らせします。5を構成しているよ

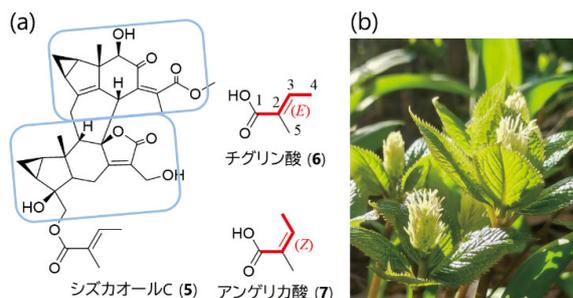


図20 (a) シズカオールC (5)、チグリン酸 (6)、アンゲリカ酸 (7) の構造。(b) ヒトリシズカ (札幌、4月)。

うなセスキテルペンの構造解析を、NMR討論会チュートリアルコースで行う予定です。

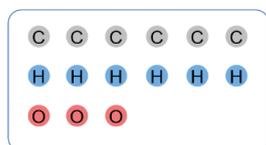
チグリン酸 (6) の構造決定

まず、第一回と同様の手順で、分子式が $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ の6の構造が未知であると仮定して (図21 (a))、平面構造を推定していきます。不足水素指標 (不飽和度、環と二重結合等価数) を計算すると2になります (図21 (b))。二重結合と環が1個ずつあるか、または、どちらかだけが2個あるか、のような構造です。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21 (c))。

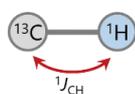
一次元 (1D) ^1H -NMR スペクトル (図22)

6のジメチルスルホキシド (DMSO)- d_6 溶液の ^1H -NMRスペクトル (図22 (a)) は溶媒の残留プロトンを2.49 ppmに合わせました。溶媒中の水が3.3 ppm付近にあります。赤色の曲線と数字はピー

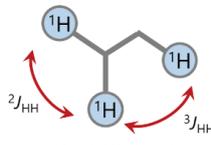
(1) 原子を用意する



(2) HSQC

直結する ^{13}C - ^1H を組む

(3) COSY

 J_{HH} で部分構造を組む

(4) HMBC

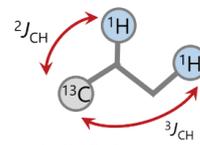
 $^{\text{LR}}J_{\text{CH}}$ で部分構造をつなぐ

図19 未知化合物の平面構造推定の手順 (前回の復習)。

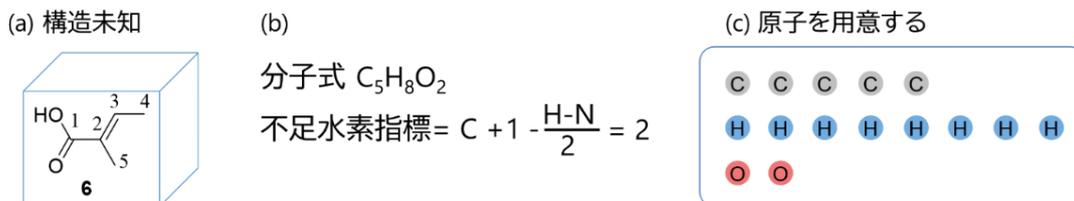


図21 (a) チグリン酸 (6) の構造が未知であるものとして推定していく。(b) 分子式から不足水素指標を計算する。(c) 分子模型などで、必要な数の原子を用意する。

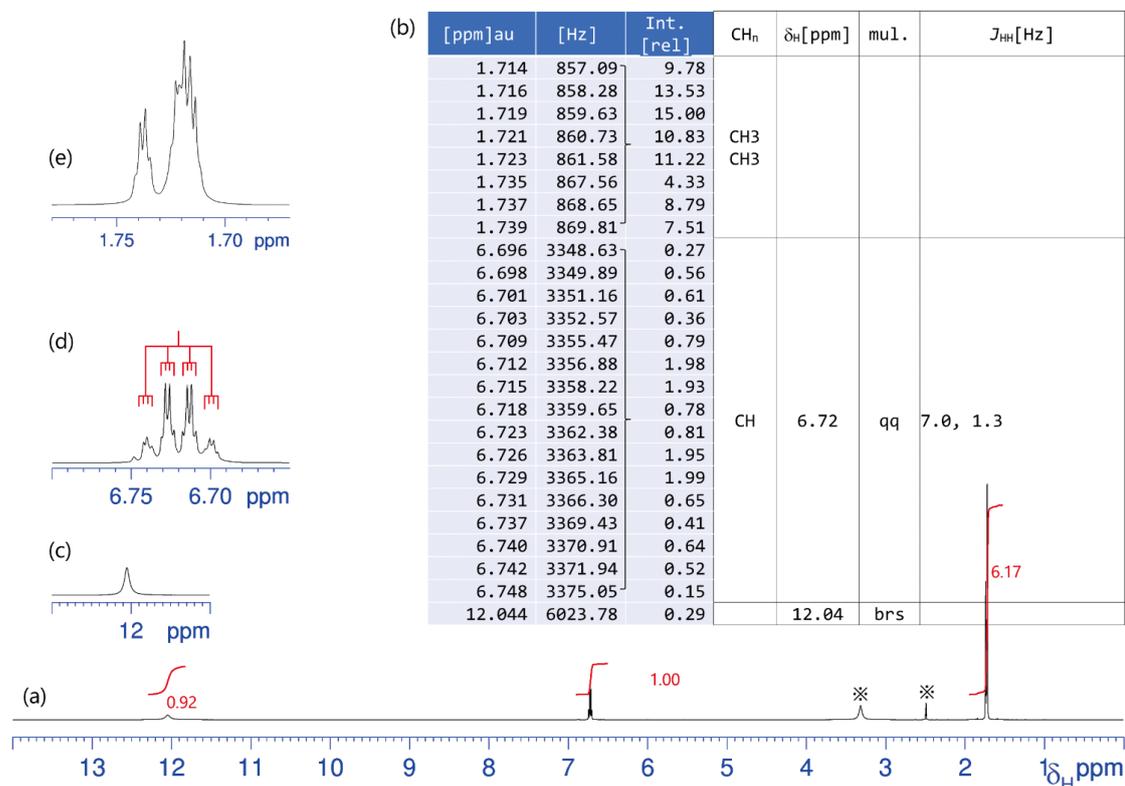


図22 (a) 6 (3 mg/DMSO- d_6) の 1H -NMRスペクトル (500 MHz、27 °C)。※印は溶媒由来。(b) ピークテーブル。わかる範囲で分裂様式などを書き加える。(c)、(d)、(e) 拡大図。

クの積分比です。ピーク位置とその高さの相対値の表 (図22 (b)) に、わかる範囲で、化学シフト (δ_H) と分裂様式 (multiplicity (mul.)), J [Hz] を書き入れておきます。12.04 ppm にブロードなシングレットがあります (図22 (c))。また、6.72 ppm に細かく分裂したシグナルがあり、分裂様式は四重線の四重線 (quartet of quartet, qq) のように見えます (図22 (d))。ここを積分比1とします。1.73 ppm 付近 (図22 (e)) は分裂様式があいまいで、積分比が6あることから、シグナルが重なっていると推定されます。6.72 ppm のプロトンシグナルは、7.0、1.3 Hz の qq に分裂していることから、カップリングの相手としてふたつのメチル基があると推定します。のちにHSQCでも確認できます。ブロードなシグナルもプロトン

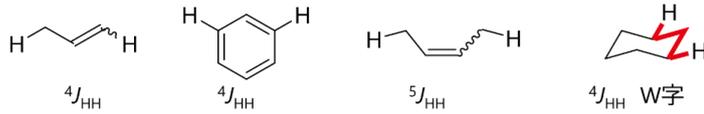
1個分と考えると、分子式にあるプロトンすべてが見えています。

通常、 J_{HH} カップリングは2または3結合離れたプロトン-プロトン間に観測されますが ($^2J_{HH}$, $^3J_{HH}$)、4結合以上離れた遠隔カップリング (図23 (a)) が観測されることや、 $^2J_{HH}$ や $^3J_{HH}$ が小さくなる場合があります。このような J 値の傾向を構造解析に使うことができます (図23 (b))。

$1D^{13}C$ -NMR スペクトル (図24)

図24は、DMSO- d_6 のメチル基カーボンシグナルを δ_C 39.5 ppm に合わせています。溶媒以外に、分子式どおり5個のカーボン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。

(a) 観測されやすい遠隔 J_{HH} の例



(b) J_{HH} [Hz]の傾向

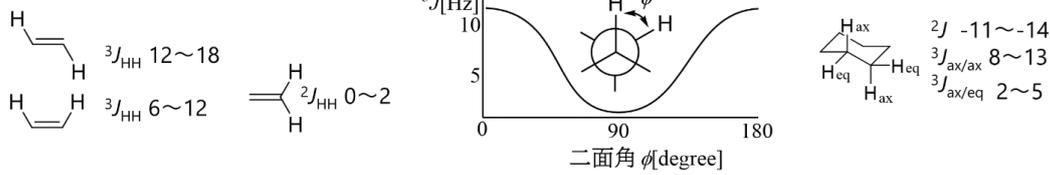


図23 構造決定に使える J_{HH} の値。(a) 遠隔 J_{HH} カップリングが観測されやすい部分構造の例。(b) 立体化学と J_{HH} の傾向。

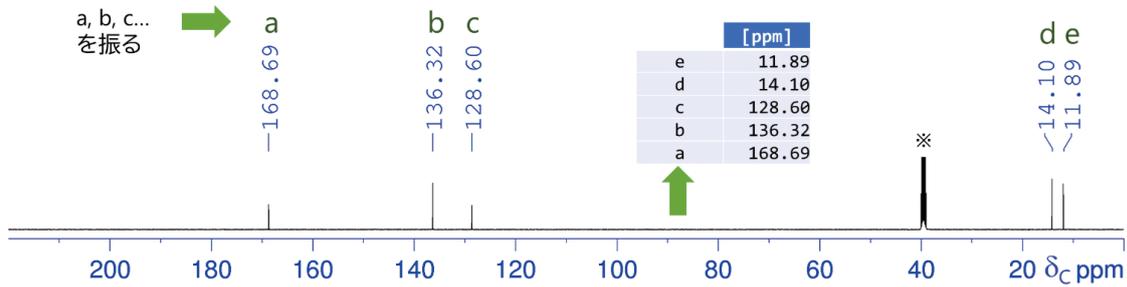


図24 6の ^{13}C -NMRスペクトル (126 MHz)。解析のために左から順にアルファベットを振る。

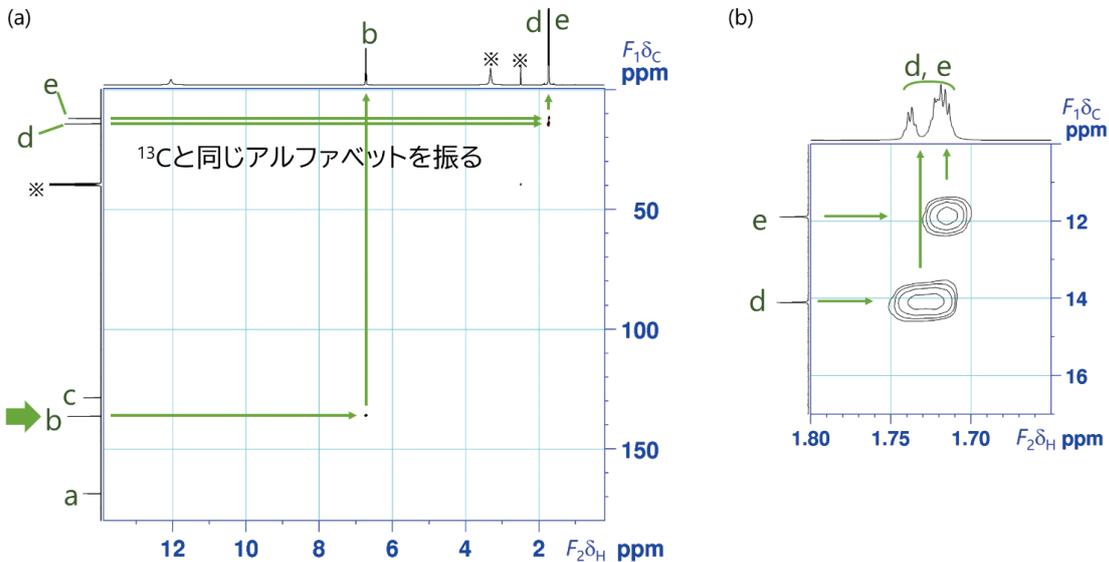


図25 (a) 6のHSQCスペクトル。(b) 拡大図。プロトンに、直結するカーボンと同じアルファベットを振る。

二次元 (2D) HSQC スペクトル (図 25)

6のHSQCスペクトル(図25(a))を使って、カーボンに振ったアルファベットと同じアルファベットを、直結するプロトンに振っていきます。HSQCの相関ピークは、メチルとメチンは正、メチレンは負で得られ、色分けして表示されますが、このスペクトルに負のピークはありません。bのカーボン(C-b)と相関のあるプロトンにbと

書きます。拡大図(図25(b))で見ると、H-d、H-eのプロトンの化学シフトが重なっていることがわかります。H-bの積分比を1とすると、H-dとH-eをあわせて6であったことからbがメチン、eとdがメチルであるとわかります。HSQC相関のないC-a、C-cは第四級炭素であることと、ブロードなプロトンは交換性水素であり、分子式から水酸基であることが推定されます。

