

# 第40回 NMR 討論会

## 講演要旨集

会期 2001年11月14日(水)～11月16日(金)

会場 京都パークホテル

共 催

高分子学会・日本化学会・日本磁気共鳴医学会・日本生化学会・日本薬学会

日本生物物理学会・日本農芸化学会・日本物理学会・日本分析化学会

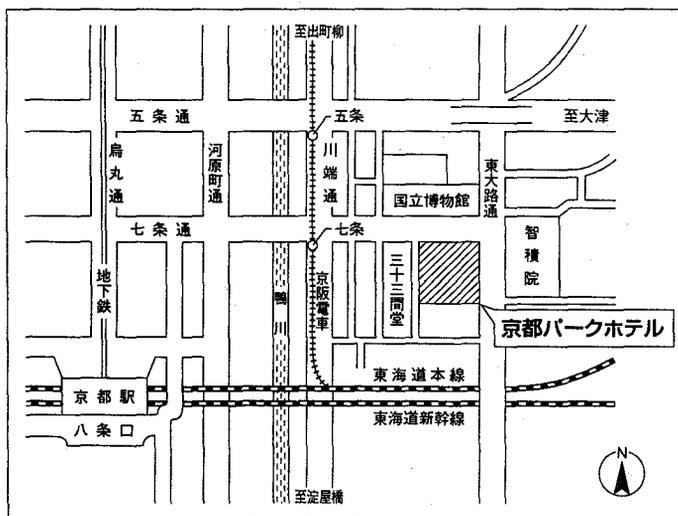
# 第40回 NMR 討論会 会場案内

京都パークホテル

(京都市東山区三十三間堂廻り町 644-2)

<http://www.kyopark.co.jp/>

## ◆会場案内



- ◆交通 JR 京都駅(烏丸中央口)から  
市バス206, 208 番(D2乗場)約15分 博物館・三十三間堂前下車  
タクシー約5分

- ◆連絡先 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄 京都大学化学研究所  
第40回NMR討論会 世話人 堀井 文敬  
TEL: 0774-38-3148 FAX: 0774-38-3148  
E-mail: horii-nmr40@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp  
<http://modych.kuicr.kyoto-u.ac.jp/nmr40/index.html>

- ◆当日連絡先 TEL: 075-525-3111 (代)

## 第40回 NMR 討論会プログラム

第1日 11月14日 (水)

(10:00-10:10)

開会の挨拶

(10:10-11:10)

座長 安藤勲

1L1  $^1\text{H}$ -Dipolar Driven  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  Polarization Transfer under MAS and Its Applications 2  
(京大院理) ○竹腰清乃理、中村新治、寺尾武彦

1L2 固体NMRによるカルシトニンのアミロイド様繊維形成機構の解析 4  
(横浜国大院工<sup>1</sup>、姫路工大<sup>2</sup>、オックスフォード大学<sup>3</sup>、新潟経営大<sup>4</sup>) ○内藤晶<sup>1,2</sup> 上平美弥<sup>2,3</sup>、大城由紀<sup>2</sup>、土肥輝美<sup>2</sup>、井上良三<sup>2</sup>、辻暁<sup>2</sup>、野坂篤子<sup>4</sup>、齊藤肇<sup>2</sup>

1L3 エリ蚕絹フィブロインに見られる  $\alpha$ -helix構造の安定化機構に関する固体NMR研究 8  
(東京農工大工) ○中澤靖元、西尾聡子、大郷耕輔、朝倉哲郎

- 休憩 -

(11:30-12:30)

座長 朝倉哲郎

1L4 固体NMRによるバクテリオロドプシンの膜貫通領域の構造解析 10  
(姫路工大理) ○辻暁、長谷川潤、河南るり子、谷生道一、吉良敦史、荒川規、齊藤肇

1L5  $^1\text{H}$  PFGSE NMR法による固相反応場ネットワークポリスチレン中の物質拡散に関する研究 (Ⅲ) 12  
(東工大院理工) ○山根祐治、小林将俊、黒木重樹、安藤勲

1L6 Total Spinning Sideband Summation (TOSS $\Sigma$ ) 法の開発 14  
(バリエンテテクノロジーズジャパン<sup>1</sup>、分子研<sup>2</sup>) 芦田淳<sup>1</sup>、桑原大介<sup>2</sup>、○中井利仁<sup>1</sup>

- 昼食 -

(13:45-15:30)

ポスターセッション (説明義務ポスター番号: 3の倍数+1)

(15:30-16:50)

座長 斎藤肇

1L7 1次元反強磁性混合金属錯体  $[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{X}(\text{chxn})_2]\text{X}_2$  (X:Cl,Br;chxn:cyclohexanediamine)の $^{13}\text{C}$ と $^1\text{H}$  固体NMR 16  
(和歌山大教育<sup>1</sup>、筑波大化<sup>2</sup>) ○木村憲喜<sup>1</sup>、加納正隆<sup>2</sup>、高石慎也<sup>2</sup>、池田龍一<sup>2</sup>

1L8 STRAFIイメージング及びCRAMPS、MQMASを利用した不定形耐火物の乾燥過程の解析 18  
(新日鐵先端研<sup>1</sup>、University of Surrey<sup>2</sup>) ○齋藤公児<sup>1</sup>、金橋康二<sup>1</sup>、Peter J. McDonald<sup>2</sup>

座長 堤耀広

1L9 超臨界水の静的および動的構造のNMRによる研究 22  
(京大化研) ○松林伸幸、中尾奈穂子、若井千尋、中原勝

1L10 超偏極Xe-129ガスの緩和特性:  $T_1$ 測定におけるガラスの材質効果および拡散の影響 26  
(阪大医) ○神谷貴史、清水隆興、柳川康洋、木村敦臣、藤原英明

- 休憩 -

(17:05-18:05)

座長 渡部徳子

1L11  $^1\text{H}$  NMRを用いる脳代謝機能評価系の構築 28  
(国立環境研<sup>1</sup>、筑波大医<sup>2</sup>) ○三森文行<sup>1</sup>、熊谷 恵<sup>1,2</sup>、山根一祐<sup>1</sup>

1L12 ラット脳脊髄液産生への血中炭酸ガス分圧の影響: Gd-DTPA 造影  $T_1$ 強調MRI法による測定 30  
(京都医大一生理<sup>1</sup>、精神神経センター神経研<sup>2</sup>、岐阜大医<sup>3</sup>、生理学研分子生理<sup>4</sup>) ○瀬尾芳輝<sup>1</sup>、鷹股亮<sup>1</sup>、荻野孝史<sup>2</sup>、森田啓之<sup>3</sup>、村上政隆<sup>4</sup>

1L13 骨粗鬆症診断用MRIの開発 34  
(筑波大物理学系<sup>1</sup>、エム・アール・テクノロジー<sup>2</sup>、筑波大臨床医学系<sup>3</sup>、住友特殊金属<sup>4</sup>) 山崎由香子<sup>1</sup>、拝師智之<sup>2</sup>、松田善正<sup>1</sup>、橋本征太郎<sup>1</sup>、宇津澤真<sup>2</sup>、○巨瀬勝美<sup>1</sup>、吉岡大<sup>3</sup>、中西昭男<sup>4</sup>、岡田重益<sup>4</sup>、遠藤政治<sup>4</sup>、青木雅昭<sup>4</sup>、津崎剛<sup>4</sup>

第2日 11月15日(木)

(9:30-10:50)

座長 嶋田一夫

2L1 溶液中蛋白質の<sup>15</sup>N化学シフト異方性観測とその応用 40  
(北陸先端大新素材セ) ○楯真一、栗田順一、島原秀登

2L2 マイクロ波温度ジャンプNMR法の開発 44  
(神戸大院自然) ○川上勝、赤坂一之

座長 赤坂一之

2L3 水素結合を介したJカップリング定数を用いたN-H...N水素結合の解析 46  
(都立大理CREST<sup>1</sup>、奈良先端大バイオ<sup>2</sup>) ○児嶋長次郎<sup>1,2</sup>、石川麗<sup>1</sup>、小野晶<sup>1</sup>、甲斐荘正恒<sup>1</sup>

2L4 構造ゲノム科学プロジェクトにおけるNMR 48  
(理研GSC) ○横山茂之、廣田洋、木川隆則、白水美香子

- 休憩 -

(11:10-12:40)

特別講演

座長 堀井文敬

2SL1 Advanced Solid-State NMR Techniques for Characterizing the Structure of Complex Organic Materials 54  
(Iowa State University, USA) Klaus Schmidt-Rohr

座長 寺尾武彦

2SL2 New Twists for Decoupling and Recoupling Combined with Fast MAS 56  
(ETH Zentrum, Switzerland) Beat H. Meier

- 昼食 -

(14:00-15:40)

ポスターセッション (説明義務ポスター番号: 3の倍数+2)

(15:40-17:10)

特別講演

座長 甲斐荘正恒

2SL3 Cross-Correlated Relaxation for the Study of Biological Macromolecules 58  
(CNRS, France) Dominique Marion

座長 阿久津秀雄

2SL4 Understanding Intermolecular Multiple-Quantum Coherences and Their Applications 60  
(Princeton University, USA) Warren S. Warren

(17:10-17:40)

NMR学会発足総会

(18:00-20:00)

懇親会

第3日 11月16日(金)

(9:30-10:50)

座長 稲垣冬彦

3L1 トランスグルタミナーゼの新規スクリーニング法 62  
(味の素中研) ○榛葉信久、横山敬一、鈴木榮一郎

3L2 高圧NMRによるプリオン蛋白の安定性及びダイナミクスの研究 66  
(岐阜大医<sup>1</sup>、理研<sup>2</sup>、UCSF<sup>3</sup>) ○桑田一夫<sup>1</sup>、李華<sup>2</sup>、山田博昭<sup>2</sup>、James Thomas<sup>3</sup>、赤坂一之<sup>2</sup>

座長 横山茂之

3L3 Maf群蛋白質MafGのDNA結合ドメインの立体構造解析 68  
(筑波大TARAセ<sup>1</sup>、応用生物化学系<sup>2</sup>、基礎医学系<sup>3</sup>) ○楠英樹<sup>1,3</sup>、本橋ほづみ<sup>1,3</sup>、勝岡史城<sup>3</sup>、  
諸橋昭雄<sup>2</sup>、山本雅之<sup>1,3</sup>、田中俊之<sup>1,2</sup>

3L4 カイコ麻痺ペプチドBmPPのNMR法による立体構造解析 70  
(生研機構<sup>1</sup>、富山医薬大薬<sup>2</sup>、農業生物資源研<sup>3</sup>、北大低温研<sup>4</sup>) ○三浦和紀<sup>1,2</sup>、神村学<sup>3</sup>、  
相沢智康<sup>1,2</sup>、木内信<sup>3</sup>、早川洋一<sup>4</sup>、水口峰之<sup>2</sup>、河野敬一<sup>2</sup>

- 休憩 -

(11:10-12:30)

座長 神藤平三郎

- 3L5 ヒト遺伝子修復酵素 hMTH1 の構造決定とその加水分解の研究 72  
(横浜市大院総合理<sup>1</sup>、奈良先端大バイオ<sup>2</sup>、九大生医研<sup>3</sup>、北大院薬<sup>4</sup>) ○三島正規<sup>1</sup>、伊藤紀幸<sup>2</sup>、酒井康成<sup>3</sup>、紙谷浩之<sup>4</sup>、中別府雄作<sup>3</sup>、白川昌宏<sup>1</sup>
- 3L6 NMRを用いた膜傷害性ペプチド・sapeicinの機能発現機構の解明 76  
(東大院薬系<sup>1</sup>、三菱生命研<sup>2</sup>、理研名取特別研究室<sup>3</sup>、産総研JBIRC<sup>4</sup>) 竹内恒<sup>1</sup>、高橋栄夫<sup>4</sup>、須貝真理子<sup>2</sup>、河野俊之<sup>2</sup>、関水久<sup>1</sup>、名取俊二<sup>3</sup>、○嶋田一夫<sup>1,4</sup>

座長 西村善文

- 3L7 リボソーム再生因子(RRF)のダイナミクス 78  
(阪大院薬) ○吉田卓也、岡伸一郎、内山進、中野博明、大久保忠恭、小林祐次
- 3L8 RNA結合蛋白質におけるダイナミクスと結合能の相関 80  
(横浜国大院環境情報) 宮の入洋平、渡辺道直、榎園能章、宮下博之、池田哲郎、上杉晴一、○片平正人

- 昼食 -

(13:45-15:30)

ポスターセッション (説明義務ポスター番号: 3の倍数)

(15:30-17:10)

座長 小林祐次

- 3L9 新規ドメインPC motif-containing region (PCCR) の立体構造とPBIドメイン認識機構 82  
(北大院薬<sup>1</sup>、都臨床研<sup>2</sup>、九大生体防御医研<sup>3</sup>、金沢大がん研<sup>4</sup>、CREST/JST<sup>5</sup>) ○吉永壮佐<sup>1</sup>、寺沢宏明<sup>2</sup>、野田祐紀子<sup>3</sup>、伊藤隆司<sup>4</sup>、横地政志<sup>5</sup>、小椋賢治<sup>1</sup>、住本英樹<sup>3,5</sup>、稲垣冬彦<sup>1,5</sup>
- 3L10 リゾチーム変異体2SS[6-127,30-115]のNMRによる構造解析 84  
(関学大理<sup>1</sup>、神戸大理<sup>2</sup>) ○野田康夫<sup>1</sup>、宮内弘世<sup>1</sup>、平井健一<sup>1</sup>、坂本恵子<sup>1</sup>、橋秀樹<sup>2</sup>、瀬川新一<sup>1</sup>

座長 白川昌宏

- 3L11 Human Lysozymeの構造と運動に与える低温効果の解析 88  
(北大院理<sup>1</sup>、富山医薬大<sup>2</sup>、千葉工試<sup>3</sup>、産総研北海道セ<sup>4</sup>、バリエーションジャパン<sup>5</sup>) ○久米田博之<sup>1</sup>、三浦和紀<sup>2</sup>、小橋川敬博<sup>1</sup>、岡千寿<sup>3</sup>、三浦愛<sup>4</sup>、根本暢明<sup>5</sup>、新田勝利<sup>1</sup>、津田栄<sup>4</sup>
- 3L12 プロテインジスルフィドイソメラーゼの高次構造の構築と相互作用のNMR解析 90  
(名古屋市大院薬<sup>1</sup>、豊田中研<sup>2</sup>) 原田拓志<sup>1</sup>、栗本英治<sup>1</sup>、浅見修<sup>2</sup>、梶野勉<sup>2</sup>、山口芳樹<sup>1</sup>、○加藤晃一<sup>1</sup>
- 3L13 遺伝的アルゴリズムによるNMR蛋白質立体構造決定自動化の試み 92  
(徳島大<sup>1</sup>、北陸先端大<sup>2</sup>) ○小野功<sup>1</sup>、藤木洋<sup>1</sup>、小野典彦<sup>1</sup>、植真一<sup>2</sup>

--- ポスターセッション 演題 ---

[固体測定法の開発]

- P1 Eledoisin Related Peptideの固体2次元NMR法による帰属と構造解析 98  
(京大院理) ○大橋竜太郎、水野敬、竹腰清乃理、寺尾武彦
- P2 The Effect of rf Inhomogeneity on Heteronuclear Dipolar Recoupling in Solid State NMR; Practical Performance of SFAM and REDOR 100  
(横浜国大<sup>1</sup>、National High Magnetic Field Laboratory<sup>2</sup>、Department of Chemistry and Institute of Molecular Biophysics, Florida State University<sup>3</sup>) ○西村勝之<sup>1,2</sup>、Riqiang Fu<sup>2</sup>、Timothy A. Cross<sup>2,3</sup>
- P3 3次元固体高分解能NMR法の開発とマストバランXへの応用 104  
(阪大蛋白研<sup>1</sup>、横浜国大工<sup>2</sup>、群馬大工<sup>3</sup>、三菱生命研<sup>4</sup>) ○戸所泰人<sup>1</sup>、柳下元<sup>2</sup>、若松馨<sup>3</sup>、河野俊之<sup>4</sup>、藤原敏道<sup>1</sup>、阿久津秀雄<sup>1</sup>
- P4 スラグ構造解析における高磁場MQ-MAS法の有効性 106  
(日本電子<sup>1</sup>、新日鐵<sup>2</sup>) ○下池田勇一<sup>1</sup>、杉沢寿志<sup>1</sup>、金橋康二<sup>2</sup>、斎藤公児<sup>2</sup>

P5	MAS条件下で同種核二量子双極子相互作用をリカップリングできるオフセット帯域の、RFパルス列による制御 (阪大たんぱく研) ○松木陽、藤原敏道、阿久津秀雄	108
P6	Uniform $^1\text{H} \rightarrow ^2\text{H}$ Cross Polarization (UNI-CP) in Solids (京大理) ○水野敬、竹腰清乃理、寺尾武彦	112
P7	$^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR (京大院理) ○中村新治、竹腰清乃理、寺尾武彦	114
P8	光・マイクロ波誘導偏極核スピンの高磁場観測 (京大院理) ○古布村亮次、武田和行、阿部智彦、竹腰清乃理、寺尾武彦	116
[固体物性、高分子、固体イメージング]		
P9	固体NMRによる(AlaGlyGly) <sub>10</sub> の精密構造の決定とクモ牽引糸の構造との関連 (東京農工大 <sup>1</sup> 、バリアンテクノロジーズジャパン <sup>2</sup> ) ○芦田 淳 <sup>1,2</sup> 、小松 耕平 <sup>1</sup> 、朝倉哲郎 <sup>1</sup>	120
P10	固体NMRによるポリシロキサン構造と機能発現のメカニズムの解析 (東工大院理工) ○木村英昭、黒木重樹、安藤勲	122
P11	二次元二量子固体NMR法によるポリエチレンナフタレートのコンホメーション解析 (京大化研 <sup>1</sup> 、Iowa State University <sup>2</sup> ) ○乾延彦 <sup>1</sup> 、梶弘典 <sup>1</sup> 、矢野達也 <sup>1</sup> 、堀井文敬 <sup>1</sup> 、Klaus Schmidt-Rohr <sup>2</sup>	124
P12	二次元固体 $^{13}\text{C}$ MAT法による高分子のダイナミクス解析 (京大化研) ○福家一則、梶弘典、磯村武範、田井利弘、堀井文敬	126
P13	The analysis of $\text{O}^2\text{H}-\pi$ interaction in phenoxy resins by a MAS NMR method without irradiating $^2\text{H}$ nuclei (京大化研 <sup>1</sup> 、Iowa State University <sup>2</sup> ) ○梶弘典 <sup>1</sup> 、堀井文敬 <sup>1</sup> 、Klaus Schmidt-Rohr <sup>2</sup>	128
P14	無機-有機分子複合材料のNMRによる構造、分子運動の解析 (京大化研) ○日下康成、増田憲二、堀井文敬	132
P15	バクテリアセルロースのマイクロフィブリル構造に関する固体スピン拡散NMR解析 (京大化研 <sup>1</sup> 、福井高専 <sup>2</sup> ) ○増田憲二 <sup>1</sup> 、安達雅幸 <sup>1</sup> 、平井諒子 <sup>1</sup> 、山本裕之 <sup>2</sup> 、堀井文敬 <sup>1</sup>	134
P16	拡散NMRイメージング法によるポリメタクリル酸ゲル中の金属イオンおよび水の拡散過程の研究 (東工大院理工) ○佐々木暁嗣、堀田芳生、黒木重樹、安藤勲	136
P17	固体高分解能NMR法によるUV照射DNAの構造に関する研究 (防衛大応化 <sup>1</sup> 、北大院地球環境 <sup>2</sup> ) ○浅野敦志 <sup>1</sup> 、山田真路 <sup>2</sup> 、西則雄 <sup>2</sup> 、黒津卓三 <sup>1</sup>	140
P18	$^{13}\text{C}$ および $^1\text{H}$ -NMRによる凍結乾燥製剤の高分子添加剤における主鎖および側鎖の運動性の解析 (国立衛研) ○吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄	142
P19	$^{13}\text{C}$ NMR緩和測定による水溶性ポリペプチドの分子運動 (北大院工) ○内野新一、堤耀広	144
P20	高圧 $^{129}\text{Xe}$ NMRによる高分子中の自由体積のキャラクタリゼーションとXeの臨界挙動 (帝人構造解析研 <sup>1</sup> 、阪大院理 <sup>2</sup> 、東大原総セ <sup>3</sup> ) ○永阪文愷 <sup>1</sup> 、尾身洋典 <sup>2</sup> 、江口太郎 <sup>2</sup> 、中村亘男 <sup>2</sup> 、伊藤泰男 <sup>3</sup>	146
P21	パルスNMR法によるアクリル酸、アクリル酸エステルの塊重合に関する研究 III (防衛大応化 <sup>1</sup> ) ○木本博喜、福田敦子、浅野敦志、黒津卓三	148
P22	絹フィブロインモデル化合物の構造設計及びNMR構造解析 (東京農工大 <sup>1</sup> 、生物系特定産業技術研究推進機構 <sup>2</sup> ) ○趙晨華 <sup>1,2</sup> 、小松耕平 <sup>1</sup> 、矢吹一人 <sup>1</sup> 、朝倉哲郎 <sup>1</sup>	150
P23	多孔性銅錯体の吸着ゲストの固体NMR (京大院工) ○堀毛悟史、北浦良、北川進	152
P24	ポリエチレンオキサイドをベースとした架橋型高分子電解質への側鎖導入の割合とNMRで観測するイオン拡散の相関 (産総研 <sup>1</sup> 、ユアサコーポレーション <sup>2</sup> ) ○早水紀久子 <sup>1</sup> 、秋葉悦男 <sup>1</sup> 、相原雄一 <sup>2</sup> 、坂東寿則 <sup>2</sup>	154

P25	P (VDF <sub>73</sub> /TrFE <sub>27</sub> )/at-PMMA ブレンドとNMR交差緩和 (北大院工 <sup>1</sup> 、山形大工 <sup>2</sup> ) ○津村憲史 <sup>1</sup> 、石井文明 <sup>1</sup> 、堤耀広 <sup>1</sup> 、大東弘二 <sup>2</sup>	156
P26	ポリブチレン-2,6-ナフタレートの結晶構造と分子運動 (群馬大工) 田辺豪、上原宏樹、○山延健、甲本忠史	158
P27	メチレン鎖を有する脂肪族ポリエステル系共重合体の固体NMR法によるキャラクタリゼーション (理研高分子化学 <sup>1</sup> 、理研物質基盤 <sup>2</sup> 、東工大院総合理工 <sup>3</sup> ) ○桑原和弘 <sup>1</sup> 、仲村高志 <sup>2</sup> 、阿部英喜 <sup>1</sup> 、土肥義治 <sup>1,3</sup>	160
P28	[ <sup>13</sup> C]ValおよびPro標識バクテリオロドプシンのシッフ塩基の荷電と構造の相関 (姫路工大) ○吉良敦史、谷生道一、辻暁、斉藤肇	162
P29	<sup>13</sup> C標識バクテリオロドプシンのシッフ塩基周囲の電荷による構造の揺らぎ (姫路工大) ○谷生道一、宮田和彦、辻暁、斉藤肇	164
P30	固体 <sup>13</sup> C NMRによるサーモトロピック液晶高分子PSHQnの構造解析 (金沢大理 <sup>1</sup> 、The University of Akron <sup>2</sup> ) ○水野元博 <sup>1</sup> 、石川裕之 <sup>1</sup> 、忍久保正治 <sup>1</sup> 、遠藤一央 <sup>1</sup> 、Han Chang Dae <sup>2</sup>	166
P31	重水素NMRによる棒状高分子ゲルの研究 (北大院工) ○武田寛之、平沖敏文、堤耀廣	168
P32	固体高分解能NMRによるキトサン-高分子複合体の構造解析 (福井大工) ○前田史郎、飯田貴之、中江一浩、山下伸一郎、大島孝友、桜井謙資	170
P33	固体NMR法によるisotactic poly(1-butene)の動的構造解析 (産総研 <sup>1</sup> 、京大理工 <sup>2</sup> ) ○三好利一 <sup>1</sup> 、林繁信 <sup>1</sup> 、海藤彰 <sup>1</sup> 、今城文雄 <sup>2</sup>	172
P34	[ <sup>13</sup> C]Val標識バクテリオロドプシンにおける細胞質側表面構造の電荷による変調 (姫路工大) ○荒川規、谷生道一、辻暁、斉藤肇	174
P35	<sup>129</sup> Xe NMR法を用いたゴム状高分子の自由体積の解析 (名工大) ○大野真希、鈴木智幸、吉水広明、辻田義治	176
P36	芳香族アミノ酸における芳香環のダイナミクス (北大院工 <sup>1</sup> 、北大院薬 <sup>2</sup> ) ○久保健太 <sup>1</sup> 、平沖敏文 <sup>1</sup> 、濱田辰夫 <sup>2</sup> 、堤耀廣 <sup>1</sup>	178
P37	立体規則性π共役系高分子における構造相転移 (東工大) ○浅川直紀、Myagmarsuren Gomboo、櫻井実、井上義夫、山本隆一	180
<b>[固体化学におけるNMR]</b>		
P38	Na型ZSM-5ゼオライト細孔内の <i>N,N</i> -ジメチル- <i>p</i> -ニトロアニリンの挙動 (産総研) ○小森佳彦、林 繁信	182
P39	<sup>17</sup> O-MQMAS、 <sup>31</sup> P→ <sup>17</sup> O CP/MAS及び <sup>17</sup> O→ <sup>31</sup> P CP/MASによるアモルファス性リン酸アルミニウムの構造解析 (新日鐵先端研 <sup>1</sup> 、PNNL <sup>2</sup> ) ○金橋康二 <sup>1</sup> 、齋藤公児 <sup>1</sup> 、Sarah Burton <sup>2</sup> 、Paul Ellis <sup>2</sup>	184
P40	固体2次元NMR法を用いたアルカリシリケートガラスの水和過程の研究 (科技団さきがけ研究21 <sup>1</sup> 、産総研関西セ <sup>2</sup> ) ○増井大二 <sup>1</sup> 、陳丹平 <sup>1</sup> 、赤井智子 <sup>1,2</sup> 、矢澤哲夫 <sup>2</sup>	186
P41	Ti <sub>1/3</sub> V <sub>2/3</sub> H <sub>x</sub> D <sub>y</sub> (x+y ≈ 0.9) におけるHおよびDの拡散挙動 (産総研) ○林 繁信	188
P42	<sup>2</sup> H-NMR法による燃料電池固体電解質のイオン伝導機構評価 (神奈川大工 <sup>1</sup> 、産総研 <sup>2</sup> ) ○高山俊夫 <sup>1</sup> 、小森佳彦 <sup>2</sup> 、林繁信 <sup>2</sup>	190
<b>[ハードウェア]</b>		
P43	ナローボア高磁場高速MASプローブの開発I (日本電子) ○樋岡克哉、長谷川憲一、神成さらら、江口剛史、杉沢寿志、栗原範明	192
P44	ナローボア高磁場高速MASプローブの開発II (日本電子) ○長谷川憲一、樋岡克哉、神成さらら、江口剛史、杉沢寿志、栗原範明	194

P45	ハイスループットNMR測定を目的とした重溶媒自動置換サンプリング装置の開発 (日本電子 <sup>1</sup> 、中外製薬化研 <sup>2</sup> ) ○津野久幸 <sup>1</sup> 、藤井直之 <sup>1</sup> 、高瀬俊和 <sup>1</sup> 、藤原伸也 <sup>2</sup> 、 小竹健一郎 <sup>2</sup> 、小玉啓文 <sup>2</sup>	196
P46	InP等の化合物半導体によるNMR量子計算機 (物材機構 <sup>1</sup> 、東京理大 <sup>2</sup> 、CREST-JST <sup>3</sup> ) ○清水禎 <sup>1</sup> 、端健二郎 <sup>1</sup> 、後藤敦 <sup>1</sup> 、宮部亮 <sup>2</sup> 、大木忍 <sup>3</sup>	198
P47	強磁場NMRの技術開発 (物材機構 <sup>1</sup> 、東京理大 <sup>2</sup> 、JST <sup>3</sup> ) ○端健二郎 <sup>1</sup> 、清水禎 <sup>1</sup> 、後藤敦 <sup>1</sup> 、宮部亮 <sup>2</sup> 、大木忍 <sup>3</sup>	200
P48	光ポンピングNMR技術の開発 (東京理大 <sup>1</sup> 、物材機構 <sup>2</sup> 、JST <sup>3</sup> ) ○宮部亮 <sup>1</sup> 、端健二郎 <sup>2</sup> 、清水禎 <sup>2</sup> 、後藤敦 <sup>2</sup> 、木戸義勇 <sup>2</sup> 、 大木忍 <sup>3</sup> 、町田進 <sup>3</sup>	202
P49	高温動作超偏極Xeガス発生装置 (産総研光技術) ○服部峰之、平賀隆	204
P50	超並列型MRマイクロスコープの開発 (筑波大理工学系 <sup>1</sup> 、エム・アール・テクノロジー <sup>2</sup> 、筑波大臨床医学系 <sup>3</sup> ) ○松田善正 <sup>1</sup> 、 拝師智之 <sup>2</sup> 、宇津澤慎 <sup>2</sup> 、山崎由香子 <sup>1</sup> 、巨瀬勝美 <sup>1</sup> 、阿武泉 <sup>3</sup>	206
P51	デュアルブロードバンドXHY PFGプローブの開発 (日本電子) ○岡田輝政、池田博、桜井智司、末松浩人、栗原範明	210
[その他]		
P52	固体 <sup>73</sup> Ge NMRスペクトルの観測と緩和時間に関する研究 (神奈川大理) 竹内敬人、○西川実希、田中克巳	212
P53	<sup>1</sup> H NMRの高精度定量測定 (産総研) ○齋藤剛、木下美雪、張潤萍、井原俊英、衣笠晋一	214
[溶液応用(蛋白質、ペプチド、核酸以外)]		
P54	<sup>37</sup> Cl/ <sup>35</sup> Cl同位体効果を利用する塩素化ベンゼン類のNMR帰属 (シーエーシーズ横浜分析セ) ○松原康史	216
P55	HMBC法の新しい応用測定---HR(High resolution)-HMBC法について (東大院農 <sup>1</sup> 、東京農大生応化 <sup>2</sup> ) ○降旗一夫 <sup>1</sup> 、瀬戸治男 <sup>2</sup>	218
P56	<sup>27</sup> Al NMR法による環状トリアリミド三リン酸イオンの多座配位錯生成挙動研究 (神戸大院自然 <sup>1</sup> 、神戸大工 <sup>2</sup> 、佐賀大理工 <sup>3</sup> ) ○横田達夫 <sup>1</sup> 、成相裕之 <sup>1</sup> 、宮島徹 <sup>3</sup> 、牧秀志 <sup>2</sup>	222
P57	<sup>9</sup> Be NMR法による環状イミドリン酸イオン群の多座配位錯生成反応に関する熱力学的研究 (神戸大工 <sup>1</sup> 、神戸大院自然 <sup>2</sup> ) ○牧秀志 <sup>1</sup> 、田畑博史 <sup>2</sup> 、成相裕之 <sup>2</sup>	226
P58	アルカリアースクロライド水溶液中の水分子の回転運動におよぼす温度および圧力効果 (立命大理工) ○文野浩一、谷口吉弘	230
P59	LC-NMRの構造解析への応用検討 (東レリサーチセ) ○川口謙、木村一雄	232
P60	<sup>13</sup> C-NMRによるGellan Gumと常磁性金属イオンの相互作用に関する研究 (北大院工) ○横川昭徳、鈴木淳司、泉川大輔、平沖敏文、堤耀廣	234
P61	海洋生物ホヤH-抗原活性糖鎖の溶液構造 (東和 <sup>1</sup> 、福山大 <sup>2</sup> 、日本電子データム <sup>3</sup> 、日本電子 <sup>4</sup> 、広島大 <sup>5</sup> ) ○加藤裕子 <sup>1</sup> 、太田雅也 <sup>2</sup> 、 宗像達夫 <sup>1</sup> 、藤原正子 <sup>3</sup> 、藤井直之 <sup>4</sup> 、重田征子 <sup>5</sup> 、松浦史登 <sup>2</sup>	236
P62	パーキンソン病原因蛋白質 Parkin の ubiquitin-like domain の NMR による構造解析 (東京薬大薬 <sup>1</sup> 、東京薬大生命 <sup>2</sup> 、都立大理 <sup>3</sup> ) 大久保征治 <sup>1</sup> 、田代桜子 <sup>1</sup> 、安田秀世 <sup>2</sup> 、田代充 <sup>3</sup> 、 甲斐荘正恒 <sup>3</sup> 、○神藤平三郎 <sup>1</sup>	238
P63	ヒアルロン酸水溶液中の分子拡散における糖鎖構造と溶質の大きさの効果 (理研) ○益田晶子、丑田公規、越野広雪、山下宏一	240

P64	CAST/CNMRシステムの開発と立体化学決定への応用 (理研 <sup>1</sup> 、国立情報研 <sup>2</sup> 、科技団さきがけ21 <sup>3</sup> ) ○越野広雪 <sup>1</sup> 、佐藤寛子 <sup>2,3</sup> 、中田忠 <sup>1</sup>	242
P65	セレクトイン糖鎖リガンド、シアリルルイスXの新規誘導体の構造と活性 (理研GSC <sup>1</sup> 、横浜市大院総合理 <sup>2</sup> 、岐阜大農 <sup>3</sup> 、愛知県がんセ <sup>4</sup> ) ○濱田季之 <sup>1,2</sup> 、廣田洋 <sup>1,2</sup> 、横山茂之 <sup>1</sup> 、大坪伸将 <sup>3</sup> 、石田秀治 <sup>3</sup> 、木曾真 <sup>3</sup> 、金森審子 <sup>4</sup> 、神奈木玲児 <sup>4</sup>	244
P66	<sup>1</sup> Hと <sup>13</sup> C NMRの外部複基準法を利用してin situ バルク体積磁化率で補正して求めた(ブタノール/重水)系のunified scaleで表わした4種のブタノールのケミカルシフトの濃度依存性と温度依存性の研究 (福井大機器分析セ) ○橋田広人、増田容子、水野和子	246
P67	有機化合物50 μgの <sup>13</sup> C NMR (シーエーシーズ) ○櫻井愛子、松原康史	248
P68	重炭酸ナトリウム水溶液とその水酸化アルミニウムへの吸着挙動 (産総研九州セ <sup>1</sup> 、イリノイ大地質 <sup>2</sup> ) ○野間弘昭 <sup>1</sup> 、R. James Kirkpatrick <sup>2</sup> 、Xiaoqiang Hou <sup>2</sup>	250
P69	PFM-NMR法による高圧マイクロエマルジョンの拡散・ダイナミクスの解明 (ノースカロライナ大化学 <sup>1</sup> 、テキサス大化学工学 <sup>2</sup> ) ○永嶋一臣 <sup>1</sup> 、B. Xu <sup>1</sup> 、J. M. DeSimone <sup>1</sup> 、C. T. Lee, Jr. <sup>2</sup> 、K. P. Johnston <sup>2</sup> 、C. S. Johnson, Jr. <sup>1</sup>	252
[液晶、膜、不均一系]		
P70	Application of <sup>19</sup> F NMR relaxometry to the determination of porosity and pore size distribution in hydrated cements, mortars, concretes and other porous materials. (D. Mendeleev Univ. of Chemical technology of Russia <sup>1</sup> 、Univ. of Dundee, Scotland, UK <sup>2</sup> 、Vienna Univ. of Technology Austria <sup>3</sup> ) ○A. B. Koudriavtsev <sup>1</sup> 、M. Danchev <sup>1</sup> 、G. Hunter <sup>2</sup> 、W. Linert <sup>3</sup>	254
P71	PGSE NMR法によるリオトロピック液晶溶液における分子運動の研究 (東工芸大連携最先端技術研究セ <sup>1</sup> 、東工芸大工 <sup>2</sup> 、東大院理工高分子セ <sup>3</sup> ) ○兼清真人 <sup>1</sup> 、土屋真純 <sup>2</sup> 、野瀬卓平 <sup>2</sup> 、安藤勲 <sup>3</sup> 、植松淑子 <sup>1</sup>	256
P72	液晶試料が示す <sup>13</sup> C磁場配向誘起シフトスペクトルの帰属簡便法 (バリエーションテクノロジーズジャパン) ○芦田 淳、中井利仁	258
P73	NMRによるPVDF系ゲル電解質のイオン移動特性の研究 (科技団科技特 <sup>1</sup> 、産総研 <sup>2</sup> 、神戸大院自然 <sup>3</sup> 、JEOL <sup>4</sup> ) ○片岡弘 <sup>1,2</sup> 、齋藤唯理亜 <sup>2</sup> 、蔭山博之 <sup>2</sup> 、宮崎義憲 <sup>2</sup> 、出来成人 <sup>3</sup> 、池田武義 <sup>4</sup>	260
P74	スピン拡散測定に基づく固体分散体におけるニフェジピンとPVPの分散状態の解明 (国立衛研) ○阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄	262
P75	キラル液晶 NMR 法による光学異性体の分離 - ユニコナゾール、ジニコナゾールへの応用 - (神戸薬大 <sup>1</sup> 、阪大医 <sup>2</sup> ) ○杉浦真喜子 <sup>1</sup> 、灰野裕美 <sup>1</sup> 、伊藤允好 <sup>1</sup> 、藤原英明 <sup>2</sup> 、木村敦臣 <sup>2</sup>	264
P76	インフルエンザウイルス融合ペプチドのpHに依存する膜融合誘起機構 (姫路工大 <sup>1</sup> 、横浜国大工 <sup>2</sup> ) ○虎谷秀一 <sup>1</sup> 、内藤晶 <sup>2</sup> 、辻暁 <sup>1</sup> 、斉藤肇 <sup>1</sup>	266
[医用/in vivo NMRとイメージング]		
P77	ラット脳組織の重水交換速度について (日本女大理 <sup>1</sup> 、精神神経センター神経研 <sup>2</sup> ) ○高橋 征三 <sup>1</sup> 、荻野 孝史 <sup>2</sup>	268
P78	核磁気共鳴映像法(MRI)によるラット関節炎の観察 (三共薬動態研 <sup>1</sup> 、第二生物研 <sup>2</sup> 、バイオメディカル研 <sup>3</sup> ) ○藤原久徳 <sup>1</sup> 、福田邦昭 <sup>1</sup> 、下里隆一 <sup>2</sup> 、熊倉誠一郎 <sup>2</sup> 、半沢宏之 <sup>3</sup> 、春山英幸 <sup>3</sup> 、高崎 渉 <sup>1</sup>	270
P79	超偏極 <sup>129</sup> Xe化学シフトによる温度測定. 水溶液、ミセル、エマルジョンについて (阪大医) ○森 慎一郎、木村 敦臣、藤原 英明	272
P80	小果実の内部形態と糖分布のNMRイメージング (食総研 <sup>1</sup> 、生物研 <sup>2</sup> ) ○小泉美香 <sup>1</sup> 、石田信昭 <sup>1</sup> 、狩野広美 <sup>2</sup>	274
P81	簡易交差緩和率イメージング法による合成高分子ゲル内の水性状の研究 (名工大院工 <sup>1</sup> 、岐阜大医 <sup>2</sup> 、岐阜大医附属病院 <sup>3</sup> 、愛知県がんセ <sup>4</sup> ) 松島秀 <sup>1</sup> 、○恵良聖一 <sup>2</sup> 、曾我美勝 <sup>2</sup> 、紀ノ定保臣 <sup>3</sup> 、大崎光 <sup>4</sup> 、高須昭則 <sup>1</sup> 、稲井嘉人 <sup>1</sup> 、平林忠道 <sup>1</sup>	278

P82	MRIによる食パンのネットワーク構造の評価 (食総研 <sup>1</sup> 、農業生物資源研 <sup>2</sup> ) ○石田信昭 <sup>1</sup> 、内藤成弘 <sup>1</sup> 、高野博幸 <sup>1</sup> 、五十部誠一郎 <sup>1</sup> 、植村邦彦 <sup>1</sup> 、小泉美香 <sup>1</sup> 、狩野広美 <sup>2</sup>	282
P83	ポリゴンを用いた3DMR画像の定量化ソフトウェアの開発 (筑波大物理工学系 <sup>1</sup> 、エム・アール・テクノロジー <sup>2</sup> ) ○橋本征太郎 <sup>1</sup> 、佐々木英典 <sup>1</sup> 、拝師智之 <sup>2</sup> 、巨瀬勝美 <sup>1</sup>	286
P84	小脳アストログリア細胞の代謝と機能 (鳥取大医) ○飯塚舜介、疋田純、富永里香、井上仁、David A. Aremu	290
[溶液測定法の開発]		
P85	2D selective-TOCSY-DQFCOSYおよびselective-TOCSY-NOESY法による糖鎖の構造解析 (日本ブルカー <sup>1</sup> 、横浜市大理 <sup>2</sup> ) ○佐藤一 <sup>1</sup> 、梶原康宏 <sup>2</sup>	292
P86	Macroscopic Background Gradient and Radiation Damping Effects on High-Field PGSE NMR Diffusion Measurements (都立大理 <sup>1</sup> 、Royal Institute of Technology <sup>2</sup> 、University of Lund <sup>3</sup> ) ○William S. Price <sup>1</sup> 、Peter Stilbs <sup>2</sup> 、Bengt Jönsson <sup>3</sup> 、Olle Söderman <sup>3</sup>	294
P87	in situ バルク体積磁化率で補正して得られる、水溶液中の水のケミカルシフトの濃度および温度依存性 (福井大機セ) ○水野和子、越智虎之、今藤真吾、田宮由香	298
P88	残余双極子結合測定のための新しい配向メディアの開発研究 (都立大院理 <sup>1</sup> 、東大院農 <sup>2</sup> ) ○小神将 <sup>1</sup> 、荒木潤 <sup>1</sup> 、野村薫 <sup>1</sup> 、空閑重則 <sup>2</sup> 、甲斐荘正恒 <sup>1</sup>	300
P89	ポリマー材を用いた高圧NMRセルの開発と応用 (産総研超臨界流体セ <sup>1</sup> 、東北大理 <sup>2</sup> 、日機装開発セ <sup>3</sup> ) ○金久保光央 <sup>1</sup> 、梅木辰也 <sup>2</sup> 、相澤高史 <sup>1</sup> 、増田善雄 <sup>1</sup> 、生島豊 <sup>1</sup> 、畑田清隆 <sup>1</sup> 、斎藤功夫 <sup>1</sup> 、吉村純子 <sup>3</sup> 、山崎博実 <sup>3</sup> 、八名純三 <sup>3</sup>	302
P90	<sup>1</sup> Hと <sup>13</sup> C NMRの外部複基準法によるケミカルシフトの温度依存性：メタノールの場合 (福井大機セ) ○泉 康彦、田宮由香、水野和子	304
[溶液応用 (核酸)]		
P91	[N3- <sup>15</sup> N]-5位置換ピリミジン類を用いたN-H...N水素結合の解析 (JST-CREST, 都立大院理) ○石川麗、児嶋長次郎、小野晶、甲斐荘正恒	306
[溶液応用 (蛋白質、ペプチド)]		
P92	<sup>31</sup> P NMRを用いた細胞内代謝化合物の新規測定法 (味の素発酵研 <sup>1</sup> 、中研 <sup>2</sup> ) ○野口泰志 <sup>1</sup> 、榛葉信久 <sup>2</sup> 、鈴木榮一郎 <sup>2</sup> 、杉本慎一 <sup>1</sup>	308
P93	ペプチドを安定同位体標識する方法の改良 (三菱生命研 <sup>1</sup> 、群馬大工 <sup>2</sup> ) ○河野俊之 <sup>1</sup> 、林和彦 <sup>2</sup> 、須貝真理子 <sup>1</sup> 、若松馨 <sup>2</sup>	312
P94	メチル化DNA結合ドメイン-DNA複合体の立体構造と分子認識機構 (横浜市大総合理 <sup>1</sup> 、奈良先端大バイオ <sup>2</sup> 、熊本大医 <sup>3</sup> ) ○大木出 <sup>1,2</sup> 、下竹敦哉 <sup>2</sup> 、藤田直之 <sup>3</sup> 、JeeJun-Goo <sup>2</sup> 、池上貴久 <sup>2</sup> 、中尾光善 <sup>3</sup> 、白川昌宏 <sup>1,2</sup>	314
P95	主鎖シグナルからのタンパク質グローバルフォールドの決定 (理研GSCタンパク質構造 <sup>1</sup> 、理研GSCタンパク質施設 <sup>2</sup> 、東大院理 <sup>3</sup> ) ○菊地淳 <sup>1</sup> 、伊藤隆 <sup>1</sup> 、木川隆則 <sup>2</sup> 、横山茂之 <sup>3</sup>	316
P96	高圧NMRによる広い構造空間での蛋白質ダイナミクスの研究： ユビキチンの2つのフォールド構造と巻戻り中間体 (神戸大自然科学) ○北原亮、山田博昭、赤坂一之	318
P97	High Pressure NMR Study Shows That the Variant Transthyretin (V30M) is Less Stable Than the Wild Type. (Kobe Univ. <sup>1</sup> 、Kumamoto Univ. <sup>2</sup> ) ○Nath NiraulaTara <sup>1</sup> 、Katsuki Haraoka <sup>2</sup> 、Yukiko Ando <sup>2</sup> 、Hua Li <sup>1</sup> 、Hiroaki Yamada <sup>1</sup> 、Kazuyuki Akasaka <sup>1</sup>	320

P98	Growth-blocking peptide(GBP)の運動性 (生研機構 <sup>1</sup> 、富山医薬大薬 <sup>2</sup> 、北大理 <sup>3</sup> 、北大低温研 <sup>4</sup> ) ○相沢智康 <sup>1,2</sup> 、三浦和紀 <sup>1,2</sup> 、河野隆英 <sup>2</sup> 、 小金澤望 <sup>3</sup> 、松原公明 <sup>2</sup> 、藤谷直樹 <sup>3</sup> 、熊木康裕 <sup>3</sup> 、水口峰之 <sup>2</sup> 、早川洋一 <sup>4</sup> 、出村誠 <sup>3</sup> 、新田勝利 <sup>3</sup> 、 河野敬一 <sup>2</sup>	322
P99	$\omega$ -conotoxin MVHC 変異体の構造機能相関 (三菱生命研) ○小林邦子、佐々木亨、佐藤一紀、河野俊之	324
P100	フリーHIVプロテアーゼのNMRによる運動性に関する研究 (農業生物資源研 <sup>1</sup> 、NIH <sup>2</sup> ) ○加藤悦子 <sup>1</sup> 、伊島理恵子 <sup>2</sup> 、John M. Louis <sup>2</sup> 、Dennis A. Torchia <sup>2</sup> 、 山崎俊正 <sup>1</sup>	326
P101	ナトリウムチャンネルのIII-IVリンカーの溶液構造 (京大院薬) ○宮本和英、中川照眞、黒田義弘	328
P102	耐熱性シトクロムcにおけるヘム活性中心の構造解析 (筑波大化学 <sup>1</sup> 、筑波大TARAセ <sup>2</sup> 、阪大院薬 <sup>3</sup> 、阪大産研 <sup>4</sup> 、東大院農 <sup>5</sup> ) 照井教文 <sup>1</sup> 、立入直紀 <sup>1</sup> 、 ○皆川和久 <sup>1</sup> 、亀田恒徳 <sup>1</sup> 、山本泰彦 <sup>1</sup> 、長谷川淳 <sup>2</sup> 、内山進 <sup>3</sup> 、小林祐次 <sup>3</sup> 、三本木至宏 <sup>4</sup> 、五十嵐泰夫 <sup>5</sup>	330
P103	フッ素化ヘムをもつヘムタンパク質の <sup>19</sup> F NMR緩和および常磁性シフトの解析 (筑波大化学 <sup>1</sup> 、長岡高専 <sup>2</sup> 、日本ブルカー <sup>3</sup> 、旭硝子中研 <sup>4</sup> ) 平井佑紀 <sup>1</sup> 、○長尾聡 <sup>1</sup> 、照井教文 <sup>1</sup> 、 亀田恒徳 <sup>1</sup> 、山本泰彦 <sup>1</sup> 、鈴木秋弘 <sup>2</sup> 、井町美佐子 <sup>3</sup> 、笹倉英史 <sup>4</sup>	332
P104	酵素の活性、耐熱性、構造、Dynamicsの関係：イヌミルクリゾチームに対するCa <sup>2+</sup> -bindingの効果 (産総研 <sup>1</sup> 、北大理 <sup>2</sup> 、Varian Japan <sup>3</sup> ) ○小橋川敬博 <sup>1,2</sup> 、久米田博之 <sup>1,2</sup> 、三浦和紀 <sup>1</sup> 、根本暢明 <sup>3</sup> 、 小柴琢己 <sup>2</sup> 、出村誠 <sup>2</sup> 、新田勝利 <sup>2</sup> 、津田栄 <sup>1</sup>	334
P105	安定同位体ラベルしたペプチドの発現系の改良 (群馬大工 <sup>1</sup> 、CREST・JST <sup>2</sup> 、三菱生命研 <sup>3</sup> ) ○田所大 <sup>1</sup> 、鈴木千紗 <sup>1</sup> 、落合研次 <sup>1,2</sup> 、野口真路 <sup>1,2</sup> 、 林和彦 <sup>1</sup> 、窪田健二 <sup>1</sup> 、須貝真理子 <sup>3</sup> 、河野俊之 <sup>3</sup> 、若松馨 <sup>1,2</sup>	336
P106	立体選択的重水素化グリシンの蛋白質NMRへの利用 (CREST <sup>1</sup> 、都立大理 <sup>2</sup> 、理研GSC <sup>3</sup> ) ○大木進野 <sup>1</sup> 、小野明 <sup>1</sup> 、寺内勉 <sup>1</sup> 、淵上和幸 <sup>2</sup> 、早野俊哉 <sup>3</sup> 、 甲斐荘正恒 <sup>1,2</sup>	338
P107	HMG-2 AドメインのNMRによる立体構造解析 (北陸先端大新素材セ <sup>1</sup> 、東京理大基礎工 <sup>2</sup> ) ○栗田順一 <sup>1</sup> 、仲谷幸司 <sup>1</sup> 、島原秀登 <sup>1</sup> 、吉田充輝 <sup>2</sup> 、 楯真一 <sup>1</sup>	340
P108	DinI蛋白質によるRecA蛋白質活性の制御機構に関する研究 (理研遺伝生 <sup>1</sup> 、埼玉大院理工 <sup>2</sup> 、横浜市大院総合理 <sup>3</sup> 、CREST/JST <sup>4</sup> ) ○吉益雅俊 <sup>1,4</sup> 、伊藤隆 <sup>1,3,4</sup> 、 本多賢吉 <sup>1,3,4</sup> 、斎藤雅子 <sup>1,3,4</sup> 、美川務 <sup>1,3,4</sup> 、柴田武彦 <sup>1,4</sup>	344
P109	プリンリプレッサーDNA結合ドメイン変異体の構造解析 (横浜市大院総合理 <sup>1</sup> 、電通大電子物性 <sup>2</sup> ) ○堤れい子 <sup>1</sup> 、長土居有隆 <sup>1</sup> 、鈴木咲良 <sup>1</sup> 、三瓶殿一 <sup>2</sup> 、 溝淵潔 <sup>2</sup> 、西村善文 <sup>1</sup>	346
P110	ICADのC末端ドメインのNMRによる構造解析 (理研ゲノムセ) ○福島径、黒田裕、菊地淳、小柴生造、横山茂之	348
P111	An inexpensive method for generating u- <sup>15</sup> N/ aro- <sup>1</sup> H ( $\alpha, \beta$ <sup>2</sup> H) Phe, Tyr and Trp incorporated u- <sup>2</sup> H/ <sup>15</sup> N labelled proteins for NMR resonance assignment (理研遺伝生 <sup>1</sup> 、横浜市大院総合理 <sup>2</sup> ) ○Sundaresan Rajesh <sup>1,2</sup> 、柴田武彦 <sup>2</sup> 、伊藤隆 <sup>1,2</sup>	350
P112	NMRによるリボヌクレアーゼT <sub>1</sub> の変性過程の解析 (東京薬大生命 <sup>1</sup> 、東京薬大中央分析 <sup>2</sup> 、東京薬大薬 <sup>3</sup> ) ○松浦久恵 <sup>1</sup> 、佐久間千勢子 <sup>2</sup> 、田代桜子 <sup>3</sup> 、 神藤平三郎 <sup>3</sup> 、小島正樹 <sup>1</sup> 、高橋健治 <sup>1</sup>	352
P113	区分安定同位体標識を利用したH <sup>+</sup> -ATPase $\beta$ サブユニットの主鎖の帰属 (阪大蛋白研 <sup>1</sup> 、東工大資源研 <sup>2</sup> ) ○八木宏昌 <sup>1</sup> 、山崎俊夫 <sup>1</sup> 、吉田賢右 <sup>2</sup> 、阿久津秀雄 <sup>1</sup>	354
P114	DNA相同組換え反応機構の解明を目指したRecA蛋白質の構造生物学的及び生化学的研究 (理研生体超分子構造 <sup>1</sup> 、理研遺伝生 <sup>2</sup> 、CREST/JST <sup>3</sup> ) ○齋藤雅子 <sup>1,2</sup> 、美川務 <sup>1,2,3</sup> 、伊藤隆 <sup>1,2,3</sup> 、 柴田武彦 <sup>1,2,3</sup>	356

P115	光受容蛋白質 Photoactive Yellow Protein の構造解析 (横浜市大総合理 <sup>1</sup> 、奈良先端大バイオ <sup>2</sup> 、奈良先端大物質 <sup>3</sup> ) ○塩沢久美子 <sup>1,3</sup> 、栃尾豪人 <sup>1</sup> 、JeeJun-Goo <sup>2</sup> 、池上貴久 <sup>2</sup> 、今元泰 <sup>3</sup> 、片岡幹雄 <sup>3</sup> 、白川昌宏 <sup>1</sup>	358
P116	Ubiquitin (Ub) -Yeast Ubiquitin Hydrolase1 (YUH1) 複合体蛋白質 (35 k Da) のNMR解析 (理研遺伝生化学 <sup>1</sup> 、横浜市大院総合理 <sup>2</sup> 、三菱生命研 <sup>3</sup> 、北里大理 <sup>4</sup> ) ○倉島かおり <sup>2</sup> 、SundaresanRajesh <sup>1</sup> 、田中剛史 <sup>3</sup> 、須貝真理子 <sup>3</sup> 、小寺義男 <sup>4</sup> 、柴田武彦 <sup>1</sup> 、河野俊之 <sup>3</sup> 、伊藤隆 <sup>1</sup>	360
P117	アカザラガイ閉殻筋トロポニンCのC末端半分子の溶液構造解析 (東大院農生 <sup>1</sup> 、東大生物生工セ <sup>2</sup> 、海洋バイオ研 <sup>3</sup> 、バリアン <sup>4</sup> 、北大院水産 <sup>5</sup> ) ○湯本史明 <sup>1</sup> 、永田宏次 <sup>2</sup> 、岩崎わかな <sup>1</sup> 、足立恭子 <sup>3</sup> 、小林由枝 <sup>3</sup> 、根本暢明 <sup>4</sup> 、尾島孝男 <sup>5</sup> 、西田清義 <sup>5</sup> 、田之倉優 <sup>1</sup>	362
P118	<sup>1</sup> H/ <sup>19</sup> F-NMRを用いたRecAとDNAとの相互作用の解析 (理研遺伝生化学 <sup>1</sup> 、横浜市大院総合理 <sup>2</sup> 、CREST・JST <sup>3</sup> 、日本ブルカー <sup>4</sup> ) ○本多賢吉 <sup>1,2</sup> 、西田幸治 <sup>2</sup> 、美川務 <sup>1,3</sup> 、伊藤隆 <sup>1,3</sup> 、Markus Waelchli <sup>4</sup> 、柴田武彦 <sup>1,3</sup>	364
P119	高等植物の His-Aspリン酸転移情報伝達系B型レスポンスレギュレータのDNA認識機構 (農業生物資源研 <sup>1</sup> 、名大農 <sup>2</sup> ) ○細田和男 <sup>1</sup> 、加藤悦子 <sup>1</sup> 、八田知久 <sup>1</sup> 、水野猛 <sup>2</sup> 、山崎俊正 <sup>1</sup>	366
P120	Human cystatin Aの多量化機構と繊維形成 (都立大理) ○大野綾子、甲斐荘正恒	368
P121	コリシンE6のRNase活性ドメインとImmE6複合体の立体構造 (東大院農 <sup>1</sup> 、理研GSC <sup>2</sup> ) ○池谷鉄兵 <sup>1</sup> 、伊藤隆 <sup>2</sup> 、畑中稔 <sup>2</sup> 、板倉健人 <sup>1</sup> 、大野光宏 <sup>1</sup> 、横山茂之 <sup>2</sup> 、清水謙多郎 <sup>1</sup> 、正木春彦 <sup>1</sup>	370
P122	p47 <sup>phox</sup> のタンデムSH3ドメインとp22 <sup>phox</sup> PRRの相互作用 (北大院薬 <sup>1</sup> 、CREST/JST <sup>2</sup> 、九大生体防御医研 <sup>3</sup> ) ○小椋賢治 <sup>1</sup> 、湯沢聰 <sup>2</sup> 、横地政志 <sup>2</sup> 、住本英樹 <sup>3</sup> 、稲垣冬彦 <sup>1</sup>	372
P123	Vav C末端側SH3の構造と標的配列の認識機構 (北大院薬 <sup>1</sup> 、CREST/JST <sup>2</sup> ) ○新沼さおり <sup>1</sup> 、小椋賢治 <sup>1</sup> 、堀内正隆 <sup>1</sup> 、湯沢聰 <sup>2</sup> 、川崎政人 <sup>2</sup> 、横地政志 <sup>2</sup> 、稲垣冬彦 <sup>1</sup>	374
[計算、シミュレーション、データ処理]		
P124	インハウスWeb上で稼動するNMRスペクトルデータベースシステムの作成 (NMRDBTech) ○早水紀久子	376
P125	固体NMRと分子動力学法による絹の繊維化機構の解明 (東京農工大 <sup>1</sup> 、生物系特定産業技術研究推進機構 <sup>2</sup> ) ○山根努 <sup>1,2</sup> 、梅村幸輔 <sup>1</sup> 、朝倉哲郎 <sup>1</sup>	378
P126	帰属支援・シグナル解析統合ソフトウェア"Olivia"の開発、これを用いた帰属解析の信頼性向上と高速化技術について (CREST/JST <sup>1</sup> 、北大薬 <sup>2</sup> ) ○横地政志 <sup>1</sup> 、稲垣冬彦 <sup>1,2</sup>	382
P127	overtoneパルスを用いたREDOR現象の観測 (分子研) ○桑原大介	384
P128	NMR化学シフトに対する相対論的効果の計算 (北見工大) ○馬場雄久、福井洋之	386
P129	NMRスペクトル解析支援ツールの開発 (北陸先端大知識 <sup>1</sup> 、北陸先端大新素材セ <sup>2</sup> ) ○辰本将司 <sup>1</sup> 、佐藤賢二 <sup>1</sup> 、栗田順一 <sup>2</sup> 、島原秀登 <sup>2</sup> 、楯真一 <sup>2</sup>	388
P130	A mini tool for resonance assignments using NMRView and tcl/tk (三共バイオメデイカル研 <sup>1</sup> 、ユトレヒト大Bijvoet Center <sup>2</sup> ) ○半沢宏之 <sup>1</sup> 、Rolf Boelens <sup>2</sup>	390
P131	三次元MR画像からの泡多面体構造の自動抽出法の研究 (筑波大物理工学系) ○佐々木英典	392





第 1 日

11月14日(水)

一般講演要旨

**$^1\text{H}$ -dipolar driven  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  polarization transfer under MAS and its applications**

(Kyoto Univ.) ○ K. Takegoshi, Shinji Nakamura, Takehiko Terao

**Abstract**

A new  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  recoupling mechanism referred to as DARR (*Dipolar-Assisted Rotational Resonance*) which occurs under magic-angle spinning is presented. The recoupling mechanism can basically be attributed to rotational resonance (R2), but the conventional R2 condition is modified by a recoupled  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar interaction. The present method does not have the drawbacks associated with rf irradiation on  $^{13}\text{C}$  and is applicable for  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  correlation experiments useful for signal assignment for a multiply  $^{13}\text{C}$ -labeled molecule. The  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  recoupling mechanism under  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  recoupling is theoretically explained and is experimentally demonstrated using several  $^{13}\text{C}$  labeled peptide samples. Further, we show that DARR can be used to enhance  $^{13}\text{C}$  signal via nuclear Overhauser effect.

 **$^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  recoupling under MAS without applying rf to  $^{13}\text{C}$** 

Recently, we proposed two  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  recoupling methods under magic angle spinning (MAS) referred to as resonant interference recoupling (RIR) [1] and  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar-assisted rotational resonance (DARR) [2]. Both methods do not employ  $^{13}\text{C}$  rf irradiation for recoupling. Hence, a fast decay of  $^{13}\text{C}$  magnetization due to inhomogeneity of the rf irradiation and a short relaxation time under a rf field, which are commonly associated with other recoupling methods using  $^{13}\text{C}$  rf irradiation, can be avoided. Polarization transfer experiments can thus be done for  $^{13}\text{C}$  longitudinal magnetization for which a relaxation time much longer than that under rf irradiation is generally observed. Instead of  $^{13}\text{C}$  rf irradiation, the  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar interaction is used to manipulate the  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  dipolar interaction. In RIR, the FSLG- $m\overline{2}mm$  sequence [3] is applied to  $^1\text{H}$  spins under MAS to produce modulation-induced  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar sidebands for a  $^{13}\text{C}$  spin coupled to  $^1\text{H}$ . The spectral overlap necessary to ensure energy conservation for efficient polarization transfer between two  $^{13}\text{C}$  spins is achieved between a spinning sideband of one  $^{13}\text{C}$  spin and a modulation-induced sideband of the other  $^{13}\text{C}$  spin and vice versa. The polarization-transfer mechanism is thus the combination of rotor-driven and  $^1\text{H}$ -driven [4]. In DARR, the  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar interaction is recovered by CW irradiation on  $^1\text{H}$  with which the  $^1\text{H}$  rf-field intensity  $\nu_1$  satisfying the rotary-resonance condition  $\nu_1 = n\nu_R$  ( $n = 1$  or  $2$ ) [5]. Contrary to RIR, the recoupled  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar interaction is time-independent and fur-

**Key Words:** Homonuclear polarization transfer in solids, Magic angle spinning, Nuclear Overhauser effect in solids

ther the flip-flop term of the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  dipolar interaction is not averaged to be zero. Hence, the  $^{13}\text{C}$  lines are broadened by both  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  dipolar interactions. The spectral overlap between the two relevant  $^{13}\text{C}$  spins is realized between a spinning sideband of one  $^{13}\text{C}$  spin and the  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar pattern of the other  $^{13}\text{C}$  spin and vice versa. It is true that the  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  recoupling is weak for RIR and DARR as compared to other recoupling methods employing  $^{13}\text{C}$  rf pulses, the polarization-transfer time can be extended to a few seconds due to the long-lived longitudinal magnetization. Hence, their capability for transferring polarization is comparable or superior to the other ones using rf. While RIR achieves recoupling for a particular pair (selective recoupling), DARR is semi-selective for a shorter transfer time but is broad-band for a longer transfer time. Further, no critical adjustments of phases and intensities of  $^1\text{H}$  irradiation is necessary for DARR. These features would make DARR useful for long range correlation experiments. Some examples are to be presented.

### **Nuclear Overhauser Polarization (NOP)-MAS experiments**

In DARR, the  $^1\text{H}$  irradiation would saturate  $^1\text{H}$  spins, which leads to the  $^{13}\text{C}$  signal enhancement due to the nuclear Overhauser effect for  $^{13}\text{C}$  in a fast rotating methyl group. Then, it is expected that  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  polarization transfer enhanced by DARR successively distributes polarization among the other  $^{13}\text{C}$  spins, leading to uniform enhancement for all  $^{13}\text{C}$  spins for uniformly/multiply  $^{13}\text{C}$  labeled samples. Hence, DARR can be used for a new  $^{13}\text{C}$  polarization technique in rotating solids operative under fast MAS. The present nuclear Overhauser polarization (NOP)-MAS does not have the drawback associated with the conventional cross-polarization method under fast MAS, that is, its extreme susceptibility to variations in the spinning frequency, rf intensities, and inhomogeneity. Further, NOP can enhance all  $^{13}\text{C}$  in a sample quantitatively. These features were demonstrated for uniformly  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -labeled glycylisoleucine. NOP-MAS is also examined for a naturally abundant  $^{13}\text{C}$  sample.

## **References**

- [1] K.Takegoshi, S.Nakamura, and T.Terao, Chem. Phys. Lett. 307 (1999) 295.
- [2] K.Takegoshi, S.Nakamura, and T.Terao, Chem. Phys. Lett. 344 (2001) 631.
- [3] K.Takegoshi and T.Terao, Solid State Nucl. Magn. Reson. 13 (1999) 203.
- [4] B.H. Meier, Adv. Magn. Reson. 18 (1994) 1.
- [5] T.G.Oas, R.G.Griffin, and M.H.Levitt, J. Chem. Phys. 89 (1988) 692.

# 1 L2

## 固体 NMR によるカルシトニンのアミロイド様繊維形成機構の解析

(<sup>1</sup>横浜国大理工、<sup>2</sup>姫路工大理、<sup>3</sup>オックスフォード大、<sup>4</sup>新潟経営大)

○<sup>1,2</sup>内藤 晶、<sup>2,3</sup>上平美弥、<sup>2</sup>大城由紀、<sup>2</sup>土肥輝美、<sup>2</sup>井上良三、<sup>2</sup>辻 暁、  
<sup>4</sup>野坂篤子、<sup>2</sup>齊藤 肇

### Fibril formation of human calcitonin as studied by high resolution solid state NMR

<sup>1</sup>Yokohama National University, <sup>2</sup>Himeji Institute of Technology, <sup>3</sup>Oxford University, <sup>4</sup>Niigata  
University of Management,

<sup>1,2</sup>Akira Naito, <sup>2,3</sup>Miya Kamihira, <sup>2</sup>Yuki Oshiro, <sup>2</sup>Terumi Dohi, <sup>2</sup>Ryozo Inoue, <sup>2</sup>Satoru Tuzi, <sup>4</sup>Atsuko  
Nosaka, <sup>2</sup>Hazime Saito

The effects of an electrostatic interaction in the fibril formation and molecular packing of human calcitonin (hCT) were investigated by solid state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy using site specifically <sup>13</sup>C labeled hCTs and a hCT mutant having replacement of aspartic acid with asparagines at the position 15 (D15N-hCT). It is found that the fibril structure of D15N-hCT fibril at pH 7.5 was similar to that of D15N-hCT and hCT fibrils at pH 3.3, which are mixtures of antiparallel and parallel  $\beta$ -sheets in the absence of negative charge at the residue 15, whereas it was different from the case of the hCT fibril at pH 7.5, which is uniformly antiparallel  $\beta$ -sheets. Fibril structure was further examined by measuring interatomic distances to determine the molecular packing of the fibrils.

【はじめに】カルシトニンはカルシウム代謝に重要な役割を果たしているペプチドホルモンであり、骨粗鬆症の治療薬としても使用されている。しかしながらヒトカルシトニンは水溶液中で容易に繊維を形成して沈殿する性質があるため、治療薬として使用する場合に大きな問題となる。一方、この繊維形成現象はアルツハイマー病に見られる、アミロイド繊維形成と類似していることから、カルシトニンの繊維形成現象を分子レベルで理解することは、繊維化を起こしにくい治療薬の開発のみならず、アミロイド繊維形成の機構を解明する点からも重要である。しかしながら繊維状態の構造決定に溶液 NMR や X 線回折法を用いることは容易でない。このような系に対して固体高分解能 NMR の手法を用いることにより、スピン相互作用の違いを利用して溶液状態と繊維状態を同時に分離観測することが可能になる。<sup>1)</sup>本研究では固体高分解能 NMR の手法を用いて、繊維の分子構造を明らかにすると同時に繊維形成における側鎖の電荷の影響を解明することを目的とした。

固体 NMR、繊維形成、カルシトニン、アミロイド、構造転移

ないとうあきら、かみひらみや、おおしろゆき、いのうえりょうぞう、つじさとる、のさかあつこ、さいとうはじめ



ル構造をとることが判明した。D15N-hCT の繊維状態において Gly10 近傍では $\alpha$ -ヘリックスと $\beta$ -シートが共存し、Phe16 近傍では $\beta$ -シート、Ala26, Ala31 近傍ではランダムコイル

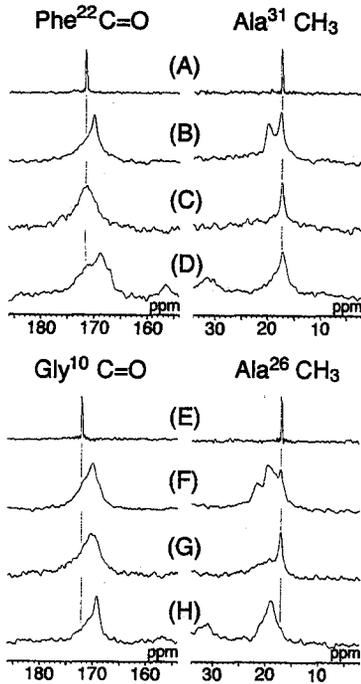


Fig. 1:  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of  $^{13}\text{C}$  labeled hCT.

A and E; DD-MAS spectra at pH 4.1.

B and F; CP-MAS spectra at pH 3.3.

C and G; CP-MAS spectra at pH 4.1.

D and H; CP-MAS spectra at pH 7.5.

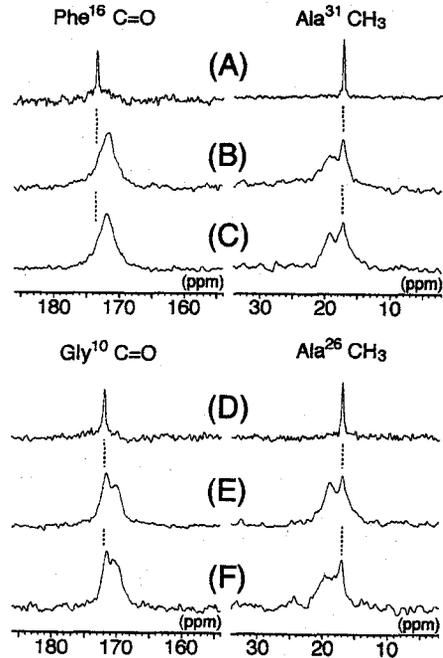


Fig. 2:  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of  $^{13}\text{C}$  labeled D15N-hCT.

A and D; DD-MAS spectra at pH 7.5.

B and E; CP-MAS spectra at pH 7.5.

C and F; CP-MAS spectra at pH 3.3.

Table1:  $^{13}\text{C}$  chemical shifts (ppm from TMS) and the assignments

	pH 3		pH 7		pH 4	
	Monomer	Fibril	Monomer	Fibril	Monomer	Fibril
<b>hCT</b>						
Gly10 C=O	171.8 ( $\alpha$ )	169.9 ( $\beta$ )		169.1 ( $\beta$ )	171.8 ( $\alpha$ )	169.7 ( $\beta$ )
Phe22 C=O	171.4 (rc)	170.1 ( $\beta$ )		168.8 ( $\beta$ )	171.4 (rc)	171.4 (rc)
				171.5 (rc)		
Ala26 CH <sub>3</sub>	16.9 (rc)	16.9 (rc)	16.9 (rc)	18.7 ( $\beta$ )	16.9 (rc)	16.9 (rc)
		19.3 ( $\beta$ )				19.1 ( $\beta$ )
		21.3 ( $\beta$ )				
Ala31 CH <sub>3</sub>	17.2 (rc)	17.3 (rc)	17.2 (rc)	17.0 (rc)	17.2 (rc)	17.2 (rc)
		19.7 ( $\beta$ )		18.8 ( $\beta$ )		
<b>D15N-hCT</b>						
Gly10 C=O	171.9 ( $\alpha$ )	169.7 ( $\beta$ )	171.9 ( $\alpha$ )	169.8 ( $\beta$ )		
		171.5 ( $\alpha$ )		171.7 ( $\alpha$ )		
Phe16 C=O	173.4 (rc)	171.8 ( $\beta$ )	173.4 (rc)	171.7 ( $\beta$ )		
Ala26 CH <sub>3</sub>	17.0 (rc)	17.0 (rc)	16.9 (rc)	16.9 (rc)		
		19.5 ( $\beta$ )		18.9 ( $\beta$ )		
Ala31 CH <sub>3</sub>	17.2 (rc)	17.2 (rc)	17.2 (rc)	17.2 (rc)		
		19.1 ( $\beta$ )		19.4 ( $\beta$ )		

$\alpha$ :  $\alpha$ -helix,  $\beta$ :  $\beta$ -sheet, rc: random coil

ルとβ-シートが共存することが判明した。さらに興味深いことに D15N-hCT の構造は pH に依存しないことが分かった。

以上の結果より hCT の繊維形成は図 3 に示すように進行すると考えられる。まず溶液状態でモノマーが会合してミセルを形成する。このとき、中性溶液では hCT の Asp15(-)と Lys18(+)<sup>18</sup>の静電相互作用により逆平行に配列して会合が起こる。一方、酸性条件では Asp15 の負電荷が消失するため、会合の際に分子の向きに制約を受けない。この結果、平行と逆平行が混合したミセルが形成する。このミセルが構造転移を起こし、中性条件では中央部が逆平行β-シートを形成する。一方酸性では平行と逆平行が混合したβ-シートを形成する。

逆平行β-シート構造の分子パッキングの詳細な情報を得るため分子間の C-N 原子間距離測定を行った。 [<sup>15</sup>N]Gly10-[1-<sup>13</sup>C]Phe22 および [<sup>15</sup>N]Gly10-[1-<sup>13</sup>C]Pro23 の主鎖の C-N 原子間距離はいずれもこれらの残基が直接水素結合を形成する値に比べてかなり大きな値を示すことから、Gly10 に対して直接水素結合を形成する相手分子の残基は Thr21 あるいは His20 である可能性が高いと考えられる。

【まとめ】カルシトニンの繊維形成において Asp15 の荷電状態が重要な役割を果たしていることが明らかになった。即ち、Asp15 が負の電荷をもつとき、静電相互作用の親和力によって逆平行β-シート構造を形成するが Asp15 の電荷が消失すると静電相互作用の親和力が消失するため、平行逆平行が共存する繊維構造が形成されることが明らかになった。本研究で使用した固体高分解能 NMR 法はカルシトニンの繊維構造さらにアミロイド繊維構造の解明にも有用であることが判明した。

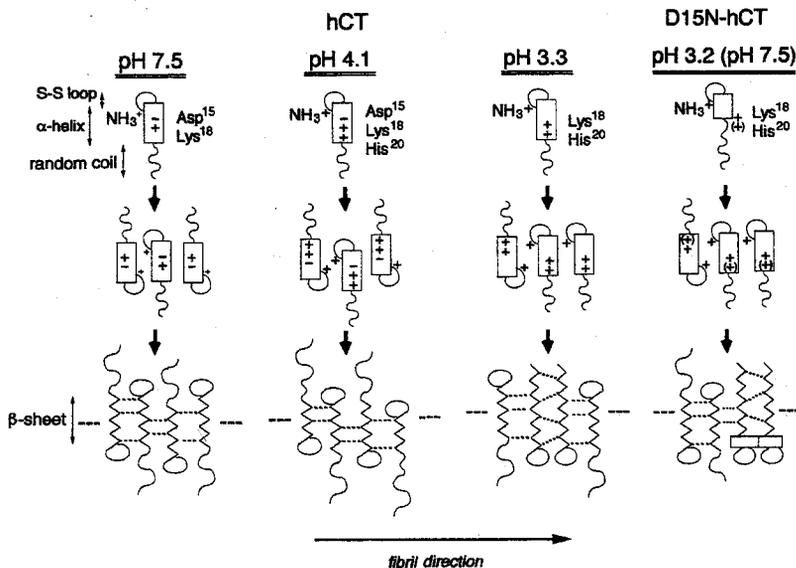


Fig. 3: Schematic representation of the proposed model for the fibril formation of hCT at pH 7.5, 4.1, and 3.3 and D15N-hCT at pH 3.2 and 7.5

【文献】 1) M. Kamihira et al. Protein Science (2000) 9, 867-877.

エリ蚕絹フィブロインに見られる  $\alpha$ -helix 構造の安定化機構に関する固体 NMR 研究  
(東京農工大工) ○中澤靖元、西尾聡子、大郷耕輔、朝倉哲郎

Solid-state NMR Study on the Stability Mechanism of  $\alpha$ -helix Structure in *S. c. ricini* Silk Fibroin

Yasumoto Nakazawa, Satoko Nishio, Kousuke Ohgo and Tetsuo Asakura

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184-8588

Tel: 042-383-7733 Fax: 042-383-7733 e-mail: asakura@cc.tuat.ac.jp

The mechanical property of silk fibroin from *Samia cynthia ricini* is originally due to the primary structure which consists of poly Ala and Gly rich regions. The polyAla region takes  $\alpha$ -helix in the aqueous solution and there are repeated sequences, Asp-Gly-Gly-(Ala)<sub>12</sub>- at the N-terminal region.

In this study, the local structure of *S.c.ricini* silk fibroin before and after spinning, especially the N-terminal region of poly Ala was determined by the conformation-dependent chemical shifts, 2D spin-diffusion NMR and REDOR methods. We synthesized the model peptide, GGAGGGYGGDGG(A)<sub>12</sub>GGAGDGYGAG, where several residues in the N-terminal region were <sup>13</sup>C stable isotope labeled. The Gly<sub>12</sub>( $\phi$ ,  $\psi$ ) and Ala<sub>13</sub>( $\phi$ ,  $\psi$ ) angles were determined to be (-60°, -30°), and other Ala ( $\phi$ ,  $\psi$ ) angles were (-60°, -45°). Thus, a tightly winded helical structure was proposed as the N-terminal region of polyAla with  $\alpha$ -helical conformation.

【緒言】野生種のカイコであるエリ蚕(*S.c.ricini*)は、家蚕とは異なる独特の性質を持つ絹糸を生産する。その物性の違いは一次構造の違いに起因しており、前者は Ala 連鎖領域と Gly リッチ領域という2つの特異的なモチーフの繰り返しからなり、後者の Ala と Gly の交互共重合体とは異なる。エリ蚕絹フィブロインは体内において、Ala 連鎖領域が $\alpha$ -helix 構造を形成し、吐糸することによって不溶性の $\beta$ -sheet 構造へと変化する。このような変化を伴って繊維を生産するメカニズムは羊毛や毛髪など異なる特徴であり、溶液状態、固体状態の二状態で、それぞれ最適な構造を形成することができるタンパク質であるといえる。一次構造を詳細に検討すると、Ala 連鎖領域の N 末端側には、一般に $\alpha$ -helix 構造の Capping 残基として頻出する Asp 残基が特異的に配置されており、その Capping 効果による安定化が推測される。 $\alpha$ -helix 構造の安定化機構の解明は、エリ蚕絹を模倣した新規絹様材料の設計に必要不可欠である。そこで本研究では、二次元 <sup>13</sup>C スピン拡散 NMR 法、REDOR 法を併用することで安定化を担っていると考えられる $\alpha$ -helix 構造 N 末端領域の構造を原子レベルで明らかにした。

【実験】エリ蚕絹モデルペプチド GGAGGGYGGDGG(A)<sub>12</sub>GGAGDGYGAG は Fmoc 固相合成法により合成した。得られたペプチドは 9M LiBr 水溶液に溶解し、透析をすることで $\beta$ -sheet 構造に、また TFA に溶解後、ジエチルエーテルで析出させると繊維化前と同一の構造を形成することが <sup>13</sup>C CP/MAS スペクトルより確認された。特に固体 NMR 法により特定残基の構造情報を得るため、Ala 連鎖領域 N 末端側の Gly 及び Ala 残基に安定同位体ラベルを施した。<sup>13</sup>C 二次元スピン拡散 NMR 測定は Varian Unity INOVA 400 によって Off MAS(54+9°)条件で行った。ミキシングタイムは 2s、試料回転速度は 6KHz、室温で測定した。シミュレーションは 2spin 系でのスペクトルの理論をもとに作製した Fortran プログラムを SGI 社製の OCTANE を使い、二面角を 30°間隔で計算した。また REDOR 測定には、CMX Infinity400NMR 分光計(Chemagnetics Co)を使い、<sup>13</sup>C 共鳴周波数は 100MHz、プローブは Chemagnetics 社製、HYX Triple Resonance T-3 プローブを用いた。試料回転速度は 3kHz および 6kHz でおこない、Evolution time は 24ms まで測定した。

---

エリ蚕絹フィブロイン、安定同位体ラベル、<sup>13</sup>C 二次元スピン拡散 NMR、REDOR、 $\alpha$ -helix

なかざわやすもと、にしおさとこ、おうごうこうすけ、あさくらてつお

【結果および考察】 Ala 連鎖領域の N 末端側に存在する Gly<sub>11</sub>、Gly<sub>12</sub>、Ala<sub>13</sub> 残基は helix 構造であることが、選択的に同位体ラベルされたモデル化合物の化学シフト値よりわかった。この結果から、 $\alpha$ -helix 構造は Ala 連鎖領域のみならず、Gly リッチ領域にも及んでいることが明らかとなった。そこで、 $\alpha$ -helix 構造に巻き込まれたアミノ酸残基である、Gly<sub>12</sub> および Ala<sub>13</sub> の詳細な構造を検討した。

二次元スピン拡散固体 NMR 法により、Gly<sub>12</sub> 残基の二面角値を決定したところ、 $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -30^\circ)$  であった (Figure 1, A,C)。また、Ala<sub>13</sub> についても同様の結果が得られた。Ala 連鎖領域は  $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -45^\circ)$  の  $\alpha$ -helix 構造であるという報告<sup>1</sup>を考慮すると、Ala 連鎖領域中央部は  $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -45^\circ)$ 、最初の helix ターンにあたる N 末端側 4 残基の Gly<sub>11</sub>-Gly<sub>12</sub>-Ala<sub>13</sub>-Ala<sub>14</sub> のみ  $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -30^\circ)$  となり、N 末端側が、すばまった構造、すなわち「winding helical structure」を形成していることが明らかとなった。

また、REDOR 法により、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}_{12}$ - $[^{15}\text{N}]\text{Ala}_{16}$  原子間距離を測定したところ、 $5.0 \pm 0.1 \text{ \AA}$  と決定された。この距離は典型的な  $\alpha$ -helix 構造を形成した場合の距離である  $4.2 \text{ \AA}$  を上回り、Ala 連鎖領域を中心とする helix 構造が単一な  $\alpha$ -helix ではないことを支持している。そこで、REDOR から得られた距離をもとに helix 末端 4 残基のとりうる二面角値の  $\phi\psi$  マップを作成した (Figure 2)。このプロットに二次元スピン拡散 NMR のシミュレーションを重ねると、 $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -30^\circ)$  の二面角値で REDOR の結果を満たしていることがわかる。

一方、繊維化後の構造を決定するため、Gly<sub>12</sub> の二面角値を検討したところ、 $\beta$ -sheet 構造の領域である、 $(\phi, \psi) = (-170^\circ, 140^\circ)$  であることが明らかとなった (Figure 1, B,D)。この結果は、当研究室で行った、エリ蚕絹フィブロイン繊維の角度依存固体 NMR の結果<sup>2</sup>とも一致する。

以上より、エリ蚕絹フィブロインは繊維化前の構造において、体内での構造転移を阻害するための安定化機構を「winding helical structure」によって行っていると結論できる。一方、この安定化領域は繊維化の際においては、繊維化を阻害することなく速やかに  $\beta$ -sheet 構造と転移していることも明らかとなった。現在、本モデルペプチドの他のアミノ酸残基についても同様に構造解析を行っている。なお、本研究は一部、生研機構基礎技術推進事業により行われた。

(1)van Beek, J. D.; Beaulieu, L.; Schafer, H.; Demura, M.; Asakura, T.; Meier, B. H. *Nature* **2000**, *405*, 1077-1079.

(2)Asakura, T.; Ito, T.; Okudaira, M.; Kameda, T. *Macromolecules* **1999**, *32*, 4940-4946.

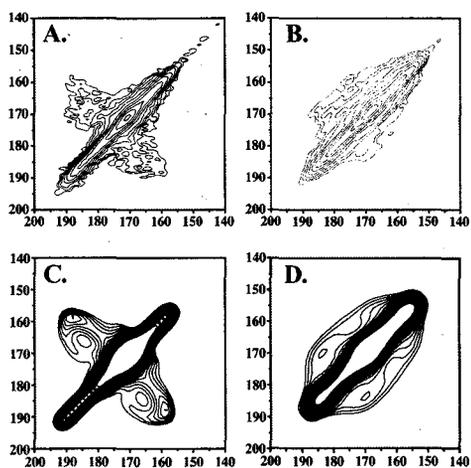


Figure 1 The (A) experimental and (C) simulated 2D spin-diffusion NMR spectra of GGAGGGYGGD[ $1-^{13}\text{C}$ ]G [ $1-^{13}\text{C}$ ]G(A)<sub>12</sub>GGAGDGYGAG (a model for before spinning). The torsion angles ( $\phi$  and  $\psi$ ) used for the simulation of this spectrum were  $(\phi, \psi) = (-60, -30)$ . And (B) experimental spectrum after dialysis (a fiber model). The simulated spectrum of the (B) with torsion angles ( $\phi, \psi$ ) =  $(-170^\circ, 140^\circ)$  is also shown.

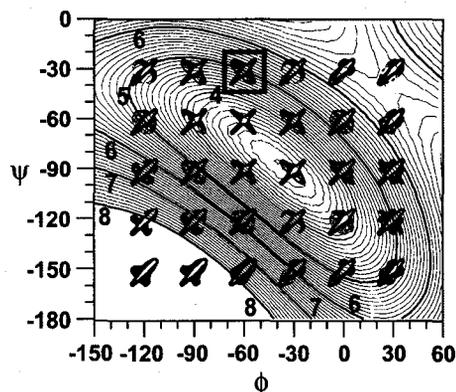


Figure 2 Ramachandran map of the calculated 2D spin-diffusion NMR spectra for Gly<sub>12</sub> in the model peptide. The contour map indicates the distance between label sites,  $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}_{12}$ - $[^{15}\text{N}]\text{Ala}_{16}$ , as a function of the torsion angle.

# 1 L4

## 固体 NMR によるバクテリオロドプシンの膜貫通領域の構造解析

(姫路工大・理)

○辻 暁、長谷川 潤、河南るり子、谷生道一、吉良敦史、荒川 規、斉藤 肇

A Solid State NMR Study of Structure and Dynamics of Transmembrane  $\alpha$ -Helices in Bacteriorhodopsin

○Satoru Tuzi, Jun Hasegawa, Ruriko Kawaminami, Michikazu Tanio, Atsushi Kira, Tadashi Arakawa, Hazime Saito

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

Transmembrane  $\alpha$ -helix bundle of membrane protein forms functionally important site for molecular function such as translocation of information or molecules across lipid bilayer, and is expected to possess structural characteristics different from hydrophilic moiety of protein at the membrane surfaces. We observed  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of individual residues in the transmembrane  $\alpha$ -helices of bacteriorhodopsin (bR) in biomembrane by solid state  $^{13}\text{C}$  NMR, utilizing relaxation reagent  $\text{Mn}^{2+}$  in order to suppress signals from water exposed surface and examined structure and dynamics of residues in the vicinity of functionally important kinks of the transmembrane  $\alpha$ -helices of bR. Temperature dependences of signals arising from Pro50, 91, 186 and Ala184 indicate that the structure of kinks involving these residues are unsusceptible to temperature variation between  $5^\circ\text{C}$  and  $35^\circ\text{C}$ .

膜内在性タンパク質の膜貫通領域は、膜を横切る物質および情報の輸送などの分子機能に重要な役割を果たしている。これらの機能の分子レベルにおける理解のために、膜貫通領域の特定部位における構造、運動性を生理的条件を含む任意の条件下において観測しうる手法が必要と考えられる。固体高分解能 NMR 法は、可溶化等の操作を加えることなく広い条件下における生体膜中の膜タンパク質を対象として部位特異的な構造情報を与えるという特徴から、可溶化、結晶化等の操作による脂質膜環境の変化により深刻な影響を受ける可能性のある膜貫通領域の挙動を解析する手法として適していると考えられる。ここでは、高度好塩菌の光プロトンポンプタンパク質バクテリオロドプシンを対象として、固体高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR を用い、膜貫通  $\alpha$ -ヘリックスの構造を残基レベルで観測し、機能上重要な膜貫通  $\alpha$ -ヘリックスのキック部位における構造とダイナミクスを解析した。膜貫通  $\alpha$ -ヘリックスに由来する信号の分離観測、帰属のために、生体膜（紫膜）表面に局在し、親水表面由来の信

---

固体 NMR、膜タンパク質、バクテリオロドプシン、膜貫通  $\alpha$ -ヘリックス、キック

○つじ さとる、はせがわ じゅん、かわみなみ るりこ、たにお みちかず、きら あつし、あらかわ ただし、さいとうはじめ

号を広幅化、消去することが見いだされた緩和試薬  $Mn^{2+}$  の添加により親水表面に位置する残基由来の信号を消去した<sup>1)</sup>。Fig. 1 に  $[1-^{13}C]$ Pro 標識野生型 bR の  $^{13}C$  CP-MAS NMR スペクトルを示す。膜貫通部位に位置し、 $\alpha$ -ヘリックスのキックを誘起している Pro50, Pro91 および Pro186 カルボニル炭素は部位特異的変異導入により  $Mn^{2+}$  処理 bR のスペクトル中で選択的に観測される 3 本の信号に帰属された。各信号の化学シフト値は Pro 残基の二面角を反映し、膜貫通  $\alpha$ -ヘリックスのキック部位の構造を直接に反映すると考えられるが、5°C から 35°C の温度範囲でこれらの信号の化学シフト、線幅はほとんど変化せず、親水表面に突出した  $\alpha$ -ヘリックス、ループにおいて温度依存性の構造および運動性変化が見られるこの温度領域において<sup>2)</sup>  $\alpha$ -ヘリックス内の水素結合の欠落により構造変化の自由度が高いと予測されるキック部位の構造が予測に反し非常に安定であることが見いだされた。 $\alpha$ -ヘリックス F のキック中に位置する  $[3-^{13}C]$ Ala184 の化学シフト (17.27 ppm) も 0~20°C の範囲で温度依存性を示さず、Pro と類似の挙動を示した。このような常温の水和脂質膜中におけるキック構造の安定性の原因のひとつとして  $\alpha$ -ヘリックス間の水素結合を考慮し、 $\alpha$ -ヘリックス F-G 間の水素結合に参与する Tyr185 を水素結合能のない Phe に置換した  $[3-^{13}C]$ Ala 標識 Y185F 変異 bR の NMR 測定を行ったところ、Ala184 の信号の 17.27 ppm から 17.36 ppm への低磁場シフトが観測され、 $\alpha$ -ヘリックス間水素結合のキック構造への影響が示唆された。これら野生型および Y185F 変異 bR に関して膜貫通  $\alpha$ -ヘリックスキック部位における構造、ダイナミクスを比較、解析する。

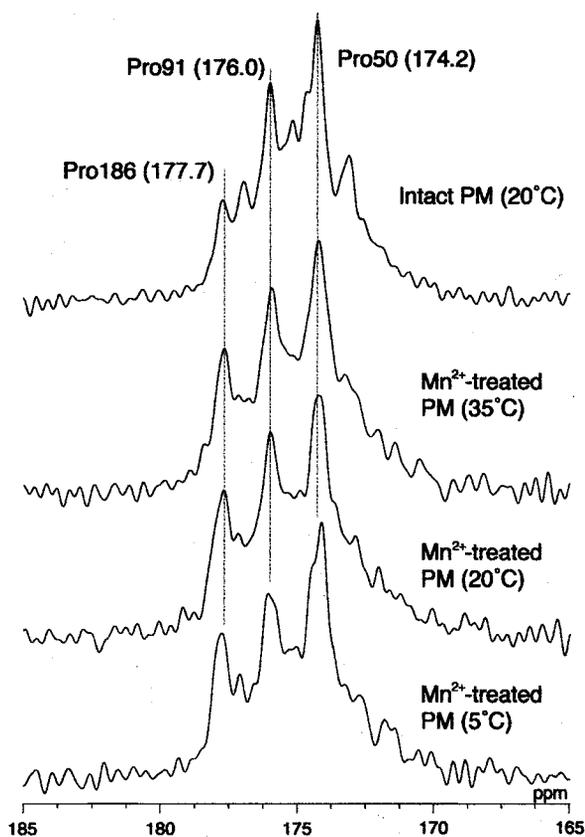


Fig. 1  $^{13}C$  CP-MAS NMR spectra of  $[1-^{13}C]$ Pro labeled bacteriorhodopsin in the intact purple membrane (PM) and PM treated with 40  $\mu M$   $Mn^{2+}$  at temperatures between 5 and 35  $^{\circ}C$ .

- 1) Tuzi, S., Hasegawa, J., Kawaminami, R., Naito, A., and Saito, H. (2001) *Biophys. J.*, 81, 425-434.
- 2) Yamaguchi, S., Yonebayashi, K., Konishi, H., Tuzi, S., Naito, A., Lanyi, J. K., Needleman, R., and Saito, H. (2001) *Eur. J. Biochem.*, 268, 1-12.

<sup>1</sup>H PFGSE NMR 法による固相反応場  
ネットワークポリスチレン中の物質拡散に関する研究(III)  
(東工大院理工) ○山根祐治、小林将俊、黒木重樹、安藤勲

**Diffusional Behavior of Regents in Network Polystyrene Gels  
as Studied by <sup>1</sup>H Pulsed-Field-Gradient Spin-Echo NMR Method (III)**  
*Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology*  
**Yuji Yamane, Masatoshi Kobayashi, Shigeki Kuroki and Isao Ando**

The reaction rate in the solid phase reaction field is closely associated with structure and dynamics of polymer gels used, and intermolecular interaction between the polymer network and amino acids. The diffusion coefficients of Boc-Phe(tert-butyloxycarbonyl-phenylalanine) in Merrifield network polystyrene gels used as solid phase reaction field have been determined as a function of the degree of volume swelling and concentration for Boc-Phe over the temperature range from 30 to 50°C by means of <sup>1</sup>H pulsed-field-gradient spin-echo NMR Method. From these experimental results, it was found that Boc-Phe in network polystyrene gels has multi-components in diffusion by intermolecular interaction between amino acids and polystyrene chains. These interactions depend on molecular distance between them.

<緒言>

近年、ネットワークポリマーを利用した固相反応は、コンビナトリアルケミストリーへ応用され、操作が簡便という利点から威力を発揮している。しかし、液相の反応系を固相反応に適用できる範囲は決して広いとは言えない。固相精密反応場を最適化するには、反応場である高分子ゲルについての理解を深めることが重要である。固相反応場はマトリックス高分子(高分子支持体)、反応活性点(マトリックス高分子中の官能基を有する側鎖)、反応基質及び溶媒で構成されている。固相反応場は反応活性点及び反応基質の運動性が、液相反応場に比較して大きく束縛されていると考えられる。そこで、本研究では、反応速度がポリマーネットワーク内の溶媒を介した反応基質の拡散過程と密接な関係<sup>1)</sup>にあることに着目し、固相反応場中の溶媒分子と反応基質の拡散過程を明らかにする。これまでに、Merrifield樹脂中の溶媒の拡散過程について、高分子ゲルの体積膨潤度及び温度依存性について詳細な報告をしてきた<sup>1)</sup>。今回は、Merrifield樹脂中の反応基質(アミノ酸)の拡散過程を中心に報告するつもりである。

パルス磁場勾配スピネコー NMR 法、拡散係数、アミノ酸、メリフィールド樹脂

やまねゆうじ、こばやしまさとし、くろきしげき、あんどういさお

### <実験・考察>

PS ビーズを DMF に Boc-Phe または Boc-Gly を溶かした溶液で膨潤させ、Boc-Phe 及び Boc-Gly の自己拡散係数  $D$  をパルス磁場勾配 NMR 法により測定した。DVB1mol%架橋した PS ゲル中のアミノ酸分子の拡散係数は 2 成分以上の拡散成分が存在する。また、磁場勾配パルスの間隔を 10ms とした場合、60%の遅い拡散成分が存在することがわかった。遅い拡散成分は、Boc-Phe 分子と PS 鎖との相互作用のため拡散が束縛されているものと考えられ、60%の遅い拡散成分は PS 鎖近傍に存在し、PS 鎖と相互作用をしている分子を反映し、その他の 40%の早い拡散成分は PS 鎖との距離の違いにより決まり、比較的束縛を受けてない多成分の拡散子が存在すると考えられる。一方、DVB2mol%架橋されている体積膨潤度が小さい PS ゲル中の Boc-Phe の拡散成分は 1 成分であった。これは体積膨潤度が小さい（ネットワークが小さい）ために、PS ゲル中のほとんどの Boc-Phe 分子が PS 鎖近傍に存在するためと考えられる。

また、NMR 測定のタイムスケール（磁場勾配パルスの間隔）を変化させて拡散係数の測定を行うことにより、プローブ分子が網目鎖に衝突することにより起こる制限拡散を確認し、測定のタイムスケールと遅い拡散成分の割合の関係を明らかにした。Fig.1 は、測定のタイムスケールに対して遅い拡散成分の拡散係数と割合をプロットしたものである。測定のタイムスケールが 50ms になると、平均化されて PS ゲル中の拡散成 1 成分となることがわかる。

本討論会では、PS ゲル中のアミノ酸分子の拡散係数について、PS ゲルの架橋密度、温度、アミノ酸濃度の影響についても報告する予定である。

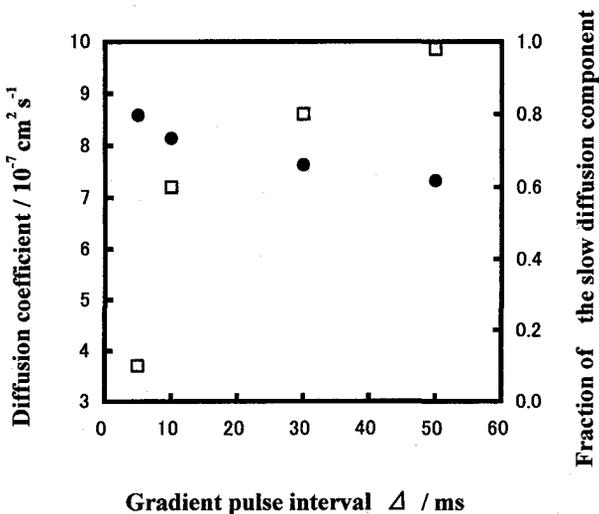


Fig.1 Dependence of the diffusion coefficient of Boc-Gly10wt%(solvent : DMF) in PS gels (●) and the fraction of slow diffusion component (□) on the gradient pulse interval  $\Delta$  at 30 °C.

### References

- 1)Sucholeiki, I.; *Annu. Rep. in Combinatorial Chemistry and Materials Science*, 1999, 2, 9.
- 2)Yamane, Y.; Kobayashi, M.; Kuroki, S.; Ando, I.; *Macromolecules* 2001, 34, 5961.

**Total Spinning Sideband Summation (TOSS $\Sigma$ )法の開発**(バリアンテクノロジーズジャパン<sup>1</sup>、分子科学研究所<sup>2</sup>)芦田淳<sup>1</sup>、桑原大介<sup>2</sup>、○中井利仁<sup>1</sup>Development of Total Spinning Sideband Summation (TOSS $\Sigma$ )Jun Ashida<sup>1</sup>, Daisuke Kuwahara<sup>2</sup>, and Toshihito Nakai<sup>1</sup>  
Varian Technologies Japan<sup>1</sup>, Institute of Molecular Science<sup>2</sup>

A novel method for observing  $^{13}\text{C}$  CPMAS spectra showing no spinning sidebands is proposed. Unlike well-known TOSS (Total Spinning sideband Suppression), the method allows summation of spinning sidebands (SSBs) onto the corresponding centerbands: We call the new technique TOSS $\Sigma$  (Total Spinning Sideband Summation). TOSS $\Sigma$  overcomes the serious disadvantage of TOSS which does not work properly when SSBs are truly required to be suppressed for large  $^{13}\text{C}$  chemical-shift anisotropies, under comparatively slow spinning and/or high magnetic field conditions. TOSS $\Sigma$  is expected to give quantitative analysis for  $^{13}\text{C}$  CPMAS signal intensities.

## 【序】

$^{13}\text{C}$  CPMAS は現在、固体高分解能 NMR の基本的テクニックとして定着している。CPMAS スペクトルでは、溶液 NMR スペクトルに類して、非等価な核それぞれに対する化学シフト等方値を示す共鳴線 (centerband) が得られるが、化学シフト異方性の大きさが試料回転速度より大きな場合、spinning sideband (SSB) と呼ばれる付加的な共鳴線が現れる。SSB は化学シフト等方値を得る目的には不要であり、さらに SSB と centerband の重なりによりスペクトルを複雑化し、化学シフト等方スペクトルの解析を困難にする。

CPMAS 法がもつ上記の欠点は、TOSS (TOtal Spinning sideband Suppression) 法と呼ばれるテクニックを併用することで、解消されるとされている。TOSS 法は、centerband 以外の SSB 共鳴線の位相を適切にかく乱することにより、それらの信号を除去するものである。

しかしながら、TOSS 法は真に SSB の除去が必要とされる条件下では使えないことが知られている。すなわち、大きな化学シフト異方性をもつ  $^{13}\text{C}$  核を対象とする場合や、相対的に遅い試料回転条件あるいは高

---

Spinning Sideband (SSB)、TOSS、TOSS $\Sigma$ 、化学シフト異方性、CPMAS

あしだじゅん、くわはらだいすけ、なかいとしひと

い磁場強度の下では、残されるべき centerband が実際は消えてしまったり反転したりする。もちろん、信号強度の定量性など望むべくも無い。

### 【方法】

我々は、TOSS 法がもつ上記の致命的な欠点を克服する方法を提案する。その方法では、SSB をかく乱して除去する代わりに、すべての SSB を centerband に実験的に足し合わせるにより、問題の解決を図るものである。この方法を TOSS $\Sigma$  (TOtal Spinning Sideband Summation) と呼ぶ。

すべての SSB を centerband に集める方法として、試料回転周期  $t_R=1/\nu_R$  ( $\nu_R$  は試料回転周波数) に同期させて信号をサンプリングする ( $t_{dw}=t_R$ :  $t_{dw}$  は信号サンプリング時間、dwelling time) 方法が知られている。しかしながらこの場合 SSB は現れないものの、スペクトル幅は  $sw=1/t_{dw}=1/t_R=\nu_R$  になり、共鳴線の折り返しによって化学シフト等方位が正しく反映されたスペクトルは得られない。

そこで試料回転同期サンプリングを行いながらも、広いスペクトル幅が実現されるテクニックが要求される。またその際、化学シフト異方性がサンプリングごとに refocus される必要がある。このようなテクニックとして我々は、次に示す  $10N-\pi$  TOSS $\Sigma$  パルス系列を提案する：

$$CP - * [ -\tau_1 - P(\pi) - \tau_2 - P(\pi) - \tau_1 - P(\pi) - \tau_2 - P(\pi) - \tau_1 - P(\pi) - \tau_2 - * \\ - \tau_2 - P(\pi) - \tau_1 - P(\pi) - \tau_2 - P(\pi) - \tau_1 - P(\pi) - \tau_2 - P(\pi) - \tau_1 - * ]_N$$

\* は信号サンプリングであり、サンプリングごとに受信機の位相を反転させる。また  $\tau_1 + \tau_2 = t_R/3$  である。このパルス系列により、化学シフト異方性は  $t_R$  ごとに refocus され、またスペクトル幅  $sw$  は  $1/3(\tau_1 - \tau_2)$  になる。

上記のパルス系列では、 $\tau_1$  と  $\tau_2$  を適当に設定することにより、 $\nu_R$  よりずっと大きなスペクトル幅が実現される。たとえば  $\tau_1 = \tau_2 (=t_R/6)$  に設定した場合、パルス系列は Carr - Purcell パルス系列にほかならず、すべての化学シフトが refocus され、非等価な核の共鳴線はすべて中央に集まる。いいかえるとスペクトル幅  $sw$  は  $\infty$  になる。この場合を極限として、たとえ試料回転周波数が 5kHz 程度でも、スペクトル幅  $sw$  を 50kHz などに設定することができる。

提案する方法は TOSS 法の欠点を完全に払拭する一方、一種の多重パルステクニックであるため、TOSS 法に比べると実行が困難でもある。すなわち CRAMPS など他の多重パルステクニックと同様、パルスの不完全性がスペクトルの質に大きく影響する。たとえば  $\pi$  パルスの mis-adjustment が集積されると、極端に短い FID = broadening した共鳴線を与えることになる。しかしながら、このような実験の困難・分解能の劣化を差し引いても、TOSS $\Sigma$  法は実現に向けた努力が望まれると考えている。講演では、TOSS $\Sigma$  法実現に向けた実験結果を示す予定である。

## 1 L7

1 次元反強磁性混合金属錯体  $[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{X}(\text{chxn})_2]\text{X}_2$  (X: Cl, Br; chxn: cyclohexanediamine) の  $^{13}\text{C}$  と  $^1\text{H}$  固体 NMR  
(和歌山大教育<sup>1</sup>、筑波大化<sup>2</sup>) ○木村憲喜<sup>1</sup>、加納正隆<sup>2</sup>、高石慎也<sup>2</sup>、池田龍一<sup>2</sup>

$^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  Solid NMR Studies in Antiferromagnetically Coupled One-Dimensional Mixed Metal Complexes,  $[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{X}(\text{chxn})_2]\text{X}_2$  (X: Cl, Br; chxn: cyclohexanediamine)

(Department of Chemistry, Faculty of Education, Wakayama University<sup>1</sup>; Department of Chemistry, University of Tsukuba<sup>2</sup>)

Noriyoshi Kimura<sup>1</sup>, Masataka Kano<sup>2</sup>, Shinya Takaishi<sup>2</sup> and Ryuichi Ikeda<sup>2</sup>

Halogen-bridged one-dimensional complexes  $[\text{MX}(\text{chxn})_2]\text{X}_2$  (M: Ni, Pd; X: Cl, Br; chxn: cyclohexanediamine) form an averaged paramagnetic  $-\text{X}-\text{M}^{2+}-\text{X}-\text{M}^{3+}-\text{X}-$  structure in M=Ni, whereas a mixed valence  $-\text{X}-\text{M}^{2+}-\text{X}-\text{M}^{4+}-\text{X}-$  structure in M=Pd. Recent studies on the mixed metal complexes  $[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{X}(\text{chxn})_2]\text{X}_2$  revealed marked conversion of valence and spin states with changing  $x$ . In the present study, we measure  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectra and  $^1\text{H}$  NMR spin-lattice relaxation times  $T_1$  in  $[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{X}(\text{chxn})_2]\text{X}_2$  ( $0.0 \leq x \leq 1.0$ ) and discuss the electronic structure in this system.

## 1.序

ハロゲン架橋 1 次元ニッケル錯体  $[\text{NiX}(\text{chxn})_2]\text{X}_2$  (X: Cl, Br; chxn: cyclohexanediamine) は  $-\text{X}-\text{Ni}^{3+}-\text{X}-\text{Ni}^{3+}-\text{X}-$  のような平均原子価状態を、パラジウム錯体  $[\text{PdX}(\text{chxn})_2]\text{X}_2$  は  $-\text{X}-\text{Pd}^{2+}-\text{X}-\text{Pd}^{4+}-\text{X}-$  の混合原子価状態を取ることが X 線構造解析、磁化率、中性子非弾性散乱などの実験によりほぼ明らかになっており、我々はこれまで各々の錯体における鎖上スピンの動的挙動に興味を持って研究を行ってきた。最近、新たに混合金属錯体  $[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{X}(\text{chxn})_2]\text{X}_2$  が合成され、これまでに赤外吸収、ラマン散乱、ESR スペクトルの測定がなされてきた。その結果によると、 $\text{Ni}^{3+}$  の導入によって Pd の価数が  $\text{Pd}^{3+}$  の状態に変化していることが予想されており、電気伝導度測定の報告によると  $x$  が約 0.5 で最も伝導度が高く、かつ活性化エネルギーが小さくなっている。本研究では、鎖上の原子価構造と電子スピンの磁氣的相互作用を明らかにする目的で、 $^{13}\text{C}$  および  $^1\text{H}$  固体 NMR の測定を行った。

## 2.実験

$[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{X}(\text{chxn})_2]\text{X}_2$  は電解酸化法を用い合成した。 $[\text{Ni}^{2+}(\text{chxn})_2]^{2+}$  と  $[\text{Pd}^{2+}(\text{chxn})_2]^{2+}$  の無水メタノール溶液を種々の割合で混合したものに支持電解質として塩化テトラメチルアンモニウム (X: Cl)、臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (X: Br) を加え、約  $20\mu\text{A}$  の定電流を溶液に通電し、長時間かけ良質の結晶を得た。試料の同定はプラズマ発光分光分析および粉末 X 線回折にて行った。 $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR スペクトルの測定は室温で行い、MAS の回転周波数は約 3 kHz、信号を約 1000 回積算した。 $^1\text{H}$  NMR スピン-格子緩和時間  $T_1$  は  $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$  パルス法を用いて 100-300 K の温度領域において共鳴周波数 54.3 MHz で測定した。

固体 NMR、スピン-格子緩和時間  $T_1$ 、ハロゲン架橋 1 次元金属錯体

きむら のりよし、かのう まさたか、たかいし しんや、いけだ りゅういち

### 3.結果、考察

得られた $[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{Cl}(\text{chxn})_2]\text{Cl}_2$ における $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルをFig. 1, 2に示す。得られたシグナル(Fig. 1)は低磁場側から順に図中に示したようなキレート環の炭素位置( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )のピークと考えられる。 $x=1.00$ における面積強度がほぼ等しい $\text{C}_\alpha$ 位の2本のシグナルは、それぞれ $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^{4+}$ に配位した $\text{chxn}$ 環に帰属される。一方、 $x=0.00$ の1本の $\text{C}_\alpha$ シグナルは平均原子価 $\text{Ni}^{3+}$ に配位した $\text{chxn}$ 環に帰属される。また、Fig. 2で示したように $\text{C}_\alpha$ のスペクトル強度を詳しく最適化した結果、混晶錯体( $x=0.44, 0.56, 0.74, 0.90$ )で観測した2本のピークはそれぞれ、NiおよびPdに配位した $\text{chxn}$ 環の $\text{C}_\alpha$ に帰属でき、すでに $x=0.90$ 以下でパラジウムの原子価は平均状態 $\text{Pd}^{3+}$ になっていると予想される。さらに、Fig. 1の $\text{C}_\beta$ に注目すると、スペクトルが $x=0.44, 0.56, 0.74$ で非常に幅広くなっており、鎖上の $\text{M}^{3+}$  ( $\text{M}: \text{Ni}, \text{Pd}$ )上の不対電子スピンの影響が $\text{C}_\beta$ に顕著に現れていることが示唆される。

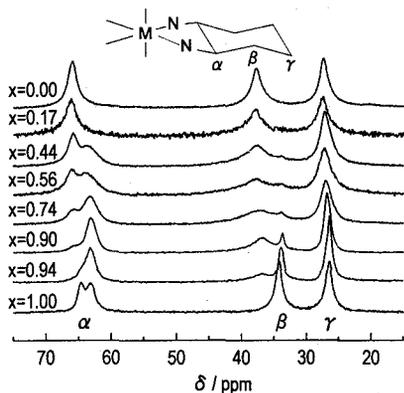


Fig. 1  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectra observed in  $[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{Cl}(\text{chxn})_2]\text{Cl}_2$  and carbon positions in a  $\text{M}(\text{chxn})$  chelate ring ( $\text{M}: \text{Ni}, \text{Pd}$ )

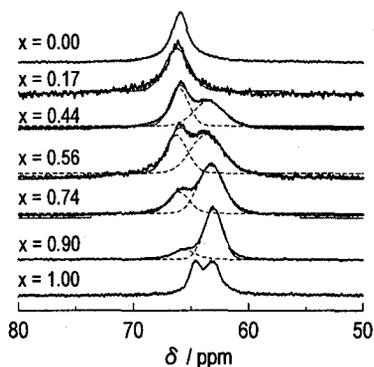


Fig. 2  $\text{C}_\alpha$  signals separated into two components corresponding to Ni and Pd sites in  $[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{Cl}(\text{chxn})_2]\text{Cl}_2$

また、 $[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{Br}(\text{chxn})_2]\text{Br}_2$ の $^1\text{H}$   $T_1$ の温度依存性を測定した結果をFig. 3に示す。混晶錯体は、得られた $T_1$ の大きさに多少の違いが見られるが、すべて $x=0.00$ であるニッケル錯体 $[\text{NiBr}(\text{chxn})_2]\text{Br}_2$ とほぼ同じ温度依存性を示した。 $x=0.00$ における $T_1$ の温度依存性は、1次元反強磁性的に相互作用した $\text{Ni}^{3+}$ のスピン揺らぎに起因し、 $x=1.00$ における $T_1$ の温度依存性はこれまでの実験から不純物オーダーの $\text{Pd}^{3+}$ サイトによる1次元鎖上の拡散によるものと解釈できる。したがって、Niの濃度が少ない領域においても、混晶系におけるPdの原子価は混合原子価状態から $\text{Pd}^{3+}$ に近い状態に変化し、この常磁性サイトが $^1\text{H}$ の緩和を強く支配していることが明らかになった。

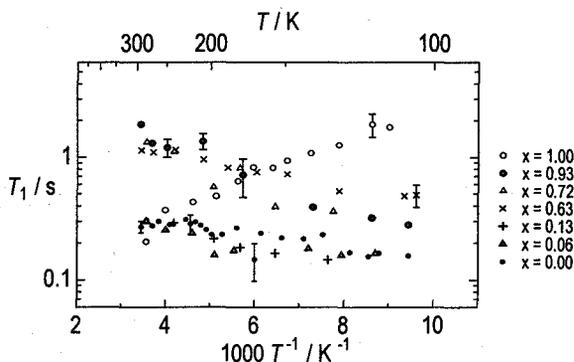


Fig. 3 Temperature dependences of  $^1\text{H}$   $T_1$  observed in  $[\text{Ni}_{1-x}\text{Pd}_x\text{Br}(\text{chxn})_2]\text{Br}_2$

## STRAFI イメージング及び CRAMPS、MQMAS を利用した 不定形耐火物の乾燥過程の解析

新日本製鐵(株)先端技術研究所<sup>1)</sup>、University of Surrey<sup>2)</sup>  
○齋藤公児<sup>1)</sup>、金橋康二<sup>1)</sup>、Peter.J.McDonald<sup>2)</sup>

A Stray Field Imaging and CRAMPS, MQMAS Studies of the Drying  
Process of Precasting Materials used in a Steel Making Converter

○Koji Saito<sup>1)</sup>, Koji.Kanehashi<sup>1)</sup>, Peter.J.McDonald<sup>2)</sup>

1) Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Lab.

2) University of Surrey Department of Physics

Optimization of the drying process conditions for a steel-making converter in a steel works is very critical since the process is basically off-line and very time-consuming. However, it is very difficult to optimize drying process conditions (temperature, surface active etc.), as steam explosion can readily occur with insufficient drying-time. To help understanding, we have demonstrated that we can monitor the drying of real refractory mortar using Stray Field Imaging and CRAMPS and MQMAS. We choose this method because of the possibility of detecting short  $T_2$  components. In this paper, I will show the effect of varying water content of different materials on the drying rate. In particular, we find that the free water loss rate is relatively independent of this parameter. However the bound water loss rate is more affected. It is clear that imaging and solid state NMR give useful information to optimize drying conditions. Using this data, we can adjust and optimize the drying process and time in steel works.

### 1. はじめに

鉄を鋼に変える工程の転炉の材料には、不定形耐火物が利用されているが、その乾燥工程でしばしば水蒸気爆発等のトラブルが発生する。その原因は、乾燥条件の最適化が出来ていないため、乾燥を単なる水の重量変化だけでなく、科学的なアプローチで乾燥過程のモニタリングが求められている。NMR イメージングは非破壊測定であるため、材料解析への応用にも期待されている<sup>1)</sup>が、実材料に応用する場合、試料の  $T_2$  が重要な問題となる。大きな磁場勾配を持つ SCM の漏洩磁場を利用する STRAFI (STRAY Field Imaging) 法が 1988 年に Samoilenko ら<sup>2)</sup>から提唱されている。STRAFI 法では 9.4T の 89mm ボア径の SCM で約 50T/m 程度の磁場勾配が得られるため、 $T_2$  の非常に短い試料、例えば不定形耐火物中の結合水に対しても有効である<sup>3)</sup>。今回 STRAFI 法を乾燥工程の in-situ モニタリングに応用し、乾燥促進剤の有無での自由水と結合水の挙動や各位置でのそれらの変化等の乾燥過程の観測・解析を行った。また乾燥メカニズムを解明すべく、<sup>1</sup>H-CRAMPS 及び <sup>27</sup>Al-MQMAS で乾燥前後での化学構造の変化を検討し、興味深い結果を得たので報告する<sup>4)</sup>。

### 2. 実験

試料は実際に製鉄所で使用されている Sample 1(Sample3+乾燥促進剤) と Sample 3(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 92%, MgO: 7%, CaO: 1%)の 2 種類を用意した。測定は 9.4T の WB-SCM で 58T/m の磁場勾配下で、Chemagnetics (VARIAN) CMX-400 Infinity 及び自製のプローブ (Figure 1) で行われた。

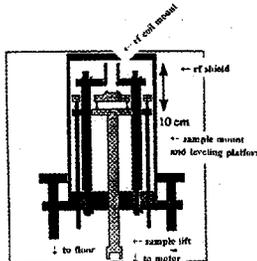
1次元のイメージング測定を共鳴周波数は 236.82 MHz、パルスシーケンスは quadrature echo sequence を使用し、 $\tau$ 時間は 60  $\mu$  sec で実施した。代表的な積算回数は 32 回程度で、約 40 分毎に測定を実施し、50 °C で in-situ で乾燥過程を追跡した。磁場勾配量が一定であるため、試料を機械的に動かす事で位置情報を得た。このプローブでは、rf コイルと独立にサンプル設置面が動くように設計されている。また  $B_1$  に水平に於かれたサドル型コイルを使用している。Figure

不定形耐火物、イメージング、STRAFI、MQMAS、CRAMPS

さいとう こうじ、かねはし こうじ、ぴーたー まくどなるど

2 に典型的な STRAFI の測定結果を示す。2つの試料の測定結果を併記してある。ひと固まりの測定結果の中は FID 信号の集団であることが容易にわかり、それぞれが測定に際して試料位置を動かした結果に対応しており、横軸は位置情報を反映している。この各 FID 信号に、例えば double-exponential 曲線を fit させ、 $T_2$  の long 成分と short 成分を得て、各位置における  $T_2$  値や成分比をつなぎあわせる事でイメージング profile を作り出すことができる。観測した領域は、表面から 12mm (試料長は 20mm) であった。

CRAMPS 及び MQMAS は、Chemagnetics CMX-300 で行った。 $^1\text{H}$ -CRAMPS の主な測定条件は、BR24 のパルスシーケンスで、90 度パルスは  $1.3 \mu\text{sec}$ 、回転速度は 1.2KHz、スペクトル幅は 9.3KHz で、化学シフトの精度は 0.1ppm であった。 $^{27}\text{Al}$ -MQMAS では、Z-filter 付きシーケンスで 3 及び 5 量子そして  $^1\text{H}$ - $^{27}\text{Al}$ CP/3QMAS での測定を、回転速度 16KHz で行った。



• The University of Surrey  
Department of Physics

Figure 1  
A schematic diagram of a one dimensional stray field profiling probe

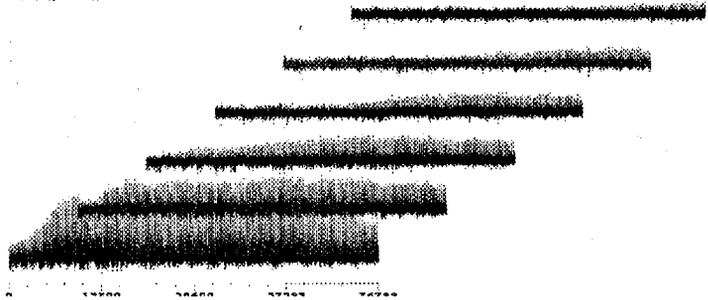


Figure 2  
Representative STRAFI echo train profiles recorded at 50 °C every 40 min from a sample of drying refractory mortar.

### 3. 結果

得られた結果は、 $M = M_0 \exp(-2it/T_2) + c$  ( $c = \text{constant}$ ,  $i = \text{echo number}$ ) で解析し、 $T_2$  の long 成分 (自由水) と short 成分 (結合水) とその緩和時間を得た。Figure 3 に Sample 1 及び 3 について、表面、中間部及び底部の結果を時間の平方根に対してプロットしたものを示す。

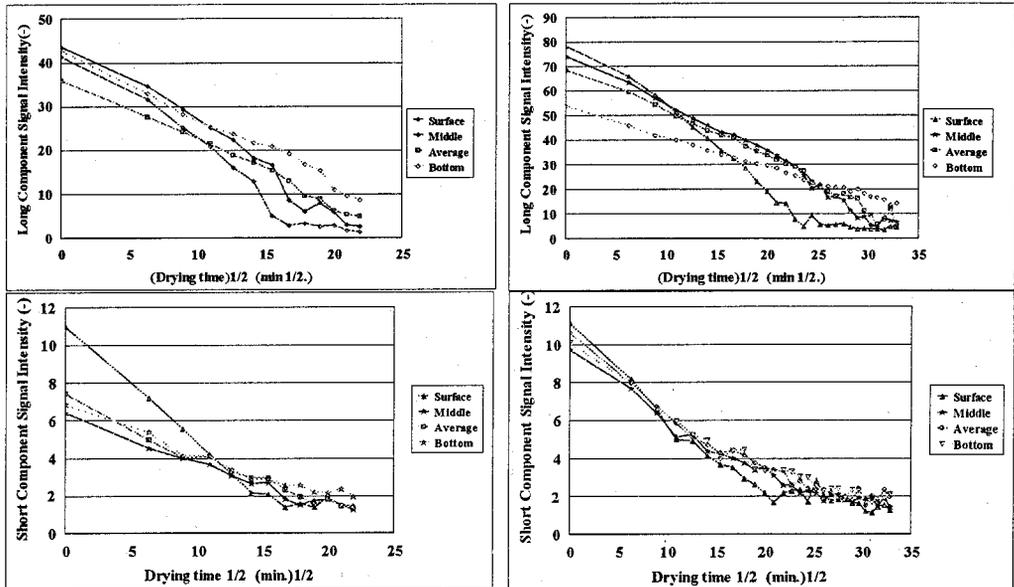


Figure 3 Long component intensity and Short component intensity at the three position from surface front as a function of root  $t$  for Sample 1(left) and 3(right)

Figure 3 から明らかなように、 $T_2$  の Long 成分の挙動は両試料であまり差がなく、時間の平方根

に対してほぼ直線であり、Fickian 型の拡散で乾燥していると考えられる<sup>5</sup>。よって、その結果から Sample 1 では平均拡散係数は  $8.7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、Sample 3 では  $9.7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  となりほとんど差がない。対して、 $T_2$  の short 成分では Sample 1 では同様に Fickian 型の拡散であるが、Sample 3 では Case II 型になっていることがわかる。Sample 1 には乾燥促進剤が添加してあり、表面を除いて、結合水と不定形耐火物との化学的相互作用が弱められた結果と推定できる。Sample 1 の平均拡散係数は  $3.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  であるが、Sample 3 では  $5.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  と遅く、この結果が乾燥時間の差 (Sample 1 ; 480min、Sample 3 ; 1040min.) となっていると考えられる。両試料で表面部分が他の部位と異なる挙動を示しているのは、表面部分での飽和蒸気圧の影響<sup>6</sup>と思われる。

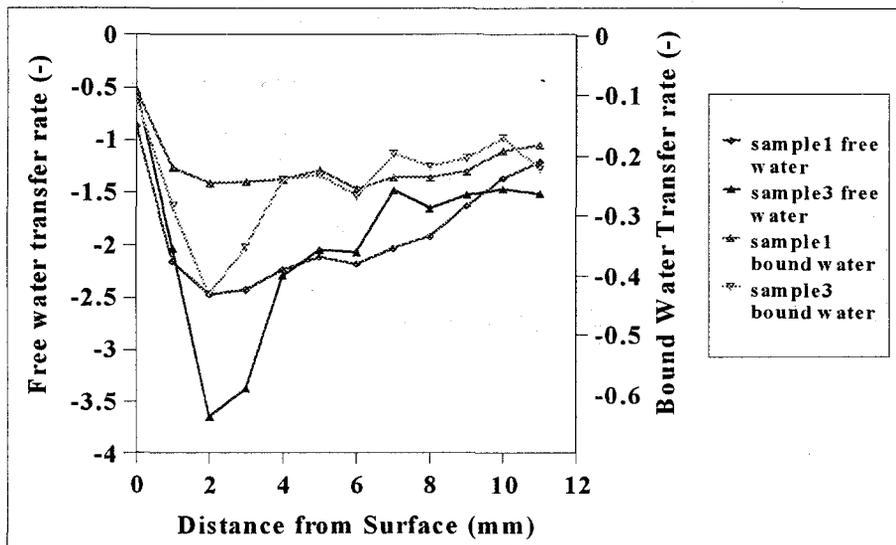


Figure 4 Relationship between the water transfer rate and the distance from surface.

Figure 4 に STRAFI での実験で得られた結果から算出した各位置での水の移動量<sup>7</sup>を示す。Sample 3 では自由水と結合水ともに移動量が大きく異なっており、表面から底部に行くほどその移動量が低下しているが、Sample 1 ではその変化程度は小さく、特に結合水の移動量はほぼ一定である。乾燥促進剤の添加効果と考えられ、不定形耐火物での乾燥過程は、結合水の乾燥が全体の乾燥時間を支配していると考えられ、如何に結合水の乾燥を加速化するかが重要であることがわかった。Figure 5 に Short 成分の緩和時間の挙動を示す。基本的に時間が経過するに連れて、全体の緩和時間は短くなっているが、Sample 3 では位置毎にそのバラツキが大きい。かなり異なって化学構造形態が存在していると推定できる。

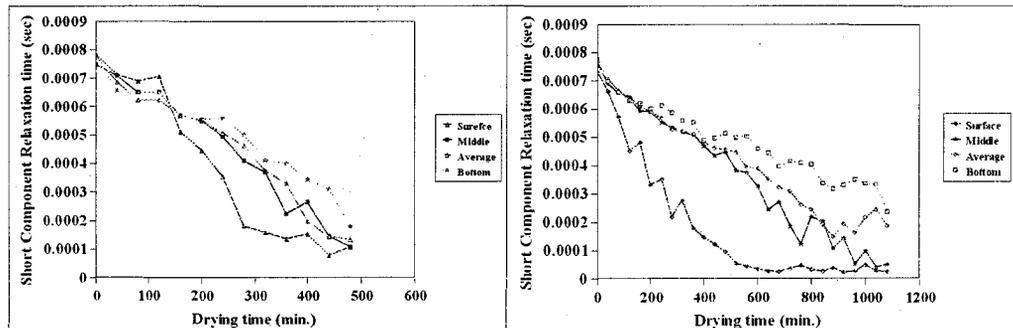


Figure 5 Short component relaxation time at the three position from surface front as a function of time for Sample 1(left) and 3(right)

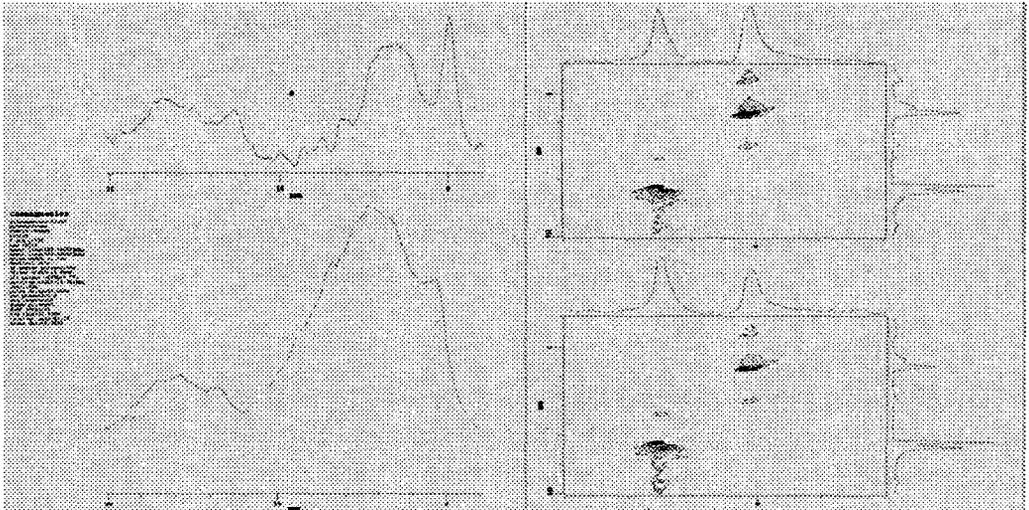


Figure 6 CRAMPS (left) and Al-5QMAS (right) spectra of Sample 3  
(upper: before drying ,lower:after drying)

Figure 6 に、Sample 3 での乾燥前後での  $^1\text{H}$ -CRAMPS 及び  $^{27}\text{Al}$ -5QMAS スペクトルを示す。CRAMPS の結果から、乾燥前にあった大量の水が乾燥後大幅に減り、また  $\text{Al}(\text{OH})_3$  の存在がわかる。また 5QMAS から主に 4 配位と 6 配位の Al 化合物がそれぞれ 2 種類ずつ存在し、乾燥が進むと 6 配位が 4 配位 ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) に変化している。また 6 配位には  $\text{Al}(\text{OH})_3$  と別の Al 系化学構造が存在しているが、CP/3QMAS の結果から  $\text{Al}(\text{OH})_3$  のみの信号が確認された。よって観測されなかった 6 配位の Al 化学構造には水和型で水が配位していると思われ、乾燥前後でのスペクトルの変化から自由水は主にこの化合物に、結合水は  $\text{Al}(\text{OH})_3$  に作用していると考えられる。乾燥後にある 6 配位は  $\text{Al}(\text{OH})_3$  であり、水素の緩和時間は短いので、Figure 5 の結果とも一致する。

#### 4. まとめ

固体 NMR 法及びイメージング法を組み合わせ、不定形耐火物の乾燥過程の解析を行い、そのメカニズム及び支配因子を明らかにした。STRAFI 法は従来法ではイメージングできなかった  $T_2$  が  $20 \mu \text{sec}$  以下の固体材料の解析に有効であり、また本研究のような材料の乾燥過程解析に関しても、得られる情報としては一次元 Projection ではあるものの、非常に有益な情報が得られる。STRAFI 法を含めた NMR イメージング法は高温で材料変化や溶媒と高分子の相互作用等の「現象の変化」を in-situ で捉えることのできる貴重な非破壊手法と考えられる。また MQMAS 法は CP-MQMAS 法も含めて、四極子核が多く存在する無機系材料の構造解析に非常に有効である。今後は両者を組み合わせた解析が増えると思われる。

#### 参考文献

- 1) B.Blumich., P.Blumler. and K.Saito, in 'Solid State NMR of Polymers', I.Ando and T.Asakura Ed. 1998, 123. Elseiver, 1998
- 2) A.A.Samolienko et al. , JETP Lett., 47 (1988) 348
- 3) P.J.McDonald , Progress in NMR Spectroscopy , 30 (1997) 69
- 4) K.Saito et al. , PROCEEDINGS of IX International Symposium on Magnetic Resonance in Colloid and Interface Scienc, NATO ASI Series (in press)  
K.Saito et al. , Applied Magn.Reson. , submitted
- 5) P.J.McDonald et.al J. Mat. Sci.Lett. 14,1175-1177 (1995)
- 6) Y.H.Song et al., Magn.Reson. Imaging 12,169-173 (1994)
- 7) P.J.McDonald et.al J. Mat. Sci. 33, 859-867 (1998)

## 超臨界水の静的および動的構造のNMRによる研究

(京大化研)○松林 伸幸・中尾 奈穂子・若井 千尋・中原 勝

NMR Study of Static and Dynamic Structures of Supercritical Water  
Nobuyuki Matubayasi, Naoko Nakao, Chihiro Wakai, and Masaru Nakahara  
(Institute for Chemical Research, Kyoto University)

The hydrogen bonding structure and dynamics of supercritical water is studied by means of high-temperature and high-pressure NMR. The proton chemical shift is measured over a wide range of thermodynamic conditions and is related to the number of hydrogen bonds in supercritical water with the help of computer simulations. It is found that the hydrogen bonding persists at supercritical temperatures and that the average number of hydrogen bonds is at least one in the supercritical densities. The spin-lattice relaxation time of  $D_2O$  is further determined to provide the reorientational correlation time of the O-D axis of a single water molecule. It is then found that while the reorientational correlation time decreases rapidly with the temperature on the liquid branch of the saturation curve, it remains on the order of several tens of femtoseconds when the density is varied up to twice the critical at a fixed supercritical temperature of 400 °C.

