

NMR

Bulletin of the Nuclear Magnetic
Resonance Society of Japan



Vol.14 No.1 & 2 2024

<http://www.nmrj.jp>

巻頭エッセイ 武藤 裕

総説論文：解説 神田大輔

NMR講座：NMR基礎講座 福士江里

総説論文：トピックス 田巻 初

会員便り：研究室便り 池上貴久

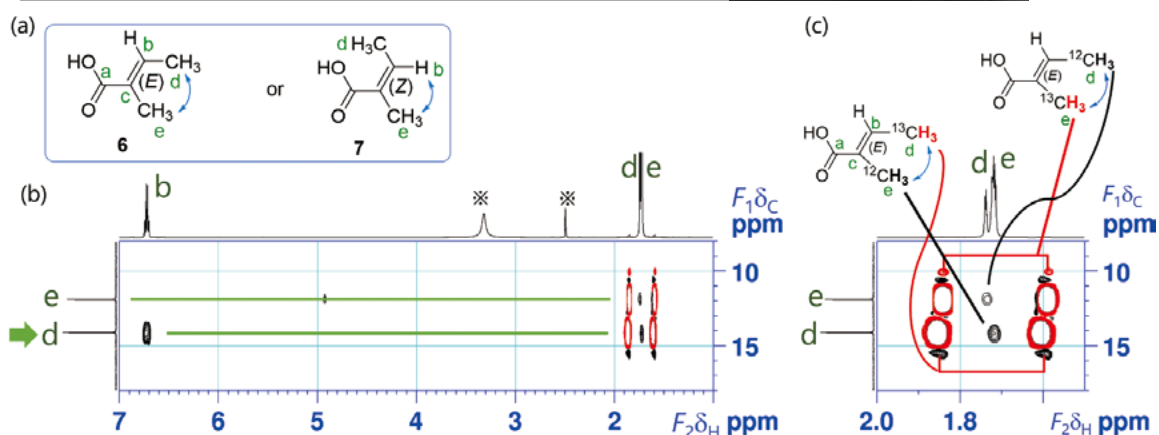
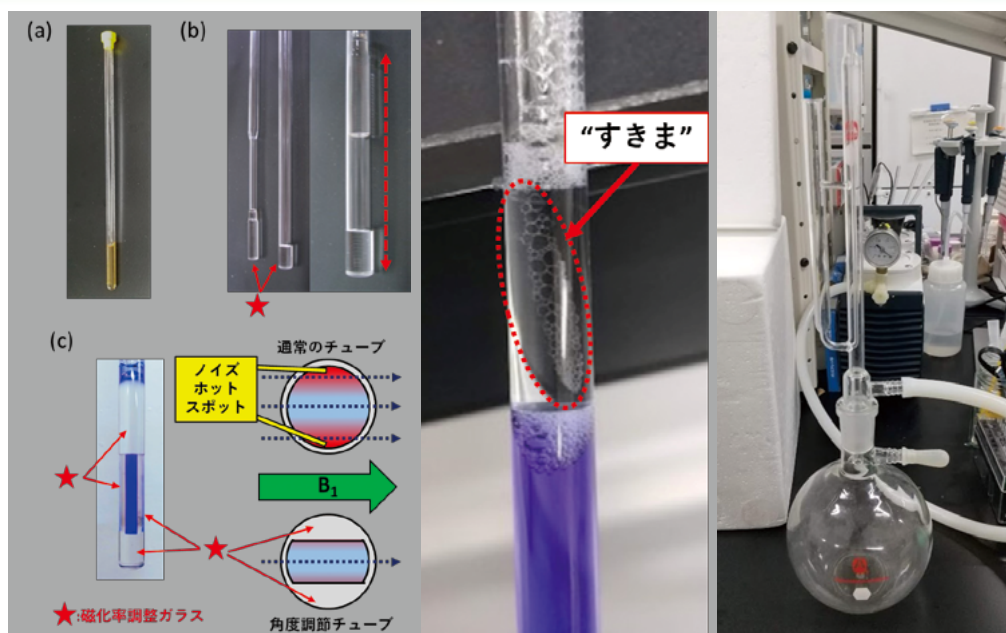
会員便り：研究室便り 田中誠人

会員便り：海外学会参加報告 鈴木陽菜梨

2024年度学会顕彰：進歩賞

2024年度学会顕彰：若手ポスター賞

NMR学会からのお知らせ



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

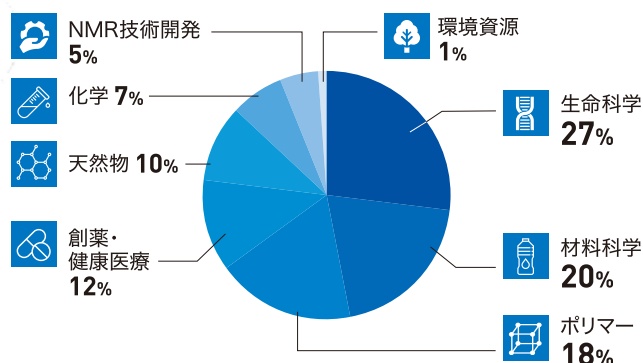
株式会社 エルエイシステムズ

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

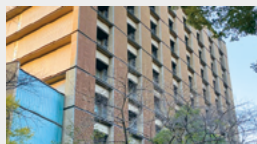
オート
サンプリング

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

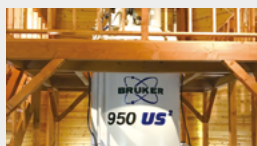
高速MAS

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



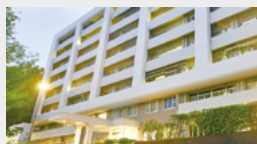
溶液

極低温
プローブ

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)



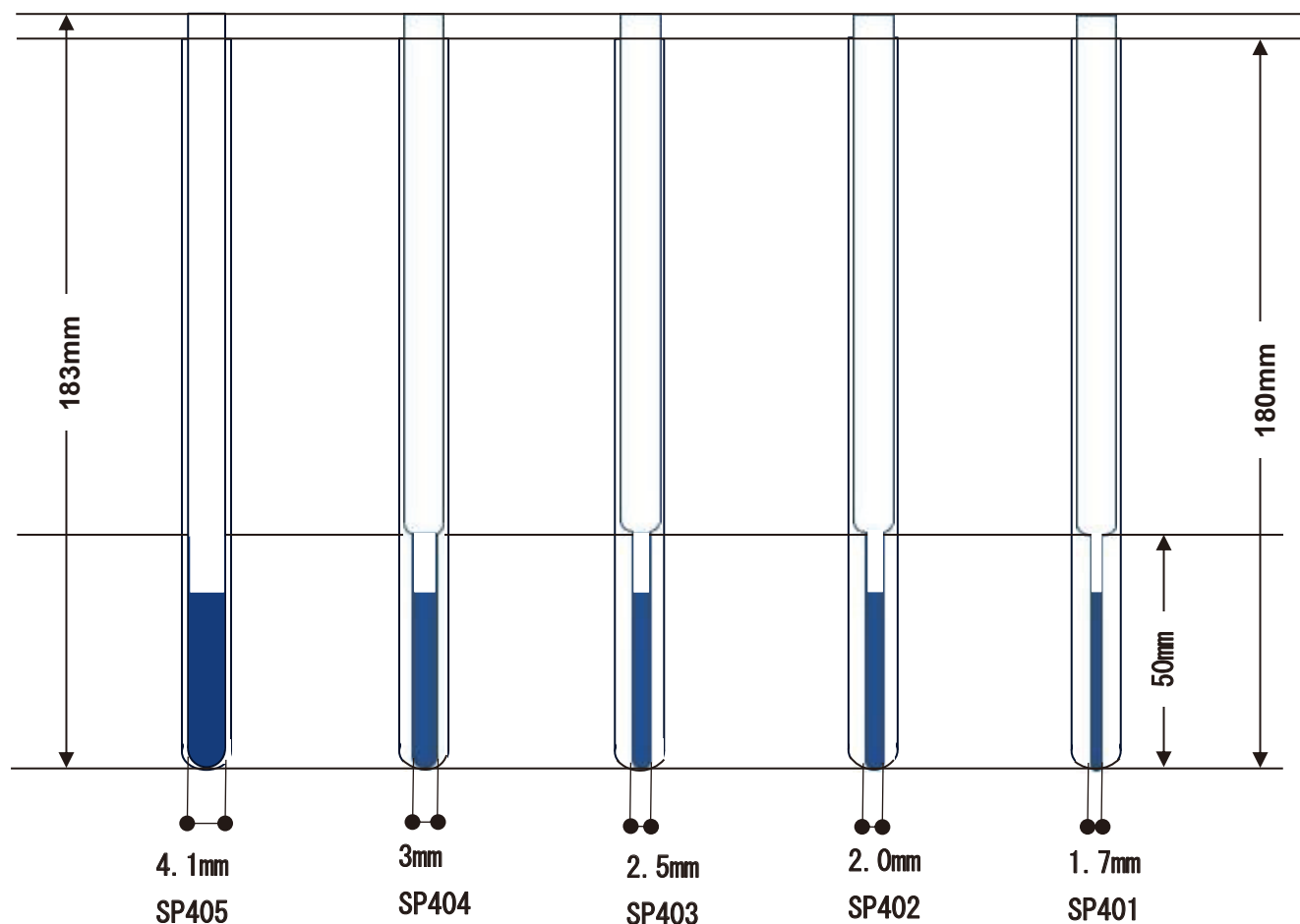
Bruker at ENC 2024
Ascend Evo Series
リーフレットダウンロード



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ボ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ありません。



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

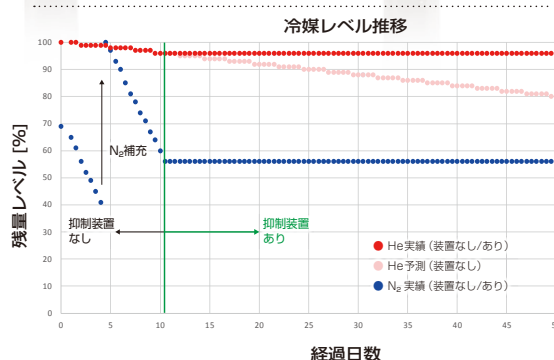
昨今の液体ヘリウムへの不安・心配解消へ



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

無細胞[®]
くん



名称	UniProt ID (start a.a. - end a.a.)	備考
St_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

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



MASローター
(1.2mm - 7.5mm)



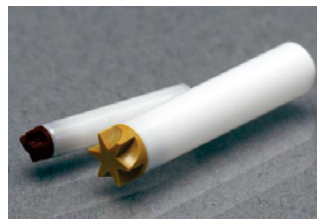
HXY Premium プローブ



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.2

February 2025

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

CONTENTS

●巻頭エッセイ 分子を手にとれるNMRのおもしろさ	47
武藤 裕	
●総説論文：解説 蛋白質分子のスムーズな構造変化を実現する物理化学基盤である「整合性原理」に NMR法の特徴を活かして実験的にアプローチする	50
神田 大輔	
●NMR講座：NMR基礎講座 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— (第三回)	66
福士 江里	
●総説論文：トピックス 最適制御理論“だから”できるNMR測定法の開発	78
田巻 初	
●会員便り：研究室便り 横浜市立大学（鶴見キャンパス）の紹介	84
池上 貴久	
味の素株式会社 バイオ・ファイン研究所 評価・分析 構造解析グループ 構造物性関連ユニットのご紹介	89
田中 誠人	
●会員便り：海外学会参加報告 ICMRBS 2024 参加報告書	91
鈴木 陽茉梨	
●2024年度学会顕彰：進歩賞 「進歩賞」について	93
●2024年度学会顕彰：若手ポスター賞 第63回NMR討論会（2024）若手ポスター賞について	95
●NMR学会からのお知らせ 日本核磁気共鳴学会の決定事項	97
日本核磁気共鳴学会機関誌投稿規程	99
賛助会員名簿	101
日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員会委員名簿（2024-2025年度）	102

分子を手にとれる NMR のおもしろさ

武蔵野大学薬学部薬学科教授

武藤 裕

ymuto@musashino-u.ac.jp

筆者は、1982年に東京大学理学部生物化学教室での研究室配属で宮澤研究室に所属することになり、そこで当時、助教授としていらした荒田洋治先生を指導教官として研究を始めることになりました。それが、NMR法を用いた蛋白質研究を行う端緒でした。初めてNMR討論会に参加したのは1984年に鳴子ビューホテルで開催された第23回大会のときになります。

この当時、生物化学の分野では遺伝子操作などの手法を用いた分子生物学分野に大きな人気がありました。私も物理化学的な手法に興味はあったのですが、まだNMRなどについてはさほど知識があるわけではなく、配属研究室を選んだ理由は荒田先生が免疫系の蛋白質を研究対象としていて、“生物学的に重要な意味がありそうな気がした”ということが大きかったと思います。荒田先生は、この当時から、分子量がとても大きな蛋白質を研究対象にされ、主に ^1H -NMRスペクトルで解析されていました。一次元 ^1H スペクトルがCDスペクトルのようで、おそらく他の低分子を扱うNMR研究者の方がみると、“これはNMRのスペクトルですか？”という感じだったかもしれません。この当時は、まだ、蛋白質のNMR研究というと、対象として試料からどうすれば情報が得られるかについていろいろ独自のアイデアを出して研究を進める場面が多かったと思います。

荒田先生のもとで、同期の遠藤聡史博士がカルボキシペプチダーゼ (CPase) を用いて、蛋白質のアミノ酸をそのカルボキシル末端 (C末端) から外していき、その酵素反応の過程をNMRスペクトルで追って (差スペクトルを取って)、抗体IgGフラグメントのC末端部分の帰属に利用する方法の開拓を行っていました。わたくしは、補体系第三成分C3を研究の対象にしていたのですが、C3のフラグメントでアナフィラトキシン活性のあるC3aフラグメント (これは、アミノ酸77残基ほどで、さほど大きくありません) についてこ

のCPaseを用いた方法でC末端の帰属を試みました。このとき、C末端がある程度切断を受けるとフラグメントのC末端部分以外の場所のシグナルに影響がでていることがわかり、逆に全体の帰属が入っている状態だと、この方法で、構造の情報も与えてくれるのではと考えました (C3aについては、X線結晶解析も行われていたのですが、crystal contactのため二量体化していたため、N末端部分の構造情報が得られておらず、活性に必要なC末端部分の構造の安定化が結晶化によるartifactかどうかまだわからないという状態でした)。1986年ごろには、Wüthrich博士による二次元 ^1H -NMR法を用いた連鎖帰属法が確立され、X線結晶構造解析に情報とは独立に、小さいながらも蛋白質の溶液構造を決定することができるようになり、NMR法に対する生物化学研究者の見方が変わってきた時期でもあります。荒田先生に、“CPaseを利用した構造情報を得る方法につながるとお思いますから”とお願いをして、当時、日本でこの手法のpioneerであった都立臨床医学総合研究所 (当時) の稲垣冬彦先生 (1988年 ^1H -NMRによるEGFの構造決定を行われています) に連鎖帰属のために必要なスペクトルを測定していただき、C3aのC, N末端部分で相互作用して構造を安定化している領域についての情報を得ることができました。この“分子自身を触って調べている”感覚はNMR法で得られる独特なもので、いまに至るまでNMR法の面白さを感じている点です。

その後、東大の横山研究室で研究を行う機会を得まして、いくつかのプロジェクトに関わってきましたが、1990年代からは、RNA結合蛋白質であるSxl蛋白質について研究をはじめていました。このころは、生体系のNMRは、さらに大きい発展を見せ、とくに1990年すこし前ほどから、Bax博士らによって開発された ^{13}C , ^{15}N 安定同位体標識を利用した3重共鳴法による多次元NMR解析法が開発されてきたことはみなさんもお存じと思

います。新しい手法がでてくることは、楽しみが増える面もありますが、同時に競争をしている状態だと最低限と思われる技術的な部分（たとえば装置の構成など）をいかにcatch-upしていくか、など研究を進める上で頭の痛い問題にも遭遇することになります。AI技術の普及が進みつつある現在では、さらに難しい問題になっていると感じていますが、どうでしょうか。

Sxl蛋白質をはじめとするRNA結合蛋白質の構造解析ですが、NMR解析の試料としては難しい状態（溶解度が低く単分散でない）で、さらにRNAの非特異的な結合などに悩まされて、きれいなスペクトルを取るためにかなりの労力を費やす局面が多かった覚えがあります。Sxl蛋白質では、変異体の作成で構造解析が可能な溶解度が向上した試料を得たのですが、記録を振り返ってみると紆余曲折があり2年間ほどは、主に変異体作製や溶液条件検討ばかりしていて、“そんなに時間がたっていたのか”とちょっと驚いています。NMR討論会でもお話ししたのですが、Sxl蛋白質とRNAとの結合で観測される特異的な核酸塩基のイミノプロトンシグナルがあり、選択的 ^{15}N 選択標識を用いてその帰属を行い、このシグナル情報を見ながら変異体を作っていました。実際のところ、蛋白質側のRNAとの結合面ではないところに変異をいれた試料を作成しても溶解度向上はまったくうまくいかない状況になっていて“どうしようか”という状況でもあったのですが、イミノプロトンの帰属はわかったので、“蛋白質側に微小な変異をいれたときのイミノプロトンの化学シフト変化でモデルが組めるかな”というのが頭に浮かぶようになっていました。RNAとの接触面にあるPhe残基をTyr残基に置換したのはそのような意図もあり、このときは物性の向上はあまり期待していなかったと思います。なぜかというに変異体作成をはじめた時期に他の類似ドメインとの比較から、このPhe残基をArg, Lysという水溶性の高いアミノ酸への置換は行ったのですが

まったく物性の改善が見られず、この位置のさらなる変異体作成はそのとき一度諦めていました。いまから思うに、NMRスペクトルでイミノプロトンシグナルが見えて帰属できていなかったら、このPheの位置に戻って、Phe→Tyrの変異体は作っていなかったかもしれません。結果的に、この変異体が、物性を大きく向上させて複合体の構造解析におおきな進展をもたらしてくれましたが、この試料が濃縮できたときには本当に驚かされました。研究をやっていると“なんでそうなるの”と思うことがままあり、それが面白さでもありましたが、同時に“なぜ、Phe→Argの変異体を作ったときに、Phe→Tyr変異体も作らなかったのか”と後悔もしました。

労力がかかりましたが、この物性の悪さは幸運な面でもあったと思います。なぜかというとNMRにおける3重共鳴法や結晶化のスクリーニングなどの方法が確立してきていたので、構造解析試料として簡単に調製できるものだと勝負が直線的になってしまい、装置のセットアップなどができていた海外のグループ（実際、競争相手がいる状況でした）とは、ほとんど競争にならなかったように思います。

思い返すと、以前は研究を進めるうえで、結局なにが有利になりそうかはわからずじまいで、とりあえずやってみようかで試行錯誤して進めることも多く、そういうことができた環境は貴重な経験であったと思います。いままで私は、NMR法をもちいて研究を進めてきましたが、どちらかというと生化学的な研究の側面が強いにもかかわらず、このようにNMR学会誌に寄稿する機会を与えていただいたのも、多くの先生方や学生のかたに助けていただいたおかげだと思います。この場を借りて御礼申し上げます。NMR法は、研究者のアイデアを入れて形を変えて利用することができる貴重な手法だと思っています。この機に日本におけるNMR研究および日本核磁気共鳴学会の益々のご発展を祈念いたします。

**武藤 裕 (むとう・ゆたか)**

- 1983年3月 東京大学理学部生物化学科卒業
1988年3月 東京大学大学院理学系研究科生物化学専門課程 博士課程修了
1988年6月 東京大学理学部生物化学科 助手
1994年4月 東京大学理学部生物化学教室 講師
1999年6月～2001年3月 文部省在外研究員 (U.K. MRC-LMB)
2002年4月 理化学研究所 横浜研究所 蛋白質機能構造グループ
安定同位体標識技術高度化チーム チームリーダー
2008年4月 独立行政法人・理化学研究所 横浜研究所 生命分子システム基盤研究領域
RNA生物学研究チーム チームリーダー
兼任 (東京工業大学・連携大学院 客員教授 (2012年3月まで))
2013年4月 武蔵野大学 薬学部 薬学科 教授 (現在に至る)

蛋白質分子のスムーズな構造変化を実現する物理化学基盤である「整合性原理」にNMR法の特徴を活かして実験的にアプローチする

九州大学生体防御医学研究所

神田 大輔

kohda@bioreg.kyushu-u.ac.jp / dkohda@kyudai.jp

はじめに

蛋白質分子がミリ秒の時間スケールでスムーズに構造変化することは生命にとって不可欠な性質であり、生物学分野では当然のこととして受け入れられている。しかし、この特別な性質は進化における自然選択の結果として獲得されたものである。蛋白質分子がスムーズな構造変化を起こせる能力の物理化学的な源は何であろうか？そして、実験データからその能力の検証ができるだろうか？

蛋白質フォールディング研究を振り返る

蛋白質分子のフォールディングの研究は蛋白質科学の歴史において、かつては(2010年頃)花形の分野であった。典型的な実験では、モデル蛋白質を変性させた後に希釈してフォールディングを開始する。ストップフロー装置を使って蛍光やCD(円二色性)の時間変化を追跡して、折れたたみ過程をモニターする。興味の焦点は遷移状態の解析である。遷移状態は蛋白質分子の折れたたみ過程においてギブズ自由エネルギー(Gibbs free energy)値が最大となる変化途上の状態である。不安定で蓄積することがないために直接観測ができない。そこで、解析には間接的なアプローチがとられる。汎用される方法にAlan R. Fersht(英国MRC)が1992年に発表した ϕ 値解析がある^[1,2]。 ϕ 値解析の解説をする前に、蛋白質分子の折れたたみ反応について説明する。

蛋白質分子の折れたたみ反応とは、通常はランダムな変性状態Uからコンパクトな天然状態Nへの構造変化を指す(図1A)。これを拡張して、蛋白質分子の一部分が構造形成の度合いの低い状態Uから高い状態Nへと変化するコンホメーション変化にも適用できる。この場合、構造変化する部分の周囲には静的構造Cがあり、全体として2つの状態AとBの間の平衡反応と捉えることができる(図1A)。折れたたみ反応の理解は漏斗状エ

ネルギー地形(funnel-shaped energy landscape)(図1B)を使うと容易になる^[3~5]。鍵となる概念はアンサンブル(集合状態)とマルチパスウェイ(多重経路)である。エネルギー地形が登場する以前は、フォールディング過程を単純に $U \rightarrow I \rightarrow N$ などと記述した。この場合、状態Uが非常にたくさんの異なる主鎖のコンホメーションのアンサンブル(集合体)であるという事実を忘れがちになる。準安定な中間体Iに関しても同様である。また、矢印 $\rightarrow$ の使用も変化が一本道であるかのような誤解を与える。中間体Iを経ない経路 $U \rightarrow N$ も同時に存在するような確率的な多重経路の可能性が覆い隠されてしまう。この点、漏斗状エネルギー地形を使うと2つの概念が自然に考慮される。

フォールディングを考える際に必要になるのが、考察の対象であるシステム(今回は蛋白質溶液)が持つギブズ自由エネルギーである(図1B)。ここでエネルギーに“自由”を付す理由は、対象とする系が多数の蛋白質分子のアンサンブルであり、それぞれの蛋白質分子が異なるコンホメーション(単結合まわりの回転異性体由来する)をとることに由来するエントロピー(乱雑さ)を考慮していることを表す。状態Uにあるポリペプチド鎖はいわゆるランダム構造をとっており、主鎖の二面角 ϕ と ψ がそれぞれ複数の安定な回転異性体を持つことに起因する多様な立体配座がある。このポリペプチド主鎖の構造多形に由来するエントロピーを S^* で表すことにする。系の自由エネルギー G から S^* の寄与分を除いて $G^*(=G+TS^*)$ で表す。ここで T は系の絶対温度である。漏斗状エネルギー地形では、垂直軸が G^* を、水平面で切った円周の長さが S^* を表す。いかなる変性状態Uから出発しても、小球(蛋白質分子)が漏斗表面上を滑らかに転がり落ちて状態Nに到達することが直感的に理解できる。異なるU状態(主鎖のコンホメーションが異なる)から異なる経路を辿って同一の状態Nに到達することもわかる。

G^* と S^* を足し合わせて G に戻して縦軸にし、横軸を反応座標 (reaction coordinate, Q) とすると見慣れたエネルギーレベル図ができる (図1B)。比較的小さな単ドメインの蛋白質分子は二状態転移をすることが多い。二状態転移を表すエネルギーレベル図は単一峰の釣鐘型の分布をしており、自由エネルギー値が最大の遷移状態Tが一つある。遷移状態Tは単一の状態ではなく、変性状態Uと同様に多数の異なるコンホメーションのアンサンブルであることに留意する。この観点を強調する場合には遷移状態アンサンブル (transition state ensemble, TSE) という。3つの状態U, T, Nの間に3つの自由エネルギー (正確には自由エネルギー差) があり、 $\Delta G_{\ddagger-U}$ は構造形成の度合いが進む $\rightarrow$ 方向の活性化自由エネルギー、 $\Delta G_{\ddagger-N}$ は構造形成の度合いが減る $\leftarrow$ 方向の活性化自由エネルギー、 ΔG_{N-U} は状態Uを基準としたときの状態Nの安定性を表す平衡自由エネルギーである。それぞれ、どの状態を基準にして差を求めているかに注意を払う必要がある。論文によって基準が異なる

り、記法も統一されていない。図1Bのように定義した場合、 $\Delta G_{\ddagger-U}$ と $\Delta G_{\ddagger-N}$ は両者ともに正であるが、 ΔG_{N-U} の値は負である。