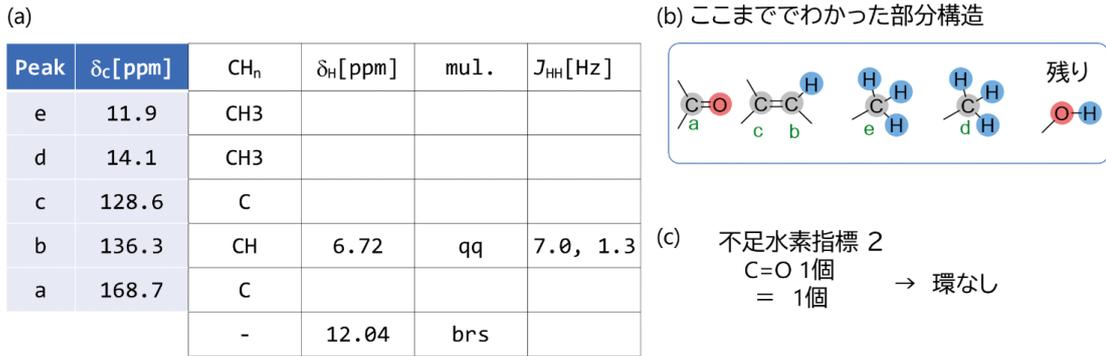


図26 ここまでの解析結果を整理する。(a) データテーブルを作る。カーボンの化学シフトを小数点以下一桁に四捨五入した。(b) ここまででわかった部分構造と残りの原子で作る部分構造。(c) 不足水素指標の使いみちを考える。

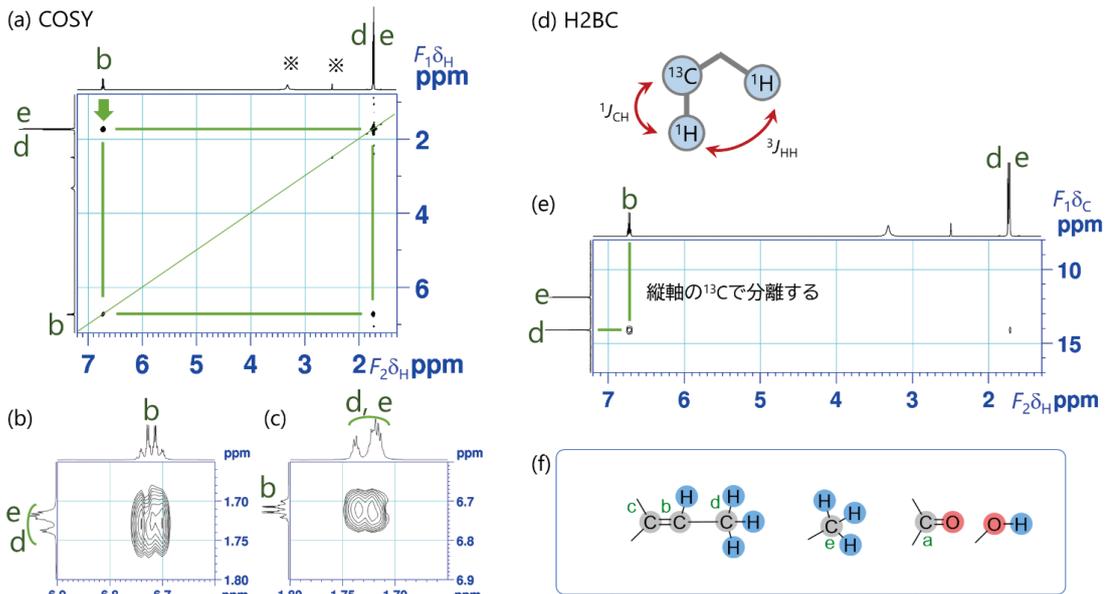


図27 (a) 6のCOSYスペクトル。HSQCで振ったアルファベットを書き写す。(b)、(c) 拡大図。(d) H2BC法では縦軸のカーボンに直結したプロトンと、 J_{HH} カップリングのあるプロトンとの間に相関ピークが得られる。 J_{HH} が小さい場合の相関ピークと直結ピークは出にくい。(e) 6のH2BCスペクトル。(f) ここまでで推定される部分構造。

ここまでの情報を整理 (図26)

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26(a))。化学シフトが重なっているH-d, eは後ほど解析します。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、C-bとC-cで二重結合を一つ作ることが推定できます。残った酸素と水素で水酸基を作り、これが δ_H 12.04 ppmにあらわれていると推定できます(図26(b))。はじめに不足水素指標を2と求めていました。カルボニル一つ、二重結合一つで指標を使い切り、環はないことがわかります(図26(c))。

2D COSY スペクトル、H2BC スペクトル (図27)

6の¹Hスペクトルで遠隔カップリングによる細

かい分裂が見られていました。COSYスペクトル(図27(a))にもこれらによる相関ピークが表れ、メチンH-bは、メチル基H-d、H-eの一方とは $^3J_{HH}$ の、もう一方とは遠隔カップリングによる相関が出ると予想されます。しかし、H-d、H-eの化学シフトが重なっており、相関ピークを分離して観測することはできません(図27(b)、(c))。

このような場合、溶媒を変更して、重なり合いを回避することができれば簡単です。今回は重なり合った状態で解析することを考えてみます。メチル基d、eは、カーボンが分離していますので、縦軸を¹³Cとして観測するH2BC法が使えます(図27(d))。6のH2BCスペクトル(図27(e))で、C-dとH-bの交点に相関ピークが得られています。これは縦軸のカーボンC-dに

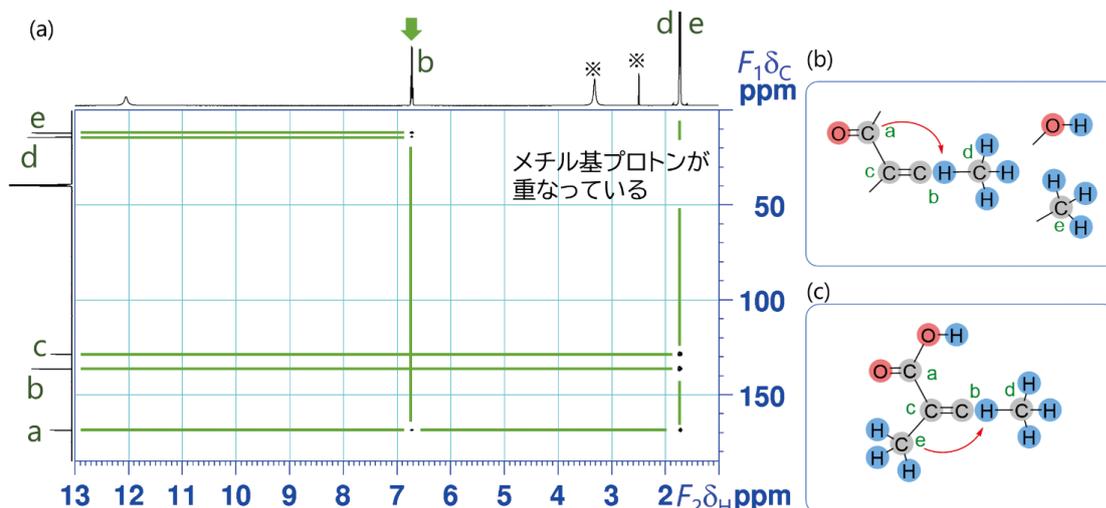


図28 (a) 6のHMBCスペクトル。アルファベットを書き写す。分離しているH-bから読む。(b) C-a/H-bのHMBC相関により、C-cとC-aを結合させる。(c) C-e/H-bのHMBC相関により、C-cとC-eを結合させる。残った水酸基をC-aに結合させてカルボン酸とする。

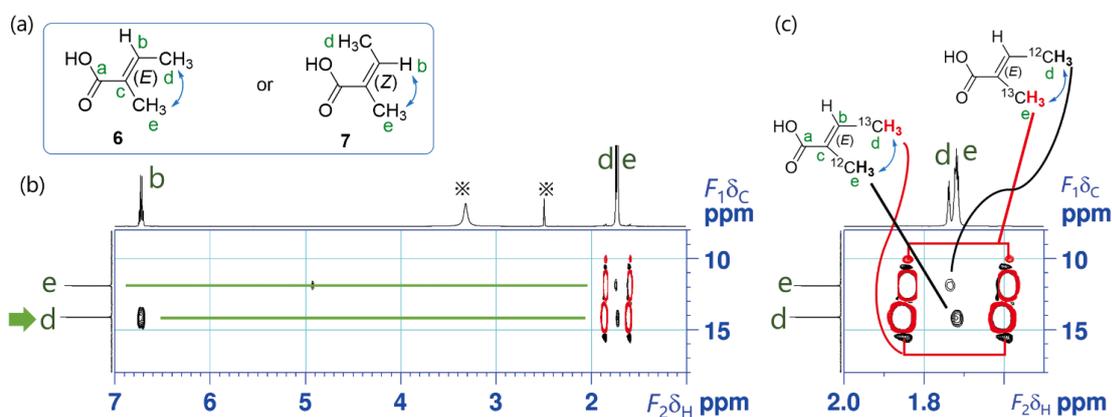


図29 (a) 得られた平面構造の二つの立体異性体。(b) 6のHSQC-NOESYスペクトル ($\tau_m = 1.5$ sec, ^{13}C 非デカップリング)。(c) 拡大図。天然存在比では、縦軸のカーボンだけが ^{13}C である分子が観測される。HSQCピークは $^1\text{J}_{\text{CH}}$ で大きく分裂した負のダブルレットで、NOEは大きな分裂のない正のピークで現れる。

直結しているH-dの、H-bとの J_{HH} カップリングを示しています。H2BC法では、小さい J_{HH} の相関ピークと直結ピークは弱いか観測されません。H-bが7.0、1.3Hzのqqになっているうち、大きいほうの7.0Hzのカップリングの相手がdのメチル基であると推定します。すでにbとcのカーボンで二重結合を作ること推定していましたが、C-c、C-b、C-dと並ぶ部分構造が推定されます(図27 (f))。

2DHMBC スペクトル (図 28)

次にHMBCでさらに部分構造をつなぎます。前回、HMBCスペクトルはメチル基プロトンから読みはじめると書きましたが、図28 (a) はメチル基プロトンの化学シフトが重なっているの

で、H-bから読みます。

H-bはC-a、C-d、C-eに相関ピークが得られています。C-dはすでに推定した部分構造で相関が出る位置関係です。C-aとの相関によって、C-cのとなりにC-aを配置します(図28 (b))。C-eとの相関によって、C-eもC-cの隣にあると推定できます(図28 (c))。H-bとH-eプロトンの間に遠隔 J_{HH} カップリングがあることも矛盾しません。残った水酸基をC-aに結合させてカルボン酸とします。

NOESY、HSQC-NOESY スペクトル (図 29)

C-b、C-cの二重結合上の立体配置は、C-aカルボン酸からメチル基dを主鎖として、これが二重結合の逆側になるE体(6)または、同じ側になる

Z体(7)のどちらかです(図29(a))。

立体化学の帰属には通常NOESYスペクトルを使います。NOESYは空間的に近接しているプロトンどうしを検出する手法で、縦、横軸とも δ_H です。E体とZ体との区別はメチル基プロトンH-eのNOEが、H-dまたはH-bのどちらに出るかでを行います。しかし、今、H-d、H-eの化学シフトが重なっており、COSYと同様にNOESYスペクトルで必要な相関ピークを分離することはできません。このような場合は縦軸を ^{13}C とするHSQC-NOESY法を使い、さらに、近接したプロトンどうしの相関を見るために ^{13}C 非デカップリングで測定します。

低分子化合物のNOESYスペクトルは対角ピークが負、NOEピークが正で得られます。HSQC-NOESYでは、HSQCピークが負、NOEピークが正で得られます。図29(b)は負を赤、正を黒で色分けしています。縦軸のC-dとH-bの交点に正のピークが見えます。H-dとH-bの間のNOEです。拡大図(図29(c))を見ると、H-d、eの位置に、大きく分裂した負のダブルレットが二組見えます。これはd、eのHSQCピークが ^{13}C との $^1J_{\text{CH}}$ で分裂しているものです。メチル基の $^1J_{\text{CH}}$ は約125 Hzで、 ^1H 500 MHzの0.25 ppmにあたります。

天然存在比の化合物では、C-dが ^{13}C である分子は、C-eが ^{12}C であるものが99%あります。このH-eは大きなダブルレットにはなりません。 δ_C 14.1 ppmと δ_H 1.72 ppmの交点にある正のピークは、 ^{13}C に結合したH-dと ^{12}C に結合したH-eとのNOEということになります。同様に、C-eの位置を横に見るときは、 ^{13}C -e、 ^{12}C -dの分子を見て

おり、H-eがHSQCピークを与えて、正のピークがH-dとの間のNOEピークです。このように δ_H が近接しているH-d、H-eの間のNOEを観測することができ、これらが二重結合の同じ側にあると推定できます。

検証と仕上げ(図30)

構造式にH2BC、HMBC、NOEの相関を書き入れ、矛盾がないか確認します(図30(a))。次にHMBCスペクトルの、3結合以内にあるプロトンとカーボンの交点にその結合数を記入します(図30(b))。H-d、H-eについてはそれぞれの結合本数を記入しておきます。C-a/H-dは4結合離れていますが、遠隔 J_{CH} 相関が出る可能性のある位置関係にあります。HMBC相関はそのいずれか、または両方に由来するものが出ていると考えます。データテーブルを化合物のナンバリング(図30(c))の順に並べ替え(図30(d))、 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。なお、化学シフトが重なっているメチル基プロトンH-d、H-eについては、次に行うスピンスミュレーションの結果(図31)を含んでいます。

