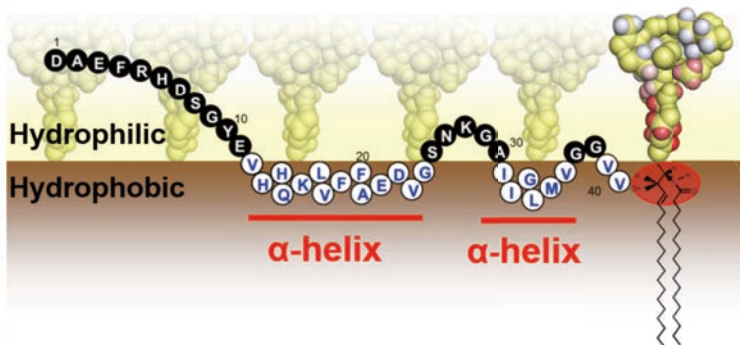
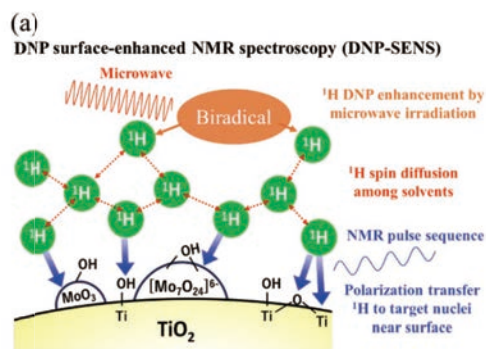
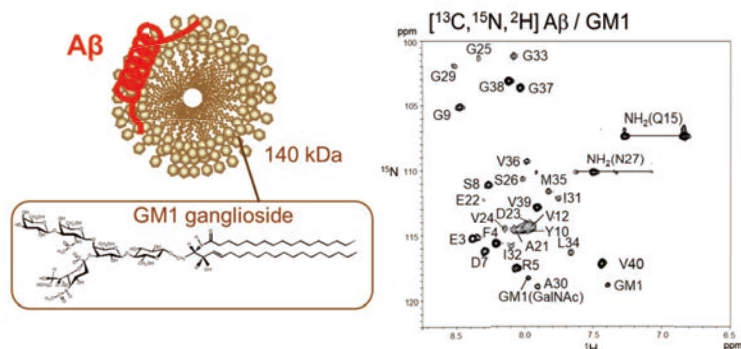


会長メッセージ 伊藤 隆
 総説論文：解説 永島裕樹
 総説論文：解説 矢木真穂
 総説論文：解説 菊池 淳
 総説論文：解説 西山裕介
 NMR 講座：NMR 基礎講座 阪本知樹
 会員便り：海外留学記 金井典子
 甲斐荘正恒先生追悼抄 阿久津秀雄
 甲斐荘正恒先生追悼抄 嶋田一夫
 甲斐荘正恒先生追悼抄 伊倉光彦

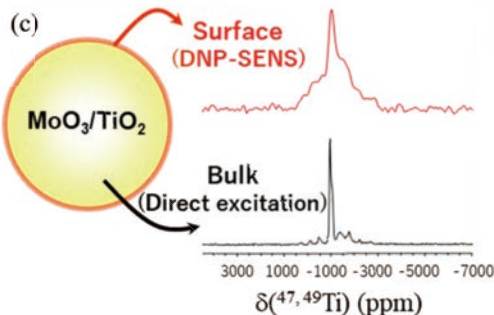


(b)

$I = 1/2$

$I > 1/2$ (Quadrupolar nuclei)

H																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									</
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----



表紙の図

- (左上): “NMRで探るタンパク質の柔構造と分子集合のダイナミクス—アミロイド研究を通して—”(図1)
名古屋市立大学大学院薬学研究科、自然科学研究機構生命創成探究センター 矢木 真穂先生
- (左下): “ $R_{1\rho}$ 緩和分散法による核酸分子の構造ダイナミクスの解析”(図6の(a))
東京薬科大学 薬学部 阪本 知樹先生
- (右): “半整数四極子核の固体DNP-NMRの測定技術”(図1)
産業技術総合研究所 触媒化学研究部門 永島 裕樹先生

広告掲載一覧

(申し込み先着順)

日本酸素 株式会社

中山商事 株式会社

株式会社 シゲミ

日本電子 株式会社

株式会社 エルエイシステムズ

ブルカージャパン 株式会社

株式会社 CRYO SHIP

株式会社 エムアールテクノロジー

NMRプラットフォーム
(文科省 先端研究基盤共用促進事業)

本学会機関誌へのご賛助に対しまして、厚く御礼申し上げます。



「無細胞くん」は理化学研究所の高度な
無細胞タンパク質合成技術をキット化した製品です。

迅速・簡便なタンパク質合成

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

多様なタンパク質合成

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

高いタンパク質合成量

(社内実施例)

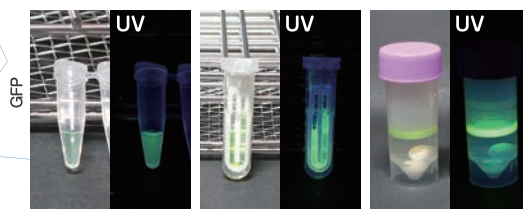
GFP 4~5 mg/mL (無細胞くん N 100, N1000: キット付属の専用透析デバイスで反応)
350 µg/mL (無細胞くん N Mini: 市販のチューブで反応)

タンパク質合成キット

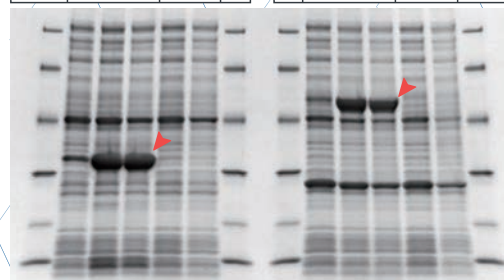
無細胞くん



「無細胞くんN」シリーズによるタンパク質合成

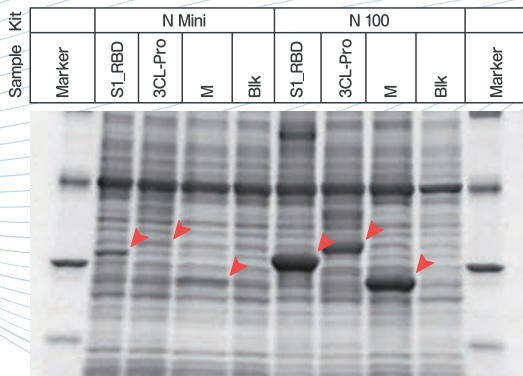


Sample	無細胞くん N Mini			無細胞くん N 100			無細胞くん N 1000		
	Marker	GFP	Blk	Marker	BAP	Blk	Marker	BAP	Blk



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

SARS-CoV-2ウイルス タンパク質合成



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

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

安定同位体標識アミノ酸・SAIL アミノ酸・膜タンパク質合成用試薬

製品番号	製品名	数量	標準価格(円)
A107-0144	無細胞くんアミノ酸混合水溶液-UL-d	1mL	お問い合わせください
A39-0072	無細胞くんアミノ酸混合水溶液-UL- ¹⁵ N	1mL	15,000
A41-0074	無細胞くんアミノ酸混合水溶液-UL- ¹⁵ N, d	1mL	75,000
A40-0073	無細胞くんアミノ酸混合水溶液-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	30,000
A42-0075	無細胞くんアミノ酸混合水溶液-UL- ¹³ C, ¹⁵ N, d	1mL	お問い合わせください
A91-0128	無細胞くんアミノ酸混合水溶液-Lys, Arg-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	20,000
A92-0129	無細胞くんアミノ酸混合水溶液-Lys, Leu-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	20,000
A108-0145	無細胞くんアミノ酸混合水溶液-SeMet	1mL	12,000
SAT2001	SAILアミノ酸混合水溶液	1mL	お問い合わせください
New A226-0290	膜タンパク質合成用添加剤 Set A	1キット	23,000

標準価格(円)に消費税は含まれておりません。
アミノ酸混合水溶液は無細胞くん1キットあたり1mL 必要です。

受託合成



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



製造・総販売元

日本酸素株式会社

イノベーションユニット SI事業部

〒220-8561 神奈川県横浜市西区みなとみらい4-6-2

みなとみらいグランドセントラルタワー

TEL. 045-872-1823 (SI 代表) FAX. 045-872-1825

●資料のご請求は、日本酸素までお気軽にご用命ください。

メールアドレス Isotope.NS@jp.nipponsanso.com

ホームページアドレス <https://stableisotope.jp.nipponsanso.com>

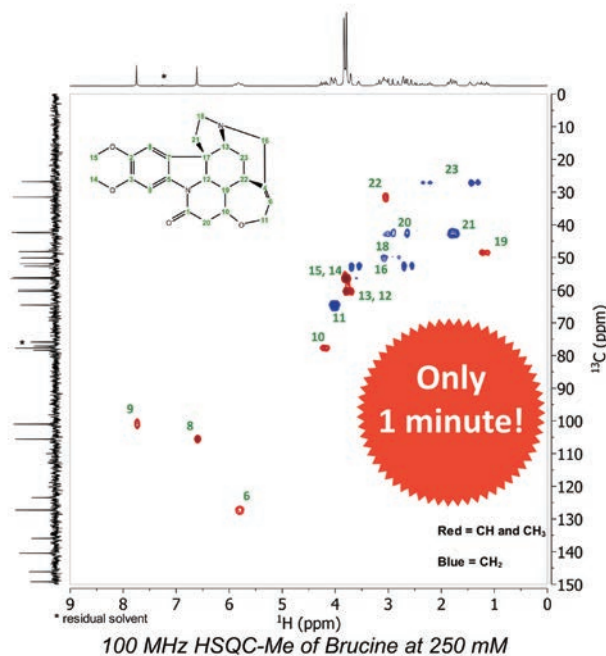
Nakayama

Dedicated Sales Division

Global Business Unit

 **magritek**
www.magritek.com

最もパワフルな構造解析を…わずか1分で!



Spinsolve 100^{ULTRA}
Multi Xⁿ

NEW

Spinsolve 100^{ULTRA}

100MHzの性能を卓上型で簡単操作

- ・¹H最高感度 ▶ **400:1** (1% Ethyl Benzene)
- ・¹H最高分解能 ▶ **<0.2Hz** / <8Hz / <16Hz
(LW50%/0.55%/0.11%)

 **中山商事株式会社**
海外事業部 海外事業課 東京デモルーム

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13-5 アソルティ日本橋小伝馬町2F
TEL: 03-3527-2745 FAX: 03-3527-2746 E-mail: dsd@nakayama-co.jp
<https://dsd.nakayama-co.jp>



株式会社シゲミ

NMR サンプルチューブで世界中のお客様の
ソリューションを解決するために

- * 特別注文品 NMR でも NMR 以外でも 1 本から受注可能です
- * さまざまな機能の機種を取り揃えております



NMR
SHIGEMI®

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

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

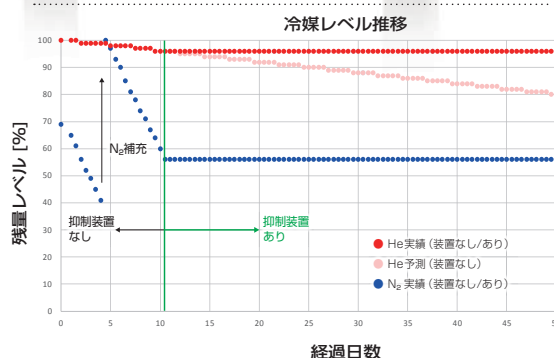
昨今の液体ヘリウムへの不安・心配解消へ



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

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, サンプリ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



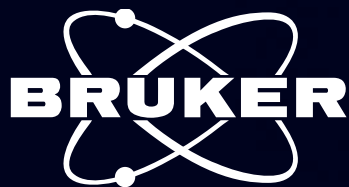
Bruker用MASローター
(1.3mm - 7mm)



Oリング付きキャップ
(左: Kel-F, 右: Vespel)



キャップリムーバー
(1.3mm - 4mm)



NMR

Ascend Evoで切り拓く、磁石技術の未来

優れた性能と持続可能性を両立した新しいスタンダード

最先端の超伝導技術と革新的なマグネット設計から生まれたBruker Ascend Evoは、幅広いNMRアプリケーションに対応する次世代マグネットです。優れた磁場安定性と均一性、高効率な極低温性能、そして設置の容易さを兼ね備え、NMRの新たな可能性を切り拓きます。

- 高度なシミング技術が実現する卓越した磁場均一性
- 独自の超伝導接合技術がもたらす優れた磁場安定性
- 高度なアクティブシールドとEDS、高精度クライオジェニックシミングがもたらす高性能
- 低ヘリウム消費設計により、400/500/600 MHzマグネットで1年以上の長期ヘリウム保持を実現

Ascend Evo超伝導NMRマグネットは、卓越した精度と柔軟性、先進技術によって、研究者の革新的な発見を支えます。

詳細は
こちら



詳しくはWebサイトをご覧ください - www.bruker.com

液体窒素蒸発防止装置 GMR/PMRシリーズ

製造元 株式会社エムアールテクノロジー

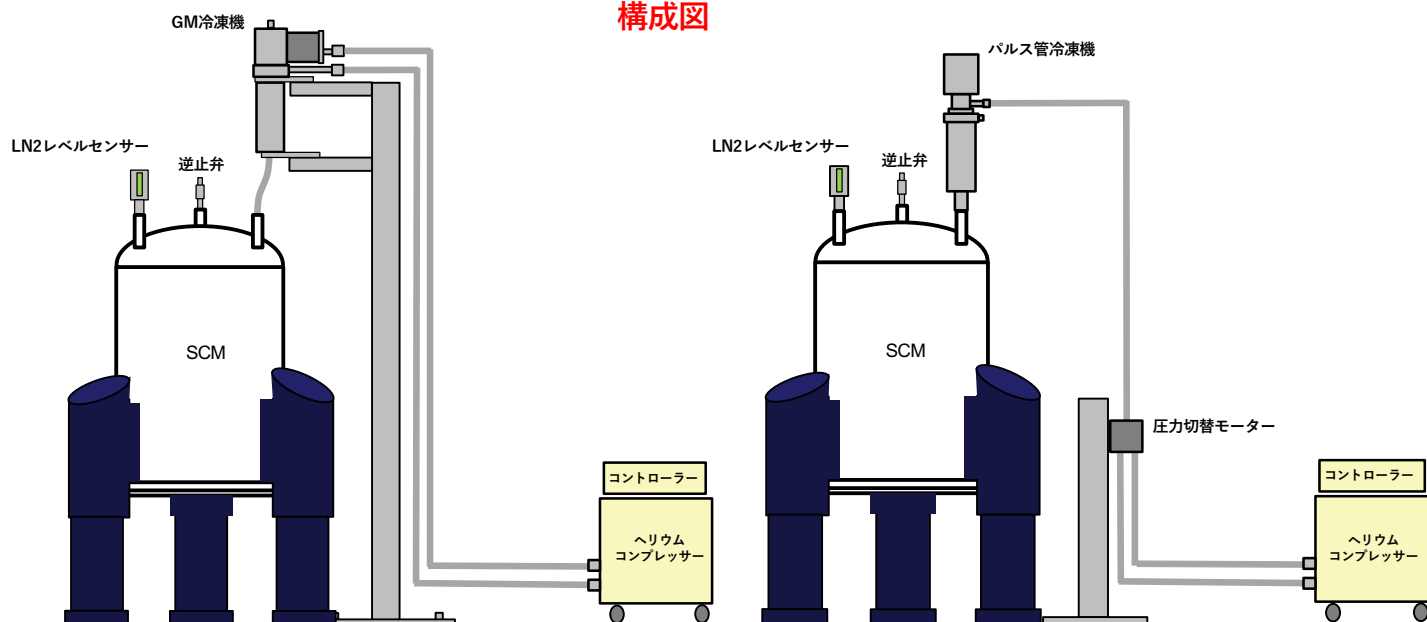
GMR



PMR



構成図



株式会社 CRYO SHIP

〒330-0854

埼玉県さいたま市大宮区桜木町1-266-3

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

URL : www.cryoship.co.jp



グループ会社

株式会社 センダガス

URL : www.sendagas.co.jp

株式会社 エムアールテクノロジー

URL : www.mr-techno.co.jp

液体窒素製造自動供給装置

XL—EMP—14A 型 / 20W型

本装置は、大気中の窒素ガスを連続的に抽出する窒素ガス発生機と小型空冷式極低温冷凍機を使用して液体窒素を製造し、核磁気共鳴装置や電子顕微鏡EDS検出器等に自動供給する装置です。液体窒素は筐体上部の供給口より各種分析装置に自動供給することが出来ます。

また、付属のフレキシブルホースにて任意の容器に外部取り出しすることが出来ます。



特 徴

- 大気を原料にして液体窒素を作ります
- ワンタッチで自動運転を開始します
- コンパクトサイズで場所を取りません
- ボタン操作一つで外部取出しが出来ます

用 途

- NMR装置
- 電子顕微鏡EDS検出器

大気から液体窒素を作ります。

大気中の窒素を効率良く抽出し液体窒素を作ります。窒素ガス発生機は、酸素・窒素分離用分子篩炭 MSC (Molecular Sieving Carbon) を使用した P・S・A (Pressure Swing Adsorption) 方式による 大気から 窒素ガスを連続的に得る窒素ガス分離装置です。分離は吸着剤である MSC に対するガスの吸着速度差を利用して行い、大気中の酸素ガス、炭酸ガス、水分等を短時間の内に加圧状態で吸着除去し、ほとんど吸着されない 窒素ガスを効率良く抽出します。窒素ガス発生機で作られた窒素ガスは、液体窒素容器に送られ、内蔵の小型極低温冷凍機で液化されます。液体窒素容器は 常時窒素ガスで充満しており 大気圧下で窒素ガスを液化し容器に保存します。

連続無人運転が可能です。

メインスイッチをONにするだけで運転を開始します。夜間・休日等にも無人で安全に液体窒素を製造します。さらに安全運転のため各種安全

装置を標準装備しています。液体窒素容器内の液体窒素量は 常時液面センサーで監視され 液体窒素の生産／停止を自動的にコントロールしています。

必要な時簡単に取出せます。

極低温の実験等 液体窒素を使いたいときにいつでも ボタン操作のみで簡単取り出すことができます。

各種装置へ自動供給が可能です。

核磁気共鳴装置SCMや電子顕微鏡EDS検出器等に液体窒素を自動供給することができます。自動供給装置は、内蔵されたウイークリータイマーで任意の曜日・時刻に自動供給する“AUTO”機能と手動で供給する“MANUAL”充填機能を内蔵しております。

先端的NMR研究基盤の設備・技術・人材の共用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続けます

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・技術へのアクセスを提供してきました。2021年-2025年の5年間で設備を利用した研究成果が600報以上発表されています。これからも先端的なNMR設備・技術の共用の連携を推進していきます。



北海道大学

- 食や健康など幅広い生命科学を中心に支援
- 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
サンプラー 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
サンプラー 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
サンプラー 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



溶液

極低温
プローブ オート
サンプラー DX対応 LC-NMR

600MHz/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
サンプラー 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



NMR PLATFORM



<https://nmrpf.jp/>

NMR

*Bulletin of the Nuclear Magnetic
Resonance Society of Japan*

Vol. **16** No.1

August 2026

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

CONTENTS

●会長メッセージ 「巻頭言・荒田先生・Bach」.....	3
伊藤 隆	
●総説論文：解説 半整数四極子核の個体DNP-NMR測定技術	5
永島 裕樹	
NMRで探るタンパク質の柔構造と分子集合のダイナミクス ーアミロイド研究を通してー	13
矢木 真穂	
AI興隆期におけるNMRデータサイエンス活用事例	21
菊地 淳	
^{14}N スピンの操作方法.....	34
西山 裕介	
●NMR講座：NMR基礎講座 $R_{1\rho}$ 緩和分散法による核酸分子の構造ダイナミクスの解析.....	42
阪本 知樹	
●会員便り：海外留学記 オーストラリアでの研究生活で得たもの	55
金井 典子	
●甲斐荘正恒先生追悼抄 甲斐荘正恒先生を偲ぶ	58
阿久津 秀雄	
東京都立大学名誉教授 甲斐荘正恒先生を偲んで	60
嶋田 一夫	
情熱のサイエンティスト 甲斐荘正恒先生を偲ぶ	62
山本 泰雅	

「巻頭言・荒田先生・Bach」

日本核磁気共鳴学会 会長

伊藤 隆

ito-yutaka@tmu.ac.jp

高校・大学と美術系の部活動をしていたために、ポスターなどのデザインを依頼されたことが何度かありました。しかし、情けないことに、(今ならば許されないのでしょうか)誰かの図案を微妙に参考にさせていただくと比較的無難なものが出来上がるのに対して、完全にオリジナルで制作したものは残念な結果に終わることが多かったのです。たまたまおしゃれな感じに出来上がったある合同展のポスターを目にした五月祭委員の方に依頼されてパンフレットの表紙を作成した時は、張り切って準備したのが裏目に出て、とても平凡なものになってしまいました。その図案を渡したときの五月祭委員の方の「えっ」という表情は今でも忘れられません。(ちなみにその時の五月祭は初めて「テーマ」が無くなった(=墮落した)五月祭として注目を集めたため、そのパンフレットは、橋本治の有名な「とめてくれるなおっかさん 背中 of いちょうが泣いている…」の駒場祭ポスター(1968年)と一緒に写真で週刊誌に掲載されてしまい、結果として、私の恥ずかしい作品は日本中に広まってしまったのです)

核磁気共鳴学会の学会誌創刊号(2010年11月発行)の表紙は、荒田先生がお書きになった「機関誌創刊にあたって」という文章で言及されていた「原研で測定されたサントニン誘導体のスペクトル」を用いてデザインしたものでした。創刊号の編集長であった鈴木榮一郎先生から、「荒田先生はどうもデザイン(図1)が気に入らないらしい。暗いと言っている」という電話を受けたのは2010年の10月のことです。その後、荒田先生から直接メールがあり(荒田先生、すいません。以下引用させていただきます)。

伊藤隆君

昨日メールをお送りしたあと、表紙をボンヤリ眺めていて色々感想をもちました。

1) 原研のスペクトルは、小生としては、思いで深いものではありますが、第1号の表紙には、少々“きたなくて”向かないような気がしてきました。この図は、文章の中にあるのですから、表紙は別のものがよいのではないかという気がしてきました。

2) 小生の案としては代わりに、電通大で作られた電磁石の写真はどうでしょうか。ウェブページの特別展示室の中に、磁石だけのきれいな写真が入っています。引用については、担当の人に了承を得ています。

ただ私としても、「その案をいただきます」と引き下がるわけにはいきません。そこで、「今回は万全を期してアイデアを拝借していた！」あるCDのジャケットデザインを手元に置いて荒田先

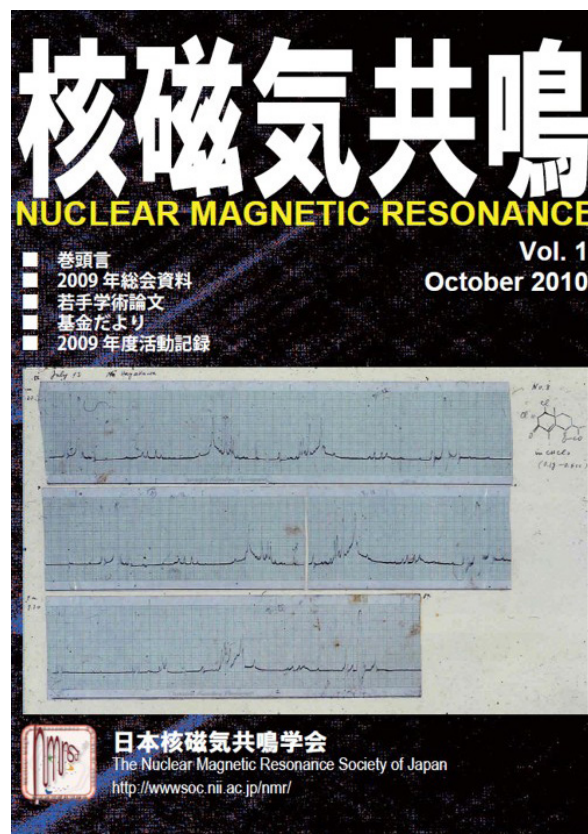


図1 学会誌創刊号表紙デザインの第1案

生にメールをしました。

荒田先生

このスペクトルの図、このままでいいのではありませんでしょうか？ 私は非常に気に入っています（場合によっては電磁石の写真をつけてもいいかもしれません）。

添付させていただいたCDのカバーの図のような感じになって趣があるような気がいたします。CDの図の場合はBach自筆楽譜です。どうでしょうか？

（このCDはSEONレーベルから出ていた、ブリュッヘン、レオンハルトらによる「バッハ、フルートソナタ全集」でした）

荒田先生から早速返信があり：

伊藤隆君

忙しいところすみませんでした。

図は、電通大の磁石はやめて、汚いですがスペクトルでOKです。おまかせします。バッハにしてください。

小生は、彼氏（バッハ）のオーケストラの伴奏が付いたもの、??? 協奏曲の類は、どれもうるさくて、聴きません。ミサ曲なども。ピアノのソロバージョンは毎日聴きます。トッカータ、パルティータ、xxx組曲など、小生のアタマには必須です。

私の作戦勝ちですかね？

その後も荒田先生とは、NMRに関する話題だけでなく、音楽や映画の話で何度も楽しいメールのやり取りをさせていただきました。ブリュッヘン、レオンハルトらのCDをよく聴いていたように、当時の私はオリジナル楽器至上主義者でした。ですが、荒田先生ご推薦のイングリッド・ヘブラーのピアノ版「フランス組曲」は、レオンハルトのチェンバロ版の演奏を凌いで、今ではこの曲の第一の愛聴盤になっています。

2010年当時理事会メンバーであったために、このように創刊号の発行に関わりましたが、私は正直に言うとそれからずっと学会誌の真面目な読者ではありませんでした。今回巻頭言を依頼されて改めて過去に発行された機関誌を拝見しましたが、（web上で見ていたにも関わらず）ずっしりとした重みを感じました。いずれも歴代の編集委員の方々がご尽力されてきた結果であろうと思います。まずは感謝を申し上げたい。エキスパートが（学術論文とはやや異なって）平易な語り口で述べる文章はどれをとっても魅力的なものでした。この号もそのような珠玉の文章が詰まっているはずです。お楽しみください。

最後になりますが、学会誌発行にあたって広告を掲載していただいている団体・企業の皆様、本学会の事業へご支援をいただいている賛助会員の皆様には、心から御礼を申し上げます。今後ともどうぞよろしくお願い申し上げます。

半整数四極子核の固体DNP-NMR測定技術

産業技術総合研究所 触媒化学研究部門

永島 裕樹

nagashima-hiroki@aist.go.jp

1. はじめに

固体表面は、現代ナノテクノロジーを支える重要な研究対象であり、その構造解析に関する研究が広く行われている。特に固体触媒は材料・化学産業において実用的に広く利用されており、多くの研究者・技術者が関与し、新規触媒の開発も現在なお活発に進められている。このため、固体触媒表面の化学構造解析に対する需要は極めて高いが、その原子レベルでの解析は依然として難しい。表面解析には多様な分析手法が応用されてきたが、固体NMRは感度の低さおよび表面選択性の欠如を主因として、これまで十分に活用されてこなかった。しかしながら、固体NMRは長いコヒーレンス時間に由来する高いサイト識別能力を有し、さらに各種磁気相互作用を通じて、他の分析法では得られないユニークな情報を提供できる。したがって、固体表面へ適用できれば、従来アクセスが困難であった詳細な化学構造情報を取得できる可能性が高い。近年、高磁場条件において実用化が進展したDynamic Nuclear Polarization (DNP) は、この課題を克服する最も有力な手段である。DNPでは、高磁場条件下において固体NMRのサイト識別能力を維持したまま大幅な高感度化を達成できる。さらに、他の表面分析法と比較しても表面を高い選択性で観測できる点に大きな特徴がある。この表面選択的解析法はDNP surface-enhanced NMR spectroscopy (DNP-SENS) と呼ばれ、NMRに関わりの少なかった研究分野においても注目を集めている^[1]。一方で、固体触媒の大半を占める無機材料では、多様な核種の観測が必要となる。特に固体触媒で広く用いられる金属酸化物においては、酸素核をはじめとする四極子核、とりわけ周期表の約66%を占める半整数四極子核が主要な観測対象となる。しかしながら、DNP-SENSにおいては、これら半整数四極子核の高感度観測に課題があり、無機材料への適用範囲は限定的であった^[2]。

著者はこの点に着目し、関連する測定手法の開発に取り組むことで、DNP-SENSの応用範囲の拡張を試みてきた。

2. DNP-SENS

固体DNP-NMRは、特に ^1H 核の高感度化に有効であることが知られている。典型的には電子スピン源としてTEMPO系ビラジカル分子を試料に添加する。これらのビラジカル分子は ^1H 核への効率的な分極移動が可能となるよう設計されており、溶媒中に均一に分散させた後、低濃度(10～20 mM程度)のラジカル溶媒として試料が十分に湿潤するまで添加する。このラジカル溶媒は無機ナノ粒子表面に接触した状態にあり、これが表面選択的観測の鍵となる。測定は、およそ100 Kの低温条件でMagic-Angle Spinning (MAS) を用いて高速回転しながら実施する。低温にする主な目的は、電子スピンの縦緩和時間の延長や電子スピン偏極度の向上によるDNP効率の増大、および溶媒凍結による ^1H スピン拡散を活用するためである。直径3.2 mmのサファイア試料管では、回転周波数は通常12.5 kHz程度(最大約14 kHz)である。マイクロ波照射により、ビラジカル分子の電子スピンから溶媒中の ^1H へ分極が移動し、さらに ^1H 核間のスピン拡散によって分極が試料表面近傍へ伝播する。その後、固体NMRパルスシーケンスの照射により、溶媒または表面水酸基・有機種などの ^1H から目的とする核スピンへ分極移動を行うことで、高感度かつ表面選択的な観測を達成する(図1a)。 ^1H からの分極移動は距離依存性を持つため、得られる信号は表面から数オングストローム程度の浅い領域に限定される。さらに、分極移動時間を制御することで、最表面およびサブ表面の寄与を選択的に強調したスペクトル取得が可能で、極めて高い表面選択性を有する。一方で、電子スピンから核スピンへ直接分極移動を行うDirect DNPでは、 ^1H を介した場合と

比較すると感度増強は一般に小さい。また、分極がバルク内部まで移動しやすいため、表面選択性の確保が難しく、数ナノメートル程度の深さまで増強が及ぶ^[3]。400 MHz級DNP-NMR装置では、ハロゲン系溶媒ではTEKPOL^[4]、水系溶媒ではAMUPol^[5]が代表的なピラジカル分子として用いられる。ラジカル分子の開発は現在でもなお活発に進められている。無機固体表面の化学状態を保持する観点からは、表面への影響が低いハロゲン系溶媒が選択されることが多い。

3. 半整数四極子核に対する DNP-SENS の課題

固体触媒へのDNP-SENSの初期の応用は、主にシリカ担体上に有機分子を修飾した固定化触媒を対象として進められてきた。この場合、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{29}Si などのスピン1/2核が中心であり、 ^1H か

らの分極移動にCross Polarization (CP) MAS (図2a)を適用することで容易に測定ができる^[6]。さらに ^{119}Sn 、 ^{195}Pt などの比較的観測が難しい試料に関しても適用が広がっている^[7, 8]。一方、金属酸化物などの無機固体触媒では、多くの対象核が半整数四極子核であり(図1b)、二次の四極子相互作用によってRFパルスでの操作も複雑化する。そのため従来の固体NMRでは主にHahn echo法などの直接励起で観測していたが、DNP-SENSでは表面選択的観測の本質が高感度化した ^1H からの分極移動にあるため、半整数四極子核への効率的な分極移動が不可欠となる。

しかしCPMASでは、一次の四極子相互作用の影響を受けない中心遷移(Central Transition, CT)を選択的に励起する必要があるため、低いRF磁場強度を用いる必要があり、recoupling条件の制約により励起帯域が狭くなる。その結果、サイト間でのスピンロック条件の不一致やスペクトル歪みが生じやすく、加えて試料ごとの条件最適化が必要である。特に信号が弱い系では条件探索そのものが困難となる。このような背景の下、観測が容易な $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ の ^{27}Al に対するCPMASベースのDNP-SENS測定が初期に報告された。その後、M.Levittらが2004年に発表したThe phase-shifted recoupling effects a smooth transfer of order (PRESTO)法^[9, 10](図2b)が、F. PerrasらによってDNP-SENSに導入され、シリカ表面水酸基の

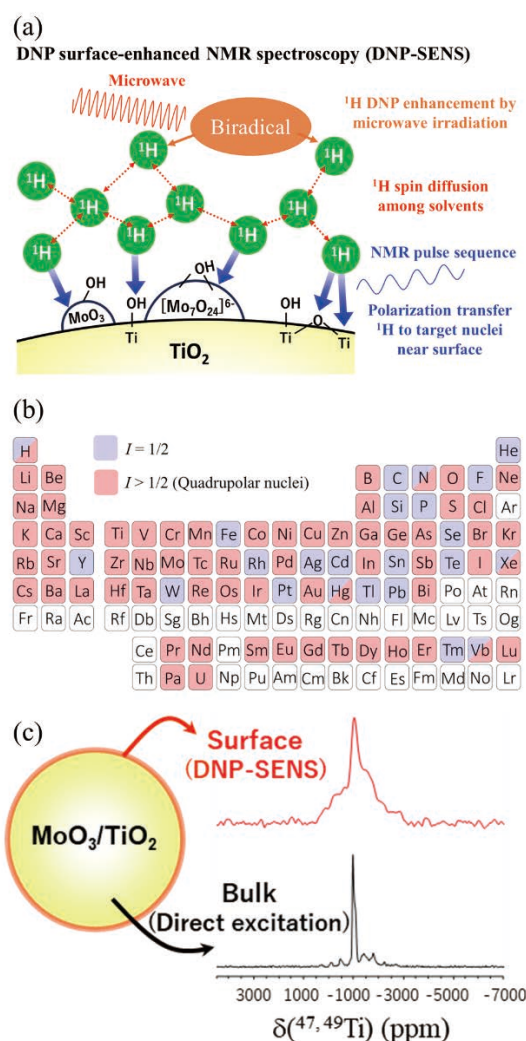


図1 (a) DNP-SENSの模式図、(b)周期表における四極子核、(c) $\text{MoO}_3/\text{TiO}_2$ の $^{47,49}\text{Ti}$ DNP-SENSスペクトル(上段)および直接励起による $^{47,49}\text{Ti}$ スペクトル(下段)

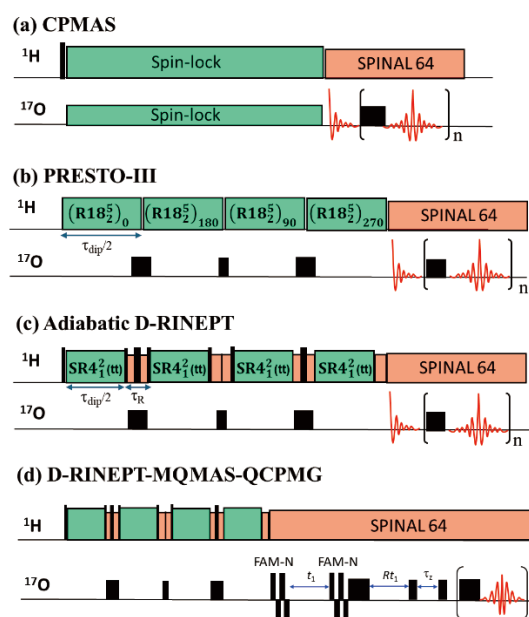


図2 パルスシーケンス模式図: (a) CPMAS、(b) PRESTO-III、(c) Adiabatic D-RINEPT、(d) D-RINEPT-MQMAS-QCPMG。

^{17}O 観測を達成した。PRESTOではCT選択的パルスと異種核 dipolar recouplingを組み合わせることで、汎用性の高い分極移動を可能とする。しかしながら、PRESTOではDNP-SENS測定条件下の低いMAS周波数において、recoupling中の ^1H - ^1H 双極子相互作用を十分に抑制できないため、分極移動時間 (τ_{dip}) が長くなる低周波数核や距離が遠い場合では効率が低下する。そのため、PRESTOの適用範囲は ^{27}Al や水酸基由来の ^{17}O など比較的有利な系に限定されていた。

4. 半整数四極子核への新しい分極移動法の開発

PRESTO 法の問題を解決するため、著者は分極移動における高効率な recoupling パルスを検討していった。その結果、 ^1H - ^1H 双極子相互作用を効果的に抑制できる Adiabatic dipolar recoupling を見出した。本手法は Simultaneous Frequency and Amplitude Modulation (SFAM)^[11] と Short High-power Adiabatic Pulse (SHAP)^[12] の概念に基づき、RF パルスの変調関数を Sin/Cos から Tanh/Tan へと変更し、さらに SR4 supercycle^[13] と組み合わせ、SR4₁² (tt) として最適化した。これにより、高いロバスト性 (RF 不均一性・オフセット・CSA) と、大きなスケールアップファクターを有し、PRESTO 法より短い分極移動時間を実現した。一方、平均ハミルトニアンは longitudinal two-spin order (2L₂_z) 型であるため、 ^1H 側に 90° および 180° パルスを挿入した D-RINEPT^[14] をとる必要がある。しかし、 90° および 180° パルスの挿入による遅延時間 τ_R において、 ^1H - ^1H 双極子相互作用による信号減衰が問題となった。解決策として τ_R 長さの 90° あるいは 180° コンポジットパルスとして置き換えることを考えつき、 ^1H - ^1H 双極子相互作用の影響による信号減衰を抑制した。シミュレーションおよび実験による最適化の結果、図 2c の Adiabatic D-RINEPT パルスシーケンスを構築した^[15, 16]。ここで、分極移動後の信号検出では、基本的に Quadrupolar Carr-Purcell Meiboom-Gill (QCPMG) 法^[17] を適用して感度を増強させる。本手法の最大の特長は、異種核間双極子相互作用が小さい場合でも、 ^1H から四極子核への高効率な分極移動を達成できる点にある。これにより低周波数四極子核の感度が大幅に向上し、PRESTO 法と比較して、 ^{27}Al 、 ^{17}O 、 ^{95}Mo に対してそれぞ

れ約 2 倍、4 倍、7 倍の向上を達成した。本手法は低周波数の半整数四極子核に特に有効であり、DNP-SENS による Al doped ZnO の ^{67}Zn 、複合酸化物 $\text{MoO}_3/\text{TiO}_2$ の ^{49}Ti 観測に成功している^[15]。また、分極移動時間の制御により化学状態の選択観測が可能である。特に ^{17}O では、短時間で双極子相互作用の強い水酸基が、長時間では非プロトン化酸素種が選択的に観測され、観測領域は表面およびサブ表面に限定される。

5. DNP-SENS における MQMAS 法の開発

Adiabatic D-RINEPTの開発により、半整数四極子核への高効率な分極移動が可能となったことで、分極移動後のコヒーレンスを利用した2次元NMR測定が容易となる。半整数四極子核では、二次の四極子相互作用により中心遷移が広がるため、一次元スペクトルでは化学サイトの重なりがしばしば問題となる。この問題に対して、Multiple Quantum (MQ) MAS法は、スペクトルの高分解能化に有効である。これまでDNPとMQMASの組み合わせは主にDirect DNPで検討されてきた。一方、DNP-SENSではCPMASを用いたMQMASが報告されているものの、上述したCPMASによる分極移動に問題があり、広く適用されていなかった。

著者はこの状況を踏まえ、Adiabatic D-RINEPTとMQMASを組み合わせたパルスシーケンスであるD-RINEPT-MQMAS-QCPMGを開発した(図 2d)^[18, 19]。本手法では、DNPで増強された ^1H 分極をD-RINEPTにより四極子核の1Qコヒーレンスへ移動させた後は、split- t_1 MQMAS-QCPMG法^[20]を採用した。3Q励起および1Q変換にはfast amplitude-modulated composite pulses (FAM-N)^[21]やcosine-modulated long-pulses (cos-lp)^[22]を採用した。特にcos-lpは大きな四極子相互作用に対しても高効率な励起を可能とする。ここで、3Q励起および1Q変換は同様のRFパルス条件を用いることが可能で、条件探索を簡素化できる。Split- t_1 展開の後、Z filterを経てQCPMGで信号検出する。ここで、Z filterの代わりにCT選択的 π パルス列を使うと位相回しの回数を削減できる^[23]。さらに位相回しの回数を削減するため、cogwheel phase cycle^[24]を部分的に適用した。MQMASの種類の選択は一般的に横緩和時間に依るが、DNPの低温条件ではQCPMGが有効になる場合が多い。加えて、分極移動前に四極子核へ