Fershtの ϕ 値解析を説明する^[1,2]。蛋白質分子の内部に位置するアミノ酸の側鎖をより小さな側鎖に置換して、疎水コア内部に空洞を作る。例えば、ロイシンをアラニンやグリシンに置換する。野生型蛋白質 (wt) と変異型蛋白質 (mut) それぞれについて尿素変性とストップフロー実験を行い、尿素濃度ゼロに外挿することで、フォールディングの速度定数 k とアンフォールディングの速度定数 k' を決定し、次式を使って状態U, T, Nの間の自由エネルギー差を求める。なお、平衡定数 K には $K=1/K'=k/k'$ の関係がある。

$$\Delta G_{N-U} = -2.3RT \log K \quad (1)$$

$$\Delta G_{U-N} = -2.3RT \log K' \quad (2)$$

$$\Delta G_{\ddagger-U} = -2.3RT (\log k - \log A) \quad (3)$$

$$\Delta G_{\ddagger-N} = -2.3RT (\log k' - \log A) \quad (4)$$

ここで、2.3は自然対数と常用対数の間の換算係数、 R は気体定数、 A はアレニウスの式における

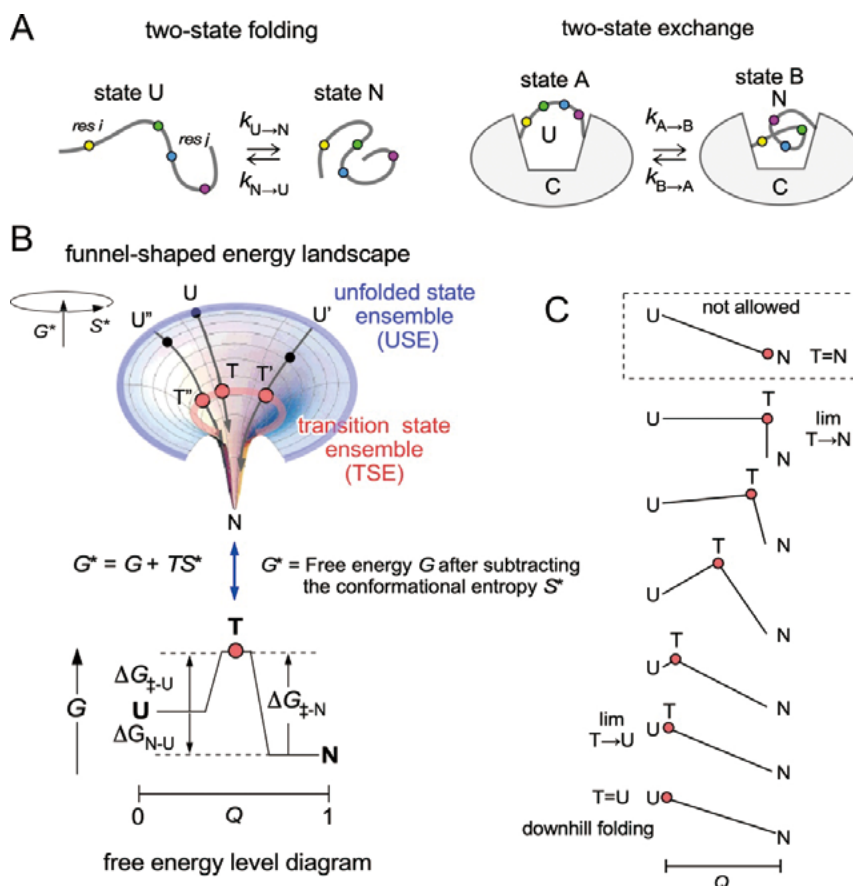


図1 蛋白質分子の構造変化を記述する。(A) 変性状態から天然球状状態への大きな構造形成 (左) と一部分の構造形成 (右) は同じ枠組みで記述できる。(B) 漏斗状エネルギー地形 (上) とエネルギーレベル図 (下) の関係。(C) 2状態交換のエネルギーレベル図は反応座標 Q 上の遷移状態の位置によって変化する。遷移状態を状態Uに重ねることはできる。状態Nに重ねることはできない (点線内)。そのため、遷移状態を状態Nに近づける極限を想定する必要がある。

衝突因子 (pre-exponential factor) である。変異した残基 i の ϕ 値は以下の式で定義される。

$$\phi \equiv \frac{\Delta G^\ddagger}{\Delta \Delta G^\ddagger} = \frac{(\Delta G^\ddagger-U)_{wt} - (\Delta G^\ddagger-U)_{mut}}{(\Delta G_{N-U})_{wt} - (\Delta G_{N-U})_{mut}} \quad (5)$$

ϕ 値解析の隠されたトリックは、野生型と変異型の間で自由エネルギーの差をとることで、活性化エネルギーの計算において、以下のように衝突因子 A の項がキャンセルされることにある。

$$\begin{aligned} (\Delta G^\ddagger-U)_{wt} - (\Delta G^\ddagger-U)_{mut} &= -2.3RT\{(\log k_{wt} - \log A) - (\log k_{mut} - \log A)\} \\ &= -2.3RT(\log k_{wt} - \log k_{mut}) \end{aligned} \quad (6)$$

その結果、式5の分子と分母の直接比較が可能になる。

$$(\Delta G_{N-U})_{wt} - (\Delta G_{N-U})_{mut} = -2.3RT(\log K_{wt} - \log K_{mut}) \quad (7)$$

式6と7を式5に代入すると

$$\phi = \frac{\log k_{wt} - \log k_{mut}}{\log K_{wt} - \log K_{mut}} \quad (8)$$

となる。

Fershtの最初の提案では、 ϕ は遷移状態において残基 i が状態Uにあるときに0、残基 i が状態Nにあるときに1をとる。しかし、実際に ϕ を実験的に求めると0と1の間の中間の値を取る。これは遷移状態が異なる状態のアンサンブルであることを考えると、集団平均を見ているためと解釈できる。 ϕ が負の値や1を超える値になることも少なくないが、この場合はアミノ酸変異導入によって状態Uが変化する、フォールディング経路が変化するなど、 ϕ 値解析の前提が破綻した場合とされる。例えば、ロイシンをバリンに置換することは一見問題なさそうであるが、バリンの2つのメチル基が主鎖に近づくことによる立体障害の観点から、ロイシン→バリンの変異は ϕ 値解析では推奨されない^[6]。多数の残基位置で ϕ 値解析を行って ϕ 値vs 残基番号プロットをつくると、遷移状態において状態Nを割合として多くとるアミノ酸配列領域を見つけれられる。このような領域はフォールディング核と考えることができる。

Cooperativityの日本語訳：共同性と協同性の表記について

蛋白質分子が構造変化するとき、蛋白質を構成するアミノ酸残基や原子が一斉に挙動する性質をcooperativityという。これを日本語に翻訳するときに、「共同性」あるいは「協同性」という漢字が当てられる。あまり使われないが、「協働性」の漢字もある。音が同じで、意味も似ているだけに、まぎらわしい。「協同」は力をあわせること、

「協働」はもう少し具体的で同じ目的のために力をあわせて働くことを意味する。これに対して、「共同」には共同浴場という言葉があるように、協力して力を合わせる必要はなく、いっしょに何かをすることを表す。

例えば、ヘモグロビンの4つのサブユニットの間のcooperativityを指す場合、「協同性」と書くことが多い。しかし、本解説では「共同性」と表記する。その理由は、後述するように、複数のアミノ酸残基が構造変化をスムーズに進めるために協調して働く様子をconsistency＝協調性としたいためである。そこで、複数のアミノ酸残基が、単に同時に挙動する様子を表すcooperativityを共同性として表記して区別する。

蛋白質フォールディング研究のための戦略：平衡定数や速度定数を残基ごとに測定する

一般的な考えでは、蛋白質分子の構造変化の共同性(cooperativity)は非常に高く、平衡定数 K や速度定数 k , k' は蛋白質分子につき1つずつで足りるとされてきた。実際、Fershtの ϕ 値解析では局所的なプローブであるはずのトリプトファン残基の蛍光を使って求めた平衡定数や速度定数を分子全体の値として解析を行う。しかし、NMR法などを使って平衡定数や速度定数を実験的に求めると、残基ごとに異なる値になることがしばしばある。

事例を示す(図2A)。ヒト表皮常在グラム陽性菌 *Staphylococcus warneri* ISK-1が分泌するペプチドnukacin ISK-1 (27残基)はlipid IIと相互作用して抗菌活性を発揮する生理活性ペプチドである^[7]。アミノ酸配列内に翻訳後修飾によって生じる不飽和アミノ酸(Dhb)と3本のモノスルフィド結合(Ala-S-Ala, Abu-S-Ala)を有する。¹⁵N標識したnukacinの¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを測定すると溶液中で二つの状態が存在している(図2B)^[7]。二つの状態は主鎖のトポロジーが異なるために、遷移状態ではHis12の側鎖が、モノスルフィド結合がつくる主鎖のリングBをくぐり抜けねばならない(図2C)^[8]。リングのくぐり抜けを起こすような遷移状態を越えるには大きな活性化エネルギー(10 ~ 12 $k_B T$, k_B はボルツマン定数)が必要のために^[8]、EXSY NMR法を適用できるくらいに遅い交換(サブ秒オーダー)になる。これはnukacinを使う利点である。同じ残基に由来する2つのクロスピークの体積比は平衡定数 K である

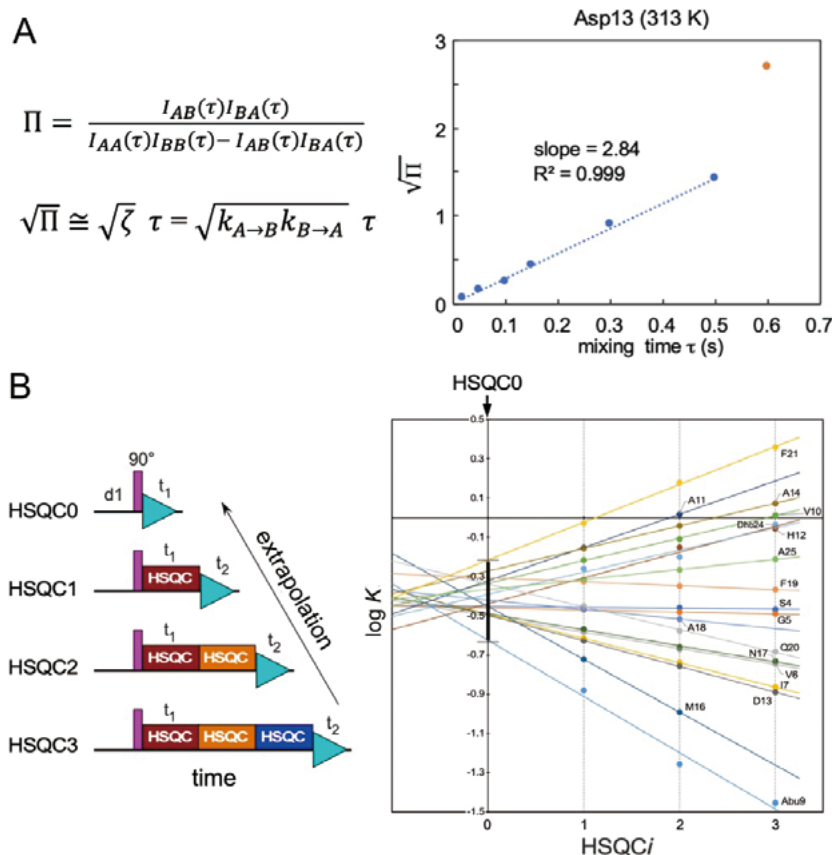


図3 平衡定数と速度定数に測定バイアスを生じない測定・解析。(A) ^{15}N zz-EXSY NMR スペクトルを使うと、1つのアミノ酸残基につき4つのピーク強度、 I_{AA} , I_{BB} , I_{AB} , I_{BA} がミキシング時間 τ の関数として得られる。4つの強度から計算される Π 値の平方根は原点を通る τ の一次関数となり、傾きは速度定数 $k_{A \rightarrow B}$ と $k_{B \rightarrow A}$ の積の平方根を高い精度で近似する。プロット例では、 τ が 0.5 s までは原点を通る良い直線関係が成り立っているが、0.6 s では大きく外れている。外れる原因は交換ピークの強度が測定限界近くに減少するためである。(B) HSQC0 NMR 測定の原理 (左)。HSQC ユニットの個数を 1, 2, 3 個とする測定を行い、平衡定数 $\log K$ (2つのピークの体積比の対数) の値を HSQC ユニットの個数 0 に外挿する (右)。プロットのデータ点は4回の独立な測定の平均である。縦軸上の黒太線がバイアスフリーの $\log K$ の分布範囲に対応する。EXSY- Π 解析と HSQC0 測定はそれぞれ既知の方法であるが、組み合わせて実験を行ったのは nukacin が最初である^[10]。

されてきた。そのため、NMRを使ってアミノ酸残基ごとに平衡定数や速度定数を決定しても、グローバルフッティングを行う、あるいは単に平均値を計算するなどして単一の値にまとめることが普通であった。単一の値にまとめる事情としては、残基ごとの値のばらつきが測定誤差に起因することへの疑いを拭えないからである。その結果、残基ごとに異なる値を報告する論文が散見されるものの^[15, 16]、その解釈は曖昧なままに残されてきた。捨てられてきた情報を有効に使うには、平衡定数と速度定数の残基レベルの変動に隠された意味があることを示す知見が必要であった。

我々は nukacin の NMR 解析の結果を使って、残基ごとの平衡定数 K と残基ごとの交換速度定数 k の両対数プロットを作ると良い相関関係があることを発見した (図4)^[9, 10]。これは平衡定数や速度定数が残基レベルで異なる値を持つことに意

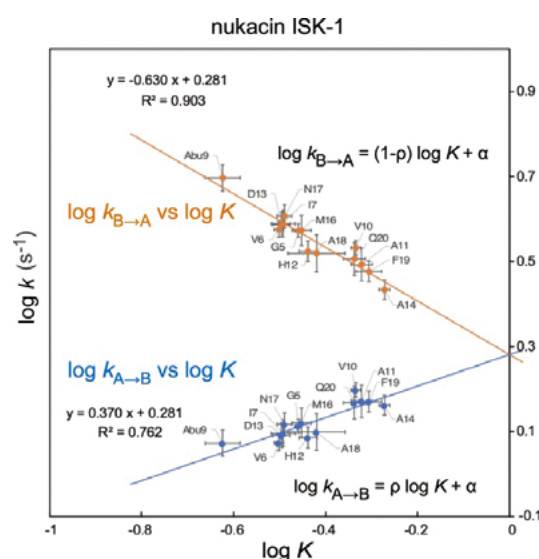


図4 Nukacinの $\log k$ vs $\log K$ プロット。平衡定数と速度定数を、NMRを用いて残基ごとに決定して $\log k_{A \rightarrow B}$ vs $\log K$ と $\log k_{B \rightarrow A}$ vs $\log K$ プロットを作成した。 $K = k_{A \rightarrow B} / k_{B \rightarrow A}$ の関係があるために2つの回帰直線は独立ではないことに注意。

味があることを支持する強い根拠となる。なお、 $\log k$ vs $\log K$ のデータ (青色) と $\log k'$ vs $\log K$ のデータ (オレンジ色) は $K=k/k'$ の関係式のために独立ではない。2つの直線の傾きの差をとると1になり、切片は等しくy軸上で交わる。横軸の $\log K$ は状態UとNの自由エネルギー差 ΔG_{N-U} に比例 ($\log K \propto -\Delta G_{N-U}$) し、縦軸の $\log k$ (あるいは $\log k'$) は遷移状態の活性化エネルギー $\Delta G_{\ddagger-U}$ (あるいは $\Delta G_{\ddagger-N}$) に比例 ($\log k \propto -\Delta G_{\ddagger-U}$, あるいは $\log k' \propto -\Delta G_{\ddagger-N}$) する。ただし、活性化エネルギーを速度定数の対数と厳密に比例関係とするには、直線を $RT \ln A$ 分だけ縦軸の下方向にずらす必要がある。まとめると、 $\log k$ vs $\log K$ プロットと $\Delta G_{\ddagger-U}$ vs ΔG_{N-U} プロットは本質的に同一である。同様に $\log k'$ vs $\log K$ プロットと $\Delta G_{\ddagger-N}$ vs ΔG_{N-U} プロットは同一である。そこで、平衡定数と交換速度定数のlog-logプロットをREFER (rate-equilibrium free energy relationship) プロットとよぶ。

REFERプロットをつくると自然界の多くの現象で経験的に直線関係が得られ、これを自由エネルギー直線関係 (linear free energy relationship)、略してLFERという。事実、インターネットで検索すると多様なLFERを見つけることができる。しかし、従来型のLFERはデータ点が同一の条件で測定された複数の異なる分子種 (例、蛋白質分子の一つのアミノ酸残基を多種類のアミノ酸に置換) に由来するか、あるいは単一の分子種について複数の異なる条件 (例; 溶媒が水やアルコール) で測定されるものであった。しかし、我々が発見したLFERはデータ点が単一のポリペプチド鎖の異なる残基に由来し、かつ単一の条件下で測定されたものであり、新しいタイプのLFERであったので、残基レベルのLFER (residue-based LFER, rbLFER) と呼ぶことを提案した^[9]。付記すると、過去に一例だけREFERプロットを行い、residue-based LFERを図にしている論文がある^[17]。しかし、筆者らは本文中で偶然の産物であると述べている。

residue-based LFER の一般化

rbLFERが蛋白質分子の構造形成変化に広く成立しているか否かを調べるために、過去の論文をサーチして残基ごとの平衡定数と速度定数を報告している論文を集めた^[18]。その結果、16個の蛋白質 (変異体は異なるものとして数える) につ

いて18個の $\log k$ vs $\log K$ プロットを作ることができた。対象となった現象は、2つの状態の間の遅い交換、IDP (天然変性ポリペプチド) のターゲット蛋白質への結合、フォールド状態の構造ゆらぎなど多岐にわたり、使われた手法もNMR EXSY、NMR緩和時間解析、重水素交換 (検出にはNMRや質量分析法を使用) など複数あった。文献情報からは測定バイアスや測定誤差がどの程度残っているかを推定することは困難であるが、半数 (10プロット) に直線関係が認められたことから、rbLFERは蛋白質分子が関与する多くの現象に広く成立していると結論した。

折れたたみ可能なポリペプチド鎖がもつべき物理化学的性質

3つの独立変数 K, k, k' に対して、 $K=k/k'$ の3項関係とrbLFER関係の2つの制約があるので、系には自由度が1つしか残っていない。すなわち、遷移状態Tの構造や状態は2つの基底状態UやNとは独立ではなく、2つの基底状態と密接な関係を持っている。では、その背後にある物理化学的な原理は何だろうか?

1983年、当時、九州大学理学部助教授であった郷信宏は整合性原理 (the consistency principle of protein folding) を提唱した^[19]。整合性原理は「フォールド状態Nに存在する接触相互作用だけが折れたたみ過程に寄与する」ことを要請する (図5)。言い換えると、状態Nに存在しない (すなわち non-native な) 相互作用はフォールディング過程には寄与しない (あるいは寄与の程度が相対的に無視できる)。整合性原理にはいくつかの表現方法があるが、ここでは格子モデル (lattice model) を使って説明する^[20]。格子モデルではポリペプチド鎖のアミノ酸残基を小球で表す (図5B)。小球は二次元あるいは三次元の格子点に配置され、隣り合う小球はペプチド結合 (一定の長さの黒棒) で繋がれている。2つの小球が隣り合うと、非共有結合性の接触相互作用 (non-bonded contact interactions) に起因する引力が働き、系のポテンシャルエネルギー $V=\sum \epsilon_{ij}$ に寄与する。ここで i と j は接触している2つの残基の番号である。整合性原理では、(1) すべての折れたたみ経路上において状態UとN以外の状態は存在しない、(2) 接触が状態Nに存在するときに限って引力が働く: $\epsilon_{ij}=-\epsilon$ 、(3) その接触が状態Nには存在しない場合は、たとえ接触が起こっても引力

は働かない： $\epsilon_{ij}=0$ (図5A)。折れたたみ途上の状態、例えば遷移状態を考えたとき、残基6と9および残基4と7の間の接触(シアン)は状態Nにも存在するので引力が働くが、残基2と5の間の接触(オレンジ)は状態Nに存在しないので引力は働かない(図5B)。ここで ϕ 値を計算してみる。Fershtの ϕ 値解析では ϕ は0か1のいずれかとしているが、その理由は変異残基の周囲の複数のアミノ酸残基が共同して挙動することが仮定されているためである。しかし、rbLFERでは残基間の共同性が低下していることを考慮する。注目している残基の周囲の残基が状態UとNのどちらも取り得ることを考慮すると、アンサンブルを考えなくても1分子だけで ϕ 値が分数値をとる(図5B)。

整合性原理ではネイティブな接触(native contact)のときだけ引力が働くことを仮定する。すなわち、状態Nに存在するものと存在しないものをあらかじめ区別しておいて、接触相互作用を有効あるいは無効とすることを要求する。これは普通に考えると到底受け入れられない非合理とも思える仮定である。しかし、実在気体をモデル化するために理想気体を想定することに似ていると考えると納得できる。整合性原理は理想蛋白質分子が持つべき性質であり、実在蛋白質分子の性質は理想蛋白質からのずれ(逸脱)として記述する。整合性原理が求める状態Nへの絶対的な指向(native-centric)を考えると、いかなる状態Uから出発しても、(あらかじめ正解がわかっている

のだから)最終状態Nに向かってスムーズに折れたたみが進行することは自明なことである。言い換えると、エネルギー地形の表面は完全に滑らか($\partial E=0$)となる。この一見、出来過ぎと思われる性質はアミノ酸配列として自然淘汰により獲得されたものであると説明される。しかし、進化の所産だからと説明されてもいささかはぐらかされている感は否めない。実は溶媒を含む全原子計算を使った計算シミュレーションを使って整合性原理の有効性が示されている^[21, 22]。その他、多くの計算シミュレーションが整合性原理を支持している。しかし、実験データを使った裏付けや検証がなされた例は我々の知る限り存在しない。何か良い方法はないだろうか？

整合性原理から rbLFER を導くための準備

整合性原理からrbLFERを論理的に導くことができる^[23]。論理展開を説明する前に、無用な誤解を避けるために2つの特別な記法を導入する。第1の記法は、 $\leftarrow i$ である。 ϕ_i と書くと残基*i*の ϕ 値であることを意味する。 ϕ 値は各残基の局所的な物理量なので問題はない。これに対し、 $(\Delta G_{\ddagger \rightarrow U})_i$ と書くと、残基*i*が関与する局所的な活性化自由エネルギーを表すと誤解される恐れがある。言うまでもないが、自由エネルギーは系全体に対して定義される物理量である。そこで、 $(\Delta G_{\ddagger \rightarrow U})_{\leftarrow i}$ と書いて、 $\Delta G_{\ddagger \rightarrow U}$ は分子全体の活性化エネルギーであり、 $\leftarrow i$ は残基*i*を使って観測した

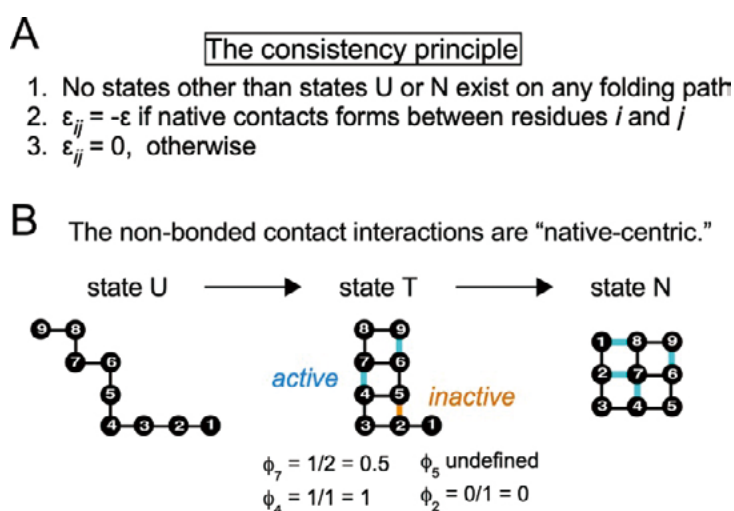


図5 整合性原理は蛋白質分子の迅速なフォールディングを実現する。(A) アミノ酸残基間の接触相互作用ポテンシャルを使って表した整合性原理の3つのルール。(B) 2次元格子モデル。遷移状態Tに存在する接触相互作用には状態Nに存在するネイティブ相互作用(シアン)と存在しない非ネイティブ相互作用(オレンジ)の2種類がある。ネイティブ相互作用はポテンシャルエネルギーの一部として構造形成に働くが、非ネイティブ相互作用は働かない。このルールは“native-centric”(ネイティブ指向)と一言で要約できる。 ϕ 値は注目している残基が関与する遷移状態中のネイティブ相互作用の数を、状態N中のネイティブ相互作用の数で割った値であり、分数値をとることができる。

測定値であることを明示する。第2の記法は、遷移状態の反応座標 Q 上の位置についてである (図1C)。2状態交換では、その定義から遷移状態Tは状態UやNよりも常に大きい自由エネルギー値を持たねばならない。遷移状態Tを状態Uに近づけていく極限 (limit) を考えることができるし、さらに遷移状態Tを状態Uに完全に重ねることができる。この完全に重なった状況はダウンヒル (downhill) と呼ばれる高速折れたたみ反応であり、実例が存在する^[24, 25]。反対に遷移状態Tを状態Nに近づける極限も可能である。このとき遷移状態Tの自由エネルギー値は状態Nの自由エネルギー値ではなく、状態Uと同じである。(少々わかりにくいですが、図1Cを見ると納得できよう)。しかし、遷移状態Tを状態Nと完全に重ねることはできない。なぜなら、遷移状態Tの自由エネルギー値が状態Uよりも小さくなってしまふからである (図1Cの点線内)。そこで、2状態交換の成立を担保するには、遷移状態Tを状態Nに限りなく近づける条件で議論を展開する必要がある。例えば、2つの特別な記法を組み合わせ、以下のような定義式を考えることになる。

$$\rho_{i \in N \text{ in TSE}, j \in N \text{ in TSE}} = \rho^{NN} = \lim_{Q_i \rightarrow 1, Q_j \rightarrow 1} \frac{(\Delta G_{\ddagger-U})_{-i} - (\Delta G_{\ddagger-U})_{-j}}{(\Delta G_{N-U})_{-i} - (\Delta G_{N-U})_{-j}} \quad (9)$$

整合性原理から rbLFR を導く：

基本方程式の導出^[23]

$\log k$ vs $\log K$ (あるいはREFER) プロットにおいて2つのアミノ酸残基 i と j に対応する2つのデータ点を結ぶ線分の傾きを ρ_{ij} とする。 ρ_{ij} を表すために4つの定数、 ρ^{NN} , ρ^{NU} , ρ^{UN} , ρ^{UU} を導入する。 ρ^{NN} は2つの残基が遷移状態において両方共に状態Nであるときの線分の傾き、 ρ^{NU} と ρ^{UN} は片方が状態Nでもう一方が状態Uのときの線分の傾き、 ρ^{UU} は2つの残基が両方共に状態Uであるときの線分の傾きである。 ρ_{ij} は4つの定数にそれぞれの存在割合をかけた荷重平均で計算できる。

$$\rho_{ij} = \rho^{NN} \phi_i \phi_j + \rho^{NU} \phi_i (1 - \phi_j) + \rho^{UN} (1 - \phi_i) \phi_j + \rho^{UU} (1 - \phi_i) (1 - \phi_j) \quad (10)$$

ϕ_i は残基 i が遷移状態における状態Nの割合であるから、2つの状態しかとれないことに留意すれば、 $1 - \phi_i$ は状態Uをとる割合である。2つの残基を考えると、 $\phi_i \phi_j$ は2つの残基が遷移状態で共に状態Nである割合となる。