プロトンNMRスペクトルで二つのメチル基のある領域の6Hの積分曲線を1.73 ppmで区切ると、比が約1:3(1.5:4.5)になる(図31(a))ことから、1.74 ppm付近にH-dの大きなダブルレットの左側のラインの1.5H分があり、1.72 ppm付近にはその右側のライン1.5H分とH-eの3H分が重なっていると推定されます。1.74 ppm付近の大きなダブルレットの左のラインは細かく1.3 Hz程度で分裂している様子が見えます。これをメチル基

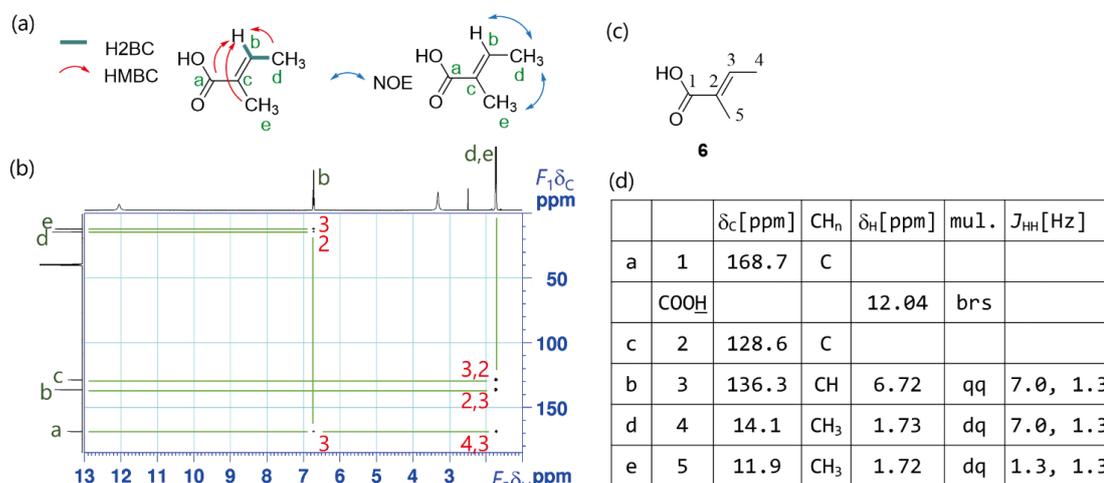


図30 検証と仕上げ。(a) 6のH2BC、HMBC、NOESY相関。(b) HMBCスペクトルの検証。推定構造で3結合以内にある $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ の位置に結合の本数を記入する。それ以外にも相関ピークがあれば結合の本数を記入する。(c) 化合物のナンバリング。(d) データテーブルの仕上げ。

プロトンどうしのカップリングと推定して、シミュレーションを行いました。図31 (b) はH-dの形を見るためにH-eの化学シフトをずらしてあり、H-dは7.0Hzのダブルットがさらに、1.3Hzのカルテットになります。図31 (c) はH-eの形を見るためにH-dの化学シフトをずらしたもので、1.3Hzのダブルットがさらに、1.3Hzのカルテットになって、結果的に1.3Hzの5重線に見えます。図31 (d) は両方の化学シフトを重ねたものです。1.74 ppmの細かい分裂のそれぞれのラインが図31 (b) のような左右対称ではなく、右側のラインが高くなっています。1.72 ppmのH-eについては右側のラインが低くなっています。これはカップリング相手の化学シフトが近いときに、相手のある方のラインが高くなるルーフ効果により見えます。

プロトンの化学シフトが重なっている時の対処をまとめると

- 可能なら別の溶媒を検討して重なりを解消することができれば簡単です。化学シフトが重なっているプロトンに、それぞれ別のプロトンとの J_{HH} カップリングやNOEがあるだけの場合は、選択的1D実験でピーク形状から判断できることもあります。今回はプロトンの化学シフトが重なった状態で解析するために、H2BCとHSQC-NOESYを使いました。基本は、

- 縦軸を ^{13}C としてシグナルを分離させる
- 重なっているプロトンどうしの相関を見るには ^{13}C デカップリングをはずして、一方を $^1\text{J}_{\text{CH}}$ で分裂させる

ことです。 ^{13}C デカップリングをしない測定では $^{13}\text{C-H}$ と $^{12}\text{C-H}$ を区別して観測できるようになります。この考え方はNOESY以外の測定法にも応用できます。また、対称構造で化学シフトが同じである場合にも使えます。

$^{13}\text{C}/^1\text{H}$ 相関法は、 $^1\text{H}/^1\text{H}$ 相関法に比べて観測できる分子の数が減るぶん、感度が低下しますので、試料濃度によっては積算回数を増やす必要があります。目安として、H2BC、HSQC-NOESYの積算回数をHMBCと同じか数倍多く設定します。

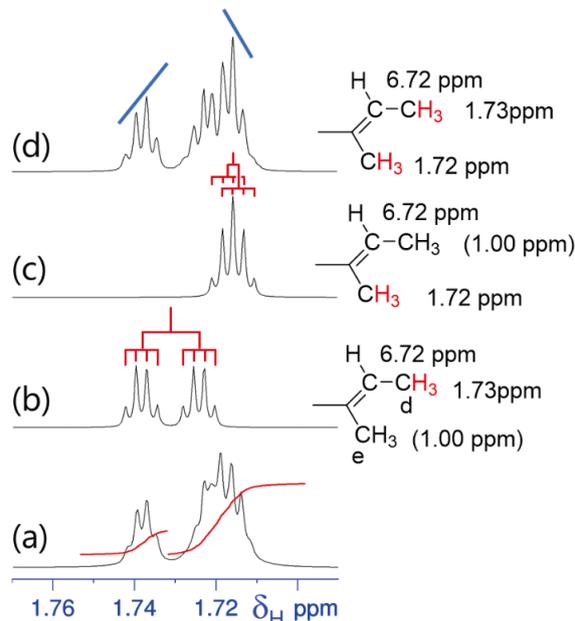


図31 ふたつのメチル基のスピンシミュレーション。(a) 実測スペクトル。(b) 仮にH-eの化学シフトが離れていた場合のH-dの形。(c) 仮にH-dの化学シフトが離れていた場合のH-eの形。(d) H-d、H-eの化学シフトを近接させた形。

未知化合物 X^{エックス} の構造を推定せよ

ミッション3. 未知化合物**8** (分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ 、1 mg/chloroform-*d*、図32、33)。

ミッション4. 未知化合物**9** (分子式 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$ 、3 mg/chloroform-*d*、図34、35)。

8、**9**は通常のNOESYスペクトルを使います。解答編を読みやすくするため、 ^{13}C -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。*印は溶媒由来のシグナルです。

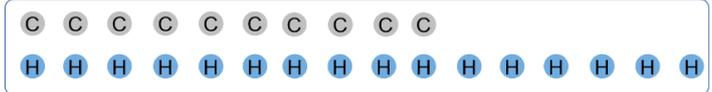
引用文献

- [1] 富士江里, 未知化合物Xの構造を推定せよ (第一回), 日本核磁気共鳴学会機関誌 **13**, 77-85 ページ (2024). 解答例, NMR ニュースレター, 1186号 (2024).
- [2] Kawabata, J. and Mizutani, J. Dimeric sesquiterpenoid esters from *Chloranthus Serratus*. *Phytochemistry*, **31**, 1293-1296 (1992).

(a) 未知化合物**8**の分子式は C₁₀H₁₆

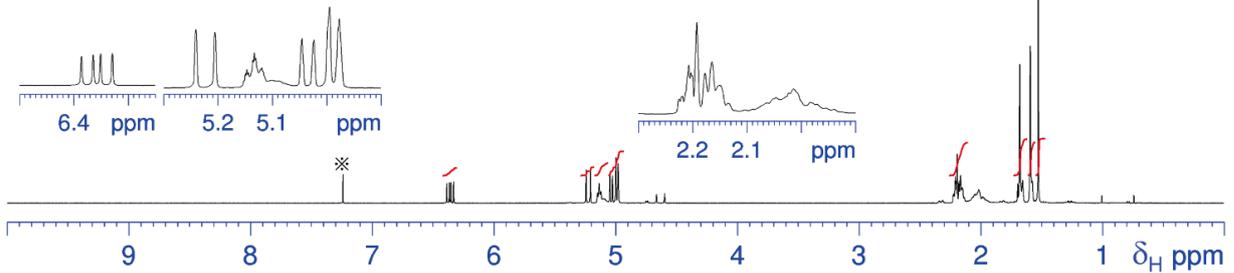
$$\text{不足水素指標} = C + 1 - \frac{H - N}{2} = \boxed{}$$

(b) 原子を用意する

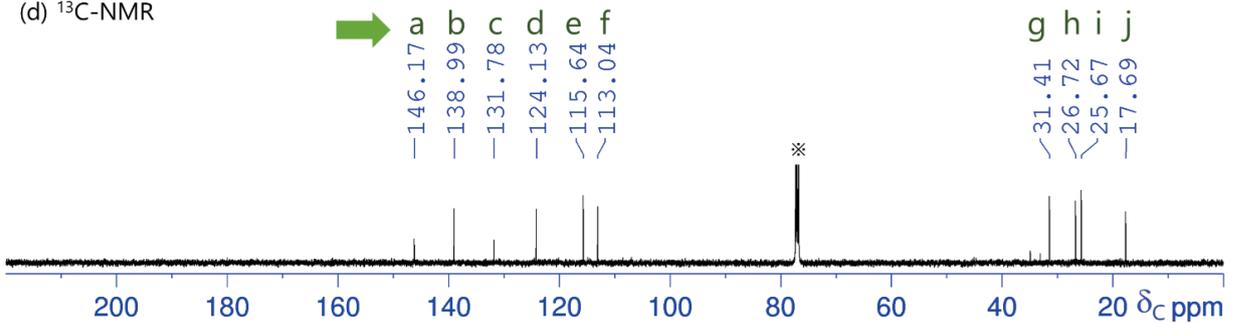


(c) ¹H-NMR

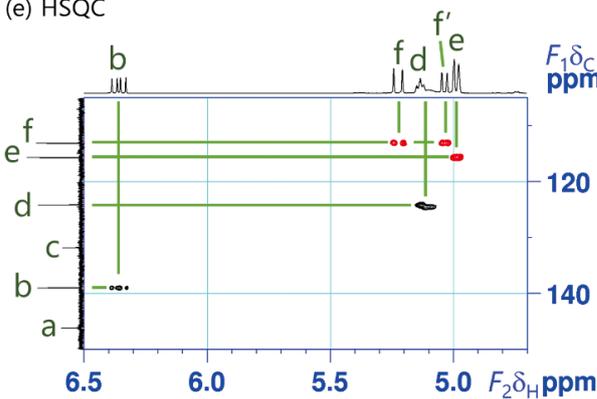
[ppm]	[Hz]	Int. [rel.]	CH _n	δ _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]	[ppm]	[Hz]	Int. [rel.]	CH _n	δ _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
1.524	762.30	15.00					5.024	2512.38	0.63				
1.591	795.66	3.56					5.045	2523.22	0.65				
1.676	838.34	3.14					5.119	2560.37	0.28				
1.678	839.26	3.15					5.130	2565.84	0.40				
2.149	1074.98	0.37					5.133	2567.15	0.47				
2.164	1082.16	0.65		2.16	m		5.136	2568.52	0.38		5.13	m	
2.177	1088.58	0.51						5.144	2572.64	0.22			
2.192	1096.15	1.13					5.147	2574.05	0.25				
2.202	1101.39	0.52					5.150	2575.44	0.20				
2.207	1103.60	0.61		2.21	m		5.205	2603.37	0.73				
2.218	1109.25	0.23						5.241	2620.97	0.77			
2.224	1112.09	0.20					6.329	3165.31	0.49				
4.977	2488.97	0.90					6.351	3176.14	0.49				
4.995	2497.99	1.05					6.364	3182.92	0.47				
							6.386	3193.73	0.45				



(d) ¹³C-NMR



(e) HSQC



(f)