の飽和パルス^[25]の適用により、 t_1 ノイズ低減を行った。

6. 半整数四極子核に対する

DNP-SENS 適用例

6.1. γ - Al_2O_3

γ - Al_2O_3 は重要な触媒担体および固体触媒で、重要な解析対象である。 ^{27}Al は自然存在比100%かつ共鳴周波数も比較的高いため観測が容易である。一次元スペクトルでは主に4配位および6配位Alが観測されるが、DNP-SENSではこれらの中に5配位Alに由来する信号がわずかに現れる。しかし、ピークの広幅化により、一次元スペクトルのみでの明瞭な識別はできない。著者はD-RINEPT-MQMAS-QCPMGを適用し、分極移動時間を制御した ^{27}Al DNP-SENS MQMAS測定を行った(図3)。その結果、短い分極移動時間($\tau_{\text{dip}} = 0.4 \text{ ms}$)では最表面を反映したスペクトルとして5配位Alが明瞭に観測される一方、長い分極移動時間ではサブ表面寄与が支配的となり、5配位Alは観測されなかった^[18]。これは、5配位

Alが最表面特有の構造であることを示している。

金属氧化物では酸素の局所構造が機能に直結するため、 ^{17}O NMRは極めて重要であるが、自然存在比($NA = 0.038\%$)の低さと低周波数のため従来は測定が困難であった。一方、四極子モーメントは小さく、スペクトルは広い化学シフト範囲に分散するため、化学構造を識別しやすい。 γ - Al_2O_3 ではDNP-SENSにより、自然存在比のままでも ^{17}O スペクトルの取得が可能である(図4a)^[15]。分極移動時間を短くすると、 ^1H と強く相互作用する水酸基の ^{17}O が選択的に観測される。一方、長時間では水酸基信号が横緩和により減衰し、非プロトン化酸素サイトが選択的に観測される。この条件では主に3配位および4配位酸素が検出された。さらに、 ^{17}O 同位体ラベルを併用することで測定効率は大幅に向上し、1次元スペクトルは数分で取得可能となる。加えてMQMAS測定により、4配位酸素の中にも複数の化学環境が存在することが明らかとなった^[19]。

6.2. ZnOナノ結晶

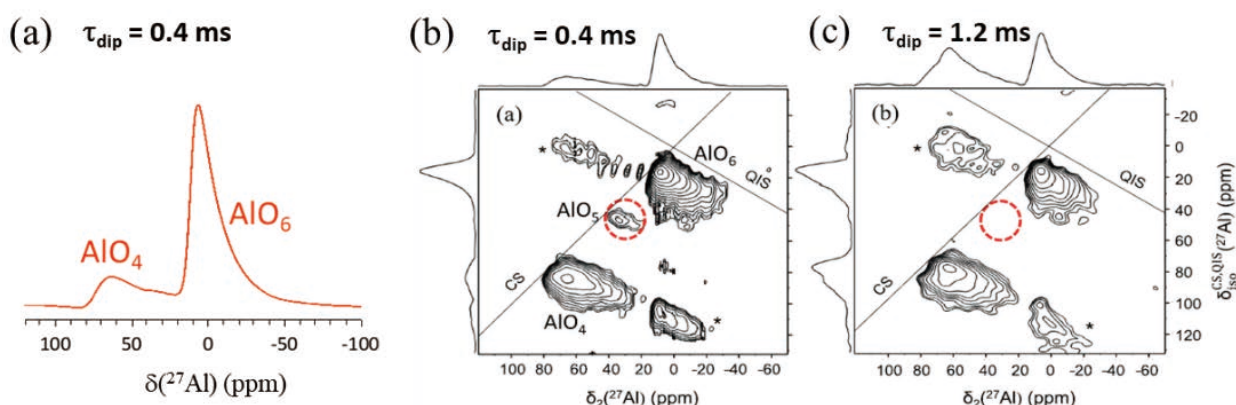


図3 γ - Al_2O_3 : (a) ^{27}Al DNP-SENS スペクトル、(b, c) $\tau_{\text{dip}} = 0.4$ 、 1.2 ms における ^{27}Al DNP-SENS MQMAS スペクトル。

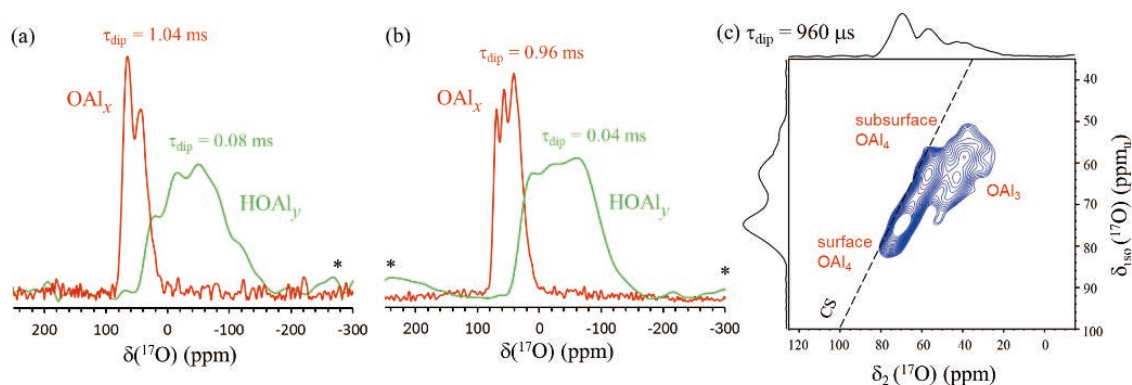


図4 γ - Al_2O_3 : (a) 自然存在比条件における ^{17}O DNP-SENS スペクトル、(b) 水熱処理による ^{17}O 同位体ラベル試料の ^{17}O DNP-SENS スペクトル、(c) 同試料に対する ^{17}O DNP-SENS MQMAS スペクトル。

ZnOは光触媒やメタノール合成触媒だけでなく様々な材料分野に広く用いられ、ドーピングや複合化により機能が大きく変化する。したがって、表面酸素サイトを原子レベルで理解することが重要である。本研究では、 ^{17}O を合成時に約20%まで同位体ラベルしたZnOナノ結晶に対し、 ^{17}O の直接励起およびDNP-SENS測定を行った(図5a)。直接励起の ^{17}O スペクトルでは、高対称性を有するバルク由来の4配位酸素が鋭いピークとして観測された。一方、DNP-SENSでは分極移動時間の制御により表面近傍の情報を選択的に取得できる。短時間では ^1H と強く相互作用する水酸基が、時間の延長とともに最表面およびサブ表面の酸素サイトが順次強調される。得られた表面スペクトルでは、高周波数側に酸素欠損に由来すると考えられる広い信号が観測される。また、0 ppmあたりに複数の成分があるのわかるが、一次元ではそれらが重なっており識別が困難である。そこで、分極移動時間を変化させて ^{17}O DNP-SENS MQMAS測定を行った(図5b-d)^[18]。その結果、複数の酸素サイトが明瞭に分離され、第一原理計算を組み合わせることで構造を特定した。特に、従来単一種のスペクトルとみなしていた水酸基の信号が、典型的OH種と水素近接3配位酸素

の2種に分かれた。また、4配位酸素についても最表面とサブ表面で異なるサイトが存在することが確認された。

6.3. BN-B₂O₃/DFNS

D-RINEPT-MQMAS-QCPMGパルスシーケンスは、 ^{27}Al や ^{17}O に限らず、他の半整数四極子核に適用できる。 ^{11}B は触媒材料において重要な核種の一つであり、本手法の有用性を示す例としてBN-B₂O₃/DFNS (Dendric Fibrous Nano Silica)を測定した^[18]。本触媒はプロパン酸化脱水素反応に高い活性を示し、BN₃、BO₃、BO₄など複数のホウ素種が共存する。Direct DNPによる一次元 ^{11}B スペクトルではこれらの信号が重なり、特にBN₃が強く観測される(図6a)。一方、DNP-SENSでは、BO₃およびBO₄が主成分として現れ、BN₃は観測されない。これは、BN₃がバルク側に位置し、表面がBO₃およびBO₄で覆われていることを示唆する。さらに ^{11}B MQMAS測定により、BN₃、BN₂O、BO₃、BO₄の各サイトを明瞭に分離できる(図6b-d)。加えて、DNP-SENSにおいて分極移動時間を制御し、短時間では水酸基結合種(BO₂OH、B(OSi)_x(OB)_{3-x}OHなど)が、長時間では非プロトン化サイトのBO₃およびBO₄

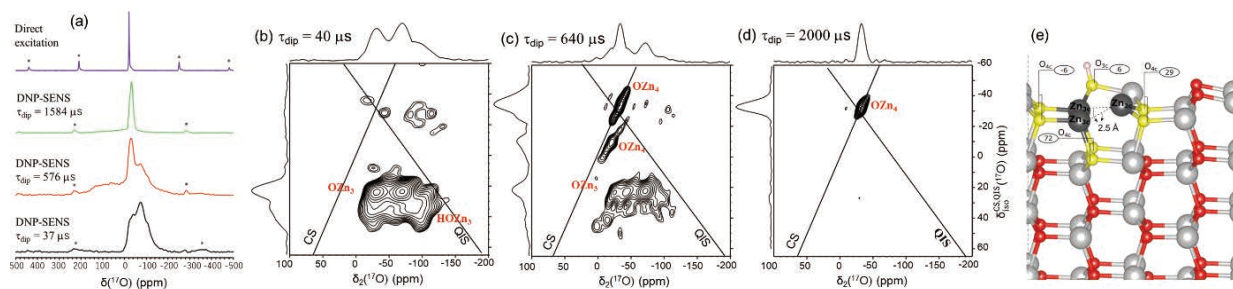


図5 ^{17}O enriched ZnOナノ結晶：(a) ^{17}O DNP-SENS スペクトルおよび直接励起による ^{17}O NMR スペクトル、(b-d) $\tau_{\text{dip}} = 40, 640, 2000 \mu\text{s}$ における ^{17}O DNP-SENS MQMAS スペクトル、(e) スペクトルの同定に用いたモデル構造の一例。

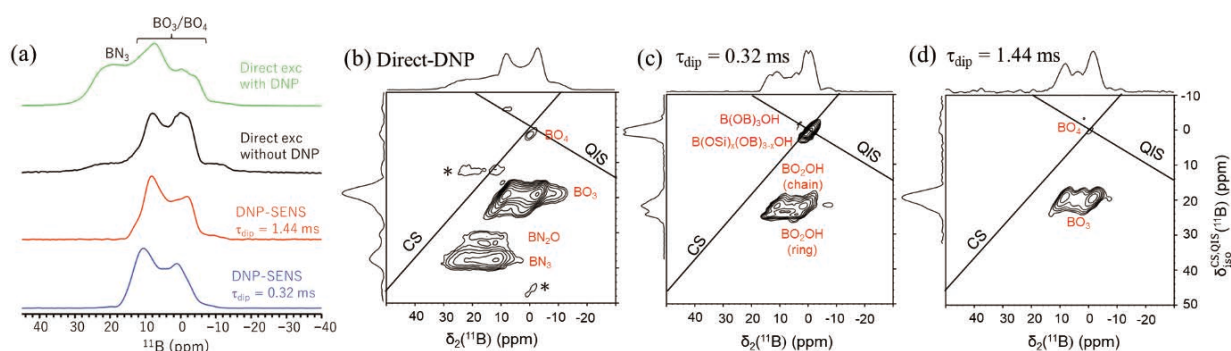


図6 BN-B₂O₃/DFNS：(a) ^{11}B DNP-SENS スペクトルおよび直接励起 ^{17}O NMR スペクトル (DNP あり/なし)、(b) ^{17}O Direct-DNP MQMAS スペクトル、(c, d) $\tau_{\text{dip}} = 320, 1440 \mu\text{s}$ における ^{17}O DNP-SENS MQMAS スペクトル。

が優先的に観測された。このような深さ・化学種選択性は本手法の重要な特長である。

6.4. ZnS nanoplatelet

ZnSはCdSe量子ドットのCdフリー代替品や光触媒としてよく検討されている。ここで硫黄空孔などの欠陥はZnSの光学特性と光触媒性能に大きく影響することが知られている。原子レベルでの局所構造解析として、固体NMRは有望なアプローチの一つである。しかしながら、 ^{67}Zn と ^{33}S のNMR観測は、低い共鳴周波数と低い自然存在比に加えて、大きな四極子相互作用などの不利なNMR特性により困難であった。最近、筆者が開発したD-RINEPT分極移動を使用したDNP-SENSによって、ZnS nanoplateletの表面近くの ^{67}Zn と ^{33}S のNMRスペクトルの検出に成功した(図7a, b)^[26]。これらのZnS nanoplateletの表面近傍の ^{67}Zn および ^{33}S は、それぞれ6.7 MHzおよび5.0 MHzの C_Q 値を示し、微結晶ZnSのバルク

領域の C_Q 値を大幅に上回っている。 ^{33}S スペクトルの幅(約190 kHz)は、中心遷移選択パルスの励起帯域幅を超えるため、variable-offset cumulative spectroscopy (VOCS)^[27]のアプローチを取り、周波数を分割して信号取得した。DNP-SENSおよび35Tで取得した ^{33}S と ^{67}Zn のスペクトルから得られたNMRパラメータを、硫黄空孔の有無および異なる厚さを有する構造モデルについて第一原理計算により求めたNMRパラメータと比較した。その結果、硫黄空孔を含む厚さ1 nmの構造モデルとの一致が最も良好であったことから、硫黄空孔を含む厚さ1 nmのZnS nanoplateletの構造モデルを提案した(図7c)。

6.5. L-histidine

上述してきたDNP-SENSは無機材料表面だけでなく、有機物中の半整数四極子核の観測にも応用できる。L-histidine微結晶試料の ^{17}O (自然存在比条件)および ^{35}Cl について同様に測定可能か

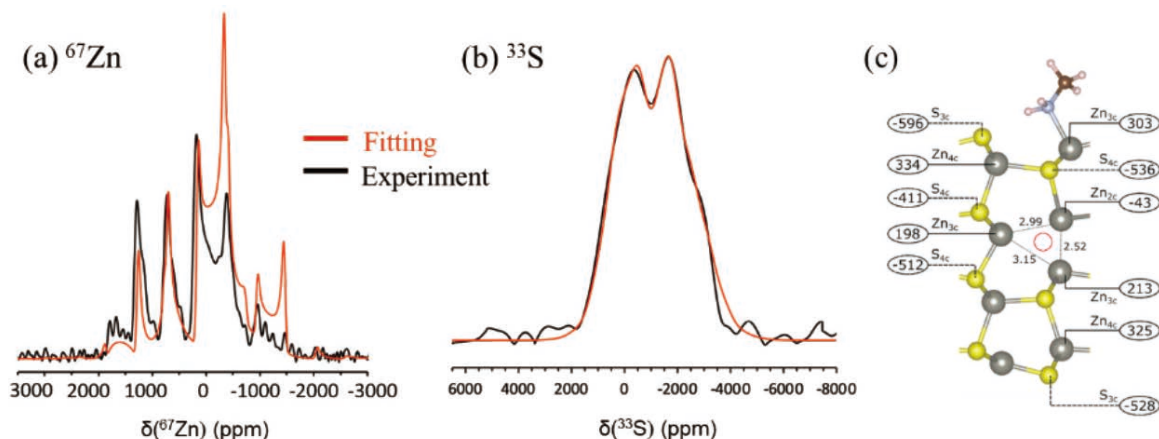


図7 ZnS nanoplatelet : (a) ^{67}Zn DNP-SENSスペクトル、(b) ^{33}S DNP-SENSスペクトル、(c) 硫黄欠損を含むZnS nanoplateletの構造モデル。

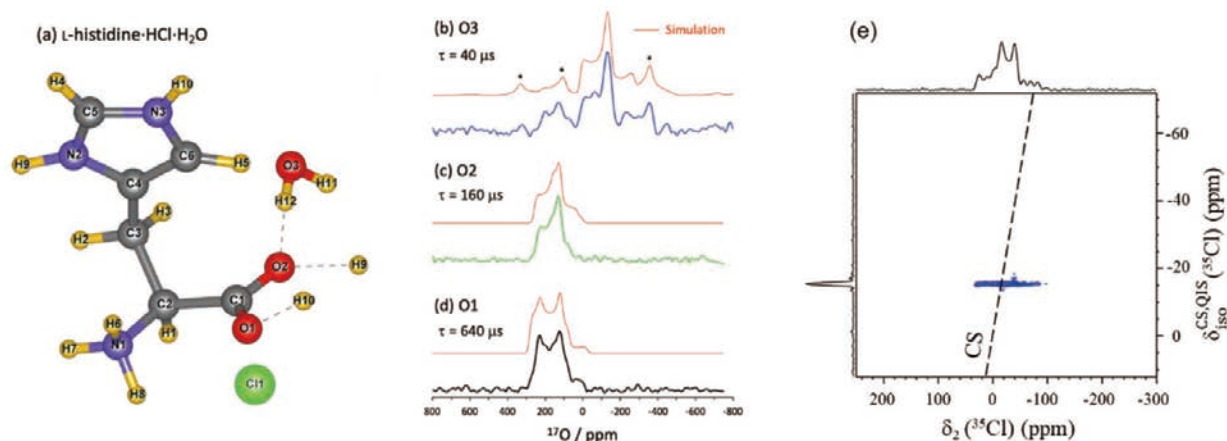


図8 L-histidine.HCl.H₂O : (a) L-histidine・HCl・H₂Oの構造、(b-d) $\tau_{\text{dip}} = 40, 160, 640 \mu\text{s}$ における自然存在比条件での ^{17}O DNP-SENSスペクトル、(e) D-RINEPT-MQMAS-QCPMG (cos lpパルス使用)により取得した ^{35}Cl MQMASスペクトル。

試みた^[16]。水分子の¹⁷O核は、中性子回折構造に基づき、酸素原子から3Å以内に存在するプロトンのみを考慮した場合、有効な双極子相互作用定数25.3kHzを受けている。この大きな¹H-¹⁷O双極子相互作用により、¹Hの分極は40 μsという短い分極移動時間で水分子中の¹⁷O核へと効率的に移動する(図8b)。一方、より長い分極移動時間では、水に由来する¹⁷O信号は消失する。 $\tau_{\text{dip}} = 160$ および640 μsとした場合には、COO-基に由来する¹⁷O信号の検出が可能であった(図8c, d)。O2サイトにおいて最適な分極移動時間がO1よりも短いことは、有効双極子相互作用がより大きいことと整合しており、3Å以内のプロトンを考慮した場合、O2では5.2kHz、O1では2.7kHzである。今後、¹⁷O同位体ラベルと併用して、より複雑な系の¹⁷O MQMAS測定が期待される。塩素イオンについては、D-RINEPT-MQMAS-QCPMG (coslpパルス使用)による³⁵Cl MQMAS測定(DNPなし)が高効率で達成できることを確認した(図8e)^[19]。

7. おわりに

DNP-SENSが2010年に報告されて以来、物質・材料分野における固体DNP-NMR解析の適用範囲は概ね整理されてきた。その中で、DNP-SENSは表面の化学構造情報をNMR解析できるユニークな手法として確立されつつあり、本手法により、様々な酸化物表面の化学構造情報の取得が期待される。現在、¹⁷O同位体ラベルを組み合わせた¹⁷O-¹⁷O同種核間相関や異種核間相関などの二次元相関測定法の開発を進めており、表面における局所的なネットワーク構造をNMRにより解析することを目指している。無機材料表面においてもサイト間の近接性・結合性に関する情報は他の分析手法では取得が困難であり、NMRの特長が特に有効に発揮されと考えられる。今後、様々な複合酸化物の固体触媒へと展開され、ナノ粒子に加えてゼオライトなどの多孔質材料やセメント・コンクリートといった社会的に重要な材料へ広く応用されることで、固体表面の化学構造に対する本質的理解が進むことが期待される。

謝 辞

本研究は、博士課程のSupervisorであるLille大学のOlivier Lafon教授、Jean-Paul Amoureux教授、Julien Trebosc博士、産総研の今喜裕博

士をはじめとする共同研究者皆さまとの成果です。ここに深く感謝申し上げます。また、修士課程においてNMRのご指導を賜った東京大学の瀧川仁名誉教授に深く感謝申し上げます。本研究は、科研費若手研究(JP20K15319)、JSTさきがけ(JPMJPR2276)の支援を受けたものです。

引用文献

- [1] A. Lesage, M. Lelli, D. Gajan, M.A. Caporini, V. Vitzthum, P. Miéville, J. Alauzun, A. Roussey, C. Thieuleux, A. Mehdi, G. Bodenhausen, C. Coperet, L. Emsley, Surface Enhanced NMR Spectroscopy by Dynamic Nuclear Polarization, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15459–15461 (2010).
- [2] H. Nagashima, J. Trébosc, O. Lafon, J.-P. Amoureux, DNP-enhanced NMR of half-integer quadrupolar nuclei in solids, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **152–153**, 101585 (2026).
- [3] O. Lafon, M. Rosay, F. Aussenac, X. Lu, J. Trébosc, O. Cristini, C. Kinowski, N. Touati, H. Vezin, J.-P. Amoureux, Beyond the Silica Surface by Direct Silicon-29 Dynamic Nuclear Polarization, *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 8367–8370 (2011).
- [4] A. Zagdoun, G. Casano, O. Ouari, M. Schwarzwälder, A.J. Rossini, F. Aussenac, M. Yulikov, G. Jeschke, C. Copéret, A. Lesage, P. Tordo, L. Emsley, Large Molecular Weight Nitroxide Biradicals Providing Efficient Dynamic Nuclear Polarization at Temperatures up to 200 K, *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12790–12797 (2013).
- [5] C. Sauvé, M. Rosay, G. Casano, F. Aussenac, R.T. Weber, O. Ouari, P. Tordo, Highly Efficient, Water-Soluble Polarizing Agents for Dynamic Nuclear Polarization at High Frequency, *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 10858–10861 (2013).
- [6] A. Zagdoun, G. Casano, O. Ouari, G. Lapadula, A.J. Rossini, M. Lelli, M. Baffert, D. Gajan, L. Veyre, W.E. Maas, M. Rosay, R.T. Weber, C. Thieuleux, C. Coperet, A. Lesage, P. Tordo, L. Emsley, A Slowly Relaxing Rigid Biradical for Efficient Dynamic Nuclear Polarization Surface-Enhanced NMR Spectroscopy: Expeditionary Characterization of Functional Group Manipulation in Hybrid Materials, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 2284–2291 (2012).
- [7] B. Li, R. Simancas, H. Nagashima, K. Iyoki, S.P. Elangovan, A. Chokkalingam, T. Yamagishi, S. Inagaki, T. Okubo, T. Wakiyama, Liquid-mediated treatment for silanol defects healing and Sn coordination optimization in Sn-beta for improved catalytic activity, *ChemCatChem* **17** (2025).
- [8] Y. Ishizaka, N. Arai, K. Matsumoto, H. Nagashima, K. Takeuchi, N. Fukaya, H. Yasuda, K. Sato, J. Choi, Bidentate Disilicate Framework for Bis-Grafted Surface Species, *Chem. Eur. J.* **27**, 12069–12077 (2021).
- [9] X. Zhao, W. Hoffbauer, J. Schmedt auf der Günne, M.H. Levitt, Heteronuclear polarization transfer by symmetry-based recoupling sequences in solid-state NMR, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **26**, 57–64 (2004).
- [10] F.A. Perras, T. Kobayashi, M. Pruski, Natural Abundance ¹⁷O DNP Two-Dimensional and

- Surface-Enhanced NMR Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 8336–8339 (2015).
- [11] R. Fu, S.A. Smith, G. Bodenhausen, Recoupling of heteronuclear dipolar interactions in solid state magic-angle spinning NMR by simultaneous frequency and amplitude modulation, *Chem. Phys. Lett.* **272**, 361–369 (1997).
- [12] G. Kervin, G. Pintacuda, L. Emsley, Fast adiabatic pulses for solid-state NMR of paramagnetic systems, *Chem. Phys. Lett.* **435**, 157–162 (2007).
- [13] A. Brinkmann, A.P.M. Kentgens, Proton-Selective ^{17}O – H Distance Measurements in Fast Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR Spectroscopy for the Determination of Hydrogen Bond Lengths, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14758–14759 (2006).
- [14] J. Trébosc, B. Hu, J.P. Amoureux, Z. Gan, Through-space R3-HETCOR experiments between spin-1/2 and half-integer quadrupolar nuclei in solid-state NMR, *J. Magn. Reson.* **186**, 220–227 (2007).
- [15] H. Nagashima, J. Trébosc, Y. Kon, K. Sato, O. Lafon, J.-P. Amoureux, Observation of Low- γ Quadrupolar Nuclei by Surface-Enhanced NMR Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 10659–10672 (2020).
- [16] H. Nagashima, J. Trébosc, Y. Kon, O. Lafon, J.-P. Amoureux, Efficient transfer of DNP-enhanced ^1H magnetization to half-integer quadrupolar nuclei in solids at moderate spinning rate, *Magn. Reson. Chem.* **59**, 920–939 (2021).
- [17] F.H. Larsen, H.J. Jakobsen, P.D. Ellis, N.C. Nielsen, Sensitivity-Enhanced Quadrupolar-Echo NMR of Half-Integer Quadrupolar Nuclei. Magnitudes and Relative Orientation of Chemical Shielding and Quadrupolar Coupling Tensors, *J. Phys. Chem. A* **101**, 8597–8606 (1997).
- [18] H. Nagashima, F. Maleki, J. Trébosc, R. Belgamwar, V. Polshettiwar, M. Kahn, Y. Kon, G. Pacchioni, O. Lafon, J.-P. Amoureux, Probing the Surface of Oxide Nanoparticles Using DNP-Enhanced High-Resolution NMR of Quadrupolar Nuclei, *J. Phys. Chem. Lett.* **15**, 4858–4863 (2024).
- [19] H. Nagashima, J. Trébosc, O. Lafon, J.-P. Amoureux, MQMAS spectra of half-integer quadrupolar nuclei enhanced by indirect DNP, *J. Magn. Reson. Open* **21**, 100177 (2024).
- [20] T. Vosegaard, F.H. Larsen, H.J. Jakobsen, P.D. Ellis, N.C. Nielsen, Sensitivity-Enhanced Multiple-Quantum MAS NMR of Half-Integer Quadrupolar Nuclei, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 9055–9056 (1997).
- [21] H. Colaux, D.M. Dawson, S.E. Ashbrook, Efficient Amplitude-Modulated Pulses for Triple- to Single-Quantum Coherence Conversion in MQMAS NMR, *J. Phys. Chem. A* **118**, 6018–6025 (2014).
- [22] I. Hung, Z. Gan, Isotropic solid-state MQMAS NMR spectra for large quadrupolar interactions using satellite-transition selective inversion pulses and low rf fields, *J. Magn. Reson.* **324**, 106913 (2021).
- [23] F.H. Larsen, I. Farnan, Site Populations and Short Range Order in Aluminosilicates Investigated by ^{27}Al Solid-State NMR, *J. Phys. Chem. B* **108**, 9764–9771 (2004).
- [24] M.H. Levitt, P.K. Madhu, C.E. Hughes, Cogwheel Phase Cycling, *J. Magn. Reson.* **155**, 300–306 (2002).
- [25] E. Nimerovsky, R. Gupta, J. Yehl, M. Li, T. Polenova, A. Goldbourt, Phase-modulated LA-REDOR: a robust, accurate and efficient solid-state NMR technique for distance measurements between a spin-1/2 and a quadrupole spin, *J. Magn. Reson.* **244**, 107–113 (2014).
- [26] E. Bellan, F. Maleki, M. Jakoobi, P. Fau, K. Fajerwerg, D. Lagarde, A. Balocchi, P. Lecante, J. Trébosc, Y. Xu, Z. Gan, L. Pautrot-d'Alençon, T. Le Mercier, H. Nagashima, G. Pacchioni, O. Lafon, Y. Coppel, M.L. Kahn, Ultra-High-Field ^{67}Zn and ^{33}S NMR Studies Coupled with DFT Calculations Reveal the Structure of ZnS Nanoplatelets Prepared by an Organometallic Approach, *J. Phys. Chem. C* **127**, 17809–17819 (2023).
- [27] D. Massiot, I. Farnan, N. Gautier, D. Trumeau, A. Trokner, J.P. Coutures, ^{71}Ga and ^{69}Ga nuclear magnetic resonance study of β -Ga $_2\text{O}_3$: resolution of four- and six-fold coordinated Ga sites in static conditions, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **4**, 241–248 (1995).



永島 裕樹 (ながしま・ひろき)

2007年 東邦大学 理学部 物理学科 卒業

2009年 東京大学 新領域創成科学研究科 物質系専攻 修士課程 修了

2009年–2014年 株式会社ブリヂストン

2017年 リール大学 触媒・固体化学研究所 Ph.D. 取得

2018年–2022年 産業技術総合研究所 研究員

2022年– 産業技術総合研究所 主任研究員

NMRで探るタンパク質の柔構造と分子集合のダイナミクス —アミロイド研究を通して—

名古屋市立大学大学院薬学研究科、自然科学研究機構生命創成探究センター

矢木 真穂

mahoyagi@phar.nagoya-cu.ac.jp

1. はじめに

タンパク質はしばしば立体構造によって理解される。しかし、生体内で機能するタンパク質の多くは、単一の静的構造として存在しているわけではない。分子は常に揺らぎながら周囲の環境と相互作用し、複数の状態を行き来することで機能を発揮している^[1]。近年、天然変性タンパク質、液—液相分離、生体超分子複合体などの研究が進展し、生命現象を理解するうえで構造だけでなく、状態や状態間の遷移を捉えることの重要性が高まっている。

NMR分光法は、分子の構造、ダイナミクス、状態間平衡、分子間相互作用を多面的に解析できる手法である^[2~4]。特に安定同位体標識技術と組み合わせることで、不均一な分子集合体の中から特定の分子や領域に着目した解析が可能となる。筆者はこれまで、プロテインジスルフィドイソメラーゼやポリユビキチン鎖などのマルチドメインタンパク質を対象として、ドメイン間の配置や揺らぎ、分子認識に伴う構造分布の変化をNMRにより解析してきた^[5~9]。これらの研究は、タンパク質を単一の静的構造としてではなく、複数の状態を行き来する柔らかな分子システムとして捉える視点につながっている。

本稿では、そのような視点をアミロイド形成研究へと展開した例として、アミロイド β ($A\beta$)を対象として、GM1ガングリオシド膜上における構造変換と分子集合の過程を紹介する。筆者はこれまで、この過程を溶液NMRおよび固体NMRを用いて解析し、さらに近年は、MDシミュレーション、高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM)、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM)、微小重力実験などとの融合により、分子集合体形成の原理に迫ろうとしている。

2. $A\beta$ との出会い

—GM1 ガングリオシド仮説を起点として—

筆者が $A\beta$ 研究に取り組む契機となったのは、名古屋市立大学・加藤晃一博士の研究室において、アルツハイマー病の発症機構に関する研究に触れたことであった。アルツハイマー病患者の脳内では $A\beta$ がアミロイド線維として沈着することが知られている^[10~12] が、生理条件下で低濃度に存在する $A\beta$ が、どのような過程を経て凝集を開始するのかは長らく大きな課題であった。

この問題に対して、柳澤勝彦博士らはGM1ガングリオシドに結合した $A\beta$ がアミロイド形成の核となる可能性を提唱した^[13]。GM1は神経細胞膜に豊富に存在する糖脂質であり、膜上でクラスターを形成する。 $A\beta$ がこのGM1クラスターと相互作用することで、構造変化を起こし、線維形成へと向かうという考え方である^[14~16]。この仮説は、 $A\beta$ の凝集を溶液中の自己会合として捉えるだけでなく、膜界面における分子認識と構造変換の問題として考えるきっかけとなった。

しかし、 $A\beta$ とGM1膜との相互作用は、弱く、動的で、不均一である。さらに、 $A\beta$ は膜環境に応じて容易に構造や会合状態を変化させるため、結晶構造解析などの静的な構造解析手法だけでその実体を捉えることは難しい。そこで筆者は、 $A\beta$ がGM1クラスターとどのように出会い、膜界面でどのような構造をとり、分子集合へと至るのかを、NMRを用いて段階的に明らかにすることを目指した。

3. 溶液 NMR で追う $A\beta$ の状態変換

$A\beta$ は水溶液中では特定の安定な立体構造を持たない天然変性ペプチドとして存在する。一方、GM1ガングリオシドを含む膜環境では構造変化を起こし、分子集合へと向かう。筆者はこの過程を捉えるため、GM1の糖鎖部分、GM1のセラミド部分から脂肪酸鎖を除いた lyso-GM1 が形成するミセル、GM1ミセル、GM1含有脂質膜など、サイズや曲率の異なる膜モデルを用いて解析を進

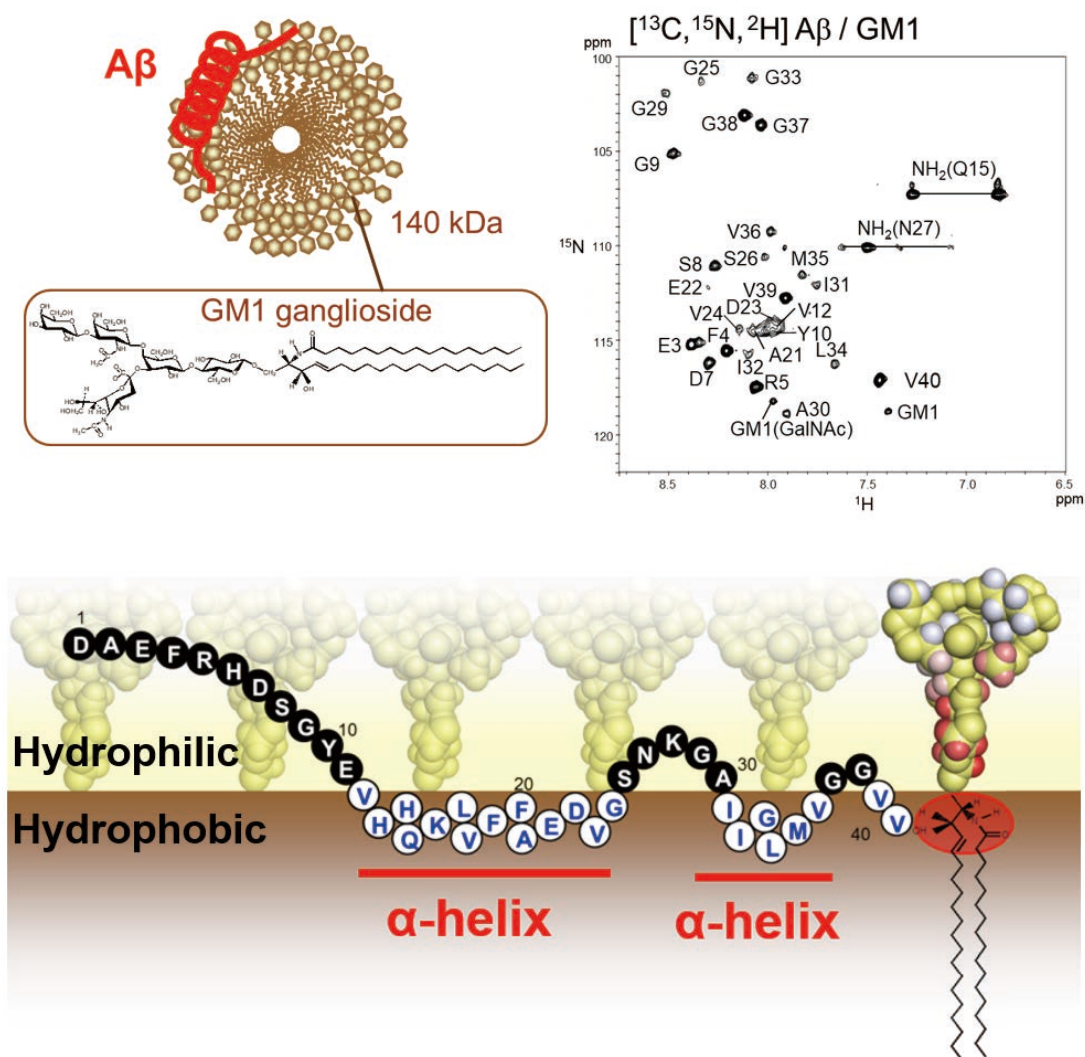


図1 GM1クラスター界面に結合したAβのNMR構造解析

Lyso-GM1およびGM1ミセルを用いた溶液NMR解析により、AβはGM1糖鎖と脂質鎖の境界に形成される親水性／疎水性界面に沿って結合し、中央領域およびC末端領域に α ヘリックス性構造を形成することが示された。

めた。

初期の溶液NMR解析では、GM1あるいはlyso-GM1ミセルに結合したAβの構造を調べた。その結果、AβはGM1の糖鎖部分に単純に結合するのではなく、糖鎖と脂質鎖の境界に形成される親水性／疎水性界面に沿って配置されることが示された(図1)^[17, 18]。特に、Aβの中央領域およびC末端領域は α ヘリックス性構造を形成し、疎水性側に埋没する一方で、N末端領域は比較的柔軟な状態を保っていた。このことから、AβはGM1クラスター上で膜界面に沿って配向しながら、結合に伴って構造形成することが明らかとなった。

この結合様式は、その後の分子集合を考えるうえで重要である。Aβが膜界面上で特定の配向をとることにより、分子同士の相対配置が制限され、Aβ間相互作用が促進されと考えられる。

実際、GM1ミセル上ではAβ同士の相互作用が促進されることが示され、GM1クラスターがAβの構造変換と分子集合を誘導する場として働くことが示唆された^[19]。

一方で、GM1ミセルやベシクルを用いた系では、膜面に安定化された状態や集合が進行した状態を観測しやすい反面、結合初期の過渡的な状態を捉えることは容易ではなかった。そこで、藤田 誠博士のグループとの共同研究により、GM1糖鎖を球面上に高密度かつ多価に提示し、天然膜上のGM1クラスターを模倣した自己組織化球状錯体を構築した(図2)。この人工糖鎖クラスターを用いて、AβがGM1クラスターに最初に接近した際に形成する初期遭遇複合体(encounter complex)の捕捉を試みた。この系では、AβがN末端領域を介してGM1糖鎖クラスターと相互作用することが示され、糖鎖部分がAβの膜面への

