

会長メッセージ 木川隆則

巻頭エッセイ 神田大輔

総説論文：解説 犬飼宗弘、齋尾智英

NMR講座：NMR基礎講座 福士江里

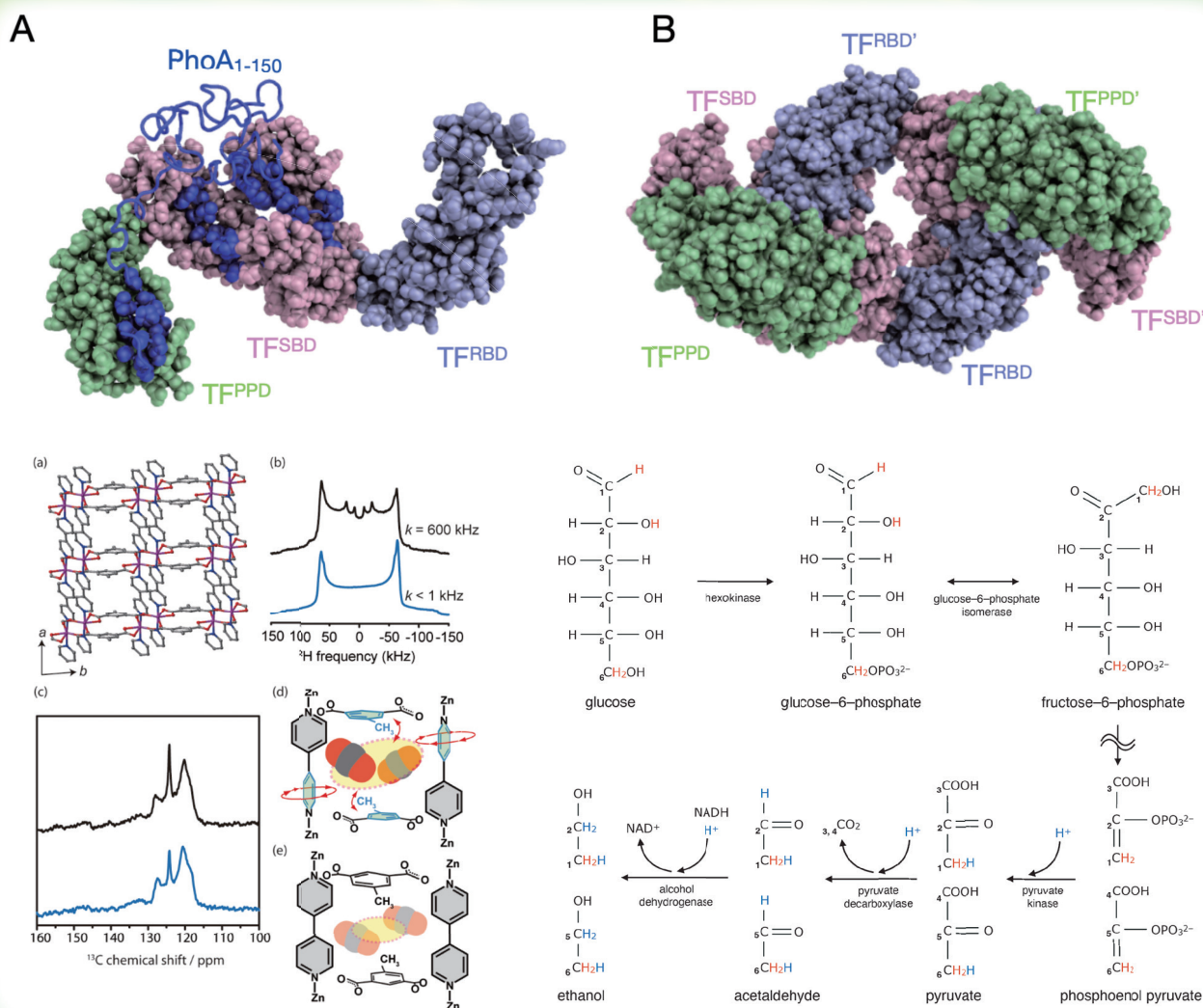
研究論文：研究報告 小椋賢治、水谷 廉

会員便り：研究室便り 相沢智康

会員便り：若手NMR研究室便り 松田 勇

会員便り：海外学会参加報告 田村真生、首藤佑輔、河端夏輝

追悼抄 朝倉哲郎



表紙の図

(上 段): “分子シャペロンの構造機能解析”(図3)

徳島大学先端酵素学研究所 齋尾 智英先生

(下段左): “結晶の個体NMR解析と機能発現”(図1)

徳島大学大学院社会産業理工学研究部 犬飼 宗弘先生

(下段右): “安定同位体比分析による清酒の鑑定”(図4)

石川県立大学 生物資源環境学部 小椋 賢治・水谷 廉先生

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)

株式会社 シゲミ

ブルカージャパン 株式会社

日本電子 株式会社

太陽日酸 株式会社

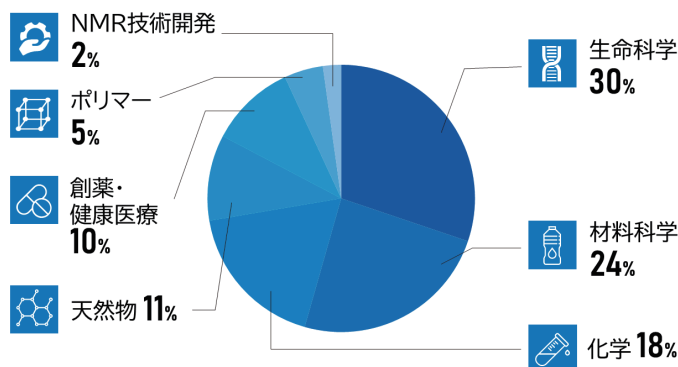
株式会社 エルエイシステムズ

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、生命創成探究センター、大阪大学、広島大学の8機関がネットワークを形成して、産官学の皆様に先端的なNMR設備へのアクセスを提供しています。2021年-2024年の4年間で設備を使用した研究成果が468報発表されています。

NMRプラットフォームは、様々な分野で利用されています。



※2021-2024年の4年間に於ける理化学研究所NMR外部利用者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

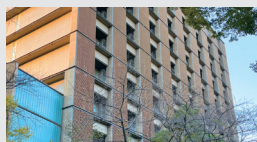
- 3台の高磁場溶液NMR
- サンプルチェンジャーによる多検体自動測定



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

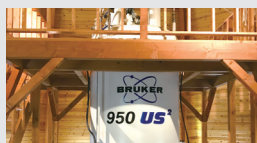
- 世界最大規模のNMRラインナップ
- 安定同位体標識技術



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
600MHz/700MHz/
800MHz/950MHz

生命創成探究センター

- 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

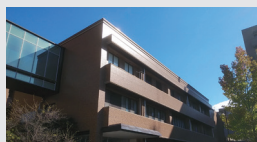
- 最高性能の溶液NMR装置群と¹⁹F化合物ライブラリーによるスクリーニング
- 超高感度DNP-NMR装置



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

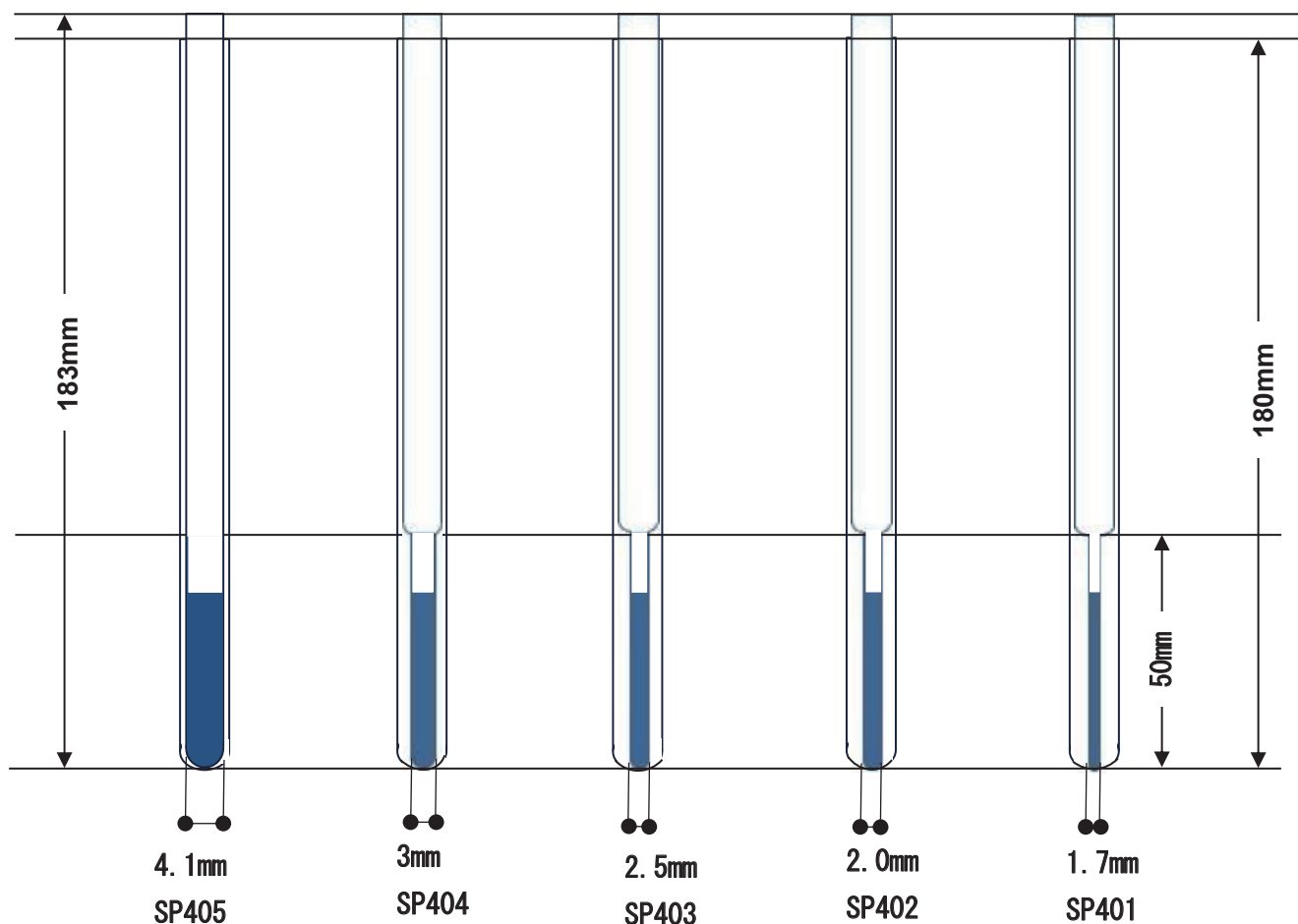


<https://nmrpf.jp/>

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せん。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)



NMR
SHIGEMI

Mail: info@shigemi.co.jp TEL:042-624-2207 FAX:042-622-0937

“卓上型NMR”という選択肢

ランニングコストを抑え、合成反応の確認をお手軽に

- ▶ 液体ヘリウムを使わず単相100Vで稼働
- ▶ 幅70cm×奥行60cm×高さ50cmでコンパクト
- ▶ 二次元測定等の様々なNMR測定にも対応
- ▶ 業界スタンダードソフトTopSpinで高度な解析も可能

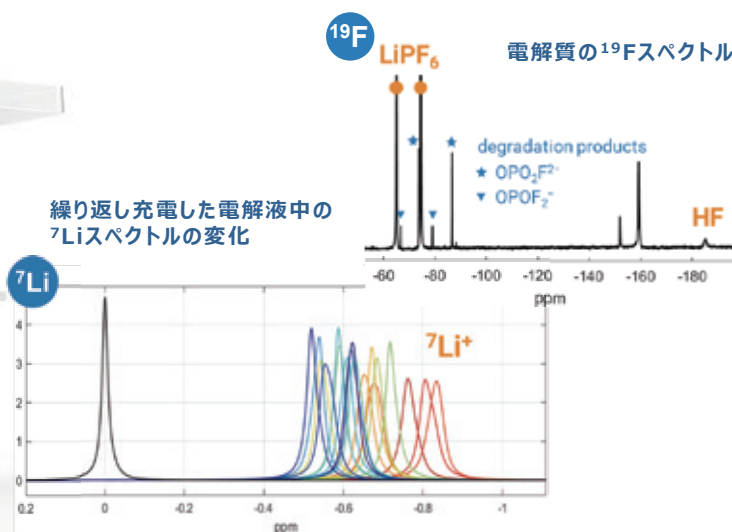


卓上型FT-NMR Fourier 80

『Multi Talent (多核モデル)』登場

NEW

- ▶ ^1H はもちろん、多核は ^{19}F , ^{31}P , ^{13}C , ^{29}Si , ^7Li , ^{15}N 等 計15核種に対応
- ▶ 手動のチューニング・マッチングは不要
- ▶ ^1H デカップリングや二次元測定がTopSpinライブラリに多数標準搭載



ブルカージャパン株式会社
バイオスピン事業部
info.BBIO.JP@bruker.com
www.bruker.com

本社（横浜営業所）

〒221-0022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町 3-9
TEL：045-444-1390

大阪営業所

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

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

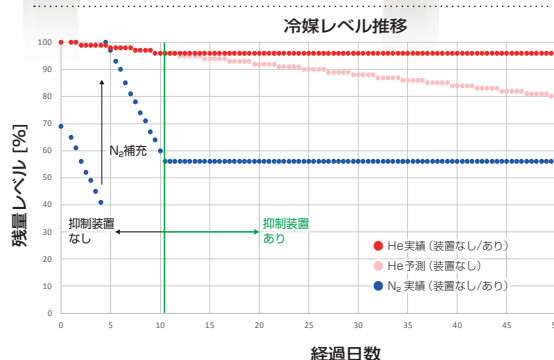
昨今の液体ヘリウムへの不安・心配解消へ



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

Stable Isotope for Structural Biology

We supply high quality stable isotope labeled compounds for NMR research at affordable prices.

Cell-Free Protein Expression Service

We offer protein expression service of intracellular proteins, secretory proteins, and membrane proteins. You can easily inquire from our website.

- Template DNA design and preparation
- Reaction condition screening
- Yield and solubility assay
- Large scale synthesis



Cell-Free Protein Expression Kit

This kit was developed under RIKEN's license of advanced cell-free protein synthesis technology. E.coli-based system can express various types of proteins including antibodies and membrane proteins in large quantities, quickly and easily. Also, stable isotope labeling can be performed with high efficiency.



■ Features - Cell-Free Protein Expression Kit Start
You can easily try cell-free protein synthesis. Six reactions of small scale (0.1 mL) synthesis can be carried out with included microdialysis devices. The kit is suitable for expression yield /solubility assay and reaction condition optimization.

Product No.	Product name	Qty	Storage temperature
A183-0242	Cell-Free Protein Expression Kit Start	1 kit (0.1 mL x 6 rxn)	-80°C
A89-0126	Cell-Free Protein Expression Kit SISS	1 kit (1 mL x 1 rxn)	-80°C
A29-0059	Cell-Free Protein Expression Kit SI	1 kit (1 mL x 1 rxn)	-80°C

◎ Linear template DNA prepared by PCR can be used.

This product was developed with the support of the Japan Science and Technology Agency.

Stable isotope labeled amino acids / Membrane protein expression additive for Cell-Free Protein Expression Kit

■ Stereo-Array Isotope Labeled Amino Acids

Please feel free to contact us.

■ Stable Isotope Labeled Amino Acids

Product No.	Product name	Qty
A107-0144	Amino Acids Mixture Solution-d	1 mL
A39-0072	Amino Acids Mixture Solution-UL- ¹⁵ N	1 mL
A41-0074	Amino Acids Mixture Solution- ¹⁵ N, d	1 mL
A40-0073	Amino Acids Mixture Solution-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1 mL
A42-0075	Amino Acids Mixture Solution-UL- ¹³ C, ¹⁵ N, d	1 mL
A91-0128	Amino Acids Mixture Solution-Lys, Arg-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1 mL
A92-0129	Amino Acids Mixture Solution-Lys, Leu-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1 mL
A108-0145	Amino Acids Mixture Solution-SeMet	1 mL

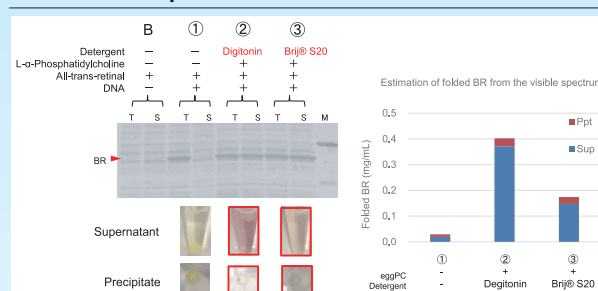
Contains 20 kinds of amino acids.

■ Additives for membrane protein expression

Product No.	Product name	Qty
A226-0290	Membrane protein expression additive SetA	1 kit

Membrane protein expression example

Bacteriorhodopsin



Purplish brown color represents proper folding of Bacteriorhodopsin.

Applications

- ◎ High-throughput protein expression, cytotoxic protein expression, mutant expression
- ◎ Protein expression for multidimensional NMR, cryo-electron microscope, X-ray diffraction, neutron diffraction, etc.
- ◎ Stable isotope labeled protein expression for mass spectrometry

Nucleic acid

- 10%, 20% Phosphoramidites (¹³C, ¹⁵N, d)
- NTPs / NMPs (¹³C, ¹⁵N, d) ● RNA / DNA oligomer custom synthesis

Culture medium

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

Amino acid / keto acid

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

Others

- Deuterated NDSB ● Lanthanide Tag
- Water-¹⁷O (10-90atom%) ● Pf1 NMR Cosolvent

* Please feel free to contact us. We can provide a specialized catalog for Biomolecular NMR.

TAIYO NIPPON SANSO Corporation
SI Division



TAIYO NIPPON SANSO
The Gas Professionals

ISOTEC™



*Prices are excluding tax.

NMRシステム, 固体NMRアクセサリ

LAS

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



高品質で革新的なNMRシステム「Quantum II」400MHz~600MHz

**NMR完全自動化で、快適かつ
高効率な測定環境を実現**

既存マグネットを活かした柔軟な
システムアップグレードが可能



【システムの特長】

- 2H/19F Digital Lock Systemにより
ロック核のシームレス切替を実現
- AIチャットツール「NMR Chat™」に
よるスペクトルベースの構造予測機能
を無料で提供



Elevating your science

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)



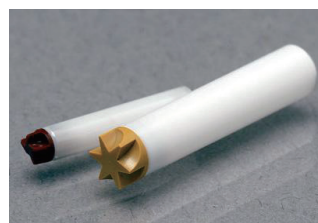
HXY Premium プローブ



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)

NMR

*Bulletin of the Nuclear Magnetic
Resonance Society of Japan*

Vol. **15** No.1

August 2025

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 木川 隆則	3
●巻頭エッセイ 無構造生物学 神田 大輔	4
●総説論文：解説 結晶の固体NMR解析と機能発現 犬飼 宗弘	8
分子シャペロンの構造機能解析 齋尾 智英	16
●NMR講座：NMR基礎講座 未知化合物 X の構造を推定せよー 低分子化合物の溶液NMRによる構造決定演習 ー（第四回） 福士 江里	24
●研究論文：研究報告 安定同位体比分析による清酒の鑑定 小椋 賢治、水谷 廉	33
●会員便り：研究室便り 北海道大学におけるNMR装置の共用事業 第63回NMR討論会開催 蛋白質科学研究所の紹介 相沢 智康	41
●会員便り：若手NMR研究室便り 第24回若手NMR研究会開催報告 松田 勇	45
●会員便り：海外学会参加報告 ENC-ISMAR 2025 参加報告書 田村 真生	49
EUROMAR2025 参加報告書 首藤 佑輔	51
EUROMAR2025 参加報告書 河端 夏輝	53
●追悼抄 追悼～安藤勲先生～ 朝倉 哲郎	55

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、幅広い分野で重要な役割を果たす必須の計測手法です。近年では、高磁場化や高感度化、自動化といった機器開発や技術革新が進み、それに伴い創薬、代謝物動態の解析、次世代電池の研究など、社会的課題やイノベーションに直結する分野への応用も広がり、NMR分野は今なお発展を続けています。

日本核磁気共鳴学会は、NMRに関わる研究者のみならず、機器メーカー、試料調製、解析サービスなどの関連企業も参加する学会として、国内NMRコミュニティの中核を担ってきました。学会の主要活動である「NMR討論会」は、多様な会員が一堂に会し交流する場を提供し、新たなアプローチや協働のきっかけを創出することで、分野の継続的な発展に大きく貢献してきました。本年は第64回を迎え、初めて沖縄での開催となります。会期中は最新の研究成果の発表、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実施し、人材育成の面でも意義ある機会となっています。

若手研究者の支援は、当学会の基本方針の一つです。これまで、若手研究者渡航奨励金やポスター賞、進歩賞などを通じて、将来の分野を担う人材の育成を図ってきました。今後はこれらの取り組みをさらに強化し、急務である次世代人材の育成に一層取り組んでまいります。また、NMR

分野の社会的認知度の向上や、他分野との連携・交流の促進も重要な課題です。本分野は学際性に富み、異分野との協働によって技術開発や課題解決が進んできました。こうした学際的・融合的な取り組みを、今後も継続・発展させていく所存です。学会誌の発行は、これらの活動の発信・共有において大きな役割を果たしています。

国際的な連携・協力も、我々の重要な使命のひとつです。NMR討論会への海外研究者の招へいや、国際会議の日本開催などを通じて、国際交流と日本のNMR研究のプレゼンス強化に努めてまいりました。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 といった主要な国際会議の招致・開催において、当学会はこれまでも中心的な役割を果たしてきました。その一環として、2029年には ISMAR が日本で開催されることが決定しております。

近年では、1 GHz を超える超高磁場装置の実用化や AI を活用した解析技術の開発などにより新たな知見の獲得が進み、NMR 分野は大きな変革期を迎えつつあります。こうした急速な変化の中にあっても、本学会は、国内 NMR コミュニティの中心として、会員の活動を支援し、分野のさらなる発展に貢献してまいります。

今後とも、皆様のご理解とご支援を賜りますようお願い申し上げます。

無構造生物学

九州大学生体防御医学研究所特任教授

神田 大輔

dkohda@kyudai.jp

タイトルの妙

以前、日本生物物理学会誌の巻頭言として書いた「50%生物学」が読まれているようだ^[1]。Academia.eduから、Someone recently saw “50%生物学”とメールがときたま来る。日本語の文章ではあるものの、読者には中国名と思われるものが多い。そこで、柳の下のドジョウを狙って、本巻頭エッセイのタイトルを“無構造生物学”と大見得を切ることにした。

AlphaFold のインパクト

蛋白質の立体構造予測がここまで成功を収めると想像できた人が果たしてどれほどいただろうか？というくらいにAIの進歩が止まらない。当初は予測精度に限界があるはずと高をくくっていた。最近ではリガンド結合部位まで教えてくれるので、創薬の分野に大きな恩恵をもたらすだろう。ChatGPTをはじめとする生成AIでも、なぜこんなに上手くいくのかと専門家が不思議に思ったという話もある。そこで興味をもって、深層学習に関する入門書をいくつか読んでみた。学習データをもとに、極めて多数の重みづけパラメータの最適化を行うのだが、数学的处理は行列やベクトルを使った線形計算を繰り返し行うことが大部分であると理解した。非線形だと局所的な解にトラップされることが普通だが、線形計算だからこそ上手くいくのかも自分なりに納得した。

AlphaFoldは2024年のノーベル化学賞に輝いた。これは「立体構造予測とそれに基づくタンパク質設計」が基礎研究から実用化段階に移行したことを意味する。こうなると、解決すべき課題をもった集団による研究・開発の効率が断然良くなって、大学などの基礎分野の個人研究者には不向きな情勢である。今や、生成AIを使うとプログラミングもしてくれるので、プログラマーの大量失職が懸念されているという。となれば、AlphaFoldが構造予測をしてくれるので、構

造生物学研究者の大量失職につながるのだろうか？たぶん、そうはならない。構造決定だけが構造生物学ではない。構造決定に割いていた時間と労力を新しい研究領域に注ぐことで、「構造決定しない構造生物学」の時代がようやく到来した。かくいう私もX線結晶解析に寄り道したものの、NMRを使った「構造決定しない構造生物学研究」すなわち「無構造生物学」に回帰した。

「構造決定しない構造生物学研究」について補足説明をしたい。偏見を交えて構造生物学の歴史を概観してみよう。生体高分子の立体構造決定例がとても少ない時代には構造決定自体が仕事になった。決めた立体構造を基に既報論文の正誤表を発表することができた。その後、立体構造が最初に決まり、生化学などの機能研究が続く状況に様変わりした。その結果、立体構造を基にした議論をしたいなら、せめてアミノ酸置換実験ぐらいしてね、の時代となった。そうそう、日本ではタンパク3000の構造生物学バブルが10年間くらいあったことを皆さんは憶えているでしょうか？クライオEM単粒子解析が登場すると、巨大蛋白質複合体の立体構造自体に注目する時代が再来した。しかし、長続きせず、AlphaFoldの登場によって終わりつつある。立体構造情報の価値は非常に高い。しかし、本来の目標は個人的な趣味で言えば、生体分子の機能の発現メカニズムを明らかにするような研究こそが構造生物学研究に相応しい。「構造決定に労力を使ったので、後は想像力を駆使した作業仮説で許して」では済まなくなつて、「本気で機能解析する必要」が出てきたのだ。やれやれ。

NMR による動的情報

X線、中性子線、電子線による結晶回折や、電子顕微鏡による単粒子「像」解析は静的な立体構造が主な出力結果なので、AlphaFoldと直接の競合関係にある。一方、NMRは溶液状態の蛋白質

の立体構造を決定する手法として21世紀初頭に脚光を浴びたものの、現在では立体構造決定手法としては脇役の感がある。しかし、NMRはスペクトロスコピー(分光学)として多様な情報を与えるポテンシャルがあり、「動的情報を与える」と一言で要約できよう。もっとも、動的情報の具体的な内容は直感的な解釈が難しい物理量である。例えば、緩和時間データをモデルフリー解析して、蛋白質分子の動的構造を調べる研究が一世を風靡した。かくいう私もモデルフリー解析で論文を書いたのだが、果たして本当に何がわかっていたのかと問うと少々疑問である。なにぶんナノ秒スケールの物理現象とミリ秒スケールの生物現象のギャップが大きすぎた。個人的には、ミリ秒スケールの化学交換から生じる(モデルフリー解析では付け足しの) R_{ex} の項こそが重要と思える。残念ながら、 R_{ex} の値を複数状態の存在割合やその間の交換速度定数まで還元できないと、生物学的にはあまり意味がない。

以上のように考えてみると、NMRを使って意味が明確な物理量を生み出すことが重要だと気付く。 J カップリングの値は生物学的には無意味だが、Karplusの式を使って二面角 ϕ に変換すれば解釈可能な役に立つ情報である。さらに理想を言えば、物理量の平均値だけでなく、分散値やできたら分布の形まで知りたい。NMR測定だけでは困難な課題なので、複数の分光学手法を組み合わせるとか、分子動力学計算の力を借りることが考えられる。

NMRの特徴を活かした研究展開

いうまでもなくNMR法の特徴は、主鎖の安定同位体標識をすることで残基レベルの情報を得ることができる点にある。これは他の分光法にはない特徴である。紫外・可視・赤外吸収、円二色性、蛍光などでは、個々のクロマトフォアが与える信号の線幅が広くて重なり、分離して観測することはできない。もっとも、赤外分光では安定同位体標識のトリック(主鎖カルボニル基の ^{13}C = ^{18}O 標識)が使える。

NMRによる残基レベル実験の遂行上の盲点は、多次元スペクトルにおけるクロスピーク強度の決定にあると考える。線幅の変化があるのでピーク強度としてピーク体積を使う必要がある。いうまでもなく、測定においては、パルス繰り返し待ち時間d1の設定、データ処理では、ウィンドウ関

数の選択、位相合わせとベースライン補正を適切に行なうなどの細心の注意が前提である。

実験の種類によってピーク体積決定の要求精度は異なる。たとえば、 R_2 緩和分散法では一つのクロスピークの体積をCPMG時間の関数として解析するので、正確度はそれほど問題にはならないかもしれない。しかし、平衡定数決定ではHSQCスペクトルの2つのクロスピーク、交換速度ではEXSYスペクトルの4つのクロスピークの体積が必要となる。リガンド滴定においては、化学シフトタイムスケールにおける中間の交換領域(intermediate exchange on the chemical shift time scale)ではピークの線幅が大きく広がる。こうした状況ではピーク体積を正確(真の値に近い)かつ精確(ばらつきが少なく、高い再現性)に決める必要がある。

誤差には測定を繰り返すことで減らせる測定誤差の他に、多数のパルスを含むNMR実験にはそれぞれ固有の測定バイアスがあることを忘れてはならない。HSQCスペクトルの測定バイアスを除く方法がある^[2,3]。パルス系列を複数回重複させて測定を行い、回数ゼロに外挿することでパルス1個の一次元スペクトルに相当する状況をつくり出す。こうした工夫を重ねることが厳密な定量実験には必要である。