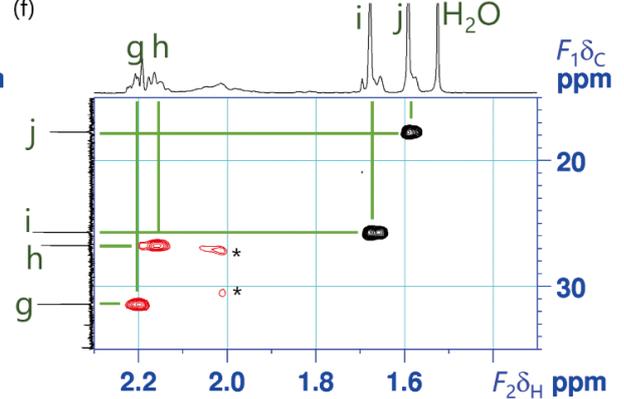
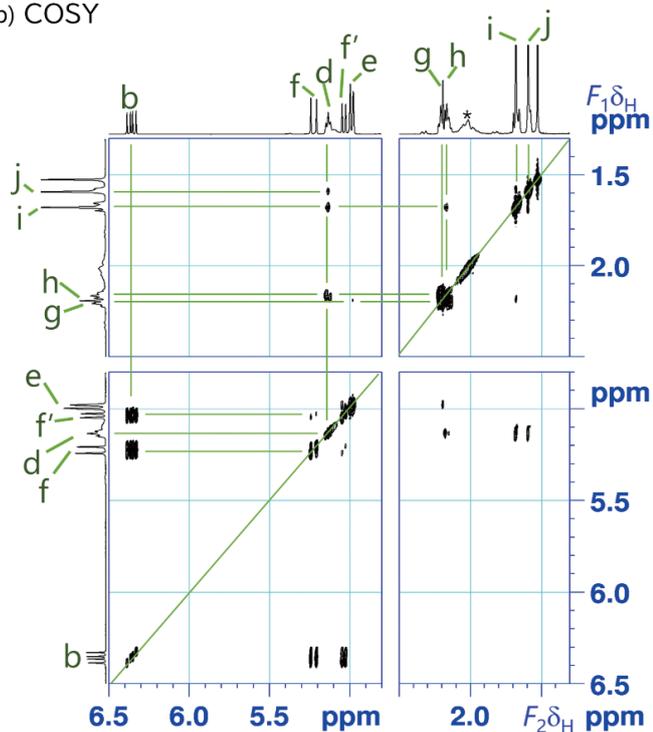


図32 未知化合物**8** (1mg/chloroform-d) の構造を推定してみよう。(a) 不足水素指標を計算しよう。(b) 原子を用意する。(c) ¹H-NMR スペクトル (500 MHz)。溶媒の残留プロトンを δ_H 7.24 ppm に合わせた。化学シフトと分裂様式を解析しよう。解析が難しいプロトンに m (マルチプレット) を記入してある。(d) ¹³C-NMR スペクトル (126 MHz)。溶媒シグナルを δ_C 77.0 ppm に合わせた。(e)、(f) HSQC スペクトル。CH₃、CH は正 (黒)、CH₂ は負 (赤)。プロトンに、直結するカーボンと同じアルファベットを振る。

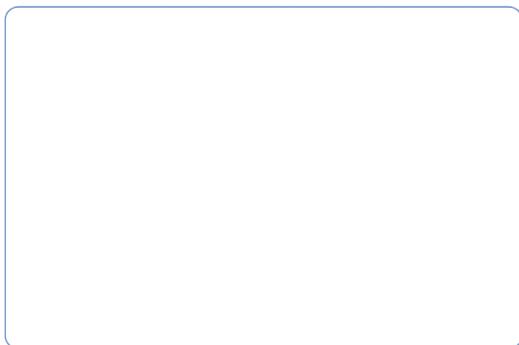
(a) データテーブル

	δ_c [ppm]	CH _n	d _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
j	17.7				
i	25.7				
h	26.7				
g	31.4				
f	113.0				
e	115.6				
d	124.1				
c	131.8				
b	139.0				
a	146.2				

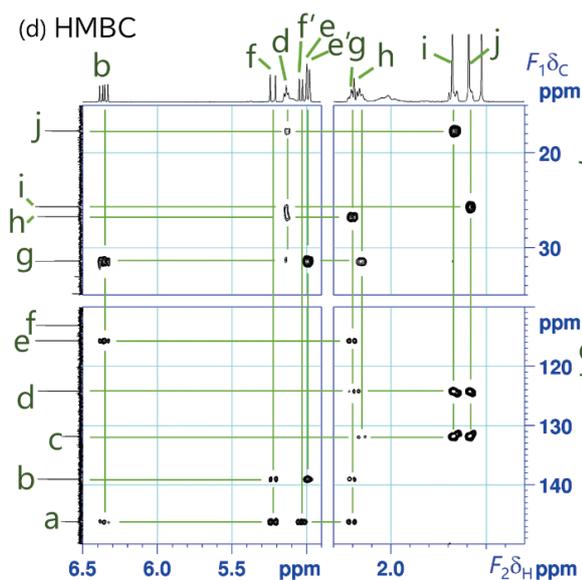
(b) COSY



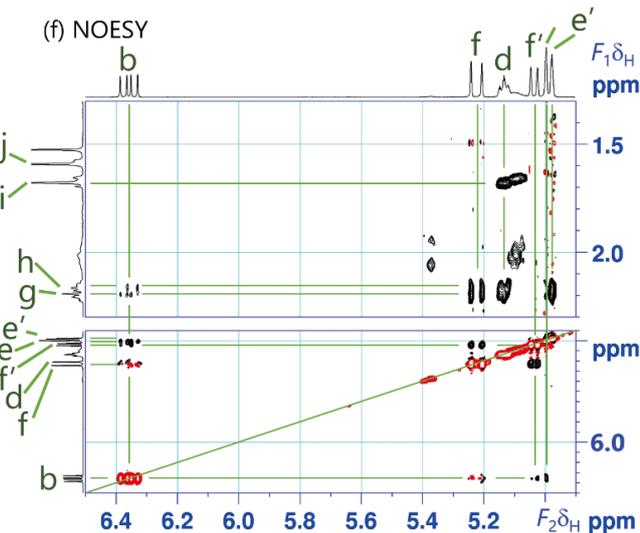
(c) 部分構造推定



(d) HMBC



(f) NOESY



(g) 推定構造・立体化学の帰属

(e) 推定構造

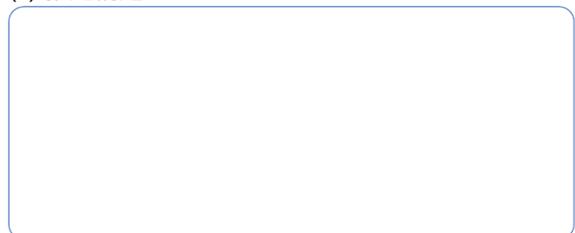
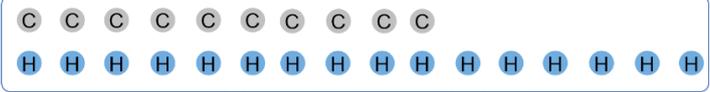


図33 8のデータの続き。(a) データテーブルを整理しよう。(b) COSYスペクトル。(c) ここまでで推定できる部分構造を書いてみよう。(d) HMBCスペクトル。(e) 平面構造を推定し、COSY、HMBCの相関を検証しよう。(f) NOESYスペクトル。(g) 立体化学の帰属を行い、NOESYの相関を検証しよう。

(a) 未知化合物9の分子式は C₁₀H₁₆

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

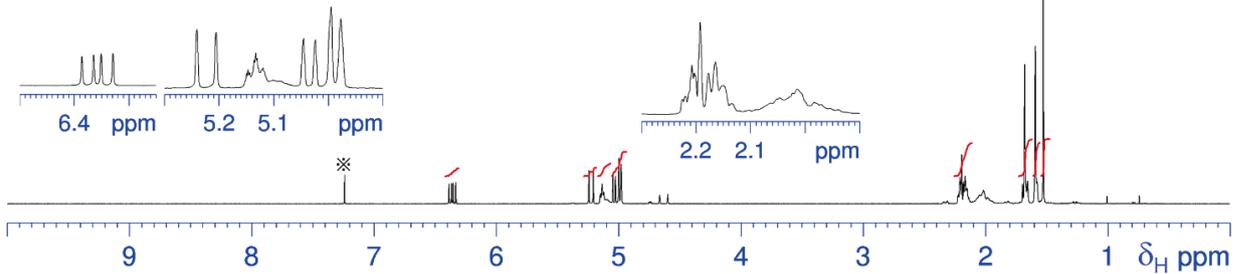
(b) 原子を用意する



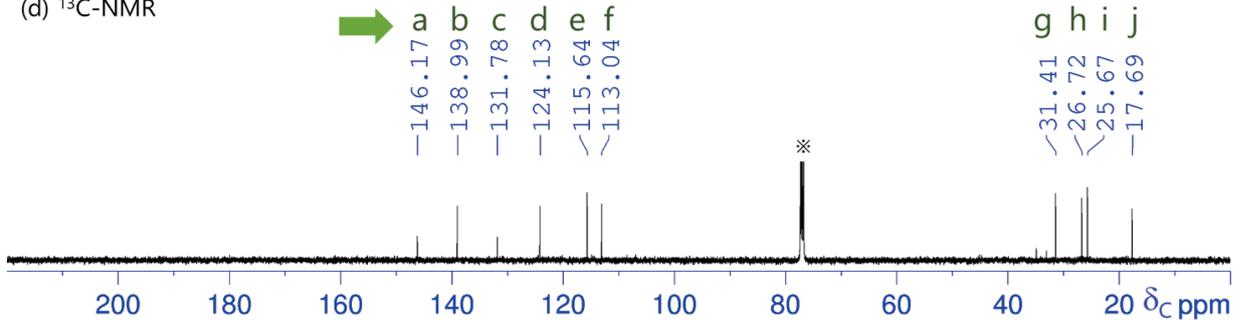
(c) ¹H-NMR

[ppm]	[Hz]	Int. [rel.]	CH _n	δ _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
1.524	762.30	15.00				
1.591	795.66	3.56				
1.676	838.34	3.14				
1.678	839.26	3.15				
2.149	1074.98	0.37				
2.164	1082.16	0.65				
2.177	1088.58	0.51				
2.192	1096.15	1.13				
2.202	1101.39	0.52				
2.207	1103.60	0.61				
2.218	1109.25	0.23				
2.224	1112.09	0.20				
4.977	2488.97	0.90				
4.995	2497.99	1.05				

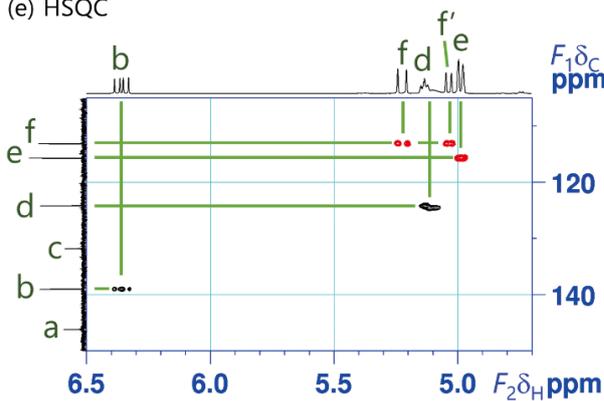
[ppm]	[Hz]	Int. [rel.]	CH _n	δ _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
5.024	2512.38	0.63				
5.045	2523.22	0.65				
5.119	2560.37	0.28				
5.130	2565.84	0.40				
5.133	2567.15	0.47				
5.136	2568.52	0.38				
5.144	2572.64	0.22				
5.147	2574.05	0.25				
5.150	2575.44	0.20				
5.205	2603.37	0.73				
5.241	2620.97	0.77				
6.329	3165.31	0.49				
6.351	3176.14	0.49				
6.364	3182.92	0.47				
6.386	3193.73	0.45				



(d) ¹³C-NMR



(e) HSQC



(f)

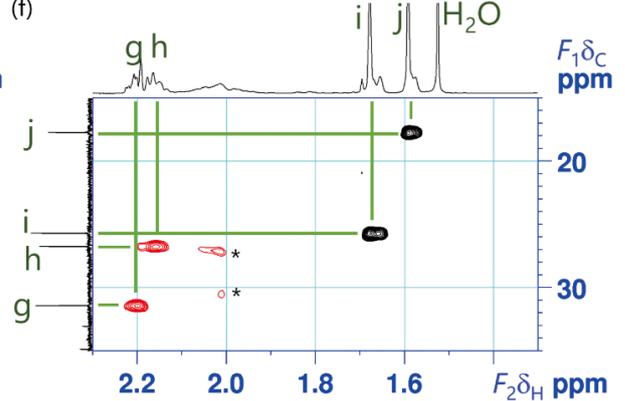
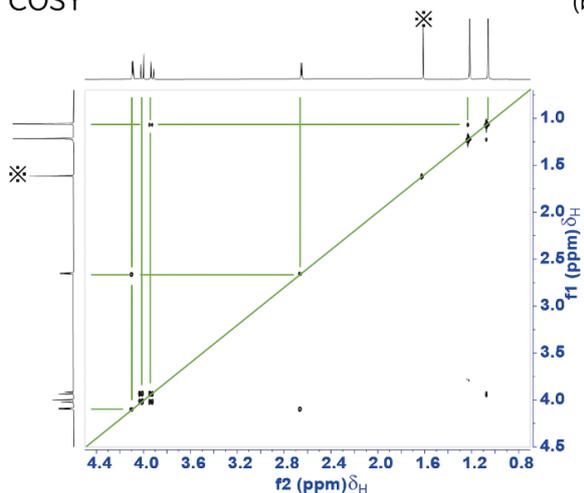
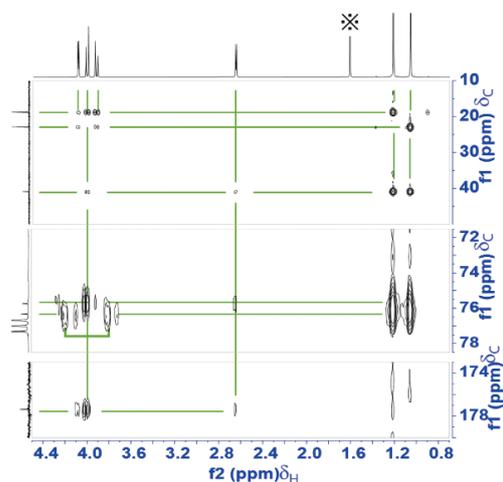