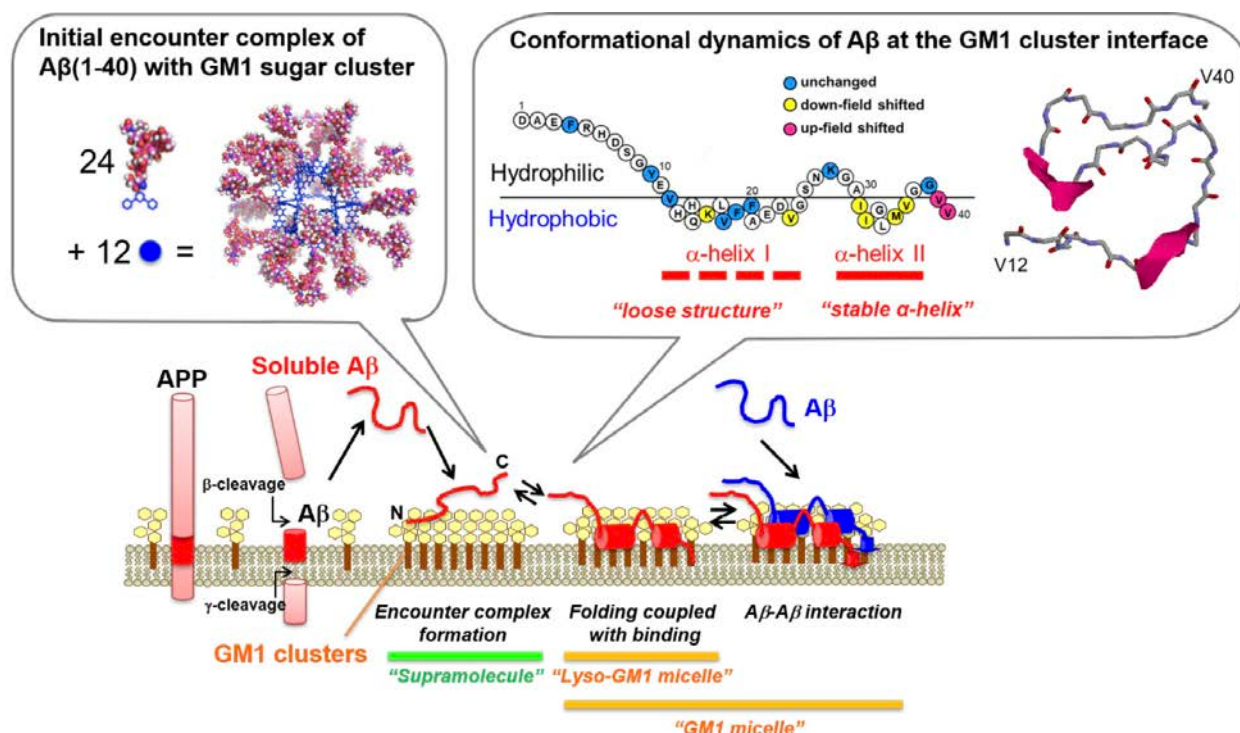


図2 GM1膜上におけるAβの多段階的な構造変換モデル

AβはGM1糖鎖クラスターとの初期遭遇複合体形成、膜界面への結合に伴う構造形成、Aβ間相互作用を経て、分子集合へと進行する。超分子錯体を用いた糖鎖クラスター解析およびMDシミュレーションにより、各段階におけるAβの相互作用様式と構造揺らぎが明らかになった。

初期ランディングに関与することが明らかとなった^[20]。

家族性変異を有するAβの解析からも、膜界面での構造変換の重要性が見えてきた。例えばFlemish型変異A21Gは、Aβ中央領域の1残基置換であるが、GM1膜上でのαヘリックス形成や集合挙動に影響を与える^[21]。この結果は、Aβの凝集性が疎水性や電荷といった平均的な物性だけでなく、膜界面上での局所構造形成や配向性に強く依存することを示している。

さらに、奥村久士博士・伊藤 暁博士との共同研究においてMDシミュレーションを組み合わせることで、NMRで得られた構造情報はより動的な描像として理解されるようになった。MDシミュレーションは、Aβが親水性／疎水性界面に置かれたとき、バルク水中とは異なる構造分布をとり、β構造形成につながる分子内・分子間相互作用が促進されやすいことを示した^[22]。また、凝集に関わる鍵残基の同定や、変異が構造分布に与える影響の理解にも有用であった^[23]。これらの研究により、AβのGM1膜上での構造変換は、糖鎖との初期接触、膜界面への結合、αヘリックス形成、分子間相互作用の促進という多段階過程として理解されるようになった(図2)。

4. 固体 NMR で捉えた分子集合体

溶液NMR解析により、AβがGM1クラスター上でαヘリックス性構造を形成し、膜界面に沿って配向することが明らかとなった。しかし、アミロイド形成の本質に迫るためには、その先に生じるβ構造への転移と分子集合体形成を捉える必要があった。集合が進行したAβは巨大で不均一な膜結合性集合体となるため、溶液NMRによる解析は困難になる。そこで筆者は、西村勝之博士との共同研究により、GM1を含む脂質膜上で形成されるAβ集合体の構造解析に固体NMRを適用した^[24, 25]。

GM1/DMPCベシクルを用いた解析では、AβがGM1ミセル上で示したαヘリックス性構造とは異なり、β構造を含む集合体へと転移することが示された^[25]。すなわち、AβはGM1という同じ分子と相互作用していても、膜モデルのサイズや曲率、GM1の局所密度、Aβの分子密度に応じて異なる構造状態をとる。このことは、Aβの集合過程が膜環境に強く依存することを示している。

固体NMR解析では、均一同位体標識Aβを用いて二次元相関スペクトルを取得し、GM1/DMPC膜上に形成されたAβ集合体のシグナル帰

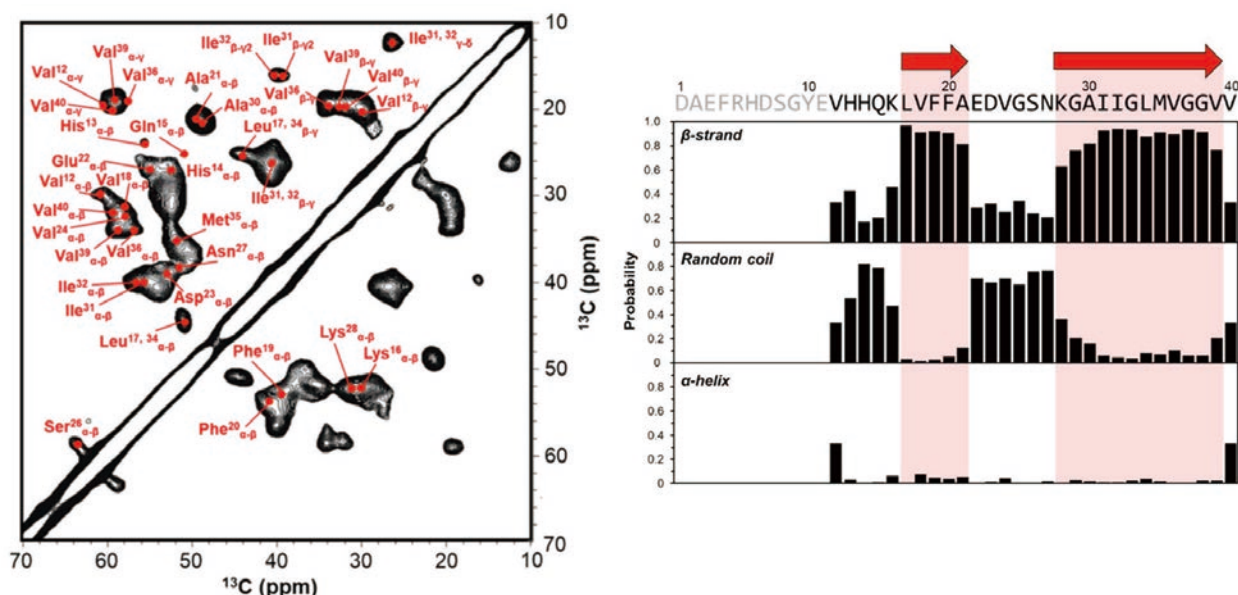


図3 GM1/DMPC膜上で形成されるAβ集合体の固体NMR解析

GM1/DMPCベシクル上で形成されたAβ集合体について、固体NMRによるシグナル帰属と二次構造解析を行った。二次元相関スペクトルの解析により、Aβの中央領域およびC末端側領域がβストランド構造を形成することが示された。文献25よりCC BY-NC-ND 4.0ライセンスの下で転載。

属を行った。その結果、Aβは中央領域とC末端側領域にβストランド構造を形成していることが示された(図3)^[25]。さらに、DARR測定により分子内および分子間の距離情報を取得し、スピラベル体を用いた常磁性緩和効果の解析と組み合わせることで、集合体中の分子間配置に関する制約を得た。

これらの情報を統合することで、GM1/DMPC膜上で形成されるAβ集合体は、典型的な成熟アミロイド線維とは異なる構造を持つことが明らかとなった。特に、βストランド同士の配置は、成熟線維にしばしば見られる平行βシートとは異なり、逆平行性を含む特徴的な集合様式を示した。また、膜内に導入した常磁性プローブを用いることで、集合体中のβ構造領域の膜界面に対する配向も評価することができた。これらの結果は、GM1膜上に形成されるAβ集合体が、線維形成途中の無秩序な中間体ではなく、膜環境によって安定化された特異な分子集合体であることを示している。

興味深いことに、このGM1膜上Aβ集合体は、それ自身が直ちに典型的なアミロイド線維へと変換されるわけではなかった。しかし、この集合体をシードとして添加すると、遊離Aβの線維形成が促進された。すなわち、GM1膜上で形成されるAβ集合体は、成熟線維そのものではなく、周

囲のAβ分子の線維形成を触媒的に促進する構造体として機能すると考えられる。この結果は、GM1膜上に形成された特異なβ構造型集合体が、アミロイド形成を促進する触媒場として働くというモデルを支持するものである(図4)。

これらの結果を合わせると、溶液NMRで観測されたGM1膜上での初期結合状態と、固体NMRで明らかとなったβ構造型集合体は、連続した状態変換過程として位置づけられる。AβはGM1糖鎖クラスターと遭遇し、膜界面でαヘリックス性構造を形成した後、分子密度や膜環境に応じてβ構造型集合体へと転移する。そして、この集合体が周囲のAβ分子の線維形成を促進する。このような中間状態を原子レベルで捉えられる点に、溶液NMRと固体NMRを組み合わせる意義がある。

5. NMRを核とした融合研究

—アミロイド線維形成過程を多面的に捉える—

溶液NMRおよび固体NMRにより、AβがGM1膜上で経験する構造変換と分子集合の過程を段階的に捉えることができた。一方で、アミロイド形成は、膜上中間体、成熟線維、線維伸長過程、さらには形成環境に依存した構造多形性を含む多階層的な現象である。その全体像を理解するため、筆者はNMRを基軸としつつ、Cryo-EM、HS-

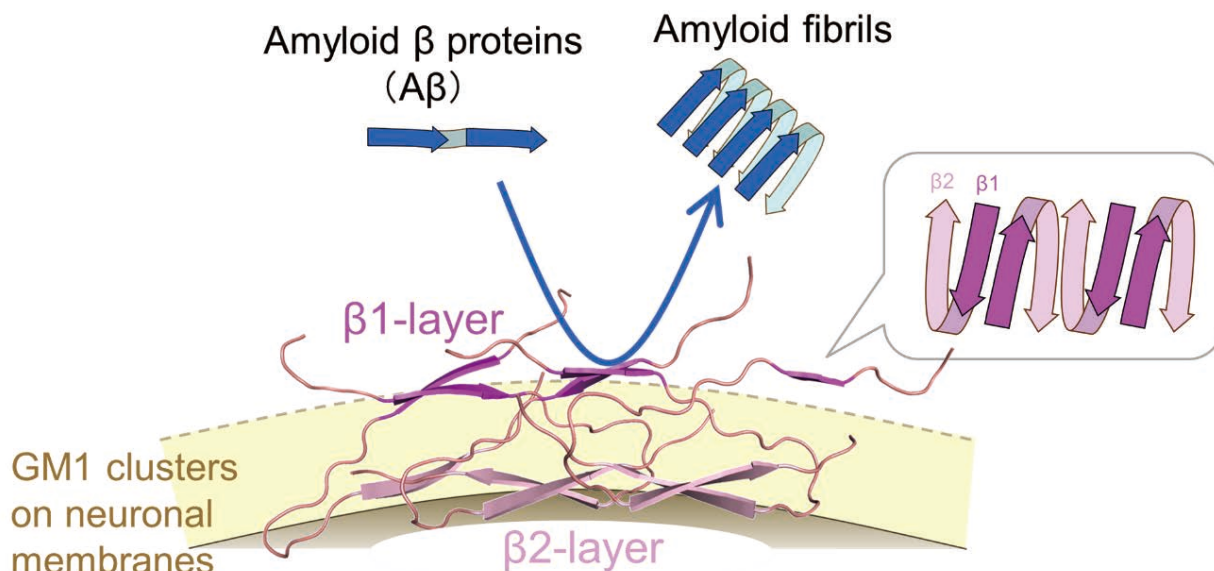


図4 GM1膜上Aβ集合体によるアミロイド線維形成促進モデル

GM1クラスターを含む神経細胞膜上で形成されたAβ集合体は、β1-layerとβ2-layerからなる特徴的な二層構造を形成する。この膜上集合体は、それ自身が直ちに成熟アミロイド線維へ変換されるのではなく、周囲の遊離Aβの線維形成を触媒的に促進する構造体として機能すると考えられる。

AFM、微小重力実験を組み合わせた融合研究を展開してきた。

成熟アミロイド線維の全体構造を明らかにするため、村田和義博士のグループと共同でCryo-EMによる構造解析を行った。Aβ線維は形成条件に応じて多様な構造多形を示すが、一分子のAβの主鎖がJ字状に折り畳まれ、その構造単位（プロトマー）が線維軸方向に積層したAβ線維の構造を明らかにした^[26]。NMRが膜上中間体や局所構造に関する情報を与えるのに対し、Cryo-EMは成熟線維全体の構築原理を高分解能で示す。これにより、NMRで捉えてきた膜上での構造変換や分子集合を、成熟線維構造との関係の中で考える基盤が得られた。

一方、線維伸長の時間発展を捉えるためには、HS-AFMを用いた単一分子観察を展開した。内橋貴之博士のグループとの共同研究により、抗Aβ抗体と伸長中アミロイド線維との相互作用を観察した。その結果、線維伸長は単調に進行するのではなく、伸長と停止を繰り返す動的な過程であることが示された^[27]。また、抗体は特定のタイミングで線維末端に結合し、伸長反応を阻害することが明らかとなった。これは、線維末端に一過的に出現する構造状態が、抗体認識や線維伸長制御に関与する可能性を示している。NMRで得られる構造・相互作用情報とHS-AFMによる実時間観察を組み合わせることで、アミロイド形成阻害機

構を動的な過程として理解する手がかりが得られた。

さらに、形成環境が線維構造に与える影響を調べるため、JAXAとの共同研究として、国際宇宙ステーションを利用した微小重力環境下でのアミロイド形成研究にも取り組んだ^[28, 29]。微小重力下で形成されたTottori型Aβ変異体の線維は、地上で形成されたものとは異なる構造分布を示した^[29]。この結果は、アミロイド線維の構造多形性がアミノ酸配列だけでなく、形成時の物理的環境にも影響されることを示している。

このように、NMRを核としてCryo-EM、HS-AFM、微小重力実験を組み合わせることで、Aβのアミロイド形成を、膜上での局所構造変換、成熟線維構造、線維伸長ダイナミクス、環境依存的な多形性という異なる階層から捉えることが可能となった。

6. アミロイド形成研究から

タンパク質分子集合の生命科学へ

本稿では、AβとGM1ガングリオシドとの相互作用を起点としたアミロイド形成研究を中心に、タンパク質の柔構造と分子集合のダイナミクスについて紹介してきた。研究を始めた当初の関心は、アルツハイマー病に関わるAβ線維形成の分子機構にあった。しかし、溶液NMRと固体NMRにより膜界面における構造変換や分子集

合体形成を追跡し、さらに Cryo-EM、HS-AFM、微小重力実験などを組み合わせて成熟線維構造、線維伸長過程、環境依存的多形性を解析する中で、筆者の関心は、生命分子がどのように状態を変え、集合し、新たな性質を獲得するのかという、より普遍的な問いへと広がっていった。

$A\beta$ 研究から見えてきた重要な点は、分子集合体の性質は個々の分子の性質だけでは決まらないということである。同じ $A\beta$ であっても、膜界面、糖鎖クラスター、分子密度、変異、形成環境の違いによって、異なる構造状態や集合様式を示す。特に GM1 クラスターは、 $A\beta$ を単に濃縮する足場ではなく、構造形成、分子配向、分子間相互作用を制御する環境場として機能していた。すなわち、アミロイド形成は分子自身の性質と環境場との相互作用によって生み出される状態変換過程として理解することができる。

このような分子集合現象を理解するためには、単一の観測手法に依存するのではなく、階層の異なる情報を統合することが不可欠である。NMR、Cryo-EM、HS-AFM といった手法を相補的に組み合わせることで、アミロイド形成を一つの静的構造としてではなく、環境に依存して変化する状態空間として捉えることが可能になる。この視点は、病的なアミロイド形成に限らず、環境応答に伴う機能的な分子集合の理解にも拡張できる。筆者が近年研究対象としているクマムシ由来タンパク質 CAHS も、環境変化に応答して線維化やゲル化を示す天然変性タンパク質であり、その集合状態の変化がクマムシの乾燥耐性能と関係している^[30]。こうした統合的アプローチは、今後のタンパク質分子集合研究において重要な基盤になると考えている。

さらに、前述の人工糖鎖クラスターが超分子錯体の外表面を利用した系であるのに対し、超分子錯体の内部空間にタンパク質を隔離・内包することで、その会合状態や構造変換を制御する研究も進めている^[31~33]。こうした「環境場を設計する」アプローチは、 $A\beta$ をはじめとする凝集性タンパク質の過渡的状态や準安定状態を安定化し、通常の溶液中では観測しにくい構造や相互作用を解析する新たな方法論につながる可能性がある。

近年、AI 技術の進展により、タンパク質構造予測は大きく進歩した。一方で、アミロイド形成のように環境依存的で多状態的な分子集合現象を理解するためには、構造そのものだけでなく、環

境因子と状態分布との関係を読み解く必要がある。動的な構造情報と AI による状態空間探索を組み合わせることで、複雑な分子集合過程をより体系的に理解できるようになると考えられる。将来的には、測定条件の探索や実験計画の一部を AI が支援することで、NMR 研究はより探索的かつ自律的な方向へ発展していくであろう。

筆者はこれまで、 $A\beta$ のアミロイド形成を通して、タンパク質の柔構造、状態変換、分子集合のダイナミクスを追究してきた。今後は、NMR を中心とする統合的アプローチをさらに発展させ、生命分子がどのように集合し、どのような機能を創発するのかという問いに挑戦していきたい。アミロイド形成の分子科学から出発した研究を、タンパク質分子集合の生命科学へと展開し、その発展に貢献していきたい。

7. 謝 辞

本稿で紹介した研究は、加藤晃一博士（生命創成探究センター / 分子科学研究所 / 名古屋市立大学）、柳澤勝彦博士（国立長寿医療センター研究所 / 筑波大学）をはじめ、多くの先生方との共同研究として進めてきたものである。藤田 誠博士（東京大学 / 分子科学研究所）、奥村久士博士、伊藤 暁博士（生命創成探究センター / 分子科学研究所）、西村勝之博士（分子科学研究所）、村田和義博士（生命創成探究センター / 生理学研究所）、内橋貴之博士（名古屋大学 / 生命創成探究センター）の各グループ、ならびに JAXA をはじめとする関係者の皆様に多大なるご支援を賜った。共同研究者の皆様、研究室メンバーの皆様に心より感謝申し上げます。

本稿で紹介した研究の一部は、JSPS 科研費および JST さきがけの支援を受けた。また、実験および解析の一部は、NMR プラットフォーム、文部科学省共同利用・共同研究システム形成事業「学際領域展開ハブ形成プログラム」スピン生命フロンティア (Spin-L)、AMED「生命科学・創薬研究支援基盤事業 (BINDS)」、ならびに自然科学研究機構生命創成探究センターの共同利用研究の支援を受けて実施した。

引用文献

- [1] Boehr, D. D., Nussinov, R. & Wright, P. E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nature chemical biology* **5**, 789–796 (2009).

- [2] Kovermann, M., Rogne, P. & Wolf-Watz, M. Protein dynamics and function from solution state NMR spectroscopy. *Quarterly reviews of biophysics* **49**, e6 (2016).
- [3] Ikeya, T. *et al.* Solution NMR views of dynamical ordering of biomacromolecules. *Biochimica et biophysica acta. General subjects* **1862**, 287–306 (2018).
- [4] Liu, Z., Gong, Z., Dong, X. & Tang, C. Transient protein-protein interactions visualized by solution NMR. *Biochimica et biophysica acta* **1864**, 115–122 (2016).
- [5] Serve, O. *et al.* Redox-dependent domain rearrangement of protein disulfide isomerase coupled with exposure of its substrate-binding hydrophobic surface. *Journal of molecular biology* **396**, 361–374 (2010).
- [6] Hirano, T. *et al.* Conformational dynamics of wild-type Lys-48-linked diubiquitin in solution. *The Journal of biological chemistry* **286**, 37496–37502 (2011).
- [7] Yagi-Utsumi, M., Satoh, T. & Kato, K. Structural basis of redox-dependent substrate binding of protein disulfide isomerase. *Scientific reports* **5**, 13909 (2015).
- [8] Hiranyakorn, M. *et al.* NMR Characterization of Conformational Interconversions of Lys48-Linked Ubiquitin Chains. *Int J Mol Sci* **21** (2020).
- [9] Hiranyakorn, M. *et al.* Mutational and Environmental Effects on the Dynamic Conformational Distributions of Lys48-Linked Ubiquitin Chains. *Int J Mol Sci* **24** (2023).
- [10] Hardy, J. A. & Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184–185 (1992).
- [11] Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews* **81**, 741–766 (2001).
- [12] Chiti, F. & Dobson, C. M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annual review of biochemistry* **86**, 27–68 (2017).
- [13] Yanagisawa, K., Odaka, A., Suzuki, N. & Ihara, Y. GM1 ganglioside-bound amyloid b-protein (Ab): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nature medicine* **1**, 1062–1066 (1995).
- [14] Ariga, T., McDonald, M. P. & Yu, R. K. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease—a review. *Journal of lipid research* **49**, 1157–1175 (2008).
- [15] Matsuzaki, K., Kato, K. & Yanagisawa, K. Ab polymerization through interaction with membrane gangliosides. *Biochimica et biophysica acta* **1801**, 868–877 (2010).
- [16] Matsuzaki, K., Kato, K. & Yanagisawa, K. Ganglioside-Mediated Assembly of Amyloid b-Protein: Roles in Alzheimer's Disease. *Progress in molecular biology and translational science* **156**, 413–434 (2018).
- [17] Utsumi, M. *et al.* Up-and-down topological mode of amyloid b-peptide lying on hydrophilic/hydrophobic interface of ganglioside clusters. *Glycoconjugate journal* **26**, 999–1006 (2009).
- [18] Yagi-Utsumi, M., Kameda, T., Yamaguchi, Y. & Kato, K. NMR characterization of the interactions between lyso-GM1 aqueous micelles and amyloid b. *FEBS letters* **584**, 831–836 (2010).
- [19] Yagi-Utsumi, M., Matsuo, K., Yanagisawa, K., Gekko, K. & Kato, K. Spectroscopic Characterization of Intermolecular Interaction of Amyloid b Promoted on GM1 Micelles. *International journal of Alzheimer's disease* **2011**, 925073 (2010).
- [20] Sato, S. *et al.* A Self-Assembled Spherical Complex Displaying a Gangliosidic Glycan Cluster Capable of Interacting with Amyloidogenic Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**, 8435–8439 (2015).
- [21] Yagi-Utsumi, M. & Dobson, C. M. Conformational Effects of the A21G Flemish Mutation on the Aggregation of Amyloid b Peptide. *Biological & pharmaceutical bulletin* **38**, 1668–1672 (2015).
- [22] Itoh, S. G., Yagi-Utsumi, M., Kato, K. & Okumura, H. Effects of a Hydrophilic/Hydrophobic Interface on Amyloid-b Peptides Studied by Molecular Dynamics Simulations and NMR Experiments. *The journal of physical chemistry. B* **123**, 160–169 (2018).
- [23] Itoh, S. G., Yagi-Utsumi, M., Kato, K. & Okumura, H. Key Residue for Aggregation of Amyloid-beta Peptides. *ACS Chem Neurosci* **13**, 3139–3151 (2022).
- [24] Yagi-Utsumi, M., Kato, K. & Nishimura, K. Membrane-Induced Dichotomous Conformation of Amyloid b with the Disordered N-Terminal Segment Followed by the Stable C-Terminal beta Structure. *PloS one* **11**, e0146405 (2016).
- [25] Yagi-Utsumi, M. *et al.* The Double-Layered Structure of Amyloid-beta Assemblage on GM1-Containing Membranes Catalytically Promotes Fibrillization. *ACS Chem Neurosci* **14**, 2648–2657 (2023).
- [26] Burton-Smith, R. N. *et al.* Elucidating the unique J-shaped protomer structure of amyloid- β (1-40) fibril with cryo-electron microscopy. *Int J Mol Sci* **26**, 1179 (2025).
- [27] Yagi-Utsumi, M. *et al.* Single-Molecule Kinetic Observation of Antibody Interactions with Growing Amyloid beta Fibrils. *Journal of the American Chemical Society* **146**, 31518–31528 (2024).
- [28] Yagi-Utsumi, M. *et al.* Characterization of amyloid b fibril formation under microgravity conditions. *NPJ Microgravity* **6**, 17 (2020).
- [29] Yagi-Utsumi, M. *et al.* Microgravity-Assisted Exploration of the Conformational Space of Amyloid beta Affected by Tottori-Type Familial Mutation D7N. *ACS Chem Neurosci* **16**, 2682–2690 (2025).
- [30] Yagi-Utsumi, M. *et al.* Desiccation-induced fibrous condensation of CAHS protein from an anhydrobiotic tardigrade. *Scientific reports* **11**, 21328 (2021).
- [31] Nakama, T. *et al.* Hysteresis behavior in the unfolding/refolding processes of a protein trapped in metallo-cages. *Chem Sci* **14**, 2910–2914 (2023).
- [32] Nakama, T. *et al.* Proximity-induced saccharide binding to a protein's active site within a confined cavity of coordination cages. *Chem Sci* **16**, 10549–10554 (2025).
- [33] Ebihara, R. *et al.* Monomer Isolation from Oligomeric Proteins within Coordination Cages to Study Interface Ligand Binding. *Journal of the American Chemical Society* **148**, 1872–1880 (2026).

**矢木 真穂** (やぎ・まほ)

2010年 3月 名古屋市立大学大学院薬学研究科博士後期課程修了、学位取得
2010年 4月 日本学術振興会特別研究員 (PD)
2011年 4月 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター 特任助教
2013年 7月 University of Cambridge, Department of Chemistry 訪問研究員
2015年 11月 自然科学研究機構分子科学研究所 助教
2018年 4月 自然科学研究機構生命創成探究センター 助教
2022年 4月 名古屋市立大学大学院薬学研究科 講師
2025年 5月 名古屋市立大学大学院薬学研究科 准教授、現在に至る

AI興隆期におけるNMRデータサイエンス活用事例

理化学研究所環境資源科学研究センター、名古屋大学大学院生命農学研究科、横浜市立大学大学院生命医科学研究科

菊地 淳

jun.kikuchi@riken.jp

要 旨

筆者らは「NMRデータサイエンス」と称する独自手法を開発し、NMR法が広く用いられる単離精製された有機分子の構造解析ではなく、分子複雑系の状態評価を遂行してきた。まず本報文では、このNMRデータサイエンスの概念を鳥瞰しつつ、材料、食と代謝消費、環境の3分野に関する活用事例を列挙した。使うNMR装置としては、TD-NMRからの緩和曲線、溶液および固体NMRによる1Dおよび2Dスペクトルであるが、いずれも「画像のように捉え」、試料のメタ情報を目的変数もしくは説明変数として活用する。概して試料 n 数を多検体計測するアプローチが多いが、環境試料への適用例としたブルーカーボンや赤潮海水の例のように、1検体に関して量子化学計算を援用した例も最後に紹介する。

1. NMR データサイエンス

近年ではDX (Digital Transformation)、GX (Green Transformation)、SX (Sustainable Transformation) 等々、何かと“X”を加えた「変革」が問われる時代となった^[1]。DXを例とすれば、ア

ナログ情報から機械可読なデータ様式とするDigitization、および機械学習等によるモデル化や自動化を意図するDigitalizationを基に、ビジネスや社会変革をもたらすDX化を推進することを指す。この一連の過程には「データサイエンス」的手法が多く包含されており、本総説では特に、材料開発等のDX化^[1]、あるいは環境分野のGX化^[2]、さらには食料生産やフードロス対策も含めた広い意味でのSX化^[3]に、「NMRデータサイエンス」の適用事例を列挙する(図1)。

最初に御断りしておきたいが、筆者は特定の材料や環境試料など、対象“*What*”に研究の軸を置いているつもりはなく、方法論“*How*”に主軸を置き研究活動してきた^[4]。だが本稿では敢えて、材料、食と代謝消費、環境の3項構成とし、NMR計測装置としても高分解能NMR(溶液/固体)のスペクトルでも、卓上型TD-NMRの緩和曲線であっても、こだわらず「データ」が生成すれば、あたかも画像のように捉えて数値行列化し、Digitizationさせることとした^[5]。

さらに言えば、「データ」とはNMR数値データのみを指すのではなく、その試料特性(材料物

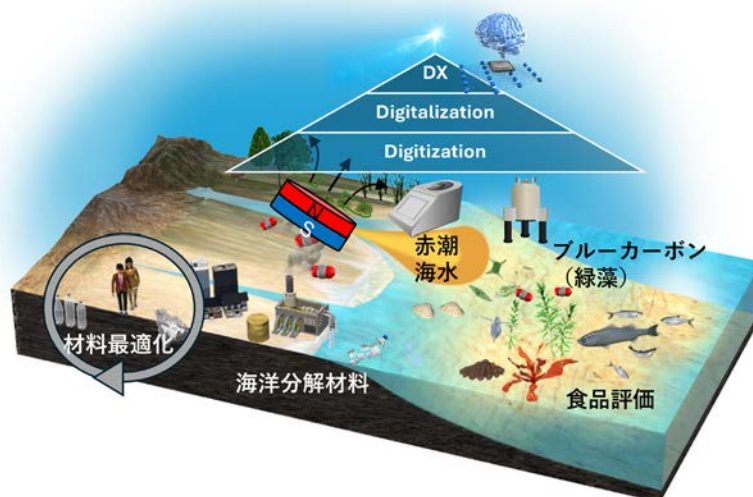


図1 本稿で扱う「NMRデータサイエンス」対象の俯瞰図

性や由来の環境要因等)、LLM (Large-language-Modeling) のテキスト等のメタ情報全てを含んでいる。逆に「NMRデータサイエンス」と言えば、スペクトルや緩和曲線を画像と同様に「データ化」したり (図2)、サンプルの由来や作成プロセス等々、テキストまで含めて「メタ情報」とし、埋もれた情報やトレンドを予測・最適化するかが鍵技術となる^[6]。

2. 材料

2-1. NMRデータサイエンスによる材料最適化

後述するようにNMRの利用展開は多様化し、有機化学の教科書的な「構造解析」のみならず、むしろNMRの潜在能力が遺憾なく発揮されるであろう物理的因子を最大限にデータマイニングさせることで、材料最適化に活用し得ると思われる。筆者らは固体 (必要に応じて溶液) NMRのスペクトル情報のみならず、緩和曲線の減衰パターンも「画像」と同様に捉え^[7]、機械学習の説明変数として扱うことで所望物性を目的変数とする分

類/回帰モデリングを遂行している。

その実例としては、毛髪サンプルの固体NMRやTime Domain (TD)-NMRデータを記述子とした、ランダムフォレスト (RF) アルゴリズムを用いることにより測定対象物の物性評価が可能になった^[8]。また、親水性ポリマーの設計実験に際し、再帰的特徴量削減 (RFE) 計算が活用され^[9]、サポートベクターマシーン (SVM) とマーケットバスケット分析 (MBA) はポリマーの構造-物性相関を調べるために使用された^[10]。さらに試料作製、NMR測定および測定データの解析を反復サイクルに基づき、効率的に材料設計するために、生成的トポグラフィックマッピング回帰 (GTMR) 計算が利用された^[7]。

このような手法整備から近年、生分解性ポリマーのTD-NMRデータ、RF、生成的トポグラフィックマッピング (GTMR)、ベイズ最適化 (BO) を用いた新しいポリマー組成設計を提案した (図3)。生分解性ポリマーが分解するためには、水分子がポリマー界面に接することが重要な

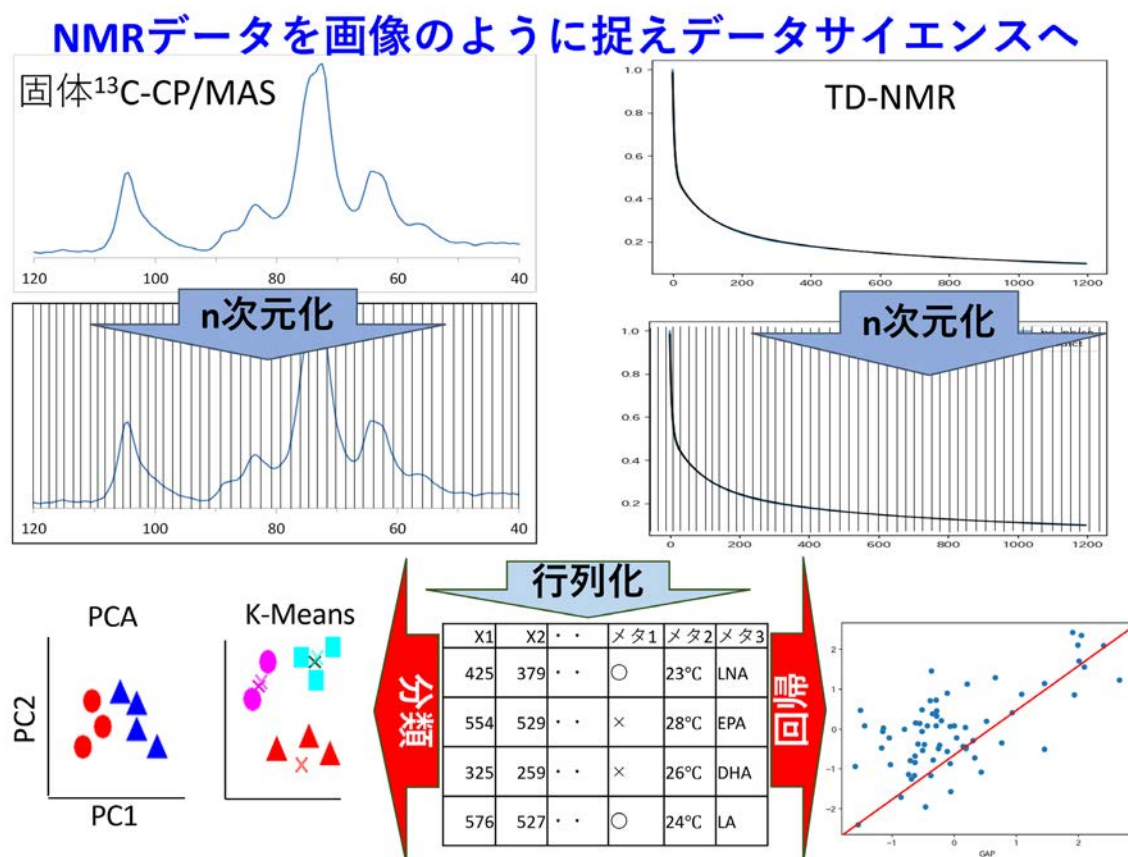


図2 NMRプロファイリングによる潜在空間数値化と分類・回帰モデリング

ここでは材料解析に多く用いられる固体¹³C-CP/MASスペクトル (左)、ならびに小型Time Domain (TD)-NMR (右) の緩和減衰曲線に関して、限定されたピークやフィッティング値のような絞られた因子を扱うのではなく、高次元に数値化された行列データ全てを用い、多検体どうしの関係性を多変量解析や機械学習アルゴリズムを用いて分類・回帰計算を行う。

役割を果たすため、ポリマーの親水性を指標に研究が実施された。水にはポリマー界面への結合水のように運動性が低いものから、ポリマー界面から離れた水のように運動性が高い自由水まで存在するため、それらを測定するのに適するTD-NMRのパルスシーケンスであるCPMGの T_2 緩和曲線から、半教師ありの非負値行列因子分解(NMF)法を用いて親水性に関する特徴量を分離した。この特徴量、ポリマー組成、分子量およびRDKit分子記述子を統合したデータを説明変数とし、アジピン酸とテレフタル酸を目的変数としたRFによって重要因子を抽出した。次に、所望の物性を有するポリマーを効率的に開発するために、GTMRの逆解析により所望の物性を有するポリマー組成を予測し、最後に、BOで期待値を計算することで候補ポリマーを絞り込むことが可能となった^[11]。

2-2. CNN潜在空間の抽出によるNMR緩和曲線のノイズ除去と材料成型プロセス最適化

前述のようにTD-NMRは物質のダイナミクスに関する情報を短時間で比較的容易に取得でき、多検体サンプルにおけるデータ採集において有効な手法である。緩和曲線には材料の高次構造や界面状態を反映した多様な情報が含まれているため、複数の物性を一度のTD-NMR測定で簡便に評価できる可能性がある^[12]。しかしながら、緩和曲線の特徴量と物性値の対応関係の同定は難し

く、加えて緩和曲線中の微弱な成分はノイズの影響を受けやすいことから、緩和曲線からの網羅的な物性情報の取得には困難が伴う。そこで筆者らは、畳み込みニューラルネットワークネットワーク(CNN)ノイズ除去モデルの構築、緩和曲線と物性値の紐づけ、モデルの潜在空間を利用した材料物性のベイズ最適化を行った^[13]。潜在空間はノイズ除去モデル内部で推論時に算出される入力データの抽象表現であり、モデルは潜在空間に物性のダイナミクスを抽出している可能性がある。ノイズ除去モデルの解析に基づき物性情報の取得を試みる本手法は、積算回数を抑えた効率的な測定、緩和曲線からの材料特性解析、取得が容易なデータに基づく成形プロセス最適化を通じて材料開発の促進に貢献する可能性がある(図4)。

そこで、我々は生分解性プラスチックの1つであるポリ乳酸を使用した。TD-NMR実測データによるモデルの検証には68通りの条件で成型したポリ乳酸のMagic Sandwich Echo (MSE)法における緩和曲線を用いた。さらに緩和曲線は酵素分解率、UV劣化前後の機械物性値8つの全9つの実験的に取得した物理パラメータと紐づけられた。このデータを用いて、RFを用いた緩和曲線からの物性回帰を行うとともに、CNN潜在空間と物性の関係性を探索した。CNNの潜在空間と物性値との関係性は、2つの方法で検証された。1つは物性値との相関係数の算出、もう1つはポリ乳酸の成型条件を探索変数としたベイズ最適化に

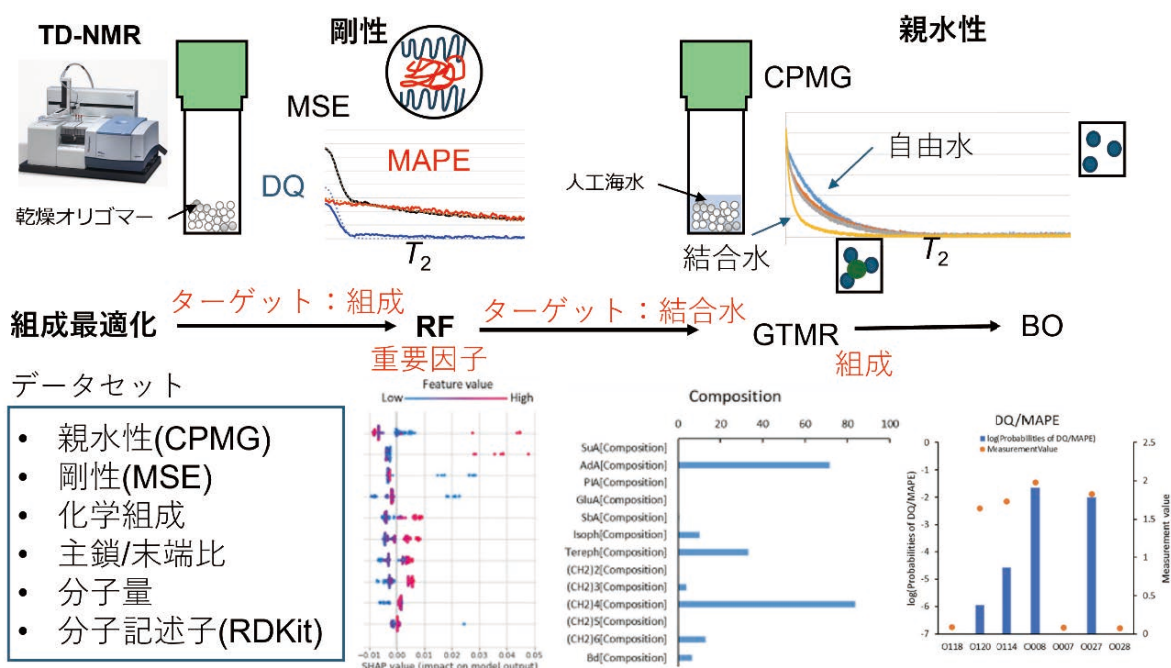


図3 TD-NMRを用いた水親和性の特徴抽出に基づくポリマー組成最適化

よる物性値の同時向上である。

その結果、Global Average Pooling (GAP) 値の最大化過程で、物性値を直接最大化した場合と同様の物性値上昇過程が確認された。他の8つの物性においても同様の傾向が確認された。この結果は、TD-NMR緩和曲線に対するノイズ除去モデルが物性最適化においても有効であることを示している。さらに、この手法により複数の物性測定を簡便な手法であるTD-NMR測定で代替できる可能性が示され、効率的な物性最適化への応用が期待される。