とはいえ、通常は、分子全体で一つの物理量(平衡定数、速度定数、リガンドの解離定数など)を決めることで十分という認識があって、ピーク体積に求められる正確度や精度はそれほど高くないように思われる。蛋白質分子の二状態平衡の平衡定数が $K=5\pm5$ と、真の値から多少ずれていたり、誤差が結構大きくなっていたりしてもそれほど問題にならない。環境変化や蛋白質分子にアミノ酸変異を導入して $K=10\pm5$ と変化することに意味がある。しかし、残基ごとに異なる平衡定数が求まり、その分布やさらにアミノ酸変異による変化の意味を正しく解釈するには、正確度と精度の高い測定と解析が必要になる。例えば許容される誤差を10%程度とすると、 $K=5\pm0.5$ が要求される。ここで、「えっ!蛋白質分子の残基ごとに平衡定数が異なるはずがない」という反応が普通だろう。平衡定数すなわち状態変化による分子全体の自由エネルギーの変化量は一つの定まった物理量である。しかし、残基レベルで観測すると少しずつ異なった値として測定されることを主張している。理想的な蛋白質分子では構造変化に

における残基レベルの共同性が完全なので、どの残基で観測しても平衡定数は同一になる。しかし、実在蛋白質では、残基同士の結びつき（コミュニケーションと言ってもよいかもしれない）が完全に共同的ではなく、結果的に異なる平衡定数や速度定数が測定される。末端のテイル領域にある残基はコア部分の構造変化を感知しにくいことは納得できるだろう。それならば、ゆるく相互作用している遠く離れた2つの残基で構造変化の感じ方が異なることに何ら不思議はない。蛋白質分子が残基ごとに異なる測定値を与えるというアイデアを前提にすると、残基ごとの平衡定数と速度定数の間に（対数を取った後で）直線あるいは放物線関係を導くことができる。その物理化学的根拠は蛋白質分子がスムーズに構造変化を起こすための「整合性原理」である^[4]。

残基ごとの平衡定数と速度定数の間の直線あるいは放物線関係を前提にすると、直線あるいは放物線からの残差平方和 (Residual Sum of Squares) を指標に、2次元NMRスペクトルにおけるクロスピーク体積を決める方法の性能比較ができる。今まではこのような指標がなかったことを強調したい。最初に、2次元クロスピーク体積を2次元のガウス関数でフィッティングする標準的な方法を試した。自動化や高精度化を目指して、Newton、FitNMR、INFOSなどのプログラムを試したが、残念ながらうまく使えなかった。結局、Sparkyを使って、ピークごとに閾値を設定してマニュアルでフィッティングを行うことがベストであった。とはいえ、誤差の減少の度合いは満足のいくレベルには達しなかった。目下の関心事は、新しいアイデアに基づく2次元クロスピーク体積の解析法の検討である。とりえあえず、ここでは新しい視点が今までにない要求を創り出すことで、新しい研究がスタートすることを強調したい。

生体分子中の水素結合の NMR による直接検出

水素結合は結合角に依存することから推測されるように共有結合性がある。共有結合性が実験的に証明されたのは1998年になってからで、水素結合を跨いだ J カップリングがあることが示された。引用した総説^[5]では、「当初の驚きと興奮が多少収まった現在、水素結合を介するNMRのスピン結合の観測によって、一体何がもたらされた

のかを考えることは無駄ではあるまい。構造化学的応用までを含めて丹念に数えあげれば、おそらく大変な広がりを見せるに違いない」と書かれているが、残念ながら現状はそうではない。NMRの特徴を活かした良い研究領域としてリポートを期待したい。

量子物理学

物理学分野の発展も著しい。量子もつれ現象を使って、解読不能な暗号通信が実現するなど身近になってきている。量子コンピュータについて当初は所詮高性能アナログ計算機と思っていた。事実、用途は汎用的ではないとのことだが、科学の発展次第では誰にもわからない。何と言っても、多くの人が参入して大規模な投資のもとに研究が行われれば、最初は不可能と言われていても実は可能になることは多い。例えば、近い将来、核融合発電もそうかもしれない。

NMRは量子コンピュータを実現する手法の一つであった。1996年に提案されたとある。過去形なのは、実現手段の候補が現在複数ある中で、残念ながらその中には入っていないからである。とはいえ、卓上型NMR装置を使って実装され、市販もされている。中国企業であるSpinQ（中国・深セン）が2020年に売り出していて、価格が1,000万円弱とちょっと高めだが、それなりに売れているようである^[6]。NMRそしてESRが他の手法と異なる点は、測定対象の化合物をデザインができることにある。コヒーレンス状態を常温で長く維持できることも利点となる。量子ビットとは、量子コンピュータにおける情報の単位であり、原子核あるいは電子のスピン2つの状態の重ね合わせを利用して0と1の間の状態を表現する。SpinQの装置では2量子ビット仕様では、 $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{PH}$ の ^{31}P 核と ^1H 核の $^1J_{\text{PH}}$ カップリングを使い、3量子ビット仕様では $\text{CF}_2=\text{CFI}$ を使って、3つの ^{19}F 核の間の J カップリングを使っている。NMRモードと量子計算モードそれぞれのパルス系列が提供されている。現時点の理解の範囲では、量子計算モードは昔のspin tickling実験みたいなものと思っているが誤解かもしれない。NMR量子コンピュータは実用にするには問題があるのだろうが、教育用には適している。パルスプログラムを自ら組んで量子現象を自在に操ることは稀有な経験になると評価が高いのだそう。とはいえ、磁気共鳴装置ユーザーには当たり前過

ぎて新鮮味がないのが残念である。「NMRを使った研究は量子生物学だ!」と学生を勧誘したら詐欺になるけど。

おわりに

以上の話題が果たして巻頭エッセイとして相応しいかどうか自信がない。しかし、エッセイとは「自由な形式で、気軽に自分の意見などを述べた散文」とあるので、ご容赦願いたい。

参考文献

- [1] 神田大輔, 50%生物学. 生物物理 60, 145 (2020). <https://doi.org/10.2142/biophys.60.145>. この中で参照した論文の引用情報に誤りがありました。PLoS ONE 3: e1672, 2008 (DOI: 10.1371/journal.pone.0001672) と訂正します。
- [2] 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). doi: 10.1021/ja1095304. Erratum in: *J Am Chem Soc.* **134**, 3612 (2012).
- [3] 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). doi: 10.1007/s10858-022-00396-y.
- [4] 神田大輔, 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. *Bulletin of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan* **14**, 50-65 (2025).
- [5] 児嶋長次郎, 甲斐荘正恒, NMRによる生体分子中の水素結合の直接的検出. 生物物理 **40**, 379-384 (2000).
- [6] Hou, SY., Feng, G., Wu, Z. et al. SpinQ Gemini: a desktop quantum computing platform for education and research. *EPJ Quantum Technol.* **8**, 20 (2021). <https://doi.org/10.1140/epjqt/s40507-021-00109-8>. 商品情報については、<https://www.spinquantum.com/products/nmr-quantum-products> を参照。



神田 大輔 (こうだ・だいすけ)

昭和61年(1986) 理学博士(東京大学)

昭和61年(1986) (財)東京都臨床医学総合研究所 研究員

(1994年7月より1年間 日本学術振興会特定国派遣研究者としてイギリス・オックスフォード大学・生物化学部の客員研究員)

平成8年(1996) (株)生物分子工学研究所 主任研究員

平成12年(2000) (株)生物分子工学研究所 主席研究員

平成14年(2002) (技術研究組合)生物分子工学研究所 主席研究員

平成14年(2002) 九州大学 生体防御医学研究所 教授

平成26年(2014) 九州大学 生体防御医学研究所 主幹教授

令和4年(2024) 九州大学 定年退職、名誉教授

結晶の固体NMR解析と機能発現

徳島大学大学院社会産業理工学研究部

犬飼 宗弘

inukai.munehiro@tokushima-u.ac.jp

1. はじめに

結晶は、原子や分子が規則正しく並んだ固体であり、その規則的な構造がもたらす物性や機能は材料科学の分野で重要な役割を果たす。近年では、構造的な秩序に加えて、わずかな動きや外部刺激に応じた変化といった運動性を持つ動的な結晶が注目されている。これら動的な結晶の中で、金属イオンと有機配位子から組み上がる金属有機構造体 (MOF: Metal Organic Framework) や配位高分子 (CP: Coordination Polymer) が注目され、世界中で盛んに研究されている^[1, 2]。MOFは結晶性と多孔性を兼ね備えた固体であり、分子の大きさや形状に応じた細孔設計が可能で、吸着・分離機能、イオン伝導、分子認識など多岐にわたる機能を示す。こうしたMOFの細孔内部では、ガスの吸着や拡散だけでなく、配位子が回転したり、フレームワーク自体が揺れ動いたりする現象が起こる^[3, 4]。これらの動きはガスの選択的な取り込みや放出を制御するだけでなく、プロトンやリチウムイオンなどの移動経路を構築し、イオン伝導性の発現にも深く関わってくることがある。こうした構造と動きの相互作用を分子レベルで理解することは、MOFを高機能材料として活用するための重要な鍵になる。

MOFの解析において、固体NMRは非常に強力なツールである。X線構造解析では得られない局所環境や動的情報、無秩序な配置などを可視化できるため、結晶構造の変化や分子の運動性、また結晶骨格 (ホスト) と細孔内に導入した分子 (ゲスト) の相互作用 (ホスト-ゲスト相互作用) の詳細な解明、および構造と機能のつながりを明らかにする。特に¹Hや¹³C、³¹Pなどの核種を用いたMAS NMRや緩和時間測定、2次元NMR、PFG NMRなどの手法は、結晶内部のガス挙動、配位子運動、拡散過程の解明に有効である。

筆者らが報告した一連の研究では、プロトン伝導体としてのMOF材料に対して固体NMRを用

い、プロトンキャリアの局所配置、移動性、拡散機構を明らかにした。たとえば、細孔内部にLiClを導入することで、水分子やLi⁺イオンの拡散性を飛躍的に向上させ、1次元チャンネル内での高速なプロトンおよびリチウム伝導 (10⁻² S/cm以上) を実現した^[5]。また、ヒスタミンを導入した研究では、¹H-¹³C HETCORやCP-MASにより配位構造とプロトン化状態を明らかにし、プロトン伝導性との相関を実証している^[6]。さらに、配位高分子の欠陥部位に可動性の高いH₃PO₄を導入し、150℃での無加湿下でも燃料電池動作を可能にした例では、³¹P MASや超高速¹H NMRによって可動分子の挙動、および緩んだ水素結合ネットワークを介してプロトンが高速移動する伝導機構を明らかにした^[7]。近年ではガス分子そのものを観測対象とした固体NMRも展開されており、吸着状態や分子間相互作用、構造相転移の兆候などを外部ガス雰囲気下で捉える試みも進んでいる。

さらに、分子の運動性を極限まで抑えた環境では、縦緩和時間 (T_1) が著しく延長されることもある。こうした長い T_1 を持つ固体は、高いスピン偏極を蓄積することが可能であり、近年では構造解析にとどまらず、スピン偏極に着眼した新たな結晶材料の開発にも注目が集まっている。次節以降では、こうしたガス分子を直接観測するNMRの応用例に加え、運動性を制御することでスピン偏極を効率的に蓄積できる結晶材料の開発について紹介する。

このように固体NMRは、静的な構造情報にとどまらず、分子の動的ふるまいと機能との関係を可視化するうえで欠かせない手段となっており、今後の結晶材料科学の発展においても中心的な役割を担うことが期待される。

2. ガス雰囲気下の高分解能固体 NMR

MOFは分子の選択的な吸着・分離に優れた機能を示し、とくにCO₂やCH₄などのガス分子に

対しては、高い選択性や吸着能を有する材料として多くの応用が検討されている。その機能発現には、細孔径や配位子の官能基だけでなく、結晶骨格の柔軟性や構造の可逆的変化が密接に関与しており、それらを分子レベルで理解することが材料設計の鍵となる。そのためには、ガス分子の吸着状態や運動性、加えてガス雰囲気下におけるMOF骨格の局所構造と運動性を直接観測できる手法が不可欠であり、固体NMR解析は有用である^[8]。特に、ガス雰囲気下での高分解能固体NMRは、ガス分子の化学シフト、緩和時間、化学シフト異方性(CSA)などを通じて、吸着部位や運動、相互作用の詳細を分子スケールで解明できる点が特徴である。

筆者らは、小さい細孔サイズを有するCID-Me (CID = coordination polymers with an interdigitated structure, $[\text{Zn}(\text{5-methylisophthalate})(4,4'\text{-bipyridine})]_n$) 内部に潜む配位子の運動に注目し

た(図1(a))^[9]。CID-Meは、細孔サイズ($2.4 \times 1.5 \text{ \AA}^2$)が CO_2 ($3.3 \times 3.2 \times 5.4 \text{ \AA}^3$)より小さいにもかかわらず、室温で CO_2 を吸着するという、ユニークな特徴を有する。細孔内部における CO_2 の拡散と配位子の回転運動の相関を ^{13}C MAS NMRと ^2H 四極子エコーで解析した(図1(b))。ビピリジン配位子の回転が細孔の窓を開閉する役割を担っており、その回転が、 CO_2 の分子運動を立体障害によって物理的に制限することで、拡散速度が著しく低下することが明らかとなった。これらの物性はガス分子の貯蔵といった機能発現に応用可能である。実際に低温条件下で配位子の回転を静止させることにより、細孔内に CO_2 や CH_4 を閉じ込めることにも成功した。 ^{13}C MAS NMRにより、低温下かつ真空中でもガス分子が細孔内部に保持できていることが明確に確認された(図1(c)~e))。

MOFのガス吸着・分離機能は、分離膜やガス

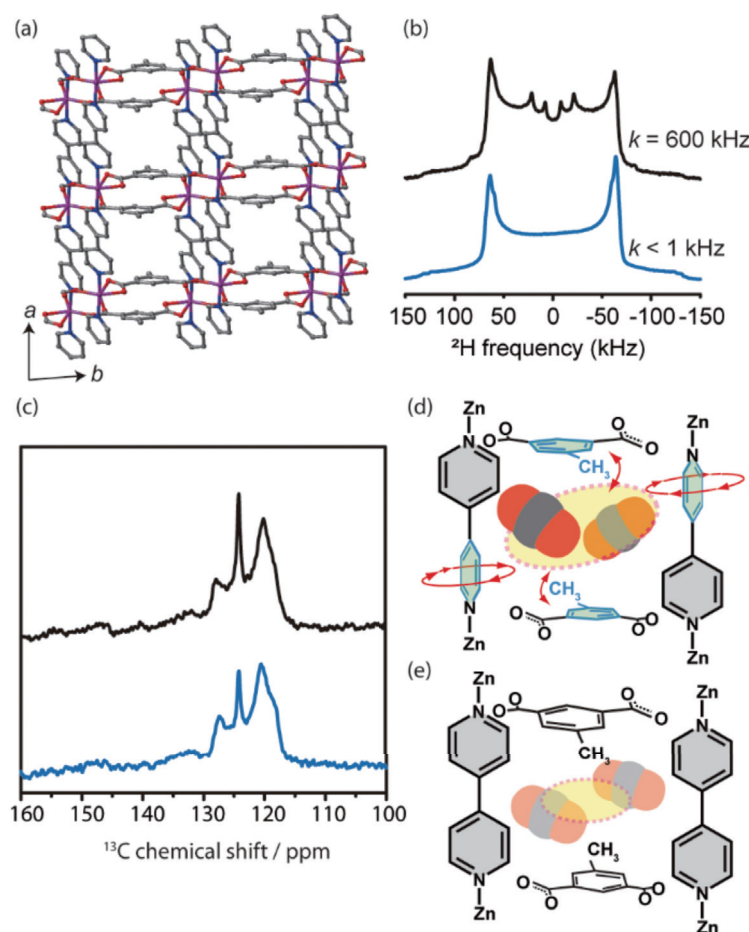


図1 (a) CID-Meの195 Kにおける結晶構造。(b) CID-Meの ^2H 固体NMRスペクトル。 k は配位子の回転周波数、黒線と青線はそれぞれ296 Kと195 Kの温度で測定した結果を示す。(c) CID-Meに CO_2 を吸着させ304 Kで測定した ^{13}C MAS NMRスペクトル(黒線)、および CO_2 を吸着させたCID-Meを195 Kおよび16時間真空中に置いた後に、304 Kで測定したスペクトル(青線)を示す。(d) 室温での配位子の回転運動を介した CO_2 吸着の模式図。(e) 195 Kでの回転子の立体障害によって制御された CO_2 貯蔵の模式図。Adapted with permission from [9]. Copyright 2018 Wiley-VCH GmbH.

貯蔵といった応用において高圧条件での利用が想定されるため、高圧ガス雰囲気下におけるMAS NMR測定は極めて重要である。我々は2 MPaまで耐圧可能なMAS試料管を開発し、それを用いてMOF-74の細孔におけるCO₂の挙動を詳細に検討した(図2 (a))^[10]。CO₂は99% ¹³C同位体置換したものを使用している。¹³C CSAおよびT₁解析により、高圧条件下でのCO₂分子の運動がCO₂–CO₂間相互作用によって顕著に抑制されていることを明らかにした。揺動やホッピング運動といった局所運動が空間的に制限されることで拡散が協調的に抑制され、最終的には吸着選択性の起源にも関与していることが示唆された。また、¹³C 2次元交換MAS NMRにより、123.8 ppmと124.1 ppmに現れる吸着状態のCO₂分子が数百ミリ秒のタイムスケールで拡散している様子が確認された(図2 (b))。一方で、124.5 ppmに現れる自由空間中のCO₂は交換していないことから、MOF細孔に吸着していないことも示された。

この研究の流れは、のちに発展した複数の論文に引き継がれている。たとえば配位子の回転性がCO₂拡散に及ぼす影響をより定量的に解析し、分子サイズ選択性の機能発現に迫る研究を報告した^[11]。また、ゲート開閉型MOFにおける構造相転移の中間状態がCO₂のCSAと¹H T₁測定を利用したドメイン解析によって明らかになり、吸着等温線や粉末XRDでは見えない表面層に限定された中間構造の存在が明らかにされた^[12]。

このように、MOF骨格の動きがガス分子の拡散や吸着といった機能を生み出す機構として認識されつつあり、固体NMRはそうした動的構造の解明に極めて有効な手段となっている。今後、ガス雰囲気下のNMRは、ガス応答性を有するMOFの設計や評価において、より一層重要な技術基盤となっていくことが期待される。

3. スピン偏極結晶の開発

固体NMRの感度向上手法として広く知られる

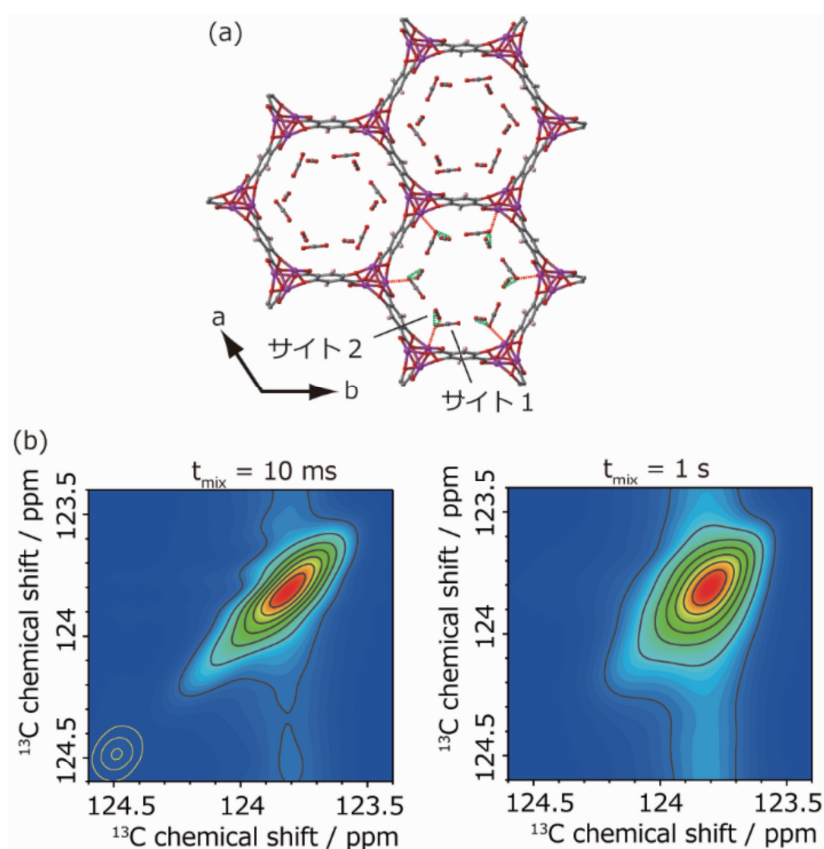


図2 (a) MOF-74におけるCO₂の吸着サイト。紫、赤、黒、淡いピンクの球はそれぞれZn、O、C、H原子を表す。(b) 1 MPaのCO₂雰囲気下におけるMOF-74の¹³C 2次元交換MAS NMRスペクトル。交換時間はそれぞれ10 msと1 sである。124.5 ppmに観測された弱い対角ピークは、見やすくするために黄色でハイライトしている。Adapted from [10] with permission from The Royal Society of Chemistry.

動的核偏極 (DNP) は、電子スピンの高い偏極を核スピンへ転移させることで核スピンの偏極率を向上させ、NMR信号を飛躍的に増強する技術である。最も一般的なDNPでは、ラジカル分子を用い、極低温 (通常100 K以下) かつ強磁場下でミリ波を照射することにより、ガラス状試料中で電子スピンから核スピンへの偏極移動を促進する手法が主流である^[13, 14]。これにより高い偏極率が得られる一方で、試料の凍結やラジカルの均一分散、極低温装置やミリ波発生装置の必要性など、実験上の制約が多い。また、結晶状態でのDNPはほとんど報告がなく、多くはアモルファス状のガラスで行われている。実際、DNP juiceと呼ばれる、グリセロールや水、重水などを含む溶液にラジカルを添加し、これを凍結して使用する手法が広く用いられている。

このような状況に対して注目されているのが、室温・低磁場下でも高い偏極率を有する光励起三重項状態の電子スピンを利用したトリプレットDNPである^[15, 16]。トリプレットDNPとは、光照射によって高偏極なトリプレット電子を生成し、Integrated Solid Effect (ISE) を介して近傍の核スピンへ偏極を転移させる手法である。原理的に非常に高い偏極率 ($P = 70\%$ 以上) が期待できる一方で、適用できる分子に制限があるなどの課題も抱えている^[17 ~ 21]。

筆者らの最近の研究では、トリプレットDNPに適した偏極結晶を開発し、室温下での高効率スピン偏極を実現した。ひとつは、共晶を用いた生体分子の室温高偏極と偏極伝播機構の解明である^[22]。共晶とは、構成する分子の各結晶相を維持しながら、混合している結晶である。ペンタセンをドーブした重水素化安息香酸 (dBA) と、生体分子 (ET: エリスリトール, SUA: コハク酸, CAF: カフェインなど) の共晶 (dBA-ET, dBA-SUA, dBA-CAF) をメルトクエンチ法 (融解後に氷水で急冷) により合成した (図3 (a))。dBAで構成させる偏極相で生成された偏極を、生体分子で構成させるターゲット相にスピン拡散させるためには、各結晶相のドメインが十分に小さいことが必要不可欠である。これらの共晶の各ドメインサイズをスピン拡散長以下 (80 ~ 170 nm 以下、各共晶の T_1 に依存する) に抑えられていることが、SEM画像と T_1 解析から明らかとなった。トリプレットDNPによる偏極率と増強係数 (ϵ) は、dBA-ETで0.091%と680倍、dBA-SUA

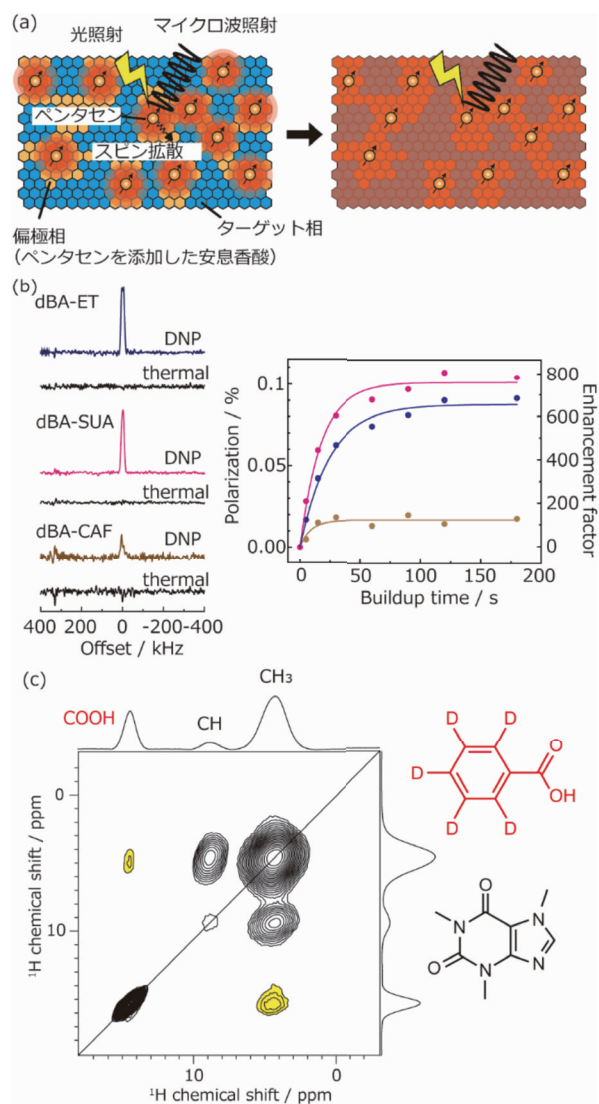


図3 (a) 偏極相の偏極は dBA ドメイン内で拡散し、 ^1H - ^1H 双極子相互作用を介して、偏極がターゲット分子のドメインへ浸透する。ターゲットドメイン内のすべての核スピンの偏極された状態を示す。(b) dBA-ET、dBA-SUA、および dBA-CAF の ^1H NMR スペクトルと ^1H 偏極ビルドアップ曲線。測定条件は、室温、および磁場強度 0.39 T である。(c) dBA-CAF の 2D ^1H - ^1H 交換 NMR スペクトル (磁場強度 14.1 T、MAS 回転数 70 kHz、およびミキシング時間 7 s)。dBA と CAF との間のクロスピークは黄色でハイライトされている。Adapted with permission from [22]. Copyright 2024 American Chemical Society.

で 0.10 % と 780 倍、dBA-CAF で 0.017 % と 130 倍であり、室温における生体分子の高い偏極率が確認できた (図3 (b))。実際に、スピン拡散によって磁化がターゲット分子に伝播しているかを確認するため、磁場強度 14.1 T、70 kHz の超高速 MAS による ^1H - ^1H 2次元交換 NMR を行い、磁化の交換を確認した (図3 (c))。縦緩和時間内に dBA の COOH とターゲット分子中の CH_3 との間に交換ピークが

観測され、ドメイン間での磁化拡散が実験的に実証された。今後、共晶を用いた偏極マトリクスの展開において、ターゲット分子の種類を拡張していくと、縦緩和時間 (T_1) がより短い分子を含むことが予想される。このような分子に対しては、より短い緩和時間内に偏極をターゲット相へスピン拡散させる必要があるため、ドメインサイズを50 nm以下に制御できる共晶合成技術の改良が今後求められると考えられている。

異なる方法として、共結晶を偏極マトリクスとして利用する方法を考案した^[23]。共結晶は、結晶工学の主要な概念の一つであり、分子間相互作用 (特に水素結合や $\pi-\pi$ 相互作用) を設計・制御することで、新たな機能性を持つ固体材料を創出するための戦略として用いられている。設計の自由度が高く、多様な分子を組み合わせることで、多様性に富んだ構造や機能を有する結晶を創出することが可能である。なかでも医薬品分野では、難溶性API (有効成分) と適切なコフォーマー (補助分子) を共結晶化することで、溶解性・安定性・吸収性を向上させる技術として注目されている。

本研究では、共結晶の特徴である「長い緩和時間」「高い溶解性」「多様性」に注目し、トリプレットDNPの偏極マトリクスとして利用することを試みた (図4 (a~c))。共結晶の密な分子配列は分子運動を抑制し、結果として局所磁場の揺らぎによる縦緩和の低減をもたらす、 T_1 時間の延長に寄与することが知られている。そして T_1 を長く保つためには、高い結晶性を維持することが極めて重要である。本研究は、結晶性を損なうことなく、偏極源を共結晶に導入する方法として、偏極源を微量だけドーピングした共結晶型の固溶体に注目した。ペンタセンは、三重項電子の高い偏極度と平面構造による強い $\pi-\pi$ 相互作用を持つことから、共結晶に適した偏極源である。加えて安息香酸やベンズアミド誘導体といったコフォーマーと構造が類似しているため、共結晶中で少量のペンタセンに置換 (固溶体) することで、結晶性を保ったまま、偏極源を効率的に導入することが可能であると考えた。

まず、ペンタセンを微量導入した酸-アミド系共結晶を用いて、アイデアの検証を行った。対象とした共結晶は、サリチル酸-ベンズアミド

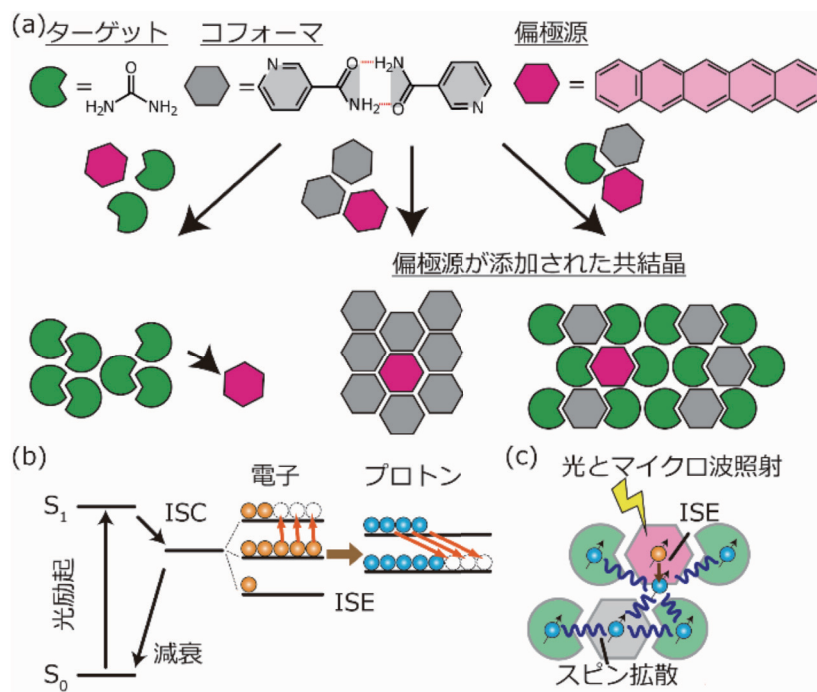


図4 トリプレットDNPを用いたスピン偏極のための共結晶マトリクスの模式図。

(a) ターゲット分子 (分析対象分子) と安息香酸およびベンズアミド誘導体のコフォーマー、そして偏極源としてのペンタセンを示している。コフォーマー・ペンタセン、もしくはターゲット・コフォーマー・ペンタセンのように固溶体になることで偏極源の添加が可能である。(b) ペンタセンにおける項間交差 (ISC: InterSystem Crossing) を経て光励起三重項状態の電子が生成される。三重項状態の電子スピンの偏極は、ISE (Integrated Solid Effect) を介してペンタセン近傍のプロトンへ転移される。(c) その後、プロトン偏極はスピン拡散によって共結晶全体に広がっていく。図中のオレンジ色の球と青色の球に矢印が付いたものは、それぞれ電子スピンとプロトンを表している。Adapted with permission from [23]. Copyright 2024 American Chemical Society.