ρ^{UU} の値は容易に求めることができる。遷移状態Tは状態Uに一致できるからである。記号 " Q_i

$\rightarrow = 0$ " は、残基 i の遷移状態Tを状態Uに近づけていき、最後には状態Uに一致させることを表す。

$$\rho_{i \in U \text{ in TSE}, j \in U \text{ in TSE}} = \rho^{UU} = \lim_{Q_i \rightarrow 0, Q_j \rightarrow 0} \frac{\Delta \Delta G_{\ddagger-U}}{\Delta \Delta G_{N-U}} = \frac{\Delta \Delta G_{U-U}}{\Delta \Delta G_{N-U}} = 0 \quad (11)$$

これに対し、 ρ^{NN} , ρ^{NU} , ρ^{UN} の値を求めるには、すでに述べたように遷移状態Tを状態Nに近づける極限で値を評価する。とはいえ、たとえば ρ^{NN} の場合、式9に含まれる各項が極限操作中に相互に関係性を持って変化するために、 ρ^{UU} の場合のように単純な算術計算で値を決めることはできない。

そこで、行きと帰りの反応は視点を変えて入れ替えても等価であることを適用する。 $\log k$ vs $\log K$ プロットの傾き ρ_{ij} を表す式10を展開すると

$$\begin{aligned} \rho_{ij} \text{ in } \log k \text{ vs. } \log K &= \rho^{NN} \phi_i \phi_j + \rho^{NU} \phi_i (1 - \phi_j) + \rho^{UN} (1 - \phi_i) \phi_j + \rho^{UU} (1 - \phi_i) (1 - \phi_j) \\ &= (\rho^{NN} - \rho^{NU} - \rho^{UN} + \rho^{UU}) \phi_i \phi_j + (\rho^{NU} - \rho^{UU}) \phi_i + (\rho^{UN} - \rho^{UU}) \phi_j + \rho^{UU} \end{aligned} \quad (12)$$

上記の式において、 ϕ を $1 - \phi$ に置き換えて反応座標 Q を反転させ、式を整理すると $\log k'$ vs $\log K'$ プロットの傾き ρ_{ij} の式が得られる。

$$\begin{aligned} \rho_{ij} \text{ in } \log k' \text{ vs. } \log K' &= \rho^{UU} \phi_i \phi_j + \rho^{NU} (1 - \phi_i) \phi_j + \rho^{UN} \phi_i (1 - \phi_j) + \rho^{NN} (1 - \phi_i) (1 - \phi_j) \\ &= (\rho^{UU} - \rho^{UN} - \rho^{NU} + \rho^{NN}) \phi_i \phi_j + (\rho^{UN} - \rho^{NN}) \phi_i + (\rho^{NU} - \rho^{NN}) \phi_j + \rho^{NN} \end{aligned} \quad (13)$$

次に $K = k/k'$ の三項関係から $\log k - \log k' = \log K$ なので、この等式を $\log K$ で両辺を微分すると、

$$\begin{aligned} (\text{左辺}) &= \frac{d \log k}{d \log K} - \frac{d \log k'}{d \log K} = \frac{d \log k}{d \log K} + \frac{d \log k'}{d \log K'} \text{ と} \\ (\text{右辺}) &= \frac{d \log K}{d \log K} = 1 \text{ であることから、} \end{aligned}$$

$\rho_{ij} \text{ in } \log k \text{ vs. } \log K + \rho_{ij} \text{ in } \log k' \text{ vs. } \log K' = 1$ が得られる。この等式に式12と13を代入すると、次式が得られる。

$$\begin{aligned} 2(\rho^{NN} - \rho^{NU} - \rho^{UN} + \rho^{UU}) \phi_i \phi_j + (\rho^{NU} + \rho^{UN} - \rho^{NN} - \rho^{UU}) \phi_i \\ + (\rho^{UN} + \rho^{NU} - \rho^{NN} - \rho^{UU}) \phi_j + \rho^{NN} + \rho^{UU} = 1 \end{aligned} \quad (14)$$

この等式は任意の ϕ_i と ϕ_j の値について成立する必要があるため、以下の連立方程式が導かれる。

$$\begin{cases} \rho^{NN} - \rho^{NU} - \rho^{UN} + \rho^{UU} = 0 \\ \rho^{NN} + \rho^{UU} = 1 \end{cases}$$

$\rho^{UU} = 0$ であるから、 $\rho^{NN} = 1$ および $\rho^{NU} + \rho^{UN} = 1$ となる。 ρ^{NU} と ρ^{UN} の個別の値は決定できない。しかし、2つの値が等しくないと考える積極的な理由はないので、両者が等しいと仮定すると、 $\rho^{NU} = \rho^{UN} = 0.5$ となる。これを式10に代入すると次の基本方程式が得られる。

$$\rho_{ij} = \frac{1}{2} (\phi_i + \phi_j) \quad (15)$$

すなわち、2つのデータ点を結ぶ線分の傾きは2点に対応する残基の ϕ 値の平均である。

整合性原理から rbLFER を導く：**基本方程式を満たす一般解を求める^[23]**

基本方程式を満たすデータ点の集まりがつかう図形はどのようなものか？ 明らかな解は直線である。この時、すべての残基の ϕ 値は等しく、直線の傾きに一致する。それでは、アミノ酸残基間で ϕ 値が異なるような一般解は存在するのだろうか？ 解の図形を求めるにあたり、 $\log k$ を y 、 $\log K$ を x とし、解の方程式を $y = f(x)$ で表すことにする。 $y = f(x)$ 曲線のどの2点を取っても基本方程式が成立しているので、2点を近づけて行った極限 $j \rightarrow i$ を考えると、基本方程式から

$$\lim_{\substack{x_j \\ \rightarrow x_i}} \rho_{ij} = f'(x_i) = \lim_{\substack{x_j \\ \rightarrow x_i}} \frac{1}{2}(\phi_i + \phi_j) = \phi_i \quad (16)$$

となる。ここで、 $C = f(0)$ 、 $B = f'(0)$ とし、 $u(x) = \{f(x) - C\}/x$ を導入すると、次の微分方程式が得られる。

$$\frac{du}{dx} = \frac{u-B}{x} \quad (17)$$

この微分方程式の解は、もうひとつの定数 A を導入して

$$\log k = A (\log K)^2 + B \log K + C \quad (18)$$

である。これは一般解が放物線であることを示している。そこでQFER (quadratic free energy relationship) と呼ぶことにする。ここで式16から、 ϕ 値は接線の傾きである。

$$\phi = 2A \log K + B \quad (19)$$

いうまでもないが、係数 A が0の場合、QFERはLFERとなり、 ϕ 値は定数 B となる。

rbLFER から整合性原理を導くことはできるか？

逆に、rbLFER/QFERの関係が成立しているという実験的証拠から、整合性原理を直接導くことは可能だろうか？ 答えはNoと考える。その理由はrbLFER/QFER関係を満たすデータ点の並びが偶然に観測される可能性があるためである。しかし、実験回数を増やす、あるいは対象となる蛋白質の種類を増やして、rbLFER/QFERの観測例を増やしていけば、rbLFER/QFER関係が偶然に多くの例で観測される確率は非常に低くなる。つまり、帰無仮説として「整合性原理が成立していない」を立て、この帰無仮説を実験的に棄却してrbLFER/QFERから整合性原理を推計統計学的に検証することは可能である。

アミノ酸変異体作成不要の ϕ 値解析

再びnukacinを実例として示す(図6)。rbLFERとして解析するとすべての残基で同じ ϕ 値が得られる(図6B左)。これは遷移状態アンサンブルとして状態UとNからなる均一な混合状態にあることを意味する。もちろん、個々のフォールディング経路の遷移状態では状態UとNの偏りがあってもよいが、アンサンブル平均をとると均一になる(図6C左)。

rbQFERとして再解析を行うと、データ点近傍の放物線の接線の傾きが ϕ 値となる(式19)ので、残基ごとの ϕ 値を計算できる(図6B右)^[23]。すなわちrbQFER関係を使った解析はアミノ酸変異体の作成を必要としない新しいタイプの ϕ 値解析法として使える。QFERは遷移状態アンサンブルとして状態UとNの分布に単純ではあるが偏りがある状態を表すことができる。個々のフォールディング経路上の遷移状態では状態UとNの偏りの分布がもっと複雑なものであってもよいが、アンサンブル平均をとると単純な偏りが残る(図6C右)。整合性原理がこのような ϕ 値に偏りがある遷移状態を許容できることを示した意義は大きいと考える。

測定誤差が十分に小さい場合に限ってrbQFERを使った解析が可能になる。測定誤差を十分に小さくできない場合は、たとえrbQFERが正しい相関関係であるとしてもrbLFERを使った解析をせざるを得ない。このとき、得られる単一の ϕ 値はrbQFER解析で得られるはずの複数の ϕ 値の平均である。

現時点ではnukacinの解析はrbQFERがrbLFERに比べて統計的に有意であるとするまでの十分な精度では測定できていない^[23]。今後の改良点を考えると、2次元NMRスペクトルのピーク体積の正確な見積もりをする課題が残っている。ベースラインの歪み、複数のピークの重なり、 $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ によるピーク分裂の影響などを極力排除する解析方法の開発が必要である。

分子レベルの記述と残基レベルの記述の比較

蛋白質フォールディングあるいはコンホメーション変化の解析では、単一の平衡定数と速度定数を定義して、分子レベルの記述を行う(図7A左)。感度の高さと時間応答の速さから、トリプトファンの蛍光が使われる場合がほとんどである。稀ではあるが、トリプトファンが含まれない場合にチロシンの蛍光を使った例がある^[26]。本来、トリプトファンの蛍光は側鎖周囲の局所的な

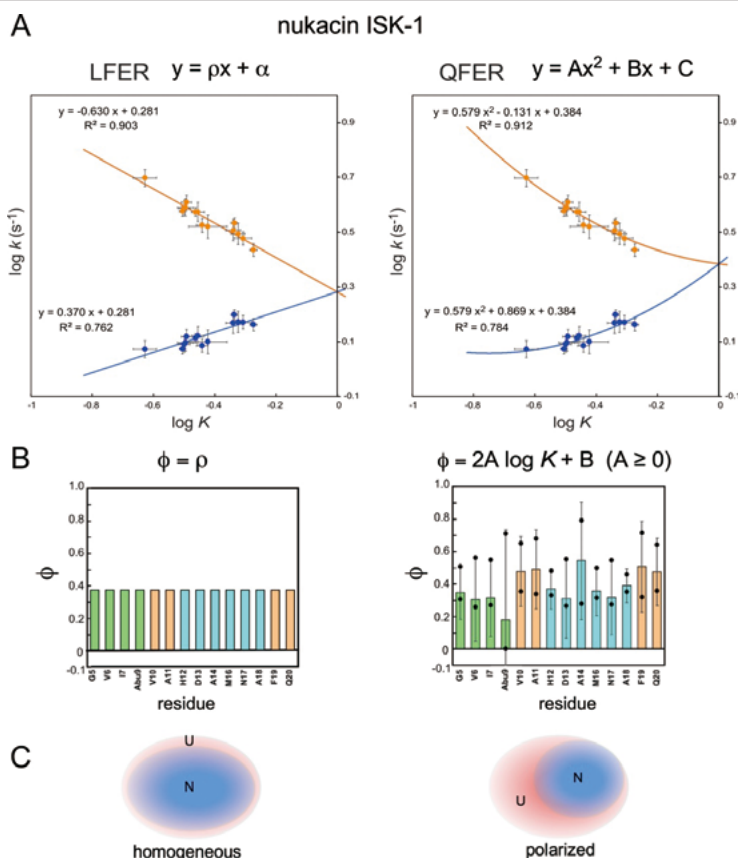


図6 Nukacinの $\log k$ vs $\log K$ プロットをLFERとQFERを使って解析した。(A) 同一データを直線(左)と放物線(右)で回帰分析した。(B) LFERでは ϕ 値はすべて等しくなる(左)が、QFERでは異なる(右)。QFER解析ではjackknife (leave-one-out) 法をつかって ϕ 値と標準誤差(SE)を求めた。黒丸はpartial estimateの最大値と最小値を示す。バーの色は図8Aに合わせているが、ここでは意味がない。(C) 遷移状態アンサンブルにおける状態UとNの分布を表した模式図。

ミクロ環境を反映するローカルプローブであるが、複数のトリプトファンが存在する、チロシンからトリプトファンへのFRETが起こる条件で蛍光を観測する場合などを想定すると、正確な平均情報とは言えないものの分子レベルの記述となる。ペプチド結合に由来する円2色性スペクトルを使う場合はほぼ正確な分子レベルの記述と言えるが、円2色性シグナルの低い感度や遅い時間応答速度が問題になる。エネルギーレベル図を作ると図7Aのようになる。

一方、残基レベルの記述は主鎖のアミド基(NMR)やカルボニル基(IR)からの情報を使う。エネルギーレベル図は観測に使うプローブごとに少しずつ異なるように見えるので、 $\leftarrow i$ の記法を導入する(図7A右)。図では見やすいように状態Uの自由エネルギー値はプローブの位置が変わっても不変として描いている。遷移状態Tとフォールド状態Nの自由エネルギー値はそれぞれ観測に使うプローブの位置によって変化する。遷移状態Tとフォールド状態Nのそれぞれで2つの残基の自由エネルギー値の差を求めて、さらに比を計算すると2つの

残基の ϕ 値の平均に等しくなる(式5)。REFERプロットをつくると、整合性原理に従う理想蛋白質ではrbLFER/QFERとなる(図7B、赤丸)。すでに述べたように、単一のポリペプチド鎖に含まれる複数の残基がデータ点であり、単一の条件下で測定される。整合性原理と同等の意味をもつとされる蛋白質の構造構築原理として1987年にJoseph D. BryngelsonとPeter G. Wolynesが提案したミニマルフラストレーション原理(the principle of minimal frustration)がある^[27]。物性物理学分野のスピンガラスの理論を敷衍したものである。複数の残基(あるいは原子)の間に引力あるいは反発する力が働くと、同時にすべてを満たすことはできない事態、すなわちフラストレーションが生じる^[28]。そのため、漏斗状エネルギー地形の表面に多少の凹凸($\delta E < 3 k_B T$)が生じる(図7B、青丸)。凹凸のために折れたため速度は低下し、相関の程度も低下する。ミニマルなフラストレーションが実現できる理由は、構造形成と機能発現を同時に満たすようにアミノ酸配列の自然選択が行われた結果である^[29, 30]とされ、自然選択を考える点は整合性原理と同じである。最

後に、折れたたみができないポリペプチド鎖を考えると、折れたたみ速度はとても小さくなり、相関関係は認められなくなる(図7B、灰色丸)。

共同性と協調性

蛋白質分子がもつ共同性 (cooperativity) という概念を考える(図7C)。残基レベルでは複数のアミノ酸残基がほぼ等しい平衡定数や速度定数を持つことを指す。すべて同一な値の場合は完全な共同性 (full cooperativity) であるが、精確な測定を行うと現実には存在しないと考える。ほどほどの共同性 (moderate cooperativity or reduced cooperativity) が現実的である。共同性を正確に表現する適切な数学的定義は今のところ定かではないが、 ΔG_{N-U} や $\Delta G_{\pm U}$ の分布の幅の逆数に関連する。

蛋白質分子がもつ協調性 (consistency) は、整合性原理に基づく新しい概念である(図7C)。協調性は複数の残基がREFERプロットで示す相関の強さ (strength of correlation) である。相関係数

R^2 が1に近いほど、蛋白質分子がスムーズに構造変化を起こすことを表す。ただし、相関係数 R^2 は不完全な指標であることに留意すべきである。例えば、すべての残基で ϕ 値がほぼ0の場合は $R^2 \approx 0$ となるが、データ点が整然と一列に並んでいるという状況は高い協調性があることを示している。今のところ、協調性を正確に表現するための良い数学的定義も定かではない。共同性と協調性をそれぞれ定量的に表す数学的定義の考案が解決すべき課題として残されている。

理想蛋白質と実在蛋白質の比較

整合性原理に従う理想蛋白質では残基間に接触にともなう引力 (ファンデアワール相互作用に基づくが、状態Nに存在するものに限る) が働くことと仮定した。しかし、実在蛋白質には疎水相互作用の原因となるフォールディングに伴う脱水和や静電相互作用が働く。これらの個別の影響はデータ点の大きな移動を引き起こし、rbLFFER/QFFERのような相関関係を得ることは難しい可能性もある。

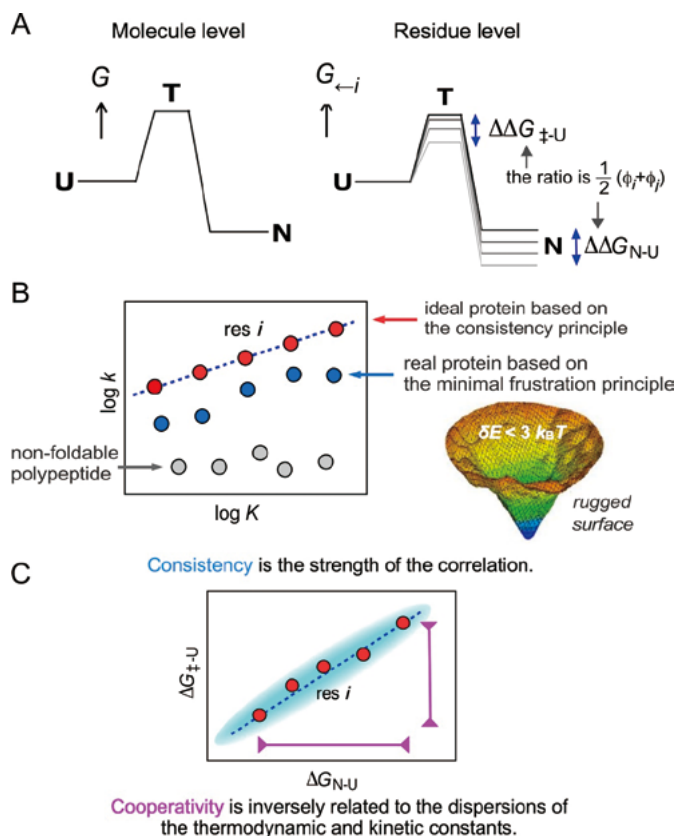


図7 残基レベルの遷移状態解析。(A) 分子レベルと残基レベルのギブズ自由エネルギーレベル図の比較。残基レベルではプローブの位置周辺のマイクロ環境を反映して、観測されるエネルギー値が少しずつ異なる。(B) 理想蛋白質、実在蛋白質、フォールドしないポリペプチド鎖の $\log k$ vs $\log K$ プロットの比較。実在蛋白質のエネルギー地形の表面には多少の凹凸があるが、熱運動で超えられる程度に抑えられている。ミニマルフラストレーションモデルで説明される。(C) 蛋白質分子が持つ共同性 (cooperativity) と協調性 (consistency) の定義。協調性は本研究で提案された蛋白質の構造変化に関係する新しい物理量である。

る。しかし、文献調査に基づくREFERプロットの作成では多くの場合に直線的な相関関係が見られたので^[18]、実在蛋白質の理想状態からの逸脱は相関関係が認められなくなるほどの大きな影響ではないと結論できる(図7B)。

REFERプロットには蛋白質に含まれる残基のすべてが含まれないことに留意する必要がある。例えば、テイルの先端付近や長いループの中間部分では、 $U \rightleftharpoons N$ の状態変化があっても周囲のミクロ環境が大きく変わらないために K や k の決定ができず、故にアミノ酸残基はREFERプロットには現れない。したがって、テイルやループ部分の柔軟性に起因するchain entropyの効果などを、REFERプロットを使って議論することには限界がある。実験的には、NMRシグナルの化学シフトの偶然の重なり、交換速度が測定レンジから外れるなどの原因で一部のアミノ酸残基がREFERプロットには現れなくなる。

NukacinのREFERプロット中のデータ点の分布をよく見ると3つのクラスターが存在する(図8A)。Nukacinの2つの状態AとBのNMR溶液構造をそれぞれ決定したときに、状態Aに比べて構造形成の度合いが進んでいる状態Bの立体構造を参照して、アミノ酸配列をN-テイル(K1-Abu9)、ヒンジ(H12-A18)、コア(V10, A11, F19-S27)の3つに分類していた^[8]。これをその後にしたREFERプロットに重ねてみると、立体構造に基づくアミノ酸配列の3つの領域とREFERプロット中の3つのクラスターがきれいに対応していた^[10]。この結果は重要である。一つは立体構造とエネルギーの間に整合性が見つけられたことは、測定バイアスや測定誤差が十分小さくなったことを意味する。二つ目は、空間的に近くにあるアミノ酸残基がよく似た平衡定数や速度定数を持つ傾向があることは筋の通ったことである。このクラスターをここではfoldonと呼ぶことにする(図8B)。オリジナルのfoldonの定義は、折れたたみにしたがって順次形成されていく構造単位(15から20残基程度)を指している^[31, 32]。しかし、REFERプロット中のクラスターであるfoldonには時間的な概念はなく、遷移状態において構造形成の度合いが似ている残基集団を指している。

蛋白質分子のスムーズな構造変化を 残基レベルで記述する

蛋白質分子の構造変化の伝統的な記述は分子レ

ベルである。すなわち、2状態交換反応を単一の平衡定数 K 、速度定数 k, k' で記述する。完全な共同性(full cooperativity)を仮定していると言い換えることができる。完全な共同性を持つ場合は ϕ の値も共通となる。これに対し、rbLFER/QFERを使った残基レベルの記述では、空間的に近くにある複数の残基が構造単位foldonをつくっており、同一foldon内の平衡定数 K 、速度定数 k, k' 、 ϕ 値は似た値を持つ(図8B)。ここで似た値とは2つの解釈が可能である。同一の値の定数を共有しているのだが、測定誤差のためにデータ点がばらついている場合と、似ているものの差異があると考えられる場合である。どちらが正しいかは今後の精度の高い解析が必要となる。ここで真に新しい見方は、複数のfoldonが協調している(consistently)ことにある(図8B)。2つのfoldonの間にコミュニケーションがあり、その結果、同じLFER直線・QFER曲線に乗る(図8C中央)。異なるLFER直線・QFER曲線となる場合は2つのfoldonは独立であることを意味し、2つのドメインがフレキシブルなリンカーで繋がっている場合に相当する(図8C下)。

Nukacinの場合、Abu9とAla14の2残基が本来所属すべきクラスターから離れている(図8A、マゼンタ)。これを例外残基(exceptional residue)と呼ぶことにする(図8D、星印)。ただし、どちらの残基も同じ直線に乗っているため、整合性原理に従っていて協調的である。Abu9とAla14の側鎖はモノS結合を形成し、わずか6個のアミノ酸残基からなる小さなリングAを作っている(図2A)。遷移状態ではHis12とAsp13の側鎖がリングBを通過しなくてはならない(図2Cと図8D)。Abu9とAla14はこのくぐり抜けを可能にするために、遷移状態において特別なコンホメーションを取ると考えることが妥当だろう^[10]。

外れ残基(outlier residue)はデータ点が直線・曲線から大きく外れている場合である(図8E、星印)。アポミオグロビンの巻き戻し中間体の水素-重水素交換実験(HX実験)の結果^[33]の再解析で検出された^[18]。外れ残基は他の残基と協調的でない(整合性原理が成立していない)ことから、構造変化の最中に第3の状態(non-native状態)があることを示唆する。第3の状態は遷移状態だけでなく、初期構造にあってもよい。アポミオグロビンHX交換実験における初期構造は折れたたみ経路上の中間体 I_b であり、このことはアポ

ミオグロビンの折れたたみ経路上に第3の状態が存在することを意味する。中間体 I_b 構造は最終的なフォールド状態Nと似ていることがわかってるので、ミオグロビンの結晶構造に7個の外れ残基をマップするとヘリックスHに集中していた(図8E、マゼンタ色)。この結果どおりに、アポミオグロビンの中間体 I_b において、ヘリックスHが軸方向に1ターン分シフトしていることが過去の別の実験で明らかにされていたことは驚きであった^[34]。我々はREFERプロットを使ってnon-

native状態の存在を再発見したことになる。このようにrbLFER/QFERを想定した上で例外残基と外れ残基を発見すると、遷移状態に関する貴重な情報が得られる。例外残基と外れ残基は蛋白質分子の物理化学的性質や生物活性をアミノ酸変異で改変しようとする場合の良いターゲットとなる。

AlphaFold および人工蛋白質設計との関連

AlphaFoldはPDBに登録されている10万個の蛋白質の座標を使って深層学習を行い、任意のア

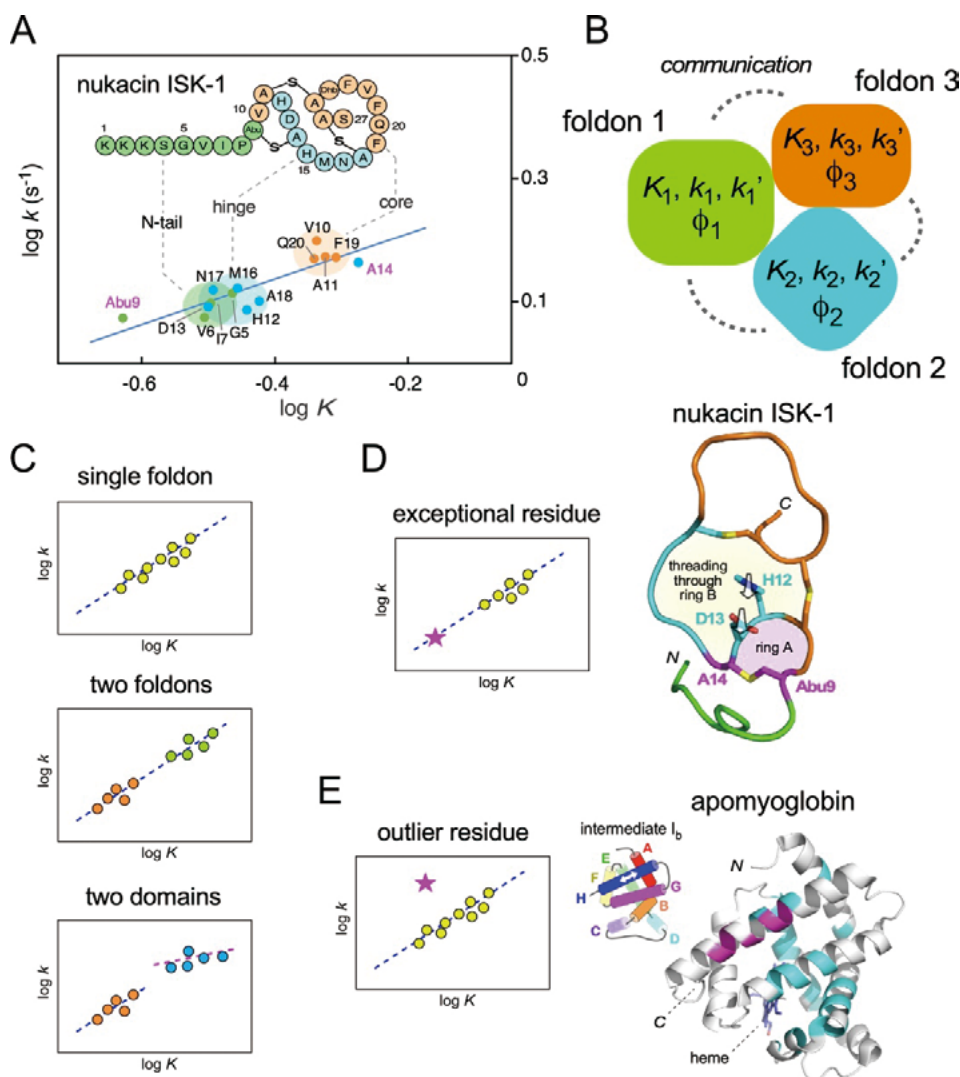


図8 rbLFER/QFER関係から得られる遷移状態に関する情報。(A) nukacinの $\log k$ vs $\log K$ プロットのデータ点は3つのクラスター(色をつけた楕円)をつくり、nukacinの立体構造から同定されたアミノ酸配列のセグメント(3色)と対応する。これは自由エネルギーから観た遷移状態と構造から観た遷移状態の間に対応関係があることを意味する。2つの例外残基Abu9とA14(マゼンタ)は本来所属すべきクラスターから離れて存在するが、同じ直線に乗っている。(B) クラスターをfoldonと呼ぶことにする。foldonの間には協調性(consistency)を実現するためのコミュニケーションが存在する。(C) 2つのfoldonと2つのドメインの相違。(D) nukacinのAbu9とA14はモノS結合を形成し、6残基のリングAをつくる。H12とD13の側鎖が遷移状態においてリングBを通過するとき、Abu9とA14は通過を助けるために特殊な状況にあると想像される。(E) 外れ残基(outlier residue)の例。アポミオグロビンの折れたたみ中間体 I_b の水素-重水素交換実験結果^[33]から $\log k$ vs $\log K$ プロットを作成すると、7残基が直線関係から有意に外れていた^[18]。ミオグロビンの天然状態の構造を中間体 I_b 構造の代わりとして、この7残基をマップするとヘリックスHに集中した(マゼンタ)。中間体 I_b においてヘリックスHはヘリックスGとの相対配置が1ターン分ずれてnon-native構造をとること(挿入図)が他の実験から明らかになっていることに合致する^[34]。シアン色は直線に乗っている残基を、白色は情報が残基を表す。