2-3. マルチモーダル・マルチタスク学習による パレート最適解材料設計

筆者らはこれまで、理研横浜地区に隣接した鶴見川河口水の多様な天然微生物叢を用いて^[14]、

生分解性ポリマーの迅速評価法を構築してきた^[15]。この蓄積を生かし、今回は市販7種ポリマーを異なる結晶化プロセスで成形し、生分解実験を遂行した。さらに、材料内部で起こる微細な変化を捉えるため、TD-NMRにより分子鎖の運動性を測定し、2D-NMR (HSQCおよび*J*-Res)では官能基などの局所的な化学構造を解析し、DSCにより融解挙動や結晶性を評価した一方、計測値以外のモダリティー情報としてRDKit分子記述子も抽出した^[16]。これらの多階層データは、材料内部の状態変化を包括的に把握するための基盤とした。

得られた多種多様なデータを統合し、筆者らはマルチモーダル・マルチタスクの機械学習モデルを構築した(図5)。このモデルは、NMR、熱分析、分子構造など異なる情報源を同時に学習し、

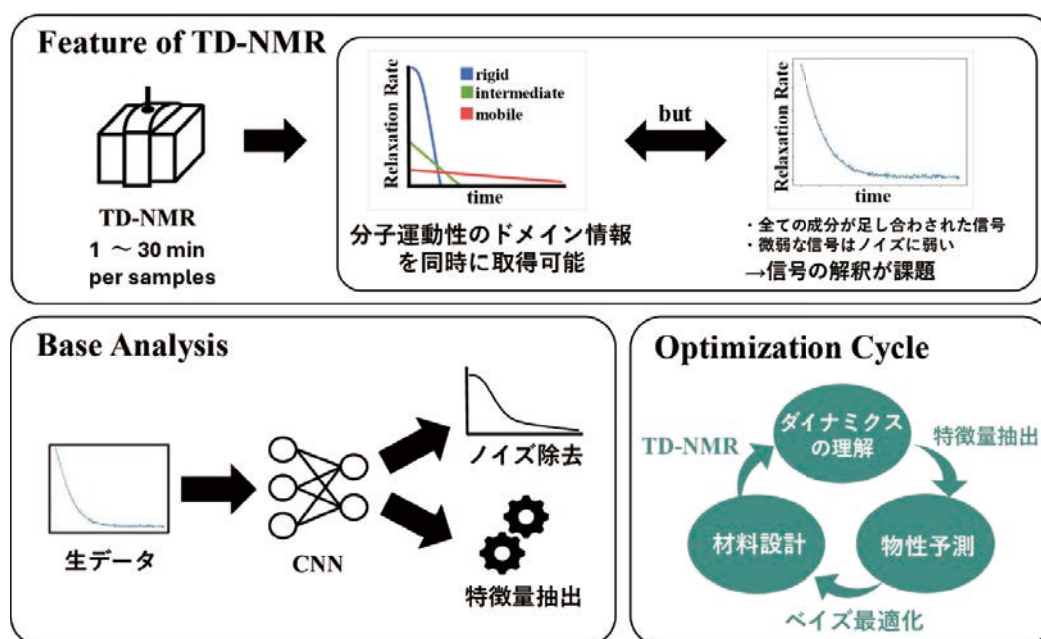


図4 TD-NMR緩和曲線全体からの特徴量抽出(上段)と、筆者らが提案するCNN特徴量抽出によるノイズ除去とベイズ最適化戦略(下段)

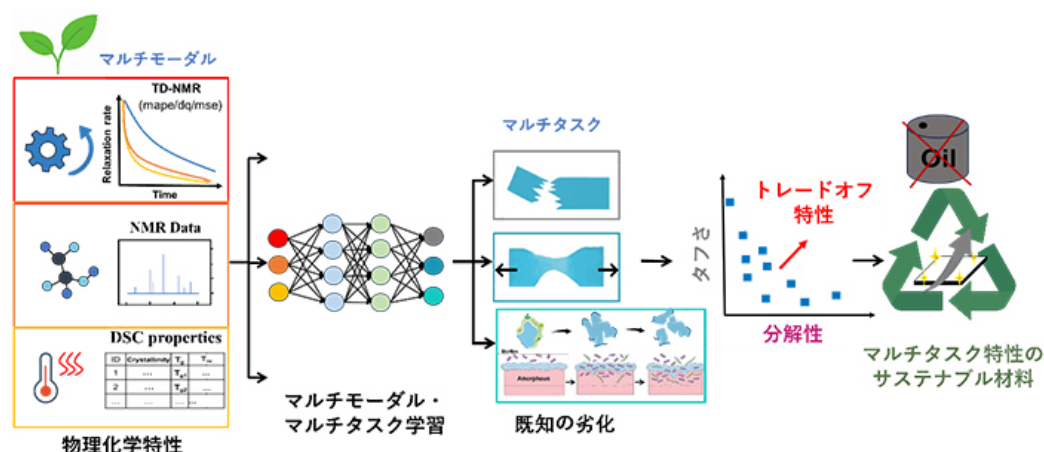


図5 トレードオフ特性の材料設計を可能とするマルチモーダル・マルチタスク学習

分解速度、靱性、弾性など複数の力学特性を一度に予測できるよう設計されている^[17]。これにより、材料の性能をより正確に推定するだけでなく、異なるデータ間に潜む深い関係性を捉えることが可能となり、時間とともに変化する材料特性の全体像を描き出すこともできた^[18]。

さらに2D-NMRデータの主成分分析 (PCA) で次元削減した、局所的な化学構造情報から、主鎖炭素の配置、末端基の種類、柔軟な脂肪鎖ユニット、非晶領域の運動性などが、材料の分解速度や耐久性に大きな影響を与えることが明らかになった。これら異なるNMRモダリティから得られる構造的および動的特徴は、生分解性ポリマーごとの分解挙動の違いを説明し、今後「使用時はタフでありながら、不意に海洋流出した際に微生物分解する」サステナブル材料を設計するための具体的な指針を与え得る。引き続き次節では、「食と代謝消費」の適用事例を紹介する。

3. 食と代謝消費

3-1. 卓上型NMRによる食品の簡易評価システム FoodPro

食品は農産物、畜産物、水産物などのほかに、様々な加工、処理、調理が行われる^[19]。それらの素材自体が有する代謝能に伴う貯蔵・熟成過程、その後の製造や調理時の物理・化学的変換過程、摂食時の調味料添加等に伴う様々な過程が、化学成分や物理的特性を大きく変化させることで、食品の多様性と価値が生まれる。そこで我々は貯蔵、発酵、加工、調理などの「プロセス」に注目した卓上型NMRの系統的なデータベース・分析ツール開発し、単にNMRデータを保持するだけではなく食品の価値指標である人間の主観や多様なプロセスとの紐づけを試みた。

魚、肉、野菜、調理食品などを含む124種の食品加工試料を卓上NMRと10人以上の食味評価で解析した。各試料は、食品抽出物の1D ¹H-NMRスペクトルを卓上NMR (60 MHz) で取得した。

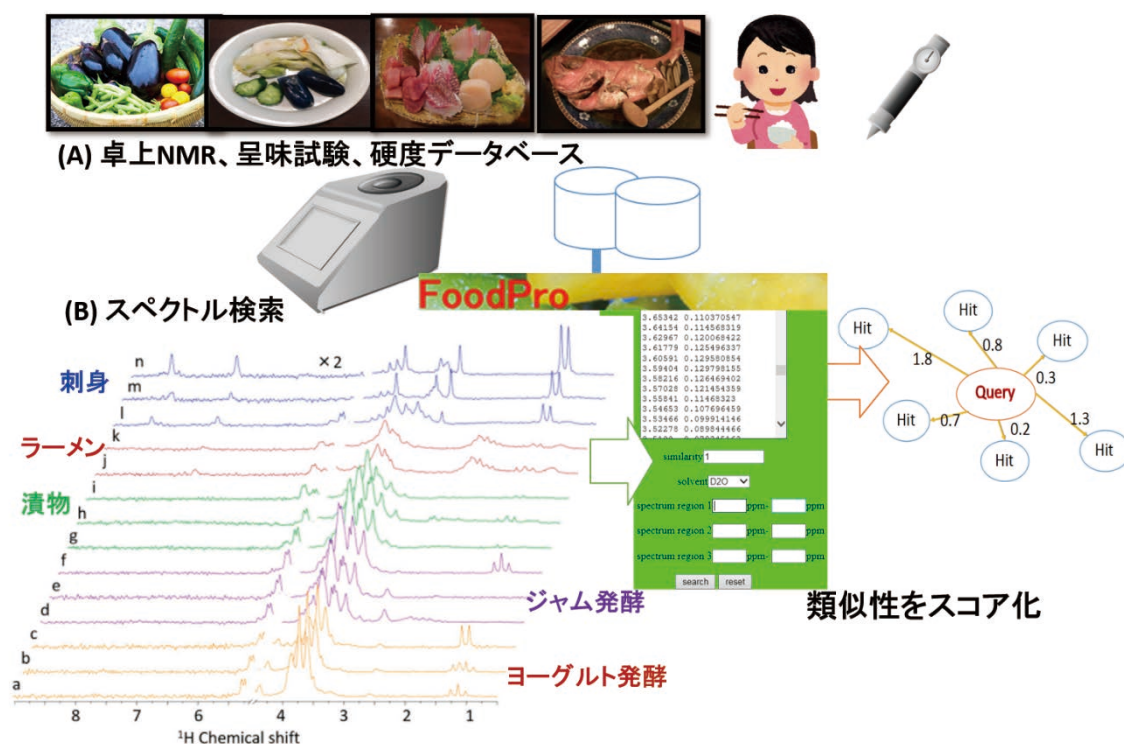


図6 卓上NMR食品評価システムFoodPro (上)。各スペクトルのID (bspcid)、食味評価値 (tasting)、類似スペクトルの試料名 (sample_description)、NMR測定に使った機器 (nmr_description)、クエリーとの距離 (distance)、データベース内の食味評価値の最大・最小値 (tasting: max・tasting: min)、未知のNMRスペクトルの食味評価の予測値 (Estimated tasting(all))、食味評価の予測値にCandle chartを採用し、可視化するツールを開発した。食味評価は5段階評価で計測しており、データベースに登録されている。食味評価されていない未知の1個のNMRスペクトルをクエリーとする。FoodProはそのクエリーと許容誤差内で類似するスペクトルをデータベースから検索する。検索する際NMRスペクトルのintensity、ppmと許容誤差の設定が必要である。許容誤差はユーザーの任意で範囲を決めることができる。各スペクトル内のppmとintensityからクエリーとデータベースのNMRスペクトルの距離を計算し、その距離を重みとして用いてクエリーの食味評価値を予測する。硬度も上記と同様に計算しクエリーの硬度を予測する。

図6には各種の調理プロセス時の卓上NMRスペクトル典型例を示しているが、例えば発酵産物は乳酸のダブルレット(魚肉にも観測)がエタノールのトリプレットへと変化したり、漬物のような植物系サンプルは糖鎖(3-5 ppm付近)の特徴等が伺える^[20]。

FoodProは食味評価、硬度だけではなく、柔軟な加工等のプロセスに対応するため、特徴ベクトルを各スペクトルに登録できる。そのため、リレーショナルデータベースに特徴ベクトルを登録するためのテーブル設計を行った。実数、整数、文字列(32字)のデータが登録可能である。今回、FoodProには、131個の試料に対する20人以上の評価者が関わる計723個の評価値を登録した。このうち、7個の外れ値を除いた124個のNMRスペクトルを解析対象とした。硬度に関しては、124個のうち測定できない液体などの試料があるため43個の硬度値を登録した。このFoodProにより、未知のNMRスペクトルを検索すると類似するスペクトルを検索し、食味評価と硬度を予測することができた。

多少話題がずれるが、NMR法は機関間互換性が高く、磁場強度やプローブ等々が異なる装置で計測したデータの機関間互換性が期待される。しかし1桁以上も磁場強度の異なるNMRデータの互換性は十分に議論されていない。筆者らはFoodProの60 MHzデータと、同じサンプルを700 MHz、極低温プローブで計測したデータ互換

性に関する“transfer simulation”手法も論文化している^[20]、御参照戴ければ幸甚である^[20]。

3-2 サステナビリティ社会を意識した水産養殖研究

ポツダム気候影響研究所が警鐘するプラネタリーバウンダリー(惑星としての地球の持続性限界)は、最近9項目のうち6項目が限界を超越し、多くは農業活動に由来している^[21]。換言すれば、土地利用変化を伴う開墾や地下水等の水資源奪取、さらにはN/P肥料や抗生物質等の河川流出と、これら要因に伴う生物多様性減少を防ぎ、かつ2030年からの生態系復興に寄与するネイチャーポジティブ化を誘因できることが望ましい^[22]。

他方で食料生産のうち、蛋白源生産が世界で偏在し、かつエネルギー換算を含めた温室効果ガス排出量が高いことから、近年では新たなフードテックとして培養肉が注目されている。もちろん新技術は大いに伸ばすべきではあるものの、培地その他のケミカル生産や、加温・加振・除菌等々のプロセス負荷は当初のLCA計算より、遙かにGHGs負荷が高いことが指摘され^[23]、サステナビリティの観点から水産養殖、特に陸上養殖技術の新たな展開が期待されている^[24]。

図7に示すように筆者らの研究グループはまず、資源循環の最下流である食品廃棄物等のメタン発酵プロセス^[25]から着手し、固体および溶液

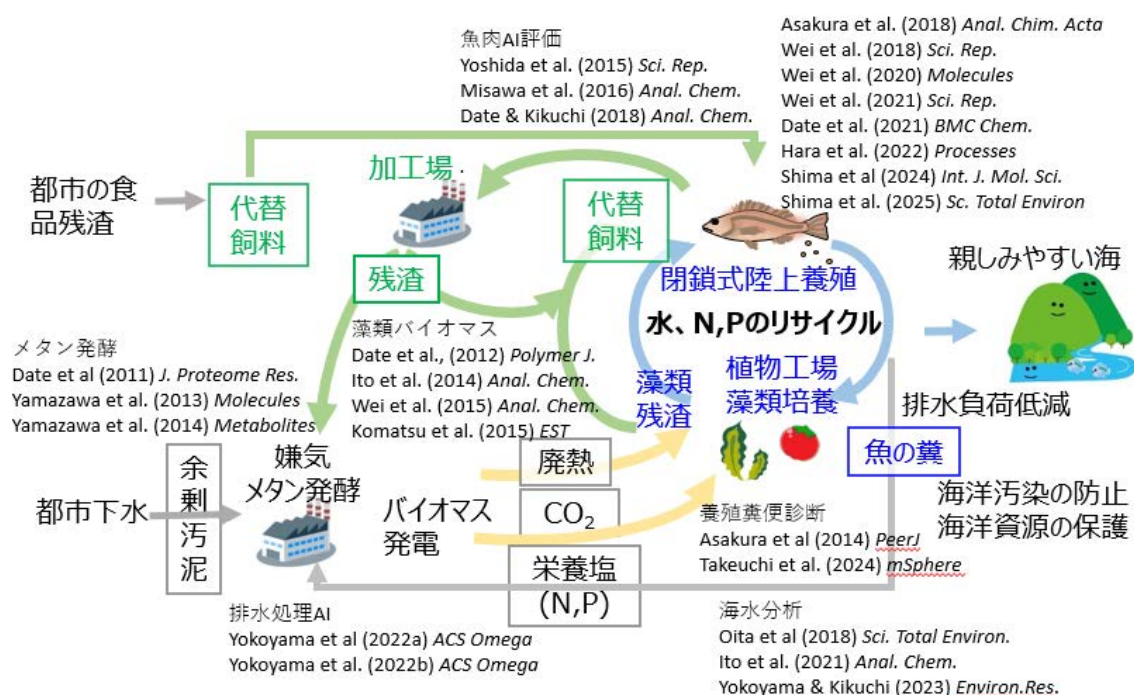


図7 培養肉よりも環境持続性を意識した陸上養殖システム研究

NMRによる藻類バイオマス評価^[26]、さらに多彩な魚種の筋肉NMR評価において^[27]、AI様解析技術を適用させた^[28]。他方で陸上養殖プロセスを意識した排水処理膜ファウリング予測^[29]、ならびに糞便診断技術^[30]と、富栄養化する沿岸環境評価^[14, 31]にもNMR法を適用している。特に赤潮時のNMR解析については、4節の「環境」も御参考戴きたい。

3-3. インタクト食材の組成・物性・空間情報

取得のSMOOSY

さらに筆者らは、食品および材料開発で用いられるNMR緩和時間、拡散係数といった物性情報と、生体混合物の成分組成情報とを非破壊計測できるパルスシーケンスの開発を試みた。NMRイメージング(MRI)法は核磁気共鳴の現象を利用し、試料中の原子核の密度や運動性の空間特徴を取得する手法であり、形態・生化学的情報を同時に収集することができる。パルス磁場勾配NMRを用いて観測原子核のZ軸方向沿いの空間分布や運動性特徴を取得する手法は一次元(1D)MRIとも呼ばれる^[27d]。

前述のようにNMR法を用いて試料成分の空間分布を評価する手法として、化学シフトイメージ

ング法が、また試料成分の拡散現象や緩和現象を評価する手法として、DOSY法とROSY法がある。筆者らは、これらの手法を組み合わせ、生体混合物中の成分の位置(深度)分布と各成分の物性評価を可能とする新しいNMRパルスシーケンスを開発した^[32]。これは、空間的な物性情報の取得が得意なMRI法と空間的な成分組成情報の取得が得意なNMR法スペクトルを組み合わせた方法である。この新しいNMRパルスシーケンスは、空間における分子動態を分光学的に評価することから、「Spatial MOolecular-dynamically Ordered Spectroscopy; SMOOSY」と名付けた。今回、空間的に不均一な生体混合物を対象としたため、NMRシグナルの広幅化が問題となったものの、MAS法を取り入れることで、高分解能なスペクトルを得ることに成功した(図8)。

次に、この手法を通称「川エビ」として唐揚げなどで親しまれるスジエビに適用した。外径約4mmのMASローターに挿入し、SMOOSYの計測を行った。ところが、この計測により得られるNMRスペクトルは、組成・物性・深度の情報を持った3次元スペクトルのため、各成分の深度における物性を直感的に解釈することが困難であった。そこで、この3次元スペクトルを疑似2次元

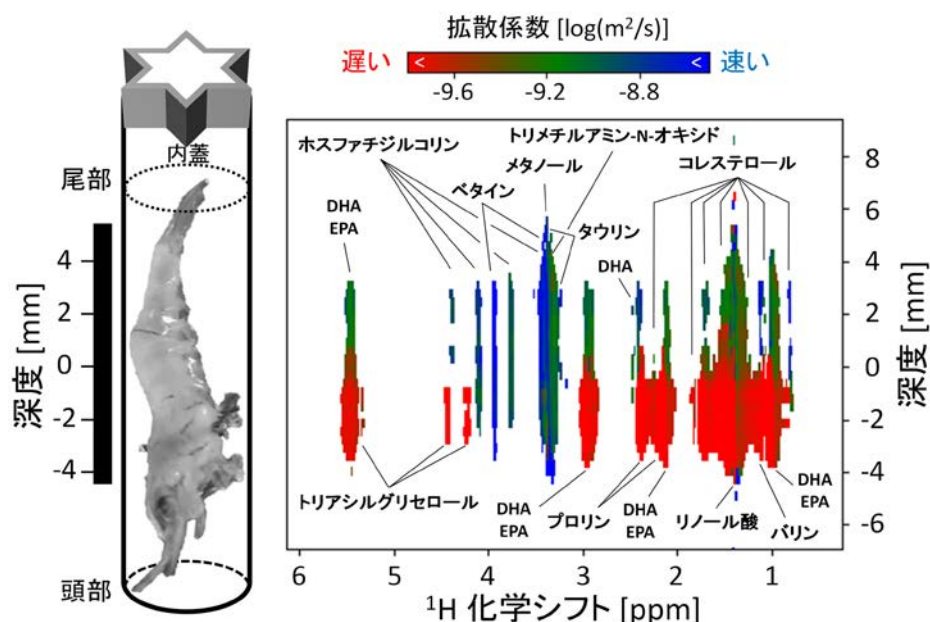


図8 スジエビの疑似2次元SMOOSYスペクトル画像

左:長さ約18mm、幅が約4mmのMASローターに挿入した試料のスジエビ。

右:SMOOSYの計測により得られた3次元NMRスペクトルを疑似2次元NMRスペクトルに変換した画像。

脂質のDHAとEPAは全体に分布しているが、拡散係数は尾部から頭部にかけて低くなっている。一方、タウリンとベタインも全体に分布しているが、拡散係数は空間的に変化が見られない。

スペクトル画像に変換するスペクトル処理プログラム (SMOOSYプロセッサと命名)を開発した結果、頭部から尾部に至る体軸方向に対し、脂質・タンパク質・糖・アミノ酸などの組成分布と「硬さ・柔らかさ」に関する物性プロファイリングを容易に行うことが可能になった。

以上のことから、SMOOSYスペクトル画像の解析により、従来法では得られなかった深度における成分物性を非破壊的かつ高分解能に評価することが可能になった。NMRはパルスシーケンスを自在に操ることで、MRIのような位置情報や、食品および材料開発で用いられる緩和時間や拡散係数といった物性情報を得ることもできる。また、磁場が地球上の全ての物質を透過できるとい

う物理学的特性を生かした、非破壊 *in situ* 計測で温度、光、酸素、水分といった物理化学的因子を変化させたり、微生物発酵させたりするなど、環境要因を変化させながら連続計測することも可能である。つまり、多様性のある水産資源を多彩な貯蔵・調理プロセスで味わう和食文化の世界に、分子レベルで探求していくことにもつながる。将来的には、例えばNMR管内で加温・冷却して食材を固めたりした際の状態変化、さらに部位ごとの食感・呈味評価などに応用展開されることが期待できる。

3-4. 非線形PCA、機械学習とアソシエーション分析による食と尿の入出力関係性抽出

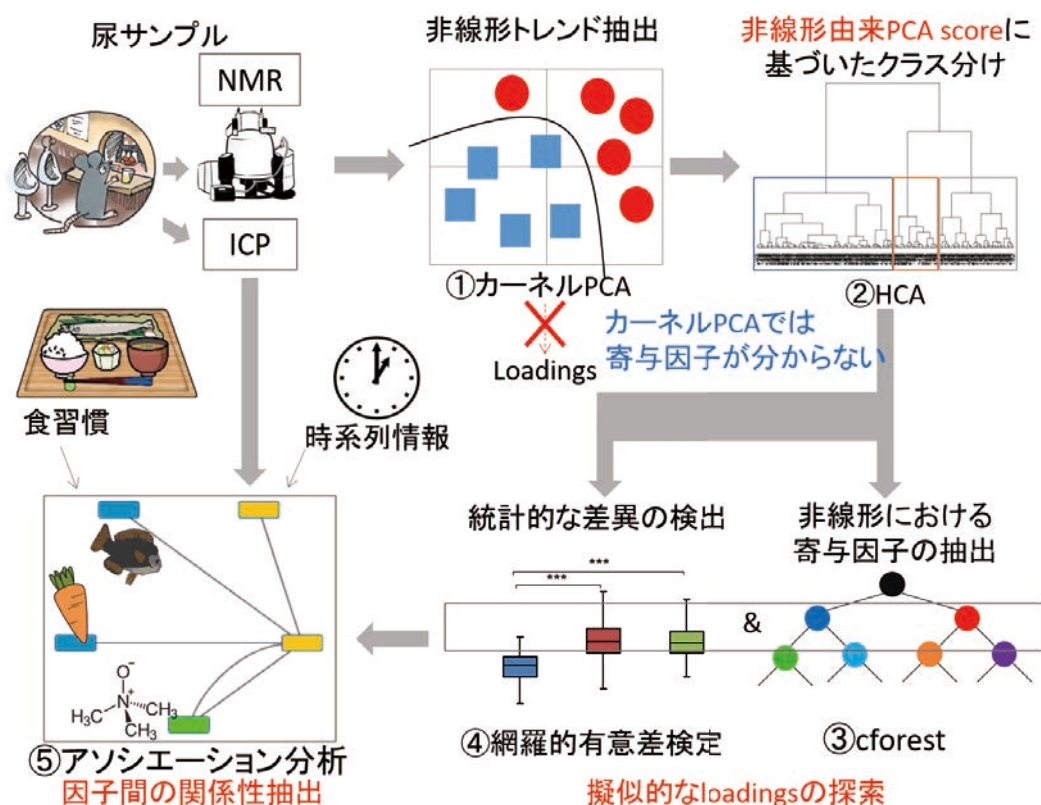


図9 多次元のデータを解釈するのに有用な手法として主成分分析 (PCA) が挙げられる。一般に用いられるPCAは多次元データを線形近似するが、本研究で取り入れる非線形のPCAでは、条件を満たす非線形関数で入力行列を変換し、その4行列に対しPCAを行う。線形PCAでは、因子負荷量を見ることで、PCAスコアの違いがどの変数に起因するのか調べることが出来るが、非線形のPCAであるカーネルPCA (KPCA) は、因子負荷量が示せないという問題がある。そこで本研究では、KPCAの欠点を克服するため、cforestという機械学習を取り入れた。cforestはサンプル間の違いを複数の決定木という弱識別器で学習し、分類や回帰、クラスターリングを行う機械学習である。同様の機械学習で広く用いられるのがRandom Forestだが、クラスに属するサンプルの数によって変数の重要度算出にバイアスが生じる。これを克服したcforestをここでは用い、KPCAのスコアを基にしたクラス分けにおいて貢献した変数の重要度を算出し、擬似的な因子負荷量を表現する方法を確立した。また、ここで見出された変数のピーク強度に対し、各クラス間の有意差を検定することで擬似的な因子負荷量の妥当性を検証した。KPCAの擬似的な因子負荷量は、従来の線形解析で見出した変数とは異なる変数に起因していることがわかり、埋もれた代謝情報の発掘を可能にしたといえる。さらに、この擬似的な因子負荷量が大きい物質と、入力情報である栄養素との関係性を示すためにアソシエーション分析 (MBA) を適用した。

近年問題視されているメタボリックシンドロームをはじめとする生活習慣病などは、ヒトの健康状態が急激に病へと変わるのではなく、日々の生活環境の影響で徐々に病へと傾いていくと考えることが出来る。また、日本では高齢化社会による医療費の増大から、医療費軽減や健康寿命の延長を目指す予防医療に関心が高まっている。そこで、非侵襲的試料であり、日々の生活環境を色濃く反映しているヒトの尿から健康状態などを把握し、健康管理へと活かすことの出来るような解析手法の構築を目指した^[33]。

本研究では、通常の日常生活を過ごすヒトの尿サンプルをNMRやICP-OESで計測した数値データ(出力情報)や、食事のデータ(入力情報)などから、ヒトの生活習慣と代謝レスポンスの関係性の抽出を試みた。

尿のNMRスペクトルから非線形主成分分析(KPCA)を遂行し、スコアを基にしたクラス分けにおいて貢献した変数の重要度を算出し、擬似的な因子負荷量を表現する方法を確立した(図9)。さらに、この擬似的な因子負荷量が大きい物質と、入力情報である栄養素との関係性を示すためにMBAを適用した。ここでは、MBAを用いて尿中の代謝物・ミネラルと前日の栄養素との関係性を検証した。算出された全ルールのうち、{入力(前日の栄養)}→{出力(午前に排出された代謝物・ミネラル)}の関係性が4,441ルール確認されたが、重要度の高いルールをリフト値1.2以上とし、1,307ルールを採用した。さらに、ルールの一部をネットワーク図として可視化した。TMAOが午前中にHigh-levelで排出されることが示され、前日のHigh-levelの魚食摂取や、魚に含まれる多価不飽和脂肪酸や ω -3不飽和脂肪酸のHigh-levelの摂取との関連が示唆された。

このように本研究例では、従来用いられていない手法を応用し、非線形手法と機械学習を組み合わせ、線形手法では見いだせない情報抽出が可能な解析手法の導入と、数値以外のデータも統合し解析することの出来るMBAの応用により、ヒトの生活習慣と代謝物の関係性を見出し、メタデータに対する解析手法の多様化及び高度化に成功した。

3-5. 腸内微生物代謝の特徴抽出(図10)

良好なプロバイオティクス種の摂取は、予防医学の観点からも期待がもたれる^[34]。我々は大腸

菌O157による感染死の予防株投与群と非予防群の代謝物プロファイルを区分化、他データと組み合わせることで酢酸の腸壁防御効果について*Nature*誌で提案することにも成功した^[35]。続く*Nature*誌続報として、高繊維食および低繊維食マウスの比較解析から、制御性T細胞の分化誘導が片利共生細菌による酪酸産生に起因している事を突き止めた^[36]。加えて最近では、有用ビフィズス菌種が酪酸産生以外にも、ビタミン前駆体合成に関与している例も報告した^[37]。他の微生物発酵産物としては、ギ酸が腸管細胞のタイト・ジャンクション増強に関与する例も報告した^[38]。

これらの腸内微生物産生の有機酸が、「脳腸相関」をはじめとする情報分子としての役割を担うことも近年盛んに報告されている。例えば、微生物産生酢酸が膵臓の β 細胞に働きかけてメタボリックシンドロームに関わるとされている一方^[39]、血液脳関門を通り海馬まで到着した酢酸が摂食行動を抑制するという報告もある^[40]。いずれも実験室系(マウス)での結果であったが、最近では個体差の激しいヒト血液データで実験室系と同様の機能性が得られるかを証明した^[41]。一方で、筆者らは冒頭で述べたように、データ駆動型アプローチによりヒトの毎食の栄養素データを区分化し、高蛋白/低蛋白な栄養摂取時にどのような代謝物、微生物種が増減するかメタボノミ

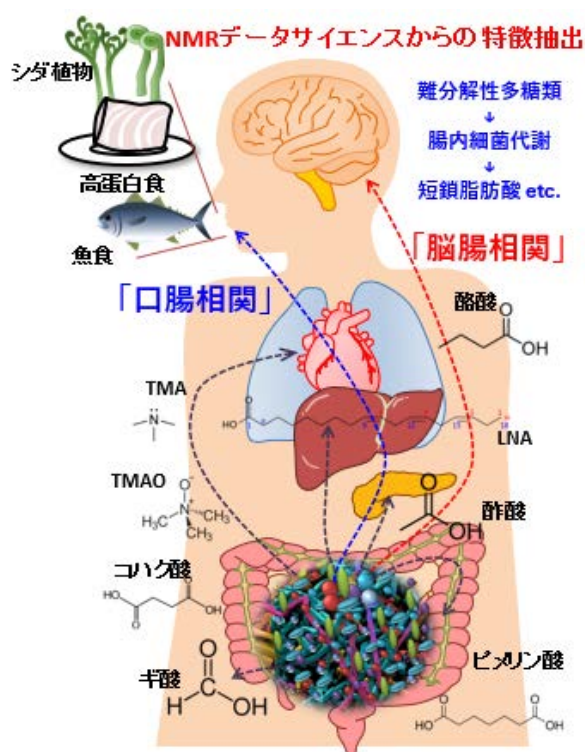


図10 腸内微生物代謝のNMR特徴抽出例

クス/マイクロバイオーーム解析した^[42]。その結果は低蛋白食の際に、上述の有機酸が増加する傾向が顕著となった。平均的な日本人のように世界水準からすると贅沢な食生活をしている場合、伝統的な和食文化に見られるような低蛋白食の方が腸内環境維持に好適なのかもしれない。

4. 環境

4-1. ブルーカーボン構成成分の量子化学計算と機械学習予測

脱石油社会への移行が叫ばれて久しいが、森林等の陸上バイオマスの炭素固定量が20 Gton/yであるのに対し、浅海で11 Gton/yおよび沖合では28 Gton/yと、海洋は圧倒的な炭素蓄積が可能である。特に沿岸に植えた海藻/海草(ブルーカーボン)に関しては、炭素固定から生態系復興のネイチャーポジティブに至るまで、漁業者を含めた市民から、当該海域を利用している民間企業に至る幅広い関心が寄せられている。

筆者らは緑藻ヘライワズタを実験室で生育させつつ、¹³C₂O₂ガスによる40%の¹³C標識試料を得て、良好な2D-および3D-NMRスペクトルを得た。H-H, C-HおよびC-Cネットワークをグラフ同型理論により半自動帰属するフラグメント集積手法によりシグナル帰属した^[43]。その物質確認に関しては、量子化学理論におけるシュレーディンガー方程式を厳密に解くことができれば、NMR化学シフト値を含む化合物特性を高精度に予測できるが、現在のコンピュータでは現実的な時間で解くことは困難である。そのため、代替手法として、ハートリー=フォック法や密度汎関数法を用いて、化合物特性を予測することが一般的である^[44]。しかしこの場合、理論値と実測値との間にある程度の誤差が生じる^[45]。そこで筆者らは、量子化学計算と機械学習の組み合わせによりこの誤差を学習・補正することで、高精度に化学シフトを予測する手法を開発した^[46]。

まず、化学シフトの予測モデルを作成するため、多様な化学構造を持つ150の化合物の化学シフトとスピン結合定数の理論値を、コンピュータを用いた量子化学計算により算出した。次に、これらの化合物の¹Hと¹³Cの化学シフトを、実際にNMR法を用いて取得し(実測値)、SpinAssign^[47]などのデータベースを用いて化合物の各部分骨格(部分構造)の同定を遂行した。

そして、化学シフトの理論値と実測値の誤差を

「目的変数Y」、理論化学シフト、理論スピン結合定数、構造記述子(隣接する元素の種類と個数)、極性溶媒の種類などを「説明変数X」とし、予測モデル作成のための機械学習用の学習データセットとした。

昨今のAI研究の進展に伴い、機械学習のアルゴリズムは多様化している。そこで、91種類の機械学習アルゴリズムを用いて予測モデルを網羅的に作成・評価し、最良の予測モデルを探索した。その結果、化学シフトの予測に最も適した機械学習アルゴリズムが極限勾配ブースティング(XGB)法であることを見つけ、最良の予測モデルを作成することができた(図11)。

4-2. 赤潮時海水の2D-Jスペクトル量子化学計算と機械学習予測

前述のようにPlanetary Boundary評価の初期から、農業肥料N/P流出による富栄養化は警鐘されてきた^[48]。湖沼の青子被害、内湾の赤潮被害が典型例であるが、東京湾のような一級河川が多く流入し、栄養負荷も高い内湾は毎年わたって、水温上昇し降雨量が増える5月頃より赤潮が発生する。天然海水は前述した海藻のように¹³C標識する訳にはいかないので、最も古典的な2D-NMRパルスプログラムであるが、計測時間あたりの感度が高い2D-Jスペクトルによって赤潮海水の良好なNMRデータを得た。

上述のように量子化学計算と機械学習の組み合わせにより、化学シフト予測精度の向上を達成できることを証明できたため、続いてスピン結合定数についても同様の試みを遂行した。ただ2018年の*Chemical Science*誌発表から2年が経過し、筆者の研究室でもケモインフォマティクスの各種ツール活用が進展してきたため、今回はRDKitの分子記述子も説明変数としつつ、またNMR実験の簡便さを求めて¹³C化学シフトを使わない「カーボンレス」のコンセプトで2D-J計測で得られる¹H化学シフトとⁿJ_{HH}(大抵は³J_{HH}だが、²J_{HH}も含まれる)値を予測することとした。SpinCoupleの標品データ^[49]と量子化学/機械学習予測データとの比較で、いずれのサンプル系でもスピン結合定数、¹H化学シフトの高い予測精度により、代謝混合物の物質同定支援に有用であると示唆された。特に本研究では予測J値よりカップリング・ツリーを自動生成するスペクトル・シミュレーションプログラムを作成したた

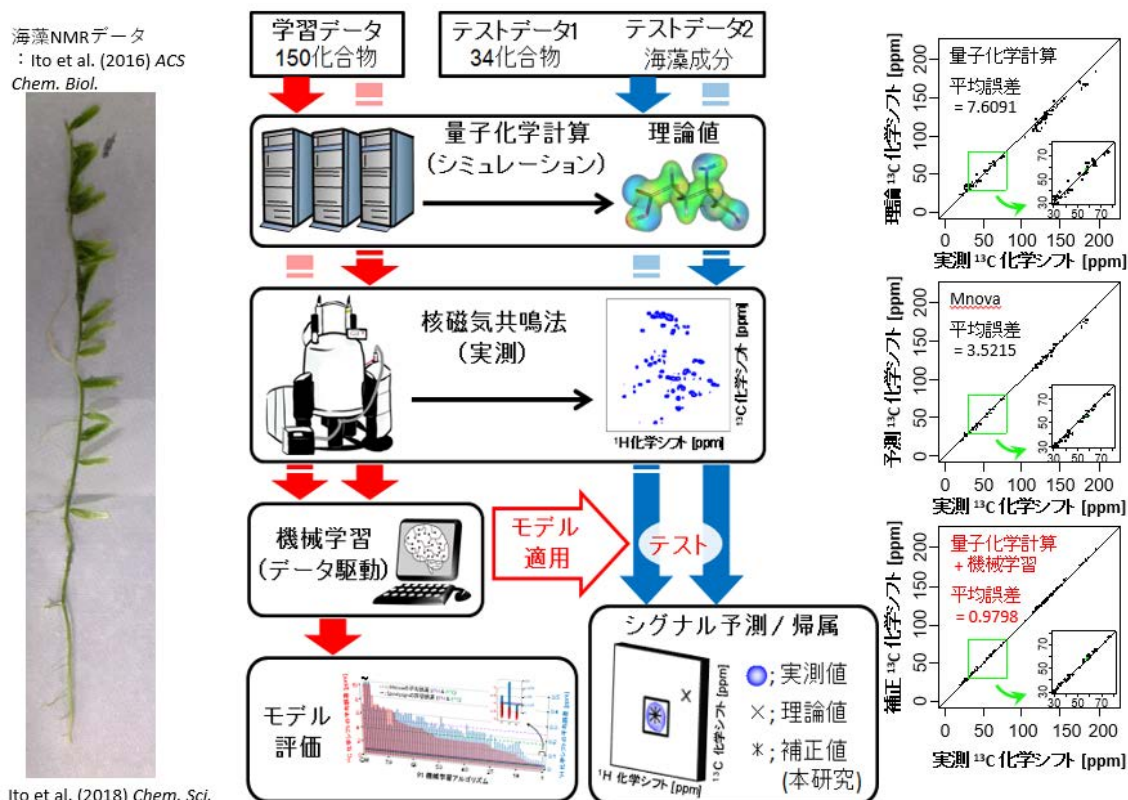


図11 機械学習用の学習データセットの詳細 (上): 量子化学計算により算出される理論化学シフトや理論スピン結合定数 (J) などを「説明変数X」として、予測対象の「目的変数Y (誤差)」に対して機械学習させる。(下): ^1H と ^{13}C のそれぞれの場合で、実測化学シフトと理論化学シフトの補正に重要な変数 (重要変数)。