(SA-BAm)、サリチル酸-ピコリンアミド (SA-PAm)、および3-ニトロ安息香酸-ベンズアミド (NBA-BAm) の3種類であり、いずれも酸とアミドの間の分子間相互作用を利用して構築されたものである。これらの共結晶では、 π - π 相互作用やCH- π (SA-BAmおよびSA-PAm)、CH-NO₂ (NBA-BAm) といった分子間力によってコフォーマーが高密度に積層されており、安定した結晶構造を形成している。トリプレットDNP測定は室温 (298 K)、ISE周波数50 Hzの条件下で行い、SA-BAm (**A1**) では $P=0.10\%$ 、 $\epsilon=750$ 倍、SA-PAm (**A2**) では $P=0.079\%$ 、 $\epsilon=590$ 倍、NBA-BAm (**A3**) では $P=0.019\%$ 、 $\epsilon=140$ 倍であった (図5 (a))。得られた偏極共結晶は水やアルコールに可溶であり、溶解させることで、偏極液体の液体NMRが可能である。偏極共結晶を11.7 Tの超伝導磁石内に転送し、メタノールで溶解したのちに¹H NMR測定を行った (図5 (b))。得られた偏極率と増強率は、 $P=0.072\%$ と $\epsilon=17$ (**A1**) および $P=0.034\%$ と $\epsilon=8.5$ (**A2**) であった。これらの偏極率は、小さな生体分子に対する室温でのオーバーハウザーDNPの偏極率と同程度、もしくは少し低い程度である。

次に、MRI用分子プローブとして注目される尿素、およびクエン酸回路に参与するコハク酸に注目した。これらのバイオ分子を偏極するための共結晶マトリックスとして、尿素-ニコチンアミド (**B1**, U-NAm) およびコハク酸-ニコチンアミド (**B2**, SuA-NAm) を用いた。トリプレットDNP測定では、**B1**において、 $P=0.0035\%$ 、 $\epsilon=26$ 、**B1**において、 $P=0.0054\%$ 、 $\epsilon=41$ が得られた (図5 (c))。これらの値は**A1**-**A3** (非生体分子系) の偏極率もやや小さい。その理由として、 T_1 緩和が速いこと、および**B1**と**B2**におけるペンタセンの光吸収ピークが、使用したレーザー波長と若干ずれていたことも原因だと考えられる。本結果は、MRI分子プローブの室温トリプレットDNPの初実証例であり、生体関連分子の高感度NMR観測に向けた有望な技術基盤となると考えている。今後は、このような偏極結晶の構造最適化や、MRI分子プローブ・薬剤・金属錯体など多様なターゲットへの展開を期待している。

4. 今後の展望

本稿では、結晶性材料における分子運動の可視化と機能発現、さらに分子運動を意図的に抑制す

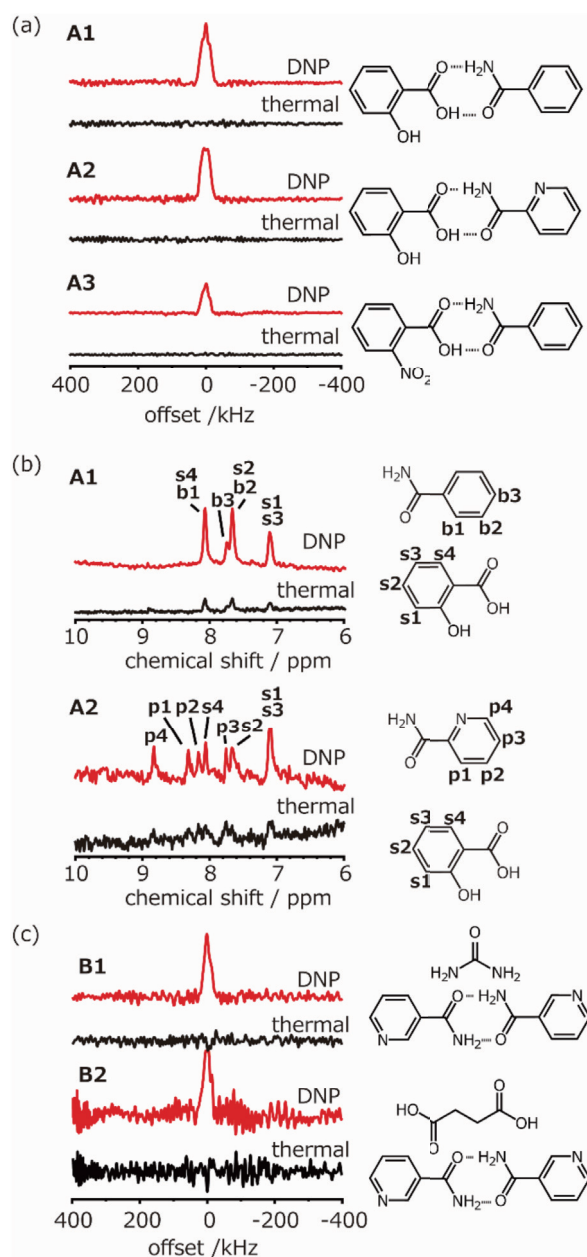


図5 (a) **A1**, **A2**, **A3**の¹H NMRスペクトル。トリプレットDNPおよび熱平衡状態で測定した。磁場強度と温度は0.39 Tと298 Kである。熱平衡条件下のNMRスペクトルは4回積算されている。(b) **A1**と**A2**の溶液¹H NMRスペクトル。トリプレットDNPで増強、および熱平衡状態で測定した。磁場強度は11.7 Tである。(c) **B1**, **B2**の¹H NMRスペクトル。条件は**A1**, **A2**, **A3**の¹H NMR測定と同じである。

Adapted with permission from [23]. Copyright 2024 American Chemical Society.

ることで実現されるスピン偏極結晶の開発について紹介してきた。これらの取り組みに共通しているのは、固体中での構造的な秩序と動的挙動の制御と利用した機能発現である。今後は、こうした知見を踏まえた材料設計の深化とともに、さらなる応用分野への展開が期待される。医療・分析用途では、MRI分子プローブやドラッグデリバリー

用ナノ材料として、偏極状態の維持時間や溶解性などの物性制御が鍵を握る。結晶工学とスピン偏極技術の融合は、NMRに限らず、量子センシングや分子認識、診断・分析技術への展開を見据えた、次世代機能性材料の設計基盤となる可能性を有している。今後も、材料科学と磁気共鳴技術の学際領域において、新たな視点とアプローチが生まれることを期待したい。

参考文献

- [1] Yaghi, O. M., O'Keeffe, M., Ockwig, N. W., Chae, H. K., Eddaoudi, M. & Kim, J., Reticular synthesis and the design of new materials. *Nature*. **423**, 705-14 (2003).
- [2] Kitagawa, S., Kitaura, R. & Noro, S.-i., Functional Porous Coordination Polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 2334-75 (2004).
- [3] Horike, S., Matsuda, R., Tanaka, D., Matsubara, S., Mizuno, M., Endo, K. & Kitagawa, S., Dynamic motion of building blocks in porous coordination polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 7226-30 (2006).
- [4] Horike, S., Shimomura, S. & Kitagawa, S., Soft porous crystals. *Nat. Chem.* **1**, 695-704 (2009).
- [5] Horike, S., Kamitsubo, Y., Inukai, M., Fukushima, T., Umeyama, D., Itakura, T. & Kitagawa, S., Postsynthesis modification of a porous coordination polymer by LiCl To enhance H⁺ transport. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 4612-5 (2013).
- [6] Inukai, M., Horike, S., Umeyama, D., Hijikata, Y. & Kitagawa, S., Investigation of post-grafted groups of a porous coordination polymer and its proton conduction behavior. *Dalton Trans.* **41**, 13261-3 (2012).
- [7] Inukai, M., Horike, S., Itakura, T., Shinozaki, R., Ogiwara, N., Umeyama, D., Nagarkar, S., Nishiyama, Y., Malon, M., Hayashi, A., Ohhara, T., Kiyonagi, R. & Kitagawa, S., Encapsulating Mobile Proton Carriers into Structural Defects in Coordination Polymer Crystals: High Anhydrous Proton Conduction and Fuel Cell Application. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 8505-11 (2016).
- [8] Wong, Y. T. A., Martins, V., Lucier, B. E. G. & Huang, Y., Solid-State NMR Spectroscopy: A Powerful Technique to Directly Study Small Gas Molecules Adsorbed in Metal-Organic Frameworks. *Chem. Eur. J.* **25**, 1848-53 (2019).
- [9] Inukai, M., Tamura, M., Horike, S., Higuchi, M., Kitagawa, S. & Nakamura, K., Storage of CO₂ into Porous Coordination Polymer Controlled by Molecular Rotor Dynamics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 8687-90 (2018).
- [10] Inukai, M., Kurihara, T., Noda, Y., Jiang, W., Takegoshi, K., Ogiwara, N., Kitagawa, H. & Nakamura, K., Probing dynamics of carbon dioxide in a metal-organic framework under high pressure by high-resolution solid-state NMR. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 14465-70 (2020).
- [11] Kurihara, T., Inukai, M. & Mizuno, M., Slow CO₂ Diffusion Governed by Steric Hindrance of Rotatory Ligands in Small Pores of a Metal-Organic Framework. *J. Phys. Chem. Lett.* **13**, 7023-8 (2022).
- [12] Kurihara, T., Souri, Y., Inukai, M. & Mizuno, M., CO₂-induced gate-opening structural transition process of a porous coordination polymer revealed by solid-state ¹³C NMR. *Chem. Commun.* **60**, 5074-7 (2024).
- [13] Ni, Q. Z., Daviso, E., Can, T. V., Markhasin, E., Jawla, S. K., Swager, T. M., Temkin, R. J., Herzfeld, J. & Griffin, R. G., High Frequency Dynamic Nuclear Polarization. *Acc. Chem. Res.* **46**, 1933-41 (2013).
- [14] Chow, W. Y., De Paëpe, G. & Hediger, S., Biomolecular and Biological Applications of Solid-State NMR with Dynamic Nuclear Polarization Enhancement. *Chem. Rev.* **122**, 9795-847 (2022).
- [15] Deimling, M., Brunner, H., Dinse, K. P., Hausser, K. H. & Colpa, J. P., Microwave-induced optical nuclear polarization (MI-ONP). *J. Magn. Reson.* **39**, 185-202 (1980).
- [16] Henstra, A., Dirksen, P. & Wenckebach, W. T., Enhanced dynamic nuclear polarization by the integrated solid effect. *Phys. Lett. A*. **134**, 134-6 (1988).
- [17] Inuma, M., Takahashi, Y., Shaké, I., Oda, M., Masaike, A., Yabuzaki, T. & Shimizu, H. M., High Proton Polarization by Microwave-Induced Optical Nuclear Polarization at 77 K. *Phys. Rev. Lett.* **84**, 171-4 (2000).
- [18] Takeda, K., Takegoshi, K. & Terao, T., Dynamic Nuclear Polarization by Electron Spins in the Photoexcited Triplet State: II. High Polarization of the Residual Protons in Deuterated Naphthalene. *J. Phys. Soc. Jpn.* **73**, 2319-22 (2004).
- [19] Tateishi, K., Negoro, M., Nishida, S., Kagawa, A., Morita, Y. & Kitagawa, M., Room temperature hyperpolarization of nuclear spins in bulk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 7527-30 (2014).
- [20] Nishimura, K., Kouno, H., Kawashima, Y., Orihashi, K., Fujiwara, S., Tateishi, K., Uesaka, T., Kimizuka, N. & Yanai, N., Materials chemistry of triplet dynamic nuclear polarization. *Chem. Commun.* **56**, 7217-32 (2020).
- [21] Hamachi, T. & Yanai, N., Recent developments in materials and applications of triplet dynamic nuclear polarization. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **142-143**, 55-68 (2024).
- [22] Sato, H., Miyanishi, K., Negoro, M., Kagawa, A., Nishiyama, Y., Horike, S., Nakamura, K. & Inukai, M., Hyperpolarization of Biomolecules in Eutectic Crystals at Room Temperature Using Photoexcited Electrons. *J. Phys. Chem. Lett.* **14**, 4560-4 (2023).
- [23] Inukai, M., Sato, H., Miyanishi, K., Negoro, M., Kagawa, A., Hori, Y., Shigeta, Y., Kurihara, T. & Nakamura, K., Cocrystalline Matrices for Hyperpolarization at Room Temperature Using Photoexcited Electrons. *J. Am. Chem. Soc.* **146**, 14539-45 (2024).



犬飼 宗弘 (いぬかい・むねひろ)

2009年 3月 大阪大学大学院基礎工学研究科博士課程システム創成専攻 博士(理学)
2009年 4月 京都大学大学院理学研究科 特定研究員
2011年 1月 京都大学物質-細胞統合システム拠点 特定研究員
2014年10月 徳島大学大学院社会産業理工学研究部 講師
2021年 4月 徳島大学大学院社会産業理工学研究部 准教授

分子シャペロンの構造機能解析

徳島大学先端酵素学研究所

齋尾 智英

saio@tokushima-u.ac.jp

1. はじめに

細胞内では、タンパク質の合成、折りたたみ（フォールディング）、輸送、分解といった一連の生命現象が、高度に統制されたネットワークによって維持されている。このタンパク質の品質管理、すなわちプロテオスタシス（タンパク質恒常性）において中心的な役割を果たすのが、分子シャペロンと呼ばれる一群のタンパク質である^[1,2]。分子シャペロンは、新生ポリペプチド鎖の正常なフォールディングを助けるだけでなく、高次構造をとらない未成熟なタンパク質を膜透過に適した状態に維持したり、異常凝集を防いだり、あるいは分解系へと誘導したりと、その機能は多彩である^[3]。近年では、細胞内の動的な区画形成を担う液-液相分離（LLPS）現象の制御に関与するシャペロンの存在も報告され、その機能の多様性についての理解は拡大している^[4]。分子シャペロンの機能不全は、タンパク質の異常凝集を特徴とする神経変性疾患の発症に深く関与する。一方で、がん細胞ではHsp90などの特定のシャペロンが過剰に発現し、変異したがん関連タンパク質を安定化させることで、がんの増殖や治療抵抗性に寄与することが知られている^[5]。このようにシャペロンは複数の疾患とも関係するため、創薬ターゲットとしても注目を集めるものは多い。

シャペロンによるプロテオスタシス維持のメカニズム解明へ向けて、構造生物学分野でも盛んに研究が進められてきた。これまでX線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡（クライオ電顕）といった構造生物学的手法は、シャペロン単独、あるいはヌクレオチドや補因子との複合体の立体構造を数多く明らかにし、その機能メカニズムの解明に大きく貢献してきた^[6~8]。シャペロンの立体構造解析から、それぞれのシャペロンが特徴的な構造を持つことが明らかにされ、その形状からメカニズムについての議論が発展してきた。一方で、シャペロンが基質タンパク質と結合した複合体に

ついては、その弱い相互作用や高い運動性によって、結晶構造解析やクライオ電顕による構造解析が困難であり、構造情報は長らく乏しかった。このような、動的なシャペロン-基質複合体に対する構造解析において、溶液NMR法による解析が有効である^[9]。NMR法は、溶液中という生理的条件に近い環境で、分子の動的な挙動や弱い相互作用を原子分解能で捉えることができる唯一無二の手法である。従来、NMR法の適用は30kDa以下のタンパク質に限定される傾向にあったが、メチル基選択的同位体標識法をはじめとする高度な安定同位体標識技術や測定法の開発により、その分子量限界は大幅に拡張された^[10,11]。これにより、100kDaを超えるようなサイズの大きいシャペロンやその複合体についても、高分解能での構造・ダイナミクス解析が可能となってきた。本稿では、我々が進めてきた研究を中心に、溶液NMR法を用いてシャペロン-クライアント複合体の動的な実体をどのように捉え、その作用機序の理解を深めてきたかについて解説する。

2. 変性状態の基質タンパク質の調製

シャペロンの作用機序を解明するうえで最大の障壁の一つは、その認識対象である変性状態の基質タンパク質の調製であった。多くのシャペロンは、高次構造を形成した天然状態のタンパク質とは結合せず、高次構造がほどけた変性タンパク質を認識する。しかし、天然構造に折りたたまれたタンパク質の構造を解きほぐして変性状態にするためには、尿素や塩酸グアニジンといった変性剤を高濃度で加える必要がある。しかし、これらの変性剤はシャペロン自体も変性させてしまう。一方、変性剤非存在下では、変性したタンパク質は疎水性領域の露出により容易に凝集・沈殿してしまう。このような基質タンパク質の不安定性が、シャペロン-基質複合体の構造生物学研究を長年にわたり妨げてきた。この問題を克服するため、

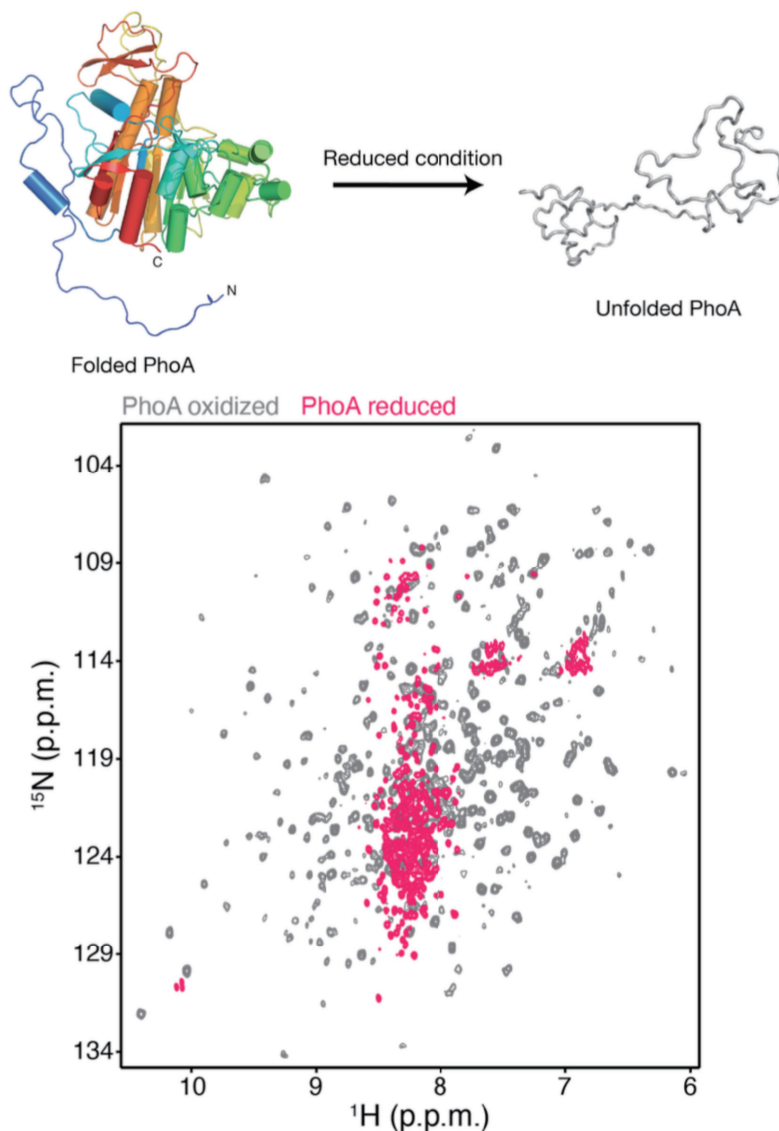


図1 PhoAのNMRスペクトル。還元的な環境において、PhoAは変性状態を維持しつつも、比較的高い可溶性を持つ。

我々は基質タンパク質としてアルカリホスファターゼ (PhoA) に着目した。PhoAは、その立体構造が複数のジスルフィド (S-S) 結合によって安定化される酸化のフォールディングを行うタンパク質である^[12]。我々はこの性質を利用し、変性剤と還元剤を用いてPhoAを完全に変性させた後、変性剤のみを除去することで、変性状態のPhoAを安定に維持することに成功した(図1)^[13]。この還元型変性PhoAは、シャペロンとの複合体立体構造解析において理想的な性質を持ち合わせており、シャペロン-基質タンパク質複合体の構造解析研究にブレークスルーをもたらした。

3. シャペロン基質複合体の構造解析：

Trigger Factor-PhoA 複合体

大腸菌の主要なシャペロンの一つである Trig-

ger Factor (TF) は、リボソームに結合し、合成されてくる新生ポリペプチド鎖のフォールディングを助ける^[14]。著者らは、先に述べた還元型変性PhoAを基質として用い、NMR法によりTF-PhoA複合体の立体構造解析を行った^[13]。構造解析においては、重水素標識やメチル選択的標識などを用いたサンプル調製、メチルTROSYや3D (¹H)-¹³C HMQC-NOESY-¹H-¹³C HMQCなどを用いたNMR測定などを実施し、高分子量かつ動的な複合体の構造解析を実現した。特に、3D (¹H)-¹³C HMQC-NOESY-¹H-¹³C HMQCスペクトルにおいては、¹³C軸におけるメチル基信号の高い分解能の恩恵を受けることができ、信頼性の高いNOE帰属が可能になる(図2)。構造解析の結果、TFの基質認識に関して、以下のような知見が得られた(図3A)。

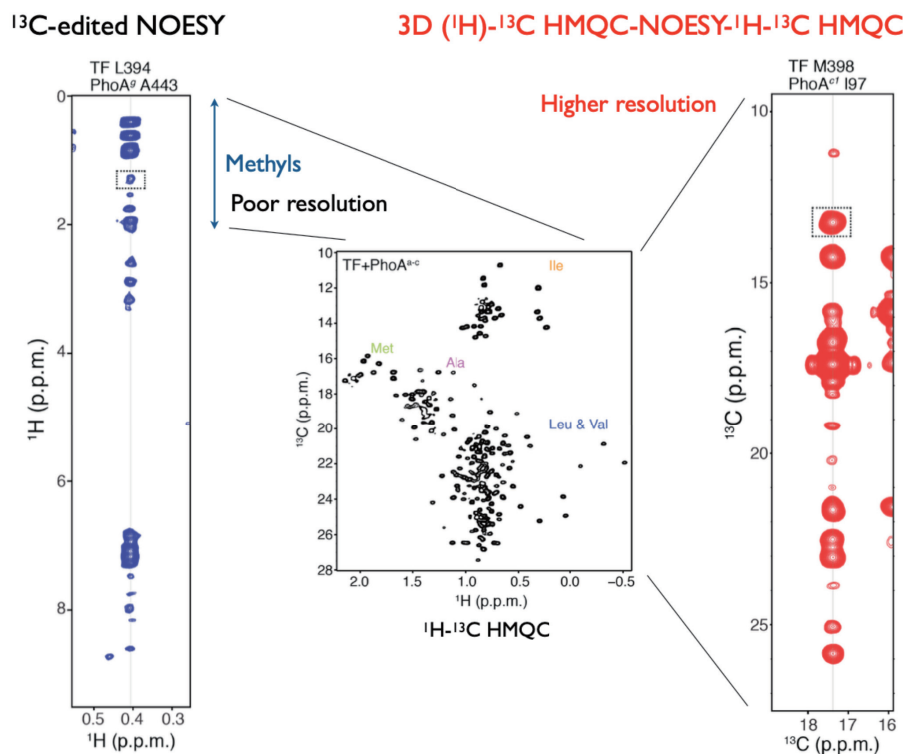


図2 メチル選択的標識サンプルについてのNOE解析。メチル基由来の信号の ^{13}C 軸の分離は比較的良好であるため、3D $(^1\text{H})-^{13}\text{C}$ HMQC-NOESY- $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMQCなどのNOESYスペクトルは、メチル間NOE信号を帰属するうえで有利である。

- ・TFは、溶液中では100 kDaの二量体を形成しているが、基質であるPhoAと結合する際には単量体として機能する。
- ・TFは3つのドメイン [リボソーム結合ドメイン (RBD)、基質結合ドメイン (SBD)、ペプチジルプロリルイソメラーゼドメイン (PPD)] から構成され、このうちSBDとPPDに存在する複数の独立した疎水的な領域が、基質タンパク質を認識する。
- ・それぞれの基質結合サイトは、基質タンパク質

上の5～10残基程度の短い疎水性ストレッチを認識する。疎水性ストレッチは基質タンパク質上に点在しているため、TF 1分子には100～150残基の基質タンパク質領域がロードされる。

TF-PhoAの複合体構造から、TFが基質タンパク質上に離散的に位置する複数の疎水性領域を同時に捕捉することで、クライアントタンパク質全体を物理的に引き伸ばした状態に保持することが示された。TFによって認識される領域は、PhoA

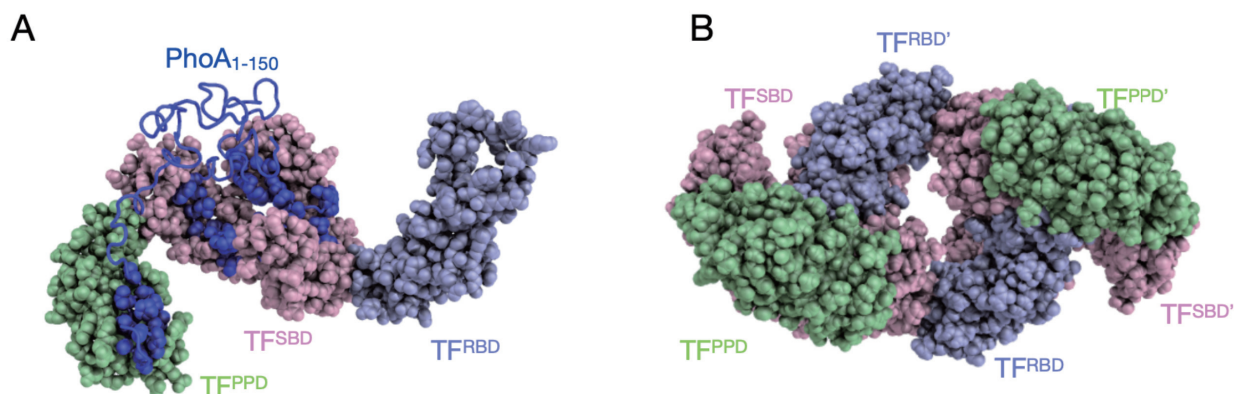


図3 TFについての立体構造解析。(A) TF-PhoA₁₋₁₅₀ 複合体の立体構造 (PDBID: 2MLY)。(B) TF二量体の立体構造 (PDBID: 6D6S)。二量体構造においては、TF分子がhead-to-tailの方向で向かいあい、基質結合面の一部を覆い隠している。

の天然構造においては内部の疎水性コアを形成する部分に相当し、TFはこれらの領域が分子内で不適切に相互作用し、ミスフォールディングや凝集を引き起こすのを防いでいると説明できる。