図34 未知化合物9 (3 mg/chloroform-d) の構造を推定してみよう。(a) 不足水素指標を計算しよう。(b) 原子を用意する。(c) ¹H-NMRスペクトル (400 MHz)。溶媒の残留プロトンを δ_H7.24 ppmに合わせた。(d) ¹³C-NMRスペクトル (101 MHz)。溶媒シグナルを δ_C77.0 ppmに合わせた。(e)、(f) HSQCスペクトル。相関のないスペースに拡大図を表示している。カーボンにアルファベットを書き写し、直結するプロトンにカーボンと同じアルファベットを振ろう。

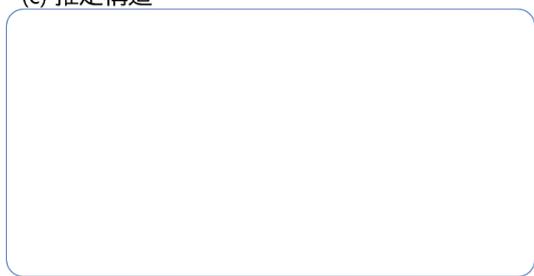
(a) COSY



(b) HMBC



(c) 推定構造



(e) 立体化学の帰属



(d) NOESY

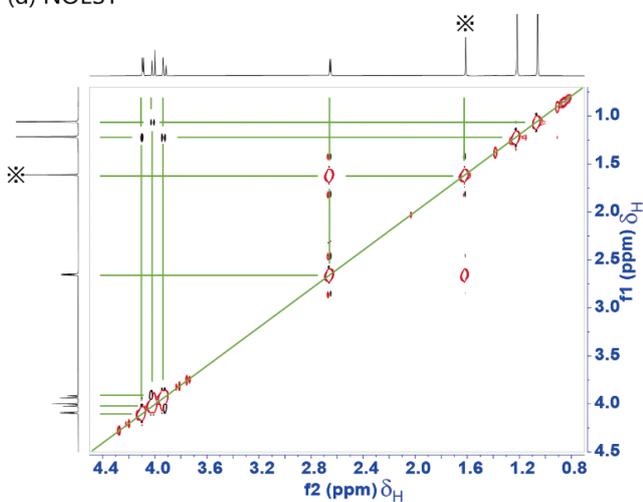
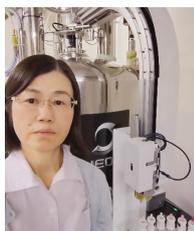


図35 9のデータの続き。(a) COSYスペクトル。アルファベットを書き写そう。(b) HMBCスペクトル。アルファベットを書き写そう。(c) 平面構造を推定し、COSY、HMBCの相関を検証しよう。(d) NOESY。(e) 立体化学の帰属をしよう。



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

1987年よりMS、1990年よりNMRを始め、受託分析・共同研究などを行う

溶液NMR測定のTips：サンプルチューブ編

大阪大学蛋白質研究所

宮ノ入 洋平

y-miyanoiri.protein@osaka-u.ac.jp

1. はじめに

NMR法では、低分子化合物から生体高分子に至るさまざまな試料を観測対象としており、構造情報や相互作用様式を原子分解能かつ定量的に解析することができる優れた手法です。このことから、産業界、学術機関を問わず幅広い分野において、NMR測定法が活躍しています。一方で、NMR装置の維持・運用には高額な費用が掛かり、特にヘリウムの調達には苦労の日々が絶えないです。そのため、各研究室や単一部署でNMR装置を管理することは困難となりつつあります。また、NMR法は応用性が高いがゆえに、その測定法や解析手法は多岐に渡っており、初学者や分野外の研究者にとって、NMR研究への新規参入は、敷居が高いというイメージがあるようです。このような背景から、NMRプラットフォーム事業や共同利用・共同研究拠点事業が整備、拡充されてきました。これらの事業では、国内の複数の研究拠点で運用されているNMR装置を共用機器として公開しており、どなたでも、先端的なNMR装置を活用できるよう整備されています。特に、各拠点では遠隔測定システムやオンラインミーティング体制が整備されており、利用者が地理的な制約を受けずに、各実験に最適な装置を利用し、スムーズにセットアップすることができます。また、これらの事業では、単にNMR装置のマシントimeを提供するだけでなく、各拠点の人材が、利用者の要望に合わせて、最適な技術・機器および手法等を紹介しており、利用者は安心かつ安全に、実験データを取得することができます。極端な例では、NMR装置を見たり触れたりすることがなくても、試料を調製して各拠点に送るだけで、必要なNMRデータを手にすることができます。このような共用体制は、NMRに限らず、さまざまな大型研究設備を対象に整備されており、国内の研究活動や産業活動の高効率化の一躍を担っています。一方で、各装置の測定原理やセッ

トアップに関する情報を、個々の利用者が体験する機会が減ってしまい、ブラックボックス化が進むことも懸念されています。特にNMR法では、試料調製時や測定パラメータの設定時のひと工夫やひと手間が、信号感度に直結することが多く、注意を要します。筆者は、NMR拠点の管理者の一人として、各種共用事業に携わっており、多様な分野の研究者と出会う機会があります。そのなかで、NMR測定に関するさまざまな工夫を垣間見ることができます。試料の運搬や保管方法、セットアップに至るまで、細かな工夫やこだわりがちりばめられており、日々勉強させてもらっています。一方で、NMR熟練者でも、いつもの装置とスペックの異なる装置に出くわすと、思わぬ設定ミスをしてしまうケースも、少なくありません。ましてや、NMR初学者が利用する際には、装置の性能を十分に発揮できないまま終わってしまうことも考えられ、せっかくの共用体制を活用しても、却って研究効率を下げてしまうことになりかねません。日本の研究力や産業活動の強化を目指すうえでも、共用事業は、装置の有効活用のみならず、装置原理に即した技術や、実験に関わる細かなノウハウについても共有できる体制を確立していく必要があると感じています。

このようななかで、2023年度のNMR学会において、チュートリアル講演の機会を頂きました。そこで、溶液NMR測定におけるTipsや細かなノウハウを紹介して、参加者の皆様と情報交換することを企画しました。“こまかすぎて伝わらない溶液NMRの実験法”と題して、周囲の研究者や有志からの情報をもとに、Tipsを紹介させていただきました。ただ、筆者のプレゼン能力に問題があり、せっかくの情報が全く伝わっていないおそれがあり、本誌でも紹介させていただくことになりました。講演では、雑多な内容となってしまいましたが、本誌では、NMRサンプルチューブにまつわる話題を中心に紹介します。皆様の日ごろ

の測定に少しでも役に立つと幸いです。

2. サンプルチューブの種類

NMR測定に供す試料が準備できたら、まずは試料をサンプルチューブに挿入することになりますが、サンプルチューブにもさまざまな種類があります。実験の種類や溶液条件に応じて使い分けることとなりますが、まずは試料の体積をもとに、サンプルチューブを選択することになります。NMR装置に装備されているプローブでは、外径5mmに対応したものが汎用で、検出コイルの長さを考慮すると、試料体積として500 μ lが目安となります。500 μ l以上の試料を準備できる場合は、外径5mmのガラスチューブが利用されます。SHIGEMI社製をはじめ、NORELL社製やWilmad社製等の製品が広く利用されており、一般に“ノーマルチューブ”として知られていま

す(図1(a))。ただし、ノーマルチューブのなかでも、安価なディスポーザブル品から、パイレック素材等を使用した高グレードなサンプルチューブも販売されています。各グレードによって、材質や真円度、推奨されるNMR装置の周波数の目安が記載されています。詳しくは各メーカーの製品情報やChem-Stationのサイト^[1]を参照してください。注意すべき点として、安価なサンプルチューブを用いて高磁場NMR装置で測定しようとすると、不純物や真円度の低さが顕著となり、十分な品質のスペクトルを得られないことが起こります。また、そのようなサンプルチューブを用いてスピニングを行うと、プローブを破損してしまう恐れもあるので、注意してください。

試料体積が少ない場合には、対称型マイクロチューブを利用する場合があります(図1(b))。SHIGEMI社で製造されており、“高橋チューブ”

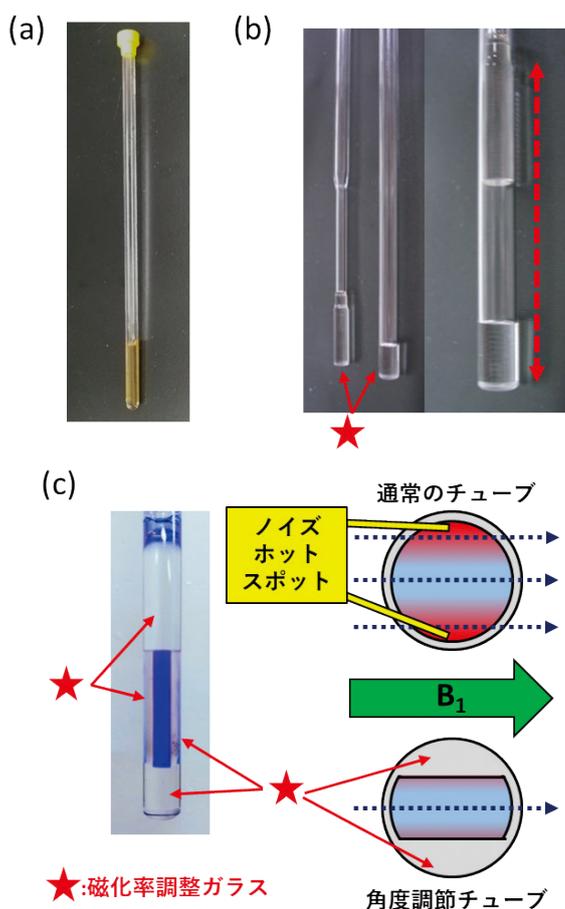


図1 サンプルチューブの種類

溶液試料が500 μ l以上調製できる場合は、外径5mmの“ノーマルチューブ”(a)を利用することが多いです。一方、対称型マイクロチューブ(b)を用いることで、250 μ l程度の試料でも測定することができます。このチューブでは、重水等の溶媒と同じ透磁率を有する磁化率調整ガラスが利用されています(図中の★部分)。そのため、微量サンプルについても、磁場の均一性((b)の破線部分)を保持し、高感度にNMR信号を得ることができます。(c) 塩濃度が高い試料溶液では、エッジの部分で誘電損失が顕著となり、感度低下のみならず試料溶液の温度上昇を引き起こします。角度調節チューブや楕円形チューブでは、エッジ部分が取り除かれており、高塩濃度下でも高感度なスペクトルを得ることができます。

や“シゲミチューブ”といった呼称でよく知られています。外径5mmの対称型マイクロチューブを利用することで、250 μ l程度の試料についても、高感度・高分解能なスペクトルを得ることができます。対称型マイクロチューブは、外管と内管で構成されており、溶液試料を内管と外管で挟み込むようにセットします。溶液試料の下端と上端の境界部分にあたるガラスについて、磁化率を重水溶媒と測定限界内で一致させることで、磁場均一度を高めており、微量な試料でも高品質なスペクトルを取得することができます(図1(b))。実際に、単位体積当たりで最高の感度を提供するシステムとなっています。重水や重クロロホルムなど、溶媒に依存して磁化率が異なるので、それぞれに対応した対称型マイクロチューブを利用して、測定することができます。対称型マイクロチューブを利用する際には、“泡抜き”が必要になります。溶液試料と磁化率調整ガラスの境界面に気泡が残ると、磁化率の均一性は崩れ、シム調整も困難となります。泡抜きの方法は、コツを要しますので、後ほど詳しく紹介します。対称型マイクロチューブは、ノーマルチューブに比べて高価ですので、洗浄して繰り返し利用することが多いです。洗浄方法についても後述しますが、洗浄の際に注意する点として、内管と外管の組み合わせは維持しておくが良いです。少なくとも同じ製品ロット内で保持しておくほうが、磁化率のズレを防ぐうえでも安全です。

サンプルチューブの選択におきまして、試料体積以外に考慮する点として、塩濃度を考慮します。特に、超高磁場NMRや極低温プローブを装備したNMR装置を利用する場合は、誘電損失の影響が顕著となります。具体的に、円筒形のサンプルチューブを(ヘルムホルツ)プローブに配置する場合、RFパワーの消耗が、サンプル中心からの距離に依存して大きくなります。つまり、サンプル管のエッジ付近がRFパワー損失のホットスポットとなり、シグナル感度の損失やサンプル自身の温度上昇を引き起こします(図1(c))。タンパク質などの生体試料では、溶解度を上げるために1M以上の塩を含んだ溶媒を利用する場合がありますが、外径5mmのサンプルチューブを用いて極低温プローブに挿入すると、十分な感度を得られないだけでなく、チューニングやマッチングを最適化することもできず、測定できないケースもあります。このような場合は、外径

が4mmや3mmのサンプルチューブを利用すると、ホットスポットの影響を軽減することができます。また、5mmチューブでもホットスポットを抑えるために楕円形や長方形のサンプルチューブおよび角度調節機能付きの対称型マイクロチューブも市販されています(図1(c))。これらのサンプルチューブは円筒形のものよりも挿入できる体積は少なくなりますが、塩濃度の影響を押さえつつ、単位体積当たりの感度は高い状態で測定することができます。

このほか、各サンプルチューブでは、遮光状態や嫌気条件下に対応したものや、オートサンプリャーに対応したものも市販されています。測定試料や装置のスペックを事前に把握しておくことで、いつでもどこでも、安心安全に実験を進めることができます。