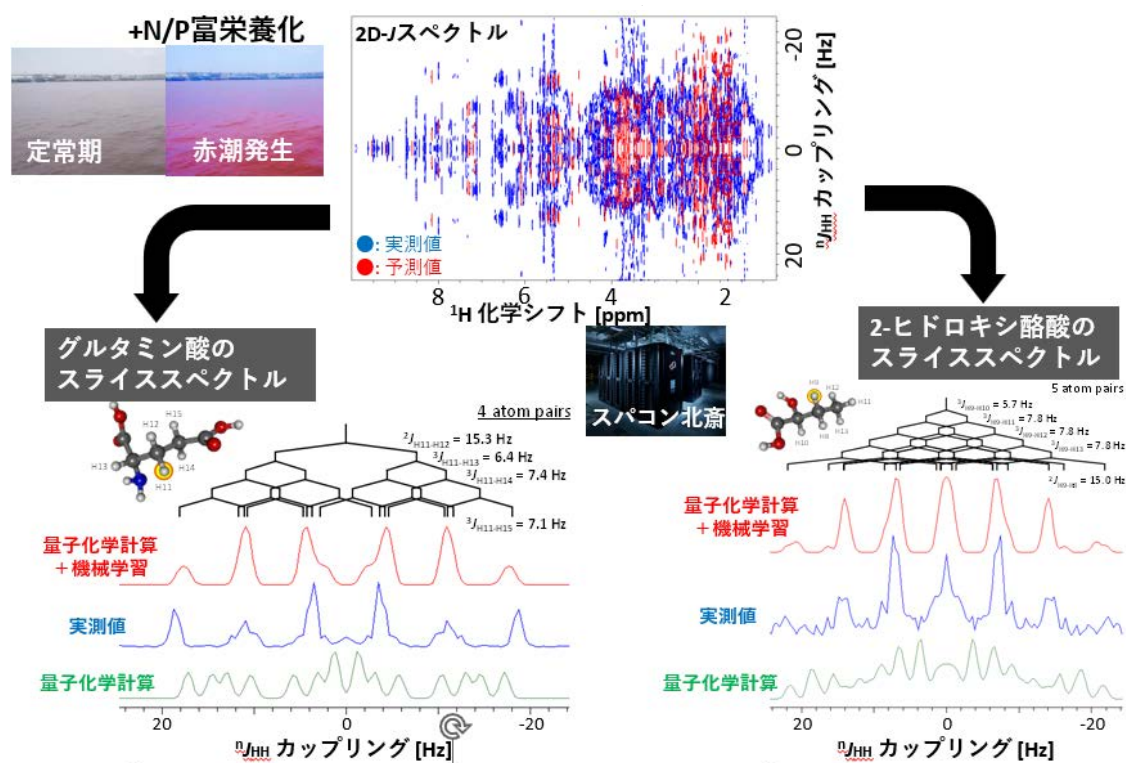


図12 量子化学計算と機械学習を用いたスピン結合定数の予測精度向上。本研究では前報のフラグメント記述子の他に、RDKit分子記述子や、ジェミナル水素対の磁氣的等価性も説明変数として用いた。パーミュテーション法により算出された重要因子は、 J 値に直結する説明変数が高い重要度を呈した。

め、マルチプレットの複雑なカップリングパターン解析にも援用し得る (図12)。

将来展望

今後の展開として、まず、本研究で採用した方法論の他分野への展開が挙げられる。例えばサーキュラーエコノミー (CE) への貢献としては、簡易的な品質評価機器であるTD-NMRを活用することで、マテリアルリサイクル時の高分子運動性と物性その他特性との連関解析により、CEプロセスDX化およびGX価値指標を与えることができるであろう。

2つ目の展開は、ブルーカーボン生態系等によるネイチャーポジティブ化、SX社会への貢献である。従来の生分解性材料の研究では、海洋に流出したポリマーの分解ばかりが注目され、生物群集形成プロセスを議論した論文はほとんど無い。筆者らは材料表面の物理化学特性を制御することで、そこにすみ着く微生物のメンバーを制御できる可能性を示している^[15b]。例えば、養殖場や洋上風力発電などで使われるロープは、タフな芯材の周りを微生物群集が形成されやすい材料でコーティングすれば、長く使える一方で表面には狙ったバイオフィームが形成され、生態系の回復に貢献する可能性がある。さらに、狙ったバイオフィーム表面と、藻場形成との因果関係を明らかにすれば、ブルーカーボンの増加にも貢献する可能性がある^[50]。

3つ目の展開は、カーボンニュートラルへの貢献である。本研究で取り上げたバイオ高分子は、バイオマスから製造可能なだけでなく、将来的にはゴミ焼却場などから回収したCO₂からのバイオプロセスによる製造も可能になると考えられている。本研究の成果は、こうした原油に依存しないカーボンニュートラルなポリマー材料の普及の一助となり得ると考えられる。

謝辞

本項で示した数々の研究成果は、歴代の菊地研究室所属員の多大なる努力の賜物である。ここに篤く御礼申し上げる。

引用文献

- [1] 菊地淳, アグリバイオ, **8**, 7-8(2023).
- [2] 菊地淳, in 藻類による二酸化炭素回収・固定化と有用物質生産 (Ed.: 植田充美). CMC出版, pp. 195-203(2025).
- [3] 菊地淳, in 食品分野におけるメタボリックプロファイリング (Ed.: 福崎英一郎). NTS出版, pp. 107-115(2021).
- [4] J. Kikuchi, S. Yamada, *Analyst*. **142**, 4161-4172(2017).
- [5] J. Kikuchi, K. Ito, Y. Date, *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* **104**, 56-88(2018).
- [6] S. Yamada, K. Ito, A. Kurotani, Y. Yamada, E. Chikayama, J. Kikuchi, *ACS Omega*. **4**, 3361-3369(2019).
- [7] S. Yamada, E. Chikayama, J. Kikuchi, *International journal of molecular sciences*. **22**, 1086(2021).
- [8] A. Takamura, K. Tsukamoto, K. Sakata, J. Kikuchi, *Scientific reports*. **11**, 24359(2021).
- [9] M. Okada, Y. Amamoto, J. Kikuchi, *Polymers (Basel)*. **16**, 824(2024).
- [10] K. Hara, S. Yamada, A. Kurotani, E. Chikayama, J. Kikuchi, *Scientific reports*. **12**, 10558(2022).
- [11] S. Yamada, Y. Tsuboi, D. Yokoyama, J. Kikuchi, *J Magn Reson*. **351**, 107438(2023).
- [12] 菊地淳, in 月刊プラスチック. Vol. **76**, p. 46(2025).
- [13] R. Fujita, Y. Amamoto, J. Kikuchi, *Npj Mat Degrad*. **9**, 72(2025).
- [14] D. Yokoyama, J. Kikuchi, *Environmental research*. **231**, 116202(2023).
- [15] a D. Yokoyama, A. Takamura, Y. Tsuboi, J. Kikuchi, *ISME communications*. **3**, 67(2023); b D. Yokoyama, Y. Tsuboi, H. Abe, R. Nagahata, H. Konno, M. Yoshida, J. Kikuchi, *The Science of the total environment*. **931**, 172401(2024).
- [16] A. Kurotani, T. Kakiuchi, J. Kikuchi, *ACS Omega*. **6**, 14278(2021).
- [17] X. Y. Ni, Y. Amamoto, J. Kikuchi, *Sustain Mater Techno*. **47**, e01781(2026).
- [18] X. Y. Ni, Y. Amamoto, J. Kikuchi, *Npj Mat Degrad*, **10**, 53(2026).
- [19] 山口秀幸, 関山恭代, 菊地淳, in *NMRによる有機材料分析とデータ解釈事例集* (2021).
- [20] K. Hara, S. Yamada, E. Chikayama, J. Kikuchi, *Processes*. **10**, 1264(2022).
- [21] a D. P. van Vuuren, J. C. Doelman, I. Schmidt Tagomori, A. H. W. Beusen, S. E. Cornell, J. Rockstrom, A. M. Schipper, E. Stehfest, G. Ambrosio, M. van den Berg, L. Bouwman, V. Daioglou, M. Harmsen, P. Lucas, K. I. van der Wijk, W. J. van Zeist, *Nature* **641**, 910-916(2025); b E. Chikayama, R. Yamashina, K. Komatsu, Y. Tsuboi, K. Sakata, J. Kikuchi, Y. Sekiyama, *Metabolites* **6**, 36(2016).
- [22] M. Maron, F. Quetier, M. Sarmiento, K. Ten Kate, M. C. Evans, J. W. Bull, J. P. G. Jones, S. Zu Ermgassen, E. J. Milner-Gulland, S. Brownlie, J. Treweek, A. von Hase, *Nat Ecol Evol* **8**, 14-17(2024).
- [23] L. J. McDonald, M. McManus, L. Newnes, *Cleaner Food Systems* **2**(2025).
- [24] T. M. Garlock, F. Asche, J. L. Anderson, H. Eggert, T. M. Anderson, B. Che, C. A. Chavez, J. Chu, N. Chukwuone, M. M. Dey, K. Fitzsimmons, J. Flores, J. Guillen, G. Kumar, L. Liu, I. Llorente, L. Nguyen, R. Nielsen, R. B. M. Pincinato, P. O. Sudhakaran, B. Tibesigwa, R. Tveteras, *Nat Commun* **15**, 5274(2024).
- [25] a Y. Date, T. Iikura, A. Yamazawa, S. Moriya, J. Kikuchi, *J Proteome Res* **11**, 5602-5610(2012); b A. Yamazawa, T. Iikura, A. Shino, Y. Date, J. Kikuchi, *Molecules* **18**, 9021-9033(2013); c A. Yamazawa, T.

- Ikura, Y. Morioka, A. Shino, Y. Ogata, Y. Date, J. Kikuchi, *Metabolites* **4**, 36–52(2013).
- [26] a K. Ito, K. Sakata, Y. Date, J. Kikuchi, *Anal Chem* **86**, 1098–1105(2014); b F. Wei, K. Ito, K. Sakata, Y. Date, J. Kikuchi, *Anal Chem* **87**, 2819–2826(2015).
- [27] a S. Yoshida, Y. Date, M. Akama, J. Kikuchi, *Scientific reports* **4**, 7005(2014); b T. Misawa, F. Wei, J. Kikuchi, *Anal Chem* **88**, 6130–6134(2016); c F. Wei, K. Sakata, T. Asakura, Y. Date, J. Kikuchi, *Scientific reports* **8**, 3478(2018); d F. Wei, K. Ito, K. Sakata, T. Asakura, Y. Date, J. Kikuchi, *Scientific reports* **11**, 3766(2021).
- [28] a Y. Date, J. Kikuchi, *Anal Chem* **90**, 1805–1810(2018); b Y. Date, F. Wei, Y. Tsuboi, K. Ito, K. Sakata, J. Kikuchi, *BMC chemistry* **15**, 13(2021); c T. Asakura, Y. Date, J. Kikuchi, *Analytica chimica acta* **1037**, 230–236(2018); d T. Asakura, K. Sakata, Y. Date, J. Kikuchi, *Anal Methods-Uk* **10**, 2160–2168(2018); e H. Shima, I. Murata, W. Feifei, K. Sakata, D. Yokoyama, J. Kikuchi, *Frontiers in microbiology* **13**, 991819(2022); f H. Shima, I. Matsunaga, J. Kikuchi, *The Science of the total environment* **1010**, 180972(2026).
- [29] a D. Yokoyama, S. Suzuki, T. Asakura, J. Kikuchi, *ACS Omega* **7**, 12654–12660(2022); b D. Yokoyama, S. Suzuki, T. Asakura, J. Kikuchi, *ACS Omega* **7**, 30399–30404(2022).
- [30] a T. Asakura, K. Sakata, S. Yoshida, Y. Date, J. Kikuchi, *PeerJ* **2**, e550(2014); b M. Takeuchi, E. Fujiwara-Nagata, K. Kuroda, K. Sakata, T. Narihiro, J. Kikuchi, *mSphere* **9**, e0030124(2024).
- [31] a A. Oita, Y. Tsuboi, Y. Date, T. Oshima, K. Sakata, A. Yokoyama, S. Moriya, J. Kikuchi, *The Science of the total environment* **636**, 12–19(2018); b K. Ito, X. Xu, J. Kikuchi, *Anal Chem* **93**, 6901–6906(2021).
- [32] K. Ito, Y. Tsuboi, J. Kikuchi, *Commun Chem* **3**, 1–8(2020).
- [33] a Y. Shiokawa, Y. Date, J. Kikuchi, *Scientific reports* **8**, 3426(2018); b H. Motegi, Y. Tsuboi, A. Saga, T. Kagami, M. Inoue, H. Toki, O. Minowa, T. Noda, J. Kikuchi, *Sci Rep* **5**, 15710(2015).
- [34] 菊地淳, in 実験医学 Vol. **32** (Eds.: 大野博司, 服部正平), 羊土社, pp. 699–705(2014).
- [35] S. Fukuda, H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J. M. Clarke, D. L. Topping, T. Suzuki, T. D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori, H. Ohno, *Nature* **469**, 543–547(2011).
- [36] Y. Furusawa, Y. Obata, S. Fukuda, T. A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, C. Uetake, K. Kato, T. Kato, M. Takahashi, N. N. Fukuda, S. Murakami, E. Miyauchi, S. Hino, K. Atarashi, S. Onawa, Y. Fujimura, T. Lockett, J. M. Clarke, D. L. Topping, M. Tomita, S. Hori, O. Ohara, T. Morita, H. Koseki, J. Kikuchi, K. Honda, K. Hase, H. Ohno, *Nature* **504**, 446–450(2013).
- [37] H. Sugahara, T. Odamaki, S. Fukuda, T. Kato, J. Z. Xiao, F. Abe, J. Kikuchi, H. Ohno, *Scientific reports* **5**, 13548(2015).
- [38] C. Y. Hsieh, T. Osaka, E. Moriyama, Y. Date, J. Kikuchi, S. Tsuneda, *Physiol Rep* **3**, e12327(2015).
- [39] T. Kato, K. Yamazaki, M. Nakajima, Y. Date, J. Kikuchi, K. Hase, H. Ohno, K. Yamazaki, *mSphere* **3**, e00460–18(2018).
- [40] K. Yamazaki, T. Kato, Y. Tsuboi, E. Miyauchi, W. Suda, K. Sato, M. Nakajima, M. Yokoji-Takeuchi, M. Yamada-Hara, T. Tsuzuno, A. Matsugishi, N. Takahashi, K. Tabeta, N. Miura, S. Okuda, J. Kikuchi, H. Ohno, K. Yamazaki, *Front Immunol* **12**, 766170(2021).
- [41] E. Miyauchi, K. Yamazaki, Y. Tsuboi, T. Nakajima, S. Ono, K. Mizuno, N. Takahashi, K. Imamura, H. Morita, N. Miura, S. Okuda, J. Kikuchi, N. Sasaki, H. Ohno, K. Yamazaki, *J Oral Microbiol* **17**, 2499284(2025).
- [42] T. Misawa, Y. Date, J. Kikuchi, *J Proteome Res*, **14**, 1526–1534(2015).
- [43] K. Ito, Y. Tsutsumi, Y. Date, J. Kikuchi, *ACS Chem Biol* **11**, 1030–1038(2016).
- [44] E. Chikayama, Y. Shimbo, K. Komatsu, J. Kikuchi, *J Phys Chem B* **120**, 3479–3487(2016).
- [45] a T. Misawa, T. Komatsu, Y. Date, J. Kikuchi, *Chem Commun* **52**, 2964–2967(2016); b T. Komatsu, R. Ohishi, A. Shino, J. Kikuchi, *Angew Chem Int Edit* **55**, 6000–6003(2016).
- [46] K. Ito, Y. Obuchi, E. Chikayama, Y. Date, J. Kikuchi, *Chem Sci* **2018**, 9, 8213–8220.
- [47] E. Chikayama, Y. Sekiyama, M. Okamoto, Y. Nakanishi, Y. Tsuboi, K. Akiyama, K. Saito, K. Shinozaki, J. Kikuchi, *Anal Chem* **82**, 1653–1658(2010).
- [48] a D. Gerten, J. Rockstrom, J. Heinke, W. Steffen, K. Richardson, S. Cornell, *Science* **348**, 1217(2015); b W. Steffen, K. Richardson, J. Rockstrom, S. E. Cornell, I. Fetzer, E. M. Bennett, R. Biggs, S. R. Carpenter, W. de Vries, C. A. de Wit, C. Folke, D. Gerten, J. Heinke, G. M. Mace, L. M. Persson, V. Ramanathan, B. Reyers, S. Sorlin, *Science* **347**, 1259855(2015).
- [49] J. Kikuchi, Y. Tsuboi, K. Komatsu, M. Gomi, E. Chikayama, Y. Date, *Anal Chem* **88**, 659–665(2016).
- [50] H. Miyamoto, N. Kawachi, A. Kurotani, S. Moriya, W. Suda, K. Suzuki, M. Matsuura, N. Tsuji, T. Nakaguma, C. Ishii, A. Tsuboi, C. Shindo, T. Kato, M. Udagawa, T. Satoh, S. Wada, H. Masuya, H. Miyamoto, H. Ohno, J. Kikuchi, *Environmental research* **219**, 115130(2023).



菊地 淳 (きくち・じゅん)

1998年 東京農工大学大学院工学研究科 修了 博士(工学)

1998–2004年 ERATO研究員、理化学研究所ゲノム科学総合研究センター・リサーチアシソシエイト/研究員

2005–2013年 理化学研究所植物科学研究センター・ユニットリーダー/チームリーダー

2013年–現在 理化学研究所環境資源科学研究センター・チームリーダー/チームディレクター、および名古屋大学大学院生命農学研究科・客員教授、横浜市立大学大学院生命医科学研究科・大学院客員教授

^{14}N スピンの操作方法

日本電子株式会社

西山 裕介

yunishiy@jeol.co.jp

1. はじめに

窒素は様々な分野で非常に重要な元素である。そこで、直接窒素原子を観測する方法としてNMRが広く用いられてきた。しかしながら、その測定はほとんどの場合は天然存在比が0.4%以下の ^{15}N NMRに頼っており、非常に感度が低い問題を抱えていた。一方で、天然存在比99%以上の ^{14}N NMRは核スピンの $I=1$ であり、四極子相互作用に起因する複雑なスピンドイナミクスのため敬遠されてきた。しかしながら固体状態であれば、四極子相互作用は比較的取り扱いやすく、例えば、高速の試料回転 ($> 70\text{kHz}$) の下で $^{14}\text{N}/^1\text{H}$ 相関固体NMRスペクトルが非常に容易に観測できることを我々は2011年に示し^[1]、広い範囲で応用されている。それでもなお、半整数四極子核と比べると、その応用と理解が進んでいないのが現状である。半整数四極子核には、対称な準位間 ($m \leftrightarrow -m$) のコヒーレンスであれば、非常に大きな一次の四極子相互作用に共鳴周波数が影響を受けない利点があることが大きい。一方で、spin $I=1$ の ^{14}N のsingle quantum (SQ) コヒーレンスは、一次の四極子相互作用によって共鳴周波数が変化する。本報告では、このようなスピンドイナミクスの理論的取り扱いの歴史から、 ^{14}N NMRへの応用を報告する。応用には ^{14}N cross-polarization (CP) および ^{14}N decouplingを扱う。

2. 試料回転の下での ^{14}N NMR

大きな異方的相互作用の存在下では、NMRスペクトルにはスピニングサイドバンドが現れる。大きな化学シフトの存在の下でのスピンドイナミクスを取り扱うためにjolting frameの考えがR.R. Ernstらによって提案された^[2]。この考えは、実験室系と回転系の関係を考えると理解しやすい。実験室系においてスピンハミルトニアンは、非常に大きなZeeman相互作用と (NMRにおいては) それよりも十分小さい相互作用から成り立ってい

る。そのため、スピンドイナミクスはZeeman相互作用に支配されており、小さな相互作用が見えにくい。そこで、Zeeman相互作用で定義されるinteraction frameである回転系を定義する。回転系ではZeeman相互作用が消えて、そのほかの小さな相互作用のみが (secular averagingされた形で) 残る。一方で、jolting frameは回転系における大きな異方的相互作用で定義されたinteraction frameであり、その中では問題となる大きな相互作用が消え去り、残りの相互作用が (変調を受けた形で) 残ることになる。これにより、jolting frameでは大きな化学シフト異方性を考えずにスピンドイナミクスが記述できるようになった。この考えは、四極子核にも拡張され、quadrupolar interaction frame^[3] やquadrupolar jolting frame (QJT)^[4] として理解されている。以下の議論ではQJTという表記を用いることにする。QJTにおいては大きな四極子相互作用は存在せず、ほかのinternal相互作用のみが残り、スピンドイナミクスが単純化されることが期待される。

非常に面白いことにQJTにおいては (試料回転周期で平均化した場合)、化学シフトHamiltonian、異種核双極子Hamiltonianは、回転系と同じ形を持つ^[5]。一方で、RF Hamiltonianは、1. 位相が四極子Hamiltonianの配向に依存する、2. 大きさがスケールされ、そのスケールングファクターも配向に依存する、3. さらに複雑な項も含まれている。1は、rfの位相が配向に依存するので、位相に異方性があると考えればよい。2は実効的なrf強度が弱くスケールされると考えてよい。ここで重要なことは、試料回転速度によってスケールの度合いは変化し、試料回転速度が速いほうがスケールングファクターが大きく、すなわち実効的なrf強度が強くなる。そのため、以下の理論的扱いを行う上で、高速の試料回転は必須である。また、同時にrf強度は試料回転よりも弱くないと高次の項が大きくなってきて複雑にな

る。十分なrf強度を照射するためにも高速の試料回転は必須である。3はここでは無視しておく。やや乱暴な議論ではあるが、この理解を行うとQJTでの ^{14}N -X異種核2スピン系でのスピンドYNAMIXは、rfの位相の異方性とスケーリングを除いて二つの異種核spin-1/2からなるスピンペアと同一になることがわかる。これが以降の議論を非常に単純にしてくれる。

まず、思考実験として ^{14}N のsingle pulse測定を考えよう。 ^{14}N の縦磁化はQJTにおいて ^{14}N パルスにより倒される。実効的なrf強度がスケールされているためパルスの長さは、 B_1 強度で予想される90度パルスの長さよりも長くなる。より重要なことに、パルスの位相が異方性を持つため、結果として生成する ^{14}N の横磁化も異方性を持つ。サンプルの配向 Ω にたいして、励起パルスの実効的な位相 $=\alpha(\Omega)$ となり、異方性が示される。この時生成する横磁化の位相は $\alpha(\Omega)-90^\circ$ となり、こちらも異方性をしめす。そのため、横磁化の生成はできるものの粉末試料においては横磁化どうしが打ち消しあってしまう、結果として非常に弱い信号強度となってしまう。これが(大きな四極子がある場合に) ^{14}N NMRが単純には観測できない理由である。次に $^1\text{H}\rightarrow^{14}\text{N}$ CPを考えよう。 ^1H は通常通りスピロックできる。 ^{14}N もrf強度はスケールされてしまうものの、スピロックできる。さらに重要なことに ^1H - ^{14}N 異種核双極子Hamiltonianは回転系と同一であるため、 ^{14}N の実効的なrf強度を考慮に入れた条件でCPが起こり、 ^1H の横磁化は ^{14}N の横磁化に転送することができる。ここで、 ^{14}N のスピロックの方向には異方性があることを忘れてはならない。CPで生じる磁化は ^{14}N のスピロックの方向($\alpha(\Omega)$)に生成するため、結果として得られる ^{14}N の横磁化の位相($\alpha(\Omega)$)には異方性が残る。そのため、粉末試料の場合には横磁化同士が打ち消しあってしまう、シングルパルス測定と同様に ^{14}N NMRの信号が非常に弱くなってしまう。ここで重要なことはCPそのものは起きているという点である。実際に、位相の異方性がキャンセルされる $^1\text{H}\rightarrow^{14}\text{N}\rightarrow^1\text{H}$ double CPでは正しく信号が観測できることが報告されている^[6, 7]。Double CPのパルスシーケンスを図1Aに示す。最初のCPにおいて生成する ^{14}N の磁化は異方性を持ち、配向 Ω にしたがって分布する。スピロックパルスの実効的

な位相 $=\alpha(\Omega)$ のとき、生成する ^{14}N の位相 $=\alpha(\Omega)$ となる。 t_1 時間発展のあと、二つ目のCPのスピロックが行われる。ここで、スピロックパルスの実効的な位相 $=\alpha(\Omega)$ となり、一つ目のCPで生じた位相の異方性がキャンセルされ、異方性にかかわらず ^{14}N 磁化をスピロックすることができる。結果として実験的に得られた ^1H の磁化強度を ^1H 及び ^{14}N の回転系におけるrf強度でプロットした図を図1Bに示す。

3. ^{14}N CPMAS^[8]

上記のように通常通り ^1H 磁化を起点とした ^{14}N CPMASは観測が困難である。ここで、逆に ^{14}N 磁化を起点にすることを考える。図1Cにパルスシーケンスを示す。先の ^{14}N single pulseの思考実験でわかるとおり、 ^{14}N の横磁化はsingle pulseで生成することができる。その磁化の位相は、分子の配向 Ω に応じて分布している。次に励起パルスから90度位相をずらしたスピロックパルスを照射する。ここで ^{14}N RFパルスの実効的な位相は(励起パルス $=\alpha(\Omega)$ 、スピロックパルス $\alpha(\Omega)+90^\circ$)となる。励起パルスで生成する横磁化は $\alpha(\Omega)-90^\circ$ の位相を持っているため、分子の配向に依存せずこの横磁化をスピロックすることができる。 ^1H には通常通りスピロックパルスを照射すると、Hartmann-Hahn条件が満たされていれば ^{14}N の横磁化は ^1H にCPで転送されることになる。 ^1H の磁化はQJTではなく通常の回転系で記述されるため通常の回転系の検出を行えば、観測ができる。CP条件は、 ^{14}N のrf強度の実効値がスケールされることを除いて、通常のspin-1/2系と同様であり、 $n=1, 2$ のZQCP、DQCPが実験および計算信号強度で確認された(図1D, E, F)。計算スペクトルはSIMPSON^[9-11]によるスピンドYNAMIX計算で得られた。さらに実験スペクトルでは $n=0$ のSOCPも(^1H , ^{14}N) $= (5-10\text{ kHz}, 30-50\text{ kHz})$ 付近に実験的に観測された(図1D)。SOCPは3スピンの関わる二次の効果であり、 ^{14}N - ^1H からなる2スピン系で行った計算では明瞭には観測されていない(図1E, F)。このCPメカニズムでは、励起パルスで発生した位相の異方性が、スピロックパルスで補正されることが重要である。確認のために、励起パルスでの異方性がないCPスペクトルを計算した(図1G, H)。予期されたように励起パルスで異方性が含まれていなければ、スピロックパルスの位

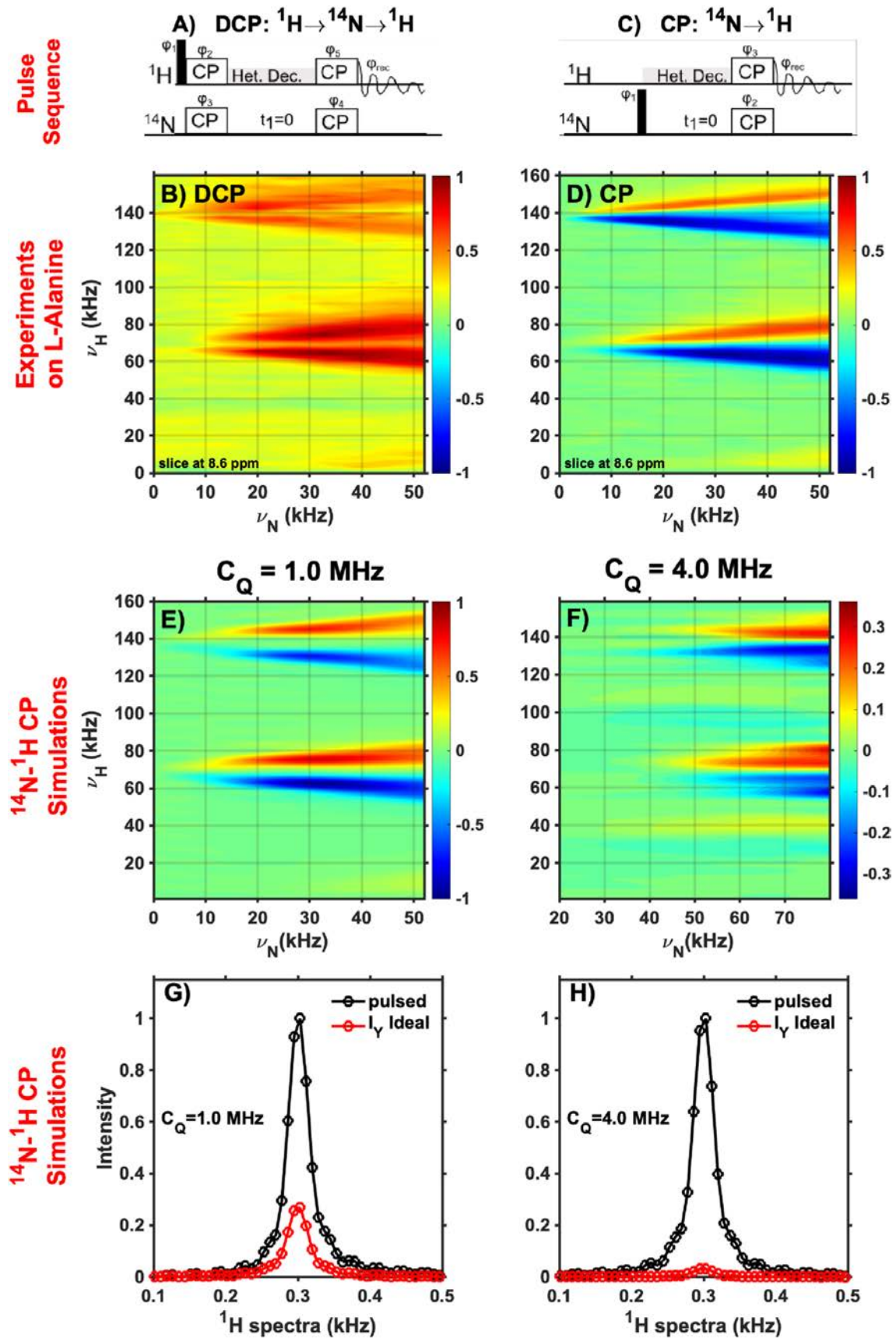


図1 (A, C) それぞれ $^1\text{H} \rightarrow ^{14}\text{N} \rightarrow ^1\text{H}$ double CP および $^{14}\text{N} \rightarrow ^1\text{H}$ CP のパルスシーケンス。有限の t_1 展開時間を入れることにより 2次元異種核間相関スペクトルの計測にも利用できる。(B, D) それぞれ double CP および CP において、 ^1H スペクトル強度を CP の間の $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ の rf 強度に対してプロットした。それぞれ 1.0 MHz および 4.0 MHz の四極子定数を用いて得られた計算 CP 信号強度の 2次元プロット (E, F) および 1D ^1H CP スペクトル (G, H)。1D スペクトルは、有限幅を持つ ^{14}N パルスで励起したもの (黒) と δ パルスで励起したもの (赤) を示す。Reproduced from Ref. 8 with permission from Elsevier.

相の異方性の影響をキャンセルできずスピロックが不完全となり、弱い信号強度となった。このように ^{14}N 磁化を起点とすることにより $^{14}\text{N} \rightarrow ^1\text{H}$ CPMASが容易に観測できることを示した。

4. ^{14}N CW decoupling^[12]

CPMASと言え、CPだけでなくデカップリングも重要な要素である。 ^{14}N に結合したspin-1/2核は、 $\text{X}-^{14}\text{N}$ の間のJ couplingおよび双極子相互作用のみならず、residual dipolar splitting (RDS)を持つ^[13~15]。前者二つはspin-1/2ペアと同様であるが、RDSは四極子相互作用と双極子相互作用の二次の相互作用となる。MASの下で1次の近似では、双極子相互作用は平均化されるものの、J couplingとRDSは依然として残る。なかでもRDSの大きさは、Larmor frequencyの逆数にリニアにスケールされるため、磁場が低い場合は大きくなる。以前は、 ^{13}C NMRは、C-Nの結合をもつピークがRDSにより2:1の分裂様(スプリッティング)を示していた。このスプリッティングは様々な情報を含んでおり、盛んに研究がなされていた。磁場が低い(7.1Tなど)ときにはRDSが大きかったため目立つ相互作用として観測されていたが、磁場が高く(14.1Tなど)になると ^{13}C

NMRでのRDSは小さくなり、あまり議論されなくなってきた。しかしながら ^1H NMRでは、 $^1\text{H}-^{14}\text{N}$ の強い双極子相互作用のために14.1Tでも依然として大きな(数百Hzに及ぶ)RDSが観測される。そのため、NHプロトンの ^1H NMRは、ほかのピークと比べると太い線幅を持つ。図2に70 kHzの試料回転の下で14.1Tの磁場で観測された ^1H NMRスペクトルを示す。8 ppm付近に現れているNHプロトンの信号が、ほかのプロトンの信号よりブロードになっていることがわかる。 ^{15}N double CPで $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ ペアの ^1H のみを選択的に励起し、 ^{15}N デカップリングの下で観測すると線幅が細くなることが示された。同様に ^{14}N デカップルが実現すれば、天然存在比ではほとんどを占める $^{14}\text{N}-^1\text{H}$ ペアであってもより高分解能のNHプロトン測定が可能になる。

デカップリングは、カップリングしている相手の核の状態を素早くmodulateしてやれば実現する。 ^1H 観測の下での ^{14}N デカップリングは、 ^{14}N のコヒーレンスを操作すればよい。 ^{14}N のQJTでのスピンドダイナミクスの議論をふまえるとこれは容易なことだ。単に ^{14}N にrfパルス照射すれば、 ^{14}N 核の状態をmodulateできる。実際に ^{14}N CWデカップリングの下で、 ^1H の線幅が細くなる

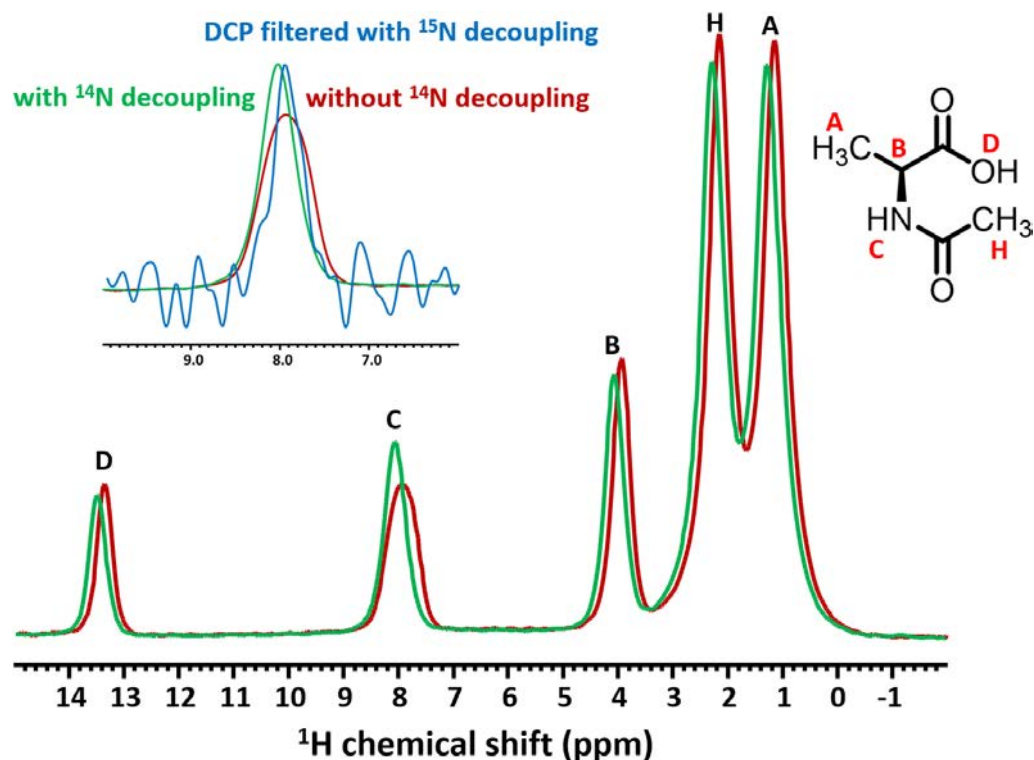


図2 70 kHzの試料回転の下で観測されたN-acetyl-L-alanineの ^1H NMRスペクトル。CWデカップリング無し(赤)およびあり(緑)を重ねた。NHプロトンはCで示される。Double CPで $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ のみ選択的に励起し ^{15}N デカップリングの下で観測した ^1H スペクトル(青)も左上に重ねてある。Reproduced from Ref. 12 with permission from Elsevier.

ことが観測された(図2)。より細くなることを期待して ^{14}N デカップリングの強度を強くすると、驚いたことに ^1H の線幅はどんどん太くなっていった(図3a)。普段あまり意識しないことであるが、これは異種核Bloch-Siegert (BS) シフトと ^{14}N の B_1 の不均一性のなせる技である。NMRにおいてrf強度は、対象核種のgyromagnetic ratioをかけて、Hz単位で記述されることが多い。実のところ、同じように100 kHzと言っても ^{14}N の B_1 強度は ^1H の B_1 強度のおおよそ14倍も大きい。さらにBSシフトは、2次の相互作用なのでその大きさは B_1^2 依存を持ち、 ^{14}N 照射の下で ^1H で観測されるBSシフトは、 ^1H 照射の下で ^{14}N で観測されるBSシフトとおおよそ192倍も大きいこと

になる。簡単に数百Hzのオーダーに達する。このように、低周波核にrfを照射するときのBSシフトは十分注意する必要がある。実際に観測されたBSシフトと、 B_1 強度から計算されるBSシフトはよく一致する(図3a, b)。困ったことに、 B_1 磁場は完全に均一ではないので、その不均一性を反映してBSシフトも分布することになる。さらに悪いことに B_1^2 依存性のために、その効果はより強調される。この効果のために ^1H スペクトルの線幅は ^{14}N デカップルにおいてブロードニングする(図3a)。なお、 ^1H デカップルの下でのBS「ブロードニング」は、Takedaにより既に報告されている^[16]。

上記の議論を踏まえて、 ^{14}N デカップリングの

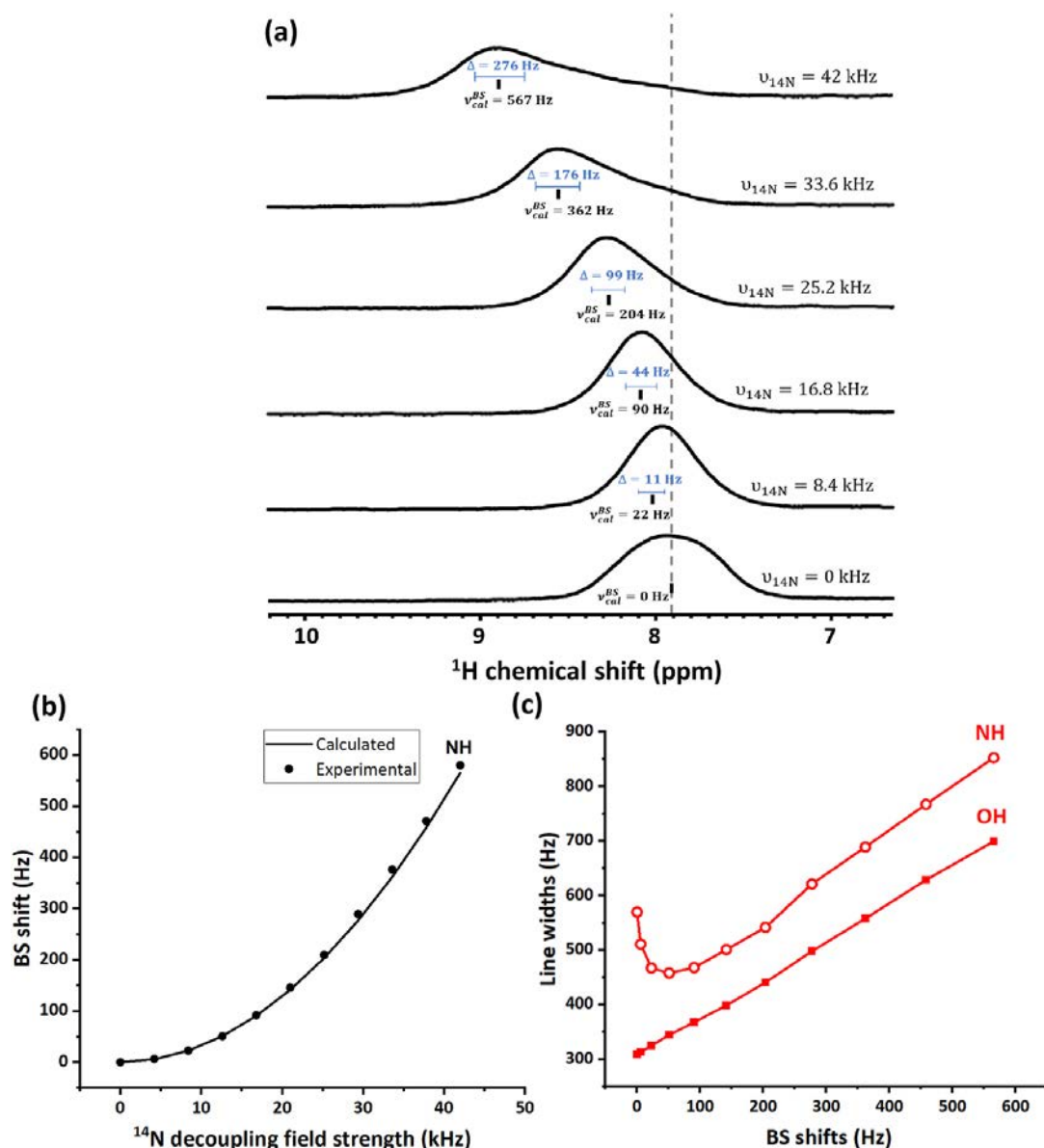


図3 (a) 様々な ^{14}N CWデカップリング強度で観測したN-acetyl-L-alanineのNHプロトンスペクトル。計算されたBSシフトと実測のピーク位置の比較を(b)に示す。(c) NHおよびOHの線幅をピークトップから20%の強度の位置の線幅で比較した。Reproduced from Ref. 12 with permission from Elsevier.