さらに、我々はTF二量体の高分解能立体構造もNMRを用いて決定した(図3B)^[15]。この構造から、TFの基質結合部位の一部が、二量体形成のための相互作用面と重なっていることが明らかになった。この結合様式は、TFが基質結合によって単量体化するメカニズムを説明するものである。

4. TF PPIase ドメインの作用機序

TFが持つ3つのドメインのうちPPDは、ペプチジルプロリル cis/trans イソメラーゼ (PPIase) としての酵素活性を持つ^[14]。タンパク質のフォールディングにおいて、プロリン残基のペプチド結合 (Xaa-Pro 結合) の cis/trans 異性化反応はしばしば律速段階となるため、この反応を触媒する PPD は、TF がフォールディングを促進する foldase として機能する上で重要な役割を担うが^[16]、その詳細な触媒メカニズムは不明であった。我々は、この触媒メカニズムを解明するため、Maltose-Binding Protein (MBP) に由来するペプチド断片と TF PPD との複合体を、NMR法と分子動力学 (MD) シミュレーションを組み合わせ解析した^[17]。NMRによる複合体の立体構造解析から、TF PPD は基質タンパク質の疎水性領域に存在する「プロリン-芳香族アミノ酸 (Pro-Aro)」という配列モチーフを優先的に認識するこ

とが明らかになった。基質の芳香環が PPD 表面の疎水性ポケットに、プロリン残基が隣接する疎水性の溝にそれぞれはまり込むように結合する(図4)。PPD と結合した基質タンパク質の Pro 残基由来の信号の化学シフト値からは、Xaa-Pro 結合は trans 状態であることが示された。NMR 構造を起点とした MD シミュレーションによって、結合角を trans から cis に人為的に変化させた際の構造変化を追跡したところ、反応の遷移状態 (二面角 $\omega \approx -90^\circ$ の syn 状態) において、PPD を構成する 195 番目のイソロイシン (I195) の主鎖アミド基と、基質ペプチドのプロリン直前の残基の主鎖カルボニル基との間に、一過的な分子間水素結合が形成されることが見出された。この結果に基づき、我々は分子間水素結合が遷移状態を特異的に安定化させ、異性化反応のエネルギー障壁を低減させることが、触媒作用の本質であるというメカニズムを提唱した^[17]。さらに、この反応ダイナミクスを実験的に検証するため、Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 緩和分散法によってマイクロ秒からミリ秒タイムスケールの化学交換を評価した。その結果、TF PPD に結合した基質タンパク質の Xaa-Pro 結合は、 740 s^{-1} の速度で cis/trans の状態間を行き来していることが明らかになった。触媒されない状態での cis/trans 異性化は $\sim 0.01 \text{ s}^{-1}$ またはそれ以下の速度であることが知られており^[18]、本実験によって TF PPD による異性化の加速が明確に示された。さらに、I195 に変異を導入すると PPIase 活性が著しく低下することが確認され、MD シミュレーションで示唆

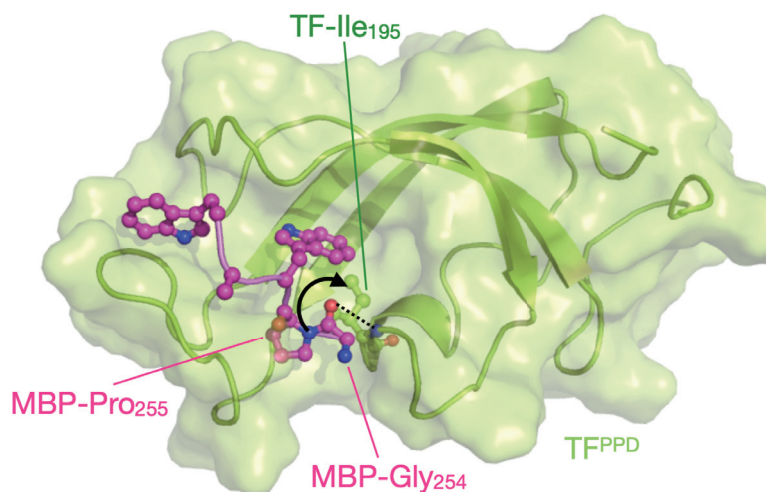


図4 TF^{PPD}によるプロリン残基周辺の認識様式。異性化の中間状態においては、Xaa-Proのペプチド結合のカルボニル基がTF Ile195と水素結合を形成することで、中間状態が安定化される。

された分子間水素結合の重要性が実験的にも裏付けられた^[17]。このように、構造情報、計算科学、そしてダイナミクスの情報を統合することで、シャペロンが持つ酵素ドメインの作用機序を解明した。

5. 疾患関連変異が PPIase に与える

アロステリック効果

TF PPDが属するFKBP型PPIaseの他にも、PPIaseにはCyclophilin型やParvulin型といったファミリーが存在する。なかでもCyclophilin A (PPIA)は、免疫抑制剤シクロスポリンAの標的として知られ、様々な生命現象に関与する代表的なPPIaseである。近年、このPPIAの機能不全が、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態と関連することが示唆されており、ALS患者からK76E変異が同定された^[19]。PPIAはR55を活性中心とし、その周囲のポケットによって基質と結合することが知られていたが^[20]、ALS関連変異K76Eはこの活性中心とは離れており、K76EがPPIase活性に与える影響やそのメカニズムは不明であった。我々はまず、生化学解析により、PPIA K76E変異体の酵素活性を調べたところ、K76E変異によってPPIase活性が低下することを明らかにした^[21]。しかし、NMRやMALSを用いた実験からは、活性低下の原因が基質結合能やタンパク質の安定性、あるいは活性部位の静的な立体構造の変化では説明できないことが示された。我々は、PPIAの活性が、マイクロ秒からミリ秒タイムスケールの構

造揺らぎと密接な関係があることを示した先行研究に注目し^[22, 23]、PPIA WT と K76EについてCPMG緩和分散法による評価を行った。解析の結果、野生型が持つ酵素活性に必須なマイクロ秒からミリ秒スケールの内部運動が、K76E変異体では約1/10にまで抑制されていたことが明らかになった(図5)。さらに、このダイナミクスの抑制は、変異部位K76が活性中心と遠隔的に繋がる「アロステリック・ネットワーク」を介して引き起こされることが示唆された。このように、我々の研究により、ALS関連K76E変異は、静的構造ではなくタンパク質の機能的なダイナミクスを阻害するというアロステリックな機構を介してPPIAの機能を低下させることが明らかになった。これは疾患発症の分子メカニズムに新たな知見を与えるものであると期待される。

6. タンパク質の液 - 液相分離を制御する

シャペロン

分子シャペロン研究における近年の大きな潮流の一つに、液 - 液相分離 (LLPS) との関わりがある。LLPSは、特定のタンパク質や核酸が生体内で濃縮され、膜に囲まれていない液滴状のコンパートメント (生体分子凝縮体) を形成する現象であり、転写、シグナル伝達、ストレス応答など、多くの生命現象の制御に関与している^[24]。これらの凝縮体を構成するタンパク質の多くは、天然変性領域 (IDR) や低複雑性ドメイン (LCD) を含んでおり、これらの領域を介した多価的な相互作用

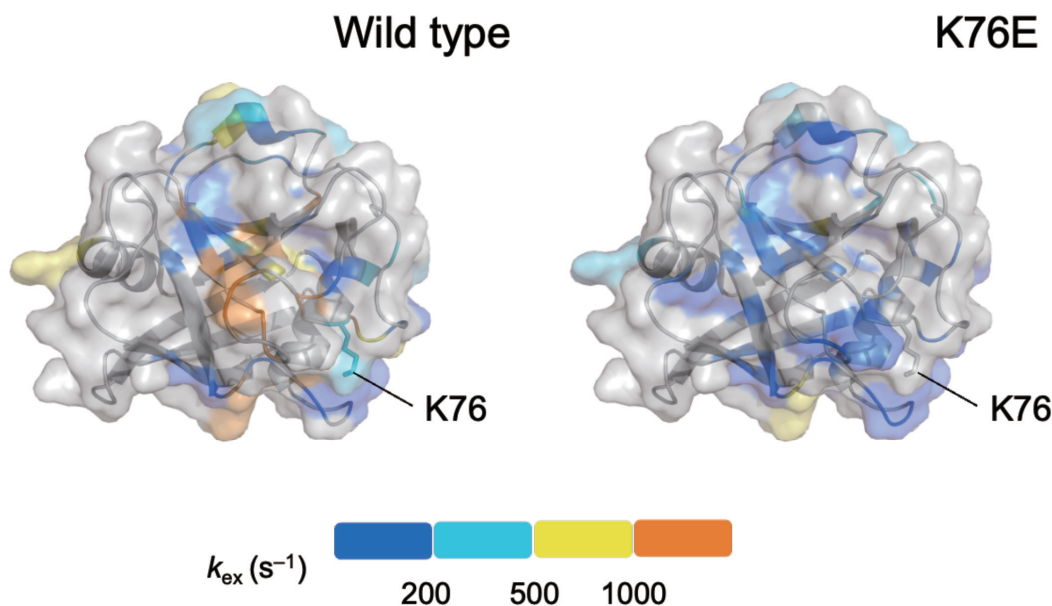


図5 PPIA K76E変異による構造揺らぎの変化。野生型に観測されていた1,000 Hz程度の交換が、K76E変異では観測されず、200 Hz程度の遅い交換が優勢になる。

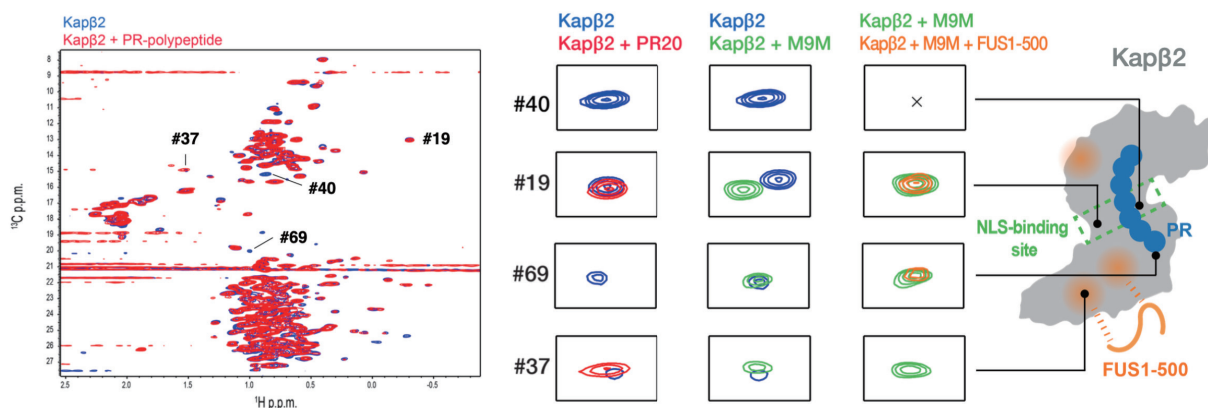


図6 Kapβ2とPRペプチドの相互作用解析。Kapβ2が基質を認識するうえで重要なNLS結合配列の認識を担う部位が、PRペプチドによって塞がれることが示唆された。

用がLLPSの駆動力となる。近年、シャペロンの新たな機能として、このようなIDRやLCDを認識し、LLPSを制御する「相分離シャペロン」または「phase modifier」としての役割が注目されている。その代表例が、核内輸送受容体Karyopherin-β2 (Kapβ2) である。Kapβ2は、RNA結合タンパク質 (RBP) であるFUSなどを核内に輸送するだけでなく、FUSが形成する液滴を溶解させるシャペロンとしても機能する。Kapβ2の機能は、ALSの原因遺伝子の一つである*C9orf72*の変異に由来するジペプチドリピート (PRペプチド) によって阻害されることが知られていたが、その詳細な分子メカニズムは不明であった。そこで我々は、この阻害機構を解明するため、NMR法およびMDシミュレーションを用いた解析を行った。Kapβ2 (890残基、～100kDa) に対するNMR解析のため、メチル選択的同位体標識法やメチルTROSYなどを適用した解析を実施した。NMRを用いた相互作用解析においては、PRペプチドの添加によってKapβ2の特定の信号に摂動が観測され、直接的な結合が確認された。この結合部位を同定するため、Kapβ2が基質タンパク質の各局在化シグナル (NLS) を認識する部位に選択的に結合する阻害剤ペプチドを添加した際のスペクトル変化と比較した。その結果、PRペプチドによって摂動を受けるシグナルの一部が、NLSペプチドによって摂動を受けるシグナルと一致することを見出した (図6)^[25]。この結果は、毒性PRペプチドの結合部位が、Kapβ2の本来の基質であるFUSのNLS認識部位と部分的に重複していることを示唆している。このNMRの結果は、MDシミュレーションによってもサポートされ、正に

帯電したPRペプチドが、Kapβ2表面の負に帯電したポケットに結合する様子が可視化された。

以上のNMRとMDシミュレーションの協調的な解析から、毒性PRペプチドがKapβ2のNLS結合部位に競合的に結合することで、Kapβ2とFUSとの正常な相互作用を阻害し、結果としてFUSの異常な相分離や凝集を引き起こすという、ALSの病態発症に関する分子メカニズムが明らかになった。

7. まとめ

本稿では、分子シャペロン、特に我々が研究対象としてきたいくつかのシャペロンに対する溶液NMR法を用いた研究を概説した。いずれの場合も、運動性の高い分子や弱い相互作用の解析に優れるNMRの特性を活かし、シャペロンと変性状態の基質タンパク質や、阻害因子との結合様式を明らかにしてきた。NMR解析から見てきたのは、シャペロンが単に静的な足場として機能するのではなく、基質タンパク質との動的で多価的な相互作用や自身の構造揺らぎなどを通して、基質タンパク質のコンフォメーションを制御している、動的な姿である。シャペロンが関与する生命現象は、タンパク質のフォールディングにとどまらず、近年ではLLPSの制御など、その機能的な重要性は広がりを見せている。生体内では、多種多様なシャペロンが協奏的に機能し、複雑なシャペロンネットワークを形成することで、精緻な生命現象を駆動している。今後、NMR法を駆使して個々のシャペロン複合体の解析を深化させるとともに、より生理的環境に近い条件での解析などを組み合わせることで、高次のシャペロンネット

ワーク全体の動作原理を理解することが重要な課題となるだろう。このような基礎研究の進展は、シャペロンが関わる様々な疾患の病態解明や、新たな創薬戦略の開発に繋がるものと期待される。

8. 謝 辞

本稿にて解説した、TF-PhoA複合体の構造解析、TF二量体の構造解析は、Rutgers University (現 St. Jude Children's Research Hospital) Dr. Charalampos G. Kalodimos のご指導のもと推進した。TF-MBPの構造解析、TF二量体の一部の解析は、北海道大学 石森 浩一郎 博士のご指導のもと、主に北海道大学 (現 徳島大学) 川越 聡一郎 博士とともに推進した。Kap β 2についての解析は、奈良県立医科大学 森 英一朗 博士、立命館大学 (現 中外製薬) 吉澤 拓也 博士との共同研究として、北海道大学 (現 住友ファーマ) 川向 ほの香 博士とともに推進した。PPIAについての解析は、徳島大学 服部 良一 博士とともに推進し、図5は服部 良一 博士にご提供いただいた。以上の方々を含む、多くの共同研究者の方々、研究室メンバーの方々のご支援に深く感謝申し上げる。

参考文献

- [1] Hartl, F. U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324–332 (2011).
- [2] Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. & Ulrich Hartl, F. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* **82**, 323–355 (2013).
- [3] Saibil, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 630–642 (2013).
- [4] Kawagoe, S., Mori, E. & Saio, T. Regulation of Liquid-Liquid Phase Separation by Molecular Chaperones. *Thermal Medicine* **37**, 31–44 (2021).
- [5] Taipale, M., Jarosz, D. F. & Lindquist, S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: Emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 515–528 (2010).
- [6] Dekker, C., Kruijff, B. de & Gros, P. Crystal structure of SecB from *Escherichia coli*. *J Struct Biol* **144**, 313–319 (2003).
- [7] Ali, M. M. U., Roe, S. M., Vaughan, C. K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P. W., Prodromou, C. & Pearl, L. H. Crystal structure of an Hsp90–nucleotide–p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* **440**, 1013–1017 (2006).
- [8] Ferbitz, L., Maier, T., Patzelt, H., Bukau, B., Deuerling, E. & Ban, N. Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature* **431**, 590–596 (2004).
- [9] Huang, C. & Kalodimos, C. G. Structures of Large Protein Complexes Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Annu Rev Biophys* **46**, 317–336 (2017).
- [10] Tugarinov, V., Kanelis, V. & Kay, L. E. Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. *Nat Protoc* **1**, 749–754 (2006).
- [11] Tugarinov, V., Hwang, P. M. & Kay, L. E. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of high-molecular-weight proteins. *Annu Rev Biochem* **73**, 107–146 (2004).
- [12] Sone, M., Kishigami, S., Yoshihisa, T. & Ito, K. Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. *J Biol Chem* **272**, 6174–6178 (1997).
- [13] Saio, T., Guan, X., Rossi, P., Economou, A. & Kalodimos, C. G. Structural basis for protein antiaggregation activity of the trigger factor chaperone. *Science* **344**, 1250494 (2014).
- [14] Hoffmann, A., Bukau, B. & Kramer, G. Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1803**, 650–661 (2010).
- [15] Saio, T., Kawagoe, S., Ishimori, K. & Kalodimos, C. G. Oligomerization of a molecular chaperone modulates its activity. *Elife* **7**, e35731 (2018).
- [16] Scholz, C., Stoller, G., Zarnt, T., Fischer, G. & Schmid, F. X. Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding. *EMBO Journal* **16**, 54–58 (1997).
- [17] Kawagoe, S., Nakagawa, H., Kumeta, H., Ishimori, K. & Saio, T. Structural insight into proline cis/trans isomerization of unfolded proteins catalyzed by the trigger factor chaperone. *J Biol Chem* **293**, 15095–15196 (2018).
- [18] Brandts, J. F., Halvorson, H. R. & Brennan, M. Consideration of the Possibility That the Slow Step in Protein Denaturation Reactions is Due to Cis-Trans Isomerism of Proline Residues. *Biochemistry* **14**, 4953–4963 (1975).
- [19] Pasetto, L., Grassano, M., Pozzi, S., Luotti, S., Sammali, E., Migazzi, A., Basso, M., Spagnoli, G., Biasini, E., Micotti, E., Cerovic, M., Carli, M., Forloni, G., De Marco, G., Manera, U., Moglia, C., Mora, G., Traynor, B. J., Chio, A., Calvo, A. & Bonetto, V. Defective cyclophilin A induces TDP-43 proteinopathy: implications for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Brain* **144**, 3710–3726 (2021).
- [20] Gamble, T. R., Vajdos, F. F., Yoo, S., Worthylake, D. K., Houseweart, M., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* **87**, 1285–1294 (1996).
- [21] Hattori, Y., Kumashiro, M., Kumeta, H., Kyo, T., Kawagoe, S., Matsusaki, M. & Saio, T. A Disease-Associated Mutation Impedes PPIA through Allosteric Dynamics Modulation. *Biochemistry* in press (2025).
- [22] Holliday, M. J., Armstrong, G. S. & Eisenmesser, E. Z. Determination of the Full Catalytic Cycle among Multiple Cyclophilin Family Members and Limitations on the Application of CPMG-RD in Reversible Catalytic Systems. *Biochemistry* **54**, 5815–5827 (2015).
- [23] Eisenmesser, E. Z., Millet, O., Labeikovsky, W., Korzhnev, D. M., Wolf-Watz, M., Bosco, D. A., Skalicky, J. J., Kay, L. E. & Kern, D. Intrinsic dynamics of an

- enzyme underlies catalysis. *Nature* **438**, 117–121 (2005).
- [24] Yoshizawa, T., Nozawa, R.-S., Jia, T. Z., Saio, T. & Mori, E. Biological phase separation: cell biology meets biophysics. *Biophys Rev* **5**, 1–21 (2020).
- [25] Nanaura, H., Kawamukai, H., Fujiwara, A., Uehara, T., Aiba, Y., Nakanishi, M., Shiota, T., Hibino, M., Wiriyasermkul, P., Kikuchi, S., Nagata, R., Matsubayashi, M., Shinkai, Y., Niwa, T., Mannen, T., Morikawa, N., Iguchi, N., Kiriya, T., Morishima, K., Inoue, R., Sugiyama, M., Oda, T., Koder, N., Toma-Fukai, S., Sato, M., Taguchi, H., Nagamori, S., Shoji, O., Ishimori, K., Matsumura, H., Sugie, K., Saio, T., Yoshizawa, T. & Mori, E. C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers. *Nat Commun* **12**, 5301 (2021).



齋尾 智英 (さいお・ともひで)

2002年 4月－2006年 3月 北海道大学薬学部総合薬学科

2006年 4月－2008年 3月 北海道大学生命科学院生命医薬化学コース修士課程

2008年 4月－2011年 3月 北海道大学生命科学院生命医薬化学コース修士課程

2011年 3月 学位取得：博士（生命科学）

2011年 4月 北海道大学先端生命科学研究院、博士研究員

2011年 10月 Rutgers University, Postdoctoral associate

2014年 10月 北海道大学大学院理学院 助教

2014年 10月 JST、さがけ研究員（兼任）

2020年 9月 徳島大学先端酵素学研究所 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 — (第四回) ^[7]

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

今回は、プロトンが多かったり、プロトンシグナルが重なり合ったりするときに有効な測定法を使ってみます。プロトンが重なって $^1\text{H}/^1\text{H}$ 相関が読めない場合の解析方針は(図70)、一次元法で ^1H の形を見ること、縦軸をカーボンにして分離すること、そして化学シフトが近いプロトンどうしの相関は ^{13}C 非デカップリング $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ 相関法で見ることです。第二回で、チグリン酸(6)のH-d、H-eの化学シフトが近接していて、これらのどちらがCOSYスペクトル(図27(a))でH-bと相関を与えているか区別できず、H2BCスペクトル(図27(e))を用いました。プロトンが多い化合物の場合は、これに先立ち、HSQC-TOCSYスペクトルで、プロトン、カーボンのシグナルをプロトンのスピン系ごとに分類しておくことが解析が簡単になることがあります。また、第二回では、化学シフトが重なっている6のH-dとH-eのあいだのNOEを見るのに、 ^{13}C 非デカップリングHSQC-NOESY法を使いました(図29(c))。 ^{13}C

デカップリングをはずすと縦軸のカーボンに直結しているHSQCシグナルが J_{CH} で大きく分裂し、中央の空いたスペースに相関ピークが見えるようになります。この方針は対称な部分構造の解析にも使えます。

未知化合物(13)の構造解析

酪酸ブチル(13)(図71(a))の構造が未知として、推定をしてみましょう。分子式は $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$ とわかっているものとします。不足水素指標を計算すると1になります。試料2mgをクロロホルム-*d*溶液とした ^1H -NMRスペクトル(図71(b))で、7.24ppmのシグナルは溶媒の残留プロトン(CHCl_3)、1.55ppmは溶媒中の水、5.28ppmの積分が小さいシグナルは不純物(ジクロロメタン)と推定されます^[8]。それ以外のシグナルの積分は左から1:1:2:1:3になっています。分子式から、それぞれ2倍した2、2、4、2、6個が水素の数であると推定します。 ^{13}C -NMRスペクトル(図71(c))に分子式の炭素の数と同じ8個のシグナ

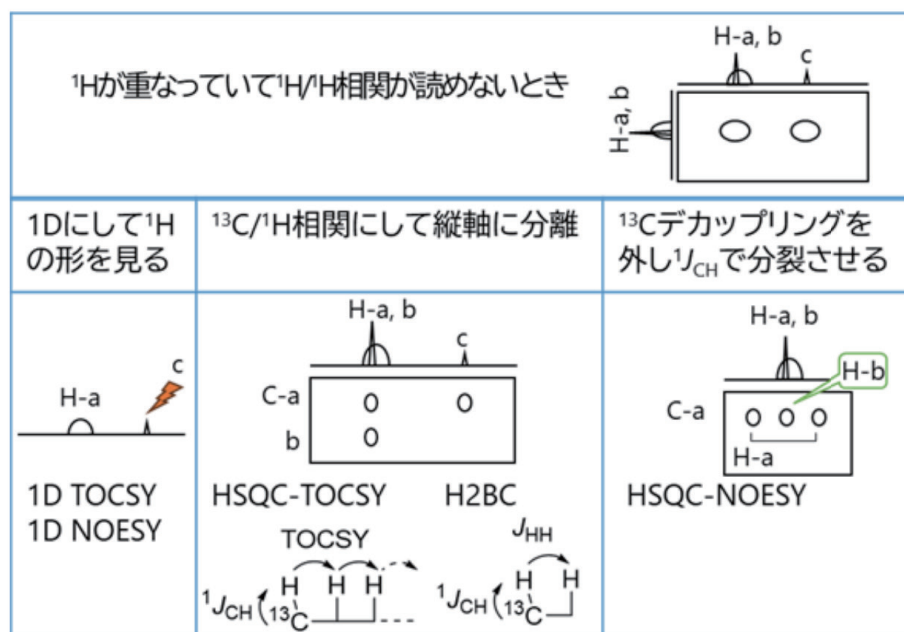


図70 プロトンシグナルが重なり合っている場合の方針。

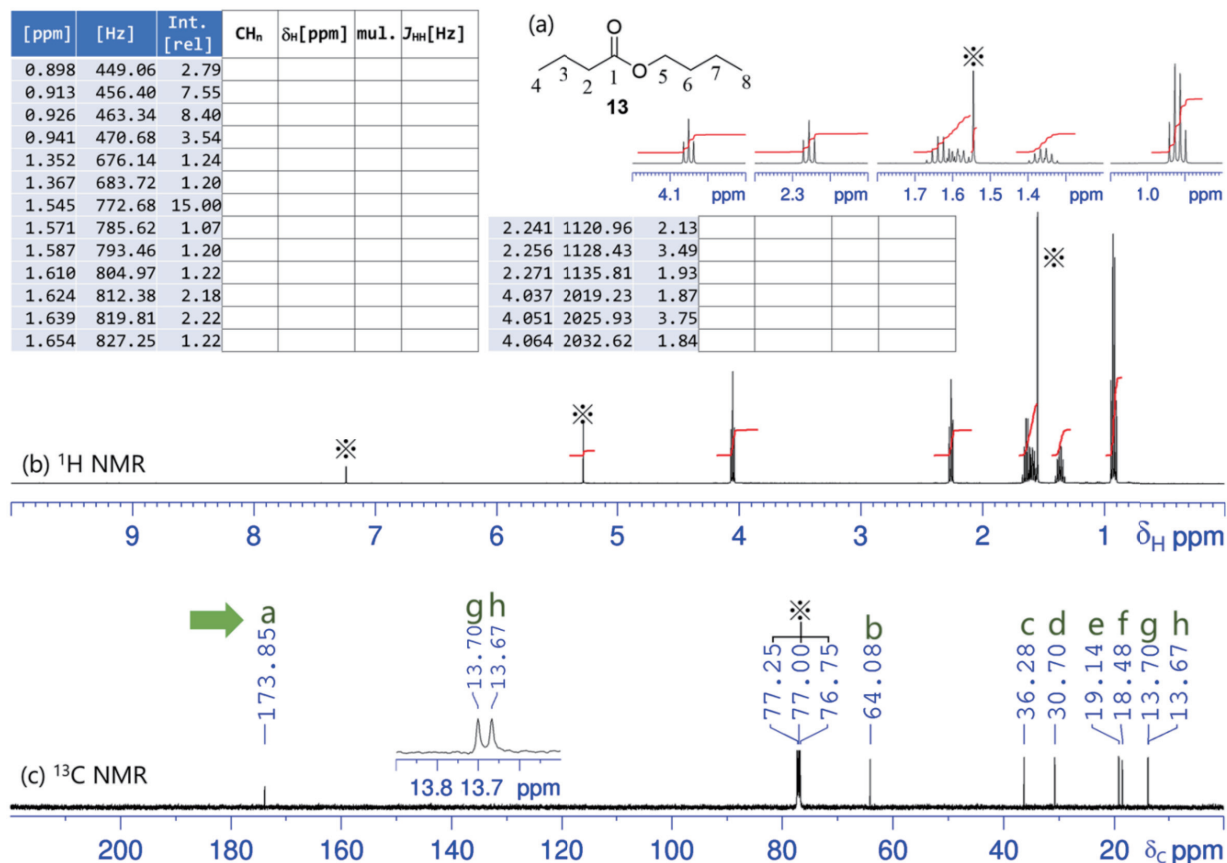


図71 (a) 酢酸ブチル(13)の構造。 (b) 13 (2 mg/chloroform-d) の¹H-NMR スペクトル(500 MHz)。 (c) ¹³C-NMR スペクトル(126 MHz)。 ※は溶媒および不純物由来。