ミノ酸配列を入力として立体構造の高精度予測を可能とした^[35]。AlphaFoldでは自然選択の結果生まれた折れたたみ可能なポリペプチド鎖の性質はニューロン素子間の重みづけ係数としてコードされていて、物理化学的な法則として抽出されていない。一方、逆問題である人工蛋白質の設計はAIツールを使うことで飛躍的に発展している^[36]。天然にはないトポロジーをもつ人工蛋白質を実現できることは、折れたたみ可能なポリペプチド鎖が持ちうるコンホメーション空間は生物進化が試した空間の大きさより、はるかに大きいことを示している。構造形成に特化した設計のために、非常に高い熱安定性(100℃を超える)を持つことが多いようである^[37, 38]。このことは生物が利用している蛋白質は構造に不安定化要因をわざと導入して柔軟性を持たせて、機能(酵素触媒活性、アロステリック効果、分解の容易性など)を付与していることが推察される。まとめると、AI時代になって蛋白質の立体構造の予測と設計が実用レベルで可能になった。しかし、生物ゲノムにコードされているアミノ酸配列は構造(堅牢性)と機能(柔軟性)を両立している点(ミニマルフラストレーション)を考慮すると、予測と設計にはまだ改良の余地が残されている。

蛋白質の予測と設計の実用レベルの成功を鑑みると、予測と設計には最終的な立体構造の知見だけで十分である^[37]。整合性原理の下では天然球状状態の接触相互作用だけが折れたたみの過程で有効に働くので、天然球状状態に存在する接触相互作用を考慮して予測と設計をすれば十分足りるという状況は、整合性原理を期せずして証明していると考えてもよいだろう。

今後の課題

今まで検証されたrbLFER相関(nukacin実験^[7-9]と文献調査^[18])は平衡定数として $K = 10^0 - 10^3$ の範囲にあって、平衡がそれほど偏っていない蛋白質の構造変化に限られている。これに対し、整合性原理は蛋白質の折れたたみのような高度に偏った平衡反応(事実上不可逆)で高速な構造変化を説明するために提案された^[19]。その後、整合性原理は蛋白質のコンホメーション変化のような平衡の偏りが小さい構造変化にも適用範囲が拡張されたので^[39]、整合性原理とrbLFER/QFERの関係について議論することには問題がない。しかし、蛋白質の折れたたみ反応のような大きな構

造変化を対象にしてrbLFER/QFERを実証することは、依然として残された課題である。

この課題解決のために必要なことは、平衡定数や速度定数を残基レベルの分解能で精度良く(目安として相対誤差が10%以内)決定できる測定・解析法の開発である。今のところ有望な方法として、特定の位置に安定同位体標識(主鎖カルボニル基 $^{13}\text{C} = ^{18}\text{O}$)した蛋白質を用いて、レーザーによる温度ジャンプ(T jump)を行って2状態平衡を一時的にずらし、新たな温度での平衡状態への復帰を赤外分光(IR)測定で測定する方法がある^[25, 40]。温度ジャンプ(+15℃)を行って、villinヘッドピースドメインHP36の平衡をN→Uにシフトさせた例では、36残基の小さい蛋白質分子であっても、 $k_{\text{ex}} (= k + k')$ の値に残基間で2倍の差があることが示されており、 $k_{\text{ex}} \sim 10^5 \text{ s}^{-1}$ という速い状態変化においても共同性の低下が観測されている。残念ながら、IRスペクトルのベースラインの問題があり、残基レベルの平衡定数を高い精度で決定するだけのデータ品質ではないようである。ほかに、蛋白質分子に位置特異的に蛍光のドナーとアクセプターを導入し、分子内のFRET現象をバルクあるいは一分子で観測して構造変化を追跡することができる^[41]。ただし、FRETでは2点間の距離を測るので、ローカルプローブを使った計測とは言えないことに注意を払う必要がある。

結語

整合性原理(図5)は蛋白質分子がスムーズに折れたたみを起こすための物理化学的基盤である。格子モデルなどを使った計算シミュレーションを用いて、整合性原理の有効性が示されてきたが、実験による検証例はなかった。私たちは整合性原理をポリペプチド鎖の残基レベルの平衡定数と速度定数の両対数プロット(REFERプロット)における相関関係によって実験的に定式化できることを提案した(図6と図7)。REFERプロットに見られる相関関係は、遷移状態アンサンブルが初期状態と最終状態の均一な混合状態なら直線に、不均一な混合状態なら二次曲線(放物線)となる。直線相関をLFER(Linear Free Energy Relationship)、二次曲線相関をQFER(Quadratic Free Energy Relationship)と呼ぶ。残基レベルのLFER/QFER関係を使えば、整合性原理を実験的に検証(ただし推計統計学的な意味で)すること

ができる。応用を考えると、変異体を使わない遷移状態の新しいタイプの ϕ 値解析や、遷移状態で特別な働きをするアミノ酸残基（例外残基と外れ残基）や第3の状態（non-native構造・相互作用）の特定に利用することができる。蛋白質分子の残基レベルのLFER/QFER関係の発見は、残基レベルの平衡定数と速度定数の精確な決定を可能にする次世代の測定技術の開発を促し、蛋白質分子のスムーズな構造変化のメカニズムの理解に資することが期待される。

謝 辞

本研究は大学院生であった藤浪大輔（現・静岡県立大学助教）と林成一郎（現・分子科学研究所博士研究員）との共同研究である。およそ6年の時間をかけて実験と解析を繰り返し行い、3人で議論を重ねて得た成果であり、ここに感謝の意を表します。本研究は科学研究費（21H02448、23K21298）と三菱財団自然科学研究助成（202110017）を受けて行われました。

引用文献

- [1] Fersht, A. R., Matouschek, A., & Serrano, L. The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding. *J. Mol. Biol.* **224**, 771-782 (1992).
- [2] Fersht, A. R. From covalent transition states in chemistry to noncovalent in biology: from β - to Φ - value analysis of protein folding. *Q. Rev. Biophys.* **57**, e4, (2024).
- [3] Bhatia, S., & Udgaonkar, J. B. Heterogeneity in Protein Folding and Unfolding Reactions. *Chem. Rev.* **122**, 8911-8935 (2022).
- [4] Wolynes, P. G., Onuchic, J. N., & Thirumalai, D. Navigating the Folding Routes. *Science* **267**, 1619-1620 (1995).
- [5] Frauenfelder, H., Sligar, S. G., & Wolynes, P. G. The Energy Landscapes and Motions of Proteins. *Science* **254**, 1598-1603 (1991).
- [6] Fersht, A. R., & Sato, S. Φ -Value Analysis and the Nature of Protein-Folding Transition States. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7976-7981 (2004).
- [7] Fujinami, D., -Mahin, A.-A., Elsayed, K. M., Islam, M. R., Nagao, J., Roy, U., et al. The lantibiotic nukacin ISK-1 exists in an equilibrium between active and inactive lipid-II binding states. *Commun. Biol.* **1**, 150 (2018).
- [8] Fujinami, D., Motomura, H., Oshima, H., Mahin, A.-A., Elsayed, K. M., Zendo, T., et al. Mosaic Cooperativity in Slow Polypeptide Topological Isomerization Revealed by Residue-Specific NMR Thermodynamic Analysis. *J. Phys. Chem. Lett.* **11**, 1934-1939 (2020).
- [9] Fujinami, D., Hayashi, S., & Kohda, D. Residue-Specific Kinetic Insights into the Transition State in Slow Polypeptide Topological Isomerization by NMR Exchange Spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **12**, 10551-10557 (2021).
- [10] Hayashi, S., & Kohda, D. The time-zero HSQC method improves the linear free energy relationship of a polypeptide chain through the accurate measurement of residue-specific equilibrium constants. *J. Biomol. NMR* **76**, 87-94 (2022).
- [11] Miloushev, V. Z., Bahna, F., Ciatto, C., Ahlsen, G., Honig, B., Shapiro, L., et al. Dynamic Properties of a Type II Cadherin Adhesive Domain: Implications for the Mechanism of Strand-Swapping of Classical Cadherins. *Structure* **16**, 1195-1205 (2008).
- [12] Palmer, A. G. Chemical exchange in biomacromolecules: Past, present, and future. *J. Magn. Reson.* **241**, 3-17 (2014).
- [13] Hu, K., Westler, W. M., & Markley, J. L. Simultaneous quantification and identification of individual chemicals in metabolite mixtures by two-dimensional extrapolated time-zero ^1H - ^{13}C HSQC (HSQC0). *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 1662-1665 (2011).
- [14] Hu, K., Ellinger, J. J., Chylla, R. A., & Markley, J. L. Measurement of absolute concentrations of individual compounds in metabolite mixtures by gradient-selective time-zero ^1H - ^{13}C HSQC with two concentration references and fast maximum likelihood reconstruction analysis. *Anal. Chem.* **83**, 9352-9360 (2011).
- [15] Farrow, N. A., Zhang, O., Forman-Kay, J. D., & Kay, L. E. Comparison of the Backbone Dynamics of a Folded and an Unfolded SH3 Domain Existing in Equilibrium in Aqueous Buffer. *Biochemistry* **34**, 868-878 (1995).
- [16] Puglisi, R., Brylski, O., Alfano, C., Martin, S. R., Pastore, A., & Temussi, P. A. Quantifying the thermodynamics of protein unfolding using 2D NMR spectroscopy. *Commun. Chem.* **3**, 1-7 (2020).
- [17] Arrington, C. B., & Robertson, A. D. Microsecond Protein Folding Kinetics from Native-State Hydrogen Exchange. *Biochemistry* **36**, 8686-8691 (1997).
- [18] Fujinami, D., Hayashi, S., & Kohda, D. Retrospective study for the universal applicability of the residue-based linear free energy relationship in the two-state exchange of protein molecules. *Sci. Rep.* **12**, 16843 (2022).
- [19] Go, N. Theoretical Studies of Protein Folding. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **12**, 183-210 (1983).
- [20] Taketomi, H., Udea, Y., & Go, N. Studies on protein folding, unfolding and fluctuations by computer simulation. *Int. J. Peptide Protein Res.* **7**, 445-459 (1975).
- [21] Wang, D., Frechette, L. B., & Best, R. B. On the role of native contact cooperativity in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **121**, e2319249121 (2024).
- [22] Best, R. B., Hummer, G., & Eaton, W. A. Native contacts determine protein folding mechanisms in atomistic simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 17874-17879 (2013).
- [23] Kohda, D., Hayashi, S., & Fujinami, D. Residue-based correlation between equilibrium and rate constants is an experimental formulation of the consistency principle for smooth structural changes of proteins. *Biophys. Physicobiol.* **20**, e200046 (2023).
- [24] Dyer, R. B. Ultrafast and downhill protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 38-47 (2007).
- [25] Muñoz, V., & Cerminara, M. When fast is better:

- protein folding fundamentals and mechanisms from ultrafast approaches. *Biochem. J.* **473**, 2545-2559 (2016).
- [26] Žerovnik, E., Virden, R., Jerala, R., Turk, V., & Waltho, J. P. On the mechanism of human stefin B folding: I. Comparison to homologous stefin A. Influence of pH and trifluoroethanol on the fast and slow folding phases. *Proteins* 296-303 (1998).
- [27] Bryngelson, J. D., & Wolynes, P. G. Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7524-7528 (1987).
- [28] Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Socci, N. D., & Wolynes, P. G. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins* **21**, 167-195 (1995).
- [29] Ferreiro, D. U., Komives, E. A., & Wolynes, P. G. Frustration in biomolecules. *Q. Rev. Biophys.* **47**, 285-363 (2014).
- [30] Ferreiro, D. U., Komives, E. A., & Wolynes, P. G. Frustration, function and folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **48**, 68-73 (2018).
- [31] Englander, S. W., & Mayne, L. The nature of protein folding pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 15873-15880 (2014).
- [32] Englander, S. W., & Mayne, L. The case for defined protein folding pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 8253-8258 (2017).
- [33] Uzawa, T., Nishimura, C., Akiyama, S., Ishimori, K., Takahashi, S., Dyson, H. J., et al. Hierarchical folding mechanism of apomyoglobin revealed by ultrafast H/D exchange coupled with 2D NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13859-13864 (2008).
- [34] Aoto, P. C., Nishimura, C., Dyson, H. J., & Wright, P. E. Probing the non-native H helix translocation in apomyoglobin folding intermediates. *Biochemistry* **53**, 3767-3780 (2014).
- [35] Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583-589 (2021).
- [36] Watson, J. L., Juergens, D., Bennett, N. R., Trippe, B. L., Yim, J., Eisenach, H. E., et al. De novo design of protein structure and function with RFdiffusion. *Nature* **620**, 1089-1100 (2023).
- [37] Koga, N., Koga, R., Liu, G., Castellanos, J., Montelione, G. T., & Baker, D. Role of backbone strain in de novo design of complex α/β protein structures. *Nat. Commun.* **12**, 3921 (2021).
- [38] Goverde, C. A., Pacesa, M., Goldbach, N., Dornfeld, L. J., Balbi, P. E. M., Georgeon, S., et al. Computational design of soluble and functional membrane protein analogues. *Nature* **631**, 449-458 (2024).
- [39] Takada, S. Gō model revisited. *Biophys. Physico-biol.* **16**, 248-255 (2019).
- [40] Nagarajan, S., Xiao, S., Raleigh, D. P., & Dyer, R. B. Heterogeneity in the Folding of Villin Headpiece Subdomain HP36. *J. Phys. Chem. B* **122**, 11640-11648 (2018).
- [41] Bhatia, S., Krishnamoorthy, G., & Udgaonkar, J. B. Mapping Distinct Sequences of Structure Formation Differentiating Multiple Folding Pathways of a Small Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 1447-1457 (2021).



神田 大輔 (こうだ・だいすけ)

1981年3月 東京大学理学部生物化学科卒業

1986年3月 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻 博士課程修了 理学博士

1986年4月 (財) 東京都臨床医学総合研究所 研究員

1994年7月～1995年7月

日本学術振興会特定国派遣研究者 (イギリス・オックスフォード大学)

1996年1月 (株) 生物分子工学研究所 主任研究員

2000年4月 (株) 生物分子工学研究所 主席研究員

2002年1月 (技術研究組合) 生物分子工学研究所 主席研究員

2002年4月 九州大学生体防御医学研究所 教授

2014年9月 九州大学生体防御医学研究所 主幹教授

2024年3月 九州大学 定年退職

2024年4月 九州大学 名誉教授

2024年4月 九州大学生体防御医学研究所 特任教授 (現在に至る)

2024年4月 静岡県立大学客員教授 (現在に至る)

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— (第三回)^[3]

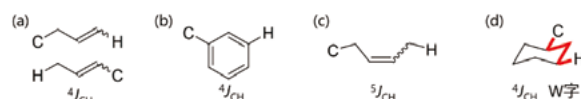
北海道大学大学院農学研究院

福士 江里

feria@agr.hokudai.ac.jp

はじめに

第一回のマルトール(1)(図45(a))の構造解析で、C-bとC-e、およびC-cとC-dの帰属が入れ替わった二つの可能性が残りました(図45(b))。この帰属ができなかった原因は、HMBCで相関が得られているプロトンとカーボンが2結合はなれているか、3結合はなれているかを区別できないことにあります。あるプロトンから2結合はなれた位置にあるプロトネートカーボンはCOSYによって帰属できますが(図45(c))、第四級炭素の場合は帰属できません。第一回では、1の二つのメチンbとeに対して、「 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」という傾向を適用して帰属しました(図45(d))が、このような傾向が使えないこともあります。今回は、1,1-ADEQUATEを使ってみます。この方法は ^1H - ^{13}C - ^{13}C の磁化移動を経ることで、2結合はなれたプロトンとカーボンを帰属できます(図45(c))。1のメチル基プロトンH-fはC-cとC-dにHMBC相関が得られていましたが、このうちH-fから2結合の位置にあるC-cを1,1-ADEQUATEで検出できると期待されます。また、H-b、H-eの両方ともC-aとHMBC相関が出ていましたが、1,1-ADEQUATEではこのうちH-eがC-aから2結合の位置であると帰属できます(図45(e))。

図46 観測されやすい遠隔 J_{CH} の例。

また、HMBCでは通常、3結合以内にプロトンがないカーボンを帰属することができませんが、 J_{CH} は4結合以上離れていても観測されることがあります。 J_{CH} の傾向は J_{HH} の傾向と同様であることが知られています。図46は第二回の図23(a)の J_{HH} の傾向のHの一方をCに書き換えたもので、プロトンとカーボンに遠隔カップリングが観測されやすい位置関係を表しています。その J 値は小さく、HMBCでは観測されにくいいため、小さな J 値の観測にも適したLR-HSQMBC (long-range heteronuclear single quantum multiple bond correlation)^[4]を使って、周囲にプロトンのないカーボンを帰属してみます。

マルトール(1)の1,1-ADEQUATE スペクトル

まず、マルトール(1)の1,1-ADEQUATEスペクトルを読んでみましょう。第一回の測定を試料は2mg/0.5mlでしたが、今回は6mg/0.5mlとしました。ADEQUATEスペクトルは縦(F_1)軸の異なる二つの形があり、ひとつは F_1 軸が δ_{C} になるようにリフォーカスした形です(図47(a))。

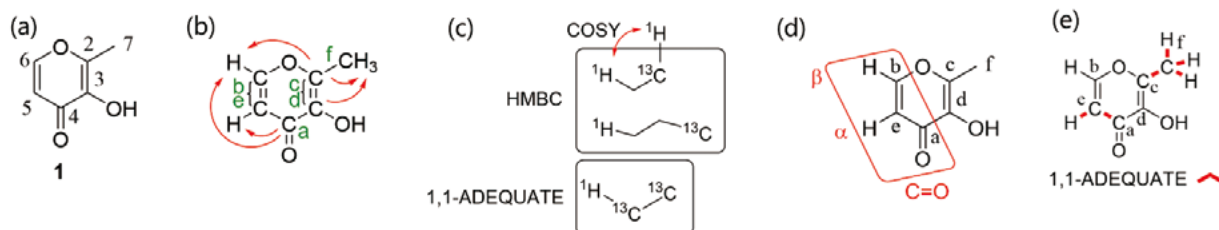


図45 (a) マルトール(1)の構造。(b) HMBCの解析で、cとdおよびbとeが入れ替わった二つの可能性が残った。(c) HMBCでは通常、2-3結合はなれたプロトンとカーボンの相関が区別できない。1,1-ADEQUATEで $^1J_{\text{CH}} \rightarrow ^1J_{\text{CC}}$ の磁化移動を検出すると2結合はなれたプロトンとカーボンがわかる。(d) プロトン、カーボンの化学シフトの傾向を適用した1の帰属。(e) 1の1,1-ADEQUATEでC-eとC-a、C-fとC-cが隣り合っていることがわかれると期待できる。

このスペクトルから、メチル基C-fの隣がC-cであるとわかります。ほかには相関ピークが得られていませんが、この一か所が決まれば、残りはHMBCで帰属できます。

もうひとつは F_1 軸が二つの δ_C の和になる形で(図47 (b))、リフォーカスを除くことで感度が向上しています。この形の1,1-ADEQUATEスペクトルを、ピークテーブル(図47 (c))を使って解析してみましょう。通常、二次元スペクトルの分解能は一次元スペクトルより低いいため、ピークテーブルの値は幅をもって見るようにします。ピークテーブルの $\nu(F_2)$ [ppm]の欄からプロトンの δ_H を読み、そのプロトンに直結する炭素の δ_C をHSQCのピークテーブル(図47 (d))から探します。1,1-ADEQUATEのピークテーブルの $\nu(F_1)$ [ppm]は二つの炭素の化学シフトの和になっていますので、この値からプロトンに直結した δ_C を引くと、隣の炭素の δ_C になります。

たとえば、図47 (c) のピーク番号4については、 $\nu(F_2)$ の値8.00 ppmをHSQCのピークテーブル(図47 (d))で見ると、H-bであり、これに直結する炭素の δ_C は158.7 ppmです。表の「 ^1H のabc…」の欄にはbと、「直結 δ_C 」の欄には158.7と記入します。ピークテーブルの $\nu(F_1)$ の値274.7から直結 δ_C を引いた116.0 ppmが、隣の

炭素の化学シフトです。炭素のピークテーブル(図47 (e))から、そのアルファベットはeであるとわかります。ほかのピークについても同様に計算した結果を記入してあります。プロトネート炭素と隣り合うすべての炭素についての相関が得られており、その結果は第一回で行った帰属を支持しています。

このような計算が手間となりますが、 F_1 が δ_C になる形より感度が高いので、両方を使い分けても良いでしょう。

1,1-ADEQUATE について

名前の最初についているカンマ区切りの二つの文字は、前の文字が炭素とプロトンの間のカップリング(J_{CH})、後ろの文字が炭素と炭素の間のカップリング(J_{CC})を直結と遠隔のどちらに最適化するかを表しています。直結(1J)に最適化すると「1」、遠隔(^{LR}J)に最適化すると「n」になり、1,1-、1,n-、n,1-、n,n-の4通りのADEQUATEがあります(図48 (a))。

ADEQUATEはインバース法です。古くからある $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ 相関法のINADEQUATEはプロトンからの分極移動も利用していない直接観測です。直接観測と比べたインバース法の感度は、異種核Xが炭素の時、最大32倍です(図48 (b))。こ

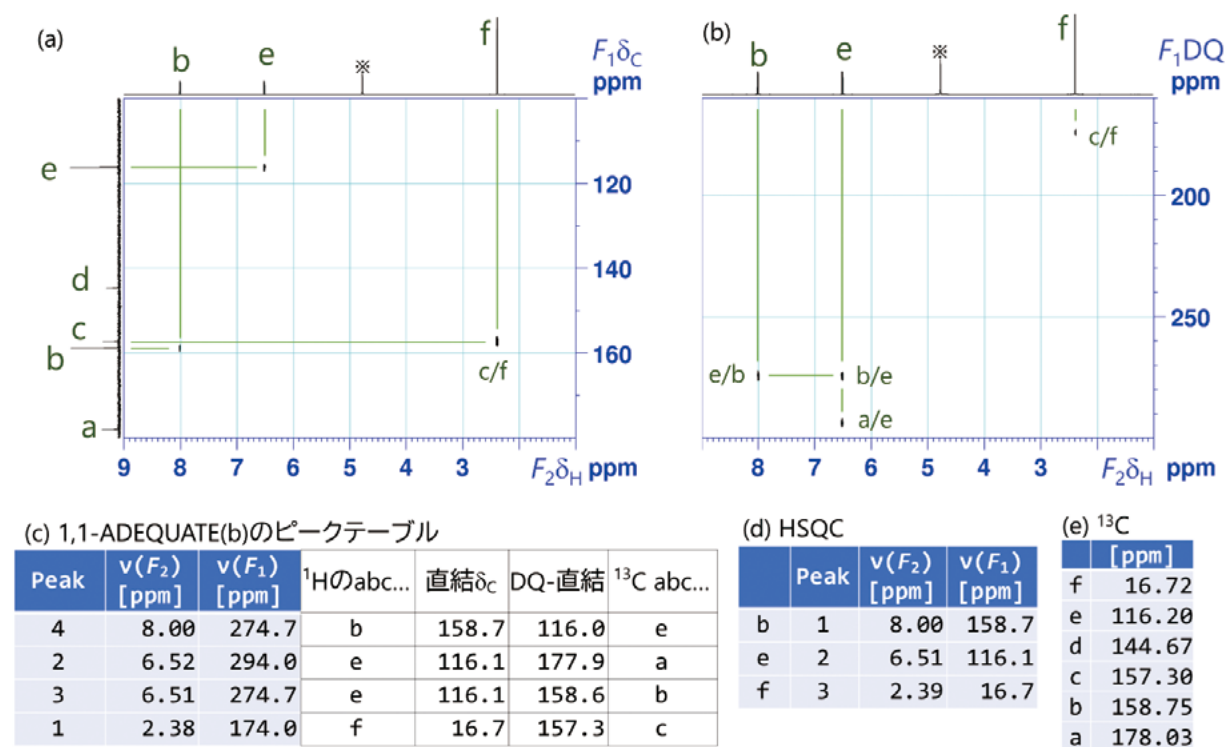


図47 1 (6 mg/D₂O) の1,1-ADEQUATEスペクトル(^1H 500 MHz、 $J_{CC}=60$ Hz) の解析。(a) F_1 軸を δ_C とした形。相関が足りない。(b) F_1 軸を二つの δ_C の和とした形。(c) (b) のピークテーブルを使った解析。(d) HSQCのピークテーブル。(e) ^{13}C -NMRスペクトルのピークテーブル。※印は溶媒由来。