条件を考える。まず、BSブロードニングを抑えるため ^{14}N rf強度は十分弱くする必要がある。 ^{14}N の実効的なrf強度はさらにスケールされるため、実効値はより小さくなる。そのため、デカップルの帯域は狭くなり、オンレゾナンス照射が要求される。図4bにCWデカップリングの下で観測されたスペクトル強度のオフセット依存性を示す。 ^{14}N のセンターピークはおおよそ10 kHzの位置に現れる。センターバンドもしくはスピニングサイドバンドが ^{14}N デカップリングにオンレゾナンス

の時にデカップリングが効率的に働き、線幅が細く、信号強度が強くなっていることがわかる。オンレゾナンス照射の下で、 ^{14}N デカップル効率とBSブロードニングの二つの相反するファクターの妥協点を実験的に見つける必要がある。図3cにNH信号の線幅と ^{14}N デカップリングパワーの相関を示す。OH信号の線幅がBSブロードニングのためにデカップリングパワーに対して単調増加するのに対して、NH信号の線幅は最初は ^{14}N デカップリングの効果が支配的で線幅が細く

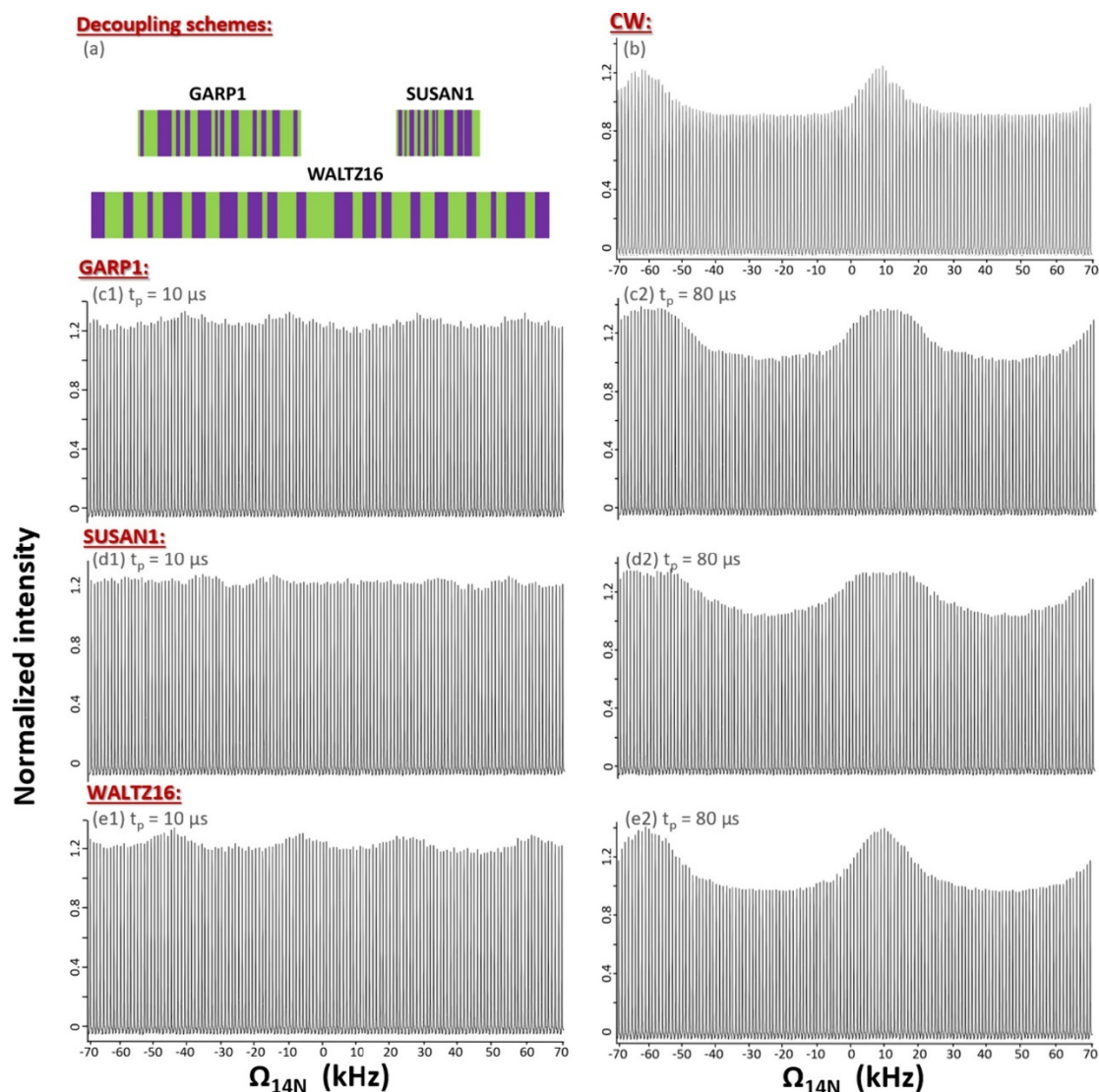


図4 (a) GARP1およびWALTZ16, SUSAN1の図示: GARP1 ($0.388t_p, 0.613t_p, 2.864t_p, 2.981t_p, 0.77t_p, 0.6911t_p, 0.944t_p, 1.02t_p, 1.494t_p, 2.845t_p, 0.737t_p, 0.51t_p, 0.2833t_p, 0.8077t_p, 1.327t_p, 1.535t_p, 2.871t_p, 0.7211t_p, 0.7877t_p, 0.8577t_p, 1.091t_p, 1.484t_p, 2.843t_p, 0.728t_p, 0.5933t_p$), SUSAN1 ($0.307t_p, 0.663t_p, 0.417t_p, 0.196t_p, 0.456t_p, 0.88t_p, 0.485t_p, 0.3811t_p, 0.756t_p, 0.907t_p, 0.672t_p, 0.547t_p, 0.001t_p, 0.4122t_p, 1.225t_p, 1.815t_p, 0.7355t_p, 1.227t_p, 0.009t_p, 1.616t_p, 1.644t_p$), WALTZ16 (RRRR, $R = 3t_p, 4t_p, 2t_p, 3t_p, 1t_p, 2t_p, 4t_p, 2t_p, 3t_p$)。ここで t_p は名目90度パルス幅であり、パルスのタイミングを示す。位相は0度および180度(下線部分)を繰り返す。(b-e)様々な ^{14}N デカップリングオフセットに対して測定したN-acetyl-L-alanineのNHプロトンの ^1H NMRスペクトル。70 kHzの試料回転を用いた。デカップリングスキームは(b) CW、(c) GARP1、(d) SUSAN1、(e) WALTZ16を(c1-e1) $t_p = 10 \mu\text{s}$ 、(c2-e2) $t_p = 80 \mu\text{s}$ の条件で用いた。RF強度はCW: 14.4 kHz、GARP1/SUSAN1/WALTZ16: 15.8 kHzに設定した。Reproduced with permission from Ref. 17. Copyright 2026 American Chemical Society.

なり、そのあとはBSブロードニングが支配的となって線幅が太くなっていることが観測される。このように ^{14}N デカップリングでは適切なデカップリングrf強度を設定することが重要である。

5. ^{14}N broadband decoupling^[17]

さて、 ^{14}N のCPおよびデカップリングが可能なが上記のように示されたが、オンレゾナンスでないでデカップルできないというのは、使い勝手が悪い。ここで溶液NMRの歴史を見ると、弱いrfで広帯域デカップリングを行う努力が長く続けられてきた。この知見を ^{14}N デカップルにそのまま当てはめられるのではないか？ この考えに基づいてWALTZ16、GARP1、SUSAN1といった溶液NMRデカップリング法を ^{14}N デカップリングに適用した。結果はすこぶる良好で、デカップリングに用いられるパルス幅を調整することで、オフセットにほとんど依存しない非常に良いデカップリング性能を実現できた(図4)。具体的にはSUSANの名目90度パルス幅(t_p)を10–20 μs に設定することをブロードバンドデカップリングにお勧めする。一方で、名目90度パルス幅(t_p)を80 μs と長く設定すると、オンレゾナンス照射が必要になるものの、ブロードバンドデカップリングやCWデカップリングよりも性能の良いデカップリングが実現した。 ^{14}N 信号の現れる帯域に応じてこれら二つの条件を選択すればよいだろう。

最後に ^{14}N デカップリングの実サンプルへの適用について議論する。NHプロトンが重要になる系として、タンパク質が一つの例として挙げられるだろう。図5にback exchangeした $[\text{U-}^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{14}\text{N}]$ - α -spectrin SH3ドメインの ^1H スペクトルを示す。このサンプルに含まれている ^1H はNHプロトンのみであり、 ^{14}N - ^1H カップリングによりブロードニングする。CWデカップリングの下で一部のピークが先鋭化するものの、ほとんどのピークの線幅は変化がない。これは ^{14}N のピーク位置が幅広く分布し、オンレゾナンス条件が一部のNHにしか当てはまらないからである。そこでSUSAN1デカップリングを行うと、大幅に状況が改善していることがわかる。ここでBSシフトによるピーク位置のずれは補正していない。またこれは、 ^{14}N デカップリングの下で化学シフトレファレンスを適切に行うことが重要であることをよく示している。

6. おわりに

「四極子相互作用」と聞くと、あまり深く考えることなく複雑なスピンドYNAMICSを想定するだろう。わたし自身おなじであった。しかしながら、その理論的な取り扱いとは40年前にすでに確立しており、それを適用するだけで非常にシンプルな ^{14}N NMRの世界が開かれた。高速回転の下で利用ができる ^{14}N CPや ^{14}N デカップリングなど、固体NMRで今後必要になる重要なブロック

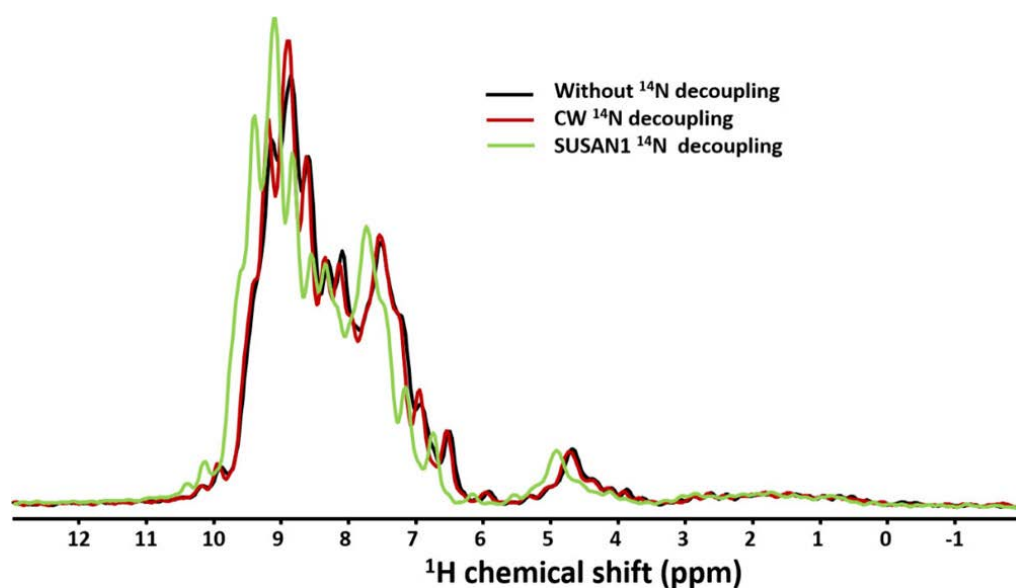


図5 アミドプロトンを50–70% バックエクスチェンジした $[\text{U-}^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{14}\text{N}]$ - α -spectrin SH3ドメインの ^1H NMRスペクトル。 ^1H - ^{13}CO - ^1H selective-double CPにより観測した。Reproduced with permission from Ref. 17. Copyright 2026 American Chemical Society.

が完成した。さらに今後の進展を期待しながら開発を進めたい。

7. 謝辞

本研究は、TIFR HyderabadのProf. Vipin Agarwalとの非常に強力な共同研究によりまとめ上げることができた。 ^{14}N デカップリングの確立のために精力的に研究を進めてくれたJEOLのDr. Ekta Nehraに深く感謝する。Charles UniversityのProf. Zdeněk TošnerがSIMPSONシミュレーションプログラムをRDS対応に拡張してくれたおかげで、数値計算を実行できた。TIFR HyderabadのDr. Sreejith Raran-Kurussiには、NMR実験およびサンプル調製での尽力に感謝する。

参考文献

- [1] Y. Nishiyama*, Y. Endo, T. Nemoto, H. Utsumi, K. Yamauchi, K. Hioka, T. Asakura, *J. Magn. Reson.* **208**, 44–48 (2011). DOI: 10.1016/j.jmr.2010.10.001
- [2] P. Caravatti, G. Bodenhausen, R.R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **55**, 88–103 (1983). DOI: 10.1016/0022-2364(83)90279-2
- [3] M. Edén, L. Frydman, *J. Chem. Phys.* **114**, 4116–4123 (2001). DOI: 10.1063/1.1344886
- [4] A.J. Pell, K.J. Sanders, S. Wegner, G. Pintacuda, C.P. Grey, *J. Chem. Phys.* **146**, 194202 (2017). DOI: 10.1063/1.4983220
- [5] I. Hung, P. Gor'kov, Z. Gan, *J. Chem. Phys.* **151**, 154202 (2019). DOI: 10.1063/1.5126599
- [6] J. A. Jarvis, I. M. Haies, P. T. F. Williamson, M. Caravatta, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 7613–7620 (2013). DOI: 10.1039/c3cp50787d
- [7] D. Carnevale, X. Ji, G. Bodenhausen, *J. Chem. Phys.* **147**, 184201 (2017). DOI: 10.1063/1.5000689
- [8] V. Agarwal*, S. Raran-Kurussi, Y. Nishiyama*, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **136**, 101992 (2025). DOI: 10.1016/j.ssnmr.2025.101992
- [9] M. Bak, J.T. Rasmussen, N.C. Nielsen, *J. Magn. Reson.* **147**, 296–330 (2000). DOI: 10.1006/jmre.2000.2179
- [10] Z. Tošner, R. Andersen, B. Stevansson, M. Edén, N.C. Nielsen, T. Vosegaard, *J. Magn. Reson.* **246**, 79–93 (2014). DOI: 10.1016/j.jmr.2014.07.002
- [11] D.W. Juhla, Z. Tošner, T. Vosegaard, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **100**, 1–59 (2019). DOI: bs.arnmr.2019.12.001
- [12] E. Nehra, V. Agarwal*, Y. Nishiyama*, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **137**, 102006 (2025). DOI: 10.1016/j.ssnmr.2025.102006
- [13] A. Naito, S. Ganapathy, C.A. McDowell, *J. Chem. Phys.* **74**, 5393–5397 (1981). DOI: 10.1063/1.440968
- [14] A. Naito, S. Ganapathy, K. Akasaka, C.A. McDowell, *J. Chem. Phys.* **74**, 3190–3197 (1981). DOI: 10.1063/1.441513
- [15] A. Naito, S. Ganapathy, C.A. McDowell, *J. Magn. Reson.* **48**, 367–381 (1982). DOI: 10.1016/0022-2364(82)90071-3
- [16] K. Takeda, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **47–48**, 1–9 (2012). DOI: 10.1016/j.ssnmr.2012.09.002
- [17] E. Nehra, Z. Tošner, S. Raran-Kurussi, V. Agarwal*, Y. Nishiyama*, *J. Phys. Chem. Lett.* **17**, 2380–2388 (2026). DOI: 10.1021/acs.jpcclett.5c03828



西山 裕介 (にしやま・ゆうすけ)

2002年 博士(理学)取得

2002–2007年 理化学研究所 横浜研究所ポスドク

2007年– 日本電子株式会社 (途中株式会社JEOL RESONANCE) (現職)

2014–2023年 理研JEOL連携センターユニットリーダー

$R_{1\rho}$ 緩和分散法による核酸分子の構造ダイナミクスの解析

東京薬科大学 薬学部

阪本 知樹

tomodna@toyaku.ac.jp

1. はじめに

タンパク質や核酸などの生体高分子は、その立体構造によって生物学的機能を発揮する。これらの分子の一次構造は、構成単位であるアミノ酸やヌクレオチドが一定の順序で連結した配列として、紙面上に一次的に表すことができる。実際、生体内における合成過程でも、これらの構成単位は一つずつ順に連結され、鎖状の分子が形成される。しかし、このような鎖状の分子が機能を発揮するためには、三次元空間において適切な立体構造へと折りたたまれる必要がある。この折りたたみの過程をフォールディングと呼ぶ。すなわち、配列として表される一次元の情報は、フォールディングを通じて三次元の立体構造へと変換され、その構造に基づいて生物学的機能が発現する。

では、折りたたまれた生体高分子の構造は、一つに固定されているのだろうか。タンパク質は、加熱や変性剤の添加によって、折りたたまれた状態（フォールド状態）から、折りたたまれていない状態（アンフォールド状態）へと移行する。両者の間に位置するすべての立体配座が、安定な中間状態として観測可能であるとは限らない。しかし、フォールド状態とアンフォールド状態は完全に切り離されたものではなく、立体配座空間上では、さまざまな立体配座を介した連続的な構造変化によって結ばれていると考えられる。この連続性からも、タンパク質が構造的な柔軟性をもつことが理解できる。実際、溶液中の生体高分子は一つの静的な構造に固定されているのではなく、平衡状態において複数の立体配座をとり、それらの間を絶えず行き来している^[1]。

このような動的な性質は、タンパク質分子だけでなく核酸分子にも共通している。DNAの二重らせん構造が示された1953年の時点で、少なくともDNAの複製には、塩基対の解離と形成を伴う動的な構造変化が必要であることがすでに示

唆されていた^[2~4]。実際、複製や転写の際には、DNAの二重らせん構造が局所的にほどけ、露出した一本鎖が鋳型として用いられる。複製では各鋳型鎖に相補的な新たな鎖が合成され、転写ではRNAの合成後にDNA鎖が再び対合する。すなわち、DNAは安定な二重らせん構造によって遺伝情報を保持する一方で、転写や複製の過程においては塩基対の解離と形成を繰り返す動的な分子である。

酵素反応は、酵素が基質を認識して結合し、それに続く化学反応を触媒することで進行する。また、シグナル伝達も、受容体とリガンド、あるいはシグナル伝達に関与する分子同士が相互作用することで開始され、その後の反応へと進行する。このように、生命現象の多くは、生体高分子間の相互作用によって駆動されている。生体高分子が相手分子を特異的に認識するためには、結合部位の形状や電荷分布、水素結合部位などが互いに適合する必要がある。その際、分子は、あらかじめ存在する複数の構造の中から相互作用に適した構造を選択したり、結合に伴って構造を変化させたりする。すなわち、生体高分子間の相互作用には、しばしば立体構造の変化を伴う。このため、立体配座空間における各構造の存在比と、それらの構造間を行き来する速度は、相互作用に適した構造がどの程度、どのようなタイムスケールで利用可能になるかを規定する^[1]。これらの性質は、分子認識や結合/解離、さらには反応の熱力学および速度論と密接に関係している。したがって、どのような立体配座がどの程度存在し、それらの間をどのような速度で行き来するのかを明らかにすることは、生体高分子の機能を理解するうえで不可欠である。

本稿では、生体高分子が複数の立体配座をとり、それらの間を行き来する現象を構造ダイナミクスと呼ぶ。以後、特に断らない限り、本稿でいう構造ダイナミクスは、この立体配座間の交換を

指す。生体高分子のダイナミクスという語は、時間的にも空間的にも幅広い現象を含み得るため、本稿では対象を明確にするためにこのように定義する。なお、NMRにおいて、立体配座、結合状態、プロトン化状態などの異なる状態間を分子が行き来する現象を化学交換と呼ぶ。

本稿は、2025年第64回NMR討論会（沖縄科学技術大学院大学）チュートリアルコース「NMR法で捉える生体高分子の構造ダイナミクス」と題した筆者の講演を基に執筆した。当チュートリアルコースは、同討論会2日目に開催されたHashim M. Al-Hashimi先生（Columbia University）の招待講演「A quantitative and predictive model of RNA cellular activity based on conformational ensembles」に先立って行われたものである。本稿では、NMR法を用いた核酸分子の構造ダイナミクスの解析、とりわけマイクロ秒～ミリ秒スケールの化学交換を捉える $R_{1\rho}$ 緩和分散法の原理と応用を解説することを目的とする。内容は核酸分子の解析を中心に想定しているが、測定の方法や考え方は、タンパク質分子や他の分子の構造ダイナミクスの解析を目的としたその他のNMR測定の理解にも応用可能である。本稿でも測定の原理の解説に努めるが、詳細についてはこれらの総説^[5~8]も参照されたい。

$R_{1\rho}$ 緩和分散法の理論は筆者にとって平易ではなく、筆者自身、わかったつもりになってはやはりわかっていなかったと思い知ることを繰り返しながら、学びつつ試行錯誤して研究を進めている。そもそも、筆者を含む多くのNMR初学者がその原理を理解するために最初に出会うベクトルモデルについても、微視的なスピンの振る舞いと巨視的磁化の時間発展との関係や、その量子力学的な記述を繰り返し学ぶことで、少しずつ腑に落ちてきたように感じる。本稿ではこれらの文献^[5~8]を参考に、量子力学的な記述には立ち入らず、巨視的磁化ベクトルの運動がブロッホ球上でブロッホ方程式に従うものとして記述している。本稿が、これから構造ダイナミクスの解析に取り組む方々の一助となれば幸いである。

2. 生体高分子の構造ダイナミクスと NMR 法

2-1. 生体高分子の構造ダイナミクスの

タイムスケール

生体高分子の構造ダイナミクスを含む生命現象をタイムスケールの観点から論じると（図1）、

フェムト秒（ 10^{-15} s）オーダーの分子内結合の振動から始まり、ナノ秒オーダー（ 10^{-9} s）の側鎖の回転、マイクロ秒～ミリ秒オーダー（ $10^{-6} \sim 10^{-3}$ s）のリガンド結合やドメインレベルの構造変化、ミリ秒～秒のオーダー（ $10^{-3} \sim 10^0$ s）のタンパク質の折りたたみや酵素反応、さらには時間～日のスケールの遺伝子発現の制御、年スケールの疾患の発症・進行、ギガ秒（ 10^9 s）以上の進化にまで至る、実に24桁以上もの広大なタイムスケールにわたる。これらの広大なタイムスケールにわたるダイナミクスの協働こそが、生命現象の本質を形作る重要な要素であると筆者は考えている。

2-2. NMR法で捉える構造ダイナミクス

構造ダイナミクスを捉えたいと考えたとき、NMR法が特に有効な解析手法となるのは、ピコ秒～秒のタイムスケールである（図1）。ピコ秒～ナノ秒の速い局所的な運動は、縦緩和速度 R_1 、横緩和速度 R_2 、核オーバーハウザー効果（NOE）などのパラメータから解析する。ここで R_1 は、励起された磁化が静磁場の方向（Z軸）へ回復してゆく速さを、 R_2 は磁化の位相がXY平面内でそろった状態、すなわちコヒーレンスが失われる速さを表す。

マイクロ秒～ミリ秒のタイムスケールの運動は、本稿で中心的に扱う $R_{1\rho}$ 緩和分散法（Relaxation Dispersion）やCPMG（Carr-Purcell-Meiboom-Gill）法を用いた R_2 緩和分散法、CEST（Chemical Exchange Saturation Transfer）法、線形（line shape）解析などで捉えることができる。本稿で注目するマイクロ秒からミリ秒の時間領域における構造ダイナミクスは、リガンド結合や酵素反応をはじめとする多くの生物学的過程と密接に関係している（図1）。したがって、対象分子がこの時間領域でどのような立体配座をとり、それらの間をどのような速度で行き来するのかを解明することは、分子認識や反応がどのような構造状態を介して進行するのかを理解するうえで不可欠である。さらに、こうした分子機構の理解は、分子機構に基づく合理的な薬剤設計や、目的とする機能を備えた分子の設計に重要な基盤を与える。

2-3. $R_{1\rho}$ 緩和分散法

$R_{1\rho}$ は、回転座標系における縦緩和速度である。 $R_{1\rho}$ 緩和分散法においては、有効磁場の方向に沿った磁化成分が緩和する速さを意味する。回転

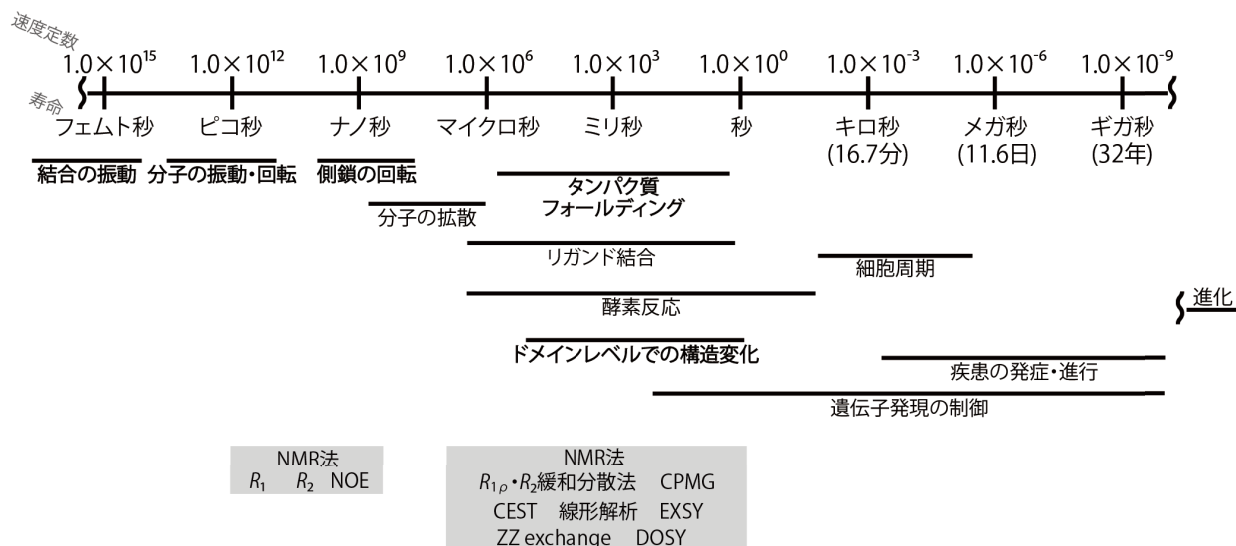


図1 生体高分子の構造ダイナミクスを含む生命現象のタイムスケールと、構造ダイナミクスを捉えるためのNMR法。

フェムト秒からギガ秒以上にわたる、24桁以上の幅広いタイムスケールを示す。本基礎講座記事の、はじめにの項で定義した生体高分子の構造ダイナミクスには含まれないものも、本図には含まれている。定義した構造ダイナミクスに含まれるものは太字で示す。図下部の網掛けで示すNMR法については、測定法と現象名が混在している。DOSYは、本稿では議論しない分子拡散を捉える手法である。NOE: Nuclear Overhauser Effect; CPMG: Carr-Purcell-Meiboom-Gill; CEST: Chemical Exchange Saturation Transfer; DOSY: Diffusion-Ordered Spectroscopy.

座標系および有効磁場については第4項で導入するが、ここでは有効磁場を、スピンロックRFを照射している間に磁化が実効的に感じる磁場と考えておけばよい。有効磁場が静磁場(Z軸)となす角を傾角 θ とすると、 $R_{1\rho}$ は

$$R_{1\rho} = R_1 \cos^2 \theta + R_2 \sin^2 \theta$$

と表される。つまり $R_{1\rho}$ は、縦緩和速度 R_1 と横緩和速度 R_2 を、有効磁場の傾き θ に応じた重みで足し合わせた量である。有効磁場が静磁場と同じZ軸方向を向く($\theta = 0^\circ$)場合には $R_{1\rho}$ は R_1 に、有効磁場がXY平面内を向く($\theta = 90^\circ$)場合には $R_{1\rho}$ は R_2 に一致する。

マイクロ秒からミリ秒の時間領域で、分子が複数の立体配座の間を行き来する化学交換が起これば、 $R_{1\rho}$ には化学交換に由来する緩和の寄与 R_{ex} が加わる。このとき、 $R_{1\rho}$ は、

$$R_{1\rho} = R_1 \cos^2 \theta + R_2 \sin^2 \theta + R_{ex} \sin^2 \theta$$

と表され、化学交換がない場合よりも大きな値をとる。この R_{ex} は、化学交換速度 k_{ex} 、各構造の存在比、および2つの構造間の化学シフト差 $\Delta\omega$ に依存して変化する。そこで、スピンロックRFパルスの強度や照射周波数を変えながら $R_{1\rho}$ 値を測定し、 R_{ex} の変化のしかたから化学交換の情報を取り出す。これが $R_{1\rho}$ 緩和分散法である。

第3項では、まず化学交換がNMRスペクトル

に及ぼす影響を概説し、続いて、化学交換の速度 k_{ex} 、各状態の存在比、化学シフト差 $\Delta\omega$ 、および交換に由来する緩和の寄与 R_{ex} について詳述する。第4項では、実験室座標系と回転座標系を導入したうえで、傾角 θ や有効磁場の概念とともに、ベクトルモデルを用いて $R_{1\rho}$ 緩和分散法の原理を解説する。第5項では、 $R_{1\rho}$ 緩和分散法を核酸分子に適用した具体的な研究例を紹介する。

3. 化学交換とNMRスペクトル

核酸分子の構造ダイナミクスは、 $R_{1\rho}$ 緩和分散法のような化学交換を定量的に解析するための測定を行わなくても、1D ^1H NMRスペクトルからその一端を捉えることができる。グアニン N^1H 、およびチミン/ウラシル N^3H のイミノプロトンは、塩基対の形成によって水とのプロトン交換から保護されると観測される。そのため、シグナルの有無、強度、線幅、および化学シフトは、塩基対の形成や安定性、さらには塩基対の開閉に伴う化学交換を反映する。イミノプロトン領域のシグナルはほかの領域の化学シフトと重なりにくく観察しやすい。一般に、安定な塩基対では鋭いシグナルが観測されるが、末端付近や安定性の低い部位では、系中の水プロトンとの交換が促進されるために線幅が広くなり、場合によってはシグナル

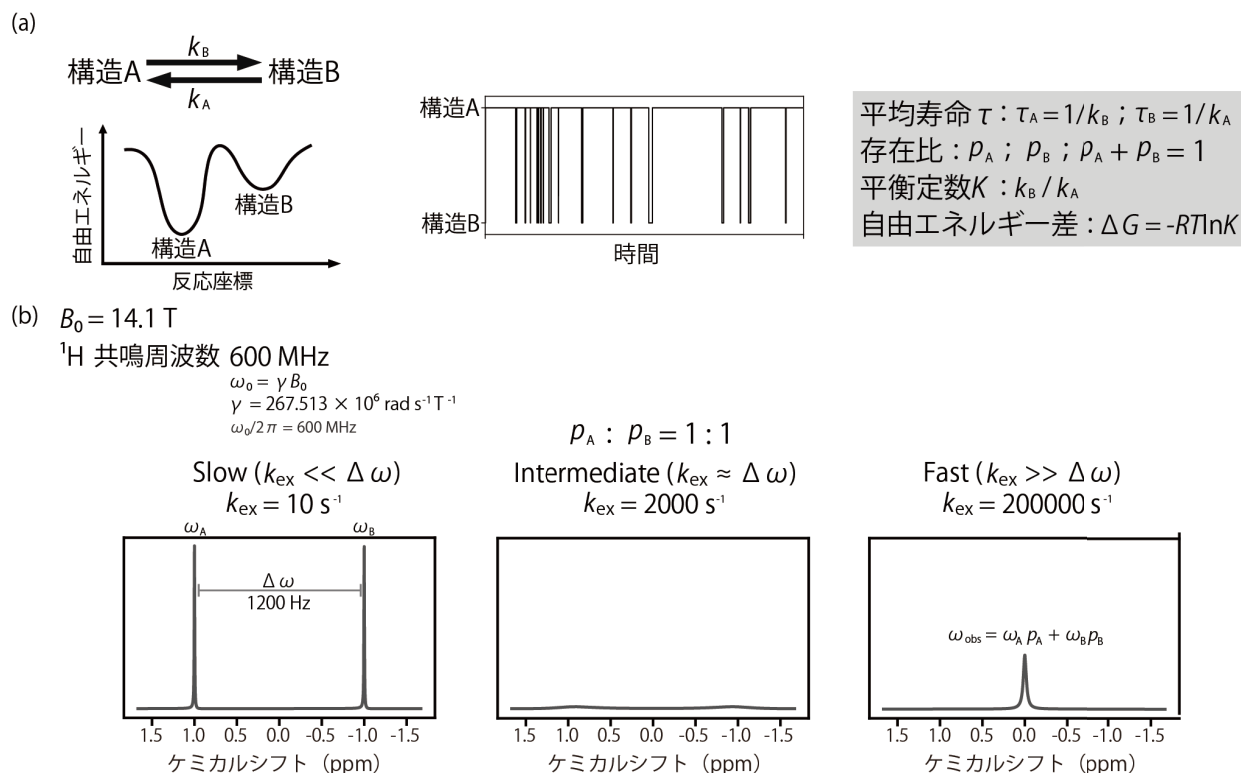


図2 二状態間の化学交換速度が一次元NMRスペクトルに及ぼす影響の模式図。

(a) 構造Aと構造Bの二状態の交換を仮定。化学交換のための速度定数 k_B (A $\rightarrow$ B)、 k_A (B $\rightarrow$ A) の逆数をその構造にとどまっている平均寿命 τ_A および τ_B とする。図中 (a) の中央に、横軸を時間とし、状態の時間発展の図を示す。各状態にとどまっている時間は指数分布に従うとする (構造の遷移は一定の確率で起こると仮定するため)。(b) $k_A + k_B$ の和を化学交換速度 (chemical exchange rate) k_{ex} と定義する。 k_{ex} と $\Delta\omega$ の比に依存した1次元NMRスペクトルのシミュレーション。遅い交換 (slow) では2本、速い交換 (fast) では平均化した1本のシグナルが観測される。中間の交換 (intermediate) では、シグナルが大幅に広幅化する。

が観測されなくなる。このような線幅や強度の違いから、構造ダイナミクスの解析が目的の測定を行う前の段階において、分子のどの部位が揺らぎやすいかをうかがい知ることができる。なお、NMR法の文脈における化学交換のタイムスケールについては後述するが、遅いタイムスケールの化学交換が存在する場合などには、予想より多い本数のシグナルを与え、複雑なスペクトルが得られることもある。

異なる立体配座 (ここでは、構造Aと構造Bの二状態間の交換を仮定する) の間で相互に変換する現象を化学交換と呼ぶ。構造AからBへの構造変化の速度定数を k_B 、構造BからAへの構造変化の速度定数を k_A とすると、化学交換速度 (chemical exchange rate) k_{ex} は $k_{\text{ex}} = k_A + k_B$ と表される。各構造の存在比は $p_A = k_B/k_{\text{ex}}$ 、 $p_B = k_A/k_{\text{ex}} = 1 - p_A$ であり、両者のギブスエネルギー差は $\Delta G = -RT \ln (k_B/k_A)$ と表される。速度定数の逆数 ($1/k_B$ および $1/k_A$) は、それぞれの構造の平均寿命に対応する。平均寿命とは、その構造に

平均してどれくらいの時間とどまっているかを表すパラメータである (図2a中央)。また、 k_{ex} は、系が平衡から離れたときに平衡へ回復する速さとして物理的に解釈できる^[6]。さらに、構造Aの化学シフトを ω_A 、構造Bの化学シフトを ω_B としたとき、その差 $\Delta\omega$ は、2つの構造間の化学的・磁気的環境の違い、すなわち構造的な差異を反映したパラメータである。

NMRスペクトルへの化学交換の影響は、 k_{ex} と $\Delta\omega$ の相対的な大きさによって3つの領域に分類される (図2b)。 $k_{\text{ex}} \ll \Delta\omega$ の遅い交換領域 (slow exchange) では、2つの構造それぞれの化学シフトに対応する位置に2本のシグナルがそれぞれ独立して観測される。 $k_{\text{ex}} \gg \Delta\omega$ の速い交換領域 (fast exchange) では、存在比で重みづけした平均の化学シフトに1本のシグナルが観測される。その中間の中間交換領域 (intermediate exchange) では、シグナルが著しく広幅化して観測困難になることもある (図2b中央)。4・2項において後述するが、このとき観測される横緩和速度 $R_{2,\text{obs}}$ は、化学

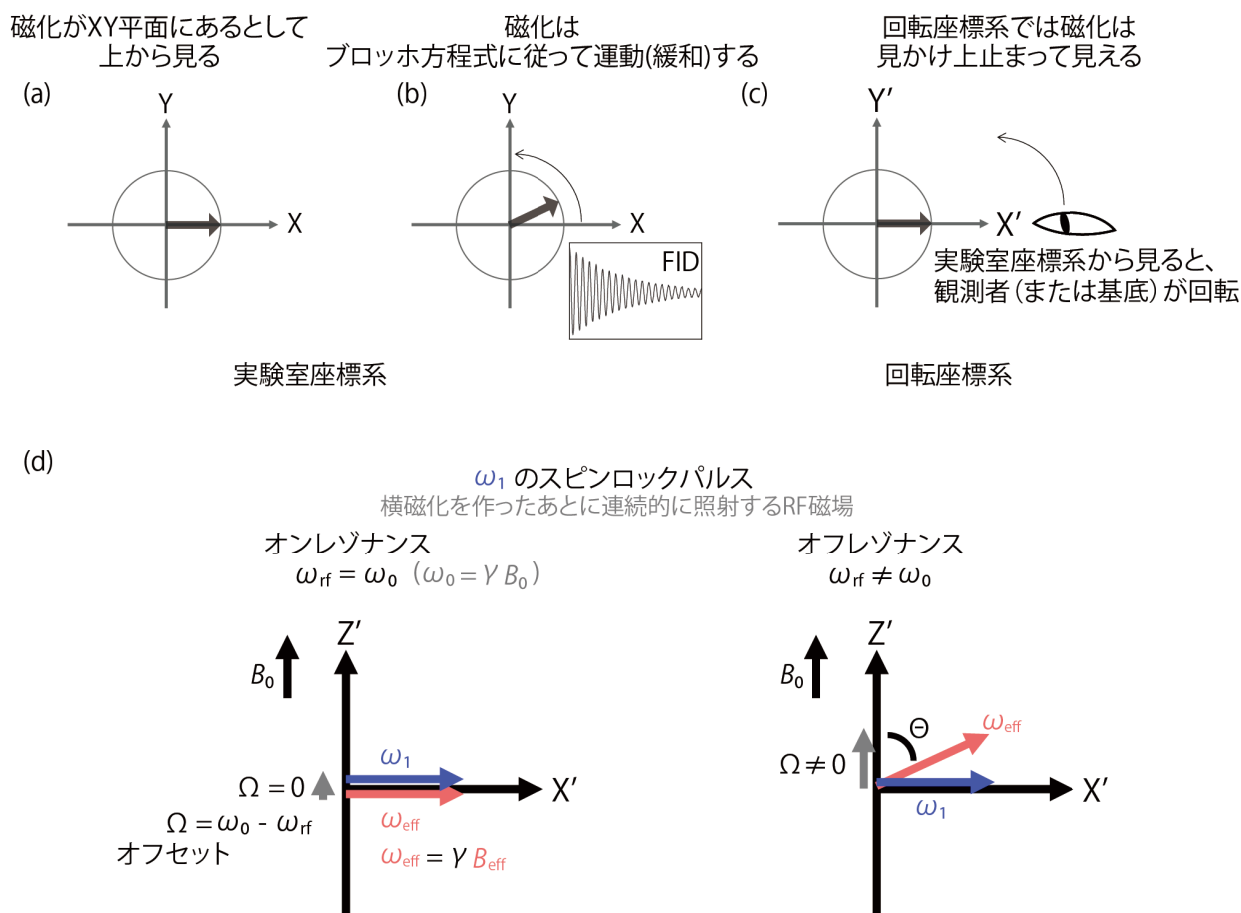


図3 スピンロックパルス下における磁化の振る舞いを、実験室座標系および回転座標系で表し、オンレゾナンスおよびオフレゾナンス条件で生じる有効磁場の方向と大きさを示す模式図。