### 1. はじめに

超臨界水は、近年、その溶解性を自在に変化させることのできる高温反応場として大きな注目を浴びている。超臨界水の有用性は、その物理的・化学的性質が温度・密度の変化と共に大きく変わるところにある。例えば、超臨界水は、常温常圧下での水と違って、有機物質を良く溶解し、有機化学反応の環境に優しい溶媒となる。そこで、超臨界水の物理的・化学的性質を理解・制御するためには、その溶媒としての微視的な構造を明らかにする必要がある。本研究では、高温高圧NMRを用いて、超臨界水の水素結合構造およびダイナミクスを探る。

### 2. 高温 NMR プローブ

超臨界水・水溶液の直接観測をするために、京都大学と日本電子(株)が共同開発した高温プローブの概念図をFig. 1に示す。Fig. 1にあるように、プローブ下部からヒー

キーワード：超臨界水・化学シフト・スピン-格子緩和時間・水素結合・回転緩和

まつばやし のぶゆき・なかお なおこ・わかい ちひろ・なかはら まさる

ターで熱した窒素ガスをサンプル部に導入し、サンプルの温度を上げる。サンプル部とコイル・検出回路部は真空二重管で仕切られており、熱はコイル・検出回路部に影響を与えず、また、冷却水を循環させることでその性能が一定に維持されている。さらに、ヒーターから出る輻射場をカットするためにシールドも装着されている。

高圧を発生させるためには、サンプル（ここでは純水）を石英毛细管に封じるだけでよい。温度を上げると、封じられた毛细管の中は気液二相状態に保たれたまま、圧力は気液共存曲線に沿って上昇する。そして、臨界温度近くの転移温度を超えると一相状態が実現する。一相状態における密度は、石英毛细管の中のサンプルの仕込み量で一意的に決まる。

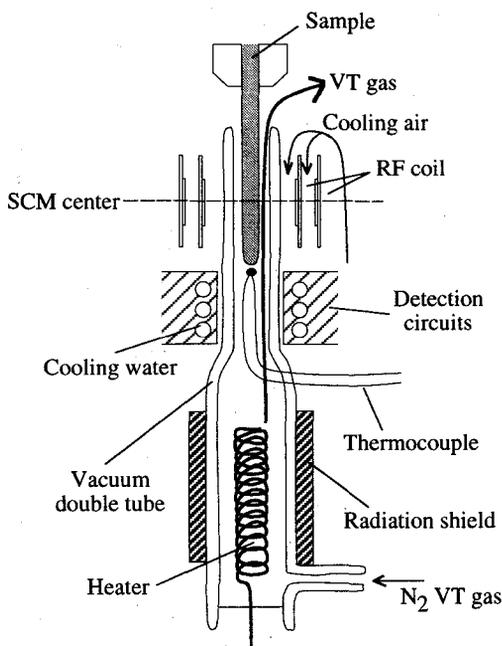


Fig. 1. Overview of the high-temperature probe.

### 3. 化学シフト

常温常圧において、水は「異常」な液体であり、その異常性を生むのが水素結合である。そこで、超臨界水の溶媒としての特性を微視的に明らかにするには、水素結合に焦点を当てる必要がある。そこで、水のプロトン化学シフトは、水素結合の強さに敏感に反応するので、超臨界水の水素結合を探るために、NMRは最適な手段である。ここでは、Fig. 1の高温プローブを用いて、 $H_2O$ のプロトン化学シフトを温度・密度の関数として測定した。

Fig. 2に典型的なスペクトルを示す。化学シフトが温度上昇と共に顕著に高磁場シフトしていることが分かる。Fig. 3は、化学シフト $\delta$ の値が温度 $T$ によってどのように変化するかを気液共存曲線上の液相・気相、超臨界状態についてまとめたものである。ここでの化学シフト $\delta$ は、分子間相互作用の無い孤立状態を基準にしている。また、磁化率補正を行って、問題にしている熱力学状態と孤立状態での遮蔽定数の差を表す形にしてある。Fig. 3に見るように、気液共存曲線の気体側で温度が低くなると、水の密度が極めて低くなるため、化学シフトは0である。気液共存曲線上では、温度上昇とともに、液体の化学シフトが大きく高磁場シフトし、気相の化学シフトは逆に低磁場シフトしていることがわかる。また、 $400^\circ C$ の超臨界水のプロトン化学シフトは、気相の化学シフトの値より常に低磁場側にある。これは水素結合が残っていることを示す確固たる証拠である。

しかし、化学シフトは、定量的かつ直感的な解釈の難しい量なので、これをより見

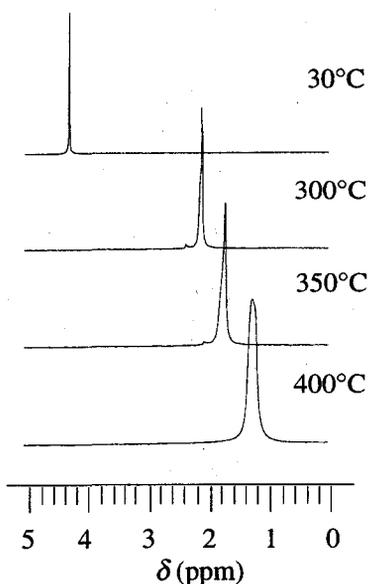


Fig. 2. The proton NMR spectra of water. At 30, 300, and 350 °C, the large peak corresponds to the liquid branch of the liquid-gas coexistence curve, and at 400 °C, the density is 0.4 g/cm<sup>3</sup>. The magnetic susceptibility correction is already made.

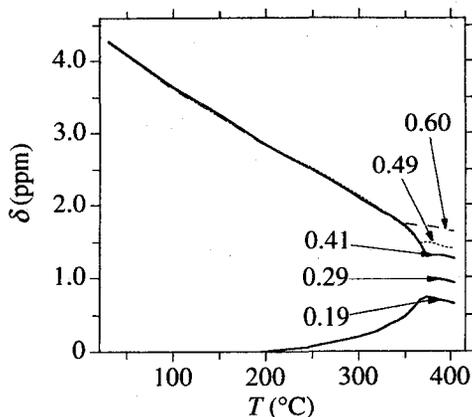


Fig. 3. The density and temperature dependence of the proton chemical shift  $\delta$  of water at high-temperature conditions including supercritical. The numbers in the figure stands for the density in the units of g/cm<sup>3</sup>. The upper and lower curves in the subcritical region correspond, respectively, to the liquid and gas branches of the liquid-gas coexistence curve.

易い量に変換する。計算機シミュレーションを行うことで、超臨界・亜臨界水の化学シフトが、平均水素結合数  $N_{\text{HB}}$ （「隣」とみなすことのできる距離にある分子間O-Hの個数として、動径分布関数から厳密に定義可能）に比例することを示すことができる。そこで、Fig. 4に超臨界水の  $N_{\text{HB}}$  を示す。超臨界水の水素結合数は、常温常圧での値である4本より減っているとはいえ、気体様の領域でもまだ1本あることが分かる。すなわち、超臨界水は水素結合性の溶媒であるといえる。また、平均水素結合数  $N_{\text{HB}}$  の密度に対する比は、水素結合領域における動径分布関数の平均値に比例し、流体構造の局所的な不均一性を記述する指標となる。Fig. 4から、その比は密度減少とともに増加することが分かる。つまり、超臨界水の局所的な不均一性は低密度において大きくなる。

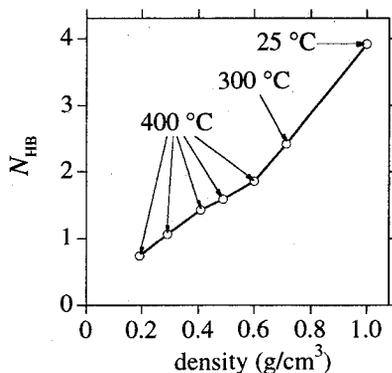


Fig. 4. The number  $N_{\text{HB}}$  of hydrogen bonds in super- and subcritical water.

#### 4. 回転ダイナミクス

化学反応の溶媒効果の理解のためには、反応分子種の周りの溶媒和の寿命を知ることがしばしば必要となる。そのとき、水が特異な効果をおよぼすとしたら、それは水素結合などを伴う異方性の強いものである。水分子そのものの回転ダイナミクスは、超臨界水中の溶媒和ダイナミクスの最も簡単なモデルとなる。本研究では、超臨界条件下にある水分子の回転ダイナミクスを調べるために、重水(D<sub>2</sub>O)のNMR  $T_1$  測定を行った。高温条件では、運動量空間での緩和が遅くなるため、スピン-回転機構の  $T_1$  値への寄与が増大するが、D<sub>2</sub>Oの  $T_1$  については、ここで取り扱った超臨界・亜臨界条件では、スピン-回転機構は無視でき、四重極機構で  $T_1$  緩和が起きていることを示すことができる。そこで、実験で得られた  $T_1$  値と計算で得られた四重極結合定数から、水分子のOD軸ベクトルの方向の(2次)の回転相関時間  $\tau_{2R}$  を決定した。

Fig. 5に、超臨界状態及び気液共存曲線上にあるときの  $\tau_{2R}$  を密度(H<sub>2</sub>O換算したもの)の関数として示す。 $\tau_{2R}$  は温度に大きく依存し、常温常圧条件下のpsの時間スケールのダイナミクスが、超臨界・亜臨界状態では数十fsの時間スケールのダイナミクスに加速されていることが分かる。温度一定の超臨界条件下では、密度が0.1から0.6 g/cm<sup>3</sup>まで変化しても、 $\tau_{2R}$  の変化率は40%であり、水素結合数1つあたりの増加で見ると、20%の変化に相当する。また、密度が0.1 g/cm<sup>3</sup>より小さくなると、 $\tau_{2R}$  は密度減少と共に増加する。これは、密度が0の極限では、各水分子の角運動量が保存し、 $\tau_{2R}$  が発散することを反映している。よって、分子間相互作用の影響が見えなくなってくるのは、密度が0.1 g/cm<sup>3</sup> 辺り以下であることが分かる。Fig. 5の  $\tau_{2R}$  をH<sub>2</sub>Oの  $T_1$  測定によって得られる角運動量の緩和時間  $\tau_j$  と比較すると、 $\tau_j > \tau_{2R}$  が成り立ち、慣性の効果が緩和に影響を及ぼし、回転緩和に対する拡散モデルの破綻を意味する。事実、400 °Cでの密度依存性は、並進拡散係数、粘性率、 $\tau_{2R}$  の順に大きく、並進拡散係数の密度依存性は  $\tau_{2R}$  の密度依存性の約4倍である。

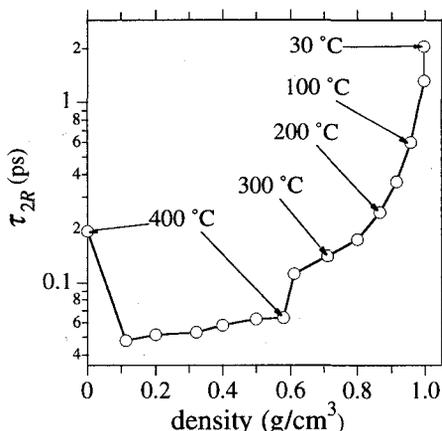


Fig. 5. The reorientational correlation time  $\tau_{2R}$  of super- and subcritical water.

#### 参考文献

- [1] N. Matubayasi, C. Wakai, and M. Nakahara, *Phys. Rev. Lett.*, **78**, 2573-2576, 4309 (1997).
- [2] N. Matubayasi, C. Wakai, and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.*, **107**, 9133-9140 (1997).
- [3] N. Matubayasi, C. Wakai, and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.*, **110**, 8000-8011 (1999).
- [4] N. Matubayasi, N. Nakao, and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.*, **114**, 4107-4115 (2001).

## 1 L10

超偏極 Xe-129 ガスの緩和特性:  $T_1$  測定におけるガラスの材質効果および拡散の影響

○神谷貴史、清水隆興、柳川康洋、木村敦臣、藤原英明

大阪大学・医学部保健学科

Relaxation Behavior of Laser-Polarized Xe-129 Gas: Wall Effect and Influence of Diffusion on the  $T_1$  Relaxation Time in Glass

Takashi Kamiya, Takaoki Shimizu, Yasuhiro Yanagawa, Atsuomi Kimura, and Hideaki Fujiwara

School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University

Size dependency of the relaxation time  $T_1$  is measured for the laser polarized Xe-129 gas encapsulated in different sized cavities made by glass bulb or tube. The dependency is measured under rigorous exclusion of contamination from air, and the relationship between relaxation rate and the inverse square of mean free path has been established for glass bulbs. Namely, a good linear correlation was obtained between the relaxation rate  $1/T_1$  of hyperpolarized Xe gas encapsulated in Pyrex glass bulb and its inverse square of the mean free path ( $1/l^2$ ). On the other hand,  $T_1$  of hyperpolarized Xe gas encapsulated in Pyrex glass tube showed a different relationship with the mean free path. This behavior was explained successfully by taking into account of the diffusion of the polarized Xe gas in the tube.

序.

超偏極希ガス NMR は物理から化学、医学まで応用可能な測定法として注目されている。我々は昨年の本討論会で、超偏極 Xe-129 ガスを用いて、ガラスなどの器壁との衝突による緩和効果の研究について報告した。今回はそれをふまえて、試料管の形状による緩和時間の変化が大ききことを取り上げ、超偏極希ガスの試料管内での拡散が緩和時間の測定値に大きく影響することを見出し、そのデータ解析を行ったので報告する。

実験. 半導体レーザを光源として GaAlAs ダイオードレーザー (コヒーレント社: FAP システム) を用い、円偏光器を通して円偏光を得た。偏光用の磁場に縦型の分析用 NMR 装置の漏れ磁場を利用することとし、垂直方向に 12mT 程度の漏れ磁場の位置に偏極セルを置いた。偏極セルは 120°C の恒温槽内に置いた。セルはシリンダー状で外径は 6cm で長さは 10cm である。装置全体の設計については図 1 に示す。Rb は約 0.2g を高真空 ( $10^{-6}$  torr) 下で封入した。ガラスはパイレックスガラスを用いたが今回は特に表面コーティングは考慮しなかった。Xe-NMR 測定には Varian 社製 INOVA 400WB 装置で行った。測定周波数は 110MHz、温度は室温 (23°C) であった。実験に使用したガラス管の材質はパイレックスを用いた。ガラス球の内径の測定は中に水を注入しその重さから決定した。ガラス管の内径はノギスで測定した。ガラス球は、材質はパイレックスで自作したものを使用した。

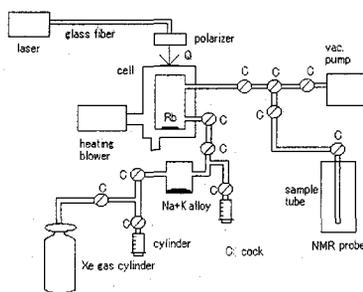


Fig.1 Hyperpolarized noble gas supplying system (homebuilt)

方法. 超偏極 Xe-129 の  $T_1$  測定. 超偏極希ガスの磁化が熱平衡磁化に戻るプロセスが (縦磁化について)  $T_1$  緩和プロセスであることから導かれた(1)式を用いて  $T_1$  を求めた。

$$\ln(S_n) = \{\ln(\cos \alpha) - T_R/T_1\}(n-1) + \ln(S_1) \quad (1)$$

超偏極希ガス NMR、Xe-129、緩和時間、ガラス材質効果、拡散の影響

かみや たかし、しみず たかおき、やながわ やすひろ、  
きむら あつおみ、ふじわら ひであき

ここでは、 $\alpha^\circ$  パルスが  $T_R$  の時間間隔で繰り返し (全部で  $n$  回) 照射され信号強度  $S$  が測定される。 $S_1$  と  $S_n$  は 1 番目と  $n$  番目の信号強度を表す。この式より、 $\ln(S_n)$  を  $n-1$  に対してプロットすると勾配が  $\ln(\cos \alpha) \cdot T_R/T_1$  で切片が  $\ln(S_1)$  となることが分かる。 $T_1$  測定に利用したパルスの傾斜角は昨年の本討論会要旨と同じ方法<sup>1)</sup>で決定した。その結果  $\alpha=8.1^\circ$  となった。

### 結果と考察.

内径の違うガラス管およびガラス球、種々の材質のガラス管内での超偏極 Xe ガスの  $T_1$  値を表 1 に示す。球状サンプルについて、気体分子運動論的な考察から、 $T_1$  値は下式により平均自由行程と関係付けられる：<sup>1)</sup>

$$1/T_1 = (3.75D/t_{1,\text{wall}})(1/\ell^2) + 1/T_{1,\text{inf}} \quad (3)$$

$D$  は自己拡散係数 ( $5.7\text{mm}^2/\text{se}$ )、 $t_{1,\text{wall}}$  は 1 秒に 1 回の速度で器壁に衝突が起こる場合の 1 回あたりの緩和時間への寄与、 $\ell$  は平均自由行程、 $T_{1,\text{inf}}$  は無限大サイズ中での緩和時間である。(3)式を用いてデータを解析したところ、ピアレックスガラス球については  $T_1$  値と  $1/\ell^2$  の間に良好な直線関係が成立し(図 2 の◆)、以下の式が得られた。

$$1/T_1 = 0.000453(\pm 0.000123)(1/\ell^2) + 0.000157(\pm 0.00003) \quad r=0.819 \quad (4)$$

$r$  は重相関係数を表す。これより、 $t_{1,\text{wall}}$  として  $47000(\pm 14000)$  が求まった。この値は前回の値と比べてかなり大きい。これは今回の実験方法の改良により壁緩和効果が 2 桁小さくなったことを意味する。今回は Xe ガスを密閉系を通してガラス球へ導入しているのでその効果が大きく現れたと考えられる。(4)式の切片の値から無限大球状セルにおける緩和時間  $T_{1,\text{inf}}$  が評価できる ( $T_{1,\text{inf}} =$  切片の逆数)。  $T_{1,\text{inf}}$  には前回との間に大差はなかったが、精度は大いに向上した ( $T_{1,\text{inf}}=6400$  秒( $\pm 1300$ ))。

管状サンプルについて、ガラス管について(4)式と同様なプロットを行うと図 2 のように直線とはならず、漸近線的な結果が得られた(図 2 の■)。この原因としては、気体の拡散の影響が緩和時間を決める際に関係していると考えられる。そこで、コイル内でパルス照射された偏極希ガスが、次のパルス照射までの間に、サンプル総体積に対して  $f$  の割合でガラス管内中へ拡散により希釈されると仮定し、(1)式を変形して解析した。そこで、上の(1)式に対応する式として次式が得られた。

$$\ln(S_n) = \ln\{1-f(1-\cos \alpha)\} \cdot T_R/T_1(n-1) + \ln(S_1) \quad (5)$$

$f$  を求めるためにパルス角度が  $\alpha^\circ$  と  $2\alpha^\circ$  での実験を行い、 $\ln(S_n)$  の  $(n-1)$  に対するプロットの傾斜をとり

$$\text{傾斜の差} = \ln\{1-f(1-\cos 2\alpha)\} / \{1-f(1-\cos \alpha)\} \quad (6)$$

の関係を利用した。得られた  $f$  は 0.3-0.6 であった。これにより、管状の細長いサンプルは rf コイルからの  $\alpha^\circ$  パルスを受けない部分への拡散が  $T_1$  データに大きく影響していることがわかる。従って、壁に対する緩和効果の定量的な評価には密閉系での球状サンプルの使用が重要であることが結論された。

Table 1. Relaxation Data of the Laser-Polarized Xe-129 Gas Encapsulated in Glass Bulbs and Tubes

Glass Bulb		Glass Tube	
$\ell$ (mm)	$T_1$ (sec)	$\ell$ (mm)	$T_1$ (sec)
3.1	3100 $\pm$ 800	2.2	5500 $\pm$ 560
4.0	3500 $\pm$ 500	3.4	6200 $\pm$ 1800
4.5	3600 $\pm$ 300	3.9	6800 $\pm$ 2100
5.2	4500 $\pm$ 200	4.9	8000 $\pm$ 1400
5.9	5600 $\pm$ 750	5.7	9900 $\pm$ 700

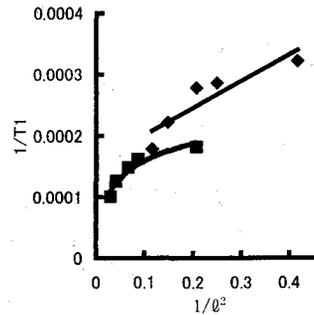


Fig.2 Plots of  $1/T_1$  against  $1/\ell^2$  for the pyrex glass bulbs and tubes (eq. 4)

### 引用文献.

- 1) 藤原、木村、柳川、飯田、平賀、服部、第 39 回 NMR 討論会要旨集 p,24-27 (2000); H. Fujiwara, et al., *J. Magn. Reson.* 150, 156-160 (2001).

## 1 L11

 **$^1\text{H}$  NMR を用いる脳代謝機能評価系の構築**(国立環境研<sup>1</sup>、筑波大医<sup>2</sup>) ○三森文行<sup>1</sup>、熊谷 恵<sup>1,2</sup>、山根一祐<sup>1</sup> **$^1\text{H}$  NMR evaluation method for brain metabolism affected by chemicals using STEAM localized spectroscopy with ultra-short echo time**(National Institute for Environmental Studies<sup>1</sup>, University of Tsukuba<sup>2</sup>)**F.Mitsumori<sup>1</sup>, M.Kumagai<sup>1,2</sup>, K.Yamane<sup>1</sup>**

We made an evaluation method of pharmaceutical or toxic agents in terms of their effects on the brain metabolism based on  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. We prepared a rat installed with a bypass at its internal carotid artery, through which chemicals were directly injected to the brain after breaking its blood brain barrier by hypertonic mannitol solution. In order to observe  $^1\text{H}$  NMR spectra localized to its brain hemisphere we implemented a STEAM method with ultra-short echo time of 2ms. Considering the  $T_2$  relaxation time of most metabolites are longer than 100 ms, the  $^1\text{H}$  spectra enable us to quantitatively evaluate the change in metabolites avoiding the  $T_2$  weighting. We can also observe metabolites with coupled spin systems with minimal J modulations.

【はじめに】さまざまな薬物や毒物が脳の代謝機能に及ぼす影響を  $^1\text{H}$  NMR を用いて定量的に評価するための実験動物評価系の構築を行った。本法ではラット片脳の血液脳関門を開き、頸動脈経由で対象とする化学物質を脳内に直接投与し、その代謝物への影響を  $^1\text{H}$  NMR 法で評価するものである。脳局所の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルの測定は、2ms という極めて短いエコー時間を実現した STEAM 法を用いた。これにより、脳内の 10 種類以上の代謝物を J 変調や、 $T_2$  緩和の影響をほとんど受けることなく観測することが可能である。

【方法】雄の Wistar ラットを halothane (1%) 麻酔下で右総頸、内頸動脈間に外部循環回路を設定し、これより D-mannitol (25% w/v, 5ml/kg 体重) を投与することにより、右脳の血液脳関門 (BBB) を選択的に破壊した。次いで脳への影響を評価する化学物質を同じ外部循環回路より右脳内に直接投与した。グラディエントエコー法 (TR/TE=50/5ms) による脳の矢状断、冠状断画像に基づいて右ないし左脳内に  $5 \times 5 \times 6\text{mm}$  ( $150 \mu\text{l}$ ) の領域設定を行った。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルは非対称 rf パルスを用いる STEAM 法により、TR/TE/TM=5000/2/30 ms で測定した[1]。関心領域内の局所シムは FASTMAP 法を用いて半自動的に調整した[2]。測定システムは JMT 社の自己シールド型水平ボア磁石 (4.7T, 31cm bore) に Varian 社の Inova 分光計を接続し、Magnex 社の口径 17.8cm の自己シールド型磁場勾配コイル、シムコイルを用いた。検出器は自作の内径 5cm の sine コイルを用いた。

【結果と考察】図 1 に正常ラット右脳  $5 \times 5 \times 6\text{mm}$  ( $150 \mu\text{l}$ ) の領域で積算 128

キーワード : in vivo NMR、 $^1\text{H}$  NMR スペクトル、脳代謝、STEAM

みつもりふみゆき、くまがいめぐみ、やまねかずすけ

回で測定されたスペクトルを示す。従来観測された、N-アセチルアスパラギン酸(NAA)、クレアチン(Cre)、コリン類(Cho)に加え、アラニン、グルタミン酸、タウリン等 10 余种の代謝物が観測可能である。エコー時間が 2ms ときわめて短いため、低分子量代謝物に加え、 $T_2$  緩和の短い高分子量物質も観測されている。7 個の CHESSE パルスにより水信号はほとんど完全に抑圧されている。なお、測定領域内の磁場の均一度は水の半値幅で 8-10Hz に調整している。

本測定法を用いて、化学物質の脳代謝への影響評価系を構築する第一段として、血液脳関門を破壊するために用いる高張マニトール溶液の影響の有無を評価した。マニトール投与前後の右脳のスペクトルの変化、左右両脳半球の比較により、マニトールは脳の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルにほとんど影響を与えないことが明らかになった。マニトール投与後の経時的追跡によって、3 時間半程度まで安定な  $^1\text{H}$  NMR スペクトルが観測された。

さらに、本法を用いて、グルタミン酸、カイニン酸、ドーパミン等の神経伝達物質の投与を行い、その  $^1\text{H}$  NMR スペクトルへの影響を見た。グルタミン酸(26  $\mu\text{mole}$ )、カイニン酸(腹腔内 70  $\mu\text{mole/kg}$  体重)では、脳内代謝物の変動は見られなかったが、ドーパミン(5.3  $\mu\text{mole}$ ) 投与では、メチル基領域での新ピークの出現を観測した。

本研究で構築した化学物質の脳代謝への影響評価法は、対象物質を NMR 分光計内で脳内に直接投与し、その代謝物への影響を投与側で経時的観測すること、また投与側と反対側との比較を可能とした。2ms の極短エコー時間での STEAM 測定により、 $T_2$  緩和による信号強度の減衰や、スピン結合による J 変調をほとんど考慮する必要なく、代謝物の定量的評価が可能となった。

【謝 辞】非対称パルスを用いる STEAM 法シーケンス、FASTMAP 自動シミュレーションプログラムを恵与されたミネソタ大学 Rolf Gruetter 博士、Ivan Tkac 博士に感謝します。

[1].Tkac, Z.Starcuk, I.-Y.Choi, R.Gruetter, MRM, 41, 649-656 (1999)

[2] R.Gruetter, I.Tkac, MRM 43, 319-323 (2000)

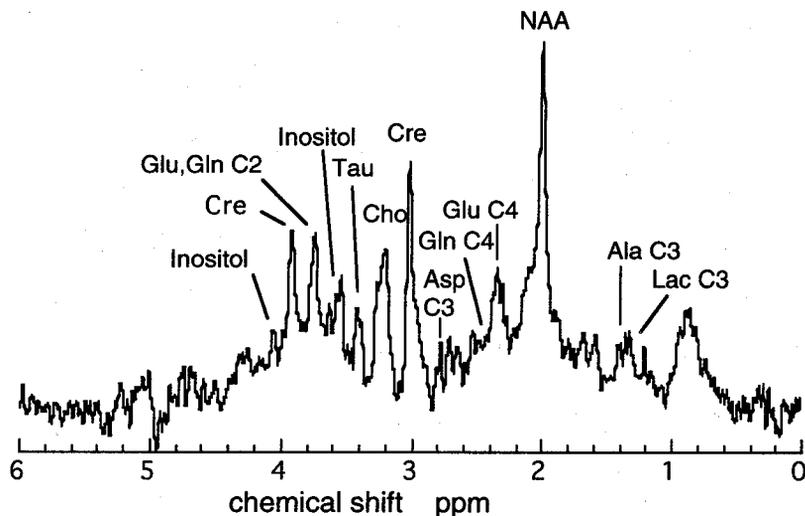


図 1. 正常ラット前脳右半球 150  $\mu\text{l}$  での  $^1\text{H}$  NMR スペクトル。  
TR = 5000ms  
TE = 2ms  
TM = 30ms  
積算 128 回

## 1 L12

### ラット脳脊髄液産生への血中炭酸ガス分圧の影響： Gd-DTPA 造影 T<sub>1</sub>強調 MRI 法による測定

(京都府立医大・一生理<sup>1</sup>、精神神経センター神経研<sup>2</sup>、岐阜大・  
医学部・一生理<sup>3</sup>、生理学研・分子生理<sup>4</sup>)

○瀬尾芳輝<sup>1</sup>、鷹股 亮<sup>1</sup>、萩野 孝史<sup>2</sup>、森田 啓之<sup>3</sup>、村上 政隆<sup>4</sup>

#### Effects of pCO<sub>2</sub> on the CSF production in rat brain using Gd-DTPA enhanced T<sub>1</sub>-weighted MRI.

(<sup>1</sup> Dept. of Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine, <sup>2</sup> Dept. of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, <sup>3</sup> Dept. of Physiology, School of Medicine, Gifu University, <sup>4</sup> Dept. of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

Yoshiteru Seo<sup>1</sup>, Akira Takamata<sup>1</sup>, Takashi Ogino<sup>2</sup>, Hironobu Morita<sup>3</sup>, Masataka Murakami<sup>4</sup>

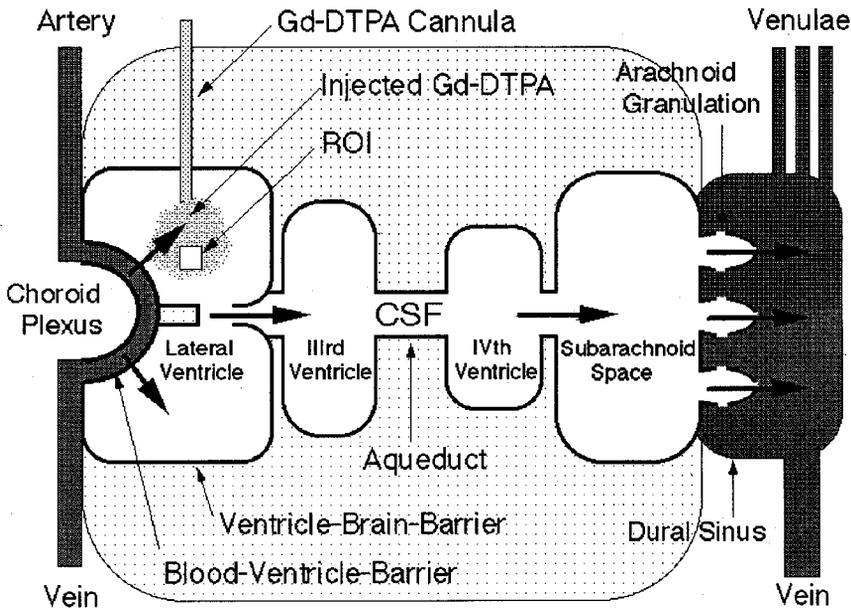
Cerebrospinal fluid (CSF) secretion of rat was monitored by longitudinal relaxation time-weighted magnetic resonance imaging (T<sub>1</sub>-weighted MRI) in combination with ventricular injection of a T<sub>1</sub>-relaxation reagent: gadolinium-diethylene triamine-N,N,N',N'',N''-pentaacetic acid (Gd-DTPA). A cannula was inserted in the left lateral ventricle, and 5 ul of 8.5 mM Gd-DTPA was injected as a CSF marker. Changes in the image intensity of the CSF were measured every 30 sec, and the turnover rate of CSF (*k*) in the left lateral ventricle was obtained from the dilution of Gd-DTPA, based on the assumption of a single compartment model. In the control conditions, *k* was  $0.158 \pm 0.009 \text{ min}^{-1}$  at an arterial blood CO<sub>2</sub> tension (pCO<sub>2</sub>) of  $38.6 \pm 2.2 \text{ mmHg}$  (n=10), which corresponds to the CSF secretion rate of  $3.6 \text{ ul} \cdot \text{min}^{-1}$ . The *k* value was decreased ( $0.078 \pm 0.010 \text{ min}^{-1}$ , n=4) by a carbonic-anhydrase inhibitor (acetazolamide). The turnover rate was decreased by hypocapnia ( $0.094 \pm 0.019 \text{ min}^{-1}$ , pCO<sub>2</sub> =  $24.7 \pm 2.9 \text{ mmHg}$ , n=4), and it increased gradually and reached a plateau level due to hypercapnia ( $0.194 \pm 0.011 \text{ min}^{-1}$ , pCO<sub>2</sub> =  $104.5 \pm 7.1 \text{ mmHg}$ , n=10). These results suggested that CO<sub>2</sub> upregulates the secretion of CSF in the rat.

キーワード： 水分子、脳脊髄液、脈絡叢、T<sub>1</sub>緩和時間、緩和試薬

せおよじてる、たかまたあきら、おぎのたかし、もりたひろのぶ、むらかみまさたか

【はじめに】 脳組織は脳脊髄液中に浮かんでおり、脳脊髄液は、脳組織を物理的衝撃から守ると共に、体液中に生じる様々な生理的変動を、脳組織内の受容器へと伝達する重要な役割を果たしている。脳脊髄液は、側脳室内の脈絡叢で産成され、第3脳室、第4脳室などを経て、脳組織外周を覆うくも膜下腔へと進み、くも膜下腔のくも膜顆粒から、静脈へと環流される(図1)。脳脊髄液産成速度への、血液炭酸ガス分圧の影響は、イヌ・サル等について測定されてきたが、相反する測定結果が報告されており、定説はない。今回、ラットやマウスなどの小動物での測定が可能な脳脊髄液産成速度測定方法を開発し、ラットにおける脳脊髄液産成速度への血液炭酸ガス分圧の影響を検討したので、報告する。

Fig. 1. A diagram showing the intraventricular injection of Gd-DTPA in the rat brain. The production of cerebrospinal fluid (CSF) in the choroid plexus, the flow of CSF through the ventricular systems, and drainage of CSF from the arachnoid granulation are shown as arrows. The bold lines in the choroid plexus and the ventricles represent the presence of the blood-ventricular-barrier and ventricle-brain-barrier, respectively. A small region-of-interest (ROI, 0.076 ul) was placed near to the choroid plexuses.

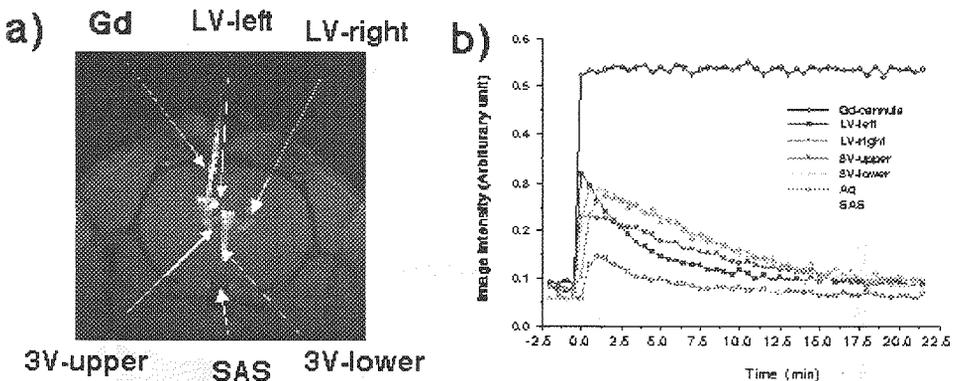


【方法】 Wistar 系ラットをガス麻酔下に、左側脳室内にカテーテルを留置した。頭頂部に直径 18mm の表面コイルを設置し、コイル中心部で 180° パルスになるように調整した。8.5 mM Gd-DTPA 溶液 5 uL を注入後、脳室内の脳脊髄液の信号強度の変化を 30-60 分間にわたり測定した。T<sub>1</sub> 強調 MR 画像は、高速磁場反転エコー法(GEFI)を用い、FOV 2.5 x 2.5 cm、データサイズ 128 x 128、スライス 1 mm、パルス繰り返し時間(TR) 100 msec、エコー時間(TE) 4.2 msec、9 スライス、2 回積算、積算時間 30 sec で測定した。測定には、Biospec4.7/40 (4.7 T)と ParaVision1.1-5 を用いた。

**【結果】**

1.  $T_1$  強調画像の強度変化と脳脊髄液産成速度 ラット左側脳室内に Gd-DTPA を注入 1 分後の  $T_1$  強調画像を図 2 a に示す。左側脳室に注入された Gd-DTPA は、第 3 脳室や対側の右側脳室にすでに現れている。各脳室の局所の信号強度の変化をプロットしたのが図 2 b である。左側脳室では、注入直後に信号強度が上昇し、その後単調に減少している。第 3 脳室や中脳水道では、やや遅れてピークを示し、もっとも離れた、脳底部くも膜下腔では 10 分後から緩やかな上昇が認められた。以上より、図 1 に示すように、側脳室からの一方向の流れに乗って Gd-DTPA が拡散しつつ運ばれている事が確認できた。

Fig. 2. a), b) A  $T_1$ -weighted coronal gradient-echo image of a rat brain at 0.8 mm and 5.2 mm caudal to the bregma, 1 min after the injection of 5  $\mu$ l of the Gd-DTPA solution.



$T_1$  強調画像の強度変化から脳脊髄液の局所での turnover rate (k)を、以下の条件の下に求めた。

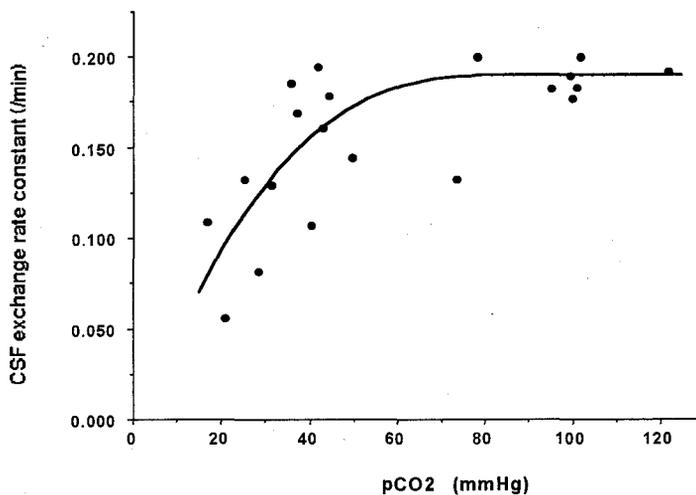
- 1) 側脳室局所に注入した Gd-DTPA は、新たに産成された脳脊髄液により希釈され、その濃度変化は、 $[Gd] = [Gd]_0 \cdot \exp(-kt)$  と表される。
- 2) 局所の脳脊髄液の  $T_1$  緩和速度は、Gd-DTPA の濃度変化により、 $1/T_1 = 1/T_{csf} + R_{gd} = 1/T_{csf} + K_1 \cdot [Gd] = 1/T_{csf} + 1/T_{gd} \cdot \exp(-kt)$  と表される。ここで、 $T_{csf}$ 、 $T_{gd}$  は、本来の脳脊髄液の緩和時間および Gd-DTPA 注入直後の濃度に相当する緩和時間である。
- 3) 一方、 $T_1$  強調画像の信号強度は、 $I = I_0 [1 - \exp(-TR/T_1)]$  と表されるので、Gd-DTPA 注入前の脳脊髄液の信号強度は、 $I_b = I_0 [1 - \exp(-TR/T_{csf})]$  と表せ、Gd-DTPA 注入後の脳脊髄液の信号強度は、 $I_t = I_0 \{1 - \exp(-TR/T_{csf}) \cdot \exp[-TR/T_{gd} \cdot \exp(-kt)]\}$  と表せる。
- 4) 以上の関係を用いれば、turnover rate (k)について、 $\log\{-\log [(I_0 - I_t)/(I_0 - I_b)]\} = \log(TR/T_{gd}) - kt$  と表し、求めることができる。

上記の  $T_1$  強調画像の信号強度は、測定部位に  $90^\circ$  パルスが印可されると仮定した。実際の測定では、表面コイルを用いているために、測定部位での RF は、 $60^\circ$  から  $120^\circ$  の範囲をとる。しかし、シミュレーションしたところ、誤差の多くは  $I_0$  に組み込まれ、turnover rate (k) には、最大 15% の誤差しか生じないことが確かめられた。

2. 脳脊髄液 turnover rate と脳脊髄液産成速度 正常ラットの脳脊髄液 turnover rate は、 $0.158 \pm 0.011 \text{ min}^{-1}$  ( $n = 8$ ) であった。Gd-DTPA 注入直後の Gd-DTPA の分布する脳脊髄液の体積は、 $22.8 \pm 2.3 \text{ uL}$  ( $n=6$ ) であった。両者の積から脳脊髄液産成速度は、約  $3.6 \text{ uL/min}$  と求められた。この値は、ラットについて、他の方法で求められた値 ( $2 - 3 \text{ uL/mi}$ ) とよく一致した。

3. 血中炭酸ガス分圧と脳脊髄液 turnover rate ラットに吸引させる炭酸ガス濃度を変化させ、30分後の脳脊髄液 turnover rate を測定した。血中の炭酸ガス濃度は、動脈血を採取し、血液ガス分析装置にて測定した。turnover rate 測定の前後も、安定していることを確認した。結果を図3に示す。血中炭酸ガス濃度は、正常時、約  $40 \text{ mm Hg}$  である。 $40 \text{ mm Hg}$  以下の低二酸化炭素血症では産生速度は明らかに低くなった。 $40 \text{ mm Hg}$  以上の高二酸化炭素血症では、やや増加するものの、血中炭酸ガス濃度が  $80 \text{ mmHg}$  以上では、ほぼ一定値を示すことが明らかになった。従来の報告では、低二酸化炭素血症での産生速度の減少については、比較的良く一致した報告がなされていたが、高二酸化炭素血症では、増加・変化せず・減少と、全く異なる結果が報告されてきた。今回の結果を見ると、高二酸化炭素血症での増加域は狭いので、実験条件の設定により、増加・変化せずという結果が出ていた可能性がある。今後、二酸化炭素による脳脊髄液産生速度の制御機構について検討していく予定である。

Fig. 3. The relationship between the  $\text{pCO}_2$  and the CSF turnover rate. Individual values obtained in the normoxia, hypocapnia and hypercapnia were plotted. The bold line was drawn by inspection.



## 骨粗鬆症診断用 MRI の開発

山崎由香子<sup>1</sup>, 拝師智之<sup>2</sup>, 松田善正<sup>1</sup>, 橋本征太郎<sup>1</sup>, 宇津澤慎<sup>2</sup>, ○巨瀬勝美<sup>1</sup>,  
吉岡大<sup>3</sup>, 中西昭男<sup>4</sup>, 岡田重益<sup>4</sup>, 遠藤政治<sup>4</sup>, 青木雅昭<sup>4</sup>, 津崎剛<sup>4</sup>

1. 筑波大学物理工学系, 2. (株) エム・アール・テクノロジー  
3. 筑波大学臨床医学系, 4. 住友特殊金属 (株)

### Development of a Compact MRI for Diagnosis of Osteoporosis

Y. Yamazaki<sup>1</sup>, T. Haishi<sup>2</sup>, Y. Matsuda<sup>1</sup>, S. Hashimoto<sup>1</sup>, S. Utsuzawa<sup>2</sup>, K. Kose<sup>1</sup>  
H. Yoshioka<sup>3</sup>, A. Nakanishi<sup>4</sup>, S. Okada<sup>4</sup>, M. Endou<sup>4</sup>, M. Aoki<sup>4</sup>, T. Tsuzaki<sup>4</sup>

1. Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 2. MR Technology Inc., 3. Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, 4. Sumitomo Special Metals Company Ltd.

Compact MRI systems for diagnosis of osteoporosis, of which installation space was only about 2m x 2m, were developed. The MRI systems were specially designed to measure trabecular bone volume fraction at calcaneus using image intensity of spin-echo MR images. A preliminary study with a small number (n=26) of female volunteers demonstrated a positive correlation between bone density and body mass index. The results have shown a promise of the MRI system as a tool for bone research and/or osteoporosis screening and diagnosis.

#### 1. はじめに

骨粗鬆症は、加齢などとともに骨密度が減少する疾患で、我が国では約 1,000 万人の患者がいて推定されている。また、この疾患は、高齢者が寝たきりになる原因の上位を占める大腿骨頸部骨折の素因であり、この克服は国民的課題である。このためには、早期にスクリーニングを行って、骨密度減少に対する対策（食事や運動など）を行うことが重要である。

骨粗鬆症のスクリーニングには、二種類の中心エネルギーを持つ X 線の吸収測定装置 (DXA: Dual Energy X-ray Absorptiometry) や、超音波測定装置などが広く用いられている。しかしながら、DXA には放射線被曝の問題と、骨の面積密度しか求まらないという欠点があり、超音波装置には、計測される音速や減衰係数と骨密度の関係が必ずしも明らかではないという欠点がある。よって、体積骨密度を繰り返し安全に計測できる可能性を有する MRI は、骨粗鬆症診断装置として大いに期待される。

MRI による骨粗鬆症評価は、1980 年代より全身用 MRI を用いて行われてきたが、その主な目的は、高い空間分解能で海綿骨の構造を計測することにより、骨密度だけでは評価できない骨の力学的性質を明らかにすることであった<sup>1,2</sup>。また、比較的低い空間分解能の MR 画像から、骨密度を評価する試みも報告されている<sup>3</sup>。しかしながら、全身用 MRI は、設置面積、検査コスト、操作の容易さなどの点で骨粗鬆症診断装置としては実用的ではなく、専用の診断装置が望まれる。本研究では、以上の背景の下に、踵骨 (calcaneus) を撮像対象とした骨粗鬆症診断用 MRI を開発したので、システム開発の概要と測定結果を報告する。

---

キーワード: MRI, 骨粗鬆症, 骨密度, 踵骨(しょうこつ)

やまざきゆかこ, はいしともゆき, まつだよしまさ, はしもとせいたろう, うつざわしん, こせかつみ, よしおかひろし, なかにしあきお, おかだしげます, えんどうまさはる, あおきまさあき, つざきつよし

## 2. システムの概要

Fig.1 にシステムの全体像と RF プロープの構造を示す。図に示すように、水平方向に均一な静磁場 (0.209T) を発生する永久磁石のギャップ (16cm) 間に、上方から踵を挿入できるように、長円形の口径 (長径 16 cm, 短径 8 cm) を有する RF プロープを設置した。また、RF プロープの中には、感度補正を行うために、円筒容器に硫酸銅水溶液を満たしたファントムを固定した。そして、外来ノイズを遮断するために、被験者と磁石をシールドルーム (幅 1m, 奥行き 1.5m, 高さ 1.8m) に収容した。MRI コンソールは、ポータブル型 (幅 55cm, 奥行き 60cm, 高さ 77cm) のシステムを、図のようにシールドルーム外に設置した。

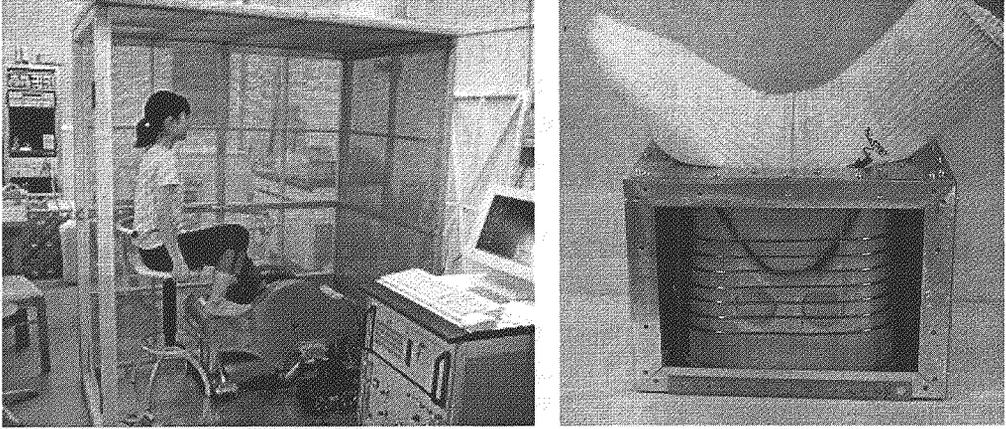


Fig.1 Overview of the compact MRI for diagnosis of osteoporosis (left). RF probe for heel measurements (right).

## 3. 骨密度定量化の方法

MRI による核スピン密度の定量化を行うためには、さまざまな問題をクリアしなければならない。本研究においては、コンパクトなハードウェアを用い、生体という個体差が大きく複雑な空間構造を有する測定対象を計測するため、これらに特に注意した。

さて、スピン・エコー法で、二次元画像を取得する場合 (スライス厚方向に均一な分布を仮定)、その画素強度  $I(x, y)$  は、

$$I(x, y) = kf(x, y)\rho(x, y)\{1 - p(x, y)\exp(-T_R^*/T_1(x, y))\}\exp(-T_E/T_2(x, y))$$

と表すことができる (J カップリングの項は別に議論する)。  $k$  は、受信系のゲインやプロープのチューニングの変化など、全体に均一な画素強度変化を表す量、  $f(x, y)$  は、静磁場の不均一性によるスライス厚の不均一性、勾配磁場の非線形性による画素濃度の不均一性、高周波磁場の不均一性によるフリップ角の不均一性と、それと同様のメカニズムによる検出感度の不均一性など、さまざまな要因による空間的不均一性を表す関数である。  $p(x, y)$  は、理想的な 90 度 - 180 度励起に対しては 1 となる定数であるが、スライス面内のフリップ角の分布、高周波磁場の不均一性などによって決定される係数である。  $T_R^*$  はパルスシーケンスの繰り返し時間にはほぼ等しい時間 (エコー時間による補正が必要)、  $T_E$  はエコー時間、  $T_1(x, y)$  と  $T_2(x, y)$  は  $T_1$  と  $T_2$  の空間分布である。

$k, f(x, y), p(x, y), T_1(x, y), T_2(x, y)$  を、複数のパルスシーケンスを用いてすべて計測

することにより、プロトン密度  $\rho(x,y)$  を求める手法も考えられるが、限られた時間で精度の良い検査を行うため、以下の方針を用いた。

- (1)  $T_1$ に関する項が無視できるようにするため、 $T_R$ の長いシーケンスを用いる。
- (2)  $k$ ,  $f(x,y)$ を計測するため、標準水ファントムなどを用いた同時撮像を行う。
- (3)  $T_2$ に関する項の補正を容易にするために、シングルエコーで2回撮像する。

以上の方針を踏まえた具体的な撮像と画像処理の手順は、以下の通りである。

- (1) 踵の代わりに、標準水ファントムと同じ濃度の硫酸銅水溶液を満たした水ファントムを置き、 $T_R=1000\text{ms}$ ,  $T_E=12\text{ms}$ ,  $36\text{ms}$ のシーケンスで撮像し、 $kf(x,y)$ を得る。
- (2) 踵を含む矢状断層像を $T_R=1200\text{ms}$ ,  $T_E=16\text{ms}$ ,  $72\text{ms}$ のシーケンスで撮像することにより、 $T_2$ の補正を行い、踵骨に関して、 $kf(x,y)\rho(x,y)$ に対応する量を求める。
- (3) ファントム撮像の場合と、踵の撮像の場合には、RFプローブのチューニングが変化し、受信系のゲインも変化するため、 $k$ の値が異なるので、標準水ファントムの部分でこれを補正することにより、(1), (2)から $\rho(x,y)$ を求める。

#### 4. 定量化のための撮像実験と結果

まず、解剖学的構造を確認するために、3Dの勾配エコーシーケンス ( $TR=100\text{ms}$ ,  $TE=10\text{ms}$ )を用いて、踵の部位の撮像を行った。撮像視野は  $12.8\text{cm}$  の立方、画素数は  $128 \times 128 \times 128$  画素、画素サイズは  $(1\text{mm})^3$  である。Fig.2 に示すように、踵骨、アキレス腱などが明瞭に観察された。

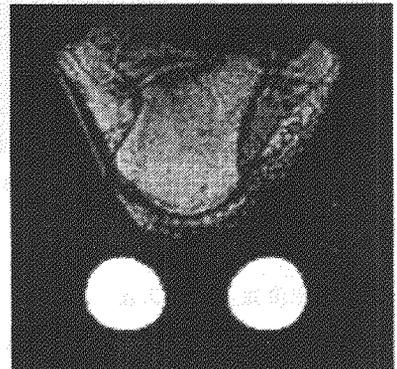


Fig.2. One slice image from 3D data set.  $1\text{mm}$  cube voxel.

次に、踵骨の海綿骨に含まれる脂肪のプロトン密度を計測するために、まず、水ファントムを踵と同じ撮像領域に設置し、 $T_R=1000\text{ms}$ ,  $T_E=16\text{ms}$ ,  $48\text{ms}$ のシーケンスで撮像した。その結果を Fig.3(a)に示す。スライス厚は  $15\text{mm}$ 、画素数は  $128 \times 128$  画素、FOVは  $12.8\text{cm} \times 12.8\text{cm}$ 、信号積算回数は1回である。このように、

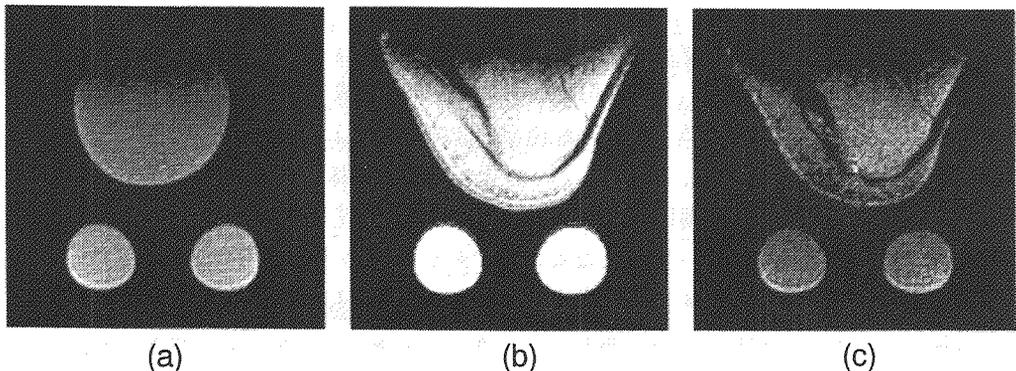


Fig.3 2D images acquired spin-echo sequences ((a)  $TR/TE=1000/16$ , (b)  $TR/TE=1200/12$ ,  $TR/TE=1200/72$ ). Slice thickness;  $15\text{mm}$ , FOV;  $12.8\text{cm} \times 12.8\text{cm}$ .

RF コイルの感度領域の変化により、中心部分より上方に向かって画素強度が減衰する。次に、被験者の踵を挿入し、 $T_R=1200\text{ms}$ 、 $T_E=16\text{ms}$ 、 $72\text{ms}$  のシーケンスで撮像した。その結果を、Fig.3(b), (c)に示す。 $T_E=16\text{ms}$ 、 $72\text{ms}$  で撮像したのは、 $T_2$ 補正における J カップリングの影響を小さくするためである。

上に示した撮像法で、21才から58才までの女性ボランティア合計26人の撮像を行い、3節に示した方法で、水に含まれるプロトンの密度を1としたときの、踵骨の部位のプロトン密度  $\rho(x,y)$  の平均値 ( $10 \times 10 = 100$  画素) を算出した (注)。 $1 - \rho(x,y)$  は、海綿骨の体積密度 (trabecular bone volume fraction) であり、いわば、骨密度に対応する量である。これを体格指数 (体重(kg)/(身長(m))<sup>2</sup>) に対してプロットしたグラフを Fig.4 に示す。このように、体格指数と骨密度には正の相関が見られる。

(注)水と脂肪のプロトン密度は、それぞれ  $0.110 \text{ mol/cm}^3$ 、 $0.108 \text{ mol/cm}^3$  とほとんど同じである。

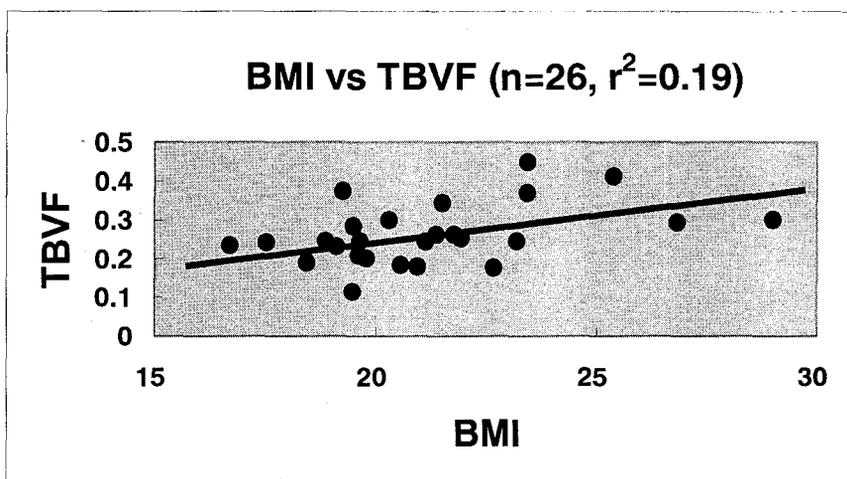


Fig.4 Trabecular bone volume fraction in calcaneus plotted against body mass index.

## 5. むすび

骨粗鬆症診断専用のコンパクトなMRIを開発し、踵骨の骨髄のプロトン密度の定量化を試みた。定量化の精度を向上させるためには、まだ検討すべき項目も多く、それらを検討した上で、さらに統計性を向上させるために多数の被験者の撮像が必要である。

## References

1. Wehrli FW, Hwang SN, Ma J, Song HK, Ford JC, Haddad JG. Cancellous bone volume and structure in the forearm: noninvasive assessment with MR microimaging and image processing. *Radiology* 206, 347-357, 1998.
2. Wehrli FW, Hopkins JA, Hwang SN, Song HK, Snyder PJ, Haddad JG. Cross-sectional study of osteopenia by quantitative magnetic resonance and bone densitometry. *Radiology* 217, 527-538, 2000.
3. Fernandez-Seara MA, Song HK, Wehrli FW. Trabecular bone volume fraction mapping by low-resolution MRI. *Magn. Reson. Med.* 46: 103-113, 2001. ■



第 2 日

11月15日(木)

一般講演要旨

溶液中蛋白質の $^{15}\text{N}$ 化学シフト異方性観測とその応用

(北陸先端大・新素材センター) ○楯 真一、栗田順一、高原秀登

Characterization of  $^{15}\text{N}$  chemical shift shielding tensor from molecular orientation dependent chemical shift changes in dilute bicelle solutionShin-ichi Tate<sup>1</sup>, Jun-ichi Kurita, and Hideto Shimahara

Center for New Materials

Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)

## Abstract

The change in chemical shift ( $\Delta\delta$ ) observed for a given nucleus, when shifting from an isotropic medium to an oriented condition, contains valuable information on the orientation of its chemical shift anisotropy (CSA) tensor relative to the molecular alignment tensor. In this presentation, we would show a novel NMR technique to quantitatively evaluate CSA parameters of the amide  $^{15}\text{N}$  in a protein from the chemical shift changes induced by the molecular alignment in a dilute liquid crystalline phase. To distinctively observe the chemical shift changes by the molecular alignment, we applied the magic angle sample spinning (MAS) to eliminate the anisotropic spin interaction in the presence of the bicelle. We applied the Saupe order matrix analysis with the singular value decomposition to obtain the  $^{15}\text{N}$  CSA tensor values from the orientation dependent  $^{15}\text{N}$  chemical shift changes. From the data on human ubiquitin collected from the sample dissolved in 7.5% (w/v) DMPC/DHPC/CTAB ternary bicelle medium, we could determine the CSA principal values;  $\sigma_{11} = -223.2\text{ppm}$ ,  $\sigma_{22} = -72.2\text{ppm}$ , and  $\sigma_{33} = -56.8\text{ppm}$  ( $\Delta\sigma = -158.7\text{ppm}$ ) with the angle ( $\beta$ ) between the principal coordinate axis  $\sigma_{11}$  and NH bond  $18.8^\circ$ . These observed values were quite consistent with those determined by the solid state NMR experiment (Lee *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (1998) **120**, 8868-8874),  $\sigma_{11} = -223\text{ppm}$ ,  $\sigma_{22} = -79\text{ppm}$  and  $\sigma_{33} = -55\text{ppm}$  ( $\Delta\sigma = -156\text{ppm}$ ) with  $\beta = 19.5^\circ$ .

## Introduction

Chemical shift shielding anisotropy (CSA) is a key parameter explored by solid-state NMR. CSA also plays a key role in  $^{15}\text{N}$  spin relaxation studies, where accurate knowledge of the corresponding tensors is a prerequisite for quantitative interpretation of relaxation rates in terms of backbone dynamics, especially when considering anisotropic internal motion. Relaxation interference between CSA and dipolar terms contains important angular information and also forms the basis of so-called TROSY experiments where the effect is exploited to increase resolution in spectra of slowly tumbling biological macromolecules. Especially, the CSA of the  $^{15}\text{N}$  is known to be dependent on numerous parameters, including backbone geometry and hydrogen bonding. Large variations in the CSA from one site to another were calculated

<sup>1</sup> *Keywords*: 液晶利用、残余双極子効果、化学シフト異方性  
たて しんいち、くりた じゅんいち、しまはら ひでと

from measurements of cross correlation between  $^{15}\text{N}$  CSA and the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dipolar interaction and the rate of the  $^{15}\text{N}$  transverse relaxation. This fact may suggest the CSA possibly provides us much more profound local structural information of protein.

Recently established experiments using weak molecular alignment using dilute liquid crystalline medium has opened the new way to measure the  $^{15}\text{N}$  CSA values in solution. A nuclei harboring anisotropic chemical shielding shows significant chemical shift change when transferred from isotropic to anisotropic phase depending on the alignment of the molecule. Boyd and Redfield analyzed the  $^{15}\text{N}$  CSA tensor from the  $^{15}\text{N}$  chemical shift differences apparent in the transition from the low-temperature isotropic to the high-temperature anisotropic phase of the DMPC/DHPC bicelle containing sample solution [1]. In their approach, they had to carefully calibrate the temperature dependent chemical shift changes to extract the "pure" orientation dependent  $^{15}\text{N}$  chemical shift changes. The dilute DMPC/DHPC bicelle solution changes its state at approximately  $30^\circ\text{C}$  between isotropic and liquid crystalline phases. Thus, in their approach, the protein is required to be in the same conformation and dynamics state to extract the accurate CSA value. This might not be always held in all kinds of protein. In this work, we report an alternative way to get the  $^{15}\text{N}$  CSA much more accurately. In our approach, we applied the magic angle sample spinning (MAS) to eliminate the anisotropic spin interaction even in the liquid crystalline condition of the bicelle solution, by controlling the bicelle normal orientation with the high-speed sample spinning. This approach makes it possible to measure the "pure" orientation dependent  $^{15}\text{N}$  chemical shift changes from the data measure under the MAS and without MAS conditions, because any other experimental conditions are kept in exactly the same, including temperature, co-existing solutes in the sample solution, and so on. From the collected  $^{15}\text{N}$  chemical shift changes, we analyzed the CSA tensor values based on the Saupe order matrix analysis using the singular value decomposition (SVD). In the presentation, we will show you the details in the analysis and discuss the significance of this approach and further application of the CSA analysis in solution.

### Mesurement of orientation dependent $^{15}\text{N}$ chemical shift changes

It is well known that bicellar liquid-crystalline phases can be oriented with the director (the normal to the bicellar plane) at an arbitrary angle to the applied magnetic field by sample rotation around one axis. When applying spinning frequencies  $\mu_r$  larger than a bicelle reorientation rate around an axis inclined by an angle  $\Theta$ , the bicelle director  $\vec{n}$  orients such that the magnetic energy per unit volume, averaged over a rotor cycle,  $E_{mag}(\Theta, \delta)$ , is minimized [2]:

$$E_{mag}(\Theta, \delta) = -\frac{\Delta\chi}{3\mu_0} B_0^2 \left( \frac{3 \cos^2 \delta - 1}{2} \right) \left( \frac{3 \cos^2 \Theta - 1}{2} \right) \quad (1)$$

where  $\delta$  is the angle between  $\vec{\mu}_r$  and  $\vec{n}$ , and  $\mu_0$ . Thus the phospho-lipid bicelle with  $\Delta\chi < 0$ , in the range  $0^\circ \leq \theta < 54.7^\circ$  the energy is minimized for  $\delta = 90^\circ$ , meaning the bicelle normal is perpendicular to the rotation axis. Because of this controllable character of bicelle normal under the high-speed sample spinning, we can completely eliminate the anisotropic spin interaction under the magic angle sample spinning. In the present work, we used 7.5% (w/v) DMPC/DHPC/CTAB (30:10:1) ternary phospho-lipid bicelle medium. The residual dipolar couplings of  $^{15}\text{N}$  labeled ubiquitin dissolved in this bicelle solution was completely eliminated by applying the 2.6kHz magic angle sample spinning. And,  $^{15}\text{N}$  chemical shift changes were clearly observed by switching the sample from the anisotropic state to under the MAS. Figure 1 shows the comparison of the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra measured with and without MAS.

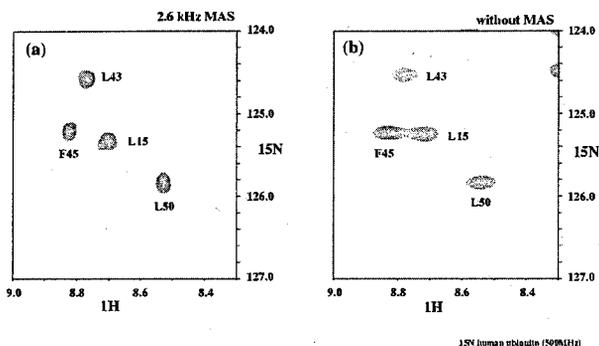


Figure 1: Orientation dependent  $^{15}\text{N}$  chemical shift changes on ubiquitin observed by the MAS application

### $^{15}\text{N}$ CSA analysis from the observed $D_{nh}$ and $\Delta\delta$

To analyze  $^{15}\text{N}$  CSA, the knowledge of the molecular alignment tensor induced by bicelle is required. And this obtained orientation has to be incorporated into the CSA analysis. The use of Saupe order matrix is appropriate for this purpose. In general, two anisotropic spin interactions, residual dipolar coupling and orientation dependent chemical shift changes (here we refer to it as residual CSA, for convenience), can be expressed with Saupe order matrix elements in an arbitrary molecular frame:

$$D_{nh} = D_{nh}^{max} \sum_{ij=x,y,z} S_{ij} \cos \phi_i^{nh} \cos \phi_j^{nh} \quad (2)$$

$$\delta_n = \frac{2}{3} \sum_{ij=x,y,z} S_{ij} \delta_{ij} \quad (3)$$

Here,  $\phi_i^{nh}$  is the angle of the internuclear vector (each N-H bond vector in the present case) relative to the  $i$ th molecular axis and the  $\delta_{ij}$  are the elements of the chemical shift tensor expressed in an arbitrary molecular frame of nucleus  $n$ . Thus, once we could know Saupe order matrix from the residual dipolar couplings, those elements are directly transferred to the  $^{15}\text{N}$  CSA analysis. The Saupe order elements can be obtained through the general relationship of the Saupe order matrix to observed residual dipolar couplings described in an arbitrary molecular frame:

$$A \begin{pmatrix} S_{yy} \\ S_{zz} \\ S_{xy} \\ S_{xz} \\ S_{yz} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} D_{nh}^1 \\ D_{nh}^2 \\ \vdots \\ \vdots \\ D_{nh}^n \end{pmatrix} \quad (4)$$

Here  $D_{nh}^n$  are the reduced residual dipolar couplings obtained after dividing each observed residual dipolar couplings by  $D_{max}^{nh}$ . And the matrix  $A$  is described as follow:

$$A = \begin{pmatrix} \cos^2 \phi_y^1 - \cos^2 \phi_x^1 & \cos^2 \phi_z^1 - \cos^2 \phi_x^1 & 2 \cos \phi_x^1 \cos \phi_y^1 & 2 \cos \phi_x^1 \cos \phi_z^1 & 2 \cos \phi_y^1 \cos \phi_z^1 \\ \cos^2 \phi_y^2 - \cos^2 \phi_x^2 & \cos^2 \phi_z^2 - \cos^2 \phi_x^2 & 2 \cos \phi_x^2 \cos \phi_y^2 & 2 \cos \phi_x^2 \cos \phi_z^2 & 2 \cos \phi_y^2 \cos \phi_z^2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \cos^2 \phi_y^n - \cos^2 \phi_x^n & \cos^2 \phi_z^n - \cos^2 \phi_x^n & 2 \cos \phi_x^n \cos \phi_y^n & 2 \cos \phi_x^n \cos \phi_z^n & 2 \cos \phi_y^n \cos \phi_z^n \end{pmatrix} \quad (5)$$

By solving the equation (4) with the use of  $A^{-1}$  obtained from the singular value decomposition of the matrix  $A$ , we can get all independent Saupe matrix elements of  $S_{ij}$ , where  $S_{xx} + S_{yy} + S_{zz} = 0$  and  $S_{ij} = S_{ji}$ .

Based on 50 residual dipolar couplings measured from the spectra collected with and without use of MAS on the same  $^{15}\text{N}$  ubiquitin sample dissolved in the 7.5% bicelle solution, we determined the all independent Saupe elements. After transforming each CSA elements in principal coordinate system to molecular frame system, we can calculate the orientation dependent  $^{15}\text{N}$  chemical shift change, or residual CSA effect, according to equation (3). By varying the four CSA parameters including three principal shielding values,  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ , and  $\sigma_{33}$ , and the angle between unique axis and N-H bond vector ( $\beta$ ), the equation (3) was fit to the experimental  $^{15}\text{N}$  chemical shift changes. The obtained parameters through the fitting are listed in Table 1. And in Figure 2, calculated orientation dependent  $^{15}\text{N}$  chemical shift changes with the optimized CSA values are compared with experimental data residue by residue. All calculated values are within the range of experimental error, 0.002ppm [3].

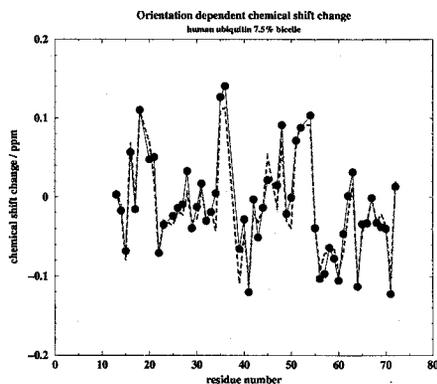


Figure 2: Comparison of the  $^{15}\text{N}$  chemical shift changes: closed circles and solid lines are experimental data and dotted lines indicate calculated values

Table 1: Average backbone  $^{15}\text{N}$  CSA parameters in ubiquitin

method	$\sigma_{11}$ (ppm)	$\sigma_{22}$ (ppm)	$\sigma_{33}$ (ppm)	$\Delta\sigma$ (ppm)	$\beta$ (deg.)
solution NMR <sup>1</sup>	-223.2	-72.2	-56.8	-158.7	18.8
solid-state NMR <sup>2</sup>	-223	-79	-55	-156	19.5

<sup>1</sup> this work.

<sup>2</sup> Lee *et al.* J.Am.Chem.Soc. (1998) **120**, 8868-8874.

## References

- (1) Boyd, J. and Redfield, C. J.Am.Chem.Soc. (1999) **121**, 7441-7442.
- (2) Zandomenghi, G., Tomaseli, M., van Beek, J.D., and Meier B.H. J.Am.Chem.Soc. (2001) **123**, 910-913.
- (3) Lee, D.K., Wittebort, R.J., and Ramamoorthy, A. J.Am.Chem.Soc. (1998) **120**, 8868-8874.

## 2 L2

### マイクロ波温度ジャンプNMR法の開発

(神戸大学自然科学研究科) ○川上 勝、赤坂 一之

## Development of Microwave Temperature-jump NMR Spectroscopy

Graduate School of Science and Technology, Kobe University

Masaru Kawakami and Kazuyuki Akasaka

Using dielectric resonator, a microwave temperature-jump NMR system suitable for aqueous solutions has been developed. A mechanical mixing instrument is also introduced, which significantly reduces the temperature gradient of the sample solution well within 50 ms after the jump. Using these devices, temperature jump by 20°C can be performed in less than 20 ms. Furthermore, various T-jump NMR pulse programs are developed.

NMR分光法はこれまで、高磁場化、他核プローブやFG技術等により高度に発展を続けてきた。しかしながら、これらは全て、系が「平衡状態にある」場合であり、反応を追跡すると言った、非平衡な状態にある系に対しては十分な対応ができていない。

温度は、圧力と共に、NMRと非常に相性のいい摂動因子となる。それは、反応が温度や圧力に対して可逆的な物であれば、何度でも繰り返し反応を起こし、NMRの弱点である感度の低さを積算により稼ぐ事が可能であり、また、多次元NMRへの応用も可能になる。そこで我々は、マイクロ波照射による水溶液の加熱を利用した「温度ジャンプNMR法」の開発を行ってきた。

キーワード： 温度ジャンプ、マイクロ波、タンパク質フォールディング、状態相関2次元法

かわかみ まさる、あかさか かずゆき

これまでに、円筒状の誘電体共振器をアンテナとして用いる方法が非常に効率よく試料にマイクロ波を照射することができ、またラジオ波コイルとの干渉も少ないことが分かった。この誘電体共振器の導入により、非常に短時間（数十ミリ秒）のマイクロ波照射によって数十度の水溶液試料の温度上昇が可能になった。

また、試料を高速に攪拌する装置を開発し、これによって温度ジャンプ後の、試料内の温度不均一を短時間に解消する事にも成功した。

さらに、この早い温度ジャンプを、様々なNMRシーケンスと組み込むことにより、1次元、2次元NMRによって、種々の時間スケールにおける反応を追跡することが可能になった。

現在、本手法はほぼ完成の域にある。本発表では、この「温度ジャンプNMR法」が広く一般に普及する事を願い、装置の詳細（マイクロ波発生装置、温度ジャンプ用NMRプローブ内部や試料高速攪拌装置）と、実際の実験の様子を、図や動画等により紹介する。

また、本手法のタンパク質フォールディング研究への応用例を報告し、本手法の能力や現時点での課題点、そして他の研究分野への今後の発展性について討論する予定である。

## 2L3

## 水素結合を介したJカップリング定数を用いたN-H...N水素結合の解析

(都立大理・CREST<sup>1</sup>、奈良先端大バイオ<sup>2</sup>)○児嶋長次郎<sup>1,2</sup>、石川麗<sup>1</sup>、小野晶<sup>1</sup>、甲斐荘正恒<sup>1</sup>Nature of the N-H...N hydrogen bonds in Watson-Crick-type A-T base pairs as seen by the trans-hydrogen bond J-coupling constants,  ${}^2J_{NN}$ , in duplex DNAChojiro Kojima,<sup>1,2</sup> Rei Ishikawa,<sup>1</sup> Akira Ono,<sup>1</sup> and Masatsune Kainosho<sup>1</sup><sup>1</sup>CREST and Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, and <sup>2</sup>Graduate School of Biological Science, Nara Institute for Science and Technology

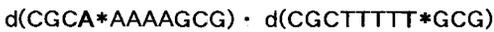
**Abstract** The effects of substitution on the hydrogen bonding interactions of the Watson-Crick base pair were investigated by NMR spectroscopy for five DNA duplexes with a Dickerson dodecamer-like sequence, d(CGCGA \*ATX \*CGCG)<sub>2</sub>, where A \* stands for [*ul*-<sup>15</sup>N]-adenosine and X \* for three [3-<sup>15</sup>N]-5-substituted-2'-deoxyuridine, including 5-bromo-, 5-fluoro-, 5-cyano-2'-deoxyuridine, [3-<sup>15</sup>N]-thymidine, and [3-<sup>15</sup>N]-2'-deoxyuridine. We compared various NMR parameters that were sensitive to the nature of the hydrogen bonds in the A \*-X \* base pairs in the five duplexes, such as <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-chemical shifts, <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H through-bond coupling constants ( ${}^1J_{NH}$ ) of X \*, through-hydrogen bond <sup>15</sup>N-<sup>15</sup>N coupling constants ( ${}^2J_{NN}$ ) between the N3 of X \* and the N1 of A \*, and the pKa values of the imino groups of 5-substituted-2'-deoxyuridines. These NMR parameters were observed to change in a highly correlated manner with the substituent at the C5 position of the uracil ring.

水素結合を経由したJ-カップリングは、1998年になりRNA次いでDNA中のワトソン-クリック塩基対の水素結合を介した<sup>15</sup>N-<sup>15</sup>N間にJ-カップリング( ${}^2J_{NN}$ )が見出された。その後様々な系に関して数多くの同様な水素結合J-カップリングが報告され、現在では蛋白質や核酸における水素結合の直接的同定手法として広く用いられている。しかしながら、水素結合を観測する初めての有効な実験的手段として大きな期待が寄せられてきたにも関わらず、最も興味のある ${}^2J_{NN}$ の値と水素結合の性質との定量的関係は未だ明白ではない。例えば、核酸塩基対における水素結合N-H...Nを形成している各原子の相対位置によって ${}^2J_{NN}$ 値は変動すると考えられるが、溶液内では0.1Å精度の距離情報を入手できないために、定量的関係を実験的に求めることは困難である。我々は有機化学領域では伝統的に利用されてきた置換基導入による振動-置換基効果<sup>1</sup>を利用して ${}^2J_{NN}$ の値と水素結合の性質との関連を明らかにしようと試みた。このために、Watson-Crick型DNA二重鎖においてはA-T塩基対のチミン塩基の5位メチル基がmajor grooveに突き出していることを利用した。即ち、チミン塩基5位に様々な置換基を導入し(T→X)、立体構造への影響を最小にとどめつつ、A-X塩基対の電子授受関係に振動を与えるモデル系の開発に成功した(石川ら、本討論会P91)。本報告では、このモデル系を用いて得られた様々な結果から、核酸の水素結合の性質に関して考察する。

水素結合、水素結合を介したJカップリング定数、DNA、<sup>15</sup>N選択標識、<sup>15</sup>N直接観測

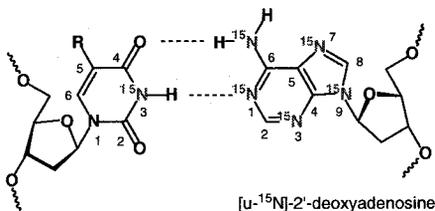
こじまちょうじろう、いしかわれい、おのあきら、かいのしょうまさつね

$^2J_{\text{NN}}$ の直接観測：T/dCの3位のみ $^{15}\text{N}$ 標識する $^{15}\text{N}$ 選択標識法と、1D- $^{15}\text{N}$  NMR直接観測法を組み合わせた $^2J_{\text{NN}}$ を高精度に決定するシステムを構築した。下に示したDNA配列に適用し、様々な温度において $^2J_{\text{NN}}$ を決定した。その結果、従来法(定量的HNN-COSY法)には10%程度の系統誤差がある事、温度が上昇すると $^2J_{\text{NN}}$ が小さくなる事、配列依存性がない事などが明らかになった。また我々が開発した手法は、測定精度を保ったまま、イミノプロトンの線幅が広い系や $\text{D}_2\text{O}$ 溶媒に適用可能である。その結果、20mMアンモニアによるイミノプロトンと水との交換速度上昇が $^2J_{\text{NN}}$ に影響を与えない事、 $\text{D}_2\text{O}$ 中でのD-decoupled $^{15}\text{N}$ シグナルは $\text{H}_2\text{O}$ 中のシグナルより鋭く、また $\text{D}_2\text{O}$ 中での $^2J_{\text{NN}}$ は $\text{H}_2\text{O}$ 中よりわずかに小さい事が明らかになった。[Kojima et al., *J. Biomol. NMR*, 18, 269-277 (2000)]

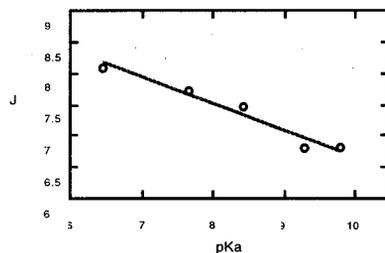


G\*/A\*は $^{15}\text{N}$ 均一標識、T\*/C\*は $^{15}\text{N}$ 選択標識した残基を示す。

イミノプロトンの酸性度と $^2J_{\text{NN}}$ ：dUの5位に立体的に嵩張らないと思われる官能基を導入した5種のdU誘導体[5-cyano-dU (pKa, 6.47)、5-fluoro-dU (7.66)、5-bromo-dU (8.42)、dU (9.3)、T (9.8)]を合成した。これらの置換基は電子吸引性が異なるために、同じ環上にあるイミノプロトン(N3H)のpKaが括弧内に示したように大きく異なる。選択的に3位を $^{15}\text{N}$ 標識した5種類の誘導体をDNA dodecamer duplex,  $\text{d}(\text{CGCGA}^*\text{ATX}^*\text{CGCG})_2$ に導入し、それぞれに関して $\delta(^1\text{H})$ 、 $^1J_{\text{NH}}$ 、 $^2J_{\text{NN}}$ を決定した。ここでX\*は $^{15}\text{N}$ 選択標識したdU誘導体、A\*は均一に $^{15}\text{N}$ -標識したdA残基を示す。 $\delta(^1\text{H})$ 、 $^1J_{\text{NH}}$ 、 $^2J_{\text{NN}}$ はpKa値と良い線形相関を示した。イミノ基の酸性度に依存して $\delta(^1\text{H})$ と $^1J_{\text{NH}}$ が変化する事は予測されたが、1次の相関である事は予想外であった。DNA-Triplexの系でも $\delta(^1\text{H})$ 、 $^1J_{\text{NH}}$ 、 $^2J_{\text{NN}}$ が相互に線形相関の関係にある事が知られていたが、我々の系とは傾き、切片ともに異なっていた。また川原らによる理論計算から得られた水素結合エネルギーが、 $\delta(^1\text{H})$ 、 $^1J_{\text{NH}}$ 、 $^2J_{\text{NN}}$ 、pKaと良い相関を示した事から、 $^2J_{\text{NN}}$ から水素結合強度を決定できる可能性が出てきた。[石川ら、本要旨集 (poster P91)。Ishikawa et al., *Magn. Reson. Chem.*, in press. Kawahara et al., *J. Phys. Chem. A*, 103, 8516-8523(1999)]



- T, R = Me, [3- $^{15}\text{N}$ ]-thymidine  
 U, R = H, [3- $^{15}\text{N}$ ]-2'-deoxyuridine  
 brU, R = Br, [3- $^{15}\text{N}$ ]-5-bromo-2'-deoxyuridine  
 fU, R = F, [3- $^{15}\text{N}$ ]-5-fluoro-2'-deoxyuridine  
 cnU, R = CN, [3- $^{15}\text{N}$ ]-5-cyano-2'-deoxyuridine



## 2 L4

### 構造ゲノム科学プロジェクトにおける NMR (理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター)

○横山茂之, 廣田洋, 木川隆則, 白水美香子

#### **NMR in Structural Genomics Project**

Shigeyuki Yokoyama, Hiroshi Hirota, Takanori Kigawa, and Mikako Shirouzu  
*RIKEN Genomic Sciences Center, Yokohama, Japan.*

Structural genomics is a new field focused on the large-scale analysis of protein structures and functions based on genome sequences. International community of structural genomics projects is now focusing on revealing the 'representative' structures of sequence families, the total number of which is now estimated to be ~ 20,000. RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI) is working on the structure determination of proteins from mouse, human, *Arabidopsis thaliana*, and *Thermus thermophilus* HB8. Prioritization of target proteins is based on potential biological/medical importance and/or expected structural novelty. By high-throughput cell-free expression, selected targets will be further screened with respect to productivity and solubility. In our project, NMR will play an important role for both structure determination and functional analysis.

#### 1. 構造ゲノム科学プロジェクト

ヒトゲノムのドラフト配列が報告されるなど、各種生物のゲノム配列の解析が急速に進むにつれて、遺伝子の産物であり生体機能を担う主役であるタンパク質について、機能と構造の解析が重要視されるようになっており、タンパク質の立体構造と分子機能に基づいてゲノム機能を網羅的・体系的に解明する構造ゲノム科学プロジェクトが、国際的な協調の下に、世界各国において推進されようとしている。日本においては、理化学研究所播磨研究所とゲノム科学総合研究センターが、緊密な連携関係を保ちながら、構造ゲノム科学/構造プロテオミクス研究 (RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI)) を進めており、また、膜タンパク質を解析対象にしたプロジェクトが、生物情報解析研究センターを拠点に進められている。

構造ゲノム科学プロジェクト, タンパク質基本構造, タンパク質分子機能, 無細胞タンパク質合成, ハイスルーブット

よこやましげゆき, ひろたひろし, きがわたかのり, しろうずみかこ

構造ゲノム科学の国際コミュニティーでは、最初のステップとして、シーケンス・ファミリー（約 30-35%のアミノ酸残基保存性で分類されたファミリー）のすべてについて、代表的な立体構造（基本構造）を決定することを一つの目標としており、新規な基本構造は1万個程度と見積もられている。基本構造が決定されれば、同じファミリーに属する他のタンパク質の立体構造を、ホモロジーに基づいてモデリングすることが可能となるので、タンパク質立体構造のユニバースを明らかにすることができるようになると考えられる。

このような立体構造の決定と並行して、分子機能の解析もバランス良く進めていくべき課題である。多くのタンパク質は、何らかのリガンドとの相互作用によりその機能を発現していることから、相互作用の網羅的・体系的な解析は、もう一つの重要な課題である。

このようなプロジェクトが成果をあげるためには、研究手法の開発が極めて重要である。そのため、どのプロジェクトも、バイオインフォマティクス、タンパク質試料の調製、立体構造決定、などのハイスループット化を目指して、独自技術の開発に力を入れるとともに、国際的な合意のもとに、プロジェクト間での情報・技術の交換・交流を盛んにおこない、全体の技術レベルの向上に努めている。構造ゲノム科学プロジェクトの進展は、様々な技術の飛躍的な進歩という形で、構造生物学に寄与するものと思われる。

## II. RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI)

我々は、マウス、ヒト、シロイヌナズナ、高度好熱菌を主なターゲット生物として、タンパク質基本構造の解明を目指した構造ゲノム科学研究を推進している。立体構造解析の手法としては、NMRとX線結晶解析を併用していく考えである。NMRに関しては、立体構造決定可能な分子量に制約があるが、試料の結晶化を必要とせず、溶液状態で解析がおこなえるという利点から、ハイスループットな立体構造決定に向けた手法であると考えられる。また、分子機能の解析において、例えば、タンパク質・リガンド間相互作用の解析など、NMRが役立つ場面は多い。特に我々は、タンパク質の基本構造という単位に着目しており、その多くの分子量は数万以下であることから、我々のプロジェクトにおいて、NMRの果たす役割は極めて大きいと考えている。

我々のプロジェクトにおける基本構造解析の流れは以下のとおりである。

まず、第一段階として、バイオインフォマティクスの手法を用いて、ターゲットとなるタンパク質ないしは基本構造の優先順位付けをおこなう。ここでは、配列

の相同性に基づいてタンパク質をファミリーに分類し、その上で、生物学的、医学的に重要度が高く、立体構造の新規性が期待されるファミリーの優先順位をあげる。解析対象となるタンパク質は数万個のオーダーになるため、このような解析により、後の実験的な解析対象となるタンパク質数を減らすことが極めて重要である。我々が選定した構造解析のターゲットは、RSGI のウェブサイト (<http://www.rsgi.riken.go.jp/>) で公開しており、進捗状況を含めて、随時更新していく予定である。

第二段階としては、各タンパク質の発現量や可溶性を解析し、発現量・可溶性の高かったものの優先順位を上げる。我々は、発現系として無細胞タンパク質合成系を主として利用している。この系では、タンパク質合成の鑄型として、PCR で増幅した DNA をそのまま利用することができるため、クローニング操作を必要とせず、すべての操作を 96 ウェルプレートフォーマットでおこなうことができるため、多数の遺伝子を同時に発現することが可能であり、その上、プロセスの機械化・自動化が容易である。本年 6 月より本格的に開始したマウス cDNA の発現に関しては、無細胞系のこの利点を生かすことにより、9 月中旬の段階で、およそ 8,000 コンストラクトに関する解析が終了している。

第三段階では、第二段階の解析の結果、発現量・可溶性の高かったものを優先して、立体構造解析のための試料をミリグラムスケールで調製する。NMR で解析を進める試料に関しては、迅速に多数の試料を調製できるという無細胞系の特徴を生かして  $^{15}\text{N}$  標識をおこない、アフィニティータグにより精製された試料の HSQC スペクトルを測定し、きちんとした立体構造をとっているかどうかの判定をおこなう。その上で、構造決定に必要な安定同位体標識試料を大容量の無細胞系を用いて調製する。X 線結晶解析を進める試料に関しては、結晶化条件の初期スクリーニングをおこない、結晶が得られた試料に関しては、更に詳細な条件検討を行うことにより立体構造決定に適した結晶を得る。セレノメチオニンの細胞毒性の影響を受けにくいという無細胞系の特徴を生かして、セレノメチオニン導入タンパク質を調製する。

第四段階としては、第三段階で得られた試料を用いて、立体構造決定をおこなう。NMR は GSC 大型 NMR 施設を、X 線結晶解析は SPring-8 を利用していく。初期段階では、多核種多次元 NMR 法ないしは MAD 法といった常法により立体構造決定を進めていくが、同時に、測定・構造決定プロセスの高速化・自動化などの研究開発も進めていき、構造決定の速度を加速していく予定である。

### III. NMR による立体構造解析の実例

RSGI として立体構造解析を進めているタンパク質のうち、NMR による構造決定が終了し、分子機能が推定された例を紹介する。

高度好熱菌タンパク質 258 (Tth258)は、機能既知タンパク質と一次配列上の相同性を持たない機能未知タンパク質である。Tth258 ホモログが真正細菌に広く見出されていることから、これらのタンパク質は生物学的に重要な役割を果たしていると考えられた。

Tth258 をトリプシンで限定分解したところ、N 末端 99 残基(Tth258A)が安定な構造を形成していることが明らかになった。そこで、立体構造解析は、Tth258A に関して進めることにした。常法により Tth258A の溶液構造を決定したところ、RNaseH フォールドをとることが明らかになった。2種類の配向溶媒 (Pf1 フェージ系、および DODPC/DOHPC/CTAB 系) で測定した residual dipolar coupling 値で主鎖の立体構造を精密化したのち、その立体構造を他の RNaseH フォールドをとるタンパク質と比較した。その結果、Tth258A は特に Holliday junction resolvase RuvC との類似性が高かった (コア部分の RMSD: 1.8 )。しかも、RuvC 上で保存性が高い酸性残基が Tth258A 上の類似した位置にも保存されていた。これらより、Tth258 は、特に RuvC と類似した機能を持つ新規ヌクレアーゼであると推定された。

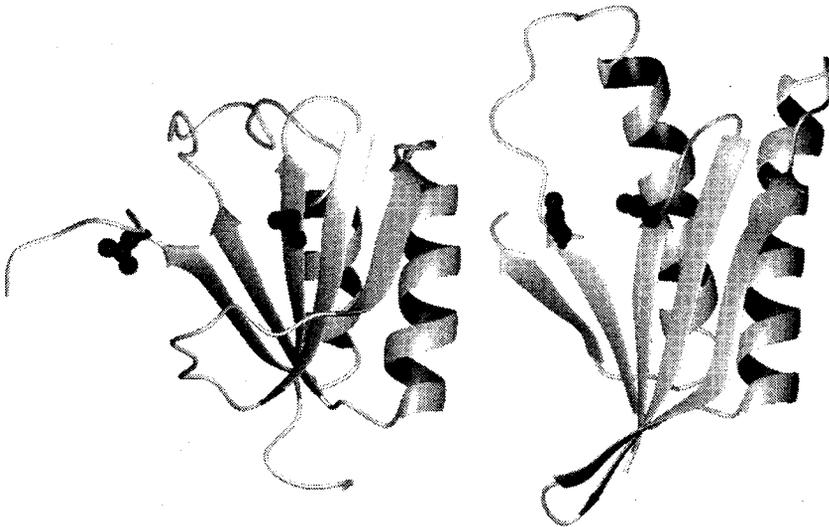


図. Ribbon representation of the solution structure of Tth258A (left) and the crystal structure of corresponding region of RuvC(1-103) (right). Side chains of highly conserved acidic residues are also represented.



**第 2 日**

**11月15日(木)**

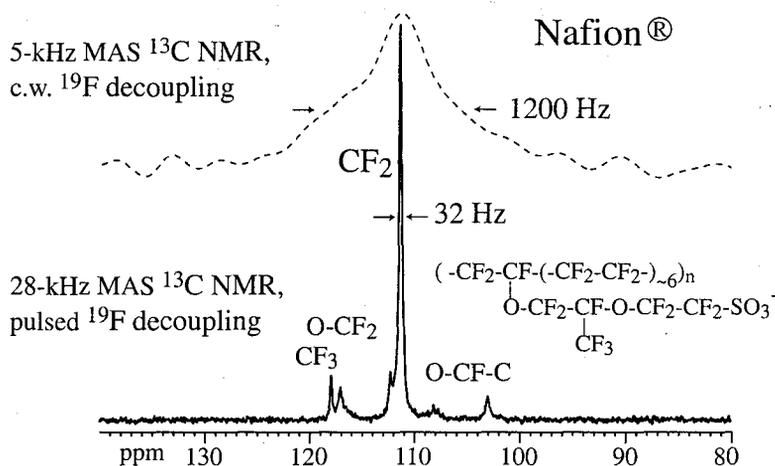
**特別講演要旨**

## Advanced Solid-State NMR Techniques for Characterizing the Structure of Complex Organic Materials

Klaus Schmidt-Rohr

Department of Chemistry, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA

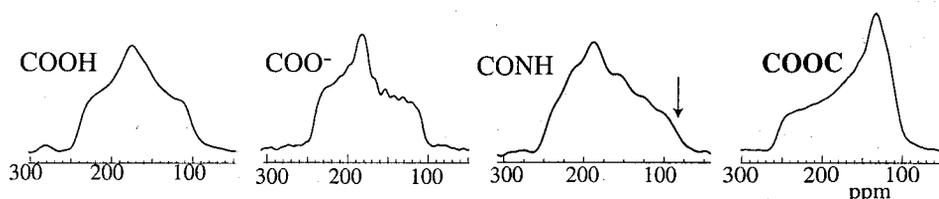
High-resolution  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of solid perfluorinated polymers, such as poly(tetrafluoroethylene), PTFE (Teflon®), or the ionomer Nafion®, is desirable for investigations of the local structure of these important materials. However, their standard  $^{13}\text{C}$  MAS spectra, observed under continuous-wave  $^{19}\text{F}$ -irradiation, are broadened by tens of ppm. This is due to the off-resonance shifts of the  $^{19}\text{F}$  decoupling field that are induced by the large  $^{19}\text{F}$  chemical-shift anisotropy. We have achieved a 30- to 200-fold narrowing of the  $^{13}\text{C}$  lines by 28-kHz magic-angle spinning (MAS) combined with rotation-synchronized  $^{19}\text{F}$   $180^\circ$ -pulses. The fast magic-angle spinning averages out homo- and heteronuclear dipolar couplings of  $^{19}\text{F}$ , and the  $180^\circ$ -pulses remove the splittings resulting from  $^{19}\text{F}$ - $^{13}\text{C}$  J-couplings. The resulting  $^{13}\text{C}$  line width obtained for crystalline PTFE is 18 Hz (0.18 ppm). Signals from many sites in the sidegroups of Nafion® can be resolved by this method, see Figure 1.



**Figure 1.** Line-narrowing of  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of Nafion by fast MAS and pulsed  $^{19}\text{F}$  decoupling. Top: Standard CP/MAS, bottom 28-kHz CP/MAS with further decoupling of  $^{19}\text{F}$  by one  $180^\circ$  pulse per rotation period.

Further, the peaks in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of Nafion® and of poly(chlorotrifluoroethylene), PCTFE (Kel-F®), are assigned based on  $^{19}\text{F}$ - $^{13}\text{C}$  J-coupling modulation and  $^{19}\text{F}$ - $^{13}\text{C}$  HETCOR experiments. The mobility of different sites in Nafion has been characterized by the motional narrowing of recoupled anisotropic interactions.

In the second part of the talk, we will demonstrate uses of the chemical-shift anisotropy (CSA) for structural magic-angle-spinning NMR studies. A robust 2D CSA separation technique, derived from the method of Tycko et al., will be presented. Using  $360^\circ$  instead of  $180^\circ$  pulses, it is highly insensitive to pulse-length errors and requires only moderate  $^1\text{H}$  decoupling fields. The technique, termed separation of undistorted powder-patterns by effortless recoupling (SUPER), makes measurements of quasistatic chemical-shift anisotropies under MAS routine. In addition to obvious applications such as site-resolved orientation measurements in drawn polymers, we will highlight the use of SUPER for distinguishing functional groups with similar  $^{13}\text{C}$  isotropic shifts. For instance, COO/COOH, CON, and COOC-ester groups can be identified in SUPER spectra based on the sign or magnitude of their  $^{13}\text{COO}$  CSAs (see Figure 2).



**Figure 2.** Carboxylic-acid, carboxylate, amide/peptide, and ester  $^{13}\text{C}$  CSA powder patterns, obtained as cross-sections from SUPER spectra of several model compounds. The COOC esters can be identified reliably by their characteristic lineshape with the  $\sigma_{22}$ -peak on the right. CONH groups characteristically have  $\sigma_{33} < 100$  ppm (see arrow).

Similarly, aromatic, olefinic, and anomeric (O-CRR'-O) carbons can be distinguished. Sites with different magnitudes of the CSA, such as aromatic and anomeric groups, which overlap in the 95 – 120 ppm range of isotropic chemical shifts, can also be separated by a simple, tunable one-dimensional CSA filter.

We will also present identification of NH and OH protons in CRAMPS and HETCOR spectra based on dephasing by their large  $^1\text{H}$  CSAs. The  $^1\text{H}$  CSA (and the  $^{14}\text{N}$ - $^1\text{H}$  dipolar coupling) is recoupled using suitably phase-inverted multiple-pulse homonuclear decoupling without  $180^\circ$  pulses. This filter is particularly valuable for distinguishing signals of aromatic-proton from NH- and OH-proton bands.

## 2 SL2

### **New twists for decoupling and recoupling combined with fast MAS**

B.H. Meier, M. Ernst, A. Detken, M. Tomaselli, P. Williamson, E. Hardy, G. Zandomeneghi,  
R. Verel, A. Verhoeven, K. Gopalakrishnan  
Physical Chemistry, ETH-Zurich, 8093 Zürich, Switzerland.  
e-mail: beme@nmr.phys.chem.ethz.ch

Recent methodological solid-state NMR developments in our lab are summarized. Particular emphasis will be given to experiments with fast magic-angle spinning at frequencies between 25 and 50 kHz.

(i) High-resolution solid-state NMR is rapidly evolving into a tool for determining the structure of biomolecules in solid phase, thereby opening up avenues for studying systems which are difficult to access by other methods. In this part of the talk, we focus on assigning the resonances of a uniformly isotope-enriched peptide or protein to its primary structure. This represents a first step towards the goal of determining the complete three-dimensional structure of proteins by solid-state NMR. The assignment strategy relies on polarization-transfer experiments involving  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  spins. The prospects for structural studies based on such assignments are discussed.

(ii) Adiabatic recoupling methods are described and their advantages and disadvantages compared to the respective sudden methods are discussed. An adiabatic version of the  $C7$  experiment is presented and described in detail. The principles illustrated for  $C7$  can be applied to the entire  $C_n^V$  family of pulse sequences. The adiabatic version of  $C7$ , DREAM- $C7$ , can be looked at as an chemical-shift-offset compensated version of the DREAM experiment. In the DREAM experiment, different spin pairs will pass through the HORROR recoupling condition at different time points during the adiabatic sweep. In the DREAM- $C7$ , in contrast, all spin pairs are recoupled simultaneous at a single time point during the sweep. This leads to a different spin dynamic. Similar principles apply also to the R class of pulse sequences. Application to fast MAS is described.

(ii) Polarization transfer through the scalar J couplings will be discussed. Design principles for pulse sequences that promote homonuclear polarization transfer mediated by the isotropic part

of the J coupling will be outlined. Theoretical, numerical and experimental results will be described.

(iii) We investigate the possibility of a low-power approach to heteronuclear spin decoupling in solid-state NMR under high-frequency magic-angle sample spinning. Decoupling is achieved by applying an rf-field with an amplitude corresponding to a precession frequency much lower than the spinning frequency. This leads to a reversal of the averaging processes compared to normal high-power continuous-wave decoupling. Such an approach becomes increasingly interesting with increasing MAS spinning frequency. In rigid solids, low-power decoupling becomes competitive above about 40 kHz MAS frequency.

(iv) The application of magic-angle spinning to bicellar systems (in solution) will be discussed. Bicellar nematic liquid-crystalline phases can be oriented with the director (the normal to the bilayer plane) at an arbitrary angle  $\Theta$  to the applied magnetic field by sample rotation around one axis (variable-angle spinning) or around two axes (switched-angle spinning). Bicelles samples (DMPC/DHPC), spun at angles  $0^\circ \leq \Theta \leq 90^\circ$ , were studied by  $^2\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR. It was found that the stable orientation of the director is perpendicular to the rotation axis when  $\Theta$  is smaller than the magic angle ( $0^\circ \leq \Theta < 54.7^\circ$ ) and parallel for  $54.7^\circ < \Theta \leq 90^\circ$ .

$^{31}\text{P}$  NMR spectra can be simulated by assuming a Gaussian distribution of the director around the stable orientation: the spread of the Gaussian distribution is a measure of the order of the system (distribution of the director) and depends on  $\Theta$  and on the spinning frequency.

Switched-angle spinning experiments are suggested in order to obtain a system oriented with the director parallel to the magnetic field, as in lanthanide-doped samples.

## Cross-correlated relaxation for the study of biological macromolecules

Dominique Marion

Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel – CNRS – CEA – UJF  
41, Rue Jules Horowitz – 38027 Grenoble Cedex – France  
e-mail: marion@ibs.fr

NMR is now a well established tool to determine the structure of biological macromolecules in solution and thus offers an alternative to X-rays crystallography, at least for molecules of intermediate size. In addition, it provides insight into the dynamics of proteins and nucleic acids over a wide range of time-scales ranging from fast internal and overall motion (typically ps to ns) up to slow unfolding processes (ms to s). This dual nature of NMR spectroscopy originates from the fact that most NMR interactions are time-modulated by the molecular motion and thus contain a geometrical term along with a frequency dependence. This is best illustrated in the case of the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  nOe widely used by distance determination, which is a function of  $r_{ij}^{-6}$  (i.e. the internuclear distance) and of the tumbling rate of the associated vector in the magnetic field: depending on the frequency of this motion, a nOe can be positive or negative.

Over the recent years, NMR relaxation has been widely used to investigate the backbone dynamics of proteins in solution <sup>1</sup>, with a special focus on amide  $^{15}\text{N}$ . A number of reasons have supported this choice, ranging from the low cost of  $^{15}\text{N}$  labeling of proteins to the simple two-spin approximation. As a matter of fact, a set of three NMR probes ( $^{15}\text{N}$   $T_1$ ,  $^{15}\text{N}$   $T_2$  and  $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$  nOe) are usually measured and interpreted assuming a dominant  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dipolar interaction and a minor contribution of the  $^{15}\text{N}$  chemical shift anisotropy. In a second step, the relaxation data are converted into motional information, using the model-free approach introduced by Lipari and Szabo, which aims at separating the global tumbling from the faster internal motions.

The extension of this approach to other relaxation probes (such as side-chain  $^{13}\text{C}$  in proteins or sugar/base  $^{13}\text{C}$  in nucleic acids) is made difficult by the numerous relaxation mechanisms involved and by interference between them due to cross-correlation. Cross-correlation <sup>2</sup> occurs when several spin interactions (as for instance dipole-dipole interaction or chemical shift anisotropy) are modulated by the same molecular motion. Consequently, the relaxation rate contains additional terms, which depend on the relative orientation of the two interactions and on how they are time-modulated. A major consequence of cross-correlation is that the various relaxation mechanisms no longer add up in a simple manner and that, in some favorable instances; a decrease of the relaxation rate is even observed. This effect has been recently exploited in the TROSY technique <sup>3</sup>, where the cross-correlation of DD and CSA interaction leads to a narrowing of specific lines in a multiplet and thus an enhanced sensitivity. Fortunately, the efficiency of this effect increases with slow molecular motion and high-magnetic field and opens thus a new avenue for the study of large biological macromolecules.

In this presentation, the application of cross-correlated relaxation will be discussed for two types of biological macromolecules – short fragments of nucleic acids and proteins – and for two different purposes – as structural information or as a dynamics probe –. While TROSY has been initially proposed for protein backbone  $^{15}\text{N}$ , any nucleus with a large CSA contribution is a suitable candidate to exploit its benefits. The aromatic carbons in nucleic acid bases fall into this category as a result of their aromatic nature. An increased sensitivity is reported for TROSY only for the base carbons<sup>4</sup>, but not for the sugar ones which lack this large CSA. Furthermore, TROSY makes possible to combine magnetization originating from the slowly relaxing  $^1\text{H}$  with that of the less sensitive but faster relaxing  $^{13}\text{C}$ . Relaxation measurements have shown that the DD-CSA cross-correlated relaxation varies for the various  $^{13}\text{C}$  types in RNA bases, a result in agreement with published theoretical DFT computation. Cross-correlation can also be used as a conformational probe for the sugar pucker in nucleic acids<sup>5</sup>, as DD-CSA cross-correlated relaxation changes magnitude for the two frequently encountered conformations:  $\text{C}_2'$ , *endo* and  $\text{C}_3'$ , *endo*.

In proteins, a number of  $\text{CH}_2$  groups are located all over the molecule and exhibit dipole-dipole cross-correlation between the two CH pairs. While this effect is inconvenient for  $T_1$  and  $T_2$  relaxation measurements, it provides valuable information on the concerted motion of the  $\text{CH}_2$  group. Several studies<sup>6</sup> have been reported in the past for  $\text{C}^\beta\text{H}_2$  groups present in proteins. When a protein is randomly deuterated, a fraction of the terminal  $\text{CH}_3$  groups found in most aliphatic side-chains (Ala, Val, Thr, Leu, Ile and Met) are replaced by  $\text{CH}_2\text{D}$  groups. It is thus possible to measure the DD-DD cross-correlated relaxation in the transverse plane by observing the intensity variation in the 1:2:1 multiplet for the  $^{13}\text{C}$  signal. A major issue for the design of this experiment is the signal selection from the  $\text{CH}_2\text{D}$  moieties, without introducing any bias on the quantitative measurement. The methyl group dynamics is clearly dominated by the 3-fold rotation around the symmetry axis which occurs at a ps time-scale, but this relaxation probe provides also insight on the global motion of the side-chain. Contributions from other DD-DD cross-correlated rates in a fully  $^{13}\text{C}$  labeled protein will also be discussed.

*Acknowledgements:* The contribution to this work by Jérôme Boisbouvier, Jean-Pierre Simorre, Bernhard Brutscher (*IBS – Grenoble*), Arthur Pardi (*Univ. of Colorado*), Ranjith Muhandiram, Nikolai Skrynnikov, Oscar Millet and Lewis E. Kay (*Univ. of Toronto*) is acknowledged.

---

<sup>1</sup> Palmer A.G. (2001) *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 129-155.

<sup>2</sup> Brutscher B. (2000) *Conc. Magn. Reson.* **12**, 207-229.

<sup>3</sup> Pervushin K., Riek R., Wider G. and Wüthrich K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12366-12371.

<sup>4</sup> Brutscher B., Boisbouvier J., Pardi A., Marion D. and Simorre J.-P. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 11845-11851;

<sup>5</sup> Boisbouvier J., Brutscher B., Pardi A., Marion D. and Simorre J.-P. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6779-6780.

<sup>6</sup> Yang D., Mittermaier A., Mok Y.K. and Kay L.E. (1998) *J. Mol. Biol.* **276**, 939-54.

## Understanding Intermolecular Multiple-Quantum Coherences and Their Applications

Warren S. Warren, Princeton University

Web site(including links to recent papers): <http://www.princeton.edu/~wwarren>

Several years ago, we showed that dipolar couplings between distant spins produce additional peaks in the indirectly detected dimension in solution two-dimensional NMR experiments [1, 2, 3]. These peaks correspond to intermolecular multiple-quantum coherences (iMQCs) between widely separated molecules (typical separations are 10 $\mu$ m-10 mm). In the last few years, these effects have evolved from a curiosity into a wide range of applications. For example, iMQC imaging [4] gives demonstrated contrast enhancement in vivo; good brain images can be obtained in a few minutes, at fields as low as 1.5 Tesla. We have recently demonstrated that intermolecular zero-quantum coherences (iZQCs) in particular can be used to remove >2KHz inhomogeneity and >1 kHz/s drift from the 25T Keck electromagnet at the National High Magnetic Field Laboratory (NHMFL), giving the first high resolution, >1GHz NMR spectra[5]. Finally, it has now become clear that the combination of dipolar field effects and radiation damping can lead to chaotic dynamics, even if the solvent magnetization is initially almost completely suppressed, to resurrection of the solvent magnetization[6], and to amplification of signals from dilute spin species. I will discuss all of these applications, the theoretical (mean-field or "classical" [1, 7, 8, 9] and coupled-spin or "quantum" [7,10]) frameworks, and the computational methods [11] that allows us to make sense of the results.

- 
1. Q. He, W. Richter, S. Vathyam and W. S. Warren, *J. Chem. Phys.* **98**, 6779 (1993).
  2. W. S. Warren, W. Richter, A. H. Andreotti, and S. Farmer, *Science* **262**, 2005 (1993).
  3. S. Ahn, W. S. Warren, and S. Lee, *J. Magn. Reson.* **128**, 114 (1997); S. Ahn, S. Lee, and W. S. Warren, *Mol. Phys.* **95**, 769 (1998)
  4. W. S. Warren, S. Ahn, M. Mescher, M. Garwood, K. Ugurbil, W. Richter, R. Rizi, J. Hopkins, and J. Leigh, *Science* **281**, 247 (1998).
  5. Y. Y. Lin, S. Ahn, N. Murali, W. Brey, C. R. Bowers and W. S. Warren, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 3732 (2000).
  6. Y. Y. Lin, N. Lisitza, S. Ahn and W. S. Warren, *Science* **290**, 118-121(2000)
  7. S. Lee, W. Richter, S. Vathyam, and W.S. Warren, *J. Chem. Phys.* **105**, 874(1996).
  8. See, for example, P. Robyr and R. Bowtell, *J. Chem. Phys.* **106**, 467(1997); P. C. M. van Zijl, M. O. Johnson, S. Mori, and R. E. J. Hurd, *J. Magn. Reson. A* **113** 265(1995); I. Ardelian, R. Kimmich, S. Stapf, and D. E. Demco, *J. Magn. Reson.* **127**, 217(1997); G. J. Bowden, T. Heseltine and M. J. Prandolini, *Chem. Phys. Lett.* **233**, 639(1995); M. Augustine and K. Zilm, *J. Magn. Reson. A* **123**, 145(1996).
  9. J. Jeener, A. Vlassenbroek, and P. Broekaert, *J. Chem. Phys.* **103**, 1309(1995).
  10. W. Richter, S. Lee, W. S. Warren, and Q. He, *Science* **267**, 654(1995).
  11. T. Enss, S. Ahn and W. S. Warren, *Chem. Phys. Lett.* **305**, 101 (1999); S. R. Garrett-Roe and W. S. Warren, *J. Magn. Reson.* **146**, 1(2000).

第 3 日

11月16日(金)

一般講演要旨

トランスグルタミナーゼの新規スクリーニング法  
(味の素(株)・中央研究所) ○榛葉信久、横山敬一、鈴木榮一郎

**NMR-based Screening Method for Transglutaminases; Rapid Analysis of their Substrate Specificities and Reaction Rates.**

Nobuhisa Shimba, Kei-ichi Yokoyama, Ei-ichiro Suzuki

Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc., 1-1 Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki-shi 210-8681, Japan.

**Abstract:** The incorporation of inter- or intramolecular covalent crosslinks into food proteins with microbial transglutaminase (MTG) improves the physical and textural properties of many food proteins, such as tofu, boiled fish paste, and sausage. Other transglutaminases (TGases) are expected to be used in the same way, and to extend the scope of industrial applications to materials, drugs, and so on. The TGases have great diversity, not only in their amino acid sequences and lengths, but also in their substrate specificities and catalytic activities, and therefore it is quite difficult to estimate their reactivity. We now demonstrate an NMR-based method using the enzymatic labeling technique (ELT) for the simultaneous analysis of the substrate specificities and the reaction rates of TGases. It is quite useful for comparing the existing TGases and for screening new TGases or TGases variants.

**Introduction:** Transglutaminases are a family of enzymes that catalyze the displacement of the amide ammonia at the  $\gamma$ -position in glutamine residues by replacing it with another amine, usually an  $\epsilon$ -amino group from a suitable lysine residue. The formation of  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine isopeptide bonds results in both intra- and intermolecular cross-linking of proteins, leading to polymerization. Guinea pig liver TGase, human epidermis keratinocyte TGase, and human blood coagulation factor XIII are calcium ion-dependent enzymes. For instance, the enzymatic and structural properties of Factor XIII have been well characterized for the cross-linking of fibrin, which stabilizes clots against redissolution by fibrinogen and plasmin, and so on. On the other hand, *Streptovorticillium* sp. S-8112 TGase (MTG: microbial transglutaminase) is a calcium ion-independent enzyme, and is the first TGase to be obtained from a source other than a mammal. Incorporations of inter- or intramolecular covalent crosslinks into food proteins with MTG, improve the physical and textural properties of many food products, such as tofu, boiled fish paste, and sausage. In addition, TGases originating from marine organisms, including fish, crustaceans, and echinoderms, for example, red sea bream liver, carp dorsal muscle, limulus hemocyte, lobster muscle, sea urchin eggs, and Japanese oyster gills and mantles, have been reported. However, they are quite

**Keywords:** スクリーニング、酵素標識法、トランスグルタミナーゼ、溶液 NMR

しんば のぶひさ、よこやま けいいち、すずき えいいちろう

diverse, not only in their amino acid sequences and lengths, but also in their substrate specificities and catalytic activities, although their enzymatic reactions generalize down to an acyl transfer.

The proposed TGase reaction mechanism is based on the crystal structure of factor XIII. At first, the  $\gamma$ -carboxyamide groups interact with TGases, and subsequently, the primary amino groups of a variety of amines or the  $\epsilon$ -amino groups of lysine residues are involved in the formation of new covalent bonds. On the basis of the proposed reaction mechanism, we have already developed an enzymatic labeling technique (ELT), in which  $^{15}\text{N}$  nuclei are incorporated into the  $\gamma$ -carboxyamide groups of the glutamine residues in arbitrary proteins. In the present study, we will show a novel method using ELT and the techniques for detection with NMR in order to analyze the substrate specificities for glutamine residues and the reaction rates of TGases simultaneously. It is quite useful to compare the existing TGases and to screen for new TGases or TGase variants. By using this method, we have characterized the enzymatic properties of various TGases, and found a preferable TGase to improve the physical and textural properties of many food products, such as tofu, boiled fish paste, and sausage. Moreover, it will extend the scope of TGase applications, for example, in the fields of foods, materials, drugs, and so on.

**Results and Discussion:** Figure 1 depicts the reaction mechanism for ELT using TGases. The labeled ammonium ion reacts with the  $\gamma$ -carboxyamide groups of glutamine residues, and exchanges with their amide groups. A large excess of  $^{15}\text{N}$  labeled ammonium ion increases the incorporation of the  $^{15}\text{N}$  nucleus. The  $^{15}\text{N}$  labeled glutamine residues, corresponding to the TGase substrate, are easily and rapidly observed in the  $^{15}\text{N}$  edited spectra using NMR.

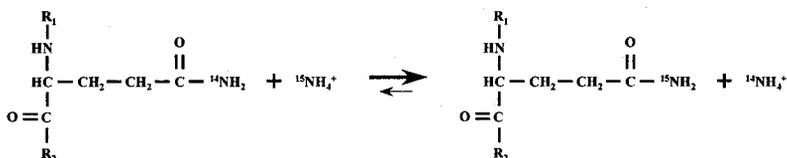


Figure 1. Schematic drawing of ELT by using TGases. The labeled ammonium ion reacts with the  $\gamma$ -carboxyamide groups of glutamine residues, and exchanges with their amide groups.

Ovalbumin (albumin from chicken egg), which is a glycoprotein (43 kDa) including 14 glutamine residues, was used as the substrate protein. The  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of ovalbumin was recorded in the presence of 200 mM  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5mM  $\text{CaCl}_2$ , and 4 $\mu\text{M}$  MTG (Figure 2a). In the same way, we measured the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of ovalbumin in the presence of GTG and FTG, instead of MTG (Figure 2b,c). Six pairs of cross-peaks were observed in the presence of MTG, showing that the corresponding  $\gamma$ -carboxyamide groups of the glutamine residues in ovalbumin were labeled with  $^{15}\text{N}$ . On the other hand, only four pairs of cross-peaks, in which the three pairs shown as 1, 3, and 4 correspond to the glutamine residues labeled with MTG, were detected in the presence of GTG and FTG. As a result, among the glutamine residues 1 to 6 that were capable of being isotopically labeled using MTG, only glutamine residues 1,3, and 4 were labeled. The glutamine residue 7 was newly labeled, in the presence of GTG and

FTG. It could easily and rapidly be proved that when using ovalbumin as a substrate protein, a plurality of glutamine residues may serve as substrates for MTG, as compared with GTG and FTG. In other words, MTG has a lower substrate specificity for ovalbumin, as compared with GTG and FTG.

ELT is useful not only for analyses of the substrate specificity, but also for the estimation of the reaction rate, since the  $^{15}\text{N}$  labeling ratio is calculated from the signal intensity in the NMR spectrum. In this example, the reaction rates were compared with MTG and its variant, Ser-MTG, which lacks the N-terminal aspartic acid residue. The  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra in the presence of MTG and Ser-MTG were measured, continuously 20 times, for the estimation of the reaction rate. The sums of the intensities of the signals, indicated by 6 in Figure 2a, are plotted in Figure 3. We found that the reaction rate for Ser-MTG is higher than that observed for MTG, at least at the site corresponding to the glutamine residue representing the signals indicated as 6 in Figure 2a. Thus, the method based on ELT permits the monitoring of the reaction rate of any glutamine residue present in a substrate protein.

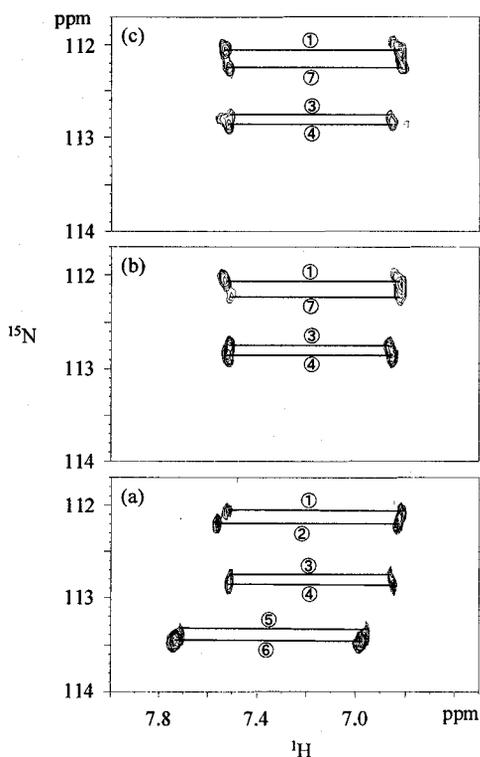


Figure 2.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of ovalbumin labeled with  $^{15}\text{N}$  in the presence of (a) MTG, (b) GTG, and (c) FTG. Observed cross-peaks labeled with MTG are shown with the serial numbers, 1-6. Cross-peaks observed in the presence of GTG or FTG are marked with the corresponding serial numbers, and newly observed cross-peaks are shown as 7.

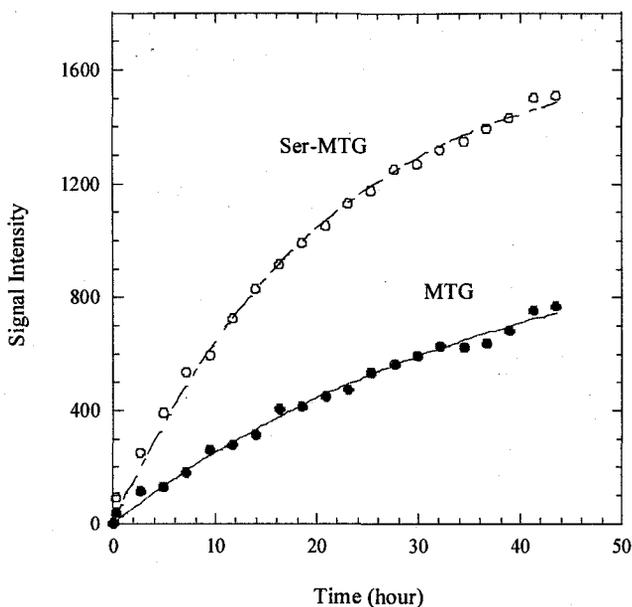


Figure 3. The sums of the intensities for the pair of signals indicated by 6 in Figure 2a, and those for the corresponding signals in ovalbumin reacted with Ser-MTG were plotted against the reaction time. Signal intensities were fitted for the estimation of the relative reaction rates, using a single exponential model function.

**Conclusion:** The TGases are a family of enzymes that catalyze an acyl transfer between a  $\gamma$ -carboxamide group of a glutamine residue and an amine, usually an  $\epsilon$ -amino group of a lysine residue. The TGases are quite diverse, not only in their amino acid sequences and lengths, but also in their substrate specificities and reaction rates, although their enzymatic reactions generalize down to the acyl transfer. The kinds of glutamine residues serving as substrates and the reaction rates vary depending on the type of TGase, and this results in the different abilities to crosslink substrate proteins. Given these circumstances, we have developed a novel method using ELT for the analysis of the substrate specificities and the reaction rates of TGases simultaneously. It is quite useful to compare existing TGases and to screen for new TGases or TGase variants. As a practical matter, we have characterized and classified the enzymatic properties of various TGases, such as MTG, GTG, and FTG, and have identified a preferable TGase variant, Ser-MTG, which is expected to improve the physical and textural properties of many food products, such as tofu, boiled fish paste, and sausage, as compared with the native TGase. Moreover, on the basis of ELT, it will extend the scope of applications for TGases for industrial use, for example, in the fields of foods, materials, drugs, and so on.

## 高圧 NMR によるプリオンの安定性及びダイナミクスの研究

(岐阜大学医学部<sup>1</sup>, 理研<sup>2</sup>, UCSF<sup>3</sup>)○桑田一夫<sup>1</sup>, 李 華<sup>2</sup>, 山田博昭<sup>2</sup>, James Thomas<sup>3</sup>, 赤坂一之<sup>2</sup>

## Prion Dynamics Characterized by a High-Pressure NMR

School of Medicine Gifu University<sup>1</sup>, RIKEN<sup>2</sup>, University of California San Francisco<sup>3</sup>,Kazuo Kuwata<sup>1</sup>, Li Hua<sup>2</sup>, Hiroaki Yamada<sup>2</sup>, Thomas James<sup>3</sup>, Kazuyuki Akasaka<sup>2</sup>

Slow conformational fluctuation of prion is considered to be a crucial step to its conversion into PrP<sup>Sc</sup>. By utilizing a high pressure NMR, we detected the volume fluctuations of the recombinant prion protein rPrP (90-231) in a residue-specific manner. We also found the major conformational intermediate PrP\*, where helices B and C are partially disordered while helix A remains intact. The disordering helix B, which has high propensity for  $\beta$ -strand, is likely to contribute to an intra-molecular extension of the  $\beta$ -strand, and eventually to the oligomerization of the protein. The structural characteristics of the intermediate PrP\* revealed here may give clues to an efficient drug design to prevent the oligomerization of PrP<sup>C</sup> into the pathogenic form.

## プリオンとは？

プリオンはヒトや動物に特発性、遺伝性、もしくは感染性の神経変性疾患（例えば、牛では狂牛病、ヒトではクロイツフェルト・ヤコブ病）を引き起こす蛋白質で、約 250 個のアミノ酸からなる。病原性を有するプリオン (PrP<sup>Sc</sup>, スクレイビー型) と病原性のないプリオン (PrP<sup>C</sup>, 細胞型) とでは、化学構造は等しいが、立体構造が異なると考えられている。細胞内では、PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への変換が観測されているが、*in vitro* での PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への変換は、未だに成功しておらず、この反応には、未知の因子 (Protein X) が介在する、と考えられている。

分光学的には、PrP<sup>C</sup> は  $\alpha$ ヘリックスが多く、わずかの  $\beta$ シートしか含まないが、PrP<sup>Sc</sup> は  $\beta$ シートを約 40%含むことが報告されている。ハムスターの PrP<sup>Sc</sup> を酵素処理すると、N 端を除いたプリオン蛋白、rPrP(90-231)が得られ、これも感染性を有することが知られている。PrP<sup>C</sup> の立体構造は解明されたが、PrP<sup>Sc</sup> の立体構造はいまのところ全く分かっていない。

プリオン, 高圧 NMR, 中間体, PrP<sup>C</sup>, PrP<sup>Sc</sup>, PrP\*

くわた かずお, り ふあ, やまだ ひろあき, じえーむす とーます, あかさか かずゆき

## プリオンの立体構造と構造揺らぎ

マウス、ハムスター、ヒト PrP<sup>C</sup>の詳細な溶液立体構造が報告されているが、基本的には3本の $\alpha$ ヘリックス (A, B, C) と $\beta$ シート (S1, S2) からなり、それらの構造は大変良く似ている。ところが、ハムスター-rPrP(90-231)の立体構造では、少なくとも113-128残基の構造が1種類でなく、複数存在することが知られている。このような、PrP<sup>C</sup>における構造の多形性や構造揺らぎを調べることは、PrP<sup>C</sup>から PrP<sup>Sc</sup>への変換メカニズムの理解を助けるのみならず、それを阻止する薬物の開発にも役立つと考えられる。

PrP<sup>C</sup>のピコ秒からナノ秒におけるダイナミクス測定では、90-140残基 ( $\beta$ シートの一部を含む) は非常に柔らかく、ヘリックス A (144-154) は、ヘリックス B (172-193)、ヘリックス C (200-227) より相対的に柔らかい。また、 $\beta$ シート領域 (128-133, 159-164) に遅い構造揺らぎが存在する。これらの観測結果は、PrP<sup>C</sup>の溶液構造ともよく符合している。このような揺らぎの描像は、天然構造周辺の揺らぎを反映しているが、PrP<sup>C</sup>から PrP<sup>Sc</sup>への変換メカニズムに関係があるかどうかは、未だ分かっていない。

一方、PrP<sup>C</sup>の構造形成反応は2状態であり、速度論的中间体の存在は確認されていない。また、変性剤 (GdnHCl) 存在下や酸性条件下では、プリオンの変性中間体が報告されているものの、その構造的特徴はつかめていない。

## 高圧 NMR で何が分かるか？

蛋白質は溶液中では多様な立体構造間の平衡状態にあると考えられるが、異なる立体構造間に体積差があれば、加圧によりそれらの間の平衡をずらすことが出来る。例えば天然状態では相対的に体積の小さい、またポピュレーションの低い“稀な構造”であったとしても、高圧下ではポピュレーションが増加するため、その観測が可能となる。実際、高圧 NMR を用いることにより、 $\beta$ ラクトグロブリンや DHFR における“稀な構造”が観測されており、それらが蛋白質機能と深い関係にあることが分かって来ている。

## プリオンの高圧変性中間体

ハムスター・プリオン rPrP(90-231)では、化学シフトの圧力依存性から、B-C ループ (B-ヘリックスと C-ヘリックス間のループ) に、蝶番 (ヒンジ) 様の遅い (ミリ秒から秒の) 運動が優勢に存在することが分かった。また、各セグメントの圧力安定性の違いから、少なくとも2種類の高圧変性中間体の存在が明らかになった。Aヘリックスは保たれているが、BとCヘリックスが壊れたものと (PrP\*)、逆にBとCヘリックスが保たれているが、Aヘリックスが壊れたものである。前者の方が安定で、この中間体は天然条件でも、1~3% 存在することが分かった。BとCヘリックスの間には S-S 結合が存在するが、この S-S 結合を切断することにより、プリオン構造が不安定化され、アミロイドを形成することが知られている (但し、PrP<sup>Sc</sup>では、S-S 結合は保存されている)。従って、PrP\*は、PrP<sup>C</sup>から PrP<sup>Sc</sup>に至るの構造変換の初期過程に関与している可能性がある。

## Maf群蛋白質MafGのDNA結合ドメインの立体構造解析

(筑波大TARAセ<sup>1</sup>、応用生物化学系<sup>2</sup>、基礎医学系<sup>3</sup>)○楠 英樹<sup>1,3</sup>、本橋ほづみ<sup>1,3</sup>、勝岡史城<sup>3</sup>、諸橋昭雄<sup>2</sup>、  
山本雅之<sup>1,3</sup>、田中俊之<sup>1,2</sup>

## Solution Structure of the DNA-binding domain of MafG

*Center for Tsukuba Advanced Research Alliance<sup>1</sup>, Institute of Applied Biochemistry<sup>2</sup>, and  
Institute of Basic Medical Science<sup>3</sup>, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan*○Hideki Kusunoki<sup>1,3</sup>, Hozumi Motohashi<sup>1,3</sup>, Fumiki Katsuoka<sup>3</sup>, Akio Morohashi<sup>2</sup>,  
Masayuki Yamamoto<sup>1,3</sup>, and Toshiyuki Tanaka<sup>1,2</sup>

Maf family transcription factors are basic region-leucine zipper (bZIP) proteins, characterized by the presence of a specific amino acid sequence, Maf extended homology region (EHR), on the N-terminal side of the basic region. The EHR is considered to be essential for the DNA binding specific to Mafs, together with the basic region. To understand the unique DNA-binding mode of the Maf family, we have determined the solution structure of the DNA-binding domain (residues 1-76) of MafG that contains the EHR and the basic region. This structure consists of three  $\alpha$ -helices and provides a possible mechanism by which Maf family proteins bind to their consensus DNA sequences.

Maf群蛋白質は、塩基性ロイシンジッパー (bZIP) 構造を持つ転写調節因子であり、転写活性化ドメインを持つ大Maf群蛋白質 (c-Maf、MafB、NRL、L-Maf) と、これを持たない小Maf群蛋白質 (MafG、MafK、MafF) の2つに分類される。Maf群蛋白質は、このファミリーで高く保存された、Maf extended homology region (EHR) と呼ばれるアミノ酸配列を塩基性領域の前に持ち、MAREというDNA配列 (TGCTGAC(G)TCAGCA) を特異的に認識して結合する。このMARE配列には、c-Fos、c-Jun、GCN4といったAP-1 bZIP蛋白質が認識するAP-1サイト (下線部) が中央に、その両外側にMaf群蛋白質のみが認識する3つの塩基配列 (flanking region) がある。それ故、Maf群蛋白質は、AP-1 bZIP蛋白質と同様な機構でAP-1サイトに結合し、更にEHRがflanking regionに結合することにより、MARE配列と相互作用していると考えられている。そこで、EHRがどのような構造を形成しているか、またどのようにMARE配列を認識するかを明らかにするため、EHRと塩基性領域から成るMafGのDNA結合ドメイン (残基1-76) のNMR構造を決定した。

[方法] 安定同位体標識したMafG(1-76)の各種異種核多次元NMRスペクトルを、Varian UNITY INOVA 500又はBruker AVANCE DRX 800分光計を用いて測定し、常法に従って主鎖

Maf、DNA結合ドメイン、多次元NMR、三次元構造

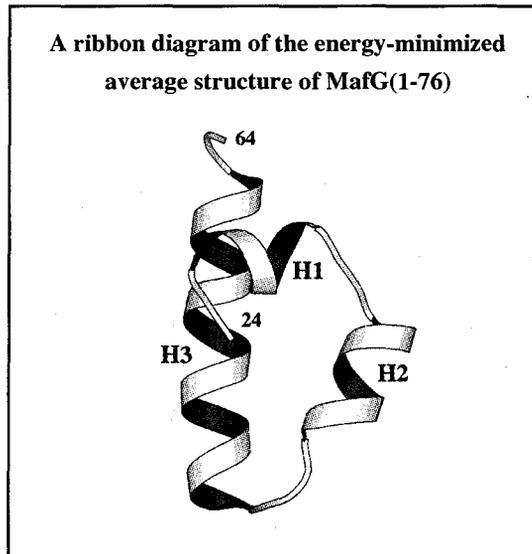
くすのき ひでき、もとはし ほづみ、かつおか ふみき、もろはし あきお、  
やまもと まさゆき、たなか としゆき

及び側鎖のシグナルを帰属した。そして、二次元及び三次元NOESYスペクトルから得た817個の距離情報と、三次元HNHAスペクトルより得た26個の二面角情報を用いて、X-PLOR ver. 3.851で構造計算を行った。また、 $^{15}\text{N}$ で標識した MafG(1-76) 溶液に、MARE 配列を有する DNA (15 bp) 溶液を 0.13 等量ずつ添加し、各濃度比で 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルを測定することによって、MafG(1-76)のアミドプロトンとアミド窒素の化学シフト変化を調べた。

[結果及び考察] MafG(1-76)は、3つの $\alpha$ ヘリックス (H1, 26-31; H2, 34-41; H3, 46-61) から成る構造を取っている (下図)。この構造において、Maf群蛋白質だけに存在するEHRはヘリックスH1からH3の前半までを、塩基性領域はヘリックスH3の後半を形成している。一方、N末端側23残基と塩基性領域のC末端側12残基は非常に運動性が高く、決まった構造を取っていない。また、蛋白質表面には、塩基性アミノ酸から成るパッチが存在している。

MARE 配列を有する DNA を用いたタイトレーション実験では、主にヘリックスH2からC末端側で大きな化学シフト変化が、更に塩基性領域ではシグナルの消失も観測された。この結果から、EHRと塩基性領域の両方がMAREとの結合に関与していることが示唆された。特に、塩基性パッチを包含する蛋白質表面を形成しているアミノ酸残基で、大きな化学シフト変化が見られた。塩基性パッチを構成するアミノ酸のほとんどがMaf群蛋白質で保存されていることから、この塩基性パッチを含む蛋白質表面がDNAと直接相互作用していると考えられる。

Maf 群蛋白質は、3つの $\alpha$ ヘリックスから成る構造 (EHR fold) を塩基性領域の前に持つことにより、他の bZIP 蛋白質よりも大きなDNAとの相互作用面を獲得し、より長いMARE配列を認識出来ると考えられる。



## 3 L4

## カイコ麻痺ペプチド BmPP の NMR 法による立体構造解析

(生研機構<sup>1</sup>、富山医薬大薬<sup>2</sup>、農業生物資源研<sup>3</sup>、北大低温研<sup>4</sup>)○ 三浦和紀<sup>1,2</sup>、神村学<sup>3</sup>、相沢智康<sup>1,2</sup>、木内信<sup>3</sup>、早川洋一<sup>4</sup>、  
水口峰之<sup>2</sup>、河野敬一<sup>2</sup>**Solution structure of paralytic peptide of the silkworm, *Bombyx mori***Kazunori Miura<sup>1,2</sup>, Manabu Kamimura<sup>3</sup>, Tomoyasu Aizawa<sup>1,2</sup>, Makoto Kiuchi<sup>3</sup>, Youichi Hayakawa<sup>4</sup>, Mineyuki Mizuguchi<sup>2</sup> and Keiichi Kawano<sup>2</sup>*(<sup>1</sup>Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, <sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University, <sup>3</sup>National Institute of Agrobiological Sciences, <sup>4</sup>Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University)*

Paralytic peptide of silkworm, *Bombyx mori*, (BmPP, 23 residues) is a small cytokine peptide isolated from silkworm. BmPP has 74% homology in the primary structure to Growth-blocking peptide (GBP, 25 residues) which is one of the multi-functional insect cytokine ENF-family peptides. The growth-blocking activity, which is one of the major activities of ENF-family, of BmPP is weaker than that of GBP although the primary structural homology is high between BmPP and GBP. To analyze the structural properties of BmPP and GBP, we determined the structures of BmPP and GBP using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy and CNS-ARIA structural calculation system. Although the overall structure of BmPP is similar to that of GBP, several structural differences are found. We will discuss the detailed structural properties of BmPP and GBP, which may be related to the difference of the activities between BmPP and GBP.