これらの式の $\{ \}$ 内に含まれる縦緩和時間 T_1 の項は、インバース法ではプロトンの T_{1H} 、直接観測ではカーボンの T_{1X} になっています。RDは繰り返し待ち時間です。低分子化合物ではプロトンに比べてカーボンの T_1 が数倍以上長くなることもあります。インバース法では、RDを短くでき、同一測定時間に多くの回数の積算が可能です。

ADEQUATEの観測対象になるサンプル中の分子は、HSQCやHMBCの1/100しかありません。シグナルノイズ比 (s/n) は積算回数の二乗、または濃度に比例しますので、HSQCと同じ濃度では100²倍の積算回数が必要ですが、濃度を10倍にすると100倍の積算回数ですみます (図48 (c))。HSQCが8回の積算で測定できる濃度の10倍濃くすることができれば、 t_1 increments = 64で週末測定が可能と計算されます。

図47 (b) のように F_1 軸を δ_C にリフォーカスしない形で測定するADEQUATEは感度のほか、もう一つ利点があります。それは、プロトンの化学シフトが重なっていても、それぞれの隣のカーボンを決定できる可能性があることです。相関ピークの F_1 軸の位置に、プロトンに直結した δ_C の情報が含まれているからです。この形のADEQUATEスペクトルの表示は、INADEQUATEでよく行われている表示方法と同様になります。スペクトルの F_2 軸は、INADEQUATEは δ_C 、ADEQUATEは δ_H です。ピークが現れる F_1 軸上の位置について、例として、二つのメチン a、b が並んだ部分構造で考えてみます (図49 (a))。それぞれの δ_C を a [ppm]、b [ppm] とします。カーボンパルスの中心 ν_0 を x [ppm] とし、それぞれのシグナルの位置を ν_0 からヘルツで測った値を y [Hz]、z [Hz] とおきます。ADEQUATEスペクトルの F_1 軸をヘルツ表示として中心を 0 [Hz] に合わせる

と、相関ピークは、 $F_1 = y + z$ [Hz] に現れます (図49 (b))。解析のため、 F_1 軸を ppm 表示にして、中心を ν_0 の二倍の $2x$ [ppm] に合わせると、相関ピーク位置は $F_1 = a + b$ [ppm] になります。本稿のADEQUATEスペクトルはこのように表示しています。なお、図49ではC-a、C-bの両方をプロトネートカーボンとしていますが、どちらか一方がプロトネートカーボンであれば、1,1-ADEQUATEで検出できます。

リフォーカスしない形のADEQUATEを測定するときは、標準の測定条件から次の点を変更します。Bruker社のTopSpinではパルスプログラム名に「rd」が入っていないadeq11etgpcspを用い、また、JEOL社のDeltaではPulseタブのsq-flgのチェックを外します。 F_1 のデータ点数の設定は、 t_1 increments = $td1/2 = y_points$ です。 F_1 方向の測定幅は、二つのカーボンの和が最小になる組み合わせと最大になる組み合わせが収まるように上と下の端を決めます。その中心の1/2を¹³Cパルスの中心に設定します。 F_1 の観測幅を狭くして折り返しをさせると、 F_1 方向の分解能を上げることができます。

積算回数の目安

図48 (c) でADEQUATEとHSQCの積算回数を比較しました。使用している装置で、各種測定法の積算回数の目安と¹H-NMRスペクトルのs/nの関係を求めておくると便利です (図50)。基準にする¹H-NMRスペクトルはよく使う測定条件とし、積算回数異なる場合は、s/nが積算回数の二乗に比例することから換算して比較します。表の値は一例で、使用装置・プローブごとに値を求めます。カーボンに必要な積算回数は、シングレットメチンプロトンのs/nでこの表を読みます。このような表は、測定を開始する際に目安にす



図48 (a) J_{CH} 、 J_{CC} を 1J または nJ のどちらかに最適化するかによるADEQUATEの種類。(b) 磁化移動経路による感度の計算式。 γ_X 、 γ_H は核の磁気回転比。 $\gamma_H / \gamma_C \approx 4$ 。異種核Xがカーボンの場合、 $\{ \}$ の外の項は、インバース法は直接観測の32倍になる。(c) HSQCとADEQUATEの観測対象分子の存在割合と、試料濃度と積算回数の関係。

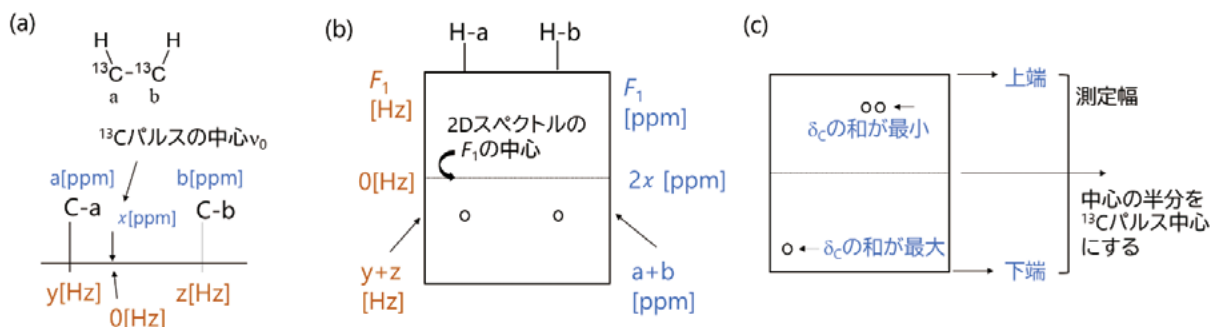


図49 (a) メチン a, b が並んだ ^{13}C -NMR の模式図。(b) リフォーカスしないタイプの ADEQUATE スペクトルの相関ピーク位置。(c) F_1 の測定幅とカーボンパルスの中心の設定方法。

^1H のs/n (30°~45° 16回)	COSY	HSQC	HMBC	NOESY	^{13}C (scans x loop)
100	4	16	256	64	256 x 256 (57 hr)
200	1	4	64	16	64 x 256 (14 hr)
400	1	2	16	並行測定 16 x 256 (loop=NOESYの t_1 increments*2) (4 hr)	
800	1	同時測定 (NOAH) 4		4 x 256 (1 hr)	

図50 1D ^1H -NMR スペクトルのs/nに基づく各測定の積算回数の目安の表。値は一例で、使用装置・プローブごとに値を求めておく。

ることができるほか、濃度がある試料の積算しすぎを防ぎ、また、微量試料管や高感度装置との使い分けの指針にもなります。 ^1H のs/nが2倍になるごとに、各測定の積算回数を1/4にできますが、1や2より小さくすることはできません。その場合、不均一サンプリング法 (NUS) により F_1 方向の取り込みデータ数を減らしたり、可能なら、NOAH^[5] や平行測定^[6] などの時短測定を用いたりします。

未知化合物 10 の構造解析

第一回の復習をしながら、未知化合物 10 の構造を推定してみましょう。この解析の最後に、周囲にプロトンがないカーボンを LR-HSQMBC によって帰属します。

10 の分子式は $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3$ 、不足水素指標を計算 (図51 (a)) すると8になります。分子式の分だけ原子を用意します (図51 (b))。 ^1H -NMR スペクトル (図51 (c)) を見ると、 δ_{H} 8.5 ~ 7.3 ppm 付近にあるプロトンの分裂様式が $J_{\text{HH}} = 8\text{ Hz}$ 程度のダブルレットまたはダブルダブルレットと遠隔カップリングであることから、ベンゼン環のような構造を推定します。

カーボンの化学シフトの大きいほうからアル

ファベットを振り、HSQC (図52 (a)) で直結するプロトンに同じアルファベットを振ります。カーボンは C-l (エル) がメチル基で、それ以外は sp^2 炭素のようです。メチンが c, f, g, h, i, k の6個で、a, b, d, e, j が第四級炭素と推定されます (図52 (b))。以上の C, H を数えると C_{12}H_9 あり、分子式との差は HO_3 です。酸素3個は、 $\text{CH}_3\text{-I}$ をメトキシ、C-a をカルボン酸と推定して、使い切ります。不足水素指標は、カルボン酸で指標を1使い、C-b ~ k で二重結合を5個作ると、残りは2となり、環が二個あることとなります。以上により、ナフタレン環を推定します。

COSY (図52 (c)) により、H-c と H-k が並んでいることと、H-h, H-f, H-i, H-g の順に4個が並んだ部分構造がわかります。プロトン2個および4個から成るスピン系があることから、1,2-または1,4-置換ナフタレン環と推定します。

HMBC スペクトル (図53) で C-g/H-c、C-c/H-g の相関があることから、二つの ^1H スピン系を図54 (a) のように配置した1,2-置換ナフタレンであることがわかります。続いて、第四級炭素の帰属をします。C-e は H-c, g, h, i, k と HMBC が出ています。これらのプロトンから3結合以内になる図54 (b) の位置を C-e と帰属します。C-d は H-c, f, g と HMBC が出ており、これらの3個のプロトンから3結合以内となる図54 (c) の位置を C-d と帰属します。C-d は2結合はなれた H-h とは相関が出ていません。ベンゼン環の $^2J_{\text{CH}}$ は $^3J_{\text{CH}}$ より小さく、HMBC が弱いか出ないことがあります。C-j は H-h, k と HMBC が出ており、二つのプロトンの両方から3結合以内になる図54 (d) の位置を C-j と帰属します。C-b はメチル基 H-l と HMBC があり、メトキシが結合していると推定できます。C-b はさらに、H-c と HMBC が出ています。これまで帰属されずに残った位置が H-c か

(a) 未知化合物**10**の分子式は $C_{12}H_{10}O_3$

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

(b) 原子を用意する

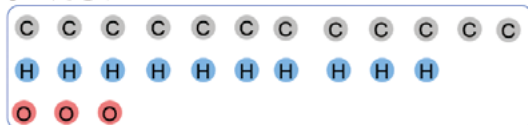
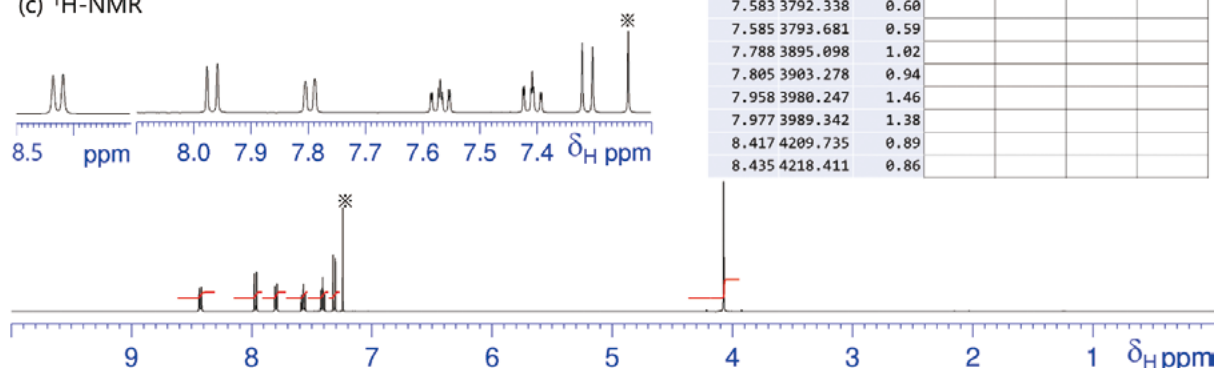
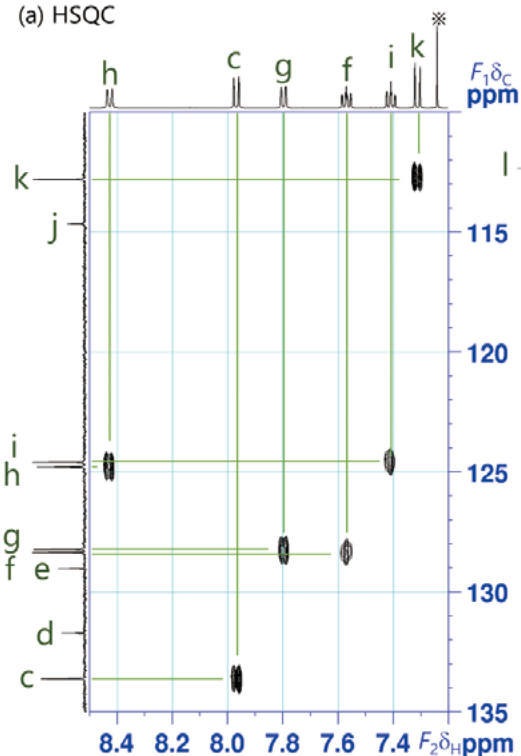
(c) 1H -NMR

図51 化合物**10** ($C_{12}H_{10}O_3$) の構造推定。(a) 分子式から不足水素指標を計算しよう。(b) 分子式の分だけ原子を用意する。(c) **10** (6 mg/chloroform- d) の 1H -NMRスペクトル (500 MHz)。

(a) HSQC

(b) ^{13}C

Peak	[ppm]		Peak	[ppm]	
l	57.22	CH ₃	f	128.35	CH
k	112.78	CH	e	129.01	C
j	114.63	C	d	131.72	C
i	124.58	CH	c	133.61	CH
h	124.79	CH	b	155.89	C
g	128.22	CH	a	169.80	C

合計 $C_{12}H_9$

(c) COSY

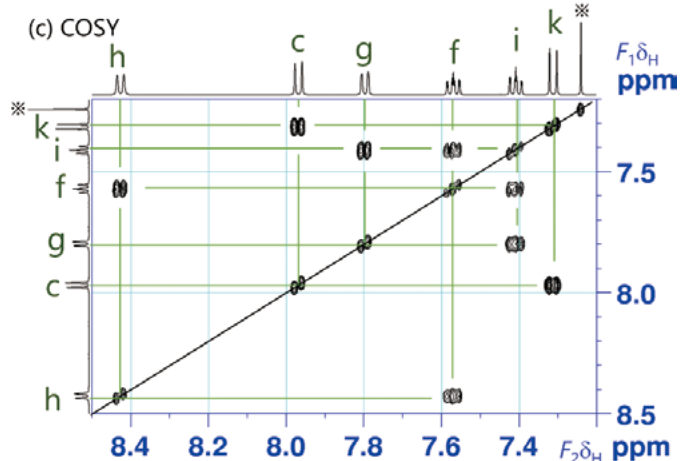


図52 (a) **10**のHSQCスペクトル。(b) **10**の ^{13}C -NMRスペクトルのピークテーブル。化学シフトの大きいほうからアルファベットを振ってある。(c) **10**のCOSYスペクトル。

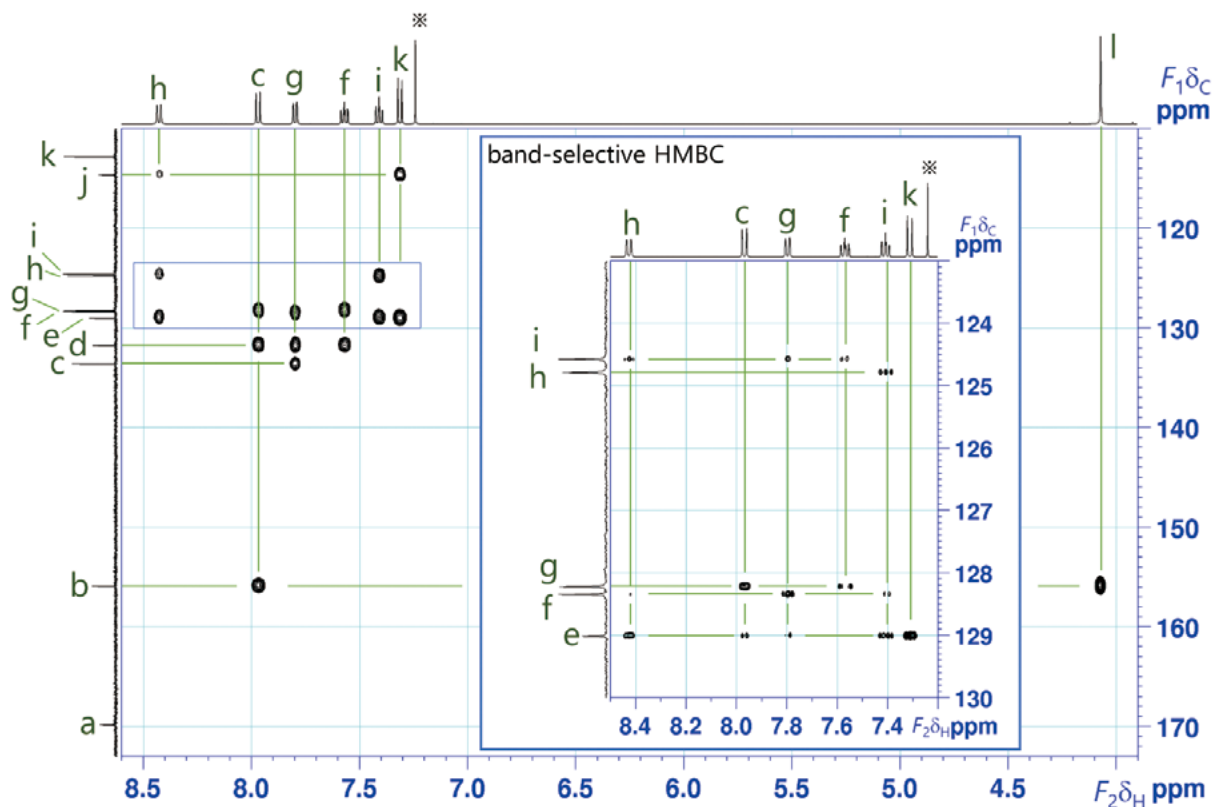


図53 10のHMBCスペクトル。

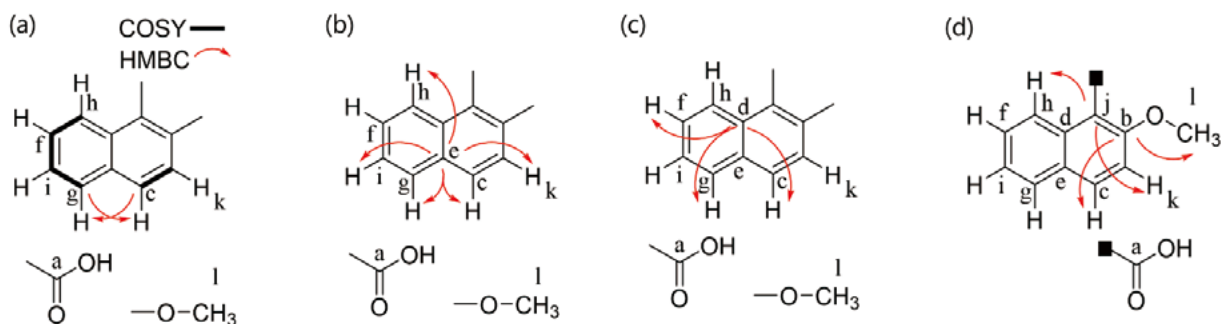
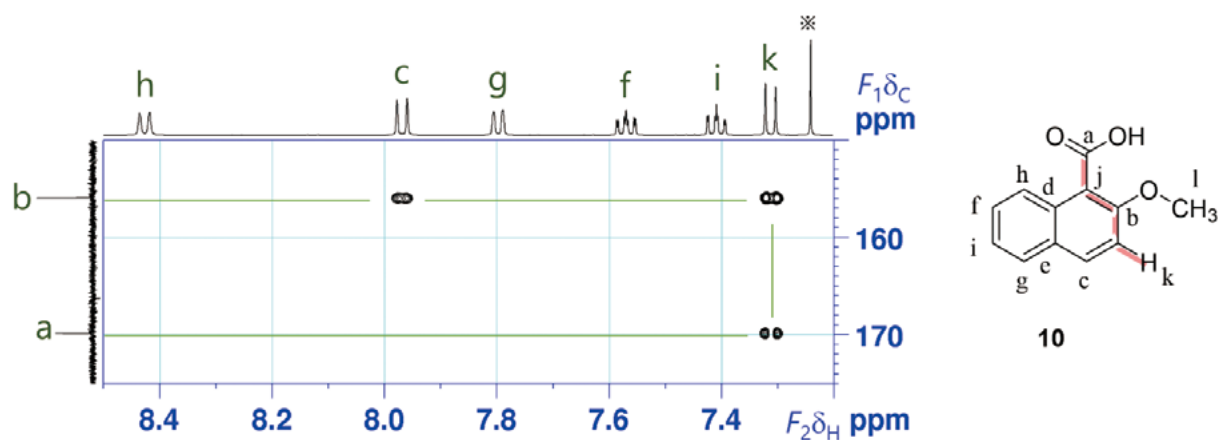


図54 (a) 10のCOSYで得られた部分構造をHMBCでつなぐ。(b) 第四級炭素eの帰属。(c) 第四級炭素dの帰属。(d) 第四級炭素jとbの帰属。結合の手がjに余っており、部分構造としてカルボン酸が残っている。

図55 10のLR-HSQMBCスペクトル ($J_{CH} = 2\text{ Hz}$)。

ら3結合の位置であり、ここをC-bと帰属します。

結合の手がC-jに余っており、置換基としてC-aのカルボン酸が残りました。C-aはどのプロトンともHMBC相関がありませんが、C-aとC-jをつないでも良いでしょうか。

化合物10のLR-HSQMBC スペクトル

残った位置どうし、C-aとC-jを結合させた構造の場合、C-aは3結合以内にナフタレン環プロトンがありませんが、H-kが図46 (b) の位置関係にあたります。プロトンどうしであればメタカップリングが出て良く、 J_{CH} の遠隔カップリングが出ると期待できます。そこで、カップリング定数2 Hzに最適化してLR-HSQMBCを測定すると、C-a/H-kの相関が得られました(図55)。また、HMBCにはなかったC-b/H-kの相関が出ています。ベンゼン環では一般に $^2J_{CH}$ が小さく、HMBCでは見えていなかった相関が、この測定では見えるようになったものです。このような部分構造では、 $^2J_{CH}$ 、 $^4J_{CH}$ の両方の相関が得られることがあり、解析には注意が必要です。この測定法は、リフォーカスしてデカップリングするもので、 T_2 によるシグナル減衰があまりない化合物に有効です。

なお、図53のHMBCスペクトル中に拡大図のように表示しているスペクトルは、band-selective HMBCです。カーボンの選択パルスを使用して、HMBCの F_1 方向の測定幅を狭くすることで

分解能を向上させています。同様の目的でband-selective HSQCも使われます。

未知化合物 X^{エックス} の構造を推定せよ

ミッション5: 未知化合物11 (分子式 $C_5H_8O_3$ 、3 mg/chloroform-*d*、図56、57)。HMBCで平面構造を推定し、1,1-ADEQUATEの相関の出方を確認してください。

ミッション6: 未知化合物12 (分子式 $C_7H_7NO_3$ 、6 mg/chloroform-*d*、図58、59)。二つのプロトンの δ_H が重なっていますが、1,1-ADEQUATEスペクトルを用いて構造を推定することができます。

解答編を読みやすくするため、 ^{13}C -NMRスペクトルにアルファベットをあらかじめ振ってあります。

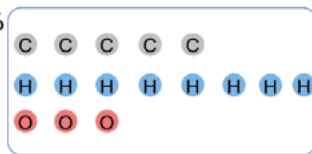
引用文献

- [3] 福士江里, 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). 第二回, 同 **14**, 21-31 ページ(2024). 解答例は機関誌一覧のページに掲載.
- [4] Williamson, R. T., Buevich, A. V., Martin, G. E. and Parella, T. LR-HSQMBC: A Sensitive NMR technique to probe very long-range heteronuclear coupling pathways. *J. Org. Chem.*, **79**, 3887-3894 (2014).
- [5] Kupče, Ě. and Claridge, T. D. W. NOAH: NMR supersequences for small molecule analysis and structure elucidation. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **56**, 11779-11783 (2017).
- [6] Kovacs, H. and Kupče, Ě. Parallel NMR spectroscopy with simultaneous detection of 1H and ^{19}F nuclei. *Magn. Reson. Chem.*, **54**, 544-560 (2016).