3. 試料溶液の挿入

最適なサンプルチューブを選択した後は、自身の試料をサンプルチューブに挿入することになります。外径5mmの細長いガラスチューブに溶液試料を挿入するので、なかなか難しい作業になります。筆者は、タンパク質をはじめとする生体試料を扱うことが多いですが、挿入中にタンパク質溶液が泡立つことや、管壁に留まり、チューブの下端までうまく挿入できないケースがよくあります。また、pH変化やリガンド滴定に伴うスペクトル変化を解析することが多く、ポイントごとに試料をサンプルチューブから出し入れすることがあります。挿入方法に気をつけておかないと、試料を大幅に損失することになり、正確かつ再現性の高い実験を行うことが難しくなります。さらには、前述したように、対称型マイクロセルを使用する場合には、試料と磁化率調整ガラスとの境界面に、気泡が残らないように注意しなければなりません。ノーマルチューブにおいても、測定中に試料から気泡が発生してしまうと、シム調整が困難になり、最適なスペクトルを得ることができなくなります。ここでは、サンプルチューブへの試料の挿入方法について紹介します。

まずは、通常のピペットを利用して、サンプルチューブの上端から試料を滴下する方法があります。使い慣れた道具で手軽に挿入できますし、サンプルがセットされるチューブの下端部分や内側を傷つける不安もありません。試料が管壁に留まってしまふことがあります、図2(a)に示す

ような手回しの遠心機を用いることで、サンプルチューブの下端まで試料をセットすることができます。また、ピペットに取り付ける使い捨てチップには、内部にフィルターが詰められたものや、低吸着タイプなどバリエーションに富んでいますので、サンプルチューブに沈殿物が混入することを防ぐこともできます。ただし、試料を管壁に沿わせて導入することになりますので、少量の試料では損失が多くなってしまいます。前述した、滴定実験などにも不向きです。

筆者が携わってきたなかでは、細長いガラス製のパスツールピペットを利用して、試料をサンプルチューブにセットする方が多いです(図2(b))。外径2mmで180mm程度の長さがあるものが市販されており、5mmや4mmのサンプルチューブに挿入して、試料溶液をアプライすることができます。3mmや1mmのサンプルチューブには、より細いガラスキャピラリーを用いることになります。パスツールピペットの上端にシリコンスポイトを装着して、試料の出し入れを行います。吸い上げすぎると試料がパスツールピペットの内側に付着して試料損失が多くなるので、注意が必要です。新品の硬いシリコンスポイトよりも使い古したシリコンスポイトの方がゆっくりと試料を吸い上げることができて扱いやすいです。サンプルチューブの下端まで効率よく試料を導入することができますし、試料をサンプルチューブから取

り出すことも可能です。ただし、細いガラス管ですので、サンプルチューブ内部を傷つけてしまう恐れがあります。挿入時には、なるべくサンプルチューブにあたらないよう、慎重に作業する必要があります。ガラス細管がサンプルチューブ内で折れてしまうと、回収することも困難ですので、注意が必要です。貴重な試料をサンプル管に詰める際は緊張しますので、不慣れな場合は溶媒などを用いて事前に練習しておくといいです。

パスツールピペットやシリコンスポイトの扱いに慣れない場合には、ポリエチレンやPEEK製のチューブを活用する方法をおすすめします。これらのチューブの先端に汎用のマイクロピペット用のチップをつなげておきます(図2(c))。これにより、マイクロピペットを用いて、溶液試料をサンプルチューブにセットすることができます。これらのチューブは、比較的高価ですが、クロマトグラフィー装置などにも使われているので、調達しやすいです。ガラスよりも柔らかく、柔軟性もありますので、サンプルチューブを傷つける心配もありません。チップとの接続部分から液漏れする恐れがありますので、その点は注意を要します。筆者も、少量の化合物を試料に滴定する際は、この手法を活用しています。このほかにも、シリンジに接続できるプラスチック製のパスツールピペットなども市販されており、サンプル挿入に活用できるかと思えます。また、サンプル

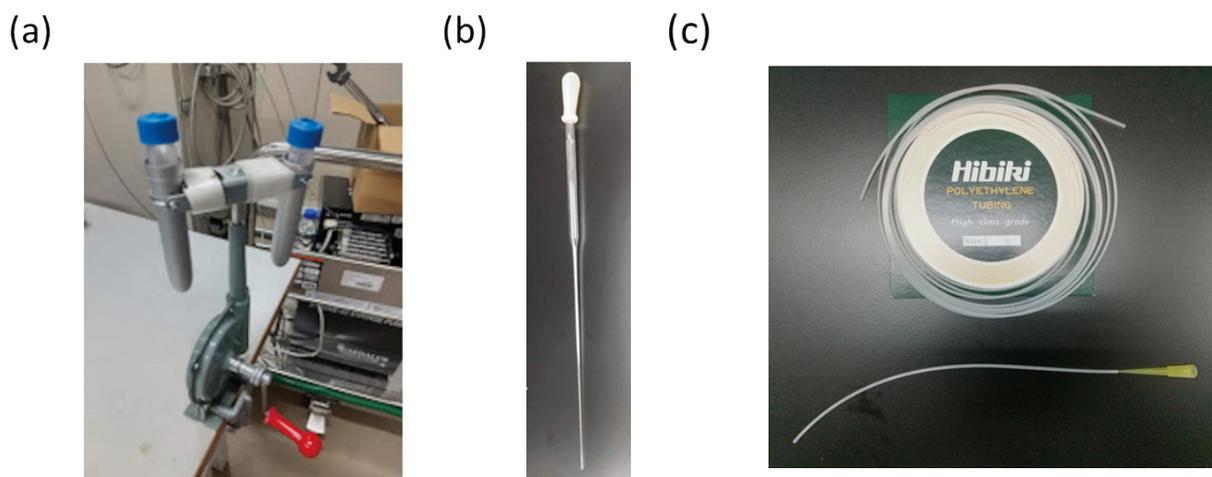


図2 サンプルチューブへの挿入方法

(a) 手回し遠心機。サンプルチューブの内壁に留まる試料を、チューブ下端まで送液することができます。(b) パスツールピペット。頭の部分に取り付けるシリコンスポイトは、使い慣れた柔らかいスポイトを利用するほうが、試料の挿入時や取り出し時に扱いやすくなります。(c) ポリエチレン製チューブにマイクロピペット用チップをつなげた自作のピペット。マイクロピペットを利用して試料をサンプルチューブにセットすることができます。チップとの接続部分から液漏れしないことを確認してください。マイクロピペットを用いていますが定量性は保証できないので、サンプル量や滴定実験に用いるリガンドの液量はあらかじめ秤量したものをすべて吸い上げてサンプルチューブに送るようにします。

チューブの内壁を撥水性のシリコン液でコーティング処理することで、試料の吸着を抑えて効率よくサンプリングすることができます。核酸や粘度の高い試料を扱うときには有効です。

4. サンプルチューブからの泡抜き、試料溶液の脱気

サンプルをサンプルチューブに挿入した後は、気泡の発生に注意します。特に対称型マイクロチューブを利用する場合、内管で蓋をする際に泡が発生しやすいです。試料内に泡が発生しますと、磁場の均一性が崩れ、シム調整が困難となり、綺麗なスペクトルを得ることはできません。そこで、泡抜きの作業を要します。泡抜きの方法ですが、SHIGEMI社のホームページ内の動画で紹介されていますので、ご覧になってください。サンプルチューブを45度くらい傾けた状態で、内管を挿入していきます。サンプルと内管が触れた時に気泡が発生するのですが、そこで内管を素早く押し込みます。これによって、気泡が内管のくびれ部分（磁化率調整ガラスの上部）まで押し上げられます。あとは気泡が内管の下部に戻らないように、ゆっくりと引き上げます。ポイントは、内管を押し込んで気泡を上部に押し出すところです。ここで気泡をうまく押し出すことができ

ず、内管の出し入れを繰り返していると、却って気泡が増加してしまいます。このことを避けるためには、内管と外管の“すきま”を把握することが重要です。外管の内径と内管の磁化率調整ガラスの外径では、わずかにギャップがあり“すきま”が生じます。この“すきま”を通り道として、気泡や試料溶液が上部に押し出されます。この“すきま”は、内管を押し込んでいき試料溶液を押し出していく際に、**図3(a)**に示すように目視することができます。この“すきま”を上側ににして、45度ほど傾けて泡抜きを行うと、効率よく気泡を押し出すことができます。

気泡を抜いた後は、内管と外管をしっかりと固定することが必要です。製品ロットによっては、先述した“すきま”が大きくなるものがあり、内管が動きやすく固定しにくい場合があります。多くの方が、パラフィルムを使って内管と外管の位置を固定していると思いますが、気泡が溶液試料側に戻らぬように注意してください。サンプル溶液の体積に依存しますが、内管のくびれ部分に、少しサンプル溶液を残した状態で固定するほうが、安心かと思います。パラフィルム自身は空気を透過しますので、長時間にわたる測定中に、少しずつ試料溶液が蒸発してしまいます。そのため、測定中に気泡が生じることが多いです。試料

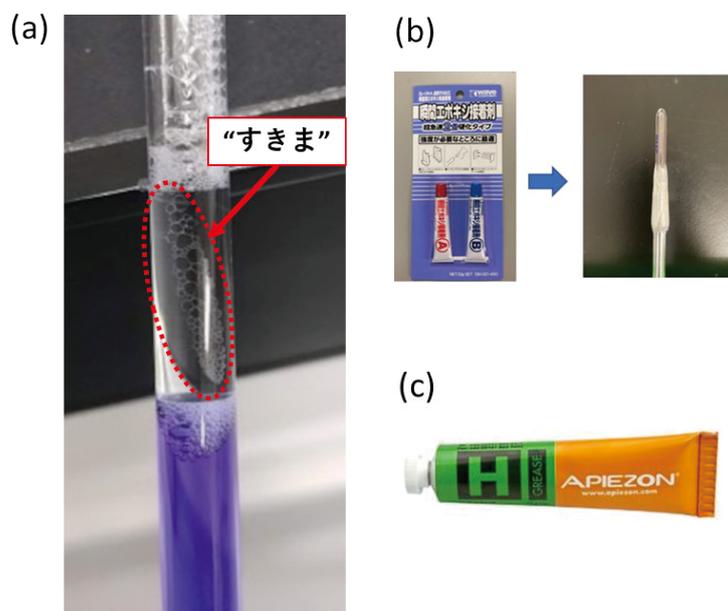


図3 サンプルチューブ内の気泡を除く方法

(a) 対称型マイクロチューブから気泡を除く場合には、内管と外管の間にできる“すきま”を確認してから、泡抜きを行うと良いです。(b) サンプルの蒸発や空気の流入を防ぐために、パラフィルム部分にエポキシ樹脂製の接着剤を塗布します。5分程度で固まり、ドライヤーで温めると簡単に剥がせるそうです。

(c) 内管と外管の接合部分にAPIEZONグリースを塗布することで空気の浸入を抑えることができます。ガスタイトチューブと併用して無酸素状態で長時間測定を行うこともできます。グレードごとに適用温度範囲が異なるので確認してください。

の蒸発を抑えるためには、パラフィルムの部分にエポキシ接着剤を塗布することや(図3(b))、市販のテフロンシールでカバーする、あるいは、内管と外管のすり合わせ部分に特殊なグリース(アピエゾングリースなど)を塗布して、空気の混入を防ぐ方法が挙げられます(図3(c))。

溶液サンプルの測定中に、サンプルチューブ内で気泡が発生することがあります。特に、室温以上の高い温度で長時間の測定を行っているときと生じることが多く、測定中にシムが大きくなりすぎてしまったり、最適なスペクトルが得られなくなるケースがよく起こります。この場合は、測定前に試料溶液を脱気しておくこと、トラブルを未然に防ぐことができます。水溶液の脱気処理は、減圧装置や超音波装置を利用する例が多いと思いますが、NMRの測定試料は体積が少ないですし、超音波を当てられないケースも多いです。また、有機溶媒と水との混合液を脱気する場合は、減圧中に有機溶媒のみが気化して組成が変わってしまうこともあるので注意が必要です。ここでは、筆者が行ってきた方法や、さまざまな研究者から教えていただいた方法を紹介します。

まず最も簡便な方法としましては、試料溶液をサンプルチューブに挿入した後に、測定温度下で

放置しておき溶存空気を排出させる方法です。試料が熱に安定であれば簡便に実施できる方法です。試料の蒸発に注意しつつ、測定前日や測定前に数時間放置することで処理できます。試料を冷やしてしまうと、再び空気が溶解してしまうので、測定まで温度を保っておくとよいです。マシンタイムに余裕があれば、試料をマグネット内に入れて測定温度で保持しておけば、気泡を除いた後に、そのまま実験を開始できます。

温度を上げて脱気することが難しい場合は、減圧器を用います。アスピレーターや小型のポンプとサンプルチューブを、シリコンチューブを介して接続し、減圧します(図4(a))。ときどきサンプルチューブを指でたたいて振動を与えることで、気泡を除いていきます。前述したように、有機溶媒等が混合した系では、組成が変わる恐れがあるので、なるべく減圧時間を一定に保つように気をつけます。ポンプなどを持ち合わせていない場合は、50ml程度のシリンジで代用することもできます(図4(b))。プランジャーを引きながら、サンプルチューブを持つことになるので、操作が難しい点もありますが、身の回りにある備品で比較的手軽に脱気することができます。いずれも、シリコンチューブ等を用いてサンプルチューブを