(序論) カイコ麻痺ペプチド (*Bombyx mori* paralytic peptide, BmPP) は、カイコ血リンパから単離されたアミノ酸 23 残基からなるサイトカインである。BmPP は、アワヨトウの Growth-blocking peptide (GBP、25 残基) と 74% の高い相同性を有している。他にも相同性の高いペプチドが単離されており、これらのペプチドは N 末端の保存性の高いアミノ酸配列をとって「ENF」ファミリーペプチドと呼ばれている。ENF ファミリーは、25 残基前後の短いペプチドでありながら、細胞や個体に対する様々な活性を発現し、その特性も様々である。それらの活性のうち、カイコ個体に対する成長阻害活性では、GBP と BmPP で成長阻害特性に大きな違いがあることが明らかになっている。本研究では活性発現パターンの異なる BmPP と GBP の立体構造を NMR 法により決定し、両者にどのような特徴の違いがあるのかを詳細に検討した。

(実験方法) BmPP の NMR サンプルは以下の条件で調製した: [BmPP]=4 mM, pH 4.5、溶媒 90% H<sub>2</sub>O / 10% D<sub>2</sub>O (軽水サンプル) あるいは 100% D<sub>2</sub>O (重水サンプル)。NMR 実験は Bruker DMX-500 分光計を用い、測定温度 30 °C 及び 40 °C で行った。NMR 実験は、DQF-COSY、TOCSY (混合時間 70 msec)、NOESY (混合時間 100 msec) を、軽水中小および重水でそれぞれ行った。また、比較のため GBP も BmPP と同様の条件で NMR サンプルを調製し、同様の NMR 実験を行った。NMR データの解析は NMRPipe および PIPP プログラム群を用いて Linux ワークステーション上で行った。

キーワード: 麻痺ペプチド、Paralytic Peptide、BmPP、Growth Blocking Peptide、GBP

みうらかずのり、かみむらまなぶ、あいざわともやす、きうちまこと、はやかわよういち、みずぐちみねゆき、かわのけいいち

BmPP の NMR 信号の帰属は、連鎖帰属法を用いて行った。GBP の NMR 信号の帰属は、すでに行われている構造解析の結果を参考に行った。水素結合の存在を示すアミドプロトンの温度係数の解析は、測定温度による (20°C、25°C、30°C) DQF-COSY スペクトルの信号の変化を用いて行った。

BmPP および GBP の立体構造計算は、NMR 実験で得られる距離情報である NOE、主鎖  $\phi$  角度情報である J 結合定数、水素結合情報であるアミドプロトンの温度係数のデータを用い、構造計算プログラム CNS および構造情報精密化支援プログラム ARIA を用いて行った。ARIA を用いることにより、信号の重なり等で判別が困難であった不確かな距離情報を、構造計算の繰り返し中に最も妥当な距離制限として客観的に分離することができ、より精密で正確な構造を決定することができる。本研究の対象は 25 残基前後のペプチド中のわずかな構造の違いを議論するため、この構造計算方法を用いた。立体構造の表示および評価には、MOLMOL プログラムを用いた。

(結果・考察) BmPP の NMR 信号の帰属は、全 23 残基の主鎖信号のうち、N 末端アミドプロトン以外のすべての信号の帰属を完了した。側鎖の信号も 90% 以上の帰属を完了した。構造計算に用いた情報は次のとおりである：軽水中および重水中 NOESY (混合時間 100 msec) のクロスピークデータそれぞれ 152 個、169 個、水素結合 7 箇所、 $\phi$  角度 17 個。最終精密化段階で用いられた距離情報はつぎのとおりである：Unambiguous NOE 306 個、Ambiguous NOE 32 個。100 個計算したもののうちポテンシャルエネルギーの低い 20 個の収束した立体構造を得た (Figure 1a)。構造計算の収束の度合いを示す主鎖原子の RMSD 値はコア領域 (Cys7-Thr22) について  $0.34 \pm 0.12 \text{ \AA}$  であった。

GBP の NMR 信号の帰属は、全 25 残基の主鎖信号のうち、N 末端アミドプロトン以外のすべての信号の帰属を完了した。側鎖の信号も 90% 以上の帰属を完了した。構造計算に用いた情報は次のとおりである：軽水中および重水中 NOESY (混合時間 100 msec) のクロスピークデータそれぞれ 135 個、162 個、水素結合 5 箇所、 $\phi$  角度 13 個。最終精密化段階で用いられた距離情報はつぎのとおりである：Unambiguous NOE 284 個、Ambiguous NOE 72 個。20 個の収束した立体構造を得た (Figure 1b)。構造計算の収束の度合いを示す主鎖原子の RMSD 値はコア領域 (Cys7-Thr22) について  $0.29 \pm 0.08 \text{ \AA}$  であった。

BmPP および GBP の立体構造を比較すると、分子の中央に 2 つのストランド (残基番号 11-13, 19-21) からなる  $\beta$  シートが存在しており、両者の骨格構造は非常に良く似た構造であった。この  $\beta$  シートの両端に存在するターン領域ではいくつか異なる構造要素が見つかった。現在さらに立体構造の精密化を進め、分子のどの領域が活性特性と関連付けられるか検討を行っている。

本研究は、生研機構基礎研究推進事業によるものである。

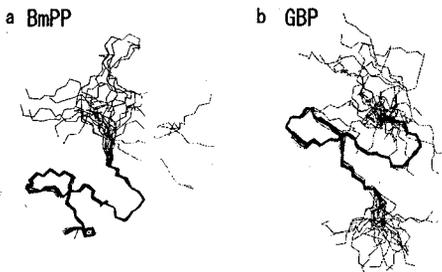


Figure 1. Best-fitted backbone representations of 20 of 100 CNS-ARIA structures of (a) BmPP and (b) GBP.

## 3 L5

## ヒト遺伝子修復酵素 hMTH1 の構造決定とその加水分解の研究

(横浜市立大学総合理学研究科<sup>1</sup>、奈良先端大バイオサイエンス研究科<sup>2</sup>、九州大学生医研<sup>3</sup>、北海道大学薬学研究科<sup>4</sup>) ○三島正規<sup>1</sup>、伊藤紀幸<sup>2</sup>、酒井康成<sup>3</sup>、紙谷浩之<sup>4</sup>、中別府雄作<sup>3</sup>、白川昌宏<sup>1</sup>

## Structural studies and analyses of the hydrolysis reaction of hMTH1

OMasaki Mishima<sup>†</sup>, Noriyuki Itoh<sup>§</sup>, Yasunari Sakai<sup>||</sup>, Hiroyuki Kamiya<sup>¶</sup>, Yusaku Nakabeppu<sup>||</sup>, and Masahiro Shirakawa<sup>†</sup> <sup>†</sup>Graduate School of Integrated Science of Yokohama City University, <sup>§</sup>Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, <sup>||</sup>Department of Biochemistry, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University <sup>¶</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University.

hMTH1 is thought to hydrolyze both 8-oxo-dGTP and 2-OH-dATP, thus preventing these oxidized forms of DNA precursors from incorporating into genome DNA through DNA synthesis. The solution structure of the hMTH1 has determined by multidimensional triple resonance NMR spectroscopy. The structure calculations were carried out based on distance restraints derived from NOEs and dihedral angle constraints. In addition, 46 hydrogen bond obtained from direct observation through <sup>3h</sup>J<sub>NC</sub> couplings. hMTH1 is composed of seven β-strands sandwiched by two α-helices. To identify the site of water attack, <sup>31</sup>P chemical shift was observed for the products of the hydrolysis of 8-oxo-dGTP under the presence of <sup>18</sup>O-enriched water. Because the attacking water is enriched with <sup>18</sup>O, one of the two products after hydrolysis is labeled with <sup>18</sup>O. The enrichment of <sup>18</sup>O and <sup>16</sup>O can be monitored by <sup>31</sup>P chemical shift owing to their isotope effects.

## 【序論】

酸素呼吸などによって生じた活性酸素はグアニン塩基に損傷を与え、GC-AT置換を引き起こす変異原 8-oxo-dGTP が生成される。また酸化損傷によるより強力な変異原として、近年 2-OH-dATP が報告されている。ヒト MTH1(hMTH1)は 8-oxo-dGTP や 2-OH-dATP を特異的に加水分解し、三リン酸体から一リン酸体にする事により、これら酸化損傷ヌクレオチドの二本鎖 DNA 中への取り込みを防ぐ酵素 (156 アミノ酸) である。最近パーキンソン病や肺癌といった疾患との関連が考えられ、その機能の重要性が示唆されている。我々はその分子認識や加水分解活性をより詳細に調べるため多次元 NMR を用いて hMTH1 の立体構造を決定した。さらに <sup>18</sup>O 付加による <sup>31</sup>P シグナルの同位体シフトを利用して、加水分解反応中に水が求核攻撃するリン酸基を同定した。

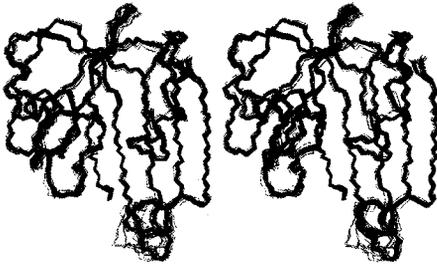
---

修復酵素、酸化損傷、<sup>18</sup>O、加水分解、水素結合の直接測定

みしままさき いとうのりゆき さかいやすなり かみやひろゆき なかべつぷゆうさく しらかわまさひろ

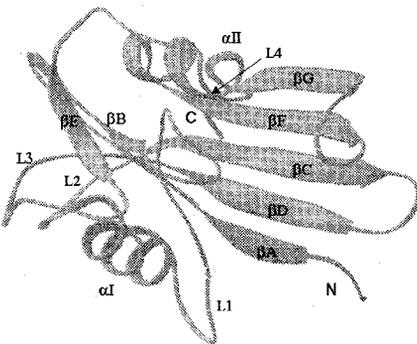
### 【立体構造】

NOE から 2043 個の距離情報、 $^3J_{\text{HNHa}}$  および Talos から 99 個の $\phi$ 角と 78 個の $\psi$ 角、さらに TROSY-HNCO から  $^3J_{\text{NC}}$ による 46 個の水素結合情報を収集し、CNS(ver. 1.0)を用いて構造計算をおこなった。その結果、ヒト MTH1 は A~G の 7 本の $\beta$ -ストランドと I~II の二本の $\alpha$ -ヘリックスからなる球状の蛋白質で、大腸菌のホモログである MutT の C 端にさらにストランド F、G を付加したトポロジーを持っていた(Fig. 1、2)。



**Fig. 1 Stereo view**

Superpositions of the backbone of 30 NMR derived structures of hMTH1(4-153) with lowest energy and no violations. They are aligned well with backbone atoms and nonhydrogen atoms 0.44 Å and 0.99 Å respectively relative to averaged structure.



**Fig. 2 Ribbon model of hMTH1**

The core of the protein is consisted of a mixed  $\beta$ -sheet, in which five long strands ( $\beta$ A, D, C, F, G) are sandwiched between two  $\alpha$ -helices.

The other short anti-parallel  $\beta$ -sheet ( $\beta$ B and  $\beta$ E) is connected by three long loops (L1, L3 and L4) and turn. The conserved sequence, Nudix motif (G37-L59), is located on loop1 and  $\alpha$ I region.

### 【基質認識】

現在までに MutT と AMPCPP との複合体構造が報告されているものの、AMPCPP が通常のアデニン塩基を持つため酸化損傷の認識は明らかになっていなかった。そこで hMTH1 と酸化損傷ヌクレオチドの相互作用を調べるため、8-oxo-dGTP と 2-OH-dADP をそれぞれ加えたときのアミド水素シグナルの化学シフト変化と広幅化を立体構造にマッピングした。ループ L1 ヘリックス I、ストランド A、ストランド D、ストランド C、ループ L4、ヘリックス II で構成される溝が大きな変化を示し、基質結合部位と推定された。この部位は AMPCPP が MutT に結合する部位とほぼ同じであった。溝の内側は主に疎水的な環境で、MutT-AMPCPP 中でアデニン塩基と相互作用する部位に立体構造上対応する付近には Lys-23, Phe-27, Asn-33 Trp-117 Asp-119 の側鎖が露出していた。現在のところ少なくとも Asp119, Trp117 が酸化損傷認識に関与する残基と考えられ、アミノ酸置換の実験からも裏付けられている。また MutT-AMPCPP 複合体中で糖に相互作用している Leu4, Phe27, Ile80 に立体構造上対応する残基は Arg5, Tyr7, Met81 であった(Fig. 3)。

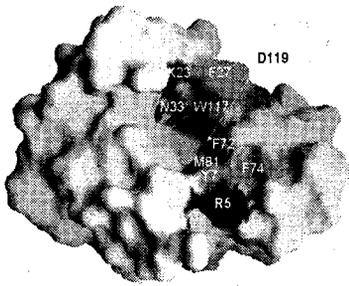


Fig. 3 Putative nucleotide binding site

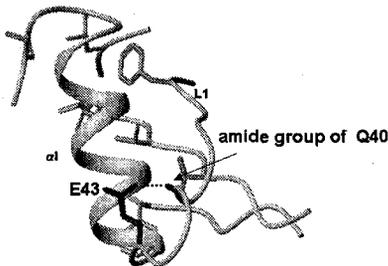


Fig. 4 The hydrogen bond between Q40 and E43

A conserved residue, Glu43, whose carboxyl group make hydrogen bond with amide group of Gln40. The hydrogen bond is depicted as dotted red line.

#### 【Nudix モチーフ】

ヒト MTH1 は活性部位に 23 残基からなる保存された配列 (GX<sub>5</sub>EX<sub>7</sub>REUXEEXGU: U は疎水残基) を持つ。この配列は hMTH1、MutT、ADPRase、ApnA hydrolase などに見つかっており Nudix モチーフとよばれている。保存された Glu52、Glu56、Glu55 はマグネシウムに配位すると考えられているが、保存された Glu43 の役割は今まで明らかになっていなかった。我々はスピン結合 <sup>3h</sup>J<sub>NC</sub> を利用し、Glu43 のカルボキシル基と Glu40 の主鎖アミドの間の水素結合を直接同定した(Fig. 4)。Glu40-Glu43 で構成される 4 残基の部分は i+2 番目の残基である Gly32 の二面角が正の値をとり、タイプ IIβ ターンを形成していた。コンセンサスではないものの Gly32 も比較的よく保存されており、このようなタイプ IIβ ターン構造は Nudix モチーフを有する酵素で共通に使われていると考えられる。また Nudix モチーフは Glu43-Glu40 の水素結合と保存された疎水残基を介して蛋白質中央部分に固定されていた(Fig. 4)。

#### 【加水分解メカニズム】

hMTH1 による酸化ヌクレオチドの加水分解反応において、水が求核攻撃部位するリン酸基として αリン酸もしくは βリン酸が考えられる(Fig. 5)。そこで <sup>18</sup>O ラベルされた水 (H<sub>2</sub><sup>18</sup>O) を含む反応液中で 8-oxo-dGTP の加水分解反応を行い水の攻撃部位を同定した(Weber, J.D. et al 1992)。反応生成物の <sup>31</sup>P NMR を測定したところ H<sub>2</sub><sup>18</sup>O を含まない反応液では 8-oxo-dGMP とピロリン酸が検出され、H<sub>2</sub><sup>18</sup>O を 48% 含む反応溶液の産物ではピロリン酸のリンのシグナルに水由来の <sup>18</sup>O による同位体シフトと思われる約 0.012 ppm 高磁場シフトしたシグナルが観測された(Fig. 6)。さらに H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 含有率が 24% の

反応液では高磁場シフトしたシグナルの高さが約半分になったことから、この高磁場シフトシグナルが  $^{18}\text{O}$  による同位体シフトによるものと考えられた。よって水由来の酸素がピロリン酸に付加したことから、加水分解反応では $\beta$ リン酸のリンに水が求核攻撃すると結論した(Fig. 6)。

$\beta$ リン酸基のリンは3つのリンの中でもっとも高磁場の化学シフトを示すことからわかる様に、他のリン酸基に比べて electron rich な環境下にあり、求核攻撃するのに最も不利な核である。このような不利な反応を敢えて行う点に興味を持たれる。

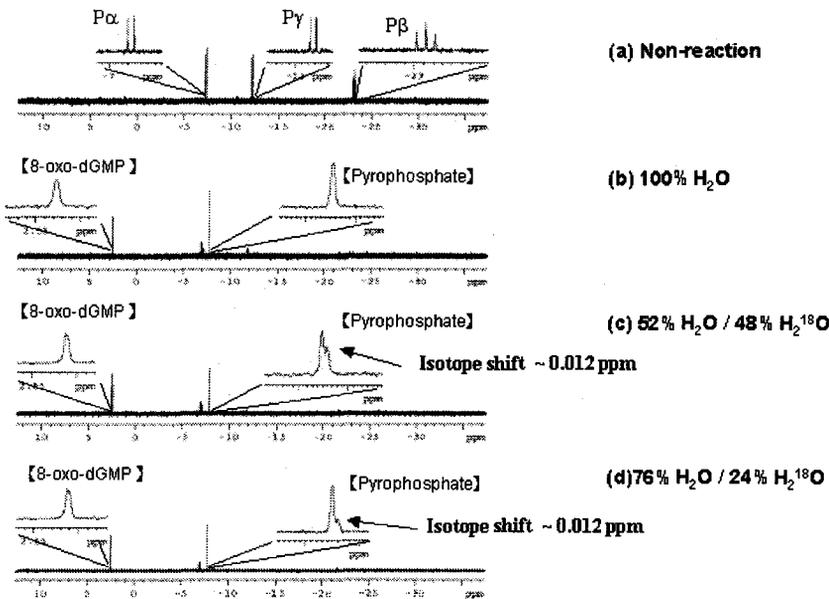
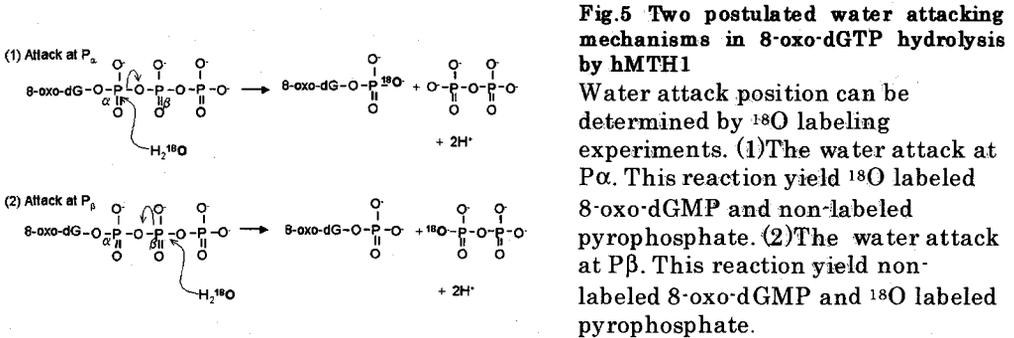


Fig. 6  $^{31}\text{P}$  spectra of products from enzymatic reaction under various conditions.

【参考文献】 Weber, J.D. et al *J. Biol. Chem.*(1992) 267 16939-16942

## 3 L6

NMRを用いた膜傷害性ペプチド・sapecinの機能発現機構の解明

(東大・院薬系<sup>1</sup>、三菱化学生命研<sup>2</sup>、理研・名取特別研究室<sup>3</sup>、産総研・JBIRC<sup>4</sup>)  
 竹内恒<sup>1</sup>、高橋栄夫<sup>4</sup>、須貝真理子<sup>2</sup>、河野俊之<sup>2</sup>、関水久<sup>1</sup>、名取俊二<sup>3</sup>、  
 ○嶋田 一夫<sup>1,4</sup>

### NMR Studies of Membrane Permeation Mechanism of Sapecin

<sup>1</sup>The University of Tokyo, <sup>2</sup>Mitubishi Kagaku Institute of Life Sciences, <sup>3</sup>The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), and <sup>4</sup>Japan Biological Informatics Research Center (JBIRC), AIST  
 Koh Takeuchi<sup>1</sup>, Hideo Takahashi<sup>1</sup>, Mariko Sugai<sup>2</sup>, Toshiyuki Kohno<sup>2</sup>, Kazuhisa Sekimizu<sup>1</sup>, Shunji Natori<sup>3</sup>,  
 and ○Ichio Shimada<sup>1,4</sup>

Sapecin is a member of insect defencin, which possesses specific binding to the membrane component of Gram-positive bacteria, cardiolipin (CL). The binding results in changing the permeability of the membrane and the death of the bacteria. In this paper, we study the membrane permeation mechanism of sapecin by using NMR along with site-specific amino acid substitution.

The dependency of the membrane permeation on sapecin concentration suggests that the permeation couples with multimerization of sapecin. Decreases of the H-D exchange rate for backbone amide protons caused by liposome binding are mainly observed for residues on one surface of sapecin (surface A), but a few for the opposite surface (surface B). Amino acid substitutions on surfaces A and B decrease the membrane binding and membrane permeation activity, respectively. From these results, we propose the membrane permeation mechanism of sapecin as follows. At the first step, sapecin binds on the membrane using surface A. And then sapecin multimerizes with each other using surface B, inducing the membrane permeation.

#### 【序】

Insect defencin は昆虫の感染防御機構における重要な位置を占める膜傷害性ペプチド群である。sapecin は 40 アミノ酸残基からなる insect defencin で、グラム陽性菌細胞膜中に多く含まれる酸性脂質：cardiolipin (CL) を介して細胞膜傷害活性を発揮することが知られている。本研究では、NMR 法を用いて sapecin-脂質二重膜複合体における相互作用界面残基の特定を行い、sapecin の CL 膜障害機構を分子論的に明らかにすることを目的とした。

#### 【方法と結果】

##### 1. sapecin の膜障害活性の測定

sapecin 添加に伴うグルコース封入りボソームからのグルコース漏出量を指標として sapecin の

Insect defencin、細胞膜障害機構、膜-膜蛋白質相互作用

たけうちこう、たかはしひでお、すがいまりこ、こうのとしゆき、せきみずかずひさ、なとりしゆんじ、しまだいちお

膜障害活性を測定した。膜障害の sapecin 濃度依存性を検討した結果、グルコースの漏出量は sapecin 濃度に対しシグモイド関数的に変化し、sapecin が互いに会合して膜障害活性を発揮することが示唆された。

## 2. 表面プラズモン (SPR) 法を用いた sapecin-CL 膜間の結合解析

sapecin の CL 膜に対する結合を SPR 法により速度論的に解析した。sapecin-CL 膜間結合の塩濃度依存性を検討した結果、NaCl 濃度を 100mM から 300mM に上昇させると結合速度定数が 20 倍遅くなるのに対し、解離速度定数は 2.4 倍の速くなるに留まった。以上の結果は sapecin-CL 膜間結合の  $k_{on}$  が sapecin の塩基性残基と CL のリン酸基間の静電相互作用により決定されていること、一方  $k_{off}$  は sapecin の疎水性残基と CL の脂肪族鎖間に疎水相互作用の影響を強く受けていることを示している。

## 3. 水素-重水素交換 (H-D 交換) 実験による sapecin の酸性脂質リポソーム相互作用残基の同定

NMR 法を用いて、CL 膜結合時、非結合時における主鎖アミドプロトンの H-D 交換速度を比較し、CL 膜結合に伴う相互作用により溶媒から遮蔽された残基を同定した。H-D 交換実験は  $^{15}\text{N}$  均一標識した sapecin を用い、 $\text{D}_2\text{O}$  中において CL リポソームと複合体を形成した膜結合状態と、CL リポソームを加えない非結合状態で行った。交換時間  $\tau$  の後、交換を凍結乾燥により停止し、氷冷した MeOH に再溶解することで交換を停止した状態でリポソームを破壊した。H-D 交換速度は MeOH 中において sapecin 主鎖 HN -  $^{15}\text{N}$  間の化学シフト相関ピークを選択的に観測することにより決定した。その結果、CL 膜結合時において非結合時より交換速度が 10 倍以上低下した 8 残基はすべて sapecin 構造上の一つの面(表面 A)の集中した。しかしその反対面(表面 B)にも膜結合状態において交換速度が 6 倍以上低下した残基 14 残基の内、3 残基が存在した。表面 A には塩基性残基 4 残基のうち 3 残基 (R26, K33, R39) が存在し、40%以上溶媒に露出した疎水性残基 (L5, I11, L21, Y29) が存在する。一方、表面 B には酸性残基 D4 が存在する。先の SPR 法による結合実験の結果を考え合わせると、塩基性残基が多い表面 A と負電化に富んだ CL 膜面が相互作用すると考えた。

## 4. sapecin 変異体を用いた CL 膜結合、傷害活性の測定

sapecin のリポソーム結合面と考えられる表面 A に対し部位特異的変異実験を行い、膜結合活性の変化を SPR 法により解析した。その結果、表面 A への変異 (L5A, I11A, H13A, L21A, R26A, Y29W, V35A, R39A) は全て膜結合活性の低下させた。さらに表面 B の膜傷害活性に対する寄与を明らかにするため、表面 B 上の荷電残基 D4、R23 に対し変異を導入し膜結合活性および膜傷害活性を測定した。その結果 D4A、R23A においては膜結合活性の変化以上に膜傷害活性が低下することが明らかとなった。

### 【結論】

H-D 交換実験および部位特異的変異実験の結果より、sapecin は、表面 A で CL 膜結合し、膜中においては表面 B で多量体形成して膜傷害活性を発揮していると考えた。

## リボソーム再生因子 (RRF) のダイナミクス

(阪大院薬) ○吉田卓也、岡伸一郎、内山進、中野博明、  
大久保忠恭、小林祐次

## Dynamics of Ribosome Recycling Factor

Takuya Yoshida, Shinichiro Oka, Susumu Uchiyama, Hiroaki Nakano,  
Tadayasu Ohkubo and Yuji Kobayashi

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University*

We have characterized the backbone dynamics of ribosome recycling factors (RRFs) from *Escherichia coli* and *Thermotoga maritima* by NMR  $^{15}\text{N}$  relaxation studies. Since RRF is not a spherical molecule, we analyzed the observed  $^{15}\text{N}$   $T_1$ ,  $T_2$  and steady-state NOE using an anisotropic extension of the Lipari-Szabo spectral density function. At 30 °C, the mean value of order parameter ( $S_0^2$ ) for domain I of *E. coli* RRF was similar to that of RRF from *T. maritima*, which is a hyperthermophilic bacterium. In contrast to domain I, the mean  $S_0^2$  value for domain II of *E. coli* RRF was substantially lower than that of *T. maritima* RRF. The difference in the  $S_0^2$  values indicates that domain II of *E. coli* RRF has higher mobility than that of *T. maritima*.

リボソーム再生因子(RRF)は、原核生物において翻訳終結後のリボソーム複合体を解離させるために不可欠な分子量 22kDa のタンパク質因子である。合成したタンパク質を遊離したリボソームはリボソーム・mRNA・tRNA の複合体となっており、この複合体を解体し再利用する過程は、効率のよいタンパク質合成のために重要であると考えられる。RRF はその活性発現に EF-G および GTP を必要とすることは知られているが、詳細な作用機構については不明な点が多い。我々は RRF のリボソーム再生機構について知見を得るため、NMR を用いた解析を続けており、昨年の本討論会では超好熱菌由来 RRF の溶液中での立体構造を報告した(1)。RRF 分子は特徴的なL字型をしており、Lの縦線に相当するドメイン I は3本の $\alpha$ ヘリックスからなる逆並行ヘリックスバンドル構造からなっている。またLの横線に相当するドメイン II は1本の $\alpha$ ヘリックス並

多核多次元 NMR、立体構造、運動性、リボソーム再生因子

よしだたくや、おかしんいちろう、うちやますすむ、なかのひろあき、  
おおくぼただやす、こばやしゆうじ

びにそれぞれ2および4ストランドからなる2つの逆並行 $\beta$ シートによって形成されている。分子全体の形・大きさは tRNA と非常によく似ており、これは RRF が tRNA と同様なかたちでリボソームと相互作用する可能性を示している。最近、RRF の機能発現に、2つのドメインを結ぶヒンジ領域のフレキシビリティが重要であることが示唆されている。超好熱菌である *T. maritima* 由来 RRF は、大腸菌のリボソームと結合する一方で、リサイクル活性を示さない。また、好熱菌である *T. thermophilus* 由来 RRF の野生型は大腸菌内で活性を示さないが、ヒンジ部分に変異を導入することで、活性を獲得することが報告されている。これらの知見は、RRF のリサイクル活性に、ヒンジ部分の適度なフレキシビリティが必要であることを示唆している。そこで今回我々は、*E. coli*、*T. maritima* 及びそれらの変異体について、NMR 緩和時間測定によって分子内運動を解析することを試みた。

$^{15}\text{N}$  標識した RRF 分子について、 $30^\circ\text{C}$ における $^{15}\text{N}$ 核の縦緩和時間  $T_1$ 、横緩和時間  $T_2$  及び $^1\text{H}$ との NOE を測定した。RRF 分子はその形状から、回転拡散の異方性が大きく分子全体を単一の相関時間で表すことができない。そこで、既に決定されている結晶構造を用い、まず回転拡散テンソルを求めた。その際ドメインごとに回転拡散テンソルの主軸を決定し、それを一致させることによって、溶液内における RRF 分子のドメイン配置を得た。次に、Model-Free パラメータを決定することによって分子内運動を見積もることを試みたが、通常の Lipari-Szabo 型スペクトル密度関数では、得られた実験値をよく再現できなかった。そこで、ドメインの相対配置の揺らぎを表現するため、分子全体の遅い回転拡散及び局所的な速い運動に加えて、その中程度のタイムスケールを表す項を用いて解析を行ったところ、観測値をより良く再現できることがわかった。またこのドメイン運動に相当すると考えられるタイムスケールのオーダーパラメータを *E. coli* と *T. maritima* で比較したところ、ドメイン II について、*E. coli* の値は *T. maritima* の値より有意に小さく、従ってドメインの相対配置の揺らぎは好熱菌由来 RRF では常温菌由来 RRF より小さいことが示唆された。このことは、RRF のリサイクル活性に、ヒンジ部分の適度なフレキシビリティが必要であるという仮説を支持するものである。現在 RRF のリサイクル活性とドメイン運動との相関を明らかにするため、ヒンジ部分のフレキシビリティを変化させるような変異体を作成し、NMR による解析を進めている。

(1) Yoshida, T. et al. *Biochemistry*, **40**, 2387-2396

RNA 結合蛋白質におけるダイナミクスと結合能の相関  
 (横浜国大院・環境情報) 宮の入洋平、渡辺道直、榎園能章、  
 宮下博之、池田哲郎、上杉晴一、○片平正人

**Correlation between dynamics and affinity of RNA-binding proteins**

(Grad. Sch. of Env. & Info. Sci., Yokohama Natl. Univ.) Youhei Miyanoiri, Michinao Watanabe, Yoshiaki Enokizono, Hiroyuki Miyashita, Tetsuro Ikeda, Seiichi Uesugi & Masato Katahira

Changes in the backbone dynamics of the second RNA-binding domain (RBD2) of hnRNP D (AUF1) upon complex formation with the target nucleic acid were examined by means of model free analysis of relaxation data. In free RBD2, the  $\beta 4'$  to  $\beta 4$  region exhibits slow conformational exchange on the milli- to microsecond time scale. The exchange is quenched upon complex formation. The flexibility of free RBD2 may be utilized in the recognition process by allowing different conformational states to be accessed and facilitating induced fit. The structure of DNA containing four tandem repeats of a GGA triplet sequence has been determined. It folds into an intramolecular quadruplex composed of a G:G:G:G tetrad and a G(:A):G(:A):G(:A):G heptad. Two quadruplexes form a dimer stabilized through a stacking interaction between the heptads of the two quadruplexes.

[序] hnRNP D (AUF1)タンパク質は、1本鎖のRNA及びDNAに配列特異的に結合し、mRNAのスプライシングやデグラデーション、さらにはテロメアDNAの維持への関与等が、実証もしくは示唆されている。一方Musashiタンパク質は、標的mRNAの3'非翻訳領域に結合して、この遺伝子の発現を抑制することで、神経細胞の非対称分裂を制御している。両タンパク質は、RRM型の核酸結合ドメインを2個有している(RBD1、RBD2)。我々は両タンパク質の合計4個のRBDに関して、立体構造の決定、核酸との相互作用の解析を行い、標的核酸認識の仕組みに迫ってきた(1-3)。今回は緩和データーのモデルフリー解析により、両タンパク質の核酸結合ドメインのダイナミクスを明らかにし、ダイナミクスが標的核酸の認識において果たす役割を考察した(3及び投稿準備中)。またGGAトリプレットリピートDNAが、特異な高次構造を形成する事を最近明らかにしたので(4)、これについても報告する。

[結果と考察]

① hnRNP D hnRNP DのRBD2に関して、タンパク質単独の時と、標的核酸と結合した時について、ダイナミクスを解析した。まず $T_1/T_2$ の解析より、分子全体の回転拡散は、axially symmetricである事が分かった。次にモデルフリー解析より、RBD2は、タンパク質単体の

ダイナミクス、化学交換、立体構造、RNA結合蛋白質、核酸-蛋白質相互作用

みやのいりようへい、わたなべみちなお、えのきぞのよしあき、みやしたひろゆき、いけだてつろう、うえすぎせいいち、かたひらまさと

時には、核酸との相互作用部位 ( $\beta 4'$  から  $\beta 4$  領域) において、ミリ秒からマイクロ秒のゆらぎを有しているが、標的核酸と複合体を形成すると、このゆらぎは消滅する事が分かった。これは、単体におけるゆらぎが、標的核酸を効率よく見つけ出し、さらに誘導適合により強固に結合するのに、有効に利用されている事を示していると考えられる。同じ RRM 型の U1A タンパク質においても、複合体形成に伴うゆらぎの消失が報告されているが、hnRNP D0 とは、部位が異なっている。両部位に共通しているのは、核酸との相互作用部位であるという点である。即ち RRM 型のタンパク質はよく似た全体構造を有しているが、標的核酸との相互作用様式の違いを反映して、各タンパク質に固有のダイナミクスを呈する事が分かった。

なお、hnRNP D の複合体の詳細な構造解析はこれまで困難であったが、標的核酸の 1 残基置換体を 6 種作成・利用する事と、安定同位体標識した標的核酸を用いる事で、相互作用に関する知見を得つつある。

② Musashi Musashi タンパク質の両 RBD は似た構造をしているが、標的 RNA への結合能は、RBD1 の方が RBD2 より、はるかに高い。先と同様な方法で両ドメインのダイナミクスを比較したところ、RBD1 は RBD2 に比べ、ミリ秒からマイクロ秒の遅いゆらぎ、及びナノ秒からピコ秒の早い運動の両者に富んでいる事が分かった。このダイナミクスの違いが、結合能の差をもたらしている可能性がある。

両 RBD を連結すると、結合能はさらに高くなる。RBD1 と RBD2 の連結体と RNA との相互作用を、ケミカルシフトパータベーションにより解析した。各 RBD 単独で見られた RNA との相互作用様式は、連結体においても各々保持されている事が分かった。これに加え、両 RBD の連結部においても相互作用が見られた。

③ GGA リピート 3 残基からなる特定の塩基配列が何回も繰り返したものを、トリプレットリピートという。いくつかのトリプレットリピートは、病気との関連が知られている。我々は GGA の繰り返しからなる DNA が、生理的条件下で特異な高次構造を形成する事を明らかにした。GGA の 4 回繰り返しからなる DNA は、4 つのグアニン塩基が同一平面に配置したテトラッドと、4 つのグアニン塩基と 3 つのアデニン塩基の合計 7 つが同一平面に配置したヘプタッドからなる分子内 4 重鎖を形成し、さらにそれが 2 分子会合した構造をとる。なお 2 量体の構造計算にあたって、分子内と分子間の NOE を区別するのに、X-PLOR の SUM オプションを用いた。この構造は非常に安定で (熱融解点  $90^{\circ}\text{C}$ )、相補鎖を加えても 2 重鎖には移行しない。この特異な構造の生物学的な意義を考察する。

- (1) Nagata, T., Kurihara, Y., Matsuda, G., Saeki, J., Kohno, T., Yanagida, Y., Ishikawa, F., Uesugi, S. and Katahira, M. (1999) *J. Mol. Biol.*, **287**, 221-237.
- (2) Nagata, T., Kanno, R., Kurihara, Y., Uesugi, S., Imai, T., Sakakibara, S., Okano, H. and Katahira, M. (1999) *J. Mol. Biol.*, **287**, 315-330.
- (3) Katahira, M., Miyanoiri, Y., Enokizono, Y., Matsuda, G., Nagata, T., Ishikawa, F. and Uesugi, S. (2001) *J. Mol. Biol.*, **311**, 973-988.
- (4) Matsugami, A., Ouhashi, K., Kanagawa, M., Liu, H., Kanagawa, Uesugi, S. and Katahira, M. (2001) *J. Mol. Biol.*, in press

新規ドメイン PC motif-containing region (PCCR) の  
立体構造と PB1 ドメイン認識機構

(<sup>1</sup>北大・院薬、<sup>2</sup>都臨床研、<sup>3</sup>九大・生体防御医研、<sup>4</sup>金沢大・がん研、  
<sup>5</sup>CREST/JST)

○吉永壮佐<sup>1</sup>、寺沢宏明<sup>2</sup>、野田祐紀子<sup>3</sup>、伊藤隆司<sup>4</sup>、横地政志<sup>5</sup>、小椋賢治<sup>1</sup>、  
住本英樹<sup>3,5</sup>、稲垣冬彦<sup>1,5</sup>

**Solution structure of a novel domain, PC motif-containing region (PCCR)  
and structural basis for the interaction with the PB1 domain**

(<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,  
<sup>2</sup>Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,  
<sup>3</sup>Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University,  
<sup>4</sup>Cancer Research Institute, Kanazawa University, <sup>5</sup>CREST/JST)

○ Sosuke Yoshinaga<sup>1</sup>, Hiroaki Terasawa<sup>2</sup>, Yukiko Noda<sup>3</sup>, Takashi Ito<sup>4</sup>, Masashi Yokochi<sup>5</sup>,  
Kenji Ogura<sup>1</sup>, Hideki Sumimoto<sup>3,5</sup>, Fuyuhiko Inagaki<sup>1,5</sup>

The PC (Phox and Cdc24p) motif consists of about 20 amino acid residues with highly conserved acidic and hydrophobic residues. It is evolutionarily conserved together with the PB1 (Phox and Bem1p) domain, which recognizes the PC motif. But a wider region (PCCR) including 80-100 amino acid residues is required for the interaction with the PB1 domain. The structural basis for the interaction between the PB1 domain and the PCCR is demanding, because those are novel modules used for the intracellular signal transduction. Previously we reported the solution structure of the PB1 domain of Bem1p, and now report that of the PCCR of Cdc24p (Bem1p and Cdc24p are required for the cell polarization in budding yeast). We suggest the structural basis for the interaction by the chemical shift perturbations and mutational effects upon PB1-PCCR complex formation.

【はじめに】

PC (Phox and Cdc24p) モチーフは、酸性残基と疎水性残基が特徴的に並ぶ約 20 残基のアミノ酸相同配列で、これを認識する PB1 (Phox and Bem1p) ドメインと共に進化的に保存されている (Fig.1)。しかし、PC モチーフのみでは PB1 ドメインと結合できず、その前後の領域を含む 80-100 残基程度の領域 (PCCR) が必要であることがわかっている。PB1 ドメインと PCCR は細胞内シグナル伝達を担う新規のタンパク質モジュールであることから、その相互認識機構を解明することは重要である。

我々はすでに出芽酵母の細胞極性決定に関与する Bem1p の PB1 ドメインの立体構造を決定し本会にて報告しているが、今回その結合相手 Cdc24p に含まれる PCCR の立体構造を NMR 法にて明らかにした。さらに、滴定実験による化学シフト変化および変異実験による結果と合わせて、PB1 ドメインと PCCR の結合様式を考察する。

キーワード：PC モチーフ、PB1 ドメイン、Cdc24p、細胞極性、phox

氏名：○よしながそうすけ、てらさわひろあき、のだゆきこ、いとうたかし、よこちまさし、  
おぐらけんじ、すみもとひでき、いながきふゆひこ

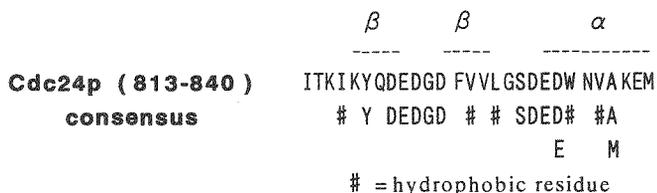
【方法】

Cdc24p の PCCR および Bem1p の PB1 ドメインは、大腸菌の系を用いて発現させた。<sup>15</sup>N または <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識体は、M9 培地にて取得した。複数のクロマトグラフィーにより精製した試料について、UNITY plus 600 および UNITY INOVA 500 を用いて多核多次元 NMR の測定を行った。信号の帰属には、自家製の帰属支援ソフト Olivia を用いた。得られた NOE に基づく距離情報は 1078 個、二面角情報は 44 個、21 個の水素結合に基づく距離情報は 42 個であった。CNS を用いて simulated annealing 法により構造計算を行いながら、ARIA を用いて ambiguous NOE peak を帰属し、立体構造を決定した。滴定実験では、<sup>15</sup>N 標識した一方のタンパク質に対して無標識のもう一方のタンパク質を滴定し、2D <sup>1</sup>H {<sup>15</sup>N} HSQC スペクトルで検知した。

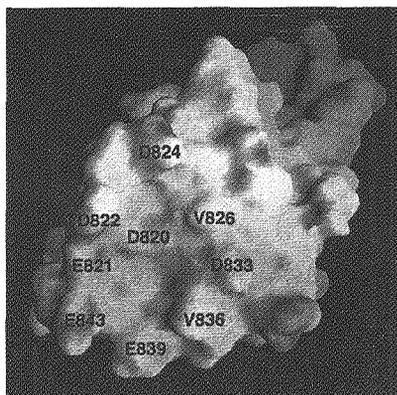
【結果と考察】

Cdc24p の PCCR は、αヘリックス 2 本とβシート 1 枚からなるユビキチン様の立体構造を持ち、PC モチーフ部分はββαの二次構造をとっていた (Fig.1)。保存された Tyr818 がその構造コアとなつて Phe825 とともにβシートに歪みを生じさせていることと、DEDGD の配列でタイプ I+ G1 βバルジ型のβヘアピンを形成していることによつてくぼみができ、縁に酸性残基が位置して溶媒側に提示されるようになっていた (Fig.2)。これらの酸性残基は滴定実験および変異実験による結果から結合に必須であることが分かつており、PB1 ドメインの保存された塩基性残基と静電相互作用することが予想される。PC モチーフの前後の領域は、PC モチーフのコンフォメーションを裏打ちして安定化するため、さらには他のタンパク質と相互作用するために必要であると考えられる。

また、Dali を用いた結果、PCCR の立体構造は結合相手である Bem1p の PB1 ドメインに相同性を有することが分かった。しかし、Bem1p の PB1 ドメインにおいて PC モチーフに相当する部分には数残基欠陥があつて flexible linker が存在し、また PCCR との相互作用面の反対側となることから、PCCR は PB1 ドメインと異なる相互作用面を持つ新機能ドメインであると考えられる。立体構造に相同性のあるドメイン同士が相互作用する点で大変興味深い。



(Fig.1) Secondary structure of the PC motif of Cdc24p and consensus sequence



(Fig.2) Electrostatic surface potential and putative PB1 binding site of Cdc24p PCCR (GRASP)

## 3 L10

## リゾチーム変異体 2SS[6-127,30-115]のNMRによる構造解析

関西学院大学・理学部、神戸大学・理学部<sup>2</sup>○野田 康夫、宮内弘世、平井健一、坂本恵子、橘 秀樹<sup>2</sup>、  
瀬川 新一

Structure analysis of hen lysozyme 2SS variant : 2SS[6-127,30-115] by NMR spectroscopy.

School of Science, Kwansai Gakuin University and Faculty of Science, Kobe University<sup>2</sup>.○Yasuo Noda, Hiroyo Miyauchi, Kenichi Hirai, Keiko Sakamoto, Hideki Tachibana<sup>2</sup>, Shin-ichi Segawa.

The <sup>15</sup>N-labeled two-disulfide variant of hen lysozyme was prepared by the amino acid substitution: 2SS[6-127, 30-115]. This variant contains two disulfide bridges in the  $\alpha$ -domain. Resonance assignments were performed using 3D TOCSY-HSQC and NOESY-HSQC spectra. The <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H-HSQC spectrum of 2SS[6-127, 30-115] was similar to that of recombinant lysozyme as a whole, although a number of cross peaks disappeared in comparison with the latter. The structure of 2SS[6-127, 30-115] was thoroughly examined based on NOE contacts determined by NMR spectroscopy. The structure of  $\alpha$ -domain was almost identical with that of authentic lysozyme, while the  $\beta$ -domain was largely unstructured.

【序論】 タンパク質の折りたたみ機構を考える際、折りたたみ中間体の構造は重要である。しかし折りたたみ過程の中間体を平衡状態として捕らえることは非常に難しい。なぜなら、折りたたみ過程は非常に速いからである。そこで我々は分子内のSS結合を欠損させることにより、SS結合再生反応中間体を作り出した。具体的には、天然卵白リゾチームの分子内にはSS1(C6-C127)、SS2(C30-C115)、SS3(C64-C80)、SS4(C76-C94)という4本のSS結合が存在する。我々は今まで1本のSS結合が欠損されたリゾチーム3種を研究してきた。それらのNMR測定を行い、主鎖ピークのケミカルシフト差、NOE交差ピーク、主鎖アミドプロトンの重水素交換反応速度からSS結合欠損体の構造について考察した。今回は、2本のSS結合を欠損したりゾチーム変異体、すなわち、 $\alpha$ ドメイン内に2本のSS結合を有する2SS[6-127,30-115]について研究を行った。また比較参考のため $\beta$ ドメイン内に2本のSS結合を有する2SS[64-80,76-94]も実験を行っている。

リゾチーム、SS結合再生反応中間体、Protein folding、水素交換反応速度、構造のゆらぎ

のだやすお、みやうちひろよ、ひらいけんいち、さかもとけいこ、  
たちばなひでき、せがわしんいち

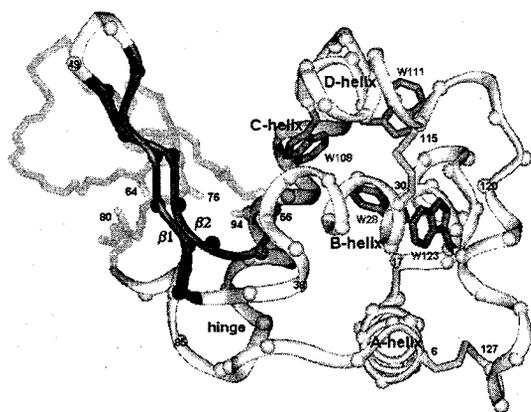


Fig. 1: Ribbon diagram of 2SS-variant of hen lysozyme: 2SS[6-127, 30-115], produced by Insight II based on the X-ray crystallographic structure (PDB 6LYZ). The portion of polypeptide chain that is folded into the native-like structure is depicted by a ribbon. Balls on the ribbon indicate the position of C $\alpha$ . Two disulfide bridges, C6-C127 and C30-C115 exist in the  $\alpha$ -domain. Four Trp residues lies in the center of four  $\alpha$ -helix in the  $\alpha$ -domain (W28, W108, W111 and W123). C-helix is colored light gray.  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-strands are colored gray. Transparent sticks represent the portion of unstructured polypeptide chain ranging from 57 to 82. Short sticks out of the backbone indicate the positions of Cys64, Cys76, Cys80 and Cys94 replaced by Ala.

リゾチーム分子内の1本のSS結合が欠損したリゾチーム変異体3種の立体構造をNMR分光法によって詳細に研究した結果を昨年の本討論会において報告した。SS結合欠損部位の局所的な構造には変化が生じるものの、4種の3SS変異体の立体構造は基本的には天然4SS体のものとほぼ変わらなかった。そこでさらに大きな構造変化を引き出すために、2本のSS結合を欠損させた2種類の2SS変異体の立体構造をNMR分光法によって詳細に解析することを試みた。

【方法】 はじめに、天然4SS体のmetLYZ(N末端にMet残基が付加している)と2SS変異体(2SS[6-127,30-115];C6-C127とC30-C115の2本のSS結合を保持するもの、2SS[64-80,76-94];C64-C80、C76-C94保持)の $^{15}\text{N}$ 置換試料を作製した。metLYZと2SS[6-127,30-115]は約1.2mM程度の濃度まで溶解した。pH3.8、25°CでNMR測定を行った。Bruker社製Avance DRX600 NMR分光器を用いて、2D DQF-COSY、NOESY、HOHAHA、 $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -HSQCおよび3D TOCSY-HSQC、NOESY-HSQCスペクトルを測定した。また同様に $\beta$ ドメイン内に2本のSS結合を有する2SS[64-80,76-94]についても同様の実験を行った。

【結果】 CDスペクトルの測定から、上記の溶媒条件によって2SS[6-127,30-115]には明瞭な立体構造が存在し、一方2SS[64-80,76-94]では秩序構造が失われていることが報告されてきた。CDスペクトルからは立体構造の詳細についての情報が得られないので、2SS[6-127,30-115]のNMRによる構造解析を試みた。まずはじめにピークの帰属を行った結果、ループ領域に含まれる約20残基を除いて、側鎖プロトンも含めた多数のプロトンの共鳴周波数を定めることができた(BMRB accession number 5069)。2SS[6-127,30-115]の主鎖HN,H $\alpha$

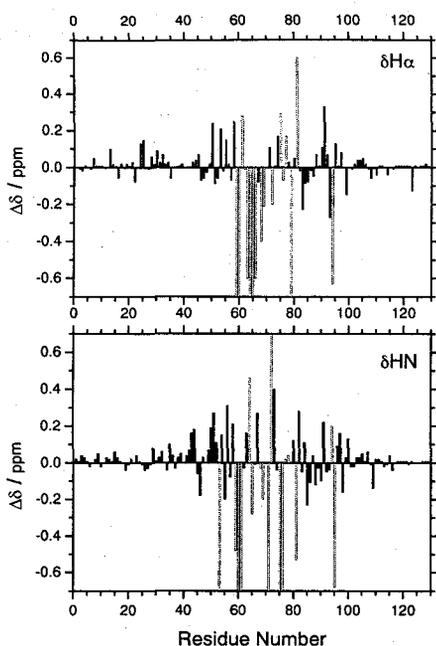


Fig. 2: Differences in chemical shift values ( $\Delta\delta$ ) between 2SS[6-127,30-115] and metLYZ at 25° C for H $\alpha$  and HN.  $\Delta\delta = \delta_{\text{met}} - \delta_{2\text{ss}}$  is plotted versus amino acid residue number. Chemical shift perturbation is very small in the region of residues 1-40 and 101-129. Since resonance frequencies of HN and H $\alpha$  could not be determined in the region of residues 59-81, long grayish lines are drawn to imply considerable perturbation in resonance frequencies.

プロトンのケミカルシフトを天然 4SS 型の metLYZ のものと比較すると、 $\alpha$ ドメインに存在する残基に対してはケミカルシフト値の差が非常に小さかった。一方  $\beta$ ドメインにおいては残基 58-82 にかけて Short-range の NOE 相関が欠落する部位が多発し、多数の残基に対して主鎖プロトンの帰属ができなかった (Fig. 2)。一方、2SS[64-80,76-94]の HSQC スペクトルは、HN の化学シフト値が 8.2 近傍に集中したランダムコイル特有のスペクトルが観測された。これらのピークの解析はまだ完成していない。変異体 2SS[6-127,30-115]の立体構造を詳細に解析するために Long-range NOE を残基番号に対してプロットした NOE 接触マップ (Fig. 3) を描いた。Fig. 3 の対角線から下半分は 4SS 体の metLYZ に対する Long-range NOE マップである。上半分が 2SS[6-127,30-115]のものである。リゾチームの立体構造を 3 つに分割し、残基 1-39 を N 端  $\alpha$ ドメイン、88-129 を C 端  $\alpha$ ドメイン、40-87 を  $\beta$ ドメインと名づけると、N 端  $\alpha$ ドメインと C 端  $\alpha$ ドメイン内の NOE マップは対角線に対してほぼ対称である。さらに 2SS 変異体においても N 端  $\alpha$ ドメインと C 端  $\alpha$ ドメイン間の NOE 接触も非常によく保存されている (図中 I<sub>88</sub>-A, C-J<sub>AB</sub>, B-D, ct<sub>310</sub>-B と略称した部分)。すなわち 2SS[6-127,30-115]において、その  $\alpha$ ドメインは天然 4SS 体のものと非常に良く似た立体構造をとっていることが分かった。一方  $\beta$ ドメインは多数の NOE 接触がほとんど失われている。2SS 変異体の  $\beta$ ドメイン構造が大きく乱れていることは明らかである。しかし興味深い事実とは  $\beta$ 1 鎖(41-46)と  $\beta$ 2 鎖(50-54)の NOE 接触および tn<sub>55</sub>-B と略称した部分の NOE が明瞭に確認されることである。すなわち残基 41-54 の部分は反平行  $\beta$ シートを形成し、その端にある I<sub>55</sub> と L<sub>56</sub> 残基を

B ヘリックス端の残基(A32,S36,F38,N39)と強く結合させている。また C-J<sub>AB</sub>の部分の NOE 接触は、C ヘリックスの片側に並ぶ残基 I88,V92,K96,V99 と N 端  $\alpha$  ドメインの中心部に強く結合し、 $\alpha$  ドメインの疎水性コアを形成していることを意味している。この C ヘリックスの結合は、 $\beta$  ドメインの C 末端部(残基 87 領域)を再びヒンジ領域に連結し、 $\beta$  ドメイン上部のループ部分がランダムコイル状でも、 $\beta$  シート基底を  $\alpha$  ドメインにしっかり固定する役割をしている。我々は、残基 40~99( $\beta$  ドメインと C ヘリックス)領域の持つ上述の潜在的構造形成能が、リゾチームの立体構造形成にとって非常に重要であるという結論を得た。

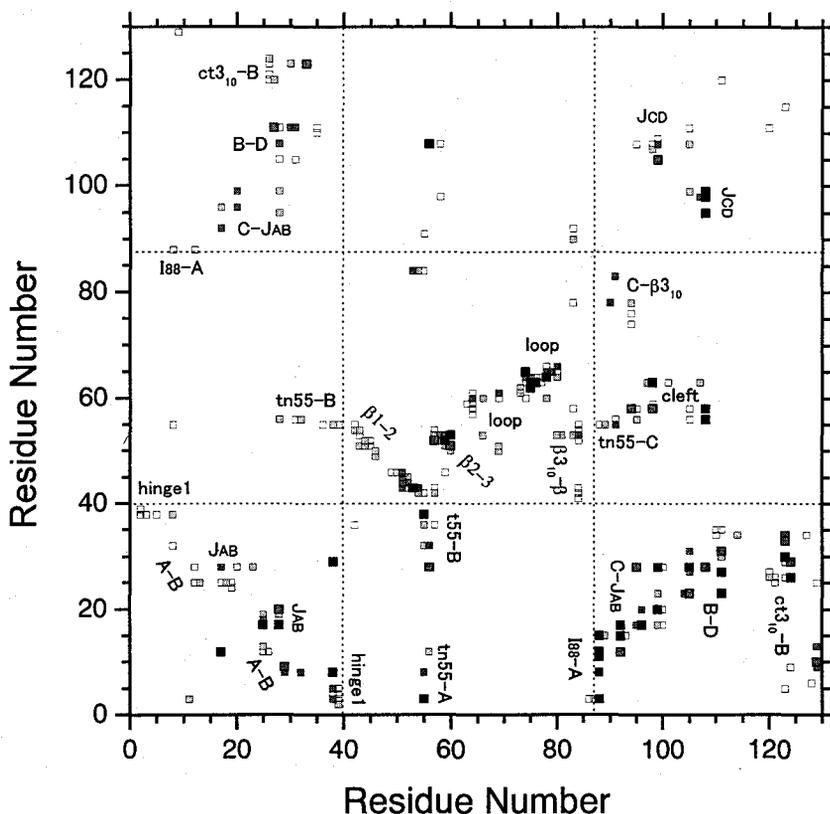


Fig. 3: Long-range NOE contacts map. A map below the diagonal represents the NOE contacts within metLYZ, a map above the diagonal within 2SS[6-127, 30-115]. In each map, a square indicates a long-range NOE connectivity observed between backbone and side-chain protons of the  $i$ -th residue and those of the  $j$ -th residue, where  $|i-j| \geq 5$ . The size and color of symbol varies according to the total number of observed NOE connectivities. 1:open square, 2-3:gray, 4-5:larger gray, over 6:larger filled. Long-range NOE contacts are classified into some groups and labeled as follows. A-B: between A-helix (4-15) and B-helix (24-36), J<sub>AB</sub>: the joint (16-23), hinge1: residues 38-40,  $\beta$ 1-2: between  $\beta$ 1(41-46) and  $\beta$ 2(50-54),  $\beta$ 2-3: between  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3(57-61), tn55-A (or tn55-B or tn55-C): between the turn 55-56 and A-helix (or B- or C-helix), loop: residues 62-79,  $\beta$ 3<sub>10</sub>- $\beta$ : between  $\beta$ 3<sub>10</sub>-helix in  $\beta$ -domain and  $\beta$ -sheet, I88-A: between I88 and A-helix, C-J<sub>AB</sub>: between C-helix (89-99) and joint J<sub>AB</sub>, B-D: between helix B and helix D (108-115), ct3<sub>10</sub>-B: between C-terminal  $\beta$ 3<sub>10</sub>-helix (120-124) and B-helix, J<sub>CD</sub>: the joint (100-107), cleft: between  $\beta$ 3 and J<sub>CD</sub>.

Human Lysozymeの構造と運動に与える低温効果の解析

(北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻<sup>1</sup>、富山医科薬科大学<sup>2</sup>、  
千葉工業試験場<sup>3</sup>、産業技術総合研究所<sup>4</sup>、バリアンジャパン<sup>5</sup>)

○久米田博之<sup>1</sup>、三浦和紀<sup>2</sup>、小橋川敬博<sup>1</sup>、岡 千寿<sup>3</sup>、  
三浦 愛<sup>4</sup>、根本暢明<sup>5</sup>、新田勝利<sup>1</sup>、津田 栄<sup>4</sup>

Low-temperature-induced effects in human lysozyme elucidated  
by three-dimensional NMR spectroscopy.

Division of Biological sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, Faculty of  
Pharmaceutical Science<sup>1</sup>, Toyama Medical and Pharmaceutical University<sup>2</sup>, Industrial  
Research Institute of Chiba Prefecture<sup>3</sup>, Structural Biology Research Group, Research  
Institute of Biological Resources, National Institute of Advanced Industrial Science and  
Technology (AIST)<sup>4</sup>, Varian Technologies Japan LTD.<sup>5</sup>.

The 3D-structure and dynamics of human lysozyme at 35° and 4°C was determined, to clarify the effect of the low-temperature-induced structural changes on enzymatic function. Three-dimensional structures of human lysozyme at both temperatures had same secondary motif each other and the X-ray structure. The surface area and volume was decreased with temperature lowering. In detail, the D-helices region (110-115) was moved to molecular inside. From 15N relaxation data, overall flexibility was decreased with chilling, but the mobility of some residue was increased. In this presentation, we proposed discussion of relationships these structural results and the effect on enzymatic function.

【序】低温環境下で機能する酵素または蛋白質のデザインのために、蛋白質三次元構造やダイナミクスが温度低下によってどのように変化するかを明らかにすることは非常に重要である。今までに我々は、筋肉蛋白質トルポニンCをモデルとして温度降下(30°C→4°C)による構造への影響を検討し、蝶番領域(Hinge-region)の構造変化による活性部位構造の変化及び、蛋白質分子内の空隙(Cavity)の減少を確認した。また、他の蛋白質において、温度低下によりCavityが減少することが断熱圧縮率計を用いた実験から報告されている。また、低温感受性残基の特定は、低温下高機能蛋白質の変異創出のための重要な足がかりとなる。今回我々は、ヒトリゾチームを新たに選択し、高次構造および運動性が常温(35°C)と氷温(4°C)とでどのように異なるのかを多次元NMR法を用いて解析した。

【実験】ヒトリゾチームはメタノール酵母を用いた発現系を用いた[Oka et al., 1999]。15Nラベル体と13C/15Nダブルラベル体は、15Nラベル(NH3)2SO4、13CラベルCH3OHを用いて得た。各種NMR測定は試料2 mM、pH3.6、35°Cまたは4°C、

キーワード：多次元NMR、15N-リラクゼーション、ヒトリゾチーム、低温効果

研究者名：くめたひろゆき、みうらかずのり、こばしがわよしひろ、おかちとし、みうらあい、ねもとのぶあき、にったかつとし、つださかえ

10%重水中にて、VarianUnityInova500を用いて行った。多次元NMR信号処理はNMRPipeにより行い、シグナルの帰属はPIPPソフト群により行った。構造計算にはXPLORv3.851を用いた。

**【結果】** 三次元NMRの手法であるCBCACONNH、HNCACB、HNCO、HCCH-TOCSY、<sup>13</sup>C-edited NOESY、mother NOESY、<sup>15</sup>N-edited TOCSY/NOESY、HNHAを用いて、35℃および4℃についてSer<sup>82</sup>のCβを除く130残基すべての主鎖原子及びCβ、Hβを帰属した。構造決定には、35℃、4℃それぞれ、1371、1679個の2点間距離情報(NOE)、96、63個の二面角情報を用いた。決定された構造をFig.1に示す。今回決定した構造は全体としてX線結晶構造解析で決定された構造と同じであった。次に35℃と4℃における溶液構造を比較

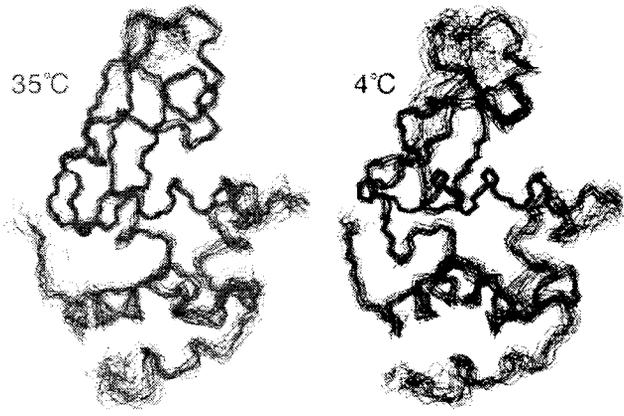


Fig.1: Solution structure of human lysozyme at 35° and 4°C. The backbone atoms of the family of 20 structures are super imposed.

Table 1: Comparison of structures at 35° and 4°C

	35°C	4°C
accessible surface area (Å <sup>2</sup> )	7152.88±127.12	6676.49±102.52
Total volume (Å <sup>3</sup> )	15228.25±150.06	14262.11±401.00*
Inter helical angles (deg)*		
A B	122 ± 3	130 ± 4
A C	79 ± 3	73 ± 3
A D	120 ± 8	119 ± 6
B C	105 ± 3	111 ± 2
B D	115 ± 7	108 ± 5
C D	92 ± 4	75 ± 4

\*A helics (5-14), B helics (25-35), C helics (90-99), D helics (110-115)

した(Table1、Fig.2)。温度低下によって、分子表面積及び体積は減少した。これは、断熱圧縮率計を用いた実験結果と適合する。また、高次構造では、Dヘリックス領域(110~115)が温度低下に伴い、分子内部に移行した。<sup>15</sup>Nリラクゼーション解析から、温度低下によって分子全体では運動性が低下し、構造が硬化したと言えるが、一部の残基では逆に運動性が増加した。本発表では、これらの結果から、温度低下による構造変化が酵素機能にどのような影響を及ぼすのか考察する。

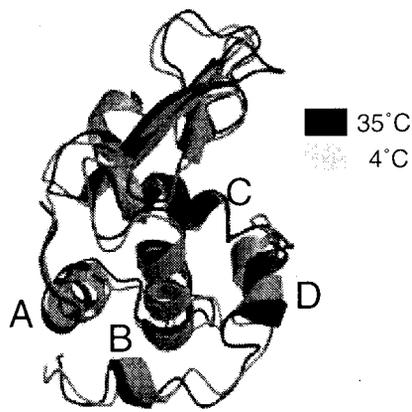


Fig.2: Overview structure at 35° and 4°C

## 3 L12

プロテインジスルフィドイソメラーゼの高次構造の構築と  
相互作用のNMR解析

(<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院薬学研究科、<sup>2</sup>豊田中央研究所生物部)

原田拓志<sup>1</sup>、栗本英治<sup>1</sup>、浅見 修<sup>2</sup>、梶野 勉<sup>2</sup>、山口芳樹<sup>1</sup>、○加藤晃一<sup>1</sup>

**NMR analyses of structure and interactions of protein disulfide isomerase**

Takushi Harada<sup>1</sup>, Eiji Kurimoto<sup>1</sup>, Osamu Asami<sup>2</sup>, Tsutomu Kajino<sup>2</sup>, Yoshiki Yamaguchi<sup>1</sup>, and Koichi Kato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, and <sup>2</sup>Toyota Central Research & Development Labs. Inc., Nagakute, Aichi 480-1192, Japan

Protein disulfide isomerase (PDI), which is a 53 kDa protein present in the endoplasmic reticulum (ER) of eukaryotes, is involved in disulfide bond formation and rearrangement during the folding of proteins. Here, we report stable-isotope-assisted NMR studies of thermophilic fungal PDI to elucidate the structural basis of function and thermal stability of this enzyme. Recombinant PDI and its truncated mutants were labeled with [<sup>13</sup>C]Cys and subjected to NMR measurements under various reducing conditions. On the basis of the <sup>13</sup>C NMR data, conformational change of PDI induced upon cleavage of the disulfide bonds and interaction of PDI with calreticulin, an ER chaperone, will be discussed.

【序論】プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)は小胞体中に広く存在する酵素で、ジスルフィド結合形成の触媒反応を通じてタンパク質の高次構造形成に重要な役割を果たしている。特に、好熱カビ由来のPDIは耐熱性、長期安定性の点ですぐれた性質を示すため、産業応用の観点から注目されている。好熱カビ由来のPDIは *a-b-b'-a'-c* という5つのドメインからなる分子質量53 kDaのタンパク質で、水溶液中ではホモダイマーとして存在すると考えられている。PDI分子内には3組のシステインペアが存在する。このうち2対はそれぞれ *a* および *a'* ドメインの活性部位を形成し、もう1対は *a* ドメインの内部でジスルフィド結合を形成している。我々は、全還元PDIをリフォールディングすることにより、1) *a* ドメイン内部のジスルフィド結合が活性部位の2つのジスルフィド結合よりも素早く形成し、この状態が最も熱安定性が高いこと、2) *a* ドメイン内部のジスルフィド結合が切断された状態では45 °Cにおける酵素活性が有意に低下することを明らかにした。本研究では好熱カビ由来のPDIの熱安定性と機能発現の分子構造論的基盤を明らかにすることを目指してNMRによる解析を行った。また小胞体においてPDIと相互作用して機能する分子シャペロン・カルレティキュリンについてもNMR解析を行った。

プロテインジスルフィドイソメラーゼ、分子シャペロン、ジスルフィド結合、選択的安定同位体標識、NMR

はらだたくし、くりもとえいじ、あさみおさむ、かじのつとむ、やまぐちよしき、かとうこういち

【方法】大腸菌による大量発現系を構築して、システイン残基の主鎖カルボニル炭素に  $^{13}\text{C}$  標識を施したリコンビナント PDI を調製して NMR スペクトルを測定した。また、PDI の *a-b* ドメインのみからなる PDI-N と *b'-a'-c* ドメインのみからなる PDI-C という 2 種類の欠失変異体を作成し、NMR 測定に用いた。 $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  二重標識法と欠失変異体とのスペクトルの比較に基づいてシグナルの帰属を行った。帰属の確定したシグナルをプローブとして全還元 PDI のリフォールディング過程における NMR スペクトルの変化を観測した。同様に、ヒトカルレティキュリンおよびその各ドメイン(N, P, C) の大量発現系を構築し、アミノ酸タイプ別に主鎖カルボニル炭素を  $^{13}\text{C}$  標識して NMR 解析を行った。

【結果・考察】 NMR 解析の結果、以下のことが明らかとなった。

(1) *a* ドメイン内部のジスルフィド結合(Cys59-Cys66)の切断に伴って同じドメイン内の活性部位(Cys30, Cys33)に高次構造変化が引き起こされる(Fig. 1)。この構造変化が活性低下の原因である考えられる。

(2) 2つの触媒ドメインについて比較すると、*a* ドメインの方が *a* ドメインよりもより低濃度の還元剤で活性部位のジスルフィド結合が切断されることが明らかとなった。この結果は、*a* ドメインの方が *a* ドメインよりも触媒活性が高いという事実と対応する。

(3) カルレティキュリンは分子内の運動性が著しく不均一であり、変性糖タンパク質との相互作用部位とされている P ドメインは極めて高い運動性を有している。

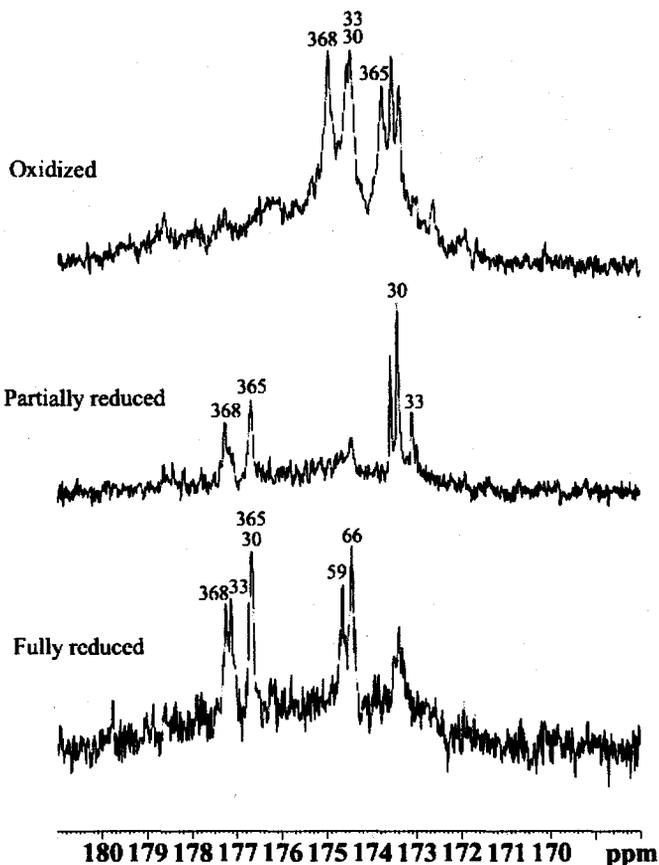


Fig.1  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of thermophilic fungal PDI labeled with  $[1-^{13}\text{C}]$ cysteine

参考文献

Harada, T., Kurimoto, E., Tokuhiko, K., Asami, O., Sakai, T., Nohara, D., and Kato, K. (2001) *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 596-598.

## 遺伝的アルゴリズムによる NMR蛋白質立体構造決定自動化の試み

徳島大 ○小野 功, 藤木 洋, 小野 典彦  
北陸先端大 楯 真一

### An Attempt to Automate The Determination of Three-Dimensional Structures of Proteins by NMR by A Genetic Algorithm

Isao ONO, Hiroshi FUJIKI and Norihiko ONO (The University of Tokushima),  
Shin-ichi TATE (Japan Advanced Institute of Science and Technology)

**Abstract :** Attempts to automate the determination of three-dimensional structures of proteins by NMR have failed so far because it is difficult to automate the assignment of complex NOE signals which must be done by trial and error. In this paper, we propose a new method for automatically determining three-dimensional structures of proteins based on a genetic algorithm, which is known as a flexible and efficient optimization method. In the proposed method, we regards the problem of assigning NOE signals and determining three-dimensional structures as an optimization problem to find a three-dimensional structure which meets the observed NOE signals. In order to examine the effectiveness of the proposed method, we apply it to the problem of determining the structure of  $\alpha$ -helix.

#### 1. はじめに

蛋白質は、酵素、免疫系を担う抗体、他の遺伝子の発現を制御するスイッチなど、様々な生命現象に関わっており、その機能は立体構造により大きく依存することが知られる。そのため、近年、蛋白質立体構造解析技術への社会的要請が高まりつつある。

現在のNMR蛋白質立体構造決定技術の基礎は、1980年代にWüthrich [5]により確立されている。構造決定のプロセスは、(1)連鎖帰属によるNMRシグナルの解析、(2)NOEシグナルの $^1\text{H}$ への帰属に基づく蛋白質の立体構造決定、に大別される。(2)のNOEシグナルを帰属しながら立体構造を決定していく過程では、NOEシグナルの重なりのために、帰属の候補として多数の水素原子が現れる。そこで、現状では、高度な専門知識と豊富な経験に基づき、試行錯誤的にNOEシグナルを帰属し、徐々に立体構造を構築していく作業が行なわれている。このため、1つの蛋

白質の立体構造決定に数ヶ月を要し、この時間的なコストが問題となっている。

Mumenthalerら[2]、Nilgesら[3]は、NOEシグナル帰属および立体構造の決定を自動的に行なう手法を提案している。しかし、専門家による手動のNOE帰属プロセスをそのまま踏襲しているため、手動のNOE帰属との併用により試行錯誤する必要があり、根本的な問題解決には至っていない。

本論文では、従来NOEシグナルの解析に主眼をおいて考えられてきた蛋白質立体構造決定問題を、NOEシグナルを満たす立体構造を求める立体構造最適化問題としてとらえる新しい考え方を導入する。さらに、この考え方にしたがって蛋白質の立体構造を遺伝的アルゴリズム[1]により直接最適化すると同時にNOEシグナルの自動帰属を行なう手法を提案し、その有効性について検証する。

キーワード：蛋白質立体構造決定、NOE帰属、遺伝的アルゴリズム、自動化、最適化

著者ふりがな：おののいさお、ふじきひろし、おののりひこ、たてしんいち

## 2. 遺伝的アルゴリズム (GA)

遺伝的アルゴリズム (Genetic Algorithm; GA) [1]は、自然界の生物の進化過程を模倣した最適化の枠組みである。GAは、目的関数の微分情報を必要としない直接探索法であることから、実数値変数最適化に限らず、組合せ最適化、構造最適化も取り扱うことができる。また、複数の解候補が探索空間内において競争的に探索を行う確率的多点探索法であることから、膨大な数の局所解が存在する多峰性の探索空間においても効率よく大域的に良好な解を探索可能である。このような特徴から、GAはさまざまな応用分野において有望な最適化手法として注目を集めている。

GAの一般的なアルゴリズムは以下のとおりである：

### (1) 初期集団の生成

ランダムに複数の解候補 (個体) を生成し、それらを初期集団とする。

### (2) 複製選択

集団から、新しい解候補 (子個体) を生成させる個体のペア (両親) を複数組生成する。

### (3) 子の生成

ステップ2で生成されたそれぞれの個体のペアに交叉および突然変異オペレータを複数回適用し、複数個の子個体を生成する。

### (4) 生存選択

ステップ3で生成された子集団と元の集団の中から、各個体の評価値を参照しながら、次世代へ残す個体を選択し、残りの個体は淘汰する。

### (5) 終了条件がみたされるまで、ステップ2から4を繰り返す。

GAの設計項目は、計算機上での個体の表現方法と子の生成方法を設計するコード化/交叉・突然変異設計、複製/生存選択方法を設計する世代交代モデル設計に大別される。探索効率の観点から、コード化/交叉設計においては形質遺伝が重要であり、得られる解の質の観点から、世代交代モデル設計においては集団内の形質の多様性維持が重要となる [7]。

## 3. 提案手法

### 3.1 基本的な考え方

本論文では、NOEシグナルの帰属により蛋白質の立体構造決定問題を行なうのではなく、観測されたNOEシグナルをなるべく多く満たすような立体構造をGAにより求めることで蛋白質立体構造を決定する手法を提案する。具体的には、以下のような方法をとる：

(1) GAにより、適当な二面角を持つ解候補となる立体構造を生成する。

(2) この立体構造からNOEシグナルを予測する。

(3) 予測シグナルを観測されたNOEシグナルに帰属する。

(4) この帰属に基づいて立体構造の評価値を計算する。

以下3.2節では、解候補となる立体構造を探索するためのGAを設計し、3.3節では、立体構造から予測シグナルを計算し、NOEシグナルの帰属を求め、立体構造の評価値を計算する過程について述べる。

### 3.2 GAの設計

#### 3.2.1 コード化/交叉・突然変異設計

コード化としては、アミノ酸残基の二面角 $\omega$ 、 $\phi$ 、 $\psi$ 、 $\chi$ 角を要素とする実数値ベクトルを採用し、交叉としては、一様交叉 (Uniform Crossover; UX) [4]を採用した。UXは、Fig. 1に示すように、2つの親個体が与えられたとき、50%の確率で染色体の各変数を入れ換える。突然変異オペレータは、各変数について1%の確率で、 $[-1.0^\circ, +1.0^\circ]$ の範囲の一様乱数を加えるものとする。

#### 3.2.2 世代交代モデル設計

本論文では、世代交代モデルとして、多様性維持能力に優れ、多峰性の探索空間において優れた性能を示す Minimal Generation Gap (MGG) モデル [6]を採用する。Fig. 2にその概要を図示する。

### 3.3 評価関数の設計

#### 3.3.1 立体構造からのNOEシグナルの予測

NOEシグナルが観測された2つのH間の距離は、5~10 Åである。逆に5~10 Åであれば必ずNOEシグナルが観測されるわけではないが、

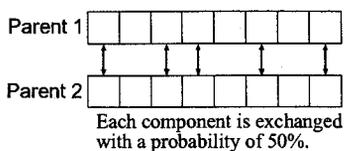


Fig. 1: Uniform Crossover (UX)

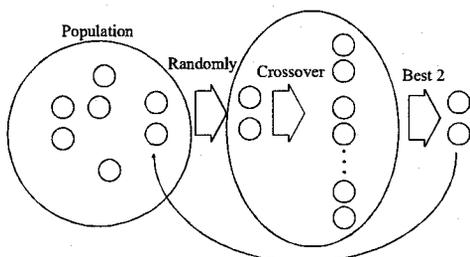


Fig. 2: Minimal Generation Gap (MGG)

可能性はある。そこで、本論文では、NHと任意のHの全てのペアについて、原子間距離 $d^p$ を計算し、 $d^p < 8.0 \text{ \AA}$  以内のものを選択し、連鎖帰属により同定されたNH、H、Nの化学シフト $x^p, y^p, z^p$ を割り当てる。予測シグナルは、 $(x^p, y^p, z^p, d^p)$ により表される。

### 3.3.2 予測シグナルと観測シグナルの一致度

実際にNOEの測定により観測された観測シグナルを、 $(x^o, y^o, z^o, d_{\min}^o, d_{\max}^o)$ とする。ここで、 $x^o, y^o, z^o$ は、それぞれNH、H、NのNOEシグナルにおける化学シフト、 $d_{\min}^o$ および $d_{\max}^o$ はシグナル強度から概算されたNH-H間距離の最小値および最大値である。予測シグナル $(x^p, y^p, z^p, d^p)$ は、観測シグナル化学シフト $x^o, y^o, z^o$ との誤差が妥当な範囲にあり、かつ距離の許容範囲 $d_{\min}^o, d_{\max}^o$ をできるかぎり満たすように、観測シグナルに帰属されるべきである。そこで、観測シグナル-予測シグナルの化学シフトの一致度 $C_{\text{NOE}}$ 、距離の一致度 $D_{\text{NOE}}$ を導入する。

観測シグナルの帰属候補を選択するときの化学シフトの誤差の許容値を $x_{\max}^o, y_{\max}^o, z_{\max}^o$ としたとき、化学シフトの一致度 $C_{\text{NOE}}$ を以下の式のように定義する：

$$C_{\text{NOE}} = \frac{1}{6} \left( \frac{4|x^o - x^p|}{x_{\max}^o} + \frac{4|y^o - y^p|}{y_{\max}^o} + \frac{4|z^o - z^p|}{z_{\max}^o} \right)$$

また、距離の一致度である $D_{\text{NOE}}$ を、以下の式

のように定義する：

$$D_{\text{NOE}} = \begin{cases} 1/(d^p - d_{\min}^o - 1) & \dots\dots d^p < d_{\min}^o \\ -1 & \dots\dots d_{\min}^o \leq d^p \leq d_{\max}^o \\ -1/(d^p - d_{\max}^o + 1) & \dots\dots d_{\max}^o \leq d^p \end{cases}$$

### 3.3.3 ファンデルワールス・コンタクト

ファンデルワールス・コンタクトは、原子間のぶつかりを表す指標で、蛋白質中のすべての原子の組合せについて、原子間距離からそれぞれのファンデルワールス半径を引いた値の和をとったもので、以下の式により定義する：

$$V_{\text{VDW}} = \sum_i \sum_j (d(a_i, a_j) - 0.8(r_i + r_j))$$

ここで、 $d(a_i, a_j)$ は原子 $a_i$ と $a_j$ 間の距離、 $r_i$ は原子 $a_i$ の半径である。

### 3.3.4 評価値計算のアルゴリズム

GAにより生成された立体構造が与えられたとき、以下のアルゴリズムに従い評価値を計算し、その立体構造に割り付ける：

- (1) 3.3.1節で述べた方法により、予測NOEシグナルのテーブルを作成する。
- (2) 全ての観測NOEシグナルについて、以下の操作を行なう。
  - (a) 観測シグナルとの化学シフトの誤差がそれぞれ $x_{\max}^o, y_{\max}^o, z_{\max}^o$ 以下の予測シグナルを帰属の候補とする。
  - (b) 3つ以上の候補がある場合、観測シグナルと予測シグナルの化学シフトの一致度 $C_{\text{NOE}}$ が小さいもの3つを選択する。
  - (c) 残った予測シグナルの中で、距離の一致度 $D_{\text{NOE}}$ が最小の候補を帰属し、これを予測シグナルのテーブルから削除する。
- (3) NOEの帰属に基づいて立体構造の評価値を計算する：

$$E_{\text{structure}} = V_{\text{NOE}} + V_{\text{VDW}}, \quad V_{\text{NOE}} = \sum_{k=1}^{n_{\text{NOE}}} D_{\text{NOE}}(k)$$

ここで、 $n_{\text{NOE}}$ は観測されたNOEシグナルの和、 $D_{\text{NOE}}(k)$ は $k$ 番目の観測NOEに帰属された予測NOEの一致度である。立体構造を求めることは $E_{\text{structure}}$ を最小化を最小化することに相当し、最小値は $-n_{\text{NOE}}$ である。

## 4. 実験

### 4.1 実験設定

提案手法の有効性を検証するために、hmg2b

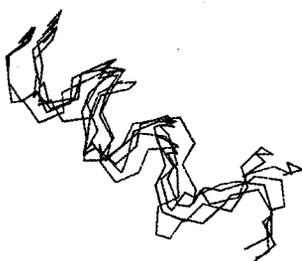


Fig.3: Structures determined by the GA

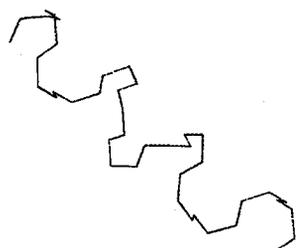


Fig.4: A structure determined by a human expert

と呼ばれる蛋白質から $\alpha$ -ヘリックスを切りだし、実際に観測された NOE シグナルを用いて実験を行なった。残基数は 13, NOE シグナルの総数は 173 である。GA の集団サイズは 500 とした。最適化すべき二面角の数は 76 である。

#### 4.2 実験結果

Fig. 3 に、実験 5 試行において GA により求められた立体構造を示す。また、専門家により決定された立体構造を Fig. 4 に示す。これより、GA がほぼ適切な立体構造を獲得していることがわかる。 $\alpha$ -ヘリックス外部との NOE シグナルを使用していないため、末端部分は実際より NOE シグナルの数が少なくなり、ぼらつきが大きくなっている。また、専門家により決定された立体構造では二面角に関する制約を用いているが、今回の GA の実験では二面角に関する制約条件を用いていないためにやや形が崩れている。

#### 5. おわりに

本論文では、NMR 蛋白質立体構造決定問題を、NOE シグナルを満たす立体構造を求める最適化問題ととらえ、これを GA により解決す

る手法を提案した。さらに、提案手法を $\alpha$ -ヘリックスの構造決定問題に適用したところ、約 5 時間 (AMD Athlon 1GHz) で立体構造を求めることに成功した。これは、提案手法により蛋白質立体構造解析に要する時間的なコストを大幅に削減できる可能性を示している。

現在、二面角制限を入れることによりさらに精度の高い立体構造を得ることが出来るように提案手法を改良中であり、この結果は講演時に報告する予定である。また、78 残基からなる蛋白質への適用においても良好な結果を得つつあり、こちらについても講演時に報告できる予定である。

さらに、今後の課題としては、PC クラスタ上に提案手法を実装することにより計算時間のさらなる短縮化を行うこと、他の蛋白質への適用を通じ提案手法のロバスト性を向上させることなどが考えられる。

#### 参考文献

- [1] Goldberg, D.E.: Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning, Addison-Wesley (1989).
- [2] Mumenthaler, C., Guntert, P., Braun, W. and Wuthrich, K.: Automated combined assignment of NOESY spectra and three-dimensional protein structure determination, *J. Biomol. NMR*, 10, pp.351-362 (1997).
- [3] Nilges, M. and O'Donoghue, S. I.: Ambiguous NOEs and automated NOE assignment, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 32, pp.107-139 (1998).
- [4] Syswerda, G.: Uniform Crossover in Genetic Algorithms, *Proc. 3rd Int'l Conf. on Genetic Algorithms*, pp.2-9 (1989).
- [5] Wüthrich, K.: *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York (1986).
- [6] 佐藤, 小野, 小林: 遺伝的アルゴリズムにおける世代交代モデルの提案と評価, *人工知能学会*, Vol. 12, No. 5, pp. 734-744 (1997).
- [7] 山村, 小林: 遺伝的アルゴリズムの工学的応用, *人工知能学会誌* vol. 9, No. 4, pp. 506-511 (1994).



# ポスター発表要旨

Eledoisin Related Peptide の固体2次元NMR法による  
 帰属と構造解析  
 (京大理学部化学)  
 ○大橋 竜太郎、水野 敬、竹腰 清乃理、寺尾 武彦

Assignment and structural characterization of Eledoisin related peptide using 2D NMR in solids

(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University)

○ R. Ohashi, T. Mizuno, K. Takegoshi, T. Terao

Several 2D experiments in solid NMR were applied to elucidate structural informations of Eledoisin, which is one of neuro transmission hormones. We labeled 4 of 6 C-terminal residues of Eledoisin by  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ : Lys-Phe\*-Ile\*-Gly\*-Leu\*-Met-NH<sub>2</sub>. The results of  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  COSY,  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  HETCOR, and a  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  shift correlation experiment using recently proposed DARR were described.

First,  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  J-connectivity was determined the  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  COSY experiment (Fig. 1), and all  $^{13}\text{C}$  signals were assigned as collated in Table 1. Second, the  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  HETCOR experiment (Fig. 2) was applied to assign  $^{15}\text{N}$  signals (Table 2). Strangely, the amide  $^{15}\text{N}$  signal of Phe is missing. We attribute temporarily it to effects of molecular motion. Third,  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  dipolar (distance) proximity was examined by the  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  2D shift correlation (exchange) NMR experiment (Fig. 3) using the recently proposed  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  recoupling method (DARR [1]). Currently, 2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  dipolar correlation experiments are undertaken to determine the peptide dipolar angle  $\phi$ .

$\delta$ /(ppm)	assignment	$\delta$ /(ppm)	assignment
11.9	Ile CH <sub>3</sub> - $\delta$	57.8	Ile CH- $\alpha$
15.0	Ile CH <sub>3</sub> - $\gamma$	126.9	Phe CH- $\xi$
25.5	Ile CH <sub>2</sub> - $\gamma$ and Leu CH <sub>3</sub> - $\delta$ ,CH- $\gamma$	130.0	Phe CH- $\delta,\eta$
39.2	Ile CH <sub>2</sub> - $\beta$ and Phe CH <sub>2</sub> - $\beta$	137.1	Phe C- $\gamma$
42.6	Gly CH <sub>2</sub> - $\alpha$	169.6	Gly C=O
44.9	Leu CH <sub>2</sub> - $\beta$	172.0	Phe C=O
52.7	Leu CH- $\alpha$	172.5	Ile C=O
54.7	Phe CH- $\alpha$	174.8	Leu C=O

Table 1.  $^{13}\text{C}$  assignment of the residue-selectively labeled Eledoisin related peptide(Lys-Phe\*-Ile\*-Gly\*-Leu\*-Met-NH<sub>2</sub>).

Key words: Signal assignment in solids, Multiple  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled peptide, Structural determination in solids

おおはしりゅうたろう、みずのたかし、たけごしきよのり、てらおたけひこ

$\delta$ /(ppm)	assignment
73.7	Gly NH
82.5	Ile NH
84,3	Leu NH

Table 2.  $^{15}\text{N}$  assignment ( $\text{NH}_4\text{Cl} = 0\text{ppm}$ )

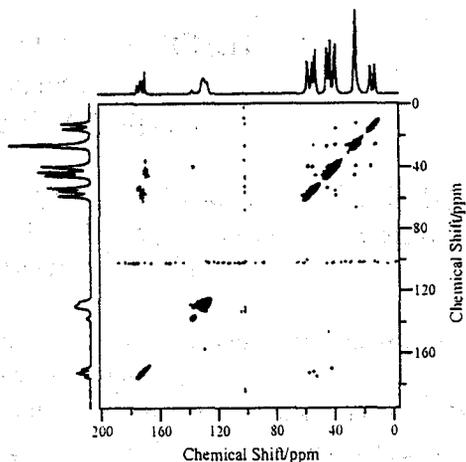


Figure 1. The  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  2D COSY spectrum.

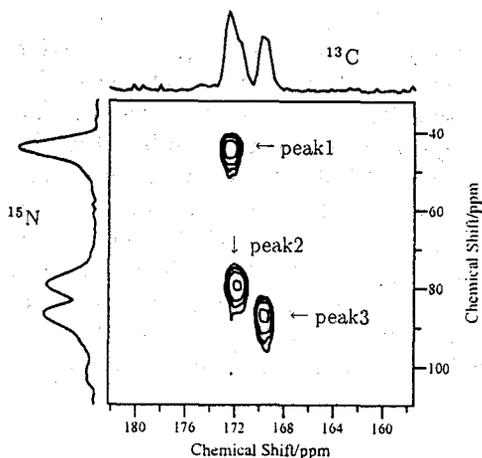


Figure 2. Expansion of the  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  2D HETCOR spectrum. Peak 1 is the cross peak between Gly NH and Ile C=O. Peak 2 is the cross peak between Ile NH and Phe C=O. Peak 3 is the cross peak between Leu NH and Gly C=O.

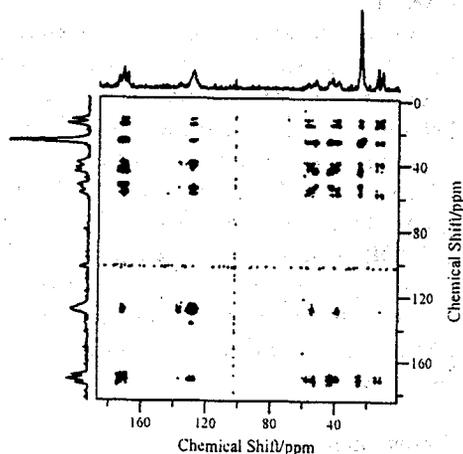


Figure 3. The  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  2D DARR spectrum with the mixing time ( $\tau_m$ ) of 1s.

All NMR experiments were carried out using a Chemagnetics CMX-400 spectrometer operating at the resonance frequency of 100.3 MHz for  $^{13}\text{C}$  with a CP/MAS probe (Chemagnetics) for a 3.2 mm rotor. Both the MAS frequency and the  $^1\text{H}$  rf intensity for DARR were 22 kHz. The TPPM decoupling was used throughout with the nutation angle and the phase-modulation angle being optimized for a rf intensity of 110 kHz to be  $180^\circ$  and  $\pm 8^\circ$ , respectively.

Reference: [1] K. Takegoshi, S. Nakamura, and T. Terao, Chem. Phys. Lett., 344, 631 (2001).

The Effect of rf Inhomogeneity on Heteronuclear Dipolar  
Recoupling in Solid State NMR  
; Practical Performance of SFAM and REDOR

(横浜国立大学<sup>1</sup>、National High Magnetic Field Laboratory<sup>2</sup>、Dept. of Chemistry and  
Institute of Molecular Biophysics, Florida State University<sup>3</sup>)

○西村勝之<sup>1,2</sup>、Riqiang Fu<sup>2</sup>、Timothy A. Cross<sup>2,3</sup>

The Effect of rf Inhomogeneity on Heteronuclear Dipolar Recoupling in Solid State NMR;  
Practical Performance of SFAM and REDOR

(Yokohama National University<sup>1</sup>、National High Magnetic Field Laboratory<sup>2</sup>、Dept. of  
Chemistry and Institute of Molecular Biophysics, Florida State University<sup>3</sup>)

○Katsuyuki Nishimura<sup>1,2</sup>、Riqiang Fu<sup>2</sup>、Timothy A. Cross<sup>2,3</sup>

**Abstract**

Practical heteronuclear dipolar recoupling performances under magic angle spinning for SFAM and REDOR have been investigated under well-defined rf inhomogeneity environments with variation of resonance offsets for the irradiated nucleus. The heteronuclear dipolar recoupling efficiencies were quantitatively determined based on the experimentally obtained rf homogeneity. As a result, SFAM retains higher recoupling efficiency (>95%) at an 85% effective nutation frequency, and its recoupling efficiency is gradually reduced at lower effective nutation frequencies. On the other hand, though REDOR retains higher recoupling (>95%) efficiency at high (>92%) effective nutation frequency with an XY-8 compensation pulse sequence, the recoupling efficiency is dramatically decreased when the effective nutation frequency is below 90%. Over all, SFAM has significant advantages for insensitivity to carrier frequency offset and rf inhomogeneity.

**Experimental**

A 20% enriched [<sup>1-13</sup>C, <sup>15</sup>N]Glycine micro crystal was used for all dipolar recoupling experiments. All NMR measurements were carried out at 25°C on a Bruker DMX-300 NMR spectrometer equipped with a triple resonance probe with a 7.0 mm o.d. spinner assembly. In the REDOR [1], the XY-8 and XY-16 [2] pulse sequences for irradiation of <sup>15</sup>N nuclei were employed experiments as illustrated in Fig. 1 to compensate for the flip angle error, the off-resonance effect, and the fluctuation of the H<sub>1</sub> field. In SFAM [3] experiments, a 40 kHz depth of rf modulation and a 40 kHz maximum offset were used for irradiation on the <sup>15</sup>N channel. Precise sample positioning was achieved via specially designed Teflon spacers with ± 0.2 mm precision along the axial direction of the sample tube. The sample spinning was controlled to 4000 ± 1.0. All simulation of REDOR curves were carried out using a FORTRAN 77 program by taking finite π pulse lengths into account and all numerical simulations for SFAM were carried out with the GAMMA [4] magnetic resonance simulation platform.

---

Key words: Solid State NMR • rf inhomogeneity, • Dipolar Recoupling • SFAM • REDOR

にしむら かつゆき、 Riqiang Fu、 Timothy A. Cross

## Result and discussion

### rf inhomogeneity in MAS probe

In this study [5], quantitative estimates of spatially resolved rf inhomogeneity effects for distance measurements and a general strategy to characterize these effects are presented. Here "rf inhomogeneity" refers to a distribution of effective nutation fields dependent on sample position in a MAS spinner. Here, single pulse excitation with high power  $^1\text{H}$  decoupling is used to observe the flip angle errors of observed and irradiated nuclei due to the rf inhomogeneity. The normalized peak integral at each site,  $I_i$ , within the spinner may be translated into a nutation frequency by using the following equation,

$$I_i = (\nu_{rf}^i / \nu_{rf}^0) * \sin[(2\pi * \nu_{rf}^i) * t_w] \quad \text{Eq.1}$$

Where  $\nu_{rf}^i$  and  $t_w$  are the nutation frequency for each site and pulse duration, respectively, and  $i$  indicates the sample position in the spinner. For the center of the spinner  $i$  equals 0.

We observed  $^{13}\text{C}$  methyl signals from a rubber disk with high power  $^1\text{H}$  decoupling using a fixed pulse length and without magic angle spinning. A 1 mm thick rubber disk was positioned in the sample chamber along the MAS axis from the top to the bottom as illustrated in Figure 2(a). Figure 2 (b) shows the profile of normalized  $^{13}\text{C}$  methyl peak integrals. By using a weighted Gaussian curve to fit the profile, the center of the rf irradiation was determined to be 8.4 mm from the inner bottom of the sample tube. The peak integrals were translated into average nutation frequencies based on Eq. 1, whose profile is shown in Figure 2(c).

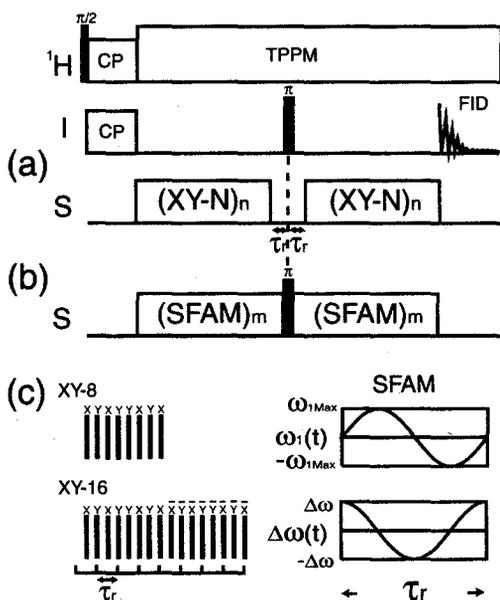


Figure 1. Pulse sequences for REDOR (a) and SFAM (b). Proton decoupling was achieved by TPPM. (c) The continuous phase and amplitude modulated irradiation and XY-8, -16 compensation phase cycles  $\pi$  pulse trains were applied in REDOR and SFAM experiments, respectively.

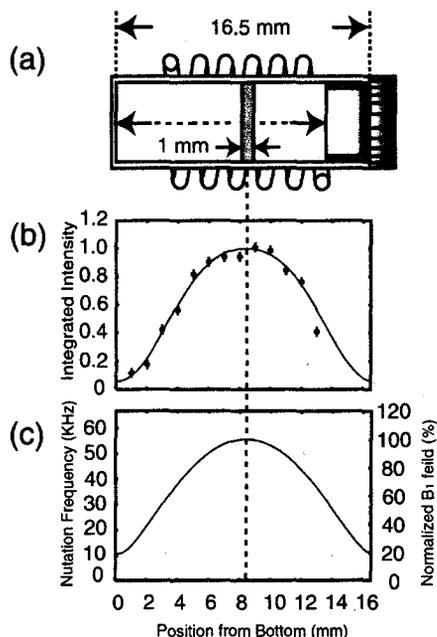


Figure 2. (a) Schematic representation of rubber disk positioned within the Bruker 7 mm o.d. spinner with a solenoid coil. (b) The normalized  $^{13}\text{C}$  methyl peak integrals at each position. (c) Position dependent effective rf field variation profile.

### Sample position and Irradiated nuclear carrier frequency offset dependences of dipolar recoupling efficiency

The sample positions for SFAM and REDOR experiments are redefined as illustrated in the column of Figure 3 allowing us to use more sample in each position (2.4 mm thickness) for dipolar recoupling experiments. The average rf nutation frequency for each sample position 1, 2 and 3 were calculated as 97, 87, and 61 %, respectively, based on the experimental rf nutation frequency profile shown in Fig. 2 (c).

In order to simulate the dephasing behavior at each position, only the dipolar coupling constant is changed to fit the experimental data without changing other parameters utilized in the experiment. The recoupling efficiency can be calculated as  $(D_{IS}^{obs} / D_{IS}) * 100$ , where  $D_{IS}^{obs}$  is the observed dipolar coupling constant through dipolar dephasing curve fitting and  $D_{IS}$  is the calculated dipolar coupling constant between the heteronuclear I and S spins. Figure 3 shows the experimental dipolar dephasing data from the SFAM and REDOR experiments superimposed by theoretical curves at different sample positions.

The carrier refrequency offset dependence of the recoupling efficiency at sample position 3 (61% effective nutation frequency) were observed. As shown in Figure 4, it is clearly seen that the recoupling efficiency for SFAM is almost independent of the

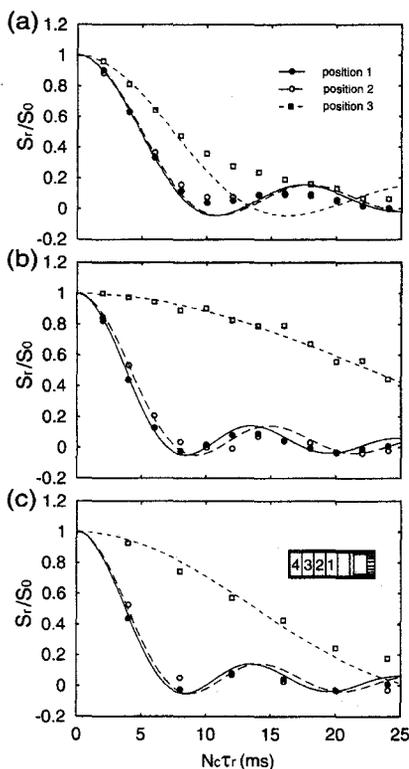


Figure 3. Normalized dipolar dephased signal intensities with best fit theoretical curves for sample positions 1 to 3 for SFAM (a), REDOR with XY-8 (b) and with XY-16(c), respectively. Sample positions were 1(●), 2(○), and 3(□), respectively.

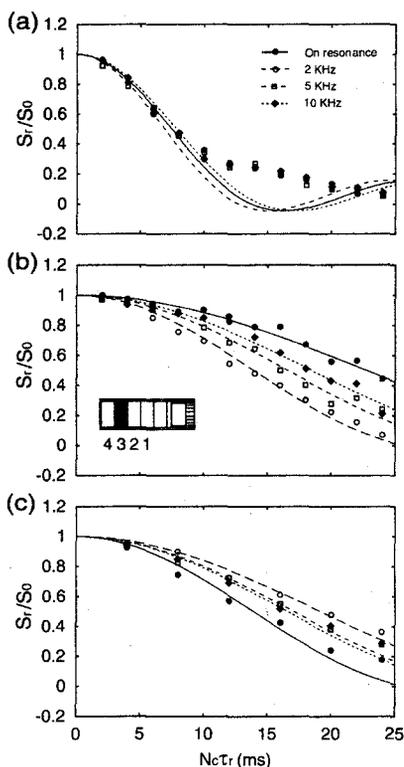


Figure 4. Normalized dipolar dephased signal with best fit theoretical curves for variation of carrier frequency offset for irradiated nuclei at position 3 for SFAM (a), REDOR with XY-8 (b) and with XY-16(c), respectively. Carrier offset frequency were on resonance (●), 2 kHz (○), 5 kHz (□), and 10 kHz off resonance(◆), respectively.

irradiation carrier frequency offset even if the effective nutation frequency is very low. On the other hand, the recoupling efficiency for REDOR with either the XY-8 or the XY-16 sequence strongly depends on the carrier offset under such a low effective nutation frequency, although the XY-16 sequence improves the recoupling performance by about a factor of 2 over the XY-8 sequence.

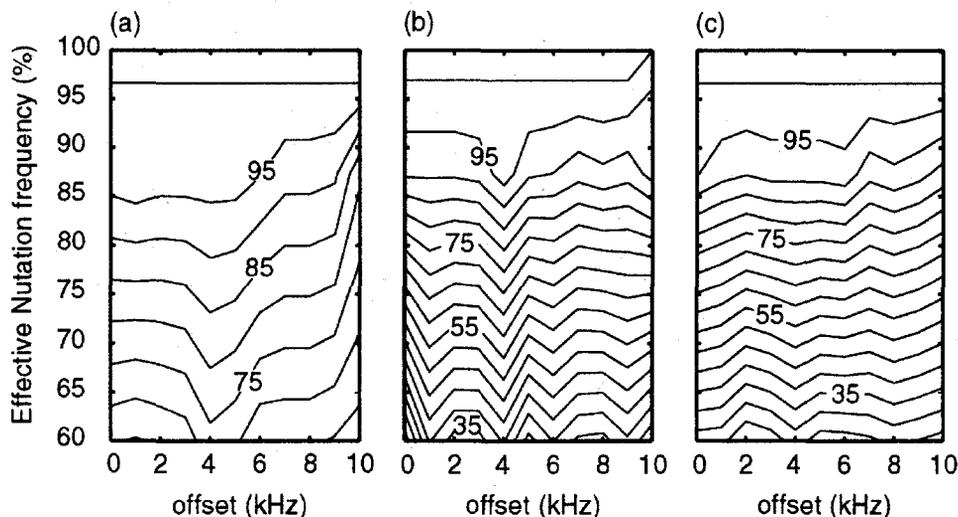


Figure 5. The contour map of heteronuclear dipolar recoupling efficiency for rf inhomogeneity and carrier frequency offset of the irradiated nucleus for (a) SFAM, (b) REDOR with XY-8, and (c) with XY-16 compensation. The Z axis is the dipolar recoupling efficiency (%). All experiments were performed with 3 different sample positions and 11 different carrier offset frequencies. Each contour map is drawn based on experimentally obtained 33 pair of carrier offset and sample positions. Total 708 experiments for SFAM and REDOR with XY-8, and 450 for REDOR with XY-16.

### Overall dipolar recoupling efficiency

It is illustrated in Fig. 5 that the profile for the recoupling efficiency strongly depends on the dipolar recoupling method employed. For SFAM, as shown in Fig. 5(a), the recoupling efficiency gradually decreases as the effective rf nutation frequency decreases. A high recoupling efficiency (>95%) can be achieved when the effective nutation frequency is larger than 85%. Even when the effective nutation frequency is as low as 65%, over 70% recoupling efficiency can still be obtained. On the other hand, for REDOR, even with XY-8 and XY-16 phase cycling sequences, the recoupling efficiency is strongly dependent upon the effective nutation frequency, as shown in Fig. 5 (b) and (c). Both the XY-8 and XY-16 sequences exhibit a high recoupling efficiency (> 95%) when the effective nutation frequency is larger than 92%. However, their recoupling efficiency decreases dramatically as the effective nutation frequency becomes less than 87%. With 65% effective nutation frequency, only about 40% recoupling efficiency is obtained.

### Ref.

- [1] T. Gullion and J. Schaefer, *J. Magn. Reson.* **81**, 196-200 (1989).
- [2] T. Gullion, D. Baker and M. S. Conradi, *J. Magn. Reson.* **89**, 479-484 (1990).
- [3] R. Fu, S. A. Smith and G. Bodenhausen, *Chem. Phys. Lett.* **272**, 361-369 (1997).
- [4] S. A. Smith, T. O. Levante, B. H. Meier and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson. Ser. A* **106**, 75-105 (1994).
- [5] K. Nishimura, R. Fu, T. A. Cross, *J. Magn. Reson.* In press (2001).

## 3次元固体高分解能 NMR 法の開発とマストパラン X への応用

Three-dimensional high resolution solid state NMR and application to Mastparan X

(阪大蛋白研<sup>1</sup>、横浜国大・工<sup>2</sup>、群馬大・工<sup>3</sup>、三菱化学生命研<sup>4</sup>)○戸所泰人<sup>1</sup>、柳下元<sup>2</sup>、若松馨<sup>3</sup>、河野俊之<sup>4</sup>、藤原敏道<sup>1</sup>、阿久津秀雄<sup>1</sup>

We are developing solid-state NMR methods which provide more structural information for isotope-labeled biomolecules. The low resolution and sensitivity are the obstacles to the application of solid-state NMR to biomolecules. We have improved the resolution and sensitivity by the combination of isotope-labeled samples and multidimensional NMR under MAS. In this study, 3D pulse sequences were designed to obtain spectra for  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{CO}$ - $^{13}\text{C}^\alpha$ ,  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}^\alpha$ - $^{13}\text{CO}$  and  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}^\alpha$ - $^{13}\text{C}^\beta$  chemical shift correlation. Their extensions to 3D correlation enhanced the spectral resolution. The signal assignment by these pulse sequences enable us to analyze the secondary structure of Mastparan X-Gly, amphiphilic 15-residue peptide.

**【序】** 固体 NMR において、タンパク質や核酸などの生体高分子の構造を解析するためには、その分解能と感度が不十分なことが障害となっている。そこで我々は安定同位体標識と多次元 NMR を組み合わせることで、分解能と感度を向上させる測定法の開発を試みている。本研究では生体高分子の共有結合に沿ってシグナルを同定するために、 $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{CO}$ - $^{13}\text{C}^\alpha$  の相関、 $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}^\alpha$ - $^{13}\text{CO}$  の相関を得るパルス系列および  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}^\alpha$ - $^{13}\text{C}^\beta$  の相関を得るパルス系列を用いて分解能を向上させる方法を検討した。また、 $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  で完全標識したアミノ酸 15 残基からなる両親媒性ペプチドであるマストパラン X-Gly (MPX-G) にこれらのパルス系列を応用し、MPX-G の 15 残基がアミノ酸配列特異的に帰属できた。本 3 次元 NMR から得られた化学シフトに基づく 2 次構造の評価を行った。

**【実験と試料】**

NMR 測定は Chemagnetics CMX400 Infinity 核磁気共鳴装置で、4mmφあるいは5mmφ  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  3重共鳴用 MAS プローブを用い、静磁場強度 9.4T で行なった。パルス系列の評価においては  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  で同位体標識した Ala, Val, Gln を 4mmφあるいは5mmφ ジルコニウム製スピナーに入れたものを用いた。

用いた MPX-G はマストパラン X の本来アミド化されている C 末端に Gly が付加したものである。アミノ酸配列は Ile-Asn-Trp-Lys-Gly-Ile-Ala-Ala-Met-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-Gly である。MPX-G は大腸菌 BL21 (DE3) で *Saccharomyces cerevisiae* のユビキチンとの融合タンパク質として発現させ、酵素を用いて切断する方法で調製した。培養は同位体標識したグルコースと塩化アンモニウムを用いた最小培地で行った。MPX-G はメタノールに溶かして、微結晶を作り、4mmφスピナーに入れた。

固体 NMR、3次元、MAS、安定同位体標識、Mastoparan X

とどころやすと、やなぎしたはじめ、わかまつかおり、こうのとしゆき、ふじわらとしみち、あくつひでお

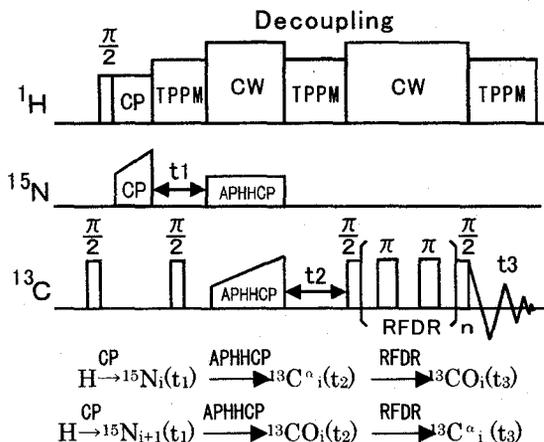


Fig.1 Pulse Sequence for 3D N-C<sup>α</sup>-CO Chemical Shift Correlation

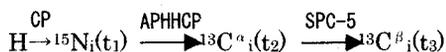


Fig.2 Magnetization Transfer Pathway of 3D N-C<sup>α</sup>-C<sup>β</sup> Chemical Shift Correlation

隣り合うアミノ酸残基を完全につなげることができ、主鎖の帰属ができるようになる。

3次元  $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}^\alpha-^{13}\text{C}^\beta$  化学シフト相関法 (Fig. 2) は 3次元  $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}^\alpha-^{13}\text{C}^\beta$  化学シフト相関法の RFDR に代わり SPC-5 (Super cycled POST-C5) を用いた。RFDR と異なり  $\text{C}^\alpha$ 、 $\text{C}^\beta$  間のような化学シフト差の小さいものの磁化移動をおこなえる。それにより、アミノ基の  $^{15}\text{N}$  の化学シフト、 $^{13}\text{C}^\alpha$  の化学シフト、 $^{13}\text{C}^\beta$  の化学シフト間の相関ピークつまり  $^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}^\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}^\beta$  と移ってきたシグナルが観測できた。 $^{13}\text{CO}$  より化学シフトの分散の大きい  $^{13}\text{C}^\beta$  のシグナルを用いることにより、残基内のシグナルについて  $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}^\alpha-^{13}\text{C}^\beta$  の相関より解析しやすい、 $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}^\alpha-^{13}\text{C}^\beta$  の新しい相関が得られる。

前述の二つのパルス系列を用いて、 $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}^\alpha-^{13}\text{CO}$  の相関 (NCACO: Fig. 1)、 $^{15}\text{N}-^{13}\text{CO}-^{13}\text{C}^\alpha$  の相関 ( $\text{N}_{i+1}\text{CO}_i\text{CA}_i$ : Fig. 1)、 $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}^\alpha-^{13}\text{C}^\beta$  の相関 (NCACB: Fig. 2) のスペクトルを得た。これらのスペクトルから、固体 NMR により MPX-G の 15 残基中 12 残基 (80%) がアミノ酸配列特異的に帰属できた。完全な帰属は、昨年示した 2次元  $^{13}\text{C}^\alpha-^{13}\text{C}^\alpha$  相関法で行なえるが、これらの方法は 2次元  $^{13}\text{C}^\alpha-^{13}\text{C}^\alpha$  相関法より感度が高い。

また、化学シフトの 2次構造依存性を利用してランダムコイルとの化学シフト差を評価した。固体状態で MPX-G は Lys4 から Leu14 まで  $\alpha$ ヘリックス構造をとっていると考えられ、昨年報告したものと一致した。

### 【考察】

2つの3次元のパルス系列を用いることで、固体 NMR により MPX-G の  $^{15}\text{N}$  と  $^{13}\text{C}$  を配列特異的に帰属することができ、さらに2次構造を求めることができた。したがってより高分解能に生体高分子のアミノ酸配列にそって帰属する方法を確立できた。今回用いたものは15残基、 $\alpha$ ヘリックスが1つと単純なものではあるが、より大きな静磁場、高速な MAS などを用いることで、さらに大きな分子にも応用できるだろう。

### 【結果】

3次元  $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}^\alpha-^{13}\text{CO}$  化学シフト相関法 (Fig. 1) は、 $^{15}\text{N}$  から  $^{13}\text{C}$  に磁化移動させる APHHCP (Adiabatic-Passage Hartmann-Hahn Cross Polarization) と双極子結合した  $^{13}\text{C}$  間で磁化交換させる RFDR (Radio Frequency Driven Recoupling) により、 $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}^\alpha-^{13}\text{CO}$  の相関が観測できる。APHHCP は約 10kHz という狭いオフセット帯域であるので、以下に述べるように選択的磁化移動に有効であった。 $\text{C}^\alpha$  と  $\text{CO}$  の化学シフトは約 12kHz 差があるので、APHHCP を使えば選択的に磁化移動できる筈である。実際 APHHCP および  $t_2$  時に  $^{13}\text{C}$  の周波数をシフトさせることで、N から  $\text{C}^\alpha$  あるいは  $\text{CO}$  へと選択的に磁化移動させることができた。したがって  $\text{N} \rightarrow \text{C}^\alpha \rightarrow \text{CO}$  ( $\text{N}_i\text{CA}_i\text{CO}_i$ : 残基内) と  $\text{N} \rightarrow \text{CO} \rightarrow \text{C}^\alpha$  ( $\text{N}_{i+1}\text{CO}_i\text{CA}_i$ : 残基間) の2種類の異なる相関を得られるようになる。これにより

## 「スラグ構造解析における高磁場 MQ-MAS の有効性」

(日本電子(株)<sup>[1]</sup>、新日本製鐵(株)<sup>[2]</sup>)○下池田勇一<sup>[1]</sup>、杉沢寿志<sup>[1]</sup>、金橋康二<sup>[2]</sup>、齋藤公児<sup>[2]</sup>

The advantage of MQ-MAS for high magnetic field in analysis of Slag.

(JEOL Ltd.<sup>[1]</sup> Nippon Steel Corporation<sup>[2]</sup>)Y.Shimoikeda<sup>[1]</sup>, H.Sugisawa<sup>[1]</sup>, K.Kanchashi<sup>[2]</sup>, K.Saito<sup>[2]</sup>

MQ-MAS method is very effective in the structural analysis of the half-integer quadrupolar nuclei, but could be used only by the sample which is limited. In this paper, we have examined the influence of the magnetic field strength to slag (by-product in the process of the iron-making process) spectra using MQ-MAS techniques. It is clear that S/N and the resolution are improved greatly at 14.1T in comparison with 9.4T, and also new peaks which aren't seen at 9.4T because of low resolution are observed at 14.1T. Therefore, we believe that MQ-MAS method under the high magnetic field (more than 14.1T) is very effective and helpful to analyze chemical structure of slag materials involving quadrupolar nuclei.

## 【緒言】

MQ-MAS 法は、半整数スピン核の固体高分解能 NMR スペクトルを得るための手法として、近年、急速に発展した。特に、これまで NMR の解析対象となり難かった無機材料の構造解析に有効な手法と期待されている。本手法による研究例は既に数多くなされているが、実材料への適用例は未だ限られている。実材料では、複雑な構造を持つ少量成分の解析を要求されている。この要請を満たす為には、感度及び分解能の更なる向上が必要とされている。本レポートでは、実材料として、スラグと呼ばれる製鉄の過程で作られる副産物を用い、磁場強度の NMR スペクトルに及ぼす効果を検証した。

## 【実験】

今回、MQ-MAS の実材料の応用としてスラグサンプルを使用した。スラグの化学状態はガラスであることから、X線回折等での構造解析もできなかった。そのため、従来は組成のみで議論されていた材料である。そこで、新日本製鐵株式会社にて作成された F-1 と呼ばれるスラグサンプルを用いて <sup>27</sup>Al の MQ-MAS 法にて解析を行った。F-1 はスラグの標準サンプルで、組成として Ca(35.5%)、Si(13.4%)、Al(2.9%)などを含んでいる無機材料である。また、磁場強度は 9.4T (<sup>27</sup>Al : 104 MHz) , 14.1T (<sup>27</sup>Al : 156 MHz) にてそれぞれ測定し、MAS スペクトルおよび MQ-MAS スペクトルの比較を行うことで磁場の影響についても考察した。

## 【結果】

Fig.1 にて F-1 の <sup>27</sup>Al-MAS スペクトル (シングルパルス) を示した。14.1T のスペクトルは 9.4T に比較して感度が格段に向上しているのが分かる。

Fig.2 は F-1 の 3Q-MAS スペクトルである。等方軸 (展開軸) はスケールリング処理を行い、化学シフト軸の傾きを 1 に補正してある。MQ-MAS は元来感度の悪い測定法であるが、14.1T のデータは 9.4T のものと比較して感度が飛躍的に向上し、少ない積算回数でもノイズの影響をほとんど受けていない。また、9.4T では一本に見えたピーク A が、分解能の向上によりピーク C とピーク D に分離しているのが観測されるようになっているのが分かる。

キーワード: MQ-MAS, 四極子相互作用, 高磁場, スラグ

しもいけだ ゆういち、すぎさわ ひさし、かねはし こうじ、さいとう こうじ

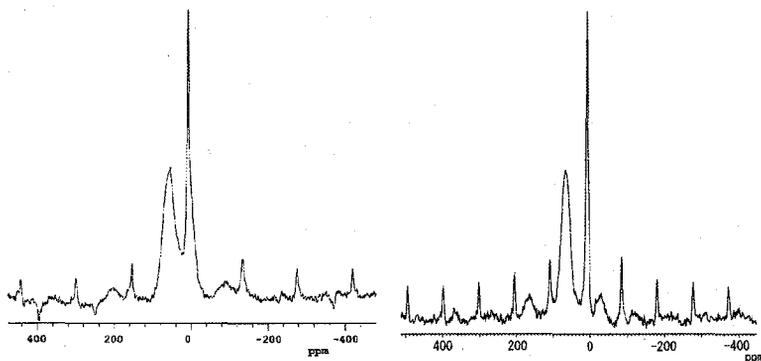


Fig.1  $^{27}\text{Al}$  MAS スペクトル：左図 9.4 T, 右図 14.1 T  
 フリップ角=20 度、積算=1000 回(9.4 T), 100 回(14.1T)、  
 MAS=15kHz、待ち時間=5 秒

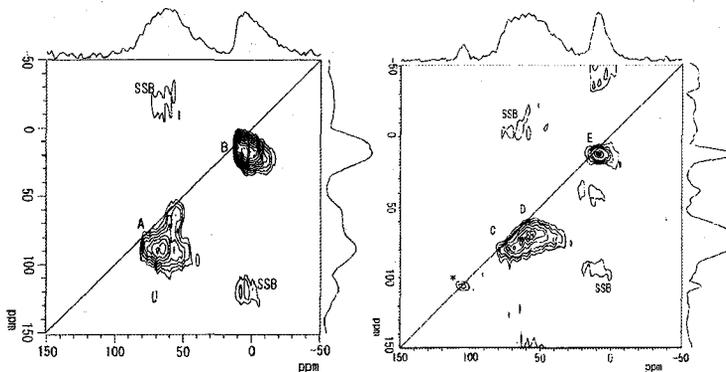


Fig.2  $^{27}\text{Al}$  3Q-MAS スペクトル：左図 9.4 T, 右図 14.1 T  
 積算=1920 回(9.4T), 480 回(14.1T)、MAS=15kHz、待ち時間=2 秒  
 (\*はサンプル管のバックグラウンド信号)

### 【まとめ】

本研究では、スラグ中に少量含まれるアルミの  $^{27}\text{Al}$ -MQ-MAS スペクトルの磁場強度依存性を調べた。14.1T の静磁場下で測定した MQ-MAS スペクトルは、9.4T で測定したものに比べ、感度、分解能とも格段の向上が見られ、9.4T では分離できなかったピーク A が、14.1T で分離できていることから、磁場向上による情報量の増加をはっきり示すことができた。実材料は、複雑な構造を持つ少量成分の解析を要求される。スラグは、その実例の一つである。今回の研究により、600 MHz を超える高磁場 MQ-MAS 法は、このような材料の構造解析に対して有効な武器となることが示せた。

### 文献

1. L. Frydman, J.S. Harwood, J. Am. Chem. Soc. 117(1995)5367.
2. 金橋康二、齋藤公兎、杉沢寿志, 第 39 回 NMR 討論会要旨集,(2000)368.

MAS 条件下で同種核二量子双極子相互作用を  
リカップリングできるオフセット帯域の、RF パルス列による制御  
(阪大たんぱく研) ○松木陽、藤原敏道、阿久津秀雄

**Effective-Bandwidth of the Homonuclear DQ-Dipolar Recoupling  
Controlled by RF-Pulse Sequence under MAS Conditions.**

Yoh Matsuki, Toshimichi Fujiwara, Hideo Akutsu

*Institute for Protein Research, Osaka University, Suita 565-0871, Japan*

Pulse sequences that recouple the homonuclear dipolar interaction under MAS condition are important for signal assignments. For the recoupling, rotor-synchronized series of 'cyclic' element pulse is often used. We previously reported that the effective range of the recoupling could be controlled by modifying element pulse so that z-component of its residual rotation axis is suppressed under arbitrary mixing power. Here, we show that a derivative of our element pulse, which is now made to comprise a finite z-rotation, gives magnetization transfer between pairs of spin having various isotropic chemical shift differences without changing MAS rate. This is experimentally demonstrated on U-[<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]-labeled L-alanine where C<sup>α</sup>-magnetization is selectively transferred to C=O or C<sup>β</sup> in the same molecule. Either of the two transfer paths can be selected by simply changing irradiation frequency. The appropriate irradiation frequency is theoretically predictable. The low mixing power requirement keeps good transfer efficiency, making the method favorable even under fast MAS conditions.

はじめに MAS 条件下において核スピン間に高い効率で磁化を移動する技術は、信号の帰属を行う上で必要不可欠である。ラジオ波パルスによってハミルトニアンのスピンパートを制御することで、普通は MAS 条件下で平均化される異方的なスピンスピン相互作用を一部復活 (リカップリング) することができる。しばしば用いられる方法は、位相の異なるエレメントパルスを試料管の回転に同期して照射するものである。各エレメントパルスは一周期の後にスピンの状態を元に戻すサイクリックな性質のものが用いられる。試料管が2回転する期間に360度の5等分ずつラジオ波位相を増加させるスキーム (C5<sub>2</sub>と表記される) でエレメントパルスを照射することで、ゼロ量子双極子や CSA 項を効果的に抑制し、二量子の双極子相互作用だけをリカップリングできる事が知られている。エレメントパルスとしては従来、

$$\left(\frac{\pi}{2}\right)_{\phi} (2\pi)_{\phi+\pi} \left(\frac{2\pi}{3}\right)_{\phi}; \quad \phi = k2\pi/5 \quad (k=0\sim 4)\dots[1]$$

などが用いられてきた。しかしながら、これは広い周波数帯域で一様に二量子双極子相互作用をリカップリングできる反面高速の MAS 条件下では、除去されずに一部残る <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H 間の双極子結合の干渉によって実験全体の感度が悪化するのが問題であった。

我々は、リカップリングの高い効率を維持したまま、いろいろに帯域をコントロールできる方法を開発してきた。これによって各実験の目的ごとに必要最低幅のリカプル帯域を用いることが可能になる。たとえば、アミノ酸種ごとの信号帰属には、側鎖の C<sup>β</sup> の化学シフト値を知ることが重要であるが、このためには脂肪族炭素が共鳴する比較的狭い帯域だけでリカプルする方が効果的である。狭い帯域のリカップリングに十分な比較的弱い混合パルス強度は <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H 双極子相互作用のデカップルを容易にし、実験の感度を向上するからである。帯域のコントロールは次のような、ラジオ波磁場強度に対して一般的な形を持つエレメントパルスを用いる事で得られた。

固体 NMR, 同種核二量子双極子相互作用, リカップリング, マジック角試料回転, 安定同位体標識  
まつきよう、ふじわらとしみち、あくつひでお

$$(a/2 - 90^\circ)_\phi (a)_{\phi+\pi} (a/2 + 90^\circ)_\phi \dots [2]$$

ここで  $a = \frac{\gamma B_1 \tau_R}{5}$ ,  $\tau_R$  はロータの一回転に要する時間である。今回われわれは、[2]の元素パルスの拡張、

$$(a/2 - 90^\circ + \varepsilon)_\phi (a)_{\phi+\pi} (a/2 + 90^\circ - \varepsilon)_\phi; (\varepsilon \text{ は任意}) \dots [3]$$

から得られた元素パルス  $\{a = 280^\circ, \varepsilon = 30^\circ\}$  を用い適切な搬送周波数を選択すれば、異なる化学シフト差を持つスピン組のうち、特定の組の間に選択的に磁化を移動することができることを示す。目的のスピン間だけに磁化を移動するための、適切な搬送周波数は下に示すように理論から予測して用いることができる。

**理論** 上記のパルススキーム  $C5_2^1$  によって、混合パルスの搬送周波数の近傍ではスピン系のハミルトニアン中に 2 量子双極子項だけを優先的に残せる事が知られている<sup>1</sup>。これを通した磁化移動過程において、移動効率のオフセットに依存した悪化は、共鳴条件で満たされる元素パルスのサイクリックな性質がオフセットにおいて大きく逸脱することが影響していると考えられる。非常に短いサイクル時間を仮定すれば、有効ハミルトニアンは下記のように近似できる。

$$\bar{H}_{\text{eff}}(5\tau_c) = \bar{H}_{(12)}^{\text{DQ}} + \bar{H}_{\text{res}} \dots [4]$$

ここで  $\bar{H}_{(12)}^{\text{DQ}}$  はスピン 1・2 間の双極子結合項、 $\bar{H}_{\text{res}}$  はオフセット条件で元素パルスが引き起こす、磁化の残余回転項である。各元素パルスの残余回転は任意方向の軸を持つ一般的な回転になり得るが、それぞれの軸は異なる 5 等分の位相で xy 平面内で平均化されていることを考えれば、 $\bar{H}_{\text{res}}$  による回転の横軸成分は第一次近似では無視できると考えられる。したがって後者のハミルトニアンは

$$\bar{H}_{\text{res}}(5\tau_c) \approx \zeta I_z \dots [5]$$

のように書ける。 $\zeta$  は残余回転の z 成分の周波数とする。この残余回転の大きさを制御することでリカップリングパルス列の性質を制御できる。我々は以前に、[2]の元素パルス ( $\varepsilon = 0$ ) を用いれば、 $\zeta$  を搬送周波数付近でごく小さく抑えられることを利用し、リカップリングの有効帯域をいろいろに変化させる方法を得た。今回、 $\varepsilon > 0$  を用いることで有効ハミルトニアン中に残余回転項を意図的に導入し、リカップリングのオフセットに対するスケールンを変化させることで、化学シフト差の異なるいろいろなスピン組に選択的にリカップリングできる方法を開発した。図 1 (i) には元素パルス  $\{a = 280^\circ, \varepsilon = 30^\circ\}$  を仮定して、2 つのスピンそれぞれに計算した  $\zeta$  の値の和  $\sum \zeta = \zeta_1(Q_{\text{off}}) + \zeta_2(Q_{\text{off}})$  を、それぞれの化学シフトの関数としてプロットしたものを示してある。また、有効ハミルトニアン  $\bar{H}_{\text{eff}}$  の下での、混合期  $\tau_m$  後における、スピン 1 の z 磁化からスピン 2 の z 磁化への移動効率  $E$  は回転系でのコヒーレンス移動の理論によれば、共鳴オフセット  $Q_{\text{off}}$  の関数として

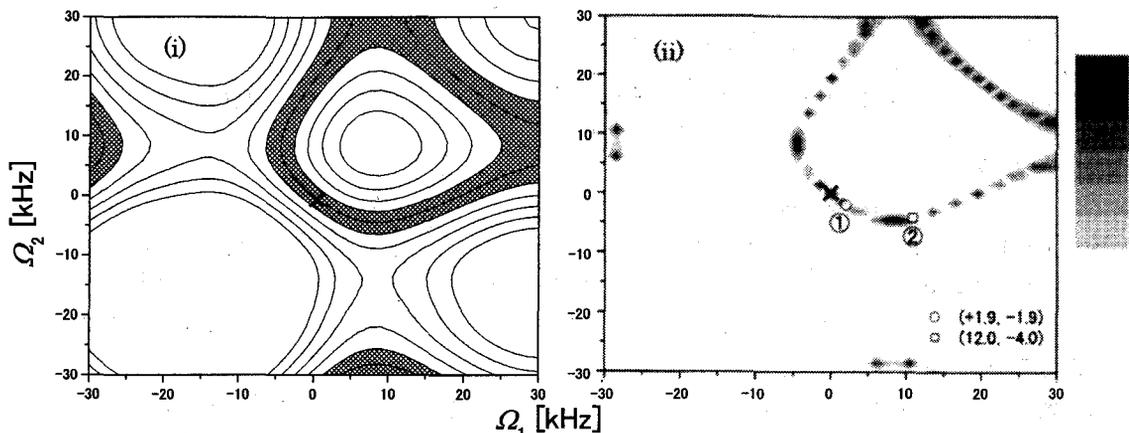


Figure 1 The z-rotation frequency summed for two spins,  $\Sigma\zeta$ , and magnetization transfer efficiency,  $E(\Omega_{\text{off}})$ , are plotted as a function of isotropic chemical shift of each spin in (i) and (ii), respectively. The result is shown for the element pulse of [3] with  $\{a = 280^\circ, \varepsilon = 30^\circ\}$ , which uses mixing power of  $\gamma B_1/2\pi = 48$  kHz under MAS rate of  $\nu_R = 12.5$  kHz. In (i), regions of  $-2 \text{ kHz} < \Sigma\zeta < 2 \text{ kHz}$  are shaded.

$$E(\Omega_{\text{off}}) = \sin^2 \left[ \tan^{-1} \left( \frac{\omega_{\text{DQ}}(\Omega_{\text{off}})}{\zeta_1(\Omega_{\text{off}}) + \zeta_2(\Omega_{\text{off}})} \right) \right] \dots [6]$$

と表される<sup>2</sup>。 $\omega_{\text{DQ}}(\Omega_{\text{off}})$ はリカップリングできる二量子双極子項の強度である。図1(ii)には同じ元素パルスについて $E(\Omega_{\text{off}})$ の化学シフト依存性を同様にプロットしてある。両者の比較によって、磁化移動のオフセット依存性は、単一スピンのオフセットでの回転挙動で主に決定されるとわかる。中心の×印の搬送周波数からのオフセットが①  $\pm 2$  kHzのスピングループ、②  $-4$  kHzと $+12$  kHzのスピングループの両方に磁化移動が望めることが示されている。これらの組が持つ化学シフト差は実験条件の磁場の下 ( $^1\text{H}$  共鳴周波数 500 MHz) で、用いた均一標識アラニン試料のそれぞれ、 $\text{C}^\alpha/\text{C}^\beta$ 間、 $\text{C}^\alpha/\text{C}=\text{O}$ 間の化学シフト差に相当する。

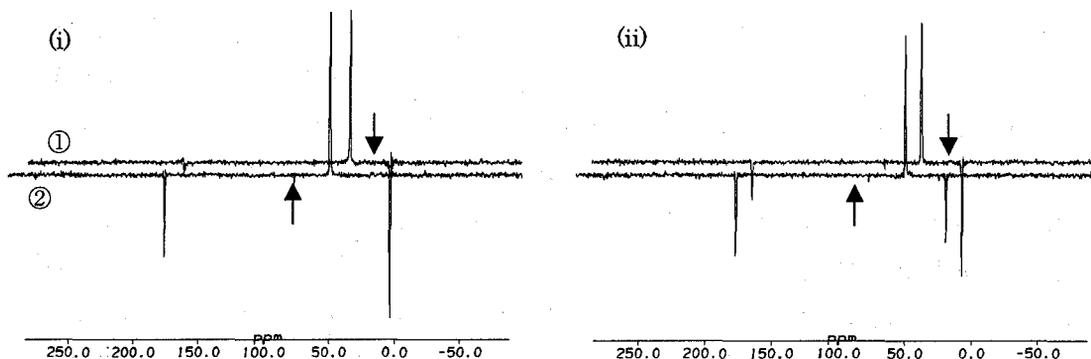


Figure 2 Spectra of powdered uniformly [ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-labeled L-alanine obtained in the magnetization transfer experiment. The element pulse used for mixing is (i)  $\{a = 280^\circ, \varepsilon = 30^\circ\}$ , which is introduced in this work, and (ii)  $\{a = 360^\circ, \varepsilon = 0^\circ\}$ , which has been used for broadband operation. In (i), spectra were obtained with the carrier which are set at positions corresponding to ① and ② of Fig. 1(i), and indicated by arrows.