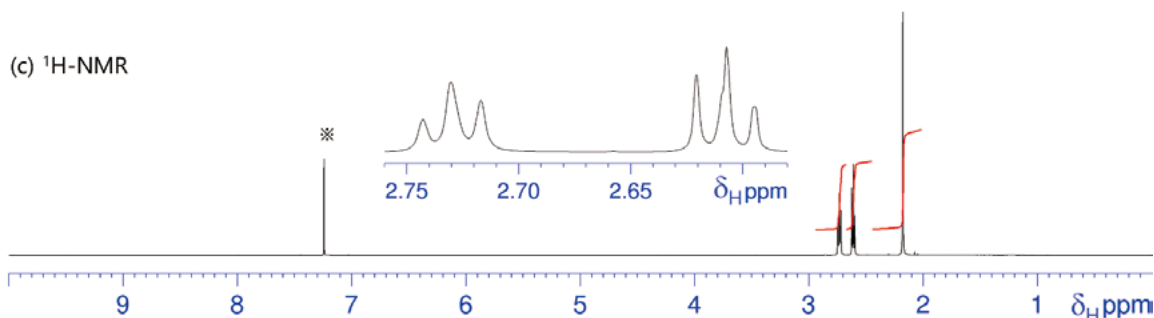
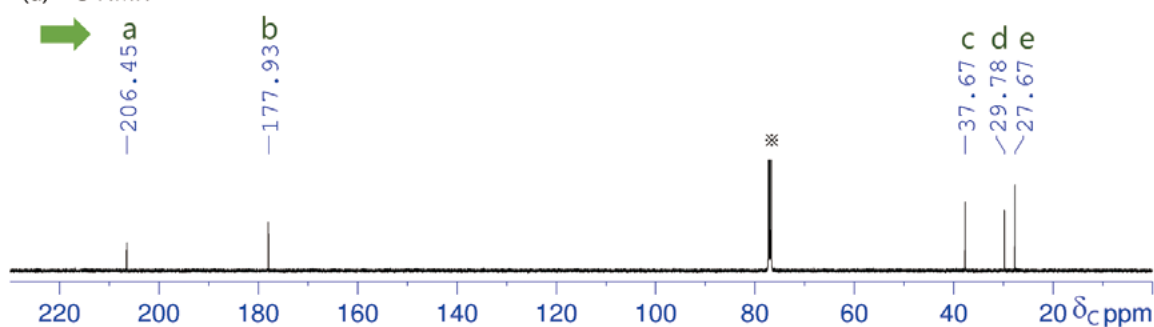
(a) 未知化合物**11**の分子式は $C_5H_8O_3$

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

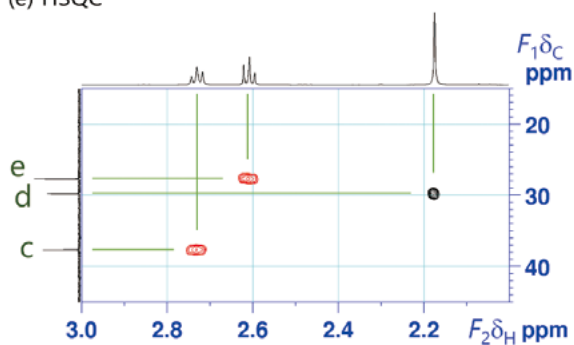
(b) 原子を用意する



[ppm]	[Hz]	Int. [rel]	CH _n	δ _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
2.174	1087.35	15.00				
2.595	1297.63	2.48				
2.607	1303.93	5.66				
2.621	1310.67	4.17				
2.717	1358.83	2.81				
2.730	1365.50	3.81				
2.743	1371.73	1.77				

(c) 1H -NMR(d) ^{13}C -NMR

(e) HSQC



(f) COSY

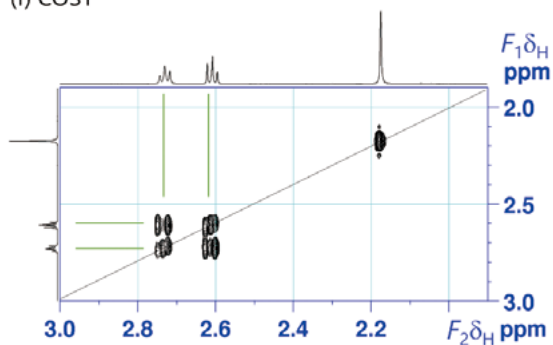


図56 未知化合物**11** (3 mg/chloroform-*d*) の構造を推定してみよう。(a) 不足水素指標を計算しよう。(b) 原子を用意する。(c) 1H -NMR スペクトル (500 MHz)。(d) ^{13}C -NMR スペクトル (126 MHz)。(e) HSQC スペクトル。CH₃、CH は正 (黒)、CH₂ は負 (赤)。プロトンに、直結するカーボンと同じアルファベットを振る。(f) COSY スペクトル。

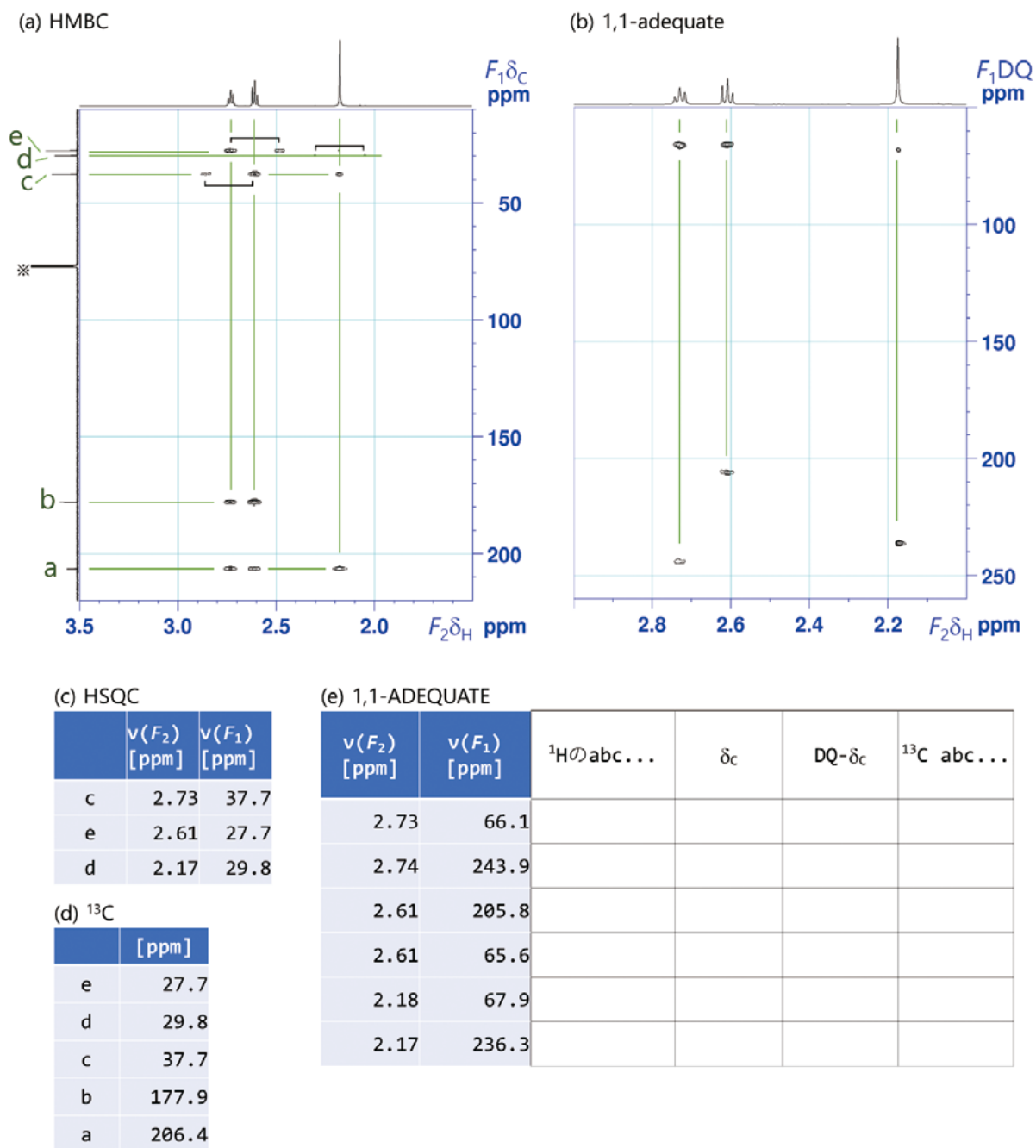
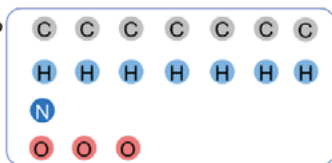


図57 11のデータの続き。(a) HMBCスペクトル。(b) 1,1-ADEQUATEスペクトル ($J_{\text{CC}} = 40 \text{ Hz}$)。 (c) HSQCのピークテーブル。(d) ^{13}C -NMRスペクトルのピークテーブル。(e) (b) のピークテーブル。

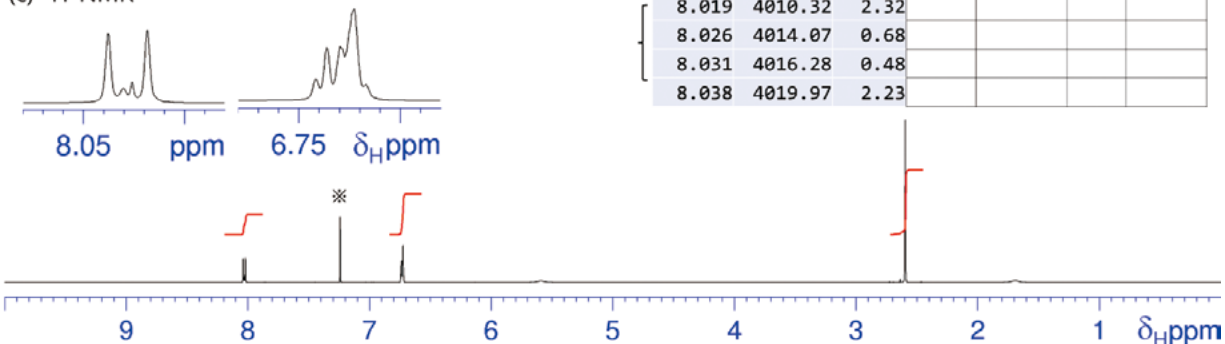
(a) 未知化合物**12**の分子式は $C_7H_7NO_3$

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

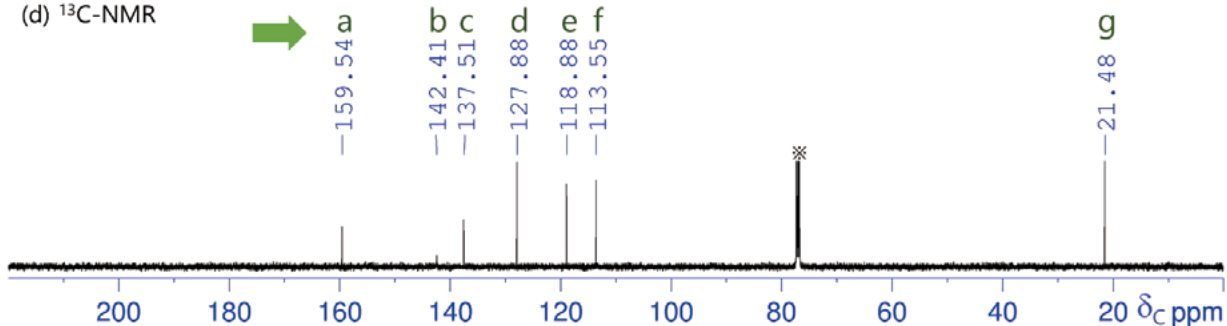
(b) 原子を用意する



(c) 1H -NMR



(d) ^{13}C -NMR



(e) HSQC

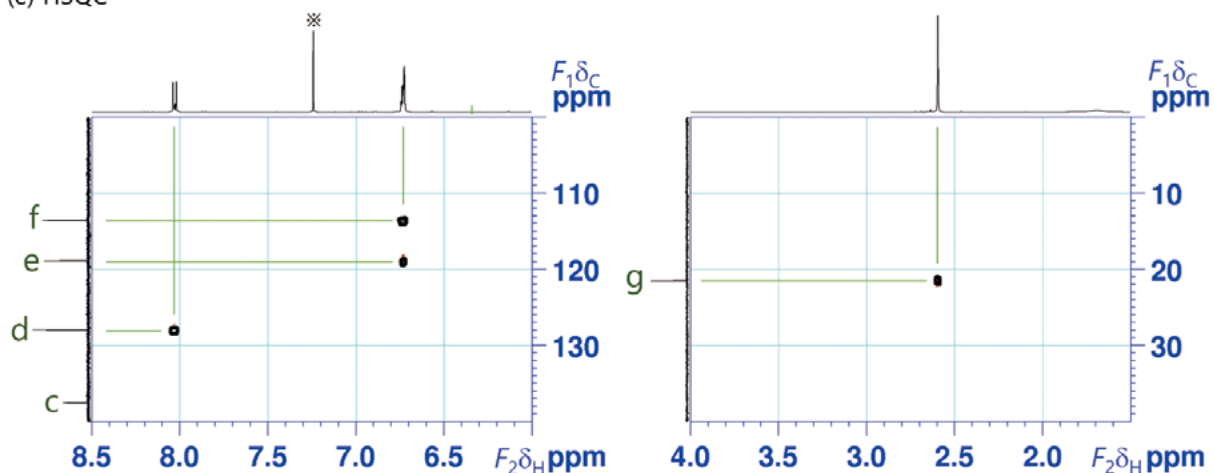
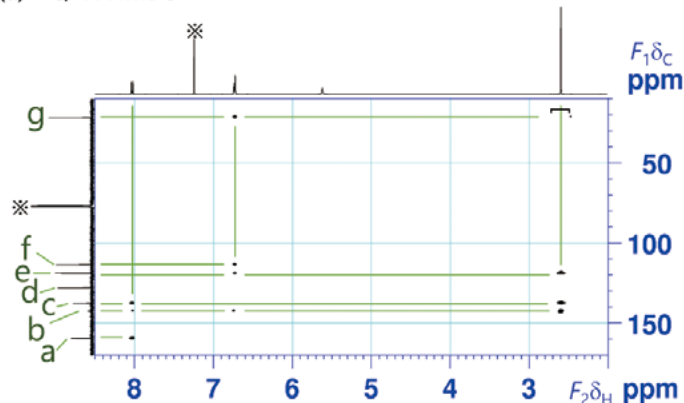
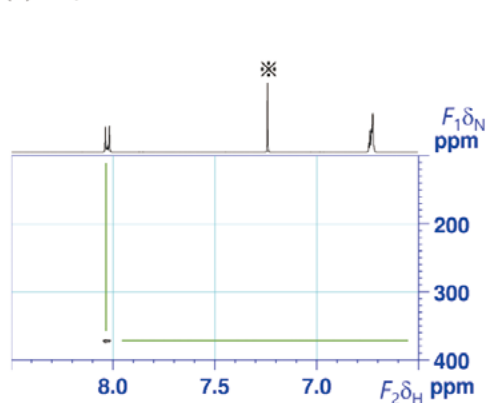
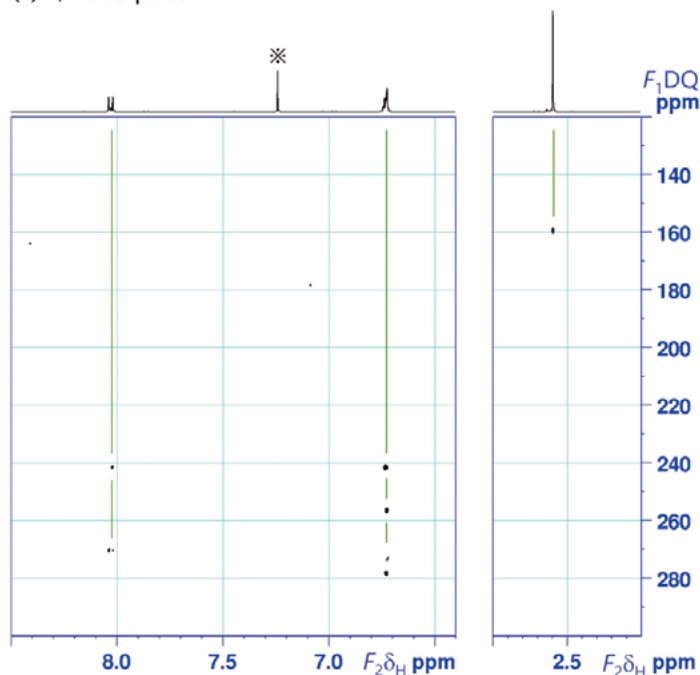


図58 未知化合物**12** (6 mg/chloroform-*d*) の構造を推定してみよう。(a) 不足水素指標を計算しよう。(b) 原子を用意する。(c) 1H -NMRスペクトル (500 MHz)。(d) ^{13}C -NMRスペクトル (126 MHz)。(e) HSQCスペクトル。CH₃、CHは正(黒)、CH₂は負(赤)。プロトンに、直結するカーボンと同じアルファベットを振る。

(a) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HMBC(b) $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HMBC

(c) 1,1-adequate



(d) (c)のピークテーブル

$\nu(F_2)$ [ppm]	$\nu(F_1)$ [ppm]
8.04	270.17
8.02	241.34
6.73	241.34
6.72	273.32
6.72	256.24
6.72	278.16
2.59	159.22

(e) ^{13}C の化学シフトの和の計算

CH	d	f	e	g
	127.9	113.6	118.9	21.5
a	159.5	287.4	273.1	278.4
b	142.4	270.3	256.0	261.3
c	137.5	265.4	251.1	256.4
d	127.9		241.4	246.8
e	118.9		246.8	
f	113.6		241.4	232.4
g	21.5	149.4	135.0	140.4

図59 12のデータの続き。(a) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HMBC スペクトル。(b) $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HMBC スペクトル。(c) 1,1-ADEQUATE スペクトル ($J_{\text{CC}} = 65 \text{ Hz}$)。 (d) (c) のピークテーブル。(e) カーボンの化学シフトの和の表。



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

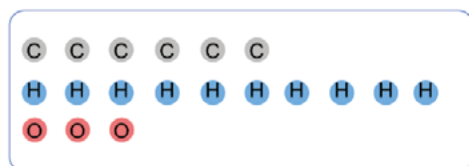
1987年よりMS、1990年よりNMRを始め、受託分析・共同研究などを行う

第二回の図34 (本誌14, 31ページ (2024)) が誤っておりましたので正しい図を以下に掲載します。また、第二回の解答例の図44 (a) の構造式の下に書いた化合物番号が8になっていましたが、9の誤りでした。お詫びして訂正します。

(a) 未知化合物8の分子式は $C_6H_{10}O_3$

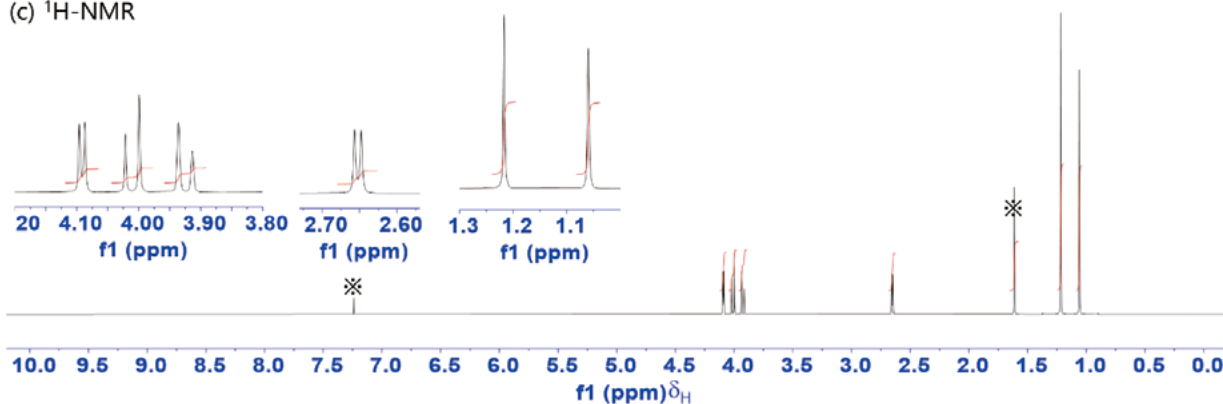
$$\text{不足水素指標} = C + 1 - \frac{H - N}{2} = \boxed{}$$

(b) 原子を用意する

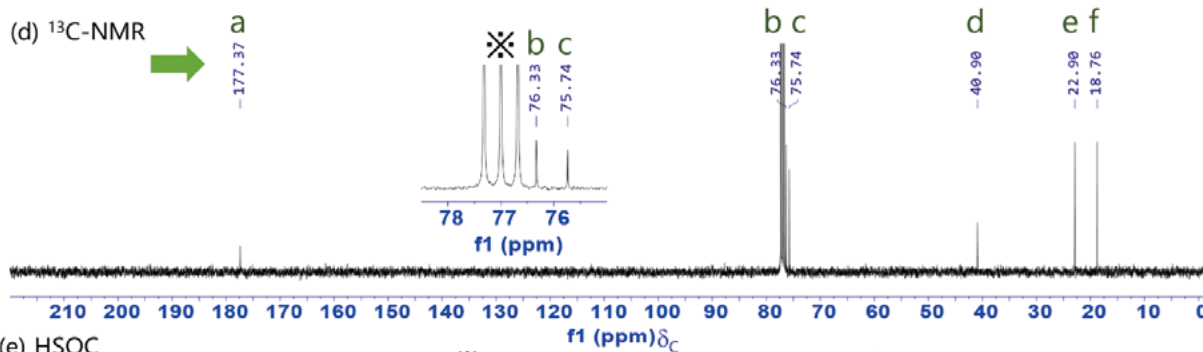


[ppm]	[Hz]	Int. [rel]	CH _n	δ _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
1.059	423.53	12.39				
1.217	486.50	15.00				
1.614	645.14	6.07				
2.650	1059.32	1.95				
2.659	1062.98	2.00				
3.914	1564.77	1.30				
3.936	1573.56	2.21				
3.999	1598.70	2.98				
4.022	1607.73	1.79				
4.087	1633.84	2.10				
4.096	1637.50	2.11				

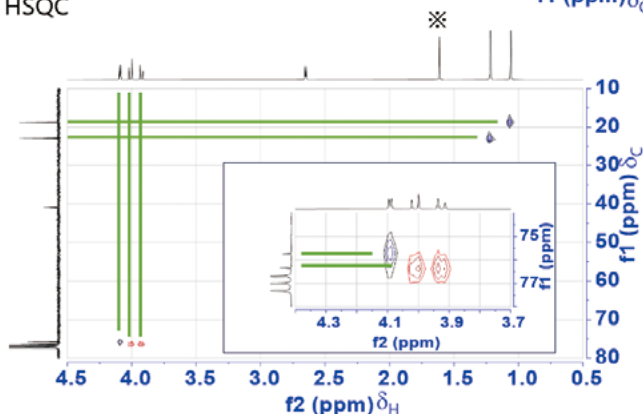
(c) 1H -NMR



(d) ^{13}C -NMR



(e) HSQC



(f) データテーブル

Peak	δ _C [ppm]	CH _n	δ _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
f	18.8				
e	22.9				
d	40.9				
c	75.7				
b	76.3				
a	177.4				

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にδ_H 7.24 ppmに合わせた。(d) ^{13}C -NMRスペクトル(101 MHz)。溶媒シグナルをδ_C 77.0 ppmに合わせた。(e) 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。(f) データテーブルを整理しよう。

最適制御理論“だから”できる NMR 測定法の開発

大阪大学・蛋白質研究所

田巻 初

tamaki@protein.osaka-u.ac.jp

はじめに

著者らが開発した、蛋白質を構成する20種のアミノ酸残基について、その帰属に重要である β 位炭素($C\beta$)の化学シフト情報を最適制御理論(Optimal control theory、以下OC)を用いて取得するc-Beta-Encoding (BE) 法^[1]について、その要点を解説する。また、OCに関連する動向も取り扱う。BE法は固体NMR向けに開発したものであるが、ここでは溶液・固体どちらにも共通することを中心に執筆したつもりである。幅広いNMR研究者のご参考になれば幸甚である。

OC とその研究の動向

この解説では、OCの定義を「数値シミュレーションを用いてパルス合成するもの」とする^[2]。これはパルスの最適化技法の違いなどによって様々な名前の手法が考案されているためであるが、基本的なコンセプトは同じである。

OCによるパルス合成では、初期条件と目標条件のスピン演算子を設定し、それを実現するためのRF磁場 B_1 出力および位相を求める。具体的にはLiouville-von-Neumann方程式によるスピンドイナミクス計算によってパルス照射によるスピン演算子の変化を計算し、その結果が所望するものとなるようにパルス強度・位相を更新する。もちろんLiouville空間で計算を行えば緩和の影響を考慮することもできる。計算の工夫次第で、装置の不安定性・不完全性(B_1 磁場の不均一性やマジック角試料回転(MAS)の不安定性、伝送系の不完全性など)に対してロバストなパルスを得ることも可能である。

OCによるパルス合成の研究の歴史は長く、1980年代頃から行われていたようである。著者の主観だが、2010年代に入る前は単純な選択パルスや広帯域パルスのデザインなど、OCの実証実験が中心という印象であった。しかし2010年代に入ると、測定上の問題を分析しOCで解決しよう、という試

みが台頭してきたように思われる。つまり「OCでもできる」から「OCだからできる」というように研究の流れがシフトしている。次に印象的な3つの例を挙げて説明する。

OC だからできる研究例 1:

CP の磁化移動効率の改善や位相情報の伝達

交差分極(CP)での磁化移動では、移動元と先のチャンネルにHartmann-Hahn(HH)条件を満たすRFを照射する必要がある。通常、 B_1 磁場には空間的な不均一性があるため、HH条件はコイル内部の限られた体積のみで達成される。つまりサンプルの一部でしか磁化移動が生じないため感度が低下する。Tošnerらはソレノイドコイルで生じる B_1 の不均一性を電磁界シミュレーションで求めOCパルス合成計算に組み込むことで、CPが生じる体積を増加させ磁化移動効率を高めた(tm-SPICEパルス)^[3]。さらに、多次元スペクトル測定で間接軸のcos/sin成分を同時に測定することで感度を最大 $\sqrt{2}$ 倍向上させるSensitivity Enhancement(SE)法を可能とするCPも実現させた(TROPパルス)^[4]。CPではRF位相と平行な成分のみが磁化移動するため、互いに直交するcos/sin成分は片方のみが選択される。そのため異種核間の磁化移動にCPを多用する蛋白質の固体NMR測定において、SE法は非常に限られた状況でしか利用できなかった。OCにより合成されたTROPパルスは磁化とその位相情報を同時に移動させるため、SE法を適用できる。TROPパルスの合成では、位相情報を伝達するためにx成分、y成分それぞれの磁化移動効率を最大化させるのに加え、両者の効率が等しくなるよう制約が施された非常に洗練された評価関数が用いられている。

OC だからできる研究例 2:

精密な励起帯域設計による BEST 法の高感度化

蛋白質の溶液NMR測定において、アミド水素

のみをPC9などの帯域選択パルスで励起・操作することで ^1H の縦緩和時間 T_1 を短くし高感度化するBEST法やSOFAST法が用いられている。これらの測定において、水の信号に触れないよう帯域選択パルスのパワーを調整すると一部のアミド水素を励起できず、逆に全てを励起するように調整すると水の一部に触れてしまうため T_1 短縮の効果が小さくなる、という問題がある。その解決にOCでデザインされたパルスを使用するRAPID-TROSYが開発された^[5]。ここで使用されたパルスは照射中にも化学シフトとJカップリングが展開されるよう設計されており、これも感度向上に寄与する。この研究で使用された手法、GENETICS-AIは文字通りAI（ニューラルネット）を用いることで効率的なパルス合成を実現している。

OC だけができる研究例 3：

帯域選択デカップリングによるCB化学シフト測定

HN (CA) CBなどのパルスシーケンスではC β の横磁化を生成するために合計で $1/J_{\text{CACB}} \sim 30 \text{ ms}$ の横磁化展開が必要であり、高分子量の蛋白質では横緩和時間が短く測定が難しい場合がある。Arthanariらが開発したNearest-neighbor NMRではHNCAパルスシーケンスのC α 化学シフト展開期に、C α と結合するC'と特定の帯域のC β のデカップリングを180度パルス照射によって行う。これにはOCで合成されたGOODCOP/BADCOPというパルスが用いられる。「C β が反転された/されなかった」ことが、「C α 信号がシングレット/ダブルットであること」に対応するため、180度パルスの反転プロファイルとC α 信号の線形から、カップリングしたC β の化学シフト情報を磁化移動せずに得られる^[6]。もちろん、この手法では化学シフト値を決めることはできない。しかしC β の化学シフト値が必要なのはアミノ酸タイプの帰属のためであり、おおまかにでも化学シフトがわかれば、その候補を絞り込める。これを磁化移動せずに実現するNearest-neighbor NMRは強力な手法である。余談になるが、この研究ではデカップリングパルス照射によって生じるBloch-Siegertシフトの抑制にも重点が置かれており、そのための目標条件設定も非常に興味深い。

BE法の仕組みとOCによるパルス合成

著者らが開発したBE法は前節のNearest-neighbor NMRのコンセプト、すなわちアミノ酸

毎に特徴的なC β の化学シフト情報をC α の信号から検出する実験を固体NMRに適用できるようアレンジしたものである。Nearest-neighbor NMRを固体NMRに適用する際の最大の課題はC α のシングレット/ダブルットの判別が困難なことである。2024年現在、0.4 mm試料管の登場によりJカップリングによる分裂が観測できるようになりつつある。しかし、分裂が観測できるかは装置や試料の制約があるため望ましい手法ではない。そこで考えたのが、信号の分裂ではなくその出現・消失によって情報をエンコードできないか、ということである。