HSQC

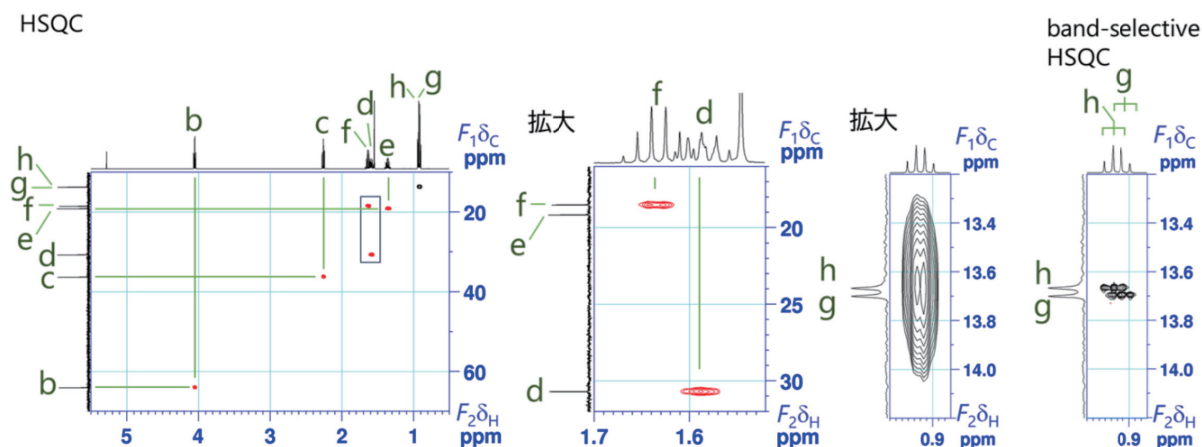


図72 13のHSQCスペクトル。CH₃、CHは正(黒)、CH₂は負(赤)。

ルが見えています。これまでと同様にカーボンの化学シフトの大きいほうから順にアルファベットを振っておきます。

HSQC スペクトル (図72) で、直結プロトンに、カーボンと同じアルファベットを振っていきます。相関ピークの位相は、gとhが同じでそれ以外は逆になっています。積分比はbを1とした時、gとhをあわせて3であったことから、先ほどの推定どおり、bはメチレンの水素2個、gとhはメチル基2個の水素6個と推定されます。残るプロ

トンc、d、e、fはそれぞれメチレンプロトン2個分となります。それぞれのメチレンは、プロトン2個が等価に現れています。以上で水素が16個となり水酸基はないようです。このことと化学シフトからC-aはエステルのカルボニルカーボンであり、酸素にはC-bが隣接している構造が推定されます。環はありません。

¹H-NMR スペクトル (図71 (b)) でメチル基 H-g、hの形がJ=7 Hz程度のカルテットのように見えますが、メチル基プロトンがプロトンと

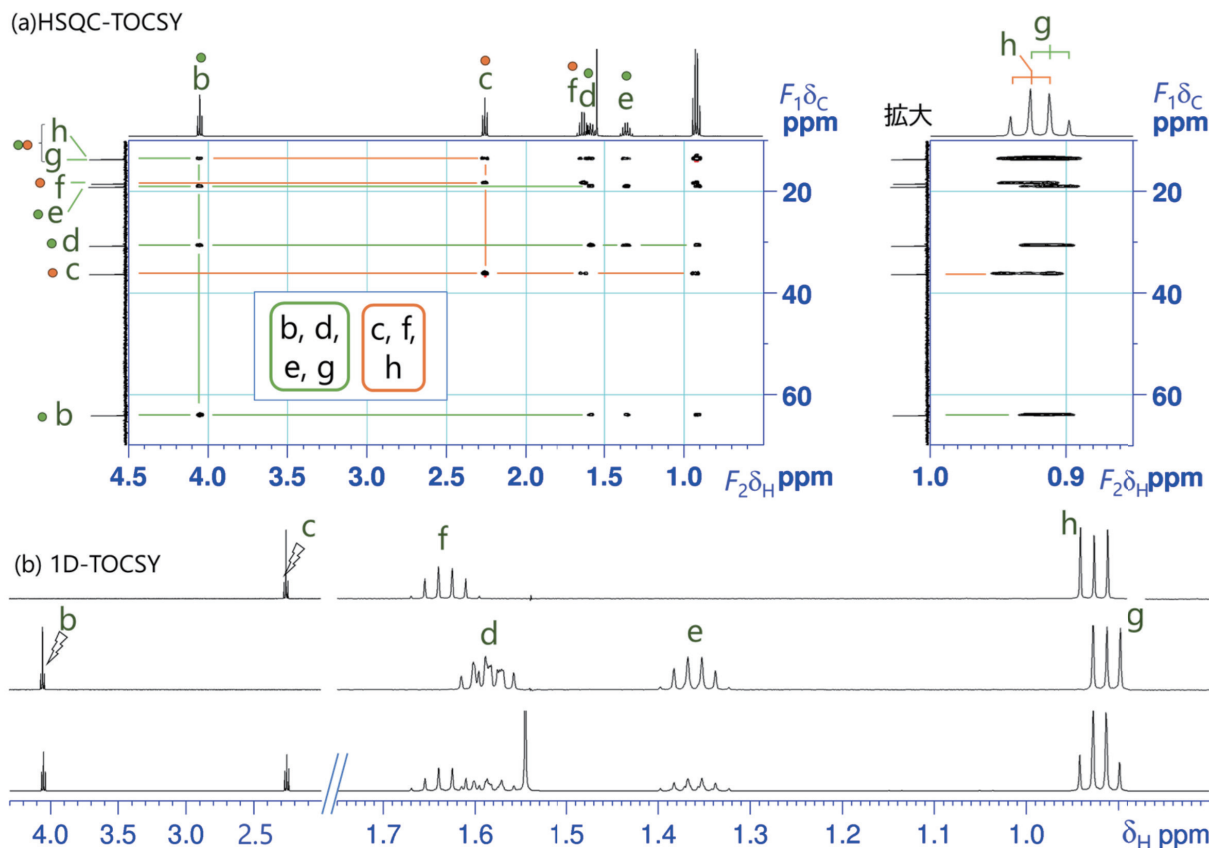


図73 (a) 13のHSQC-TOCSYスペクトル。(b) 1D-TOCSYスペクトル。

のカップリングでこのようなカルテットに観測されることはなく、ずれて重なっているものと推定されます。メチル基gとhはカーボンの化学シフトも近接しており、HSQCスペクトルではピークが分離できていません。そこで、band-selective HSQCスペクトルを測定しC-gとC-hの分離を試みました。band-selective 二次元測定法では、 ^{13}C の選択パルスを用いて二次元スペクトルの縦方向の一部分だけを測定することで、縦方向の分解能を高くすることができます。HSQCとband-selective HSQCスペクトルの同じ範囲の拡大図を並べて表示しています。後者では、二つの相関ピークが分離し、H-gとH-hがそれぞれトリプレットであることと、その化学シフト差が500MHzにおいてJ値と同程度であることが確認できます。

HSQC-TOCSY スペクトルでシグナルを分類する

プロトンが多い化合物の場合、HSQC-TOCSYスペクトルを使って、プロトン、カーボンのシグナルをプロトンのスピン系ごとに分類しておきます。天然存在比のサンプルの $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ 相関では

分子中に一つだけ ^{13}C が入っている分子が観測されます。スペクトルは、 ^{13}C が入っている位置の異なる分子に由来するシグナルの重ね合わせとなっています。HSQC-TOCSYスペクトルは縦軸のカーボンから横に見て、HSQCシグナルと、そのプロトンと同じスピン系のプロトンに相関ピークが出ます(図70)。HSQC-TOCSYの解析の際には、まず、 ^1H -NMRスペクトルで、ほかのプロトンと重ならないプロトンシグナルから縦に読み、同じプロトンスピン系に属するカーボンを見つけていきます。このとき、別の分子由来のシグナルを見ていることになります。

13のHSQC-TOCSYスペクトル(図73(a))を、まず、H-bから縦に見ると、C-b, d, e, およびgとhのどちらかまたは両方にピークが出ています。H-cから縦に見ると、C-c, f, およびgとhのどちらかまたは両方にピークが出ています。H-dおよびH-eから縦に見たパターンはH-bと同じで、H-fから縦に見たパターンはH-cと同じです。プロトンスピン系は二種類見えていることがわかります。

C-gとC-hは化学シフトが近接しており、どちらかまたは両方に相関ピークがあるかどうか判

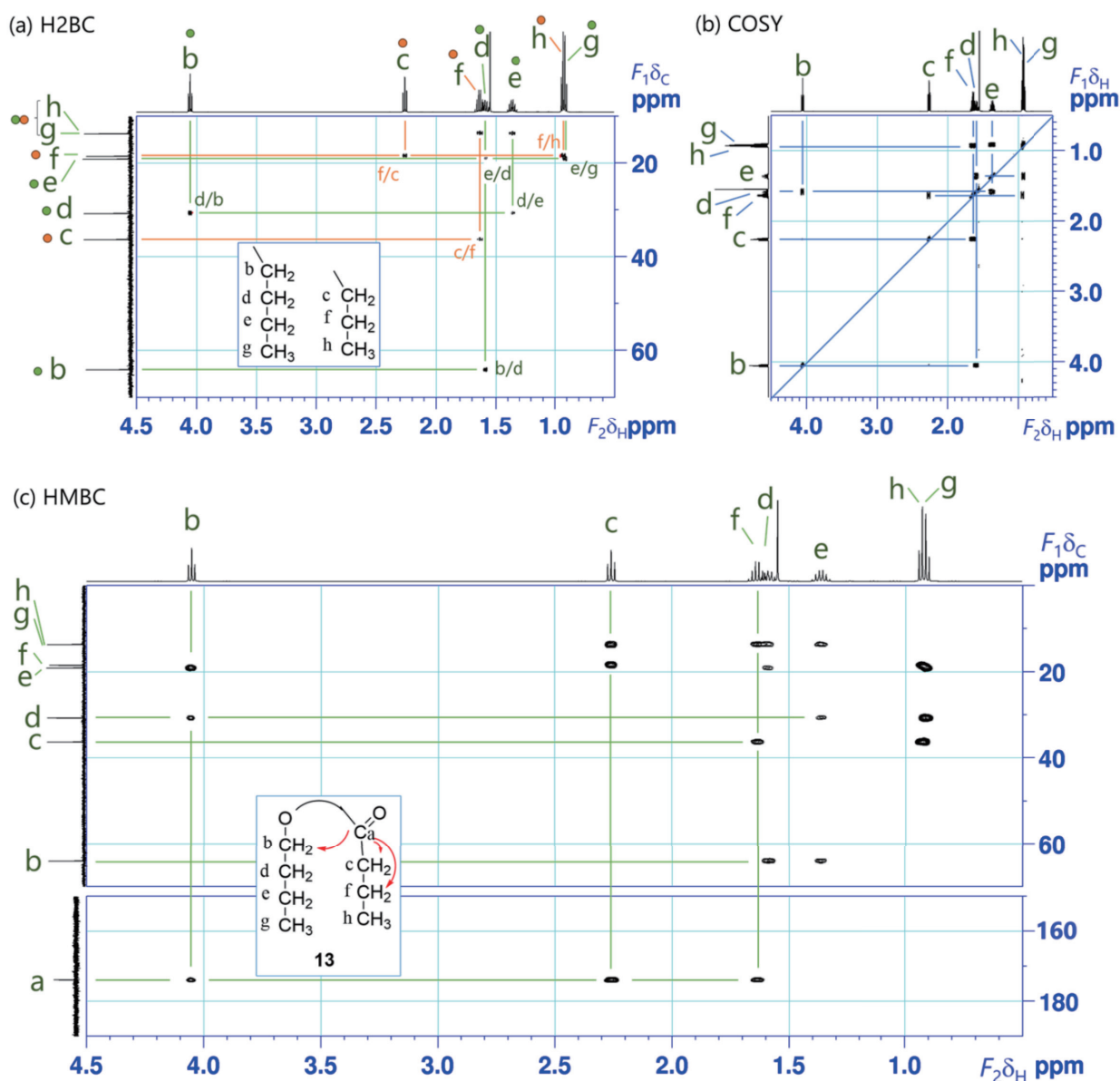


図74 (a) **13**のH2BCスペクトル。(b) COSYスペクトル。(c) HMBCスペクトル。

断できませんが、H-gとH-hは少しずれていることがわかっています。図73 (a) の拡大図でC-b、C-cから横に見ていくとC-bはH-gと、C-cはH-hと相関があるように見えます。二次元スペクトルでわかりにくければ、1D-TOCSYスペクトル(図73 (b))で、プロトンシグナルの形を確認します。H-bを選択励起した1D-TOCSYではH-gに、H-cを選択励起した1D-TOCSYではH-hにシグナルが得られています。以上により、**13**のプロトン、カーボン二つのグループに分類できました。ひとつはb、d、e、gのグループ、もう一つはc、f、hのグループです。

H2BC スペクトルの解析

プロトンが多くCOSYが読みにくい場合は、縦

軸が ^{13}C であるH2BCスペクトルが役に立ちます。H2BCは、縦軸のカーボンから $^1J_{\text{CH}} \rightarrow ^3J_{\text{HH}}$ の二段階の磁化移動を経て2結合はなれたカーボンとプロトンに相関が得られます(図70)。直結シグナルと、 $^3J_{\text{HH}}$ が小さい相関ピークは弱かったり出なかったりすることがあります。HSQC-TOCSYでプロトンのスピン系ごとにグループ分けしてあれば、H2BC相関が得られるのは同じグループ内の ^1H と ^{13}C だけであり、別のグループ間には相関が出ないことを使って、近接する相関ピークの解釈を行うことができます。

13のH2BCスペクトル(図74 (a))を読んでみましょう。まず、プロトンのスピン系のb、d、e、gのグループについて、並び順を決めていきます。H-bから縦に見ると、C-dと相関ピークがあるこ

とから、bの隣はdであることがわかります。C-bから横にたどってもH-dと相関ピークがあります。これらのいずれかが観測できれば、bの隣を決めることができます。COSYスペクトル(図74(b))は縦軸、横軸ともに δ_H ですので、二つの相関ピークが対角線に関して対称に現れ、H-bから縦に見たH-dとの相関ピークと、H-bから横に見たH-dとの相関ピークは、シグナルの重なり合い方などに差はありません。いっぽうH2BCは、プロトンから縦に見ることとカーボンから横に見ることができ、プロトンの化学シフトが近くても、カーボン側で分離できることがあります。もしも、COSYでH-bと相関が出ているのがH-dであるかH-fであるか迷う場合、H2BCでも同様にC-bから横にたどった相関ピークが出ているのが、H-dであるかH-fであるか迷うことになります。そのような場合でも、H2BCでH-bから縦に見たC-dとの相関ピークによって相手をはっきりさせることができます。

続いて図74(a)のH2BCスペクトルをC-dから横に見るとH-eと相関があり、dの隣はeとわかります。同じ情報の相関ピークがC-e/H-dにあります。次にH-eから縦に見るといずれもメチル基のC-gかhと相関がありますが、このうち同じスピン系のgがeの隣であると推定できます。また、C-eから横に見たH-gとの相関ピークは、C-f/H-hの相関ピークとは左右にずれていることがわかります。

次に、c、f、hのグループについて決めます。H-cから縦に見るとC-fと相関ピークがあり、cの隣はfとわかります。同じ情報の相関ピークがC-c/H-fにあります。C-fから右に見ると先ほど述べたH-hとの相関ピークがあり、fの隣はhとわかります。以上により、それぞれのプロトンスピン系グループ内での並び順を、b-d-e-gとc-f-hと決定できました。このH2BCスペクトルには直結ピークは出ていません。

部分構造をつなぎ合わせて仕上げる

最後に、HMBCスペクトル(図74(c))で第四級炭素C-aとH-b、c、fとのあいだに相関ピークが出ていますので、C-b、酸素、C-a、C-cの順に

部分構造をつなぎ合わせてエステルの推定構造を完成させます。なお、図71(b)のように、実験に使用した溶媒が完全に除去されずにNMRスペクトルで見えてしまうことがあります。サンプル調製前には試料をよく乾燥させ、必要なら共沸を行います。不純物由来のシグナルを構造解析に含めてしまうと、誤った構造が導かれることにつながります。積分比がおかしかったり、二次元NMRでどこともつながらなかったりするシグナルは、データ集などで化学シフトを確認するようにします。各種重水素化溶媒中における汎用溶媒の 1H 、 ^{13}C 化学シフトが調べられており、教科書やデータ集に掲載されています^[8]。

未知化合物 X^{エックス} の構造を推定せよ

ミッション7. 未知化合物14(分子式 $C_6H_{12}O_2$ 、3mg/chloroform-d、図75、76)。プロトンのスピン系はひとつながりになっています。並び順をH2BCで推定し、分岐や非等価メチレンがある場合の相関ピークの現れ方や解析方法を確認してください。

ミッション8. 未知化合物15(分子式 $C_5H_{10}O_5$ 、5mg/ D_2O 、図77、78)は単糖であり溶液中では α 体と β 体の混合物となっています。それぞれのシグナルを帰属し、 J_{HH} の値も使って糖の種類を推定してみてください。

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。

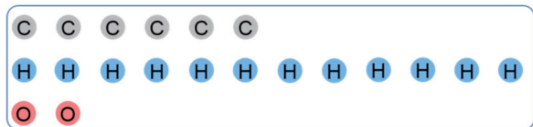
引用文献

- [7] 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). 第三回, 同 **14**, 66-77ページ(2025). 解答例は機関誌一覧のページに掲載。
- [8] たとえば, シルバースタインら「有機化合物のスペクトルによる同定法(第8版)」東京化学同人(2015), p. 190 微量の不純物としての実験室での汎用溶媒の化学シフト, p.228 いくつかの重水素化NMR溶媒中において痕跡量の不純物となる一般的な実験室溶媒の ^{13}C 化学シフト。

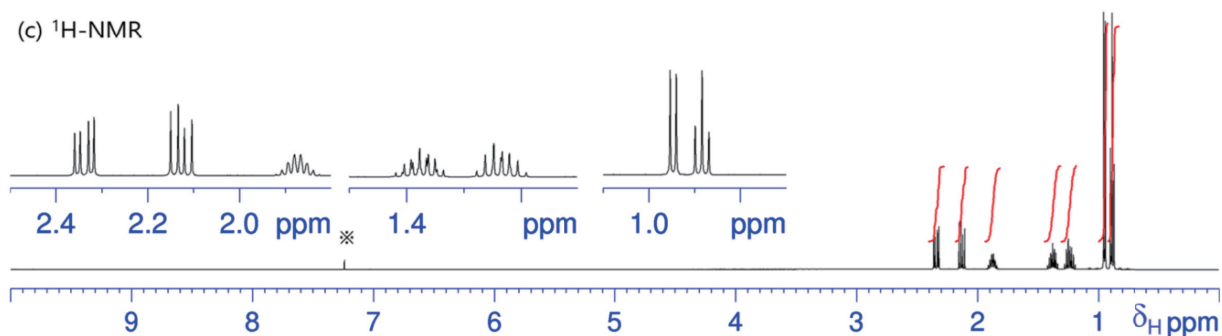
(a) 未知化合物**14**の分子式は $C_6H_{12}O_2$

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

(b) 原子を用意する



(c) 1H -NMR



[ppm]	[Hz]	Int. [rel]	CH _n	δ _H [ppm]	mul.	J _{HH} [Hz]
0.869	434.72	6.11				
0.884	442.16	14.98				
0.899	449.59	7.14				
0.940	470.30	14.54				
0.949	474.61	0.64				
0.954	476.99	15.00				
1.191	595.52	0.26				
1.206	602.89	0.86				
1.218	609.18	0.51				
1.220	610.27	1.27				
1.233	616.46	1.34				
1.235	617.65	1.02				
1.247	623.84	1.80				
1.262	631.28	1.18				
1.277	638.76	0.31				
1.335	667.83	0.36				
1.347	673.59	0.42				
1.350	675.25	0.97				
1.362	681.08	1.20				
1.365	682.72	1.01				
1.374	687.24	0.40				
1.377	688.64	1.52				
1.380	690.17	0.46				
1.389	694.58	0.76				
1.392	696.20	0.95				
1.404	702.06	0.68				
1.407	703.79	0.26				
1.419	709.57	0.22				
1.838	919.41	0.25				
1.852	926.38	0.53				
1.866	933.36	0.91				
1.879	939.92	0.90				
1.893	946.95	0.56				
1.907	953.65	0.26				
2.103	1051.91	2.38				
2.120	1060.06	2.04				
2.133	1066.90	3.04				
2.150	1075.06	2.75				
2.317	1158.73	2.47				
2.329	1164.77	2.34				
2.347	1173.73	1.88				
2.359	1179.76	1.81				

図75 化合物**14** ($C_6H_{12}O_2$) の構造を推定しシグナルを帰属してみよう。(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) **14** (3mg/chloroform-*d*) の 1H -NMRスペクトル (500 MHz)。

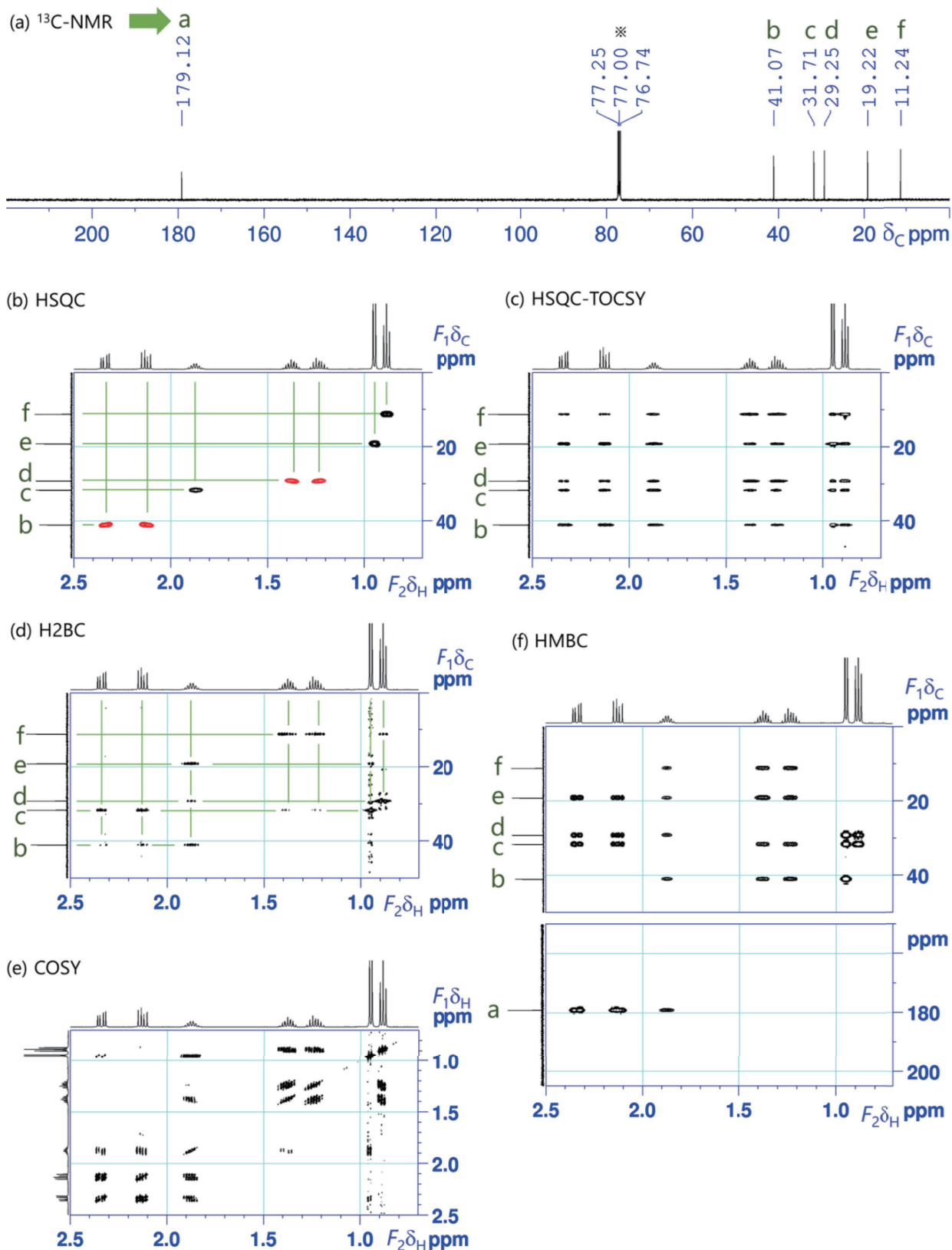


図76 14のデータの続き。(a) ^{13}C -NMRスペクトル (126 MHz)。(b) HSQCスペクトル。CH₃、CHは正(黒)、CH₂は負(赤)。プロトンに、直結するカーボンと同じアルファベットを振る。(c) HSQC-TOCSYスペクトル。(d) H2BCスペクトル。(e) COSYスペクトル。(f) HMBCスペクトル。

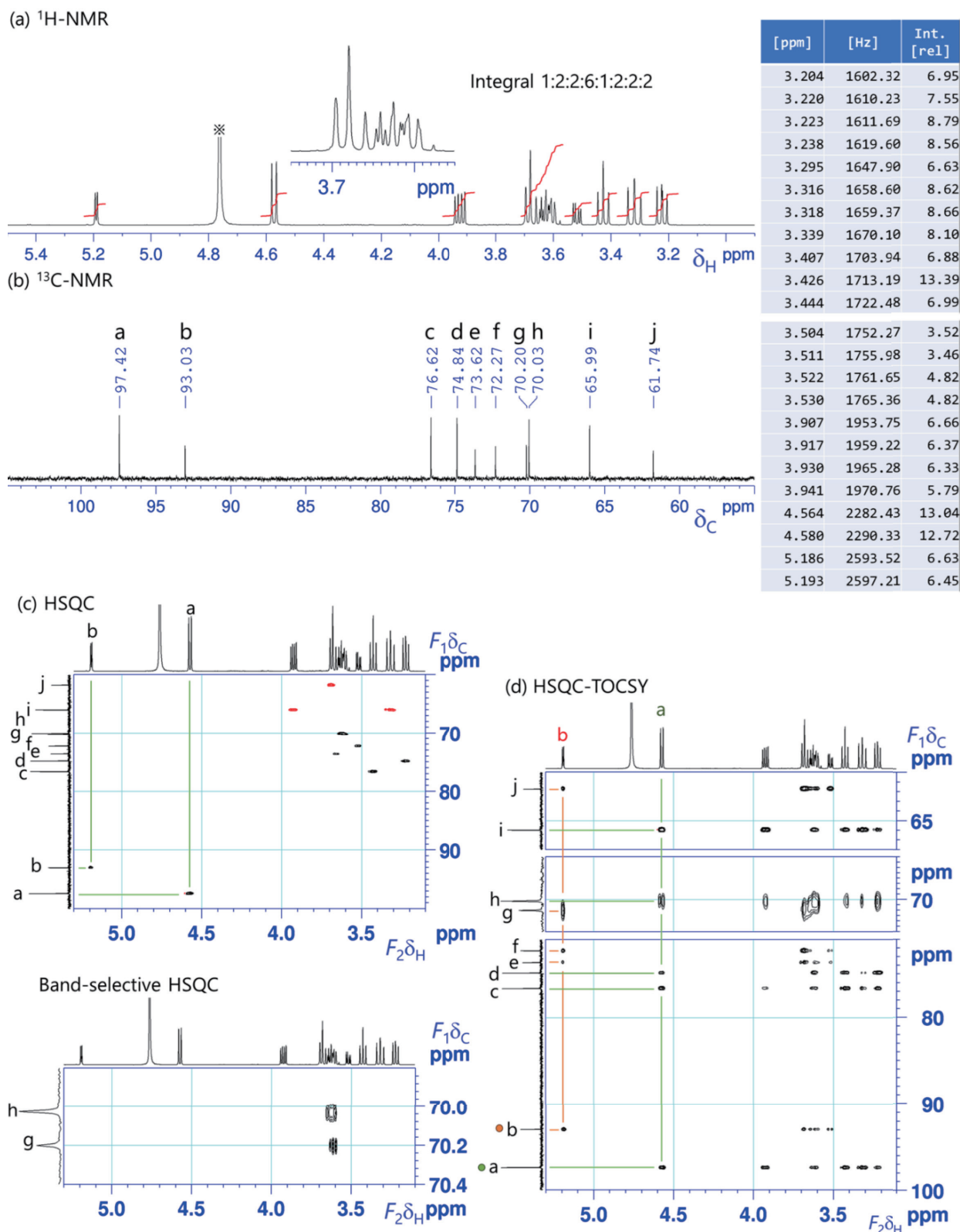


図77 (a) **15** ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$) の ^1H -NMRスペクトル (5 mg/ D_2O 、500 MHz)。 δ_{H} (TSP) = 0.00 ppm (外部標準)。表示範囲外にシグナルはない。(b) ^{13}C -NMRスペクトル (126 MHz)。 δ_{C} (dioxane) = 67.4 ppm (外部標準)。(c) HSQCスペクトル。 CH_3 、 CH は正(黒)、 CH_2 は負(赤)。プロトンに、直結するカーボンと同じアルファベットを振る。(d) HSQC-TOCSYスペクトル。 ^1H 、 ^{13}C のシグナルをアノマーごとに分類する。