実験室座標系(基底XYZ)において静磁場 B_0 のもとで磁化ベクトルはラーモア周波数 ω_0 で歳差運動する(a, b)。回転座標系(基底X'Y'Z)、 ω_0 と同じ角速度で回転する座標系では磁化ベクトルは見かけ上静止する(c)。オンレゾナンス($\Omega = 0$)下におけるスピンロックパルス印加時の有効磁場は、 $\omega_{eff} = \omega_1$ である(d)。オフレゾナンス($\Omega \neq 0$)での有効磁場は、 $\omega_{eff} = (\omega_1^2 + \Omega^2)^{1/2}$ となる。磁化を有効磁場方向に傾けるための角度 θ は $\theta = \tan^{-1}(\omega_1/\Omega)$ 。

交換によって内在的(intrinsic)な R_2 値($R_{2,intrinsic}$)よりも増大する。この増大分 $R_{ex}(=R_{2,obs}-R_{2,intrinsic})$ に $\Delta\omega$ 、 k_{ex} 、存在比の情報が含まれており、この項を定量することが緩和分散法の目的である^[5~7]。

4. $R_{1\rho}$ 緩和分散法の原理

4-1. 実験室座標系と回転座標系

実験室座標系と回転座標系を導入する。数式や図を追う際には、実験室座標系と回転座標系のどちらで議論しているかを常に意識することが、混乱を避けるうえで重要である。静磁場 B_0 のもとで、巨視的磁化ベクトルはラーモア周波数 $\omega_0 = \gamma B_0$ で歳差運動する。実験室座標系の図3abでは、 90° パルスなどによって横磁化を生成した後の運動を示している。この歳差運動する磁化ベクトルと同じ角速度 ω_0 で観測者自身も回転する座

標系(回転座標系、X'Y'Z系)では、磁化ベクトルは見かけ上静止する(図3c)。 $R_{1\rho}$ 緩和分散法を理解するうえでは、この回転座標系での議論が中心となる。

4-2. 化学交換がある場合の磁化の動きと R_{ex}

化学交換がない場合、XY(X'Y')平面上の磁化(横磁化)は、内在的な横緩和速度 $R_{2,intrinsic}$ で減衰する。化学交換がある場合を回転座標系で考える(図4)。構造Aの共鳴周波数 ω_A で回転する座標系では、分子が構造A中にある間は、磁化は静止して見える。ここで構造Bへの化学交換が起きると、磁化は歳差運動を始める(図4a)。このとき、この回転座標系は構造Aの周波数に同期しており構造Bには同期していないため、磁化は構造Aと構造Bのラーモア周波数の差、すなわち $\Delta\omega$ の角速度で歳差運動する。その後、構造Aに戻ると磁

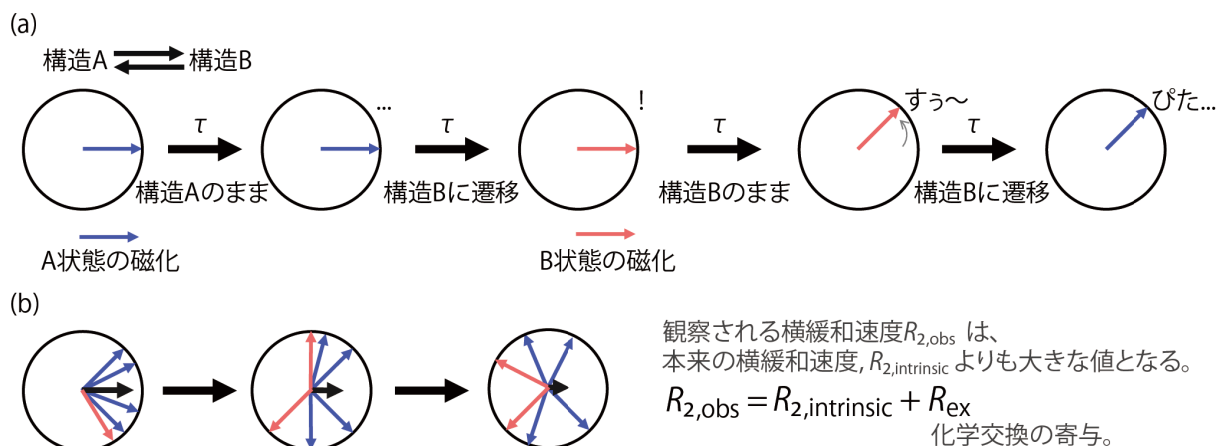


図4 二状態間の化学交換により、異なる化学シフトをもつ状態間で磁化の位相が分散し、交換由来の横緩和 (R_{ex}) が生じる過程を回転座標系で示した模式図。

構造Aのラーモア周波数 (ω_A) で回転する座標系で見ると、構造Aにあるときの磁化は静止しているが (aの左2つ)、構造Bへの交換が起こると、 $\Delta\omega = \omega_B - \omega_A$ に対応する角速度で歳差運動を始める (aの左から3つめ、4つめ)。再び構造Aへの遷移が起これば、磁化は再び静止する (aの右端)。化学交換がある場合の回転座標系における磁化ベクトルの位相の分散 (b)。交換が繰り返されるにつれて、分子集団全体で磁化の位相が分散する。

化は再び静止する。この交換が繰り返されるにつれて、分子集団全体で磁化の位相が次第に分散していく (図4b)。結果として、磁化の減衰速度は内在的な横緩和速度よりも速い $R_{2,intrinsic} + R_{ex}$ となる。

4-3. スピンロックと有効磁場

$R_{1\rho}$ 緩和分散法では、横磁化を生成した後、回転座標系において磁化を有効磁場方向に保つため、一定時間にわたってRFパルス (スピンロックパルス) を連続して照射する。スピンロックパルスの強度は $\omega_1 = \gamma B_1$ で表される。このスピンロック磁場下における磁化の緩和速度 $R_{1\rho}$ を観測する (図3d)。照射するスピンロックパルスの角周波数 ω_{rf} が、観測核の共鳴周波数、すなわち実務的には観測できるシグナルの化学シフト位置に対応する主状態の共鳴周波数 ω_0 と一致するとき、オンレゾナンス条件となる (図3d左)。このとき、オフセット $\Omega = \omega_0 - \omega_{rf} = 0$ であり、有効磁場はスピンロックパルスRF場の方向、すなわち ω_1 方向に一致する (図3d左)。回転座標系では、共鳴周波数からのずれに由来するZ'軸方向の有効磁場成分は見かけ上ゼロとなる。オンレゾナンスの測定では、スピンロック強度 ω_1 のみを系統的に変化させることで、ミリ秒からマイクロ秒の化学交換の有無を調べることができる。十分な緩和分散プロファイルが得られ、適切な交換モデルを適用できる場合には、化学交換速度 k_{ex} を決定することができる。緩和分散プロファイルとは、ス

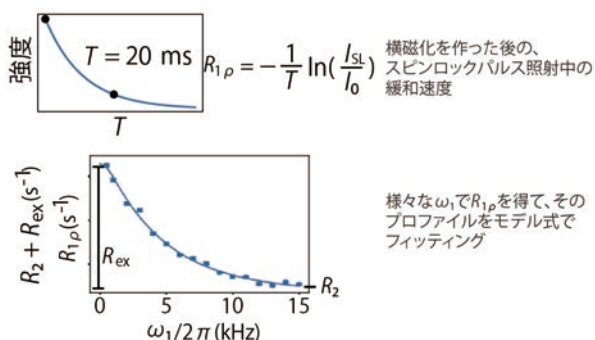


図5 オンレゾナンス $R_{1\rho}$ 緩和分散測定における、スピンロック時間依存のシグナル減衰からの $R_{1\rho}$ の決定と、スピンロック強度依存の緩和分散プロファイルに基づく化学交換パラメータの解析。

実務的には、スピンロック時間 T に対するシグナル強度の指数関数的な減衰から $R_{1\rho}$ 値を得る (上)。実際のオンレゾナンス $R_{1\rho}$ 緩和分散プロファイル (下)。横軸：スピンロック強度 $\omega_1/2\pi$ (kHz)、縦軸： $R_{1\rho}$ (s^{-1})。改めて整理すると、 ω_1 は、 $\omega_1 = \gamma B_1$ で表され、 B_1 は通常の静磁場 B_0 ではなく、スピンロックパルスとして照射しているRF磁場である。したがって、 ω_1 は、スピンロックRF場の強度を周波数単位で表したものである。 ω_1 の強度が弱い領域では化学交換の寄与 R_{ex} がより大きく加わって $R_{1\rho}$ が増大し、 ω_1 が強い領域では R_{ex} が抑制され、 $R_{1\rho}$ は R_2 に近づく。緩和分散プロファイルをモデル式でカーブフィッティングし、 R_2 、 $\Delta\omega$ 、 k_{ex} 、存在比を決定する。

ピンロック強度などの実験条件に対する緩和速度の依存性を表した曲線である。図5下のグラフは、実際のオンレゾナンス $R_{1\rho}$ 緩和分散測定から得られた緩和分散プロファイルである。化学交換が存在すると、交換に由来する緩和の寄与 R_{ex} が

スピンロック強度によって変化し、対応した $R_{1\rho}$ 値が観測される。この曲線をモデル式でカーブフィッティングすることで、化学交換に関する情報を抽出できる。ただし、オンレゾナンス測定のみからは $\Delta\omega$ の符号を決定することができないため、完全な化学交換のパラメータの決定には、次に述べるオフレゾナンス測定が必要となる。

ω_{rf} を ω_0 からずらしたオフレゾナンス測定では、 $\Omega \neq 0$ となり(図3d右)、有効磁場は $\omega_{\text{eff}} = (\omega_1^2 + \Omega^2)^{1/2}$ (Z軸に対して傾角 $\theta = \tan^{-1}(\omega_1/\Omega)$ の方向)をとる。 $R_{1\rho}$ は、この有効磁場 ω_{eff} 方向に沿った、回転座標系における縦緩和速度として観測される。オンレゾナンス測定では磁化を 90° 方向(XY平面)に倒せばよいが、オフレゾナンス測定では、スピンロックRFパルスの照射前に、磁化を有効磁場の方向(傾角 θ)に合わせて倒す必要がある^[6]。オフレゾナンス測定によって $\Delta\omega$ の符号まで決定できるのは、次の理由による。オフセット Ω を掃引すると、通常はシグナルとして直接観測されない低存在比の状態の化学シフト近傍において緩和分散プロファイルに特徴的な変化が現れる。その結果、プロファイルは主状態の化学シフトを中心として非対称な形状を示す。オフレゾナンス $R_{1\rho}$ 緩和分散プロファイルの典型的な形状と、そこから $\Delta\omega$ の符号を決定する具体例については、文献^[6, 7, 9~15]を参照されたい。この非対称性から、 $\Delta\omega$ の符号、すなわち低存在比の状態の化学シフトが主状態に対して高磁場側・低磁場側のいずれにあるかを決定できるのである。その結果、単一の磁場強度でも R_2 、 k_{ex} 、 p_A 、 p_B ($=1-p_A$)、符号まで含む $\Delta\omega$ という完全な化学交換のパラメータセットを決定できる^[6]。

前述のとおり、オフレゾナンス $R_{1\rho}$ 緩和分散測定では、スピンロックRF磁場の強度 ω_1 に加えて、その照射周波数と観測核の共鳴周波数との差であるオフセット Ω を系統的に変化させる。これにより、有効磁場の大きさと方向の両方を変化させ、幅広い条件下で化学交換の寄与を観測できる。そのため、単一の静磁場強度で取得したデータからでも、化学交換速度、交換状態の存在比、化学シフト差などを精度よく決定可能である。一方、CPMG法を用いた R_2 緩和分散測定では、これらのパラメータの決定精度を高めるため、異なる静磁場強度で取得したデータを同時に解析することが多い。単一の静磁場強度においても化学交換に関する多くの情報を得られることは、オフレ

ゾナンス $R_{1\rho}$ 緩和分散法の利点の一つである。

スピンロック強度 ω_1 を大きくすると化学交換に由来する緩和の寄与 R_{ex} は小さくなる(図5下のグラフおよび図6abc)。図6にこの関係を直感的に理解するためのシミュレーションを示す。観測される主状態Aの共鳴周波数に合わせた回転座標系では、状態Aにある磁化は、 ω_1 に対応するX'軸方向の有効磁場を感じる。一方、状態Bへ交換したスピンの磁化は、 ω_1 に対応するX'軸方向の磁場成分に加えて、化学シフト差 $\Delta\omega$ に対応するZ軸方向の磁場成分も感じる。したがって、状態Bにおける有効磁場は、これら二つの磁場成分の合成磁場となり、その方向は状態Aにおける有効磁場の方向とは異なる(図6a)。化学交換が起こると、磁化を感じる有効磁場の方向が変化し、磁化の分散が生じる(図4b)。これに対して、 ω_1 を大きくすると、 $\Delta\omega$ の相対的な寄与が小さくなり、二つの状態における有効磁場の方向の差が小さくなる(図6a)。 ω_1 が小さい場合には、状態Aと状態Bにおける有効磁場の方向の差($B_{\text{eff,A}}$ と $B_{\text{eff,B}}$ のなす角)が大きい。そのため、化学交換に伴って磁化が歳差運動する軸の方向が大きく変化し、磁化の位相が分散しやすい(図6a)。有効磁場のまわりの歳差運動を考えると、この角度が小さいほど、磁化の軌跡はスピンロックによって保持されるX'軸の近くにとどまる。 ω_1 を大きくすると、 $\Delta\omega$ に対応する磁場成分の相対的な寄与が小さくなり、二つの状態における有効磁場の方向の差も小さくなる。その結果、スピンロックRFの照射中に二つの状態間で交換が起こっても、各状態における磁化の運動の差が小さくなり、磁化の位相分散が抑えられるため、 R_{ex} は小さくなる。

CPMGパルスを用いた R_2 緩和分散測定の場合には、高い ν_{CPMG} の条件では、緩和の寄与 R_{ex} が小さくなる(図6def)。高い ν_{CPMG} 条件では 180° パルス間隔が短くなるため、各区間内で交換が起こる確率が低下し、仮に交換が起こっても化学シフト差に由来する位相ずれが蓄積する時間が短くなる(図6d)。その結果、交換に由来する不可逆な位相の分散が抑えられ、交換の寄与 R_{ex} が小さくなる。

4-4. データ解析とパラメータ抽出

各スピンロック強度 $\omega_1/2\pi$ (kHz)で得られた $R_{1\rho}$ 値をプロットすることで、緩和分散プロファイルが得られる。このプロファイルを適切なモデ

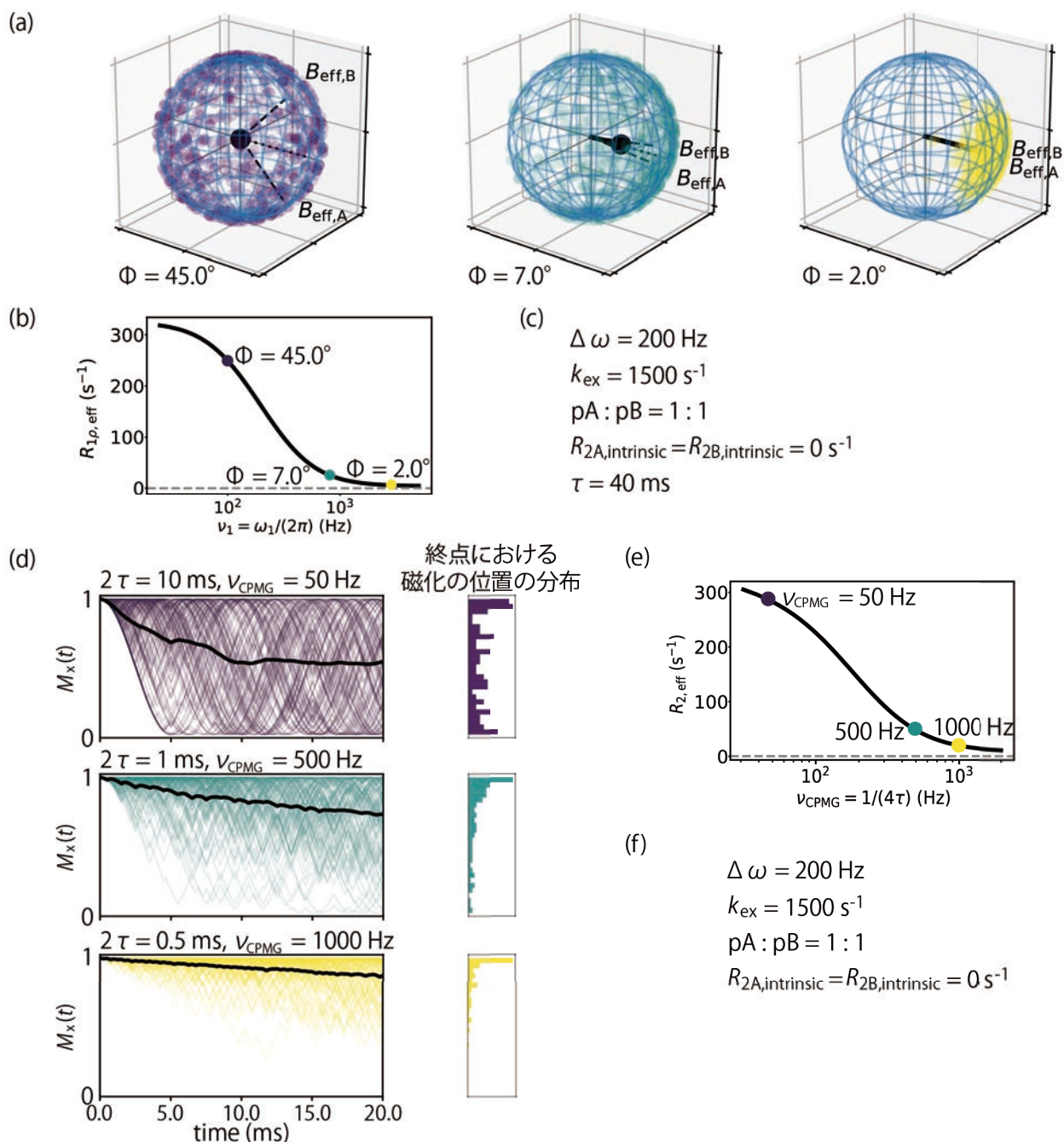


図6 $R_{1\rho}$ 緩和分散法およびCPMG法における化学交換に由来する磁化の分散のシミュレーション。二状態の化学交換を仮定し、状態Aと状態Bの存在比を $p_A = p_B = 0.5$ 、化学交換速度を $k_{\text{ex}} = k_A + k_B = 1500$ s⁻¹とした。状態Aと状態Bの化学シフト差は $\Delta\omega = 200$ Hzとし、回転座標系における各状態の周波数オフセットを -100 Hzおよび $+100$ Hzとした。

(a-c) $R_{1\rho}$ 緩和分散法のシミュレーション。(a)初期の磁化を $+x$ 方向にそろえ、 x 方向にスピンロックRF場を印加した条件で、化学交換による磁化ベクトルの分布をブロッホ球上に示した。スピンロック強度は、左から100、800、および3,000 Hzとした。各点は、700本の磁化ベクトルを40 ms発展させた後の終点を表す。破線は状態Aおよび状態Bにおける有効磁場 $B_{\text{eff,A}}$ および $B_{\text{eff,B}}$ を示す。スピンロック強度が大きくなるほど、スピンロック場 B_1 が支配的になり、 $B_{\text{eff,A}}$ と $B_{\text{eff,B}}$ の向きの差が小さくなる。その結果、化学交換が起こっても磁化ベクトルの向きは $+x$ 軸近傍に保たれ、時間発展後の磁化の分布が狭くなる。(b) $R_{1\rho}$ 緩和分散プロファイル。(c)の条件下でシミュレーションを行った。

(d-f) CPMG法のシミュレーション。(d)初期磁化を $+x$ 方向にそろえ、 180° パルスを含むCPMGパルス列の下で、二状態交換に伴う磁化の発展をシミュレーションした。CPMG周波数は、上から $\nu_{\text{CPMG}} = 50$ 、500、および1,000 Hzとした。ここで $\nu_{\text{CPMG}} = 1/(4\tau)$ であり、連続する 180° パルス間隔 2τ は、それぞれ10、1.0、および0.50 msである。各条件について110本の磁化を20 ms発展させた。紫、緑、黄色で示す細い線は個々のスピンの $M_x(t)$ 値、太線はその平均を示す。右側のヒストグラムは、最終時点における $M_x(t)$ 値の分布を示す。 ν_{CPMG} が高いほど、 180° パルス間に交換由来の位相ずれが蓄積する時間が短くなり、終点における位相の分布は $M_x(t) = 1$ 近傍に集中する。(e)緩和分散プロファイル。(f)の条件下でシミュレーションを行った。

ル式にフィッティングすることにより、化学交換に関する各種パラメータを抽出する(図5)。二状態間の化学交換を仮定したモデルを適用した場合には、横緩和速度 $R_{2,\text{intrinsic}}$ 、化学シフト差 $\Delta\omega$ 、各状態の存在比 p_A および p_B ($p_B=1-p_A$)、ならびに化学交換速度 k_{ex} などが解析対象となる。

フィッティングに用いるモデル式は、採用する近似に応じていくつか知られているが、いずれもBloch-McConnell方程式^[5~8]に基づいている。用いるモデル式がどのような仮定に基づくかを理解し、その適用条件を確認することが重要である。例えば、二状態モデルでは、両状態の内在的な横緩和速度($R_{2A,\text{intrinsic}}$ および $R_{2B,\text{intrinsic}}$)が等しいと仮定することが多い。また、近似式によっては、交換が速い交換領域にあること、存在比が大きく偏っていることなどを前提とする^[5~8]。

実際の解析では、複数のモデルを適用し、どのモデルが実験結果を最も適切に説明するかだけでなく、各パラメータをデータからどの程度独立に決定できるか、すなわちパラメータの識別可能性についても吟味する必要がある。識別可能性とは、他のパラメータとの相関によってその変化が補償されることなく、各パラメータをデータから一意に推定できる程度を指す。異なるパラメータの組合せがほぼ同一の緩和分散プロファイルを与える場合には、フィッティング曲線が実験データによく一致していても、個々のパラメータの推定値を信頼することはできない。特に速い交換領域では、緩和分散プロファイルは、しばしば $\phi_{\text{ex}}=p_A p_B (\Delta\omega)^2$ で表される複合パラメータに主として依存する。この場合、 p_A 、 p_B 、および $\Delta\omega$ を個別に決定することは困難である。また、測定に用いたスピンロック強度の範囲が十分でない場合には、 k_{ex} についても精度よく決定できないことがある。

本稿では二状態間の交換を仮定して解説しているが、この二状態モデルは、観測された緩和分散を限られた数のパラメータによって記述するための解析上の近似である。したがって、二状態モデルが実験データをよく説明したとしても、分子が実際に二つの明確に区別された構造のみをとることを意味するわけではない。実際の反応座標には、複数の中間状態、連続的な構造分布、あるいは複数の交換過程が含まれる可能性がある。適切なモデル式の選択には、使用する近似式の適用条件($k_{\text{ex}} \gg \Delta\omega$ か否か等)を慎重に確認することが

求められる。また、推定値の不確かさは、測定の再現性の確認に加え、スペクトルノイズに基づくモンテカルロ法やブートストラップ法などによって評価する。フィッティングが収束しない場合、残差に系統的な偏りがみられる場合、あるいは推定値の不確かさが大きい場合には、スピンロック強度やオフセットの設定範囲、温度、塩濃度、pHなどの測定条件を見直すことも有効である。さらに、試料として用いる生体高分子の設計、すなわち配列や長さ、導入する変異、修飾、標識部位などを見直すことも重要である。そうした試行錯誤の過程は、解析精度を高めるだけでなく、当初のモデルでは説明できない交換過程や、構造ダイナミクスを規定する要因を見いだすことにも繋がる。

5. $R_{1\rho}$ 緩和分散法を用いた核酸分子の構造ダイナミクスの具体的な研究例

5-1. 核酸分子の構造ダイナミクスと生物学的機能

ここでは、 $R_{1\rho}$ 緩和分散法を用いて明らかにされた、核酸分子の構造ダイナミクスに関する代表的な研究成果を紹介する。

DNAおよびRNA二重鎖構造中のHoogsteen型塩基対に関する一連の研究が挙げられる^[9~16]。二重鎖構造中において、主状態として観察されるWatson-Crick型塩基対(WCBP)は、低存在比のHoogsteen型塩基対(HBP)と平衡にある^[9~16](図7)。WCBPからHBPへの変換では、プリン塩基がグリコシド結合周りで*anti*型から*syn*型へ反転し、それに伴ってピリミジン塩基との水素結合の様式および塩基対の幾何が変化する(図7)。この変換は、二重らせん構造の主溝および副溝への官能基の提示、局所的な電荷分布、二重らせんの形状を変化させるため、これらを認識するタンパク質や低分子との相互作用に影響し得る。続いて紹介していくいくつかの研究において、 $R_{1\rho}$ 緩和分散法は、主状態であるWCBPのシグナルから

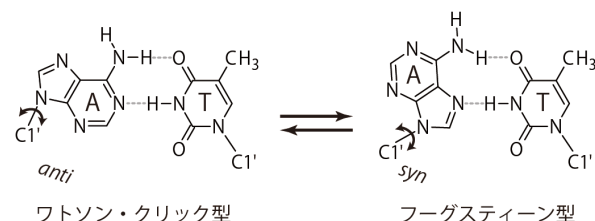


図7 ワトソン・クリック型塩基対(WCBP)とフーグスティーン型塩基対(HBP)。

低存在比の状態との化学交換を検出し、その存在比、化学交換速度、および化学シフト差を定量する役割を担っている^[11, 13~15, 17]。 $R_{1\rho}$ 緩和分散法に加え、HBPを安定化するように設計した試料のNMR測定や、NOESY、HSQCから得られる構造情報と組み合わせることで、緩和分散で検出した低存在比の状態をより詳細に解析している^[11, 13~15]。必要に応じて、X線結晶構造^[13]やMDシミュレーション^[17]を用いている。これらを組み合わせて得られた構造ダイナミクスの変化を、リガンド結合、タンパク質認識、酵素反応、細胞内活性などと比較することで、構造ダイナミクスと機能との関係が検討されている。

具体的には、Shiらは、タンパク質-DNA複合体のX線結晶構造を再解析し、従来WCBPとしてモデル化されていた部位の中に、HBPとして解釈した方が得られている電子密度および立体配座をよりよく説明できる例が存在することを示した^[13]。短縮したC1'-C1'間距離(WCBPならば $\sim 10.6\text{\AA}$ 、HBPならば $\sim 8.6\text{\AA}$)、塩基対のずれ(shear)と開き(opening)を構造の指標とする解析を行い、HBPがミスマッチ、損傷、ニック、末端など、局所的に構造歪みを受けたDNA領域の近傍に多く存在することを見いだした^[13]。さらに、この結晶構造の再解析から得られた仮説を溶液中で検証するため、均一に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識されたDNAヘアピンを用い、G-C塩基対のグアニンC8シグナルに対してオフレゾナンス ^{13}C $R_{1\rho}$ 緩和分散測定を行った。注目する塩基対が、安定なWCBPに挟まれている場合、約0.5%の低存在比の状態との交換が検出され、その化学シフト差および化学交換のパラメータは C^+-G HBPへの変換と整合していた。注目する塩基対の隣接部位にG-TまたはT-Tミスマッチを導入すると、二状態モデルによる解析から推定された C^+-G HBPの存在比は、それぞれ約3倍および13倍に増加した。すなわち、ミスマッチによって近傍の塩基対におけるHBPの形成を促進し得ることが支持された^[13]。

さらに、Guらは、鋳型鎖のdAに対するdGTPおよび酸化ヌクレオチドd8OGTPの誤挿入に、A-GおよびA-8OGミスマッチの構造ダイナミクスが関与する可能性を検討した^[14]。オフレゾナンス ^{13}C $R_{1\rho}$ 緩和分散法およびCESTを用いた解析により、A-Gミスマッチでは、主状態である $\text{A}^{\text{anti}}-\text{G}^{\text{anti}}$ 構造が、低存在比かつ短寿命の $\text{A}^{\text{anti}+}-\text{G}^{\text{syn}}$ お

よび $\text{A}^{\text{syn}}-\text{G}^{\text{syn}}$ 型の構造と交換していることが示された。これに対して、Gが8OGに酸化されるとこれらに対応する塩基対構造の存在比が変化し、変異原性をもつ $\text{A}^{\text{anti}}-\text{8OG}^{\text{syn}}$ 型の構造が主状態となった。さらに、NMRから得られた各構造の存在比および化学交換速度をヒトDNAポリメラーゼ β による誤挿入反応の速度論モデルに組み込んだところ、 $\text{A}^{\text{anti}+}-\text{G}^{\text{syn}}$ 構造を誤挿入可能な状態とするモデルが、dA-dGTP誤挿入の速度、pH依存性、および8OG導入による誤挿入の促進を定量的に再現した。これらの結果は、溶液中において一過的に存在する構造の存在比と化学交換速度が、塩基誤挿入の頻度を規定し得ることを示している^[14]。

Liuらは、 N^6 -メチルアデノシン(m^6A)修飾が核酸のハイブリダイゼーションおよび構造交換の速度論に与える影響を解析した^[15]。 m^6A を含む核酸に対してCESTおよびオフレゾナンス $R_{1\rho}$ 緩和分散測定を行い、修飾部位近傍に存在する構造状態の存在比と、それらの間の交換速度を定量した。さらに、独立に測定したハイブリダイゼーション速度と組み合わせることで、 m^6A 修飾がハイブリダイゼーションの速度論を変化させる定量的なモデルを構築した。 m^6A は、塩基対形成に適した anti 型と、塩基対形成を妨げる syn 型との間で平衡にある。そのため、修飾による構造アンサンブルの変化は、単なる二重鎖の熱力学的安定性の変化にとどまらず、二重鎖の形成/解離の経路および速度にも影響する。この研究は、CESTや緩和分散法から得られる化学交換パラメータを二重鎖形成の反応速度論と結び付けることで、RNA修飾が核酸の構造変化とその下流にある細胞応答のタイムスケールを調節し得ることを示した例である^[15]。

ここまで具体的に紹介した研究^[13~15]は、いずれもAl-Hashimi(以下より敬称略)らの研究グループによるものである。一方、菅瀬らの研究グループでは、古川らが、エピジェネティックなDNA修飾が二本鎖DNAの塩基対の開閉ダイナミクスに及ぼす影響を解析した^[17]。この研究では、G-C塩基対のイミノプロトンを対象に、オンレゾナンス ^1H $R_{1\rho}$ 緩和分散測定を行った。各イミノプロトンの化学シフト位置にRF照射を合わせ、塩基対が閉じた状態と一過的に開いた状態との交換に由来する k_{ex} を評価した。さらに、水プロトンと交換性プロトンとの間の磁化移動を利用してp

ロトン交換速度を評価する CLEANEX-PM (phase-modulated CLEAN chemical exchange) 法により、イミノプロトンと水プロトンとの交換速度を測定した。この値を $R_{1\rho}$ 緩和分散から得られた k_{ex} と組み合わせることで、塩基対の開閉ダイナミクスおよび閉状態の寿命を推定した。MD シミュレーションも併用し、DNA のメチル化やヒドロキシメチル化が局所的な塩基対開閉および速いタイムスケールの揺らぎをどのように変えるかを検討した。この研究は、エピジェネティックな DNA 修飾が構造ダイナミクスを変化させ、それを介して DNA-タンパク質相互作用に影響を及ぼす可能性を示した例である。

$R_{1\rho}$ 緩和分散法を用いた例ではないが、NMR を用いて RNA の構造アンサンブルを定量化し、その構造ダイナミクスと細胞内機能とを結び付けた研究が Ken らにより報告されている^[18]。この研究は、本 NMR 討論会における Al-Hashimi 先生の講演でも紹介され、質疑では活発な議論が交わされた。Ken らは、HIV-1 TAR RNA について、タンパク質結合に適したスタッキング構造をとる分子の存在比を評価した^[18]。得られた構造アンサンブルの特徴は、Tat-ARM ペプチドに対する結合親和性および細胞内における転写活性化能と対応しており、RNA の構造アンサンブルが細胞内機能を規定し得ることが示された。

5-2. 生体内環境を考慮した構造ダイナミクスの解析

以下では、オンレゾナンス $R_{1\rho}$ 緩和分散法を用いて、細胞内環境における DNA 三重鎖構造の塩基対開閉ダイナミクスを研究した筆者らの成果を紹介したい。DNA 三重鎖構造は、ゲノム不安定性や複製の停止、フリードライヒ運動失調症の発症との関連が指摘される、二重鎖ではない核酸の非標準構造の一種である。生体高分子の構造・ダイナミクスと機能との関係を理解するためには、精製した試料を用いた希薄溶液中での解析に加えて、細胞内の複雑な分子環境が生体高分子の構造やダイナミクスに及ぼす影響を考慮する必要がある。細胞内は高濃度の生体高分子が密集した分子込み合い状態にある^[19, 20]。この環境は、排除体積効果の増加、水活性の低下、非特異的な相互作用の増加などを通じて、生体高分子の構造・ダイナミクスに影響を与えられ^[19, 20]。このような環境が核酸分子の構造や物理化学的な性

質に与える影響については多くの研究があるが、構造ダイナミクスに与える影響は研究例が少なく全く自明ではない。

筆者らは、オンレゾナンス $R_{1\rho}$ 緩和分散法とイミノプロトン-水プロトン間の交換速度の解析を組み合わせ、2種類の分子込み合い試薬によりそれぞれ再現された細胞内様の環境が DNA 三重鎖構造の塩基対開閉ダイナミクスに与える影響を、塩基対分解能で定量的に評価した^[21]。

各条件で観測されたイミノプロトン領域の NMR スペクトルは、希薄溶液中で得られたスペクトルと類似しており、細胞内様環境においても DNA 三重鎖の全体の構造は大きく変化しないことがわかった。筆者らが以前に報告した in-cell NMR 研究においても、実際の細胞内で形成された DNA 三重鎖の構造は、希薄溶液中の構造と類似していた^[22]。一方で、塩基対開閉ダイナミクスには、用いた分子込み合い試薬の種類に応じた変化が観察された。細胞内における除外体積効果の増大を主に模倣する Ficoll PM 70 の添加では、Hoogsteen 型塩基対の閉状態の平均寿命 (τ_{closed}) および開状態の平均寿命 (τ_{open}) がともに増大し、 τ_{closed} の増加がより大きく、結果的に塩基対開閉のギブスエネルギー差 ΔG_{open} は増大した。これは、三重鎖構造を形成する塩基対が安定化したことを示す。一方、細胞内における水活性の低下を主に模倣する PEG 200 の添加では、構造上の位置に応じた複雑な影響が観察されたが、主として τ_{closed} の減少と τ_{open} の増大により、 ΔG_{open} は減少した。これは、三重鎖構造を形成する塩基対が不安定化したことを示す。これらの結果は、細胞内環境の変化に応じて DNA 三重鎖構造の構造ダイナミクスが変化し、ひいては生物学的プロセスを調節する可能性を示唆している^[21]。

5-3. 核酸アプタマーの構造ダイナミクスと機能

筆者らはさらに、核酸分子の構造ダイナミクスがアプタマー分子の分子認識をどのように規定するかを調べ、その知見が合理的な分子設計につながる可能性を示した^[23]。アプタマーは、特定のターゲット分子に高い親和性と特異性をもって結合する一本鎖核酸であり、創薬・診断への応用が広く期待されている。本研究で標的としたヒト IgG1 の Fc 断片は、抗体の抗原結合部位とは異なる定常領域に由来する断片であり、Fc 受容体や補体系との相互作用を介して抗体の生体内機能に

関与する。

IgG1のFc断片を標的とするRNAアプタマーとRNA-DNAキメラアプタマーの構造ダイナミクスを、イミノプロトンを観測対象としたオンレゾナンス $R_{1\rho}$ 緩和分散測定、CLEANEX-PM、MDシミュレーションを用いて比較したところ、キメラアプタマーはRNA単独のアプタマーよりも高い構造的柔軟性を示し、ITCによる解析から、標的タンパク質との結合に伴うエンタルピー変化がより大きいことが明らかになった。しかし同時に、この柔軟性の高さは結合時の大きなエントロピー損失を伴い、両者の結合親和性は最終的に類似した値となった。すなわち、アプタマーの構造ダイナミクスは、結合に伴うエンタルピー利得とエントロピー損失の大きさを左右し、両者の補償関係を通じて最終的な結合親和性に影響を及ぼす。これらの結果は、アプタマーの柔軟性を高めれば親和性が向上するわけではなく、結合に有利な相互作用の形成と、構造固定化に伴うエントロピー損失の双方を考慮する必要があることを示している。構造ダイナミクスと結合の熱力学の関係を定量的に理解することは、アプタマー設計において制御すべき分子特性を明確にするための重要な基盤となる^[23]。

6. まとめ

本稿では、生体高分子の構造ダイナミクスの解析手法の一つである $R_{1\rho}$ 緩和分散法の原理をベクトルモデルによって解説し、その応用として核酸分子を対象としたいいくつかの研究例を紹介した。多くの生命現象は、生体高分子間の相互作用とそれに伴う立体配座の変化に支えられている。個々の分子の構造ダイナミクスは、分子間相互作用の速度や強さに影響を及ぼす。さらにこのような分子レベルの過程が多数の分子間で協調して働くことで、酵素反応、シグナル伝達、遺伝子発現などの細胞レベルのイベントへとつながり、最終的に形質として観察される生命現象として現れる。この一連の過程を理解するためには、マイクロ秒～ミリ秒スケールの構造ダイナミクスを定量的に捉えることが重要であり、 $R_{1\rho}$ 緩和分散法はそのための有力な手法である。

さらに、生体高分子の構造ダイナミクスを理解するためには、試験管内の希薄溶液条件だけでなく、分子込み合いをはじめとする細胞内環境の影響も考慮する必要がある。こうした生理的環境下

における構造ダイナミクスの解明が、核酸分子の機能をより深く理解することにつながると筆者は考えている。今後も、 $R_{1\rho}$ 緩和分散法をはじめとするNMR法が、核酸分子の機能解明や創薬、アプタマー設計において重要な役割を担い続けることが期待される。

謝 辞

博士号取得後1年に満たない若輩者である筆者に、第64回NMR討論会チュートリアルコースでの講演機会を与えてくださいました山内一夫先生、鈴木悠先生をはじめ、NMR討論会関係者の皆様に深く感謝申し上げます。また、本稿の執筆および編集に際して丁寧にご対応くださいました編集委員の相沢智康先生と田巻初先生に、心より御礼申し上げます。

本稿で紹介させていただいた研究は、筆者が博士課程を過ごした京都大学・片平正人先生の研究室において実施したものであり、片平正人先生をはじめ、永田崇先生、山置佑大先生、および研究室の皆様には、多大なるご指導を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。また、本稿で紹介したアプタマーに関する研究は、千葉工業大学の坂本泰一先生らとの共同研究として実施したものです。坂本泰一先生をはじめ、共同研究に携わってくださった共著者の皆様に感謝申し上げます。

最後に、講演時および本稿執筆時に筆者が所属する東京薬科大学分子生物物理学教室の三島正規先生、青山洋史先生、武田光広先生をはじめ、教室の皆様に、日頃から多くのご指導とご支援をいただいております。ここに厚く御礼申し上げます。

引用文献

- [1] Boehr, D.D., Nussinov, R. & Wright, P.E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 789–796 (2009).
- [2] Franklin, R.E. & Gosling, R.G. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **171**, 740–741 (1953).
- [3] Watson, J.D. & Crick, F.H.C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
- [4] Watson, J.D. & Crick, F.H.C. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **171**, 964–967 (1953).
- [5] Palmer, A.G. III. NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. *Chem. Rev.* **104**, 3623–3640 (2004).
- [6] Rangadurai, A., Szymanski, E.S., Kimsey, I.J., Shi, H. & Al-Hashimi, H.M. Characterizing micro-to-

- millisecond chemical exchange in nucleic acids using off-resonance $R_{1\rho}$ relaxation dispersion. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **112-113**, 55–102 (2019).
- [7] Massi, F., Johnson, E., Wang, C., Rance, M. & Palmer, A.G. III. NMR $R_{1\rho}$ rotating-frame relaxation with Weak Radio Frequency Fields. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2247–2256 (2004).
- [8] McConnell, H.M. Reaction rates by nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* **28**, 430–431 (1958).
- [9] Nikolova, E.N., Kim, E., Wise, A.A., O'Brien, P.J., Andricioaei, I. & Al-Hashimi, H.M. Transient Hoogsteen base pairs in canonical duplex DNA. *Nature* **470**, 498–502 (2011).
- [10] Conroy, D.W., Xu, Y., Shi, H., Gonzalez Salguero, N., Purusottam, R.N., Shannon, M.D., Al-Hashimi, H.M. & Jaroniec, C.P. Probing Watson-Crick and Hoogsteen base pairing in duplex DNA using dynamic nuclear polarization solid-state NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **119**, e2200681119 (2022).
- [11] Xu, Y., McSally, J., Andricioaei, I. & Al-Hashimi, H.M. Modulation of Hoogsteen dynamics on DNA recognition. *Nat. Commun.* **9**, 1473 (2018).
- [12] Ben Imeddourene, A., Zargarian, L., Buckle, M., Hartmann, B. & Mauffret, O. Slow motions in A-T rich DNA sequence. *Sci. Rep.* **10**, 19005 (2020).
- [13] Shi, H., Kimsey, I.J., Gu, S., Liu, H.-F., Pham, U., Schumacher, M.A. & Al-Hashimi, H.M. Revealing A-T and G-C Hoogsteen base pairs in stressed protein-bound duplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **49**, 12540–12555 (2021).
- [14] Gu, S., Szymanski, E.S., Rangadurai, A.K., Shi, H., Liu, B., Manghrani, A. & Al-Hashimi, H.M. Dynamic basis for dA•dGTP and dA•d8OGTP misincorporation via Hoogsteen base pairs. *Nat. Chem. Biol.* **19**, 900–910 (2023).
- [15] Liu, B., Shi, H., Rangadurai, A., Nussbaumer, F., Chu, C.-C., Erharter, K.A., Case, D.A., Kreutz, C. & Al-Hashimi, H.M. A quantitative model predicts how m⁶A reshapes the kinetic landscape of nucleic acid hybridization and conformational transitions. *Nat. Commun.* **12**, 5201 (2021).
- [16] Kole, K., Gupta, A.M. & Chakrabarti, J. Conformational stability and order of Hoogsteen base pair induced by protein binding. *Biophys. Chem.* **301**, 107079 (2023).
- [17] Furukawa, A., Walinda, E., Arita, K. & Sugase, K. Structural dynamics of double-stranded DNA with epigenome modification. *Nucleic Acids Res.* **49**, 1152–1162 (2020).
- [18] Ken, M.L., Roy, R., Geng, A., Ganser, L.R., Manghrani, A., Cullen, B.R., Schulze-Gahmen, U., Herschlag, D. & Al-Hashimi, H.M. RNA conformational propensities determine cellular activity. *Nature* **617**, 835–841 (2023).
- [19] Ellis, R.J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 597–604 (2001).
- [20] Nakano, S., Miyoshi, D. & Sugimoto, N. Effects of molecular crowding on the structures, interactions, and functions of nucleic acids. *Chem. Rev.* **114**, 2733–2758 (2014).
- [21] Sakamoto, T., Yamaoki, Y., Nagata, T. & Katahira, M. Contrasting effects of different molecular crowding environments on base-pair opening/closing dynamics of DNA triplex structures. *FEBS J.* (2026). doi: 10.1111/febs.70503.
- [22] Sakamoto, T., Yamaoki, Y., Nagata, T. & Katahira, M. Detection of parallel and antiparallel DNA triplex structures in living human cells using in-cell NMR. *Chem. Commun.* **57**, 6364–6367 (2021).
- [23] Hasegawa, T., Sakamoto, T., Sekiguchi, M., Horiuchi, M., Ishikawa, T., Katahira, M., Nagata, T., Yamagishi, K. & Sakamoto, T. Impact of nucleotide flexibility on aptamer-protein recognition: RNA vs RNA-DNA chimera. *ACS Chem. Biol.* **21**, 1053–1062 (2026).