BE法のシーケンスを図1aに示した。前半のC α がin-phase (IP) の状態からスタートするスピンエコーが最も重要なブロックである。C α とC β の2スピン系においてC α のみ選択的に反転する場合、Jカップリングは展開されないため、C α はIPのままとなる。このIP成分はZフィルタを通過できるため、信号を観測できる。一方、C α とC β を同時に反転する場合、Jカップリングが展開されるため、エコー時間を $1/(2J_{\text{CACB}})$ とすることでIP成分はanti-phase (AP) 成分となる。AP成分はZフィルタを通過できないため、信号は消失する。つまり特定の化学シフトをもつC β を反転できれば、目的通り、C α 信号の出現・消失として化学シフト情報をエンコードできる。ここでアミド水素を直接観測する実験で用いられるC β の間接観測方法(図1b)と比較する。このシーケンスではIP $\rightarrow$ AP $\rightarrow$ IPという演算子の変化が必要である。一方、BE法ではIP $\rightarrow$ APだけで済み、通常のCB化学シフト測定と比べて横展開時間が半分となるため感度増加が期待できる。

BE法で必要となるC α と特定のC β を同時に反転するパルスはOCで合成した。まず、どのC β を反転するかを決定した。SerとThrおよび側鎖の酸化・還元状態で化学シフトが大きく異なるCysを除くとC β の化学シフトは35 ppmと25 ppmを境界に3つのグループに分けられる(図2)。これらを識別できるようBE-1, 2, 3パルスという3つのパルスを合成することにした。35 ppmより大きいC β 化学シフトをもつアミノ酸をグループA、25~35 ppmのものをグループBとする。BE-1パルスはグループA、BE-2パルスはグループBとAla、BE-3パルスはグループAとAlaが観測されるよう反転プロファイルをデザインした。

前述の通りOCによるパルス合成にはスピン演算子で記述された適切な初期条件と目標条件が必

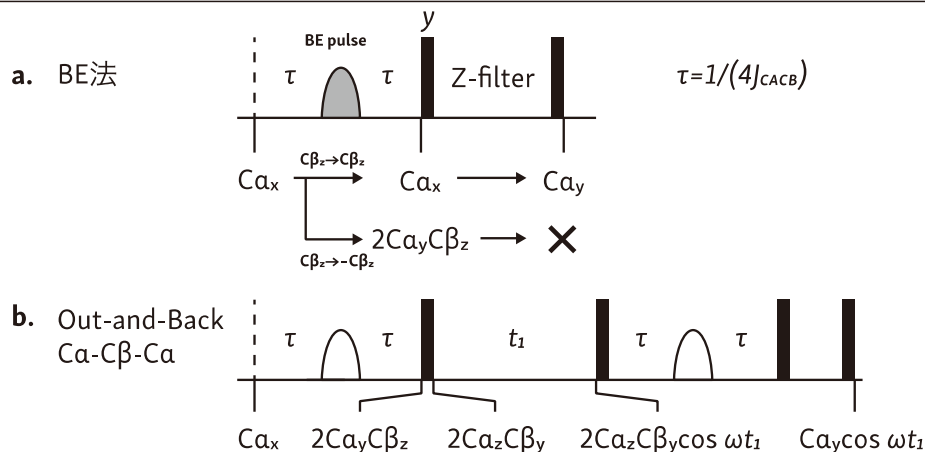


図1 (a) BE法と(b) 通常のCβ化学シフトエンコード法のシーケンス。矩形波は90°パルス、半楕円は選択180°パルスであり、特に灰色で示したパルスはOCで合成したBEパルスである。パルス位相は記述がない限りx位相である。演算子の発展は主要なもののみ記述した。

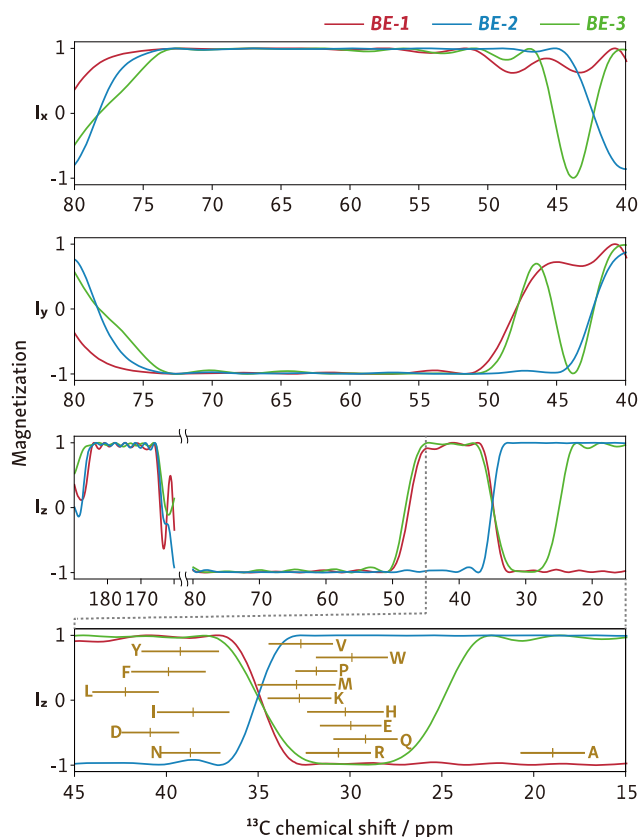


図2 BE-1, 2, 3パルスの周波数応答プロファイル。I_zのプロファイルにはBMRBから取得したCys, Ser, Thrを除く各アミノ酸のCβ化学シフトの統計値を重ねて表示した。プロファイル計算は700 MHz装置を想定して計算したものである。文献 [1] より許可を得て転載 (Copyright 2024 American Chemical Society)。

要であり、以下の通りに設定した:

1. Cαについてはリフォーカシングのために横磁化の180度回転が必要、すなわちx軸まわりの回転としたとき、初期条件と目標条件は $C\alpha_x \rightarrow C\alpha_x$, $C\alpha_{y,z} \rightarrow -C\alpha_{y,z}$
2. Cβについて、信号を出現させる場合は $C\beta_z \rightarrow C\beta_z$, 消失させる場合は $C\beta_z \rightarrow -C\beta_z$
3. Cαと結合しているC'をデカップリングするため $C'_z \rightarrow C'_z$

CβとC'はz→±zへの変化のみコントロールすればよいため、x, y軸には制約を設けていない。Cβの反転もx軸まわりとなる制約を加えた場合、後述のパルス長および分割幅では設計通りの結果は得られなかった。制約条件を極力シンプルにするのは非常に重要である。

最後にパルス合成のパラメータとしてパルス長およびその分割幅の設定が必要である。前者について、長ければ長いほどスピン操作の自由度が増

えるが、緩和の影響により感度が損なわれる。後者について、シェーブドパルスはその波形を複数の短冊パルスに分割することで表現される。そのため、それぞれの短冊の長さを決定する必要がある。短冊が短いほどスピニング操作が精密になるが、分光器の応答速度を超えるとパルス波形が乱れ設計通りの応答プロファイルが得られなくなる。つまり求めるパルスの特性および装置性能に合わせて、両者を最小にする必要がある。BEパルスのパルス長は複数条件で合成、周波数応答プロファイル計算を行い、 $C\beta$ 化学シフトのエンコードに支障がない2msとした。また分割幅は $2\mu s$ とした¹。

パルス合成にはGRAPE法^[7]を使用した。GRAPE法は初期条件から順方向の計算、目標条件から逆方向の計算を行い、両者が一致するようにパルスパラメータを調整していく手法である。スピンドYNAMICS計算ソフト、例えばSIMPSONやSpinachから利用できる。また、アルゴリズムは非常に簡単であるため、自身でコードを書き計算することも難しい。BEパルスの合成はPythonと数値計算ライブラリNumPyを利用した自作ソフトによって行った。合成されたパルスの周波数応答プロファイルを図2に示した。いずれも設計通りの結果であった。

BE法の測定例

図3にBE法を適用したCANH測定をタンパク質GB1の微結晶試料に対して行った結果を示した。説明を簡単にするために、BE-1, 2, 3パルスで信号が観測された・されなかったということをBEコードという三桁の二進数で表記することにする。例えばBE-1およびBE-3で信号が観測さ

れた場合、[101]と表記する。グループA, BおよびAlaのBEコードはそれぞれ、[101]、[010]、[011]で表現される。ここでA20のシグナルを見るとBE-2, 3でシグナルが現れており、BEコードは[011]となる。これは実験デザイン通りの結果である。同様に、L5, I6, D46を見るとBEコードはいずれも[101]であり、これらも正しく情報がエンコードされていた。一方、Q2, E19を見るとBEコードは[110]となっており、これは設計上、生じないはずのパターンであった。こういった誤りは(i)ピークのオーバーラップ、(ii) $C\beta$ の化学シフトが外れ値、(iii)Jカップリングの大きさが標準値から離れていることが原因だと考えられる。Q2, E19のシグナルは他とは分離しており、どちらも従来法で測定した $C\beta$ の化学シフトが ~ 30 ppmであることから、(iii)が原因であると考えられる。ただし、誤って生じたBE-1の信号強度はBE-2のものと比べて弱く、BEコードのパターンが不正なことも合わせて誤りを排除可能である。弱い信号の除外および残基間相関測定のCAcoNHの結果を加えることで、シグナルが生じる55残基のうち53残基で正しい結果が得られた。

BE法で得た「化学シフト」は自動帰属アルゴリズムFLYA^[8]で利用できる。FLYAはインプットを工夫することでアミノ酸選択標識試料の測定結果を取り扱うことができる。BE法の測定結果は、特定のアミノ酸のみラベルしたものと考えることができ、帰属情報として入力できる。図4では従来法のCANH/CAcoNHのみのデータに対して、通常の化学シフトエンコードによるcaCBcaNH/caCBcacoNHのデータ、もしくはBE法を適用し

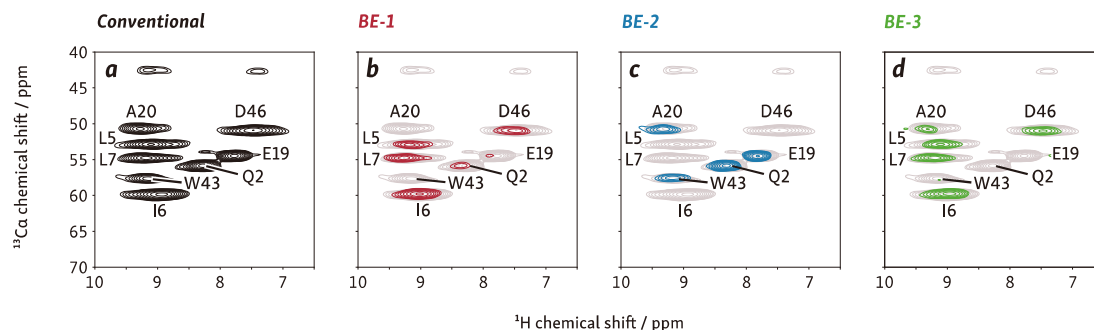


図3 GB1微結晶の(a) 従来法および(b-d) BE法によるCANH測定結果。 ^{15}N 化学シフトが125.9ppmのポイントでのスライスを表示した。日本電子ECA-II 700 MHz装置で測定した。1.0 mmローターを用いMASは70 kHzとした。文献 [1] より許可を得て転載 (Copyright 2024 American Chemical Society)。

¹ 著者が所属する研究室では日本電子 ECA-II を使用している。古いデザインの分光器であるため、余裕をもった設定にした。現行の分光器 (ブルカー Avance NEO や日本電子 ECZ Luminous) であればより短い分割幅を設定可能と思われる。実際、公開されている Avance NEO 用の TROP パルスでは分割幅は $1\mu s$ と設定されている。

たCANH/CaCoNHのデータを加えてFLYAによる自動帰属を行った結果を示している。通常の化学シフト測定と同等の帰属結果であり、BE法によって得られるC β の情報が帰属において有用であることがわかる。

今後の展開など

BE法はProof-of-Conceptが完了した段階であり、改良点が残っている。具体的にはスピン間相互作用を考慮したパルス合成である。シミュレータ上でC α -C β のみ計算した場合に比べ、主鎖+C β 原子とそれらに結合する ^1H を加えたスピン系では感度低下することが確認されている。ここで課題となるのが計算コストである。スピンドYNAMICS計

算は行列操作により行われる。スピン系が大きくなれば、行列のサイズが指数的に大きくなり計算コストが増大する。加えて固体NMRのシミュレーションでは、双極子相互作用等の異方性相互作用の計算のために分子配向を考慮しなければならない。少なくとも100パターン程度の配向を計算する必要があり、さらにコストが増加する。

ただし、この問題は緩和されつつある。これには昨今のAIブームが関係している。AIの発展を牽引する重要な技術の一つがGPUを利用した行列の高速並列計算である。GPUによる並列計算は十数年に登場した技術であるが、その当時はGPUの仕組みを理解せずにコードを書くとCPUよりも遅くなるという難易度であった。現在ではアーキテクチャの進化やライブラリの整備により、NMR研究者が片手間にコードを書いても、かなりの性能が出るようになった。実際、著者が5スピン系に相当する行列計算をGPUで実行したところ、CPUと比較して数十倍高速化できた。現在、GPUを使用したOCパルス合成プログラムの開発およびBEパルスの改良を進めている。

今後、OCを利用したNMR測定がより普及すると著者は考えている。その理由は高磁場化が進む機運が高まっていることである。2024年現在、高温超伝導線材を使用した1.2 GHzのマグネットが市販されており、さらに高磁場の装置も開発が進んでいるとのことである。高磁場になれば1 ppmの幅が広がる。BEパルスは700 MHzの装置を想定して合成した。仮に1.4 GHzのマグネットで測定するのであれば、パルス照射時間は半分でよいと感度が向上する。また同じ照射時間であればより急峻なC β の反転プロファイルを実現できる。つまり高磁場では複雑なスピン操作をより簡便に行うことができる。著者のBE法や例示した手法のようにOCにより単純なパルスでは実現が難しい測定が可能となる。最新の計算技術や高磁場装置の組み合わせにより、NMRの限界を押し広げる測定法が今後も誕生していくことを期待したい。

引用文献

- [1] Tamaki, H., Matsuki, Y. Optimal-Control-Based C β Chemical Shift Encoding for Efficient Signal Assignment of Solid Proteins. *J. Phys. Chem. B.* **127**, 10118-10128 (2023).
- [2] Jones, J. Controlling NMR spin systems for quantum computation. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **140**, 49-85 (2024).

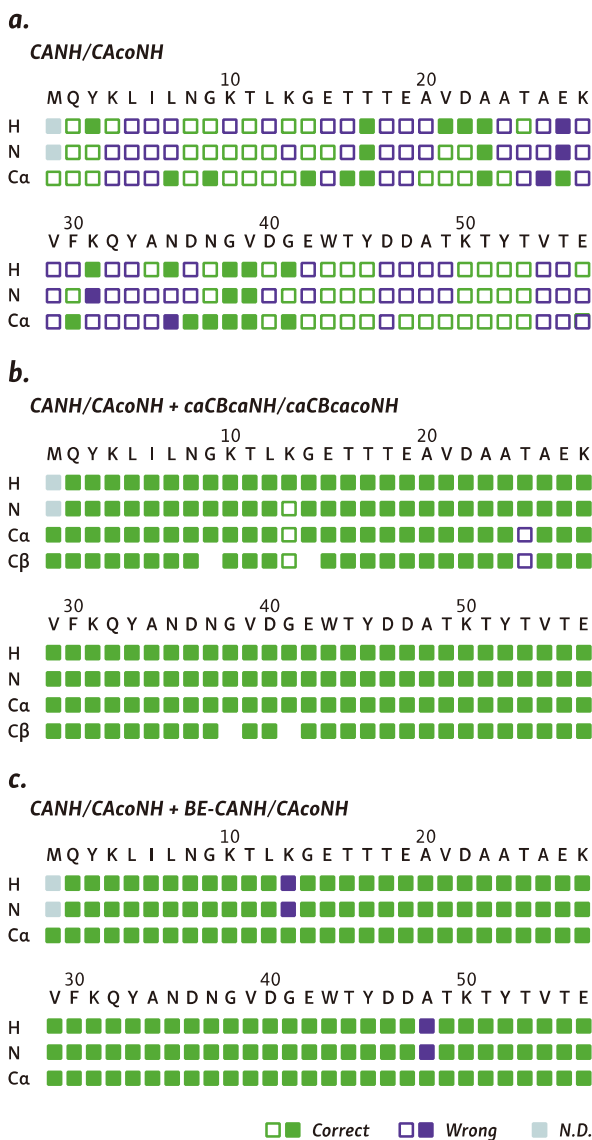


図4 FLYAによる主鎖化学シフト自動帰属結果。緑と紫のアイコンは帰属の正誤を示している。複数回計算を行い、80%以上結果が一致したものは塗り潰されたアイコン、そうではないものは白抜きで表示した。文献 [1] より許可を得て転載 (Copyright 2024 American Chemical Society)。

- [3] Tošner, Z. *et al.* Overcoming Volume Selectivity of Dipolar Recoupling in Biological Solid-State NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 14514-14518 (2018).
- [4] Blahut, J. *et al.* Overcoming Sensitivity-Enhanced Multidimensional Solid-State NMR Spectroscopy by Optimal-Control-Based Transverse Mixing Sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 17336-17340 (2022).
- [5] Manu, V., Olivieri, C., Veglia, G. AI-designed NMR spectroscopy RF pulses for fast acquisition at high and ultra-high magnetic fields. *Nat. Commun.* **14**, 4144 (2023).
- [6] Coote, P. *et al.* Optimal control theory enables homonuclear decoupling without Bloch–Siegert shifts in NMR spectroscopy. *Nat. Commun.* **9**, 3014 (2018).
- [7] Khaneja, N. *et al.* Optimal control of coupled spin dynamics: design of NMR pulse sequences by gradient ascent algorithms. *J. Magn. Reson.* **172**, 296-305 (2005).
- [8] Schmidt, E., Güntert, P. A New Algorithm for Reliable and General NMR Resonance Assignment. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12817-12829 (2012).



田巻 初 (たまき・はじめ)

2014年～2016年 日本学術振興会特別研究員 (DC2：北海道大学)
2016年 北海道大学大学院生命科学院 博士後期課程修了 博士 (生命科学)
2016年～2020年 大阪大学蛋白質研究所 特任研究員
2020年～2021年 株式会社アグロデザイン・スタジオ 研究員
2021年～ 大阪大学蛋白質研究所 特任研究員 (常勤)

横浜市立大学（鶴見キャンパス）の紹介

横浜市立大学 生命医科学研究科 構造エピゲノム科学研究室

池上 貴久

ikegamit@yokohama-cu.ac.jp

横浜市立大学

横浜市立大学（横市大）・生命医科学研究科をご紹介します。駅員のいないJR鶴見小野駅から海に向かって15分ほどレンガ道を歩くと、大きな研究所の建物が見えてきます。この建物は理化学研究所横浜キャンパス（理研）で、その広いキャンパスの海側に横市大の当研究科の小さな建物があります（図1）。同じ敷地内に理研と大学が同居しており、それだけでなく横市大の学生や院生が理研の一部の研究室にも所属して卒業論文・修士論文・博士論文研究ができるという面白い連携システムが作られています。門には理研の守衛があり常に警備員の目が光っているため、少なくとも当研究科内では盗難などの犯罪を聞いたことがありません。安全衛生管理についても、このキャンパス全体で組織されているため安心して頼れるという利点があります。

この鶴見キャンパスが設置されたのは2001年ですが、本部は金沢八景にあります。当大学の起源は、明治15年に設立された横浜商学校に

遡ります。その後、明治5年に設立された横浜共立病院を前身とする横浜医科大学と戦後に統合し、巨大な附属病院（福浦キャンパス）を有する大学へと発展しました。金沢八景キャンパスには、材料系の固体NMRを専門とする物性物理化学研究室（本多尚グループ）が所在しています。また、当大学は教員1人当たりの学生数が3.5人と非常に少なく、これは国内の総合大学の中で第1位、世界では第14位にランクされています。さらに、蛇足ながら「名前がカッコいいと思う公立大学ランキング」でも堂々の第1位に選ばれています。学生は北海道をはじめ全国各地から集まっていますが、自宅通学が可能な「はまっこ」の比率も高いです。また、他県の大学に通学していたものの、大学院進学を機に地元に戻る「里帰り院生」も少なからず見られます。

研究活動

当研究科には18個の研究室がありますが、そのうちの半分は理研、産業技術総合研究所（産



図1 生命医科学研究科の建物とNMR棟

総研)、国立医薬品食品衛生研究所(国衛研)に所属しています。当大学の専任教員によるNMRの研究室としては、機能構造科学研究室(高橋栄夫、坂倉正義)、構造エピゲノム科学研究室(池上貴久、小沼剛)があり、さらにプロジェクト研究室(西村善文グループ)があります。高橋教員はロドプシンなどの膜蛋白質の機能構造、相互作用、ダイナミクスに関する研究を行っています。近年では理研との共同研究で、光照射した状態でのロドプシンのNMR解析により、光反応サイクルにおける過渡的中間体の構造解析に成功しています(2024年度のNMR討論会(札幌)で、学生さんが最優秀若手ポスター賞を受賞しました)。坂倉教員は、神経の髄鞘(ミエリン)において膜接着を担うタンパク質について、その機能発現メカニズムや、疾患を誘発する変異がタンパク質の機能・構造に及ぼす影響を明らかにするための研究を行っています。また、血液・唾液などの臨床サンプルや食品を対象としたNMRメタボロミクス解析にも取り組んでいます。小沼教員は、抗がん剤の創出を目指し、転写調節因子やキナーゼ、糖結合蛋白質に対する低分子および中分子阻害剤の開発を行っており、NMRだけでなくX線結晶構造解析、クライオ電顕、質量分析など、構造生物学分野におけるあらゆるツールを駆使しています。筆者の池上は、解糖系酵素が機能を変える時に起こるとされているサブユニット構成(四次構造)の変化を解析しています。その他、光合成の電子伝達系蛋白質と光化学系との遷移的な相互作用の解析、海綿が産生するジスルフィド結合を3本もつ毒素ペプチドの構造解析などにも取り組んでいます。西村研究室(プロジェクト研)は、先端研究基盤共用促進事業(NMRプラットフォーム)やAMED-BINDSを通じて、企業やアカデミックの解析技術支援を行うとともに、NMRを用いた解析を活用し、転写やクロマチン構造に関連する蛋白質とDNAの構造やダイナミクスの解明を進めています。特に、ヌクレオソームや天然変性蛋白質を対象に、これらが転写制御やクロマチン構造変化に果たす役割を明らかにし、複合体形成に伴う構造変化や認識機構の解明に取り組んでいます。上記のように、当研究科は理研などと連携大学院のシステムを作っており、環境要因解析研究室(菊地淳グループ)がその一例です。実際に4年生や院生が配属されており、卒論、修論、博士論文などに勤しんでいます。菊地教員は

客員として横市大の建物内にも研究室を置いており(NMRは理研の建物内)NMRとAI解析等を組み合わせた「NMRデータサイエンス」や、NMRハードウェアおよびソフトウェア開発も遂行しています。

NMR 設備等

この横市大の建物の1階にはドーム型の構造物が併設されており、その内部にはNMR装置(950, 900, 800, 700, 600, 500, 500 MHz)が設置されています。2002年に国家プロジェクト「タンパク3000プロジェクト」が開始され、それに伴い理研に広大なNMR施設が建造されました。横市大のNMR施設はそれとは独立したものですが、基本的に似たデザインとなっています。唯一の違いは、ドーム内側の木製板の形状であり、横市大では横長の板が使用されているのに対し(図2)、理研では正方形の板が採用されていると聞いています。これらのNMR装置のうち、900 MHz装置は現在は静磁場が入っておらず、一般公開などの際に見学者が上に登り、磁石の上部構造を見学する用途などで使用されています。一方、残りの装置はすべてBruker社製の超伝導シールド磁石を備えており、そのうち1台を除いたすべてに $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 核種対応のクライオプローブ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ プリアンプ冷却)が付属しています。例外となる500 MHz装置には、多核種対応で ^1H コイルを外巻きにした室温プローブが接続されています。この構成からもわかるように、ほとんどの装置は蛋白質などの生体分子を主たる測定対象としています。

ヘリウム・窒素ラインの改修への道のり

これらの装置の分光計や一部の磁石は2014年に一度更新されていますが、建物を含めた施設全体はすでに23年が経過しており、最近では冷暖房設備、クライオプローブの冷却装置、窒素供給装置、ヘリウム回収装置などの故障が相次いでいます。これらの装置のうち700と950 MHzについては、西村先生のNMRプラットフォームを通じた企業からの利用料収入などで維持がなされていますが、それでも毎年の維持費は増加傾向にあり予算を圧迫しています。さらに、近年のヘリウム価格の高騰が追い打ちをかけており、コスト削減の一環として、それまでほとんど稼働していなかったヘリウムガス回収ラインを再稼働させることになりました。以下では、その話を中心に書き

たいと思います。

この施設が建設された際に、ヘリウム (He) ガス回収ラインも同時に設置されました(図3)。NMR磁石から蒸発したHeガスは一旦Heガスバッグ(バルーン)に貯められます。数日経つとバッグが満杯になりますが、レーザーセンサーがそれを感知し、ポンプが作動して金属製のHeガスホルダーにガスを押し込みます。このホルダーが約8気圧近くになると、理研の安全管理室の職員の方がバルブを開き、地下に埋設されたパイプ

を通してHeガスを理研に送ります。理研ではその後、液化処理が行われます。この回収システムは設置当初は正常に稼働していましたが、やがてHeガスの純度が数パーセントにまで低下し、ほぼ使用されない状態が長期間続いていました。そこで、理研安全管理室の池田靖雄様に相談した結果、まずどこで純度が低下しているのかを調査することになりました。しかし、専門業者による調査には非常に高額な費用がかかるため、私たち教員だけで対応することにしました。具体的に