**結果** 図2はアラニンを用いた磁化の移動実験で得たスペクトルで、混合パルスの搬送周波数が矢印で示されている。この実験では $C^\alpha$ に選択的に磁化を励起した後、混合期にエレメントパルス $\{\alpha = 280^\circ, \varepsilon = 30^\circ\}$ を用いて同一分子内の他の炭素、つまり $C^\beta$ か $C=O$ に移動させる。図1中に①と②で示された点に対応する搬送周波数を用いたとき、磁化の移動相手を $C^\beta$ か $C=O$ に完全にコントロールできることが図2の(i)に示されている。図2の(ii)は同様の磁化移動実験を[1]のエレメントパルスを用いて行った結果である。移動の選択性が低いことに加え、特に $C^\alpha/C^\beta$ 間の移動に関してはその効率も(i)と比べて非常に悪いのが分かる。このエレメントパルスでも搬送周波数を極端に低/高次場側にシフトさせることで移動の選択性を高めることはできるが、引き換えに移動の効率はさらに著しく悪化する。移動の選択性は、目的以外のスピンへの磁化の漏れを防ぐので測定感度の面からも重要であるが、観測周波数幅を極力狭く抑えたい多次元実験においては、折り返し信号を抑制する上でも特に重要である。

**考察** 今回紹介したエレメントパルス $\{\alpha = 280^\circ, \varepsilon = 30^\circ\}$ は、化学シフト差がそれぞれ約4 kHzと16 kHzであるアラニンの $C^\alpha/C^\beta$ 間、 $C^\alpha/C=O$ 間に選択的に磁化を移動した。さらに図1は、このエレメントパルスが、MASの周波数を変えずに、25 kHz程度までの任意の化学シフト差を持つスピン組に磁化移動を実現できる可能性があることを示している。今回、複合ラジオ波パルス列を用いて得られた磁化の選択的移動は、連続ラジオ波場による回転共鳴ティックリング法(R2TR)<sup>8</sup>によっても可能であるが、我々の方法では移動の各周波数帯の幅を比較的容易に広げることができる可能性があり、多次元測定への応用も期待できる。我々のエレメントパルスに要求される混合パルスの強度は[1]のエレメントパルスに要求されるもの(MAS周波数 $\nu_R = 12.5$  kHzの下で $\gamma B_1 / 2\pi = 63$  kHz)と比べて小さく( $\gamma B_1 / 2\pi \approx 48$  kHz)、比較的高速のMAS条件下でも高い移動効率を実現できる。さらに、特定のスピンプアに選択的に二量子双極子相互作用をリカップリングする方法は、近傍の核からの強い双極子結合の干渉を避け微小な相互作用の観測を可能にする。

ペプチドの $^{13}C$ 信号の帰属に一般的に用いられるNCACB実験では窒素核の化学シフトで標識した磁化が同一残基内の $C^\alpha$ に移された後、さらに側鎖の炭素に移され観測される。同様にN(CO)CACB実験では窒素磁化は隣接するアミノ酸残基の $C=O$ に移され、続いて側鎖炭素の化学シフトで観測される。両者はそれぞれ残基内、残基間の相関スペクトルを得るのに重要であるが、前者は脂肪族炭素同士、後者はカルボキシル炭素と脂肪族炭素の同種核間磁化移動を要求する。前者は小さな、後者は大きな化学シフト差のスピン組間の磁化移動を求めるから、二つの実験では目的に適した別の混合パルススキームを用いることが、感度向上の面から望ましかった。今回紹介した新しいエレメントパルスは両方の目的を、パルスの搬送周波数を変更するだけで達成するので、両実験にまったく同一のパルススキームを用いることができる。

#### 参考文献

1. M. Carravetta *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, **321**, 205-215, 2000.
2. L. Muller and R. R. Ernst, *Mol. Phys.*, **38**(3), 963-992, 1979.
3. K. Takegoshi *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, **232**, 424, 1995.

Uniform  $^1\text{H} \rightarrow ^2\text{H}$  Cross Polarization (UNI-CP) in Solids

Takashi Mizuno, K. Takegoshi and Takehiko Terao

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University,  
Kyoto 606-8502, Japan**Abstract**

To overcome the low sensitivity of  $^2\text{H}$  NMR in powdered solids, we developed a novel Uniform  $^1\text{H} \rightarrow ^2\text{H}$  Cross Polarization (UNI-CP) scheme which enhances a whole  $^2\text{H}$  powder pattern uniformly. The sequence is based on Lee-Goldburg irradiation to  $^2\text{H}$  employed to spin-lock the  $^2\text{H}$  magnetization without the effect of the quadrupolar interaction.

$^2\text{H}$  is a spin=1 nucleus and its powder spectrum is distributed by quadrupolar interaction of the order of a few 100kHz. Further, the sensitivity of conventional direct  $^2\text{H}$  observation using the solid-echo sequence is relatively low, because of its low gyromagnetic ratio (15% of that of  $^1\text{H}$ ). To overcome the low sensitivity, we propose here to apply the cross-polarization signal enhancement method from abundant  $^1\text{H}$  spins.

It should be noted that, however, with the conventional cross-polarization sequence employing on resonance spin-locking, only a part of the  $^2\text{H}$  powder pattern is enhanced (Fig.1) because the Hartmann-Hahn condition is modified to be  $\nu_1^{2\text{H}} + \nu_Q(\alpha, \beta, \gamma) = \nu_1^{1\text{H}}$ , where  $\nu_Q$  denotes the quadrupole coupling for a micro crystallite at the orientation  $(\alpha, \beta, \gamma)$ <sup>1)</sup>.

To enhance the whole  $^2\text{H}$  powder pattern, one simple way is to remove the quadrupolar interaction, which can be achieved by the Lee-Goldburg (LG) irradiation<sup>2)</sup> to  $^2\text{H}$ , that is, the direction of the effective field is along magic angle from the external field. Under LG irradiation, the spin part of the zeroth-order quadrupolar interaction is averaged to be zero, hence the Hartmann-Hahn condition is modified to be  $\nu_1^{2\text{H}}_{eff} = \nu_1^{1\text{H}}$ , where  $\nu_1^{2\text{H}}_{eff} = \sqrt{(\nu_1^{2\text{H}})^2 + \Delta\nu^2}$ :  $\Delta\nu$  is the offset from the carrier frequency. Note that the new Hartmann-Hahn condition does not involve the orientations of crystallites, the uniform enhancement is thus expected. Fig.3 shows two  $^2\text{H}$  spectra taken by (a) the solid echo sequence, and by (b) the UNI-CP sequence shown in Fig.2. Significant enhancement is achieved.

**references**

- 1) Takegoshi, K et al., *Chem. Phys. Lett.* (1996) **260**, 159
- 2) Lee, M et al., *Phys. Rev. A* (1965) **140**, 1261

Keywords : Cross polarization, Quadrupolar interaction, Lee-Goldburg irradiation  
みずの たかし、たけごし きよのり、てらお たけひこ

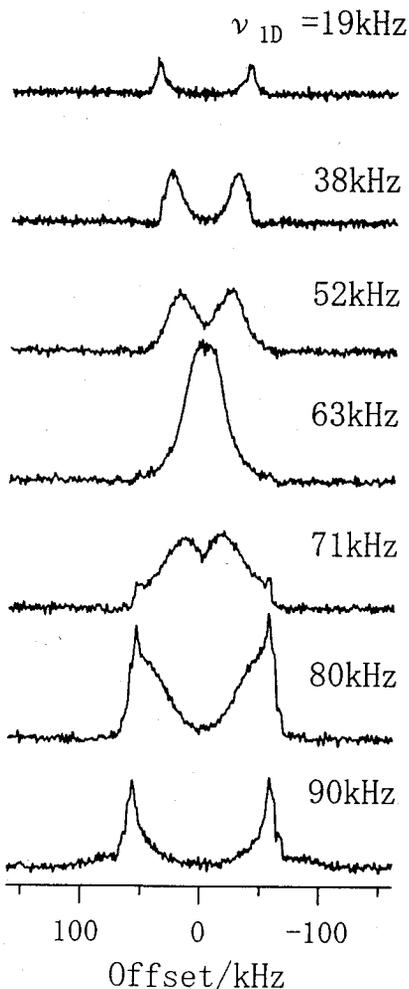


Fig.1  $^2\text{H}$  rf-field amplitude dependence of  $^2\text{H}$  spectra observed for  $\alpha\text{-NH}_2\text{CD}_2\text{COOH}$  using normal CP.  $^1\text{H}$  rf-field amplitude was 63kHz. This figure is reproduced from ref.2).

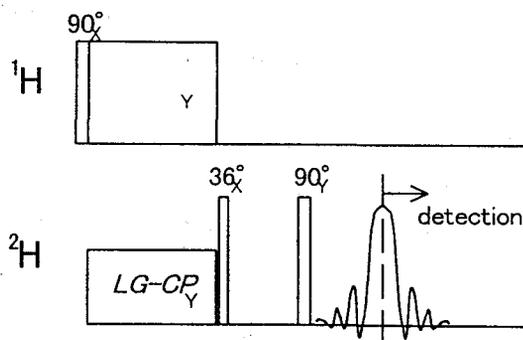


Fig.2 :Pulse sequence for UNI-CP.

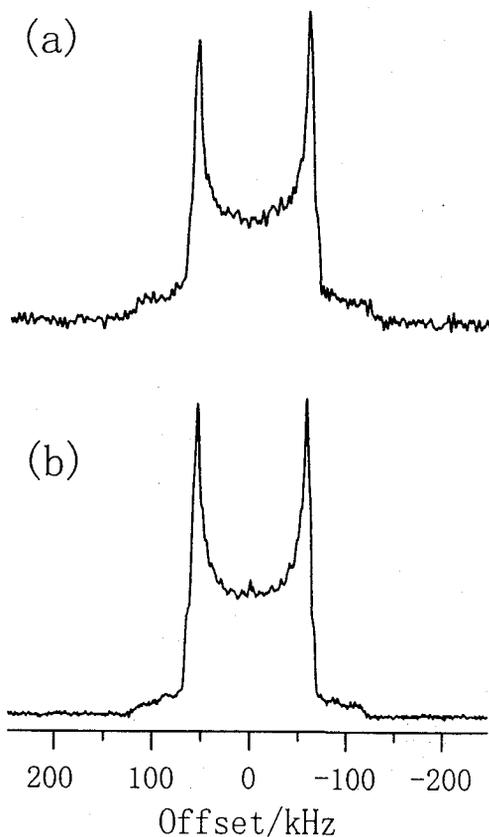


Fig.3  $^2\text{H}$  powder pattern spectra observed for  $\alpha\text{-NH}_2\text{CD}_2\text{COOH}$  using (a) the solid echo sequence and using (b) the UNI-CP sequence. (a)The solid echo sequence was used with the pulse repetition time of 225s and 64 FIDs accumulated. (b) The UNI-CP sequence was used with the contact time of 15msec, the pulse repetition time of 2.5s, and 5760FIDs were accumulated. Note that the total acquisition time (240min) was set to be equal for both spectra. The  $^1\text{H}$  rf-field amplitude was 102kHz and that of  $^2\text{H}$  for CP was 80kHz. NMR measurements were carried out on CheMagnetics 300 spectrometers, at  $^2\text{H}$  NMR frequency of 46.122 MHz. CheMagnetics  $5\phi$  probe was used. All measurements were taken at room temperature.

$^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR

(Kyoto Univ.) OS. Nakamura, K. Takegoshi, T. Terao

A new  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  polarization transfer mechanism (Dipolar-Assisted Rotational Resonance, DARR) under magic-angle spinning (MAS) is presented. DARR have some desirable features: (1) no rf-irradiation to  $^{13}\text{C}$ , (2) less restriction for the spinning speed, and (3) high resolution during observation. DARR shows band-selective recoupling because of homogeneous broadening due to the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  dipolar interaction, which can be used to recouple carboxyl/carbonyl/aromatic carbons and aliphatic carbons. Further, for a longer polarization transfer period, second order recoupling among  $^{13}\text{C}$  spins with smaller chemical shift differences, such as aliphatic carbons, does occur. Hence, DARR becomes broadband. These features would make DARR useful for the structural study of peptides.

試料回転下(MAS)での  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  磁化移動実験は、分子の構造情報を得る手法として用いることができるために、いくつかの手法が開発されてきた。中でも、MAS による双極子相互作用の平均化を妨げるように  $^{13}\text{C}$  核への RF 照射を行う RF 駆動系の手法は、高い磁化移動効率を示すことが知られている。一方で、RF 駆動法における  $^{13}\text{C}$  への RF 照射によりもたらされる  $^{13}\text{C}$  磁化の速い減衰(～数 ms)は磁化移動の観測時間を制限するために、2bond 以上離れた核間の相関情報を得ることの大きな妨げになることが考えられる。そこで我々は、 $^{13}\text{C}$  核にラジオ波を照射しないで、代わりに  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  相互作用を利用して  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  間の flip-flop 項を復活させることのできる手法を模索してきた。 $^{13}\text{C}$  への RF 照射を行わないことは、 $^{13}\text{C}$  磁化移動実験を縦緩和時間の間で行うことができることを意味する。最近我々は、RIR 法 (Resonant Interference Resonance) [1]と DARR 法 (Dipolar-Assisted Rotational Resonance) [2] という MAS 下での  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  双極子相互作用のリカップリング法を開発した。RIR 法では、Frequency-switched Lee-Golgburg パルスに基づいた FSLG- $m\overline{2mm}$  を照射することで  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  双極子相互作用を導入する。FSLG- $m\overline{2mm}$  のもとで、 $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  双極子相互作用の空間部分は MAS 周波数による変調を受け、スピン部分は FSLG- $m\overline{2mm}$  による変調を受ける。一方、 $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  双極子相互作用は空間部分が MAS 周波数により、スピン部分が化学シフト等方値差による変調を受けている。 $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  相互作用のリカップリングは、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  と  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  の双極子相互作用の変調周波数が一致するように FSLG- $m\overline{2mm}$  のサイクルタイムを調整することで達成される。一方、DARR 法では、Rotary-Resonance 条件をみたく  $^1\text{H}$  への CW 照射により  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  双極子相互作用を復活させて、広幅化した  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  双極子パターンともう一方の  $^{13}\text{C}$  の MAS サイドバンドを Spectral overlap させることで行われる。RIR 法と異なり、DARR 法では  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  の

key word : spin diffusion, rotary resonance

なかむら しんじ、たけごし きよのり、てらお たけひこ

flip-flop 項は取り除かれていない。つまり、 $^{13}\text{C}$  ラインは  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  と  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  により広幅化されている。

本発表では、 $^{13}\text{C}$  への RF 照射を行わない  $^1\text{H}$  駆動法も加えて、リカップリング効率や周波数選択性などについて比較を理論と実験により行う。

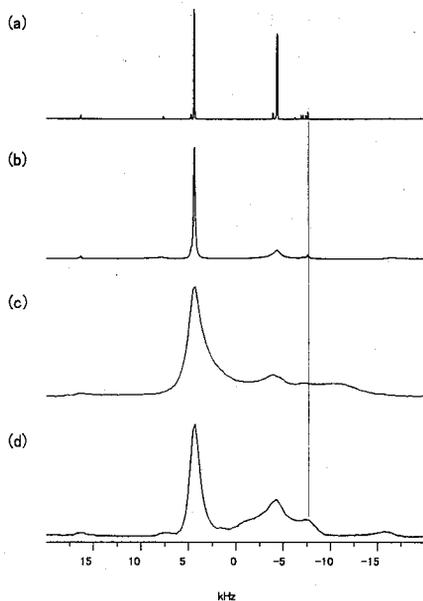


Fig. 1.  $^{13}\text{C}$  CP/MAS spectra of *N*-acetyl [1,2- $^{13}\text{C}$ ] DL-valine at a spinning frequency  $\nu_R$  of 12.0 kHz; with  $^1\text{H}$  CW decoupling (a), without  $^1\text{H}$  decoupling (b), with  $^1\text{H}$  irradiation for  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  recoupling by rotary resonance ( $\nu_1 = \nu_R = 12$  kHz) (c) and by the FSLG-242 sequence (d). The vertical line shows the position of a spinning sideband of  $^{13}\text{C}=\text{O}$ . The main difference of two irradiation (c) and (d) is polarization transfer with and without  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  coupling, respectively.

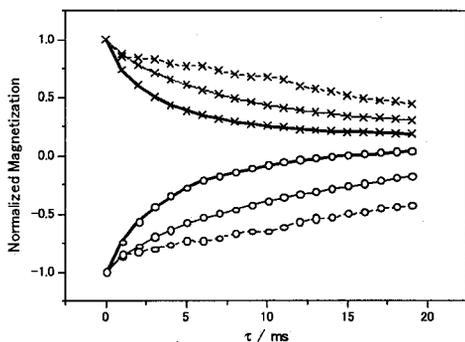


Fig. 2. Mixing-time dependence of the normalized magnetization of  $^{13}\text{C}=\text{O}$  ( $\times$ ) and  $^{13}\text{CH}$  ( $\circ$ ) in *N*-acetyl [1,2- $^{13}\text{C}$ ] DL-valine at  $\nu_R = 12$  kHz. The  $^{13}\text{CH}$  magnetization is selectively inverted before the mixing

time. Three different  $^1\text{H}$  irradiation conditions during the mixing time were examined: (1) no irradiation (tick line), (2) FSLG-242 (broken line), and (3) irradiation with rotary resonance condition (solid line). The lines drawn for eye guidance. It is shown that the polarization transfer under DARR with  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  coupling is most efficient. This shows the indispensable role of the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  coupling for efficient DARR. That is, the homogeneous broadening of  $^{13}\text{C}$  resonances due to the non-zero  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  coupling relaxes the DARR condition, thus increasing the number of carbons to be recoupled.

[1] K. Takegoshi, S. Nakamura, and T. Terao, Chem. Phys. Lett. 307 (1999) 295.

[2] K. Takegoshi, S. Nakamura, and T. Terao, Chem. Phys. Lett. 344 (2001) 631.

## 光・マイクロ波誘導偏極核スピンの高磁場観測

(京都大学大学院理学研究科)

○古布村亮次、武田和行、阿部智彦、竹腰清乃理、寺尾武彦

Observation of photo- and microwave-induced nuclear polarization in high magnetic field

(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University)

○R. Koumura, K. Takeda, T. Abe, K. Takegoshi, T. Terao

In order to realize a high-field observation of nuclear magnetization, enhanced in low field by dynamic nuclear polarization (DNP) due to photo-excited triplet electron spins, a sample-shuttle system has been developed, which consists of superconducting and non-core magnets, a loop-gap resonator for microwave irradiation, a quadrupole coil for field sweep, and 200 MHz - 50 MHz double-tuned probe for  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  double resonance NMR. Using this system,  $^1\text{H}$  polarization can be built up by a repetition of the integrated cross polarization (ICP) technique in low field (0.3 T), and the sample can be moved into high field (4.7 T), where the  $^1\text{H}$  polarization is further transferred to  $^{13}\text{C}$  by the conventional cross polarization (CP) technique. The experiment is demonstrated in a single crystal of 0.018 mol% pentacene-doped naphthalene.

[序] 電子スピン偏極を核スピンへ移動させる動的核偏極(Dynamic Nuclear Polarization: DNP)によりNMR信号を大幅に増大化させることができる[1]。DNPを行うためには、試料中にフリーラジカルか光照射により三重項状態へ励起する分子が含まれている必要があるが、後者には以下のような利点がある。(a)光励起で得られる三重項状態の中にはフリーラジカルよりはるかに大きな電子スピン偏極を持つものがある。(b)光励起三重項状態は有限の寿命を持ち基底状態へ減衰するためNMR信号への影響を及ぼさない。これまでに提案されている最も効率的なDNPの手法は、回転系の光励起三重項電子スピンと実験室系の核スピンの間でのcross polarizationに基づくもので[2]、ペンタセンをドーブしたナフタレン単結晶を用いて0.3 T、100 Kで32%の $^1\text{H}$ スピン偏極が得られている[3]。また、最近では粉末試料においても光励起三重項状態を用いたDNPが可能であることが示され[4]、化学的・生物学的に興味深い系でのNMR信号増大化の実現に向けて期待が持たれている。しかしこれらの実験は、利用可能なマイクロ波の出力の制約のもとで回転系の電子スピンと実験室系の核スピンとの間でHartmann-Hahn条件を満たすために、約0.3 Tという低い磁場中でしか行われておらず、増大したNMR信号を高分解能測定することが不可能だった。そこで我々は、0.3 Tで光励起三重項状態を用いたDNPを行った後、試料を4.7 Tの高磁場へシャトルして $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 二重共鳴NMRを行うことができるシステムを開発した。

Key words: 光励起三重項状態、動的核偏極(DNP)、試料シャトル、高磁場NMR

こむら りょうじ、たけだ かずゆき、あべ とむひこ、たけごし きよのり、てらお たけひこ

[装置と実験] 4. 7T超伝導マグネットの下に、空芯コイルを設置し、ステッピングモーターにより両者の間を約1秒で試料が移動できるようにした(fig. 1)。空芯コイルには光照射をするために10mm幅のスリットが設けられている。また、0~55 Aの電流制御により、空芯コイルの中心部に0~0.32 Tの磁場を作り出すことができ、そこにXバンドマイクロ波照射のためのループギャップレゾネータと磁場掃引のための四重極コイルが設置してある。超伝導マグネット中には200MHzと50MHzに共振のとれたサドルコイルがセットされており、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 二重共鳴NMRを行うことができる。また、両マグネット内部は真空二重管によって外界と熱的に遮断されており、試料の温度を100Kから300Kの範囲で制御可能である。fig. 2にパルスシーケンスを示す。シーケンスの前半では低磁場中でintegrated cross polarization (ICP)を繰り返し行い、 $^1\text{H}$ スピン偏極をビルドアップしている[3,4,5]。その後、試料を高磁場中へシャトルし通常のCPを用いることで、光励起三重項スピンの偏極を $^1\text{H}$ 経由で $^{13}\text{C}$ に移動させている。

実験はペンタセンをドーブしたナフタレン単結晶(ペンタセン濃度0.018mol%)を試料に用いて100Kで行った。fig. 3に、ICPを0.2925Tで50Hzの繰り返しで5400秒測定を行った後4.7Tで観測した $^{13}\text{C}$ のスペクトルを示す。この $^{13}\text{C}$ の信号強度は、4.7T 100Kにおける熱平衡時と比べて140倍になっており、低磁場でエンハンスした核スピン偏極を高磁場で観測することに成功している。

[今後の展望] 原理的には、より一層の信号強度の増大化が期待できるので[3, 5]、今後は更なる実験条件の最適化を図りたい。また現在は生体物質への応用を目標に、トリプトファンの光励起三重項状態を用いたDNP実験が進行中である。

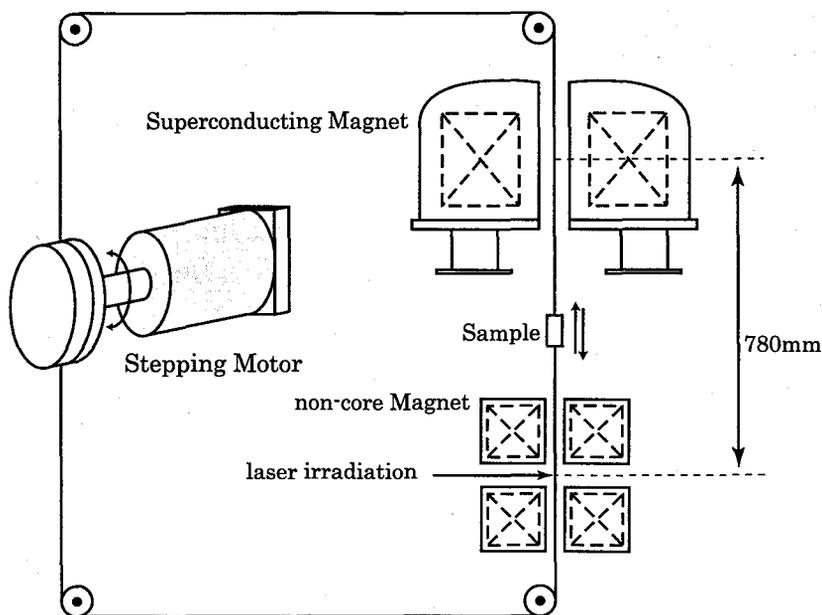


fig. 1. Schematic view of a sample shuttle system.

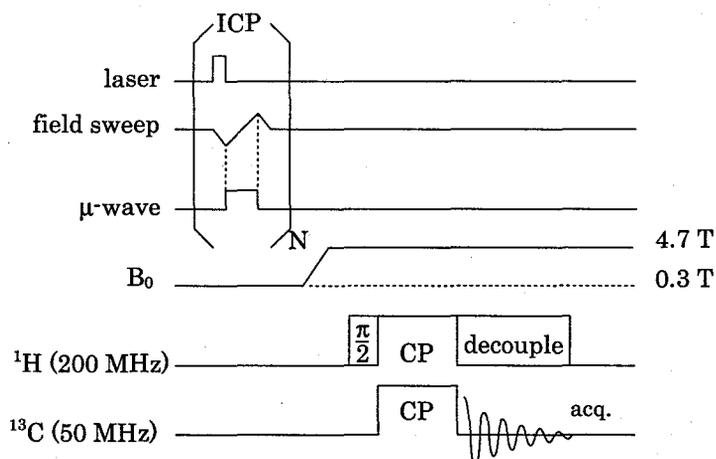


fig. 2. Pulse sequence for the high-field observations of NMR signals enhanced by DNP due to photo-excited triplet electron spins in low field. After the buildup  $^1\text{H}$  polarization by the integrated cross polarization (ICP) sequence in 0.3 T, the sample is moved into 200 MHz-superconducting magnet, where the spin polarization is further transferred to  $^{13}\text{C}$  by the conventional cross polarization (CP) technique.

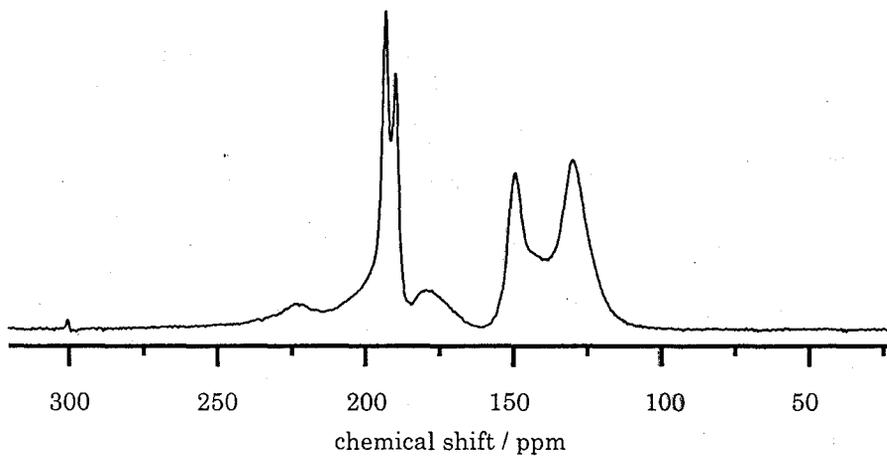


fig. 3. Enhanced  $^{13}\text{C}$  spectrum in a single crystal of 0.018 mol% pentacene-doped naphthalene at 100 K. Before the signal detection in 4.7 T, the ICP sequence was repeated at a rate 50 Hz for 5400 s in 0.2925 T.

#### References

- [1] A. Abragam, *Principles of nuclear magnetism*, Clarendon Press, Oxford (1961).
- [2] A. Henstra et al., *Chem. Phys. Lett.*, **165**, 6 (1990).
- [3] M. Iimuna et al., *Phys. Rev. Lett.*, **84**, 171 (2000).
- [4] K. Takeda et al., *Chem. Phys. Lett.*, **345**, 166 (2001).
- [5] K. Takeda et al., 第39回 NMR 討論会講演要旨集, 48 (2000).

## 固体 NMR による(AlaGlyGly)<sub>10</sub> の精密構造の決定と クモ牽引糸の構造との関連

(東京農工大<sup>1</sup>、バリアンテクノロジーズジャパン<sup>2</sup>)

○芦田淳<sup>1,2</sup>・小松耕平<sup>1</sup>・朝倉哲郎<sup>1</sup>

The Determination of the Structure of (AlaGlyGly)<sub>10</sub> by Solid State NMR and  
the Relationship with the Spider Dragline Silk Structure.

Jun Ashida<sup>1,2</sup>, Kohei Komatsu<sup>1</sup>, and Tetsuo Asakura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology,  
<sup>2</sup>Varian Technologies Japan Ltd.

Spider dragline silk consists of the repetition of two unique motifs – poly-Ala, and Gly-rich regions. From the previous studies, the structure of poly-Ala region in dragline silk was characterized as  $\beta$ -sheet, and contributed to the strength of the dragline silk. While, the detailed structure of Gly-rich regions have not been determined yet, however, it was suggested that (Gly-Gly-X) motif contributes to the elasticity of the dragline silk. In this study, the local structure of the isotope-labeled (AlaGlyGly)<sub>10</sub> was determined as  $3_1$ -helix by solid-state two-dimensional spin-diffusion NMR, and <sup>13</sup>C chemical shift contour maps. And also the Gly-rich region motifs of natural dragline silk were analyzed by these solid state NMR methods, and the structure of them was compared with (AlaGlyGly)<sub>10</sub>.

### 【緒言】

家蚕絹フィブロインと異なり、クモの生命線である牽引糸は、4~7個の Ala 連鎖領域と Gly リッチ領域の2種類の特異的なモチーフの繰り返し構造で成り立っている。その Ala 連鎖領域は、 $\beta$ シート構造を形成し、異常に強い糸の源となっていることが、これまでの多くの研究から明らかにされてきた。一方 Gly リッチ領域の決定的な構造は得られていないが、Kummerlen[1]らによるスピン拡散固体 NMR の研究から、(GlyGly-X)の繰り返し構造が $3_1$ -ヘリックスを形成し、その弾性の発現に寄与している可能性が示唆されている。

そこで、本研究では、任意の炭素や窒素を <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N でラベルした(AlaGlyGly)<sub>10</sub> を合成し、配向しない系にも適用できる2次元スピン拡散固体 NMR 法[2, 3]などの固体 NMR の手法を用いて構造の決定を行った。一方、クモの Gly 残基を含む天然化合物についても同様の解析を行い、構造を比較・検討した。

### 【試料作成】

試料は、Pioneer Peptide Synthesis System(PE Biosystems 社製)を用いて、Fmoc 固相合成法により合成した。得られた粗ペプチドを 9M LiBr 溶液に溶解後、不純物を吸引濾過により除去し3日間透析を行い、NMR 測定に供与する試料を得た。

---

ポリアラニルグリシルグリシン、クモ牽引糸、2次元スピン拡散固体 NMR

あしだ じゅん、こまつ こうへい、あさくら てつお

### 【NMR 測定】

固体 NMR は、Varian UNITY/NOVA400 および Chemagnetics Infinity400 を用いて測定した。2次元スピンドiffusion NMR では、試料回転速度は 6kHz、ミキシングタイムは、分子内でのスピンドiffusionがおこるが分子間でのスピンドiffusionがほとんど無視できる条件で最適化を行い、2秒と設定した。また、試料回転角度はマジック角から 5~10 度程度ずらして測定した。シミュレーションスペクトルは、SGI の OCTANE Workstation 上で自作の FORTRAN プログラム[2, 3]を使用して求めた。

### 【結果と考察】

図 1 に(AlaGlyGly)<sub>10</sub> の 14 番目と 15 番目の Gly のカルボニル炭素を選択的に <sup>13</sup>C-enrich した試料の固体 2次元スピンドiffusion NMR スペクトルを示した。この実験スペクトルとシミュレーションスペクトルの比較を行った。さらに、Ala の C<sub>β</sub> の化学シフト値が 17.3ppm であり、3<sub>1</sub>-ヘリックス構造の典型的な化学シフト値 17.4ppm[4]とよい一致を示すことより、15 番目の Gly 残基の内部回転角は( -90° ±10° , 150° ±10° )と求められた。図 2 に内部回転角(φ, φ)=( -90° , 150° )のシミュレーションスペクトルを示した。

発表当日は、残りの 3n+1 番目の Ala や 3n+2 番目の Gly の内部回転角を求めた結果も合わせて報告する。さらに、クモの牽引糸中の、(Gly-Gly-X)モチーフを含む天然化合物の構造についても解析を行い、(AlaGlyGly)<sub>10</sub> モデルペプチドとの比較・検討を行う。

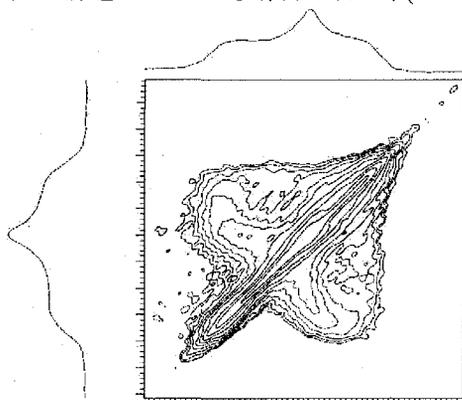


Fig. 1. Experimental 2D spin NMR spectrum of carbonyl carbons of 14-th and 15-th Gly enriched (AlaGlyGly)<sub>10</sub>.

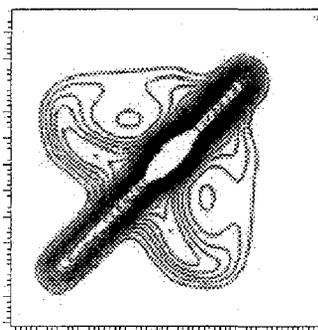


Fig. 2. Calculated spectrum of carbonyl carbons of Gly-Gly regions for torsion angles of ( -90° , 150° ).

なお、本研究は一部、生研機構基礎研究推進事業により行われた。

### 【参考文献】

- 1) J. Kummerlen, J. D. van Beek, F. Vollrath, and B. H. Meier, *Macromolecules*, **29**, 2920 (1996)
- 2) 芦田、桑原、植垣、寺尾 第 29 回 NMR 討論会講演予稿集 p245 (1989)
- 3) T. Asakura, J. Ashida, T. Yamane, T. Kameda, Y. Nakazawa, K. Ohgo, and K. Komatsu, *J.Mol.Biol.*, **306**, 291 (2001)
- 4) H. Saito, R. Tabeta, T. Asakura, Y. Iwanaga, A. Shoji, T. Ozaki, and I. Ando, *Macromolecules*, **17**, 1405 (1984)

## 固体 NMR によるポリシロキサン<sup>1</sup>の構造と 機能発現のメカニズムの解析

東工大院理工 ○木村英昭、黒木重樹、安藤勲

### Structural Analysis of Polysiloxanes by Solid State NMR

Hideaki Kimura, Shigeki Kuroki, Isao Ando

(Department of Chemistry and Material Science, Tokyo Institute of Technology)

Structural analysis of some polysiloxanes (silicones,  $[RR'SiO]_n$ ) was carried out by  $^{13}C$ ,  $^{17}O$ , and  $^{29}Si$  NMR. We have prepared  $^{17}O$ -labeled polysiloxanes to obtain  $^{17}O$  NMR spectra. In  $^{29}Si$  NMR spectrum of polydimethylsiloxane  $(-Si(CH_3)_2-O)_n$ , a very narrow singlet peak appears at  $-21.9$  ppm. This result shows that the main chain has high mobility and it is in cationic character. On the other hand, the  $^{17}O$  NMR spectrum of the polymer exhibits an asymmetric doublet pattern. The appearance of the doublet pattern was reasonably explained by quadrupolar interaction.

緒言：ポリシロキサン（シリコーン）は高度な耐熱性、主鎖のイオン性、液晶性、電気絶縁性から注目を集めている無機高分子である。ポリシロキサンの主鎖 $(-Si-O)_n$ は有機高分子の炭素骨格に比べて、結合長が長く、結合角も大きいので柔軟である。そのため、一般に室温で液体であるが、側鎖の構造によって、固体や液晶状態にもなりうる。実用的な材料として広く普及しているポリシロキサンであるが、その構造解析は全くと云っていいほどなされていない。その理由は、NMR 以外の手法でそれを行うのは困難であること、逆に NMR で観測しようとする、主鎖骨格に酸素( $^{17}O$ )が含まれ、それが測定困難な核種（天然存在比 0.037%、スピン 5/2）であることがあげられる。他の含ケイ素無機高分子であるポリシランやポリカルボシランの構造研究が、すでに固体 NMR を用いて行われたのは、それらのポリマーが  $^{13}C$ ,  $^{29}Si$  という比較的測定容易な核で構成されていたからである。

本研究では、数種のポリシロキサンの構造を  $^{13}C$ ,  $^{29}Si$  核で観測することはもとより、主鎖の酸素を  $^{17}O$  ラベルしたポリシロキサンの  $^{17}O$  NMR スペクトルを観測し、ポリシロキサンのさまざまな高度な機能を構造という側面から議論したい。

キーワード：ポリシロキサン、含ケイ素ポリマー、 $^{17}O$  NMR、 $^{29}Si$  NMR  
きむらひであき、くろきしげき、あんどういさお

## 実験

**試料：**本研究で用いた  $^{17}\text{O}$  ラベルされたポリシロキサンは当研究室で合成した。合成法は、(1) ジクロロシラン( $-\text{SiCl}_2-$ )を加水分解重合させ、その後、生成物をよく水で洗浄した。その生成物には環状オリゴマーと鎖状シロキサンの両方が含まれているので、(2) その生成物にビス(4-ヒドロキシブチル)テトラメチルジシロキサン (末端基) を塩基触媒存在下で仕込み、シロキサン結合をランダムに切断・結合を繰り返して平衡化させ、目的生成物を得た。

**$^{17}\text{O}$  NMR 測定：** $^{17}\text{O}$  NMR 測定は、Bruker AVANCE DSX-300 分光計で共鳴周波数 40.7 MHz で行った。化学シフトは、水 ( $\delta=0\text{ppm}$ ) を基準とした。 $\pi/2$  パルス幅は  $5\mu\text{s}$  とし、待ち時間は 4s とした。

## 結果と考察

Fig.1 にポリジメチルシロキサン (常温で高粘性の液体) の  $^{29}\text{Si}$  NMR スペクトルを示す。 $\delta=-21.9\text{ppm}$  (TMS 基準) に線幅の極めて細いシングレットが観測される。ポリマー独特の主鎖のコンホメーションの分布による線幅の広がり観測されないことから、ポリジメチルシロキサンは主鎖はかなり屈曲性が高く、運動性が良いことがわかる。また、比較的高磁場にピークが出現していることは、ポリジメチルシロキサンの主鎖のケイ素原子の陽イオン性を裏付けた結果といえる。

Fig.2 に  $^{17}\text{O}$  天然存在比のポリジメチルシロキサンの  $^{17}\text{O}$  NMR スペクトルを示す。積算回数 12000 回 (一晚) でそこそこのシグナル強度が得られた。ポリジメチルシロキサンは、比較的  $^{17}\text{O}$  NMR スペクトルを得やすいサンプルであるようである。ポリジメチルシロキサンの  $^{29}\text{Si}$  シグナルは、シングレットであったのに対し、 $^{17}\text{O}$  スペクトルではダブルレットが観測された。この原因については、現在、考察中である。2つのピークは、両方とも水よりも低磁場に出現しており、ポリジメチルシロキサンの酸素原子の陰イオン性を裏付けている。

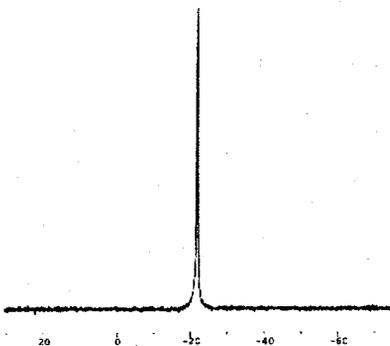


Fig. 1  $^{29}\text{Si}$  NMR spectrum of polydimethylsiloxane.

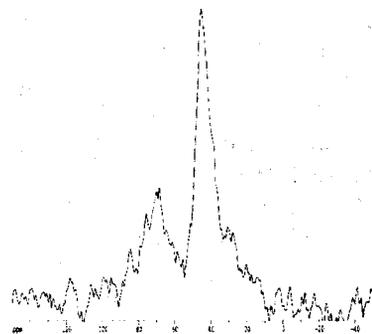


Fig. 2  $^{17}\text{O}$  NMR spectrum of  $^{17}\text{O}$  natural abundant polydimethylsiloxane.

## 二次元二量子固体 NMR 法による ポリエチレンナフタレートのコンホメーション解析

京大化研<sup>1</sup>、Iowa State University<sup>2</sup>

○乾延彦<sup>1</sup>、梶弘典<sup>1</sup>、矢野達也<sup>1</sup>、堀井文敬<sup>1</sup>、Klaus Schmidt-Rohr<sup>2</sup>

### Conformational Analyses of Poly(ethylene naphthalate) by Two-Dimensional Double-Quantum Solid-State NMR Spectroscopy

<sup>1</sup>Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA

Nobuhiko Inui,<sup>1</sup> Hironori Kaji,<sup>1</sup> Tatsuya Yano,<sup>1</sup> Fumitaka Horii,<sup>1</sup> and Klaus Schmidt-Rohr<sup>2</sup>

CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> conformations of poly(ethylene naphthalate) (PEN) in  $\alpha$ ,  $\beta$  crystal forms and in a glassy state have been investigated by solid-state two-dimensional (2D) double-quantum (DQ) NMR spectroscopy. In the glassy PEN, the experimental 2D DQ spectrum is dominated by the features of the gauche conformation. Nevertheless, the straight ridges of slope-two characteristic of the trans conformation is also observed, indicating that the existence of trans conformation in the glassy state. Quantitative analyses the trans/gauche ratio and the torsion angles for respective conformations are now in progress. The 2D DQ spectrum of PEN in the  $\alpha$  crystal form is dominated by narrow straight of slope-two. It is thus found that CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> bond is in the trans state, which agrees with the results by wide-angle X-ray diffraction (WAXD). A similar experiment on PEN in the  $\beta$  crystal form, whose crystal structure is not well defined by WAXD experiments, is also in progress.

#### 1. 緒言

ポリエチレンナフタレート(PEN)は、力学特性や耐熱性等、数多くの優れた特性をもつ高分子材料であり、現在その利用が盛んになりつつある。このPENのさらなる物性改善のためには、非晶部分の構造制御が重要であると予想されるが、非晶成分あるいは、非晶状態の詳細な構造解析は困難であり、これまでその定量的な解析が行われてこなかった。本研究では、我々が最近開発した、結晶性・非晶性を問わず高分子の固体状態におけるコンホメーションを直接解析することができる、二次元二量子遷移(2D DQ) 固体NMR法により、非晶状態におけるCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> コンホメーションを解析した。また、PENの結晶形には $\alpha$ 型と $\beta$ 型があることが知られている。 $\alpha$ 型については広角X線回折法(WAXD)によりすでに解明されているが、 $\beta$ 型についてはいまだ明確にされていない。そこで、同様の2D DQ NMR法を用いて $\beta$ 型結晶のコンホメーションについても検討した。

#### 2. 実験

CH<sub>2</sub>炭素を<sup>13</sup>CダブルラベルしたPENをエステル交換法により合成した。得られたPEN試料を310°Cで20分間熔融した後、氷水中で0°Cに急冷することにより非晶フィルム(q-PEN)を得た。また、 $\alpha$ 型結晶( $\alpha$ -PEN)は、q-PENを室温から1°C/minで240°Cまで昇温し、240°Cで30分間等温結晶化することにより得た。 $\beta$ 型結晶( $\beta$ -PEN)は、q-PENを310°Cで熔融した後、250°C付近の様々な温度で等温結晶化を行うことで得られた。PENの合成、および結晶形の確認ならびに結晶化度の決定は、溶液<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMR測定、DSC測定、およびWAXD測定により行った。溶液および固体NMR測定は、それぞれJEOL AL-400分光計およびChemagnetics CMX-400分光計により9.4Tの静磁場下で行った。DSC測定およびWAXD測定には、それぞれTA Instruments DSC-2910および理学電機Rint 2000を用いた。

**Keyword;** ポリエチレンナフタレート、コンホメーション、二次元固体NMR、二量子NMR

いぬいのぶひこ、かじひろのり、やのたつや、ほりいふみたか、くろうすしゅみつとろー

### 3. 結果と考察

Fig.1 に q-PEN,  $\alpha$ -PEN, および  $\beta$ -PEN の WAXD 測定結果を示す。これら回折パターンから PEN がそれぞれ非晶、 $\alpha$ 型結晶、 $\beta$ 型結晶状態にあることが分かる。また結晶性試料はほぼ単一の結晶型として得られていることが分かる。

Fig.2(a), (b) に、 $^{13}\text{C}$  炭素をダブルラベルした PEN 試料を用いて作製した  $\alpha$ -PEN および q-PEN の実測 2D DQ NMR スペクトルを示す。また、Fig.2(c), (d) には、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$  のねじれ角  $\psi$  が  $\psi = 180^\circ$  (trans) および  $\psi = 70^\circ$  (gauche) の場合のシミュレーションスペクトルを示す。Fig.2(c) から、傾き 2 の対角線方向に伸びた成分が trans 状態に対応していることがわかる。一方、gauche に対しては、二量子軸 ( $\omega_1$  軸) の高磁場側、すなわち図の右上に強度を示さない。そのため、trans、gauche を明確に区別することができるがわかる。

Fig.2(a)において、傾き 2 の対角方向にのびるシグナルにより、 $\alpha$ 型結晶では  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$  結合が trans 状態にあることが分かる。この結果はこれまでの WAXD による結晶構造解析の結果と一致している [1]。さらに詳細には、スペクトル中央部にシミュレーション (c) には見られないシグナルが観測される。このシグナルが  $\alpha$ -PEN 試料 (結晶化度 0.38) の非晶成分に由来するシグナルであることが  $T_{1\rho\text{H}}$ -filter を用いた測定によって明確になった。一方、Fig.2(b) に示した q-PEN のスペクトルから、非晶状態においては、gauche-rich であること、また、minor 成分はあるが、trans が存在していることが明らかとなった。

$\beta$ 型試料は q-PEN を  $310^\circ\text{C}$  で熔融した後温度を下げて等温結晶化を行うことで得られたが、試料の分子量の違い等のために、等温結晶化に適した温度は試料により異なることがわかった。

発表当日は、trans/gauche 比と、それぞれのねじれ角  $\psi$  の定量的な解析結果、および、 $\beta$ -PEN に関する結果についても報告する予定である。

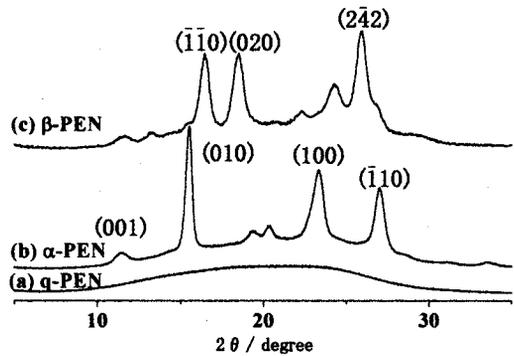


Fig.1. WAXD patterns of q-,  $\alpha$ - and  $\beta$ -PEN samples.

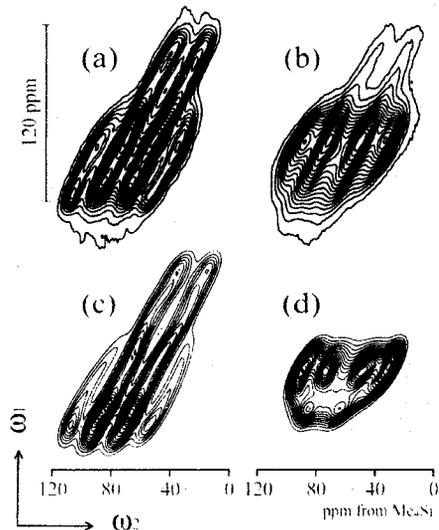


Fig.2. 2D  $^{13}\text{C}$  DQ spectra of  $^{13}\text{C}_2$ -labeled PEN ( $\tau_{\text{DQ}} = 280 \mu\text{s}$ ). Experimental spectra for  $\alpha$ -PEN and q-PEN samples are shown in (a) and (b), respectively. Simulated spectra for (c) trans and (d) gauche states are also shown.

[1] C.J.M. van den Heuvel, E.A. Klop *Polymer* 2000, 41, 4249

二次元固体  $^{13}\text{C}$  MAT 法による高分子のダイナミクス解析

京大化研

○ 福家一則、梶弘典、磯村武範、田井利弘、堀井文敬

The Analysis of Dynamics in Polymers by a Two-Dimensional Solid-State  $^{13}\text{C}$  MAT techniqueKazunori Fuke, Hironori Kaji, Takenori Isomura, Toshihiro Tai, Fumitaka Horii  
Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011

The dynamics of an amorphous polymer, phenoxy resin (PHR), has been investigated by using a two-dimensional solid-state  $^{13}\text{C}$  magic angle turning (2D MAT) technique. The  $^{13}\text{C}$  chemical shift anisotropy (CSA) spectra for respective  $^{13}\text{C}$  species are successfully separated for a wide temperature range (-140 – 90°C) by this technique, and therefore, the dynamics of respective  $^{13}\text{C}$  sites can be analyzed from the temperature dependence of  $^{13}\text{C}$  CSA line shapes. From the temperature dependence of CSA line shapes of phenylene ring axis carbons, the motion of phenylene ring axis is found to be mostly frozen below 90 ( $T_g + 10$ )°C. Only a small fluctuation and the angle distribution of phenylene ring  $\pi$ -flip motion shown below are suggested. In contrast, with increasing temperature, the averaging of  $\sigma_{11}$  and  $\sigma_{22}$  is observed for phenylene ring C-H carbons, indicating that phenylene rings undergo  $\pi$  flip motion. At 150°C, an isotropic chain motion is found to occur with the frequency above  $10^5$  Hz, since CSA for all  $^{13}\text{C}$  species are averaged out. The quantitative details will be discussed based on the results of simulation analyses.

## 緒言

ビスフェノール-A-ポリカーボネート(PC)、ポリアリレート(PAr)等のガラス状高分子は耐衝撃性などの力学特性に優れており、金属材料に代わるエンジニアリングプラスチックとして広く用いられている。この優れた物性は分子運動や構造に関係していると考えられ、その詳細を明らかにすることにより、さらなる高性能材料の開発・設計が期待できる。我々はこれまで PC、PArと同様にビスフェノール A 残基を持つガラス状高分子であるフェノキシ樹脂(PHR)の分子運動を明らかにするため、CP/MAS  $^{13}\text{C}$  スペクトル、2D CP/MAS  $^{13}\text{C}$  exchange スペクトルの解析を行ってきた[1]。本研究では二次元 magic angle turning(2D MAT)法[2]を用いて、-140°Cから 150°Cにおける各炭素の  $^{13}\text{C}$  化学シフト異方性(CSA)スペクトルを測定し、より詳細なダイナミクスの解明を試みた。

## 実験

試料として用いた PHR(ユニオンカーバイド製 PKHJ)は 160°C、100kgf/cm<sup>2</sup>でホットプレスし、氷水中で急冷した後、室温で 3 日間減圧乾燥を行った。固体  $^{13}\text{C}$  NMR 測定は、Chemagnetics CMX-400 分光計により行った。MAT 法における試料の回転速度は、-140°Cで 128(±2)Hz、27°Cで 128(±1)Hz、90°Cで 125(±1)Hz である。

---

キーワード：高分子、ダイナミクス、エンジニアリングプラスチック、二次元固体 NMR、MAT 法

ふけ かずのり、かじ ひろのり、いそむら たけのり、たい としひろ、ほりい ふみたか

## 実験結果

Fig.1 に 90°C における 2D  $^{13}\text{C}$  MAT スペクトルをその sky projection とともに示す。 $\omega_1$  軸には CP/MAS スペクトルとほぼ同等の分解能を持つ projection が得られており、 $\omega_2$  軸では重なり合っている各炭素の CSA がうまく分離できていることがわかる。

Fig.2 には C4 炭素および C6 炭素の  $^{13}\text{C}$  CSA スペクトルの温度変化を示す。フェニレン環部分の  $^{13}\text{C}$  化学シフトテンソルの主軸方向と分子構造の関係は Fig.3 に示した。C6 炭素の CSA は -140°C から 90°C では大きな変化が見られない。しかし、温度上昇とともに線幅がわずかに狭くなっており、また  $\sigma_{22}$  が高磁場側にシフトしていることがわかる。この結果は、 $T_g(80^\circ\text{C})+10^\circ\text{C}$  以下ではフェニレン環の主軸の運動はほぼ凍結されているが、わずかに揺動運動を行っていること、また後述の  $\pi$ -フリップ運動にフリップ角の分布があることを示唆している。一方、C4 炭素では -140°C から 90°C に温度が上昇するにつれて  $\sigma_{11}$  と  $\sigma_{22}$  の平均化が見られる。PC に対する CSA 形状の温度変化[3,4]との比較から、フェニレン環の  $\pi$ -フリップ運動が示唆された。C3 および C5 炭素の CSA スペクトルについても同様の結果が得られた。

Fig.2 の 150°C におけるスペクトルは magic angle spinning を行っていない状態における CP/dipolar decoupling スペクトルである。すべての炭素に対して CSA が平均化しており、そのことから  $10^5\text{Hz}$  以上の isotropic な運動を行っていることがわかる。

発表当日は、シミュレーション解析結果に基づいた定量的な議論を行なう予定である。

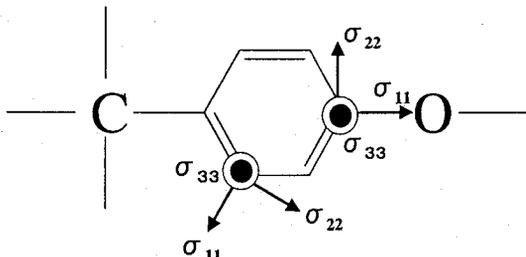


Fig.3 Relation between molecular structure and chemical shift tensor directions.

- 1] Kaji, H.; Tai, T.; Horii, F. *Macromolecules* **1997**, *30*, 5791.
- 2] Gan, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8307.
- 3] Horii, F.; Beppu, T.; Takaesu, N.; Ishida, M. *Magn. Reson. Chem.* **1994**, *32*, S30.
- 4] O'Gara, J. F.; Jones, A. A.; Hung, C.-C. *Macromolecules* **1985**, *18*, 1117; Roy, A. K.; Jones, A. A. *Macromolecules* **1986**, *19*, 1356.

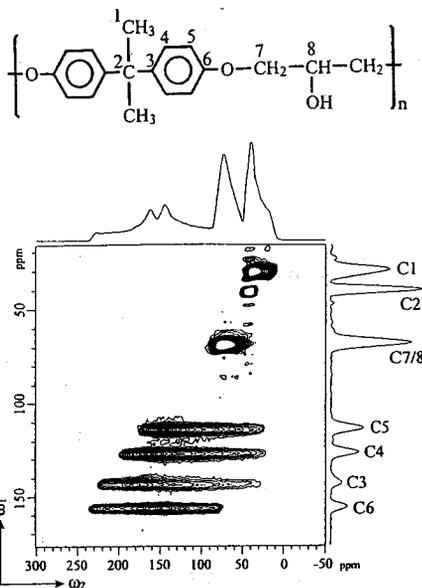


Fig.1 2D  $^{13}\text{C}$  MAT spectrum of phenoxy resin at 90°C. The sky projections are also shown for both dimensions.

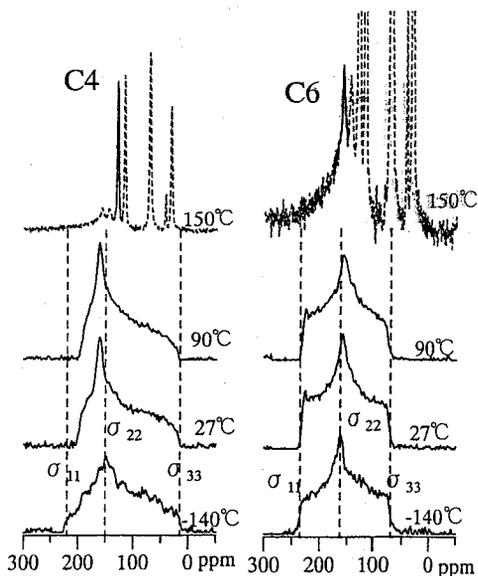


Fig.2  $^{13}\text{C}$  CSA spectra of C4 and C6 carbons for phenoxy resin. Spectra from -140°C to 90°C are obtained by 2D MAT experiments. Spectra at 150°C are obtained by a CP/dipolar decoupling experiment without MAS.

## The analysis of O<sup>2</sup>H - $\pi$ interaction in phenoxy resins by an MAS NMR method without irradiating <sup>2</sup>H nuclei

京大化研<sup>1</sup>、Iowa State University<sup>2</sup>  
○梶弘典<sup>1</sup>、堀井文敬<sup>1</sup>、Klaus Schmidt-Rohr<sup>2</sup>

The analysis of O<sup>2</sup>H -  $\pi$  interaction in phenoxy resins by an MAS NMR method without irradiating <sup>2</sup>H nuclei

Hironori Kaji<sup>1</sup>, Fumitaka Horii<sup>1</sup>, and Klaus Schmidt-Rohr<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011

<sup>2</sup>Dept. of Chemistry, Iowa State University, Ames, IA 50011

The OH $\cdots\pi$  interaction in an amorphous polymer, phenoxy resins (PHR), has been investigated by a newly-developed magic angle spinning NMR method for distance determination between unlike spins. This experiment, termed relaxation-induced dipolar exchange with recoupling (RIDER), can be performed without irradiating one of the two spins in question, and therefore conventional double-resonance probes can be utilized for the experiment. Longitudinal relaxation of the passive spin during the mixing time, which is sandwiched by two recoupling periods, results in a dephasing of the heteronuclear coherence and consequently a decay of the magnetization. As a result of <sup>13</sup>C-<sup>2</sup>H RIDER experiments on an OH-deuterated PHR (O<sup>2</sup>H-PHR) sample, signal decays are observed not only for CH<sub>2</sub> and CH resonance lines but also those for phenylene carbons. This indicates that OH $\cdots\pi$  interaction exists in PHR. We have also investigated the origin of the resonance line splitting at low temperatures observed for phenylene ring C-H carbons, and the interaction between OH group in PHR and the co-existing solvent.

### 1. 緒言

超分子や分子集合体、また、分子認識や自己組織化に関する研究が、現在目覚しく発展しつつある。これらの構造体は特定官能基間の相互作用により形成されており、したがって、それら分子間力の解明は、これまで以上に重要となりつつある。中でも、弱い特異的相互作用は興味深い。これまで、この特異的相互作用は、X線回折による結晶構造解析、溶液 NMR の NOE 等により解明されてきたが、非晶性固体材料に対しては、その確証が困難であった。一方、我々は固体 NMR において、L 核にパルス照射することなく S-L 間の距離を測定する手法を開発した[1]。Relaxation-Induced Dipolar Exchange with Recoupling (RIDER)と名付けられたこの方法では、<sup>1</sup>H decoupling を含めても二重共鳴の装置で測定できるため、REDOR 等の方法では十分な S/N を得ることが困難であった材料に対しても、詳細な解析が可能となることが期待される。

---

キーワード : relaxation、recoupling、dipolar coupling、phenoxy resins、OH -  $\pi$  interaction

かじ ひろのり、ほりい ふみたか、くろうす しゅみつとろー

本研究では、我々がこれまで研究を行ってきた非晶性合成高分子であるフェノキシ樹脂 (PHR)[2,3] の OH 水素を重水素化し、 $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$  RIDER 測定を行うことにより、そのフェニレン環と OH 基間の OH $\cdots\pi$ 相互作用について検討した。

## 2. 実験

ペレット状 PHR を過剰量の重メタノールと THF の混合溶液に溶解し、重水素化 PHR( $\text{O}^2\text{H}$ -PHR)試料を作製した。得られた試料を  $50^\circ\text{C}$  で減圧乾燥した。1 日間の減圧乾燥では THF が残存しており、3 日間かけて残存溶媒を除去した。固体  $^{13}\text{C}$  NMR 測定は、Chemagnetics CMX-400 分光計により 9.4T の静磁場下で行った。MAS 回転速度は、 $25^\circ\text{C}$  で 6 kHz、 $-120^\circ\text{C}$  で 5.8 kHz である。

## 3. 結果と考察

### 3.1. RIDER 測定

測定に用いたパルスを、図 1 に示す。CP の後、first recoupling period におけるローター  $1/2$  周期ごとの  $\pi$ -pulse train により、 $S$ - $L$  双極子相互作用および  $S$  核の化学シフト異方性(CSA)が recouple される。ここでは、 $S$ 、 $L$  はそれぞれ  $^{13}\text{C}$  および  $^2\text{H}$  である。このように modulate された  $S$  核の coherence が、mixing time ( $t_m$ )を経験した後、second

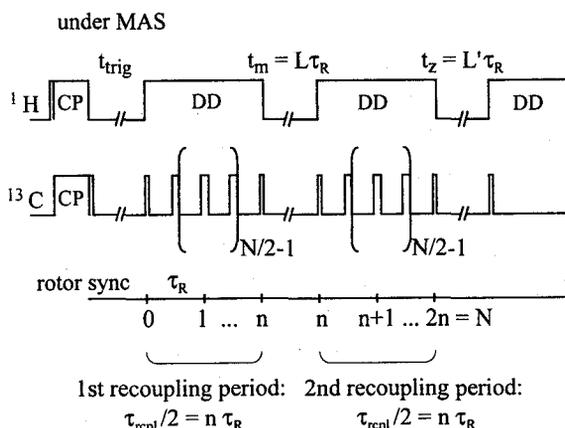


Fig. 1. Pulse sequence for the RIDER experiments.

recoupling period の終わりに full stimulated echo を与えるよう、 $\pi$ -pulse train の位相を設定する。スピン拡散・分子運動の影響を無視できる場合、この stimulated echo の強度は、 $t_m$ 間に  $L$  核の緩和が起こることにより減衰する。reference 強度  $S_0$  と RIDER 強度  $S$  との差( $\Delta S = S_0 - S$ )によって得られる強度の減衰分  $\Delta S$  は、全 recoupling time ( $\tau_{\text{repl}} = 2n\tau_R = N\tau_R = N/\omega_R$ )、 $L$  核との双極子相互作用、 $t_m$ 間の  $L$  核の緩和、および核の天然存在比にのみ依存する。その結果、後述の(1)、(2) 式より  $S$ - $L$  双極子相互作用を決定することができる。

本研究における実験条件では、スピン拡散、 $25^\circ\text{C}$ での分子運動は無視できることが我々の以前の研究[2]から予想され、また、後述の重水素化していない試料に対する測定により確認された。 $-120^\circ\text{C}$ では、周波数分布の広い(KWW  $\beta = 0.2$ )  $\pi$ -flip 運動を起こしている[2]が、平均周波数は  $2 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ であり、その影響は大きくないと推察される。

### 3.2. PHR に対する測定結果

図 2(a)に、 $25^\circ\text{C}$ における  $\text{O}^2\text{H}$ -PHR の RIDER スペクトルを示す。測定パラメータは図中に示

した。また、ここでは reference スペクトルと rider スペクトルを重ね合わせて示した。室温において、C7/8 炭素の共鳴線だけでなく、フェニレン環の炭素に対しても強度の減衰が見られることから、OH 基がフェニレン環の近傍に存在していることがわかる。一方、C1 炭素の共鳴線の強度には変化が見られない。C2 炭素は、 $t_m = 0.5$  s の測定では  $^{13}\text{C}$  の  $T_1$  緩和のため観測されないが、 $t_m \leq 0.2$  s では、C1 と同様、共鳴線の強度に変化が見られなかった。したがって、これらの炭素の近傍に OH 基は存在しないことがわ

かる。また、重水素化していない PHR に対し同様の測定を行ったところ、共鳴線の減衰が見られなかったことから、これらの減衰が各  $^{13}\text{C}$  核と  $^2\text{H}$  核との相互作用のみによるものであることが確認された。

図 3(a), (b)には、25°Cにおける RIDER buildup 曲線および RIDER 緩和曲線を示す。 $L=1$  の場合、これらの曲線は次式にしたがう[1]。

$$\Delta S/S_0 = 1 - (s_0 + s_1 \exp(-t_m/T_1^{\text{app}}) + s_2 \exp(-3t_m/T_1^{\text{SQ}})) \quad (1)$$

ここで、 $\Delta S/S_0$  は、規格化された減衰強度である。また、

$$T_1^{\text{app}} = T_1^{\text{SQ}} T_1^{\text{DQ}} / (T_1^{\text{DQ}} + 2T_1^{\text{SQ}})$$

$$s_0 = (3 + 4\cos(N\Phi) + 2\cos(2N\Phi)) / 9$$

$$s_1 = (3 - 3\cos(2N\Phi)) / 9$$

$$s_2 = (3 - 4\cos(N\Phi) + \cos(2N\Phi)) / 9$$

$$\Phi = (D_{\text{SI}} / \omega_R) 2\sqrt{2} \sin(2\beta_{\text{DR}}) \sin(\gamma_{\text{DR}}) \quad (2)$$

である。これらの式より、 $\tau_{\text{repl}}$  および  $t_m$  依存の測定から  $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$  核間の双極子相互作用、したがって、距離が求められることがわかる。また、 $L$  核の一量子および二量子スピン - 格子緩和時間  $T_1^{\text{SQ}}$ ,  $T_1^{\text{DQ}}$  を評価することも可能である。発表当日は、 $\text{O}^2\text{H}$ -PHR 試料の重水素化率、室温での運動を考慮することにより、各炭素と  $^2\text{H}$  間の距離を定量的に評価する予定である。定性

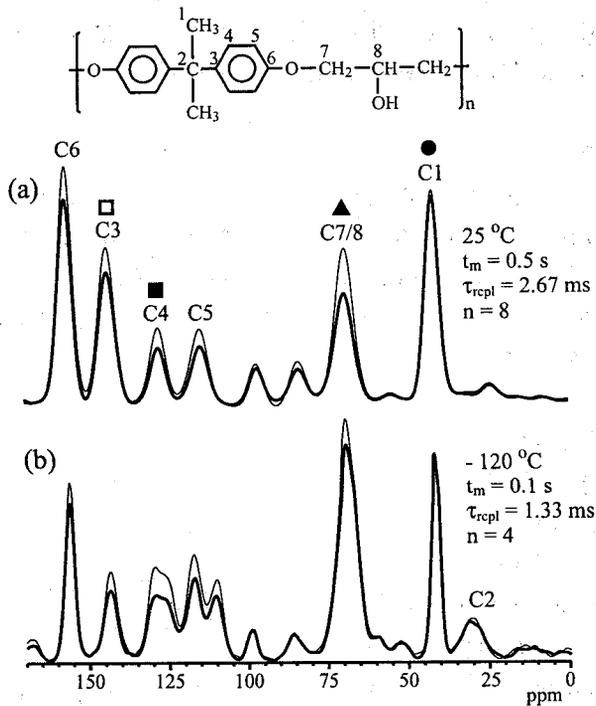


Fig. 2. RIDER (thick lines) and reference (thin lines) spectra of phenoxy resins; (a) at 25 °C with  $t_m = 0.5$  s and  $\tau_{\text{repl}} = 2.67$  ms; (b) at -120 °C with  $t_m = 0.1$  s and  $\tau_{\text{repl}} = 1.33$  ms.

的には、これらの RIDER 測定の結果、 $^2\text{H}$  がフェニレン環の近傍にあり、 $\text{OH}\cdots\pi$ 相互作用の存在が明らかとなった。

図 2 (b)には、 $-120^\circ\text{C}$ における  $\text{O}^2\text{H}$ -PHR の RIDER スペクトルを示す。低温(約 $-60^\circ\text{C}$ 以下)では、フェニレン環の CH 炭素が 2 本に split する[2]。温度上昇による共鳴線の coalesce は、フェニレン環の $\pi$ -flip 運動によるものである[2,3]が、本研究では、split の起源について検討を行った。すなわち、1つのフェニレン環中に 2 個存在する C5 (あるいは C4) 炭素の一方と OH 基がより密接な  $\text{OH}\cdots\pi$ 結合をとることにより化学的に異なる 2 種のサイトが生じ、共鳴線が split する可能性がある[2]。図 2(b)の $-120^\circ\text{C}$ でのスペクトルから、2 本の C5(および C4)炭素共鳴線は、ほぼ同程度減衰していることがわかる。

以上の結果から、 $\text{OH}\cdots\pi$ 相互作用の存在は明確となったが、OH 基はフェニレン環の 6 つの炭素からほぼ等距離に位置しており、C5, C4 共鳴線の split の原因ではないことが明らかとなった。split の原因としては、C7/8 炭素との  $\text{CH}\cdots\pi$ 相互作用、あるいはフェニレン環同士の $\pi\cdots\pi$ 相互作用を考える必要があるだろう。

また、共存溶媒 - 高分子間の相互作用について検討するため、1 日間のみ減圧乾燥を行った THF 共存状態での  $\text{O}^2\text{H}$ -PHR に対して RIDER 測定を行った。その結果、THF 共鳴線の強度に明確な減衰が見られ、THF が OH 基の近傍にあることが示された。このように、RIDER 法は、分子間 complex の相互作用の解明にも有用であることがわかる。

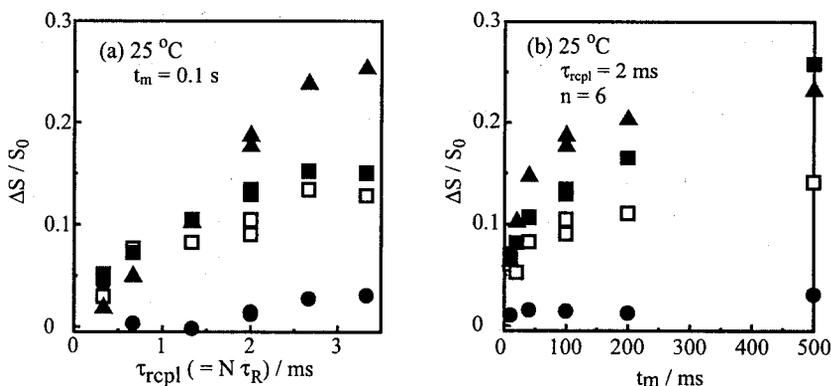


Fig. 3. (a) RIDER buildup curves of phenoxy resins as a function of the recoupling time with  $t_m = 0.1$  s at  $25^\circ\text{C}$ . (b) RIDER relaxation curves of phenoxy resins as a function of the mixing time with  $\tau_{\text{repl}} = 2 \times 6 \tau_R = 2$  ms at  $25^\circ\text{C}$ . Symbols of  $\square$ ,  $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ , and  $\bullet$  represent the experimental results for C3, C4, C7/8, and C1 resonances, respectively, as shown in Fig. 2.

## References

- [1] Saalwächter, K.; Schmidt-Rohr, K. *J. Magn. Reson.* 2000, **145**, 161.
- [2] Kaji, H.; Tai, T.; Horii, F. *Macromolecules*, 2001, **34**, 6318.
- [3] 本要旨集, P12.

無機-有機分子複合材料の CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR 法による構造、分子運動の解析

京大化研 ○日下 康成・増田 憲二・堀井 文敬

CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR Analysis of the Structure and Dynamics

for Inorganic-Organic Molecular Composite Materials.

Yasunari Kusaka, Kenji Masuda, and Fumitaka Horii,

Institute for Chemical Research, Kyoto University

TBA<sub>4</sub>[Sb<sub>8</sub>O<sub>12</sub>(OH)<sub>20</sub>] reacts with (*t*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiOH to yield TBA<sub>2</sub>[Sb<sub>4</sub>O<sub>6</sub>(OH)<sub>4</sub>{OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(*t*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>6</sub>}]<sub>6</sub>. This inorganic-organic molecular composite material has 6 bulky silyl groups and these silyl groups make shallow pockets on each side of the anion that can contain a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> molecule in the crystalline state. In this paper, we characterize the structure and dynamics of this anion, especially of substituted silyl groups, by CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR and solution-state NMR spectroscopy.  $T_{1\rho}$  measurements of the crystals indicate that the molecular motion of the CH<sub>3</sub> groups directly bonded to the Si atoms is much hindered compared to that of the *tert*-butyl groups.  $^1\text{H}$  NMR and  $^1\text{H}$  NOESY spectra in CD<sub>3</sub>CN also reveal that the rotation of some silyl groups is greatly inhibited by neighboring silyl groups.

[緒言] アンチモン原子 8 個と 32 個の酸素原子から成る三次元かご型アニオンであるオクタアンチモン酸(図 1)の TBA<sup>+</sup>塩 {TBA<sup>+</sup> = (*n*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>}, TBA<sub>4</sub>[Sb<sub>8</sub>O<sub>12</sub>(OH)<sub>20</sub>]が 1995 年にポリアンチモン酸の初めての単離例として報告された。<sup>1)</sup> 著者らはこのオクタアンチモン酸と(*t*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiOH との縮合反応により、オクタアンチモン酸塩からの初めての誘導体 TBA<sub>2</sub>[Sb<sub>4</sub>O<sub>6</sub>(OH)<sub>4</sub>{OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(*t*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>6</sub>}]<sub>6</sub>の合成、単離に成功し、すでにその構造(図 2)を解明した。<sup>2)</sup>

このアニオンは嵩高い 6 個のシリル基を放射状にもち、全体として球状にシリル基が伸びている。結晶中でこれらのシリル基はアニオンの両側の一つずつポケットのような空孔を形成することが分っており、このポケットが CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 分子のような小分子を内包すること、またそのポケットの内部にある水酸基と水素結合させる機能をもつことを見出した。本研究ではこれらを背景として、溶液 NMR と CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR 法を用いて、[Sb<sub>4</sub>O<sub>6</sub>(OH)<sub>4</sub>{OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(*t*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>6</sub>}]<sub>6</sub><sup>2-</sup>アニオンの構造、特にシリル基の溶液および固体状態での分子運動の解析を行った。

[実験] 固体 NMR の測定は O-ring 付き MAS ローターに約 200 mg の試料を充填し、Chemagnetics CMX200 分光計により、4.7 T の静磁場下、室温で行った。

inorganic-organic composites/ polyoxometalate/ polyantimonate/ CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy/  
nanocomposites

くさかやすなり ますだけんじ ほりいふみたか

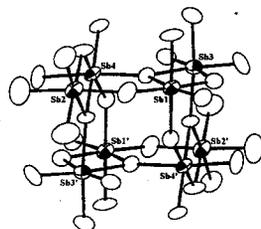


Figure 1. The structure of [Sb<sub>8</sub>O<sub>12</sub>(OH)<sub>20</sub>]<sup>4-</sup> anion. Ellipsoids are drawn to encompass 50 % of the electron density. As indicated in the formula, all 20 terminal oxygen atoms are protonated.

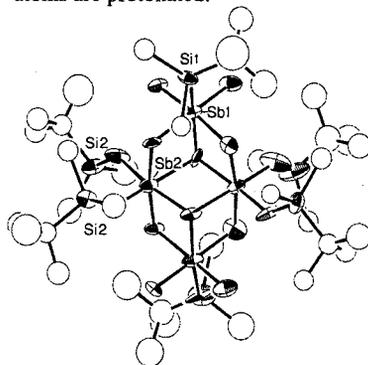


Figure 2. The structure of [Sb<sub>4</sub>O<sub>6</sub>(OH)<sub>4</sub>{OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(*t*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>6</sub>}]<sub>6</sub><sup>2-</sup> anion. Ellipsoids are drawn to encompass 50 % of electron density.

[結果と考察] アニオンを図式的に図3に示した。ここでは3つのシリル基は省略してある。図4には、 $TBA_2[Sb_4O_6(OH)_4\{OSi(CH_3)_2(t-C_4H_9)\}_6]$ のCP/MAS  $^{13}C$  NMR スペクトルを示す。すべての炭素の各共鳴線はそれぞれ2-4本に分裂しており、これは結晶中における複数のサイトの存在を反映している。図ではSiに結合した $CH_3$ 基の共鳴線の拡大を示している。それぞれの炭素の運動性を評価するために、 $^{13}C$  スピン格子緩和挙動をCPT1法により測定した。この結果、シリル基に結合した $CH_3$ 基の $T_{1c}$ は3.1 sで、*tert*-Bu基の $CH_3$ 基は $T_{1c}=0.4$  sと明らかに異なることが分かり、さらに、同じ $CH_3$ の共鳴線でも $T_{1c}$ に違いが見られた。したがって結晶状態でこれらの運動性が異なると考えられる。また、 $^{29}Si$  NMR 共鳴線の強度のCP接触時間の依存性により、Sb(1)と1:1で結合しているシリル基(1)の $CH_3$ 基の運動性は1:2で結合しているシリル基(2)より高いと考えられる。

一方、 $CD_3CN$ 中で測定した溶液の $^1H$  NMR スペクトルを図5に示す。シリル基の $CH_3$ プロトンの共鳴線が3本に分裂して現れることが分かる(図中拡大)。高磁場側のシャープな共鳴線は環境の大きく異なるSi(1)に結合している $CH_3$ 基に帰属した。 $Sb_4O_{16}$ 骨格は $C_{2h}$ の対称をもち、図3の二つのSi2は等価であるため、O-Si結合(図3の結合d)のまわりの回転が起こっているとこれらの $CH_3(1), (2)$ のプロトンの共鳴線は一本になるはずである。実際にはdoubletとなっているのはその立体障害のためにO-Si(2)結合のまわりの回転が束縛されていると考えられる。このことは $^{29}Si$  NMR,  $^1H$  NOESY スペクトルからも支持された。以上の結果より、固体、溶液両状態ではともにシリル基の先端部分と根元部分において運動性に差があると考えられる。

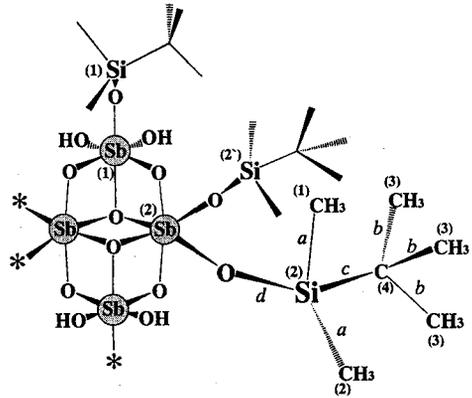


Figure 3. Schematic representation of silyl groups of  $[Sb_4O_6(OH)_4\{OSi(CH_3)_2(t-C_4H_9)\}_6]$  anion. Three asterisks reveal hidden silyl groups.

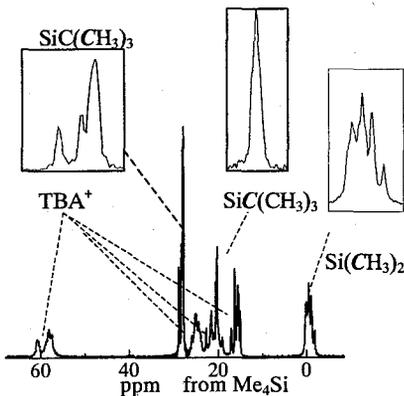


Figure 4. CP/MAS  $^{13}C$  NMR spectrum of  $TBA_2[Sb_4O_6(OH)_4\{OSi(CH_3)_2(t-C_4H_9)\}_6]$ .

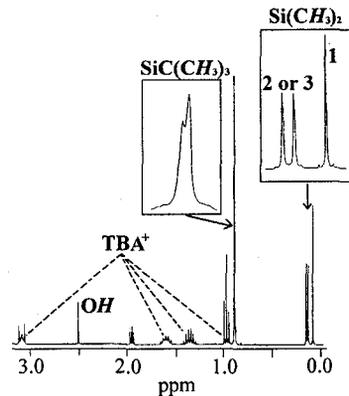


Figure 5.  $^1H$  NMR spectrum of  $TBA_2[Sb_4O_6(OH)_4\{OSi(CH_3)_2(t-C_4H_9)\}_6]$  in  $CD_3CN$ .

<sup>1)</sup> H. Nakano, Y. Ozawa, and A. Yagasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12007.

<sup>2)</sup> Y. Kusaka, Y. Ozawa, and A. Yagasaki, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2634.

バクテリアセルロースのマイクロフィブリル構造に関する固体スピン拡散NMR解析

京大化研 ○増田 憲二・安達 雅幸・平井 諒子・堀井 文敬  
福井高専 山本 裕之

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Spin Diffusion NMR Analyses of the Microfibril Structure for Bacterial Cellulose

Kenji Masuda, Masayuki Adachi, Asako Hirai, Hiroyuki Yamamoto<sup>†</sup>, and Fumitaka Hori  
Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan  
<sup>†</sup>Fukui National College of Technology, Sabae, Fukui 916, Japan

It is well known that the C<sub>4</sub> resonance line of native cellulose splits into two lines in CP/MAS <sup>13</sup>C NMR spectra. The downfield line (C<sub>4D</sub>) is assigned to the crystalline component, but the assignment of the upfield line (C<sub>4U</sub>) has not been established as yet. <sup>1</sup>H spin diffusion from measurements have been conducted for water swollen poly(vinyl alcohol) (PVA) films in which the ribbon assemblies are dispersed in order to make an assignment of the C<sub>4U</sub> line. As a result, it is found that the <sup>1</sup>H spins really diffuse from the swollen PVA phase to dispersed ribbon assemblies and the diffusion rate is almost the same for the C<sub>4D</sub> and C<sub>4U</sub> carbons. This suggests that the C<sub>4U</sub> carbons are distributed in the whole area in the microfibril. Furthermore, the effect of water on the <sup>1</sup>H spin diffusion rate is also examined by comparison the diffusion process for PVA films containing 20 wt% glycerin.

[緒言] バクテリアセルロースの CP/MAS <sup>13</sup>C NMR スペクトルには、89.5ppm に結晶成分の C<sub>4</sub>炭素に帰属される C<sub>4D</sub>共鳴線に加えて、その高磁場側にも C<sub>4</sub>炭素に由来する C<sub>4U</sub>共鳴線が観測される。低磁場側の C<sub>4D</sub>共鳴線は結晶成分に帰属されるが、高磁場側の C<sub>4U</sub>共鳴線に関しては、帰属はなお確立していない。これまで我々は、マイクロフィブリルサイズの異なるバクテリアセルロースの <sup>1</sup>H スピン格子緩和時間について固体 <sup>13</sup>C NMR 解析を行い、<sup>1</sup>H のスピン拡散距離から C<sub>4U</sub>共鳴線の帰属に関して検討を行った。その結果、C<sub>4U</sub>と C<sub>4D</sub>炭素は 10nm 以内に共存していることを明らかにした。しかし、帰属に関してはさらなる検討が必要であることから、我々は <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C スピン拡散 NMR 法により検討を行なって来た。本発表では、<sup>1</sup>H スピン拡散 NMR 法により、C<sub>4U</sub>共鳴線の帰属およびマイクロフィブリル構造について検討した結果を示す。

[実験] *Acetobacter xylinum* 菌を、Hestrin-Schramm 培地で培養して得られたバクテリアセルロースを用いた。得られたバクテリアセルロースを硫酸処理して得たリボン集合体を、アタクチックポリビニルアルコール (A-PVA)溶液に加えた後、ガラス板上に cast することによりセルロース分散 A-PVA フィルムを作製した。この試料を、50wt%含水させて測定に供した。図 1 に本研究で用いた <sup>1</sup>H スピン拡散 <sup>13</sup>C NMR 測定のパルス系列を示す。固体 <sup>13</sup>C NMR 測定は、Chemagnetics CMX-400

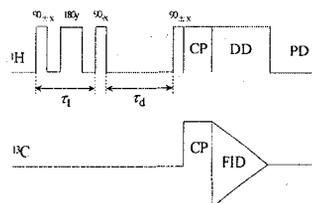


Figure 1 Pulse sequence for <sup>1</sup>H spin diffusion measurement

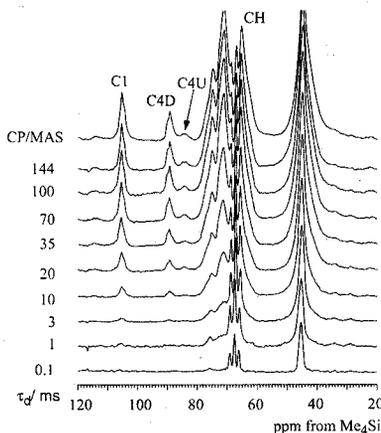


Figure 2. <sup>1</sup>H spin diffusion process for the water swollen A-PVA films in which the ribbon assemblies are dispersed, measured at different diffusion times ( $\tau_d$ ) by the pulse sequence shown in Figure 1.

バクテリアセルロース / <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C スピン拡散 / ミクロフィブリル / リボン集合体

ますだ けんじ、あだち まさゆき、ひらい あさこ、やまもと ひろゆき、ほりい ふみたか

分光計により、9.4Tの静磁場下で行った。

[結果と考察] 図2に、図1のパルス系列を用いて種々の混合時間( $\tau_d$ )について測定した、含水状態のセルロース分散PVAフィルムの $^1\text{H}$ スピン拡散 $^{13}\text{C}$ NMRスペクトルを示す。準備期間( $\tau_r$ )が0.1msにおいては、含水によって運動性の増大したPVAの非晶成分のCHおよび $\text{CH}_2$ 共鳴線のみが $^1\text{H}$ スピン-スピン格子緩和時間の違いにより選択的に観測される。 $\tau_d$ の増加にともない、バクテリアセルロースおよびPVA結晶成分の各共鳴線の強度が増大している。これは、 $\tau_d$ の間にPVAの非晶領域および水の $^1\text{H}$ プロトンから他成分への $^1\text{H}$ スピン拡散が起こっていることを示している。ここで、C4U炭素がマイクロフィブリル表面の非晶成分に帰属されるならば、PVAの非晶領域からのスピン拡散はまずC4U炭素との間で起こり、その後マイクロフィブリル内部の結晶に帰属されるC4D炭素との間で起こるはずである。しかし、図2において、スピン拡散によるC4DおよびC4U共鳴線の強度の増大はほぼ同じ割合であった。この結果は、C4U炭素がマイクロフィブリルの表面ではなくC4D炭素と共にマイクロフィブリル中に存在することを示している。

スピン拡散距離( $r$ )は、拡散係数( $D$ )および平衡拡散時間( $\tau_d^s$ )を用いて $r^2 = aD\tau_d^s$ と表される。定数 $a$ はスピン拡散のモデルにより決まり、ここでは $a=4/3$ (ラメラモデル)とした。また $\tau_d$ が112ms以上において各共鳴線の強度はほぼ一定となることから、 $\tau_d^s=112\text{ms}$ とした。

ここで、含水試料における $^1\text{H}$ スピン拡散プロセス及び拡散係数は未だ明らかでない。そこで、含水した場合における、水分子の $^1\text{H}$ スピン拡散への影響を調べるために、含水したA-PVAフィルムおよび20wt%のグリセリンを含んだA-PVAフィルムについて同様の $^1\text{H}$ スピン拡散実験をし、その比較から拡散係数について検討を行った。グリセリンを含むことにより、A-PVAフィルムのガラス転移温度が下がるため、 $^1\text{H}$ スピン-スピン緩和時間の違いを利用して、非晶成分のみ選択的に励起できる。図3に図1のパルスシーケンスを用いて測定した20wt%グリセリン含有A-PVAフィルムの $^1\text{H}$ スピン拡散 $^{13}\text{C}$ NMRスペクトルを示す。測定は50°Cで行った。グリセリンを含有することで、 $\tau_d$ が1ms以下では、グリセリンの2本の共鳴線(63.5および74ppm)およびA-PVAフィルムの非晶成分の共鳴線(65-70ppm)のみ現れる。 $\tau_d$ の増加に伴い $^1\text{H}$ スピン拡散が非晶成分から結晶成分へと起こることにより、A-PVAフィルムの結晶成分の共鳴線I,II,IIIの強度が増大が観測される。

図4に、含水したA-PVAフィルムおよび20wt%グリセリン含有A-PVAフィルムの結晶成分の共鳴線Iのスピン拡散過程を $\tau_d^{1/2}$ の関数に示した。図4から明らかに、スピン拡散が含水試料と比べ、グリセリン含有A-PVAフィルムにおいて早く起こることがわかる。含水A-PVAフィルムの $\tau_d^s$ が60.8msであり、グリセリン含有A-PVAフィルムの $\tau_d^s$ は13.7msである。この結果は、拡散係数は含水時には約1/5に減少することを示している。これより、一般に固体において用いられる $0.5\text{-}1.0\text{nm}^2/\text{ms}$ の拡散係数の約1/5である $0.1\text{-}0.2\text{nm}^2/\text{ms}$ の値を含水状態において用いるのが妥当であることを示唆している。

発表では、セルロース分散A-PVAフィルムの含水状態およびグリセリンを含有した場合における $^1\text{H}$ スピン拡散についても検討を行う。

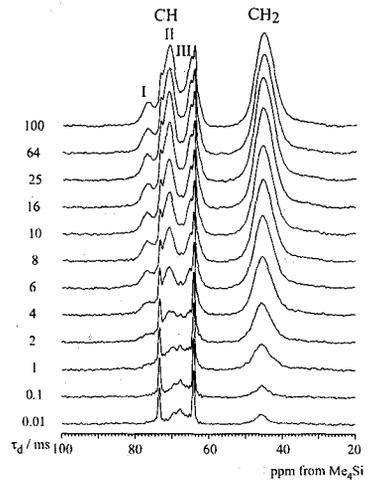


Figure 3.  $^1\text{H}$  spin diffusion process for the A-PVA films which contain the 20 wt % of glycerin, measured at 50 °C at different diffusion times ( $\tau_d$ ) by the pulse sequence shown in Figure 1.

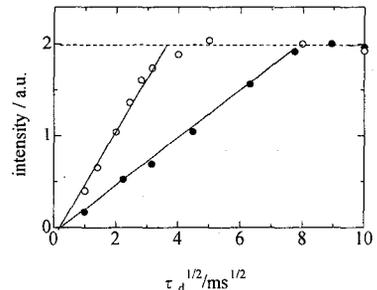


Figure 4. Plots of the peak intensities for the CH I resonance lines of the water swollen A-PVA films (●) and A-PVA films which contain the 20 wt % of glycerin (○).

拡散NMRイメージング法による  
ポリメタクリル酸ゲル中の金属イオンおよび水の拡散過程の研究  
高分子センター東京工業大学大学院理工学研究科  
○佐々木曉嗣 堀田芳夫 黒木重樹 安藤勲

A study of diffusional behavior of metal ions and H<sub>2</sub>O  
in a PMAA gel by <sup>1</sup>H NMR diffusion Imaging method  
Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology,  
International Research Center of Macromolecular Science,  
2-12-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8552, Japan  
○Akitsugu Sasaki, Yoshio Hotta, Shigeki Kuroki, and Isao Ando

The <sup>1</sup>H diffusion NMR imaging patterns of a poly(methacrylic acid) gel with paramagnetic ions, Cu<sup>2+</sup>, were measured, in order to clarify the diffusion process of Cu<sup>2+</sup> ions in the gel. From these experimental results the diffusion process of Cu<sup>2+</sup> ions in the gel was successfully elucidated. It has been demonstrated that NMR imaging is a powerful means for obtaining three-dimensional information about the diffusion process of polymer gels.

## 1. 序論

NMRイメージング法は現在主に医学分野において医療診断に用いられ、臨床医学を中心に活発に利用されている。その特徴として、非破壊であること、三次元形態学的情報のみならず、代謝的情報も得られ、生物をそのままの状態で観察することができること、任意の断面の画像を得ることができること、そして電離放射線を用いていないので比較的安全であること等が挙げられる。

このような背景を踏まえて、我々は、NMRイメージング法を用いて、高分子ゲル中の核の物理的情報(空間密度分布や運動性の空間分布等)の空間分布について画像として得ることにより、ゲルの構造・ダイナミックスについて、マイクロ・マクロな面から三次元解析を行い、NMRイメージング法の有用性を示してきた。[1~8]

以上のような背景を踏まえ、本研究では、水を溶媒としたポリメタクリル酸ゲルに銅イオンを添加し、水分子及びCu<sup>2+</sup>イオンの拡散過程をNMRイメージング法により解明する。

## 2. 実験

ネットワークポリメタクリル酸(以下PMAAゲル)は、モノマーとしてメタクリル酸(MAA)、架橋剤にN,N-メチレンビスアクリルアミド(MBAA)および、開始剤にペルオキシ

NMRイメージング、ポリメタクリル酸ゲル、拡散イメージング法、銅イオン、

ささきあきつぐ、ほったよしお、くろきしげき、あんどういさお

Table 1 diffusion coefficients of H<sub>2</sub>O in PMAA gels as a function of the swelling degree

PMAA-Gel No.	MBAA (mol/l)	immersed time of PMAA gel into Cu <sup>2+</sup> aqueous solution (min)	swelling degree q	Diffusion coefficient D (cm <sup>2</sup> /s)
1	0.01	0	21.32	1.97x10 <sup>-6</sup>
2	0.01	>>1	9.729	2.20x10 <sup>-6</sup>
3	0.01	1	-	-
4	0.10	1	-	-

二硫酸カリウムを用いてラジカル重合させ、架橋密度の異なる2種類のゲルを合成した。銅イオン (Cu<sup>2+</sup>) は、生成したゲルを 0.005mol/l の CuSO<sub>4</sub> 溶液に長時間と、1分間漬け込んだ2種類のゲル調製した。また、ゲルの膨潤時の重量M<sub>swollen</sub>と乾燥時の重量M<sub>dry</sub>を用いて、膨潤度qを

$$q = M_{\text{swollen}} / M_{\text{dry}} \quad (1)$$

と定義した。

Cu<sup>2+</sup>を添加していないPMAAゲル及びCu<sup>2+</sup>を添加したPMAAゲルについてPFGSE<sup>1</sup>H NMR法により、水分子の拡散係数D (cm<sup>2</sup>/s)を測定した(観測核: <sup>1</sup>H、観測周波数: 20MHz、繰り返し時間: 5000ms、積算回数1~5、温度296℃)。また、<sup>1</sup>H NMRイメージング法により、金属イオンと水分子の拡散過程を測定した(観測核: <sup>1</sup>H、観測周波数: 300MHz、繰り返し時間: 1000~20000ms、積算回数1、温度296℃)。

### 3. 結果と考察

Table 1にPMAAGel-1~4について、その生成時の架橋剤の濃度、Cu<sup>2+</sup>の添加時間、膨潤度、PFGSE<sup>1</sup>H NMR法による拡散係数測定の結果を示す。Gel-2はCu<sup>2+</sup>の添加時間が十分長いことを示す。また、Gel-1~3に比べ、Gel-4は10倍の架橋密度を持つ。Gel-1とGel-2を比較することにより、Cu<sup>2+</sup>を添加することにより、PMAAゲルの膨潤度は低くなり、水分子の拡散は速くなることが分かる。

Gel-1とGel-2について、<sup>1</sup>H NMRイメージング法(SE法)により、<sup>1</sup>Hスピン密度をTR 20000msと1000msで測定した。その結果をFig. 1に示す。高分子ゲルはその双極子-双極子相互作用により、<sup>1</sup>H NMRイメージング法の画像には現れないので、ここで検出した<sup>1</sup>Hの信号は全て水分子からである。この結果を見ると、T<sub>R</sub>(積算の繰り返し時間)が20000msのときは、

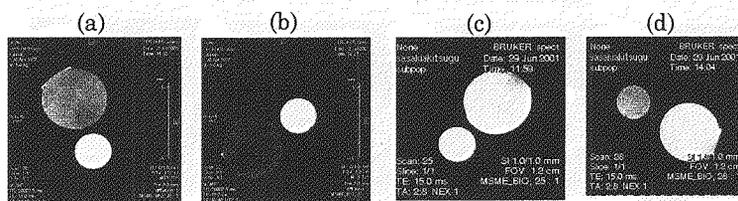


Fig. 1 <sup>1</sup>H spin density images of PMAA gel. A small circle is water in a capillary, and a big circle is water in a PMAA gels. (a) (c) gel-1 (b) (d) gel-2 (a) (b) TR=20000 (ms) (c) (d) TR=1000 (ms)

Gel-1 より Gel-2 の方が小さくなり、 $\text{Cu}^{2+}$ を添加することにより、水分子の密度の減少が見られるが、 $T_R$ が 1000ms のときは逆に密度が増加している。また、比較のために一緒に測定した純水と比べると、水分子の密度の大小が、 $T_R$ が 20000ms のときは、Gel-2 < Gel-1 < 純水だったが、 $T_R$ が 1000ms のときは Gel-1 < 純水 < Gel-2 となった。ここで、Table 1 の膨潤度の測定結果と比べると、膨潤度は Gel-1 よりも Gel-2 の方がかなり小さい。さらに Gel-1 と Gel-2 について、純水と比較しながらスピン-格子緩和時間  $T_1$  を  $^1\text{H}$ NMR イメージング法により測定したところ、Gel-1 内の水分子が純水 2799.96ms に対し 1258.55ms となり、Gel-2 内の水分子は純水 2803.66ms に対し 316ms と大幅に下がった。これは、 $T_1$  を大きく短くする常磁性イオンである  $\text{Cu}^{2+}$  の影響であり、Gel-1 中の水分子や、純水の  $^1\text{H}$ 核の磁気モーメントが、 $T_1$ が 1000ms だと、緩和する前に SE 法の次の  $90^\circ$  パルスの照射が繰り返され、観測する信号強度が小さくなり、Fig. 1 のような結果になった。

Gel-3 について、同様に  $^1\text{H}$ スピン密度画像を用いて、その  $\text{Cu}^{2+}$ の拡散の様子を  $^1\text{H}$ NMR イメージング法 (SE 法) により、経時的に測定した。その結果を Fig. 2 に示す。速い経時変化を観測するために、 $T_R$ を 1000ms にして測定時間を短縮した。そのために、 $\text{Cu}^{2+}$ が浸透した部分の信号強度が大きく観測されている。次に拡散 NMR イメージング法により水分子の拡散係数の分布を測定するが、この結果により、何枚かの画像を撮像し、その信号強度の減衰から分析する拡散 NMR イメージング法は、 $T_R=1000\text{ms}$  でも 10 分前後時間がかかり、経時変化の初めの方の測定では、測定中の変化が大きく、十分な結果を出すことが難しいと考えられる。拡散 NMR イメージング法による結果を Fig. 3 に示す。この結果はその拡散 NMR イメージング画像において、拡散の速い部分 (Table 1 より、 $\text{Cu}^{2+}$ が浸透した部分) が信号強度が強くなり、その信号強度の強い部分が、時間が経つにつれて外側から内側に向けて浸透する様子が確認されると予想したが、それほど大きな信号強度の違いは観測されず、また、経時変化も見られなかった。これは、経時変化に観測が追いつけていないことが考えられる。そこで、 $\text{Cu}^{2+}$ の浸透の遅い架橋密度の大きい Gel-4 を用いて拡散 NMR イメージング法による拡散係数の分布の経時変化

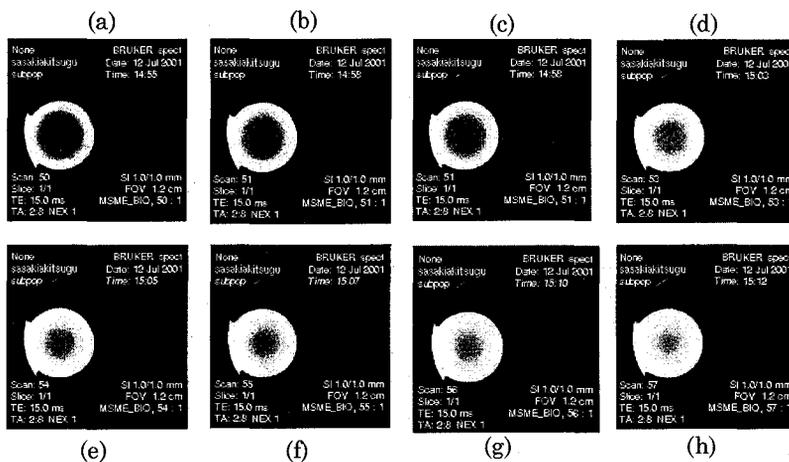


Fig. 2 Time-resolved images for diffusion process of  $\text{Cu}^{2+}$  ions into a PMAA gel (gel-3).

The images were taken at elapsed times of 2min (a), 4min (b), 6min (c), 8min (d), 10min (e), 12min (f), 14min (g) and, 16min (h).



Fig. 3 Time-resolved diffusion images of diffusion process  $\text{Cu}^{2+}$  ions into a PMAA gel (gel-3). The images were taken 4min (a) and 16min (b) after .

を測定しようとしたところ、膨潤度が小さすぎてSE法で画像を得ることができず（信号強度が小さすぎたと思われる。）、GE法によって $^1\text{H}$ スピン密度の経時変化を見るにとどまった。その結果をFig. 4に示す。しかし、この結果から、 $\text{Cu}^{2+}$ の浸透が十分に遅くなっていることが分かったので、現在架橋密度の5倍ぐらいの高分子ゲルを生成することにより、拡散NMRイメージング法による拡散係数の分布の経時変化の実験を行っている。詳細は発表にて述べる。

#### 4. 文献

- [1] H. Yasunaga, H. Kurosu, I. Ando, *Macromolecules* 25(1992)6505.
- [2] T. Shibuya, H. Yasunaga, H. Kurosu, Iando, *Macromolecules* 28(1995)4377.
- [3] H. Kurosu, T. Shibuya, H. Yasunaga, I. Ando, *Polym. J.* 28(1996)80.
- [4] A. Yamazaki, Y. Hotta, H. Kurosu, I. Ando, *Polymer* 39(1998)1511.
- [5] N. Tanaka, S. Matsukawa, H. Kurosu, I. Ando, *Polymer* 39(1998)4703.
- [6] H. Hotta, H. Kurosu, I. Ando, *Polym. Gels Networks* 6(1998)
- [7] H. Yasunaga, M. Kobayashi, S. Matsukawa, H. Kurosu, I. Ando, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* 34(1997)39.
- [8] I. Ando, H. Kurosu, S. Matsukawa, A. Yamazaki, Y. Hotta, N. Tanaka, *Polym. Networks Rev.* 1(1998)331.

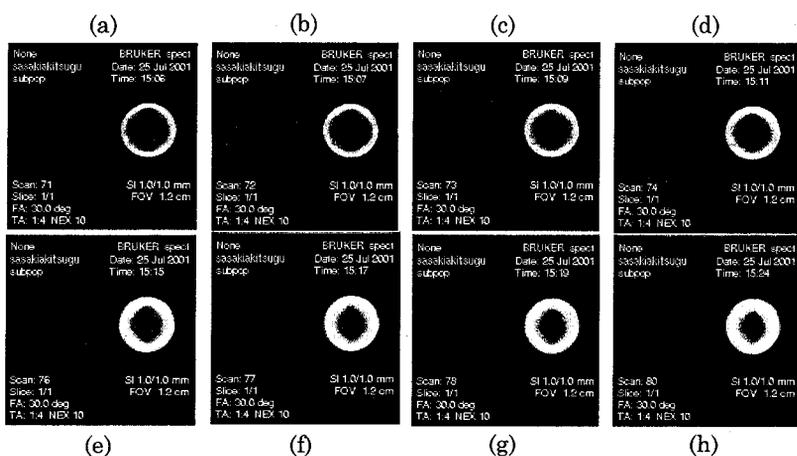


Fig. 4 Time-resolved images for diffusion process of  $\text{Cu}^{2+}$  ions into a PMAA gel (gel-4).

The images were taken at elapsed times of 2min (a) , 3min (b) , 5min (c) , 7min (d) , 10min (e) , 13min (f) , 15min (g) and 20min (h) after .

## 固体高分解能NMR法によるUV照射DNAの構造に関する研究

(防大応化<sup>1</sup>、北大院地球環境<sup>2</sup>)

○浅野敦志<sup>1</sup>、山田真路<sup>2</sup>、西則雄<sup>2</sup>、黒津卓三<sup>1</sup>

### Structural Study of UV-irradiated DNA by Solid-State NMR

A. Asano,<sup>1</sup> M. Yamada,<sup>2</sup> N. Nishi,<sup>2</sup> T. Kurotsu<sup>1</sup>

1: Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Japan

2: Division of Bioscience, Graduate School of Environmental Earth Science,  
Hokkaido University, Japan

It has been shown<sup>1</sup> that the circular dichroism spectrum of a UV-irradiated DNA (water-insoluble, film) is same as that of a native DNA (water-soluble, fiber), indicating the standard B-form structure, and the infrared spectrum of the UV-irradiated DNA shows a small difference in that of the native DNA. To discuss the structural change of DNA after UV-irradiation in more detail, we observed the solid-state NMR spectra of the native and the UV-irradiated DNA. The <sup>13</sup>C NMR spectrum of the UV-irradiated DNA shows a decrease of the peak intensity at the OCH<sub>2</sub> carbon in the phosphate chain linked with Thymine or Cytosine bases, and a increase of 2'-CH<sub>2</sub> carbon peak of ribose comparing to the native one. Furthermore, the <sup>13</sup>C-relaxation time of Thymine (6-CH) and Cytosine (5-CH) only changes significantly by UV-irradiation. The <sup>15</sup>N NMR peak intensities of Thymine (3-NH) and Cytosine (1-N) for the UV-irradiated DNA decreases after UV-irradiation. These observations indicate that the Thymine and/or Cytosine, that is, pyrimidine bases are strongly affected by UV-irradiation.

**<はじめに>** DNA (デオキシリボ核酸) は生物の遺伝子であり、生物の生命活動の設計図となっていることは、言うまでも無い。このDNAを天然高分子としてとらえたとき、これほど潤沢に自然界に存在し、特徴的な構造をもつ高分子物質は他に類を見ない。この潤沢に存在する天然高分子、DNAを素材として考え、機能性材料へと転化しようと試みる研究は、最近、精力的に行われている<sup>2</sup>。

DNAは、すでに知られているように、二重らせん構造からなり、水溶性である。しかしUV照射を行なったDNAは、水に不溶となる。不溶化したDNAは、CDスペクトルやIRスペクトルとの比較により、もとのDNAの構造(B型構造)をほぼ保っていることがわかっている<sup>1</sup>。UV照射したフィルムは水に安定なので、機能性材料として使用することができ、その応用が期待されている。

不溶化したDNAの詳細な構造はまだ多くはわかっていない。そこで我々は、さらに詳細な構造変化の知見を得るために、この系に固体NMR法を適用した。本発表では、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>31</sup>PのNMRスペクトルの変化などから議論した結果について報告する。

**<実験>** DNAサンプルは、サケ白子から調整したものを使用した。UV照射DNAサンプルは、DNA水溶液からキャストしたフィルムに、254 nmの波長で5600 μW/cm<sup>2</sup>の強

---

キーワード: DNA / UV照射 / <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>31</sup>P 固体NMR

あさのあつし、やまだまさのり、にしのお、くろつたくぞう

度の光を6時間照射して作成した。

固体NMRの測定にはBruker DMX 500 分光光度計とDOTY社製の5φ用MASプロブを用いた。<sup>13</sup>Cと<sup>15</sup>Nの測定には交差分極(CP)とマジック核回転(MAS)を用い、<sup>31</sup>P核の測定には90度パルス法を用いた。<sup>15</sup>Nスペクトルの化学シフト値は、<sup>15</sup>Nラベル化グリシン粉末を外部2次基準(11.59ppm)とすることで、飽和<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>水溶液基準とした<sup>3</sup>。<sup>31</sup>Pの化学シフト値は、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>粉末の<sup>31</sup>Pピークを1.33ppmの外部2次基準として、85%-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>水溶液基準とした<sup>4</sup>。MASは7kHzあるいは5kHzで行なった。<sup>13</sup>Cのラジオ波強度は48.6kHz、<sup>15</sup>Nのラジオ波強度は41.7kHz、<sup>1</sup>Hのラジオ波強度は55.6kHzまたは46.7kHzであり、<sup>31</sup>Pのラジオ波強度は43.1kHzである。

### <結果と考察>

図1に、UV照射前(native)と照射後(film)のDNAの<sup>13</sup>C CPMAS NMR スペクトルをピークの帰属とともに図中に示した<sup>5,6</sup>。塩基中の炭素の番号を( )内に示してある。nativeとfilmの<sup>13</sup>Cスペクトルは互いによく似ていることがわかる。このことは、CDやIRの測定から示された、DNAがUV照射後においても、ほぼ立体構造を維持していることを指示している。さらに細かくスペクトルを見ると、filmの62.6ppmのピークと39.6ppmのピークは、nativeに比べて変化していることがわかる。62.6ppmのピークはfilmになるとピーク強度が減少し、39.6ppmのピークは逆に線幅が増大している。62.6ppmはDNA中のチミン(T)かシトシン(C)塩基に結合しているリン酸基グループ中のOCH<sub>2</sub>と帰属される<sup>6</sup>。また、39.6ppmのピークはリボース部位のCH<sub>2</sub>である。その他のピークには顕著な変化が観測されない。さらに、天然存在比の<sup>15</sup>Nスペクトルを測定したところ、チミンとシトシン塩基由来のピークが、filmになると他のピークに比べて変化することが見出された。これらのことから、UV照射により、DNA鎖中のチミンとシトシン、つまりピリミジン塩基が特異的に影響を受けていることが示唆される。また、<sup>13</sup>Cの緩和時間を観測したところ、(preliminaryな結果ではあるが)111ppmのチミン塩基由来のピークの緩和時間が、filmになると長くなり、96ppmのシトシン塩基由来のピークの緩和時間が短くなった。他のピークの緩和時間の変化はこれら2つのピークの変化に比べると小さかった。

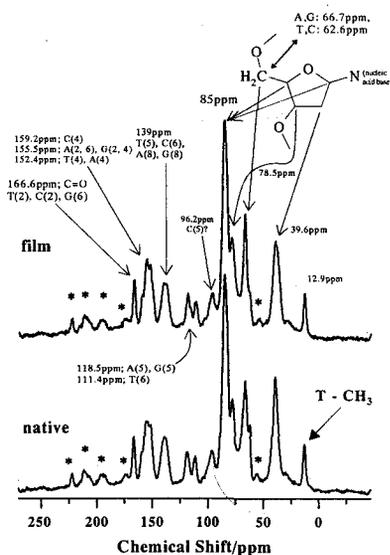


図1 <sup>13</sup>C CPMAS NMR spectra of a native DNA and the UV-irradiated (film) one. The symbol of \* represents the spinning side band.

- 1: M. Yamada, K. Kato, M. Nomizu, N. Sakairi, K. Ohkawa, H. Yamamoto, N. Nishi, *Nucleic Acids Symposium Series* 44, 255-256 (2000)
- 2: 西則雄, 敦賀智絵, 平敏夫, *生体材料*, 18, 146-151 (2000)
- 3: A. Shoji, T. Ozaki, T. Fujito, K. Deguchi, S. Ando, I. Ando, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4693-4697 (1990)
- 4: 林繁信, 中田真一編, "チャートで見る材料の固体NMR", 講談社サイエンティフィック, 1993
- 5: T. Fujiwara, K. Sugase, M. Kainosho, A. Ono, A.M. Ono, H. Akutsu, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 11351-11352 (1995).
- 6: Aldrich Library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H FT-NMR spectra, Aldrich Co., 1993

$^{13}\text{C}$  および  $^1\text{H}$ -NMR による凍結乾燥製剤の高分子添加剤における主鎖および側鎖の運動性の解析

(国立衛研) ○吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄

Mobility of Backbone and Side Chains of Polymer Excipients in Lyophilized Protein Formulations as Measured by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Solid-State NMR

(National Institute of Health Sciences) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima

The  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  of d protons and carbons in lyophilized bovine serum  $\gamma$ -globulin formulations containing polymer excipient (dextran and methylcellulose) were determined by solid-state pulsed  $^1\text{H}$ -NMR and high resolution  $^{13}\text{C}$ -NMR. At temperatures below the critical temperature of appearance of Lorentzian relaxation ( $T_{mc}$ ), localized motions of polymer was observed by  $T_1$ . When the temperature increased past  $T_{mc}$ , a larger scale of motion was reflected by  $T_{1\rho}$ . When the temperature climbed above glass transition temperature, a still larger scale motion probably involving multiple repeating units was observed by  $T_{1\rho}$ .

【目的】タンパク質凍結乾燥製剤の安定性に大きな影響を与える高分子添加剤の分子運動性について、運動のスケールが温度によってどのように変化するかを明らかにすることを目的とし、高分子添加剤およびタンパク質の  $^{13}\text{C}$  および  $^1\text{H}$  のスピン-格子緩和時間  $T_1$  および  $T_{1\rho}$  の温度依存性を解析した。デキストランおよびメチルセルロースをモデル添加剤として用い、主鎖および側鎖の運動性に及ぼす温度の影響を考察した。

【実験】デキストラン(40k)あるいはメチルセルロースを牛血清 $\gamma$ グロブリンと重量比 50 : 1 で重水に溶解した溶液を凍結乾燥してタンパク質凍結乾燥製剤を調製した。製剤中のプロトンの  $T_1$  および  $T_{1\rho}$  をパルス NMR (MU-25、日本電子) を用いて測定した(5~85°C)。  $T_1$  の測定は Inversion-recovery 法で行った。 $T_{1\rho}$  は 10 ガウスのスピンロッキング磁場を照射して測定した。また、デキストランおよびメチルセルロースのメチン炭素の  $T_1$  および  $T_{1\rho}$  を固体高分解能  $^{13}\text{C}$ -NMR (Varian) を用いて測定した(5~65°C)。同様にタンパク質のカルボニル炭素の  $T_1$  も測定した。さらに、メチル基を  $^{13}\text{C}$  で置換したメチルセルロースを用いて調製した製剤について、側鎖メチル炭素の  $T_1$  および  $T_{1\rho}$  を測定した。 $T_1$  の測定には Torchia のパルス系列を用い、 $T_{1\rho}$  の測定には 54 ガウスのスピンロッキング磁場を用いた。

【結果】デキストラン主鎖の運動性 デキストランを添加剤とした凍結乾燥製剤においては、デキストラン水素およびデキストランメチン炭素のいずれも、温度上昇とともに  $T_1$  は

タンパク質、凍結乾燥製剤、分子運動性、緩和時間、温度依存性

よしおかすみえ、あそゆきお、こじましげお

低下し、測定温度領域は slow motional regime であることが示された。一方、 $T_{1\rho}$ は水分活性の高い製剤では極小値が観察された。 $T_1$ および  $T_{1\rho}$ の観測値から計算した相関時間 $\tau_c$ は、温度が  $^1\text{H}$ のスピン-スピン緩和においてロレンツ型緩和が現れ始める温度 ( $T_{mc}$ ) を超えると温度変化に伴う変化率が大きくなり、さらにガラス転移温度( $T_g$ )付近で再び温度依存性が増大した。

$T_{1\rho}$ から求めた相関時間 $\tau_c$ は、 $T_{mc}$ と  $T_g$ の間の温度領域において、誘電緩和で測定された $\beta$ 緩和時間に近い値を示し、またその活性化エネルギーも $\beta$ 誘電緩和時間とほぼ同様であった。 $\beta$ 誘電緩和は、デキストランのヒドロキシ基の運動に基づく $\gamma$ 緩和に対して、それより大きなスケール (モノマー単位スケール) の動きを表すと考えられるが、 $T_{1\rho}$ は主にこの $\beta$ 緩和に相当するスケールの動きを反映することが示唆された。温度が  $T_g$ 以上に上昇すると、 $T_{1\rho}$ から求めた相関時間 $\tau_c$ は、 $\alpha$ 誘電緩和時間とほぼ同様の大きい活性化エネルギーを示し、 $T_{1\rho}$ は複数のモノマー単位が関与する $\alpha$ 誘電緩和に相当するスケールの運動を主に反映するようになると思われる。一方、 $T_{mc}$ 以下では $\alpha$ 誘電緩和時間と同様に温度による変化率が減少することから、 $\alpha$ 誘電緩和に相当するスケールの動きは  $T_{mc}$ 以下の温度領域においてもスピン-格子緩和に関与していると考えられる。

$T_1$ から求めた相関時間 $\tau_c$ は、 $\gamma$ 誘電緩和より小さい活性化エネルギーを示したことから、デキストラン水素あるいは炭素の局所的な小さなスケールの動きを反映することが示唆された。

#### メチルセルロース主鎖および側鎖の運動性

メチルセルロースを添加剤とした凍結乾燥製剤では、Fig.1 に示すように、メチルセルロースのメチン炭素の  $T_1$ は温度上昇とともに直線的に低下するが、 $T_m$ における温度依存性の変化は明らかでなかった。製剤中のタンパク質のカルボニル炭素も同様の温度依存性を持つ  $T_1$ を示した。また、メチルセルロースのメチン炭素の  $T_{1\rho}$ は温度による変化を示さず、メチルセルロースの主鎖の運動性は、デキストランの場合と異なり、 $T_{1\rho}$ に反映されないことがわかった。一方、メチル炭素は、温度によって変化しない  $T_1$ と温度上昇とともにわずかに増大する  $T_{1\rho}$ を示し、主鎖のメチン炭素より著しく高い運動性を持つことが示された。

【まとめ】凍結乾燥製剤中の高分子添加剤は  $T_{mc}$ 以下では  $T_1$ に反映される局所的な動きが支配的であるが、 $T_{mc}$ 以上になると  $T_{1\rho}$ に反映されるモノマー単位スケールの動きが現れ、さらに  $T_g$ 以上になると複数のモノマー単位が関与する大きな動きが起こることが示唆された。

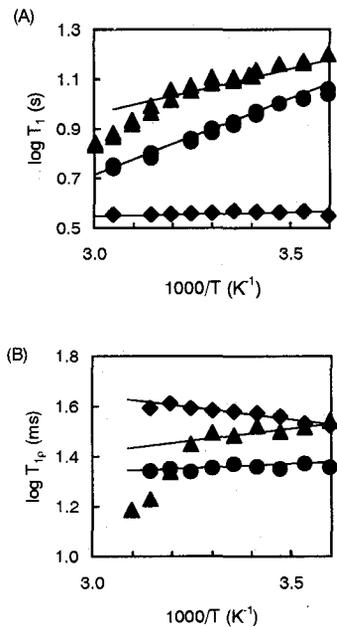


Fig.1.  $T_1$  (A) and  $T_{1\rho}$  (B) of dextran methin carbon (▲), methylcellulose methin carbon (●), methylcellulose methyl carbon (◆).

$^{13}\text{C}$  NMR 緩和測定による水溶性ポリペプチドの分子運動

北大院工 ○内野 新一、堤 耀広

Molecular Motion of Polypeptides in Aqueous Solution by  $^{13}\text{C}$  NMR Relaxation Technique

S. Uchino and A. Tsutsumi

*Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Hokkaido University,**Sapporo 060-8628*

In order to clarify the relation of structure and function for biopolymers, we investigated molecular motion of aqueous polypeptide by  $^{13}\text{C}$  NMR relaxation technique. To estimate for molecular motion, we adopted three models, i.e. Dejean-Laupretre-Monmerie (DLM) model, multiple internal rotation model and model free approach. Since these models have well consistent with experimental data, we have discussed among these approaches.

$\alpha$ -ヘリックス構造をとるポリアミノ酸は、側鎖同士の相互作用が物性に大きな影響を与えると考えられるため、分子運動に関する研究は側鎖運動に焦点を当てた研究が数多くなされている。このうち、poly(N $\epsilon$ -hydroxyethyl L-glutamine)(PHEG)、Poly(N $\epsilon$ -hydropropyl L-glutamine)(PHPG)、poly(L-histidine)(PLH)は、温度、pH、溶媒組成等の条件により、水溶液中で $\alpha$ -ヘリックス構造からランダムコイル構造へ構造が変化することが知られている。このように、水溶液中でいくつかの構造をとり得るポリアミノ酸の分子運動を調べることは、アミノ酸配列と蛋白質の高次構造との関係や、生体物質特有の機能を解明する上での基礎的なアプローチのひとつになると考えられる。

一方、分子運動を説明するモデルとして、現在までに数多くのモデルが提案されてきており、これらのモデル計算による値と実験データをフィッティングすることによって、分子内部でどのような運動が起こっているかを推定することができる。そこで本研究においては、上述のPHEG、PHPG、PLHを用いて $^{13}\text{C}$  NMR緩和の技法を用い、水溶液中におけるランダムコイル状態でのスピン-格子緩和時間( $T_1$ )測定を行なった。なお $T_1$ 測定は、10°C~90°Cで Inversion Recovery 法を用いた。モデル計算に関しては、Dejean-Laupretre-Monmerie (DLM)モデル、多重内部回転モデル、モデルフリーアプローチを採用し、実験値とのフィッティングを行った。

キーワード：高分子、ポリペプチド、NMR緩和、DLMモデル

うちのしんいち、つつみあきひろ

解析結果の例として、PHEG 主鎖の  $T_1$  測定による実験値と DLM モデルによるシミュレーションの比較を Fig.1 に示す。水溶液では、実験による可変温度範囲が限られてしまうため、 $^{13}\text{C}$  Larmor 周波数を変えて測定を行い、周波数-温度換算法<sup>1)</sup>を用いて温度範囲をカバーしている。この結果から、DLM モデルの正当性を仮定した場合、PHEG 主鎖のセグメント運動の相関時間は 1 ns オーダーであり、librations 相関時間は 10 ps オーダーの速い運動をしていると推定できる。

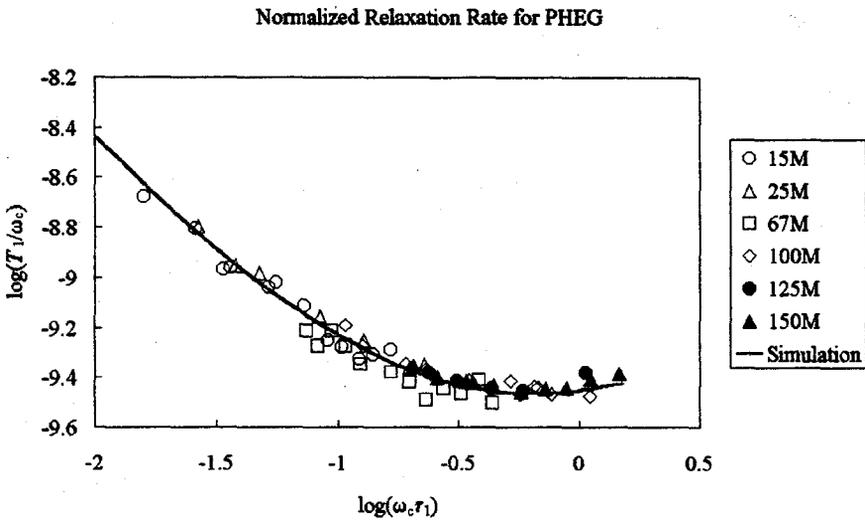


Fig.1 Normalized spin-lattice relaxation rate<sup>1)</sup> of  $^{13}\text{C}$  NMR for PHEG. Observed frequencies are 15MHz( $\circ$ ), 25 MHz( $\triangle$ ), 67 MHz( $\square$ ), 100 MHz( $\diamond$ ), 125 MHz( $\bullet$ ) and 150MHz( $\blacktriangle$ ). The continuous curve represents the simulation data making use of DLM model.  $T_1$ ,  $\omega_c$ ,  $\tau_1$  represents spin-lattice relaxation time, Larmor frequency of  $^{13}\text{C}$ , correlation time for correlated pair transitions, respectively.

#### Reference

- 1) A. Guillermo, R. Dupeyre, and J. P. Cohen-Addad, *Macromolecules* **1990**, *23*, 1291-1297, "Homogeneity Properties of NMR Rates Measured in Molten Polybutadiene. Temperature Dependence of Segmental Chain Motions"

高圧  $^{129}\text{Xe}$  NMR による高分子中の自由体積の  
 キャラクターゼーションと Xe の臨界挙動  
 (帝人<sup>1</sup>、阪大院理<sup>2</sup>、東大原総セ<sup>3</sup>)

○永阪文惣<sup>1</sup>、尾身洋典<sup>2</sup>、江口太郎<sup>2</sup>、中村亘男<sup>2</sup>、伊藤泰男<sup>3</sup>

**Characterization of Free Volume and Critical Phenomenon of Xe in Polymers as studied  
 by High-Pressure  $^{129}\text{Xe}$  NMR**

○Bunsow Nagasaka<sup>1</sup>, Hironori Omi<sup>2</sup>, Taro Eguchi<sup>2</sup>, Nobuo Nakamura<sup>2</sup>, and Yasuo Ito<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Material Analysis Research Laboratories, Teijin Ltd., Hino, Tokyo 191-8512

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043

<sup>3</sup>Research Center for Nuclear Science and Technology, The University of Tokyo, Tokai, Ibaraki 319-1106

Free volume and critical phenomenon of Xe in polymers have been investigated by high-pressure  $^{129}\text{Xe}$  NMR. It was found that the  $^{129}\text{Xe}$  chemical shift of the confined xenon in highly permeable PTMSP shows strong pressure dependence in the low-pressure region due probably to the strong adsorption affinity of xenon gas into large pores; this behavior of xenon is well interpreted by the Langmuir adsorption isotherm. It is noted that a new resonance peak appeared at a lower field than that for the free Xe peak just below the critical point of bulk xenon and disappeared above the critical point, suggesting the formation of Xe-clusters in the critical region.

気体透過性のよいポリトリメチルシリルプロピン (PTMSP) について自由体積中 (マイクロポア) に取り込まれた Xe と free Xe の室温における  $^{129}\text{Xe}$  NMR 化学シフトの圧力依存性を調べたところ、Fig. 1 に示すように Free Xe の  $^{129}\text{Xe}$  NMR 化学シフトは、臨界点 ( $P_c = 5.84$  MPa) 近傍で密度の急激な増大に伴って大きく低磁場シフトするが、マイクロポア中の Xe では、より低圧の  $P = 0-3$  MPa の範囲で圧力上昇とともに約 50ppm、低磁場側にシフトした。これを吸着の Langmuir model で解析した結果、PTMSP 中のマイクロポアが比較的強い吸着力をもつことがわかった (Fig. 1

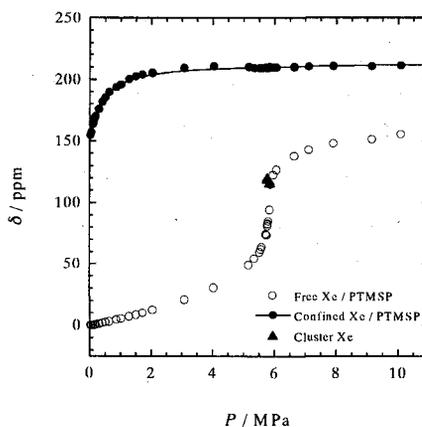


Fig. 1. Pressure dependence of the  $^{129}\text{Xe}$  NMR chemical shift of Xe / PTMSP at 298 K. A solid line is calculated by the Langmuir adsorption isotherm.

Key words:  $^{129}\text{Xe}$  NMR、高分子、自由体積、高圧 NMR、超臨界流体、吸着

ながさかぶんそう、おみひろのり、えぐちたろう、なかむらのぶお、いとうやすお

実線)。陽電子消滅実験によって PTMSP には異なったサイズ (0.74, 1.48 nm) をもつ 2 種類のマイクロポアの存在が示唆されたが、10 MPa までの圧力下で confined Xe の  $^{129}\text{Xe}$  NMR 信号は 1 本だけ観測された。陽電子寿命スペクトルの強度と 0 MPa における  $^{129}\text{Xe}$  NMR 化学シフト値から、大きなポアの数が圧倒的に多く、また異なるポア間の交換が速いと推測できる。この比較的大きなポアに対しては、通常の mean free path model は  $^{129}\text{Xe}$  化学シフトのポアサイズ依存性の解析に適用できない。

また Fig. 2 に示すように、臨界点直下 (5.78 MPa) で、free Xe (81 ppm) のピークより少し低磁場側に新たなピーク (120 ppm) が出現し、わずかな圧力上昇によって線幅が広がり、 $P = 5.87$  MPa で free Xe の信号と重なり再び尖鋭化する現象が観測された。恐らく臨界点近傍で生成する Xe クラスターに対して PTMSP の比較的大きなマイクロポア (1.48 nm) がちょうどよいサイズをもつため、クラスターXe 信号が観測されたものと推定している。これはモンテカルロ計算によるクラスター解析の結果にほぼ一致する。圧力上昇における広幅化と再尖鋭化が起こるのは、クラスターXe と free Xe の間でその状態の均一化が起こるためであると解釈できる。

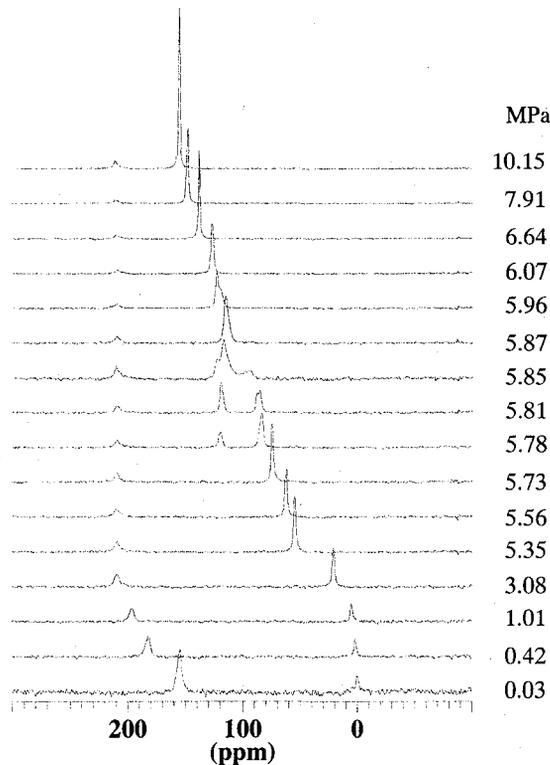


Fig. 2. Pressure dependence of  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectrum of Xe / PTMSP at 298K.

パルスNMR法によるアクリル酸, アクリル酸エステルの  
塊重合に関する研究Ⅲ

(防衛大応化) ○木本博喜, 福田敦子, 浅野敦志, 黒津卓三

Pulsed NMR Studies of Bulk Polymerization of Acrylic Acid and its esters Ⅲ.

Hiroki KIMOTO, Atsuko FUKUDA, Atsushi ASANO, and Takuzo KUROTSU

Department of Applied Chemistry, National Defense Academy

The spin-spin relaxation times ( $T_2$ ) of acrylic acid (AA) and methyl acrylate were (MA) measured as a function of the polymerization time. The bulk polymerization was carried out in a sealed glass tube with benzoyl peroxide as an initiator at various temperatures. Three kinds of the relaxation times,  $T_{2l}$  (long),  $T_{2m}$  (intermediate), and  $T_{2s}$  (short) were observed.  $T_{2s}$  was made of two components,  $T_{2s1}$  and  $T_{2s2}$  on the polymerization of AA. As the polymerization proceeded, the fraction of the  $T_{2l}$  component decreased while that of the  $T_{2s}$  component increased. Furthermore, the sum of  $T_{2s}$  and  $T_{2m}$  fractions was in agreement with the polymer yields. We concluded that the decrease of  $T_{2l}$  component reflects the decrease in monomer concentration, and the increase of  $T_{2s}$  component is consistent with the amount of polymer chains forming network structure. Then, we can trace the polymerization process non-destructively and continuously by the pulsed NMR technique.

**【序】** パルスNMR法は, 容易に, 非破壊的かつ連続的に, 系全体の運動性に関する情報が得られるため, 固体高分子の分子運動, その熱的挙動や相構造の研究に用いられている。一方, 高分子の塊状重合過程はゲル効果を伴う液相から固相への一種の相変化と考えられるが, この過程を分子運動論的に検討した例はほとんどない。そこで, 我々はアクリル酸及び, そのエステルの塊状重合について, パルスNMR法を用い, 分子の相対的運動に関する値であるスピン-スピン緩和時間( $T_2$ )を, プロトン自由誘導減衰信号(FID)測定から求め, その時間変化より, 重合過程を分子運動論的観点から検討している。今回は, 前報告<sup>1</sup>に引き続き, アクリル酸(AA), アクリル酸メチル(MA)についての結果を高分解能NMR測定の結果も併せて発表する。

**【実験】** FIDは日本電子JNM-MU25を用い, プローブ中で重合させながら測定した。重合は, 減圧封管した10 mm  $\phi$  NMR管内で過酸化ベンゾイルを開始剤とし, 40, 45, 50, 55, 60°Cの温度でそれぞれ行った。高分解能NMR測定にはBruker DMX-500を用いた。

**【結果と考察】** 反応開始直後はAA, MA共に溶液状態であり,  $T_2$ は単一の緩和時間を示した。反応が進行し, 反応物が固体化するのに伴い, それぞれの $T_2$ は大きく変化し, 複数の緩和時間

パルスNMR, アクリル酸, アクリル酸エステル誘導体, 塊重合, 緩和時間

きもとひろき, ふくだあつこ, あさのあつし, くらつたくぞう

成分が見られるようになった(Figs. 1, 2)。MAにおいては、長い緩和時間( $T_{2l}$ )、短い緩和時間( $T_{2s}$ )

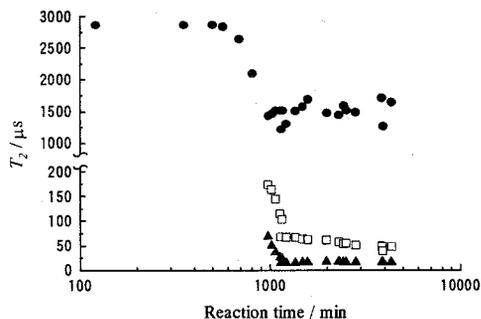


Fig. 1.  $T_{2l}$ ,  $T_{2m}$ , and  $T_{2s}$  vs. Reaction time at 40 °C for MA: ●,  $T_{2l}$ ; □,  $T_{2m}$ ; ▲,  $T_{2s}$ .