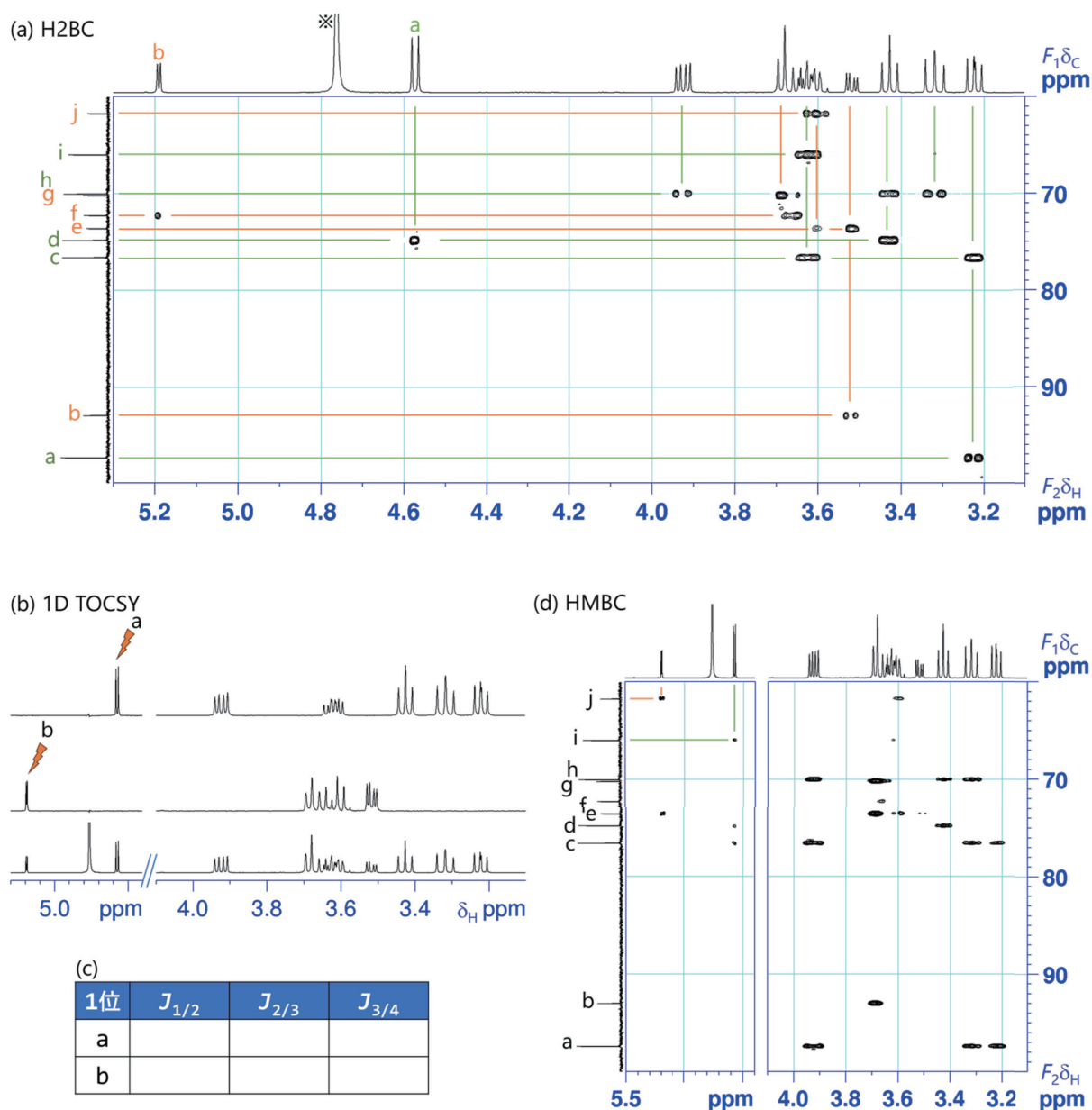
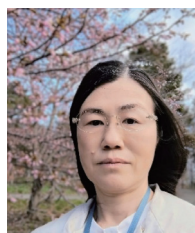


図78 15のデータの続き。(a) H2BC スペクトル。HSQC-TOCSYで分類したアノマーごとにシグナルを帰属してみよう。(b) 1D TOCSY スペクトル。(c) わかる範囲で J_{HH} を求めてみよう。(d) HMBC スペクトル。



福士 江里 (ふくし・えり)

1987年 北海道大学農学部農芸化学学科卒業

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

安定同位体比分析による清酒の鑑定

石川県立大学 生物資源環境学部

小椋 賢治、水谷 廉

k-ogura@ishikawa-pu.ac.jp

1. はじめに

清酒の主原材料は米、米麹、水であるが、副原材料として、醸造アルコール、酸味料、糖類を添加した製品も清酒と呼ばれる。米、米麹、水のみを原材料として製造された清酒を純米酒という。近年、和食ブームの高まりにともなって、世界中の国・地域で清酒の需要が高まっている。そのため、清酒の原材料、産地、製造方法を鑑定する技術が求められているが、清酒の原材料と製法の情報を科学的な手法で鑑定する方法が広く利用されているとはいえない。

安定同位体比分析は、試料に含まれる元素（主に、水素、炭素、窒素、酸素）の安定同位体比を測定することにより、その試料の環境的または生物学的な由来を推定する手法である。地球上に存在する元素の安定同位体比は天然存在比として知られており、水素の天然存在比は ^1H が99.985%、 ^2H が0.015%、炭素の天然存在比は ^{12}C が98.89%、 ^{13}C が1.11%である。安定同位体比は、試料の置かれている物理的または化学的環境により影響を受け、試料中の化合物の安定同位体比は天然存在比からわずかに異なる^[1]。たとえば、高緯度地方と低緯度地方で採取された H_2O は、水素と酸素の安定同位体比が異なることが知られている。原子の質量数は、 ^1H よりも ^2H 、 ^{17}O よりも ^{18}O のほうが大きいので、これらを含む水はそうでない水よりも沸点がわずかに高い。その結果、液体として存在する H_2O の安定同位体比は、採取された場所の環境または気候を反映することになる。また、植物は光合成回路の違いから、C3、C4およびCAM植物に分類される。植物は空気中の CO_2 を固定化する際、それぞれの光合成回路で利用される酵素の反応効率が ^{12}C と ^{13}C でわずかに異なることから、C3、C4およびCAM植物が産生する有機化合物では、それぞれ炭素安定同位体比が異なることが知られている（同位体分別）。したがって、炭素安定同位体比は、試料

に含まれる化合物がどの植物由来なのかを反映する。このように、安定同位体比は、試料が生成された環境または生物種を推定するための有力な情報となる。

安定同位体比分析には、元素分析質量分析計（EA/IRMS）、キャピティリングダウン分光法（CRDS）が広く利用されており、試料全体あるいは化合物全体の安定同位体比を測定することができる。一方、NMRは試料化合物の官能基特異的な安定同位体比を測定することができる。偽装ワインが社会問題となっていた1980年代、当時ナント大学のG. Martin（後にEurofin社を創設）が中心となってNMRを用いた水素安定同位体比分析法として、SNIF-NMR (site-specific natural isotope fractionation studied by nuclear magnetic resonance) が開発された^[2]。

SNIF-NMRによるワインの水素安定同位体比分析では、最初に、ワインを蒸留してエタノールを精製し、エタノールの重水素（D）のNMRスペクトルを測定する。次に、D-NMRスペクトルの信号強度比に基づいて、エタノールのメチル基およびメチレン基それぞれの水素安定同位体比（D/H比）を算出する。最後に、多くのワイン製品の水素安定同位体比測定結果を集計して、ワインの真正性および原材料を推定する手がかりとする。SNIF-NMRによる部位別D/H比の測定は、ワインにおいては早くからその有用性が認識されており、Martinらはワインの原料植物（C3またはC4）や発酵経路による同位体分別を系統的に検討し、エタノールのメチル基におけるD/H比が原料起源の識別に有効であることを示している^[3]。さらに、食品由来エタノールのSNIF-NMRはワインだけでなく、はちみつ^[4]、メープルシロップ^[5]、フルーツジュース^[6]への加糖の判別にも応用されている。また、エタノールだけでなく、天然香料成分であるバニリンのD/H比測定による真正性評価^[7]や、樹木由来糖における光合成経路の違い

に基づく部位別D/H分布の研究^[8]なども報告されており、SNIF-NMRの応用範囲は多岐にわたる。SNIF-NMRは現在、EU域内における食品の公定分析法として認定されている。

本研究では、清酒の水素安定同位体比分析にSNIF-NMRを適用する。清酒からエタノールを精製し、エタノールの部位別(D/H)を測定する。その結果から清酒の鑑定のために有用な情報を得られるかどうか検討することを目的とした。

2. 理論

水素安定同位体比(δD_{Sample})は式(1)で定義される。

$$\delta D_{\text{Sample}} (\text{‰}) = \left(\frac{(D/H)_{\text{Sample}} - (D/H)_{\text{STD}}}{(D/H)_{\text{STD}}} \right) \times 1000 \quad (1)$$

ここで、(D/H)は安定同位体の比率である。添字のSampleは試料、STDは安定同位体比標準物質を示す。安定同位体比標準物質として、水素ではウィーン標準平均海水(VSMOW)が採用されている。NMRによる官能基特異的な水素安定同位体比分析では、分析対象試料に安定同位体比が既知の物質(テトラメチル尿素; TMU)を内部標準として添加し、NMRスペクトルの信号強度から水素安定同位体比分析を算出する。本研究では以下の式(2, 3)により、エタノールの官能基特異的な水素安定同位体比を求める^[9]。

$$(D/H)_{\text{methyl}} (\text{ppm}) = \frac{I_{\text{methyl}}}{I_{\text{TMU}}} \times \frac{m_{\text{TMU}}}{m_{\text{ethanol}}} \times \frac{M_{\text{ethanol}}}{M_{\text{TMU}}} \times (D/H)_{\text{TMU}} \times \frac{1}{c} \times \frac{12}{3} \quad (2)$$

$$(D/H)_{\text{methylene}} (\text{ppm}) = \frac{I_{\text{methylene}}}{I_{\text{TMU}}} \times \frac{m_{\text{TMU}}}{m_{\text{ethanol}}} \times \frac{M_{\text{ethanol}}}{M_{\text{TMU}}} \times (D/H)_{\text{TMU}} \times \frac{1}{c} \times \frac{12}{2} \quad (3)$$

ここで、 I はD-NMRスペクトルの信号強度、 m は質量、 M はモル質量($M_{\text{TMU}} = 116.16 \text{ g/mol}$ 、 $M_{\text{ethanol}} = 46.068 \text{ g/mol}$)、 c はエタノールの質量パーセント濃度である(100%のとき、 $c = 1$)。式の末尾の係数の意味は、12: TMUの水素の数、3: エタノールのメチル基の水素の数、2: エタノールのメチレン基の水素の数、である。

3. 実験方法

試料として、市販清酒(純米酒29種、非純米酒30種)および原材料が異なる二種類の醸造アルコール(国産米およびサトウキビ)を入手した。米、米麴を使用して、文献^[10]の方法にした

がって清酒を作製した。オールダーショウ式蒸留装置OSS-HR型(旭製作所)を用いて清酒を蒸留し、エタノールを精製した。エタノールの濃度は ^1H -NMRスペクトルの信号積分強度から求めた。NMR測定にはECX-400P(日本電子)またはAvance Neo 400(ブルカー)を用いた。 ^1H -NMRスペクトル測定には5mmプローブ、D-NMR測定には10mmプローブを用いた。

エタノール3mLとTMU1mLを混合し、10mm径NMR試料管に入れ、D-NMRスペクトル測定試料とした。試料ごとに自動チューニングおよび自動マッチングを調整した。磁場の均一性は ^1H -NMRの信号を利用した自動グラジエントシムで調整した。スペクトル測定中に磁場ロックを掛けなかった。D-NMRスペクトルは次の条件で測定した。パルスプログラムは ^1H ゲーテッドデカップリングを併用したシングルパルス法を使用して、パルス幅は 90° ($32 \mu\text{s}$)とした。スペクトル幅は32ppm、取り込み時間は1.0sとした。サンプリングデータ点数は4,096、データ取り込み後のディレイタイムは7sとした。Dの T_1 は約0.5sであったため、今回の測定条件では定量性は確保されたものとした。2回のダミースキンののち、300回積算した。1回の測定に40分を要した。D-NMRスペクトルから信号強度を読み取り、水素安定同位体比の算出に使用した。同一試料で10回測定を繰り返し、定量精度の目安として標準偏差を算出した。

4. 結果と考察

(1) 清酒エタノールの官能基特異的水素安定同位体比

図1に、清酒を蒸留して精製したエタノール(試料3)のD-NMRスペクトルを示す。このスペクトルにおける信号の帰属は、低磁場側から、エタノールの水酸基(OD)、水(HDO)、エタノールのメチレン基(CHD)、標準物質として添加したTMU、エタノールのメチル基(CH_2D)である。

醸造アルコールおよび市販清酒から精製したエタノールについて、D-NMRスペクトルの信号強度、エタノールとTMUの秤量値、エタノールの濃度に基づき、式(2)、(3)により、エタノールの $(D/H)_{\text{methyl}}$ および $(D/H)_{\text{methylene}}$ を算出した。 $(D/H)_{\text{methyl}}$ および $(D/H)_{\text{methylene}}$ の値が小さい順に並べて図2に示す。図2(a)より、 $(D/H)_{\text{methyl}}$ は97ppmから111ppmの値を示した。そのうち、

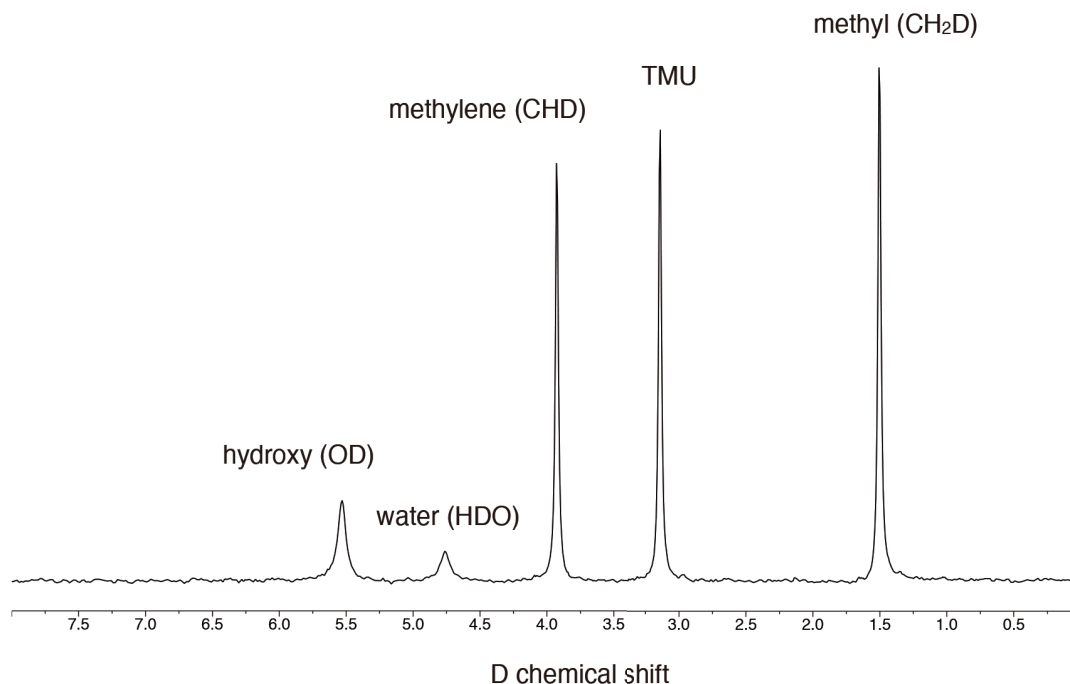


図1 清酒 (No.3) を蒸留して精製したエタノールのD-NMRスペクトル。シグナルの帰属ラベルはスペクトル中に記入してある。

純米酒は97から104ppmの範囲に、非純米酒は100から107ppmの範囲に分布していた。このことは、エタノールの $(D/H)_{\text{methyl}}$ は原材料の違いを反映することを示している。一般に、市販清酒に添加されている醸造アルコールはサトウキビを原材料としたものである。先行事例のSNIF-NMRによるワインエタノールの分析では、ブドウ (C3植物) 由来では $(D/H)_{\text{methyl}}$ は103ppm程度、サトウキビ (C4植物) 由来では110ppm程度と報告されており^[11]、その差異を利用してワインへの不正加糖 (C4糖の添加) が高精度で検出可能としている。本研究では、醸造アルコールの $(D/H)_{\text{methyl}}$ が試料1 (コメ由来、イネはC3植物) では100.84ppm、試料2 (サトウキビ由来) では111.30ppmであったことから、 $(D/H)_{\text{methyl}}$ を指標として、清酒への醸造アルコールの添加を検出できることを示唆している。図2 (b) より、 $(D/H)_{\text{methylene}}$ は122ppmから130ppmの値を示した。 $(D/H)_{\text{methylene}}$ は $(D/H)_{\text{methyl}}$ とは異なり、純米酒と非純米酒で分布の傾向が見られなかった。このことは、 $(D/H)_{\text{methylene}}$ は原材料の違いを反映しないことを示している。

(2) エタノールのメチル基とメチレン基の水素の由来

図2より、エタノールの $(D/H)_{\text{methyl}}$ と $(D/H)_{\text{methylene}}$ について、 $(D/H)_{\text{methyl}}$ は原材料の違いを

反映し、 $(D/H)_{\text{methylene}}$ は原材料の違いを反映しないという結果の原因として、酵母が産生したエタノールのメチル基とメチレン基の水素の由来が異なることが考えられた。そこで、清酒の発酵過程において、仕込み水に含まれる H_2O 分子内の水素原子がエタノール分子に取り込まれる割合を調べるため、 D_2O を10%、20%、30%の濃度比で仕込み水に添加して清酒を作製した。作製した清酒から蒸留によりエタノールを精製し、Dおよび 1H -NMRスペクトルを測定した。それぞれのスペクトルを図3 (a) および (c) に示す。Dおよび 1H -NMRスペクトルのメチレン基の信号強度を1としたとき、メチル基の相対信号強度と仕込み水における D_2O の濃度比の関係を図3 (b) および (d) に示す。

図3 (b) より、 D_2O の濃度比が高くなるにつれて、メチレン基に対するメチル基のDの相対信号強度は増加した。また、 D_2O 濃度をゼロに外挿すると、メチレン基に対するメチル基の信号強度は約0.5と推定された。この結果は、酵母のエタノールの生合成においてメチレン基では2個、メチル基では1個の水素を仕込み水から取り込んでいることを示す。言い換えると、メチレン基水素2個は両方ともグルコース由来ではなく、メチル基水素3個のうち2個がグルコース由来である。このことは、図2において、 $(D/H)_{\text{methylene}}$ が原材料の違いを反映していないこと、および、(D/

$(D/H)_{\text{methyl}}$ が原材料の違いを反映することを説明する。したがって、この結果は、清酒エタノールの $(D/H)_{\text{methylene}}$ が清酒の仕込み水を判別する指標となることに対する科学的な裏付けとなる。このことは、図2 (a)において、 $(D/H)_{\text{methyl}}$ の値が一部の市販清酒で純米酒と非純米酒の大小関係が入れ替わっていることも説明する。なぜなら、メチル基水素3個のうち1個はグルコース由来ではな

いため、原材料以外の要因により $(D/H)_{\text{methyl}}$ が影響を受けるからである。たとえば、試料61は市販純米酒であるが、 $(D/H)_{\text{methyl}}$ が103.74 ppmと他の純米酒よりも大きく、非純米酒と同程度の値を示している。この原因は、試料61の $(D/H)_{\text{methylene}}$ が130.07 ppmと他の市販清酒と比べて大きい値を示していることから、原材料以外の要因により $(D/H)_{\text{methyl}}$ が影響を受けたためであると考え

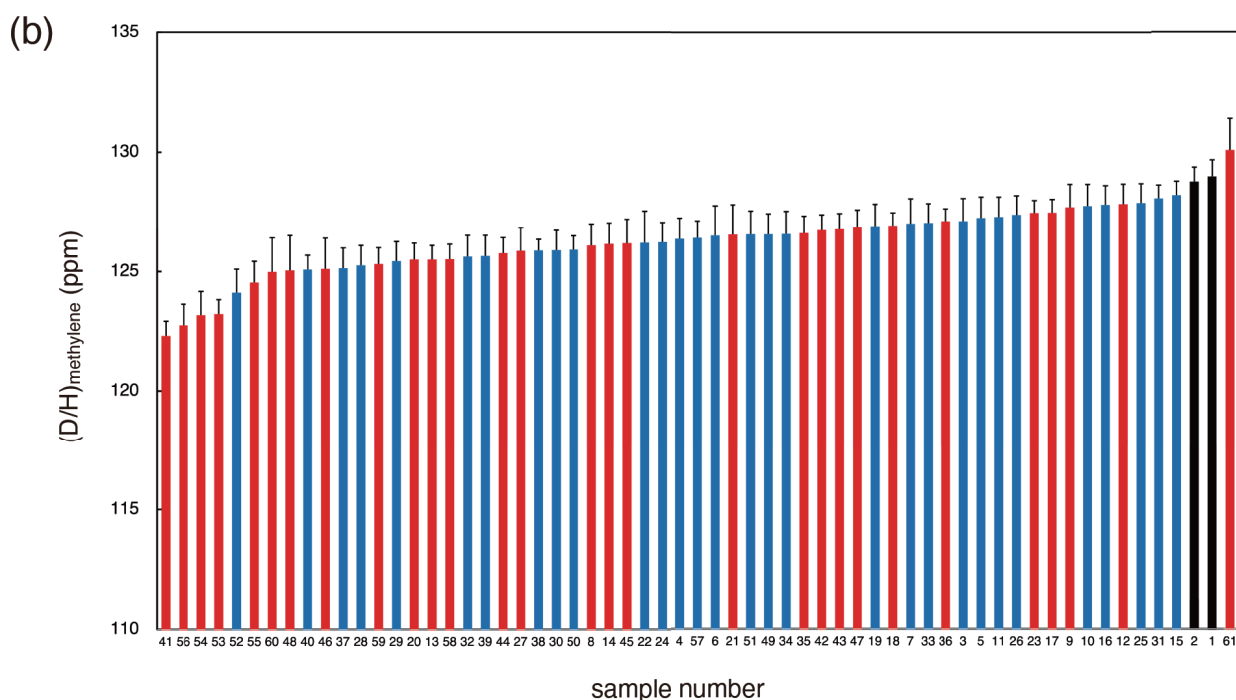
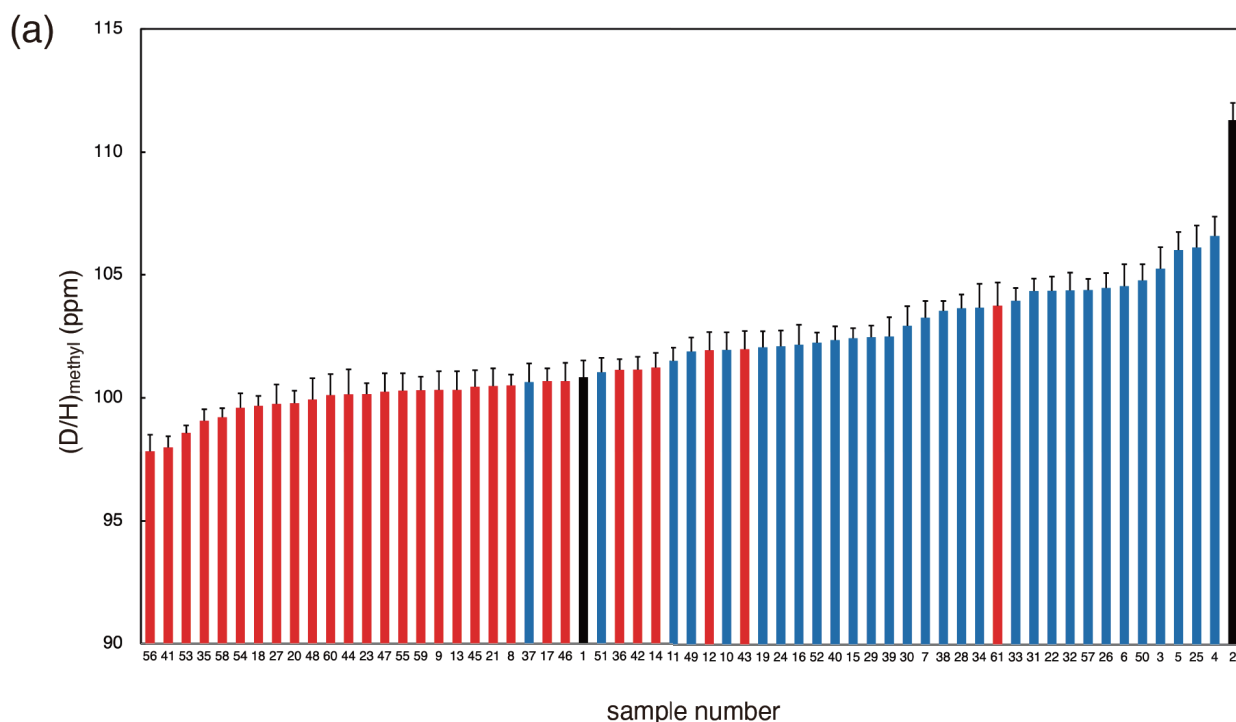


図2 清酒を蒸留して精製したエタノールおよび醸造アルコールの試料ごとの (a) メチル基、(b) メチレン基の水素安定同位体比 (D/H) 。純米酒、非純米酒、醸造アルコールはそれぞれ赤、青、黒で着色されている。

えられる。

ここで、エタノールのメチル基とメチレン基の水素の由来について、エタノール生合成経路を利用して考察する。酵母において、グルコースからピルビン酸を経由してエタノールに至る生合成の経路を図4に示す。図4において、グルコース6-リン酸はグルコース6-リン酸イソメラーゼの作用によりフルクトース6-リン酸に変換される。この反応は平衡反応であるから、1位炭素に付加される水素(赤)は隣接する2位炭素から供給される。解糖系を経て、グルコースは2個のピルビン酸に変換されるが、ピルビン酸のメチル基炭素はグルコースの1位および6位炭素に由来しており、メチル基水素3個のうち2個(赤)はグルコースに由来しているが、それ以外の1個は、ピルビン酸キナーゼの作用により外部から供給された H^+

(青)が付加したものである。また、エタノールのメチレン基の水素2個はそれぞれ、ピルビン酸デカルボキシラーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼの作用により、外部から供給された H^+ (青)が付加したものである。以上のとおり、酵母が産生するエタノールにおいて、メチル基水素のうち1個およびメチレン基水素の2個は、グルコース分子内の転位反応に由来するのではなく、外部から供給された H^+ に由来すると考えられる。この考察は、D-NMRによる実験結果(図3 a、b)と矛盾しない。

図3 (d) より、仕込み水における D_2O の濃度比が高くなるにつれて、メチレン基に対するメチル基の 1H の相対信号強度は増加していき、30% D_2O 条件下では1.65になった。また、 D_2O 濃度をゼロに外挿すると、メチレン基に対するメチル基

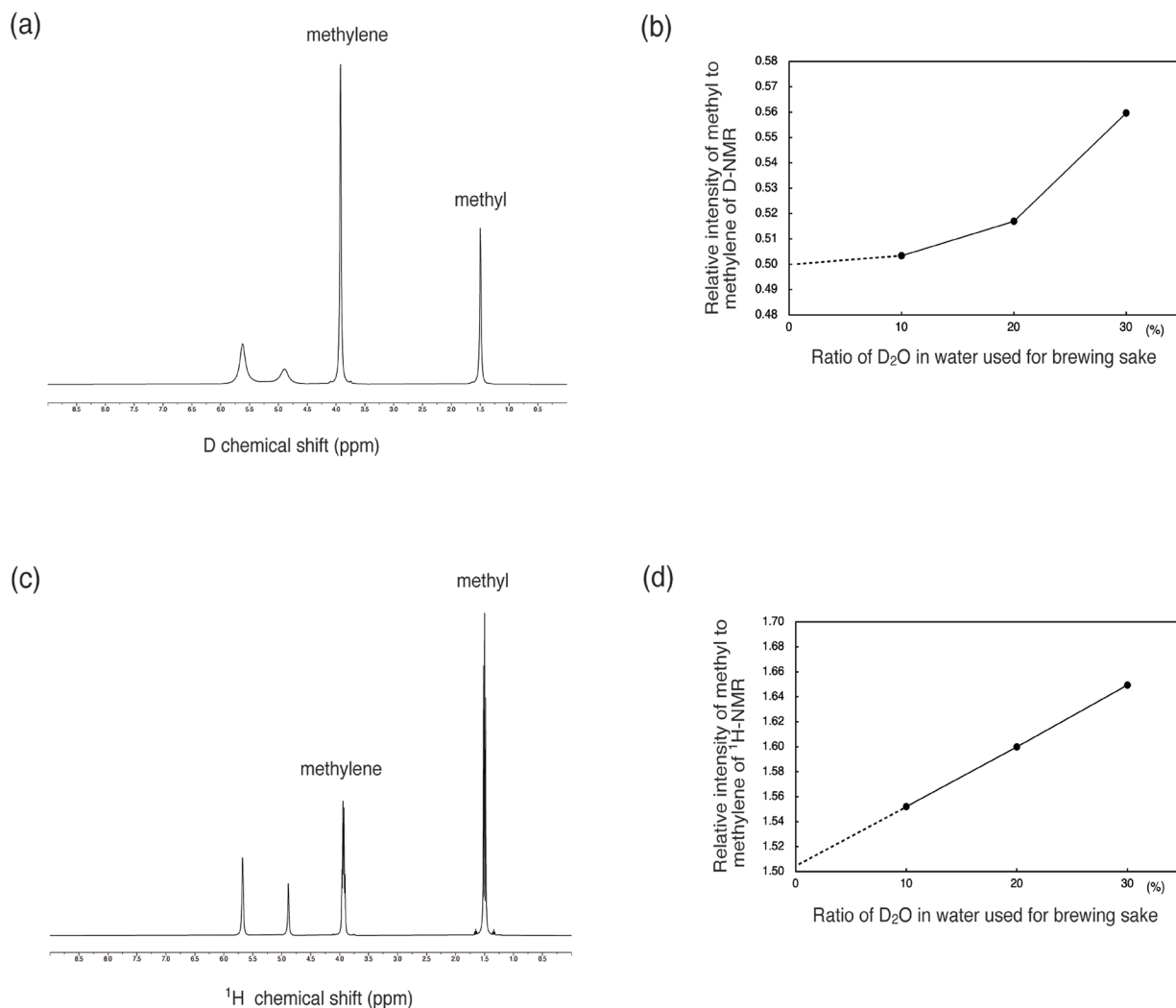


図3 (a) 10% D_2O を含む仕込み水を用いて作製した清酒から精製したエタノールのD-NMRスペクトル。メチレン基とメチル基のシグナルにラベルを記入してある。(b) 仕込み水の D_2O の比率とD-NMRシグナルのメチレン基とメチル基の相対強度との関係。(c) 10% D_2O を含む仕込み水を用いて作製した清酒から精製したエタノールの 1H -NMRスペクトル。メチレン基とメチル基のシグナルにラベルを記入してある。(d) 仕込み水の D_2O の比率と 1H -NMRシグナルのメチル基とメチレン基の相対強度との関係。