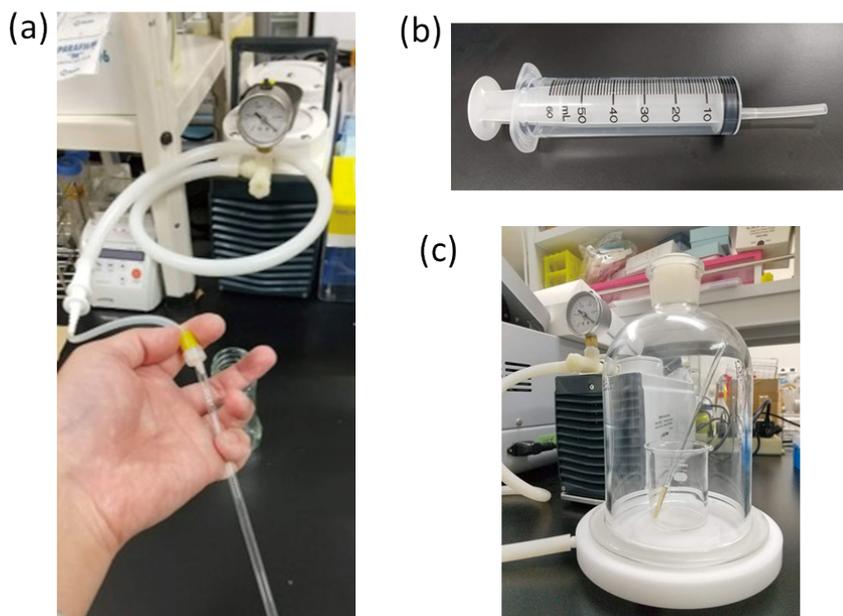


図4 サンプルの脱気処理

測定中にサンプル内から気泡が発生することを防ぐために、サンプルの脱気処理を行います。(a) 小型のポンプからシリコンチューブを介してサンプルチューブに接続します。ときどきサンプルチューブに振動を与えて、気泡が発生しなくなるまで(5~10分程度)減圧します。(b) ポンプの代わりに、50mlの大型シリンジを活用することでも、脱気処理を行うことができます。(a)と同様に、シリコンチューブを介してサンプルチューブを接続して操作する。室温や測定温度下で長時間安定な溶液試料であれば、数時間かけて測定温度下に放置するか、減圧容器下で脱気します(c)。

減圧器につながりますので、接続部分でガラスが割れてしまうことも多いので、注意を要します。チューブでつなぐ代わりに、専用のガラスチャンバーを用いて、減圧下で放置して脱気することもできます(図4(c))。この方法では、振動を与えて気泡の発生を促すのが難しいので、脱気には数時間を要します。

このほか、ヘリウムや窒素ガスでパージして脱気する方法もあります。空気の再溶解を抑え、安定に脱気状態を保つことができますが、ランニングコストはだいぶ高くなります。また、操作を誤って微量な試料を損失してしまうリスクも高いです。

5. サンプルチューブの洗浄

対称型マイクロチューブや高品質チューブは、大変高価ですので、洗浄して再利用することが多いです。ただし、精密なガラスチューブですので、誤った方法で処理をしてしまうと、再利用できなくなってしまいます。筆者や複数のユーザーのご経験をもとに、サンプルチューブの洗浄方法を紹介します。

筆者は、サンプルチューブから試料を取り出したのち、精製水ですすいだ後、中性洗剤を加えて、一晚程度かけて、浸け置き洗浄することが多いです。この方法で、たいていの汚れが落ちますが、ガラス表面に汚れが残る場合には、6M塩酸グアニジン溶液か硝酸水溶液でさらに浸け置き洗いをします。アルカリ溶液での洗浄は、ガラスが溶ける恐れがあり、真円度に影響しますので極力利用しません。各種溶液で浸け洗いした後は、精製水で十分にすすぎを行います。近年では、SIGMAやNeweraで販売されている洗浄用ガラス器具を利用しています^[4, 5]。これらの器具をアスピレーターなどの減圧器に接続することで、精製水を勢いよくサンプルチューブ下端まで送り込むことができ、素早くすすぎ洗浄することができます(図5)。酸性溶液などを利用した際の廃液回収にも有用です。また、すすぎ後は、そのまま減圧して乾燥させることもできます。これらの方法でも、汚れや水滴、固形物を取り除けない場合には、カット綿を細いステンレス棒に巻き付けたブラシを作製し、こすり取る方法などが紹介されています。ガラス内壁にこびりついた汚れを取り除くうえで効果的ですが、内部に糸くずが残ることが多く、却ってゴミを増やしてしまう恐れがあ

ります。また、芯となるステンレス部分が露出してしまい、サンプル管を傷つけてしまう恐れがありますので注意を要します。実験用のガラス器具を超音波で洗浄する装置がありますが、サンプルチューブを傷つけてしまうので、使用しないでください。このほか、洗浄後のサンプルチューブを乾燥させる際に、乾熱オープンを用いると真円度や反りに影響を与えてしまいます。上述のブラシや手回し遠心機で水滴を除いた後に、自然乾燥するか減圧装置で乾燥させます。そのほか、窒素ガスなどを吹き付けて水滴を吹き飛ばし、乾燥させることもできます。このほかの注意点として、対称型マイクロセルの内管と外管の組み合わせは、洗浄後なるべく維持しておくほうが、シム調整でのトラブルを回避でき、安全です。また、RNA試料を測定する際には、RNA分解酵素の混入に細心の注意を払います。サンプルチューブは上記の洗浄を行ったのちに15%過酸化水素水に10～30分ほど浸け置きして、その後、DEPC処理水等のRNase Free Waterやクロロホルム溶液で洗浄、すすぎを行います。グローブやマスクを着用して



図5 サンプルチューブ洗浄用のガラス器具 (SIGMA製)。5mm管だけでなく、3mm管にも対応した器具が市販されています。

の操作はもちろんのこと、エアロゾル等によるRNaseの混入を抑えるため、RNA専用の実験スペースやグローブボックス内でサンプリング操作を行います。RNase除去スプレーなども市販されているので、適宜活用します。

6. サンプルチューブの搬送方法

共同利用施設でのNMR実験が一般的になりますと、NMR試料を送送する機会が多くなります。高価なサンプルチューブや、さらに高価で貴重な測定試料を損失しないためにも、梱包方法に気を付けておきたいです。また、生体系試料では、温度管理も重要となります。筆者のもとにも、外部から数多くの試料が届きますが、多くのユーザーが、サンプルを保護するために工夫をこらしていますので、紹介したいと思います。

多くの方が、サンプルチューブに試料を充填した状態で、送付されています。梱包には、サンプルチューブ納入時に使用されている、オリジナルケースを活用する方が多いです。サンプルチューブを一本ずつ固定することができるので、搬送時の破損リスクを抑えることができます。このほかに、実験によく利用するカラムケースやプラスチックの遠沈管を用いた、手作りのサンプルケースを活用される方も多いです(図6)。これらのケース全体を、エアキャップやキムタオルなどで覆い、発泡スチロール製のクーラーボックスに入れて発送されてきます。宅配業者には、“天地無用”かつ“ワレモノ注意”の旨を伝えておくと、より破損のリスクを抑えることができます。一方、上記のような処置を行っても、3mm管のように細い試料管や角度調節機能付きのサンプルチューブに試料を入れた状態で搬送された場合では、何度か破損した状態で受け取ったことがあります。万が一に備え、試料とサンプルチューブは別々に梱包し、現地でサンプルチューブに挿入することも検討すべきです。

試料送付時には、温度管理にも注意すべきです。冷蔵便や冷凍便を利用することが多いですが、送り先で確実に受け取ることができるよう、日時指定を利用すると良いです。受け取り後に、すぐに適切な場所・方法で保管することが重要です。特にタンパク質等の凍結試料については、融解方法を誤ると凝集してしまう恐れもあるので、受託測定時などは、双方で事前の情報交換をしておくトラブルが少ないです。まれに、冷蔵便で



図6 サンプルチューブの発送方法

ガラスの破損を避けるために、サンプルチューブが入っていた箱(左)や15mlのディスポーザブルチューブ2本を組み合わせた自作カバー(中)やカラム精製用の容器(右)にサンプルチューブを入れて搬送されてくるケースが多いです。

送られているにもかかわらず、サンプルチューブの中で試料が一部凍結してしまうことがあります。必要以上に保冷剤を利用すると、凍結してしまうようです。一般的な保冷剤の代わりに、蓄熱剤を利用することで冷え過ぎや凍結を抑えることができます。4℃、20℃、36℃に対応した蓄熱剤が市販されています。また、宅配業者によって“冷蔵便”や“冷凍便”の温度帯が異なりますので、発送前に各社の温度帯を確認すると良いです(ex. ヤマトの冷蔵は0-10℃、佐川の冷蔵は2-10℃、日本郵便の冷蔵は5-10℃)。長期間、温度管理を確実にを行う“定温輸送”を行う場合には、生体試料や医薬品の搬送を専門に行う業者を選ぶと良いです。

7. おわりに

本項では、サンプルチューブにまつわる話題について、紹介させていただきました。普段、何気なく扱っているサンプルチューブですが、本項では書ききれなかった注意点や測定感度を向上させるための工夫は、まだまだあります。サンプルチューブの取り扱い以外にも、実験のセットアップやパラメータの選択についても、各々にちょっとした工夫や注意点が数多く存在します。学会等

の講演や学術論文からは読み取ることができないこれらの技術やTipsについて、多くの皆さんと共有することができれば、NMR研究の更なる拡大や新技術の発見に繋がると思います。また機会がありましたら、本誌等でTips集を紹介できればと思います。このような、NMR実験に関する素朴な疑問については、すでに、NMR Wiki^[7]やNMR Knowledge Base^[8]といったweb上で共有されていることも多いです。国内におきましても、本学会が後援している若手NMR研究会等の交流行事や、NMRプラットフォーム事業が提供する基礎講習会や教材コンテンツ^[9]にて、情報を得ることができます。さらには筆者も世話人として参加しているNMRワーキンググループでは、生体系NMRを中心に、体験型のNMR講習会を定期的に開催し、Web上ではNMR実験に関わるTips集や論文情報などを共有しています^[10]。このような情報交換の場を介して、みなさまが持っているちょっとした工夫や実験テクニックをご紹介いただき、多くの皆さんと意見交換できると嬉しいです。

謝 辞

本稿の執筆およびチュートリアルコースでの講演にあたり、資料や情報提供をいただきました次世代NMRワーキンググループおよび日本生物物理学会サブグループ・次世代NMRワーキンググループのメンバーの皆様に、深く感謝申し上げます。

引用文献

- [1] Chem-Station ホームページ.
<https://www.chem-station.com/chemglossary/2018/03/nmr.html>
- [2] 株式会社 SHIGEMI
ホームページ: <https://www.shigemi.co.jp/>
・ 泡抜きの動画: <https://www.shigemi.co.jp/products02>
・ 洗浄の動画: <https://www.shigemi.co.jp/products-sample>
- [3] Takeda, M., Hallenga, K., Shigezane, M., Waelchli, M., Löhr, F., Markley J.L.& Kainosho, M. Construction and performance of an NMR tube with a sample cavity formed within magnetic susceptibility-matched glass. *J. Magn. Reson.* **209**, 167-173 (2011).
<https://doi.org/10.1016/j.jmr.2011.01.005>
- [4] SIGMA サンプルチューブ洗浄器:
<https://www.sigmaaldrich.com/JP/ja/product/aldrich/z282383>
- [5] Newera サンプルチューブ洗浄器:
<https://newera-spectro.com/multiple-sample-tube-washer>
- [6] 株式会社スギヤマゲン ホームページ. 保冷剤・蓄熱剤
<https://www.sugiyama-gen.co.jp/products/cat/constant-temperature-transportation/ice-pack/>
- [7] NMR Wiki ホームページ.
http://nmrwiki.org/wiki/index.php?title=Main_Page
- [8] NMR Knowledge Base ホームページ.
<https://analyticalscience.wiley.com/topic/browse/spectroscopy>
- [9] NMRプラットフォーム ホームページ. <https://nmrpf.jp/>
- [10] 次世代NMRワーキンググループ ホームページ.
<https://nextnmr.jp/>



宮ノ入 洋平 (みやのいり・ようへい)

2004年～2006年 日本学術振興会特別研究員 (DC2: 横浜国立大学, PD: 横浜国立大学)
2005年 横浜国立大学大学院 環境情報学府 博士後期課程修了博士 (工学)
2006年～2008年 香港科技大学 生化学科 博士研究員
2008年～2011年 名古屋大学大学院 理学研究科附属構造生物学研究センター 博士研究員
2011年～2017年 名古屋大学大学院 理学研究科附属構造生物学研究センター 特任助教
2017年～現在 大阪大学 蛋白質研究所 准教授

東京大学薬学部 生命物理化学教室

東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 修士2年

山本 泰雅

zeraora-blue@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

はじめに

生命物理化学教室は、2021年度から新たに竹内教授が就任し、新たなスタートを切りました。私は竹内教授が就任してから初めて配属された学生で、当初は竹内教授を筆頭に、上田准教授、幸福助教、徳永助教の4人のスタッフに対して所属学生が3人という、なんとも贅沢な研究室でした。現在では学生が9人に増え、年々賑やかになってきています。さらに、今年度からは上田准教授が大阪大学の教授に栄転され、幸福助教が講師に昇進されるなど、研究室の発展を強く感じています。研究室の成長を目の当たりにし、活気づいていく様子に奮起させられます(写真1)。