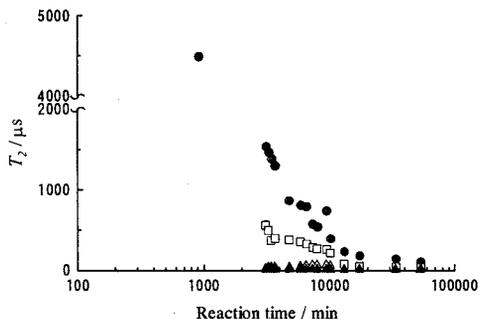


Fig. 2.  $T_{2l}$ ,  $T_{2m}$ ,  $T_{2s1}$  and  $T_{2s2}$  vs. Reaction time at 50 °C for AA: ●,  $T_{2l}$ ; □,  $T_{2m}$ ; △,  $T_{2s1}$ ; ▲,  $T_{2s2}$ .

及び、中間の長さの緩和時間( $T_{2m}$ )の3つから成り、反応中期からその値はほぼ一定となった。AAにおいても、緩和時間成分は $T_{2l}$ ,  $T_{2m}$ ,  $T_{2s}$ の3つに大別されたが、短い緩和時間成分が2つの成分( $T_{2s1}$ ,  $T_{2s2}$ )から構成されており、全体として4つの緩和時間成分から成ることがわかった。また、AAはMAと異なり、 $T_{2l}$ と $T_{2m}$ の値が反応最終段階まで減少し続けた。以上のことは、側鎖の違いにより、反応中の分子の運動性に差があることを示している。緩和時間 $T_{2l}$ ,  $T_{2m}$ ,  $T_{2s}$ の分率( $P_l$ ,  $P_m$ ,  $P_s$ )の重合時間に対する挙動、及びその値(Figs. 3, 4)から、 $T_{2l}$ ,  $T_{2s}$ は残存モノマー、生成ポリマーの緩

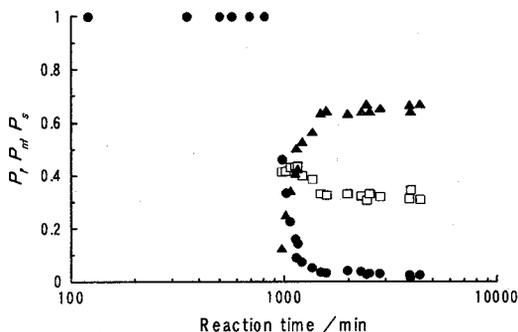


Fig. 3.  $P_l$ ,  $P_m$ , and  $P_s$  (fractions of  $T_{2l}$ ,  $T_{2m}$ , and  $T_{2s}$ , respectively) vs. Reaction time at 40 °C for MA: ●,  $P_l$ ; □,  $P_m$ ; ▲,  $P_s$ .

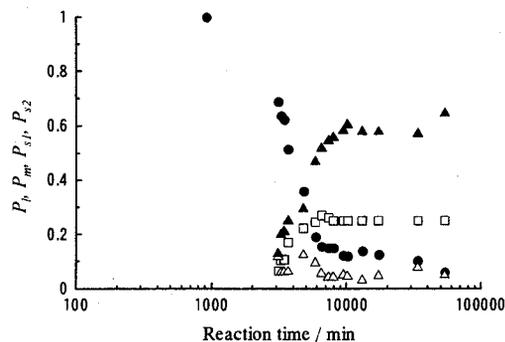


Fig. 4.  $P_l$ ,  $P_m$ ,  $P_{s1}$  and  $P_{s2}$  (fractions of  $T_{2l}$ ,  $T_{2m}$ ,  $T_{2s1}$  and  $T_{2s2}$ , respectively) vs. Reaction time at 50 °C for AA: ●,  $P_l$ ; □,  $P_m$ ; △,  $P_{s1}$ ; ▲,  $P_{s2}$ .

和時間に相当するのではないかと考えられる。また、ポリマー回収率と $P_m + P_s$ の値とを比較したところ、良い相関関係が認められた。このことは、 $T_2$ の変化がAA, MAの重合反応過程を反映していることを示している。

現在、高分解能NMRを用いた検討を加えており、その結果も併せた議論を行う予定である。

【参考文献】 1. 木本, 浅野, 福田, 黒津, 第5回分析化学東京シンポジウム・2001機器分析東京討論会講演要旨集 p. 184 (2001)

絹フィブロインモデル化合物の構造設計及び NMR 構造解析

1. 東京農工大学工学部、2. 生物系特定産業技術研究推進機構  
 ○趙晨華<sup>1,2</sup>、小松耕平<sup>1</sup>、矢吹一人<sup>1</sup>、朝倉哲郎<sup>1</sup>

### Structural Design of Model Compounds of Silk Fibroin and NMR Structural Analysis

1. Tokyo University of Agriculture and Technology

2. Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

○Chenhua Zhao<sup>1,2</sup>, Kohei Komatsu<sup>1</sup>, Kazuto Yabuki<sup>1</sup> and Tetsuo Asakura<sup>1</sup>

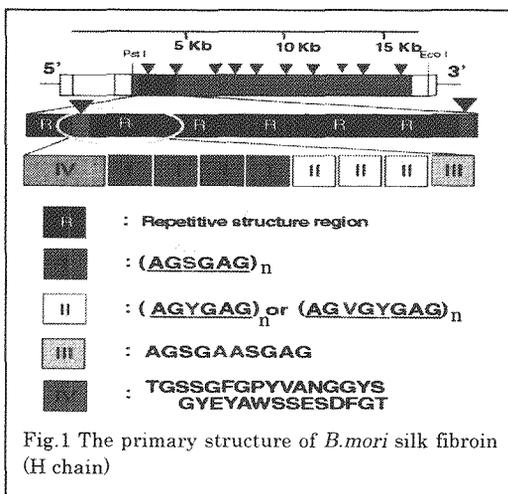
The primary structure of *B. mori* silk fibroin consists of twelve repetitive domains and eleven amorphous domains, IV, alternatively. We divide such repetitive region into three parts, I, the alternative copolymer (Ala-Gly)<sub>n</sub> containing Ser residues, II, (Ala-Gly)<sub>n</sub> containing Val and/or Tyr residues, III, (Ala-Gly)<sub>n</sub> containing Ala-Ala sequences. In order to study the partial structures and function of each domain, we synthesized a series of model peptides, and analyzed their structures by using solid-state NMR and conformational energy calculations. From the results, it is shown that the presence of Ser residues are stabilized the silk I or silk II structures of (Ala-Gly)<sub>n</sub> sequences. The presence of Ala-Ala regions play strong driving force for forming β-sheet structure. The role of Tyr residues and amorphous domains will be the origin of the solubility of silk fibroin in water.

**[緒言]** 家蚕絹フィブロインの一次構造が昨年報告され<sup>1</sup>、12個の繰り返し領域と11個のアモルファス領域が交互に出現する構造であることが明らかになった(Fig.1)。繰り返し領域は近似的に、Ala-Glyの交互共重合体とみなすことができるが、詳細に見ると、一部のAla残基をSerやTyrで置換した種々のモチーフの組み合わせからなる、以下のI~IVの領域に分けられる。I. Serを含む領域、II. TyrやValを含む領域、III. 特異的なAla-Alaを含む領域、IV. アモルファス領域。

本研究では、家蚕絹フィブロイン自身の安定同位体ラベルと各々の代表的なモチーフのペプチドの化学合成を行い、固体NMRを用いて、それらの部分構造と物性を解明し、新しい絹様物質を作成するための指針を得ることを目的とした。

**[実験]** 領域Iの解明のために、(AG)<sub>15</sub>など数種類のペプチドと絹のキモトリプシン処理不溶部 Cp fraction を、IIのために<sup>13</sup>C<sub>α</sub>]Tyr-silk fibroin、<sup>13</sup>C<sub>β</sub>]Tyr-silk fibroinならびに<sup>15</sup>N]Tyr-silk fibroin、さらに Tyr

を含む(AG)<sub>3</sub>YG(AG)<sub>3</sub>YG(AG)<sub>3</sub>YG(AG)<sub>3</sub>、(AGYGAG)<sub>5</sub>など数種類のペプチドをFmoc固相法によって合成した。さらに、IIIの解明のために(a)AGYG(AG)<sub>3</sub>YG(AG)<sub>2</sub>SGAASG(AG)<sub>4</sub>、



キーワード：家蚕絹フィブロイン、固体NMR、silk I構造、silk II構造

ちょう しんか、こまつ こうへい、やぶき かずと、あさくら てつお

(b)(AG)<sub>9</sub>[3-<sup>13</sup>C]A[1-<sup>13</sup>C]A(AG)<sub>5</sub> を含む数種類のペプチドを、IV のために、TGSSGFPGYPV[3-<sup>13</sup>C]ANGGYSGYEY[3-<sup>13</sup>C]AWSSESDFGT をそれぞれ合成した。固体 NMR 測定は、CMX400 NMR スペクトルメーター(Chemagnetic Co)を用いた。また構造の安定性を検討するために、コンフォメーションエネルギーの計算を行った(Molecular Simulation Inc.製の Insight II(ver.4.0.0P+)のモジュールである Discover3 を使用)。

**【結果と考察】** I に関して、Ala-Gly の繰り返しからなるモデルペプチドは、処理方法の違いによって、silk I 型ならびに silk II 型構造をとる。また、Ser 残基が Ala2 個に対して 1 個の割合で導入されても、もとの構造に摂動を与えず、むしろ各々側鎖 OH の関与した分子内、分子間水素結合を通して、各構造を安定化させることがわかった。

II に関して、絹が silk I 型構造をとる場合、Tyr 残基はランダムコイル構造をとること、モデル化合物の検討から、Tyr を含む連鎖部分は、水に対する絹の溶解性の向上に寄与することがわかった。また、絹が silk II 型構造をとる場合は、Tyr 残基はそれに組み込まれる。(Fig. 2)

III に関して、Ala-Gly の繰り返し中の Gly が一部 Ala に置換され、Ala-Ala と並んだ場合、全体の構造は silk II 型構造を形成しやすくなることがわかった(Fig.3)。すなわち、β-シ

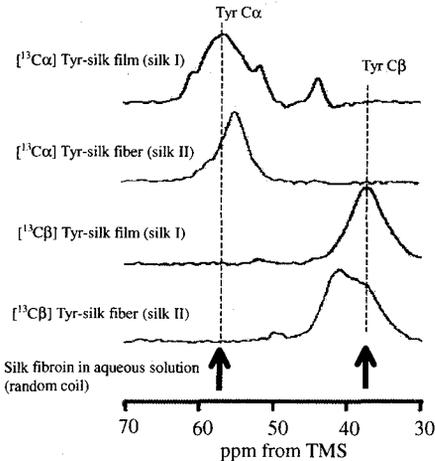


Figure 2 The difference <sup>13</sup>C NMR spectra between [<sup>13</sup>C]<sub>α</sub>Tyr-silk fibroin and non-labeled silk fibroin. The Tyr C<sub>α</sub> peak was emphasized. Similarly, the difference spectra were obtained for Tyr C<sub>β</sub> peak, too.

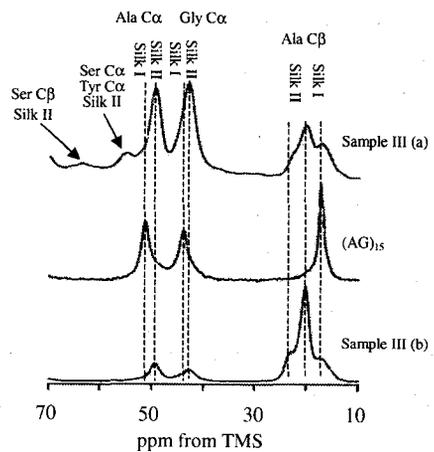


Figure 3 <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectra of the model peptides (III(a) and (b), (AG)<sub>15</sub>). All samples were dissolved in 9M LiBr and then dialyzed against water.

ート構造発現の核になりうる。

IV に関して、アモルファス領域は、水に溶解しやすいランダムな構造をとることが明らかになった。以上のように、家蚕は吐糸時に瞬時に silk II 型の繊維を形成しやすくするために AA という AG の繰り返しを乱す配列を一部配置すると同時に、Tyr を含むモチーフやアモルファス領域を体内における不溶化を避けるために配置している。蚕はこのように、アミノ酸残基を巧みに配置し、体内での溶解性の維持と瞬時に強い絹糸を作ることコントロールしていると考えられる。

尚、本研究は一部、生研機構の基礎研究推進事業により行われた。

1. C. Zhou et.al. *Nucleic Acids Res.* 28, 2413-2419 (2000)

多孔性銅錯体の吸着ゲストの固体NMR  
(京大院工) ○堀毛悟史、北浦良、北川進

Solid-State NMR for guest molecules absorbed in porous copper coordination polymers

Satoshi HORIKE, Ryo KITAURA, and Susumu KITAGAWA

Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto 606-8501

[Abstract]

High resolution solid-state NMR spectra were measured for methanol molecules absorbed in porous coordination polymers, whose pillared layer frameworks are rationally modified by changing the pillar ligand. The  $^{13}\text{C}$  chemical shifts and spin-lattice relaxation times well correlate to the channel size and/or the functionality of pillar ligands.

[緒言]

金属錯体は、配位子の持つ高い設計性と金属イオンの持つ多様な立体構造を組み合わせることにより、様々なサイズのチャンネルを有する多孔性配位高分子を構築することが可能である。これまでに我々は、Figure1に示すような、2次元シートがピラー配位子(柱状配位子)で連結された多孔性銅(II)錯体を合成し、その骨格の高い安定性およびゲスト吸着性を報告してきた<sup>1)</sup>。今回、ピラーの異なる銅錯体を用い、それらのチャンネルに取り込まれているゲストの挙動を解析した。

[実験]

多孔性錯体およびサンプルの合成

各錯体の合成は、 $\text{Na}_2\text{pzdc}$  (20mM, 50mL)と各ピラー配位子 (10mM, 50mL)の水/エタノール1:1混合溶液に、 $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ および  $\text{CuBF}_4$  (20mM, 50mL)の水/エタノール1:1溶液をゆっくりと滴下させることにより生成する青色固体をろ過して得られた。また各サンプルは、得られた多孔性銅錯体を室温で1日間真空乾燥させた後、室温飽和蒸気圧下でゲストとなる各溶媒と共存させることにより、

$\{[\text{Cu}_2(\text{pzdc})_2(\text{L})] \cdot x\text{H}_2\text{O}\}_n(\text{solvent})_n$ として調製した。これらの同定は単結晶および粉末X線構造解析、そして元素分析によって行った。

**固体 NMR 測定** 測定は日本電子社製 JNM-LA300 FT-NMR( $^{13}\text{C}$  観測周波数 75.4626MHz、観測幅 30030Hz、パルス幅 5.2usec)を用いて行った。サンプルは約 0.25g をジルコニア製 7mm 試料管に密閉して測定した。全ての  $^{13}\text{C}$  NMR 測定はシングルパルス法+ $^1\text{H}$  デカップリングを用いて行った。またスピン-格子緩和時間( $T_1$ )測定は反転回復(inversion recovery)法を用いた。

キーワード：固体 NMR、多孔性錯体、ゲスト、水素結合、緩和時間

ほりけさとし、きたうらりょう、きたがわすすむ

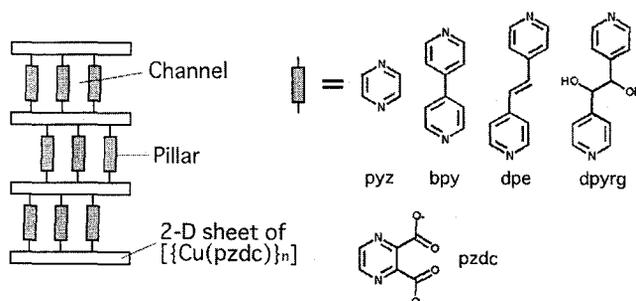


Figure1. Schematic representation of the pillared-layer structures of  $[\text{Cu}_2(\text{pzdc})_2(\text{L})x\text{H}_2\text{O}]_n$ . pzdc=pyrazine-2,3-dicarboxylate; 1:L=pyz; 2:L=bpy; 3:dpe; 4:dpyrg.

[結果および考察]

ピラーが pyz(1)、bpy(2)、dpe(3)、および dpyrg(4)で架橋されている多孔性銅錯体に、ゲストとしてメタノールを吸着させ、それぞれ  $^{13}\text{C}$ NMR の測定を行った。それぞれのスペクトルは complex1、2、および 3 の場合、バルク溶液のメタノールより約 1.4ppm 高磁場シフト位置(48.6ppm)付近に1本のメタノールのピークが現れた。

一方 complex4 では 49.2ppm と 44.4ppm にそれぞれピークが観測された。これら2種類のメタノールの温度依存性を調べるため 296K から 353K まで温度を上げてゆくと、Figure2 に示したように 44.4ppm のピークが温度を上げるにつれて低磁場シフトした。これより complex4 中ではメタノール分子を吸着できるチャンネルが2種類存在し、高温ではそれらの中で化学交換が起こってピークが重なると考えられる。

次に取り込まれているゲストの運動のチャンネル半径  $R$  (Å) に対する依存性を検討するために、complex1~4 において室温下でメタノールの  $^{13}\text{C}$   $T_1$  測定を試みた。各 complex に対するチャンネル半径、および得られた  $T_1$  を Table1 に、また  $1/R$  と  $1/T_1$  の関係図を Figure3 に示す。各  $T_1$  はゼオライトの H-ZSM-5 中に物理吸着されているメタノールの  $T_1$  と比べて 10 倍以上大きい<sup>2)</sup>。またチャンネルサイズと  $T_1$  が比例していることが分かる。

この分子運動が等方的で緩和が主に双極子相互作用によるものと考え、相関時間  $\tau_c$  は  $10^{-11}\text{sec}$  のオーダーとなる。つまり分子運動はチャンネル内でも速いが、チャンネルサイズにより水素結合等の束縛力が変わる物理吸着状態であることが分かる。complex4 の  $T_1$  は 49.2ppm のピークが 0.233sec、44.0ppm のピークが 0.179sec であった。これより前者帰属のメタノールはそのピラー部位の有するフレキシビリティおよび大きなチャンネルサイズにより4つの錯体中最も自由に運動していることが明らかとなった。

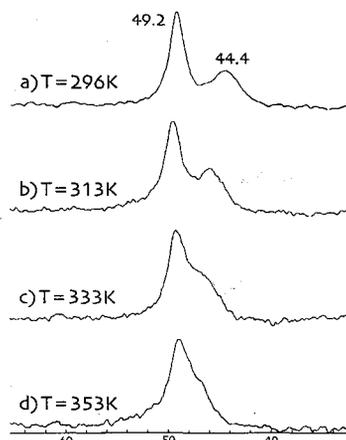


Figure2.  $^{13}\text{C}$  solid-state NMR spectra of methanol sorbed on complex4 at temperature of T=296K(a), T=313K(b), T=333K(c), and T=353K(d).

Table 1. Channel size and  $^{13}\text{C}$   $T_1$  of methanol sorbed in complex1~4.

complex	R (Å)	$^{13}\text{C}$ $T_1$ (sec)
1	4	0.14
2	8	0.19
3	10	0.21
4	14	0.23 / 0.18

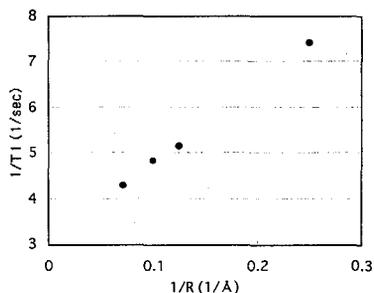


Figure3.  $^{13}\text{C}$  spin-lattice relaxation rates,  $1/T_1$ , as a function of pore radius ( $1/R$ ) for methanol.

このように、取り込まれたゲストはフレームが常磁性の銅(II)により形成されているが固体NMRによって同定でき、それぞれチャンネルサイズに依存した挙動を示していることが明らかとなった。錯体の構造やメタノール以外のゲストの挙動等、詳細は当日発表する。

[参考文献]

- 1) S. Kitagawa et al., *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 1999,38,140-143.
- 2) C. Dybowski et al., *J.Am.Chem.Soc.* 1990,112,7140-7144.

ポリエチレンオキサイドをベースとした架橋型高分子電解質への  
側鎖導入の割合とNMRで観測するイオン拡散の相関

(産総研) ○早水紀久子、秋葉悦男、  
(ユアサコーポレーション) 相原雄一、坂東寿則

**The effects on the ion diffusion by the degree of cross-linking for the polyethyleneoxide-based solid electrolytes**

(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) K. Hayamizu, E. Akiba  
(Yuasa Cooperation) Y. Aihara, T. Bando

The cross-linked polyethyleneoxide-based solid electrolytes are important candidates to use lithium batteries. We have been studied the ionic conductivity and the anion and the lithium diffusion by pulsed field-gradient spin-echo (PGSE) NMR for the cross-linked poly(ethylene-propylene) copolymers. To obtain the faster ion diffusion, the degrees of cross-linking are controlled by introducing the methyl group instead of the acrylate. The self-diffusion coefficient measurements indicate the meaning the cross-linking.

1. はじめに

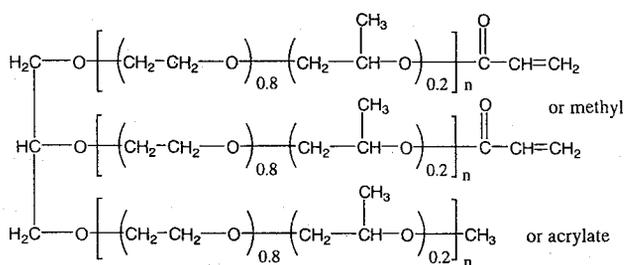
ポリエチレンオキサイド (PEO) をベースとして設計された櫛形ポリマーにリチウム塩をドーブして高分子電解質としてリチウム二次電池を利用する試みが電池研究の分野では活発に行われており、イオン伝導の機構についても研究されている。我々もイオン伝導、熱測定、NMR による T1 および自己拡散係数の測定から、ポリマーのセグメント運動、リチウムのホッピング運動、アニオンの時間に依存した拡散などから、電解質高分子構造、その運動性、イオン伝導について研究報告を行っている。

本報告では、イオン伝導性の向上を目指してポリマー構造の柔軟性を上げるために、架橋密度を制御することを試みた。架橋密度の小さい系でのイオン拡散について研究したので報告する。

2. サンプル作製： 架橋前駆体のマクロモノマーの構造を示す。分子量約 8,000 の粘稠な液体で統計的なメチル基導入 0% (架橋 100%、報告済み<sup>1-2</sup>)、20% (架橋 80%)、50% (架橋 50%) のマクロモノマーにリチウム塩として LiN(SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (LiTFSI) をポリマーの酸素と Li の割合を 20:1 (P20TF1) と 10:1 (P10TF1) とした 2 種類の濃度で作製した。キャスト後電子線照射により架橋した。サンプルは固体である。サンプリングは乾燥室で行いシゲミ製 2 重管にサンプル高さ 5mm で挿入した。

自己拡散係数、イオン伝導度、高分子電解質、ポリエチレンオキサイド、架橋深度

はやみずきくこ、あきばえつお、あいはらゆういち、ばんどうとしのり



### 3. 結果

架橋を完全に行った高分子電解質ではリチウムイオンの T2 は一成分にならず正確な自己拡散係数の測定はできなかったが架橋の割合が小さくなると T2 は一成分になり拡散も速くなったので、温度依存性、塩濃度依存性を測定して Fig.1 に示した。アニオンの自己拡散係数は以前に報告した通りに時間依存性があるが、 $\Delta = 70\text{ms}$  に固定して自己拡散係数の温度依存性を Fig.2 に示した。ポリマーの架橋度が大きくなるとイオン類の拡散は遅くなることがわかる。一方塩濃度を大きくするとイオン拡散は遅くなり、架橋深度の効果を相殺する。言いかえると塩が架橋を形成する役割を果たしていることを示している。

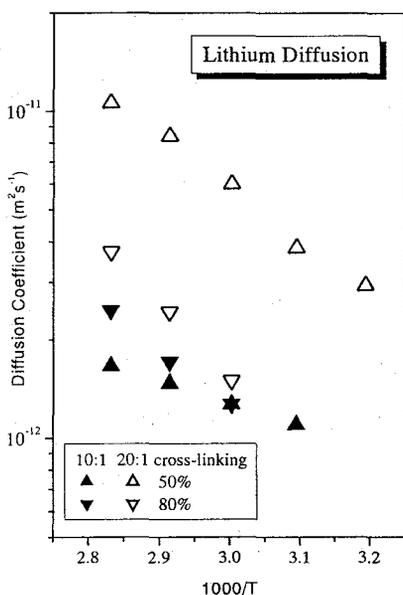


Fig. 1 The temperature-dependent lithium coefficients for different cross-linking

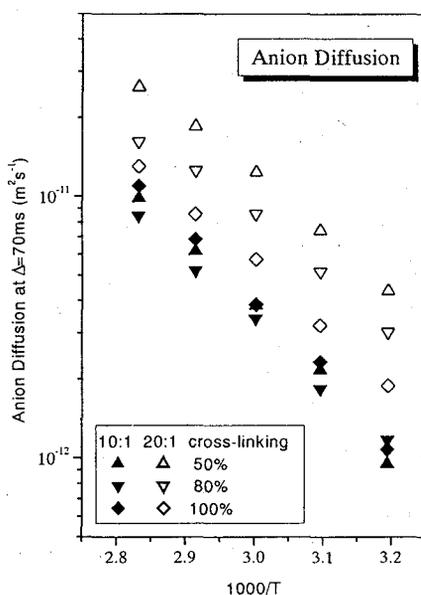


Fig. 2 The anion self-diffusion self-diffusion coefficient for the various cross-linking

- 文献 1. K. Hayamizu, Y. Aihara, and W. S. Price, J. Chem. Phys. 113, 4785-4793 (2000).  
2. K. Hayamizu, Y. Aihara, and W. S. Price, Spectrochimica Acta, 46, 1475-1485 (2001).

P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>)/at-PMMA ブレンドと NMR 交差緩和  
 北大院工 ○津村憲史、石井文明、堤耀広、山形大工 大東弘二

<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR Cross Relaxation and P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>)/at-PMMA Blends

○Kenji Tsumura<sup>1</sup>, Fumiaki Ishii<sup>1</sup>, Akihiro Tsutsumi<sup>1</sup>, and Hiroji Ohigashi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Division of Applied Physics, Graduate of School of Engineering, Hokkaido University Sapporo 060, Japan, and <sup>2</sup> Department of Material Science and Engineering, Yamagata University, Yonezawa 992-8510, Japan

Miscibility in the binary blends of Poly(vinylidene fluoride/trifluoro ethylene) (P(VDF/TrFE)) and Poly(methyl methacrylate) (PMMA) were investigated by DSC and cross polarization / magic angle spinning NMR methods. The blends containing  $\Phi_w=0.2-0.4$  weight fraction of the copolymer were found to be separated into the copolymer-rich and PMMA-rich phases by annealing near melting point. The  $\Phi_w$  dependences of glass transition  $T_g$  and proton spin-lattice relaxation in the rotating frame  $T_{1\rho}$  were analyzed, based on free volume theory and Flory-Huggins theory. Interaction parameters of  $\chi_A$  and  $\chi_B$  for the respective phases were negative values, and when  $\Phi=0.2$ , both polymers were most miscible each other in each phase.

### 1). 背景と目的

LCST型と云われる強誘電体高分子であるビニリデンフロライドとトリフロロエチレンの共重合体、P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>)と at-PMMA のブレンドは  $T > T_m$  (融点) から  $T_m$  近傍の常誘電相で熱処理すると、共重合体の重量百分率  $\Phi_w$  が 50wt% 以上では巨大単結晶が生成し、50wt% 以下では両ポリマーがよく相溶した無定形ブレンドとなると報告されている。<sup>1)</sup> 我々は以前常誘電相での単結晶生成機構を明らかにするため、DSC と高分解能 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C CP/MAS NMR 法を用い、同じ熱処理条件で熱処理時間に関し研究した。それによると  $\Phi_w > 50wt\%$  では熱処理時間の増加と共に、初期段階のスピノーダル分解、結晶核生成に伴う相溶無定形相の相分離、各相の界面成長が起きた後、分子鎖の厚化による巨大な安定結晶ができることを明らかにした。 $\Phi_w < 50wt\%$  では、各相がよく相溶した無定形の共重合体-rich 相と at-PMMA-rich 相に相分離し、各相のガラス転移温度  $T_g$  や回転系スピン格子緩和時間  $T_{1\rho}$  の  $\phi_w$  依存がそれぞれの自由体積によっていることを明らかにした。

本研究の目的は巨大単結晶生成に重要な役割を演じていると思われる無定形相の相溶状態を明らかにするため、50wt% 以下の P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>)/at-PMMA ブレンドの  $T_g$  や  $T_{1\rho}$  の  $\Phi_w$  依存性と相溶状態との関係をガラス転移の自由体積理論と Flory-Huggins 理論で考察することである。

### 2). 実験

試料はダイキン工業株式会社と三菱化学株式会社からそれぞれ提供された P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>) と at-PMMA である。DSC と <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C CP/MAS NMR 測定に用いた試料は、 $\Phi_w = 50wt\%$  以下の P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>)/at-PMMA ブレンドのキャストフィルム膜を室温で作成し、窒素気流下、150°C で溶融させて 135°C に急冷し、12 時間熱処理した後、液体窒素に急冷させたものである。

### 3). 結果と考察

Fig.1 と Fig.2 は、熱処理した P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>)/at-PMMA ブレンドの A, B 相の  $T_g$  と室温における  $T_{1\rho}$  の  $\Phi_w$  依存性である。各相の  $T_g$  はともに  $\Phi_w = 20wt\%$  で極小となっている。一般に、 $T_g$  とガラス転移に伴う比熱の変化  $\Delta C_p$  はガラス転移理論から、

$$\Delta C_p = T_g V_g \Delta \alpha (\partial P / \partial T)_v \quad (1)$$

で表される。<sup>2)</sup> ここで  $V_g$  はガラス転移における自由体積、 $\Delta \alpha$  はガラス状態と液体状態の熱膨張係数の差である。 $\Delta \alpha$  と  $(\partial P / \partial T)_v$  はポリマーに関係なくほぼ一定の値で、

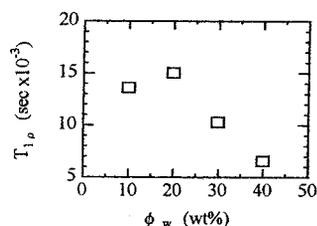


Fig.2. The  $T_{1\rho}$  vs.  $\phi_w$  plot for P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>)/at-PMMA

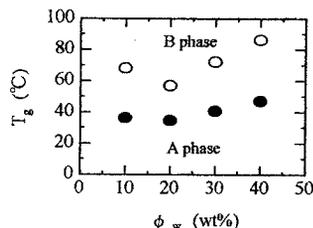


Fig.1. The  $T_g$  vs.  $\phi_w$  plot for and B phases of P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>)/at-PMMA blend.

キーワード : 相溶性、ガラス転移、NMR交差緩和、自由体積理論、Flory-Huggins理論

著者 : つむらけんじ、いしいふみあき、つつみあきひろ、おおひがしひろじ

それぞれ  $\Delta\alpha = 4.8 \times 10^{-4} (\text{deg}^{-1})$ ,  $(\partial P / \partial T)_V = 4.6 \times 10^7 (\text{dyn/cm}^2 \cdot \text{deg})$  である。相分離した A 相と B 相の体積分率をそれぞれ  $\Phi_A$ ,  $\Phi_B$  とし、A 相と B 相における共重合体の体積分率をそれぞれ  $\Phi_{1A}$ ,  $\Phi_{1B}$  とすると、共重合体の体積分率  $\Phi_1$  は、

$$\Phi_1 = \Phi_{1A} \Phi_A + \Phi_{1B} \Phi_B \quad (2)$$

で表される。各相の実測の  $\Delta C_p$  と  $T_g$  及び ① と ② から、 $\Phi_{1A} \doteq 0.7$ ,  $\Phi_{1B} \doteq 0.4$  となる。これは A 相が共重合体-rich 相で、B 相は at-PMMA-rich を意味している。また、ブレンドの  $T_g$  は各相では各ポリマーがよく相溶しているので、

$$T_g = T_{g,1} + (T_{g,2} - T_{g,1}) \Phi_2 + k \Phi_2 (1 - \Phi_2) / \alpha \quad (3)$$

で表される。ここで  $k$  は経験的ブレンド特性定数である。

Fig. 3. は回転系プロトンスピン-格子緩和時間  $T_{1\rho}^H$  と温度の関係である。 $1/T = 2.8 \sim 3.2$  と  $2.8 \sim 2.5$  の温度域に 2 つの極小化  $\alpha_A$  過程と  $\alpha_B$  過程が起きている。Fig. 1. の A と B 相の各  $T_g$  と比較すると、 $\alpha_A$  と  $\alpha_B$  過程は相分離した 2 相のガラス転移に伴う、主鎖のマイクロブラウン運動に基因しているといえる。一般に回転系において Hartmann-Ham 条件下で  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  交差分極緩和の  $T_{1\rho}^H$  は、

$$1/T_{1\rho}^H = M_2^{HH} \tau_c / (1 + 4 \omega_1^2 \tau_c^2) \quad (4)$$

で表される。ここで、 $M_2$  は同種核 NMR2 次能率、 $\omega_1$  は  $T_{1\rho}$  の緩和周波数、 $\tau_c$  は局所場相関時間である。 $\omega_1 \tau_c = 1/2$  のとき  $T_{1\rho}$  は極小となり、相関時間は  $T > T_g$  域でセグメントの換算自由体積分率  $f$  を用い、

$$\tau_c = \tau_{\infty} \exp(1/f) \quad (5)$$

と表される。 $(T_{1\rho}^H)_{\min}$  は、

$$(1/T_{1\rho}^H)_{\min} = 1/2 M_2 \tau_{\infty} \exp(1/f) \quad (6)$$

となる。ここで、 $f(T) (T > T_g)$  の温度依存性は  $T_g$  とその換算体積分率  $f_g$  を用い、

$$f(T) = f_g + \alpha (T - T_g) \quad (\alpha, f_g: \text{一定}) \quad (7)$$

で表される。

③ と ⑦ を用いると、fig. 2. の  $T_{1\rho}$  vs.  $\Phi_w$  の最適化からも  $T_g$  と同様に  $k$  を評価できる。ブレンドの混合自由エネルギー変化  $\Delta G_{\text{mix}}$  は Flory-Huggins 理論より

$$\Delta G_{\text{mix}} / RT = V/V_r (\Phi_1 \ln \Phi_1 / m_1 + \Phi_2 \ln \Phi_2 / m_2 + \chi_{12} \Phi_1 \Phi_2) \quad (9)$$

と表わされる。ここで、 $V$  は混合系の体積、 $V_r$  はセグメントのモル体積、 $\Phi_i$  は  $i$  ポリマーの体積分率、 $m_i$  は  $V_r$  を単位としてみた  $i$  ポリマーの重合度、 $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度、 $\chi_{12}$  は相互作用パラメーターである。一方、仮にガラス転移を Ehrenfast の 2 次相転移とし、Flory-Huggins 理論を用いると、

$$T_g = \Phi_1 T_{g1} + \Phi_2 T_{g2} + \{ \chi R (T_{g1} - T_{g2}) / M_2 \Delta C_{p2} \} \Phi_1 \Phi_2 \quad (10)$$

となる。ここで、 $M_2$  と  $\Delta C_p$  はそれぞれ at-PMMA の分子量とガラス転移に伴う比熱変化である。 $\chi_{12}$  と  $k$  の関係が ③ と ⑩ より求まり、 $\chi_{12}$  は、

$$\chi_{12} = k M_2 \Delta C_p / R (T_{g2} - T_{g1}) \quad (11)$$

となる。⑪ を用い実測値から求めた A と B 相のそれぞれの  $\chi_{12}$  と  $\Phi_w$  の関係を Fig. 4. に示している。 $T_{\text{ann}} = 135^\circ\text{C}$  で 12 時間熱処理したブレンドは P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>)-rich 相と at-PMMA-rich 相の  $\chi_A$  と  $\chi_B$  の値は全て負となり、各相は両ポリマーがよく相溶しており、特に  $\Phi_w = 20\text{wt}\%$  が最も相溶状態がよいことが判った。

$\chi_{12}$  と  $k$  に対する Ehrenfast の 2 次相転移の適用や  $\Phi_w > 50\text{wt}\%$  以上での相溶した無定形 A 相と B 相との関係について現在検討している。

#### References

- 1) Y. Wen and H. Ohigashi, Polymer Preprints, Japan vol. 44, 3423. (1995)
- 2) Okano, K. Polymer Physics. Japan, 7, 89 (1964)
- 3) S. Akiyama, Bulletin of the Chemical Society of Japan, vol. 45, 1381 (1972).

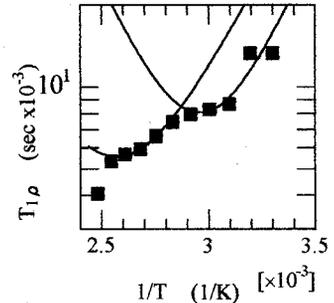


Fig. 3.  $T_{1\rho}^H$  vs.  $1/T$  plot for P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>)/at-PMMA

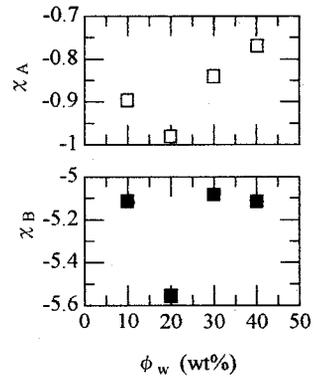


Fig. 4.  $\chi$  vs.  $\Phi_w$  plot for A and B phases of P(VDF<sub>73</sub>/TrFE<sub>27</sub>)/at-PMMA blend

## ポリブチレン-2,6-ナフタレートの結晶構造と分子運動

(群馬大・工) 田辺豪、上原宏樹、○山延健、甲本忠史

## Structure and Molecular Mobility of Poly(butylene-2,6-naphthalate)

Suguru TANABE, Hiroki UEHARA, Takeshi YAMANOBE, Tadashi KOMOTO

Department of Chemistry, Gunma University, 1-5-1, Tenjin-cho, Kiryu, Gunma  
376-8515, Tel0277-30-1331, Fax0277-30-1333, e-mail yamanobe@cc.gunma-u.ac.jp

Solid state NMR measurements were carried out for poly(butylene-2,6-naphthalate) in order to investigate the transition mechanism between A and B forms. The amount of produced B form increased with drawing temperature. From  $^1\text{H}$  pulse NMR, second(soft) component of  $T_2$  appeared above  $T_g$ . Further, above  $100^\circ\text{C}$  where transition to B form increases, the amount of soft component increases drastically. The transition mechanism and molecular mobility were discussed.

## 1. 緒言

ポリブチレン-2,6-ナフタレート(PBN)にはA型及びB型結晶構造が存在する。PBNは通常安定であるA型構造をとるが、応力を加えることでB型構造が形成される。これまで、PBNの延伸による構造変化については延伸倍率の増加に伴いB型が多く生成することがわかっている。また延伸温度については $180^\circ\text{C}$ 延伸で最もB型が多く生成し、それ以上、それ以下ではB型の生成は減少することがわかっている。このことは各温度での分子運動と構造変化に関連があることを意味している。

本研究では、フィルム試料における延伸比、延伸温度依存性及びペレット試料における圧力依存性について $^{13}\text{C}$ NMR、 $^1\text{H}$ パルスNMRを用いB型構造の生成と分子運動との関連を検討した。

## 2. 実験

試料は延伸用としてPBN 0.5mm厚無配向フィルムを用い、そのフィルムより切り出した短冊型試験片を所定の温度で延伸を行い延伸試料を作成した。圧縮試料として半径1.6mm、高さ3.5mmの円柱型ペレットを用い、所定の温度、圧力で圧縮することにより作成した。作成した試料を延伸試料においてはJEOL社製EX270W分光計、圧縮試料においてはBRUKER社製DSX300分光計を用いて $^{13}\text{C}$ NMR測定を行った。また、緩和時間測定として無配向フィルムを試料とし、JEOL社製JNM-MU25分光計を用い、solid-echo法にて温度可変 $^1\text{H}$ パルスNMR測定を行った。

Poly(butylene-2,6-naphthalate). Crystal Structure. Molecular Mobility.

たなべすぐる、うえはらひろき、やまのべたけし、こうもとただし

### 3. 結果と考察

図1は、カルボニル炭素の各延伸温度での延伸試料の $^{13}\text{C}$ NMRスペクトルである。延伸温度が上昇するにしたがって高磁場シフトしていることがわかる。165.5ppm 付近のピークがA型構造、164ppm 付近のピークがB型構造のピークに対応している。延伸温度上昇に伴いB型構造が多く形成されることがわかる。ガラス転移温度以下の延伸ではA、B型以外に第3成分が167ppm 付近にピークが確認された。

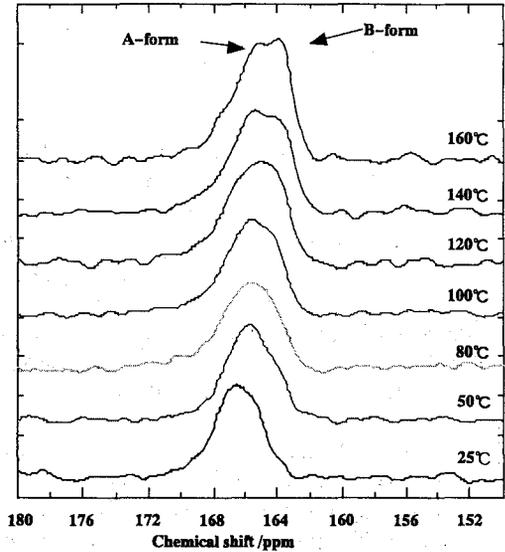


Fig1.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of samples drawn at various temperature

延伸試料作成過程において低温領域での延伸では最大延伸比が低くネッキング現象が確認され、逆に高温領域での延伸では最大延伸比が高く明確な降伏点を示さないことが確認された。(a)

これより低温延伸では降伏点以降にA型からB型へ転移が始まるのに対し、高温延伸では応力が加えられた時点で転移すると考えられる。これは温度上昇によって分子鎖が動きやすくなったためと考えられる。図2(a)に、温度可変 $^1\text{H}$ パルスNMR測定より得られた $T_2$ の温度依存性を示した。ガラス転移温度(48°C)以下では $T_2$ が約25 $\mu\text{sec}$ の硬い成分1だけであった。ガラス転移温度以上ではそれに加えて運動性が高い $T_2$ が約55 $\mu\text{sec}$ の成分2が確認された。図2(b)は、成分1と成分2の割合をプロットしたものである。温度上昇を伴い成分2の割合が増加していることより、温度の上昇により結晶全体の運動性が高まっていることがわかった。さらに100°C付近から著しく成分2の割合が増加している。つまり、B型生成量の増加は分子運動が活発になることと関連していることがわかる。具体的には運動の詳細について議論する予定である。

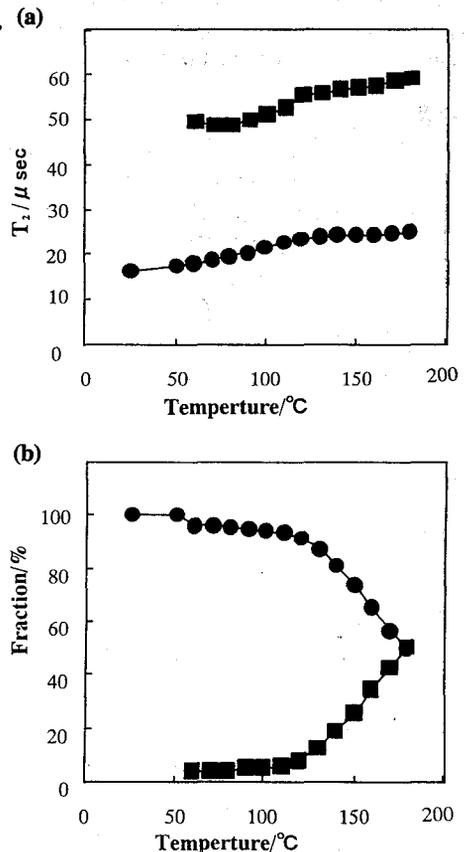


Fig2. (a) Temperature dependence of  $^1\text{H}$   $T_2$   
(b) Temperature dependence of composition for  $^1\text{H}$   $T_2$  components

メチレン鎖を有する脂肪族ポリエステル系共重合体の  
固体NMR法によるキャラクタリゼーション(理研・高分子化学<sup>1</sup>、理研・物質基盤<sup>2</sup>、東工大院・総合理工<sup>3</sup>)○桑原 和弘<sup>1</sup>、仲村 高志<sup>2</sup>、阿部 英喜<sup>1</sup>、土肥 義治<sup>1,3</sup>Solid-State NMR Characterization for the Aliphatic Polyester Type Materials  
Containing Methylene Chains<sup>1</sup>Polymer Chemistry Laboratory, RIKEN Institute, <sup>2</sup>Characterization Center, RIKEN Institute,  
<sup>3</sup>Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology)  
Kazuhiro Kuwabara<sup>1</sup>, Takashi Nakakura<sup>2</sup>, Hideki Abe<sup>1</sup>, and Yoshiharu Doi<sup>1,3</sup>

Solid-state NMR analyses have been performed for poly(butylene succinate) and poly[(butylene adipate)-*co*-(butylene terephthalate)] random copolymer samples. <sup>13</sup>C spin-lattice relaxation times ( $T_{1CS}$ ), <sup>13</sup>C spin-spin relaxation behavior, <sup>1</sup>H spin-lattice relaxation times in the rotating frame ( $T_{1\rho HS}$ ), <sup>13</sup>C chemical shifts, and <sup>13</sup>C NMR line width have been measured. For the poly(butylene succinate) sample, compared to the case of polyethylene, molecular mobility along the chain axis in the crystalline region was remarkably restricted and the molecular arrangement in the solid noncrystalline region was conformationally more random. As for the poly[(butylene adipate)-*co*-(butylene terephthalate)] random copolymer sample, molecular mobility of each CH<sub>2</sub> carbon has been evaluated for the purpose of clarifying the mechanical property.

## 1. 緒言

近年の地球環境問題への関心の高まりの中で、生分解性脂肪族ポリエステル材料の超延伸に向けた研究が活発に行われている。ポリ(3-ヒドロキシブチレート)およびポリ乳酸等に対して約20倍までの延伸倍率が現在のところ得られているが、150倍以上の延伸倍率を再現性良く得ることに成功している超高分子量ポリエチレンと比較すると、今後の発展の余地がある。材料設計を行う上で、結晶および非晶両領域のとりやすい分子レベルでの構造と、典型的に起こっている分子運動を明らかにし、ポリエチレンの場合と比較することは重要である。脂肪族ポリエステルの分子特性を明らかにする上でNMR法の有用性はよく知られており、今後さらに、1)メチレン鎖を有することによりポリエチレンとの比較が容易で、2)力学物性と加工性の点でポリエチレンと同等の性質を意図した、試料に適用することにより興味深い情報が得られることが期待される。本研究では、以上の観点より固体<sup>13</sup>C NMR法による解析を行った。

## 2. 実験

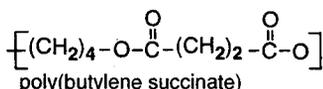
ポリブチレンサクシネート(図1)の室温における解析には、熔融状態の後、90℃で等温結晶化したフィルム試料を実験に用いた。本試料のガラス転移温度は-30℃、融点は113℃、結晶厚は約4nm、結晶構造は $\alpha$ 型の単斜晶、結晶化度は約40%である。

ポリ(ブチレンアジペート-ブチレンテレフタレート)ランダム共重合体(図1)として、BASF製のEcoflex®のペレットを用いた。X線およびAFMを用いたモルホロジーの解析は現在進行中である。

キーワード：固体NMR、ポリ(ブチレンアジペート-ブチレンテレフタレート)共重合体、結晶、分子運動、コンホメーション

くわばら かずひろ、なかむら たかし、あべ ひでき、どい よしはる

固体  $^{13}\text{C}$  NMR 測定は、Chemagnetics Infinity-400分光計により9.4 Tの静磁場下で行った。



### 3. 結果

室温におけるポリブチレンサクシネートの結晶成分に対して  $^{13}\text{C}$  スピナー格子緩和時間 ( $T_{1C}$ ) の測定を行い、その分子運動性は、80~100 °Cにおけるポリエチレンの分子運動性に匹敵することを明らかにした。一方、ポリエチレンにおいて知られているような、結晶中の分子鎖が分子鎖方向に移動する鎖拡散は、起こりにくいことも分かった。

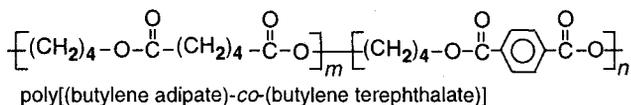
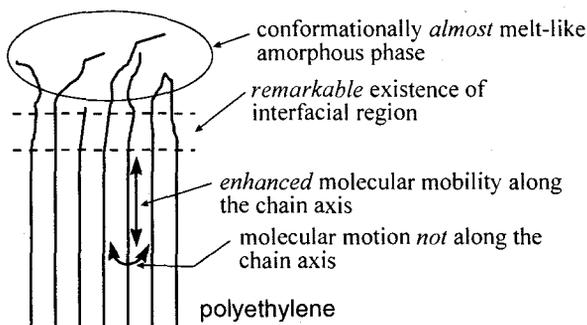


Fig. 1. Chemical structures of poly(butylene succinate) and poly[(butylene adipate)-co-(butylene terephthalate)].

ポリブチレンサクシネートに対して  $^{13}\text{C}$  スピナー スピン緩和時間 ( $T_{2C}$ ) の解析を行った結果、室温における非晶領域の大部分は、 $T_{2C}$  がミリ秒のオーダーの分子運動性の高い成分のみからなることを明らかにした。室温におけるポリエチレンの非晶においては、比較的分子運動性の低い  $T_{2C}$  が数十マイクロ秒のオーダーの、結晶と無定形の間にある界面成分も存在する。ポリブチレンサクシネートの非晶領域の場合は、結晶と無定形の間にある界面領域の分子運動性はゴム状無定形成分と同等であると言える。

ポリブチレンサクシネートに対して、室温から熔融状態に至る固体高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルの形状および  $T_{1C}$  の解析を行った。その結果、熔融状態と固体における非晶状態との分子運動性は顕著に異なるものの、コンホメーションに関しては大きな違いが認められなかった。

ポリ(ブチレンアジペート-ブチレンテレフタレート) ランダム共重合体に対して、 $T_{1C}$  および回転系の  $^1\text{H}$  スピナー格子緩和時間 ( $T_{1\rho\text{H}}$ ) に基づいた分子運動性の評価を行った。その結果、ゴム状のメチレン鎖ユニットと剛直なベンゼン環ユニットから構成される一つとも見なせ得る相が、あたかも結晶相とゴム状非晶相から形成されるポリエチレンと、同じ性質を引き出していることが分かった。



### 4. 考察

ポリブチレンサクシネートに対して得られた結果を、比較となるポリエチレンの場合とともに図2にまとめた。結晶領域の分子運動性はポリエチレンより大きいものの、分子鎖方向への移動に限っては起こりにくい。固体の非晶における室温でのコンホメーションは、ポリエチレンでは熔融状態と明らかに異なるのに対し、ポリブチレンサクシネートでは熔融状態により近い。

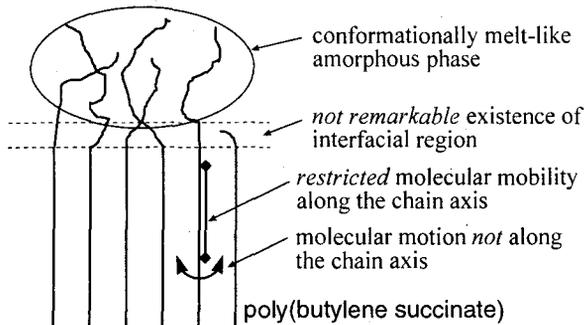


Fig. 2. Molecular-level structures and molecular motions in the crystalline and noncrystalline phases.

[1-<sup>13</sup>C]Val および Pro 標識バクテリオロドプシンのシッフ塩基の荷電と構造の相関

(姫路工業大学理学部生命科学科)

○吉良敦史、谷生道一、辻 暁、斉藤肇

The effect of the charge of Schiff base on conformation and dynamics of [1-<sup>13</sup>C]Val and Pro-labeled bacteriorhodopsin as studied by <sup>13</sup>C NMR

*Department of Life Science, Himeji Institute of Technology*

○Atsushi Kira, Michikazu Tanio, Satoru Tuzi and Hazime Saito

We have examined the effect of the charge of the Schiff base(SB) on conformation and dynamics of bacteriorhodopsin (bR). Replacement of Asp 85 by Asn in bR decreases pKa of SB from 12 of wild type to 8.5. Conformational changes of [1-<sup>13</sup>C]Val or Pro labeled D85N were followed by recording <sup>13</sup>C NMR spectra. It turned out that <sup>13</sup>C signal of Val 49 in helix-B is suppressed when Schiff base is deprotonated due to acquisition of the motional freedom with the correlation time in the order of 10<sup>-4</sup> s. In contrast, <sup>13</sup>C NMR signal of Pro 50, insensitive to pH variation, indicates that conformation of Pro 50 is not affected by the deprotonation of SB. These results suggest that deprotonation of SB makes cytoplasmic region above Val 49 in helix-B flexible. The replacement of Asp 85 by Asn is found to induce conformational change of Val 179 or 187 in helix-F. This suggests that the charge of Asp 85 contribute to the conformation of helix-F.

《序》

バクテリオロドプシン(bR)は高度好塩菌の紫膜に存在する膜タンパク質で、光駆動プロトンポンプ活性を有する。bR は発色団である retinal が Lys 216 とシッフ塩基(SB)結合を形成しており、プロトン輸送反応は、SB から Asp 85 にプロトン移動することから開始する。この状態(M中間体)においてはSB, Asp 85 の荷電が消失しており、これまでの研究から F-helix のキックを始めとした大きな構造変化が誘起される事が知られている。Asp 85 を Asn に変異させると SB の pKa が約 8.5 まで低下することから、中性付近で SB のプロトン化状態をコントロールできる。この条件において D85N における SB プロトン化状態に依存する立体構造変化を、[1-<sup>13</sup>C]Val または Pro 標識 bR の固体高分解能 <sup>13</sup>C NMR<sup>(1)</sup>によって得た。

《実験》

[1-<sup>13</sup>C]Val または Pro を含んだ完全合成培地で野生株(WT), 各変異株を培養し、これを精製することで標識 bR を得た。NMR 測定試料は、pH 滴定時には広域混合 buffer(5 mM MES/HEPES

キーワード: 固体 NMR、膜タンパク質、バクテリオロドプシン、シッフ塩基

○きら あつし、たにお みちかず、つじ さとる、さいとう はじめ

/CHES/TAPS/CAPS, pH 6-11, 10 mM NaCl, 0.025 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ )に、中性での測定時は 5 mM HEPES(pH 7.0) 10 mM NaCl, 0.025 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ の緩衝液に懸濁し用いた。

Chemagnetics 社製 CMX400 NMR 分光器( $^{13}\text{C}$ の共鳴周波数: 100.6 MHz)で NMR 測定を行った。測定は 20 °C、遮光状態で測定し、測定方法は CP-MAS(交差分極マジック角回転)法と TOSS 法を併用した。

### 《結果と考察》

[ $^{13}\text{C}$ ]Val-V179M および V187L の NMR 測定から、F-helix 内のこの 2 残基は WT で 174.62 ppm に信号を与えることがわかった。このピークは、D85N(fig.1)の場合 174.98 ppm にシフトし、Asp 85 の荷電の消失が F-helix の構造変化を誘起する事がわかった。

[ $^{13}\text{C}$ ]Val-WT<sup>(2)</sup>の pH 滴定実験では 174.62 ppm 付近の信号が pH 上昇に伴って減少している以外は変化が見られなかったが、[ $^{13}\text{C}$ ]Val-D85N(Fig.1)では pH に対して線形全体が大きな変化を示した。一方、[ $^{13}\text{C}$ ]Val-D85N/V49A の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルでは 172.04 ppm の信号が消滅し、D85N の pH 8 以上でみられる高磁場側の信号(171.88 ppm)は Val 49 には由来しないことがわかった。このことから、D85N では pH 上昇とともに Val 49 には  $10^4$  Hz の揺らぎが生じ、信号が消失することがわかった。そこで、B-helix に関するより詳細な情報を得るために[ $^{13}\text{C}$ ]Pro-D85N の pH 滴定実験を行った。Val 49 に隣接する Pro 50 の化学シフト値<sup>(3)</sup>は、WT から D85N への変異によっては変化した、pH に対してはシフトおよび強度変化を示さなかった。したがって、Val 49 は SB との間に相互作用を持ち、SB の荷電の消失は Pro 50 による  $\alpha$ -helix のキック部位を境として細胞質側の運動性の上昇を引き起こすことがわかった。このことは実際の bR 光サイクルにおいても SB 脱プロトン化による helix-B の細胞質側の運動性が上昇し、タンパク中心部をより親水的な環境に変化させ、プロトン輸送において大きな寄与を持つことを示唆している。

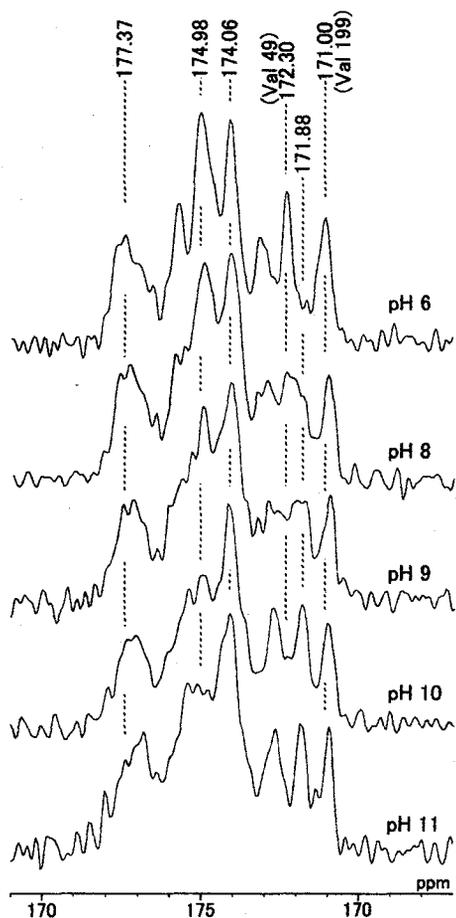


Fig.1  
 $^{13}\text{C}$  CP-MAS spectra of  
[ $^{13}\text{C}$ ]Val-D85N at pH 6 to 11.

### Reference

- [1] H.Saito, et al. (2000) *Biochem. Biophys. Acta*, **1460**, 39-48
- [2] Y.Kawase, et al (2000) *Biochemistry*, **39**, 14472-14480
- [3] 辻ら, 第 40 回 NMR 討論会講演要旨集(1L4)

**$^{13}\text{C}$ 標識バクテリオロドプシンのシッフ塩基周囲の電荷による構造の揺らぎ**

(姫路工大・理) ○谷生道一、宮田和彦、辻 暁、斉藤 肇

**Conformational fluctuation in  $^{13}\text{C}$  labeled bacteriorhodopsin induced by charged groups around the Schiff base***Department of Life Science, Himeji Institute of Technology*

○Michikazu Tanio, Kazuhiko Miyata, Satoru Tuzi and Hazime Saitō

**The electric charges in protein play crucial roles for the activity. We have recorded  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]Ala, [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Ala- and [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Val-labeled bacteriorhodopsin and its mutants by solid-state NMR methods, to investigate charge-induced fluctuational changes in bacteriorhodopsin (bR). We found that the charge at Asp85, but not Asp212, affects conformational fluctuation of bR, because changes of NMR signal intensities in D85N, but not in D212N, were observed. From these findings, it was suggested that modification of electric interaction between Asp85 and the Schiff base induces conformational fluctuation, which may induce effective proton transfer.**

【序論】 高度好塩菌 *H. salinarum* の紫膜に存在するバクテリオロドプシン (bR) は、光駆動プロトンポンプとして働く膜蛋白質である。bRは、248残基のアミノ酸から構成されており、タンパク質中心部に位置するLys216に発色団であるレチナルがシッフ塩基結合している。bRのプロトン輸送には、蛋白質中心部に位置する荷電性残基、Asp85、Asp212、Arg82およびシッフ塩基 (SB) が重要な働きをしている。これまでの本研究室の [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]Ala標識および [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Val標識bRの研究によって、SB、Asp85およびArg82の荷電状態の変化は、bRの高次構造と揺らぎに影響することが明らかになってきた[1-3]。今回は、SB近傍の残りの荷電性残基であり、Asp85とSBに対してほぼ対称な位置にあるAsp212のbR高次構造と揺らぎへの影響を固体高分解能 $^{13}\text{C}$  NMRを用いて解析した。また、SB周囲の荷電性残基による蛋白質立体構造と揺らぎ変化の機構についても考察した。

## 【実験】

[ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]Ala、[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Alaおよび[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Val標識bRは、各標識アミノ酸を含む合成培地で高度好塩菌を培養し精製した。標識試料は、5 mM MES、10 mM NaCl、0.025% (w/v)  $\text{NaN}_3$  (pH 7) の緩衝液に懸濁し、NMR測定試料とした。100.6 MHz 固体高分解能 $^{13}\text{C}$  NMR測定は、交差分極マジック角回転法 (CP-MAS) と双極子デカップリングマジック角回転法 (DD-MAS) を用いた。測定条件は、MAS回転数; 2600 Hz ([ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]Ala標識試料) あるいは4000 Hz ([ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]AlaあるいはVal標識試料)、接触時間; 1 ms、取り込み時間; 50 ms、繰り返し時間; 4 s ([ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]AlaあるいはVal標識試料のDD-MAS測定では、6 s)、 $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$ の $\pi/2$ パルス; 5  $\mu\text{s}$ 、積算回数; 10000-30000回、測定温度は20  $^\circ\text{C}$ で遮光状態で行った。

---

固体高分解能 $^{13}\text{C}$  NMR、バクテリオロドプシン、膜蛋白質、揺らぎ、コンフォメーション変化

たにお みちかず、みやた かずひこ、つじ さとる、さいとう はじめ

【結果と考察】

Fig.1に[1-<sup>13</sup>C]Ala標識D85N (A) およびD212N (B) 変異株のCP-MASスペクトルを示す(点線は野生株; WT)。D85NではWTに比べ、176.5 ppm付近の膜貫通ヘリックス領域の信号強度が上昇していることが分かる

(Fig.1A)。これはAsp85の電荷の消失が、bRの膜貫通ヘリックスの揺らぎを上昇させ、MAS周波数(4 kHz)との干渉領域から抜けたことを表している。一方、D212NのNMRスペクトルは、WTとほぼ一致した(Fig.1B)。これは、分子内でほぼ同じ位置に存在するAsp85とAsp212のbRの運動性への寄与は異なることを示している(Fig. 2)。一方、[3-<sup>13</sup>C]Alaおよび[1-<sup>13</sup>C]Val標識試料の<sup>13</sup>C NMR信号の化学シフト値の変化から、Asp85とAsp212の電荷はbRの高次構造にも変化を与えることが分

かった。また中性でAsp85が約85%プロトン化していることが知られているR82Q変異株でも、その[1-<sup>13</sup>C]Ala標識試料の<sup>13</sup>C CP-MASスペクトルにおいて、膜貫通ヘリックス領域のNMR信号強度上昇が確認された。これらの結果は、SB周囲に存在する荷電性残基のうち、Asp212よりも、Asp85の電荷の方がbR高次構造と揺らぎに寄与していることを示している。Asp85とAsp212のこのようなbR分子の揺らぎへの影響の違いは、正電荷のSBとAsp212は、

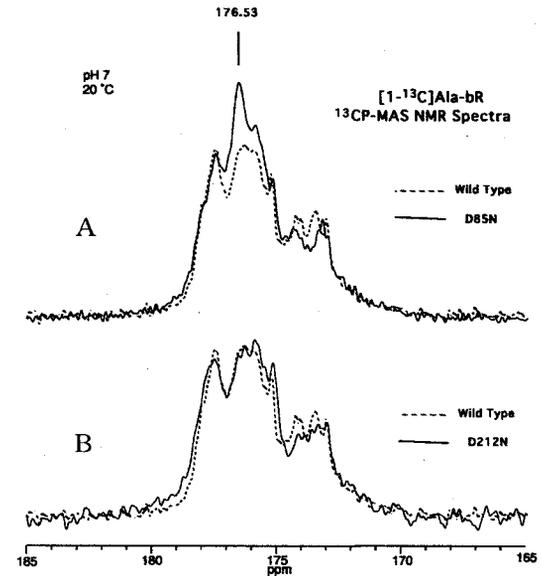


Fig. 1 <sup>13</sup>C CP-MAS NMR spectra of [1-<sup>13</sup>C]Ala-D85N (A) and D212N (B). The dotted spectra are for the wild type at pH 7 (20 °C).

同じGヘリックス上に存在するのに対し、Asp85とSBの相互作用の変化は、Asp85の存在するCヘリックスとSBの存在するGヘリックスの相互作用の変化を誘起するためであると考えられる

(Fig.2)。このような揺らぎの変化は、bRの効率よいプロトン輸送に関与しているかもしれない。

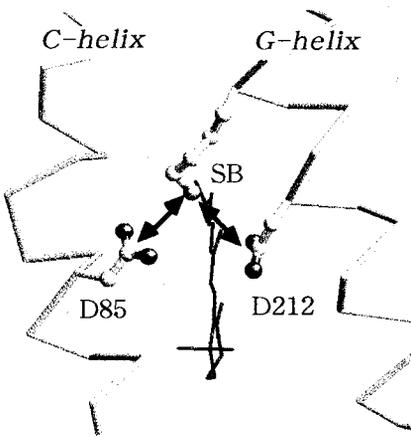


Fig. 2 Locations of Asp85, Asp212, and SB in bR (Luecke et al., (1999) J. Mol. Biol., 291, 899-911.).

References

- [1] Tanio et al., *Biophys. J.* 77 (1999) 431-442.
- [2] Tanio et al., *Biophys. J.* 77 (1999) 1577-1584.
- [3] Kawase et al., *Biochemistry* 39, (2000) 14472-14480.

## 固体<sup>13</sup>C NMRによるサーモトロピック液晶高分子PSHQ<sub>n</sub>の構造解析

(金沢大理<sup>1</sup>, The University of Akron<sup>2</sup>) ○水野元博<sup>1</sup>, 石川裕之<sup>1</sup>, 忍久保正治<sup>1</sup>, 遠藤一央<sup>1</sup>, Han Chang Dae<sup>2</sup>

### Structural Analysis of Thermotropic Liquid-Crystalline Polymers PSHQ<sub>n</sub> by using Solid-State <sup>13</sup>C NMR

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanazawa University, Kanazawa

<sup>2</sup>Department of Polymer Engineering, The University of Akron, Akron, Ohio 44325-0301

Motohiro Mizuno<sup>1</sup>, Masaharu Shinokubo<sup>1</sup>, Kazunaka Endo<sup>1</sup>, and Chang Dae Han<sup>2</sup>

The effect of flexible spacers on molecular structure of poly[(phenylsulfonyl)-*p*-phenylenealkylenebis(*p*-phenylenealkylenebis(4-oxybenzoate))]s (PSHQ<sub>n</sub>) having varying lengths (*n*) of methylene groups of flexible spacers and bulky pendent side groups was investigated using high-resolution solid-state <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. The separation of <sup>13</sup>C MAS spinning-sideband patterns was performed using TOSS-*t*<sub>1</sub>-deTOSS-*t*<sub>2</sub>- pulse sequence. The principal values of <sup>13</sup>C chemical shift tensor in each carbon site were estimated by the analysis of the site-selected MAS spinning-sideband patterns. We discuss the local structure of PSHQ<sub>n</sub> using these values.

【序】サーモトロピック液晶高分子 poly[(phenylsulfonyl)-*p*-phenylenealkylenebis(4-oxybenzoate))]s (PSHQ<sub>n</sub>; *n* = 4-12 はスペーサーの炭素数) は温度が上がるとガラス転移を起こし、ネマティック相を経て等方性液体になる。分子構造を Fig. 1 に示す。PSHQ<sub>n</sub> のガラス転移温度 (*T*<sub>g</sub>) とネマティック-等方液体転移温度 (*T*<sub>N</sub>) は *n* が大きくなるにつれて下がるとともに、*n* が偶数の PSHQ<sub>n</sub> は奇数の PSHQ<sub>n</sub> より転移温度が高くなるという偶奇性を示す。広角 X 線回折と熱分析 (DSC) の解析から構造に関して以下の 2 つの特徴が示されてきた。(1) *n* が奇数の PSHQ<sub>n</sub> はガラス性のネマティック相を示すのに対し、偶数の PSHQ<sub>n</sub> は結晶性のネマティック相を示す。(2) *n* が偶数の PSHQ<sub>n</sub> は *n* が減少するにつれて結晶性が増す。本研究ではこのようにスペーサーの長さや偶奇の違いによって大きく性質が異なる PSHQ<sub>n</sub> のローカル構造を固体高分解能 <sup>13</sup>C NMR を用いて解析することを試みた。

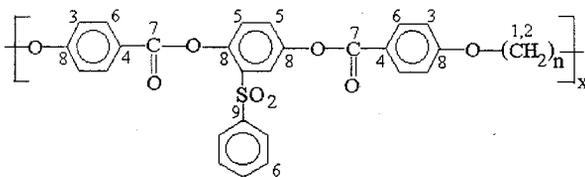


Fig.1 Molecular structure of PSHQ<sub>n</sub>

【実験】<sup>13</sup>C NMR の測定は CMX-300 を用い共鳴周波数 75.04 MHz で行った。一次元スペクトルの測定は CP/TOSS 法を用い MAS 速度 4 kHz で行った。<sup>13</sup>C の MAS スピニングサイドバンドパターンの分離には TOSS-*t*<sub>1</sub>-deTOSS-*t*<sub>2</sub>- パルス系列を用いてスペクトルを 2次元に展開することによって行った。このとき、MAS 速度は 1.8 kHz とした。

キーワード：サーモトロピック液晶高分子、ネマティック相、<sup>13</sup>C NMR、TOSS-*t*<sub>1</sub>-deTOSS パルスシーケンス

みずのもとひろ、いしかわひろゆき、しのくぼまさはる、えんどうかづな、Han Chang Dae

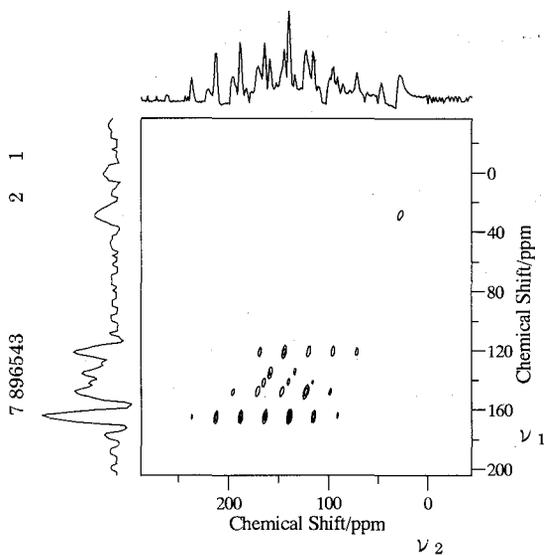


Fig.2  $^{13}\text{C}$  2D site-separated spinning sideband spectrum in PSHQ12 at room temperature.

【結果と考察】 Fig. 2 に室温で得られた PSHQ12 の 2 次元スピニングサイドバンドパターン分離スペクトルを示す。  $\nu_1$  軸への射影スペクトルはサイドバンドが消去された高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを示す。ピークに付けられた番号はスペクトルの帰属を表し、 Fig. 1 の炭素の番号に対応する。スペクトルの帰属にはデータベース及び分子軌道計算が用いられた。 Fig. 3 に C(7) と C(4) について測定されたスピニングサイドバンドパターンとそのシミュレーションを示す。中央ピーク(図中 \* 印) の強度以外は実測スペクトルをよく再現することができた。 Table 1 にシミュレーションで得られた化学シフトテンソルの主値及び平均値を示す。本研究では他の PSHQ $n$  についても同様の測定を行い、得られた  $^{13}\text{C}$  化学シフトテンソルの主値から PSHQ $n$  の構造が  $n$  によってどのように変化するかを考察した。

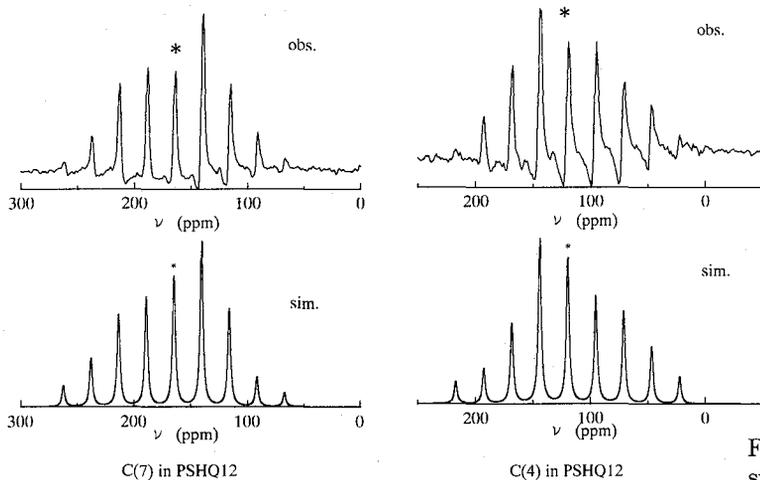


Fig.3 Site-selected spinning-sideband pattern

Table 1 Principal values of  $^{13}\text{C}$  chemical shift tensor.

Site	4	7
principal values of chemical shift tensor / ppm	$\delta_{zz}=196.6$ $\delta_{yy}=139.6$ $\delta_{xx}=22.6$	$\delta_{zz}=256.8$ $\delta_{yy}=123.8$ $\delta_{xx}=113.8$
isotropic chemical shift value / ppm	119.6	164.8

## 重水素 NMR による棒状高分子ゲルの研究

北大院工 ○武田寛之・平沖敏文・堤耀廣

Deuterium NMR Studies on Gel of Rigid-Rod Polymer

Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060-8628

Kanji Takeda, Toshifumi Hiraoki, and Akihiro Tsutsumi

Poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)(PBLG) in benzene forms a thermoreversible gel. Deuterium  $T_2$  of the solvent was measured to investigate the sol-gel transition and the dynamics of benzene.  $T_2$  of benzene decreases with the PBLG concentration in the gel state, showing the presence of the slow motional states of benzene. As increasing the temperature,  $T_2$  increases, rises steeply from 20 to 27°C due to the gel-to-sol transition, and approaches the solvent value. Decreasing the temperature,  $T_2$  decreases very sharply below 8°C, showing the sol-to-gel transition. The rotational correlation time and the activation energy of benzene in the gel show much less mobile than those of the free benzene, which indicates the hindered motions of PBLG.  $T_2$  decreases in two stages with time at lower temperatures, showing the two-step gelation.

**【目的】** poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)(PBLG)はベンゼン中で $\alpha$ -ヘリックス構造をとる剛直な棒状高分子である。この溶液は低温でPBLGの物理的な架橋によりゲルを形成し、温度可逆的なゾル-ゲル転移をおこす。この転移には溶媒が大きく関与していることが示唆されているが、溶媒に関する知見は明らかではない。本研究では、PBLG-ベンゼン溶液のベンゼン分子の緩和時間のPBLG濃度・温度依存性を測定し、溶媒の動力学とゾル-ゲル転移との関係を調べた。

**【試料・測定】** 試料はPBLGに10%重水素化ベンゼンを加え、高分子濃度1.0、3.3、4.0、5.3、7.2wt%のものを作成した。重水素NMR測定は、共鳴周波数41.36MHz、観測周波数帯域2000Hzで行った。スピンスピン緩和時間 $T_2$ をCPMG法で測定し、180°パルスの繰り返し時間は10msとした。いずれの試料でも重水素シグナルは一本のみ観測され、減衰信号は単一の指数関数でfittingすることができた。本研究で重水素NMRを用いたのは、重水素核は $I=1$ であり、四極子緩和のみを考慮に入ればよいので、解析が容易におこなえるためである。

poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)(PBLG)、ベンゼン、重水素NMR、ゾル-ゲル転移、 $T_2$

ただかんじ、ひらおきとしふみ、つつみあきひろ

**【結果・考察】** 5.3wt%試料の  $T_2$  の温度依存性を Fig.1 に示す。昇温時、20°C以下のゲル状態での  $T_2$  は溶媒のみの  $T_2$  より短く、遅い運動状態のベンゼン分子が存在することを示している。21~27°Cで  $T_2$  が急激に上昇し、高温領域で溶媒のみの  $T_2$  に近づく。この変化は DSC 測定で明らかになっているゲル-ゾル転移の温度範囲に一致しているので、溶媒の  $T_2$  はゾル-ゲル転移を反映していることがわかった。降温時、 $T_2$  は 8°C以下で急激に減少し、1°C付近でゲル状態の  $T_2$  と一致した。同様の結果が他の濃度でも観測された。

ゲル状態で、ベンゼン分子について free の状態と PBLG に bound している状態の 2 相モデルを考え、回転相関時間と活性化エネルギーを求めた。10°Cにおいて、bound した分子の相関時間は 80ps、活性化エネルギーは 41kJ/mol となった。free 状態の 2ps、

7kJ/mol と比べると、bound した溶媒分子の運動がかなり制限されていることがわかる。

ゾル状態から降温していき、ゾル化温度以下で温度を固定して、 $T_2$  の時間変化を調べた。5.3wt% 試料の  $T_2$  の時間依存性を Fig.2 に示す。6°Cから 3.6°Cでは時間経過につれて  $T_2$  は 2 段階で減少し、ゲル状態の  $T_2$  に近づく。この過程をアブラミの式で解析し、速度定数と指数を求めた (Fig.2 実線)。詳細は発表当日、他の試料での時間依存性と解析結果と合わせて報告する。

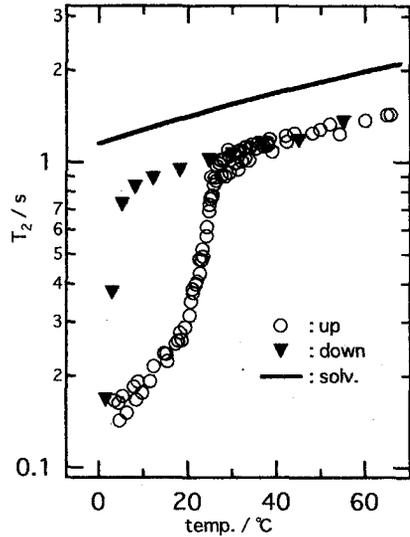


Fig.1 Temperature dependent  $T_2$  of benzene- $d_6$ .

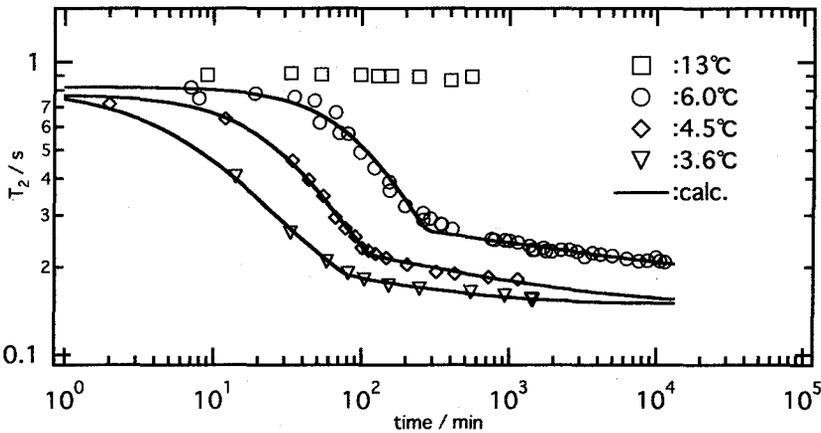


Fig.2 Time dependent  $T_2$  of gelation.

固体高分解能 NMR によるキトサン-高分子複合体の構造解析  
 (福井大・工) ○前田史郎, 飯田貴之, 中江一浩, 山下伸一郎,  
 大島孝友, 桜井謙資

High-Resolution Solid-State NMR Study on Chitosan/Polymer Complex  
 Shiro Maeda, Takayuki Iida, Kazuhiro Nakae, Shin-ichiro Yamashita,  
 Takatomo Ohshima, Kensuke Sakurai  
 Faculty of Engineering, Fukui University, Fukui, 910-8507, Japan

The inter-polymer interactions of chitosan/(carboxymethyl cellulose) (CS/CMC) and chitosan/poly(acrylic acid) (CS/PAA) complex were investigated by using  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  high-resolution solid-state (CP/MAS) NMR.  $^{15}\text{N}$  NMR spectra of both CS/CMC and CS/PAA showed a little signal at about 120ppm due to amide group and main signals were observed at about 34ppm, where the chemical shift range of  $\text{NH}^{3+}$ . From these results we concluded that the intermolecular polymer-polymer ion complex was formed.

【はじめに】 キトサン(CS)は酸性溶液に溶解するとポリカチオンになり, 金属, もしくはポリアニオンと複合体を形成することがよく知られている. また, 溶媒和したCS結晶は, 酸性CS溶液から形成されることが知られている.

この研究では,  $^{13}\text{C}$ 液体高分解能NMRと $^{13}\text{C}$ および $^{15}\text{N}$ 固体高分解能NMRを用いてCS/PAA(キトサン/ポリアクリル酸)<sup>1)</sup>とCS/CMC(キトサン/カルボキシメチルセルロース), 2つの高分子複合体の形成機構の解明を試みた.

【試料】 CS(片倉チッカリン, DAC=97%, DPn=5,500)は5%過ホウ酸ナトリウム水溶液で4時間混合することにより解重合した後, 濾過, 洗浄, そして1日間凍結乾燥した. 解重合したCSは粘度測定から, DPn=367である. PAA(Aldrich, Mw=2,000)とCMC-Na(和光純薬, DS=0.8, 粘度平均分子量: $1.06 \times 10^6$ )は精製せずに使用した.

CSとPAAは2%ギ酸水溶液(2wt%)にそれぞれ溶解すると, すぐに沈殿が起こる. 1日静置し, 集めた沈殿物を洗浄したのち, 1日間凍結乾燥した.

CS/CMCは2.0wt%/20%重ギ酸重水溶液で, 化学量論的に1:1になるよう調製し, 60~70°Cで8時間乾燥した.

【装置】 固体NMR測定にはChemagnetics CMX Infinity 300を用い,  $^{13}\text{C}$ はヘキサメチルベンゼンにおけるメチル炭素をTMSから17.35ppm,  $^{15}\text{N}$ はグリシンのシグナルを液体 $\text{NH}_3$ から32.5ppmとし, それぞれ外部基準とした. 溶液NMR測定にはJEOL LA-500を使用した.

固体高分解能NMR, CPMAS, 高分子複合体, キトサン

まえだ しろ, いいだ たかゆき, なかえ かずひろ, やました しんいちろう,  
 おおしま たかとも, さくらい けんすけ

【結果と考察】

CSおよびCS/PAAの<sup>13</sup>C CP/MASのスペクトルを、図1の(a)および(b)に示す。複合体中におけるCSのC<sub>1</sub>シグナルは高磁場側に8ppmシフトし、C<sub>3</sub>シグナルは3ppmシフトするので、C<sub>5</sub>とC<sub>3</sub>の重なっていたシグナルが分離した。次にCS/PAAの<sup>15</sup>N CP/MASスペクトルを図2に示す。CSのN由来のシグナルは低磁場側にシフトし、約33ppmに現れた。33ppm付近はNH<sub>3</sub><sup>+</sup>の化学シフト領域であるので、このことはアンモニウムイオンの構造を示唆する。したがって複合体は、CS-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>...OOC-PAAのようなイオンタイプのポリマー間相互作用によって形成されると考えられる。

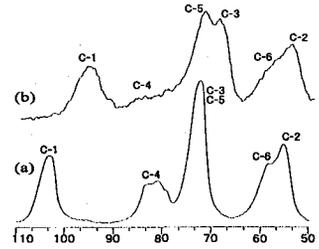


Fig.1 <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectra of chitosan and CS/PAA complex: (a) CS (b) CS/PAA

CS, CMC, CS/CMCの<sup>13</sup>C CP/MASスペクトルを図3に示す。CMCには180ppmにCOOH炭素のシグナルが現れている。一方、CS/CMCでは170ppmと180ppmに2本のシグナルが現れた。CS/ギ酸キャスト膜においては、C=Oのシグナルは170ppmに現れるが、これはCSのNH<sub>2</sub>基がギ酸によりホルミル化<sup>2)</sup>されたアミド基のC=Oのシグナルとフィルム中に残存するHCOO<sup>-</sup>イオンのC=Oのシグナルが170ppmに重なって現れたものである。一方、<sup>15</sup>Nスペクトルにはアミドのシグナルは小さく、34ppmに大きなシグナルが現れる。したがって、CS/CMCにおいてもCMCのC=Oのシグナルが180ppmに現れ、ホルミル化されたアミド基とHCOO<sup>-</sup>イオンのC=O炭素のシグナルが170ppmに重なって現れたと考えられる。

以上の結果から、CS/PAA, CS/CMCどちらの場合もCS-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>...OOC-polymerのようなポリマー間イオン複合体が形成されると考えられる。

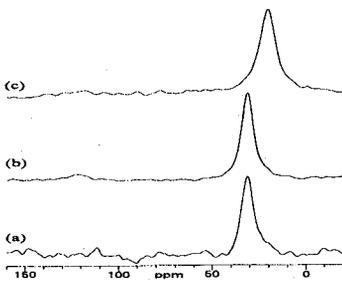


Fig.2 <sup>15</sup>N CP/MAS NMR spectra (a)chitosan (b)CMC (c)CS/CMC

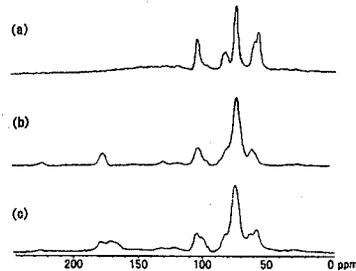


Fig.3 <sup>15</sup>N CP/MAS NMR spectra of chitosans and chitosan/poly(acrylic acid) complex: (a)CS/PAA; (b)chitosan cast film from 2% formic acid; (c)chitosan

【参考文献】

- 1) S. Maeda, T. Ohshima, and K. Sakurai, *Proc. XVIIIth Int. Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, 166(1998); K. Sakurai, T. Ohshima, and S. Maeda *Adv. Chitin Sci.*, 135-140(1998).
- 2) 桜井謙資, 前田史郎, 原謙吾, *キチン・キトサン研究*, 2(3), 197-204(1996).

固体 NMR 法による **Isotactic-Poly(1-Butene)** の動的構造解析  
産総研 ○三好利一、林繁信、海藤彰、京大院理 今城文雄

**Chain Dynamics and Conformation of Isotactic-Poly(1-Butene)  
Investigated by Solid-State NMR**

<sup>1</sup>National Institute Advanced Industrial Science and Technology

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

Toshikazu Miyoshi,<sup>1</sup> Shigenobu Hayashi,<sup>1</sup> Akira Kaito,<sup>1</sup> Fumio Imashiro<sup>2</sup>

High-resolution solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy and MM3 molecular mechanics calculations have been applied to investigate side-chain conformations, side- and main-chain dynamics of the form III polymorph of isotactic-poly(1-butene) (*i*-PB). The <sup>13</sup>C two-dimensional exchange NMR reveals that the 74 % polymer chains execute 90° helical jump motion with an activation energy of 79.3±5.6 kJ/mol, while the residual chains are immobile. The 90° helical jump motion is found to be still active below *T<sub>g</sub>*. With increasing temperature, motional mode changes from 90° helical jump motion to a more or less continuous rotation. It is suggested that the main-chain dynamics is affected by the dynamic disorder of the side chain.

<緒言> 近年、多次元固体 NMR 法の適用により、高分子の結晶、非晶相の高分子鎖のダイナミクスが明らかになりつつある。非晶相では異なる配座間の遷移や回転拡散がガラス転移温度以上で起きることが明らかになり、そのダイナミクスはガラス転移温度近傍では、WLF 関数により記述される。ポリエチレン<sup>1</sup>、ポリオキシメチレン<sup>2</sup>の結晶相では、分子鎖がフリップ運動やヘリックス運動を行い、運動の相関時間は Arrhenius 関数により記述されている。これらの分子運動の開始温度は、非晶相のガラス転移温度と結晶相の融点の間である。これらの事実より、非晶相の分子運動が間接的に結晶相の分子運動に影響を及ぼしていると推測されている。このことは、結晶内部の分子鎖運動がガラス転移より僅かに高い温度で開始する場合、その運動性がガラス転移温度近傍で急激に低下することを示唆する。しかし、ガラス転移温度近傍での結晶相の分子鎖運動を解析した例は皆無である。また、上記の結晶性高分子は融点まで、運動モードを変えないことがわかっている。

イソタクチックポリ (1-ブテン) は異なる条件下で配座やパッキング構造の異なる 4 種類の結晶形態を示す。III 型結晶の高分子鎖は orthorhombic 格子の中で 4<sub>1</sub>ヘリックス構造を形成する。<sup>3</sup>我々は固体 NMR 法を用いて III 型結晶内部の高分子鎖の分子運動を調

<keywords> isotactic poly(1-butene)、分子運動、コンフォメーション、相転移、結晶化

みよしとしかず、はやししげのぶ、かいとうあきら、いましろふみお

べ、側鎖を有する高分子の結晶内部における分子鎖運動が幅広い温度でどのように振舞うのかを検討した。

<結果、考察> 図 1 に III 型結晶の固体高分解能  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示す。低温にすると各原子団のシグナルが 2 本に分裂するのがわかる。この分裂は分子内の非等価な 2 サイトに由来する。つまり、室温で融合したシグナルは 2 サイトの交換を示す。この交換運動は  $90^\circ$ ヘリックスジャンプ運動によるものである。図 2 は二次元交換 NMR スペクトルである。測定とその解析により、272K では、III 型結晶内の高分子鎖は 2 成分からなり、75%の分子鎖が  $9.3\text{ s}^{-1}$  のジャンプ速度で  $90^\circ$ ヘリックスジャンプ運動を行い、残りの 25%は動かないことが明らかになった。さらに、ガラス転移近傍で  $90^\circ$ ヘリックスジャンプ運動のダイナミクスを検討した。その結果、ガラス転移温度以下でも、ヘリックスジャンプ運動が存在し、ジャンプ速度はアレニウス関数により記述されることが明らかになった。得られた活性化エネルギーは  $79.3 \pm 5.6\text{ kJ/mol}$  である。この結果は、結晶内部の分子鎖ダイナミクスがアモルファス鎖の影響を受けないことを初めて示した。当日は、側差のコンフォメーションとダイナミクス、さらに、側差のダイナミクスが  $90^\circ$ ヘリックスジャンプ運動に及ぼす影響についても発表する。

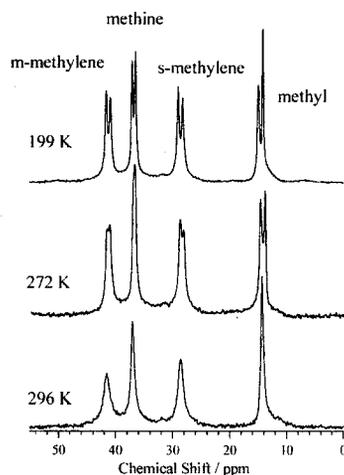


Figure 1.  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spectra of form III polymorph of *i*-PB.

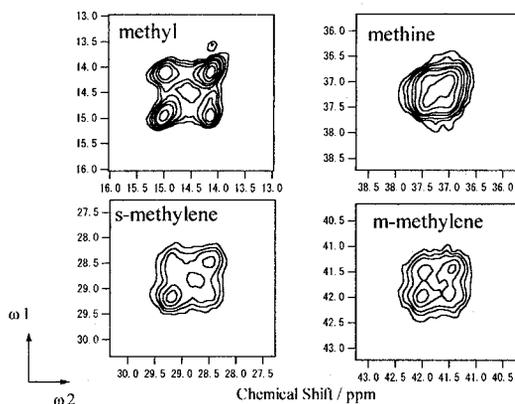


Figure 2  $^{13}\text{C}$  2D exchange NMR spectrum of form III polymorph of *i*-PB at 272 K. The mixing time is 300 ms.

<References>

1. Hu, G-W., et al. *Macromolecules*, **1999**, 32, 1611-1619.
2. Hagemeyer, A et al. *Adv. Magn. Reson.*, **1989**, 13, 85.
3. Cojazzi, G et al. *Macromol. Chem.*, **1976**, 177, 915-926.

**[1-<sup>13</sup>C]Val 標識バクテリオロドプシンにおける  
細胞質側表面構造の電荷による変調**  
(姫路工大・理) ○荒川 規、谷生道一、辻 暁、斉藤 肇

**Modulation of Cytoplasmic Surface Structure of Bacteriorhodopsin by Electric Charge  
as Studied by High-resolution Solid-state NMR**

Department of Life Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Tadashi Arakawa , Michikazu Tanio , Satoru Tuzi , Hazime Saito

We compared <sup>13</sup>C NMR Spectra of [1-<sup>13</sup>C]Val-labeled wild-type bacteriorhodopsin (bR) and mutant bRs containing replacements of Asp<sup>36</sup>, Asp<sup>38</sup>, Asp<sup>102</sup>, Asp<sup>104</sup>, Glu<sup>166</sup>, by means of Cross Polarization-Magic Angle Spinning (CP-MAS) and Dipolar Decoupled-Magic Angle Spinning (DD-MAS) techniques, in order to clarify the effect by electric charges on cytoplasmic surface dynamics. The absence of a negative charge at surface modified local conformation as well as backbone dynamics, as manifested from displacements or intensity change of peaks. These spectral variations are diminished by addition of 40 μM Mn<sup>2+</sup>, proving that conformational changes are from the surface domain. We discussed a relationship between this dynamic structure and proton transfer.

【はじめに】

高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の紫膜中に存在する光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン(bR)は、その構造から種々の受容体タンパク質のモデルとして考えることができる。これまでに、pH・温度・脂質組成・金属イオン濃度など様々な環境因子により形成される、C 末端部位や loop を含めた細胞質側表面領域の高次構造—細胞質側表面複合体—の存在を示してきた。また、bR の NMR 観測の際、Ala の C<sub>α</sub> や C=O 炭素を標識した場合、MAS 周波数(10<sup>4</sup>Hz)との干渉によって loop 由来の信号が消滅するのに対し、Pro や Val の C=O 炭素標識の場合、比較的多くの信号を分離観測できることがわかってきた。[1-<sup>13</sup>C]Val からの信号は 171.1ppm (V199)、172.0ppm(V49)、172.9ppm(V69)、174.6ppm (V179,V187) の帰属が得られている<sup>(1,2)</sup>。本研究では、細胞質側表面に存在する負電荷極性残基を置換したbR に[1-<sup>13</sup>C]Val 標識を行い、表面複合体の形成要素やその働きを解析するとともに、タンパク質の解析における固体高分解能 NMR の新たな知見を得ることを目的とした。

【試料調製】

高度好塩菌の野生株(WT; S-9)と変異株(D36N, D38N, D102N, D104N, D102N/D104N, E166G)を[1-<sup>13</sup>C]Val を含む合成培地で培養して同位体標識し、精製を行った。試料は 5mM HEPES(pH 7.0), 10mM NaCl, 0.025% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 緩衝液に懸濁した。また、同緩衝液で 1o.d.に懸濁したbRに対して 40 μM Mn<sup>2+</sup>を加えた試料も用意した。各試料は遠心沈降後、ペレットをそのまま NMR 管に導入した。測定中の水分の漏れを防ぐために、NMR 管キャップは接着剤で封じた。封入後遮光し、暗順応状態にした。

固体 NMR、バクテリオロドプシン、細胞質側表面電荷

あらかわ ただし、たにお みちかず、つじ さとる、さいとう はじめ

### 【測定】

測定は Chemagnetics CMX-infinity 400 NMR Spectrometer ( $^1\text{H}$ :400MHz)を用いて主に CP-MAS 法と TOSS を併用し、DD-MAS 法でも行った。測定温度:20°C, MAS 周波数:4KHz

### 【結果と考察】

図1に示すように、 $[1-^{13}\text{C}]$ Val 標識試料の CP-MAS スペクトルは、野生株(WT)との比較から、D102N/D104N では loop 領域に高次構造の変化によるシフトもしくは MAS 周波数と干渉領域から逃れて新たに出現した信号(171.5ppm,172.6ppm)が、E166G(図1C)では helix 領域に高次構造の変化による信号のシフト(174.6ppm)がそれぞれ観測された。他の mutant においても同様の変化を示す信号変化が見られた。

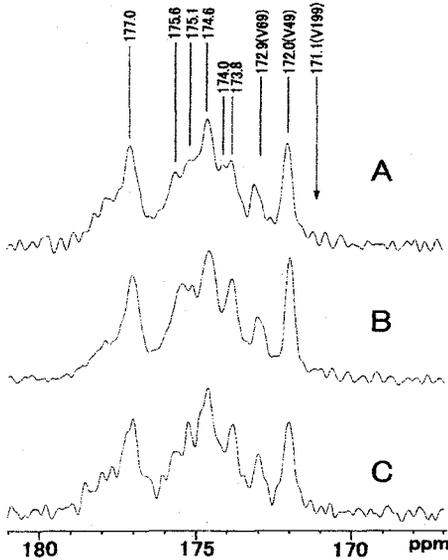


Fig.2

CP-MAS NMR spectra of  $[1-^{13}\text{C}]$ Val labeled bR with  $\text{Mn}^{2+}$  of wild type(A), D102N/D104N(B), E166G(C).

### 【参考文献】

- (1) H.Saito et al., (2000) BBA 1460, 39-48
- (2) A.Kira et al., (2001) NMR 討論会 40
- (3) Checover et al., (2001) Biochemistry 40, 4281-4292

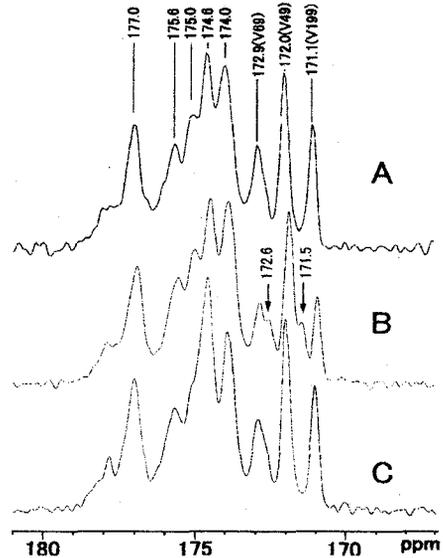


Fig.1

CP-MAS NMR spectra of  $[1-^{13}\text{C}]$ Val labeled bR of wild type(A), D102N/D104N(B), E166G(C).

$\text{Mn}^{2+}$ を添加した実験(図2)では、図1で見られたような信号変化が観測できなくなった。よって、その運動性や構造が変化した領域は  $\text{Mn}^{2+}$ の効果が得られる親水領域に近い表面部位であると考えられ、その Val 残基の候補としては V34(A-B loop)、V101(C-D loop)、V167(F-helix)が挙げられる。

これらのことから、電荷の有無が表面の構造および運動性を変化させていると考えられ、細胞質側複合体形成に電荷も寄与しているとわかった。表面電荷の消失はプロトンの取り込み効率を低下させることから<sup>(3)</sup>、この複合体が光サイクル中で重要な役割を果たすと示唆する。

$^{129}\text{Xe}$  NMR 法を用いたゴム状高分子の自由体積の解析  
 名古屋工業大学工学部○大野真希、鈴木智幸、吉水広明、辻田義治

An Investigation on Free Volume of Rubbery Polymers  
 using  $^{129}\text{Xe}$  NMR Spectroscopy

Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology  
Maki Ohno, Tomoyuki Suzuki, Hiroaki Yoshimizu, Yoshiharu Tsujita

In this study, to clarify the relation between  $^{129}\text{Xe}$  NMR chemical shift and free volume of rubbery polymers,  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra and Xe sorption isotherms were measured using acrylonitrile-butadiene copolymer rubbers(NBR) with various acrylonitrile(AN) content. The result of Xe sorption measurement revealed that the sorption isotherms of all samples obeyed Henry's law and as well as many other rubbery polymers. The sorption amount of Xe increased with decreasing AN content. It was suggested that  $^{129}\text{Xe}$  NMR chemical shift of the  $^{129}\text{Xe}$  in NBRs reflected the free volume of each sample, because a good correlation between  $^{129}\text{Xe}$  NMR chemical shift and density was obtained. These results can be said that the estimation of free volume of rubbery polymers is possible by using  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectroscopy.

《緒言》Xe は他の物質と相互作用しにくく、また大きな分極率を有するため、周りの環境を反映して幅広い NMR 化学シフトを示す。したがって  $^{129}\text{Xe}$  をプローブとして高分子に吸着させて NMR 測定を行い、その NMR シグナルを解析することにより高分子の様々な情報を得ることができる。本研究では、ゴム状高分子中に存在する  $^{129}\text{Xe}$  核の  $^{129}\text{Xe}$  NMR 化学シフト値とゴム状高分子が有する自由体積との関連性を  $^{129}\text{Xe}$  NMR 測定及び Xe 吸着測定から評価した。

《実験》測定には種々のアクリロニトリル(AN)含有率を持つアクリロニトリル-ブタジエン共重合体ゴム(NBR)を用いた。Xe 吸着測定は CAHN 社製精密電子天秤を用い、重量法により圧力範囲 0~760cmHg、測定温度 25°Cで行った。 $^{129}\text{Xe}$  NMR 測定は、まず各フィルムサンプルをテフロン製バルブのついた NMR 管(Wilmad 社製)に約 1g 充填した後、十分真空乾燥してから所定圧力に相当する Xe を導入して十分吸着平衡に達した後、測定に用いた。 $^{129}\text{Xe}$  NMR スペクトルは、日本電子(株)社製の GX400NMR 分光計を用い、25°Cにおいて観測周波数 110.5MHz にてシングルパルス法で測定した。 $^{129}\text{Xe}$  NMR 化学シフト値は同時に観測される気相  $^{129}\text{Xe}$  のピークを内

$^{129}\text{Xe}$  NMR 化学シフト値、ゴム状高分子、自由体積、吸着、アクリロニトリル-ブタジエン共重合体ゴム

おおのまき、すずきともゆき、よしみずひろあき、つじたよしはる

部基準として補正した。

《結果と考察》Xe 吸着測定を行った結果、いずれのサンプルもゴム状高分子に特徴的な Henry 型の吸着等温線を示した。各サンプルの Xe 吸着量は、AN 含有率の増加に伴い減少した。Xe は不活性ガスとみなしてよく他の物質と相互作用しにくいので、この Xe 吸着量の違いはサンプル中の自由体積の総量に起因すると考えられる。 $^{129}\text{Xe}$  NMR 測定を行った結果、いずれのサンプルも圧力の増加に伴いわずかながら低磁場シフトした。この低磁場シフトの原因として、サンプル中の Xe 密度の増加が挙げられる。一般に、 $^{129}\text{Xe}$  NMR 化学シフト値( $\delta$ )は $\delta = \delta(S) + \delta(E) + \delta(Xe)$ と表される。

ここで、 $\delta(S)$ は Xe 原子と空隙内壁との衝突による項であり、空隙が小さいほど大きくなる。 $\delta(E)$ は電場による分極あるいは Xe 原子からの電荷移動によって引き起こされる項であるが、通常の有機高分子ではこの項は無視してよいと考えられる。また、 $\delta(Xe)$ は Xe 原子同士の衝突による項であり、Xe 密度とともに線形的に増加する。ゴム状高分子において  $^{129}\text{Xe}$  NMR 化学シフト値は圧力とともに線形的に低磁場シフトするが、これは Xe 密度と圧力が線形関係にあるためである。 $^{129}\text{Xe}$  NMR 化学シフト値を Xe 吸着量  $C$  に対してプロットし(Figure 1)、 $C=0$  に外挿した。この値を  $\delta(S)$ 値と呼び、これは Xe 原子と分子鎖間隙との衝突に起因する。各サンプルの  $\delta(S)$ 値は AN 含有率の増加に伴い大きくなった。AN 含有率とともに各サンプルの密度は増加する。密度は空隙の量を表していると考えられ、密度が小さいほど空隙は多くなる。また、ゴム状高分子における空隙は自由体積に対応している。得られた各サンプルの  $\delta(S)$ 値を密度に対してプロットしたところ良い相関が見られた(Figure 2)。このことから、 $^{129}\text{Xe}$  NMR 法はゴム状高分子の自由体積を評価するための優れた手法の一つであることが示唆された。

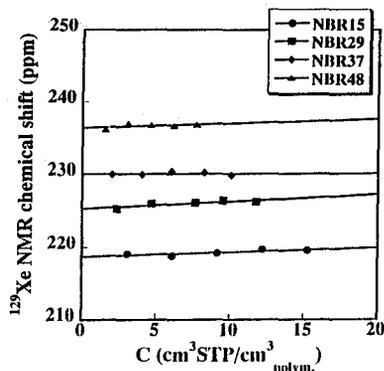


Figure 1 The plots of  $^{129}\text{Xe}$  NMR chemical shift vs. sorption amount of Xe for NBR at various temperature.

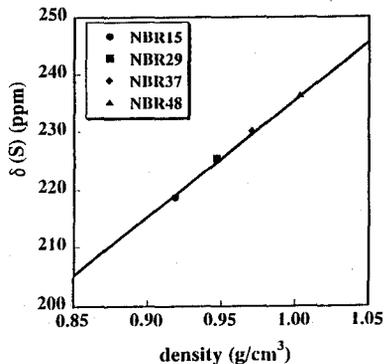


Figure 2 The plot of  $^{129}\text{Xe}$  NMR chemical shift  $\delta(s)$  vs. density.

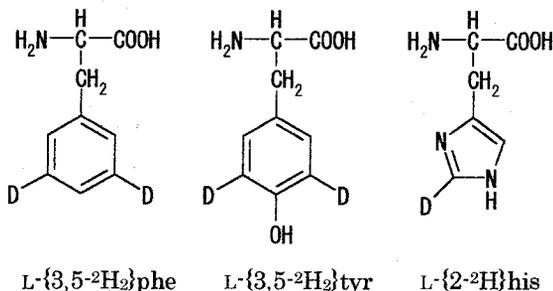
## 芳香族アミノ酸における芳香環のダイナミクス

(北大院工<sup>1</sup>・北大院薬<sup>2</sup>) ○久保健太<sup>1</sup>、平沖敏文<sup>1</sup>、濱田辰夫<sup>2</sup>、堤耀廣<sup>1</sup>Ring Dynamics of Amino Acids by solid-state <sup>2</sup>H-NMR<sup>1</sup>Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo<sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo.K. Kubo<sup>1</sup>, T. Hiraoki<sup>1</sup>, T. Hamada<sup>2</sup>, and A. Tsutsumi<sup>1</sup>

Dynamics of the aromatic rings of L-phe, L-tyr, and L-his selectively deuterated in solid state were characterized by <sup>2</sup>H-NMR. The spectra of L-{3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>}phe show the superposition of two components from phenyl rings performing fast and slow  $\pi$  flip motions about the C <sub>$\beta$</sub> -C <sub>$\gamma$</sub>  axis, and corresponding T<sub>1</sub> values are 10ms and 4s at 22°C, respectively. The spectrum of L-{3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>}tyr at 22°C shows a rigid lineshape with remarkably long T<sub>1</sub>. The spectrum of L-{2-<sup>2</sup>H}his shows a nearly rigid lineshape at 22°C, and a nearly rigid lineshape superposed on the inner singularities with the quadrupole splitting of 42kHz in the center of spectrum is observed at 60°C, suggesting the reorientation of the imidazole ring.

(はじめに)

芳香族アミノ酸のフェニルアラニン (L-phe)、チロシン (L-tyr)、ヒスチジン (L-his) の芳香環のダイナミクスは6員環、5員環の違い、水素結合、結晶状態によって異なり、その詳細は明らかではない。本研究ではL-phe、L-tyr、L-hisの芳香環のダイナミクスの違いを比較検討し、ダイナミクスと構造との相関を調べるために、それぞれの芳香環を選択的に重水素化し、固体重水素NMRにより測定した。



(実験)

芳香環の重水素化は既報に従って行った<sup>1,2</sup>。重水素化されたアミノ酸を再結晶して試料として用いた。(試料: L-{3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>}phe, L-{3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>}tyr, L-{2-<sup>2</sup>H}his) 測定は<sup>2</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR共にBRUKER DSX300を使用した。(共鳴周波数: 46.07MHz、75.48MHz)

(結果と考察)

L-{3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>}pheのスペクトルの温度依存性を示す(Fig.1)。quadrupole echoによるスペクトル(a)は昇温に伴い、外側の成分の強度が減少し、内側の成分の強度が増加した。また、22°Cから71°C付近までは±120kHz付近にrigid patternに特徴的な肩が観測された。これはphenyl環の

固体<sup>2</sup>H-NMR、アミノ酸、芳香環、フリップフロップ

くぼけんた、ひらおきとしふみ、はまだたつお、つつみあきひろ

$C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$  軸周りの  $\pi$  flip 運動に速い成分と遅い成分とが共存している事を示している。速い成分を検出するために saturation quadrupole echo により測定した(b)。昇温に伴い、その強度が増加した。2つのスペクトルの面積比から、速い phenyl 環の割合を求めた結果が Fig.2 である。22°Cの2つの成分の  $T_1$  は 10ms と 4s で、 $\pi$  flip 運動の jump rate はそれぞれ  $3 \times 10^7 \text{Hz}$ 、 $8 \times 10^4 \text{Hz}$  である。

L-{3,5- $^2\text{H}_2$ }tyr の 22°Cのスペクトルは rigid な線形を示し、著しく  $T_1$  が長いことが分かった。この試料の  $C^{13}$  CPMAS NMR スペクトルは鋭い線形を持ち、結晶性が良く、しかも分子間水素結合により、環が運動し難いと考えられる。

L-{2- $^2\text{H}$ }his の 22°Cのスペクトルは rigid な線形を示す。60°Cではスペクトルの中央部分に 42kHz の分裂幅を持つ成分が出現した。この成分はイミダゾール環が運動をしていることを示唆しているが、 $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$  軸周りの  $\pi$  flip 運動ではないことが計算スペクトルとの比較から分かった。L-{2- $^2\text{H}$ }his のイミダゾール環は 6 員環に比べて対称性が悪く、分子間水素結合により運動の制限を受けているので  $\pi$  flip 運動以外の運動をしていると考えられる。

結果の詳細は発表時に報告する。

#### 参考文献

- (1) D.S. Wishart, B.D. Sykes, and F.M. Richards, *Biochim. Biophys. Acta*, 1164 (1993) 36-46.
- (2) H.R. Matthews, K.S. Matthews, and S.J. Opella, *Biochim. Biophys. Acta*, 497 (1977) 1-13.

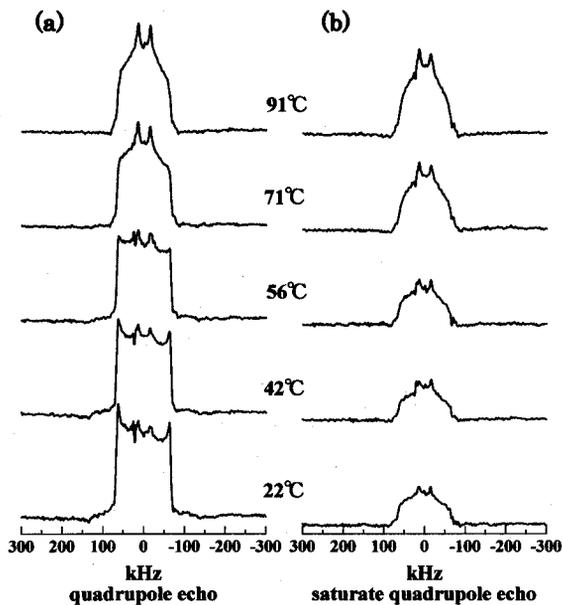


Fig.1. Temperature dependence of  $^2\text{H}$  quadrupole echo (a) and saturate quadrupole echo (b) spectra of L-{3,5- $^2\text{H}_2$ }phe.

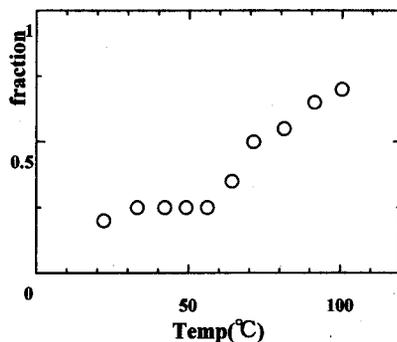


Fig.2. Temperature dependence of the fast component fraction.

立体規則性  $\pi$  共役系高分子における構造相転移

(東工大院生命理工)○ 浅川直紀, Myagmarsuren Gomboo, 櫻井実, 井上義夫  
(東工大資源化学研究所) 山本隆一

Structural Phase Transition in Regio-regulated  $\pi$ -conjugated Polymers

Naoki Asakawa,<sup>†</sup> Myagmarsuren Bomboo,<sup>†</sup> Minoru Sakurai,<sup>†</sup> Yoshio Inoue,<sup>†</sup> and Takakazu Yamamoto<sup>‡</sup>

<sup>†</sup>Graduate School of Bioscience and Biotechnology and <sup>‡</sup>Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology

4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, JAPAN

Tel:045-924-5796 FAX:045-924-5827 e-mail: nasakawa@bio.titech.ac.jp

Solid-state structure of some five-membered ring  $\pi$ -electron conjugated polymers with high regio-regularity was investigated by differential scanning calorimetry(DSC) and  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ , and  $^{13}\text{C}$  solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.  $^2\text{H}$  quadrupolar echo spectra of a head-to-head(HH) type of perdeuterated poly(4-methylthiazole-2-diyl)[ $d_3$ -HH-P4MeTz] shows asymmetry character above *ca.* 290K, which could be due to wagging motion of the methyl groups and/or discommensuration of HH-P4MeTz.  $^1\text{H}$  transverse relaxation time measurements of the methyl protons in HH-P4MeTz with two pulse Hahn echo (TPHE) and Carr Purcell Meiboom Gill(CPMG) methods shows that there exists diffusion-like motion in the system, which is probably due to the modulation waves. The dynamics of the modulation was investigated by  $^2\text{H}$  two dimensional exchange NMR spectroscopy and the exchange rate was as slow as an order of 1 kHz at room temperature. The structural phase transition was also inferred by two dimensional spin-echo  $^{13}\text{C}$  CPMAS experiments of HH- P4MeTz and ab initio chemical shielding calculation of the model compounds. From quantum chemical calculation of  $^{13}\text{C}$  chemical shielding tensor, it appeared that melting of the face-to-face  $\pi$ -stacking is strongly correlated with the methyl rotation in HH-P4MeTz.

## 1. 緒言

一次構造制御型のポリ(4-メチルチアゾール-2,5-ジイル)[Head-to-head(HH)-P4MeTz]は複素五員環がface-to-face型の $\pi$ スタッキングすることにより側鎖に存在する多数のメチル基が異常に高密度に配列したユニークな結晶構造を形成する。こ

れまで我々は、主に固体NMRを用いて $\pi$ 共役系高分子の分子構造を調べてきている。今回我々は、HH-P4MeTzの示差走査型熱量計(DSC)測定とメチル基を99%重水素化した試料を用いた $^2\text{H}$ 四極子エコーNMR測定により、メチル基の回転転移と $\pi$ スタッキングの融解挙動を調べた。

<sup>1</sup> $\pi$ 共役系高分子・横緩和時間・CPMG-Hahnエコー・二次元交換

あさかわなおき, みやぐまるすれん=ゴンボ, さくらいみのる, いのうえよしお, やまもとたかかず

## 2. 実験

一次構造制御型のポリ(4-メチルチアゾール)[P4MeTz]を脱ハロゲン化重縮合法により合成し、DSC測定(Seiko, DSC5200)

および NMR 実験 (JEOL GSX270, Varian Unity400) を行った。 $^2\text{H}$  NMR の測定には四極子エコー法を用い、118~393K の温度範囲で実験を行った。

### 3. 結果・考察

DSC 測定により、P4MeTz では約 290K に大きな比熱の変化を伴った吸熱ピークが観測され、P3MeTh では約 363K に比熱の変化を伴わない吸熱ピークが観測された。P4MeTz は複素五員環が face-to-face 型の  $\pi$  スタッキングすることにより側鎖に存在する多数のメチル基が異常に高密度に配列した構造を形成する。側鎖のメチル水素を 99% 重水素ラベルした P4MeTz を合成し、固体  $^2\text{H}$  四極子エコースペクトルを 118~393K の温度範囲で測定したところ、転移の高温相側では、メチル重水素の粉末スペクトルに非対称性が現れた (Fig.1)。非対称性の原因として、電荷の存在・ $^2\text{H}$ - $^2\text{H}$  双極子カップリング  $\cdot C_{3v}$  対称性の破れ・Wagging 運動・discommensuration が考えられる。非対称性が高温相側でのみ現れるので、電荷の存在や  $^2\text{H}$ - $^2\text{H}$  双極子カップリングや  $C_{3v}$  対称性の破れによるとは考えにくい。残る Wagging 運動と discommensuration は必ずしも独立ではなく、構造不整相での原子変位の変調波が拡散している場合には Wagging 運動として観測されることも有り得る。HH-P4MeTz において構造不整が存在するかどうかはまだ明らかではないが、 $^2\text{H}$  スペクトルの二つの垂直端の温度依存性の違いより、HH-P4MeTz には原子の変位の非局在化した変調波が存在していて、293K の転移は整合不整合転移である可能性がある。さらに  $^2\text{H}$  二次元交換固体 NMR 測定を行なったところ、変調波の拡散は非常に遅く、数 kHz 程度であると見積もられた。

これらと同様の結果が、 $^{13}\text{C}$  二次元 NMR スピンエコー実験により決定したメチル炭素の磁気遮蔽テンソル主値にも現れ

た。これは、ab initio 分子軌道法による磁気遮蔽計算からも示唆された。

以上より、室温付近で DSC 測定により観測された吸熱ピークはこの相転移に伴う face-to-face の分子間  $\pi$  スタッキングの融解に帰属されると考えられ、この融解により  $\pi$  共役系の広がり が 2 次元 (分子内+分子間) から 1 次元 (分子内) に低下したことが比熱の変化の原因ではないかと考えられる。以上のことを踏まえると、HH-P4MeTz では、メチルの回転転移と  $\pi$  スタッキングの融解とが強く相関していて、六員環と比べて立体障害の少ないと考えられる五員環においても側鎖と主鎖骨格との相互作用が強いことがわかる。

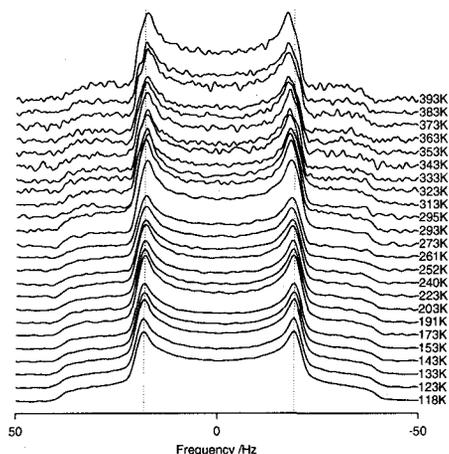


Figure 1. HH-P4MeTz の 41MHz  $^2\text{H}$  四極子エコースペクトル

Na型ZSM-5ゼオライト細孔内の  
*N,N*-ジメチル-*p*-ニトロアニリンの挙動  
 (産総研) ○小森佳彦、林 繁信

***N,N*-Dimethyl-*p*-nitroaniline in the micropore of Na-type ZSM-5** (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) Yoshihiko KOMORI and Shigenobu HAYASHI

Interaction between *N,N*-dimethyl-*p*-nitroaniline (DMpNA) molecules and Na ions in the micropore of ZSM-5 was investigated by using solid-state  $^{23}\text{Na}$  NMR spectroscopy. DMpNA molecules were introduced into the micropore of Na-type ZSM-5 at 443 K. It was found that the color of the sample depended on the amount of adsorbed water. When the sample adsorbed water molecules, a broad  $^{23}\text{Na}$  signal at -6.2 ppm due to hydrated Na ions was observed. On the other hand, when the sample was dried at 423 K, the  $^{23}\text{Na}$  signal shifted to -17 ppm. Furthermore, the signal was detected by cross polarization method, suggesting that DMpNA molecules located near the Na ions. It is concluded that adsorbed water molecules play an important role for controlling the distance between DMpNA molecules and Na ions.

### 1. 緒言

無機有機ナノ複合体は無機・有機双方の利点を兼ね備えた新しい材料として注目を集めている。しかしながら無機物(ホスト)中における機能有機分子(ゲスト)のダイナミクス等について検討された例は少なく、効率的なナノ材料の創製のためにはゲスト分子の挙動やホスト-ゲスト間相互作用を明らかにし、それに基づいた材料設計の指針の確立が重要であると考えられる。当研究グループでは様々な無機ホスト中における *p*-ニトロアニリン類の運動について検討を行ってきた。<sup>1-3</sup>

本研究ではNa型ZSM-5ゼオライト細孔内に*N,N*-ジメチル-*p*-ニトロアニリン(DMpNA)を吸着させた試料に着目した。ZSM-5は直径約0.54 nmの直線状の細孔を有するゼオライトで、Al原子を骨格に混入させることでNaイオンを細孔に導入することが可能である。この場合、水分子も同時に吸着しやすく、ゼオライト細孔内ではNaイオン、DMpNA、吸着水の3成分が混合している状態となる。この系において吸着水の有無により試料の色が可逆的に変化することを見出し、その要因について検討した。

### 2. 実験方法

Na型ZSM-5は触媒学会から配布されている参照触媒(JRC-Z5-70Na;  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3=70$ )を用いた。ZSM-5を473 Kで3 h真空排気した後、窒素雰囲気下で単位格子当たり約4分子のDMpNAを導入し、混合物の入った試料管を真空下で封じた。これをDMpNAの融点(436 K)を考慮し、443 Kで3日間加熱処理することで吸着反応を進行させた。

固体 $^{23}\text{Na}$  NMR分析はBruker MSL400及びASX400を用いた。クロスポーラリゼーション

こもりよしひこ、はやししげのぶ

ン(CP)測定はボラックスにおける $-2\text{ ppm}$ のシグナル強度を最大にするHartmann-Hahn条件に調整した後、行った。化学シフトは $1\text{ M NaCl aq.}$ を基準とした。

### 3. 結果・考察

得られた試料を空气中に放置しておくとき水が8%程度吸着した。この時の試料の色は黄色であり、UV-visスペクトルでは最大吸収波長が約 $400\text{ nm}$ を示した。この試料を $150^\circ\text{C}$ で乾燥・脱水すると試料の色は橙色になり、UV-visスペクトルでは約 $500\text{ nm}$ に吸収帯が出現した。この変化は吸着水の有無により可逆的であった。

脱水前後の変化を $^{23}\text{Na}$  NMRを用いて測定した。DMpNA反応前のNa型ZSM-5(図1a)はシャープな $7.2\text{ ppm}$ (A)とブロードな $-6.2\text{ ppm}$ のシグナル(B)を示す。乾燥させるとシグナルAの化学シフト値は変化しないのに対して、シグナルBは $-25\text{ ppm}$ 付近までシフトしたことから、前者は骨格に配位したNaイオン、後者は水分子が配位したNaイオンと考えられた。

DMpNA反応後、室温で放置した試料のスペクトル(図1b)ではシグナルBは $-6.5\text{ ppm}$ に観測された。この試料を乾燥させると(図1c)、シグナルBは $-17\text{ ppm}$ へと低周波数側へシフトし、線幅も広がった。CP測定を行ったところ、乾燥後のZSM-5/DMpNAの試料においてのみシグナルBが観察され(図1d)、DMpNA分子の $^1\text{H}$ 核から $^{23}\text{Na}$ 核へと交差分極が起こっていると考えられた。以上の結果から乾燥によりNaイオンから水分子が脱離することで、DMpNA分子がNaイオンに近接できるようになると考えられた。

### 4. まとめ

乾燥前後による試料の色の変化は、NaイオンとDMpNA分子との相互作用の変化によるものと考えられ、吸着水がこの相互作用において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

### 5. 参考文献

- (1) S. Hayashi and Y. Komori, Proceedings of the 13th Inter. Zeolite Conf., Montpellier, 13-P-06 (2001).
- (2) 小森佳彦・林繁信、日本化学会第79春季年会、講演予稿集I、p178 & p259 (2001).
- (3) 小森佳彦・林繁信、第39回NMR討論会、講演要旨集、p372 (2000).

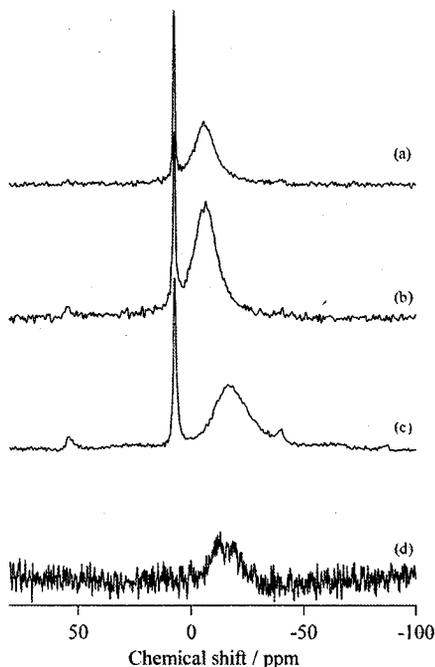


Figure 1.  $^{23}\text{Na}$  MAS NMR spectra of (a) ZSM-5, (b) ZSM-5/DMpNA in an ambient atmosphere and (c), (d) dried ZSM-5/DMpNA. Spectra of (a), (b) and (c) are measured by the single pulse method with high power decoupling and those of (d) by the CP technique.

## $^{17}\text{O}$ -MQMAS、 $^{31}\text{P} \rightarrow ^{17}\text{O}$ CP/MAS 及び $^{17}\text{O} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP/MAS によるアモルファス性リン酸アルミニウムの構造解析

(新日鐵先端研<sup>[1]</sup>、Pacific Northwest National Laboratory<sup>[2]</sup>)  
○ 金橋康二<sup>[1]</sup>、齋藤公児<sup>[1]</sup>、Sarah D. Burton<sup>[2]</sup>、Paul D. Ellis<sup>[2]</sup>

Structural Analysis of Amorphous Aluminum Phosphate using  
 $^{17}\text{O}$ -MQMAS,  $^{31}\text{P} \rightarrow ^{17}\text{O}$  CP/MAS and  $^{17}\text{O} \rightarrow ^{31}\text{P}$  CP/MAS

Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Laboratories<sup>[1]</sup>, Pacific Northwest National  
Laboratory<sup>[2]</sup> ○ Koji Kanehashi<sup>[1]</sup>, Koji Saito<sup>[1]</sup>, Sarah D. Burton<sup>[2]</sup>, Paul D. Ellis<sup>[2]</sup>

$^{17}\text{O}$ -MQMAS (Multiple-Quantum Magic-Angle-Spinning) NMR being capable of averaging the second-order quadrupolar interaction was applied to the investigation of the chemical structure of  $^{17}\text{O}$ -enriched amorphous aluminum phosphate ( $\alpha$ - $\text{AlPO}_4$ ). 2D cross peak consisting of two oxygen components was observed. Moreover, these peaks was distributed along chemical shift direction, which caused by its amorphous structure. In order to investigate the connection between O and P in  $\alpha$ - $\text{AlPO}_4$ , both  $^{31}\text{P} \rightarrow ^{17}\text{O}$  CP/MAS and  $^{17}\text{O} \rightarrow ^{31}\text{P}$  CP/MAS experiments were carried out. In  $^{31}\text{P} \rightarrow ^{17}\text{O}$  CP/MAS spectrum of  $\alpha$ - $\text{AlPO}_4$ , the resonance corresponding to shoulder peak on the higher field side in MAS spectrum, which indicate that this oxygen site is close to phosphorus atom. On the other hand, Three peak tops were observed in  $^{17}\text{O} \rightarrow ^{31}\text{P}$  CP/MAS spectrum. Thus, application of both  $^{31}\text{P} \rightarrow ^{17}\text{O}$  CP/MAS and  $^{17}\text{O} \rightarrow ^{31}\text{P}$  CP/MAS were found to give useful structural information in  $\alpha$ - $\text{AlPO}_4$  as well as  $^{17}\text{O}$ -MQMAS for the direct information in oxygen atom.