の相対信号強度は約1.5になった。1.5はメチレン基とメチル基における水素の個数比(2:3)と一致する。上で述べたとおり、メチレン基水素2個のうちの2個、および、メチル基水素3個のうち1個がすべて仕込み水に由来すると仮定すると、30% D₂Oを含む仕込み水で作製した清酒におけるそれぞれの官能基における¹Hの存在比は、メチレン基では $0.7 \times 0.7 = 0.49$ 、メチル基では $0.7 \times 1 \times 1 = 0.7$ となり、メチレン基の信号強度を1としたときのメチル基の相対信号強度は $1.5 \times 0.7 / 0.49 = 2.14$ になるはずである。実際には1.65であったから、仕込み水に含まれる水素のみがエタノールに付加されるのではなく、原材料のコメに含まれる化合物に由来する水素が発酵中に他の化合物に代謝される過程でH⁺が生成し、仕込み水由来のH⁺と混合してエタノールに付加されるのだろう。

(3) 地理的条件とエタノールの水素安定同位体比の関係

図3より、エタノールのメチレン基水素は仕

込み水に由来することが示された。そこで、清酒が製造された場所の地理的条件と清酒エタノールの水素安定同位体比の関係を調べた。市販清酒のうち純米酒29種について、製品ラベルに記載された製造所所在地の緯度に対して、それぞれの清酒から精製したエタノールの(D/H)_{methylene}をプロットした(図5)。その結果、緯度と(D/H)_{methylene}のあいだに負の相関が見られた(R=−0.83)。たとえば、試料61は低緯度地域(沖縄)で製造された純米酒であり、(D/H)_{methylene}は130.07 ppmと比較的高い値を示した。また、試料41と試料56は高緯度地域(北海道)で製造された純米酒であり、(D/H)_{methylene}はそれぞれ122.31および122.75 ppmと比較的小さい値を示した。このように、清酒を製造した場所の緯度が、その清酒エタノールの(D/H)_{methylene}に反映されていた。

Mizotaらは、日本の河川水と浅部地下水の水素安定同位体比(δD)は緯度や標高など地理的条件の影響を受けると報告している^[12]。前述したとおり、水の水素安定同位体比は緯度などの地理的条件の影響を受ける。また、同じ地

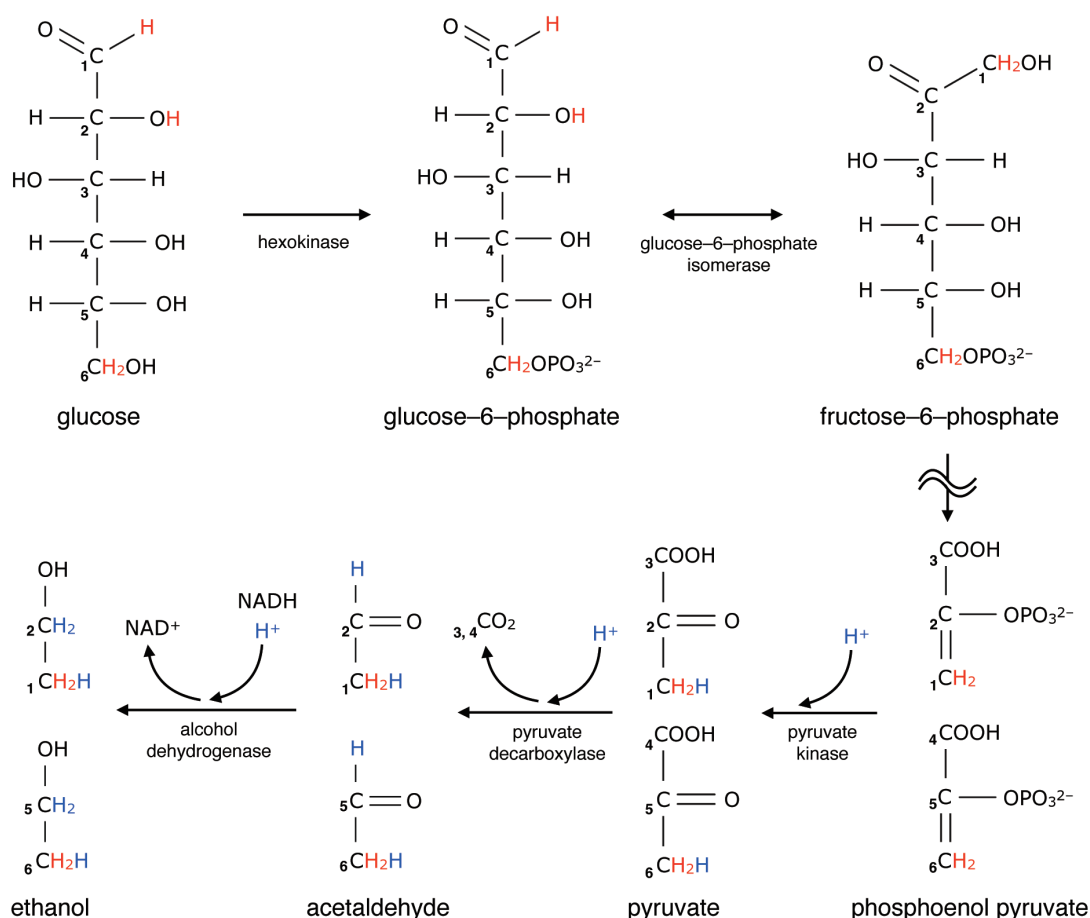


図4 酵母におけるグルコースからピルビン酸を経てエタノールに至る生合成経路。赤で着色した水素原子はグルコースに由来する。青で着色された水素イオン／原子はグルコース以外に由来する。

域でも地下水の採取深度や地質構造により水の水素安定同位体比が異なる可能性がある。市販清酒は、醸造所周辺で採取された水を使用して醸造されていると考えられるが、その結果、仕込み水の水素安定同位体比が清酒のD/H比に反映されることになる。実際、CRDS法を用いて清酒の δD を測定した先行研究^[13]は、その清酒製造所所在地の緯度とのあいだに負の相関($R = -0.72$)があったと報告している。本研究において、市販清酒エタノールの $(D/H)_{\text{methylene}}$ と製造所所在地の緯度の相関係数($R = -0.83$)は先行研究よりも高い相関を示した。この結果の原因について考察する。先行研究^[13]ではCRDS法を用いて市販清酒の δD を測定していたが、清酒は、水、エタノールおよびその他の有機化合物の混合物であるから、市販清酒の δD 値には、水および米由来の多くの物質からの寄与が含まれる。一方、NMR法を用いた本研究では、清酒から精製したエタノールの水素安定同位体比を測定したが、 $(D/H)_{\text{methylene}}$ の値は仕込み水の影響が大きいため、醸造所の緯度の情報すなわち水の水素安定同位体比を鋭敏に反映したと考えられる。

NMRによる水素安定同位体比分析の特徴は、化合物の官能基ごとの安定同位体比を測定することである。そのため、清酒から精製したエタ

ノールについて、そのメチル基から主に原材料の情報を、メチレン基から主に水の情報を、独立して得ることができる。一方、IRMSおよびCRDSでは試料全体の安定同位体比しか得ることができない。したがって、NMRによる水素安定同位体比分析は、清酒を醸造した地理的条件をIRMSやCRDSよりも高い精度で判別できるだろう。

5. まとめ

本研究では、市販清酒からエタノールを精製し、NMRを用いてエタノールのメチル基およびメチレン基の水素安定同位体比を測定した。清酒エタノールのメチル基の水素安定同位体比は原材料の判別に利用できることがわかった。また、メチレン基の水素安定同位体比は産地の判別に利用できることがわかった。さらに、エタノールのメチル基とメチレン基の水素の由来が異なることを実験的に確かめた。したがって、NMRによる水素安定同位体比分析を清酒の原材料と産地の判別に利用するための科学的な根拠を得ることができた。NMRによる清酒の水素安定同位体比分析は、官能基ごとの安定同位体比を測定することができるため、従来法による水素安定同位体比分析よりも清酒の産地を正確に判別することが可能となるだろう。

「はじめに」で示したとおり、SNIF-NMRの応

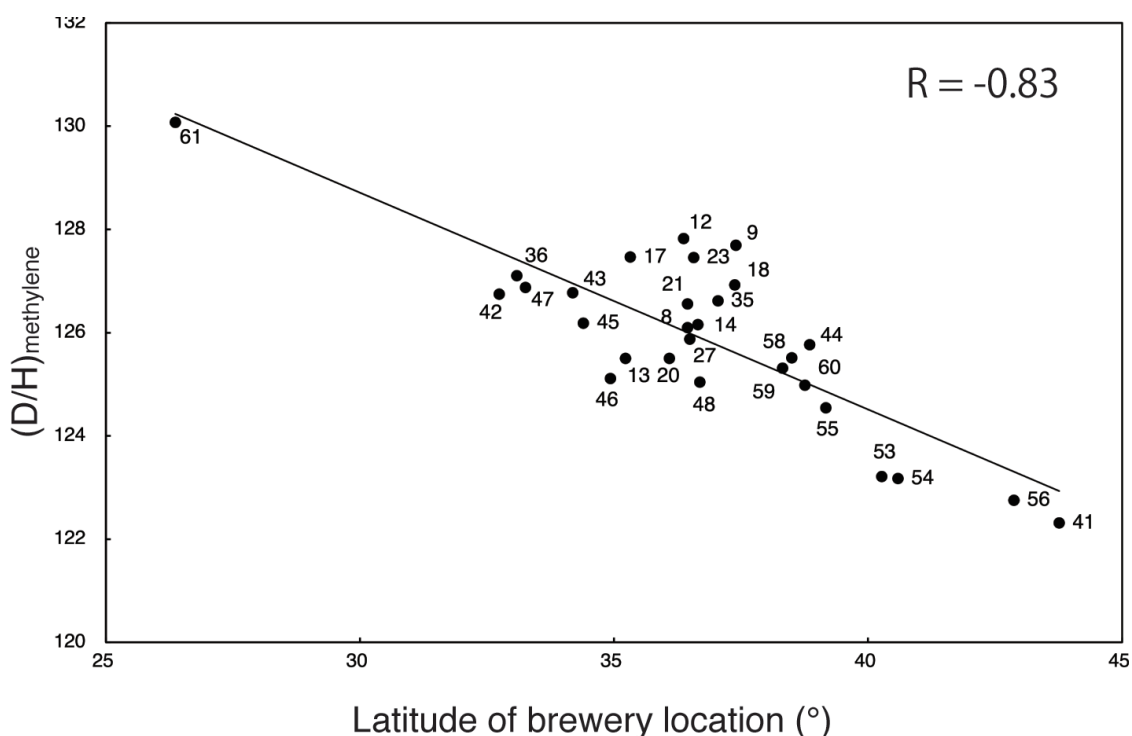


図5 市販清酒（純米酒のみ）のラベルに記載されている醸造所所在地の緯度(°)と $(D/H)_{\text{methylene}}$ の関係。

用はワイン、清酒のような酒類にとどまらず、果実飲料、天然香料などの食品、さらには樹木などの天然資源の由来の判別に広がっている。SNIF-NMRはIRMSやCRDSよりも感度が低く、測定試料の高濃度・高純度での精製が必要という欠点があるため、適用可能な試料および化合物が限定されるものの、部位特異的な情報が得られるという利点がある。SNIF-NMRに加え、溶液・固体NMRによる混合物プロファイリング技術との併用は、食品などの原材料および地理的起源の判別のための有効な戦略として注目されている^[14]。

謝 辞

本研究における清酒の作製は、松任税務署から交付された清酒製造免許（試験製造免許）により石川県立大学食品科学実習棟にて実施された。図4の作成にあたりご助言をいただきました石川県立大学生物資源環境学部准教授 小柳 喬 先生に深く感謝いたします。

参 照

- [1] Hoefs J. *Stable Isotope Geochemistry Ninth Edition*. (Springer 2021).
- [2] Martin GJ, Akoka S, Martin ML. *SNIF-NMR—Part 1: Principles*. In: Webb GA. (ed). *Modern Magnetic Resonance*. 1651-1658 (Springer, 2008).
- [3] Martin GJ, Guillou C, Martin ML, et al. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **36**, 316-322 (1988).
- [4] Cotte JF, Casabianca H, Lhéritier J, et al. Study and validity of ^{13}C stable carbon isotopic ratio analysis by mass spectrometry and ^2H site-specific natural isotopic fractionation by nuclear magnetic resonance isotopic measurements to characterize and control the authenticity of honey. *Analytica Chimica Acta*. **582**, 125-136. (2007).
- [5] Martin YL. Detection of added beet or cane sugar in maple syrup by the site-specific deuterium nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR) method: collaborative study. *Journal of AOAC International*. **84**, 1509-1521 (2001).
- [6] Martin GG, Wood R, Martin GJ. Detection of added beet sugar in concentrated and single strength fruit juices by deuterium nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR method): collaborative study. *Journal of AOAC International*. **79**, 917-928 (1996).
- [7] Jamin E, Martin F, Martin GG. Determination of site-specific (deuterium/hydrogen) ratios in vanillin by ^2H -nuclear magnetic resonance spectrometry: collaborative study. *Journal of AOAC International*. **90**, 187-195 (2007).
- [8] Zhang BL, Billault I, Li X et al. Hydrogen isotopic profile in the characterization of sugars. Influence of the metabolic pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 1574-1580 (2002).
- [9] International Organisation of Vine and Wine. OIV Method OIV-MA-AS311-05 (2009).
入手先 URL: <https://www.oiv.int/public/medias/2485/oiv-ma-as311-05.pdf> (最終閲覧2025年4月14日).
- [10] 東京国税局鑑定指導室編, 酒造教本. (日本醸造協会, 1998).
- [11] Joint Research Centre. Certification of the deuterium distribution in ethanol from grape, sugar cane and sugar beet sugars' fermentation: ERM@-AE200 (2023).
入手先 URL: https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC133154/JRC133154_01.pdf (最終閲覧2025年7月12日).
- [12] Mizota C, Kusakabe M. Spatial distribution of δD - $\delta^{18}\text{O}$ values of surface and shallow groundwaters from Japan, south Korea and east China. *Geochemical Journal*. **28**, 387-410 (1994).
- [13] 笹本なみ, 阿部善也, 高久雄一, 中井 泉, 微量元素組成及び軽元素同位体比による日本酒の化学的キャラクタリゼーション. *分析化学* **66**, 591-597 (2017).
- [14] Viskić M, Bandić LM, Korenika AJ et al. A. NMR in the Service of Wine Differentiation. *Foods* **10**, 120 (2021).



小柳 賢治 (おぐら・けんじ)

1988年 3月 北海道大学理学部高分子学科卒業
 1990年 3月 北海道大学大学院理学研究科高分子学専攻修士課程修了
 1990年 4月 日本電子株式会社
 1993年 10月 東京都臨床医学総合研究所
 1999年 8月 北海道大学大学院薬学研究科 助教
 2010年 7月 北海道大学大学院先端生命科学研究院 特任准教授
 2014年 4月 石川県立大学生物資源環境学部 教授

北海道大学におけるNMR装置の共用事業 第63回NMR討論会開催 蛋白質科学研究所の紹介

北海道大学大学院先端生命科学研究所蛋白質科学研究所

相沢 智康

aizawa@sci.hokudai.ac.jp

1. はじめに

研究室便りというタイトルではありますが、まずは北海道大学におけるNMR装置の共用事業についてご紹介します。次に、最近お手伝いさせていただいた2024年のNMR討論会について触れ、最後に私たちの研究室の紹介をさせていただきます。

2. 北海道大学におけるNMR共用事業

～先端NMRファシリティ

現在、国内で様々な研究機器の共用事業が進められています。大型放射光施設やスーパーコンピュータは、そもそも一つの大学や研究機関で整備可能な規模ではなく、従来から共用環境の整備が計画的に進められてきました。近年はこれに加え、大学や研究機関が保有する個別の研究設備についても、投資効果を向上させ、科学技術イノベーションや企業の産業競争力の強化につなげる狙いで、幅広くこれらの共用を促進する事業が国により推進されています。例えば2009年には文部科学省の「先端研究施設共用促進事業」により、個別の機関が保有する設備のマシントimeを、有償等で外部に提供する取り組みへの支援が開始されました。

私の所属する北海道大学では、こうした国の取り組みに先立ち、先駆的な機器共用事業を展開してきました。2005年には、学内だけでなく学外の研究機関や民間企業への機器共用を行う「オープンファシリティシステム」という仕組みを立ち上げました。この仕組みの特徴的な点は、機器分析センター等に集約した装置の共同利用といった一般的なもののだけでなく、各研究室の研究者が供出した個々の装置も共用が可能な点です。これにより、装置利用者による機器予約、利用料金体系や料金収納の整備といった、研究者にとっては煩雑な部分をこのシステムが集約して行います。装

置供出者には利用料金が配分され、これを装置の維持管理等に充当することが可能です。現在は学内全体で350台を超える機器が登録され、学内利用のみならず、学外利用も非常に多い機器共用システムへと大きく成長しています。

このような背景から、私たちは北海道大学内のNMR装置についても共用を積極的に推進してきました。前述のオープンファシリティシステムでの共用開始後、2013年には「北海道大学先端NMRファシリティ」を設立し、集中的な装置の管理と運用を進めています。現在は、様々な特徴を持つ8台のNMR装置の共用を行っています。施設は北海道大学の札幌キャンパス内の2カ所に分かれており、札幌駅に近いキャンパスの南側に位置する「理学部施設」と、キャンパスの北端に位置する「北キャンパス施設」があります。それぞれの施設では、スタッフとして熊木康裕博士、久米田博之博士が、測定や解析に関するサポートを行い、民間の受託機器分析とは異なる付加価値を有する幅広い共用環境を提供しています。従来からこれらの施設のNMR研究の中心であった蛋白質等の生体高分子の立体構造や相互作用解析に加え、北海道の地域的な特徴でもある農林水産・食品分野での共用促進にも力を入れており、NMRメタボローム解析等の生体分子全般の研究分野での利用が広がっています。さらに2016年からは、本学会の会員の皆様も広くご存じかと思われる、理化学研究所、横浜市立大学、大阪大学が形成する「NMR共用プラットフォーム」の一員に加わらせていただき、各種講習会やオンライン教材の提供など、特に教育・人材育成面での活動も強化してきました。このプラットフォームには、2021年度からは新たな機関が加わり、計8機関で「NMRプラットフォーム」として幅広く連携した活動を続けています。

本学の先端NMRファシリティの800MHz装置2台では、蛋白質向けの3重共鳴実験に対応した極低温高感度プローブが利用可能です。また、480サンプルを低温保持可能なオートランプレーも装備され、自動測定や遠隔からの測定にも対応しており、各種スクリーニング実験やNMRメタボローム解析等も円滑に進めることができます。半固体試料に対応したHigh Resolution (HR) MASプローブによる細胞内の代謝産物の直接観測や、固体用1.3mm試料管を用いた3重共鳴実験による蛋白質解析なども可能です。また、主に固体専用の600MHz装置も共用しており、3.2mm試料管を用いた2重共鳴、3重共鳴MASプローブ、半固体試料に対応した2重共鳴プローブに加え、高速MAS測定が可能な1mm試料管用の2重共鳴プローブを備えています。加えて、本施設の特徴的な装置として、60MHzの卓上NMR装置も、オートサンプラーや遠隔操作による利用が可能な環境で共用に提供しています。現在のヘリウムの供給状況の悪化により、永久磁石を用いた卓上NMR装置の普及が進みつつあるため、従来からの超電導高磁場NMR装置のユーザーによる試験的な利用や、分解能の低いスペクトルをメタボローム解析へ応用する技術の開発にも活用されています。

このようなNMR装置の共用事業においては、遠隔利用の整備が常に課題となってきました。全国の利用者への対応はもちろん、北海道内だけでも大学や研究機関が遠く離れて点在しており、私たちも早い時期から遠隔利用や自動化の検討を進めてきました。特に、コロナ禍以降は、技術的な面でも利用者対応の面でもさらに遠隔利用環境を整備し、広く活用いただいています。是非、本学会会員の皆様にも私たちの施設の活用を検討いただければ幸いです。

3. 第63回NMR討論会の開催

2024年10月30日から11月1日の会期で北海道にて開催された、第63回NMR討論会の世話人を務めさせていただきました。2018年に出村誠先生が世話人をご担当された第57回NMR討論会は、北海道胆振東部地震の影響により、現地開催を断念せざるをえませんでした。このような事情から、少し早いタイミングとなりましたが、再び北海道でのNMR討論会となりました。会場は北海道大学構内の学術交流会館で、広い面積を持つ学内でも札幌駅から徒歩10分の正門近くに位置する、利便性の良い施設です。10月末の札幌は年によってはすでに雪が降る時期ですが、幸い天気にも恵まれ、北海道大学構内の美しい紅葉の中での開催となりました。

例年通り、3日間の会期の前日にチュートリアルコースを開催するスケジュールでしたが、いくつかの新しい試みも進めさせていただきました。まず、午後からのチュートリアルコースの前に、NMRメーカーにご協力をいただき、技術紹介セミナーの時間を設けさせていただきました。NMR技術の動向や幅広いアプリケーション等、多くのユーザーが最新の情報に触れる良い機会になったと思います。また、北海道での開催で日程が合わず、会場での直接参加が困難な方のために、口頭発表のハイブリッド配信を行いました。ハイブリッド配信はコストの問題がありますが、今回のNMR討論会も1会場に参加者が集まり口頭発表が行われるスタイルでしたので、最低限のコストに抑えて配信を行うことができました。加えて、最終日の閉会後には、前述の北海道大学先端NMRファシリティの施設見学会を実施させていただきました。北キャンパスのNMR施設は討論会会場から離れており、学内循環バスでの移動となったにもかかわらず、多数の参加者の方に見学いただき、NMR装置共用への関心の高さを改



Vipin Agarwal先生招待講演



Mike Williamson先生招待講演



伊倉光彦先生招待講演



懇親会にてジギスカン用正装(?)で乾杯の音頭を取られる木川会長

めて確認させていただくことができました。

NMRメーカーの技術紹介セミナーと、引き続き行われたチュートリアルコースでの、京都大学・寺尾武彦先生の「NMRを作った人たち」および北海道大学・福士江里先生の「化合物Xの構造を推定せよ in Sapporo」の講演は、NMR学会・NMR討論会に広く興味を持っていただくことを目的として、学会員以外にも無料で参加いただけるイベントとさせていただきました。結果、オンライン参加も合わせると300名以上の方に申し込みをいただき、その約半数が非会員の方となり、私たちの学会活動に加わることを今後検討いただく良い機会になったと考えております。

会期中には計38件の口頭発表が行われ、1日目と3日目の一般講演は日本語、2日目の一般講演や招待講演は英語を使用言語とし、最先端のNMR研究に関する幅広い発表と活発な議論が繰り広げられました。海外からの招待講演は、インドからのVipin Agarwal先生による「 ^1H - ^{14}N Cross-Polarization: an Efficient Approach to Quantify ^{14}N Zeeman and Overtone Order Spin-Lattice Re-

laxation Constants in Fast Magic Angle Spinning Solids」、イギリスからのMike Williamson先生による「The Future of Protein Structure Determination by NMR」、カナダからの伊倉光彦先生による「NMR-based Mechanistic Studies of Small-GTPase RAS in Cancer」と、いずれも各分野の最先端のトピックスに関する貴重なものでした。また、進歩賞受賞講演では、徳島大学・犬飼宗弘先生による「Solid-state NMR of Metal-organic Frameworks and Organic Crystals」、徳島大学・齋尾智英先生による「Depicting Protein Structure and Dynamics by NMR Equipped with Paramagnetic Lanthanide Probe Methods」、功労賞講演では、武蔵野大学・武藤裕先生による「Structural Study on the Regulatory Factors in the Pre-mRNA Splicing Reaction」、九州大学・神田大輔先生による「I. Personal Research History, and II. New Methods for Characterizing Dynamic Molecular Structures Focusing on Spatial and Energy Distributions」の演題で、NMRの歴史から未来へのさらなる進展を確信させる素晴らしい講演を聴講できました。

また、計100件のポスター発表では、発表義務時間はもちろんのこと、他のプログラムの合間などにも熱心に説明や議論する様子が多く見受けられました。そのうち35件が若手ポスター賞にエントリーされ、審査の結果、最優秀若手ポスター賞を横浜市立大学・廣西麗加さんが受賞されました。優秀若手ポスター賞は徳島大学・熊代宗弘さんと東京大学・重見圭汰さんが、若手ポスター賞は徳島大学・稲井開陸さん、京都大学・Chen Yiranさん、住友金属鉱山株式会社・金田治輝さん、東京工業大学・松田勇さん、徳島大学・佐藤晴紀さん、大阪大学・加藤賢さん、九州大学・澤



NMR討論会の運営をお手伝いさせていただいた研究室メンバー

田侑大さんが受賞されました。

ポスター賞の表彰は、2日目の夜に開催されたビール園でのジンギスカンを囲んでの懇親会にて行われました。ビール園での懇親会は、大変賑やかになり声が聞こえにくいことも多いのですが、今回は幸いなことに大きなステージがある会場で開催できたため、若手の受賞者の喜びの声や招待講演者の素晴らしいスピーチなどを楽しみながら、親睦を深めることができました。また、沖縄科学技術大学院大学で開催の、次回NMR討論会の世話人の山内一夫先生の挨拶では、日本の北端から南端への大移動での開催への大きな期待が高まりました。

このように第63回NMR討論会は、おかげさまで盛会のうちに終了いたしました。この場を借りて、参加いただいた皆様、支援をいただいた皆様に心より厚く御礼を申し上げます。

4. 研究室の紹介

私たちの蛋白質科学研究室は、北海道大学大学院先端生命科学研究院に所属しており、学部としては理学部生物科学科を担当しています。研究室は前述の理学部のNMR施設に近い建物に位置しており、教員は2024年春に赴任されたばかりの新井達也助教と相沢の2名体制で、留学生7名を含む21名の学生が所属しています。研究テーマとしては、抗菌ペプチドを中心としてアレルギーやサイトカイン等の生体防御に関連するペプチド・蛋白質の構造と機能に関する研究を幅広く行っております。抗菌ペプチドは標的となる微生物の膜を対象とし、その破壊などにより機能を発揮する分子です。アミノ酸残基数が少ないため、一般には固相合成によるペプチドが研究に利用されることが多いのですが、微生物膜との相互作用解析等で高度なNMR法の実験を行うためには、遺伝子組換え安定同位体標識ペプチドが有用となります。しかしながら、抗菌ペプチドの組換え生産においては、その抗菌活性が宿主へ与える毒性や、宿主内のプロテアーゼによる分解などが問題となり、一般的な蛋白質の発現系が適用できない例も多く見られます。

そこで私たちは、宿主内での毒性や分解の抑制を効果的に行うための新規融合パートナー蛋白質の開発や、不溶性顆粒形成促進技術の検討等にも取り組んでいます。これらの技術で得られた抗菌ペプチドを活用し、NMR法をはじめとした分光

法などによる分子レベルでの機能解析はもちろん、その高い生産性を活かして応用を目指した共同研究も進めています。

また、植物由来の抗菌ペプチドは、その安定性の高さからアレルギーとなることが多いことが知られており、これらを対象とした立体構造や安定性、IgEによるエピトープ認識、免疫細胞刺激機構の解析も進めています。特に、花粉中のアレルギーへの感作が原因となり食物アレルギーを発症する花粉-食物アレルギー症候群に関連するエピトープ解析と発症機構の解明に力を入れています。