図2 ドーム型の建物内の950 MHz NMR装置

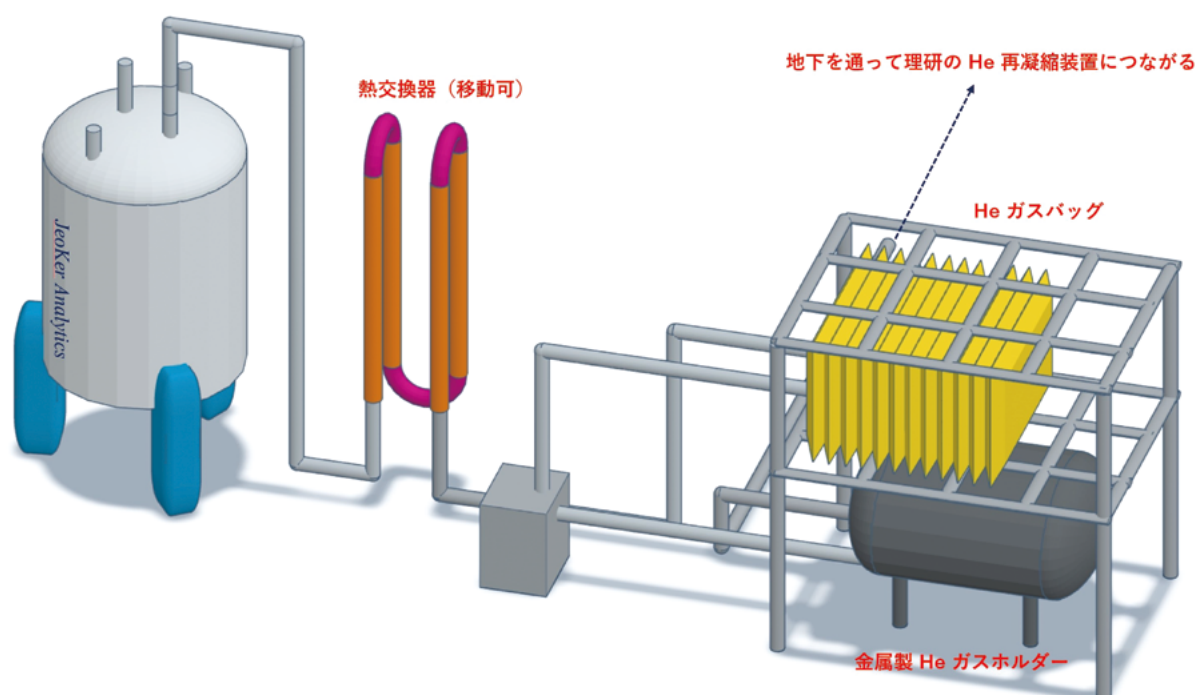


図3 Heガス回収ライン装置

は、パイプラインを節ごとに閉鎖し、He ボンベからの高圧ガスを封入して内圧が数日間で減少するかどうかを観察するという、地道な作業を行いました。地下に埋設されたパイプまではチェックできなかったものの、床下や天井裏のパイプについては建物の設計図をもとに懐中電灯を手に潜り込み、蜘蛛の巣を払いながらパイプに亀裂や損傷がないかを確認しました。その結果、これまでいくつかの大きな地震を経験しているにもかかわらず、回収ラインの金属製パイプにはガス漏れが一切ないことが確認できました。

次に可能性として浮上したのはHe ガスバッグでした。しかし、目に見えてガスが表面から吹き出しているわけではなく、ガスバッグに穴が開いているとは考えにくい状況でした。最終的にHe ガス簡易純度計を購入し、脚立に登ってガスバッグの表面をセンサーでなぞったところ、微量ではありますが、確かにガスバッグの表面から漏れているHe ガスが検出されました。とはいえ、漏れている量は非常に少なく、それだけで数日から1週間でガスバッグ内のHe ガスの9割以上が空気に置き換わるという仮説には大きな疑問がありました。ガスバッグの交換費用は非常に高額で、大学当局に経費補助を申請しても毎年却下されました。それでも諦めず、費用対効果を学長に直接説明した結果、数年前にようやく交換が認められることになりました。しかし、ガスバッグの劣化が本当に原因であるのか、それとも理研への地下パイプに亀裂があるのではないかといった疑念がつきまといました。そのため、もしガスバッグを交換しても効果が得られなかった場合には、自分たちで責任を取る覚悟でした。そして、交換後初めてのHe ガス回収が行われ、理研から純度100%との報告を受けた時、長年の努力がようやく実を結んだと実感し大きな喜びを感じました。

ところが、もう一つ新たな課題がすぐに発生しました。平常時に蒸発したHe ガスは回収ラインを通じて回収することに成功しましたが、NMR 磁石に液体He を充填する際に溢れ出るHe ガスは、温度が極めて低いため、ステンレス製の回収ラインに流し込むことができないことが判明しました。この場合、He の平均回収率は半分程度にとどまってしまいます。この充填時に発生する冷たいガスを回収するためには、まずガスを温めたうえで回収ラインに流す必要がありました。そこで、ガスを加温できるような装置を調査するため、

理研を訪問して見学を行いました。しかし、業者さんからの説明によると、そのような装置の製造には数千万円以上の費用がかかるということで、実現は非常に困難だと感じられました。そこで知人の業者に相談したところ、手作りで設計・製造することで対応可能かもしれないという提案を受けました。特に950MHz磁石への液体He充填では、大量の冷たいHe ガスが発生するため、これを室温にまで温めるのは容易なことではありません。また、電気を使用せず、放熱板を用いて室温で自然にガスを温める熱交換器を採用することにしました。その際、放熱板を備えたパイプが長すぎると、磁石に背圧がかかり、液体He充填時にクエンチを引き起こすリスクがあることも心配でした。これらの条件を慎重に検討・調整した結果、持ち運び可能な簡易装置を製作し、すべてのNMR装置で100%のHe回収率を達成することができました。この装置では放熱板を備えたパイプの長さが予測どおりに最適化されており、950MHzでも出口のHe ガスは室温とほぼ同じ温度となることを確認しました。その完成度の高さに、業者さんとともに大いに喜んだことを覚えています。

このようにして、Heのコストを少しでも抑えることができるようになりましたが、最近は液体窒素供給におけるトラブルも見受けられるようになってきました。この施設にはNMR磁石に自動で液体窒素を充填できるパイプラインが備わっていますが(図4)、その断熱配管の真空度が低下しており、充填前にパイプ内の圧力が急上昇し、エラーを引き起こしてしまうことが問題でした。本来であれば専門業者に真空引きを依頼するのが最善ですが、その作業費用は非常に高額で、毎年高級車を購入できるほどの金額がかかります。そこで、この問題についてもできる限り自力で解決することを目指しました。この配管の真空口は特殊な設計だったため、まず専門業者に依頼して型を同定してもらいました。その後、業者さんと相談しながら真空ポンプや真空口の接続部品の仕様を決定しました。その結果、驚くほど低コストで真空ポンプシステムを構築することができました。今後、このシステムを用いて数十か所の真空引きを行うには相應の時間がかかると予想されますが、この取り組みによりNMR用のみならず、横市大鶴見キャンパス全体での液体窒素供給における圧力トラブルを大幅に削減できるものと期待しています。



図4 700, 800 MHz NMR装置と天井下の液体N₂供給ライン

さいごに

プロジェクト研の栗田教員は、かつてVarian社で優秀なアプリケーションエンジニアとして活躍していた経験を持ち、磁石や分光計、ガスラインなど、さまざまな箇所の故障をある程度まで自力で修理することができます。また、故障の原因を突き止めたうえで、専門業者と協議し、最も効率的な解決策を導き出すことも可能です。液体窒素

やHeの充填、故障時の対応においては、装置ごとの担当区分にこだわらず、全メンバーで情報を共有し即対応することで、マシンタイムを分け合い、経費の削減だけでなく研究効率の向上を目指しています。このように、横浜市大のNMRメンバーは、老朽化が進むNMRの維持という共通課題を通じて結束を深めており、この変化は研究内容にも良い影響を与え始めているように感じられます。



池上 貴久 (いけがみ・たかひさ)

1991年 3月 大阪大学 理学部 生物学科 卒業
 1991年 4月 株式会社日立製作所 計測器事業部 入社
 1994年 4月 大阪大学 大学院理学研究科 生物化学 修士課程 入学
 1997年 4月 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 助手
 1999年 3月 博士号取得 (理学生物化学 大阪大学)
 2000年 11月 フランクフルト大学 (Prof. Griesinger) JSPS海外特別研究員
 2001年 10月 ゲッティンゲン マックスプランク研究所 同上
 2002年 3月 大阪大学 蛋白質研究所 助教授
 2007年 4月 蛋白質研究所 および 生命機能研究科 (兼任) 准教授
 2014年 4月 横浜市立大学 生命医科学研究科 教授 現在に至る

味の素株式会社 バイオ・ファイン研究所 評価・分析室 構造解析グループ 構造物性相関ユニットのご紹介

味の素株式会社 バイオ・ファイン研究所 評価・分析室 構造解析グループ

田中 誠人

masato.tanaka03.tq9@asv.ajinomoto.com

1. はじめに

今年の7月に社内異動で構造解析グループ配属になり、NMRを用いた分析・研究開発を行っております。学生時代には低分子有機化合物の単結晶X線構造解析を用いた研究を行っており、入社後は味の素®のプロセス開発や次世代食品素材開発を担当していました。NMRを用いた分析・研究開発はまだ始めたばかりですが、先日北海道で開催された第63回NMR討論会に参加し、ポスター発表いたしました^[1]。

2. 味の素株式会社について

味の素株式会社は、池田菊苗博士による昆布のうま味成分であるグルタミン酸の発見、創業者である鈴木三郎助による調味料味の素®の製造販売をスタートとして、アミノ酸の生産とその機能研究を根幹として、食品や医薬品、化粧品や電子材料など様々な事業を展開してきました。現在では4つの成長領域として、ヘルスケア：治療や予防の進化と健康寿命の延伸への貢献、フード&ウェルネス：食を通じたWell-beingと自己実現への貢献、ICT：半導体の進化とスマート社会への貢献、グリーン：新しい食のスタンダードの創造と循環



第63回NMR討論会ポスター発表の様子

型バイオサイクルへの転換、といった事業目標が設定されています。味の素株式会社には、食品研究所と私が所属するバイオ・ファイン研究所、二つの研究所があります。テレビコマーシャルの印象の通り、食品企業の側面がある一方で、医薬用アミノ酸やバイオ医薬品製造技術、再生医療用培地、遺伝子治療や細胞治療、化粧品や半導体基板に使われる絶縁材料など、医学や化学を基盤とした様々な事業の側面もあります。

3. 分析業務

研究所では、新しい製品やサービスの基となる基礎的な研究から、レシピや生産プロセス開発など、商品化に至る様々なプロセスを多くの部門が連携して仕事をしています。そのような中で分析部門は、研究開発において主に二つの役割を担っています。一つは品質保証であり、安心と安全を守るため製品が定められた基準を満たしているかを判断すること、あるいはそのための新規分析法を開発することです。もう一つは、開発現場では解決不可能な問題の原因究明や未知なる現象を“発見し解決に導く”ことです。何れにおいても分析研究者が苦心するのは、溶液から固体まで様々な性状の試料に対し適切な分析法を適用し、限られた時間の中で問題解決に繋げる、ということです。分析部門には広い事業領域を反映して、溶液から固体、その混合物など様々な性状のサンプルが持ち込まれます。分析の目的も成分研究から構造物性相関まで実に幅広く、何か一つの分析法だけで解決できるとは限りません。サンプル性状に応じた前処理、関心事を適切に捉えるための検出法の選択など、戦略を考えることが重要です。

4. NMR 設備について

上述のように様々な性状の試料に対応するため、

溶液NMR、固体NMR、MRIなど、ほぼ全てのNMRの機能を有しています。NMRの面白いところは、サンプルの性状を問わないことに加え、無限ともいえる様々な測定法が存在し、状況に応じて柔軟に分析戦略を構築できる点です。食品、たとえば“だし”であれば、 ^1H -NMR測定では溶解している成分が漏れなく検出されることから呈味を俯瞰していると言えます^[2]。また、ダイコンの煮熟調理であれば、調理の各段階のサンプルを固体NMRの様々な手法で測定することで、細胞壁の成分が柔らかくなる様子が分子のレベルで判ります^[3]。私は現在、酵素の動的な性質を溶液NMRの手法を用いて研究しています。生産性向上や環境負荷低減を目指し、循環型バイオサイクルの実現を目指す我々は、化学的プロセスを置き換え可能な酵素について、その機能と性能を正確に理解し制御する方法を見つける必要があります。複雑な酵素反応を理解するためには従来の比色定量法では限界があり、NMRの網羅性を活かし、化学反応の変化をリアルタイムかつ定量的に評価する手法が必要であると考えています^[1]。

5. おわりに

私の所属する構造物性相関ユニットでは、求める機能が発現する要因を捉え、課題解決の道筋を

最短距離で提案できることが求められます。NMRは重要な分析手法ですが、成分分析であれば各種クロマトグラフィー技術^[4]や質量分析、高次構造解析であれば放射光X線など^[5]、相補的な分析手法との連携も大事です。NMRの世界観を体感しつつ、課題解決の道筋を最短距離で立てられるよう、広い視野と知識を持って日々研究に取り組みたいと考えています。

文 献

- [1] 田中 誠人, 藤井 英里, 小野 拓人, 杉野 多美, 山口 秀幸 NMRを用いたオリゴ糖を基質とする酵素の反応速度論的解析. 第63回NMR討論会, P15 (2024).
- [2] 山口 秀幸, 関山 恭代 NMRフードミクス. 先端の分析法 第2版 第5章 食品 2, 681-686 (NTS, 2022).
- [3] Tsuchida, M., Yamaguchi, H., Katayama, N., Sato, Y., Kawashima, W. & Kasai, M. Structural changes in cell wall of Japanese radish accompanied by release of rhamnogalacturonan during pressure cooker heating. *Food Chem* **349**, 129117 (2021).
- [4] Kanbayashi, Y., Tsutsumi, Y., Mizukoshi, T. & Yamaguchi, H. Development of an LC-NMR System Using a Diode Array Detector and a Charged Aerosol Detector. *BUNSEKI KAGAKU* **69**, 151-155 (2020).
- [5] Ohmoto, C., Taguchi, T., Onishi, M., Yamaguchi, H., Sekita, M., Hashimoto, T., Hirata, Y., Katsuno, N. & Nishizu, T. Retrogradation inhibition and intragranular distribution in cooked rice by addition of α -glucosidase (AG) and branching enzyme (BE). *Food Chem* **456**, 140049 (2024).

ICMRBS 2024 参加報告書

横浜市立大学大学院生命医科学研究科 修士2年
鈴木 陽茉梨

この度、日本核磁気共鳴学会の2024年度第1回若手研究者渡航奨励金のご支援を賜り、2024年8月18日～23日に韓国ソウルにて開催されたICMRBS (International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems) 2024に参加いたしました。本奨励金により国際学会に参加させていただきただけましたことを、日本核磁気共鳴学会会長 木川隆則先生、故京極好正先生、故阿久津政明先生、ご家族の皆様、並びに関係者の方々に心より御礼申し上げます。

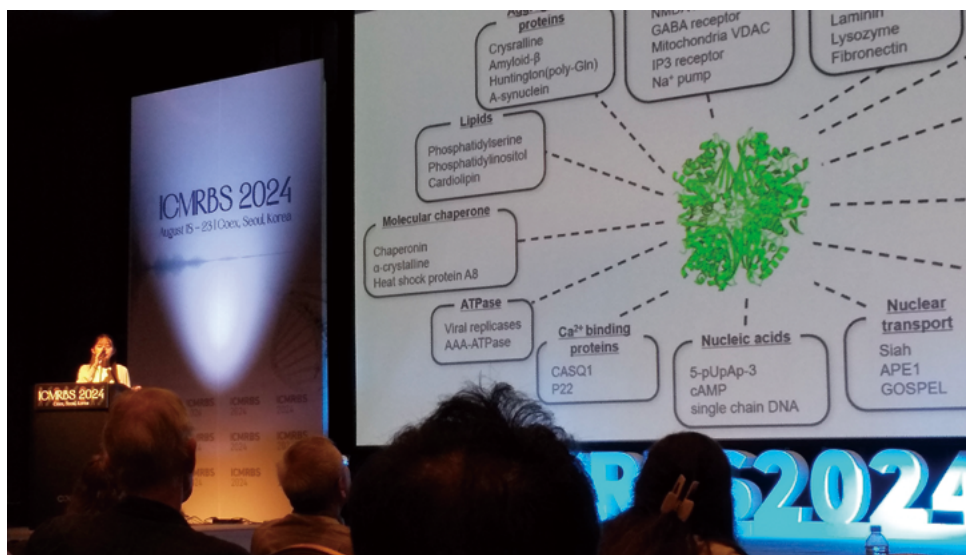
開催会場のCOEXは2000年にASEM (アジア欧州会合) が開催されたことで有名になった会場です。さらに併設されているショッピングモールには有名な「ピョルマダン図書館」や韓国最大規模の水族館があることから、国内外から多くの観光客が訪れており、国際都市であることが感じられました。

本学会はICMRBSが60周年 (30回目) を迎える節目の会であり、29か国から600人を超える参加者が集まり、生体分子を中心にAI-NMRやNew methodologiesまで幅広い演題での発表がありました。私は「Dynamics analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)」という題目

でポスター発表とLightning talkを行いました。解糖系酵素として知られてきたGAPDHが解糖系以外の機能にも関与することから、GAPDHの相互作用を制御する仕組みを解明すべく研究を進めています。この度は、ホモ四量体GAPDHが低温変性条件下でATPによって二量体を維持することやGAPDHとmRNAの相互作用モデルについて報告しました。ポスター発表ではGAPDHを他の系 (光合成) で研究している方やGAPDHが相互作用する相手側の分子を研究されている方など様々な方と議論をすることができ、測定条件や方法、研究方針について質問やコメントをいただき非常に学びの多い時間になりました。また、Lightning talkは1分間という短い時間での発表でしたが、招待講演の直後であったため、大勢の人が集まっている中での発表となり、非常に貴重な経験となりました。講演の中ではソウル大学のPark Sunghyoun先生の「Live Metabolomics with NMR: Real-Time Metabolic Monitoring」というご発表が個人的に興味深かったです。 ^{13}C ラベルした大腸菌を食べた線虫を直接サンプル管に入れ、3時間NMRで代謝物を測定し、ロックアウトの種類によって代謝経路に及ぼす影響を調べた研究でした。3時間の測定の中



COEX Convention Center ロビー



Lightning talk

でグルコースの割合などが大きく変化しており、生きた状態で代謝物の変化を追跡することの重要性が感じられた内容でした。本学会を通して論文や書籍で拝見してきた著名な先生方のお話を生で聞くことができ、今まで学んできたことをより一層身近に感じられるようになりました。

また、プログラム内のイベントを通して様々な国の方と交流したことも良い思い出となりました。Student nightでは韓国・中国・ベトナムの方たちとともに実験の話やMBTIの話題で盛り上がり、Excursionではアメリカ・スイスの方と五味子茶（韓国の伝統的なお茶）を飲みなが

らそれぞれの地域の言語について語ったりしました。私は以前より韓国語を学んでいたため、現地では英語だけでなく韓国語で会話したり、ポスター発表を行ったりしました。言語も活かすことができ、より一層充実したものとなりました。

本学会の参加にあたり、多大なるご指導・ご支援いただきました池上貴久先生に深く感謝申し上げます。最後に、貴重な機会を与えてくださいました日本核磁気共鳴学会に重ねて御礼申し上げます。本学会で得た経験を活かしていけるよう今後も精進してまいります。



Student night (右手前から2人目が筆者)



五味子茶（オミジャ茶）

「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。

2024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例年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）

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）

各審査員の審査結果を得て、2024年7月11日、審査員全員および松木 陽（各賞担当理事、選考委員会委員長）、石井佳誉（各賞担当理事、オブザーバ）、木川隆則（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2024年度（第5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2024年9月30日ニュースレターにて本会員全員に配信されました。おめでとうございます。

2024年度進歩賞受賞者（順不同、敬称略）

犬飼 宗弘（徳島大学）

齋尾 智英（徳島大学）

上記の受賞者には第63回NMR討論会（札幌）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。



左から八島 秀仁氏^{*1}、齋尾 智英 氏、犬飼 宗弘 氏、木川 隆則 学会長、末松 浩人 氏^{*2}

^{*1}ブルカージャパン株式会社 バイオスピン事業部 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

2024年度学会顕彰：若手ポスター賞

第63回NMR討論会(2024) 若手ポスター賞について

今年度の『若手ポスター賞』には、前年より大幅に多い35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7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大陽日酸社、セティ社からのご厚志による副賞の授与もおこないました。若手ポスター賞の趣旨や応募資格など、詳しくは第63回NMR討論会(2024)のホームページ「若手ポスター賞」(<https://nmr63.mons.work/poster-award>)をご参照下さい。

選考にあたっては、まず35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名の利益相反のない評価者により、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、木川会長より賞状が授与され、副賞として賞金と記念のトロフィーが昭光サイエンス社と大陽日酸社より贈られました。ついで、優秀若手ポスター賞2名に賞状が授与され、副賞として昭光サイエンス社と大陽日酸社よりそれぞれに賞金と記念のトロフィーが贈られました。さらに7名の若手ポスター賞受賞者を選び、賞状と副賞として賞金が贈られました。またポスター賞を得た全員に対してセティ社から副賞のワインが贈られました。受賞者のお名前、所属、発表題目は以下の通りになります。

■最優秀若手ポスター賞

P12Y 廣西 麗加 横浜市立大学大学院 生命医科学研究科

溶液NMR法を用いた光駆動膜タンパク質 RxRのプロトン放出メカニズムの解析

■優秀若手ポスター賞

P06Y 熊代 宗弘 徳島大学 先端酵素学研究所

シャペロンのフォールディング制御における過渡的複合体の特性解析

■優秀若手ポスター賞

P08Y 重見 圭汰 東京大学大学院 薬学系研究科

NMRを用いたGTP生合成の律速酵素 IMPDH2の活性制御機構の解明

■若手ポスター賞7件

P48Y 稲井 開陸 徳島大学大学院 創成科学研究科

メカノケミカル合成によるDNP-MRI分子プローブのtriplet DNP

P18Y CHEN YIRAN (陳 伊然) 京都大学大学院 理学研究科・生物科学専攻

The study of molecular details of the interaction between α Synuclein and G4RNA

同率6位2名

P36Y 金田 治輝 住友金属鉱山株式会社

固体NMRおよび計算科学を活用したリチウムイオン電池用Ni系
層状正極材料の局所構造解析

P50Y 松田 勇 東京工業大学 生命理工学院

家族型アルツハイマー病におけるE22G A β 40線維から自然型A β イソフォームへのクロスシーディング

同率8位 3名

P42Y 佐藤 晴紀 徳島大学大学院 創成科学研究科

磁場中共結晶化による偏極リレーを用いたピルビン酸のTriplet-DNP

P54Y 加藤 賢 大阪大学 蛋白質研究所

高速MASによるタンパク質に結合した小分子の ^1H - ^{14}N NMR測定

P78Y 澤田 侑大 九州大学大学院 工学府応用化学専攻

マイクロ波フリーで駆動する偏極技術による高感度MRIの実現に向けた分子群の探索

各賞担当理事 松木 陽、石井佳誉



左から岩田^{*1}、村上^{*2}、澤田、加藤、佐藤、重見、松田、廣西、金田、熊代、稲井、陳、
種市^{*3}、木川

^{*1}岩田和則 昭光サイエンス株式会社 代表取締役社長

^{*2}村上祐児 太陽日酸メディカル事業本部 SI事業部長

^{*3}種市大喜 セティ株式会社

NMR学会からのお知らせ

日本核磁気共鳴学会の決定事項

2024年度 通常総会

日 時：2024年10月30日（水）11：00～12：00

会 場：北海道大学 学術交流会館

出席者：91名 委任状：97名 合計188名

1. 開会の辞
2. 会長挨拶（木川）
3. 第63回 NMR 討論会（2024）世話人（相沢）挨拶
4. 事業報告
5. 2023 年度収支決算の承認
6. 2024 年度中間報告の承認
7. 2025 年度収支予算案の承認
8. 会則および細則改定の承認
9. 2025 年度役員（評議員（2025-2026））の選任
10. 入会案内HPの文言修正について
11. 第64回 NMR 討論会（2025）世話人（山内）挨拶
12. その他
13. 閉会の辞

会員数

会員種別	2022年 9月30日	2023年 9月30日	2024年 9月30日
正会員	390	381	394
学生会員	137	134	142
名誉会員	12	13	15
賛助会員	7	8	9
合 計	546	536	560

* 定足数 [一般会員394名 (2024年9月30日現在)]
/5 = 79名

* 資料に基づき全て承認された。

役員名簿

会長

木川 隆則 理化学研究所 第12期会長
(R6-R7)

理事会長 (*) 副会長 (**)

相沢 智康 北海道大学

浅野 敦志** 防衛大学校

池上 貴久 横浜市立大学

石井 佳誉 東京工業大学
加藤 晃一 自然科学研究機構
木川 隆則* 理化学研究所
武田 和行 京都大学
野村 薫 サントリー生命科学財団
松本 陽 大阪大学
宮ノ入 洋平 大阪大学蛋白質研究所

会計監査 (R6-R7)

北原 亮 立命館大学
竹内 恒 東京大学

評議員 (R6-R7)

池上 貴久 横浜市立大学 生命医科学研究科
構造エピゲノム科学
池谷 鉄兵 東京都立大学理学研究科化学専攻
石井 佳誉 東京工業大学
梶 弘典 京都大学 化学研究所
分子材料化学研究領域
片平 正人 京都大学 エネルギー理工学研究所
加藤 晃一 自然科学研究機構
生命創成探究センター
児嶋長次郎 横浜国立大学 工学研究院
佐藤 一 ブルカー・バイオスピン (株)
楯 真一 広島大学大学院理学研究科
数理分子生命理学専攻
鳥澤 拓也 中外製薬株式会社
野田 泰斗 京都大学大学院理学研究科
化学専攻
野村 薫 サントリー生命科学財団
生物有機科学研究所
宮ノ入洋平 大阪大学蛋白質研究所
矢澤 宏次 日本電子株式会社
山田 和彦 高知大学総合科学系複合領域
科学部門

評議員 (R5-R6)

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
齋尾	智英	徳島大学
坂本	泰一	千葉工業大学
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	旭化成ファーマ株式会社
谷中	冴子	九州大学
山内	一夫	沖縄科学技術大学院大学

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

太陽日酸株式会社

日本電子株式会社

ブルカージャパン株式会社

Magritek

株式会社 Resorna

令和7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 (2024-2025 年度)

編集委員長	西山 裕介	JEOL
副編集委員長	相沢 智康 松木 陽	北海道大学 大阪大学
編集委員	池上 貴久 池谷 鉄兵 川村 出 菊地 淳 児嶋長次郎 齋尾 智英 佐藤 一 枋尾 尚哉 鳥澤 拓也 野村 薫 橋本 康博 福士 江里 三島 正規 村上 美和	横浜市立大学 東京都立大学 横浜国立大学 理化学研究所 横浜国立大学 徳島大学 ブルカー・バイオスピン 理化学研究所 中外製薬 サントリー生命科学財団 旭化成 北海道大学 東京薬科大学 京都大学

NMR*Bulletin of the Nuclear Magnetic
Resonance Society of Japan***Vol.14 No.1 & 2**

2025 年 2 月 28 日発行

発行：日本核磁気共鳴学会

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