### 【緒言】

酸素は天然物、合成物を問わず、酸化物として様々な物質中に存在しており、酸化物の精密な化学構造を明らかにするためには、酸素の化学構造情報を取得することが非常に重要である。NMR 測定対象核である  $^{17}\text{O}$  は  $I=5/2$  であるため、固体試料測定時において、MAS 法では 2 次の核四極子相互作用が平均化できずに線幅の広幅化、シフトのずれが生じ、正確な化学構造解析が困難になってしまう場合が多いが、MQMAS 法[1]を用いれば 2 次の核四極子相互作用を平均化することができ、高分解能スペクトルを得ることができるものと期待される。しかしながら、実際は  $^{17}\text{O}$  の天然存在比が非常に少なく低感度であり、また  $^{11}\text{B}$ [2]、 $^{23}\text{Na}$ 、 $^{27}\text{Al}$  等と比較して核四極子相互作用が非常に強いいため、広く用いられている 7 T クラスの磁場強度下での精密な化学構造解析は非常に困難であるのが現状である。

そこで今回、 $^{17}\text{O}$  を同位体濃縮したアモルファス性リン酸アルミニウム ( $\alpha$ - $\text{AlPO}_4$ ) を合成し、11.7 T の磁場強度下において  $^{17}\text{O}$ -3QMAS 法による  $\alpha$ - $\text{AlPO}_4$  の構造解析を実施した。さらに、酸素原子周辺からの構造情報を得るために、 $^{31}\text{P} \rightarrow ^{17}\text{O}$  及び  $^{17}\text{O} \rightarrow ^{31}\text{P}$  の相互の交差分極 (相互 CP/MAS) を用いて、酸素とリンとの結合連鎖について検討した結果について報告する。

### 【実験】

一連の NMR スペクトル測定には、Chemagnetics CMX Infinity-500 (5mm $\phi$  Chemagnetics 製 HX プロローブ、試料回転速度; 12.5 kHz) 及び VARIAN UNITY-500 (5mm $\phi$  DOTY 製 HXY プロローブ、試料回転速度; 14 kHz) を使用した。 $^{17}\text{O}$  共鳴周波数及び  $^{31}\text{P}$  共鳴周波数はそれぞれ 67.8 MHz、202.5 MHz である。 $^{17}\text{O}$ -enriched  $\alpha$ - $\text{AlPO}_4$  は  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  と  $^{17}\text{O}$ -enriched  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $^{17}\text{O}$ : 20 atom %) とから、 $\text{NH}_3$  水を用いて pH=8 で調整し、120 $^\circ\text{C}$  20 h、500 $^\circ\text{C}$  6.5 h の順で乾燥、焼成することによって得られた。MQMAS パルスシーケンスは、z-Filter 型 3 パルスシーケンスを用いた[3]。 $^{31}\text{P} \rightarrow ^{17}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O} \rightarrow ^{31}\text{P}$  の各 CP/MAS 測定では、式(1)、(2)の条件を満たすように各パラメータを最適化した[4]。 $^{17}\text{O}$  及び  $^{31}\text{P}$  NMR スペクトルの化学シフト基準はそれぞれ  $\text{H}_2\text{O}$ : 0 ppm、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ : 1.33 ppm とした。

$$\text{Spin locking efficiency: } \alpha = \nu_{IS}^2 / \nu_Q \nu_r \quad \alpha \ll 1 \quad (1)$$

$$\text{CP matching condition: } (I+1/2)\nu_r = (S+1/2)\nu_S \pm n\nu_r \quad (2)$$

$I$ : spin number of  $I$  nucleus,  $S$ : spin number of  $S$  nucleus,  $\nu_r$ : strengths of rf-fields applied to  $I$  spin,  $\nu_S$ : strengths of rf-fields applied to  $S$  spin,  $\nu_r$ : sample spinning frequency,  $\nu_Q$ : quadrupole frequency,  $n$ : integer

### 【結果・考察】

$\alpha$ - $\text{AlPO}_4$  の  $^{17}\text{O}$ -MAS スペクトルを Fig. 1(a)に示す。42.7 ppm にピークトップを示すスペクトルが得られ、高磁場側に肩が見られた。しかしながら MAS スペクトルは 2 次の核四極子相互作用を受けており、化学シフト値も正確ではないため、詳細な構造を議論することは困難である。そこで、 $^{17}\text{O}$ -3QMAS スペクトルを測定したところ、Fig. 2 中の矢印で示すような主に 2 成分から成るクロスピークが観測された。最も強い強度を持つクロスピークの等方性化学シフト  $\Delta\sigma$  及び核四極子結合定数  $C_Q$  はそれぞれ 60.7 ppm、6.7 MHz であった。また、このピークは CS (Chemical Shift) 方向に分布していた。これは  $C_Q$  がほとんど変わらずに、 $\Delta\sigma$  が連続的に変化するような酸素構造が複数存在していることを意味している。このような CS 方向或いは QIS (Quadrupolar Induced Shift) 方向へのクロスピークの分布は無秩序な構造を持つ化合物においてしばしば観測され[5]、今回合成した  $\alpha$ - $\text{AlPO}_4$  も同様であると考えられる。

$^{17}\text{O}$ -MQMAS、 $^{31}\text{P} \rightarrow ^{17}\text{O}$  CP/MAS、 $^{17}\text{O} \rightarrow ^{31}\text{P}$  CP/MAS、アモルファス性  $\text{AlPO}_4$

かねはしこうじ、さいとうこうじ、さらばーとん、ぼーるえりす

次に酸素とリンの結合状態を明らかにするために、 $^{31}\text{P}$  →  $^{17}\text{O}$  CP/MAS 及び  $^{17}\text{O}$  →  $^{31}\text{P}$  CP/MAS スペクトルを測定した。 $^{31}\text{P}$  →  $^{17}\text{O}$  CP/MAS スペクトルでは、Fig. 1 の  $^{17}\text{O}$ -MAS スペクトルの高磁場側に対応するピークのみが選択的に観測されたことから (Fig. 1(b))、この化合物中には、リンと直接結合している、或いは近距離に存在している酸素 ( $\text{PO}_4$  四面体中の酸素) と、そうでない酸素 (末端  $\text{AlPO}_4$  中の酸素、 $\text{Al}-\text{O}-\text{Al}$  の酸素等の可能性) が存在していることが推測された。

$^{31}\text{P}$ -MAS スペクトルでは、アモルファス構造に由来すると考えられるピーク分布により、ブロードな 1 本のシグナルを与えたが (Fig. 3(a))、 $^{17}\text{O}$  →  $^{31}\text{P}$  CP/MAS スペクトルにおいては、Fig. 3(b) に示すように明確な 3 つのピークトップを示すシグナルが観測された。このことから、 $\alpha$ - $\text{AlPO}_4$  には少なくとも 3 種類の P 化学構造が存在していることが明らかとなり、観測された 3 本のピークは、 $\text{PO}_4$  の縮重度  $Q^n$  の違いに起因している可能性がある。また、 $\alpha$ - $\text{AlPO}_4$  は基本的に  $\text{AlO}_4$  四面体と  $\text{PO}_4$  四面体の縮重構造をとっているが、アモルファス構造のため O-P 原子間距離にばらつきものと推測され、Fig. 3(b) で観測されたリンの化学種は、比較的 O-P 間距離に近い環境に存在するものであると考えられる。

以上のように、MQMAS 法により得られる酸素自身の直接的な酸素構造情報に、周囲核との結合状態を知ることのできる CP/MAS 法を組み合わせることで、 $\alpha$ - $\text{AlPO}_4$  の化学構造を詳細に議論することが可能となった。特に、CP/MAS においては、2 核間で相互に実施 (相互 CP/MAS) することにより、構造情報量が増加することがわかった。

なお、本研究は Pacific Northwest National Laboratory 内の Environmental Molecular Sciences Laboratory にて行われた。

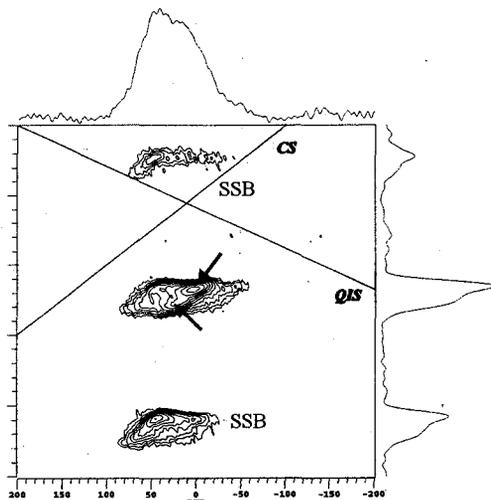


Fig. 2  $^{17}\text{O}$ -3QMAS spectrum of  $^{17}\text{O}$ -enriched amorphous  $\text{AlPO}_4$

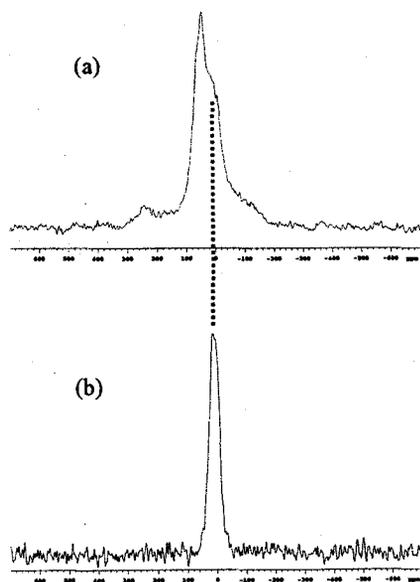


Fig. 1  $^{17}\text{O}$ -NMR spectra of  $^{17}\text{O}$ -enriched amorphous  $\text{AlPO}_4$ , (a)  $^{17}\text{O}$ -MAS, (b)  $^{31}\text{P}$  →  $^{17}\text{O}$  CP/MAS

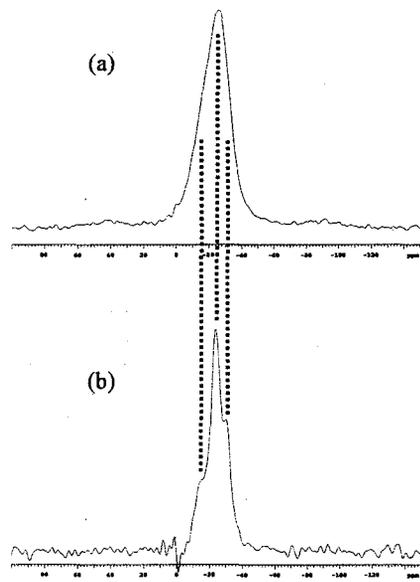


Fig. 3  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra of  $^{17}\text{O}$ -enriched amorphous  $\text{AlPO}_4$ , (a)  $^{31}\text{P}$ -MAS, (b)  $^{17}\text{O}$  →  $^{31}\text{P}$  CP/MAS

#### 【文献】

- [1] L. Frydman and J. S. Harwood, *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995) 5367.
- [2] K. Kanehashi, K. Saito and H. Sugisawa, *Chem. Lett.*, **6** (2000) 588.
- [3] J. P. Amoureux, C. Fernandez and S. Steuernagel, *J. Magn. Reson.*, **A123** (1996) 116.
- [4] C. Fernandez, L. Delevoye J. P. Amoureux, D. P. Lang and M. Pruski, *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 6858.
- [5] 例えば S.-J. Hwang, C. Fernandez, J. P. Amoureux, J. Cho, S. W. Martin and M. Pruski, *Solid State NMR*, **8** (1997) 109.

固体 2 次元 NMR 法を用いた  
アルカリシリケートガラスの水和過程の研究  
(科技団さがけ研究 2 1<sup>1</sup>、産総研生活環境系<sup>2</sup>)  
○増井大二<sup>1</sup>、陳 丹平<sup>1</sup>、赤井智子<sup>1,2</sup>、矢澤哲夫<sup>2</sup>

Hydration process of alkali-silicate glasses as studied  
by solid-state two-dimensional NMR spectroscopy  
(Conversion and Control by Advanced Chemistry, PRESTO, JST<sup>1</sup>,  
Special Division of Green Life Technology,  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology<sup>2</sup>)  
Hirotugu Masui<sup>1</sup>, Danping Chen<sup>1</sup>, Tomoko Akai<sup>1,2</sup>, and Tetsuo Yazawa<sup>2</sup>

The hydration process in  $\text{Na}_2\text{O}\cdot 3\text{SiO}_2$  glass was studied by  $^1\text{H}$  CRAMPS,  $^{23}\text{Na}$  MAS and 2D MQMAS NMR, and  $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$  2D WISE NMR. It is found that  $^{23}\text{Na}$  MAS and 2D MQMAS NMR of the hydrated glasses with more than 8.4wt% water consist of two signals. The 2D MQMAS spectra could provide values of the isotropic chemical shift ( $\delta_{\text{iso}}$ ) and the quadrupole coupling frequency ( $\nu_{\text{Q}}$ ) for each site. From these results, the mechanism of the hydration process in the glasses is discussed.

[序] ガラスの水和反応は、ガラスの耐水性のみならず、マグマの生成過程を検討するという地質学的な見地からも重要であり、古くから多くの研究が行われている。しかしながら、最も単純な組成のソーダシリケートガラスについてさえ、水を含有する過程における微視的なメカニズムについては未だに明らかではない。本研究では、ガラス中の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  がどのような状態で存在し、またそれらがどのようにシリカネットワークの周囲に存在しているか、という情報を得るために、様々な量の水を含んだソーダシリケートガラスについて、 $^1\text{H}$  CRAMPS,  $^{23}\text{Na}$  2D MQMAS [1] ならびに  $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$  2D WISE NMR [2] スペクトルを測定し、ガラスの水和メカニズムについて検討した。

[実験] 試料は、 $\text{Na}_2\text{O}\cdot 3\text{SiO}_2$  ガラスを粉砕し、 $80^\circ\text{C}$  の飽和蒸気圧中で水和させることによって得た。試料中の含水量として、水和処理によって生じた試料の重量増加を用いた。NMR 測定は、全て Chemagnetics CMX-200 分光計を用いて行った。観測周波数は、 $200.257\text{MHz}$  ( $^1\text{H}$ ),  $52.97\text{MHz}$  ( $^{23}\text{Na}$ ) および  $39.78\text{MHz}$  ( $^{29}\text{Si}$ ) であっ

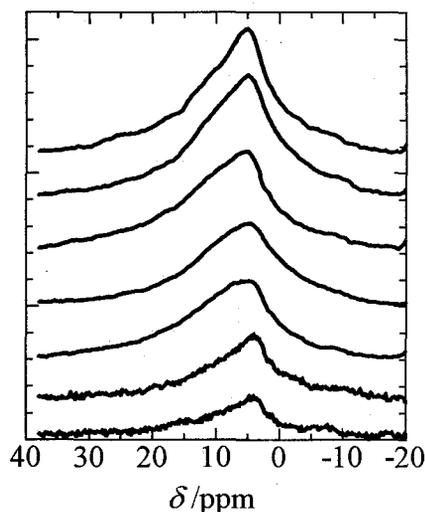


Fig. 1  $^1\text{H}$  CRAMPS spectra of hydrated glasses with different water content: 8.4wt%, 10wt%, 21wt%, 27wt%, 29wt%, 31wt%, 39wt% (from the bottom to the top).

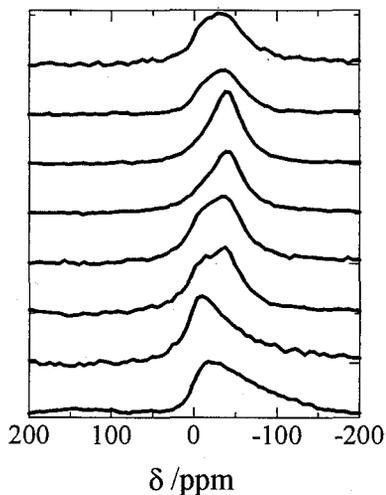


Fig. 2  $^{23}\text{Na}$  MAS spectra of hydrated glasses with different water content: anhydrous, 2.4wt%, 8.4wt%, 10wt%, 21wt%, 27wt%, 31wt%, 39wt% (from the bottom to the top).

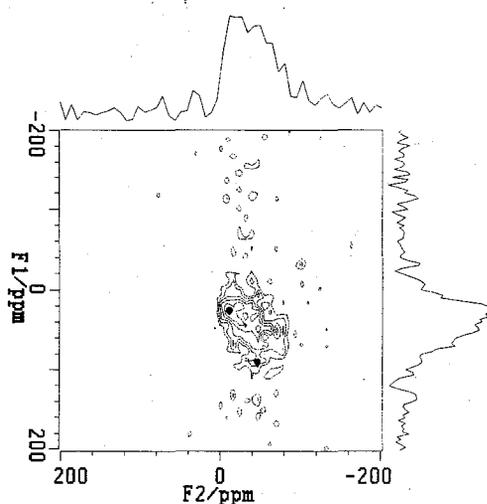


Fig. 3  $^{23}\text{Na}$  2D MQMAS spectrum of hydrated glass (39wt%  $\text{H}_2\text{O}$ ). The closed circles show the center of two Na signals.

た。 $^1\text{H}$  CRAMPS の測定は、BR-24 パルスシーケンスを用い、シリコンゴムを用いてスケールリングを行った。 $^{23}\text{Na}$  NMR のシフト値は  $\text{NaCl}(1\text{M aq})$  を外部標準として用いた。 $^{23}\text{Na}$  2D MQMAS は、Z フィルター-3 パルス法を用い、hypercomplex 法でデータを取り込み、その後 shearing を含むデータ処理を行った。 $^{29}\text{Si}$  NMR では、3-(トリメチルシリル)プロピオン酸- $d_4$  ナトリウム(TSPA- $d_4$ )を化学シフトの基準として用いた。

[結果と考察] 含水量の異なる試料  $^1\text{H}$  CRAMPS スペクトルを Fig. 1 に示す。21-29%の試料でややブロードになっている。また、 $^{23}\text{Na}$  MAS (Fig.2) および、2D MQMAS スペクトル (Fig.3) から、含水量が 8.4wt%以上の試料において2種類のサイトが存在することがわかり、それぞれのサイトの核四極相互作用パラメータや化学シフト値の等方値を見積もることができた。当日は、 $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$  2D WISE スペクトルの結果もあわせて、水和過程におけるガラス骨格の構造変化や  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$  の存在状態について検討した結果を詳しく報告する。

[謝辞] MQMAS 測定について様々な面でご指導をいただきました、日本電子(株)杉沢寿志氏に深く感謝いたします。

[文献] 1) L. Frydman and J. S. Harwood, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 5367 (1995).  
2) K. Schmidt-Rohr, J. Clauss, and H. W. Spiess, *Macromolecules*, 25, 3273 (1992).

キーワード (5つ以内) : ガラス、水和、2次元、WISE、MQMAS

著者ふりがな : ますいひろつぐ、ちんたんぺい、あかいともこ、やざわてつお

$Ti_{1/3}V_{2/3}H_xD_y$  ( $x+y \approx 0.9$ )におけるHおよびDの拡散挙動  
(産総研) 林 繁信

Dynamics of hydrogen isotopes in  $Ti_{1/3}V_{2/3}H_xD_y$  ( $x+y \approx 0.9$ )

(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Shigenobu Hayashi

Dynamics in  $Ti_{0.33}V_{0.67}H_xD_y$  ( $x+y \approx 0.9$ ) has been studied by means of  $^1H$  and  $^2H$  NMR. H and D atoms are considered to occupy tetrahedral ( $T$ ) sites. The temperature and frequency dependence of spin-lattice relaxation times  $T_1$  of  $^1H$  and  $^2H$  has been analyzed by Bloembergen-Purcell-Pound equations with a distribution of correlation times, and the activation energy of hydrogen diffusion is determined. The mean activation energy for D diffusion ( $E_D$ ) is higher than that for H diffusion ( $E_H$ ).  $E_H$  is constant while  $E_D$  increases slightly with the  $[D]/[H]$  ratio. The distribution increases as the  $[D]/[H]$  ratio decreases.

1. はじめに

金属水素化物は水素の貯蔵・運搬材料として有望な材料である。Ti-V 合金は[水素]/[金属]比2まで水素を安定に吸蔵できる材料である。我々は従来から[水素]/[金属]比1の水素化物における水素のサイトおよび拡散挙動を固体NMRによって調べてきた。今回は  $Ti_{0.33}V_{0.67}$  を取り上げた。 $Ti_{0.33}V_{0.67}$  の一水素化物は軽水素化物も重水素化物も同じ体心立方構造をしている。本研究では、軽水素 (H) および重水素 (D) が同時に吸蔵された場合それぞれの拡散挙動がどのように変わり、HとDがお互いにどのような影響を与えるかを調べた。

2. 実験

$Ti_{0.33}V_{0.67}$  合金を高圧水素ガス下で水素化した後、脱水素化して含有水素量を調整し一水素化物を得た。このようにして得られた軽水素化物および重水素化物を所定量混合し、閉鎖真空系内で加熱して均一の試料を作成した。HおよびDの含有量は、熱重量/質量分析複合装置によって決定した。

固体NMR測定は、静止試料についてスペクトルとスピナー格子緩和時間 ( $T_1$ ) を測定した。 $^1H$  はブルカー-CXP90 (32 および 60 MHz)、ASX400 (400 MHz)、 $^2H$  はブルカー-ASX200 (31 MHz)、MSL400 (61 MHz) で測定した。

金属水素化物、水素、スピナー格子緩和時間、水素拡散、同位体効果

はやししげのぶ

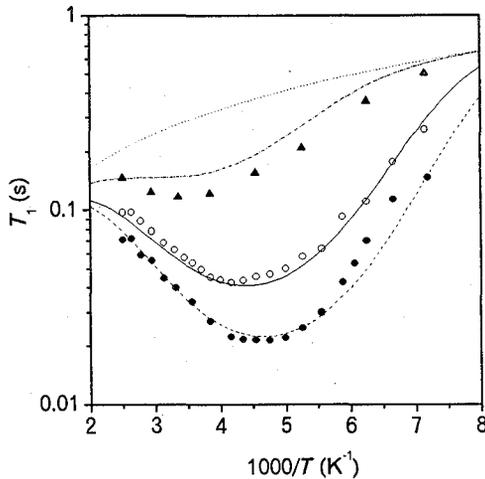


Fig. 1.  $^1\text{H}$   $T_1$  in  $\text{Ti}_{0.33}\text{V}_{0.67}\text{H}_{0.49}\text{D}_{0.43}$  at 31.6 (●), 60.0 (○) and 400.13 MHz (▲), and their simulated results.

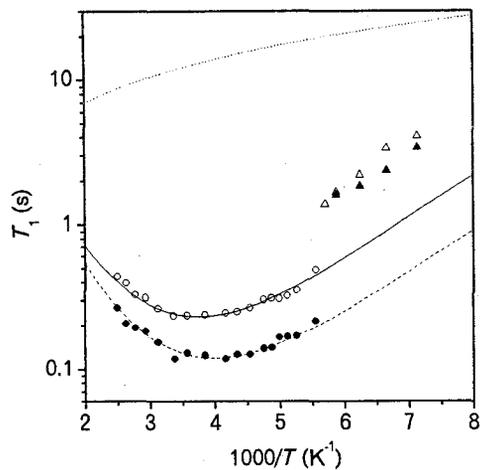


Fig. 2.  $^2\text{H}$   $T_1$  in  $\text{Ti}_{0.33}\text{V}_{0.67}\text{H}_{0.49}\text{D}_{0.43}$  at 30.7 (●) and 61.4 MHz (○) for the  $-4\text{-kHz}$  component and at 30.7 (▲) and 61.4 kHz (△) for the  $-9\text{-kHz}$  component, and their simulated results.

### 3. 結果及び考察

Fig. 1 と Fig. 2 に、 $\text{Ti}_{0.33}\text{V}_{0.67}\text{H}_{0.49}\text{D}_{0.43}$  の  $^1\text{H}$  および  $^2\text{H}$  の緩和時間の温度・周波数依存性を示した。水素拡散による緩和と伝導電子との相互作用による緩和（図中の点線）が寄与している。 $^2\text{H}$  の緩和時間が 180 K 以下で不連続に変化しているのは混在している二水素化物の影響と考えられる。図で示された温度・周波数依存性は Bloembergen-Purcell-Pound (BPP) 式そのものでは解析できない。金属水素化物では活性化エネルギーに分布を持たせる方法がよく用いられるが、活性化エネルギーの分布だけでは図の結果を再現できなかったので頻度因子にも分布を持たせて解析を行った。図中の線は計算値でありほぼ実験値を再現できた。

活性化エネルギーの平均値は、いずれの試料についても軽水素より重水素の方が大きかった。軽水素の活性化エネルギーが  $[\text{D}]/[\text{H}]$  比が変化してもほとんど一定であるのに対し、重水素の活性化エネルギーは  $[\text{D}]/[\text{H}]$  比の増加につれ若干増加した。一方、相関時間の分布は  $[\text{D}]/[\text{H}]$  の減少につれて増加した。同一試料において、相関時間の分布は軽水素より重水素の方が大きい傾向を示した。

以上の結果は、軽水素および重水素が直接もしくは間接的にお互いの拡散挙動に影響を及ぼしあっていることを示している。

<sup>2</sup>H-NMR法による燃料電池固体電解質のイオン伝導機構評価  
(神奈川大工<sup>1</sup>、産総研<sup>2</sup>) ○高山俊夫<sup>1</sup>、小森佳彦<sup>2</sup>、林 繁信<sup>2</sup>

Study of Deuterium Conduction Mechanism in Solid Electrolytes of Fuel Cell by means of <sup>2</sup>H-NMR  
O.T. Takayama<sup>1</sup>, Y. Komori<sup>2</sup> and S. Hayashi<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Chemistry, Kanagawa University,  
<sup>2</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Fuel cells convert chemical energy directly to electrical energy cleanly and efficiently. Cs<sub>2</sub>(HSO<sub>4</sub>)(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) was known to be good deuterium (proton) conductors. In order to check deuterium dynamics and disorder in O—D···O on a microscopic level, we performed <sup>1</sup>H and <sup>2</sup>H NMR measurements of the solid acid. In the <sup>1</sup>H NMR spectra at 294K two peaks were observed at δ = 11.8 and 13.5. The two peaks disappeared dramatically at 350K and a new peak appeared at δ = 13.0. This meant that protons on each oxyanion became equivalent. The <sup>2</sup>H NMR spectra indicated coexistence of two Pake doublets with QCC = 130 and 160 kHz at 313K. At 350K the two Pake doublets disappeared drastically, and the center peak remained. This implied that the weak and strong O—D···O bonds coexisted at 294K and that deuterium ions underwent an isotropic motion at 350K.

### 1. はじめに

燃料電池は水素ガスを燃料にして酸素と反応させることによって化学エネルギーを電気エネルギーに効率よく変換するシステムである。燃料電池にとってプロトンを伝導する電解質が重要となる。多くの固体酸 SO<sub>4</sub>、PO<sub>4</sub> 塩は 50～150℃で高いプロトン伝導を起こすことが知られている。プロトン伝導の評価はイオン伝導度や熱測定などによって行われてきているが、その機構解明をミクロな視点で行った例はほとんど見あたらない。そこで我々は、プロトンと同じように振る舞う重水素イオンに着目し、<sup>2</sup>H NMR測定を行うことによって固体酸中のDイオンの伝導機構からプロトン伝導機構評価を行った。

### 2. 実験

固体プロトン酸として Cs<sub>2</sub>(HSO<sub>4</sub>)(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)に注目した。プロトン伝導機構をプロトンの運動として理解するためにHをDに交換した上記化合物を合成した。D交換した上記化合物のなかには数%の Cs<sub>2</sub>(HSO<sub>4</sub>)(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)が存在する(rare protonなので<sup>1</sup>H NMR測定には好都合)。

NMR測定には Bruker MSL400 を用いた。<sup>2</sup>H NMRは、観測周波数 61.42 MHz、四極子エコー法、90°パルス幅 3μs、パルス間隔 15 μs、繰返時間 5 s、シフト基準 D<sub>2</sub>O、温度 313~355Kで行った。<sup>1</sup>H MAS NMR測定は、観測周波数 400.13 MHz、回転数 8 kHz、繰返時間 5 s、シフト基準 TMSで行った。また、<sup>1</sup>Hについては反転回復法でスピナー格子緩和時間 (T<sub>1</sub>) の測定も行った。

### 3. 結果及び考察

プロトン伝導度が急激に大きくなる要因を分子レベルで見るために Cs<sub>2</sub>(DSO<sub>4</sub>)(D<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)の温度可変<sup>1</sup>H MAS NMR、<sup>2</sup>H NMR測定を行った。

キーワード：<sup>2</sup>H NMR法、燃料電池、Dイオン伝導機構、CsHSO<sub>4</sub>-CsH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>系、Pake doublet

たかやまとしお、こもりよしひこ、はやしげのぶ

**$^1\text{H}$  NMR** : Fig. 1 に  $\text{Cs}_2(\text{DSO}_4)(\text{D}_2\text{PO}_4)$  中に微量含まれている  $\text{Cs}_2(\text{HSO}_4)(\text{H}_2\text{PO}_4)$  の温度可変  $^1\text{H}$  MAS NMR スペクトルを示した。294 K では二つのピーク ( $\delta = 11.8$  (強度比約 1)、 $\delta = 13.5$  (約 2)) が見られた。これはプロトン酸 ( $\text{HSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4$ ) の  $\text{H}^+$  スペクトルである。二つに分れているのは結晶中の  $\text{HSO}_4$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4$  成分によって形成された  $\text{O}-\text{D}\cdots\text{O}$  の水素結合の強度差による。350 K では  $\delta = 13.0$  の鋭いピークのみとなった。これは温度が高くなり両プロトン酸の  $\text{H}^+$  の運動性が増大し、 $^1\text{H}$  NMR のタイムスケール内での両ピークの平均的化学シフトを見ていることによる。294 K における  $T_1$  は、 $\delta = 11.8$ 、 $13.5$  のピークに対しそれぞれ 55 s、56 s であった。ほぼ同じ値であったのはプロトン間のスピン拡散のために平均化されたものと思われる。320 K での 2 つのピークの  $T_1$  値は 24 s、340 K では 20 s であった。350 K での 1 つのピークの  $T_1$  値は 1 s 以下と極端に小さくなった。これはプロトン酸の  $\text{H}^+$  が激しく運動していることを示している。

**$^2\text{H}$  NMR** : Fig. 2 に温度可変  $^2\text{H}$  NMR スペクトルを示す。室温から 313 K までは 2 成分のピークダブルレットであった。線形解析の結果、核四極結合定数  $QCC = 130$  kHz (39%)、 $160$  kHz (61%) で非対称定数  $\eta = 0$  であった。さらに、加熱すると、340 K でセンターピークが出現し、350 K では両端のピークが極端に小さくなりセンターピークが非常に大きくなった。そして、360 K で両端のピークは完全に消失し、全ての重水素が等方的な運動を示した。360 K から 294 K まで下げて 10 日間放置して測定した  $^2\text{H}$  NMR スペクトルはセンターピークと 2 成分のピークダブルレットであった。線形解析した結果、スペクトル強度は、センターピークが 3%、一つのピークダブルレット ( $QCC = 125$  kHz、 $\eta = 0$ ) が 45%、もう一つ ( $QCC = 160$  kHz、 $\eta = 0$ ) が 52% であった。10 日間放置してもセンターピークが完全には消失しなかったことは本化合物に熱的ヒステリシスがあることを示している (このことはイオン伝導度測定からも示されている)。

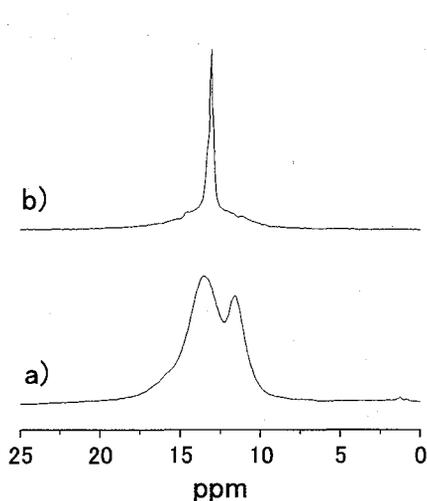


Fig. 1.  $^1\text{H}$  MAS NMR spectra of  $\text{Cs}_2(\text{HSO}_4)(\text{H}_2\text{PO}_4)$  at 294K (a) and 350K (b).

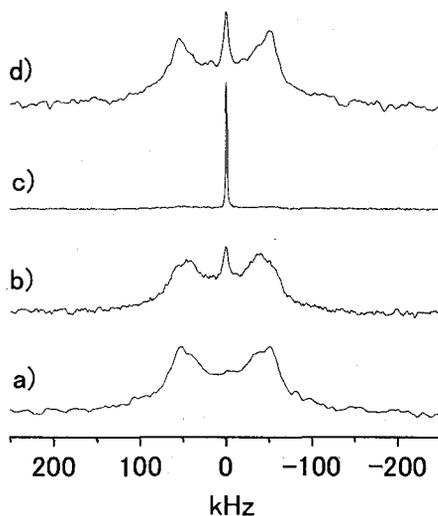


Fig. 2.  $^2\text{H}$  NMR spectra of  $\text{Cs}_2(\text{DSO}_4)(\text{D}_2\text{PO}_4)$  at 313K (a), 340K (b), 350K (c) and after 10 days at 294K (d).

## ナローボア高磁場高速MASプローブの開発 I

日本電子(株) ○樋岡克哉、長谷川憲一、神成さらら、江口剛史、杉沢寿志、栗原範明

Development of a high-speed MAS probe  
for high magnetic field in a narrow bore SCM(I)○Katsuya Hioka, Ken-ichi Hasegawa, Sarara Kannari, Takefumi Eguchi, Hisashi Sugisawa, Noriaki Kurihara  
JEOL Ltd.

We report improvement of the air bearing for dispensable high-speed spinning to a high performance MAS probe. We carried out fine improvement to the design of air bearing; the form of a turbine was designed so that a gas jet flows smoothly; the material of sample tube is silicon nitride, the outer diameter is 4mm. We attained the rotation speed of 20kHz using the sample tube that packed KBr with comparatively high density. The gas of drive and bearing is air.

## 【はじめに】

NMRプローブに要求される機能と性能は、測定対象や測定方法によって異なり、優先される項目も違う。一般に溶液プローブでは感度と分解能が、固体用MASプローブでは試料回転速度と90度パルス幅が最重要と考えられる。我々は、固体NMR用高性能MASプローブの開発に当たり、その目標をMQ-MAS<sup>1)</sup>測定の最適化に設定した。また、スピナー<sup>2), 3)</sup>のロータは4mmとし、高磁場に対応できる<sup>4)</sup>NB(ナローボア)とした。

固体NMR用高性能MASプローブは、WB(ワイドボア)が主流である。NBでは限られたスペースに回転機構、エアの配管、電気回路が実装されるために、90度パルス幅や試料回転速度などの性能が犠牲になってしまっている。しかしながら、我々は高磁場を目指すならばNBが必然と考え、MASプローブの基礎技術に詳細な検討を加え、WB用MASプローブに匹敵する性能のMASプローブを開発した。分解能、BG、温度可変範囲、および使いやすさ等については、回転速度とパルス幅に影響しない範囲で改善に努めた。

本報告では、回転速度の高速化を達成するための空気軸受の改良について説明する。

## 【高速回転用空気軸受の原理】

空気軸受は、ロータと軸受の狭い隙間に、給気孔から圧縮空気を送り込むと、ロータを支える力が発生することを利用している。即ち、この力は粘性を持つ流体が高速で隙間を流れることによって発生する。空気は水や油などに比べると粘性が小さいため、ロータを支える力は小さいが、高速で安定な回転を目的とする軸受に適している。空気軸受を用いた高速回転のスピナーを設計するには、以下の3項目の考慮が不可欠である。

ロータに作用する遠心力…遠心力の大きさは、回転速度の2乗に比例し、ロータの密度に比例する。応力がロータの素材の強度を超えると破損してしまうので、高強度かつ密度の小さな素材を選択する必要がある。

回転方向に作用する力…ロータの回転方向に作用する力は、タービンに加えられるエアジェットによる力と、軸受とロータの隙間の空気の粘性による抵抗力の2つである。高速回転を得るためには、粘性による抵抗を小さくすること、エアジェットを強力にすること、タービンの効率を上げることが重要である。

振れ回り(Whirl)…ロータが高速で回転していると軸受空気の圧力分布が非対称になり、ロータの重心が中心からずれて、ロータが軸受と接触してしまうことがある。安定に高速回転を実現するためには、この現象「振れ

キーワード: MAS, 空気軸受

ひおかかつや、はせがわけんいち、かんなりさらら、えぐちたけふみ、すぎざわひさし、くりはらのりあき

回り」の発生を抑えることが非常に重要である。

### 【空気軸受の設計・製作】

前述の理論的背景をふまえて、4mmスピナーを設計、製作した。Fig. 1にスピナーの内部を示す。軸受・ドライブガスとも空気で、20kHzを超えることを確認した。参考までに、回転速度20kHzでは、ロータの表面の速度は251.3(m/s)で音速の約74%である。

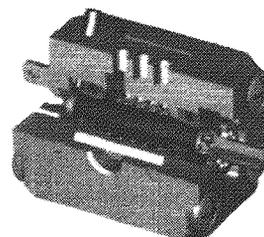


Fig.1 4mm Spinner

### 【NMR測定】

製作した4mmスピナーをプローブに組み込み、NMR測定をおこなった。装置は、JNM-ECA600を使用した。

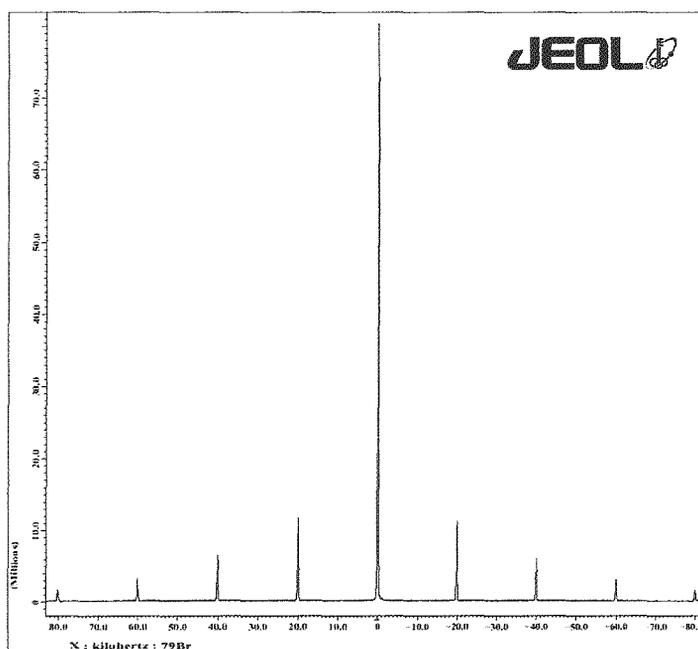


Fig.2 <sup>79</sup>Br MAS NMR spectrum of KBr

### 【まとめ】

空気軸受の改良と共に、90度パルス幅も改良し、開発当初に計画したMQ-MAS測定用プローブに求められる機能と性能とをほぼ達成できた。

- 1) L. Frydman, J.S. Harwood, J. Am. Chem. Soc. 117(1995)5367.
- 2) 樋岡克哉、第38回NMR討論会要旨集、p298(1999)
- 3) 樋岡克哉、第39回NMR討論会要旨集、p382(2000)
- 4) 長谷川憲一、特開平9-269364

「ナローボア高磁場高速MASプローブの開発II」  
 (日本電子(株)) ○長谷川憲一、樋岡克哉、神成さらら、  
 江口剛史、杉沢寿志、栗原範明

Development of high-speed MAS probe for high magnetic field in a narrow bore superconducting magnet (II)  
 (JEOL Ltd.) K.Hasegawa, K.Hioka, S.Kannari, T.Eguchi, H.Sugisawa, N.Kurihara

A MAS probe was developed for high RF power. The target specifications of this probe are as follows.

1. Single tuning circuit for MQ-MAS  $B_0=600\text{MHz}$  (for  $^1\text{H}$ )

2. Sample tube size 4mm in diameter

3.  $^{79}\text{Br}$  (150.3MHz) pulse width 1.2 $\mu\text{sec}$  (1kW)

A balanced circuit and a cylindrical frame were adopted to prevent arcing. This method satisfied those specifications completely.

【はじめに】

MQ-MAS測定には、短パルス幅を得るため1kW程度の電力が必要である。従来、NB(ナローボア)プローブでは300W程度しか扱えないので、WB(ワイドボア)プローブを使う必要があった。しかし、より高磁場に対応するには、WB(ワイドボア)よりも、NB(ナローボア)のほうが有利である事は、言うまでもない。そこで、電気回路とフレームを改良して、NB(ナローボア)プローブの耐圧を改良した。

【改良について】

電気回路方式を平衡回路とし、さらに円筒フレームを採用して、耐圧を向上させた。

1) 電気回路 平衡回路

従来の固体プローブ回路は、不平衡回路が多い。そのため、検出コイルの片側がグランド電位になるので、コイルに発生する電圧がそのまま電気回路に加わってしまう。それに対して、溶液プローブに使われている平衡回路の場合は検出コイルの中点がアース電位となる。そのため、電気回路に加わる電圧は不平衡回路の半分になり、4倍の電力を扱える。

2) 円筒フレーム

従来、固体プローブのフレームは支柱や円板で構成されていた。今回、中空の円筒をフレームとして使い、内壁に部品を取り付ける方式を採用した。この方式には以下のような、有利な点がある。

・低インピーダンスグランド

溶液高磁場(800MHz)プローブでもこの円筒フレームを使用している。グランド面が広く確保できるので、グランドのインピーダンスを小さくして電力損失を軽減できるからである。また、グランドが安定に確保できるので、電気特性のよい回路を製作できる。

MQ-MAS, 高耐圧、実装

はせがわ けんいち、ひおか かつや、かなり さらら、えぐち たけふみ、  
 すぎさわ ひさし、くりはら のりあき

・高耐圧部品の実装が可能

プローブの耐圧はほとんどバリコンの耐圧で決まってしまう。ところが、従来構造の場合には支柱などが実装スペースを占拠するため、大型の高耐圧電気部品は実装できず、耐圧4 kV程度のバリコンの実装が限界だった。

円筒フレームの断面は輪なので、電気部品の実装スペースを無駄に占拠しない。それで、WB (ワイドボア) 固体プローブに使われている耐圧10 kV程度の大型バリコンの実装が可能になった。

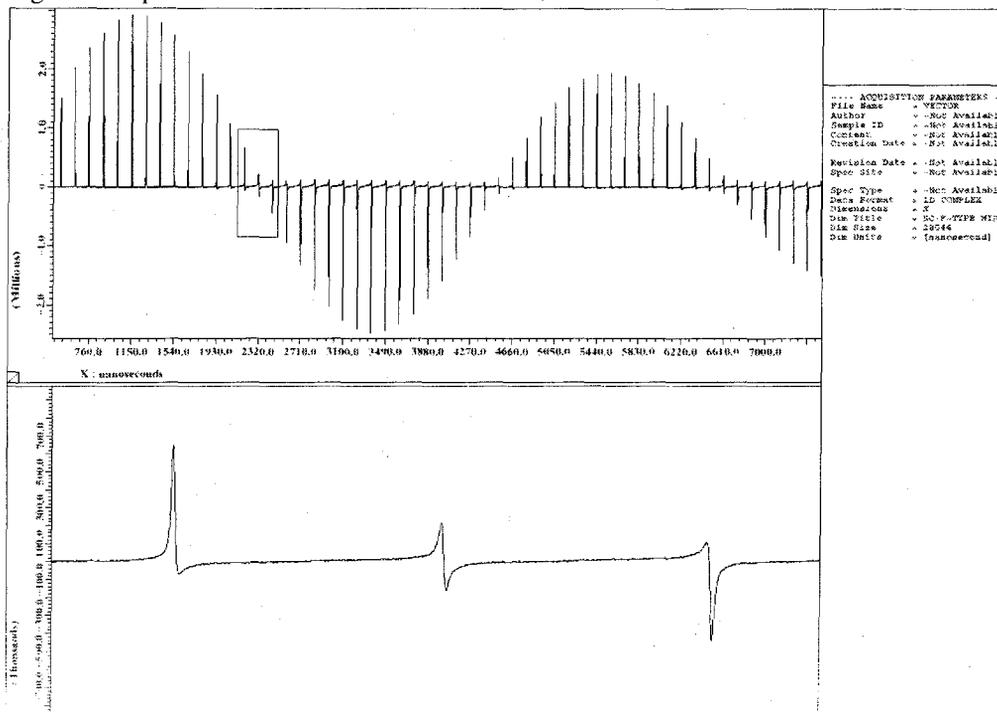
【結果】

600 MHz NB (ナローボア) SCM用 試料管 直径4 mm で、<sup>79</sup>Br (150.3 MHz) シングルチューニングプローブを試作した。1 kW入力時 <sup>79</sup>Br (150.3 MHz) パルス幅1.2 μsecを得た。Fig. 1 参照。

【考察】

NB (ナローボア) プローブでも1 kW程度の電力が扱える。平衡回路と円筒フレーム採用は有効である事が確かめられた。今後、シングルチューニング回路だけでなく、ダブルチューニング回路などの応用が期待できる。

Fig. 1 The pulse nutation measurement <sup>79</sup>Br (150.3 MHz)



文献

1. L. Frydman, J.S. Harwood, J. Am. Chem. Soc. 117(1995)5367.
2. F. David Doty, Ruth R. Inners, and Paul D. Ellis, J. Mag. Reson. 43, 339-416 (1981)

ハイスルーブット NMR 測定を目的とした  
重溶媒自動置換サンプリング装置の開発  
(日本電子(株)<sup>1</sup>、中外製薬(株)化学研究所<sup>2</sup>)

○津野久幸<sup>1</sup>、藤井直之<sup>1</sup>、高瀬俊和<sup>1</sup>、藤原伸也<sup>2</sup>、小竹健一郎<sup>2</sup>、小玉啓文<sup>2</sup>

Multiple Automatic Deuterated Solvent Exchanger for NMR Measurements

Hisayuki Tsuno<sup>1</sup>, Naoyuki Fujii<sup>1</sup>, Toshikazu Takase<sup>1</sup>, Shinya Fujiwara<sup>2</sup>, Ken-ichiro Kotake<sup>2</sup>, Hirofumi Kodama<sup>2</sup>

LC-NMR and tubeless NMR samples often have large solvent peaks that overlap and obscure important sample peaks. We have developed the Automated Sample Preparation Instrument that removes or reduces these solvent peaks by exchanging the original solvents for deuterated solvents while maintaining high sample throughput. The turntable automatically performs simultaneous operations such as sample aspiration and transfer, sample dispensing into mini-tube, evaporation with heated nitrogen gas, dispensing and mixing of deuterated solvents, aspiration and injection into an NMR flow probe, and sample recovery and unloading into a mini-tube rack. This instrument enables us to perform high throughput NMR measurements of pharmaceutical samples.

はじめに

近年、特に創薬研究開発過程において大量のサンプルを迅速に測定して解析するいわゆるハイスルーブット測定への要求が顕著になっている。NMR は主に有機化合物の構造をより正確に決定できる分析機器として発展を続けているが、サンプリングに高精度で高価なサンプル管と重溶媒を必要とするため、他の分析機器と連携させたハイスルーブット測定を行うことは難しかった。そこで今回軽溶媒に溶けたサンプルを複数、自動的、連続的に重溶媒に置換した後、Tubeless NMR プローブに送液してハイスルーブット NMR 測定が行えるサンプリング装置を開発した。

装置概要

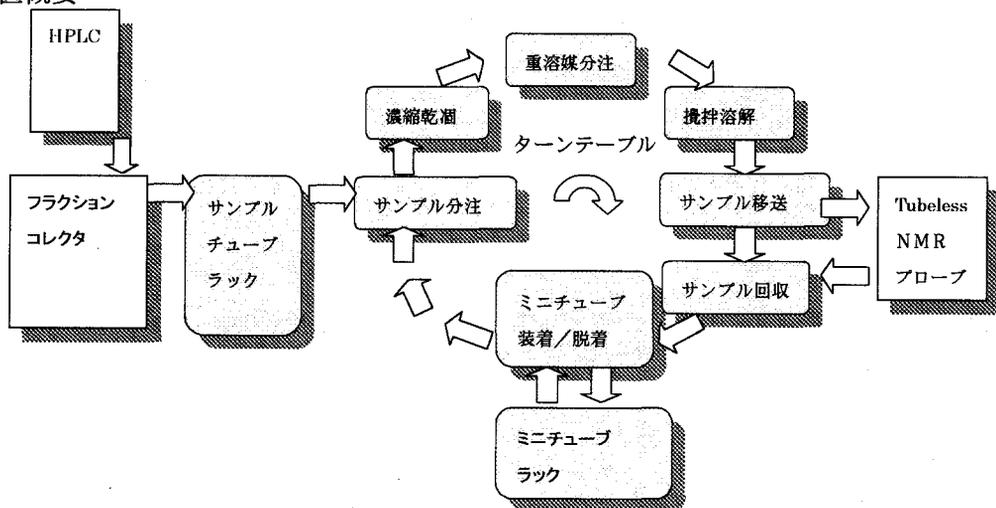


Fig.1 装置概要図 (灰色部分が今回開発したサンプリング装置に相当)

キーワード ハイスルーブット NMR、重溶媒置換

つのひさゆき、ふじいなおゆき、たかせとしかず、ふじわらしんや、こたけけんいちろう、こだまひろふみ

装置概要図を Fig.1 に示す。HPLC 等で分離されたサンプルはフラクションコレクタで分取された後サンプルチューブラックに移送され、さらにターンテーブル上のミニチューブに分注される。ターンテーブルはミニチューブを乗せながら順次回転するが、その間に軽溶媒は濃縮乾涸される。続いて重溶媒が分注されてサンプルは攪拌溶解されることにより重溶媒に置換される。さらにサンプルは TubelessNMR プローブのセル内に自動移送され NMR 測定が行われる。測定が終わったサンプルはミニチューブに回収され、ラックに保持される。ラックは一度に 150 個までのミニチューブを保持することができる。また重溶媒は重クロロホルム、DMSO、重水などを使用することができる。

## 測定結果

Fig.2 に Santonin 5mg/CHCl<sub>3</sub>、CH<sub>3</sub>OH、CH<sub>3</sub>CN、C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O 1cc の <sup>1</sup>H-NMR データ (400MHz) と、同じサンプルを重溶媒自動置換サンプリング装置を用いて自動的に CDCl<sub>3</sub>(99.8%) 0.5cc に重溶媒置換して全自動測定した <sup>1</sup>H-NMR データを示す。

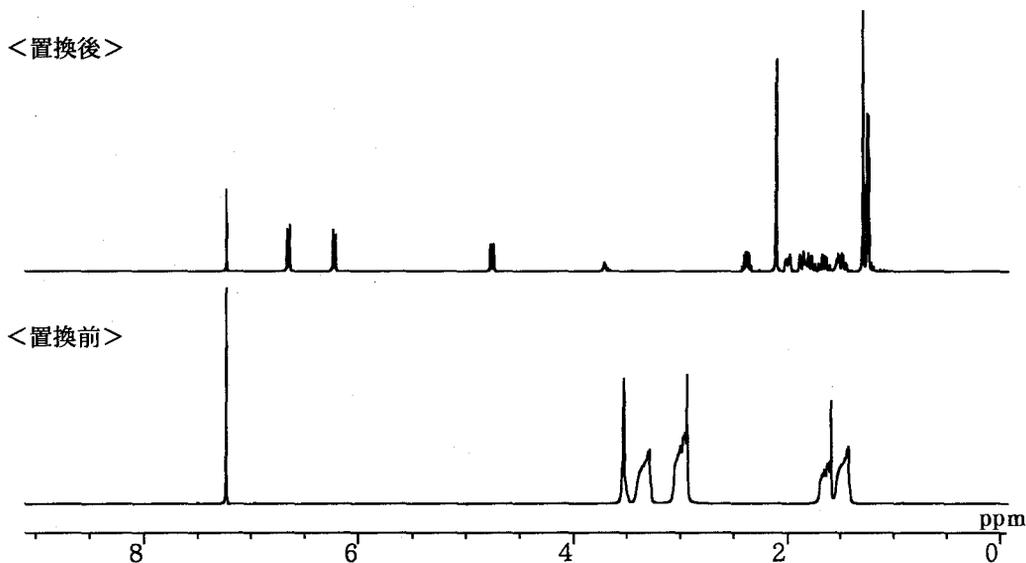


Fig.2 軽溶媒に溶けた Santonin 5mg を重溶媒に置換した前後のデータ

置換前では当然ながら軽溶媒の信号のみしか十分には観測されていないし、溶媒シフトも複雑におこるため解析が困難であることがわかる。置換後には Santonin の <sup>1</sup>H-NMR 高分解能測定が可能になっていることがわかる。

## 考察

HPLC などでは二種類以上の軽溶媒を用いてサンプルの分取を行うことも多い。これをそのまま NMR で解析すると簡単には <sup>1</sup>H-NMR 高分解能データを得るのは困難である。重溶媒自動置換サンプリング装置を用いれば容易に、しかも連続的に <sup>1</sup>H-NMR 高分解能データを得ることができ、特に創薬研究開発の効率化に大きく寄与することが期待できる。さらに NMR が他の様々な分析機器と連動した形でハイスループット測定に対応できるようになることで、NMR のルーチン測定に新しい方向性が出てくることも期待できる。

## InP 等の化合物半導体による NMR 量子計算機

(物質・材料研究機構) ○清水禎、端健二郎、後藤敦  
(JST-CREST) 大木忍  
(東京理科大) 宮部亮

### An NMR Quantum Computer on a Compound Semiconductor

T. Shimizu, K. Hashi and A. Goto (National Institute for Materials Science, Tsukuba)  
S. Ohki (JST-CREST)  
R. Miyabe (Tokyo Science University)

Since a specific algorithm for a quantum computation was proposed, extensive efforts have been made to achieve the realization of a quantum computer by many experimental methods including quantum optics, SQUID devices, ion trap, laser cooling, nano-structured devices, spintronics, electron array on liquid-He and NMR. The best realization achieved so far is the 5-qubits solution NMR. It is expected that solid-states would be better than solutions for NMR to improve beyond 10-qubits. Our study is focused on the basic research of material design and developing a new NMR technique needed for a solid state NMR computer, especially from the view point of what kind of nuclear interaction is available in what kind of material is used. We present a proposal of an NMR quantum computer on the isotope superlattice of compound semiconductors InP and CdTe. The dynamic nuclear polarization by optical pumping method is a key technique to prepare a quasi-pure quantum state and improve sensitivity high enough to make the NMR/MRFM detection from a microscopic device possible.

量子計算機の具体的なアルゴリズムが発表されて以来、さまざまな実験手法によって量子計算の実現へ向けての努力がなされている。今までのところ、量子計算を実行したとされる実例は溶液 NMR のみで、しかもまだ 5Q ビットしか達成されていない。NMR を用いる方法で 10Q ビット以上の量子計算機を開発するには固体 NMR の方が適切であると予想されている。

当グループでは、10Q ビット以上の NMR 量子計算機を開発するために必要な基盤的研究を行っている。特に、「どのような固体材料を用いると、どのような核スピン間相互作用が計算に利用できるのか？」という観点から物質探索と NMR 技術開発の両面から研究を行っている。

本報告では具体例として、化合物半導体を用いて NMR 量子計算機を構築する場合の一つの方法について提案を行う。

---

量子計算機、半導体、光ポンピング、同位体超格子、MRFM

しみずただし、はしけんじろう、ごとうあつし、おおきしのぶ、みやべりょう



## 強磁場NMRの技術開発

物質・材料研究機構 ○端 健二郎、清水 禎、後藤 敦  
東京理科大学 宮部 亮  
JST-CREST 大木 忍

### Development of high field NMR technique

National Institute for Materials Science ○K.Hashi, T.Shimizu, A.Goto  
Sci.Univ.Tokyo R.Miyabe  
JST-CREST S.Ohki

#### Abstract:

We have performed high field proton FT-NMR measurements using the superconducting magnet operating at 21.6 T (920 MHz for proton) in persistent mode. Utilizing the superconducting and room temperature shim coils for solid, the resolution of 4 Hz for FT spectrum of H<sub>2</sub>O is achieved.

#### はじめに

タンパク質の構造解析のためにNMRの強磁場化が行われており、特にTROSY法が最も有効となる1GHzでのNMRが求められている。これまでに、超伝導線材の改良などにより永久電流モードで21.6T（プロトンに対して920MHz）の超伝導磁石が物質・材料研究機構と（株）神戸製鋼によって共同開発されている。本研究では、この超伝導磁石を用いたNMRを行うために、分光計、室温シム、プローブなどの開発を行い、920MHzにおいて水およびエチルベンゼンの高分解能1H-NMRを行った。

#### 実験

分光計はオールソリッドステート化され500MHzから1GHzまでをカバーするパワーアンプを（株）サムウェーと共同開発した。プローブは19チャンネルの固体用マトリックス型室温シムと一体型としたプローブを（株）日本電子と共同開発した。試料は標準試料として水およびエチルベンゼンを選び、シングルショットの信号を観測した。

キーワード：強磁場 高分解能 水 エチルベンゼン

○はし けんじろう、しみず ただし、ごとう あつし、  
みやべ りょう、おおき しのぶ

## 結果とまとめ

図1に水のFT-NMRスペクトルを示す。固体用室温シムを調整することにより半値全幅4Hzを達成した。また、図2にエチルベンゼンのFT-NMRスペクトルを示す。ベンゼン環およびエチル基に対応するシグナルを明瞭に観測した。

以上のことから、超伝導磁石および超伝導シムは溶液用高分解能NMR磁石として十分に高い完成度に達しており、今後、溶液用の室温シム、プローブ、分光計を開発することによりシステムとして完成できることが明確になった。

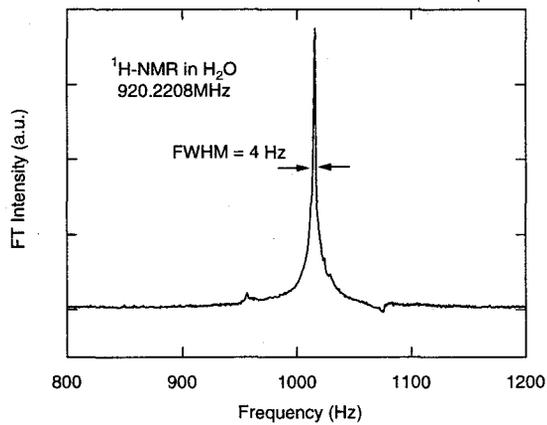


Fig1.  $^1\text{H}$ -FT-NMR spectrum of  $\text{H}_2\text{O}$  measured at 920 MHz

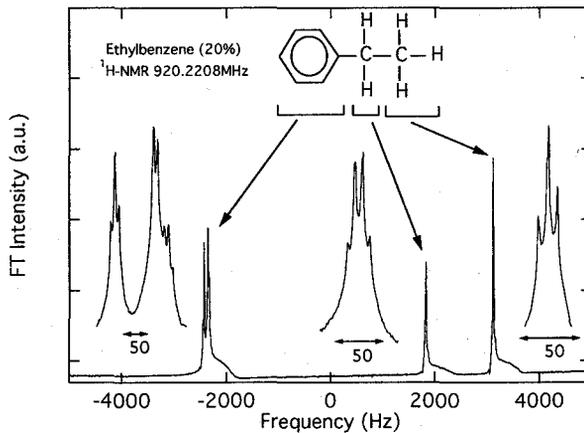


Fig1.  $^1\text{H}$ -FT-NMR spectrum of ethylbenzene measured at 920 MHz

## 光ポンピング NMR 技術の開発

(東京理科大学、物質・材料研究機構) ○宮部亮  
(物質・材料研究機構) 端健二郎、清水禎、後藤敦、木戸義勇  
(JST) 大木忍、町田進

Development of the Optically Pumped NMR  
(Science Univ. of Tokyo、NIMS) ○R.Miyabe  
(NIMS) K.Hashi, T.Shimizu, A.Goto, G.Kido  
(JST) S.Ohki, S.Machida

We have developed an optically pumped NMR (OPNMR) technique for InP in high magnetic fields at low temperatures. This technique makes use of the spin-selective inter-band excitations of the electrons in semiconductors by polarized laser lights. The polarizations of the conduction electron spins pumped by the circularly polarized laser lights are transferred to the nuclear spins via hyperfine couplings. This process enables us to obtain significantly enhanced NMR signals in a semiconducting wafer. We have set up the several optical systems for the OPNMR, and succeeded in observing the enhanced NMR signal and the shortening of  $T_1$  for  $^{31}\text{P}$  under the laser irradiation.

### 1. はじめに

我々は半導体薄膜からの微弱な核磁気共鳴信号を、レーザー光を用いて劇的に増強させる「光ポンピング NMR 技術」の開発を行っている。今回は測定対象として InP の  $^{31}\text{P}$  核を選んだ。InP のバンドギャップに相当する波長(約 850nm)をもつ円偏光のレーザー光を InP 薄膜に照射すると、価電子帯の電子は伝導帯に励起されるが、その際、レーザー光の円偏光性のため角運動量を保存するある一方向のスピンの電子が選択的に励起される。一方、電子スピンと  $^{31}\text{P}$  原子核スピンはお互いに平行になろうとする働きがあるので、この一方向に揃った電子スピンは、核スピンを上向き方向に偏極させるように働く。この「光—電子—核」間の一連の現象により、最終的に下向き  $^{31}\text{P}$  原子核スピンの電子が上向きに pump され、結果として、NMR 信号が大幅に増強される。

キーワード: InP、光ポンピング、技術開発

著者: ○みやべ りょう、はし けんじろう、しみず ただし、  
ごとう あつし、きど ぎゆう、おおき しのぶ、まちだ すずむ

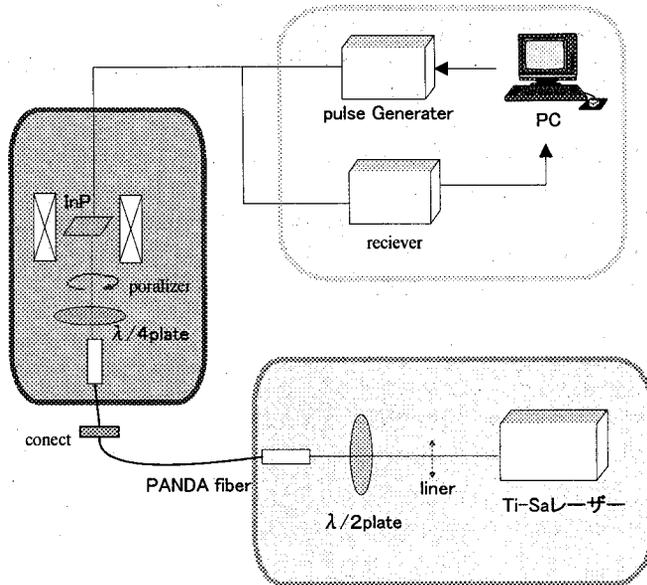


Fig.1 Optical system etc. for OPNMR

## 2. 実験装置

OPNMR の実験に用いた光学系を Fig1 に示す。半導体レーザーから発信した 850nm の直線偏光を  $\lambda/2$  波長板と PANDA ファイバーを介して試料に送る。このとき PANDA ファイバー内では直線偏光性が保たれる。ファイバーから出てきた光を試料の手前で円偏光させて試料に照射する。(Fig.2)  $^{31}\text{P}$  核スピンの偏極を待ち、 $^{31}\text{P}$  の NMR 測定を行う。

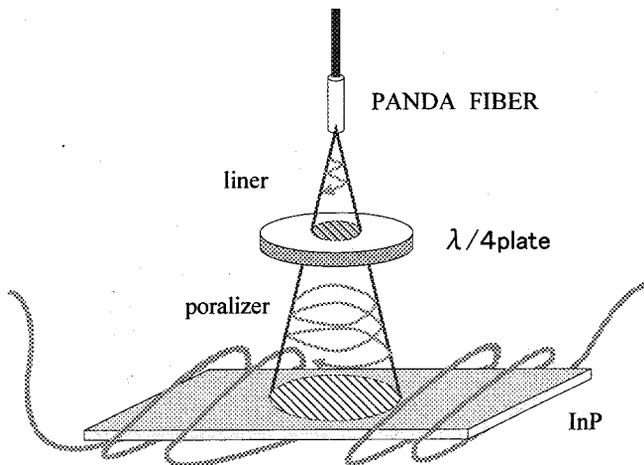


Fig.2 Radiated Optical Polarization

## 3. 結果

開発状況、実験結果に関しては発表当日に報告する。

## 高温動作超偏極 Xe ガス発生装置

(産業技術総合研究所 光技術研究部門 デバイス機能化技術グループ)

○服部峰之、平賀隆

Hyperpolarization Apparatus for Xe gases operating under Higher Temperature  
 Photonic Device Application Group, Photonics Research Institute,  
 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology  
 AIST Tsukuba Central 2, 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki 305-8568 Japan.  
 Mineyuki Hattori and Takashi Hiraga

A specialized flow-through type apparatus for Xe polarization which is installed just before the nuclear magnetic resonance detector, and is free from He buffer gas and cold-trap storage is proposed. The efficiency of hyperpolarization increased by increasing the partial pressure of rubidium vapor that absorbs the light in the flow apparatus. A linear diode laser arrays (794.7nm, 20W) was used as light sources and the arrays are arranged so that all the gas flowing through the cell passes through the region where the pumping light is sufficiently intense for. This design enables the device to continuously generate hyperpolarized Xe gas. The prototype of this apparatus was constructed and the performance for the polarization of natural abundant Xe gas was evaluated. In order to optimize the pumping condition, flow rate and temperature of the cell was varied.

**【序論】**  $^3\text{He}$ ,  $^{129}\text{Xe}$  の核スピンの 1/2 の希ガスは、Rb の  $D_1$  線 ( $5^2S_{1/2}-5^2P_{1/2}$ ) を光ポンピングしたアルカリ金属原子とのスピン交換を行って、NMR 信号を飛躍的に増強できる[1]。MRI 診断用に大量発生を想定した、出力 100W 程度のダイオードレーザーを励起源とした装置として、 $^4\text{He}$  をバッファガスに用いて  $^{129}\text{Xe}$  を運び偏極させ液体窒素でトラップして貯蔵する装置の開発が進められている[2]。Rb 濃度を高めることができれば、励起光を強くして Xe 核と偏極 Rb との衝突回数も増大させられ、偏極効率を効果的に上昇させられることが予想される。また、これまでの円筒状ガラス容器を採用した偏極装置[2,3]では、励起光強度は入射方向の入射面からの距離に依存して指数関数で減少する。円筒状ガラス容器内での Rb 等の濃度は、励起光が強い部位に最適化して決定するため、入射面からの距離が離れた励起光強度が弱い部分かなりの体積を占めることになる。こうした励起効率の低い部位での偏極率の低下は、ガス分子が対流・拡散によって効率の高い部位に移動することにより解消されるが、全体の励起効率を低下させている原因となる。フローセルを用いて常圧付近で安全にガスを流しながら偏極希ガスを製造し、後方に核磁気共鳴装置を配置することで連続的に偏極希ガスを発生させた後、偏極率を減少させずに短時間で NMR 測定を行える偏極装置[4]について、セルの材質及び形状に関して、高偏極率の希ガス発生方法の最適化について考察する。

**【実験】** Rb の数密度を増加させる方法として、ここでは、偏極操作を行うセル部分の温度を上昇させることを考える。Rb の蒸気圧の温度依存性を Fig. 1 に示す[5]。これから、Rb 金属を透明なセルに封入して、Rb ランプからの光を照射すると、透過する光量は、セルの温度の上昇に伴い、減少することが期待される。パイレックス及び石英でできたセルに Rb を封入し、温度を上昇したところ、パイレックスセル中の Rb は 180℃以上で酸化してしまったのに対し、石英セル中の Rb は、300℃以上、金属光沢を保持していた。Fig. 2 に Rb ランプ光の透過率の実測値を示す。

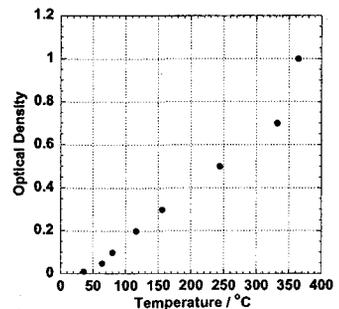


Fig. 1 Vapor Pressure of Rb

キーワード： $^{129}\text{Xe}$ 、超偏極、光ポンピング、スピン交換、石英セル

はっとりみねゆき、ひらがたかし

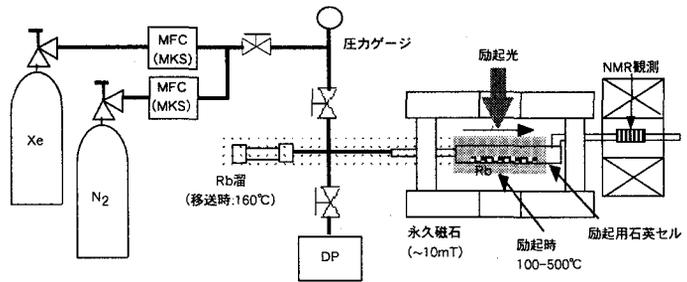
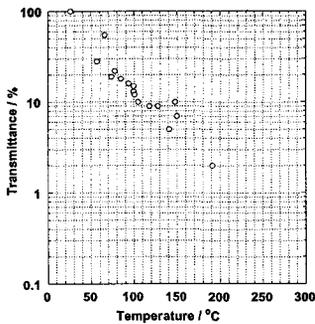


Fig. 2 Transmittance of 795nm light Fig. 3 Hyperpolarization Apparatus for Xe gases operating under Higher Temperature

【装置】 Fig. 3 に高温動作偏極装置の概略を示す。Xe, N<sub>2</sub> ガス(日本酸素:99.995%高純度ガス)は、マスフローコントローラー(MKS:M-100-11C, M-310-01C)で、流量(Xe:~10sccm, N<sub>2</sub>:~1sccm)を制御した。その後、ラインで混合され、あらかじめ Rb 金属を薄膜状に蒸着した石英製励起セル(~50mm × 70mm × 1mm)へ導入される。セルは、0.1mm 厚 Al 板で作った窓付きの炉中に設置し、ライスター熱風機を用いて、室温~500°C 程度の温度に保持することが可能である。光ポンピング過程は、10mT 程度の磁場中で行うと効率がよい。ここでは、Fig. 3 に示した、住友特殊金属製の永久磁石を利用した。4本の支柱を持ち、上下の磁性ステンレス鋼板には励起光を磁束と平行に入射できる開口(80mm φ)を設けた。励起光には、GaAlAs ダイオードレーザー (OptoPower:OPC-A020-795-CSPS;795.11±1nm,20W)を使用した。ビーム(エミッタサイズ 200μm×1μm)をλ/4 波長板(CVI:QWPO-795-10-4-R15)を通して回転偏光にした後、セルの 1mm 厚さ方向から入射した。セルを出た後の混合ガスは、炉外の管にでると冷却され Rb 蒸気は除かれる。こうして、生成した偏極 Xe ガスの偏極率を電磁石(~0.7T)又は、永久磁石(0.3T)を利用した、パルス方式 NMR 装置(サムウェイ:3.553MHz)を使って、時間をおいてモニターした。

【まとめ】 これまで、希ガス偏極実験には、パイレックス系ガラスが主に用いられてきた。(最近では、GE180 が最良であるといわれている。)これは、ガラス壁による緩和効果が小さいことによると報告されている。石英は、一般に常磁性不純物の混入が少ないので、緩和に関してもパイレックスより優れているはずであるが、加工温度が高いこと、内圧が上がると割れやすいなどの理由でこれまで敬遠されてきたようである。今回の実験から、500°C 程度の高温で、Rb 金属を酸化させないで保持できることが確認された。高温での高密度アルカリ金属を利用した、高効率偏極装置のセルへの利用の適性を確認できた。

#### 【参考文献】

- [1] W. Happer, E. Miron, S. Schaefer, D. Schreiber, W. A. van Wijngaarden, and X. Zeng, Phys. Rev. **A29**, 3092 (1984).
- [2] B. Driehuys, G. D. Cates, E. Miron, K. Sauer, and W. Happer, Appl. Phys. Lett. **69**, 1668 (1996).
- [3] M. E. Wagshul and T. E. Chupp, Phys. Rev. **A40**, 4447 (1989). ; W. J. Cummings, O. Hausser, W. Lorenzon, D. R. Swenson, B. Larson, Phys. Rev. **A51**, 4842 (1995).
- [4] 服部峰之、平賀隆、守谷哲郎, 第 36 回 NMR 討論会講演要旨集, P9, 103 (1997).
- [5] T. J. Killian, Phys. Rev. **27**, 578 (1926).

## 超並列型 MR マイクロスコープの開発

(1 筑波大学物理工学系, 2 (株) エム・アール・テクノロジー,  
3 筑波大学臨床医学系)

○松田善正<sup>1</sup>, 拝師智之<sup>2</sup>, 宇津澤慎<sup>2</sup>, 山崎由香子<sup>1</sup>, 巨瀬勝美<sup>1</sup>, 阿武泉<sup>3</sup>

Development of Super-Parallel MR Microscope

1. Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 2. MR Technology Inc.,

3. Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

○Y. Matsuda<sup>1</sup>, T. Haishi<sup>2</sup>, S. Utsuzawa<sup>2</sup>, Y. Yamazaki<sup>1</sup>, K. Kose<sup>1</sup>, H. Anno<sup>3</sup>

A novel parallel MR microscope, which consists of an array of coils and individually shielded RF coils, and multiple transmitter and receiver system, was proposed. The gradient coil array was made of unshielded gradient coil systems, which generate magnetic fields at both sides of the coils. The system concept was experimentally verified using an eight-channel probe array and two compact MRI consoles. An eight-channel fully parallel MRI transmitter-receiver system is now in progress and the final system will be presented in the poster.

### 1. はじめに

多数のサンプルのMR撮像を, 短い時間に実施したいという要求が増えつつある. 特に, 生命科学分野における実験では, 特にその要求が強い. これに対して, サンプルを1個ずつ撮像する従来のMRマイクロスコープでは, 処理速度の点で問題がある. よって同様のシステムを多数使用する方法が考えられるが, 撮像操作が自動化されていない場合には, オペレーターの負担も膨大なものとなる.

よって, このような場合に対しては, 一人のオペレーターが多数のサンプルを同時計測できる「並列型」の計測システムが望まれる. 本研究では, 広い均一空間の中に, 勾配磁場プローブを多数配置し, 同一のパルスシーケンスで同時に多数のサンプルを計測するという超並列型マイクロスコープを提案し, このコンセプトの中核をなす8チャンネルの二次元アレイ型勾配磁場プローブを開発して, 複数のサンプルの同時撮像に成功した. さらに, 同時に8個のサンプルの撮像を可能とするMRI計測・制御系を開発中であるので, その開発経過を報告する.

### 2. 8チャンネル二次元アレイ型勾配磁場プローブの開発

超並列型MRマイクロスコープでは, 広い均一な静磁場の中に, 多数の勾配磁場プローブ

---

超並列型MRマイクロスコープ, 並列型, 二次元アレイ型勾配磁場プローブ, 8チャンネルMRIコンソール, MRI

まつだ よしまさ, はいし ともゆき, うつざわ しん, やまざき ゆかこ, こせ かつみ, あんの いずみ

を高い密度で配置することが基本的アイデアである。これを達成する方法として、多数のアクティブシールド型勾配コイルを使用する手法も考えられるが、本研究では、一つのサンプルに対する勾配コイルの外側の勾配磁場を、隣接するサンプルの勾配磁場となるように多数の勾配コイルを配置する手法をもちいた。これにより、勾配コイルシステムを容易に作成することができる。Fig.1に、8チャンネルの二次元アレイ型勾配磁場プローブにおける、勾配コイルの電流の方向を示し、Fig.2に開発したプローブヘッドを示す。

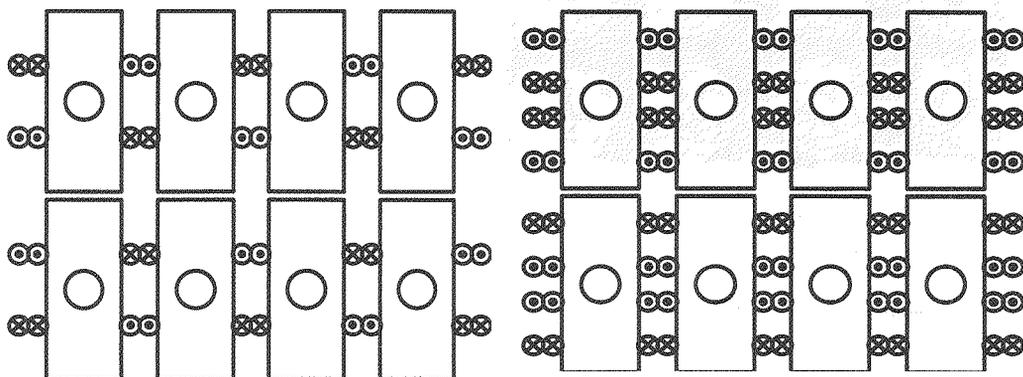


Fig.1 Current directions for Gz (left) and Gx or Gy (right) gradient coils.

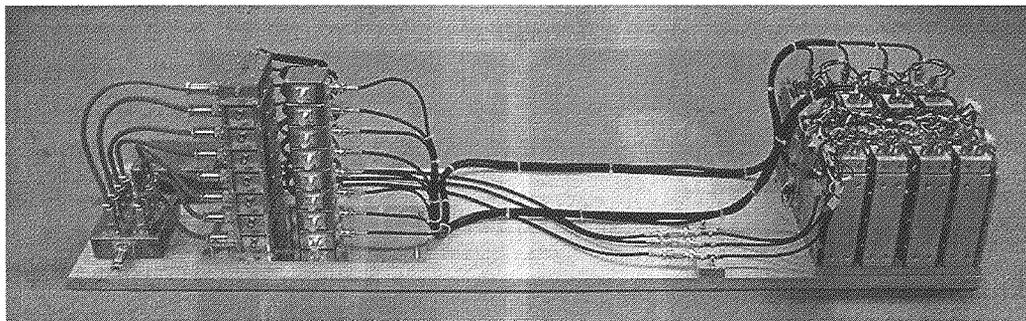


Fig.2: 8-channel Probe head for the super-parallel MR microscope.

### 3. 原理検証実験

均一静磁場としては、筑波大学病院の臨床用MRIの静磁場(1.5 T)を使用した。また、撮像装置としては、ポータブル型MRIコンソールを2台使用し、パルスプログラマと勾配磁場電源は1台のみを使用して、2台の送信系と全勾配コイルを制御した。

#### 3. 1. 勾配磁場の直線性と強度の評価

開発したアレイ型勾配コイルにおいて、勾配磁場の直線性を確認するために、すべての勾配コイルを同時に駆動しながら、8カ所の各撮像位置で、1台のMRIコンソールを用いて水ファントムの撮像を行った。水ファントムとしては、NMR用試料管にキャピラリを挿入して硫酸銅水溶液を満したものと、同様にナイロン球(直径 6.35mm)を挿入したものを

いた。Fig.3 に、個々の位置で撮像した水ファントムの二次元断層画像を示す。このように、勾配コイルを同時にドライブした場合でも、各サンプル位置に、直線性の良い勾配磁場が発生していることが確認された。なお、Table 1 に、ナイロン球により測定した勾配磁場発生効率を示す。

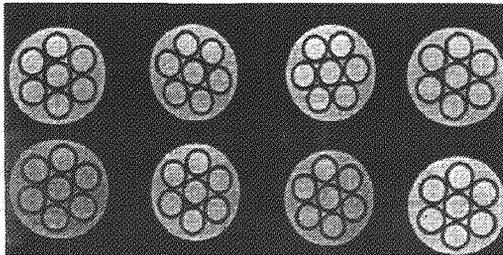


Fig.3 Phantom images separately acquired at eight sample zones

	X	Y	Z
Inner	2.1	2.0	2.0
Outer	2.1	2.0	1.9

Table.1 Experimentally measured efficiency of magnetic field gradient. (G/cm/A)

### 3. 2. 複数サンプルの撮像

開発したアレイ型勾配コイルを用いて、同時に複数のサンプルの撮像が可能であることを示すために、2台のMRIコンソールを用いた実験を行った。Fig.4 に、隣接する2カ所のサンプル位置で撮像したマウスの画像を示す。このように、信号の干渉のない、独立した画像が取得される。

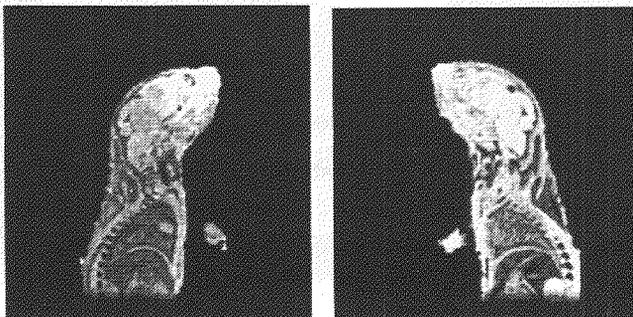


Fig.4 2D cross-sectional images selected from 3D data sets of two newborn mice simultaneously acquired at two sample positions.

voxel size = (200 $\mu$ m)<sup>3</sup> TR/TE = 100 ms / 8 ms NEX = 1 Time acq = 28 min

## 4. 8チャンネルMRIコンソールの開発

2Dアレイ型プローブと接続して、同時に8個のサンプルの撮像を可能とするMRIコンソールの開発を進めている。開発の方針は、1台のMRIコンソールと同様の大きさで、1人の操作者で容易に使えるシステムとすることである。以下、各部に分けて述べる。

### 4. 1. 送受信系

Fig.5 に、送信系と受信系のブロック図を示す。送信系では、共通のRFパルスを使用するため、生成したRFパルスをパワーディバイダで8分割することにより8個のRFパルスを生成する。受信系では、8個のRFコイルでそれぞれ検出され、8個のプリアンプでそれぞれ

れ増幅された NMR 信号を、8 分割された参照信号を用いて、それぞれ QPD 検波し、合計 16 チャンネルのアナログ信号を得る。受信系としては、中間周波数にダウンコンバートして、中間周波数の 4 倍の周波数でサンプリングする、いわゆるデジタル検波方式も検討したが、AD コンバータのコスト、PC の処理能力などの点から、アナログ検波方式を採用した。

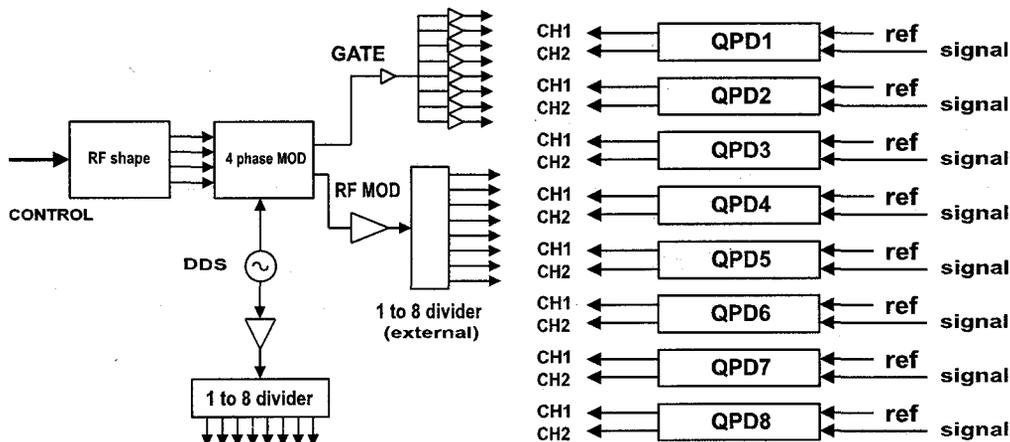


Fig.5 Block diagram of RF modulation system (left) and receiver system (right).

#### 4. 2. 送信機

RF 送信機としては、10W の出力を持つ 8 台の広帯域 (10~200MHz) NMR 用パワーアンプを並べることで実現した (サイズ: 幅 45cm, 高さ 15cm, 奥行き 55cm). 各チャンネル毎にパワー調整が可能であるため、90 度条件の調整も各チャンネル毎に可能である。

#### 4. 3. データ収集システム

14 ビット同時 8CH サンプリングが可能な AD 変換ボード (ADM-688PCI) を 2 枚同時に使用し、16 本のアナログ信号の同時サンプリングを行っている。アナログ検波方式のため、計算機の負荷は比較的軽く、繰り返し時間 100ms で、8 枚の画像の二次元リアルタイム画像再構成表示が可能であることを確認した。

#### 5. むすび

8 個のサンプルが同時に撮像可能な、超並列型 MR マイクロスコープの構築に、技術的な見通しを得た。今後は、このシステムを用いた計測を行いつつ、さらに 100 チャンネル程度のシステムを構築するための技術を開発する予定である。

#### 参考文献

1. K. Kose, T. Haishi, Y. Matsuda, I. Anno, 9<sup>th</sup> ISMRM, 609.
2. Y. Matsuda, T. Haishi, S. Utsuzawa, Y. Yamazaki, K. Kose, I. Anno, 9<sup>th</sup> ISMRM, 1142
3. K. Kose, Y. Matsuda, T. Haishi, S. Utsuzawa, Y. Yamazaki, I. Anno, 6<sup>th</sup> ICMRM, C-25
4. Y. Matsuda, T. Haishi, S. Utsuzawa, Y. Yamazaki, K. Kose, I. Anno, 6<sup>th</sup> ICMRM, P-52
5. 巨瀬勝美、拝師智之、松田善正、「超並列型 MR マイクロスコープの開発—システムコンセプトと設計」第三十八回 NMR 討論会要旨集 2L4
6. 松田善正、拝師智之、巨瀬勝美、「超並列型 MR マイクロスコープの開発—勾配コイルシステムの開発」第三十八回 NMR 討論会要旨集 P70
7. 「NMR マイクロスコープ装置」、特許 2000-266247.

## デュアルブロードバンド XHY PFG プロープの開発

(日本電子(株)) ○岡田輝政、池田博、桜井智司、末松浩人、栗原範明

### Development of a dual broadband XHY PFG probe

(JEOL Ltd.) ○Terumasa Okada, Hiroshi Ikeda, Satoshi Sakurai, Hiroto Suematsu, Noriaki Kurihara

A dual broadband probe was developed, which is a 5 mm XHY type probe for liquid sample with PFG capability. This probe can be used for triple resonance experiments, for example X observation with {H,Y} decoupling and H observation with {X,Y} decoupling. H channel can be tuned for  $^1\text{H}$  or  $^{19}\text{F}$ , and low frequency channels X and Y are possible to tune  $^{15}\text{N}$  to  $^{31}\text{P}$  and  $^{29}\text{Si}$  to  $^{31}\text{P}$ . Also this probe has a performance of variable temperature from  $-100^\circ\text{C}$  to  $+150^\circ\text{C}$ . This dual broadband PFG probe that is called XHY type probe can be useful for various kinds of measurements.

デュアルブロードバンド XHY PFG プロープは、X 観測-{H,Y}照射測定及び H 観測-{X,Y}照射測定を行うための溶液用 3 重共鳴プロープである。さらに PFG コイルも付いているので、PFG 測定も可能である。

このプロープは、H、X、Y、Lock の 4 つのチャンネルを持ち、2 つの観測/照射コイルで構成されている。内側のコイルは H 核と X 核のダブルチューンとなっており、H 核の観測/照射及び X 核の観測/照射に使われる。外側のコイルは Y 核と  $^2\text{H}$  核のダブルチューンとなっており、Y 核の照射及び NMR ロックに使われる。

各チャンネルの測定核は以下の通りである。

H チャンネル： $^1\text{H}$  核または  $^{19}\text{F}$  核

X チャンネル： $^{15}\text{N}$  核～ $^{31}\text{P}$  核

Y チャンネル： $^{29}\text{Si}$  核～ $^{31}\text{P}$  核

Lock チャンネル： $^2\text{H}$  核

キーワード 溶液 3 重共鳴プロープ

おかだてるまさ、いけだひろし、さくらいさとし、すえまつひろと、くりはらのりあき

プローブボディには、回路損失が少ないグラウンドプレーン型を採用した。また、X核、Y核には、チューニング、マッチング調整用のデジタルダイヤルが付いているので、再現性の良い操作が可能となっている。

試料管径は 5 mm、温度可変範囲は $-100^{\circ}\text{C}$ ～ $+150^{\circ}\text{C}$ である。

以上のように、本プローブは 2 つの独立したブロードバンドチャンネルを持っているため、1本で様々な種類の測定を行うことができる。

ポスターでは 400MHz で測定したデータ等を紹介する。

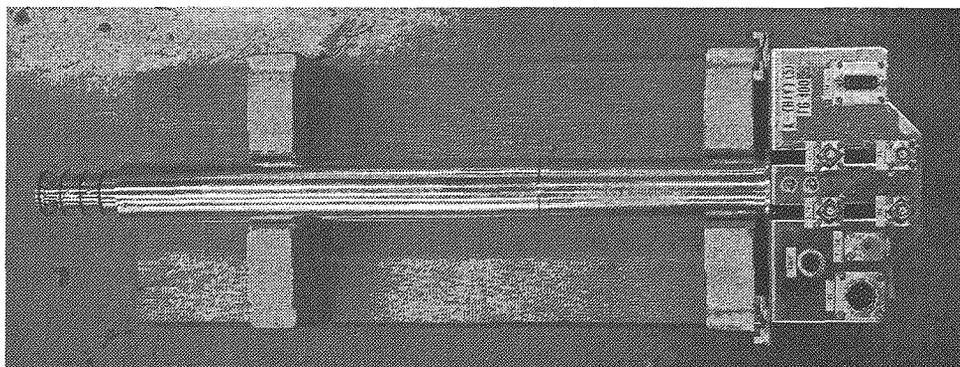


Fig.1. 5 mm dual broadband XHY gradient NMR probe (400MHz)

固体  $^{73}\text{Ge}$  NMR スペクトルの観測と緩和時間

(神奈川大理) ○西川実希、田中克己、竹内敬人

Solid State  $^{73}\text{Ge}$  NMR Spectrum and Its Relaxation

Miki NISHIKAWA, Katsumi TANAKA, Yoshito TAKEUCHI,

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University

It has generally been accepted that observation of  $^{73}\text{Ge}$  resonances in the solid-state would be extremely difficult, because of the low value of gyromagnetic ratio along with its nuclear spin of  $-9/2$  and large quadrupolar moment, which tend to cause excessive broadening of signals. We have previously reported the observation of the  $^{73}\text{Ge}$  NMR signals of some organogermanes in the solid-state. Here we report the  $^{73}\text{Ge}$  NMR resonance of metal germanium and its relaxation mechanism. The half width of the isotopically enriched metallic germanium was significantly broader than that of the natural abundance sample. The spin-lattice relaxation of the latter seems most likely to proceed via quadrupolar passway.

$^{73}\text{Ge}$  は大きな核スピン ( $9/2$ ) を有するとともに、磁気回転比が小さいため、NMR の観測が困難な核の一つとして知られ、固体状態における共鳴線の観測は不可能であるとさえ言われてきた。我々はこれまでに、ゲルマニウム化合物の構造研究の手法として、固体高分解能  $^{73}\text{Ge}$  NMR 法の開発に取り組み、初めて共鳴線の観測に成功するとともに、共鳴線の線幅とゲルマニウム原子の周りの対称性との間に相関が見られることを提案してきた。今回は、主として金属ゲルマニウムを用いて、緩和機構に関する研究を行ったので報告する。

これまでに金属ゲルマニウムにおけるスピン-格子緩和時間を報告した。さらに、 $^{73}\text{Ge}$  同位体濃縮された金属ゲルマニウムを用いて測定を行った。図 1 に、同位

【キーワード】  $^{73}\text{Ge}$  NMR、四極子緩和

【発表者ふりがな】 にしかわ みき、たなか かつみ、 たけうち よしと

体濃縮試料と、天然存在比の試料の固体  $^{73}\text{Ge}$  NMR スペクトルを示した。同位体濃縮試料では、同種核双極子相互作用に基づく有意の広幅化が観測された。一方 Vrekhovskii らは、 $^{73}\text{Ge}$  の同位体を 0.1 %まで希釈した単結晶金属ゲルマニウムについて、その線幅は天然同位体存在比の試料と差異を示さないことを報告している\*。この事実は、天然同位体存在比の金属ゲルマニウムの緩和機構において、双極子相互作用の寄与は無視できる程度であることを示唆する。

また、金属ゲルマニウムについて、いくつか異なる温度における  $T_1$  を測定した。常温で 10 s 程度であった  $T_1$  は、低温時にはおよそ 3 倍まで増大することが観測された (図 2)。

通常  $I > 1/2$  の核は、非常に効率の良い四極子緩和機構によって緩和するため、これらの核の溶液における  $T_1$  はミリ秒のオーダーである。しかし、固体試料においては、上述のように  $T_1$  は秒のオーダーであった。金属ゲルマニウムはダイヤモンド型の結晶で、 $^{73}\text{Ge}$  核の周りは四面体対称であるため、時間平均としては四極子相互作用がないが、格子振動により瞬間的に小さな値をもち、これが緩和に寄与することが考えられる。金属ゲルマニウムは、その構造から容易に予想されるように、比較的硬い分子で、緩和に寄与する適当な分子運動がないため、固体における緩和時間は相当に長くなると結論できる。

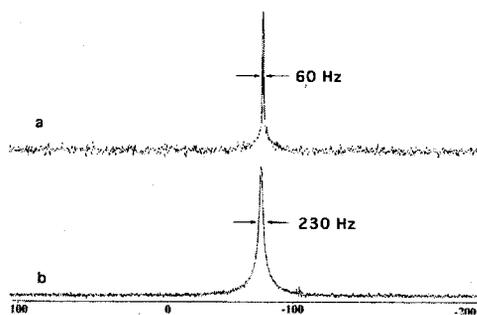


図 1 金属ゲルマニウムの固体  $^{73}\text{Ge}$  NMR スペクトル。(a) 天然同位体存在比の試料、および (b)  $^{73}\text{Ge}$  98 %濃縮試料。半値幅に有意差が見られた。

\* \* S.V.Vrekhovskii, B.Z.Malkin, A.Trokiner, A.Yakobovskii, E.Haller, A.Ananyev, A.Gerashenko, Yu.Piskunov, S.Saikin, A.Tikhomirov, V.Ozhogin, *Naturforsch A. phys. Sci.* **55**, 105 (2000).

**$^1\text{H}$  NMR の高精度定量性測定**

産総研 計測標準研究部門

○齋藤剛、木下美雪、張潤萍、井原俊英、衣笠晋一

**Accuracy and Precision of Quantitation in  $^1\text{H}$  NMR measurements**

National Metrology Institute of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Takeshi Saito, Miyuki Kinoshita, Runping Zhang, Hidetoshi Ihara, Shinichi Kinugasa

NMR can be used for determination of chemical purity without relying on reference materials. For this reason, NMR is expected to satisfy requirements for a primary method of measurement, which is defined by The Comité Consultatif pour la Quantité del Matière (CCQM) under Comité International des Poids et Mesures (CIPM). The primary method is a method having the highest metrological qualities, whose operation can be completely described and understood, for which a complete uncertainty statement can be written down in terms of SI unit. In this study, we report identification and evaluation of sources of uncertainties related to measurements of  $^1\text{H}$  NMR by using experimental design method.

はじめに

NMR は化学構造など情報を明確に与える、最も重要な分析機器であると言って過言でないであろう。化学構造、運動性などに関する研究は数多く行われている一方で、NMR の定量性の不確かさを評価した研究はまださほど多くない。現在 NMR は、国際度量衡委員会 (CIPM) の物質諮問委員会 (CCQM) で定義された、一次標準測定法になり得ることが期待されている測定法である。一次標準測定法とは、「最高の計量学的な質を有している方法であり、その方法の操作が完全に理解され得るものであり、その方法に対しての不確かさを SI 単位によって完全に書き下せるものであり、したがって、その方法の結果が測定しようとしている (種類の) 量の標準を参照することなしで受け入れられるもの<sup>1)</sup>」である。したがって測定および解析に起因する不確かさ因子を同定し、その因子が結果に与える大きさを個々に評価することが、一次標準測定法としての定量 NMR を確立するためには最低条件となる。本研究では、実験計画法に基づき、まず  $^1\text{H}$  NMR で高精度の定量実験を行う際に生じる装置起因の不確かさの大きな因子を同定し、評価・検討を行った。

方法

混合型直交表を利用した実験計画は、結果に大きな影響を与える因子を特定するために有用な方法なので、この方法を利用して測定時に制御可能なパラメーターのうち、NMR の定量性に

キーワード: 定量 NMR、不確かさ評価、一次標準測定法、CCQM、実験計画法

さいとうたけし、きのしたみゆき、ちゃんるんぴん、いはらとしひで、きぬがさしんいち

大きな影響を与える因子を特定することを試みた。まず実験装置に起因する因子のうち、不確かさを含むものの候補として、NMR 測定で制御可能なパラメーターである磁場の均一性、トランスミッターオフセットの位置、スペクトル幅、フィルタ幅、繰り返し測定時間、データ取り込み時間、測定温度、積算回数、レシーバーゲイン、パルス幅とパルス角度を取り上げた。取り上げた因子の数を考慮して、表 1 に示した混合型直交表  $L_{18}$  に割り付けた実験を計画した。 $L_{18}$  の直交表は、設計上の 2 水準の因子 A と 3 水準の因子 B、C、D、E、F、G、H の計 8 つの因子についての実験計画で、18 回の実験で 8 個の因子の寄与を評価する方法である。本来大きい効果を持つ因子の割り付けられている列の効果は、そうでない列の効果に比べて相対的に大きくなるので、本当に大きい因子の選別が理論上可能になり、最適条件を選ぶ上で誤りが少ない方法である。取り上げた 11 因子は制御因子、表示因子、信号因子、誤差因子に分類した。制御因子で影響が大きいと考えられる因子から順に、通常用いられるパラメーターとこの条件から外れた条件の水準を設定し  $L_{18}$  直交表に割り付けを行った。信号因子、誤差因子などは、表の外に割り付けた。実験を行う際には、割り付けた因子以外から来る影響が最小限になるように、同一測定試料を、同一の解析条件で検討した。結果については当日発表する予定である。

Table 1  $L_{18}$  orthogonal array. A through H represent eight factors, numbers under each factor are levels for each factor. Bolded numbers represent experiment numbers.

$L_{18} (2^1 \times 3^7)$								
No.	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	1	3	3	3	3	3	3
4	1	2	1	1	2	2	3	3
5	1	2	2	2	3	3	1	1
6	1	2	3	3	1	1	2	2
7	1	3	1	2	1	3	2	3
8	1	3	2	3	2	1	3	1
9	1	3	3	1	3	2	1	2
10	2	1	1	3	3	2	2	1
11	2	1	2	1	1	3	3	2
12	2	1	3	2	2	1	1	3
13	2	2	1	2	3	1	3	2
14	2	2	2	3	1	2	1	3
15	2	2	3	1	2	3	2	1
16	2	3	1	3	2	3	1	2
17	2	3	2	1	3	1	2	3
18	2	3	3	2	1	2	3	1

<sup>1</sup> 久保田正明編「標準物質—分析・計測の信頼性確保のために—」化学工業日報社(1998).

$^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  同位体効果を利用する塩素化ベンゼン類のNMR帰属

(シーエーシーズ 横浜分析センター) ○松原康史

 $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  Isotope Effect as a Key for Full  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Assignments of Chlorinated Benzenes

Yokohama Laboratory, Center for Analytical Chemistry and Science, Inc.

Koshi Matsubara

One-bond  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  isotope effects on  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts were effectively used to assign the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of three poly-substituted chlorobenzenes. In the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra measured with a digital resolution of 0.02 Hz per point, the chlorine-bonded carbons showed characteristic peak separation by about 4 ppb with a 3:1 area ratio, which corresponds to the natural abundance of  $^{35}\text{Cl}$  and  $^{37}\text{Cl}$  isotopes. The chlorine-bonded carbon signal was used as a key in the interpretation of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra when several 2D NMR techniques and the empirical additivity rules of the chemical shifts were insufficient for a definitive full assignment.

二次元NMR法の開発により有機化合物の構造解析に必要な時間は著しく短縮された。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC および HMBC スペクトルから部分構造を逐次結合して分子構造を構築する方法は極めて有効である。多くの分子構造に関する問題がこの方法で解決できるが、シグナルの重なりが全くないような単純なスペクトルでさえ完全には帰属できない場合がある。たとえば、二次元NMR スペクトルを解析するためには始めに鍵となるシグナルが必要であるが、その鍵がない場合である。 $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR とともに複数の帰属されていないシグナルが狭い化学シフトの範囲に集中する場合にこの状況になりうる。

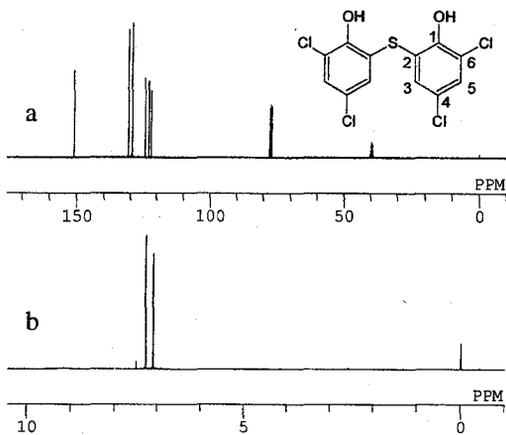
Fig.1 に 2,2'-thiobis(4,6-dichlorophenol) (1) の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを示す。二つの芳香族水素の化学シフトは 7.11 および 7.28ppm であり、0.17ppm の差は H3 と H5 を明確に帰属するには十分ではない。Fig.2 に示す  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  シフト相関 NMR スペクトルを解析すると、帰属の候補を以下の 2 種類に絞ることができる。すなわち  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  とともに高周波数側から (1) H5-H3, C1-C3-C5-C4-C2-C6, あるいは (2) H3-H5, C1-C5-C3-C4-C6-C2 である。ベンゼンの化学シフトに対する置換基効果にはある程度の加成性を期待できるが、置換基の数が多くなるほど加成則による計算値と実測値のずれは大きくなる傾向がある。C3-C5 ペアのシフト差は 1.4ppm, C2-C6 ペアのシフト差は 0.8ppm であり、上記候補のどちらが正しいかを定めるのは容易ではない。Fig.3 に示す 2D INADEQUATE スペクトルを解析しても状況は変わらない。特徴的な化学シフトから 151.0ppm のシグナルを酸素の結合した C1 に帰属し、そこからスペクトル上で水平、垂直方向に順次シグナルをつなぐことはできるが、それがベンゼン環にそって時計まわりなのか反時計まわりなのかは判別できない。

Fig.4 にデジタル分解能 0.02Hz/point で測定した  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを示す。122.2 および 124.4ppm のシグナルはそれぞれ強度比 3:1 で 4ppb 隔てられた 2 本のピークに分裂している。この分裂は炭素に直接結合した塩素の  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  同位体に起因する<sup>1)</sup>。したがって、この分裂のない 123.0ppm のシグナルは硫黄の結合した C2 となり、上記 (1) の帰属が極めて強く支持される。

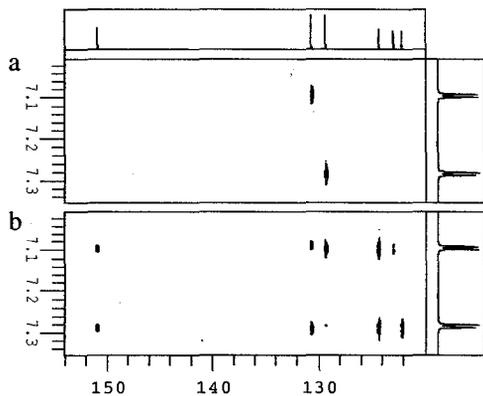
ポスターでは bis(4-chlorophenyl)sulfone と 4,5-dichlorophthalic acid の例も紹介する。

 $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  同位体効果, 塩素化ベンゼン

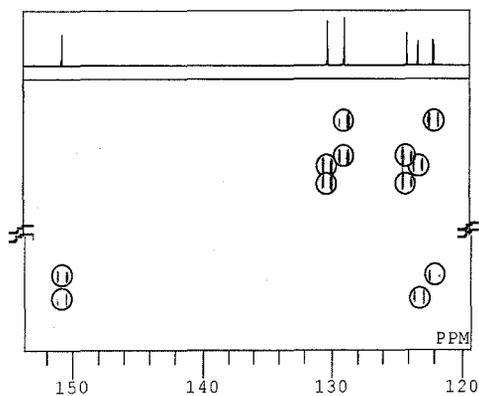
まつばらこうし



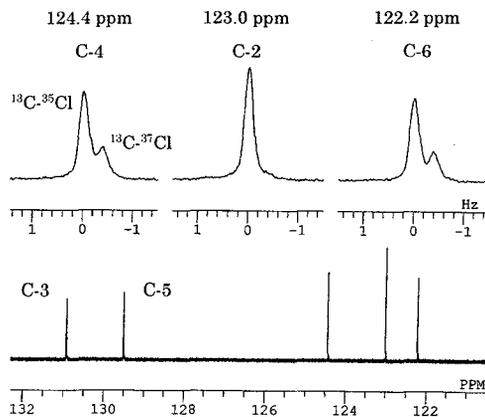
**Figure 1.** (a)  $^{13}\text{C}$  and (b)  $^1\text{H}$  NMR spectra of 2,2'-thiobis(4,6-dichlorophenol) (**1**) measured in  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO}-d_6$  (5:1, v/v) at 297K. Chemical structure and numbering is shown in (a).



**Figure 2.** (a) Direct and (b) long-range  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HETCOR spectra of **1** with 1D spectra at the top and on the right.



**Figure 3.** 2D INADEQUATE spectrum of **1** with 1D  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum at the top.



**Figure 4.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **1** with the expanded spectra for C-2, C-4, and C-6. Digital resolution was 0.02 Hz/point and no window function was used before Fourier transformation.

文献

1) W. Buchner and D. Scheutzw, *Org. Magn. Reson.* **1975**, *7*, 615.

HMBC法の新しい応用測定---HR-HMBC法について,  
東大院農・応生化、\*東農大・生応化  
○降旗一夫、\*瀬戸治男

High Resolution HMBC(HR-HMBC), a New Method for Measuring Heteronuclear Long  
Range Coupling Constants  
K. Furihata and H. Seto\*

Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo  
\* Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture

Structural analysis of natural products usually exploits HMBC that enables to detect carbon-proton long range correlations. It is, however, difficult to measure long range C-H coupling constants by analysis of cross peak multiplets due to poor resolution in the  $F_1$  or  $F_2$  dimension. Although several techniques to overcome this problem have been proposed for measuring long-range C-H couplings, they suffer from several practical problems associated with setting of suitable experimental conditions, limited observation field width, data processing, etc.

Although J-split multiplets due to  $J_{HH}$  and  $J_{CH}$  are observed in the  $F_2$ -dimension of HMBC spectra, observation of spin coupling constants directly from J-splitting cross peaks in the  $F_2$ -dimension is practically impossible. As an alternative to solve this problem, we have developed a new technique named High Resolution HMBC (HR-HMBC) by incorporation of J-scaling pulse sequence into the HMBC method. This method has turned out to be a useful method for measuring C-H long range coupling constants.

はじめに

天然有機化合物の構造解析において、long-range  $J_{CH}$  を如何にして効率良く測定するかが重要な課題の一つである。HMBC法は、long-range  $J_{CH}$  を利用した相関ピークを検出するために、広範に利用されている測定法であるが、そのクロスピークから直接 long-range  $J_{CH}$  を読みとることは困難である。この問題を解決するため、HMBC法を応用したlong-range  $J_{CH}$  の測定法が多数提案されているが、条件設定が困難、観測領域が制限される、あるいは解析が困難である等の欠点を有している。HMBC法では、 $F_2$ 軸方向に $J_{HH}$ や $J_{CH}$ のスピ結合によるJ-分裂が観測される。また、 $F_1$ 軸方向にはプロトン-プロトンによるJ-分裂が観測されるが、実際の測定では、 $F_2$ 軸、 $F_1$ 軸方向のいずれにおいても、J-分裂スペクトルから直接スピ結合定数を検出することは困難である。

我々は、既に、long-range  $J_{CH}$  を測定する一つの方法として、J-rezolved-HMBC-1,-2を報告してきた<sup>(1)</sup>。このJ-rezolved-HMBC-1は、 $F_1$ 方向でlong range  $J_{CH}$  を観測するという方法であるが、 $F_1$ 軸、 $F_2$ 軸方向にlong-range  $J_{CH}$  が観測されるために、クロスピークが複雑に分裂し、分離能が不十分な場合、小さなスピ結合の観測が困難となる場合があった。今回は、複雑なクロスピークを単純化し、 $J_{CH}$  の分離能を高めることを目的にHigh-Resolution-HMBC(HR-HMBC)法を検討し、良好な結果を得ることができたので報告する。

パルス系列

図1にパルス系列 High-Resolution-HMBC-1, -2,-3を示す。

HMBC法の磁化は、炭素の化学シフトと、プロトン-プロトンのスピ結合で展開している。しかし、 $\Delta t_1$ は短く設定されるため、小さなスピ結合が検出できるほど

High Resolution-HMBC、J-rezolved HMBC、long range  $J_{CH}$

ふりはた かずお、せと はるお

には $t_{1,max}$ を展開していない。例えば $F_1=30000\text{Hz}$ で512点測定しても $t_{1,max}$ は17msecに過ぎない。そのため、 $F_1$ 方向は、スピン-スピンカップリングを検出するには至らない。スピン結合定数を検出するためには、 $t_{1,max}$ が300msから500ms位まで展開する必要がある。HMBC法においてlong-range  $J_{CH}$ を観測するためには、 $J_{CH}$ の磁化を $t_{1,max}=300\text{ms}$ から500ms位まで展開しなくてはならない。そのために、HMBCのスピンの展開の後にJ-scalingパルス( $-nt_1/2-180(\text{H,C})-nt_1/2-$ )を導入する<sup>(2)(3)(4)</sup> (図1)。その結果、HMBC磁化は化学シフトに対しては $t_1$ 、プロトン-プロトンのスピン結合では $(n+1)t_1$ 、そして、炭素とのスピン結合に対しては $nt_1$ で展開する。スペクトルのサンプリング定理に従えば、2D-J-分解法の $t_1$ の設定において、 $t_{1,max}$ は観測するスピン結合定数 $1/J$ のオーダーを越えるように設定しなければならない。例えば、 $J=2\text{Hz}$ を観測するためには、digital resolutionが2Hz以下、 $t_{1,max}$ が500msec以上になるように設定する。HR-HMBC法においても、J-分解スペクトルの時間展開パラメータと同様に $nt_{1,max}$ がスピン結合定数 $1/J$ のオーダー(300msから500ms)を越えるようにscaling factor (n)を設定する。その結果、スピン結合定数は実際の値よりもn倍、あるいは、 $n+1$ 倍の値として観測される。

**High-Resolution-HMBC スペクトル**  
 図2はエチルベンゼンのメチル基プロトンからメチレン炭素とのlong range  $^2J_{CH}$ によるHR-HMBCのクロスピークを示す。通常のHMBCスペクトルからlong range  $J_{CH}$ を測定するためには、 $F_1$ 軸、 $F_2$ 軸を高分解能で測定をしなければならないが、実用的には、測定時

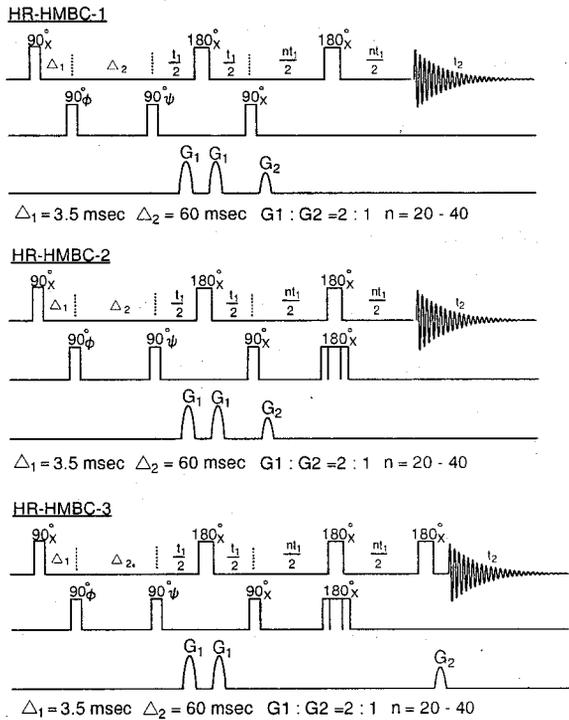


図1. High Resolution HMBCのパルス系列

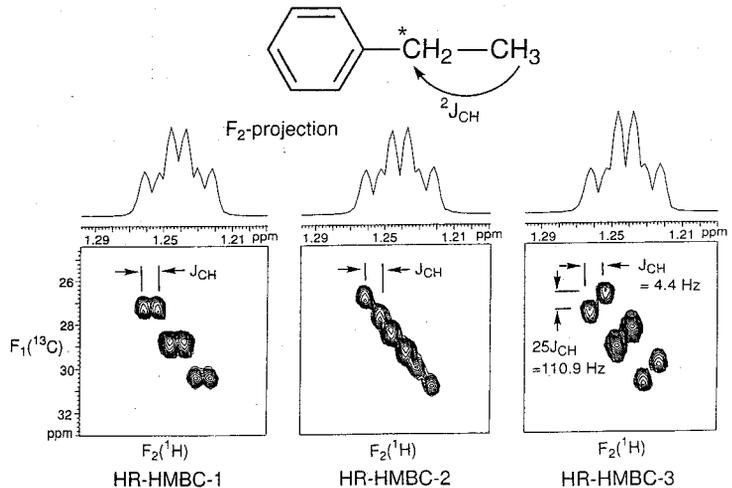


図2. EthylbenzeneのHR-HMBCスペクトル

$F_1/n$  resolution = 1.1 (Hz)、 $F_2$  resolution = 2.2 (Hz)  
 scaling factor (n) = 25、

間やマトリックスの大きさの制限からそのような設定は困難である。そのため、long-range  $J_{CH}$  と  $J_{HH}$  を分離し測定することは出来ない。

HR-HMBC-1のスペクトルは、 $F_1$ 次元において、 $J_{HH}$ がscaling法により、 $n+1$ 倍に拡大されている以外は、通常のHMBCのスペクトルと同じパターンを示す(図2a)。このスペクトルに示すように、 $F_1$ 次元の分解能を高めることにより、 $F_2$ 次元においては、 $J_{HH}$ と $J_{CH}$ が分離し、このスペクトルからlong range  $J_{CH}$ の値を読みとることが可能となる。

HR-HMBC-2においては、long-range  $J_{CH}$  と  $J_{HH}$  が同じ $F_1$ 方向に傾斜して観測される。そのため、プロトンの $J_{HH}$ の解析ができない場合は、long-range  $J_{CH}$  と  $J_{HH}$  を区別し観測することは困難になる(図2b)。

HR-HMBC-3においては、J-scalingパルスの最後に180度パルスを導入し、プロトンの磁化を反転する。炭素の磁化を反転させても構わない。その結果、long-range  $J_{CH}$  は、HR-HMBC-2とは逆方向に分裂し、 $J_{HH}$ の傾斜ラインが2本になって観測される(図2c)。しかも、分裂幅はHR-HMBC-1におけるlong-range  $J_{CH}$  による2本の傾斜ラインに対してほぼ2倍に広がっている。したがって、HR-HMBC-3は、 $F_1$ および、 $F_2$ 軸の分離能の低いスペクトルにおいても、long-range  $J_{CH}$ の観測が可能となる。また、HR-HMBC-3は、 $F_1$ 次元、 $F_2$ 次元どちらの方向でも、long-range  $J_{CH}$ を読みとることが可能である。

HR-HMBC-3スペクトルの解析パターンを図3に示す。上記の3個のスペクトル比較から、long-range  $J_{CH}$  と  $J_{HH}$  の分離観測という点では、HR-HMBC-3のスペクトルが最も優れている。

#### ポートミシンのHR-HMBCスペクトル

図4はポートミシンのJ-resolved HMBC-1、図5はHR-HMBC-3のスペクトルである。ポートミシンの2位のプロトンは多重線に分裂している。H2とH3は10 Hzでスピ結合しており、両者はantiの関係にある。この2位のプロトンに対する3位の炭素の $^2J_{CH}$ のクロスピークは $F_1$ 軸方向、 $F_2$ 軸方向に分裂し、複雑化している。また、4位のクロスピークについては、 $J_{CH}$ による分裂は検出されず、スピ結合は非常に小さいことがわかる(図4)。

これに対して、HR-HMBC-3のスペクトルでは、3位のクロスピークは $J_{CH}$ による分裂により斜め2本に観測され、そのクロスピーク $^2J_{CH}=5.5$  Hzから、3位に結合したメトキシ基は2位のプロトンとはgaucheの関係にあることがわかる。また、4位の炭素とのクロスピークにおいても、 $^3J_{CH}$ による2本線が観測され、 $^3J_{CH}=2.8$  Hzから2位のプロトンと4位の炭素はgaucheの関係にあることが判明する(図5)。

このように、J-resolved-HMBCスペクトルにおいては、multipletに分裂したプロトンからのクロスピークは複雑となり、スピ結合の値を読みとることがしばしば困難となる。また、小さなスピ結合の値を数値化することが難し場合がある。しかし、HR-HMBC法では、スピンの分裂パターンは単純化され、スピ結合を容易に読みとることが可能となっている。また、3Hz前後小さな $J_{CH}$ の値を読みとることも容易である。

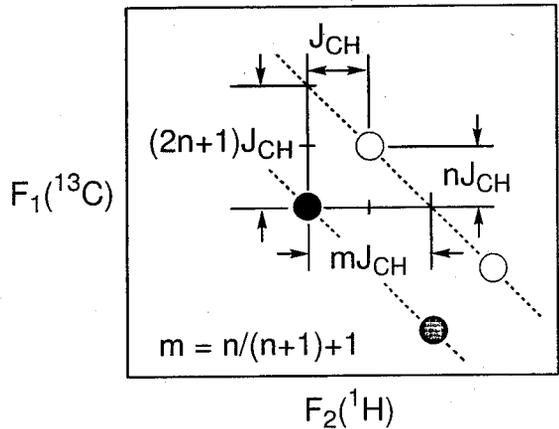


図3. HR-HMBC-3 スペクトルの模式図

## まとめ

HR-HMBC法は通常のHMBCで観測されるクロスピークを、更に、2D-J-resolvedスペクトル展開するという方法を用いている。そのために、HMBCスペクトルが十分なS/Nでもって観測されることが必要である。また、2D-J-resolvedスペクトル法を用いて、

$nt_{1,max}$  を250msec(4Hz)から500msec(2Hz)ぐらいと長い値をとるように設定しているために、通常のHMBC法に比べて、かなりスペクトルのS/Nが低下する。実際の測定に当たっては、このS/Nの低下を考慮して積算時間を設定することが重要である。

HR-HMBC法は、クロスピークは単純化され、解析が容易になる。また、小さなクロスピークの結合定数を読みとることも容易となった。本法は、HMBCと同様、測定は容易であり、しかも、複雑な化合物にも適用が可能であり、実用的には他の方法にひけをとらないと考えられる。

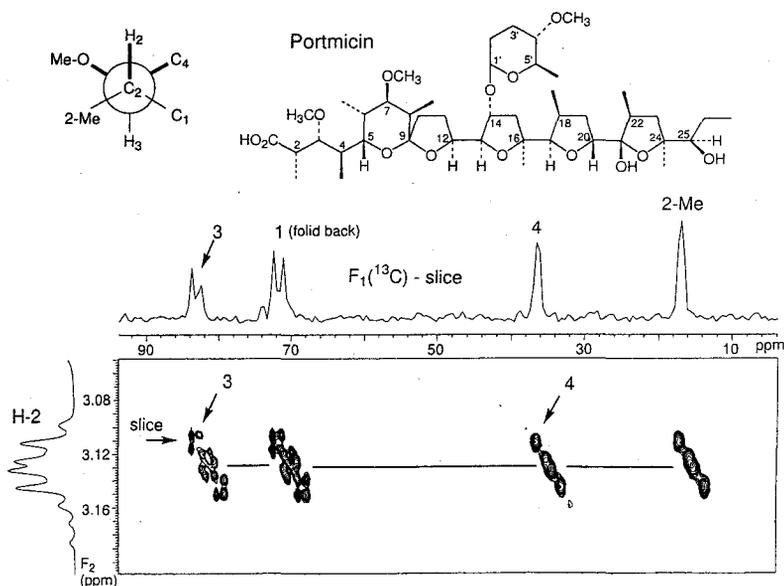


図4. ポートミシンのJ-resolved HMBC-1 スペクトル  
scaling factor (n) = 25,  $t_1 \times t_2 = 256 \times 4000$  (point),  
 $F_1 \times F_2 = 14000 \times 2250$  (Hz),  $nt_{1,max} = 457$ ms, scan = 64

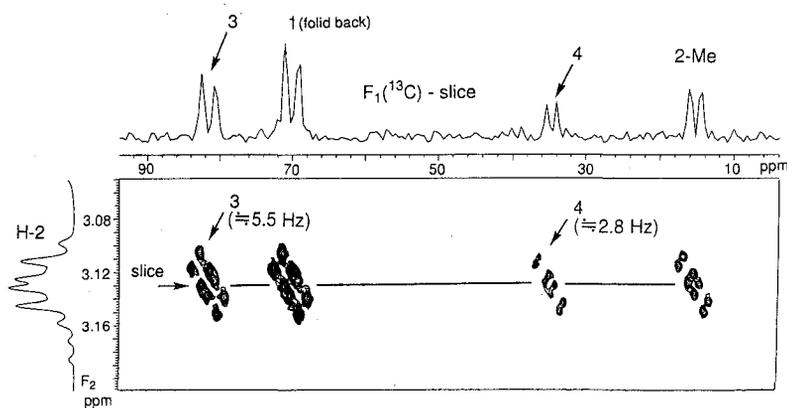


図5. ポートミシンのHR-HMBC-3 スペクトル  
scaling factor (n) = 25,  $t_1 \times t_2 = 256 \times 4000$  (point),  
 $F_1 \times F_2 = 14000 \times 2250$  (Hz),  $nt_{1,max} = 457$ ms, scan = 64

- 1). K. Furihata, and H. Seto, *Tetrahedron Lett.*, 40, 6271, (1999).
- 2). R.V.Hosur, M.Ravikumar, and A.Sheth, *J.Magn.Reson.* 65,375(1985).
- 3). V.V.Krishnamurthy, *J.Magn.Reson. B* 113,46(1996).
- 4). V.V.Krishnamurthy, *J.Magn.Reson. A* 121,33(1996).

**$^{27}\text{Al}$  NMR法による環状トリイミド三リン酸イオンの多座配位  
錯生成挙動研究**

(神戸大学・院自然、佐賀大学・理工\*、神戸大学・工\*\*)  
○横田 達夫、成相 裕之、宮島 徹\*、牧 秀志\*\*

**$^{27}\text{Al}$  NMR Study on the Multidentate Complexation Behavior of *Cyclo- $\mu$ -triimidotriphosphate Anions***

<sup>a</sup>Tatsuo Yokota, <sup>a</sup>Hiroyuki Nariai, and <sup>b</sup>Tohru Miyajima, and <sup>c</sup>Hideshi Maki

<sup>a</sup>Department of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan

<sup>b</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Saga University, 1-Honjo, Saga, Japan

<sup>c</sup>Department of Chemical Science and Engineering, Faculty of Engineering, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan

As shown in Figure 1,  $\text{cP}_3(\text{NH})_3$  ligand molecule consists of P-NH-P linkages. Non-bridging oxygen atoms as well as bridging nitrogen atoms of the molecules are able to coordinate to metal ions in aqueous solution. Even though extensive studies have been carried out on the coordination structures of metal complexes of  $\text{cP}_3(\text{NH})_3$  ligands, the details of the complexation mechanisms still remain unclear.  $^{27}\text{Al}$  NMR studies on  $\text{Al}^{3+}$  ion complexation with  $\text{cP}_3(\text{NH})_3$  ligand indicates direct coordination of nitrogen atoms of imino groups to  $\text{Al}^{3+}$  ions. It has also been revealed that nitrogen-coordination is much more favored than oxygen-coordination, and that various complexes with mono-, bi-, and tridentate coordination are formed. In the present work,  $^{27}\text{Al}$  NMR spectra of the mixture solutions of  $\text{Al}^{3+}$  cations and  $\text{cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$  anions of various compositions have been obtained and the complexation equilibria are analyzed by a peak deconvolution method in order to get the information on the microscopic complexation.

【緒言】本研究で用いた環状トリイミド三リン酸イオン、 $\text{cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$  (Fig. 1) は3個のリン酸基がイミノ基によって架橋された環状ポリリン酸イオンであり、分子内に2種類の配位原子すなわち非架橋酸素原子と架橋窒素原子を持つため多様な配位構造が期待される。当研究室ではこれまで $\text{cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ の

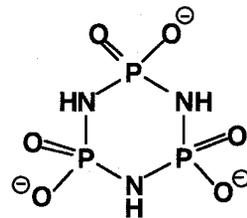


Fig 1 Structure of  $\text{cP}_3(\text{NH})_3$  anion.

MULTINUCLEAR NMR · ALUMINIUM · DECONVOLUTION · COMPLEX · PHOSPHATE

よこた たつお・なりあい ひろゆき・みやじま とおる・まき ひでし

Be<sup>2+</sup>錯生成に関して <sup>9</sup>Be NMRによる研究を行い、「Be-N直接配位構造」の存在、並びに架橋窒素原子や非架橋酸素原子といった配位原子の違いを反映した「微視的錯体安定度定数」を明らかにした。「Be-N直接配位構造」はHSAB理論による単純な予測に反するものであり、また「微視的錯体安定度定数」には優れた化学種認識力を持つNMR法の特長が反映されている。

本研究ではAl<sup>3+</sup>-cP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup>錯生成系の多座配位錯生成挙動を、<sup>27</sup>Al NMRのピーク分離解析を行うことによって詳細に考察した。Al<sup>3+</sup>イオンとBe<sup>2+</sup>イオンは同程度の電荷/イオン半径比をもつため化学的類似性を示すことが知られている<sup>1)</sup>が、本錯生成系においては金属イオン-配位子間の立体的適合性が錯生成挙動に大きな影響を及ぼすと考えられる。そのためイオン半径がBe<sup>2+</sup>イオンの約1.5倍大きいAl<sup>3+</sup>イオンとの錯生成反応においては、Be<sup>2+</sup>-cP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup>系ではみられなかった分子内錯体や多座配位錯体等の多様な錯体の生成が期待される。

滴定法のような一般的な熱力学的手法では、遊離の金属イオン等、一部の化学種の測定から平衡系の全体像を考察することになる。それに対してパルスNMR法では優れた化学種認識力を持つため直接的かつ同時に多くの化学種の情報を把握することが可能である。

【実験】<sup>27</sup>Al NMRスペクトルは、JEOL GX-400 NMR測定装置 (Ref. 0.1 moldm<sup>-3</sup> Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) を用いて測定を行った。試料溶液は、C<sub>Al</sub><sup>0</sup> = 0.01, 0.05, 0.10 moldm<sup>-3</sup>の各Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>水溶液に順次cP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup>水溶液を添加することにより調製した。またAl<sup>3+</sup>イオンの加水分解防止のためHNO<sub>3</sub>またはNaOHを用いることによりpH4.5に調整した。このpH領域においてはcP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup>に対するプロトネーションの影響は無視できる。

【解析】Fig.2にAl<sup>3+</sup>-cP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup>錯生成系の代表的な<sup>27</sup>Al NMRスペクトルを示す。化学シフトと配位数の間に加減則が成立する<sup>2)</sup>ため、遊離のAl<sup>3+</sup>イオンを0ppmとし、以下等間隔に低磁場側から単座配位、二座配位、三座配位錯体のシグナルと同定した。

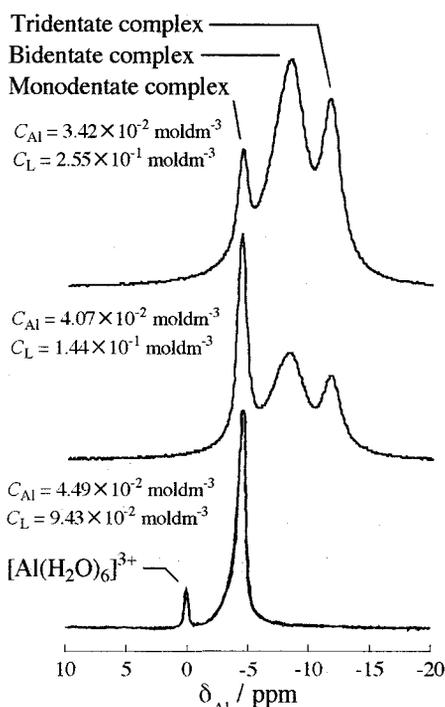


Fig. 2 Representative <sup>27</sup>Al NMR spectra of Al<sup>3+</sup>-cP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup> mixture solutions (Ref. 0.1 moldm<sup>-3</sup> Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 298.15K, pH 4.5).

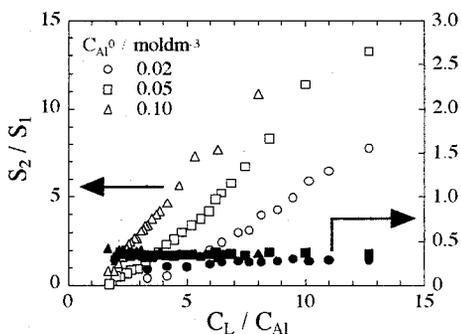


Fig. 3 Plots of  $S_{n+1}/S_n$  vs.  $C_L/C_{Al}$ .

$Al^{3+}$ イオンの配位子交換速度はNMRタイムスケールに対して充分小さいため、配位数の異なる錯体の各シグナルを観測可能である。一方、 $^{27}Al$ 核は四極子核であるためNMRシグナルの線幅は増大し、スペクトルは数本のシグナルの重なりとして現れる。そこで各々のシグナル強度を算出するためローレンツ型曲線を用いた非線形最小二乗法によるピーク分離解析を行った。今回測定した  $^{27}Al$  NMRスペクトルにおいては全て計算曲線と実測値が良く一致した。

【結果と考察】各錯体間のピーク面積比と配位子および  $Al^{3+}$  イオンの総濃度比との関係をFig. 3に示した。  $S_2/S_1$  は  $C_{Al}^0$  および  $C_L/C_{Al}$  に大きく依存しているのに対し、  $S_3/S_2$  は常に一定である。このことは単座錯体から二座錯体へは分子間反応、二座錯体から三座錯体へは分子内反応で錯生成が進行することを示唆している。一連の逐次錯生成反応において分子間および分子内反応が同時に進行することは興味深い。このような関係をさらに定量的に明らかにするため、各錯体間のピーク面積比から各錯体安定度定数を決定した。  $n$  座錯体のピーク面積を  $S_n$  とすると、各錯体安定度定数はピーク面積比を用いて以下のように表現できる。

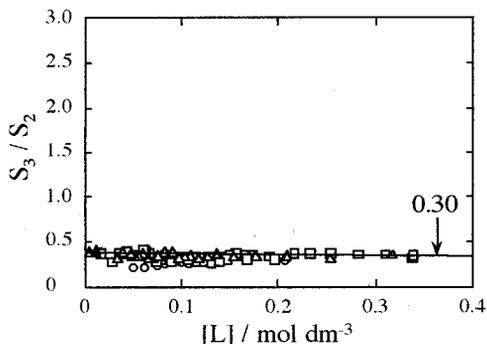
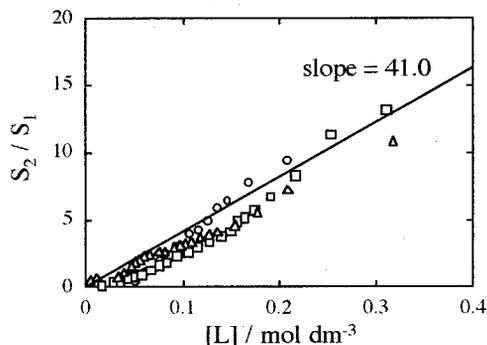
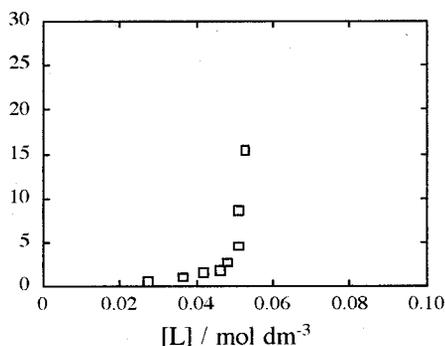
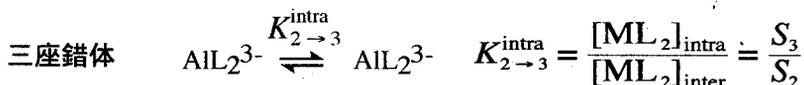
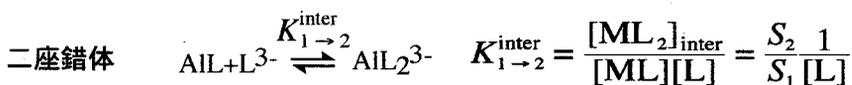


Fig. 4 Plots of  $S_{n+1}/S_n$  vs.  $[L^{3-}]$ .



すなわち、各錯体安定度定数は各錯体間のピーク面積比と遊離配位子濃度、 $[\text{L}^{3-}]$ 、を用いて表すことができる。 $\text{Al}^{3+}$ - $\text{cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ 錯生成系における各錯生成反応についてのピーク面積比 vs.  $[\text{L}^{3-}]$ プロットをFig. 4に示す。二座錯体生成反応については概ね原点を通る直線が得られ、分子間錯体安定度定数はその傾きから、 $K_{1 \rightarrow 2}^{\text{inter}}=41.0$ となった。さらに三座錯体生成反応については  $S_3/S_2$  は $[\text{L}^{3-}]$ によらず一定となり、分子内錯体安定度定数、 $K_{2 \rightarrow 3}^{\text{intra}}=0.30$  が決定できた。また単座錯体生成反応についてはプロットの直線関係が得られず、分子間錯体安定度定数、 $K_{0 \rightarrow 1}^{\text{inter}}$ 、は決定できなかった。これは $\text{M}_2\text{L}$ 錯体生成のためであると考えられる。

【総括】 $\text{Al}^{3+}$ イオンと $\text{Be}^{2+}$ イオンの電荷/イオン半径比の値はほぼ等しいにもかかわらず、本錯生成系においては $\text{Be}^{2+}$ - $\text{cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ 錯生成系ではみられなかった三座錯体の生成が確認された。従ってこれらの錯生成系は金属イオン-配位子間の立体的適合性に大きく依存すると考えられる。また二座錯体が分子間反応で生成するのに対し、分子内反応によって生成する三座錯体等の多様な錯体構造が明らかとなった。今後、架橋窒素原子や非架橋酸素原子といった配位原子の違いを反映する微視的錯体安定度定数等を行い、 $\text{Al}^{3+}$ - $\text{cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ 錯平衡系の特異性や多様性を詳細に検討する予定である。

- 1) A. Cotton and G. Wilkinson, "Advanced Inorganic Chemistry" fifth edition, pp. 144, John Wiley & Sons Inc., New York (1988)
- 2) T. Miyajima and R. Kakehashi, Phosphorus Res. Bull., 1, 101 (1991)

**$^9\text{Be}$  NMR法による環状イミドリン酸イオン群の多座配位錯生成反応に関する熱力学的研究**

(神戸大学工学部、神戸大学大学院自然科学研究科\*)

○牧 秀志、田畑 博史\*、成相 裕之\*

**$^9\text{Be}$  NMR Study on the Microscopic Complexation Behavior of *cyclo- $\mu$ -Imidotriphosphate Anions***

<sup>a</sup>Hideshi Maki, <sup>b</sup>Hirohumi Tabata, and <sup>b</sup>Hiroyuki Nariai

<sup>a</sup>Department of Chemical Science and Engineering, Faculty of Engineering, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan

<sup>b</sup>Department of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan

Despite a large number of thermodynamic studies on inorganic polyphosphate complexation equilibria, quite a limited number of studies has been employed on the microscopic coordination behavior of the complexation equilibria in aqueous solution. This is due to the difficulty in the determination of microscopic complex stability constants by the use of conventional thermodynamic methods on these multidentate ligand molecules. A metal NMR technique is expected to give direct and quantitative information on the microscopic complexation equilibria. Due to the slow chemical exchange in aqueous solution,  $\text{Be}^{2+}$  ion complexation system is one of the most suitable systems for the microscopic complexation equilibrium analyses, i.e., separate signals for respective microscopic coordination structures of the complexes are expected to be observed in the  $^9\text{Be}$  NMR spectra. This technique has been applied to the  $\text{Be}^{2+}$  complexation studies on the series of ligands,  $\text{cP}_3(\text{NH})_n$  ( $n=1-3$ ). In our previous study, it has been clarified that  $\text{cP}_3(\text{NH})_n$  ( $n=1-3$ ) ligand forms monodentate complexes with oxygen-coordination and nitrogen-coordination, as well as bidentate complexes coordinated with two oxygen atoms. In this study, the variations of the entropy and the enthalpy of the complexation reaction for the series of ligand molecules,  $\text{cP}_3(\text{NH})_n$  ( $n=1-3$ ) have been elucidated from the quantitative treatment of  $^9\text{Be}$  NMR spectra of  $\text{Be}^{2+}$ -ligand mixture solutions.

【緒言】本研究で用いた環状イミド三リン酸イオン、 $\text{cP}_3(\text{NH})_n^{3-}$  ( $n=1\sim 3$ , Fig. 1) は3個のリン酸基が酸素原子またはイミノ基によって架橋された環状ポリリン酸イオンである。これらは分子内に2種類の配位原子すなわち非架橋酸素原子と架橋酸素原子

MULTINUCLEAR NMR · ENTROPY · DECONVOLUTION · BERYLLIUM · PHOSPHATE

まき ひでし・たばた ひろふみ・なりあい ひろゆき

を持つため多様な配位構造が期待される。単純なHSAB理論による予測では、ハードなBe<sup>2+</sup>イオンは非架橋酸素原子のみに配位すると予想されるが、cP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup> および cP<sub>3</sub>(NH)<sub>2</sub><sup>3-</sup> においては分子中央部に窒素原子が密集してい

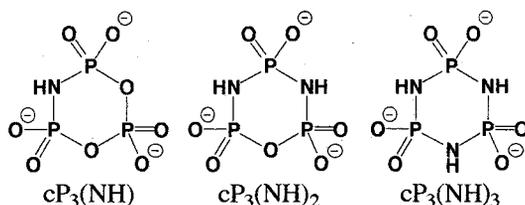


Fig.1 Structure of cyclo-μ-imidotriphosphate anions

るため、架橋窒素原子も配位に関与する可能性がある。当研究室ではこれまでBe<sup>2+</sup>-cP<sub>3</sub>(NH)<sub>n</sub><sup>3-</sup> (n=1~3) 錯生成系について <sup>9</sup>Be NMRのピーク分離解析を行い、配位原子の違いを反映する「微視的錯生成定数」の決定に成功し、単座(O)配位、単座(N)配位および分子間二座(O,O)配位錯体の存在を明らかにした。このような多様な錯生成挙動は反応系の熱力学的定数にも反映されると考えられる。本研究では <sup>9</sup>Be NMRのピーク分離解析により、錯生成反応前後のエンタルピー変化およびエントロピー変化を決定し、各錯生成挙動の詳細を熱力学的側面から考察した。

【実験】 <sup>9</sup>Be NMR測定に用いた試料溶液は、NMRサンプル管 (10mmφ) 中の0.01 moldm<sup>-3</sup> BeCl<sub>2</sub>溶液に、配位子として0.1 moldm<sup>-3</sup> cP<sub>3</sub>(NH)<sub>n</sub><sup>3-</sup> (n=1~3)各水溶液をマイクロシリンジで順次添加することにより調製した。また試料溶液はBe<sup>2+</sup>イオンの加水分解を防ぎ、かつ配位子のプロトネーションを最小にする目的でHCl及びNaOH水溶液によりpH 2.5±0.2に調整した。<sup>9</sup>Be NMR測定は、Bruker社製DPX-250 NMR測定装置を用い、271.15~318.15Kの温度範囲で行った。温度校正は80% 1,2-ethanediol in [d<sub>6</sub>] DMSOの <sup>1</sup>H NMR測定により行った<sup>1)</sup>。

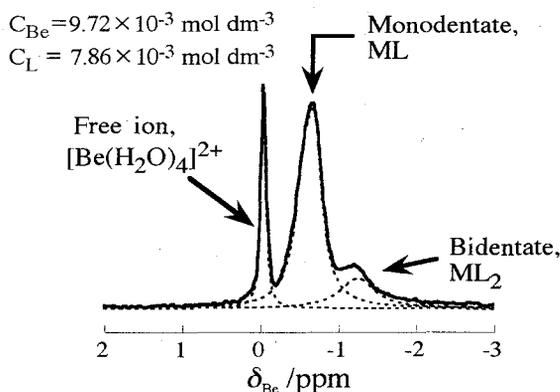


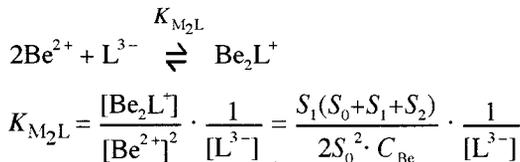
Fig. 2 <sup>9</sup>Be NMR spectrum of Be<sup>2+</sup>-cP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup> mixture solution (pH 2.5, -2±1°C).