そして、助教の新井先生は氷の微結晶に結合することでその成長を抑制する、不凍蛋白質の研究を専門としています。魚類や節足動物、植物、微生物等、幅広い生物が、多様な立体構造を有する不凍蛋白質を持つことが知られており、その研究にX線結晶構造解析を用いた構造生物学的手法等で取り組んでこられました。もちろん、これらの蛋白質による氷結晶の認識機構の解明にもNMR法は威力を発揮します。さらに、不凍蛋白質には細胞に作用し低温下での生存率を高めるといふ、不凍活性とは異なる興味深い活性があることも近年明らかになってきました。この活性には、不凍蛋白質と細胞膜との相互作用が鍵となっていると考えられることから、今後この研究にもNMR法の活用を進めていきたいと考えています。

もう一つ、最近では前述の共用事業の紹介で述べたNMRメタボローム解析についても、研究室のテーマとして力を入れており、私たちの研究対象も大きく広がりました。例えば、札幌市近くの岩見沢市で実施されている母子健康調査においては、母子便や母乳のメタボローム解析に取り組んでおり、学内を中心とした他の研究グループと連携しながら乳児の腸内細菌叢の形成と発育の関係の解析を進めています。さらに、これらの研究で得られた高分解能のNMRメタボローム解析データを活用し、卓上NMR装置の低分解能のスペクトルから効率よく情報を抽出し、判別や診断に用いる技術の開発も進めています。

このように私たちの研究室では、北海道大学先端NMRファシリティとも連携しながら生体内の様々な現象の解明に取り組んでおります。様々な共同研究も歓迎いたしますので、私たちの研究に興味をお持ちいただけましたら、ぜひお気軽にお声がけください。

第24回若手NMR研究会開催報告

東京科学大学 生命理工学院 石井研究室

松田 勇

matsuda.i.aa@m.titech.ac.jp

はじめに

2024年9月2日(月)～4日(水)の3日間、日本核磁気共鳴学会の共催で「第24回若手NMR研究会」が開催されました。若手NMR研究会は、例年合宿形式で開催されている勉強会で、これからNMRを使い始める学生から、様々な分野で活躍されている若手研究者の方々まで幅広く、日本全国から参加していただいております。本研究会は、博士前期・後期課程の学生を対象とした基礎的勉強会としての役割と、大学等の研究機関や企業の研究者やNMR装置の開発や販売をする企業の方も交えたより深い議論の場となることを目指してきました。第24回もこの方向性を引き継ぎ、これからNMRを使い始める学生や、自身の研究をさらに発展させたい若手研究者、様々な分野で活躍されている「自称」若手研究者の方々に幅広く参加していただき、世代を越えたつながりを築ける場を提供したいと考えております。ここでは実行委員を代表して、第24回会期中の様子についてご報

告したいと思います。

開催にあたって

第24回若手NMR研究会は、東京科学大学(旧東京工業大学)の松永達弥先生、近畿大学の櫻井一正先生、京都大学の宗正智先生、そして私を含めた4人が実行委員を務め、開催されました。コロナ禍中の第21回、第22回はオンラインでの開催でしたが、2023年大阪で開催された第23回からは現地開催を再開することができました。今回は多くの先生方、学生さんにお声がけさせていただき、最終的に52名の方々にご参加いただくことになりました。

ところが、開催間近になり台風10号が非常に遅い速度で九州地方に上陸しました。最大級の警戒が必要と言われ、西日本だけでなく関東においても豪雨となり、広範囲で猛威を振りました。また、開催間近になっても進路予想が不安定という状況であったため、実行委員で開催についてざり



写真1 タカオネ前にて撮影した集合写真。現地参加者47名とオンライン参加者5名が集まりました。参加者の皆様、講師の先生方、ご協力いただいた多くの方々のおかげで盛会のうちに終えることができました。

ぎりまで検討しました。最終的に参加者の安全を確保するため、ハイブリッド開催に決定しました。

開催地の八王子市でも警報が発令され、冠水しているところもあったそうですが、幸い台風10号は次第に勢力を落とし、開催前日にはほとんどの参加者の移動に影響が出ないほどに治まり、結果的に一部の参加者を除いて現地で開催することができました。

第24回はより多くの学生の方々やNMR初学者に参加していただくことを意識して「NMR測定の理論と基礎」と「NMRによる実際の構造決定」をテーマとしました。大学、企業の先生方にご講演をお願いしNMRの基礎、そして応用的な測定法や難しさについて講義をしていただきました。また、ジャスコインタナショナル株式会社の大橋麻美様、杉原寛之様にご協力いただき、イベントとして初の卓上NMR実機体験も実現することができました。この場をお借りしてジャスコインタナショナル株式会社の皆様に厚くお礼申し上げます。最終的には、以下のようなプログラムで進行了しました。

1日目 9月2日(月)

講義1:

吉村 優一 先生(ライフマティックス株式会社)
「NMRの基礎」

講義2:

平野 桐子 先生(ブルカージャパン株式会社)
「測定方法・パルスプログラム講座」
研究室紹介

2日目 9月3日(火)

講義3:

福士 江里 先生(北海道大学)
「未知化合物の構造決定演習」

講義4:

杉原 寛之 先生
(ジャスコインタナショナル株式会社)
「卓上NMRを用いた測定講習」

スペシャルイベント:

「さわってみようNMR！」
(ジャスコインタナショナル株式会社)

イベント:

学生口頭発表
企業講演
ジャスコインタナショナル株式会社(大橋 麻美

様)

大陽日酸株式会社SI事業部(竹内 礼夏 様)
ブルカージャパン株式会社バイオスピン事業部
(佐藤 一 様)
ポスター発表

3日目 9月4日(水)

講義5:

池谷 鉄兵 先生(東京都立大学)
「蛋白質構造解析手法」→「振り返り勉強会」

講義6:

川村 出 先生(横浜国立大学)
「NMRの応用・固体NMR/光NMR」

会期中の様子

第24回は若手NMR研究会の目的の一つであるNMRの基礎知識を身につけることを重点として、基礎理論から構造解析の実践的な内容についてご講演いただきました。初日は、吉村優一先生による基礎講義から始まりました。ベクトルモデル、密度演算子を用いてシンプルなOne-pulse実験や磁化移動実験等での磁化の計算を学びました。先生方には、講義のところどころに演習問題を挟んでいただき、参加者が実際に演習問題に取り組めるようにしました。磁化の計算は難しいと感じる参加者も多かったようですが、参加者同士で相談しながら演習問題にも取り組んでいました。小休憩の後、二つ目の講義は平野桐子先生による測定・パルスプログラム講座でした。NMR測定をするうえで必須のパルスプログラムですが、「この測定にはどのプログラムを使えばいいの?」「信号が出ないけど、どこを直せばいいの?」という経験がある方もいらっしゃるのではないでしょ



写真2 吉村先生の基礎講座中の様子



写真3 講義会場での集合写真

うか。平野先生にはBruker社製のパルスプログラムを例に、よく使われる測定法で何が測定できるのか、パルス条件の決め方、デカップリング法などについて、実践的な面を学びました。

初日は午後からの開催だったため、二つの講義の後は夕食・自由時間を挟み、交流会を兼ねた研究室紹介の時間を持ちました。今回、北海道から沖縄まで、日本各地20研究室からの参加者が、大学・研究室の様子、普段の生活の様子、研究内容について面白おかしく紹介していました。一通りの紹介が終わった後も、参加者同士で研究の話から雑談まで会場のあちこちで夜遅くまで会話が弾んでいました。

2日目は福士江里先生の講義から始まりました。NMR情報を基に低分子化合物の構造決定をしていく過程をご講演いただき、参加者は実際の一次元、二次元NMRスペクトルや化学シフト情報などを見ながら演習問題に取り組んでいきました。福士先生にご提供いただいた分子模型キットも活用しながら、分子式から立体構造を推定していきました。午前中二つ目の講義は、杉原寛之先生に

よる卓上NMRを用いた測定講習でした。卓上型NMRと普段使っている超電導型NMRとの装置やスペクトルの違いから、卓上型のメリット等を学びました。卓上型の実際のソフトウェア画面やスペクトルを使って、測定の一連の流れをご説明いただきました。

2日目午後はスペシャルイベント「さわってみようNMR！」と題して、卓上型NMRの実機体験を行いました。ジャスコインタナショナル株式会社様のご協力で、会場にはOxford Instruments社製X-Pulseを設置し、福士先生にご提供いただいた試料を使って、参加者は測定を体験することができました。普段あまり利用することのない卓上型NMRに触れる貴重な時間となりました。小休憩後、若手研究者と博士課程学生計5名による口頭発表が行われました。それぞれ、自身の研究成果を発表し、会場からの質問にもしっかりと答えながら活発に議論が行われました。企業講演では、ご後援いただいた企業の中から、ジャスコインタナショナル株式会社様、大陽日酸株式会社SI事業部様、ブルカージャパン株式会社バイオスピン事業部様にご発表いただきました。普段の研究に役立つ器具や製品の最新情報から開発状況などご紹介いただきました。ポスター発表では若手研究者、大学院生、企業からの参加者を合わせた10名のポスターが並びました。どのポスター前でも活発な議論が行われ、研究内容を通して盛んに交流が行われていました。懇親会では、ポスター発表後ということもあり、学生も若手も先生も関係なく、大いに盛り上がりました。

3日目最初の講義は池谷鉄兵先生による蛋白質構造解析手法の講義を予定していました。残念ながら池谷先生が体調不良でご参加できなくなったため、この時間は復習の時間としました。講師の



写真4 ポスター発表の様子

先生方を中心としたグループに分かれて、密度演算子の計算や化合物の構造決定演習等、復習・質問したいグループに参加して問題に取り組みました。図らずも多くの参加者にとって、それまでの講義内容の理解に役立ったようです。第24回最後の講義は、NMRの応用について川村出先生にご講演いただきました。光照射システムを用いた溶液NMR、固体NMR、そしてDNP測定における研究について幅広くご紹介いただきました。

第24回若手NMR研究会を振り返って

第24回若手NMR研究会は、多くの方々のご協力のおかげで盛会のうちに終えることができました。講師を務めていただいた先生方、参加者の皆様、ご後援いただきました企業、学会、八王子市の皆様、そして会場とさせていただいたホテルタカオネのスタッフの方々に、この場をお借りして心よりお礼申し上げます。また実機体験を実現するためご尽力いただいたジャスコインタナショナル株式会社 大橋様、杉原様、北海道大学 福士先生には特にお礼申し上げます。

最後に、次回の第25回若手NMR研究会は千葉大学 田村真生先生、徳島大学 熊代宗弘先生、立命館大学 北村奎時様、京都大学 李勇進様が中心となり2025年9月8日(月)～10日(水)にグランドニッコー淡路にて開催される予定となっております。ご参加、ご講演、ご宣伝等、引き続き当研究会にお力をお貸しいただければ幸いです。

・第24回若手NMR研究会ホームページ
<https://wakatenmr2024.wixsite.com/home>

・第25回若手NMR研究会ホームページ
<https://sites.google.com/view/wakatenmr2025/>



写真5 懇親会にて



写真6 タカオネの中庭焚火エリアにて

home

なお、この度の台風10号で被害にあわれた九州地方を始めとする方々には謹んでお見舞い申し上げます。台風だけでなく自然災害が相次ぎましたが、被災地の一日も早い復興を心よりお祈り申し上げます。



写真7 閉会挨拶にて。第25回実行委員の4名です。

ENC-ISMAR 2025 参加報告書

千葉大学大学院 国際高等研究基幹 / 薬学研究院 特任助教 / 特別研究員-PD

田村 真生

maikit@chiba-u.jp

序 文

この度、日本核磁気共鳴学会の2024年度第3回若手研究者渡航奨励金のご支援を賜り2025年4月6日から10日まで、カリフォルニア州のパシフィックグローブにて開催されたENC-ISMAR 2025に参加いたしました。今回の渡航に際し初めて訪れたサンフランシスコでは、意外にも日本車が多く走っており、日本の技術が評価されていることに誇らしさを感じました。また、パシフィックグローブの気候は日本とほとんど変わらず、渡航期間中は快適に過ごすことができました。

参加報告

本年度のISMARは、ENCと合同で開催され口頭発表やポスター発表を含め約300人の参加者がパシフィックグローブに集いました。興味深いことに、本学会のプログラムや要旨等は全てアプリで一元管理されていました。そのため、ペーパーレスに加え、必要な情報へ迅速かつ容易にアクセ

スできる点が非常に利便性に優れており、学会運営のデジタル化が進むなかで先進的な取り組みであると感じました。

ポスターセッションは、4月7日から10日までの4日間にわたって開催され、ポスター番号が偶数と奇数で交互に発表が行われました。報告者は「Direct observation of intracellular liquid-liquid phase separation (LLPS) of FUS LC by in-cell NMR」というタイトルでポスター発表しました。FUSは代表的な液滴形成タンパク質で、神経変性疾患であるALS（筋萎縮性側索硬化症）の発症に関与します。本研究では、in-cell NMR法を用いて細胞内環境におけるFUSの液滴形成メカニズムを解析しました。発表中には、細胞内にタンパク質を導入する技術や経時的なシグナル強度の低下に興味を持っていただき、多くの研究者と活発な議論を交わすことができました。また、ポスター発表時間に2024年度に韓国で開催されたICMRBSに参加していたテキサス大学の博士後期課程3年の学



左図：ポスター会場、右図：講演会場



左図：懇親会会場、右図：会場近くのビーチ

生と再会し、研究に関する意見交換を通じて交流を深めることもできました。

期日中にさまざまな発表を聴講するなかで特に興味深く感じたのは、 $A\beta 40$ とsmall Heat Shock Protein(sHSP)である αB -crystallin(αBC)との相互作用をssNMRで解析した研究です。この研究では、 αBC が $A\beta 40$ の凝集を抑制する一方で、“Fuzzy coat”と呼ばれる新たな相互作用ネットワークを有した構造を構築し、線維化の多様性を高める可能性が報告されました。これまで報告者は、凝集の抑制は病態の改善に直結するものと考えていましたが、必ずしもそうとは限らないという新たな視点を得られたことは、報告者にとって大きな学びとなりました。

最後に

夕食後には懇親会があり海外の研究者と交流し研究に関する意見交換や文化の交流ができる貴重な機会を得ることができました。また、開催地であるパシフィックグロブはアメリカの西海岸側にあることから、会場から徒歩5分で海岸まで赴

くことができ、休憩中の散歩コースとして満喫することもできるのでパシフィックグロブに行く際には是非、足を運んでみてください。

謝 辞

本研究は千葉大学大学院薬学研究院の西田紀貴先生のグループで行われました。この場をお借りして御礼申し上げます。なお、本研究は特別研究員奨励費(24KJ0032)の補助を受けて遂行しました。

若手渡航奨励を創設してくださった、故京極好正先生、故阿久津政明先生、ご家族の皆様にご心より御礼申し上げます。また、本奨励金により国際学会に参加させていただいたことを日本核磁気共鳴学会会長および若手研究者渡航奨励金選考委員長 木川隆則先生、副委員長 池上貴久先生、並びに関係者の方々に心より御礼申し上げます。本学会で得た経験を今後の研究に活かし、より一層研鑽を積んでまいります。

EUROMAR2025 参加報告書

京都大学 大学院農学研究科 博士後期課程3年

首藤 佑輔

shutou.yuusuke.28a@st.kyoto-u.ac.jp

この度、日本核磁気共鳴学会の2025年度第1回若手研究者渡航奨励金のご支援を受け、2025年7月6日から7月10日までの5日間にかけてフィンランドのオウルで開催されたthe 21th European Magnetic Resonance Congress (EUROMAR2025)に参加いたしました。まず初めに、故京極好正先生、故阿久津政明様、ご家族の皆様、ならびに、日本核磁気共鳴学会会長 木川隆則先生、若手研究者渡航奨励金選考委員長 池上貴久先生、同副委員長 浅野敦志先生をはじめとする日本核磁気共鳴学会関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

本学会の開催地であるオウル市はフィンランド西部のボスニア湾沿岸に位置し、日照時には半袖でも快適に過ごせる一方、日が陰ると長袖でも肌寒く感じられる気候でした。特に湿度が低く、非常に過ごしやすい環境であったことが印象的です。市内では、休日にサイクリングを楽しんだり、家族でボートに乗る姿も見られました。また、7月かつ北極圏地域ということもあり、夜でも太陽が沈まない「白夜」を体験でき、夜11時でも夕方のような明るさでした。

さて、本題である EUROMAR2025の様子につ

いて報告いたします。本会はBrukerやJEOLをはじめとする35社によるスポンサー・パートナーシップのもと開催され、オーラル・ポスター両セッションにおいて、幅広い分野の研究者と活発な議論が交わされました。Plenary Sessionでは13名、Parallel Sessionでは37名、Poster Sessionでは300名以上の世界各国の研究者が発表し、非常に大規模な国際学会でした。海外学会への参加が初めてだった私はその規模感だけでも大きな刺激を受けました。研究分野としては、溶液NMRや固体NMRだけでなく、MRI、シミュレーション、基盤技術の開発に至るまで多岐にわたっており、特にDNP法（超偏極技術）に関する研究発表が多い印象でした。

私は7月7日(2日目)と7月9日(4日目)の2日間にわたり、「Electric Field- and ATP-Induced Conformational Changes in Proteins Investigated by MD Simulations and NMR Spectroscopy」というタイトルでポスター発表を行いました。本研究では、生体内の非平衡環境として電場やATP濃度の変化に着目し、それらがタンパク質凝集に与える影響を、溶液NMR法およびMDシミュレー



写真1 ホテルから見た白夜



写真2 休日の海岸沿いの風景

ションにより解析しています。

発表形式については、国内学会とは異なり、研究内容をすべて詳細に説明するのではなく、聴衆が関心を持った点に絞って対話形式で進めるスタイルが主流であり、初めはその違いに戸惑いました。さらに、今回が初めての英語での学会発表であったこともあり、とくに質疑応答では言葉に詰まる場面も多く、英語での発信力を一層高める必要性を痛感しました。一方で、Brukerの社員を含む多くの研究者に発表を聞いていただき、特に現在並行して進めている新たな測定手法の開発に対して高い関心が寄せられたことは、今後の研究推進への大きな励みとなりました。特に印象的だったのは、測定手法を開発するうえでのベースである「電気泳動NMR法 (Electrophoretic NMR)」に関する発表を、Monica Schönhoff氏お

よびBuyting Simon氏から聞くことができた点です。国内の学会では本手法に関する発表を耳にしたことがなかったため、こうした偶然の出会いがあることも国際学会の大きな意義であると実感しました。

改めて、EUROMAR2025への参加に際して渡航費助成をご決定いただいた関係者皆様に、心より感謝申し上げます。本学会への参加経験を今後の研究活動にも活かせるよう努力してまいります。ちなみに、2026年7月にはスウェーデンでEUROMAR2026が開催予定ですので、興味がある方はぜひご参加ください。本報告書が、今後国際学会への参加を検討されている方々の参考となり、ご自身の研究活動にとって実りある機会となることを願っております。



写真3、4 EUROMAR2025会場

EUROMAR2025 参加報告書

群馬大学大学院 理工学府 博士課程1年

河端 夏輝

t252a001@gunma-u.ac.jp

この度、日本核磁気共鳴学会2025年度 第1回若手研究者渡航奨励金のご支援を賜り、Oulu (Finland) で開催されたThe 21st European Magnetic Resonance Congress (EUROMAR) 2025に参加させていただきました。ご支援につきまして、日本核磁気共鳴学会会長である木川隆則先生、若手渡航選考委員である池上貴久先生・浅野敦志先生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、Oulu Music Centre and Pohjankartano Multipurpose Building (Oulu, Finland) を会場として、2025年7月6日から10日の5日間で開催されました。21年のEUROMARの歴史のなかで、フィンランドでの開催は初だそうです。Oulu市は、フィンランドの真ん中付近：北緯65度に位置しており、気温は夏場でも18℃程度、カラッとした気候で非常に過ごしやすく感じました。また、7月は白夜であり、街は真夜中でも活気がありました。日が暮れないので、学会参加者

の方々も、学会終了後の時間を非常に満喫していたように思います。

私は、「Development of an MRI methodology for polymeric films by ex-situ solid-state NMR with a needle-like ferromagnet」という題目でポスター発表を行いました。針状強磁性体による静的磁場勾配を利用した、安価かつ簡便な新規の固体NMRイメージング法を用いて、高分子膜材料の分子ダイナミクスを明らかにするという内容です。

さらに今回は、Flash Talkにも選出していただき、4分間の口頭発表も行いました。私にとって、国際学会での口頭発表は初めてで非常に緊張しましたが、とても良い経験となり、チャレンジして良かった！と感じております。私の発表の様子は、学会公式Xアカウント (<https://x.com/euromar2025>) から発信していただきました。

今回は、世界中から500件近い発表があり、およそ700名が参加したそうです。たくさんの興味



学会会場：Oulu Music Center



Flash Talkの様子（公式Xより）



Oulu で見かけた鳥



Closing Ceremonyの様子

深い発表がありましたが、特に、学会の裏テーマであるBird (鳥)にちなんだ発表である、「Animal Detected Magnetic Resonance (Dr. Peter Hore, Oxford Univ.)」は印象的でした。渡り鳥の優れた磁気感覚には、鳥の目の光受容細胞にあるタンパク質内で、光によって生じたラジカル対の量子スピンドイナミクスが大きく関与しているのではないかという内容で、非常にユニークで新鮮でした。

その他、発表者それぞれ、お気に入りの鳥の写真やイラストを資料に散りばめており、皆さんの遊び心を垣間見ることができました。

学会プログラムとしては、Conference DinnerやBruker Nightといった食事会のほかに、JEOL Music Nightでは、学会参加者の有志による楽器

演奏+Oulu大学管弦楽部による弦楽四重奏を披露していただき、学会員の方の多才さに驚くとともに、素晴らしい演奏による非常に心地の良い時間を過ごすことができました。また、Ouluの街を楽しむCity Walking & Runningも開催され、ランナーの方は本気でランニングしていました。

総じて、心地よい気候と白夜のOuluで、世界中の研究者の方から大きな刺激を受けて、さらにFlash Talkの機会も頂けて、大満足なEUROMAR2025でした。この経験を糧に、今後の研究も頑張ります!!

Thank you very much to all the organizers of EUROMAR2025!!

追 悼 ～安藤勲先生～

東京農工大学 名誉教授

朝倉 哲郎

asakura@cc.tuat.ac.jp

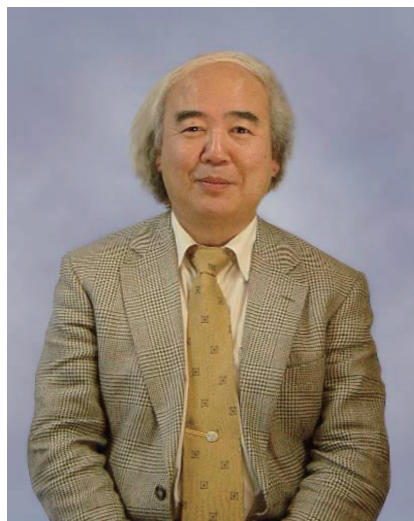
東京工業大学名誉教授の安藤勲先生は、2025年2月2日、83歳で逝去されました。長きにわたりご指導いただいていた先生を失った悲しみは、筆舌しがたいものがあります。あの人懐っこい、優しい笑顔を思い出し、もう、お会いできないかと思うと残念でたまりません。NMR学会や高分子学会でお会いすると、必ず、すぐ寄ってきていただき、いつも楽しく過ごさせていただきました。

安藤先生は、東京理科大学今村研究室を卒業された後、1972年に東京工業大学(現東京科学大学)の理工学研究科で西岡篤夫教授の下で博士号を取得され、取得後、直ちに同大学の高分子工学科の助手として教育・学術研究キャリアを開始されました。1976年には、イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校のグタウスキー教授の研究室で博士研究員として1年間を過ごされました。

日本に帰国後、1982年に東京工業大学の助教授に就任され、1988年に教授に昇進されました。その後、東京工業大学国際高分子基盤研究センターセンター長、高分子学会常任理事、関東支部長、国際交流委員会委員長、日本学術会議高分子化学専門委員会幹事、委員長、日本核磁気共鳴学会常任理事、副会長、会長等、歴任されました。先生が委員長の時に、委員として何度か学会活動に従事させていただきましたが、いつも和やかな雰囲気の中で皆の意見をまとめ、学会の発展に大きく貢献されてられました。

また、東京農工大学を始めとして、国内の、実に17大学で非常勤講師を務められるとともに、イギリス・サリー大学を始めとして海外の9大学で訪問教授を務められました。特に、サリー大学のウエブ教授とは、親友として長く付き合われました。

先生は、NMR化学シフト理論に基づく量子化学計算をベースに、高分子の構造を高精度で解析する新たな方法論を開発、様々な高分子の構造と



安藤勲先生

ダイナミクスの解明に応用、先駆的な優れた研究を行い、NMR分光光学や高分子科学の進歩に大きな貢献をされてきました。その業績は、300報を超える原著論文、80報のレビュー等多くの研究成果として残されてきました。その業績の主なものは次の通りです。

1. 高分子NMR化学シフトの理論的計算に基づく 高分子の構造・ダイナミクスの解析

ポーブルのNMR化学シフト理論にフローリーの高分子統計力学を組み込み高分子NMR化学シフトの理論的計算法を開発、それを適用して、環状パラフィン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、フッ素化高分子などの様々な高分子の化学シフトを評価し、その構造を詳細に解明されました。さらに、高分子、ペプチド、ポリペプチド、羊毛ケラチンなどに安定同位体ラベルを施し、選択的かつ高感度に測定したNMRスペクトルデータを得て、高精度固体構造解析法を大きく発展させました。さらに、これらの方法を用いてポリペプチドの高次構造の形成に大きな寄与をしている水素結合の構造と役割の解析に成功されました。また、NMR化学シフトと二面体角(φ , ϕ)の関係を示

した“NMR化学シフトマップ”の方法論はポリペプチド、およびタンパク質の高次構造解析に応用され大きな成果を与え、優れた方法として高い評価を受けておられます。

2. 高分子結晶のNMR化学シフト理論の開発と 高分子の構造・電子状態の評価

固体物理におけるバンド理論を応用して高分子結晶のNMR化学シフト理論を開発、NMR化学シフトを通して高分子鎖内相互作用と高分子鎖間相互作用を分離して評価されました。この方法は、NMR分光法における基礎的な研究として評価されています。

3. 高磁場勾配NMRシステムの開発と

高分子ゲル・高分子液晶の拡散過程の解明

最高 2000 G/cm まで発生できる高磁場勾配 NMR プローブシステムの開発に成功、 $10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$ までの拡散係数の精度高い測定を可能とされました。このシステムを応用して世界に先だって、高分子ゲル中のプローブ高分子の拡散過程についての解析および液晶状態における棒状ポリペプチドの異方的拡散係数の測定とその拡散過程の解析に成功されました。この方法を、ナノスケールチャンネルを有する系に応用して、そのナノチャンネルの中でのプローブ分子の拡散過程を解明、ナノスケールチャンネル内の場合とプローブ分子の間の相互作用について解析評価する新しい道を切り拓かれました。

4. 刺激—応答 NMR 画像システムの開発と

ゲル科学への応用

刺激—応答 NMR 画像システムを開発、高分子ゲルの外部から応力、電場の刺激を加えることにより変形と収縮過程を三次元画像化することに成功、刺激—応答過程の解明に成功されました。また、ゲル中の常磁性金属イオンの空間分布を NMR 画像化し、ゲルのネットワークと金属イオンの相互作用ならびに電場印加による金属イオンの挙動を明らかにされました。これらの研究によってゲル科学への新しい局面を広げられました。

以上の高分子の NMR 研究における卓越した貢

献に対して、1991 年には、NMR 法によるポリオレフィン・ポリペプチドの構造研究で高分子学会賞を、高分子 NMR 分光法の展開と高分子キャラクタリゼーションへの応用で高分子学会高分子科学功績賞を受賞されました。これらの科学的業績に加えて、さらに、国際協力の促進にも尽力され、Bulletin of Chemical Society、Journal of Polymer Science、Annual Reports on NMR Spectroscopy など 12 に及ぶ著名なジャーナルの編集委員を長く務められました。

また、安藤先生は、いろいろと趣味を持たれておりました。姫路工大の斎藤肇先生ともよく音楽会に行かれました。また、ご自宅では、ランを栽培されていきました。登山が大好きで、毎年、夏にアルプスに行かれ、私も何度も連れて行っていただきました。この写真は、その時のものです。いまでも、アルプスの山々をテレビで見るとその時のことを懐かしく思い出します。先生のほのぼのとした逸話は、数多くありますが、ここでは控えさせていただきます。



左から 2 番目が朝倉、3 番目が安藤先生、
右端が今村先生

先生の温かいお人柄に触れるとともに先生の薫陶を受けた若き研究者が、今後は先生が教えてくださった想いを大切に受け継ぎ、研究開発に励んでくれることと思います。どうぞ、安らかにお休みください。

合 掌

NMR

*Bulletin of the Nuclear Magnetic
Resonance Society of Japan*

Vol.15 No.1

2025 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