研究テーマ

研究室のホームページには、「How Does A Molecule Drive Life?」(分子がどのように生命を駆動するのか)というメッセージが掲げられています。この言葉が示す通り、私たちの研究室の大きなテーマは、生体分子の動的ふるまいが生体機能をどのように果たしているのかを明らかにする

ことです。このテーマに基づき、核磁気共鳴法(NMR法)をはじめとしたさまざまな物理化学的手法を駆使して研究を進めています。特に、「A Molecule」という表現にはこだわりがあり、特定の分子が生体機能のどのような部分を担っているのかを詳細に解明することを目指しています。通常、生体機能は複雑な生体分子のネットワークによって支えられていますが、私たちの研究室では、そのなかでも特定の生体分子が果たす役割、ひいてはその周辺の相互作用に焦点を当てています。これらの挙動を理解することではじめて全体のネットワークを理解することが可能となり、それが新たな医療やバイオテクノロジーの開発に繋がると考えています。この大きなテーマのもと、3つの研究に焦点を当てています。

1. Dynamics

タンパク質をはじめとした生体分子は、その動的な構造変化によって機能を発揮します。NMR法の原子分解能と定量性を活かし、生体分子の動的ふるまいと生体機能の関係を明らかにすることを目指しています。これまでに、多剤結合転写



写真1 薬学部棟前での集合写真。前段中央が竹内恒教授、左が幸福裕講師。後段中央が徳永裕二助教。

因子の結合様式や膜タンパク質のリガンド活性と相関のある動的な平衡変化を明らかにしてきました^[1,2]。

2. Interaction

受容体や酵素などのタンパク質は、基質との相互作用によって機能します。この相互作用の仕組みを解明することで、より優れた薬剤の設計や評価が可能になります。当研究室では、運動性を加味した創薬技術の開発に成功しています^[3,4]。

3. Method

生体分子は分子量が大きく、緩和速度が速いため、NMR解析では感度の低下が問題となります。このため、生体分子のNMR解析を可能にするための感度を向上させる手法の開発に取り組んでいます^[5,6]。また、NMRの新しい可能性を広げるために、in-cell NMRを用いた細胞内創薬の手法開発にも力を入れています。

設備について

当研究室の実験設備は生化学実験室と地下のNMR室に分かれています。生化学実験室では主にタンパク質や核酸のNMRサンプル調製やアッセイ実験を行うための実験設備が揃っています。サンプル調製については、無細胞系、大腸菌、昆虫細胞、哺乳細胞をホストとした発現および精製のための機器が設置されています。アッセイ実験としては分子間相互作用解析が可能なBiacore T200 (Cytiva) や MicroCal iTC200 (Malvern)、蛍光および発光の検出の際に用いるFSEC (島津)、CytoFLEX (Beckman)、Glomax (Promega) などが設置されています。また、地下のNMR室には800 MHzを筆頭に、600 MHzが2台、500 MHz、400 MHzの計5台が稼働しています。これらは前教授である嶋田一夫先生(現・理研チームリーダー、広島大副学長)のご尽力によって導入されたものであり、恵まれた設備環境での研究を進められています(写真2、3)。

まとめ

新たなスタートを切った生命“物理化学”教室ですが、物理化学系の研究室は生物系や有機合成系など他の薬学系研究室に比べると、どうやらほんの少しだけ人気がないようで、一昨年は当研究室への配属学生が最小の2人で「大丈夫か?」と思うこともありました。しかし、昨年は最大人数



写真2



写真3

写真2,3 NMR室の様子。上段が400 MHz、500 MHz、600 MHz、下段が800 MHz。

である5人が配属され、一段と賑やかになりました。これまでは人数が足りずに参加できなかった薬学部の運動会にも参加したり、研究室旅行を企画したりするなど、楽しい研究室ライフを過ごせるようになってきました。研究面に関しても一段と躍進できるよう、嶋田前教授時代からの知見や環境を糧に新たな一歩を踏み出し、「How Does A Molecule Drive Life?」という問いについて追究していきます。

文献 *Correspondence, #Equal contribution

- [1] *Takeuchi, K., Imai, M. & *Shimada, I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **116**, 19963–19972 (2019).
- [2] Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, Keita., Maeda, M., Tsujishita, H. & *Shimada, I. *Nat. Commun.* **3**, 1045 (2012).
- [3] #Mizukoshi Y, #*Takeuchi K, Tokunaga Y, Matsuo H, Imai M, Fujisaki M, Kamoshida H, Takizawa T, Hanzawa H, *Shimada I. *Sci Adv.* **6**: eabd0480 (2020).
- [4] Tokunaga, Y., *Takeuchi, K. & *Shimada, I. *Molecules*. **22**(9), 1492 (2017).
- [5] Boeszoermerenyi A, Chhabra S, Dubey A, Radeva DL, Burdzhiev NT, Chaney CD, Petrov OI, Gelev VM, Zhang M, Anklin C, Kovacs H, Wagner G, Kuprov I, *Takeuchi K, *Arthanari H., *Nat Methods*. **16**, 333–340 (2019).
- [6] Tokunaga Y, *Takeuchi K, Okude J, Ori K, Torizawa T, *Shimada I. *J Med Chem*. **63**, 5360–5366 (2020).

Euromar 2024 渡航記

京都大学大学院理学研究科 博士課程1年
上出 友哉

この度、日本核磁気共鳴学会、2023年度 第3回若手研究者渡航奨励金のご支援を賜り、スペイン・ビルバオで開催されたEuromar 2024に参加いたしました。本奨励金により海外学会に出席し、非常に有意義で貴重な経験を得ることができました。ご支援につきまして、日本NMR学会 藤原敏道 学会長、加藤晃一 選考委員長および故京極好正先生、故阿久津政明先生、ならびにご家族と関係者の皆さまに厚く御礼を申し上げます。

本学会は、スペイン・ビルバオ市、Euskalduna Bilbao Conference Centreにて、6月30日～7月4日までの5日間で行われました。特に、本学会が20周年であること、そしてコロナにより中止となったEuromar 2020 @ビルバオのリベンジ開催であることも受けて、大変盛り上がったように思われます。本学会のロゴマーク(図1)にある2024の「4」の背後に、2020の「0」の文字が浮かび上がっていることから、その開催への思いが察しられます(学会会場でお会いしたT先生は、「あの「0」は4年前スペインに行けなかった俺の恨みがこもっているんだ!」と仰っていました)。学会の様子は、公式Xアカウントからも発信されておりますので、良かったらご参照ください。



図1 Euromar 2024のロゴマーク。

スペイン・ビルバオ市の様子

ビルバオ市は北緯43度15分、西経2度55分^[1]に位置しており、緯度としては日本における北海道札幌市付近となります。日本で夏真っ盛りの7月においても、気温は20～25℃と大変過ごしやすく感じました。学会を終え30℃以上の高温+多湿の日本(京都)に帰国した際は、スペインに

ニューズレター掲載日：2024年7月18日

帰りたい、とさえ思いました。また、ビルバオの時計が指し示す時間は(2024年3月31日～10月27日の間)中央ヨーロッパ夏時間(日本-7時間)であり、ロンドンとほぼ同じ経度であるにもかかわらず、協定世界時(つまりロンドン時間)から+2時間進んだ時差を持ちます。そのため、20時ごろにおいても日は街を照らし、往来は賑やかさを保ったままでした。ビルバオは芸術の街として賑わっており、建築物や町の構造、トラムにも美しさが散りばめられており(図2)、Banquetもグッゲンハイム美術館で行われるなど、オシャレさに溢れていました。

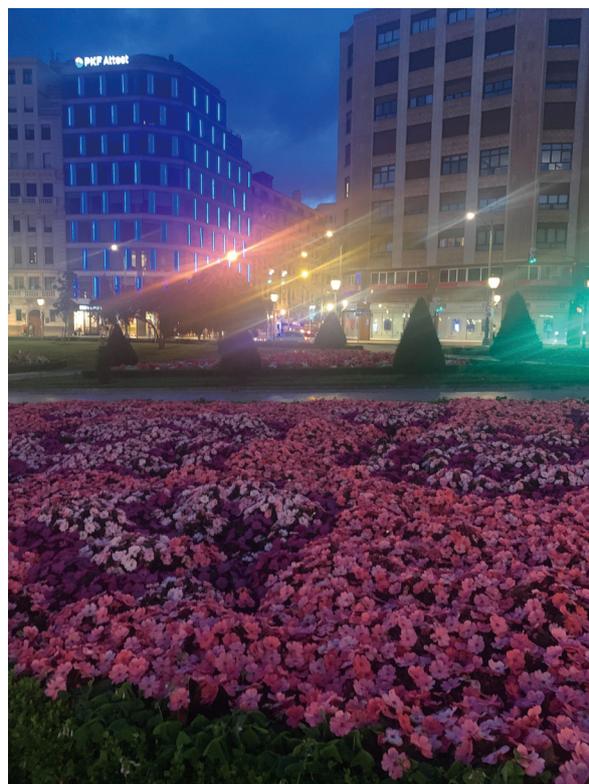


図2 ビルバオ市街の様子。

研究発表

口頭発表は、7月1～4日の間で、溶液NMRや固体NMR、Bio NMR、Hardware、Hyperpolarizationに関するものからEPRと、幅広い分野にわたっ

て行われました。NMR手法の研究からNMRによる材料研究などを主に拝聴することができ、最先端の研究に数多く触れることができました。私個人として興味深かったお話は、Iowa State UniversityのAaron J Rossini先生の、 ^1H detectionと高速MASを使用した固体NMR手法についての研究です。重いスピン1/2核や半整数四極子核に測定を適用したものであり、測定の感度向上と高速化の成功を発表されておりました。測定の感度的な困難を、間接的に測定する手法で打破し、材料物質に応用する着眼点・技術に圧倒されました。ポスター発表は総数450件と多く、さらに発表は7月1～3日の間で一斉に行われたため、会場は素晴らしく活気で満ち溢れていました。発表数は、溶液NMRとBio NMRに次いでHyperpolarizationの件数が多く(表1)、特にDNPだけでなくパラ水素によるHyperpolarizationの発表を聞き、研究テーマとしての重要性や熱さを感じました。それ以外の分野においても、Dipole orderを用いた粉末パターンのindirect detection^[2]やrDFS-QCPMGによる半整数スピンの高感度測定^[3]など、興味惹かれる発表が多く、その発想の素晴らしさに驚きました。

表1 ポスター発表の分野と発表件数
(Withdrawal分も含む)。

Field	Number
BCH(Bench-top + LowField)	14
BIO(BioSolid)	14
CEL(InCellNMR)	4
COM(Computation + MachineLearning)	29
DRG(Drug Discovery)	16
EPR	17
HRD(Hardware)	13
HYP(Hyperpolarization)	63
MRI	13
MTB(Metabolomics)	30
MTR(Material)	24
NMR(BioNMR)	107
SLT(Solution NMR Method+Application)	77
SML(Small Molecules)	9
SST(Solid-state NMR Method+Application)	40
OTH(Other)	9
Sum	479

私は、「Solid-state NMR of quadrupolar nuclei in magnetically oriented microcrystals」というタイトルでポスター発表を行いました。粘性溶媒に懸濁させた粉末微結晶は、静磁場中で変調回転させることで、その方向を物理的に、そして3次的に揃えることができます。この配向が揃った微結晶は疑似的な単結晶を構成し、そのNMRスペクトルは単結晶ライクになります。我々は、この配向した微結晶を用いたNMR測定を四極子核(^{14}N)に拡張し、粉末のままでは広幅となる共鳴線を高分解能に捉える手法を実現しました。本研究はSolid State NMR誌に論文掲載された^[2]内容であり、その紹介も兼ねての発表を行いました。発表・質疑のなかで、なぜ配向するのか、どのように配向させるのか(原理や装置の仕組み)の質問や、応用先への質問や指摘もいただきました。また、研究の内容だけでなく、他人に研究の面白さを伝えることへのアドバイスもいただき、これから研究発表をする上で大変参考となりました。

まとめ

発表では後悔や反省点も多々ありましたが、この学会に参加して大変楽しく、有意義な時間を過ごすことができました。また、想像もつかなかったような素晴らしい研究に数多く接する機会を得ました。自分自身は研究者としてまだまだ未熟ですが、いつか再び研究成果を持ってEuromarに参加したいと思います。この学会に参加できた経験を実り多いものにするため、今後も一層励んでいく所存です。

最後に、京都大学理学研究科 武田和行 准教授(学会参加の提案もしていただきました)、野田泰斗 助教の厳しくも温かいご指導により、本学会の参加に繋がりました。この場をお借りして深く感謝申し上げます、拙文を締めさせていただきます。

参考文献

- [1] https://www.itb.co.jp/kaigai_guide/western_europe/spain/BIO/index.html
- [2] J. K. Kimbell, et al., Euromar2024, SST-006.
- [3] A. Wong, M. Negroni, A. P. M. Kentgens, Euromar 2024, SST-037.
- [4] T. Kamide, Y. Noda, K. Takeda, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **131** (2024) 101924.

NMR

*Bulletin of the Nuclear Magnetic
Resonance Society of Japan*

Vol.14 No.1

2024年8月31日発行

発行：日本核磁気共鳴学会

編集：NMR学会機関誌編集室 株式会社クバプロ
〒102-0072 東京都千代田区飯田橋3-11-15-6F
TEL：03-3238-1689 FAX：03-3238-1837