坂本 知樹 (さかもと・ともき)

2025年 京都大学 大学院 エネルギー科学研究科 エネルギー基礎科学専攻博士後期課程
修了 博士(エネルギー科学)(2025年3月 京都大学)

2025年—現在 東京薬科大学 薬学部 分子生物物理学教室(三島研究室) 助教

オーストラリアでの研究生活で得たもの

横浜国立大学 大学院環境情報研究院

金井 典子

kanai-noriko-jv@ynu.ac.jp

修士課程だった当時、国際会議への参加を機に研究留学をしたいという強い希望が芽生え、指導教員の川村出先生が7か月という長期間の滞在を快く承諾してくださいました。オーストラリアという国を選んだのは、今まで行ったことがなく、気候が良さそうだからという程度の理由でした。川村出先生の指導教員で大学にいらした内藤晶先生より、ご交流のあった西シドニー大学のBill Price先生をご紹介いただき、好奇心のみを胸に2019年に渡豪しました。

オーストラリアは人口の実に約3人に1人が海外生まれという、国外にバックグラウンドをもつ移民が非常に多いMulti cultureな国です。大学、レストラン、公共交通機関では毎日あらゆる言語が飛び交っています。ラボメンバーもオーストラリア人と海外出身者が半々くらいの割合で、これまで中国、イギリス、ポルトガル、インド、イランなどの多様な国の皆と働きました。現地の人々の働き方は、やはり日本とかなり違いがあり、朝早くから働く人は多いですが、遅くまで残っている人はほぼいません。勤務後の飲み会はなく、その代わりにモーニングティーやランチパーティをするというスタイルです。職位に関係なく、ほぼ皆が年に数週間～1か月ほどのホリデーを取っており、ワークライフバランスが定着していることにも驚きました。

修士課程の当初は正直、英語にあまりついて行けていませんでした。アメリカンイングリッシュの受験勉強で鍛えられた耳には、オーストラリア訛りはもちろん、グループミーティングでは皆早口でしゃべるので、何を話しているかさっぱり分からず、よく落ち込んでいました。しかし、英語が完璧でなくともオーストラリアで生活する人はたくさんいるのです！ 今でも分からない時はあるものの（特にジョークやオーグースラングは難易度が高い）、そこは割り切って重要そうなことは確認をするようにしたところ、聞き間違いはか

なり減りました。

Bill先生のNanoグループで初めに取り組んだのは、イオン液体の拡散NMR測定でした^[1]。拡散NMRの理論を論文や書籍で勉強しつつ、ニューサウスウェールズ大学との共同研究で送られてきたサンプルを使って実際に測定・解析を行いました。このような一連のプロセスを国際共同研究の場で学ぶことができ、貴重な期間でした。西シドニー大学のキャンベルタウンキャンパスのBiomedical Magnetic Resonance Facilityには4台のNMR分光装置（300, 400, 500, 600 MHz）があり、Nanoグループには理論や拡散NMRを研究するチームと、イメージングプローブを使って非人体用のMRIで動植物の組織などを研究する、主に二チームがあります。滞在期間も終わりに近づいた頃、自身の研究材料であった食品廃棄物由来セルロースナノファイバーの解析ツールとしても拡散NMRやMRIを活かせないかと考え（もう少しオーストラリアでの滞在を満喫したかったので）、博士課程後期に進むことを決めました。

セルロースナノファイバーにより乳化したエマルションのダイナミクス解明の研究を日豪両国で行う、という内容で日本学術振興会の特別研究員に無事採択されたものの、帰国直後からCOVID-19によるパンデミックに入ってしまい、当面渡航が叶わなくなりました。横浜国立大学でエマルションの基礎研究を進める傍ら、100ページ以上の渡航許可願を作成し、ついにビザを取得することができました。

2022年1月からの二回目の滞在では、MRIを使ってエマルションの微細構造の経時的变化を可視化する実験と、制限拡散NMRを使って液滴サイズを測定する実験を主に行いました。MRIは、分割した体積（ボクセル）中の原子核（通常はプロトン）の核磁気共鳴情報を空間的画像のコントラストとして得るもので、NMRと同様に特定のシーケンスを用いることで、緩和時間（ T_1 、

T_2) や自己拡散係数 (D) 等の物性値を測定できます。これらの物性値はボクセル毎に解析できるため、不均一な組織やエマルションのサンプルを領域ごとに評価できる利点があります。一年半の滞在中に、日本ではなかなか難しいMRIと拡散NMRを組み合わせた実験を実施することができ、全体構造の把握が難しかったエマルションの不安定化機構を明らかにしました。MRIで

は、エマルション全体を100 μm の分解能で可視化し(図1 (a)、(b))、その成果は、Langmuir誌のSupplementary coverにも採用されました^[2]。また、拡散係数の測定では、粘性が高く白濁したエマルションでも希釈することなく油滴サイズを得ることができ、乳化剤としてのセルロースナノファイバー濃度と油滴サイズの相関を明らかにすることができました^[3](図1 (c))。

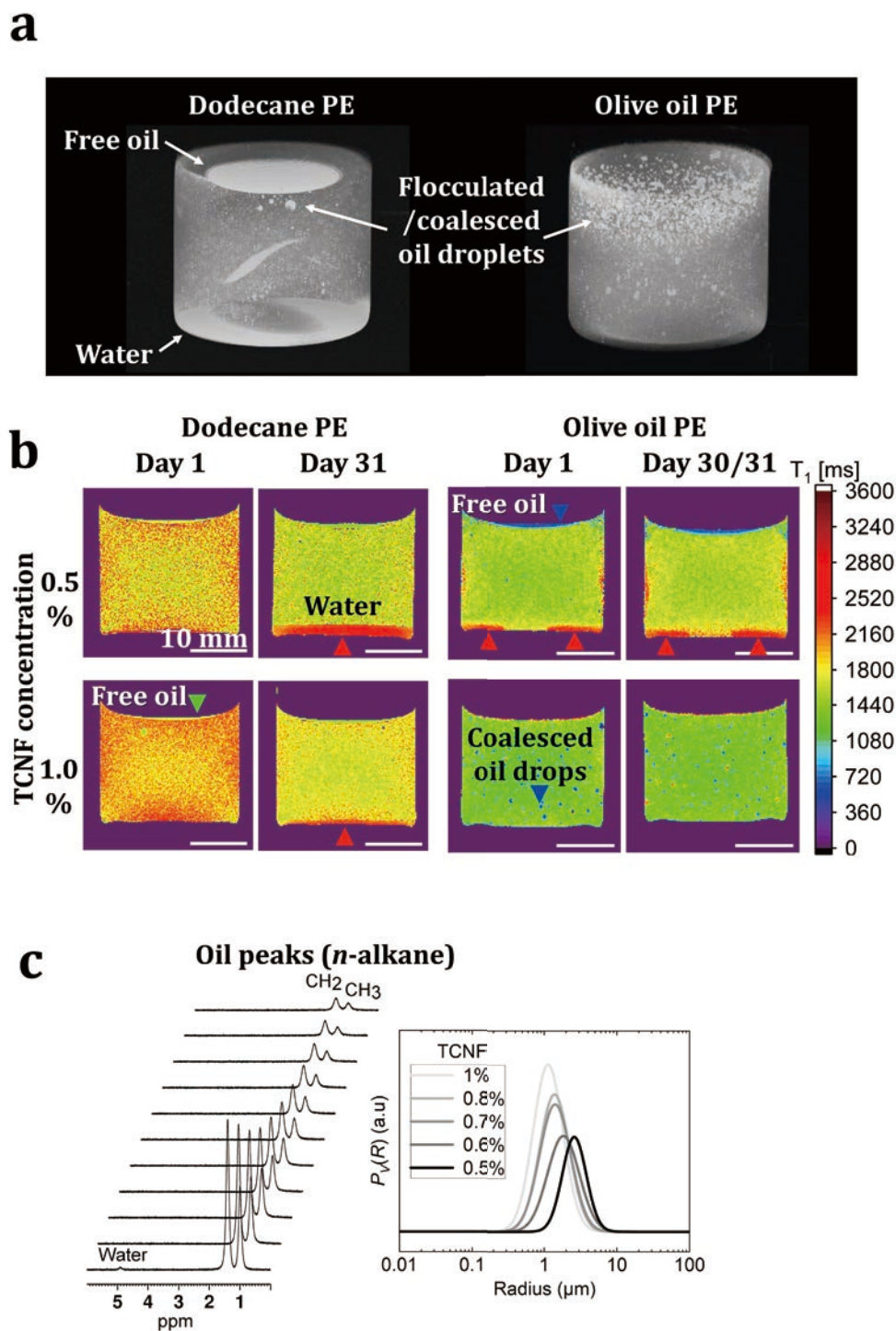


図1 西シドニー大学において行った、MRIと拡散NMRによるエマルションのダイナミクス解析。(a) セルロースナノファイバーを乳化剤として安定化したエマルションの3次元MRI、(b) T_1 マップ、(c) ^1H 制限拡散NMRスペクトルと油滴サイズ分布。(a)、(b)は文献^[2]、(c)は文献^[3]から許可を得て転載。



図2 ホークスベリーキャンパスにあるHawkesbury Institute for the Environment (HIE)。研究所内では各国から訪れた研究者によるセミナーが毎週開催され、活発な交流が行なわれていた。

博士論文の公聴会を半年後に控え、学位取得後はオーストラリアでポスドクをしたいと思っていた頃、西シドニー大学の別キャンパスにあるHawkesbury Institute for the Environment (HIE) (図2)のBen Moore先生と交流する機会がありました。先生は、植物細胞壁研究におけるNMRの活用を模索されていたので、プロジェクトに参加させていただき、海外特別研究員の研究課題として応募しました。補欠の通知が来た後は、国内のアカデミックポストも探し、現職の横浜国立大学 環境情報研究院でテニュアトラック助教に採用いただきました。半ばあきらめていた海外特別研究員の補欠でしたが、2月末に繰り上がり採用となりました。急いで長期出張許可などを得て、多くの先生方のご協力の下、着任から2か月後というタイミングで渡航しました。

2024年6月からの三回目の滞在では、Ben先生の研究グループで、コアラの食餌選択性の解明を目的としたユーカリ葉と糞便中の細胞壁高次構造の溶液ゲルNMR解析を実施しました。グループには、コアラやウシ、ポッサムに関する生態学や栄養学、リモートセンシング等の研究を行うラボメンバーがいました。HIEでは多くの博士課程、ポスドクが共同の実験スペースで研究をしていたので、土壤微生物学、植物生理学、森林生態学関連といった様々な分野の研究者の話を聞くことができ、自身の励みにもなりました。HIEの研究機器は基本的に全てシェアだったので、誰かに相談すれば大抵のことは解決する横の連携が非常に良くとれており、二年間の滞在中で新しい研究手法を多く学ぶことができました。なかなか難しい研究テーマであったものの、自身が扱ってきた「細胞

壁」や「磁気共鳴技術」と生態学を中心とした学際研究ができたのは非常に良い経験で、帰国後の自身の研究に大いに役立てようと思っているところです。

これまでの振り返ると修士課程、博士課程、ポスドクでの三回の研究生生活を経て、多様なバックグラウンドをもつ人々と働き、海外での研究拠点ができたことが自身の一番の糧になったと思います。最近あまり海外に出たがらない学生が多いと聞きますが、修士課程の早い段階で、海外での研究の実際を目の当たりにしたことは、その後の研究滞在のきっかけにもなりました。言語の壁、ビザの問題、周囲の協力など多くのことを解決する必要がありますが、まずはあまり考えすぎずに飛び込む勇気があれば、どうにかなることが多いのではと思っています。

末筆になりますが、五年間にわたるオーストラリアでの研究生生活を支えてくださった日豪両国の先生方とラボメンバー、滞在費のご支援をいただいた日本学術振興会、そして日頃より支えてくれる家族に心より感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Harris, K. R. *et al.* A Volumetric and Intra-diffusion Study of Solutions of AlCl_3 in Two Ionic Liquids - $[\text{C}_2\text{TMEDA}][\text{Tf}_2\text{N}]$ and $[\text{C}_4\text{mpyr}][\text{Tf}_2\text{N}]$. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **24**, 24924–24938 (2022).
- [2] Kanai, N., Willis, S. A., Gupta, A., Kawamura, I. & Price, W. S. Evaluating the Stability of Cellulose Nanofiber Pickering Emulsions Using MRI and Relaxometry. *Langmuir* **39**, 3905–3913 (2023).
- [3] Kanai, N., Willis, S. A., Kawamura, I. & Price, W. S. Droplet size Distribution of Oil-in-Water Pickering Emulsions Stabilized by Cellulose Nanofibers Using Restricted Diffusion NMR. *J. Mol. Liq.* **403**, 124793 (2024).

甲斐荘正恒先生を偲ぶ

大阪大学 蛋白質研究所 名誉教授、横浜市立大学 客員教授

阿久津 秀雄

akutsu@protein.osaka-u.ac.jp

甲斐荘正恒博士の急逝は多くのNMR研究者に驚きと悲しみをもたらしました。甲斐荘先生はいろいろな意味でわが国および世界のNMRコミュニティに大きな影響を与えてきました。安定同位体の効果的な利用に代表される学問的貢献は国際的に高く評価されています。日本核磁気共鳴学会の創立と運営にも重要な貢献をされ、第2代会長を務めました。わが国で開催された2回のICMRBS (International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems)の招致、運営でも中心的な役割を果たされました。その他の国際会議をも通してわが国のNMR関係の学問的業績を世界に広めることに尽力されました。心から哀悼の意を表するとともに、個人的な思い出を述べて故人を偲びたいと思います。

私は大学院時代、リン脂質膜構造の偏光赤外分光解析を行っていました。核酸のリンの周りの構造解析にはNMRが有効であることが分かっていたので、指導教官であった京極好正先生の指示でリン脂質のリンの周りの構造を調べるために味の素中央研究所の甲斐荘先生を訪ねました。1971年のことです。当時、最先端のVarian XL-100 NMR分光装置を使わせていただいて、ズブの素人が処女スペクトルを記録するところまで指導していただきました。測定の合間にはいろいろとNMRや味の素関係の興味深い話を聞かせてもらったことが楽しい思い出です。その後、私は振動分光から核磁気共鳴分光へと専門を換えることになりました。まさに甲斐荘先生は私にとってNMRの師匠です。

超伝導NMR装置が大阪大学蛋白質研究所に導入されると、甲斐荘先生は自分の試料を持ってよく測定にいられたので話をする機会が増えました。当時、有機化合物の構造決定にはNMRが必須なものとなり、かなりの有機化学者がNMR討論会で活躍していました。甲斐荘先生も有機化学がベースでしたが、核酸・タンパク質等生体高分子のNMRによる

構造機能解析に強い興味を持ち、これへの有機化学独自の貢献について一貫した問題意識を持っていたことが他の有機化学者との際立った違いでした。蛋白研に測定に来た折には、重要なことは目の前の測定ではなく、一生の研究目標を探すことだと何時も言っていたことが印象に残っています。キーワードは勿論安定同位体でした。これが後にSAIL (stereo-array-isotope labeling) アミノ酸システムの開発として実を結ぶわけですが、学ぶことの多かった日々です。この頃は国際会議で一緒になることも多くなり、1980年のフランスバンドール、1984年のインドゴアなどでは泊る所も近く、いろいろ議論したことが懐かしい思い出です。特にゴアでは同じロジの向かいどうしの部屋に宿泊したこともあって、セッションの間だけでなく街なかや海岸でも一緒に楽しい時間を過ごしました。この際、いろいろな研究者と知り合いになる恩恵にも与ることができました。甲斐荘先生は美味しいレストランを見つける天才で、宮澤辰雄先生、荒田洋治先生とともにインド風中華料理に舌鼓を打ったこともあります (写真)。



写真 左より荒田、(筆者)、宮澤、甲斐荘先生、於ゴア

甲斐荘先生の影響でわが国ではNMRにおける安定同位体標識法が比較的早く広まりました。私もその恩恵を受けた一人です。横浜国立大学に移った時、所属研究室で扱っていた硫酸還元菌の4ヘムタ

ンパク質、cytochrome c_3 、のNMR解析を始めました。硫酸還元菌は絶対嫌気性菌であるために無酸素下で培養する必要があります。培地も複雑で安定同位体標識は困難を極めました。何とかメチオニンを標識することに成功しました。ヘムメチル基の一部はメチオニンから転移されると考えられていたもので、NMRシグナル帰属のためにヘムメチル基の選択的 ^2H 標識を試みました。しかし、 ^2H 標識されたヘムメチル基の位置は既知のヘム生合成系では説明できないものでした。そもそもそれまで知られていたヘム生合成には酸素が必須であり、絶対嫌気性硫酸還元菌でのヘム合成は謎だったのです。われわれの発見がきっかけとなり、それまで全く予想されていなかった新しいヘム生合成系路の存在が明らかになりました。現在は、この無酸素ヘム生合成系路が生物進化上、最初に現れたヘム合成を今日に伝えるものだと考えられています。

横浜国大時代には甲斐荘先生との本格的な共同研究が始まり、アデノシン粉末の固体高分解能NMR解析に取り組みました。甲斐荘研で ^{13}C 、 ^{15}N 完全標識アデノシンを合成してもらい、私達の研究室の藤原敏道博士が開発した双極子相関パルス系列を用いて ^{13}C 、 ^{15}N シグナルの完全帰属を初めて行いました^[1]。このような手法は脂質膜に結合した生理活性ペプチドの固体NMRによるシグナル完全帰属と構造解析に発展します。SAIL法が発表されると、早速この方法のメリットを生かした巨大膜タンパク質の構造機能解析を検討しました。当時私達が行っていたのは回転モーター膜タンパク質であるF型ATP合成酵素(525 kDa)で、NMRにとっては分子量から言ってもサブユニット構成から言ってもチャレンジングなタンパク質です。研究を進めるに当たっては甲斐荘先生といろいろ情報交換を行いま

した。私達はモーターの核心をなす脂質膜中におけるプロトン移動とローター回転のカップリングメカニズムに興味を持っていました。この解析にはATP合成酵素の全複合体を使う必要がありますので、SAILによる焦点を絞った解析が重要になります。ローターは c -サブユニットで構成されたリングです。そこでSAIL標識した c -サブユニットリングを用いてATP合成酵素全体を膜中に再構成し、これを固体高分解能MAS-NMRで解析することを目指しました。SAILアミノ酸は高価なので選択的標識は無細胞系で行う必要があります。最初は甲斐荘先生の勧めに従って大腸菌無細胞系での発現を試みたのですが、膜タンパク質のためか当時の技術では発現がうまくいきませんでした。そこで私たちは小麦胚芽無細胞系を使った発現の検討を行いました。脂質リポソームを共存させると c -サブユニットが高効率に発現し、脂質膜中で直ちにリングを形成することを見出しました。SAILアミノ酸の威力で0.5 MDaのATP合成酵素でプロトンキャリアーであるグルタミン酸残基の高分解能なシグナルを観測することに成功し、クライオ電子顕微鏡では解析が困難だったその構造とpKaを明らかにしました^[2]。

SAILの成功で忙しくなった後も折に触れ、飲み会や食事会に誘ってくださり、亡くなる少し前まで楽しい時間をともにする機会を持つことができました。今はその笑顔を見ることができなくなり、寂しい限りです。先生のご冥福を心よりお祈りします。

文 献

- [1] T. Fujiwara, K. Sugase, M. Kainosho, A. Ono, A(M) Ono and H. Akutsu, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11351–11352 (1995).
- [2] Y. Todokoro, S.-J. Kang, T. Suzuki, T. Ikegami, M. Kainosho, M. Yoshida, T. Fujiwara, and H. Akutsu, *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 14132–14139 (2022).

東京都立大学名誉教授 甲斐荘正恒先生を偲んで

東京大学 名誉教授、理化学研究所 名誉研究員

嶋田 一夫

kumashiro@tokushima-u.ac.jp

長年にわたり、日本および世界の核磁気共鳴(NMR)分光法の研究に多大な貢献をなされた東京都立大学名誉教授、甲斐荘正恒先生がご逝去になりました。深い悲しみと大きな喪失感を覚えております。ここに心より哀悼の意を表しますとともに、先生のご業績とご人柄を偲び、謹んで追悼の意を表します。

甲斐荘先生は、日本におけるNMR研究の草創期から今日に至るまで、NMRの発展を牽引されてきた第一人者です。卓越した有機化学合成法と、NMR現象に対する深い物理化学的理解とを融合させ、独創的なNMR研究のスタイルを確立されました。そして、NMR技術を駆使した構造生物学的解析や化学反応機構の解析など、多くの優れた研究成果を挙げられました。

50年ほど前になるのでしょうか。甲斐荘先生のご講演をお聞きし、感銘を受けたことがありました。それは、アオキの実のNMR研究についてのお話でした。先生は口径の大きい ^{13}C -NMR測定用チューブにアオキの実を入れて外部ロックを用いて ^{13}C -NMRスペクトルを測定し、細胞中のショ糖など低分子化合物のNMRスペクトルの取得に成功されました。それに続き、鳥の卵をNMRチューブに入れ、NMRスペクトルの測定をされていました。ご発表ではNMRスペクトルの計時変化を示され、シグナル強度が変わっていくことを示され、さらに時間がたつとシグナルが消失するところまで示されました。私を含め聴衆は何故シグナルが消えるのか？と考えましたが、甲斐荘先生は「ここで卵が孵化しました」とタイミングよく説明されました。学問的に優れているばかりでなく、このようにウィットにも富んでいました。このお仕事は、私としては現在のin cell NMRにつながるものにとらえています。

また、先生は高分子量タンパク質のNMR研究にも大きな貢献をされました。1970年代の生体系NMRでは ^1H NMRが主流であり、高分子量化

に伴う線幅の増大が大きな課題でした。その解決法としては、一般には重水素化による線幅の先鋭化が用いられていましたが、甲斐荘先生はアミノ酸カルボニル炭素に着目したアミノ酸選択的安定同位体標識法を開発され、二量体分子量23kDaのセリンプロテアーゼ阻害タンパク質SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*) および分子量78kDaの2:2 SSI-subtilisin 複合体中のカルボニル炭素NMRスペクトルの測定に成功されました。

さらに、 ^{15}N 標識アミノ酸と ^{13}C カルボニル標識アミノ酸による安定同位体二重標識帰属法を考案されました。この方法は、 ^{15}N による ^{13}C カルボニルのJ結合分裂を利用し、カルボニル炭素NMRシグナルの帰属を行うという独創的戦略でありました。当時、J結合現象は主として ^1H - ^1H スピン結合など、同種核間で利用されていましたが、甲斐荘先生は ^{13}C - ^{15}N 異種核間スピン結合に着目され二重標識帰属法を開発され、これはその後の三重共鳴多次元NMRの発展につながるものでした。

先に述べたように、甲斐荘先生は有機化学に関する深い知見を有しておられ、それを生かして独創的な安定同位体標識法を展開されました。その集大成ともいえるのがSAIL法 (Stereo-Array Isotope Labeling: 立体整列同位体標識法) の開発です。このSAIL法では、NMRシグナルの感度向上とスペクトルの簡略化を可能にするよう設計されたアミノ酸 (SAILアミノ酸) を、不斉有機合成と発酵・酵素法を組み合わせで調製します。次いで、無細胞タンパク質合成系などを用いてSAILアミノ酸からなるタンパク質を作製しNMR測定試料とするという、従来のNMR技術とは一線を画す洗練された手法です。海外から来訪した研究者が、先生の机の引き出しに大切に保管されていたSAILアミノ酸をご覧になり、「これは人類の資産である」と語られたというお話は、先生の研究の価値を象徴する逸話として深く印象に残っています。

先生のNMR研究は国内外で広く知られ、数多

くの国際学会で招待講演を務められました。アメリカ、ヨーロッパ、アジアをはじめ世界各地に親交の深い研究者がおられ、日本のNMR研究の国際的プレゼンス向上にも大きく貢献されました。前述のSAIL法をはじめとする独創的な研究成果は著名な国際学術誌に発表され、世界的にも極めて高い評価を受けています。

先生はご自分の研究の進展だけでなく日本のNMRを発展させることに熱意をお持ちでした。NMR国際学会の招致では複数年にわたる運営組織が必要であると考えられ、日本核磁気共鳴学会の立ち上げにご尽力されました。加えてNMR討論会(1989、2004)や生体系磁気共鳴国際会議(ICMRBS1998、2016)など国内外の学会の世話人を務められました。

以上の学問的活動のみならず、私生活においても周囲への細やかな心配りを決して忘れない方で

した。私は研究のみならず、多方面にわたって多くのことをご教示いただきました。また、食に関する造詣も深く、学会や研究会の後にお連れいただいたお店はいずれも素晴らしく、そこで先生が語られるお店や料理にまつわるお話も忘れ難い思い出となっています。

甲斐荘先生のご逝去は、学界にとって計り知れない損失であるとともに、私たちにとっても大きな悲しみです。しかし、先生が築かれた学問の礎、そして後進に遺された教育の精神は、これからも生き続け、未来の研究者たちへ受け継がれ、さらなる発展へとつながっていくものと確信しております。

先生のご冥福を心よりお祈り申し上げますとともに、ここに深い敬意と感謝の念を込めて、謹んで追悼の言葉とさせていただきます。

情熱のサイエンティスト 甲斐荘正恒先生を偲ぶ

トロント大学医学部医学生物物理学研究科・プリンセスマーガレット癌研究センター

伊倉 光彦

Mitsu.Ikura@uhn.ca

2025年の年の暮れ、日本から全く予期せぬ訃報が届いた。甲斐荘正恒先生が12月28日に脳内出血で亡くなられた。あまりにも突然で、まったく予期しなかったことだったので、しばらく呆然とするばかりだった。甲斐荘さん（親しみを込めて、いつも通りにこう呼ばせていただく）の体調がすぐれないことは数ヶ月前から知ってはいた。ただ、風邪由来の肺炎が少し長引いているとのことだったので、それほど心配はしていなかった。それでも、12月に入って、メールの返事が遅かったり、いつもなら長文の返事が返ってくるのに、メールが極めて短くなったりしていたので、気にはなっていた。同様に、甲斐荘さんの親友である John Markley 博士から、私のところへメールがあり、「Kai（英語のニックネーム）からメールの返事が1週間も来ないのだけでも、何か知っているか？」とのことだった。あれは、クリスマス直前だったと記憶する。今にして思うと、12月の暮れには、相当体調が悪かったのかもしれない。それでも、ご逝去後のご家族のお話だと、28日の昼食は奥様と一緒に楽しんでいたとのことと、その直後に自宅で倒れられ、病院に搬送されたが手遅れだったとのことである。本当に急なことだったのだろう。ただただ、ご冥福をお祈りするばかりである。

甲斐荘さんのサイエンスにおける業績や功績については、すでに Peter Wright 博士と共に追悼文（英文）を1月に執筆し、NMR学会ホームページにも掲載されているので、それを参照されたい^[1]。そこで、本稿では、形式的な業績紹介をするのではなく、私が四十余年親しくお付き合いさせていただいた中で感じ取った、甲斐荘さんが我々に残してくれた目に見えない「遺産」を掘り起こしてみたい。それは、甲斐荘正恒博士という人物像であり、サイエンティストとしての生き方の考察でもある。

甲斐荘さんは、本当に「情熱の人」だった。そして、「こだわりの人」でもあった。1970年代の味の素時代から、いち早く安定同位体のNMRへの利用を考えておられた。そして、その姿勢と研究方針は亡くなる直前まで一貫して、変わることはなかった。特定のアミノ酸のカルボニル炭素を¹³C同位体で標識して、そのNMRシグナルをプローブとする手法は、当時極めて斬新でユニークであった。同法を用いた初期のアミノ酸の側鎖ロータマーの研究は当時最先端であった。そして当然のことながら、同法を蛋白質に展開されていった。当時東京大学で精力的に抗体の研究を進められていた故・荒田洋治先生との共同研究も素晴らしかった。多くの研究者が、感度のいいプロトンNMRを利用して、二次元法に流れていた時代である。甲斐荘さんは、自分の方法論にとことんこだわり、それを深められていた。その究極の方法が、2006年にNature誌に発表されたStereo-array isotope labeling (SAIL) 法である^[2]。この成果は、甲斐荘さんのアミノ酸標識法の集大成と言ってもいい。話は少し遡るが、80年代後半に私がNIHに留学し、Ad Bax博士の元で三次元Triple Resonance法の開発に携わった折、国際電話で何度かディスカッションしたことを今でも思い出す。専門的になるが、主鎖のカルボニルおよびアルファ炭素とアミド窒素とのカップリング定数について、経験豊富な甲斐荘さんの知識を拝聴するためだった。その情報は、現在多くの研究者が使っているHNCAやHNCUなどの開発に、極めて重要な知見であった。i番目のアミノ酸残基のアミド窒素とi-1番目の残基の α 炭素の2-bond couplingが比較的大きくなりうることに、当時の私は驚いたのだが、そのことを既にご存知だったと記憶する。このことは、甲斐荘さんもよく覚えておられて、会食の折この話題になると、いつも興奮気味になられたのを思い出す。

私がトロントにラボを持つことになった1991

年頃、甲斐荘さんは東京都立大学の助教授として研究を続けておられた。この頃には、ようやくEメールが研究者の間で広まり始めて、甲斐荘さんと私の通信は主にメールとなった。ほぼ毎日のように届く甲斐荘さんからのメール(全て英文)を私は楽しみにしていた。当時、日本の大学で、高額なNMRの装置を購入することは極めて困難で、甲斐荘さんも大変ご苦労された時代であったと思う。そんな話もいろいろ聞いた。その頃甲斐荘さんは、阪大蛋白研の装置を頻繁に利用されて、蛋白質分解酵素の阻害因子SSIを中心にNMR研究を続けておられた。これは、年代的には80年代だったと思うが、宮城県の鳴子温泉でNMR討論会が開催された時、広い昼敷の大広間でSSIの構造に関して、当時京都大学におられた赤坂一之博士と喧々諤々の議論を熱く交わしておられた姿が、今でも目に焼き付いている。まだ研究者として青かった私には、研究者とはこういうものだとして強く印象づけられた。その熱い議論の裏に存在した確固たる信念と優れた考察力が、私には印象深かったのである。さらに言うならば、一つのテーマ(すなわちSSIの構造)に関して、執拗に考察を深める探究心こそがサイエンスであると思ひ知らされたのである。これほどまでに自分の仕事にこだわりと情熱を持って取り組んでおられた甲斐荘さんの姿を忘れることができない。サイエンスに対するその姿勢は、63歳という若さで都立大を退職され、その後同校と名古屋大学で研究を続けられ、80歳を超えられたつい最近まで、変わることはなかった。一貫してサイエンスを愛し、情熱を持って自分の研究に没頭されていた甲斐荘さんに、心から敬意を表したい。

甲斐荘さんと私の付き合いは、四十余年という長い間続いた。本当に楽しい思い出がたくさんある。そのかけがえのない時間と温かいおもてなしの心に、心から感謝している。日本各地で舌鼓を打った鰯や海産物、上野のとんかつ店めぐり、銀座の某有名店での鰻、そしてその後いつも甘いものをご一緒するのが決まりだった。海外では、学会でご一緒するたびに、各地のレストランを一緒に楽しんだ。中でも忘れられないのは、韓国の釜山で会議があった時の出来事である。会議終了後に同僚数人と海岸を散策していたところ、海産物を調理している屋台が何軒も並んでいた。甲斐荘さんは、持ち前の好奇心で並べられた海産物を

じっくりと眺め、その中から甲殻類とも貝類ともつかない不思議な海産物を選び注文した。その珍品は、強いというならば、シャコに似たものだったと記憶している。調理され湯気を立てているその珍しい海産物を美味しそうに頬張っておられた姿が今でも忘れられない。釜山であの海産物を見つけた時の甲斐荘さんの鋭い眼光は、お目当ての食べ物屋を見つけた時の「井之頭五郎」のようだった。興味を持ったものはとにかく試してみようとするあの情熱は、蛋白質の本質を深く探求しようとするサイエンス・マインドと共通する。甲斐荘さんは、サイエンスに関しても、食に関しても、情熱を持って向き合われた。世界各地で開催された会議に共に参加して、様々な料理をご一緒できないかと思うと、本当に寂しい限りである。

甲斐荘さん、あなたは実にたくさんの友人を世界中にお持ちだった。グローバルな研究者との交流、そしてフレンドシップを何よりも大切にしておられた。ICMRBS、ISMAR、そしてAP-NMRなどの数多くの国際会議に積極的に参加され、特にICMRBSに関しては、日本への二度の招致の実現に大いに貢献された。国際交流の重要性、他国の研究者とのディスカッションの重要性を若い世代の研究者に訴え続けたその姿勢には、深い敬意を覚える。親密な研究者との交流をご自身が心から一番楽しんでおられたのだと思う。その際に、いつもあなたのそばに寄り添っておられた奥様、光枝さんの存在は本当に美しかった。あなたがどれほど光枝さんを愛し、大切にされていたかは、言葉や態度の節々に現れる優しさに滲み出ていた。私はそばでいつも目を細めながら拝見していた。家族への思い、愛情は、甲斐荘さんが私も含めた周りの友人たちに注がれたフレンドシップの中にも、脈々と流れており、甲斐荘さんの温かさ、優しさを忘れることはないだろう。そこにもまた、甲斐荘さん固有の情熱が存在した。本当に熱い人だった。

この追悼文を結ぶにあたり思うことは、甲斐荘さん、あなたの存在感の大きさである。あなたは、日本核磁気共鳴学会の立ち上げに尽力され、学会発足から今日まで学会を常に支援されてきた。そのあなたがなくなり、同学会は一つの時代の幕を閉じたと言っても過言ではない。昭和の偉大なるサイエンティストがまた一人いなく

なった。あなたは、亡くなる直前まで、サイエンス一筋の人生を全うされた。ご家族への愛情、気を許した友人との深い付き合い、全てにおいて情熱を持って、ことにあたられたあなたは、「情熱のサイエンティスト」だ。もう、NMR討論会等であなたの鋭い質問を拝聴することはできなくなった。様々な国際会議で、情熱溢れ出るあなたの講演を聴くことはかなわなくなった。懇親会や食事会であなたの素晴らしい笑顔を見ることはできなくなった。長年にわたっていただいたあなたの長

文のメールは、もう私の受信ボックスには届かない。本当に寂しい限りである。あなたは、私を含めて多くの友人、知人の心の中に大きな穴を開けたまま旅立たれた。甲斐荘正恒先生、心からご冥福をお祈りします。

引用文献

- [1] https://www.nmrj.jp/pdf/nl/20260116_1293_1.pdf
- [2] Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations. Kainosho M, Torizawa T, Iwashita Y, Terauchi T, Mei Ono A, Güntert P. *Nature*. **440(7080)**, 52-7 (2006 Mar 2).