【解析】分子中のイミノ基数が最も多く、Be<sup>2+</sup>-N原子間相互作用が最も期待される、Be<sup>2+</sup>-cP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup>錯生成系の代表的な <sup>9</sup>Be NMRスペクトルをFig.2に示す。化学シフトの配位数に対する加成則<sup>2)</sup>に基づき、低磁場側から遊離のBe<sup>2+</sup>イオン、単座錯体、二座錯体のピークと同定した。Be<sup>2+</sup>イオンは水溶液中では配位子交換速度が比較的遅いため、逐次錯体の各NMRピークは分離して出現するが、<sup>9</sup>Be核は四極子核であるためピークは

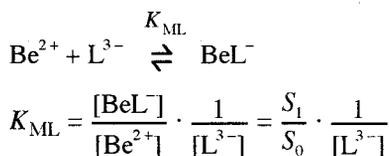
広幅化する。そのため今回得られたスペクトルも数本のピークの重なりとして現れる。そこで、ローレンツ型曲線を用いた非線形最小二乗法による波形分離解析を行った。その結果も併せてFig. 2に示した。今回測定した<sup>9</sup>Be NMRスペクトルにおいては全て計算曲線と実測値が良く一致した。

遊離のBe<sup>2+</sup>イオン、単座錯体、二座錯体のピーク面積をそれぞれ S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> とすると、各錯体安定度定数はピーク面積比を用いて以下のように表現できる(単座錯体にはM<sub>2</sub>L型およびML型錯体が含まれる)。種々の要因により、ピーク面積と化学種の濃度間の直線性は一般的に誤差の大きいものとされているが、本解析法では「強度比」を用いることで定量的精度が改善される。

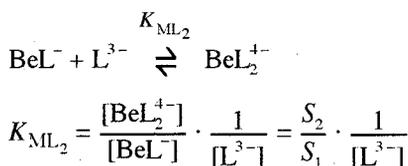
M<sub>2</sub>L型錯体



ML型錯体



ML<sub>2</sub>型錯体



すなわち、各錯体安定度定数は各錯体のピーク面積比と遊離配位子濃度、[L<sup>3-</sup>]、を用いて表すことができる。Be<sup>2+</sup>-cP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup>錯生成系における各錯生成反応についてのピーク面積比 vs. [L<sup>3-</sup>]プロットをFig. 3に示す。各プロットの直線の傾きから、log K<sub>M2L</sub>値、log K<sub>ML</sub>値、およびlog K<sub>ML2</sub>値を算出した。

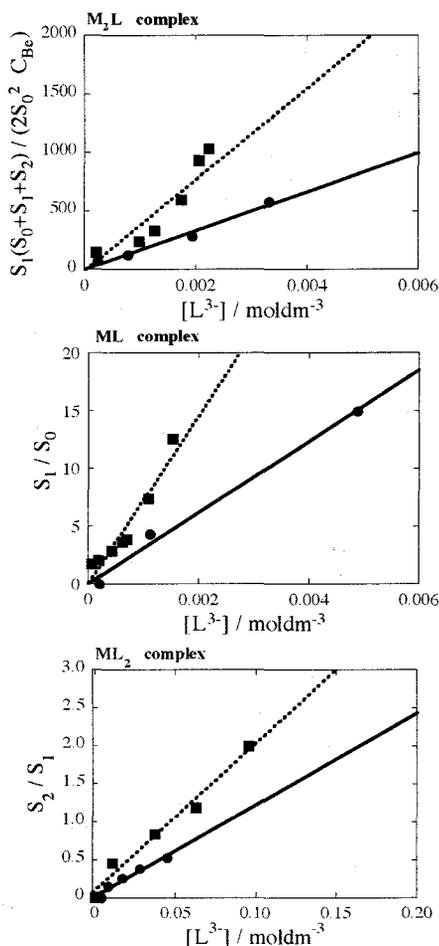


Fig. 3 Determination of the stability constants for Be<sup>2+</sup>-cP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup> complex formation system. (●); 271.15K, (■); 308.15K

【結果と考察】 log K<sub>ML</sub>値のアルカリ土類金属イオン半径に対する依存性を Fig. 4に示す。Be<sup>2+</sup>イオンの log K<sub>ML</sub>値が他に比べて大きいことが分かった。Be<sup>2+</sup>イオンのイオン半径は全ての金属イオン中最小であり脱水和には極めて大きなエネルギーを必要とする。このような金属イオンが配位子と安定な錯体を形成することは興味深い結果である。これまでのBe<sup>2+</sup>-cP<sub>3</sub>(NH)<sub>n</sub><sup>3-</sup>(n=1-3)錯生成系に対する<sup>9</sup>Be NMR測定結果によると、ML型錯体

では小さなイオン半径を持つBe<sup>2+</sup>イオンは配位子との立体的適合性のため非架橋酸素原子のみならず架橋酸素原子にも配位することが分かっている。この立体的適合性の効果は、Be<sup>2+</sup>イオンの大きな脱水和エネルギーを十分に補償し、かつ安定なML型錯体の形成を可能にしていると考えられる。

さらに錯体の配位構造に関する詳細な検討を行うため、各錯体安定度定数値の温度依存性から錯生成反応前後における ΔH°, ΔS°を決定した。ΔH°と ΔS°の関係式を以下に示す。

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (R: \text{気体定数})$$

上式より求めた各錯生成系の298.15Kにおける -ΔG°, -ΔH°, TΔS°を Table 1に示す。一般的に、-ΔH°が優勢の場合は、結合力の大きい錯体の形成を示しており、また TΔS°が優勢の場合は、金属イオンの多座配位性を示している。本研究において、ML型錯体生成の場合、ML<sub>2</sub>型錯体生成時よりもTΔS°が相対的に大きいことが分かった。これはML型錯体においては、非架橋酸素原子だけでなく架橋酸素原子も配位に関与するため、単座O配位および単座N配位錯体といった多様な錯種が形成することを示唆している。それに対して、ML<sub>2</sub>型錯体について得られた比較的小さな TΔS°値は分子間(O,O)二座錯体しか存在しない事実を反映していると考えられる。

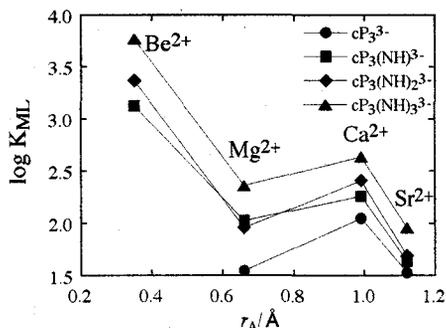


Fig. 4 Plots of log K<sub>ML</sub> vs. ionic radius (298.15K)

Table 1 Thermodynamic quantities associated with the interactions of cP<sub>3</sub>(NH)<sub>3</sub><sup>3-</sup> with Be<sup>2+</sup> ions (C<sub>Be</sub><sup>0</sup> = 0.01 mol dm<sup>-3</sup>, 298.15 K).

	-ΔG kJ mol <sup>-1</sup>	-ΔH kJ mol <sup>-1</sup>	TΔS kJ mol <sup>-1</sup>
M <sub>2</sub> L	31.3	-16.4	47.7
ML	21.5	-15.1	36.5
ML <sub>2</sub>	7.1	- 8.2	15.4

- 1) S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger, "150 and More Basic NMR Experiments", pp.140-143, VCH Publishers, New York(1998).
- 2) T. Miyajima and R. Kakehashi, Phosphorus Res. Bull., 1, 101 (1991)

アルカリアースクロライド水溶液中の水分子の  
 回転運動におよぼす温度および圧力効果  
 (立命館大理工)○文野浩一・谷口吉弘

Temperature and Pressure Effects on the Rotational Motion of  $D_2O$   
 Molecule in Alkali Earth Chloride Aqueous Solutions

Koichi, FUMINO; Yoshihiro, TANIGUCHI

Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University, Kusatsu, Shiga,  
 525-8577

The spin-lattice relaxation rates ( $R_1$ ) of D nucleus of heavy water ( $D_2O$ ) molecule in alkali earth chloride ( $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $SrCl_2$  and  $BaCl_2$ ) aqueous solutions were measured in the range of 0.1-300 MPa and 0-1.0 molkg<sup>-1</sup> at 10, 25 and 50 °C.  $R_1$  increases with concentration quadratically in 0.1-200 MPa and linearly at 250 and 300 MPa at 10 and 25 °C and linearly at 0.1-300 MPa at 50 °C. With increasing pressure, the rotational correlation times ( $\tau$ ) coordinated to  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  and  $Ba^{2+}$  which is estimated by  $R_1$ , increases at 10 and 25 °C and decreases at 50 °C.

### 1. はじめに

以前に<sup>1)</sup>、塩化マグネシウムおよび塩化カルシウム水溶液中の水分子のD核および<sup>17</sup>O核のスピン-格子緩和速度( $R_1$ )を10, 25°C、0-1.0 molkg<sup>-1</sup>、0.1-300 MPaにおいて測定した。 $R_1$ は圧力の増加とともに減少し、溶液濃度と0.1-200 MPaでは2次式の関係に、250, 300 MPaでは直線関係にあった。また、 $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ に配位する水分子におけるD核および<sup>17</sup>O核の回転相関時間( $\tau$ )は各圧力において $Mg^{2+} > Ca^{2+} > \text{pure } D_2O$ の順になり、圧力の増加とともに増加した。そこで高圧力下における水分子の回転運動に関する知見をさらに得るため、アルカリアースクロライド( $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $SrCl_2$  および  $BaCl_2$ )水溶液中における水分子のD核の $R_1$ を10, 25, 50°C、0-1.0 molkg<sup>-1</sup>、0.1-300 MPaにおいて測定した。

### 2. 実験方法

$R_1$ の測定はInversion-recovery法を用いて行った。測定圧力は0.1, 50±1, 100±1, 150±1, 200±1, 250±1, 300±2 MPa、測定温度は10±0.1, 25±0.1, 50±0.1°C、溶液濃度は0.25, 0.5, 0.75, 1.0 molkg<sup>-1</sup>とした。 $R_1$ の測定誤差は3%以内であった。

### 3. 結果および考察

$SrCl_2$ 水溶液中における $R_1$ と溶液濃度 $m$ との関係をFig. 1に示す。純水における測定核の $R_1$ を $R_1^0$ とすると、10および25°Cにおいては0.1-200 MPaにおいて(1)式が、250-300 MPaにおいて(2)式が成立するものと思われ、50°Cにおいては0.1-300 MPaにおいて(2)式が成立するものと思われる。(この傾向は $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ および $BaCl_2$ 水溶液についても同様であった。)

アルカリアースクロライド、水分子、スピン-格子緩和速度、温度、圧力

ふみの こういち、たにぐち よしひろ

$$R_1/R_1^0 = 1 + Bm + Am^2 \quad (1)$$

$$R_1/R_1^0 = 1 + Bm \quad (2)$$

ここで、Aはイオン-イオン間相互作用に関するパラメーター、Bはイオン-溶媒間相互作用に関するパラメーターである。(1)式および(2)式のBはイオン分割およびイオン対を考慮することにより、(3)式が成立する。

$$B = B^+ + B^- + B_{ip} \quad (3)$$

よって、二状態モデル<sup>2)</sup>を用い、 $B^+(K^+) = B^-(Cl^-)$ を仮定することにより(4)式が得られる。

$$B^+ = \{(R_1^+/R_1^0) - 1\} (n^+/50.0) \quad (4)$$

ここで、 $R_1^+$ はカチオンに配位する水分子の $R_1$ 、 $n^+$ はイオンの配位数である。さらに極度尖鋭化条件下では(5)式が成立する<sup>3)</sup>。

$$R_1 = (3/40) \{(2I+3)/I^2(2I-1)\} (e^2qQ/\hbar)^2 \{1 + (\eta^2/3)\} \tau \quad (5)$$

ここで、Iはスピン量子数、 $e^2qQ/\hbar$ は四極子結合定数、 $\eta$ は非対称性パラメーター、 $\tau$ は測定核の回転相関時間である。(4)式、(5)式より $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ および $Ba^{2+}$ に配位する水分子の $\tau$ が得られ、 $\tau$ は圧力の増加とともに10および25℃では増加しているのに対し、50℃では減少しているものと思われる。

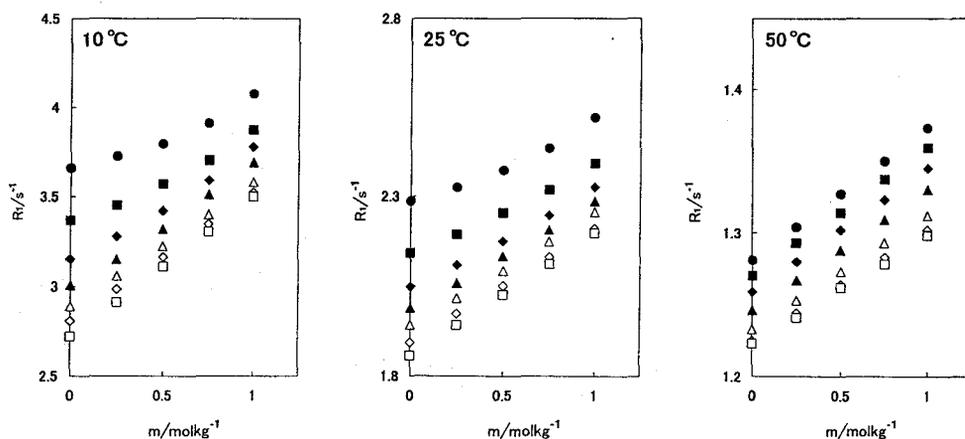


Fig. 1 Concentration dependences of  $R_1$  values of D nucleus in  $SrCl_2$  aqueous solutions.

●: 0.1MPa, ■: 50MPa, ◆: 100MPa, ▲: 150MPa, △: 200MPa, ◇: 250MPa, □: 300MPa

#### 4. 参考文献

- 1) 文野浩一・谷口吉弘, 第39回NMR討論会要旨集, p.210 (2000).
- 2) H. G. Hertz, "Water, A Comprehensive Treatise" Plenum Press, vol. 3, Chap. 7, p.301 (1973).
- 3) A. Abraham, "The Principles of Nuclear Magnetism," Oxford University Press, p.313 (1961).

## P 59

## LC-NMR の構造解析への応用検討

(東レリサーチセンター) ○川口 謙、木村一雄

## Investigations of LC-NMR application for structural analysis

Toray Research Center, Inc., Ken Kawaguchi and Kazuo Kimura

An LC-NMR is the useful tool for structural analysis of metabolites or impurities from drug substances. In the structural determination, we need the data of homonuclear spin-couplings or NOEs. But in many cases, the amounts of the minor ingredients are very small, so we often face the low sensitivity problems when we apply 2D NMR techniques on LC-NMR. To overcome these difficulties, we have tried various 1D-NMR techniques on LC-NMR, i.e., 1D-NOESY, COSY and TOCSY. The advantage of the 1D-NMR techniques over 2D-NMR techniques is that we do not need long time for experiments of many scans. Using 1D NMR techniques, we can take the information around the target spin. Most of the structures of minor ingredients in the drug substances have similar structures of the original drugs, so it is often sufficient to get the only information around the signals that are derived from the original drug spectrum. In this poster, we will show the example of the application of the structure determination of the minor ingredient with 1D NMR techniques on LC-NMR.

はじめに

LC-NMR は、その名の通り、HPLC と NMR を直結した装置で、混合物の NMR 分析に威力を発揮する。医薬品の分野では、分解物（不純物）や代謝物の構造決定に応用が期待されている。しかし、要求される分解物（不純物）や代謝物の含有量は 0.1% レベルと低く、感度不足のため 2 次元 NMR 測定が不可能な場合が多い。そこで微量成分の構造解析の戦略として、1 次元応用測定に着目し、LC-NMR における 1D-NOESY や 1D-COSY、1D-TOCSY などの検討を行った。上記のような構造解析では主成分（未変化体）の構造が既知でかつ目的成分は未変化体の一部が構造変化している場合が多いため、変化した構造部位に特化して 1 次元応用測定を用いれば、2 次元 NMR 測定が不可能な微量成分についても構造解析が可能であると考えたからである。

実験

装置は LC-NMR を含めて、Varian UNITY INOVA600 を用いた。試料は酢酸グラニル（市販試薬）を用いた。この試料には 12% 程度の不純物が含まれ、LC-NMR (Stop-Flow 法) で測定した  $^1\text{H}$  NMR スペクトルおよび LC/MS から、不純物は Fig. 1 に示す還元体であることが分かった。この不純物について、溶媒シグナル消去を組み込んだ 1D-NOESY の測定を試みた。Fig. 2 に測定結果を示す。期待どおりの NOE が観測されており、おそらく 10  $\mu\text{g}$  以下でも NOE が測定可能と思われる。

LC-NMR、溶媒シグナル消去、1 次元応用測定、微量成分の構造解析

かわぐち けん、きむら かずお

まとめ

1D-NOESY 測定法が、2次元 NMR の適用が事実上不可能な微量成分の構造解析に役立つことを確認することができた。今後さらに 1D-TOCSY, COSY 等の測定法も試みる予定である。

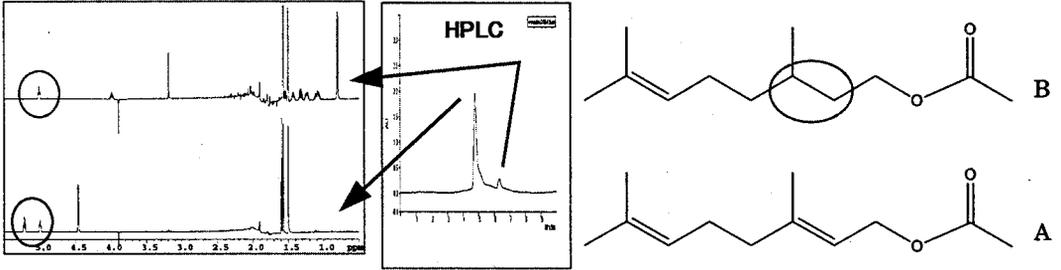


Fig. 1 LC-NMR spectra of Granyl acetate (A) and the impurity (B) using stop-flow method. Mobile phase:  $D_2O/CH_3CN$  (35/65).

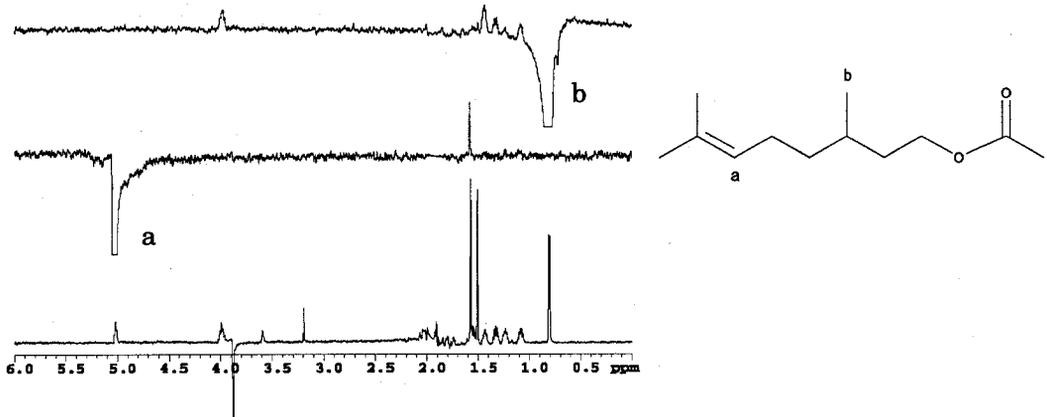


Fig. 2 1D-NOESY spectra (LC-NMR) of the impurity (B) in Fig. 1. The bottom spectrum shows that of a normal LC-NMR.

**$^{13}\text{C}$ -NMRによる Gellan Gum と常磁性金属イオンの  
相互作用に関する研究**

(北大院工) ○横川昭徳、鈴木淳司、泉川大輔、平沖敏文、堤耀廣

$^{13}\text{C}$ -NMR Study on Interaction between Gellan Gum and Paramagnetic Metal Ions

A. Yokogawa, A. Suzuki, T. Izumikawa, T. Hiraoki and A. Tsutsumi

Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering,  
Hokkaido University, Sapporo

Gellan gum aqueous solution forms stable gel at room temperature. Especially under the existence of divalent cations gelation is drastically promoted. To clarify this phenomenon we investigated the interactions between gellan gum and paramagnetic metal ions such as  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  in the sol state.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum measurements showed that resonance lines of the carboxyl carbon and the nearby ring carbon are selectively broadened or shifted. These results suggest that paramagnetic metal ions strongly interact with the carboxyl group in the D-glucuronate.  $T_1$  and  $T_2$  relaxation measurements of the carboxyl carbon and the nearby ring carbon were made to determine the distance from the metal ions and the coupling constants.

〔背景と目的〕

Gellan Gum(以下 GG)は、微生物 *Pseudomonas elodea* から得られる電解質高分子多糖であり、その化学構造は Fig.1 に示す通りである。Gellan Gum 水溶液は、 $\text{Ca}^{2+}$ 等の 2 価カチオン添加により①ゲル形成の促進、②ゲル安定化、が起こる。我々はこの機構を明らかにするために常磁性金属イオンである  $\text{Mn}^{2+}$ を用い、ESR 測定による  $\text{Mn}^{2+}$ の動的挙動、NMR 測定による結合部位の特定等に関する研究を行ってきた。

本研究では、更に  $\text{Mn}^{2+}$ 以外の常磁性金属イオン  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ を用い、結合部位を  $^{13}\text{C}$ -NMR で観測する。常磁性金属イオンが特定サイトに作用すると、常磁性効果によって作用部位に、NMR シグナルのシフトやブロードニング、緩和時間の変化が起こる。これを用いて、原子間距離等の GG と金属イオンの相互作用を調べることが目的とする。今回は、ゾル状態について得られた結果を報告する。

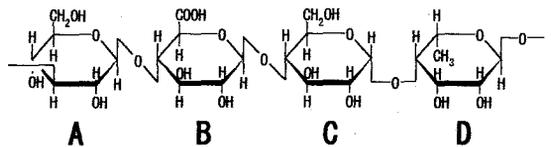


Fig.1 Chemical Structure of Gellan Gum

〔試料と実験装置〕

試料には、カリフォルニア・ケルコ社の GG を用いた。定量した GG と水を  $90^\circ\text{C}$  で 1 時間攪拌し、濃度を調整して温めておいた金属イオン水溶液( $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ )を加え、さらに  $90^\circ\text{C}$  で 30 分~1 時間攪拌し、NMR、DSC サンプル管に詰めた。 $^{13}\text{C}$ -NMR 測定には BRUKER DSX 300(共鳴周波数 75.48MHz)を使用した。DSC 測定にはセイコーインスツルメント DSC 6100 を使用した。

Gellan Gum、 $^{13}\text{C}$ -NMR、常磁性金属イオン、 $T_1$ 、 $T_2$

よこがわあきのり、すずきあつし、いずみかわたいすけ、ひらおきとしふみ、つつみあきひろ

【結果・考察】

Fig.2 は、GG に各金属イオンを添加し、降温過程で DSC 測定を行った結果である。常磁性金属イオンが二価金属イオンとして  $\text{Ca}^{2+}$  と同様の効果をもつことを確認した。

Fig.3 は、GG2.5wt/v%水溶液、GG2.5wt/v% +  $\text{CuCl}_2$  0.1mM 水溶液、333K の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルである。金属イオン無添加の場合、ピークはシャープであるが、 $\text{Cu}^{2+}$ 添加によりブロードニングが生じる。特にカルボキシル基とその付け根 (B6、B5)のピークのブロードニングが著しい。このことはゾル状態で  $\text{Cu}^{2+}$ が B6 位に選択的に結合

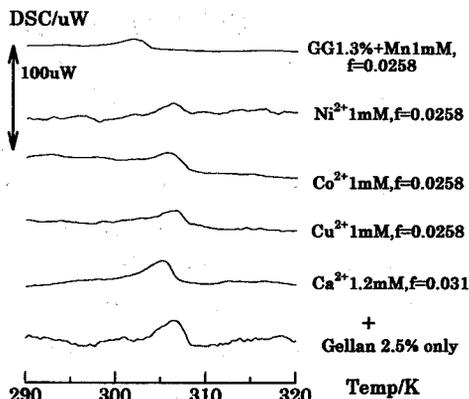


Fig.2 DSC diagram Gellan Gum + salts on cooling process

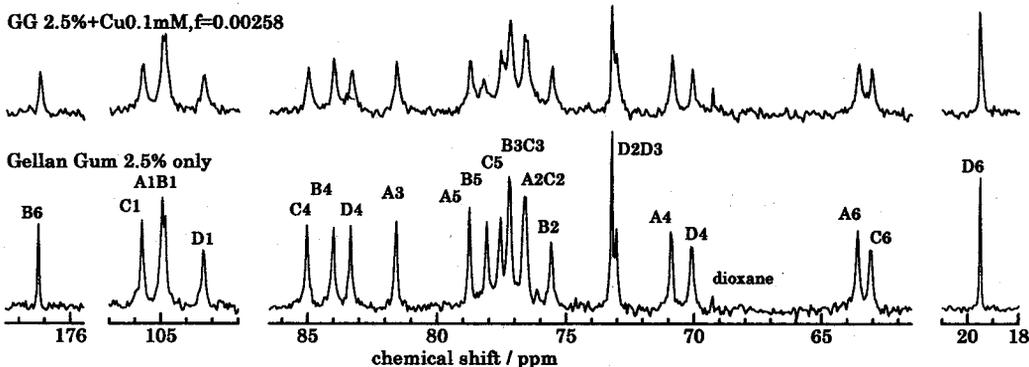


Fig.3  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum at 333K

していることを示す。そこで  $\text{Cu}^{2+}$ 濃度を変化させたとき、 $\text{Cu}^{2+}$ の効果が化学シフトや線幅に与える影響を B6 位について調べた。その結果が Fig.4 であるが、シフトよりも線幅への影響が顕著であることが分かる。

次に GG2.5wt/v% +  $\text{CuCl}_2$  0.05.mM について、ゾル状態で温度を変化させたときの B6 位の緩和時間  $T_1$  を調べた。Fig.5 のように  $\text{Cu}^{2+}$ の常磁性効果によって  $T_1$  が短くなることが確認できる。常磁性金属と作用する核は、電子スピンと核の双極子相互作用、スカラー相互作用の影響を受け、緩和時間は Solomon-Bloembergen の式に従う。得られた  $T_1$  の値から、 $\text{Cu}^{2+}$  と B6 位の距離は約 3.8Å となった。また、 $T_2$  ( $1/\Delta\nu$ ) より超微細相互作用は約  $5 \times 10^5 \text{ Hz}$  であった。

当日は、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ についても得られた結果を詳細に報告する予定である。

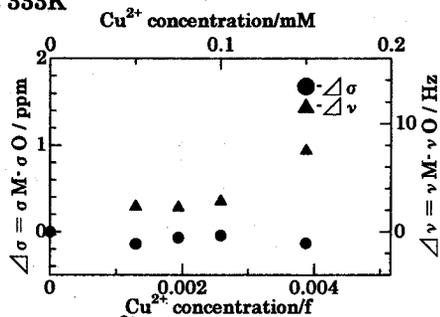


Fig.4  $\text{Cu}^{2+}$  concentration dependence of shift and width at 333K

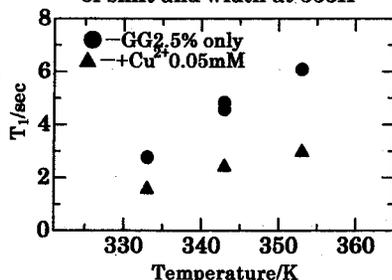


Fig.5 Temperature dependence of  $T_1$  about GG2.5%+ $\text{Cu}$  0.05mM

## 海洋生物ホヤ H-抗原活性糖鎖の溶液構造

(東和大<sup>1</sup>, 福山大<sup>2</sup>, 日本電子データム<sup>3</sup>, 日本電子<sup>4</sup>, 広島大<sup>5</sup>)○加藤祐子<sup>1</sup>, 太田雅也<sup>2</sup>, 宗像達夫<sup>1</sup>, 藤原正子<sup>3</sup>, 藤井直之<sup>4</sup>, 重田征子<sup>5</sup>, 松浦史登<sup>2</sup>

## Determination of Solution Conformation of Allergically Active Pentasaccharitol by 2D-NMR and DADAS Calculation

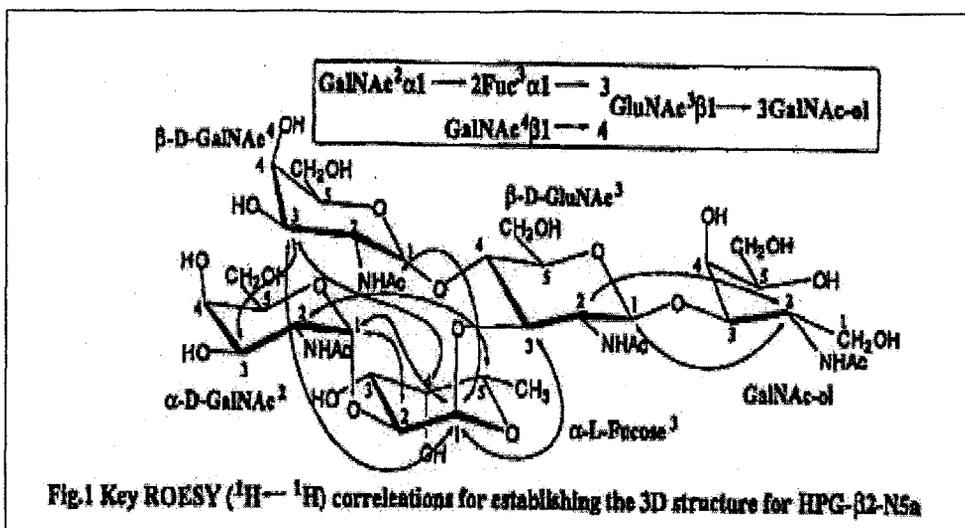
<sup>1</sup>Department of Bioengineering Tohwa University, Fukuoka, 815-8510, <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Fukuyama University, Fukuyama, 729-0292, <sup>3</sup>JEOL Datum Ltd., Akishima-shi, Tokyo, 196-0022, <sup>4</sup>JEOL Ltd., Akishima-shi, Tokyo, 196-8558, <sup>5</sup>Department of Fermentation Technology, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, 739-8527, Japan  
Yuko Kato<sup>1</sup>, Masako Fujiwara<sup>2</sup>, Tatsuo Munakata<sup>1</sup>, Masaya Ohta<sup>3</sup>, Naoyuki Fujii<sup>4</sup>, Seiko Shigeta<sup>5</sup>, and Fumito Matsuura<sup>3</sup>

Pentasaccharitol, GalNAc  $\beta$  1-4(GalNAc  $\alpha$  1-2Fuc  $\alpha$  1-3)GlcNAc  $\beta$  1-3GalNAc-ol<sup>1)</sup> is an allergenically active O-linked oligosaccharitol derived from a sea squirt H-antigen. Concerning the interaction between the allergen and specific IgE, an analysis of the solution structure of the saccharitol was carried out<sup>2)</sup>. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR assignments for the pentasaccharitol were obtained using 1D-HOHAHA, TOCSY, DEPT135, HSQC and HMBC techniques. The solution structure was determined using a combination of 2D-NMR ROESY data and distance geometry (DG) calculations in dihedral angle space with DADAS 90 program<sup>3)</sup>. Two conformers, family A and family B that satisfied almost all the NOE constraints were obtained, and supplemental MD calculations revealed that family A was in conformational equilibrium whereas family B was rather flexible. The molecule of HPG- $\beta$  2-N5a had a layered conformation not a linear one.

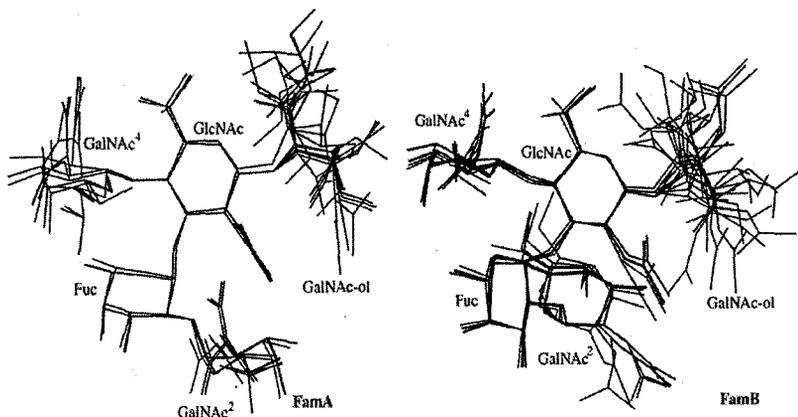
ホヤ体液中にあるアレルゲン糖鎖分子 HPG- $\beta$  2-N5a<sup>1)</sup>の溶液構造は、抗体との分子認識機構を知る上に重要である。2D-NMR と Distance Geometry(DG)計算によって立体構造の解析を行った<sup>2)</sup>。1D-HOHAHA, TOCSY, HMQC, さらに ROESY から NOE 情報を得た結果、5糖の単糖間に Fig1.のような特徴ある NOE 相関が見られた。NOE constraints を用いての DADAS90<sup>3)</sup>による DG 計算の結果2つのコンフォーマーA, B が得られた。各々の重ねあわせ図を⑤に示す。コンフォーマーの安定性を調べるために MD 計算を行ったところ、A はエネルギー的に安定、B はやや不安定な状態にあることがわかった。両者は GalNAc2 と Fuc3 の間のグリコシド結合の二面角に違いがあるが、いずれも立体構造は積層構造をとり、抗体との結合部位である2つの GalNAc の OH 間距離は 10-11 Å であることがわかった。

## References

- 1) M. Ohta, S. Shigeta, K. Ono, T. Takao, Y. Shimonishi, S. Oka, *Arch. Biochem. Biophys.* 275,151 (1989).
- 2) Y. Kato, M. Ohta, T. Munakata, M. Fujiwara, N. Fujii, S. Shigeta, and F. Matsuura, *Mag. Res. Chem.* 39, 259 (2001)
- 3) S. Endo, H. Wako, K. Nagayama, N. Go, *NATO ASI series*, 233 (1991).



## ⑤ Solution Structures



For FamA and B of HPG- $\beta$ 2-N5a, superpositions of 10 converged structures best-fit for backbone atoms excluding GalNAc-ol in all heavy atom representation.

The glycosidic dihedral angles  $\phi$  (degrees) and  $\psi$  (degrees) of FamA and FamB of HPG- $\beta$ 2-N5a based on DADAS.

Dihedral angles	$\phi_1$ H1-C1-O1-C4	$\psi_1$ C1-O1-C4-H4	$\phi_2$ H1-C1-O1-C3	$\psi_2$ C1-O1-C3-H3	$\phi_3$ H1-C1-O1-C2	$\psi_3$ C1-O1-C2-H2
FamA	58.6 $\pm$ 8.3	18.3 $\pm$ 0.3	43.5 $\pm$ 4.1	26.1 $\pm$ 0.3	-62.5 $\pm$ 0.0	-21.6 $\pm$ 0.0
FamB	73.3 $\pm$ 2.9	21.9 $\pm$ 2.6	-5.0 $\pm$ 4.0	-38.3 $\pm$ 6.4	-60.2 $\pm$ 3.2*	-15.6 $\pm$ 5.5*

\* different results obtained by MD

謝辞：サントリー生物有機化学研究所の岩下孝博士には NMR 測定および貴重なご意見をいただきました。

Key words: ROESY-TOCSY (ROTO); Allergenic-Pentasaccharitol; DADAS 90 calculation; MD calculation

〇かとうゆうこ、おおたまさや、むなかたつお、ふじわらまさこ、ふじいなおゆき、しげたせいこ、まつうらふみと

パーキンソン病原因蛋白質 Parkin の ubiquitin-like domain の NMR による構造解析。  
 (東京薬科大・薬<sup>1</sup>、東京薬科大・生命<sup>2</sup>、東京都立大・理<sup>3</sup>) 大久保征治<sup>1</sup>、田代桜子<sup>1</sup>、  
 安田秀世<sup>2</sup>、○田代 充<sup>3</sup>、甲斐荘正恒<sup>3</sup>、○神藤平三郎<sup>1</sup>

### Structural Studies of Ubiquitin-Like Domain in Parkin: Gene Product of Familial Parkinson Disease

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy & Life Science, <sup>2</sup>School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy & Life Science, <sup>3</sup>Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University  
 Seiji Okubo<sup>1</sup>, Sakurako Tashiro<sup>1</sup>, Hideyo Yasuda<sup>2</sup>, ○Mitsuru Tashiro<sup>3</sup>, Masatsune Kainosho<sup>3</sup>,  
 ○Heisaburo Shindo<sup>1</sup>

Protein Parkin is the gene product of *PARK2* responsible for Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism (AR-JP), one of the most common familial forms of Parkinson disease (PD). It consists of three domains, one of which is a ubiquitin like domain (Uld) at the N-terminus with 32% of identity to human ubiquitin. The function of Parkin has been identified as a ubiquitin-protein ligase, and the mutant Parkins from AR-JP patients show loss of the ubiquitin-protein ligase activity. In order to clarify the specific role of the Uld in Parkin, we have constructed the deletion mutant of Parkin which contains Uld alone. The structural characterization of Uld has been carried out using the heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy.

Protein Parkin is the gene product of *PARK2* responsible for Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism (AR-JP), one of the most common familial forms of Parkinson disease (PD). AR-JP is characterized by selective dopaminergic neural cell death and the absence of the Lewy body, a cytoplasmic inclusion body consisting of abnormally accumulated protein aggregates usually associated with other forms of PD. The function of Parkin has been identified as a ubiquitin-protein ligase, and the mutant Parkins from AR-JP patients show loss of the ubiquitin-protein ligase activity.

Parkin consists of three domains, one of which is a ubiquitin-like domain (Uld) at the N-terminus with 32% identity to human ubiquitin. The others include two RING-finger motifs at the C-terminus and a linker region which connects two other domains. It has been proposed that the Uld is involved in recognition of the target protein whereas the RING-finger motifs recruit ubiquitin conjugating enzyme E2. Recently, independent studies have revealed two different target proteins for Parkin. One of them is a 22kD glycoprotein named  $\alpha$ -synuclein (aSp22), a main component of the Lewy body, while the other is a G protein-coupled transmembrane protein called Pael receptor.

In order to clarify the specific role of the Uld in Parkin, we have constructed the deletion

Keywords: Parkin, Parkinson disease, solution structure, NMR, ubiquitin

おおくぼ せいじ、たしろ さくらこ、やすだ ひでよ、たしろ みつる、かいのしょう まさつね、  
 しんどう へいざぶろう

mutant of Parkin which contains Uld alone. The structural characterization of Uld has been carried out using the multidimensional NMR spectroscopy. The preliminary results along with the comparison of Uld with ubiquitins and their biological implications will be discussed.

## Methods and Experiments

The recombinant Uld was expressed using a pET28 vector in *E. coli* strain BL21(DE3). The protein was purified from the soluble fraction on a SP-Sepharose cation exchange column. Other impurities were removed by gel filtration chromatography. All NMR spectra were acquired at 25 °C on a Bruker DMX-500 or DRX-600 spectrometer. The standard triple-resonance methodology was employed to obtain sequential backbone and side-chain assignments for 1.0 mM samples of <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N- or <sup>15</sup>N-uniformly labeled Uld protein in 25 mM C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>COONa and 10% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at pH 5.0. The sequential connectivities were made using a CBCA(CO)NH and CBCANH pair of experiments, and verified using a HNCA experiment.

## Results and Discussion

Nearly complete backbone and side-chain sequential resonance assignments were obtained except the N-terminal region. The secondary structure of Uld in Parkin, as determined by the consensus of the chemical shift index, comprises four β-strands and two α-helices, and the overall positioning of the secondary structural elements in Uld is similar to that of human ubiquitin as shown in Figure 1. The comparison of hydrophobicity between Uld and human ubiquitin shows a small difference. This implies that the difference in the stability between two proteins is not simply due to the differences in amino acid sequences. Unlike human ubiquitin, Uld is unstable under the current NMR condition which made the task of assignment difficult. As the possibility of degradation has been eliminated by SDS-PAGE analysis, the aggregation from unfolding of Uld under this condition might be the major cause of the deterioration of NMR spectra. It is possible that the interaction with other domains is necessary for the stabilization of Uld. Once the assignment of all side chain protons is completed, three dimensional structure of Uld will be elucidated in order to investigate the recognition mechanism of the target protein by Parkin.

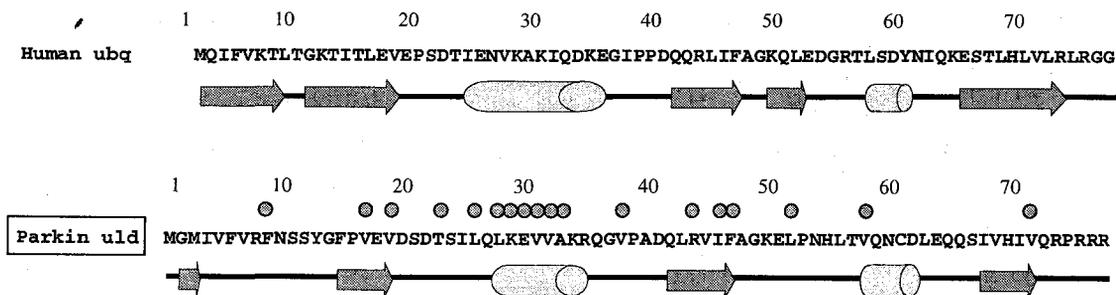


Figure 1. Comparison of the amino acid sequence and the secondary structural elements between uld and human ubiquitin.

ヒアルロン酸水溶液中の分子拡散における  
糖鎖構造と溶質の大きさの効果  
(理研)○益田晶子、丑田公規、越野広雪、山下宏一

Effect of hyaluronan pore structure and size of solutes  
on diffusion in aqueous hyaluronan solution.

(RIKEN)Akiko Masuda, Kiminori Ushida, Hiroyuki Koshino, Koichi Yamashita

The self-diffusion coefficients of water, tris(bipyridine) ruthenium (II) complex (Rubpy), methyl viologen (MV) and cytochrome c (Cytc) were measured in the aqueous hyaluronan (HA) solutions by a pulsed field gradient NMR (PFG-NMR) method. The observed diffusion constants of MV, Rubpy, and Cytc depended on the concentration of HA, and the results showed a sharp contrast to those estimated from photochemical experiments, where only slight effect of HA was observed. The difference in the diffusions observed by these two methods was ascribed to "distance dependent diffusion" reflecting the characteristic pore structures of HA aqueous solution.

【序】ヒアルロン酸(HA)は生体内に広く存在する直鎖の多糖で、水溶液中で絡み合い、網目構造を形成し、水を保持する性質を持つ。そのため、わずか1wt%程度の水溶液においても、HAの分子量や濃度を変えることによって、粘性率は数十~数万cPと劇的に変化し、その物性には医療の分野からも注目が集まっている。本研究では、HA水溶液中での、水分子(直径0.3nm)、トリスビピリジンルテニウム(II)錯体(Rubpy、直径1.0nm)、メチルピオローゲン(MV、長さ1.1nm)、シトクロムc(Cytc、直径3.4nm)の拡散定数を、パルス磁場勾配NMR

(PFG-NMR)法で直接測定し、拡散分子の大きさとHAの濃度・分子量が拡散定数に与える影響を明らかにすることを目的とする。また、このような不均一溶液中での拡散現象では、観測される拡散定数は糖鎖構造によって、観測時間すなわち拡散距離に依存すると考えられる。PFG-NMRの測定から得られる拡散定数は、拡散分子の大きさなどによって異なるが、拡散距離1-43 $\mu$ mの平均拡散定数である。一方我々はこれまで、HA水溶液中の輸送現象を検証するために、Rubpy錯体を用いた光励起分子間電子移動反応を研究してきたが、この反応には、15-43nmの拡散距離に対応する拡散定数が関与している。2種類の観測時間(拡散距離)で求めた拡散定数に対するHAの糖鎖構造、濃度の効果を実験的に示し、比較して考察する。

【実験】NMR測定: JEOL-A400および磁場勾配ユニットを用い、最大磁場勾配強度約0.9Tm<sup>-1</sup>で測定を行った。パルスシーケンスはstimulated-echoに2つの磁

ヒアルロン酸、パルス磁場勾配NMR法、糖鎖構造、分子拡散

ますだ あきこ、うしだ きみのり、こしの ひろゆき、やました こういち

場勾配パルスを加えたものを使用した。サンプル：HAは生合成により得た分子量の異なる3種類のサンプル（数平均分子量43万、128万、265万）を用いた。またHA水溶液は、HAの分子量・濃度によって4時間から12時間攪拌し、HA濃度0.18-2wt%の溶液を調製した。

【結果と考察】磁場勾配パルス照射時と非照射時のエコー強度の比（R）は、パラメーター、磁場勾配強度（G）・磁場勾配パルスの幅（ $\delta$ ）・拡散時間（ $\Delta$ ）と、 $R \propto \exp[-G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D]$ （D：拡散定数）式（1）という関係にある。水分子の場合は、どのパラメーターを変数としても式（1）を満たし、拡散定数はHAを加えても変化しなかった。これは、少なくとも数～数十 $\mu\text{m}$ オーダーの拡散距離の間では、水分子は自由にHA水溶液中を拡散できることを示す。一方MV、Rubpy、Cytcと拡散分子の大きさが大きくなると、HA鎖に干渉されて、水溶液中より拡散速度が遅くなることが明らかになった。（Figure 1）特にCytcではHA濃度が0.5wt%以下の非常に薄い領域で拡散が急激に遅くなることが明らかになった。この拡散定数の減少は、HAの分子量には依存しなかった。

Rubpy-CytcおよびRubpy-MVの光励起分子間反応を支配する数十nmの短距離拡散では、HAの効果はほとんど現れず、HAを含まない緩衝溶液中と同じ挙動を示した。これはHA鎖によるporeの存在を示唆し、その内側での微視的環境は緩衝溶液に非常に近いものと考えられる。一方PFG-NMRの測定で観測された数～数十 $\mu\text{m}$ オーダーの長距離の拡散はHAの濃度に依存し、poreを超えての拡散であることを示している。拡散分子の大きさがある程度大きくなると、HA水溶液中での拡散定数が、HA糖鎖構造を反映して、拡散距離に依存することが明らかになった。

【謝辞】本研究にご援助いただきました、電気化学工業（株）総合研究所 三好照三氏、中外製薬医薬企画部 高橋泰文氏に感謝いたします。

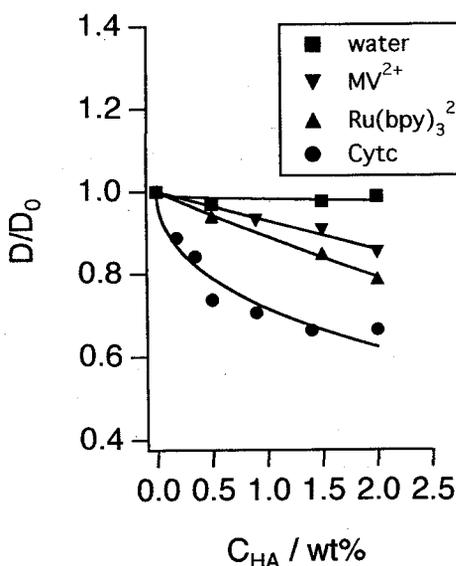


Fig. 1 The ratio of the diffusion constants in the presence and absence of HA plotted against the HA concentration.

## CAST/CNMRシステムの開発と立体化学決定への応用

(理研<sup>1</sup>, 国立情報学研<sup>2</sup>, 科技団さがけ 2 1<sup>3</sup>)  
 ○越野広雪<sup>1</sup>, 佐藤寛子<sup>2, 3</sup>, 中田 忠<sup>1</sup>

Development of CAST/CNMR System  
 and Its Application to Stereochemical Determination

(RIKEN<sup>1</sup>, NII<sup>2</sup>, JST PRESTO<sup>3</sup>)  
 H. Koshino<sup>1</sup>, H. Satoh<sup>2,3</sup>, T. Nakata<sup>1</sup>

We have developed a new computer system CAST/CNMR for <sup>13</sup>C-NMR chemical shift prediction using a database considering stereochemistry, efficiently. Stereochemistry is an essential attribute for accurate <sup>13</sup>C-NMR chemical shift prediction. A new canonical coding method for representation of 3D structures, CAST has been developed for this purpose. The database has been constructed, including structures with stereochemical information described by CAST with <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts of terpenoids, polyketides, and polyethers. CAST/CNMR system is successfully applied to some natural products and related synthetic compounds. Most of <sup>13</sup>C-NMR shift values are predicted with high accuracy by considering configurational information and solvent effects. Applications of CAST/CNMR to determination of stereochemistry are also presented.

天然有機化合物の構造解析,あるいはそれらの合成中間体の構造決定にNMRは非常に有効に利用されている。各種二次元NMRが容易に測定可能であり,平面構造の決定はルーチン的に行えるが,立体化学の決定は種々の測定法を駆使してホモおよびヘテロのスピン結合定数を求め,NOEの測定結果および配座解析も行い決定されている。複雑な化合物では分解反応や誘導体の調製を行って詳細に解析を行う場合も今だに多いのが現状で,多様な構造を有する天然有機化合物の構造解析の分野では新しい立体化学の決定法の開発は重要なテーマである。我々は,データベースに基づいて<sup>13</sup>C-NMR化学シフトを高精度で予測するコンピュータシステムの開発を行い,CAST/CNMRシステムを開発したので,今回その概要,ならびに立体異性体間の識別が可能な精度で<sup>13</sup>C-NMR化学シフトの予測を行う本システムの有機化合物の立体化学決定への応用について報告する。

CAST/CNMRシステムの特徴の一つは,分子の立体化学情報を個々の炭素を中心とする部分構造に持たせることで効率的かつ容易な構造の比較を可能とするCASTコード化法を利用することである。CAST(CAnonical representation of STereochemistry)法<sup>1)</sup>は独自に開発した分子の二面角情報に基づいた立体コード化法で,平面構造の表記法であるCANOSTコード<sup>2)</sup>と並列表記でき,立体配座情報を表現するConformational C A S Tコード<sup>3)</sup>および立体配置情報を表現するConfigurational C A S Tコード<sup>4)</sup>がある。一般にはC A S T / C N M R システム

CAST/CNMR, 立体化学, 化学シフト予測, データベース, 構造解析

こしのひろゆき、さとうひろこ、なかたただし

では Configurational CAST を主に利用するが、立体配座を考慮する必要のある分子、たとえば中員環構造で2種の配座が安定に存在可能であり、明確に異なる化学シフトを与える化合物などでは、Conformational CASTを利用することで、より正確なシフト予測が可能になる。

CAST/CNMRシステムの基本的な機能について簡単に説明する。CAST/CNMRで $^{13}\text{C}$ -NMRの化学シフトを予測するために必要な入力ファイルは、予測対象分子の3次元構造ファイル(MDL-molfile形式)と2面角情報ファイルである。3次元構造ファイルは、立体化学を含めて記述したChemDrawファイルをもとにChem3Dで3次元構造に立ち上げた後、MM2計算により構造最適化を行ったものを用いている。CAST/CNMRでは、入力分子に対して予測したい各炭素から任意の結合数までの範囲の部分構造が一致する化合物の実測データをデータベースから検索し、その条件を満たすデータの平均値をシフト予測値とする。検索条件として、平面構造および立体配置情報、立体配座情報の比較が可能である。一般的には3結合先までの平面構造および立体配置を比較することを基本としている。さらに4結合先、5結合先と広げていくことにより予測精度を上げることが可能である。また、各原子や置換基が含まれる環のサイズを考慮することも可能で、予測精度の向上に効果的である。溶媒効果を考慮することも重要で、可能であれば同じ溶媒で測定したデータのみを利用することが望ましい。但し、条件を厳しくするほど該当するデータが少なくなるため、データベースに類似構造が含まれているかどうか重要な鍵となる。現在までにデータベースに登録した分子は約750件で、テルペノイド、ポリケタイド、ポリエーテル系の天然有機化合物および関連する合成品から構成されている。独自に帰属した合成品のデータでは通常帰属されない合成中間体の保護基の部分も帰属してデータベースに入れている。現在、データベースに格納されている最も大きなサイズの分子は、ペプチドや多糖を除く天然有機化合物として最大のmaitotoxin(炭素数164個)である。また、規則性のあるポリマーであればオリゴマーとして入力可能である。現在のところ、水素結合が強く、立体配座を考慮することが必須であるペプチド類は本システムの対象にはしていない。核種は $^{13}\text{C}$ の他、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{29}\text{Si}$ 、 $^{31}\text{P}$ なども同様に扱えるが、 $^1\text{H}$ -NMRに関しては、遠隔位の影響が大きいので現在のシステムでは十分な精度が期待できないと考えている。

CAST/CNMRを用いた立体化学の決定の考え方はシンプルで、立体化学を決定したい分子の予想立体化学、および可能性のある立体異性体について予測された $^{13}\text{C}$ -NMRシフト値と実測値を比較し、高い一致が見られた場合に、入力した立体化学が最も可能性の高い構造であると決定できる。不斉点が隣接する場合や一原子を介して存在する場合には比較的立体異性体間のシフト差が大きく、立体化学を決定出来る場合が多い。今後データベースの充実に伴って有望な手法となると期待できる。発表ではCAST/CNMRの幾つかの応用例も合わせて報告する予定である。

#### 参考文献

- 1) 越野広雪, 佐藤寛子, 船津公人, 中田 忠, 鶴澤 洵, 第39回NMR討論会講演要旨集p400(2000)
- 2) H. Abe, Y. Kudo, T. Yamasaki, K. Tanaka, M. Sasaki, S. Sasaki *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **24**, 212 (1984).
- 3) H. Satoh, H. Koshino, K. Funatsu, T. Nakata, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **40**, 622 (2000).
- 4) H. Satoh, H. Koshino, K. Funatsu, T. Nakata, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, in press.

セレクチン糖鎖リガンド、シアリルルイス X の新規誘導体の構造と活性

(理研 GSC<sup>1</sup>, 横浜市大院総合理<sup>2</sup>, 岐阜大農<sup>3</sup>, 愛知県がんセンター<sup>4</sup>)

○濱田季之<sup>1,2</sup>, 廣田 洋<sup>1,2</sup>, 横山茂之<sup>1</sup>, 大坪伸将<sup>3</sup>, 石田秀治<sup>3</sup>, 木曾 真<sup>3</sup>, 金森審子<sup>4</sup>, 神奈木玲児<sup>4</sup>

NMR analysis of novel ganglioside Lewis X and GM4 analogues containing de-N-acetyl and lactamized sialic acid: probes for searching new ligand structures for human L-selectin

(GSC, RIKEN<sup>1</sup>; Integrated Science, Yokohama City Univ.<sup>2</sup>; Applied Bioorganic Chemistry, Gifu Univ.<sup>3</sup>; Molecular Pathology, Aichi Cancer Center<sup>4</sup>)

○Toshiyuki Hamada<sup>1,2</sup>, Hiroshi Hirota<sup>1,2</sup>, Shigeyuki Yokoyama<sup>1</sup>, Nobumasa Otsubo<sup>3</sup>, Hideharu Ishida<sup>3</sup>, Makoto Kiso<sup>3</sup>, Akiko Kanamori<sup>4</sup>, and Reiji Kannagi<sup>4</sup>

On the basis of NMR analysis of two model gangliosides, de-N-acetyl sialyl GM4 (4) and cyclic sialyl GM4 (5), structure determination of novel selectin ligand, cyclic-6-sulfo sialyl Lewis X (3), which contains lactamized sialic acid instead of usual N-acetylneuraminic acid, was carried out. The combination of NMR data, such as chemical shifts, coupling pattern, intrasidual NOEs, and the appearance of NH proton signal provided the B<sup>3,2</sup> conformation for 3. Moreover, conformations of a glycosidic bond connecting the Neu and Gal residues of 3, 4, and 5 were determined by some interresidual NOEs.

セレクチン (selectin) は、血管内皮細胞、白血球、血小板などに発現する細胞接着分子のファミリーであり、白血球の血管外脱出、リンパ球のホーミング、悪性腫瘍細胞の浸潤や転移に関与するとされている。このセレクチンファミリーの細胞接着分子には、E-, P-, および L-selectin の 3 種類があるが、基本構造はそれぞれ類似しており、特に分子の N 末端にお互いに相同性の高い C 型 (Ca<sup>2+</sup> 依存性) レクチン様ドメインをもつ。つまり、このレクチン様ドメインがリガンドである糖鎖分子と相互作用し、細胞接着を引き起こす。最近、神奈木らは、L-selectin の糖鎖リガンドが 6-sulfo sialyl Lewis X (1; 6-sulfo SLeX) であることを明らかにした。更に、この 6-sulfo SLeX の発現の調節機構は、シアラ酸部分の環状化を介したユニークな経路で進行することが分かった。つまり、Figure 1 に示したように、6-sulfo SLeX (1), deNAc-6-sulfo SLeX (2; 強いセレクチン結合活性を有するが不安定), cyclic-6-sulfo SLeX (3; 結合活性を不活性化) の 3 つの糖鎖がお互いに構造変化し、その存在比を変えることで、セレクチンとの結合が調節される。

これら糖鎖リガンドの中で、cyclic 6-sulfo SLeX (3) の化学構造については、FAB マススペクトル解析、およびそのアルカリ耐性から、図に示したラクタム環を持つ構造と推定されてはいるものの、直接的な化学構造の解明は行われていなかった。

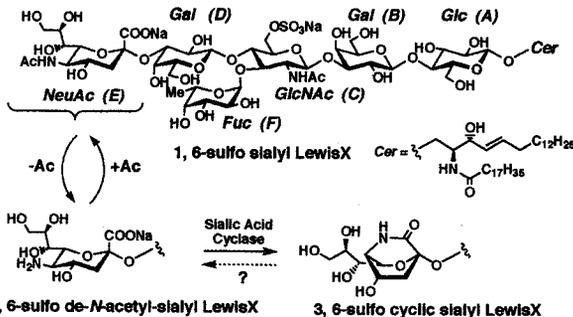


Figure 1: Hypothetical metabolic pathway of 6-sulfo sialyl Lewis X by cyclization of sialic acid; the cyclic sialic acid pathway

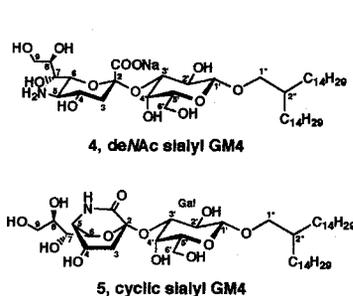


Figure 2: Chemical structures of de-N-acetyl and cyclic sialyl GM

セレクチン、糖鎖リガンド、シアリルルイス X、NMR、コンフォメーション

はまだ としゆき, ひろた ひろし, よこやま しげゆき, おおつぼ のぶまさ, いしだ ひではる, きそ まこと, かなもり あきこ, かななぎ れいじ

そこで、我々は各種 NMR 法を用いて、この化学構造を決定し、更に、他の代謝物を含めた三次元構造の解明を試みた。

Cyclic 6-sulfo SLeX は、生体内に極微量しか存在せず、しかも 6 個の糖鎖を含むことからスペクトルが複雑になるため、NMR 解析はかなり困難であることが予想された。そこで、まず、モデル化合物を用いた構造解析を行った。化学合成で得られた de-N-acetyl sialyl GM4 (4) を高温下で WSC (water-soluble carbodiimide) で脱水処理することで、RI スペクトルで  $1690\text{ cm}^{-1}$  に吸収をもつ化合物が得られた。この IR 吸収から、目的のラクタム環を形成した cyclic sialyl GM4 (5) が得られたことを確認した。

そこで、4 と 5 について、それぞれ、gs-COSY, HOHAHA, NOESY, HMQC, 及び HMBC スペクトルを測定し、 $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift の帰属を行なった。5 は、ラクタム環を形成し、B<sup>5,2</sup> タイプの boat 型の構造をとっているが、それにより下記に示すいくつかの特徴的な NMR 情報を与えた。

1. 化合物 4 と 5 において、シアル酸部分の chemical shift 値が大きく変化する。
2. 化合物 5 のシアル酸の H-3 $\alpha$  と H-3 $\beta$  が boat 型の典型的なカップリングパターンを示す。{それぞれ  $\delta$  1.84 (dd, 4.4, 13 Hz) と  $\delta$  2.26 (dd, 13, 14 Hz)}
3. 化合物 5 において、H-5 と H-3 $\alpha$  から C-1 に HMBC クロスピークが観測される。
4. 軽溶媒 (95% DMSO-*d*<sub>6</sub> / 5% H<sub>2</sub>O) 中で、5 は、 $\delta$  8.90 (d, 5.7 Hz) にアミドプロトンが観測される。
5. その他、boat 型特有の W-タイプのロングレンジカップリングや NMR 情報あり。

これらの結果をもとにして、次に、cyclic 6-sulfo SLeX (3) の NMR 解析を行なった。その結果、

1. Neu - Gal の  $^1\text{H}$ -NMR の chemical shift 値が、cyclic sialyl GM4 (5) の値とよく一致する。
2. 軽溶媒中の  $^1\text{H}$ -NMR, gs-COSY スペクトルの測定で、 $\delta$  8.93 (d, 5.0 Hz) に、アミドプロトンの存在が確認できた。
3. その他の NMR 情報も 5 のそれと良く一致する。

以上のことより、化合物 3 は、予想されていた通りシアル酸部分がラクタム環化した構造であることが決定できた。

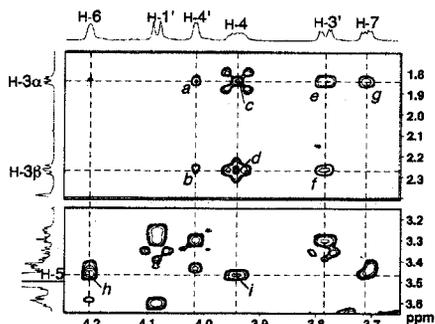


Figure 3: A part of NOESY spectrum of cyclic sialyl GM4 (5) with 300-ms mixing time. NOE peaks are assigned to (a) Neu H-3 $\alpha$  - Gal H-4; (b) Neu H-3 $\beta$  - Gal H-4; (c) Neu H-3 $\alpha$  - Neu H-4; (d) Neu H-3 $\beta$  - Neu H-4; (e) Neu H-3 $\alpha$  - Gal H-3; (f) Neu H-3 $\beta$  - Gal H-3; (g) Neu H-3 $\alpha$  - Neu H-7; (h) Neu H-5 - Neu H-6; (h) Neu H-5 - Neu H-4.

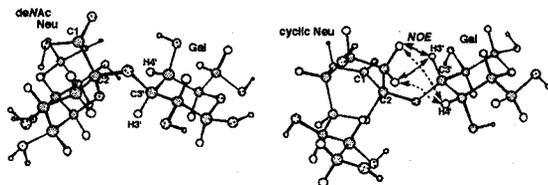


Figure 4: Schematic drawing of possible conformations of two sugar moieties for deNAc sialyl GM4 (4; left) and cyclic sialyl GM4 (5; right). Some critical NOEs for 5 are described. The following values were obtained for the dihedral angles at the glycosidic bond: deNAc sialyl GM4  $\phi$  (C1-C2-O-C3') =  $-160^\circ$ ,  $\psi$  (C2-O-C3'-H3') =  $-21^\circ$ ; cyclic sialyl GM4  $\phi$  (C1-C2-O-C3') =  $90^\circ$ ,  $\psi$  (C2-O-C3'-H3') =  $0^\circ$ .

次に、化合物 4, 5 の NOESY スペクトル (Figure 3) の解析から、それぞれの Neu-Gal 間のコンフォメーションについて検討した。その結果、deNAc 体(4)は、Neu H-3 $\alpha, \beta$  と Gal H-3' との間に非常に弱い NOE を示し、これまでに報告されているように、conformer I が major ではあるものの conformation は固定されず、いくつかの構造をとっていることが示唆された。一方、化合物 5 は、Neu H-3 $\alpha, \beta$  - Gal H-3 に強い NOEs と Neu H-3 $\alpha, \beta$  - Gal H-4 間に中程度の NOEs を示した。これより、5 はほぼ単一の構造、conformer II をとっていると思われる。(Figure 4)

化合物 2 と 3 についても、同様の NOESY 解析を行なっており、それぞれ化合物 4, 5 と同様の結果を与えていることが分かった。現在、6 個の糖鎖を含めた全体の conformation 解析を行なっており、その結果及びそこから得られる生理学的知見の詳細についても、本討論会で示す予定である。

$^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  NMRの外部複基準法を利用して in situ バルク体積磁化率で補正して求めた(ブタノール/重水)系の unified scale で表わした4種のブタノールのケミカルシフトの濃度依存性と温度依存性の研究

(福井大・機セ) ○橋田広人、増田容子、水野和子

Concentration and Temperature Dependences of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Chemical Shifts Measured by an External Reference Method and Corrected in Terms of in situ Bulk Volume Magnetic Susceptibilities; Binary Aqueous Mixtures of Four Butanol Isomers.

(Fukui University, Center for Instrumental Analysis) ○ Hiroto Hashida, Yoko Masuda, and Kazuko Mizuno.

Concentration and temperature dependences of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts in NMR of binary aqueous mixtures of four butanol isomers were studied.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts were measured by the external double reference method using a capillary with a blown-out sphere at the bottom, in which liquid hexamethyldisiloxane, as an external reference substance, was sealed. By the method, it is possible to correct the observed chemical shifts in terms of in situ bulk magnetic susceptibilities. Changes in the chemical shift of the reference peak due to temperature changes were also taken into consideration of the correction to obtain chemical shifts measured on a unified scale over all the data to be compared strictly with each other.

● はじめに

私達はこれまでに IR と NMR 分光法を用いて、アセトン/水、DMSO/水、ジオキサン/水の系において疎水性水和の研究を行ってきた。その結果、水の濃度が高くなるにつれて、より分極した水の存在が確認された。そして、水の分極の大きさは、溶質の親水基の basicity と関係つけられることが明らかになってきた。ここでは、4種のブタノール異性体/重水の系についての実験結果をもとに、水和のメカニズムを解明することを目的とする。

外部複基準法・ブタノール・温度依存性・濃度依存性・ケミカルシフト・水

○はしだひろと、ますだようこ、みずのかずこ

## ● 実験

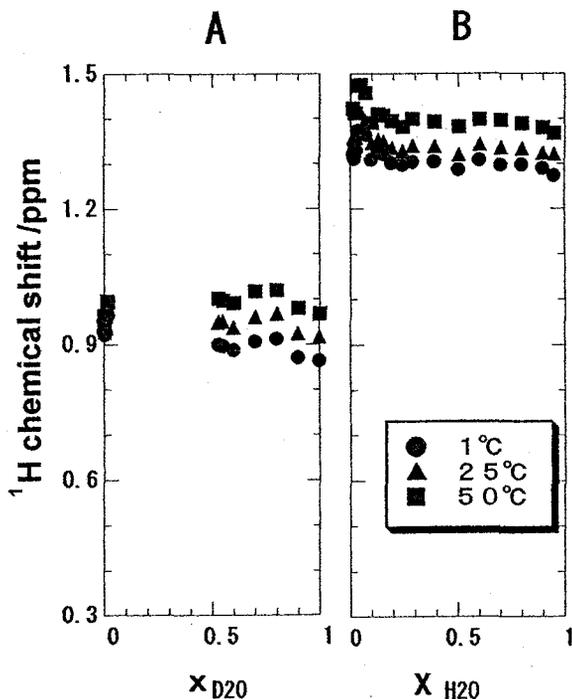
NMR の測定は、外管に試料溶液、内管に基準物質（ここでは、ヘキサメチルジシロキサンを使った）を入れて測定する外部基準法で行った。従って内部基準法とは違い、試料溶液と基準物質を分離するので、溶媒や組成が異なっても基準物質の化学状態が変わることなく、複数のサンプルに共通の基準として測定することができる。内管には、通常用いられるシリンダー状のものとは違い、先端が球状になっている細管を使用した。この内管を使用すると球とシリンダー状部分にある基準物質の 2 本のシグナルを観測することができる。2 本のシグナルのケミカルシフトの差  $\Delta\delta$  を利用することで、バルクの体積磁化率の測定を同時に行い、これを用いてバルクの体積磁化率の補正をした。さらに、温度依存性の測定において、25°C のケミカルシフトを基準にして 1°C、50°C のケミカルシフトの補正を行った（詳しくは P87 参照）。

これらの補正によって、全てのケミカルシフトのデータは、25°C のヘキサメチルジシロキサンのメチルプロトン を 0 ppm とした unified scale で表わしてある。

ヘキサメチルジシロキサン (HMDO) を基準物質として、ブタノールの  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを JEOL JMN-EX400 分光器により 1°C、25°C、50°C で測定した。

## ● 結果と考察

右に示してある図は (n-butanol/ $\text{D}_2\text{O}$ ) 系と (t-butanol/ $\text{H}_2\text{O}$ ) 系のそれぞれの  $\text{CH}_3$  基プロトンケミカルシフトの濃度依存性と温度依存性を示したものである。比較してみると、t-butanol の  $\text{CH}_3$  基プロトンケミカルシフトに比べて、n-butanol の  $\text{CH}_3$  基プロトンケミカルシフトの温度依存性がわずかに大きいというのがわかる。これは、それぞれの構造に由来するものであると予想される。



Concentration and Temperature Dependences of  $\text{CH}_3$  protons in A)n-butanol/ $\text{D}_2\text{O}$  and B)t-butanol/ $\text{D}_2\text{O}$ .

有機化合物 50  $\mu$ g の  $^{13}\text{C}$  NMR

(シーエーシーズ 横浜分析センター) ○櫻井愛子, 松原康史

 $^{13}\text{C}$  NMR on Samples of under 50 Micrograms

Yokohama Laboratory, Center for Analytical Chemistry and Science, Inc.

Aiko Sakurai and Koshi Matsubara

The detection limit of  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum was estimated using a Varian Nanoprobe for a weekend experiment in the field of 11.7 T and 298 K. We experimentally examined the effect of pulse repetition time and flip angle on the signal to noise ratio (S/N) of a quaternary carbon using 600  $\mu$ g of cholesterol in 40  $\mu$ l  $\text{CDCl}_3$ . The S/N of the quaternary carbon in the spectrum acquired in 63 hours was 6.4 for 30  $\mu$ g of cholesterol, and the detection limit (S/N = 3) was estimated to be 14  $\mu$ g.

低分子量有機化合物の分子構造を決定する場合,  $^1\text{H}$ , COSY,  $^{13}\text{C}$ , DEPT,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC および HMBC スペクトルが測定できればかなりの程度まで構造が決まる. しかし, 例えば代謝物や天然物など試料が微量である場合には, 相対的に感度が低い  $^{13}\text{C}$  NMR や HMBC で解析に十分なスペクトルが得られないことが多々ある.  $^{13}\text{C}$  NMR が測定できる試料量があれば他のスペクトルも測定できる. そこで, 高感度な溶液 MAS プローブを用いて低分子量有機化合物の測定条件を検討し, いかにか微量の試料で  $^{13}\text{C}$  NMR が日常的に測定できるかを確認した.

一般に水素の結合した炭素は四級炭素より S/N 比が高いため, 四級炭素が検出できれば全てのシグナルが検出できると期待される. そこで定量性を多少犠牲にしても四級炭素の S/N 比が高いスペクトルを得ることを目的として測定条件を検討した. 一定時間内での S/N 比を上げるためには, 基本的には許容できるデジタル分解能の範囲内でパルス繰り返し時間を短くすれば良い. ただしそれがスピンスピン緩和時間  $T_2$  に対して短すぎるとスペクトルの位相を合わせることができなくなる. つまり, パルス繰り返し時間の下限は必要なデジタル分解能あるいは  $T_2$  により決まる. フリップ角は Ernst の式から導かれる値を目安にできるが, そのために必要なスピンスピン緩和時間  $T_1$  および  $T_2$  を実際に微量試料を扱う場合に実測できるケースはほとんどない. そこで, 微量の未知化合物を測定する際の参考とすべく, 2, 3 の低分子量有機化合物についてパルス繰り返し時間とフリップ角の S/N 比への影響を実験的に確認し, S/N 比が最高になる条件で  $^{13}\text{C}$  NMR を測定した.

溶液 MAS,  $^{13}\text{C}$  NMR, 微量

さくらあいこ, まつばらこうし

装置はバリアン社製 Unity Inova NMR 分光計, プローブはバリアン社製  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  ナノプローブを用いた. 共鳴周波数は 125MHz, 測定温度は 25°C である. データ取得後の待ち時間をゼロとして 67 時間積算したショ糖 45  $\mu\text{g}$  (0.13  $\mu\text{mol}$ , 重水 40  $\mu\text{l}$ ) の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを Fig. 1 に示す. 全てのシグナルを良好な S/N 比で観測できている. 次にコレステロール 600  $\mu\text{g}$  の重クロロホルム 40  $\mu\text{l}$  溶液を用い, パルス繰り返し時間とフリップ角による 140.7ppm の四級炭素の S/N 比への影響を調べた. その結果決定した測定条件を用いてコレステロール 30  $\mu\text{g}$  (0.08  $\mu\text{mol}$ ) を重クロロホルム 40  $\mu\text{l}$  中で 63 時間積算した  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを Fig. 2 に示す. 四級炭素の S/N = 6.4 より, 検出下限 (S/N = 3) は 14  $\mu\text{g}$  と概算できる.

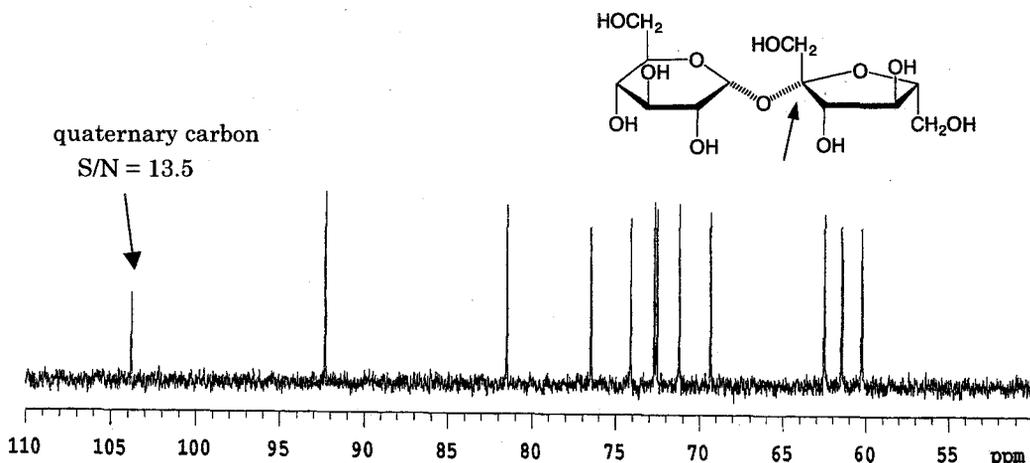


Figure 1.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 45  $\mu\text{g}$  of sucrose in 40  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$ . The total experimental time was 67 h.

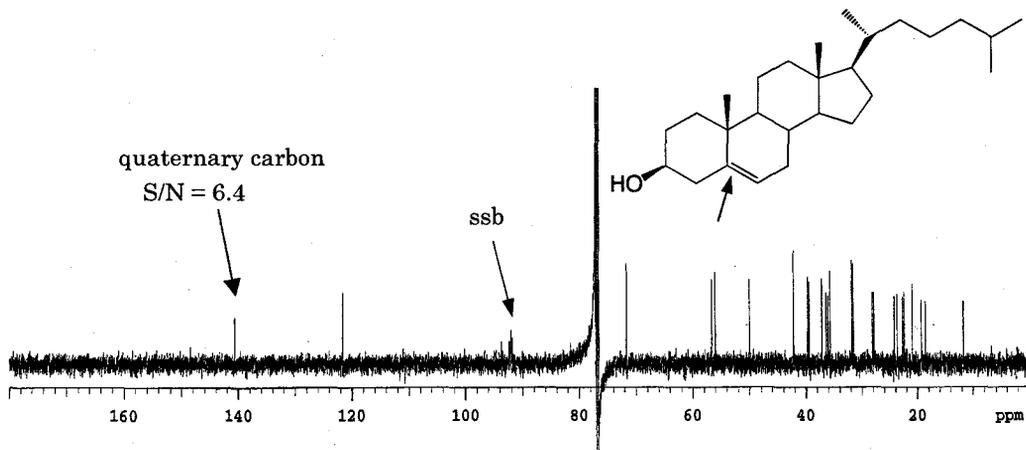


Figure 2.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 30  $\mu\text{g}$  of cholesterol in 40  $\mu\text{l}$   $\text{CDCl}_3$ . The total experimental time was 63 h.

## 重炭酸ナトリウム水溶液とその水酸化アルミニウムへの吸着挙動

(産業技術総合研究所九州センター<sup>1</sup>, イリノイ大学地質学科<sup>2</sup>)

○野間 弘昭<sup>1</sup>, R. James Kirkpatrick<sup>2</sup>, Xiaoqiang Hou<sup>2</sup>

Aqueous Solution of Sodium Bicarbonate and its Adsorption Behavior on Aluminum Hydroxide

Hiroaki Noma<sup>1</sup>, R. James Kirkpatrick<sup>2</sup>, Xiaoqiang Hou<sup>2</sup>

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)<sup>1</sup>, University of Illinois<sup>2</sup>

Spectra and relaxation times ( $T_1$ ,  $T_2$ ) of  $^{13}\text{C}$  and  $^{23}\text{Na}$  NMR were measured for both aqueous solutions of  $\text{NaHCO}_3$  and suspensions of amorphous  $\text{Al}(\text{OH})_3$  in the solutions to analyze the chemical species of the solutions and the adsorption behaviors of carbonate ions on the hydroxide surfaces.  $T_2$  value of  $^{13}\text{C}$  NMR of the solutions was less than 1/10 of  $T_1$ , which is attributed to the rapid proton exchange of bicarbonate ions. The line widths of  $^{13}\text{C}$  and  $^{23}\text{Na}$  NMR signals of the suspensions increased compared with those of the neat solutions. This indicates that both bicarbonate ions and Na ions exchange rapidly between solutions and solid surfaces. Carbonate fractions sorbed on the surface were estimated from  $T_1$  values of  $^{13}\text{C}$  NMR and compared with the values from the sorption isotherm. By solid-state NMR of solid samples after the sorption, it was clarified that part of carbonate ions were chemically sorbed on the surfaces.

### 1. はじめに

地球の炭素サイクルを考える時、水に溶解した炭酸イオン種の状態と、その鉱物表面との相互作用を分子レベルで明らかにすることは重要である。今回、重炭酸ナトリウム水溶液と、この溶液に水酸化アルミニウムを懸濁させたモデル系を用いて、 $^{13}\text{C}$ と $^{23}\text{Na}$  NMRのスペクトルとその緩和時間 $T_1$ と $T_2$ を測定することで、炭酸イオンの溶存状態と吸着挙動について検討した。

### 2. 実験方法

$^{13}\text{C}$ を濃縮した0.05M  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ に1N HClまたは1N NaOHを添加してpHを変化させた。10mm NMR管に、非晶質の $\text{Al}(\text{OH})_3$ を加え、さらに各種濃度の $\text{NaHCO}_3$ 溶液を添加して、固液比0.4g/mlの懸濁液を調整した。溶液と懸濁液の $^{13}\text{C}$ と $^{23}\text{Na}$ のNMRを、Varian製Unity Inova 600 (14.1 T)を用いて、25°Cで測定した。緩和時間 $T_1$ と $T_2$ の測定には、それぞれ反転回復法とCarr-Purcell-Meiboom-Gill法を用いた。別に湿式分析で $\text{NaHCO}_3$ 溶液の $\text{Al}(\text{OH})_3$ への吸着等温線を求めた。40mlの $\text{NaHCO}_3$ 溶液に1gの $\text{Al}(\text{OH})_3$ を加え、25°Cの恒温槽で2時間攪はんし、ろ別後、ろ液中の炭素量をUIC, Inc.製Model 5014  $\text{CO}_2$  Coulometerで、NaをICPで定量した。ろ別後の固体試料は、固体NMRで評価した。

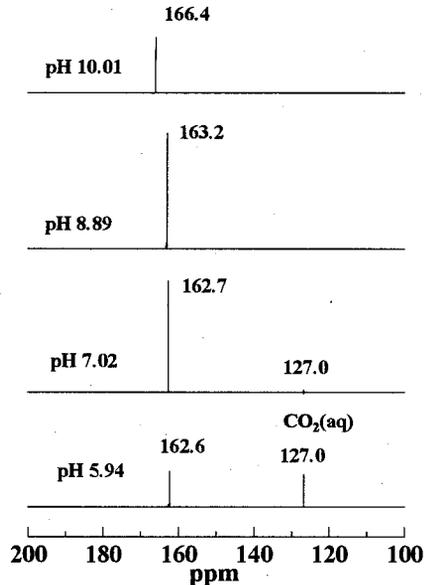


Fig.1  $^{13}\text{C}$  NMR of  $\text{NaHCO}_3$  solutions.

重炭酸イオン、炭酸イオン、緩和時間、プロトン交換、イオン吸着

のみ ひろあき, R. ジェイムズ・カークパトリック, ショウチャン・ホウ

### 3. 結果と考察

図1に0.05M NaHCO<sub>3</sub>溶液の<sup>13</sup>C NMRスペクトルを示す。純粋溶液のpHは8.89で、163.2ppmに1本のシグナルが認められた。pHを変化させると、化学シフトは162.6から166.4ppmに変化し、純粋のNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液では170.1ppmであった。これはHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>イオンとCO<sub>3</sub><sup>2-</sup>イオンの2種類のイオンが高速で交換しているために、一本のシグナルとなり、その存在割合に比例して化学シフトが変化するためである<sup>1)</sup>。普通の溶液ではT<sub>1</sub>とT<sub>2</sub>は一致するはずだが、<sup>13</sup>CのT<sub>2</sub>(2.1s)はT<sub>1</sub>(33s)の1/10以下となっており、これはこの化学交換の効果と考えられた。低いpHでは-127.0ppmにCO<sub>2</sub>(aq)の存在が認められた<sup>1)</sup>。<sup>23</sup>Na NMRでは、0 ppm付近に1本のシグナルが認められ、pHによる変化はほとんどなく、T<sub>1</sub>とT<sub>2</sub>は一致した。

懸濁液では、溶液と比較して化学シフトはほとんど変化しなかったが、その線幅(半価全幅)は、<sup>13</sup>C NMRでは溶液の1~3Hzから163Hzに大幅に増加した。Naの線幅も7Hzから80Hzに増加した。この線幅の増加に対応して、T<sub>2</sub>の値はCでは1/75以下、Naでは1/7程度に減少した。このことから、炭酸イオンとNaイオンともに溶液と固体表面の間を動的に交換していることがわかる。

NaHCO<sub>3</sub>溶液と懸濁液の<sup>13</sup>CのT<sub>1</sub>を図2に示す。濃度が変化しても、溶液のT<sub>1</sub>がほぼ一定であるのに対し、懸濁液のT<sub>1</sub>は、1Mでは溶液と同じであったのに、濃度が減少するに従い減少した。これは重炭酸イオンが溶液中と固体表面の間を動的に交換しているため、測定されたT<sub>1</sub>の値は、式(1)に示すように、溶液と表面の値の平均化されたものとなる。

$$R_{\text{avg}} = \alpha R_{\text{surf}} + (1 - \alpha) R_{\text{soln}} \quad (1)$$

( $R = 1/T_1$ : 緩和速度,  $\alpha$ : 全体の炭酸イオンの内、固体表面に存在する割合)

この式と、 $R_{\text{surf}} = 0.3$ と推定することで、存在割合 $\alpha$ を計算でき、図3にT<sub>1</sub>から求めた $\alpha$ の値と、湿式分析により求めた吸着等温線を示す。NMRと湿式分析で固液比が異なるために、横軸には固体の単位表面積あたりの全炭素量を用いて標準化した。2つの方法で求めた値は、低濃度では一致するのに対し、高濃度ではNMRから求めた値の方が小さかった。ろ別後の固体試料の<sup>13</sup>Cと<sup>23</sup>Naの固体NMRから、Al(OH)<sub>3</sub>表面に化学吸着した炭酸イオンとNaイオンが検出された。以上から、多くの炭酸イオンとNaイオンは溶液と固体表面の拡散層の間を高速に交換しているが、一部のイオンは固体表面に化学吸着しており、懸濁液のNMRのシグナルとは別の広幅のシグナルとなる。このため緩和時間の測定では、固体表面に化学吸着された分は含まれず、固体表面での存在割合 $\alpha$ が高濃度では湿式分析の値よりも小さくなったと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Abbott, T. M.; Buchanan, G. W.; Kruus, P.; Lee, K. C. *Can. J. Chem.* 1982, 60, 1000-1006.

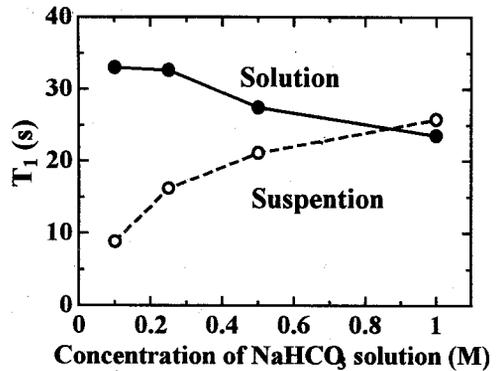


Fig. 2 <sup>13</sup>C T<sub>1</sub> of suspension of Al(OH)<sub>3</sub>.

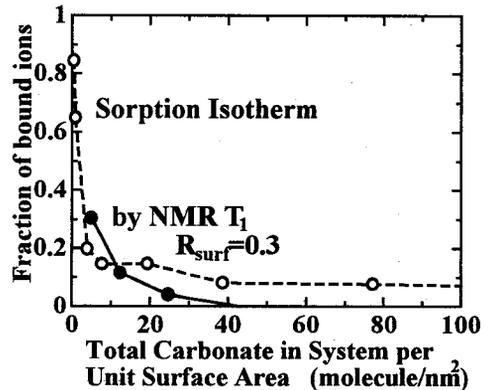


Fig. 3 Amount sorbed for amorphous Al(OH)<sub>3</sub> from T<sub>1</sub> and sorption isotherm data.

**PFG-NMR 法による高圧マイクロエマルションの  
拡散・ダイナミクスの解明**

(ノースカロライナ大・化学1、テキサス大・化学工学2)

○永嶋一臣<sup>1</sup>, B. Xu<sup>1</sup>, Joseph M. DeSimone<sup>1</sup>, C. Ted Lee, Jr.<sup>2</sup>,

K. P. Johnston<sup>2</sup>, C. S. Johnson, Jr.<sup>1</sup>

**Diffusion and Dynamics of High Pressure Microemulsions Probed by PFG-NMR**

University of North Carolina<sup>1</sup> and University of Texas<sup>2</sup>, Kaz Nagashima<sup>1</sup>, Bin Xu<sup>1</sup>,

Joseph M. DeSimone<sup>1</sup>, C. Ted Lee<sup>2</sup>, Jr., Keith P. Johnston<sup>2</sup>, and Charles S. Johnson, Jr.<sup>1</sup>

Liquid and supercritical carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) has been used as a solvent alternative in food, cleaning, and separation industry. Its non-toxic, non-flammable, and low cost natures are the advantages above conventional hydro- and fluoro- carbons. However, there is a drawback in that most polar species cannot dissolve in the high pressure solvent. Recent attentions have then been toward the use of water mixture to incorporate polar catalysts, inorganic compounds, and bio-macromolecules. Ammonium salt of mono-carboxylated perfluoropolyether (PFPE-NH<sub>4</sub>) is one of few surfactants which form aqueous microemulsions in liquid and supercritical carbon dioxide (i.e., water/CO<sub>2</sub> microemulsion).<sup>1)</sup> This report presents the diffusion and relaxation behavior of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PFPE backbone, and water in liquid CO<sub>2</sub>. A flame-folded high pressure capillary<sup>2)</sup> and ordinary liquid NMR probe were used for the measurements above 400 atm.

近年、液体及び超臨界二酸化炭素は従来の有機溶媒の代替品として注目を集めている。無害、非燃、低価格といった特徴に加え、臨界圧・臨界温度が低く (T<sub>c</sub> = 31.4 °C, P<sub>c</sub> = 72.8 atm)、高い圧縮率を持つため取扱い易い。さらにその低い粘度や表面張力が通常の溶媒では不可能な細かい洗浄や効率の良い合成反応を可能にする。蒸発熱が極めて低いため (元よりガスだからバルブを開けば逸散する) 水に比してエネルギー消費が少ない。しかし、かくも多くの利点を持ちながら利用が広まらないのには理由がある。二酸化炭素は俗に化学で言う「貧溶媒」で、揮発性の高い小さな分子以外、殆どの中・高分子量種が溶けない。また永久双極子をもたないため、水や無機塩といった極性のあるものも微量しか溶けない。

最近、環境科学への感心の高まりから急進的にこの分野の研究が進み、分子量 700 程度のフッ化ポリエーテル界面活性剤が水/二酸化炭素マイクロエマルション形成の仲立ちをすることが発見された。<sup>1)</sup> 活性剤濃度や系の圧力を変えると、50体積%まで水を混入することができるため、イオン種や親水性物質の適用も可能となる。新しい活性剤の分子設計やマイクロエマルション形成の最適条件の発見のため、当該系の構成物の分子交換や拡散を

高圧、毛細管、拡散、緩和、分子交換

ながしまかずおみ、ビン・シュー、テッド・リー、ジョー・ディシモン、キース・ジョンストン、チャールズ・ジョンソン

調べることは有意義と考える。本報告では水、活性剤、アンモニウムイオンの動的挙動並びに拡散を高圧耐性毛細管<sup>2)</sup>を用い通常の液体用 NMR プロブで調査した。H<sub>2</sub>O と NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の間での水素原子の交換が液体二酸化炭素中で観察された。また拡散実験の結果より、含水量に関わらず、水分子は逆ミセル内にほぼ完全に包含されることが分かった。

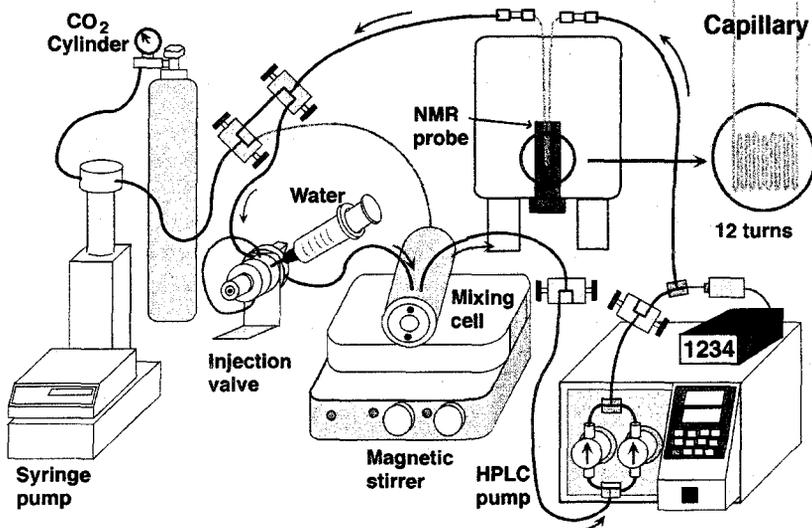


Fig. 1 High pressure set-up and flame-folded capillary.

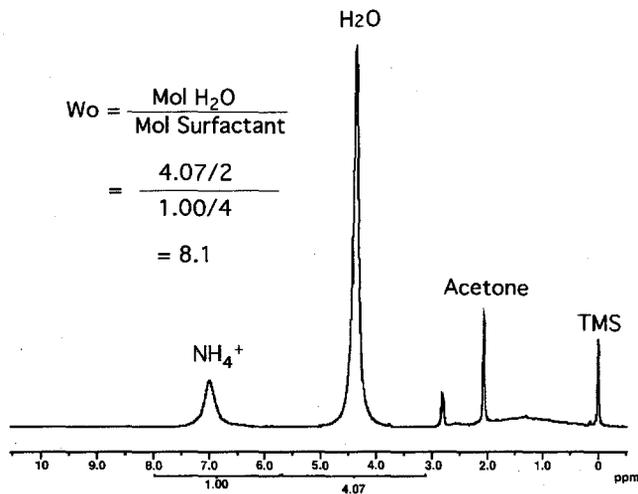


Fig. 2 <sup>1</sup>H NMR spectra of the microemulsion sample at 4,000 psi (272 atm).

1. K. P. Johnston *et al.* *Science*, 271, 624 (1996); C. T. Lee, Jr. *et al.* *J. Phys. Chem. B* 104, 4448 (2000).
2. C. R. Yonker, *et al.* *J. Magn. Reson. A* 113, 102 (1995).

### Application of <sup>19</sup>F NMR Relaxometry to the determination of porosity and pore size distribution in hydrated cements, mortars, concretes and other porous materials.

<sup>a</sup>Analytical Centre, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya sq. 9, 125047 Moscow, RUSSIA, <sup>b</sup>University of Dundee, Dundee DD1 4HN, Scotland, UK, <sup>c</sup>Vienna University of Technology, Getreidemarkt 9/153, A1060 Wien, ÖSTERREICH  
 ○ A.B. Koudriavtsev<sup>a</sup>, M.D. Danchev<sup>a</sup>, G. Hunter<sup>b</sup> and W. Linert<sup>c</sup>

The aim of this study was to explore the possibility of the determination of porosity of various porous materials employing <sup>19</sup>F nmr relaxometry. This has been done using samples of hydrated Portland cement (*pc*) white cement (*wc*) calcium aluminate (*ca*) and tricalcium silicate (*c<sub>3</sub>s*) filled with Freon 11. Samples were prepared using commercial cements and water-to-cement ratio 0.5. The advantages of this method are the absence of background signal and longer (than in <sup>1</sup>H relaxometry) free induction decay.

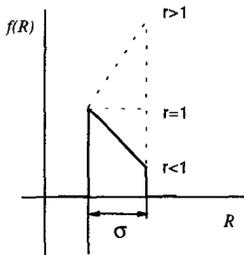
Using a modified high power NMR probehead designed for large samples (*d* = 20 mm, *h* = 25mm, *t<sub>90</sub>* = 5 - 8 μsec) the saturation - recovery <sup>19</sup>F (188.3 MHz) FID curves were recorded over Freon contents from 0.07 to 0.35 weight fraction at 296K. The <sup>19</sup>F spectra of the samples containing exterior liquid showed that the magnetic susceptibility of solid samples, hence the content of paramagnetic components, can be estimated from the chemical shift induced in the signals of the exterior liquid. Obtained estimates (Table 1) qualitatively followed the average Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> contents in commercial products, although the absolute amounts were higher than those specified for actual cements. A calibration procedure must therefore be applied in order to obtain absolute values.

The total porosity was determined by weighing that sample with the maximum Freon content that did not result in specific signals for the exterior liquid (Table 1). The relationship between maximum Freon content and extrapolated signal amplitude (*A<sub>0</sub>*) in such samples was linear, with a small intercept corresponding to less than 6% of the total amount of Freon.

Table 1. Estimated parameters for the samples of hydrated cements investigated.

	Weight of cement g	ρ g cm <sup>-3</sup>	Δ ppm	χ <sub>v</sub> 10 <sup>6</sup>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> % <sub>w</sub>	Freon content g	Total porosity cm <sup>3</sup> /g	A <sub>0</sub> arb.u.
<i>pc</i>	10.38	1.54	67.4	282	11.9	3.120	0.201	15430
<i>wc</i>	7.88	1.51	9.07	38	1.64	2.480	0.210	12408
<i>ca</i>	8.06	1.78	1.56	6.51	0.24	1.057	0.088	5005
<i>c<sub>3</sub>s</i>	9.34	1.29	-	-	-	2.570	0.184	11948

Experimental saturation-recovery re-equilibration curves were analysed as functions of real time (FID) and re-equilibration time, using from one to three distributions of relaxation rates having triangular or square shape (Fig. 1, Eqs. (1, 2, 3)).



$$f(R) = \frac{2}{(r+1)\sigma} \left( 1 + \frac{r-1}{\sigma} R \right) \quad (1)$$

$$\overline{R^i} = \frac{2\sigma^i}{(i+1)(i+2)} \left( 1 + \frac{ir}{r+1} \right) \quad (2)$$

$$A(t, \tau) = A_0 \cos(\omega t) e^{-R_0 t} \left[ 1 + \frac{\overline{\Delta R_2^2}}{2!} t^2 - \frac{\overline{\Delta R_2^3}}{3!} t^3 + \dots \right] \left[ 1 - \rho e^{-R_1 \tau} \left( 1 + \frac{\overline{\Delta R_1^2}}{2!} \tau^2 - \frac{\overline{\Delta R_1^3}}{3!} \tau^3 + \dots \right) \right] \quad (3)$$

Fig.1. The triangular-square distribution

Keywords: NMR, relaxometry, cements, porosity

In general, a decaying pattern of triangular distribution describes the experimental data better than either square or rising triangular distributions. By selecting a fixed type of distribution the number of adjustable parameters was reduced to four: initial relaxation rate, width of distribution, asymmetry factor and intensity (extrapolated amplitude) of distribution. Analysis of the experimental data yielded estimates of mean relaxation times ( $R_1$  and  $R_2^*$ ), their variances, third moments, etc. Although only four parameters were adjusted a moment of any order can be calculated (Eq. (2)). Additionally, the resonance frequencies of the relaxing phases ( $\omega$ ) were also estimated (Eq. (3)).

Both the longitudinal ( $R_1$ ) and transverse ( $R_2^*$ ) relaxation rate in *pc* were described by single distributions (Fig. 2). The width of the distribution of  $R_1$  decreased with decreasing Freon content, whereas that of  $R_2^*$  increased as a result of the contribution of the difference in resonance frequencies to transverse relaxation. At higher Freon contents the filled pores are connected and fast exchange effected a narrow  $R_2^*$  distribution. When the connecting fluid was removed, the exchange between pores characterised by different resonance frequencies became slow, resulting in a wide distribution of  $R_2^*$ . The narrow distribution of  $R_1$  (much smaller than that of  $R_2^*$ ) reflected the slow exchange between bulk connecting fluid (macro-pores) and Freon in micro- and meso- pores.

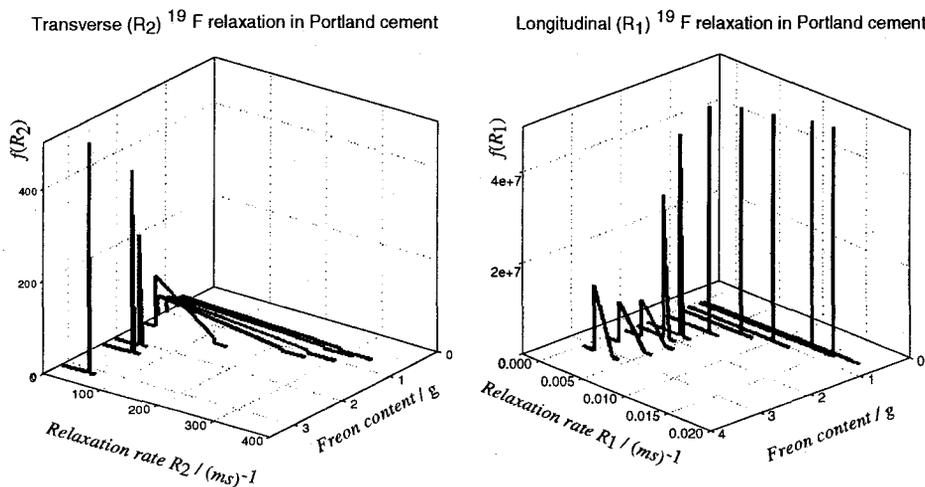


Fig 2. Distributions of transverse and longitudinal relaxation rates in *pc* at different freon contents.

In other samples (*wc*, *ac* and *c<sub>3</sub>s*) transverse relaxation was successfully described (in the region of  $A(t) \geq 0.5 A_0$ ) by single exponentials, while the longitudinal relaxation could be deconvoluted into two or three *separate distributions*. These distributions were assigned to relaxing phases in slow exchange, distinguished by their relaxation rates and (mainly) by their resonance frequencies. One of these phases, characterised by the lowest longitudinal relaxation rate, was found to *disappear selectively* when Freon was allowed to evaporate from a sample. The content of the fast relaxing phase was approximately constant in the region of their co-existence. These data can be explained by a model of bulk (connecting) fluid in slow exchange with either the adsorption layer or with liquid in micro- and meso-pores. The observed dependencies of the mean relaxation rates on Freon content fit this model.

These results indicate that  $^{19}\text{F}$  relaxometry can be used advantageously in studies of the pore size distribution in hydrated cements, mortars, concretes, and other porous materials.

## PGSE NMR 法によるリオトロピック液晶溶液における分子運動の研究

東工芸大連携最先端技術研究セ ○兼清真人  
 東工芸大工 土屋真純, 野瀬卓平  
 東工大院理工・高分子セ 安藤勲  
 東工芸大工・連携最先端技術研究セ 植松淑子

A Study of Molecular Motions in PLG Liquid Crystal Solutions by  $^1\text{H}$  pulse NMR method.

Masahito KANEKIYO (Joint Research Center for High-technology, Tokyo Institute of Polytechnics, 1583, Iiyama, Atsugi-shi, Kanagawa, 243-0097), Masumi TSUCHIYA, Takuhei NOSE, (Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Polytechnics), Ando ISAO (Department of Chemistry and Material Science, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8552), Yoshiko UEMATSU (Joint Research Center for High-technology・Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Polytechnics)  
 Tel. 0462-42-4111(ex.9526), Fax. 0462-42-9526, e-mail: [mkanekiy@chem.t.kougei.ac.jp](mailto:mkanekiy@chem.t.kougei.ac.jp)

In order to clarify molecular motions of PLG liquid crystal solution,  $^1\text{H}$  pulse NMR and  $^1\text{H}$  pulse field gradient spin echo (PGSE) spectra were measured. From the experimental results it was found that the self-diffusion signal of the solvent is mainly composed of two components. The rapid self-diffusion component corresponding to the mobile component comes from the free solvent, and the slow self-diffusion component corresponding to the immobile component comes from solvent molecules having strong interactions with PLG. Further, it was found that the self-diffusion coefficient is changed with the temperature and concentration of the PLG solution.

## 序論

リオトロピック液晶を形成する代表的な棒状高分子の一つであるポリ( $\gamma$ -ベンジル L-グルタメート)(PBLG)は光学的に活性であり、濃厚溶液中でコレステリック液晶を形成し、液晶中では高い形態旋光性を示す。そのコレステリックピッチは濃度、温度そして溶媒の種類など多くの物理的因子に影響される。

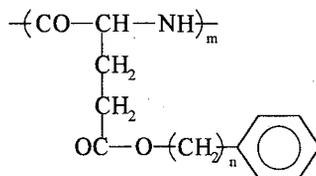
上記のような性質を持つ PBLG 溶液の分子運動を評価するために、本研究では、パルス NMR 法によりスピンスピン緩和時間( $T_2$ )と拡散係数の測定を行い、PBLG 液晶溶液の分子運動の解析を行い、溶媒分子の運動を通じて PBLG 分子の側鎖の運動を解明することを試みた。

## 実験

試料は、PBLG( $M_w=18200$ )、溶媒にはクロロホルムを使用し、濃度は 10~40 w/v% に調製した。

また溶媒が異なった試料として、クロロホルム/ベンゼン混合溶媒(1:1)を使用し、濃度は 20 w/v % のサンプルを調製した。

PBLG の側鎖長が異なった試料は、協和発酵(株)提供の PMLG[poly( $\gamma$ -methyl L-glutamate)](重合度 700)の末端メチル基に、benzylalcohol, phenethylalcohol, 3-phenyl-1-propanol, 4-phenyl-1-butanol の



PBLG、液晶、パルス NMR、 $^1\text{H-T}_2$ 、自己拡散

かねきよまさひと、つちやますみ、のせたくへい、あんどういさお、うえまつよしこ

4種類のアルキル基の異なるアルコールをエステル交換法により置換し、PBLG[poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)]( $n=1$ ), PPLG[poly( $\gamma$ -phenethyl L-glutamate)]( $n=2$ ), PPPLG[poly( $\gamma$ -3-phenylpropyl L-glutamate)]( $n=3$ ), PPBLG[poly( $\gamma$ -4-phenylbutyl L-glutamate)]( $n=4$ )を合成し、溶媒にはクロロホルムを使用した。

測定方法はBruker社製のMinispec Mq20パルスNMR(測定周波数20.0MHz)を用いて、CPMG法により $^1\text{H T}_2$ の測定を行い、PBLG溶液の運動性の評価を行った。スピネコーパルス系列により、パルス磁場勾配 $^1\text{H NMR}$ 測定を行い、溶液中の溶媒分子の拡散係数を測定した。

## 結果及び考察

$^1\text{H T}_2$ の測定の結果PBLG/ $\text{CHCl}_3$ 溶液において $\text{CHCl}_3$ 溶媒の $^1\text{H T}_2$ 成分は1成分であることがわかった。一方、パルス磁場勾配 $^1\text{H NMR}$ 測定の結果 $\text{CHCl}_3$ 溶媒には2つの異なった拡散係数の成分が存在することがわかった(Fig.1)。これらの成分のうち、大きな拡散係数の成分は速い運動を行っている自由な溶媒の成分であり、小さな拡散係数の成分はPBLGによって束縛され遅い運動を行っている溶媒の成分であると考えられる。これら成分の自己拡散係数は、温度及びPBLG濃度変化に対して変化することがわかった。

混合溶媒系の試料としてPBLG/ $(\text{CDCl}_3 / \text{C}_6\text{H}_6)$ 溶液及びPBLG/ $(\text{CHCl}_3 / \text{C}_6\text{D}_6)$ 溶液の拡散係数測定の結果、 $\text{CHCl}_3$ 溶媒と $\text{C}_6\text{H}_6$ 溶媒の拡散係数の温度変化には大きな違いは見られなかった。一方、小さな拡散係数の成分の分率の温度変化はFig.2の様になり、 $\text{CHCl}_3$ 溶媒の分率は温度上昇に伴い変化するのに対し、 $\text{C}_6\text{H}_6$ 溶媒の分率は変化が見られなかった。この結果、 $\text{CHCl}_3$ 溶媒に比べて $\text{C}_6\text{H}_6$ 溶媒の方がPBLG分子により強く束縛されていることが明らかとなった。

更に、これらの結果及びPPLG, PPPLG, PPBLG溶液の結果を用いてPBLG系液晶溶液における分子運動について検討を行う予定である。

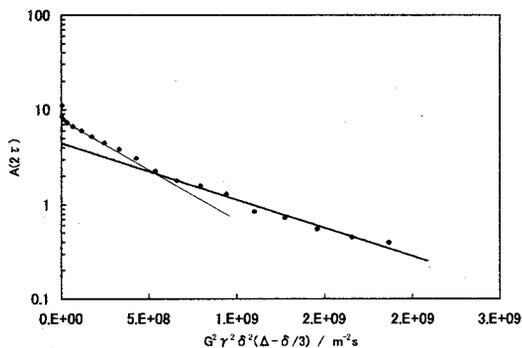


Fig. 1. Diffusional spin-echo attenuation of  $\text{CHCl}_3$  in PBLG solution with PBLG concentration 40 w/v% ( $T = 323 \text{ K}$ ) by varying the field gradient amplitude( $G$ ).

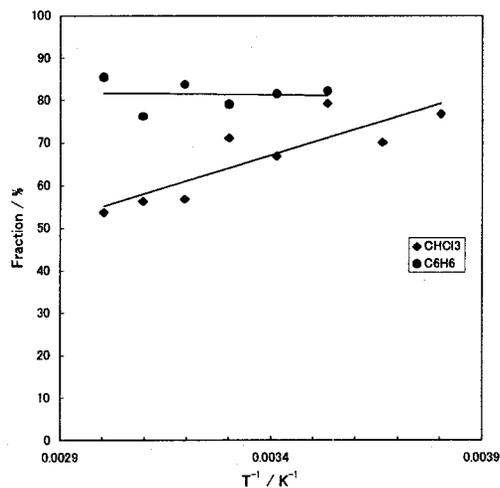


Fig.2. Plots of fractions of the echo signal for slow motion components of  $\text{C}_6\text{H}_6$  in PBLG/ $(\text{CDCl}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_6)$  solution and  $\text{CHCl}_3$  in PBLG/ $(\text{CHCl}_3 \cdot \text{C}_6\text{D}_6)$  solution with PBLG concentration 20 w/v% against the inverse temperature.

## 液晶試料が示す $^{13}\text{C}$ 磁場配向誘起シフトスペクトルの 帰属簡便法

(バリアンテクノロジーズジャパン)

○芦田淳、中井利仁

The Simple Assignment Method for  $^{13}\text{C}$  Magnetic Field Alignment Induced Shift Spectrum of Liquid Crystal Samples.

Jun Ashida, and Toshihito Nakai

Varian Technologies Japan Ltd.

Liquid crystal molecules orient in the magnetic field and show specific  $^{13}\text{C}$  chemical shifts (magnetic field alignment induced shift) which originate in chemical shift anisotropy. From the analysis of these  $^{13}\text{C}$  chemical shifts, the information of structure and dynamics of the liquid crystal molecules and the properties of the liquid crystal could be obtained. However, the method for the assignment of the magnetic field alignment induced shift signals has not been established yet. In this study, a new method for the assignment of the magnetic field alignment induced shifts under the off magic angle spinning is proposed.

### 【緒言】

液晶分子は磁場中で配向し、化学シフト異方性に由来する独特の $^{13}\text{C}$ 化学シフト(磁場配向誘起シフト)を示す。このシフトの解析により、液晶分子の構造・運動および試料としての液晶物性に関する豊富な知見が得られる。しかしながら、この磁場配向誘起シフトとMAS法や溶液NMRで観測される化学シフト等方平均値の間には相関がないため、解析に必要な不可欠な共鳴線の帰属方法は確立されていない。

本発表では、スペクトルの帰属を決定する簡便な方法として、オフマジックアングルスピニングの利用を提案する。

### 【実験】

NMR測定は、Varian<sup>UNITY</sup> INOVA400で行った。プローブは、AutoMAS<sup>®</sup> 7mm CP/MASプローブを用いた。このプローブでは、試料回転角度をmagic angleから $\pm 5\sim 10^\circ$ ずらして測定を行うことが可能である。試料回転速度は、4~5kHzとした。試料は、p-methoxybenzylidene p'-n-butylamine (MBBA)を用いた。

---

液晶、磁場配向誘起シフト、化学シフト異方性、帰属、  
オフマジックアングルスピニング

あしだ じゅん、なかい としひと

【結果と考察】

図に MAS および静止状態での MBBA の  $^{13}\text{C}$  CP/MAS スペクトルを示した。14本のピークが観測されるが、磁場配向誘起シフトにより、MAS スペクトルで示される化学シフト等方平均値と静止状態でのスペクトルは異なっており、静止状態でのスペクトルの帰属は困難である。

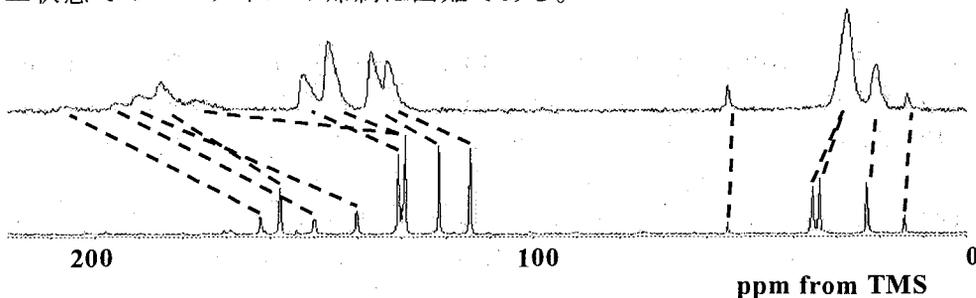


Figure The static (top) and MAS (bottom)  $^{13}\text{C}$  spectra of MBBA. The dashed lines show the assignment determined from the following table.

下表左に MBBA の 14本のピークの MAS、Off-MAS ( $\theta < \theta_m$ ) 状態での  $^{13}\text{C}$  化学シフト値を示した。また下表右には、角度依存変化から予測される静止状態での  $^{13}\text{C}$  化学シフト値と、実測の静止状態の  $^{13}\text{C}$  化学シフト値を示した。このように、MAS スペクトルと静止スペクトルの 14本のピークを、一対一で対応づけることができた。

試料回転角度 (deg)	54.74	53.66	51.41	49.45	47.44	予想シフト	静止実測値	
Scaling Factor	0	0.0267	0.0835	0.134	0.1863	1.00		
化学シフト (ppm)	1	14.4	14.4	14.2	14.1	14.0	12.6	13.8
	2	23.1	23.0	22.7	22.6	22.4	19.7	20.9
	3	34.0	33.8	33.4	33.2	32.6	28.1	27.5
	4	35.7	35.4	34.9	34.5	33.8	26.0	26.8
	5	55.2	55.1	55.1	55.1	54.9	54.0	55.2
	6	114.4	114.8	115.9	116.5	117.7	132.2	133.5
	7	121.6	121.8	122.7	123.2	124.3	136.4	137.1
	8	129.4	129.7	130.7	131.3	132.4	145.8	147.0
	9	130.0	※	※	135.2	138.4	175.4	177.5
	10	130.9	131.4	132.6	133.4	134.8	152.2	152.7
	11	140.4	141.5	144.0	146.0	149.5	189.6	189.8
	12	150.0	151.0	153.7	156.2	157.5	193.2	195.3
	13	157.9	158.5	160.1	160.9	162.8	184.5	185.0
	14	162.3	163.2	165.9	167.3	170.3	205.6	206.5

Table (Left) The  $^{13}\text{C}$  chemical shifts at MAS, and off-MAS of MBBA. (Right) The calculated and experimental static  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of MBBA.

発表当日は、他の液晶試料における実験結果も合わせて示す予定である。

## NMRによるPVDF系ゲル電解質のイオン移動特性の研究

(科技団科技特<sup>1</sup>、産総研<sup>2</sup>、神戸大院自然科学<sup>3</sup>、JEOL<sup>4</sup>)○片岡弘<sup>1,2</sup>、齋藤唯理亜<sup>2</sup>、蔭山博之<sup>2</sup>、宮崎義憲<sup>2</sup>、出来成人<sup>3</sup>、池田武義<sup>4</sup>

## TRANSPORT PROPERTIES OF IONIC SPECIES IN PVDF-BASED POLYMER GEL ELECTROLYTES AS STUDIED BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

Hiroshi Kataoka<sup>1,2</sup>, Yuria Saito<sup>2</sup>, Hiroyuki Kageyama<sup>2</sup>, Yoshinori Miyazaki<sup>2</sup>,Shigehito Deki<sup>3</sup> and Takeyoshi Ikeda<sup>4</sup>(Japan Science and Technology Corporation<sup>1</sup>, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology<sup>2</sup>, Kobe University<sup>3</sup>, JEOL<sup>4</sup>)

Transport properties of ionic species (lithium and anion group) in P(VDF-HFP) - 1M LiN(CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>/EC/DEC were investigated by pulsed-gradient spin-echo NMR and direct current NMR technique. Declines of ionic mobilities of lithium ion and anion group were observed with increase of the polymer weight ratio, whereas the diffusion coefficients of lithium, anion and solvents were constant. This indicated that the dissociation degree of LiN(CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> was decreased as the polymer ratio increased.

1. はじめに 磁場勾配 NMR による拡散係数測定は等方的な系に留まらず、コロイドや膜など異方性をもつ多岐な系に応用されている。我々はこれまでに、安全性の高い全固体型リチウムイオン二次電池材料として研究開発が行われているリチウムゲル電解質に関して、磁場勾配 NMR や直流電場 NMR を用いてゲルの導電メカニズム解明を行ってきた[1,2]。直流電場 NMR では、一定電場(E)の印加によりイオンのみを選択的にドリフトしてイオン種の泳動速度 $v_{\text{obs}} (= \mu_{\text{obs}} E)$ を測定することにより、イオン易動度 $\mu_{\text{obs}} (= x\mu_{\text{ion}}, x: \text{塩の解離度}, \mu_{\text{ion}}: \text{真のイオン易動度})$ が評価可能である[3]。今回、PVdF系ゲル電解質中で、電場存在下でのリチウムイオン挙動のポリマー量依存性を測定し、ゲル中でポリマーが塩の解離やイオンダイナミクスに及ぼす影響を調べた。

2. 実験 測定は JEOL/ECP300W 分光器(共鳴周波数 <sup>1</sup>H 核 300.5MHz)を用いて 298 K にて行った。拡散係数測定は磁場勾配 NMR 法を用いて行った。ここで得られるエコー強度  $M(2\tau) \propto \exp[-\gamma^2 g^2 \delta^2 D_s (4\Delta - \delta) \pi^2]$  は電場を印加した場合

拡散係数, 易動度, <sup>7</sup>Li, <sup>19</sup>F, ポリマーゲル電解質

かたおか ひろし, さいとう ゆりあ, かげやま ひろゆき, みやざき よしのり,  
でき しげひと, いけだ たけよし

$$M_v(2\tau) \propto \cos(2\gamma g v \delta \Delta / \pi) M(2\tau) \quad (1)$$

と表される。ここで $v$ はイオンの泳動速度であり、 $\gamma$ : 観測核の磁気回転比、 $g$ : 磁場勾配強度、 $D_s$ : 自己拡散係数、 $\delta$ : 磁場勾配パルス幅、 $\Delta$ : 磁場勾配パルス間隔(拡散時間)である。試料への電場印加は、直流電場 NMR 法で 4 端子セルを用いて NMR 信号観測領域の電場を一定値に制御して、イオンのドリフト速度を求めた。磁場勾配および直流電場方向は超伝導磁石の静磁場方向と一致させ、試料の分極・分解防止のために測定毎に電極極性を反転させて測定した。典型的な実験条件は、 $g=62$  ( $^7\text{Li}$ ) /  $17$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ) Gauss  $\text{cm}^{-1}$ 、 $\delta=0\text{-}3\text{ms}$ 、 $\Delta=1.5\text{s}$ 、最大印加電圧  $20\text{V}$  であった。試料のリチウムゲル電解質は  $\text{LiN}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2$  の EC/DEC( $v/v$  2/3)  $1\text{M}$  溶液とポリフッ化ビニリデンヘキサフルオロプロピレン(PVdF-HFP)を適量混合し、キャスト法により調製した。PVdF-HFP の重量分率は  $2\text{-}10\text{wt}\%$  の範囲で変化させた。

**3. 結果及び考察** 図 1 にゲル電解質の自己拡散係数(リチウム○, アニオン□, 溶媒△)およびイオン易動度(リチウム●, アニオン■)のポリマー比率依存性を示す。ポリマー量が  $2\text{-}10\text{wt}\%$  の範囲で、いずれの拡散係数も一定値を示した。これはポリマー添加によるゲルのマクロ粘性変化が、数  $\mu\text{m}$  範囲のマイクロな拡散係数には影響していないことを示している。一方、イオン易動度は、ポリマー量が増加するに従い減少する傾向が明らかとなった。マイクロ粘性が一定の領域では、真のイオン易動度( $\mu_{\text{ion}}$ )は一定であると考えられるため、 $\mu_{\text{obs}}$  のポリマー依存性は、リチウム塩の解離度( $x$ )成分が減少したことに起因すると考えられる。更にこの領域で測定により得られた拡散係数とイオン易動度から、解離度を求める考察を行った。当日は電気伝導率の測定結果も合わせてイオンダイナミクスについて議論する。

参考文献

1. Y. Saito et al., *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 2189.
2. H. Kataoka et al., *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 11460.
3. H. Kataoka et al., *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) 2546.

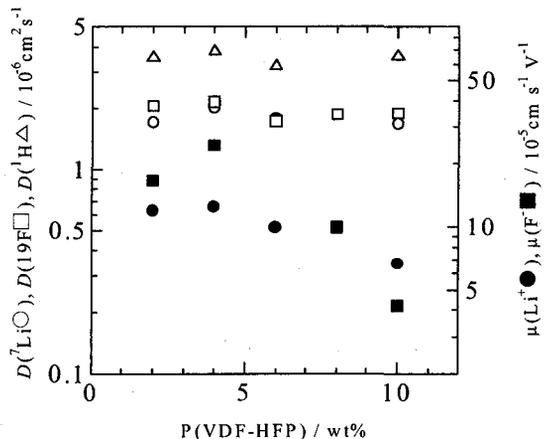


Fig. 1 Polymer weight dependence of diffusion coefficients and ionic mobilities of lithium, anion group and solvent species in P(VDF-HFP) -  $1\text{M}$   $\text{LiN}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2/\text{EC}/\text{DEC}$  at  $298\text{ K}$ .

スピン拡散測定に基づく固体分散体におけるニフェジピンとPVPの分散状態の解明  
(国立衛研) ○阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄

Study on miscibility of nifedipine and PVP in solid dispersions by spin-diffusion measurement  
(National Institute of Health Sciences)

Yukio Aso, Sumie Yoshioka and Shigeo Kojima

Miscibility of nifedipine and PVP in solid dispersions was studied by measuring  $^1\text{H-T}_{1\rho}$  of nifedipine and PVP. Solid dispersion, which was prepared by melting and solvent evaporation methods, showed averaged  $^1\text{H-T}_{1\rho}$ , indicating that the dispersions are homogeneous in the scale of about 5 nm.

はじめに

難溶性医薬品と水溶性高分子を固体分散体とすることによって溶解性を改善する試みが多数の医薬品において行われている。溶解性の改善のメカニズムは固体分散体化することにより医薬品が結晶状態から非晶質化することによると考えられている。固体分散体が非晶質であることはDSC、X線回折測定などによって確認されるが、医薬品と高分子の分散状態、すなわち、医薬品が分子レベルで高分子の中に分散しているのか、非晶質医薬品がある程度の大きさをもった状態で高分子の中に分散しているのかという知見に関してはほとんど検討されていない。固体分散体における医薬品と高分子の分散状態は溶解性に大きな影響を及ぼすと考えられるため、医薬品の分散状態に関する情報は優れた固体分散体を調製するための重要な知見と考えられる。

本研究では種々の条件で調製したニフェジピン-PVP固体分散体について、 $^1\text{H-NMRT}_{1\rho}$ の測定を行い、スピン拡散による緩和時間の平均化を指標として、医薬品と高分子の分散状態分散状態を明らかにした。

実験

熔融法による固体分散体は、結晶ニフェジピンとPVPの混合物(重量比7:3)を180°Cで熔融後、液体窒素にに入れて急冷することによって調製した。溶媒法による固体分散体は、結晶ニフェジピンとPVPの混合物(重量比7:3、5:5)をジクロロメタンあるいはアセトンに溶解した後、減圧下、溶媒を留去して調製した。 $^1\text{H-T}_{1\rho}$ は $^{13}\text{C}$ -固体高分解能NMR(Varian Unity Plus)を用い、0.1から8msのcontact timeで測定したニフェジピンおよびPVP炭素の信号強度から算出した。信号強度とcontact timeの関係をFig. 1に示す。

結果および考察

非晶質ニフェジピンおよびPVPの単独系における $T_{1\rho}$ はTableに示すように、それぞれ60, 8msであった。分散体にすることによりニフェジピン、PVPの $T_{1\rho}$ はほぼ同様の値となった。また、その値は1式に基づいて算出した $T_{1\rho}$ の計算値と実験誤差内でよく一致した。従って、今回検討した分散体ではニフェジピンは数nmのスケールで均一に分散していると考えられる。

キーワード: スピン拡散、緩和時間、固体分散体

あそゆきお、よしおかすみえ、こじましげお

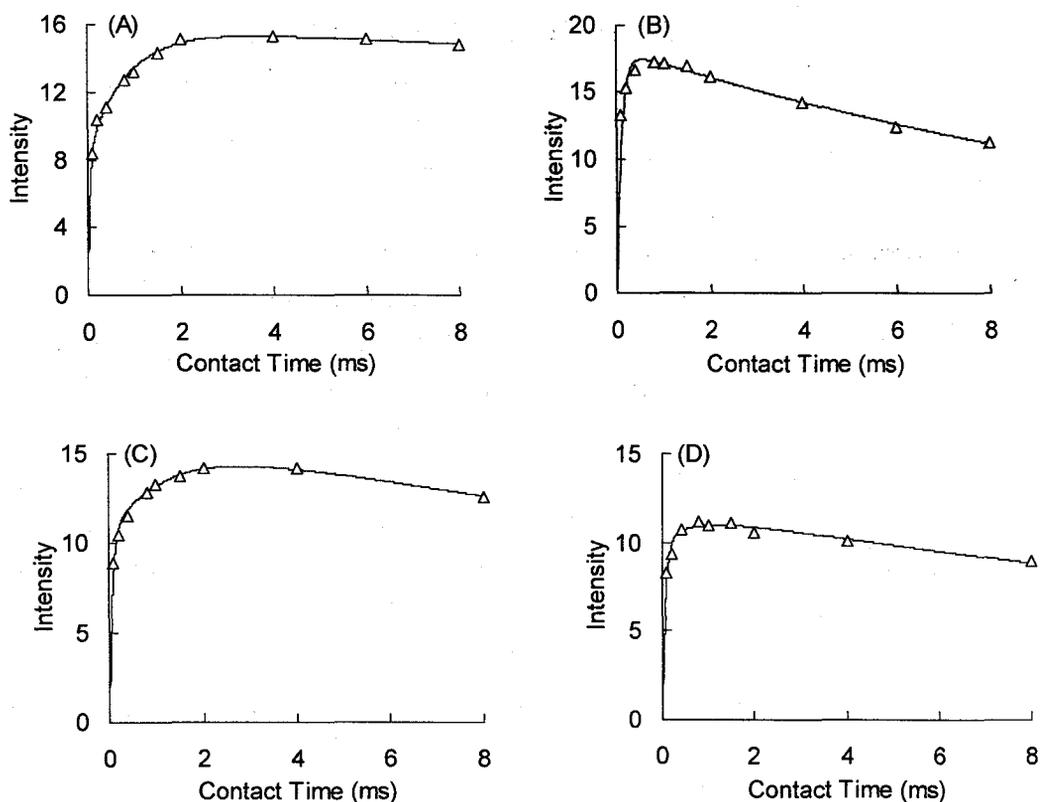


Fig. 1 Signal intensity of Nifedipin and PVP carbons as a function of contact time. (A) pure nifedipine, (B) pure PVP, (C) nifedipin in dispersion (7:3) and (D) PVP in dispersion (7:3)

Table 1  $^1\text{H-NMR}$   $T_{1\rho}$  of nifedipine and PVP, and  $T_g$  of solid dispersions

$$\frac{1}{T_{1\rho}(\text{calc.})} = \frac{f_{NIF}}{T_{1\rho}(NIF)_{\text{pure}}} + \frac{f_{PVP}}{T_{1\rho}(PVP)_{\text{pure}}} \quad (1)$$

また、Modulated DSC の可逆成分のデータから得られた  $T_g$  は何れの分散体においても 1 つであり、その値は Gordon-Taylor 式から予測される値と同様であった。これは NMR のデータを支持するものと考えられる。

	$T_{1\rho}^H$ (ms)		$T_g$ (°C)
	obsd.	calcd.	
	Nifedipine	PVP	(ms)
Pure sample	60.4	7.7	48, 171
Dispersion			
7:3 melting	16.0	14.0	16.1
Solvent method			
7:3 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	16.6	15.4	16.1
7:3 Acetone	15.6	15.9	16.1
5:5 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	11.6	10.6	11.6
5:5 Acetone	10.1	12.1	11.6

## キラル液晶 NMR 法による光学異性体の分離

## - ウニコナゾール, ジニコナゾールへの応用 -

(神戸薬大<sup>1</sup>, 阪大医<sup>2</sup>) ○ 杉浦真喜子<sup>1</sup>, 灰野裕美<sup>1</sup>, 伊藤允好<sup>1</sup>藤原英明<sup>2</sup>, 木村敦臣<sup>2</sup>*Discrimination of Optical Isomers using NMR Method in Chiral Liquid Crystalline Solution.**- Application to Uniconazole and Diniconazole -*Makiko Sugiura<sup>1</sup>, Hiromi Haino<sup>1</sup>, Masayoshi Ito<sup>1</sup>, Hideaki Fujiwara<sup>2</sup>, Atsuomi Kimura<sup>2</sup><sup>1</sup>Kobe Pharmaceutical University,<sup>2</sup>School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University

Uniconazole (I) and diniconazole (II) which show antifungal and plant growth regulating activities have been dissolved in PBLG-CDCl<sub>3</sub> chiral liquid crystalline solvent for measurements of <sup>13</sup>C NMR. The chemical shift separations due to the chemical shift anisotropy have been observed on several aromatic carbons between the optical isomers (R and S). Direct coupling constants (D<sub>CH</sub>) have been also measured for each optical isomers. Enantiomeric excess have been estimated using the area of the separated signals (I : R/S=21/79, II : R/S=89/11), which shows quantitative agreements with the actual ratios.

【はじめに】 近年キラル液晶を溶媒として NMR 測定を行い, 光学異性体における化学シフト異方性, 双極子直接結合, 四極子結合などの差を利用して光学異性体の分離観測する試みがなされている。この方法は, 対象となる光学活性体に化学修飾をほどこさずに直接観測出来ること, 溶媒として用いる液晶がヘリックス構造をとるため生理環境に近いということなど, 魅力的な方法であるが, 多くの例があるにもかかわらず, 少し構造が複雑な生理活性物質や天然物への応用はあまりなされていない。

今回矮小化活性及び殺菌活性を有するトリアゾール系化合物ウニコナゾール (I), ジニコナゾール (II) を対象としてその光学異性体の分離観測を試みた。これらの化合物は, 植物生長調節剤としては S 体の方が, 殺菌剤としては R 体の方がはるかに強い作用を示すことが知られている。

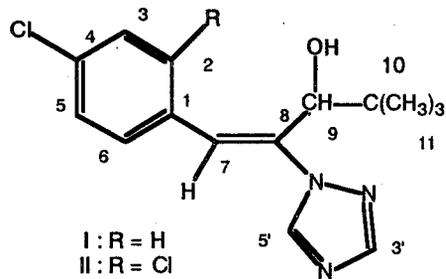
【実験】 I (R/S=21/79), II (85/15) それぞれを, Poly-γ-(benzyl-L-glutamate) (PBLG) - CDCl<sub>3</sub> 液晶に溶解し, サンプルとした。最適な濃度を検討するために I or II/PBLG/CDCl<sub>3</sub>

キラル液晶, 光学異性体, 化学シフト異方性, ウニコナゾール, ジニコナゾール

すぎうらまきこ, はいのひろみ, いたうまさよし, ふじわらひであき, きむらあつおみ

の比を変化させて  $^{13}\text{C}$  及び  $^2\text{D}$  NMR の測定を行った。NMR の測定は、Varian VXR-500 または INOVA-500 ( $^{13}\text{C}$ :125.7 MHz,  $^2\text{D}$ :76.8MHz) を用い、いずれの測定も、Lock なしで行った。

C-H 直接結合定数は、Het2DJ により求めた結合定数から溶液中での結合定数の値を差し引いて求めた



【結果と考察】 I, II 共, PBLG- $\text{CDCl}_3$  液晶溶媒に溶解したものは、いくつかの  $^{13}\text{C}$  シグナルで分裂が観測出来た。この分裂は、2 つの対掌体 (R 体, S 体) の液晶中での配向の違いによる化学シフト異方性の差を反映したものと思われる。またこの配向の違いは直接結合にも反映されることが予想されるので、その直接結合定数も求めた。

観測された化学シフトと、C-H 直接結合定数の値を、Table にまとめた。I, II 共に主に芳香環炭素で分裂が観測されるが、それらでは一般に R 体が S 体より低磁場側で観測されている。

比較的分裂の大きく、PBLG の影響の少ない位置にあるシグナルの面積比から得た R/S 比は、I : 21/79, II : 89/11 となり、ほぼ定量可能であることが確かめられた。

Table Observed  $\delta\text{c}$  and  $D_{\text{CH}}$  values for Optical Isomers of I and II.

C	$\delta\text{c}$				$^1D_{\text{CH}}$			
	IR	IS	IIR	IIS	IR	IS	IIR	IIS
1	133.42	133.19	131.88	131.35				
2	130.20	130.04	134.53	134.37	159.0	166.2		
3	128.99	128.84	129.53	129.45	158.3	153.4	116.4	114.9
4	135.06	134.88	135.56	135.40				
5	128.99	128.84	127.44	127.25	158.3	153.4	113.7	115.2
6	130.20	130.04	131.40	131.25	159.0	166.2	121.4	122.1
7	128.43	128.50	125.30	125.30	-7.7	-10.6	28.66	
8	134.41	134.41	138.82	138.82				
9	75.18	75.18	76.11	76.11		134.3	133.1	
10	36.01	36.01	36.02	36.02				
11	25.90	25.90	25.76	25.76		17.3	21.5	
3'	150.89	150.89	151.38	151.32		7.3	-3.6	-4.8
5'	143.41	143.41	143.36	143.36		358.0	296.5	

【謝辞】 サンプルを提供していただいた住友化学工業 (株) の古田リツ子博士に感謝致します。

また、科研費特定領域研究 A(2)「生物現象鍵物質」からの援助に感謝します (課題番号 13024251)。

## インフルエンザウイルス融合ペプチドの pH に依存する膜融合誘起機構

(姫路工大・理1、横浜国大・工2)

○虎谷秀一 1、内藤晶 2、辻暁 1、斉藤肇 1

## pH-dependent Fusogenic Mechanism of Influenza Virus Hemagglutinin2(1-27)

(\* Department of Life Science, Himeji Institute of Technology; § Faculty of Engineering, Yokohama National University)

Shuichi Toraya,\* Akira Naito,§ Satoru Tuzi,† Hazime Saito‡

Influenza virus is incorporated into the host cell by endocytosis. In the infection process, it is known that proton is subsequently transported to lower the endosomal pH by the viral M2 protein, followed by insertion of the N-terminal region of HA2 into the endosomal membrane, which results in fusion of the viral membrane with the endosomal membrane. However, the fusogenic mechanism of HA2 has remained obscure. In this study, solid-state  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of HA2(1-27)-DMPC bilayer systems were measured under neutral and acidic pH conditions to elucidate the molecular mechanism. It was shown that fluidity of the lipid is increased with the peptide bound to the bilayer as  $^{31}\text{P}$  chemical shift anisotropy of HA2(1-27)-DMPC bilayer system is smaller than that of a DMPC bilayer system. Under the fusogenic condition, pH 5.0 and 40 °C, an interaction is induced between the peptide and the lipid, suppressing the lateral diffusion of the lipid. These results are discussed with the location of the peptide in the membrane.

[序] ウイルスの融合ペプチドによって誘起される膜融合現象を分子論的に明らかにすることは、ウイルスの感染機構を理解する上で重要である。インフルエンザウイルス粒子のエンベロープ表面には、宿主細胞に感染する際に重要な役割を担うタンパクの一つであるヘマグルチニン (以下 HA) が三量体を形成して外側に向かって突出している。この HA は、ジスルフィド結合した二つのサブユニット HA1 と HA2 から構成されており、HA1 がウイルス受容体であるシアル酸に結合すると、ウイルスはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。エンベロープに存在する膜タンパク質 2 (M2) によるプロトン放出により、エンドソーム内の pH が中性から酸性へと変化し、HA2 の N 末端側がエンドソーム膜に挿入することでエンベロープとの膜融合が誘起されることが知られている。しかしながら、その誘起される膜融合の分子機構については、広い分野にわたって研究が行われているが、未だ十分に理解されていない。そこで本研究では、インフルエンザウイルスの感染における膜融合機構を、固体 NMR を用いて分子論的に解明することを目的とした。

[実験] インフルエンザファミリー内で高度に保存されている HA2 の初めの 27 残基に相当するペプチド HA2(1-27) (GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQ) を化学的に合成し、DMPC 膜に結合させた状態で、中性条件 (pH 7.4) 下と酸性条件 (pH 5.0) 下で固体  $^{31}\text{P}$  NMR を測定した。

キーワード: ヘマグルチニン 2、固体高分解能 NMR、インフルエンザウイルス、膜融合誘起機構、pH 依存性

とらやしゅういち、ないとうあきら、つじさとる、さいとうはじめ

[結果と考察] 液晶相において、HA2(1-27)-DMPC 二分子膜系の軸対称粉末線形の  $^{31}\text{P}$  化学シフト異方性は、DMPC 単独の膜系と比べ 10 ppm 程度小さかったことから、脂質がペプチドと相互作用することで流動性が増加することが判明した。また、酸性条件下では、温度を 20 °C から 40 °C に上げることで異方性が増加したのに対し、中性条件においては変化がなかった (図 1)。このことから、膜融合誘起条件下では、脂質の二次元拡散運動を抑制するような相互作用がペプチド-脂質間で生じることが明らかとなった。以上の結果から、次のような pH に依存する脂質の流動性変化の機構が導かれる。中性条件下では、ペプチドの酸性アミノ酸残基は負電荷をもっているため膜表面側に存在するが、ペプチド全体としては疎水的であるので脂質の極性基と反発し、したがって脂質の流動性が増加する (図 2(A))。一方、酸性条件下では、電荷を失ったペプチドはより疎水的になり、C 末端側以外の部位は膜中に入ることが可能になる。よって、ペプチドと脂質のアシル鎖の疎水性相互作用により脂質の二次元拡散運動が抑制される (図 2(B))。発表では、 $^{13}\text{C}$  標識したペプチドの  $^{13}\text{C}$  NMR 測定の結果をふまえて、pH に依存するペプチドの膜融合誘起機構を検討する。

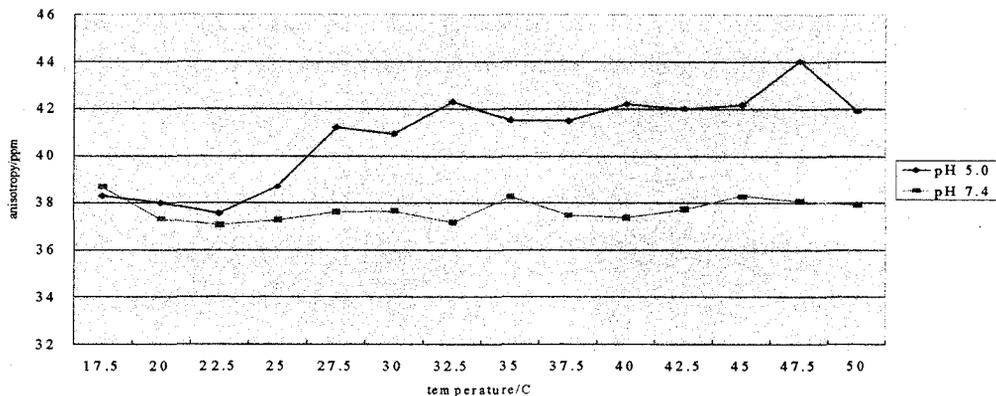


Fig. 1. Temperature variations on  $^{31}\text{P}$  chemical shift anisotropy of HA2(1-27)-DMPC bilayer system with the peptide-to-molar ratio of 1:20 in the liquid crystalline state at pH 7.4 and 5.0.

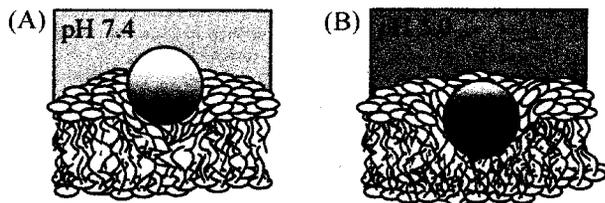


Fig. 2. The mechanism of pH-dependent fluidity change of the lipid in the HA2(1-27)-DMPC bilayer system. (A) As the charged peptide is on the membrane surface, fluidity of the lipid is increased by a mutual repulsion between the polar headgroup of the lipid and the hydrophobic region of the peptide. (B) As the peptide is protonated and then buried in the membrane, lateral diffusion of the lipid is suppressed by a hydrophobic interaction between the acyl chain of the lipid and the peptide.

## ラット脳組織の重水交換速度について

(日本女子大学理学部<sup>1</sup>、国立精神神経センター神経研究所<sup>2</sup>)○ 高橋征三<sup>1</sup>、荻野孝史<sup>2</sup>

On the Apparent Exchange Rates of Deuterium Oxide to Rat Brain Tissue

Seizo Takahashi<sup>1</sup> and Takashi Ogino<sup>2</sup>(Dept. Chem. & Biol. Sci., Japan Women's Univ.<sup>1</sup> & Inst. Neurosciences, NCNP<sup>2</sup>)

An apparent up-take rate of deuterium oxide to rat brain tissue was investigated to solve the conflicting results between those observed by <sup>1</sup>H- and <sup>2</sup>H-NMR. The apparent rates were at least 50 times slower when observed by <sup>1</sup>H-NMR. Dy-DTPA was used in these experiments as a shift reagent to separate outside water from inside on the spectrum. DTPA has been considered not to interact with membranes in the tissue. However, extensive study revealed that <sup>2</sup>H observes outside water exclusively from the cells, and that the discrepancy could be ascribed to the irreversible adsorption to the rat brain tissue of the shift reagent. The present result suggests that the relaxation reagents under clinical use should also be re-evaluated.

## [はじめに]

生体組織中の水は、自由に運動できるものから高分子とかたく結合したもので、さまざまな形態で存在するが、これらの水はその存在状態にしたがって固有の速度で交換すると考えられる。同位元素を使った実験から、組織への水の取り込み速度としては ms のオーダーの値が報告されている。我々は脳組織におけるもっとゆっくりとした水の交換速度に興味を持った。そこで NMR を用いて、軽水および重水の信号強度変化から水の平均の交換速度を追跡した。その結果、みかけの交換速度が 50 倍以上も食い違うという結果を得た。今回、この食い違いの原因を追跡した結果、測定法および使用したシフト剤に問題があることが分かった。

## [実験]

試料は 8 週令の Wister ラットの脳組織を摘出し、細片にして約 120mg を 5mm NMR 試料管に詰めた。組織内外の水を区別するために、シフト剤として Dy-DTPA と Gd-DTPA を添加した。装置は Bruker AMX-400 を使い、298K で測定した。<sup>2</sup>H の測定はロックチャンネルを用い、acoustic ringing を避けるために spin-echo で測定した。Spin-echo は組織外液からの寄与を抑制することも期待された。スペクトルの解析は FID をパソコンに転送し MATLAB による自作のプログラムで行った。

キーワード 脳組織、シフト試薬、吸着、交換速度

## [結果]

1. 25  $\mu\text{M}$  の範囲でシフト試薬の濃度を変えて滴定実験をした結果、シフト試薬の濃度に比例して  $^2\text{H}$  の線幅が変化することが分かった。そこで細胞内の信号を選択的に得るために、1mM 濃度のシフト試薬で観測を試みたが、まったくピークを得ることができなかった。つまり  $^2\text{H}$  では、細胞外の信号は観測できるが、細胞内の信号は観測されないと解釈された。
2. 見かけの重水取り込み速度の再現性のある値を得ることは困難であった。試料の磁場の均一度が高いときは、速い成分は 2-3 時間で半分が交換した。2 相性の変化が観測された場合、遅い成分は 100 時間以上であった。
3. spin echo で測定すると、変化量は小さいが  $^1\text{H}$  でも同様に速い成分が観測されることが分かった。しかもこの速い成分は  $^2\text{H}$  と同様、強度の増加を示した。
3. 50% 重水濃度で測定したとき速い変化に有意の差はなかった。この結果は、観測している信号変化を、細胞内外の重水と軽水の交換で解釈することに無理があることを示唆した。
4. 重水を十分に取り込んだ脳組織の試料に、軽水を添加し逆交換を測定したところ、予想に反し、重水取り込みとまったく同じく  $^2\text{H}$  の信号は時間とともに増加した。したがって信号強度の変化は重水濃度の変化でなく、シフト試薬の濃度の変化と解釈すべきであると考えられた。
5. シフト試薬を添加しないで同様の実験を行ったところ、ゆるやかな変化を観測したが、その変化はシフト試薬を添加した場合とまったく異なり、速い変化成分は観測されなかった。

## [考察]

上記の結果より、観測された  $^2\text{H}$  信号の変化は、細胞外の水がシフト試薬によって線幅が広がり、spin echo pulse sequence で観測したために、線幅の変化を強度変化として捉えた結果であると考えられる。こうして求められた見掛けの交換速度は、細胞内外の水の交換ではなく、シフト試薬が組織に吸着される速度を反映すると考えるのが合理的である。

使用したシフト試薬のキレート剤 DTPA は、細胞膜と相互作用しないため、細胞膜を通過しないと考えられている。しかし今回の結果は、このシフト試薬の有効濃度が時間とともに減少することを示した。シフト試薬が恐らく不可逆的に膜に吸着され、溶存濃度が時間とともに減少した結果であると考えられる。これは DTPA に固有の性質であるとは考えにくい。もし我々の考えが正しいとすると、臨床的に使用されている造影剤についても再検討が求められる。

今回の結果から、脳組織の細胞内の水を  $^2\text{H}$  で選択的に測定することはきわめて難しいことが分かった。つまり脳組織の細胞内の水は組織外の水にくらべて、分子運動がかなり制限を受けていることを示唆する。 $^1\text{H}$  は反対に、細胞外より細胞内の水のほうがシャープに観測される。つまり細胞外液は、組織に捕われた水と素早く交換し、磁化率変化によって、測定周波数の高い  $^1\text{H}$  は大きく影響を受けるのに対し、 $^2\text{H}$  は比較的影響されない。いっぽう細胞内液は、細胞内の種々の成分と水素結合ネットワークを構成し、双極子緩和よりは核四重極緩和に大きく影響すると考えられる。したがって 2 量子遷移の  $^1\text{H}$  スペクトルを測定すれば、細胞内の水を、より選択的に捉えることが可能になる。

## 核磁気共鳴映像法(MRI)によるラット関節炎の観察

(三共株式会社 薬剤動態研究所<sup>1)</sup>、第二生物研究所<sup>2)</sup>、バイオメディカル研究所<sup>3)</sup>)○ 藤原久徳<sup>1)</sup>、福田邦昭<sup>1)</sup>、下里隆一<sup>2)</sup>、熊倉誠一郎<sup>2)</sup>、  
半沢宏之<sup>3)</sup>、春山英幸<sup>3)</sup>、高崎 渉<sup>1)</sup>

## Magnetic resonance imaging of adjuvant-induced arthritis in rats

Hisanori Fujiwara<sup>1</sup>, Kuniaki Fukuda<sup>1</sup>, Takaichi Shimozato<sup>2</sup>, Seiichiro Kumakura<sup>2</sup>,Hiroyuki Hanzawa<sup>3</sup>, Hideyuki Haruyama<sup>3</sup>, Wataru Takasaki<sup>1</sup>Pharmacokinetics and Drug Delivery Research Laboratories<sup>1</sup>, Biological Research Laboratories<sup>2</sup>,Biomedical Research Laboratories<sup>3</sup>, Sankyo Co., Ltd.

Adjuvant-induced arthritis in rats was evaluated by magnetic resonance imaging (MRI) in this study. The arthritis was induced by an injection of *Mycobacterium butyricum* into the footpad of Lewis rats, and the *ex vivo* images of the swelled foot was obtained by MRI on designated days up to 21 days post-injection. The morphological changes in the foot of adjuvant-induced arthritic rats were monitored by MRI, and were compared with those in the normal foot in which the joint architecture was well defined. From the MRI of the adjuvant-induced arthritic rats, significant increase in synovia and bone damage was observed. The quality of the MR images was high enough for monitoring the damage in the progression of adjuvant-induced arthritis in rats.

## 1. はじめに

ラットアジュバント関節炎モデルは、抗慢性関節リウマチ薬の開発における *in vivo* 薬効評価系として汎用されている。しかし、関節炎部腫脹の測定が主であり、病理組織学的変化の観察には組織切片染色法による煩雑な操作が必要となる。また、関節炎部の観察にマイクロフォーカス X 線撮影法が用いられることもあるが、骨の観察が主であり、軟組織については所見が得られない。そこで、今回、関節炎部を空間分解能高く撮像するため核磁気共鳴映像法 (MRI) に着目し、アジュバント関節炎ラットにおける滑膜組織の成長および骨破壊過程の詳細をモニターするため、動物用高磁場 MRI 装置 (11.7 T) を用いて観察を行なった。

---

核磁気共鳴映像法(MRI)、アジュバント関節炎ラット

ふじわら ひさのり、ふくだ くにあき、しもざと たかいち、くまくら せいいちろう、  
はんざわ ひろゆき、はるやま ひでゆき、たかさき わたる

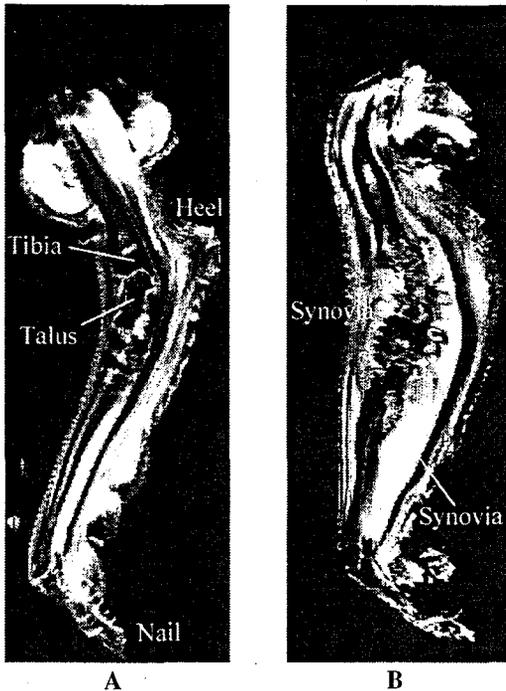
## 2. 材料と方法

1) 動物: Lewis ラット (7 週齢、雌) の右足裏に *Mycobacterium butyricum* を感作し、ラットアジュバント関節炎モデルを作製した。感作後 0、3、7、13、21 日目にラット両足を切断しホルマリン固定標本とした。なお、各時点ごとにコントロールとして非感作の同週齢 Lewis ラットを用いた。

2) MRI 観察: 11.7 T の縦型装置 Unity INOVA (Varian 社製) を用い、内径 38mm の画像プローブ (DOTY Scientific 社製) を併用した。Sagittal 断面の Field of View を  $6 \times 2 \text{ cm}^2$  に設定し、 $512 \times 256$  データポイントで Spin-echo 法により画像を取得した。セグメンテーションおよび面積定量には MEDx (Sensor Systems 社製) を用いた。

## 3. 結果および考察

Fig.1 に感作後 21 日目のアジュバント関節炎ラットおよび正常ラットの足根部 MR イメージを示す。正常ラットにおいては、足根関節部の骨組織である Tibia、Talus などが明確に画像化できた。一方、アジュバント関節炎ラットにおいては、Tibia、Talus 周辺の滑膜組織が腫脹し、正常ラットに比べ高強度のシグナルが得られ水分含量の多いことが



**Fig.1** Sagittal magnetic resonance images of tibiotarsal joints from rats (A: normal, B: adjuvant-induced arthritis model). The spin-echo pulse sequence was used with a TE of 13 ms and a TR of 3 s.

示唆された。さらに足根関節部の骨形状は正常ラットと大きく異なっていた。骨内においてもプロトン密度が高く、骨密度が低下していることが示唆された。腫脹した滑膜組織が、破壊されて広がった骨髓腔にも浸潤し骨髓組織と混ざっているという従来の解釈で説明できる。また生体切片標本においても滑膜の肥大、骨破壊について同様の所見が得られた。以上より、アジュバント関節炎ラットにおいて関節の滑膜腫脹のみならず、骨破壊の発症をも MRI にて観察することができ、アジュバント関節炎の進行過程の詳細を形態学的に明らかにすることができた。このように高磁場 MRI を用いることにより、小動物の組織を迅速に観察することができ、動物モデルを用いた薬効評価への応用が期待される。

超偏極  $^{129}\text{Xe}$  化学シフトによる温度測定.

## 水溶液、ミセル、エマルジョンについて

(阪大・医) ○森 慎一郎、木村 敦臣、藤原 英明

Temperature measurement basing upon Hyper-Polarized  $^{129}\text{Xe}$  chemical shift.  
Water, micell and emulsion solutions

○S.Mori,A.Kimura,H.Fujiwara (School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University)

The temperature measurement of living systems using Hyper-Polarized  $^{129}\text{Xe}$  is expected to become a precise and accurate technique. It is already suggested that the temperature measurement by NMR chemical shift of dissolved  $^{129}\text{Xe}$  is solvent dependent. Therefore, in the present study, solvent dependency is examined in the temperature measurement by Xe NMR chemical shift. Namely, temperature dependence was examined in such different media as water micell and emulsion. The temperature coefficient of  $^{129}\text{Xe}$  gaseous state was  $-3.2 \times 10^{-3}$  ppm/°C. The temperature coefficient was  $-5.4 (\pm 0.5) \times 10^{-3}$  ppm/°C in water and  $-5.5 (\pm 0.5) \times 10^{-3}$  ppm/°C in micell. The chemical shift of Xe dissolved in water was not linear, it showed lowest field shift at about 45 °C. The pH dependency is also tested in the temperature dependence experiments, and pH is shown to be important in such studies.

## 〔序論〕

超偏極  $^{129}\text{Xe}$  を用いた生体温度計測は、より高精度な非侵襲的手法として従来の水プロトン信号を利用した手法にとって代わり得ると期待できる。これは、溶存 Xe の化学シフトの温度による変動を検出することに基づくものであるが、W.Miller<sup>1)</sup> によると温度係数が、 $-0.4$  ppm/°C ( $\text{CCl}_4$  溶媒中, 30 ~ 37°C)、 $-0.2$  ppm/°C (オリーブ油中, 13 ~ 50°C) とあり、溶媒による影響が大きい。そこで本研究では、生体温度計測への応用を視野に入れた上で、軽水およびミセル、エマルジョン中に溶存した超偏極  $^{129}\text{Xe}$  化学シフトの温度依存性を調べた。また、温度依存性に及ぼす pH の影響も大きいことがわかったので併せて述べる。

## 〔実験〕

NMRの測定は、Varian社製INOVA400WB(縦型9.4T超伝導磁石)により、 $^1\text{H}=400\text{MHz}$ 、 $^{129}\text{Xe}=110.636\text{MHz}$ の共鳴周波数で行った。スペクトルの条件は、 $^1\text{H}$ ではスペクトル幅=6000.6Hz、取り込み時間=1.4秒、待ち時間0.4秒、であり、データ点数=128k点でフーリエ変換した。 $^{129}\text{Xe}$ では、スペクトル幅=33003.3Hz、取り込み時間=0.396秒、待ち時間0秒、であり、データ点数=32k点でフーリエ変換した。

Xeガスの温度依存性の測定は、10 φ のNMRサンプル管内に外径8.75mmのガラス球を入れ、その中に超偏極Xeガスを導入し、NMR測定することにより行った。試料温度の変化は、常法どおりに10 φ /分で流れる空気温度の制御により行った。測定温度は22.7°Cから60°Cまで9点変化させた。

水、ミセル、エマルジョン中における溶存Xeガスの温度依存性およびpH依存性の測定では、次の3種類の試料を作成し、pHと温度を変化させてNMR測定を行った。

- 1). 30% 重水を含む水に、内部基準信号として *t*-Butyl Alcohol を 1% 加えた。
- 2). 10% 重水を含む水に、SDS(Sodium Dodecyl Sulfate) を 200mM 加えミセル溶液とした。
- 3). 軽水に卵黄レシチン、およびミスチン酸、トリパルミチン酸、コレステロール、菜種油を加え、エマルジョン溶液とした。

NMR サンプル管に偏極 Xe ガスと保温槽にいたおいた上記に試料溶液を入れ攪拌後、 $^1\text{H}$  と  $^{129}\text{Xe}$ -NMR を測定した。重水を含むサンプルでは D-Lock をかけた。化学シフトは、*t*-Butyl Alcohol のメチル基の  $^1\text{H}$  化学シフトの共鳴周波数を 399,995,448.8Hz として、これに相当する  $^1\text{H}$  および  $^{129}\text{Xe}$  の共鳴周波数を絶対周波数で示した。

もり しんいちろう、きむら あつおみ、ふじわら ひであき

超偏極希ガス NMR、 $^{129}\text{Xe}$  化学シフト、温度依存性、pH 依存性、温度測定

〔結果・考察〕

1. Xe ガスの温度依存性について

温度変化の測定は温度の上昇、および下降の2通りの方法で行った。両者に大きな違いはなかったが、それぞれのシリーズで温度依存性を別々に直線回帰すると、温度下降実験の方が直線性が良かったのでこのデータを採用することとした。温度が高くなるに従い Xe ガス化学シフトは高磁場側に直線的にシフトした。これより求めた温度係数は、 $-3.2 \times 10^{-3}$  ppm/°Cであった。Fig.1 に測定結果を示し、このときの式を Eq.1 に示す。ここで  $\delta$  の化学シフトは 110,619,498 Hz からの正方向へのずれを表し温度  $t$  は摂氏温度である。t-Butyl Alcohol 基準の適応は難しいので任意基準である。

$$\delta(^{129}\text{Xe}) = -0.33(\pm 0.014)t + 1596.3(\pm 0.7)$$

$$R^2 = 0.9934 \quad (1)$$

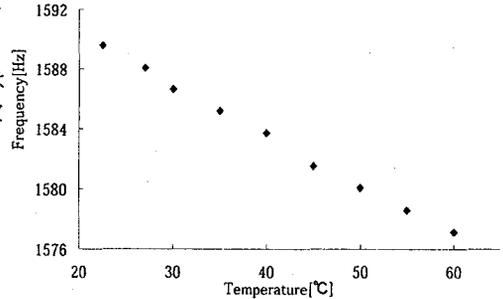


Fig. 1 Relationship between the chemical shift of  $^{129}\text{Xe}$  gas and temperature

2. 水、ミセル中における水の  $^1\text{H}$  および溶存 Xe の化学シフトの温度依存性について

水、およびミセル中における水の  $^1\text{H}$  化学シフトの測定結果については、温度が上昇するほど高磁場側へシフトする傾向 (22°C ~ 65°C) が見られ、温度係数はそれぞれ  $-5.5(\pm 0.5) \times 10^{-3}$  ppm/°C、 $-5.4(\pm 0.5) \times 10^{-3}$  ppm/°Cであった。水の  $^1\text{H}$  の温度係数の文献値<sup>2)</sup>は、 $-0.01$  ppm/°Cであり、今回の実験値とほぼ同じ値であった。

次に、溶存 Xe の化学シフト温度依存性は水中では、45°C で最も低磁場にシフトした山形の傾向が見られた。(Fig.2) ミセル中では、温度が上昇するほど高磁場にシフトする傾向がみられ、温度係数は水の  $^1\text{H}$  では  $-5.21(\pm 0.21) \times 10^{-2}$  ppm/°Cであった。水中では、直線近似ができたが、ミセル中の溶存 Xe では、直線近似が難しく 2 次式の近似を取った。これを Fig.3 に示し、このときの式を Eq.2 に示す。

$$\delta(^{129}\text{Xe}_{\text{in micell}}) = -0.0894t^2 + 1.7921t + 1.106308 \times 10^8 \quad R^2 = 0.9926 \quad (2)$$

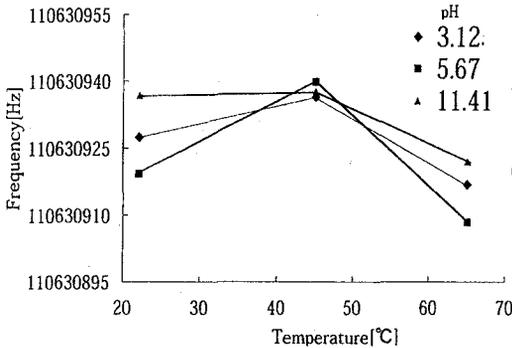


Fig. 2 Relationship between the chemical shift of  $^{129}\text{Xe}$  dissolved in water and temperature

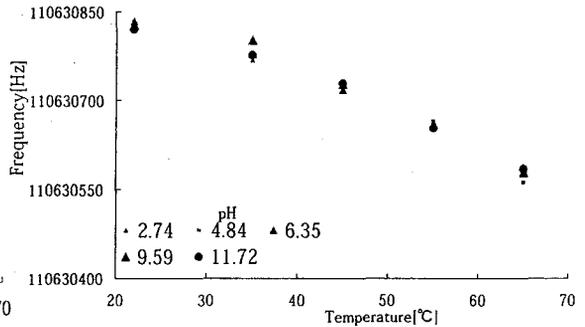


Fig. 3 Relationship between the chemical shift of  $^{129}\text{Xe}$  dissolved in micell and temperature

3. 水、ミセル中における水のプロトン、および溶存 Xe の pH 依存性について

水中における水の  $^1\text{H}$  化学シフトは、pH による変化は少ないが、溶存 Xe については pH が中性になるほど高磁場側にシフトした (Fig.4)。ミセル中では、中性からアルカリ性になると、急激に高磁場にシフトした。pH7.5 以上では SDS ミセルの表面張力が急激に高くなり<sup>3)</sup>、平均会合数が減少しミセルのサイズが小さくなること、報告されておりこれに相当した変化であると考えられる。

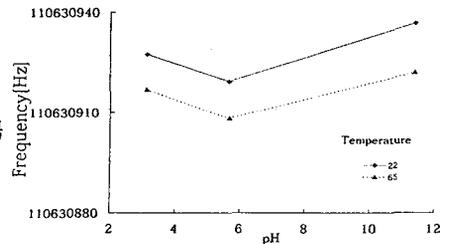


Fig. 4 Relationship between the chemical shift of  $^{129}\text{Xe}$  dissolved in water and pH

〔参考文献〕

1. W. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78-8, 4946-4949, (1981)
2. A. Venkatesh, D. F. Kacher, K. Kuroda, D. Balamore, F. A. Jolesz, M. S. Albert, *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, 9, 2194, (2001)
3. F. A. Long, G. C. Nutting, W. D. Harkins, *J. Am. Chem. Soc.* 59, 2197 (1937)

## 小果実の内部形態と糖分布のNMRイメージング

(食総研<sup>1</sup>, 生物研<sup>2</sup>)○小泉美香<sup>1</sup>, 石田信昭<sup>1</sup>, 狩野広美<sup>2</sup>Inner structures and sugars distribution for berries  
on magnetic resonance imaging*(<sup>1</sup>National Food Research Institute and <sup>2</sup>National Institute of Agrobiological Sciences)*M. Koizumi<sup>1</sup>, N. Ishida<sup>1</sup> and H. Kano<sup>2</sup>

MRI is an excellent means to evaluate the quality and to trace the physiology of postharvest fruits since it can non-destructively map water status and sugars distribution as morphological images. Blueberry and grape fruits were used.  $T_2$  value images and chemical shift images were measured by a Bruker DRX300 imaging system, in order to obtain useful parameters for estimating fruits quality and indicating postharvest physiology of the fruits. The initial changes of the fruits during storage were detected by  $T_2$  value images. There are two water components with 80-90 ms and 130-150 ms of  $T_2$ . The high mobility water component was reduced with increase of storage period. Sugars are differently distributed with fruits and cultivars of the fruits. In blueberry fruit, sugars were located uniformly. While in the grape berries, sugars were located differently for the individual tissues.

果実の品質は、その組織の新鮮度と甘味より成っていると考えられる。組織の劣化は、その柔軟であるにもかかわらずしっかりした感触を損ない、甘味の欠如は果実に求められる最も大きな価値を失わせるものである。果実の新鮮度を保つことは、組織の健全性を保持することであり、新鮮度の評価には形態的観察が不可欠であるが、果肉に含まれる水が多い液果類については、光学的形態観測は切断面より滲出する細胞液のため、極めて困難である。NMR イメージングは非破壊的に内部形態の観察が可能であるという点で、評価法として適していると考えられる。一方、甘味のもとである糖の分布は、糖が水に溶けているので分析のために組織を破壊すると、その局在と部位の変動の正確な情報を失う。この事実は、果実の生理に最も強い関係を持つ細胞の水の状態についても、また同様である。NMR イメージングは、この点についても非破壊的に糖を検出しマッピングする、また、水の物理性を検出しマッピングするという意味で、果実の生理を追跡するために優れた手法である。

キーワード：小果実、内部組織形態、イメージング、レンダリング、ケミカルシフトイメージング

こいずみみか、いしだのぶあき、かのひろみ

本報告では、小果実、ブルーベリーとブドウをモデル試料として、果実保存中の形態変化、細胞の水の状態変化、形態と糖の分布の関係など、果実のポストハーベスト生理に結びつくパラメーターの計測の検討を行った。生理を示すパラメーターは果実品質の評価に応用可能であると思われる。

#### <方法>

ブルーベリーは、湿度を 25%及びほぼ 100%に保った冷蔵庫に貯蔵して貯蔵期間を追って、ブドウは、ラップでパックした状態で約 3 週間保存し、NMR イメージの変化を計測した。

イメージ測定は、Bruker DRX300 に装着したイメージング装置を用いて行った。T<sub>2</sub> 値イメージは、128 x 128 マトリックスでマルチ T<sub>2</sub> シークエンスによって測定した一連のイメージより構築した。ケミカルシフトイメージは、水シグナル抑制を加えたスピネコー局所スペクトロスコピー法のデータより構築した。形態観察のための 3D イメージデータはイメージングパラメーターを適正化し、スピネコー法またはグラジェントエコー法によって測定した。測定データの一部は、マイクロコンピュータに転送して Microsoft Excel, Microsoft Visual Basic で書かれたプログラム、及び、Scion Image (Windows で動作するように改変された NIH Image) によってプロセスして、Scion Image 及び Adobe Photoshop により表示した。

#### <結果および考察>

保存中の果実のイメージ変化は、T<sub>2</sub> 値イメージに最もよく反映された。形態的コントラストが鮮明な新鮮な果実のイメージから、形態的コントラストが弱い部分的に崩壊したイメージへと変化する (Fig. 1, left)。これは果実が消耗するにつれて、細胞の水の状態をそれぞれの組織に特異的に保っていた細胞膜が機能を停止して分化していた組織が各々の間の性質の差を失うからである。NMR イメージでは初期のシュリンクが明確に捉えられる。しかし、生理的面ではイメージで明確な変化が認められる時には、果実の変化は肉眼によっても劣化が認められ、NMR イメージングを用いる利点がない。T<sub>2</sub> 値イメージのシグナルの表示方法を検討した結果、T<sub>2</sub> 値に対する PIXEL 頻度のヒストグラムを作成すると微妙な T<sub>2</sub> 値の変化を感度よく捉えることが可能なことが解った。ブルーベリー果実のヒストグラムは新鮮な果実には 130-150 ms 付近と 80-90 ms 付近にピークを持つ二種類の水の成分が存在すること、そのうち長い成分は果実の劣化に従い減少することを示した (Fig. 1, right)。130-150 ms の水の成分の減少は、T<sub>2</sub> 強調イメージ及び 3D イメージの MIP を照合すると維管束のコントラストの減衰と対応するので、果実内の分化した組織の崩壊という収穫後生理を表す良い指標になると考えられる。これは、ブドウ及びサクランボなど水分の多い小果実について共通の現象であった。ブルーベリーの果実を殺菌装置の付いた冷温高湿庫で貯蔵すると、果実の外観の変化だけでなく、長い T<sub>2</sub> を持つ水の成分の減少を大幅に遅らせることができた。高湿度は、収穫後果実の生理的崩壊を抑制する。

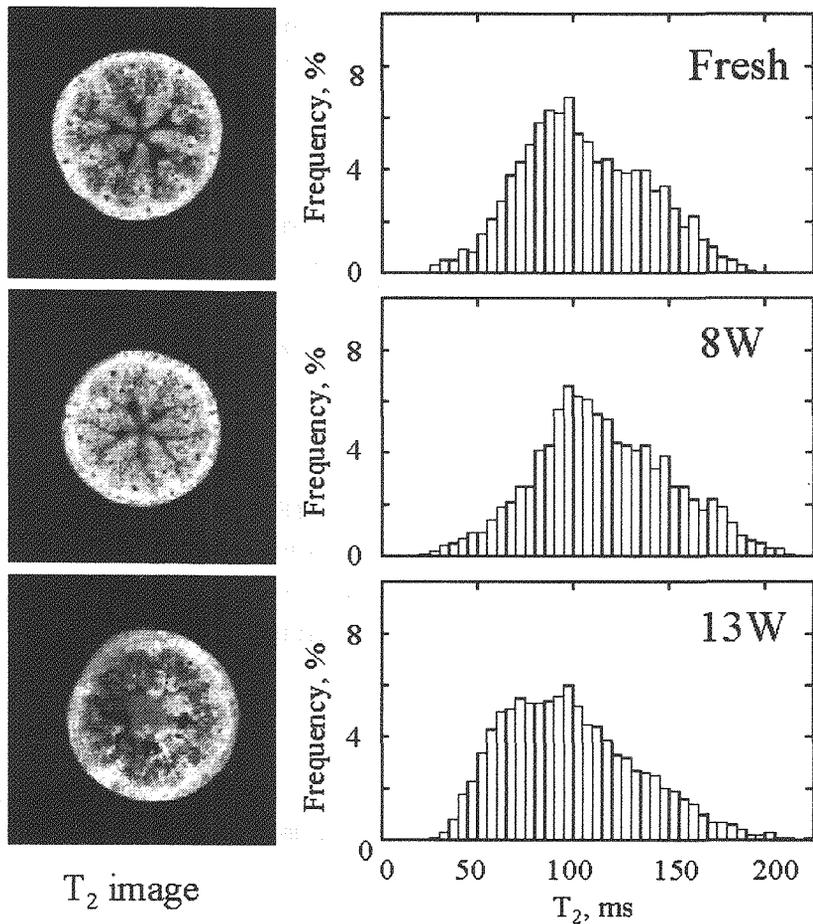


Fig. 1 Changes of  $T_2$  value images for the blueberry fruit stored in a chamber at  $0^\circ\text{C}$  near 100% humidity.

Left;  $T_2$  value images, Right; histograms of PIXEL frequency detected against  $T_2$  value.

糖は、ブルーベリー果実の果肉に均一に分布していた。種子の存在している芯室の壁は、磁化率が不均一なためスペクトルが変形し、著しいアーティファクトが起こったのでスペクトルを解析して補正する必要があった。

ブドウにおいても種子の周辺の磁化率が異なっている。ブドウでは形態的違いによって糖の局在部位が異なり、果肉の内壁の発達が著しく、表皮層の非常に薄い巨峰や

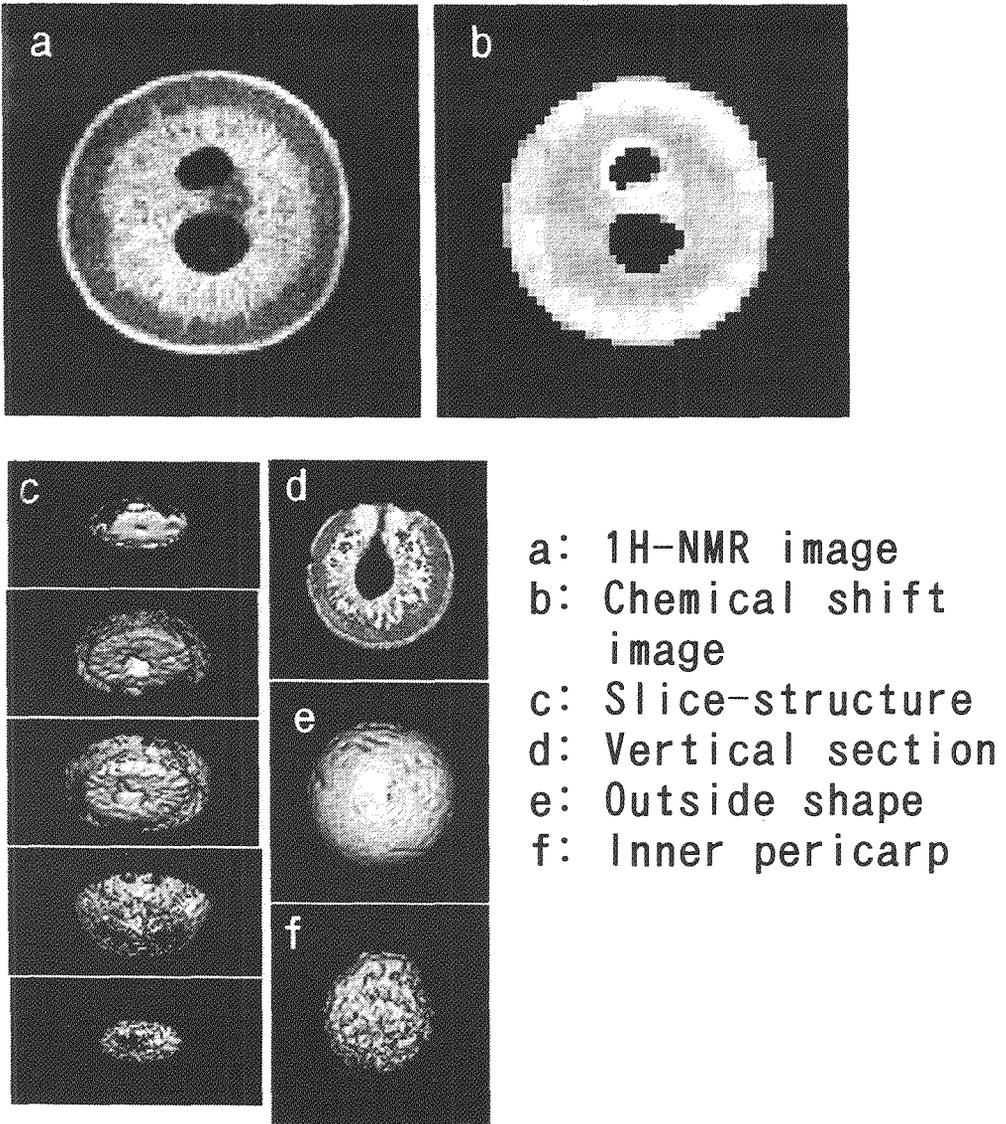


Fig. 2 Morphological images and a chemical shift image of sugars of a grape berry (cv. Stuben).

デラウェアでは、糖は果肉に均一に分布していた。甲州は、胎座と果肉の外壁に蓄積されていた。一方、果肉の内壁の外に厚い外壁が存在しているスチューベンでは、外壁に糖が局在していた(Fig. 2)。蓄積される糖は、甲州は果糖（グルコース+フラクトース）であり、スチューベンでは果糖の他にショ糖が蓄積され、非常に強い甘味のもととなった。果実の形態と蓄積される糖の種類と形態を形成する組織の生理的役割の関係は興味ある問題であるが考察中である。

## 簡易交差緩和率イメージング法による合成高分子ゲル内の水性状の解析

<sup>1</sup>名古屋工業大学大学院・工学研究科, <sup>2</sup>岐阜大学医学部・生理,  
<sup>3</sup>同・医療情報部, <sup>4</sup>愛知県がんセンター・放射線治療部

松島 秀<sup>1</sup>, ○恵良聖<sup>2</sup>, 曾我美 勝<sup>2</sup>, 紀ノ定保臣<sup>3</sup>, 大崎  
光<sup>4</sup>, 高須昭則<sup>1</sup>, 稲井嘉人<sup>1</sup>, 平林忠道<sup>1</sup>

Water structure for synthetic copolymer gels studied by the *equivalent* cross-relaxation rate imaging

Shigeru Matsushima<sup>1</sup>, ○Seiichi Era<sup>2</sup>, Masaru Sogami<sup>2</sup>, Yasutomi Kinoshita<sup>3</sup>, Hikaru Oosaki<sup>4</sup>, Akinori Takasu<sup>1</sup>, Yoshihito Inai<sup>1</sup> and Tadamichi Hirabayashi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Technology and Urban Planning, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Departments of <sup>2</sup>Physiology and <sup>3</sup>Medical Informatics, Gifu University School of Medicine and <sup>4</sup>Department of Radiation Oncology, Aichi Cancer Center Hospital

Being similar to values of saturation transfer ratio (STR) in magnetic resonance imaging (MRI), values of *equivalent* cross-relaxation rate (ECR) correlated well with conditions of water in various copolymer gels composed of any two or three monomers among 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), glycidyl methacrylate (GMA), *N*-vinyl-2-pyrrolidinone (N-VP) and methyl methacrylate (MMA). The MRI measurements were performed by using an off-resonance saturation pulse under conventional field-echo imaging at frequency apart within  $\pm 75$  ppm from the water resonance frequency. The ECR values showed excellent correlation with the HEMA as well as constrained water contents in the series of copolymers. Thus the ECR values would be adopted as a novel parameter helpful for molecular/material characterization of synthetic copolymers without invasive process to the samples.

キーワード：高分子ゲル, 水性状, MRI, 磁化移動, 交差緩和

まつしま しげる, えら せいいち, そがみ まさる, きのみ やすとみ, おおさき ひかる,  
たかす あきのり, いない よしひと, ひらばやし ただみち

【はじめに】 われわれはこれまでに、高分解能<sup>1</sup>H-NMRを用いて“タンパク質より水分子への”磁化移動効果を利用した交差緩和時間(T<sub>1s</sub>)を測定し、生体高分子-水分子間相互作用を研究してきた。その一連の研究成果の臨床応用として、磁化移動効果をMR画像コントラストに反映させた交差緩和率(1/T<sub>1s</sub>; cross-relaxation rate)イメージング法を確立してきた。しかしこの1/T<sub>1s</sub>値は、“1/T<sub>1</sub>\* = 1/T<sub>1</sub> + 1/T<sub>1s</sub>”で与えられるために、実際に1/T<sub>1s</sub>画像を得るためには、1/T<sub>1</sub>値(ラジオ波非照射時)と1/T<sub>1</sub>\*値(ラジオ波照射時)とをそれぞれ別に測定(または撮像)しなければならない。すなわち本法が「高分子-水分子間相互作用を非常に良く反映する」という特性をもつにもかかわらず、実用的には余分な撮像時間と煩雑なプロセスが必要であった。ところで臨床的には、現在、このような磁化移動効果を利用したイメージング法として、[1 - (M<sub>s</sub>/M<sub>0</sub>)] × 100 という式で表されるSTR(saturation transfer ratio; 飽和移動比)イメージング法が一般に良く使用されている(M<sub>0</sub>, M<sub>s</sub>はそれぞれラジオ波の非照射時および照射時の信号強度)。

今回われわれは1/(T<sub>1s</sub>/T<sub>1</sub>) = [(M<sub>0</sub>/M<sub>s</sub>) - 1]という関係に着目し、[(M<sub>0</sub>/M<sub>s</sub>) - 1] × 100で表されるECR (equivalent cross-relaxation rate; 交差緩和率に等価的)イメージング法を用いて、種々の組成と含水率を有する鎖状合成高分子ゲル内の水性状を解析し、本法の利点、有用性を検討した。

【材料と方法】 (HEMA-*stat*-GMA), (HEMA-*stat*-N-VP), (N-VP-*stat*-GMA/MMA) および(N-VP-*stat*-MMA)の4種類、14個の合成高分子ゲルを試料とした(Table 1)。HEMA, N-VP, GMA, MMAはそれぞれ2-hydroxyethyl methacrylate, N-vinyl-2-pyrrolidinone, glycidyl methacrylate, methyl methacrylateの略号で、いずれもソフトコンタクトレンズの素材でもある(試料は日本メニコン社より供与)。それらの化学的性質は、HEMAは側鎖に水酸基を有して主に親水性、MMAは側鎖にメチル基を有して主に疎水性を示し、GMAとN-VPはその中間である。

MRIにおける計測手法にはECRを用い、ECR = [(M<sub>0</sub>/M<sub>s</sub>) - 1] × 100によってECR値を算出・画像化し、高分子ゲルの構造的特徴と水性状との相関性を検討した。ただしM<sub>0</sub>, M<sub>s</sub>はそれぞれ同一計測部位におけるラジオ波(RF, 飽和パルス)の非照射時および照射時の信号強度である。RF照射による磁化移動効果の概略はFig. 1に示すとおりである。

Table I. Characterization of sample gels

Samples No.	Composition (% of unit)	Water Content / %			
		Total	Free	Bound <sup>a</sup>	[Constrained, Non-Frozen <sup>b</sup> ]
1	HEMA(65), GMA(35)	58.0	8.0	50.0	[14.7, 35.3]
2	HEMA(83), GMA(17)	48.0	7.1	40.9	[4.2, 36.7]
3	GMA(32), N-VP(41), MMA(27)	59.0	2.9	56.1	[9.8, 46.3]
4	HEMA(20), N-VP(80)	83.0	66.2	16.8	[0.0, 16.8]
5	HEMA(40), N-VP(60)	74.0	52.0	22.0	[0.0, 22.0]
6	HEMA(60), N-VP(40)	61.0	7.5	53.5	[9.5, 44.0]
7	HEMA(80), N-VP(20)	47.0	6.9	40.1	[3.2, 36.9]
8	N-VP(88), MMA(4), BzMA(8)	79.2	58.6	20.6	[0.0, 20.6]
9	N-VP(79), MMA(13), BzMA(8)	73.2	51.3	21.9	[0.0, 21.9]
10	N-VP(70), MMA(22), BzMA(8)	64.7	42.6	22.1	[0.0, 22.1]
11	N-VP(61), MMA(34), BzMA(5)	55.0	22.0	33.0	[0.0, 33.0]
12	N-VP(52), MMA(40), BzMA(8)	40.0	7.6	32.4	[0.0, 32.4]
13	N-VP(43), MMA(49), BzMA(8)	28.5	0.0	28.5	[0.0, 28.5]
14	N-VP(34), MMA(58), BzMA(8)	18.4	0.0	18.4	[1.1, 17.3]

【結果と考察】 Fig. 2 に合成高分子ゲルにおけるオフセット周波数 ( $\pm 75$  ppm) と STR 法 (a), ECR 法 (b) および交差緩和率 (c) との関係を示す。水の周波数に近い near-resonance 領域では ECR 法, 交差緩和率ともに STR 法に比してとくに親水性ゲル (◆, ■) に対して高感度を示している。また図の形状は, その名のとおり ECR 法と交差緩和率とで非常に類似している。そこで水の周波数に近い near-resonance 領域での RF 照射の代表として 4 ppm の部位, 遠い far-resonance 領域での RF 照射の代表として 19 ppm の部位を選択照射したものを示す。それぞれの部位における STR, ECR と各モノマーの組成率 (%) との関係を図 3 に示す。この図から, ECR-4 (■) は HEMA すなわち側鎖に水酸基を有している親水性ゲルに対して特異的に高感度を示す (図(a)) ことが分かる。

これらの合成高分子ゲルの MR イメージを Fig. 4 に示す ((a), (b), (c) はそれぞれ STR-19, STR-4, ECR-4 の計算画像)。図の上 2 段は親水性ゲル, 下 2 段は疎水性ゲルである。いずれの画像も親水性ゲルは疎水性ゲルよりも高い磁化移動を示し, 画像上高信号を示す。さらに ECR-4 画像は HEMA 濃度に依存して高信号を示している (図(c))。

このように, ECR 法は分子内に水酸基を含む親水性高分子ゲルに対し, 特に near-resonance 照射した場合に, 特異的に高感度を示した。従って ECR 法は, 合成高分子ゲルの含水状態やゲルの化学構造を非破壊的に評価し得る有用なパラメーターになり得ると考えられた。

#### 【参考文献】

1. Era S, Sogami M, Kinosada Y, Matsushima S, Kato K, Nagai N. Magnetization transfer in protein solution, gel and polymer gel. Proc. Int. Workshop on Applic. Magn. and Other Spectr. to Food Sci. 1997; 107-110.
2. Matsushima S, Takasu A, Inai Y, Hirabayashi T, Era S, Sogami M, Kinosada Y. Saturation transfer ratio in magnetic resonance imaging: A novel physical parameter for evaluation of the hydrophilicity of synthetic copolymer gels. Polymer J. 2000; 32: 828-833.
3. Matsushima S, Takasu A, Inai Y, Hirabayashi T, Era S, Sogami M, Kinosada Y. Equivalent cross-relaxation rate in magnetic resonance imaging. A novel physical parameter for evaluation of conditions of water in synthetic copolymer gels. Polymer J. 2001; 33: 236-241.

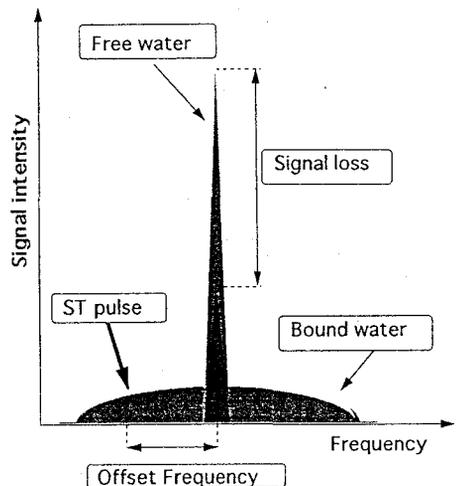
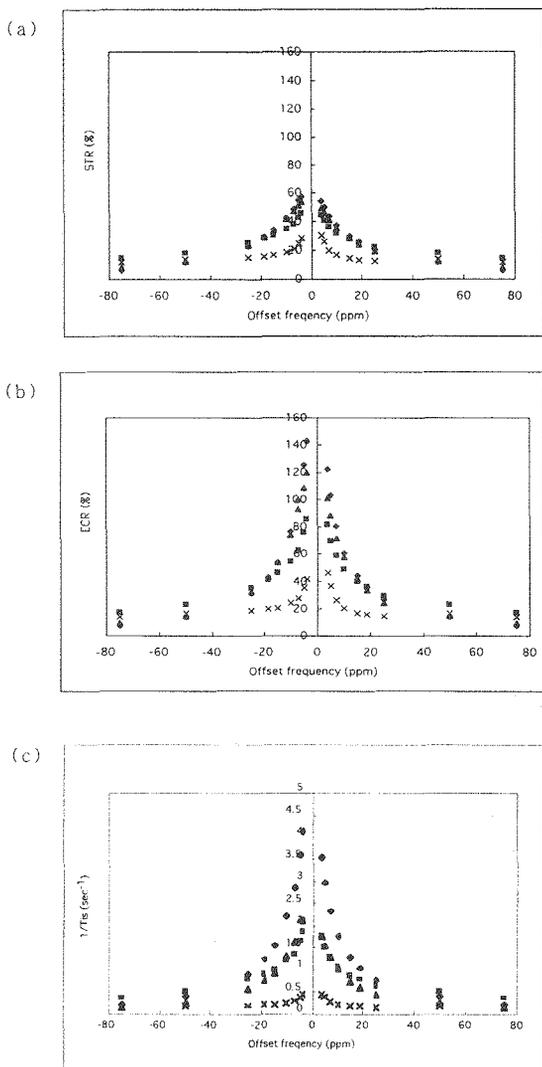
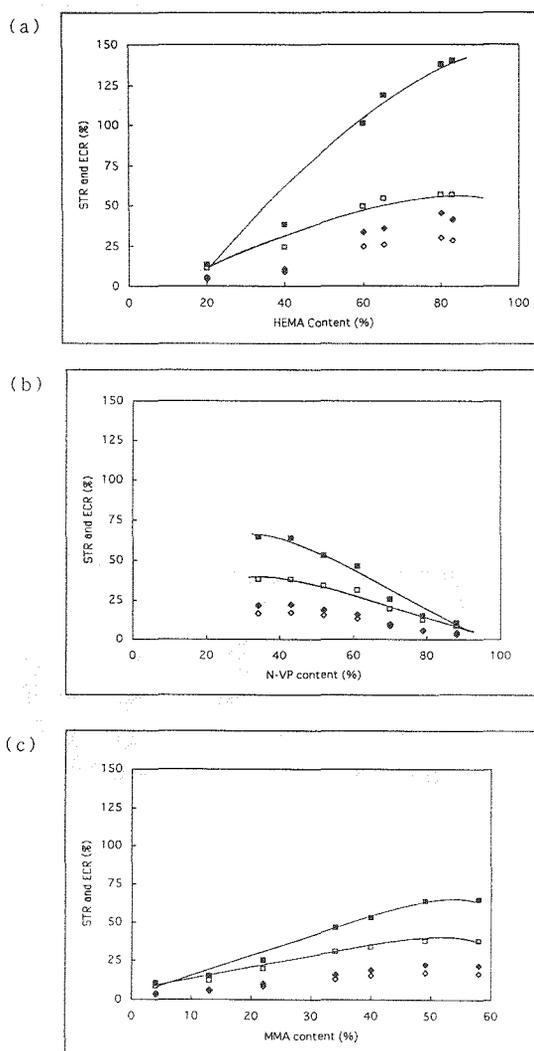


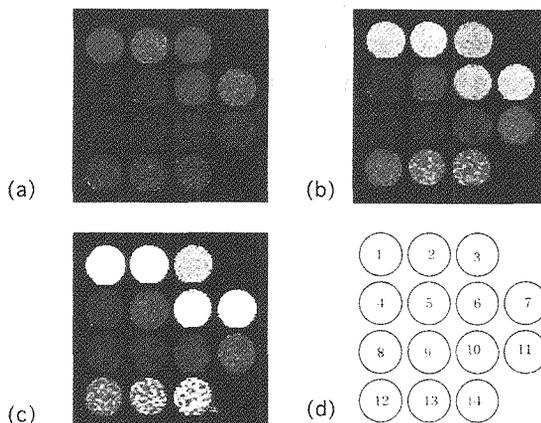
Figure 1. Scheme of saturation transfer effect. In the clin MRI, signal intensity of free water was obtained for MR image. In the ST prepared image, the signal intensity of free water was decreased than without ST prepared image by ST effect. Their signal reduction was different at ST pulse frequency offsets.



**Figure 2.** Correlation between offset frequency and STR, ECR, or  $1/T_{2s}$  in the synthetic copolymer gels. (a) Correlation between STR and offset frequency. (b) Correlation between ECR and offset frequency. (c) Correlation between  $1/T_{2s}$  and offset frequency.  $\blacklozenge$ : poly(HEMA-*stat*-GMA)s,  $\blacksquare$ : poly(N-VP-*stat*-GMA/MMA)s,  $\blacktriangle$ : poly(HEMA-*stat*-N-VP)s,  $\times$ : poly(N-VP-*stat*-MMA/BzMA)s.



**Figure 3.** Correlation between STR, ECR values and monomer content in the synthetic copolymer gels. ECR-4 ( $\blacksquare$ ), ECR-19 ( $\blacklozenge$ ), STR-4 ( $\square$ ), or STR-19 ( $\diamond$ ) values vs. (a) HEMA, (b) N-VP, (c) MMA content.



**Figure 4.** MR images of the synthetic copolymer gels. (a) Calculated STR image at frequency offset of 19-ppm. (b) Calculated STR image at frequency offset of 4-ppm. (c) Calculated ECR image at frequency offset of 4-ppm. (d) Samples No. in the image.

## MRIによる食パンのネットワーク構造の 評価

(<sup>1</sup>食総研、<sup>2</sup>生物研) ○石田信昭<sup>1</sup>、内藤成弘<sup>1</sup>、高野博幸<sup>1</sup>、  
五十部誠一郎<sup>1</sup>、植村邦彦<sup>1</sup>、小泉美香<sup>1</sup>、狩野広美<sup>2</sup>

### MRI Analysis of gluten network of bread

Nobuaki Ishida<sup>1</sup>, Shigehiro Naito<sup>1</sup>, Hiroyuki Takano<sup>1</sup>, Seiichiro Isobe<sup>1</sup>,  
Kunihiko Uemura<sup>1</sup>, Mika Koizumi<sup>1</sup>, Hiromi Kano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Food Research Institute, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8642, Japan

<sup>2</sup>National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba Science City, Ibaraki  
305-8602, Japan.

The network of breads composed of gluten fibers is one of the major elements to determine the quality of the bread. We developed the method to measure the network structure using MRI by soaking a piece of bread in acetone containing Fe<sup>3+</sup> ion and the network was measured as a shadow image. MRI image gives a clear image free from background image, but it takes too long time for the evaluation of bread to measure 3D images. In the current study, we examine a practical method to characterize the bread structure by obtaining good quality 2D image in a short time and by image analysis.

パンの網目構造はパンの品質を決める重要な要素である。昨年度は、切り出したパンの切片をFe<sup>3+</sup>を含むアセトン溶液に浸漬し、アセトンのイメージを3D測定することによりパン断面のネットワーク構造を明瞭に捉えることができることを示した。MRIでは深さ方向の写り込みのない明瞭なスライスイメージを得ることができるが3Dイメージングは測定時間が12時間と長いため、実際の場面でパンの評価法として利用するためには測定時間の短縮が必要である。そこで、2Dイメージ測定により測定条件を最適化して短時間に質の良い画像を得て、画像解析することによりパンのネットワークの特徴を捉える技術について検討した。

キーワード：MRI、パン、ネットワーク、画像解析

著者：いしだのぶあき、たかのひろゆき、いそべせいいちろう、うえむらくにひこ、  
こいずみみか、かのひろみ

### 【材料及び方法】

パン：市販食パンを約12mmの立方体に切り出して試料とした。

測定試料の調製：径20mmの試験管を用い、8～50 mMの過塩素酸鉄を含むアセトンにパンを浸漬して脱気後、試料とした。

MRIイメージの測定：270MHz高分解能NMRに装着したイメージング装置で径20mmのイメージングプローブを用いて、spin-echo法により測定した。測定は256 x 128 のマトリックスで行った後、256 x 256のマトリックスで画像再構築を行った。イメージの平面分解能は0.1mmである。

画像解析：イメージデータはマイクロコンピュータに転送しデータ形式を変換した後、Windowsに移植されたNIHイメージ(Scion Image)により解析した。

### 【結果及び考察】

Fig. 1 にパンをそのまま測定したSPI(single point imaging)法によるイメージ(左)とアセトン浸漬法によるイメージ(右)を比較した。アセトンや染色のための $Fe^{3+}$ の影響を受けていないSPI法によるイメージと比較して、アセトン浸漬法はパンのネットワーク構造を保

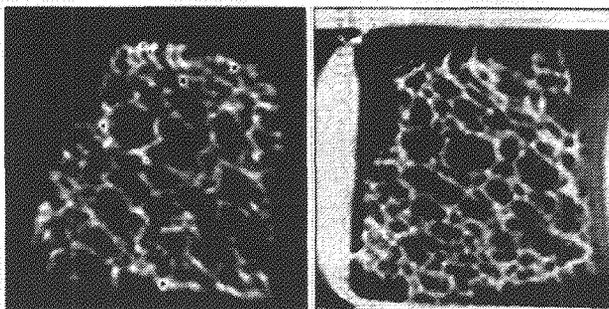


Fig. 1 Images of bread by SPI method (left) and the acetone method (right)

存しており、迅速に高い分解能で明瞭なイメージを得ることができた。

MRIイメージはスライス厚が薄ければネットワークのにじみや上下のネットワークの写り込みのほとんどないイメージが得られ、イメージのグレースケールの明度分布が暗いネットワーク部分と明るい気泡部分に分かれた2山となるため、2値化イメージとする際の閾値の決定が容易で画像解析に適したイメージである。迅速測定のためスライスを厚くすると、スライスの厚みによる画像のにじみが問題となる。グレースケールの明度分布のヒストグラムはスライスが厚いほど写り込みにより中心部にピークを持つ1山となり、一方、薄すぎるとS/Nの低下により気泡の溶液部分の明度が低下してネットワーク部分と重なり、低明度にピークを持つ1山となる。本装置における最適のスライスは0.3mmであった。

鉄の濃度の検討は、ネットワークの染色と同時にアセトンの緩和時間を短くし、短いTRの測定におけるシグナル飽和を回避して、短時間に質の良いイメージを測定するために重要な要素である。

Fig. 2にイメージの画像解析手順を示した。試料は将来において自動測定、自動解析を目標とするためオートサンプラーの使用を想定して、エアリフトによってマグネットにセットした。その際、試料の方向は一定とならないため、試料の上部を示すマーカーとしてキャピラリーを入れてある(Fig. 2 arrow)。測定データはマイクロコンピュータに転

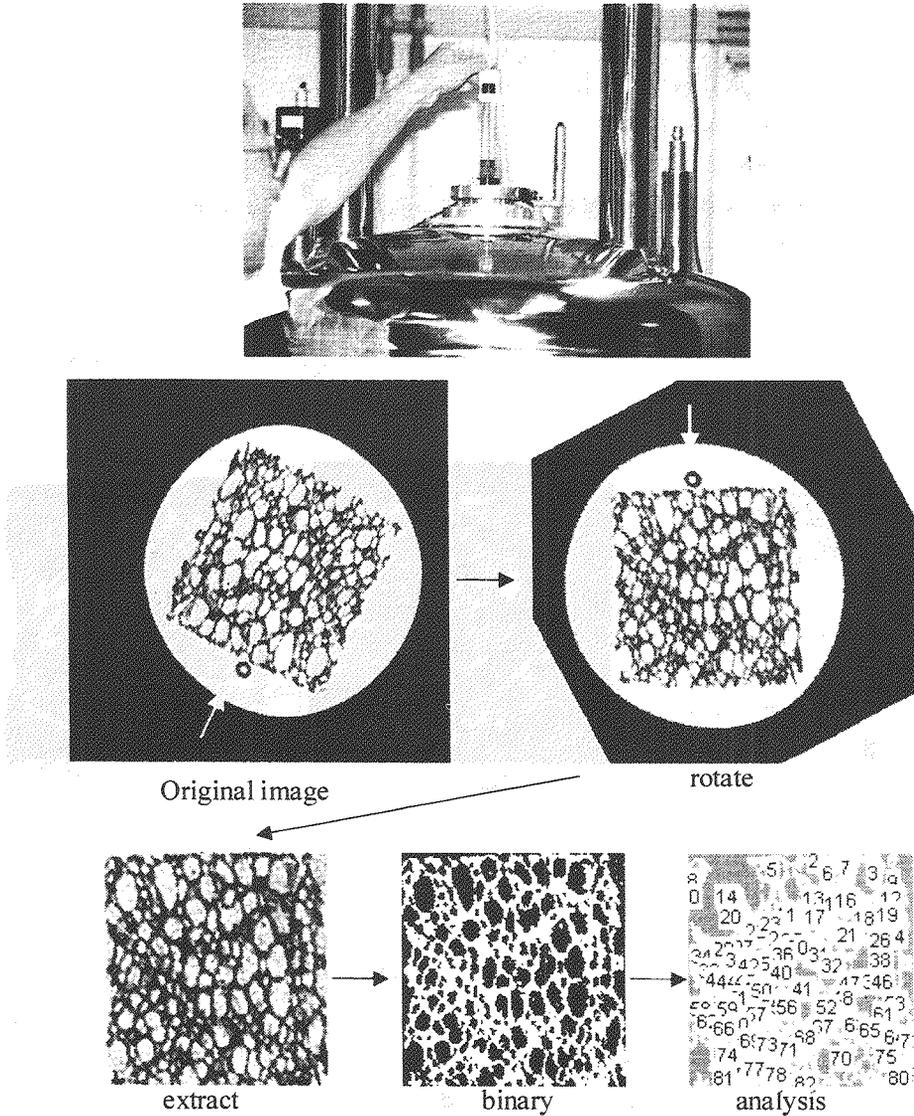


Fig. 2 Image analysis of bread networks

送りScion Imageプログラムで以下の一連の作業を行った。イメージの方向をあわせた後、解析部位を抽出し閾値設定を自動で行いイメージを2値化し、ポア占有面積及びサイズ等の解析を行った。

3種の市販食パンの中心部分5枚のイメージと解析結果をFig.3に示した。イメージはパンによりかなり異なっていた。イメージの画像解析からポア面積の分布をヒストグラムに示したのがFig.3cである。横軸はポアを円近似したときの直径、縦軸はイメージ全体に占める面積割合である。A(b2)のパンは比較的小さなポアからなり、1.4mmと2mm付近に分布の山を持つ。B(b3)のポアは全体に平均的に分布しており、C(b6)は大きなポアが中心の構造をしていた。

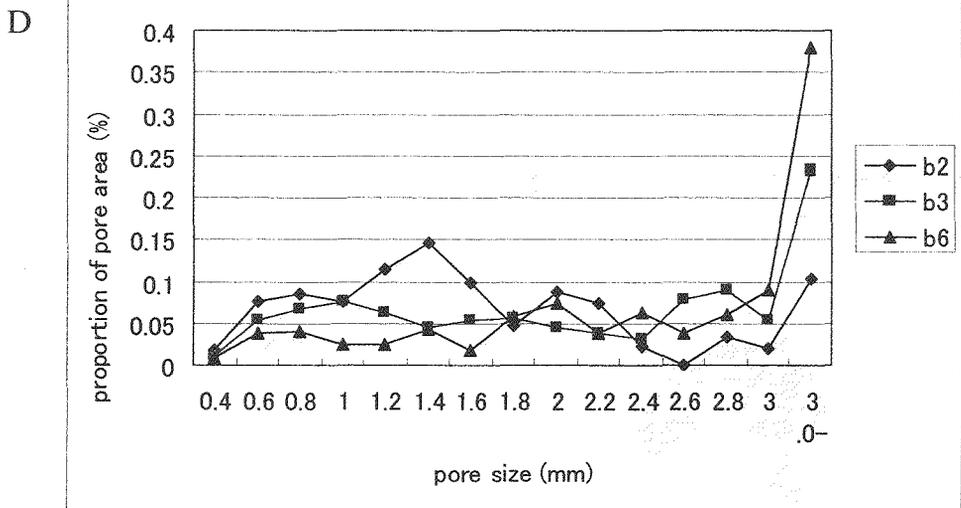
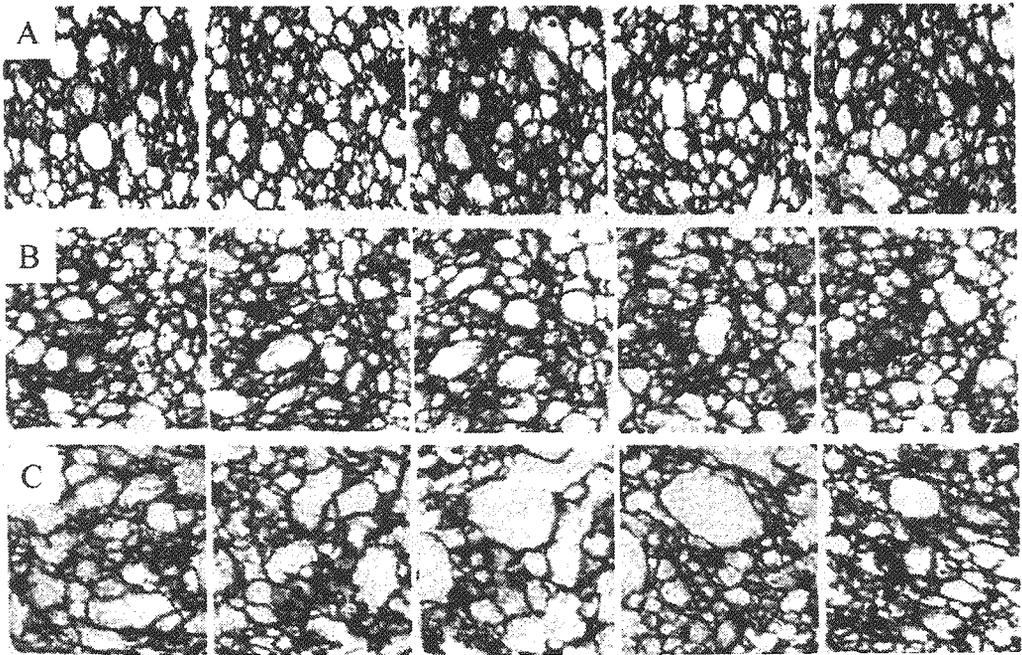


Fig. 3 Slice images of three commercial white breads (A -C) and pore distribution of the images.

## ポリゴンを用いた3DMR画像の定量化ソフトウェアの開発

○橋本征太郎<sup>1</sup>、佐々木英典<sup>1</sup>、拝師智之<sup>2</sup>、巨瀬勝美<sup>1</sup>

1 筑波大学物理工学系 2 (株) エム・アール・テクノロジー

Development of visualization and geometrical quantification software for 3D MR images  
by using polygonal expression of the 3D image surfaces

○Seitaro HASHIMOTO<sup>1</sup>, Hidenori SASAKI<sup>1</sup>, Tomoyuki HAISHI<sup>2</sup>, Katsumi KOSE<sup>1</sup>

1 Institute of Applied Physics, University of Tsukuba and 2 MR technology Inc.

We developed a 3D visualization software program, in which the surface of the volume data was defined as a set of polygons to quantify the geometrical properties of a 3D object. In the program, the surface of a 3D object was selected through a threshold operation and mathematically defined as a set of polygons using the "marching-cube" algorithm. The polygonal data were used for calculation of geometrical parameters (surface area, volume) and surface display on the PC window through the OpenGL functions. For a typical 3D volume data set with  $128^3$  voxels, it took about 2.2 sec to generate the polygonal data set and the image refresh-rate for a view direction change was 7.89 fps. It was concluded that the developed program was a useful tool to understand the structure and to quantify the geometrical properties of a 3D volume data set.

## 【はじめに】

近年のMRI撮像の高速化によって三次元データを処理する機会が増え、これに伴って三次元画像処理ソフトウェアの重要度がますます高まってきている。このようなソフトウェアの実行には、従来ワークステーションや専用のハードウェアが必要であったが、近年のコンピュータ技術の進歩により、汎用のパーソナルコンピュータ(PC)で十分に対応できる環境が整ってきている。そこで我々は、三次元データの表面をポリゴンで表現する手法を用いて、PC上で動作する三次元画像表示・定量化ソフトウェアを開発した。本研究では、表示機能に加えて、被写体の定量解析や画像解析が可能な、より汎用性の高いソフトウェアの開発を目指した。

## 【開発手法】

本ソフトウェアは、Microsoft社の統合開発ソフトであるVisualC++を用いて開発を行った。使用言語はC/C++およびMicrosoft社が提供するMFC(Microsoft Fundamental Library)を使用した。さらに、外部グラフィックスライブラリに、業界標準として知

キーワード 画像処理、定量解析、ポリゴン、三次元表示

○はしもとせいたろう、ささきひでのり、はいしともゆき、こせかつみ

られる OpenGL ライブラリ[6.7]を採用した。このライブラリの採用により、コーディングの効率は画期的に向上した。なお、三次元データからポリゴンデータを構築するアルゴリズムには、等値面再構成手法である Marching Cubes 法[1.2.3]を用いた。

開発環境は次の通りである。

- ① OS Windows2000
- ② CPU PentiumIII 600MHz
- ③ メモリ 384Mbytes (ポリゴンデータが大きいため)
- ④ ビデオ OpenGL 対応のビデオカード

### 【開発結果】

本ソフトウェアの実行画面を Fig.1 に示す。入力データ形式は、1 画素あたり 1 バイトもしくは 2 バイトの生データ (ヘッダー無し) である。メインウィンドウは、ポリゴンを用いた三次元のサーフェスレンダリング画像が出力され、さらにサブウィンドウには被写体のスライス画像を表示している。Fig.1 のメインウィンドウに表示している切断面がスライス面の位置を示しているのので、断層面の位置を直感的に把握することが出来る。ポリゴンデータはマウス操作により任意に回転し、任意の視線方向から見る事が可能である。他にも MIP 処理や、スライス方向の連続画像や軸回転の連続画像を、標準動画フォーマットである AVI ファイルとして出力する機能も備えている。

本ソフトウェアの特徴である定量解析に関して、表面積と体積はポリゴンデータ生成時に求められる。MRI データは一般にノイズを含むので、凹凸のある等値面が生成されるが、フィルタリングによりある程度滑らかにする事が出来る。ただし、この場合は、幾何学的位相条件が保持されないという問題点があるので、表面積の値に関してはこれらの条件を考慮する必要がある。体積については、従来のボクセル容量を足し合わせたものと比べると精度は良くなっている。

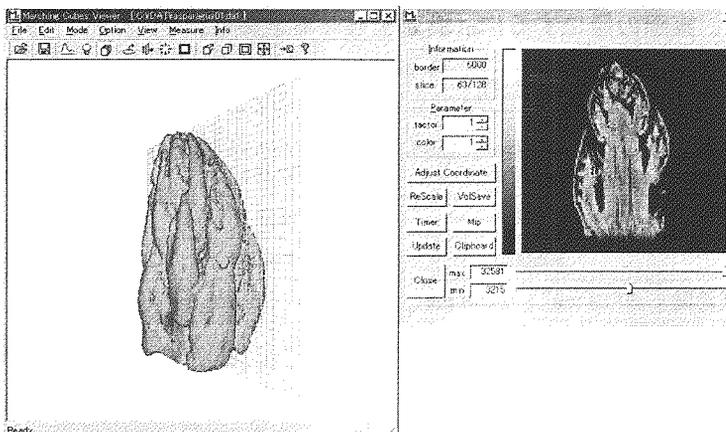


Fig.1 CRT image of the working windows. Left window shows a polygonal surface rendered image and cut plane. Right window shows the corresponding 2D slice. Sample is an asparagus. The FOV is  $(19.2\text{mm})^3$  and the image matrix is  $128^3$ .

【実行例】

本ソフトウェアの実行例を Fig.2 と Fig.3 に示す。試料にはマウス胎児と梅の実の三次元スピンエコー画像を用いた。メディアンフィルタ処理をしてあるので、表面が滑らかになっているのが分かる。また、梅のように、閾値の設定によって等値面が複数生成されるケースもある。これを回避するために、Region Growing 法[4]などを用いて任意の関心領域を抽出することもできる。

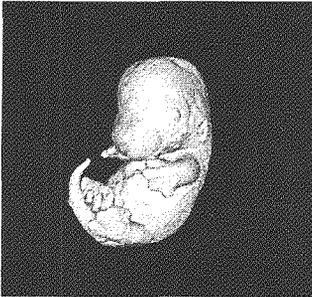


Fig.2 Surface rendered image of a mouse fetus. The FOV is (8.96mm)<sup>3</sup> and the image matrix is 128<sup>3</sup>.

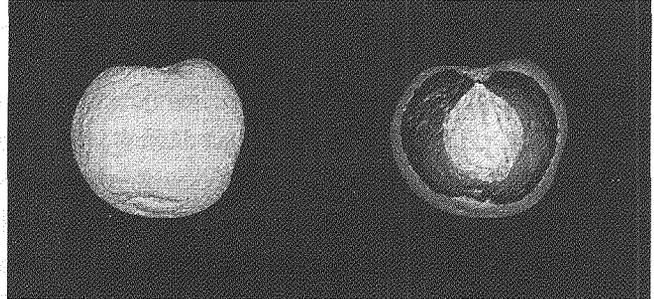


Fig.3 Surface rendered image of a plum. Left image shows plum's surface. Right image, which is cut by a plane, also shows a plum's seed. The FOV is (25.6mm)<sup>3</sup> and the image matrix is 128<sup>3</sup>.

【実行速度の評価】

下の表 (table.1) は、それぞれのポリゴンデータにおける各種情報の比較と、計算時間と描画速度を 2 台の PC で比較したものである。表から分かるように、生成時間や更新レートは CPU の性能に比例していることがわかる。右の梅の画像では、実の表面のほかに、種子の表面も表示されている。表面積や体積は、等値面を生成する際に計算されるので、計測値がどの領域を求めているのか注意する必要があるが、この問題は先に述べた領域抽出により解決できる。なお、面積や体積はスクリーン座標系での値なので、実際の値にするには換算する必要がある。

	マウス胎児		梅	
	A	B	A	B
ポリゴン数	320576		302396	
表面積	45098.6		42248.6	
体積	305990		383600	
ポリゴン生成時間	6719 ms	2203 ms	6549 ms	2183 ms
画像更新レート	2.85 fps	7.46 fps	3.03 fps	7.89 fps

・PC A  
Windows2000  
Athron 1.2GHz  
Memory 256MB  
VGA GeForce Ultra

・PC B  
Windows2000  
Pentium III 600Hz  
Memory 384MB  
VGA GeForce2GTS

※fps=frame/sec

### 【結語】

本研究では、PC上で動作する三次元MR画像の定量解析ソフトウェアを開発した。機能としては、任意の視線方向からの表面表示とスライス画像表示、加えて被写体の定量解析を有し、被写体の形状把握には十分な機能を持ちあわせていると思われる。今後、臨床画像に適用するために、対応するデータ形式の増加や操作性の向上、ポリゴンデータの単純化を研究する予定である。

なお、本ソフトウェアの評価版をサンプルデータとともに一般に公開しているので、興味をもたれた方は参考にさせていただきたい。

### 【参考文献】

1. 「Marching Cubes: A High Resolution 3D Surface Construction Algorithm」  
William E. Lorensen and Harvey E. Cline  
Computer Graphics (Proceedings of SIGGRAPH '87), Vol.21, No.4, pp.163-169.
2. 「Polygonising a Scalar Field Using Tetrahedrons」  
Paul Bourke  
<http://astronomy.swin.edu.au/pbourke/modelling/polytetra/>
3. 「ポリューム・データの等値面の構成に関する研究」  
永江 孝規, 安居院 猛  
東京工業大学生命化学専攻大学院博士後期課程学位論文 平成6年1月
4. 「Seeded Region Growing」  
Rolf Adams, Leanne Bischof  
IEEE Transactions on Pattern Analysis and..., Vol.16, No.6, pp.641-647
5. 「Bilateral Filtering for Gray and Color Images」  
C.Tomasi, R.Manduchi  
Proceedings of the 1998 IEEE International Conference On Computer Vision
6. 「OpenGL プログラミングガイド第2版」  
Manson Woo, Jackie Neider, Tom Davis 著  
ピアソン・エデュケーション出版
7. OpenGL, The Industry's Foundation for High Performance Graphics, ArtLab  
<http://www.opengl.org>

### 【公開先】

- ・NMR イメージング研究室  
<http://mrlab.bk.tsukuba.ac.jp/mrlab/seitarou/index.html>

## 小脳アストログリア細胞の代謝と機能

(鳥取大・医・医療環境学) ○飯塚舜介、疋田 純、富永里香、  
井上 仁、D. A. Aremu

**NMR studies of the metabolism and functions of cerebellar astrocytes**  
Tottori University Faculty of Medicine. S.Meshitsuka, J.Hikita, L.Tominaga,  
M.Inoue, D.A.Aremu

Astrocytes play important roles in central nervous systems by secreting specific metabolites on the demand of neurons. In order to have more information on the metabolites from astrocytes, DQCOSY and HSQC were applied to the primary culture systems such as astrocytes, and neuron-astrocyte co-culture to establish the substantial interaction between neurons and astrocytes, using  $^{13}\text{C}$  labeled glucose as a nutrient. In the presence and absence of environmental pollutants in the culture, the observation of labeled metabolites and the toxic effects leads to clarify the aspects of CNS alteration.

はじめに

アストロサイトは中枢神経系において特異な機能を担っていることが知られている。その一つが神経細胞の生存と活動の維持であると考えられている。培養系を用いた神経細胞、及びアストロサイトの代謝物を介しての相互作用が研究されてきた。アルツハイマー病などの神経変性疾患は遺伝的要因によってもおこるが、環境的要因が発症を決定していることが多いと考えられている。神経細胞とアストロサイトの代謝物を介しての相互作用に対する環境要因の影響はよく分っていないことが多い。NMRによるアストロサイト等の代謝物の分析は1次元の測定で行われてきた。混合物系であるためシグナルの重なりなどによって、重要な代謝物についての見落としや不十分な解析にとどまっていた。昨年の討論会では、マウス大脳のアストログリア細胞の $^{13}\text{C}$ ラベルした代謝物のインパース NMR 測定による分析について報告した。今回は、マウス小脳から採取した培養細胞について発表する。

実験方法

生後4~5日のマウスの小脳を採取し、初代培養によってアストログリア細胞を得た。また、顆粒細胞とアストロサイトの共培養を行った。10%又は15%子牛胎児血清を含

キーワード: HSQC、DQCOSY、アストロサイト、神経細胞、脳代謝物

めしつか しゅんすけ、ひきた じゅん、とみながりか、いのうえ まさし、D. A. Aremu

む BME 培養液を用いた。培養液に放出される代謝物を DQCOSY 法で分析した。また、 $1\text{-}^{13}\text{C}$ -グルコース添加した DMEM 培養液中で一定時間培養後の細胞と培養液中の代謝物を HSQC 法により分析した。装置は Varian Inova 500 を用いた。

## 結果

マウス小脳アストロサイトの初代培養細胞の培養液中には lactate, alanine, acetate, pyruvate, glutamine, citrate の isotopomer が観測された。小脳アストロサイトは、大脳皮質由来と比べて citrate の放出が極めて多いことが特徴であることが分った。また、長時間（5日～）培養した培養液中にはグルコースは消費されて殆ど残っていないが、lactate と共に citrate が大量に存在していた。succinate, glutamate は全く検出されなかった。また、 $0.1\text{mM}$  Al-glycinate の存在で citrate の放出が強く抑制された。顆粒細胞とアストロサイトの共培養においても同様に、lactate, alanine, glutamine, citrate の isotopomer が観測されたアストロサイトの単一培養と比べて、citrate の濃度が少なかった。

## 考察

大脳皮質から採取したアストロサイトでは、citrate の放出は観測されるが、極めて僅かな量であった。これに対して、小脳アストロサイトは細胞外に大量の citrate を放出した。長時間培養時に細胞のエネルギー源となる分子は残っていないにもかかわらず、培養液中の citrate は取り込まれなかった。従って、citrate の放出は不可逆的な過程であり、再度吸収して TCA 回路を経てエネルギー源として使われることはないことが分った。中枢神経系において citrate がどのような役割をしているのか明らかにされていない。三塩基酸であることから、 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  などの 2 価金属イオンを調節する機能をはたしていると予想されているが、よく解っていない。脳脊髄液中には、citrate がほぼ一定の濃度に保たれている。小脳アストロサイトが citrate 濃度の調節に重要な役割をしていることがうかがわれた。さらに、微量のアルミニウムによって citrate の放出が特異的に阻害されたことから、アルミニウムの神経毒性との関係が示唆された。また、glutamine についても再吸収される傾向は見られなかった。 $^1\text{H}$  の一次元測定から succinate, glutamate がアストロサイトから放出されると報告されているが、我々が今回行った  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -グルコースを添加した培養では、HSQC スペクトルで観測されなかった。1次元測定の結果は再検討が必要であると考えられる。顆粒細胞とアストロサイトの共培養において、アストロサイトの単一培養と比べて、citrate の濃度が少なかった。顆粒細胞によって取り込まれたか、或いはアストロサイトからの放出を減少させる機構があるかのいずれかであると考えられる。

2D selective-TOCSY-DQFCOSY および selective-TOCSY-NOESY 法による  
糖鎖の構造解析

(日本ブルカー<sup>1</sup>, 横浜市大・理<sup>2</sup>)      ○佐藤一<sup>1</sup>, 梶原康宏<sup>2</sup>

**Structure analysis of oligosaccharide by 2D selective-TOCSY-DQFCOSY and  
selective-TOCSY-NOESY**

(Bruker Japan<sup>1</sup>, Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University<sup>2</sup>)

○Hajime SATO<sup>1</sup>, Yasuhiro KAJIHARA<sup>2</sup>

We present a 2D selective-TOCSY-DQFCOSY experiment for a strict assignment of an individual sugar component in oligosaccharides and a 2D selective-TOCSY-NOESY for discriminating NOE signals between inter- and intra-ring. In 2D selective-TOCSY-DQFCOSY, network of proton signals of a selected sugar is observed as the diagonal peaks in the 2D spectrum by use of the first selective-TOCSY period, and the correlation signals between J-coupled neighboring protons are observed as the cross peak by the second DQFCOSY development. In 2D selective-TOCSY-NOESY, an intraring-NOE signal is distinguished by connecting the NOE cross peak to two diagonal peaks in this 2D spectrum, and an interring-NOE is not connected the NOE peak to two diagonal peaks.

[序論] 本研究では糖鎖の複雑な <sup>1</sup>H スペクトルから単糖のみのシグナルを抽出することで単純化しそのシグナルを誤りなく帰属するために 2D selective-TOCSY-DQFCOSY および 2D selective-TOCSY-NOESY 法を考案した。前者の実験において (Fig. 1), 選択励起したある糖の <sup>1</sup>H シグナルのネットワークが selective-TOCSY によって 2D スペクトル上に対角ピークとして観測され, また Jカップリングした隣りのシグナルはクロスピークとして高感度に観測することができた。この手法により糖鎖を構成している各糖骨格内のプロトンを非経験的に連鎖帰属する手法を確立した。一方, 後者の実験において (Fig. 2), 対角ピークは前者の測定と同じように観測され, また NOE はクロスピークとして観測された。この 2D スペクトルにおいて糖残基内の NOE ピークは, 2つの対角ピークを結ぶ位置に観測され, 糖残基間の NOE ピークは対角ピークがない化学シフト上に観測された。この手法により糖残基内と残基間の NOE を容易に区別することができた。

本研究では 11 残基からなる糖鎖を構成する全 <sup>1</sup>H シグナル中 60%以上のプロトンを非経験的に連鎖帰属できる新規測定法を確立した。また selective-TOCSY-NOESY 法により 49 個の NOE を容易に帰属することができ糖鎖の立体構造を詳細に解析できた。

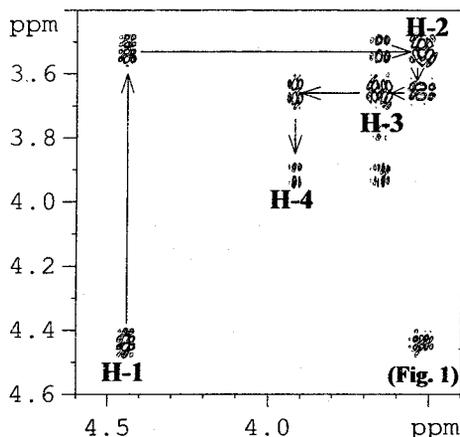
<sup>1</sup>H-NMR, 2D selective-TOCSY-DQFCOSY, 2D selective-TOCSY-NOESY, 糖鎖

さとう はじめ, かじはら やすひろ

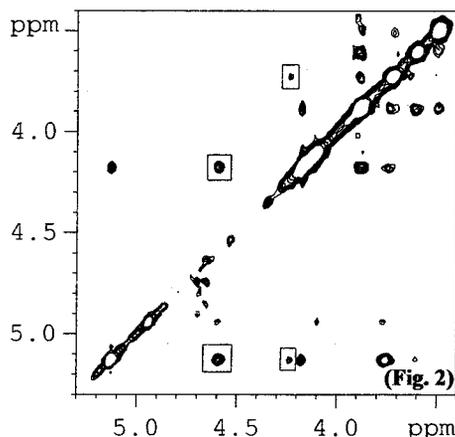
[実験] 本研究では 11 残基からなる糖鎖を用いた. この試料(15mg)を重水(0.3mL)に溶かして NMR 測定試料(25mM)とした. 全ての測定は BRUKER 社製 5mmTBI-Z プローブを装着した AVANCE-400 を用いて行なった. 測定温度は 298K に設定した. 2D selective-TOCSY-DQFCOSY および 2D selective-TOCSY-NOESY において, 糖のアノメリックシグナルを選択励起するために RE-BURP(150ms)を用いた. 前者の測定において TOCSY 混合時間を 140ms に設定し, 積算回数 16 回, 展開側を 512 ポイント取り込んだ(測定時間 4:37). 後者の測定において TOCSY 混合時間を 140ms および NOE 混合時間を 300ms に設定し, 積算回数 16 回, 展開側を 512 ポイント取り込んだ(測定時間 5:15). 両者の測定をアノメリックシグナルの個数分を行なった.

[結果と考察] 両者の 2D スペクトルにおいて対角ピーク強度を最適化するために TOCSY 混合時間依存の実験を行なった. その結果, 混合時間が 60ms および 80ms のとき, H-1 から H-3 まで対角ピークが観測され, H-4 から H-6 までの対角ピークは非常に小さいかまたは観測されなかった. 混合時間が 120ms および 140ms のとき, H-1 から H-6 までの対角ピークが観測された. このとき H-1 の対角ピーク強度は 60ms または 80ms のときより小さくなったが全体的に全ての対角ピークが良好に観測されたので 140ms を TOCSY 混合時間の最適値とした.

本研究では  $^1\text{H}$  だけを用いた 2D selective-TOCSY-DQFCOSY 法により 11 残基からなる糖鎖を構成する全  $^1\text{H}$  シグナル中 60% 以上のプロトンシグナルを非経験的に連鎖帰属できた. また 2D selective-TOCSY-NOESY 法により 49 個の NOE を容易に帰属することができ糖鎖の立体構造を詳細に解析できた. 残りの帰属されていない理由のひとつはアノメリックシグナルが分離していないためである. この問題を解決するために selective(1)-TOCSY-selective-TOCSY(2)-DQFCOSY を行ない, 一つの糖を抽出する必要があると考えられる. また別のアプローチとして軽水中でアミドプロトンから展開する方法を試みることが考えられる. 二つめの理由はガラクトース残基のように H-4 と H-5 のカップリング定数が非常に小さいために TOCSY による磁化が効率よく伝達しないことが考えられる. この場合は NOE を用いることにより解決されると考えられる.



**Fig. 1** Expanded plot of 2D selective-TOCSY-DQFCOSY, which one of galactoside residues was selectively excited.



**Fig. 2** Expanded plot of 2D selective-TOCSY-NOESY spectrum, which one of mannoside residues was selectively excited. Inter-ring NOE signals were marked by rectangles.

## Macroscopic Background Gradient and Radiation Damping Effects on High-Field PGSE NMR Diffusion Measurements

(東京都立大学)

(都立大) ○W. S. Price, (スエーデン王立研究所) P. Stilbs, (ルント大) B. Jönsson, O. Söderman

W. S. Price (Tokyo Metropolitan University), P. Stilbs (Royal Institute of Technology, Sweden), B. Jönsson and O. Söderman (University of Lund, Sweden)

The effects of macroscopic background gradients due to susceptibility differences at the sample interfaces and of radiation damping on PGSE experiments are examined. Both phenomena can lead to the seemingly strange effect of the echo signal growing as the gradient strength increases at low applied gradient strengths. For a freely diffusing species, background gradients manifest themselves as slight concave or convex inflections in the linearized PGSE attenuation curve – depending on the polarity of the applied gradient. The various means of overcoming macroscopic background gradient problems, including bipolar gradients, and their efficacy are examined experimentally and discussed. The effects of radiation damping can also result in the attenuation curve being non-linear but, different than the effect of background gradients, the non-linearity does not change with the polarity of the applied gradient. The vulnerability of the stimulated echo-based PGSE sequence and variations of Hahn-based PGSE sequences is investigated. Both background gradients and radiation damping have serious implications for accurate diffusion measurement determination.

### INTRODUCTION

Pulsed-Gradient Spin-Echo (PGSE) NMR is now the method of choice for measuring translational diffusion coefficients,  $D$ . To obtain accurate measurements, numerous well-known sources of artefacts including eddy currents, non-constant ('non-linear') gradients, microscopic magnetic inhomogeneities, convection and mismatched gradient pulses must be accounted for.<sup>1-3</sup> However, two other complications, (1) 'macroscopic' background gradients due to the magnetic susceptibility differences at sample interfaces (i.e., the 'meniscus effect') and (2) radiation damping, that can seriously reduce accuracy have received far less attention. Importantly, the severity of both of these complications increases with the static magnetic field strength,  $B_0$ . Here, we investigate these two deleterious effects and how they can be alleviated, thereby increasing the accuracy of the diffusion coefficients determined.<sup>4</sup>

### THEORY

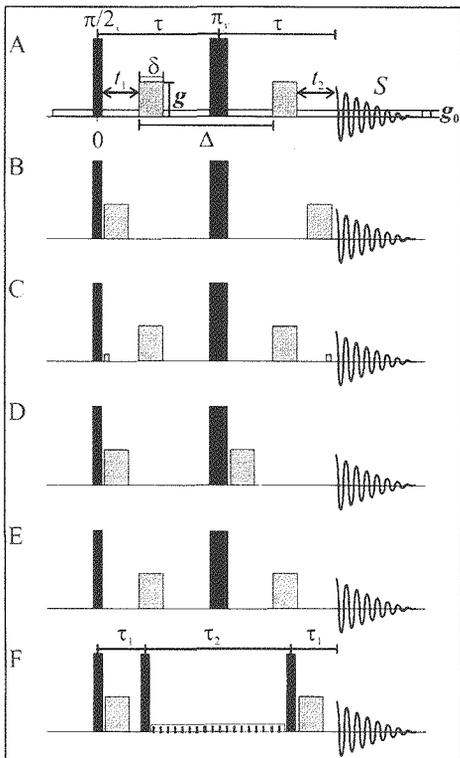
In the simplistic case of the applied gradient,  $g$ , superimposed on a constant background gradient  $g_0$ , the attenuation (i.e., the echo signal  $S$ , divided by the signal acquired with  $g = 0$ ,  $S_0$ ) due to diffusion in the Hahn spin-echo based PGSE sequence (Fig. 1A) is<sup>5</sup>

$$E(g, g_0) = \frac{S}{S_0} = \exp \left( -\gamma^2 \left[ \underbrace{g^2 D \delta^2 (\Delta - \delta/3)}_{g \text{ term}} + \underbrace{\mathbf{g} \cdot \mathbf{g}_0 D \delta \left[ t_1^2 + t_2^2 + \delta (t_1 + t_2) + \frac{2}{3} \delta^2 - 2\tau^2 \right]}_{\mathbf{g} \cdot \mathbf{g}_0 \text{ cross terms}} \right] \right) \quad [1]$$

Importantly,  $E$  depends on the polarity of  $\mathbf{g}$  due to the  $\mathbf{g} \cdot \mathbf{g}_0$  term. When  $g_0 = g$ , [1] reduces to

$$E(g) = \exp \left( -\gamma^2 g^2 D \delta^2 (\Delta - \delta/3) \right). \quad [2]$$

Keywords: Background gradients, Bipolar gradients, Calibration, Self-diffusion, PGSE, Radiation damping



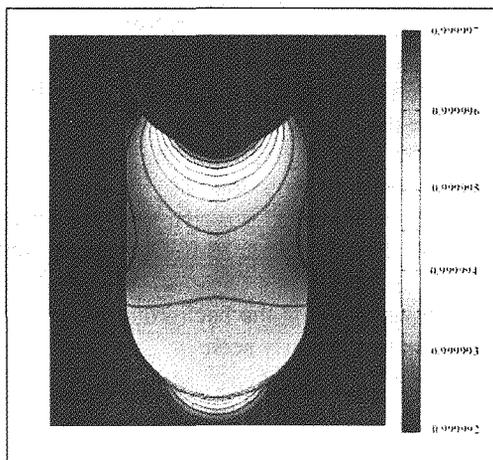
**Figure 1.** Schematic diagram of the variations of the Hahn spin-echo based PGSE pulse sequence (A-E), and the monopolar (F) stimulated-echo based PGSE sequence. Radiation damping can occur during the periods in which the magnetization is not spatially encoded (i.e., during the periods  $t_1$  and  $t_2$  in A). The striped gradient pulse in F is a purge pulse for reducing the phase cycling requirements as well as preventing the onset of radiation damping during the  $\tau_2$  period.

In reality the background gradient is a function of position in the sample (i.e.,  $\mathbf{g}_0 = \mathbf{g}_0(r, z)$ , where  $(r, z)$  denotes the position of a volume element in cylindrical coordinates) and if the diffusing species moves between volume elements of different background gradient strength slowly (i.e., stays within a volume of constant  $g_0$  during  $\Delta$ ), [1] becomes

$$E = \int E(g, g_0(r, z)) dV. \quad [3]$$

If the presence of  $g_0$  is ignored and the gradient is calibrated using a sample of known diffusion coefficient and [2], the value of  $g$  determined inherently contains the effects of  $g_0$ .

The background gradients resulting from magnetic susceptibility discontinuities in a standard NMR tube containing water using are illustrated in Fig. 2.



**Figure 2.** Finite element simulation of the background gradients in a standard NMR tube. Each contour reflects a 0.5 ppm change in the field. Lengthening a sample is not necessarily a means of obviating background gradients since the sample will almost certainly not be contained within the constant region of the applied gradient.

Radiation damping results from the precessing spin magnetization generating an oscillating current in the receiver coil, which in turn generates an oscillating magnetic field, which rotates the magnetization back to its equilibrium position. Radiation damping can be characterized by a rate constant

$$R_{\text{RD}} = \frac{1}{T_{\text{RD}}} = \kappa \eta Q \quad [4]$$

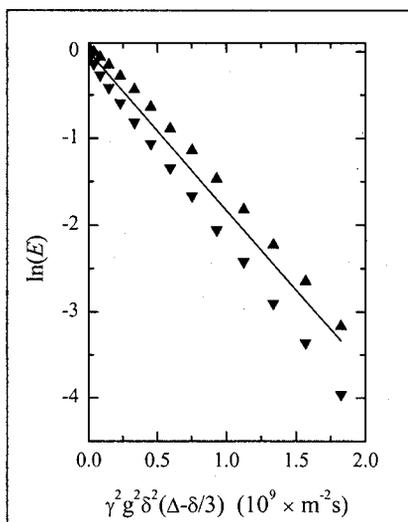
where  $\eta$  and  $Q$  are the filling and quality factors of the coil. The constant  $\kappa$  is defined by

$$\kappa = \frac{1}{2} \mu_0 \gamma M_z^{\text{eq}} = \frac{\mu_0 \gamma^3 \hbar^2 B_0 c_A}{8kT} \chi_{\text{water}} \quad (\text{s}^{-1})$$

where  $\mu_0$  is the permeability of free space,  $M_z^{\text{eq}}$  is the equilibrium magnetization,  $c_A$  is the number of protons (water protons in the present case) per unit volume and  $\chi_{\text{water}}$  is the magnetic susceptibility of water. Thus, the effects of radiation damping are much more serious in larger static fields and higher- $Q$  NMR probes and can cause strong resonances to effectively 'relax' with a time constant of 100 ms (or less) which is of similar order to the length of a PGSE sequence. Radiation damping is effectively inhibited when the net transverse magnetization is zero such as when the magnetization is spatially encoded by a gradient pulse.

## RESULTS AND DISCUSSION

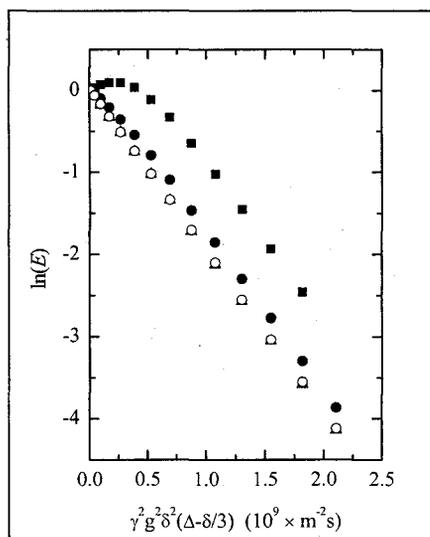
**Background Gradients:** Examples of PGSE measurements for the somewhat exaggerated case of a susceptibility matched NMR tube with the plunger removed to accentuate the formation of background gradients are shown in Figure 3. For this sample configuration the polarity-dependence of the measured diffusion coefficients was 43%. However, with the plunger in place (i.e., usual configuration) the agreement between the diffusion coefficients obtained using gradients of positive or negative polarity was much closer and was in fact superior to that observed for a standard NMR tube.



**Figure 3.** PGSE NMR attenuation plot for the residual water in 50  $\mu\text{l}$  of  $^2\text{H}_2\text{O}$  in a susceptibility matched NMR tube but without the plunger acquired using positive gradient polarity ( $\blacktriangle$ ) and negative gradient polarity ( $\blacktriangledown$ ). The data was acquired at 300 MHz using sequence D with  $\tau = \Delta = 25$  ms and  $\delta = 2$  ms (rectangular shaped). Regression of [2] onto the average of the normalized positive and negative polarity data (solid line) gives a diffusion coefficient of  $1.831 \pm 0.01 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Only the low gradient value data is shown to allow the background gradient-induced curvature to be clearly seen.

Apart from minimizing background gradients by using susceptibility matched NMR tubes, bipolar PGSE sequences<sup>6</sup> can be used to efficiently circumvent their effects. However, the underlying assumption is that a diffusing molecule experiences a constant background gradient throughout the sequence, and thus, can fail especially with large  $\Delta$  values. If bipolar pulses are unavailable and assuming that the background gradients are small and that the exchange between volume elements is slow, a partial solution is to average the normalized PGSE attenuation data from two identical experiments but performed with opposite gradient polarity.

**Radiation Damping:** Diffusion measurements on a 'strong' water sample were performed using some of the sequences in Fig. 1 and the results are shown in Fig. 4.



**Figure 4.** Plots of the PGSE attenuation curves for the water resonance of a sample consisting of 5  $\mu\text{L}$  ethanol, 20  $\mu\text{L}$   $^2\text{H}_2\text{O}$  and 175  $\mu\text{L}$   $^1\text{H}_2\text{O}$  in a 5 mm susceptibility matched tube using the sequences (B ▲, D ■, E ●, and F ○) given in Figure 1 acquired at 300 MHz. The data is normalized to the first positive value of  $g$  ( $= 0.037 \text{ T m}^{-1}$ ) in each case. Note the rise and fall of the attenuation curve for sequence D due to the competition between radiation damping and diffusive attenuation. In the measurements  $\tau = \Delta = 70 \text{ ms}$  (except in sequence B where  $\tau = 36.2 \text{ ms}$ , the minimum value of  $\tau$  possible) and  $\delta = 2 \text{ ms}$  (sine shaped). Sine shaped gradient pulses were used to ensure that sequence B was unaffected by eddy current effects.

Thus, to avoid artefacts arising from radiation damping, it is necessary to place the gradient pulses so that the spin-magnetization is spatially encoded for as much of the sequence as possible.

## REFERENCES

- (1) Price, W. S. *Concepts Magn. Reson.* **1998**, *10*, 197-237.
- (2) Hedin, N.; Furó, I. *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 126-130.
- (3) Price, W. S.; Hayamizu, K.; Ide, H.; Arata, Y. *J. Magn. Reson.* **1999**, *139*, 205-212.
- (4) Price, W. S.; Stilbs, P.; Jönsson, B.; Söderman, O. *J. Magn. Reson.* **2001**, *150*, 49-56.
- (5) Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 288-292.
- (6) Cotts, R. M.; Hoch, M. J. R.; Sun, T.; Markert, J. T. *J. Magn. Reson.* **1989**, *83*, 252-266.

**in situ** バルク体積磁化率で補正して得られる、水溶液中の水  
のケミカルシフトの濃度および温度依存性

(福井大・機セ) ○水野和子、越智虎之、今藤真吾、田宮由香

Concentration and Temperature Dependence of the Chemical Shift of Water Protons in Aqueous Solutions Corrected in Terms of *in situ* Bulk Volume Magnetic Susceptibilities.

(Fukui University, Center for Instrumental Analysis) ○ Kazuko Mizuno, Torayuki Ochi, Shingo Imafuji, and Yuka Tamiya.

Concentration and temperature dependence of  $^1\text{H}$  chemical shifts in NMR of binary aqueous mixtures of organic solutes were studied.  $^1\text{H}$  chemical shifts were measured by the external double reference method using a capillary with a blown-out sphere at the bottom, in which liquid tetramethylsilane, as an external reference substance, was sealed. By the method, it is possible to determine difference in the volume magnetic susceptibilities between a sample and the reference solutions, and thus to correct the observed chemical shifts in terms of *in situ* bulk magnetic susceptibilities. Changes in the chemical shift of the reference peak due to temperature changes were also taken into consideration of the correction to obtain chemical shifts measured on a unified scale over all the data to be compared strictly with each other.

はじめに、溶媒が異なったり、濃度が異なる2つ以上の試料のケミカルシフトを比較したり温度依存性を調べたい時には、通常の方法である内部基準法をさけて、基準物質の物理的状态が一定に保たれる外部基準法で測定したいと思う。しかし、外部基準法には、バルクの磁化率の補正というやっかいな問題が避けられない。本研究では、このやっかいさの中味とこれを解決するためのひとつの方法、さらにこの方法を利用して有機化合物の水溶液の溶液構造をしらべた結果を報告する。

**外部複基準法.** ケミカルシフトはプローブ核の核外電子による外部磁場の遮蔽効果に関係づけられる。溶液中の溶質分子のプローブ核は、プローブ核外電子による、いわば分子内の効果による外部磁場の遮蔽の他に、バルクと呼ばれる溶媒による遮蔽をうける。溶質と基準物質のバルクが同じである内部基準法ではこのバルクの遮蔽効果は問題にならないが、外部基準法では試料溶液と基準物質溶液でこの効果が異なる。基準物質を封入した細管を試料管の中央に入れる方法では、

$$\delta_{\text{cor}} = \delta_{\text{obs}} - 4\pi(\chi_s - \chi_r) \times 10^6/3 \quad (1),$$

ここで、 $\delta_{\text{obs}}$  は細管中の基準物質のピークを0ppmとして観測したケミカルシフト、 $\chi_s$  と

外部複基準法・ケミカルシフトの温度依存性・バルクの磁化率補正

みずのかずこ・おちとらゆき・いまふじしんご・たみやゆか

$\chi_s$  はそれぞれ試料と基準物質溶液の体積磁化率、 $\delta_{\text{cor}}$  はバルクの体積磁化率で補正したケミカルシフトである<sup>1</sup>。

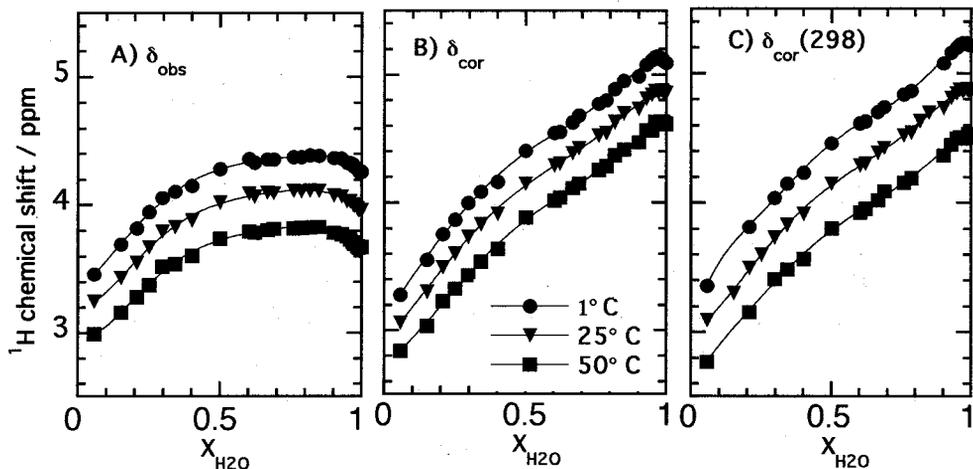
先端を球状にした内管に溶液を封入して試料の NMR を測定すると、試料の他に内管の球とシリンダー部分にある溶液に帰属する 2 本のシグナルが観測される。Mulay and Haverbusch は、それらのケミカルシフトの差を  $\Delta\delta$  とすると、

$$\Delta\delta = k(\chi_s - \chi_r) \times 10^6 \quad (2)$$

で表されることを示した<sup>2</sup>  $k$  は球の部分の形状因子で、すでに  $\chi_s$  が得られている試料液体について  $\Delta\delta$  を測定して得られる検量線の傾きとして求められる。Momoki and Fukazawa はこの球つき内管に基準物質としての液体 TMS を封入して、シリンダー部分の TMS のピークを 0 ppm として  $\delta_{\text{obs}}$  と  $\Delta\delta$  を測定し、(2) の  $(\chi_s - \chi_r)$  を (1) に代入して得られる次式にしたがってケミカルシフトを求めた (Bulbed Capillary Method)<sup>3</sup>。

$$\delta_{\text{cor}} = \delta_{\text{obs}} - 4\pi\Delta\delta/3k \quad (3)$$

我々はこの方法に加えて、温度変化によって生じる基純物質のピークのずれを考慮することで、複数のケミカルシフトデータがある基準温度  $T_r$  (本研究では 25°C) の液体 TMS を 0 ppm として、統一したスケール上であらかし厳密に比較する方法、External Double Reference Method (外部複基準法)、を提出してきた<sup>4-6</sup>。ここでは補正後の  $\delta_{\text{cor}}$  を  $\delta_{\text{cor}}(T_r)$  で表す。温度効果の補正については P90 の要旨で述べてあるので省略する。ここでは [アセトン/水] の 2 成分系の水プロトンのケミカルシフトの、(A)  $\delta_{\text{obs}}$ 、(B)  $\delta_{\text{cor}}$ 、(C) 温度変化の効果 considering 補正した  $\delta_{\text{cor}}(298)$  を図に示す。補正の重要なことが明らかであり、特に、水の濃度が高くなるのにつれてケミカルシフトの温度による違いが大きくなることわかる。



## References

1. Becker, E.D. *High Resolution NMR, Theory and Chemical Applications*, 2<sup>nd</sup>, ed.; Academic Press, New York, 1980, 38-39 50-51.
2. Mulay, L.N. & Harverbusch, M. *Rev. Sci. Instrum.*, 1964, **35**, 756.
3. Momoki, K.; Fukazawa, Y., *Anal. Chem.* 1990, **62**, 1665.
4. Mizuno, K.; Ochi, T.; Shindo, Y., *J. Chem. Phys.* 1998, **109**, 9502.
5. Mizuno, K.; et al. *J. Mol. Liq.*, 2000, **5**, 139.
6. Mizuno, K.; et al., *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 11001.

残余双極子結合測定のための  
新しい配向メディアの開発研究  
(都立大院・理<sup>1</sup> 東大院・農<sup>2</sup>)

○小神 将<sup>1</sup>、荒木 潤<sup>2</sup>、野村 薫<sup>1</sup>、空閑 重則<sup>2</sup>、甲斐荘 正恒<sup>1</sup>

**New Magnetic Orientation Media  
for the Measurement of Residual Dipolar Couplings**

*JST-CREST & Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University<sup>1</sup>*

*Graduate School of Agriculture and Life Science, The University of Tokyo<sup>2</sup>*

Masaru Kogami<sup>1</sup>, Jun Araki<sup>2</sup>, Kaoru Nomura<sup>1</sup>, Shigenori Kuga<sup>2</sup> and Masatsune Kainosho<sup>1</sup>

**Abstract:**

Liquid crystals composed of a microcrystalline suspension of cellulose and chitin provide suitable orientation media for measuring residual dipolar couplings in biological macromolecules. Importantly and in contradistinction to lipid bicelles and filamentous phages, these media can be used over a wide temperature range and can orient solutes perpendicular to the applied magnetic field. In contrast to previous reports, in which the cellulose and chitin liquid crystals were stabilized by electrostatic repulsion, we have succeeded in stabilizing them through steric repulsion introduced by poly-ethyleneglycol (PEG) grafting. As a consequence, these new media have improved salt tolerance compared to previous polysaccharide-type liquid crystals.

**【はじめに】**

NMR法による溶液立体構造決定において、残余双極子結合定数を構造情報として用いる手法は既に数多く報告されており、それらの測定に用いる様々な配向メディアが開発されてきた。最も一般的に利用されている脂質バイセルや繊維状ファージの配向軸は磁場に対してほぼ平行であるが、セルロースやキチンは磁場に対して垂直に配向することが知られている。しかしながら、従来報告されているセルロースやキチンの液晶は、電荷反発により液晶を形成しているため、電解質の添加に対して非常に敏感であり実用性に乏しかった[1-2]。本研究においては、ポリエチレングリコール(PEG)を用いて立体的に安定化させた液晶の調製 [3-4, Fig.1a]、及びそれらを用いる電解質添加効果やタンパク質を試料とするNMR測定時の条件検討に関して報告する。

残余双極子結合、立体安定化液晶、キチン微結晶、核四極子相互作用、磁場配向

こがみ まさる、あらかき じゅん、のむら かおる、くが しげのり、  
かいのしょう まさつね

## 【実験】

粉末セルロースを塩酸加水分解、部分的酸化処理、PEG-NH<sub>2</sub>の付加、遠心、透析、濃縮超音波処理をすることにより、セルロース立体安定化液晶を調製した[Fig.1b]。また、粉末キチンを塩酸加水分解し、PEG-CHO を付加させ、遠心、透析、濃縮、超音波処理をすることにより、キチン立体安定化液晶を調製した[Fig.1c]。このようにして調製した液晶に重水、及び重水緩衝液を加えて測定用試料とし、Bruker DMX 500 (500 MHz)を用いて磁場配向実験を行った。

## 【結果】

調製した試料中の <sup>2</sup>H スペクトルを観測したところ、緩衝液を添加していないときは調製したすべての試料で核四極子相互作用による <sup>2</sup>H スペクトルの分裂が確認された[Fig.2a]。また、Chitin-PEG2000 液晶に緩衝液を添加しても、同様な <sup>2</sup>H スペクトルの分裂が得られた[Fig.2b]。さらに、この緩衝液を添加した試料を温度変化させ、同様の実験を行ったところ、Chitin-PEG2000 液晶で配向が確認された。

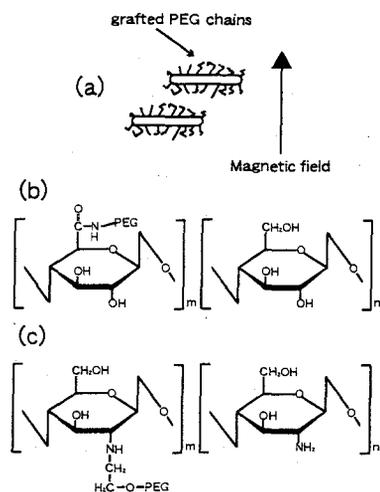


Fig.1 Molecular Model:

- (a) The possible morphology of microcrystals with the presence of PEG chains,  
 (b) PEG grafted cellulose microcrystals,  
 (c) PEG grafted chitin microcrystals.

## 【参考文献】

1. Fleming, K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5224-5225 (2000).
2. Revol, J-F. *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **18**, 177-187 (1996).
3. Araki, J. *et al.*, *Langmuir*, **17**, 21-27 (2001).
4. Posso, A. D. *et al.*, *Carbohydrate Polymers*, **42**, 201-206 (2000).

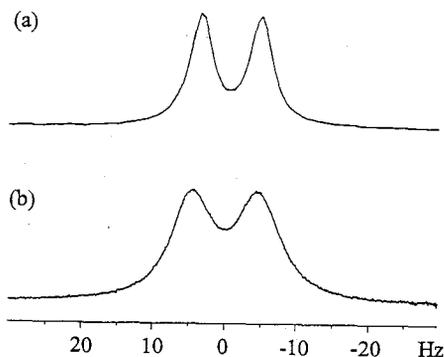


Fig.2 <sup>2</sup>H spectra of 8% w/w chitin-PEG2000 liquid crystallite in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O at 298K.  
 (b) Included 20mM sodium phosphate buffer.

## ポリマー材を用いた高圧NMRセルの開発と応用

(産業技術総合研究所・超臨界流体研究センター<sup>1</sup>, 東北大院理<sup>2</sup>, 日機装・開発センター<sup>3</sup>)○金久保光央<sup>1</sup>, 梅木辰也<sup>2</sup>, 相澤崇史<sup>1</sup>, 増田善雄<sup>1</sup>, 生島豊<sup>1</sup>, 畑田清隆<sup>1</sup>, 斎藤功夫<sup>1</sup>, 吉村純子<sup>3</sup>, 山崎博実<sup>3</sup>, 八名純三<sup>3</sup>

## Development of High-Pressure NMR Cell Using Polymer Material

(Supercritical Fluid Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology<sup>1</sup>, Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University<sup>2</sup>, R&D Center, Nikkiso<sup>3</sup>)○M. Kanakubo<sup>1</sup>, T. Umecky<sup>2</sup>, T. Aizawa<sup>1</sup>, Y. Masuda<sup>1</sup>, Y. Ikushima<sup>1</sup>, K. Hatakeda<sup>1</sup>, N. Saito<sup>1</sup>, J. Yoshimura<sup>3</sup>, H. Yamazaki<sup>3</sup>, J. Yana<sup>3</sup>

We have newly developed a double-tube type of high-pressure NMR cell, which has a versatile use for both batchwise and on-line operations. The high-pressure cell made of a strong, easy-machinable, and ideally non-magnetic poly(etherether ketone) withstands temperatures and pressures, at least, up to 100 °C and 35 MPa, respectively. The flow rate dependence of <sup>1</sup>H longitudinal relaxation time of 1 w/w-% chloroform in carbon tetrachloride was measured at 26.9 °C.

【はじめに】近年、水や二酸化炭素をはじめとした超臨界流体は環境調和型プロセスの媒体として注目を集めている。超臨界流体などの試料を高圧条件下で NMR 測定する場合に、磁石外部で試料の調製や反応を行い、オンラインで観測領域に運び込むことは、操作上非常に簡便で有用である。また、HPLC や MS などの分析装置とオンラインで接続された NMR は複合分析システムとして多くの利点を有する。そのような観点から、我々は市販されている通常のプローブで使用可能な流通式高圧セルの開発を試みた。

【高圧 NMR セル】高圧 NMR セルの模式図を Fig. 1 に示す。セルは二重管構造を有し、内管 ( $f_1$ )、外管 ( $g$ )、およびヘッドキャップ ( $c$ ) の主要 3 点からなる。流体試料は、ヘッドキャップに接続したチューブから内管内部を通り、試料管末端部に到達後折り返し、鼓状に切られた観測領域に供給される。観測領域の試料体積は内管の形状により簡単に変更することが可能である。Fig. 1 に示した内管では、鼓状に切られた体積は約 0.3 cm<sup>3</sup> であり、内管内部を通過する試料体積に比べ約 30 倍と十分に大きい構造となっている。また、本高圧セルは、内管の選択 ( $f_2$  使用) により、バッチ式としての利用も可能であり、その際、内管はセル内の流体試料の温度むらを防ぐスパーサーとしても機能する。

キーワード：高圧, NMR セル, 超臨界流体

かなくぼ みつひろ, うめき たつや, あいざわ たかふみ, ますだ よしお, いくしま ゆたか, はたけだ きよたか, さいとう のりお, よしむら じゅんこ, やまざき ひろみ, やな じゅんぞう

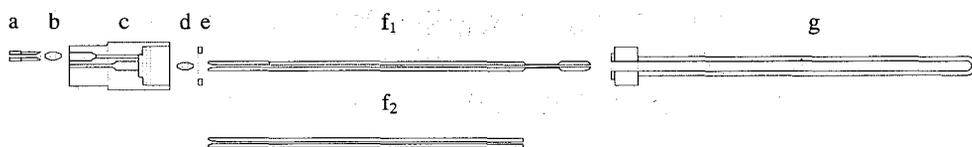


Fig. 1. Exploded view of high-pressure NMR cell.

a : Screw, b, d : Joint, c : Head cap, e : O-ring,  $f_1$  : Inner tube (flow),  
 $f_2$  : Inner tube (batch) g : Outer tube

本高圧セルは、耐圧強度、加工性、ならびに磁気特性が良好なポリエーテルエーテルケトン (PEEK) を材料として用いており、約 100 °C、35 MPa 程度の耐久性を有する。また、セルの構造は検出部中心をもって対称的であり、500 MHz の分光器 (Varian, Inova 500) を用いた  $^1\text{H}$  の共鳴信号の実験では、半値幅が約 0.007 ppm 以下と高い分解能が得られている。

【結果と考察】 開発した高圧セルが流通式として良好に稼動するが縦緩和時間の流速依存性を測定し検討した。一例として、26.9 °C における 1 w/w-%クロロホルム-四塩化炭素溶液 (未脱気) の  $^1\text{H}$  の縦緩和時間 ( $T_1^{\text{obs}}$ ) の結果を Fig. 2 に示す。図から分かる通り、 $1/T_1^{\text{obs}}$  は体積流速 ( $v$ ) が約  $5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  までは直線的に増加 (破線) し、その後直線からはずれていくことが確認された。

ある一定流速で流れている試料の縦緩和時間 ( $T_1^{\text{obs}}$ ) は、観測領域における滞在時間 ( $\tau$ ) と (1) 式のように関係付けられる。ここで、 $T_1^{\text{static}}$  は試料が静置している場合の縦緩和時間である。また、滞在時間 ( $\tau$ ) は試料体積 ( $V$ ) と体積流速 ( $v$ ) とを用いて表せば、 $\tau = V/v$  となる。よって、 $1/T_1^{\text{obs}}$  を  $v$  に対してプロットすれば、傾き  $1/V$ 、切片  $1/T_1^{\text{static}}$  の直線が得られるはずである。

$$\frac{1}{T_1^{\text{obs}}} = \frac{1}{T_1^{\text{static}}} + \frac{1}{\tau} = \frac{1}{T_1^{\text{static}}} + \frac{v}{V} \quad (1)$$

Fig. 2 の破線の傾きから求めた試料体積は  $0.26 \text{ cm}^3$  であり、幾何学的なコイルの長さから計算した体積  $0.29 \text{ cm}^3$  とほぼ一致した。すなわち、本高圧セルでは、四塩化炭素のように比較的粘性率が高い流体を試料とした場合にも、体積流速が  $5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  程度までは試料が円滑に流通しているものと考えられる。

発表当日は、超臨界流体などの粘性率が低い試料の結果もあわせて報告する。

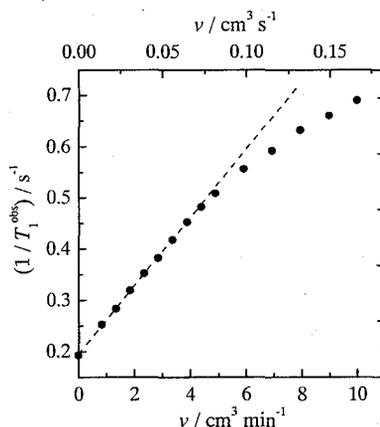


Fig. 2. Flow rate dependence of  $^1\text{H}$  longitudinal relaxation time ( $T_1^{\text{obs}}$ ) of chloroform in carbon tetrachloride at 26.9 °C.

<sup>1</sup>H と <sup>13</sup>C NMR の外部複基準法によるケミカルシフトの  
温度依存性：メタノールの場合

(福井大・機セ) ○泉 康彦、田宮由香、水野和子

Temperature Dependence of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Chemical Shifts of Methanol Measured by the External Double Reference Method.

(Fukui University, Center for Instrumental Analysis) ○Yasuhiko Izumi, Yuka, Tamiya, and Kazuko Mizuno

Temperature dependences of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts of methanol were studied. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts were measured by the external double reference method using a capillary with a blown-out sphere at the bottom, in which liquid hexamethyldisiloxane, as an external reference substance, was sealed. By the method, it is possible to correct observed chemical shifts in terms of in situ bulk magnetic susceptibilities. Changes in the chemical shift of the reference peak due to temperature changes were also taken into consideration of the correction to express chemical shifts on a unified scale over all the data and to compare them strictly with each other.

[はじめに]

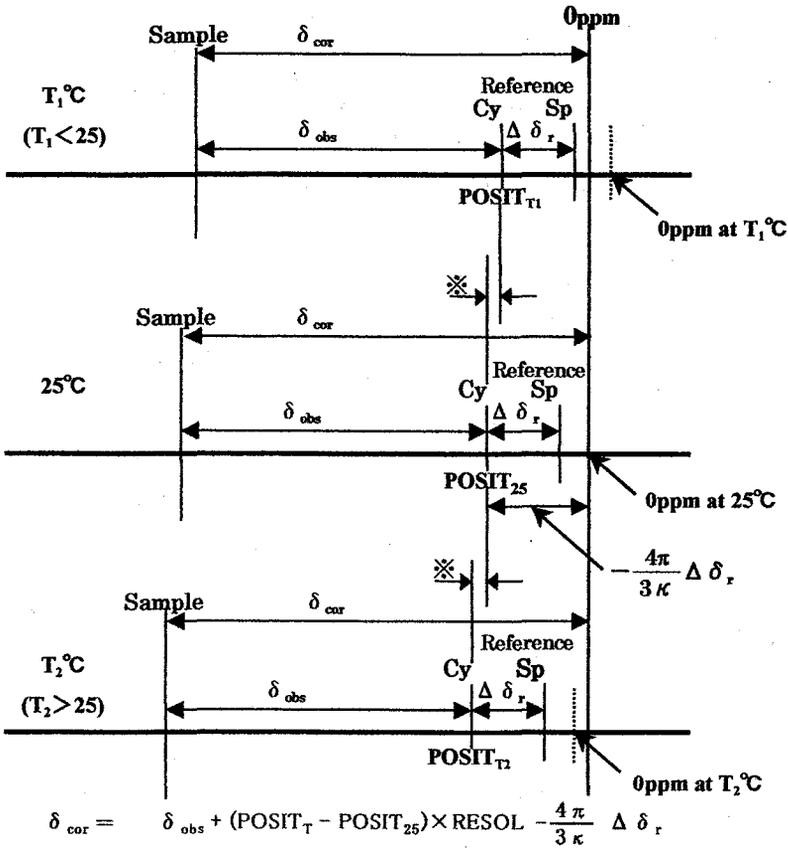
P87に述べてある外部複基準法は、溶媒・組成・温度のどれも異なる溶液のケミカルシフトを比較できる非常に有用な測定方法である。本稿では、温度変化によって生じる基準物質のピークのずれを補正するための、すなわち複数の測定温度に渡って得られたデータを共通のスケール上で表す方法を示す。

[外部複基準法で温度を変えて測定する場合のケミカルシフトの補正]

測定温度を変えるとき、基準物質の物理的状态を一定に保つことはできない。すなわち、一つの試料のケミカルシフトを温度を変えて測定するとき、先端が球状の同じ内管を使っても 0ppm の位置は温度によってずれる。このずれは超伝導磁石の外部磁場の測定時間内の揺らぎをはるかに超える。そこである基準温度でのある基準物質(本研究では、25°Cでの液体ヘキサメチルジシロキサン(HMDO))の共鳴線を 0ppm として、測定したすべての温度でのケミカルシフトを統一したスケールで表した(Fig.1)。25°Cあるいはある温度 T°Cのときの基準物質のシリンダー部に帰属するピークの POSITION(NMR スペクトルをデジタル化したときのサンプリングポイント数)を POSIT<sub>25</sub>あるいは POSIT<sub>T</sub>とおくと、これらの差(POSIT<sub>T</sub>-POSIT<sub>25</sub>)に RESOL(デジタル分解能)を掛けた値(Fig.1の※)が、T°Cのときのケミカルシフトのずれとなる。

外部複基準法、ケミカルシフトの温度依存性、メタノール

○いずみやすひこ、たみやゆか、みずのかずこ



$$\delta_{cor} = \delta_{obs} + (POSIT_T - POSIT_{25}) \times RESOL - \frac{4\pi}{3\kappa} \Delta\delta_r$$

Fig.1 : Shifts of a reference peak due to temperature changes and their correction to express all the data on a unified scale

[実験]

ヘキサメチルジシロキサン(HMDO)を基準物質として、メチルアルコールの<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C-NMRスペクトルをJEOL JMN-EX400分光器により0°Cから60°Cの範囲で測定した。

[結果]

メタノールのOH基の<sup>1</sup>Hのケミカルシフトは、温度上昇に伴い高磁場シフトした(Fig.2)。メタノールのCH<sub>3</sub>基の<sup>1</sup>Hと<sup>13</sup>Cのケミカルシフトは、両方とも温度上昇に伴い僅かに高磁場シフトした。これらの結果を文献値と比較して議論する。

[参考文献]

- 1) W.Schulman, D.W.Dwyer, D.C.Doetschman, *J.Phys.Chem.*,94(18),7308-12,1990

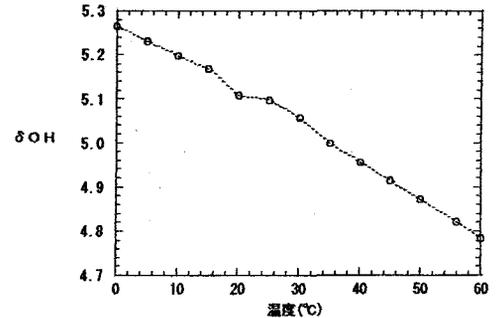


Fig.2: Temperature dependence of chemical shifts of OH proton in methanol

[N3-<sup>15</sup>N]-5位置換トリミジン類を用いたN-H...N水素結合の解析  
(JST-CREST, 都立大院理)

○石川 麗、児嶋 長次郎、小野 晶、甲斐荘 正恒

**NMR studies of substituent effects on the N-H...N hydrogen bond in duplex DNA**

JST-CREST & Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

○Rei Ishikawa, Chojiro Kojima, Akira Ono, and Masatsune Kainosho

The substitution effects on various parameters, which may influence the hydrogen bond strengths of Watson-Crick-type base pairs, were investigated for DNA dodecamers containing 5-substituted-2'-deoxyuridine derivatives. In doing so, a series of [3-<sup>15</sup>N]-2'-deoxyuridine derivatives, including thymidine, 2'-deoxyuridine, 5-bromo-2'-deoxyuridine, 5-fluoro-2'-deoxyuridine, and 5-cyano-2'-deoxyuridine, and [*ul*-<sup>15</sup>N]-2'-deoxyadenosine, were incorporated into the DNA dodecamer, d(CGCGA\*ATX\*CGCG)<sub>2</sub>, where X\* and A\* were a [3-<sup>15</sup>N]-2'-deoxyuridine derivative and [*ul*-<sup>15</sup>N]-2'-deoxyadenosine, respectively. The imino proton chemical shift and the spin coupling constant between the imino proton and nitrogen (<sup>1</sup>J<sub>NH</sub>) were measured for the Watson-Crick-type A\*-X\* base pair of all five duplexes. The substitution with an electron-withdrawing group results in down-field shift of the imino proton and a concomitant decrease in magnitude of the <sup>1</sup>J<sub>NH</sub> value, and a good, linear correlation was found between the two effects. These substitution effects on the NMR parameters were linearly correlated with the pK<sub>a</sub> values of the 2'-deoxyuridine derivatives and also with the theoretically calculated hydrogen bond energy.

はじめに

1998年にRNA(1)、次いでDNA(2)におけるWatson-Crick型塩基対に関して、NH...N水素結合間にスピン結合定数(<sup>2h</sup>J<sub>NN</sub>)が観測された。生体高分子がその立体構造を維持し生物機能を発現する上で水素結合は重要な役割を担っているがその本質的な理解には至っていない。渡水素結合スピン結合が大いに注目される理由の一つには、それらが水素結合に関する直接的な知見を与えるとの期待がある。本研究においては、種々の[N3-<sup>15</sup>N]-5位置換-2'-デオキシウリジン類を導入した二重鎖DNAを用いて、Watson-Crick塩基対の水素結合に及ぼす置換基効果を検討した(3)。

標識DNAオリゴマーの調製

[N3-<sup>15</sup>N]-5位置換デオキシウリジン類は、対応する非標識ヌクレオシドを原料として化学合成した。 [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>] 均一標識 2'-デオキシアデノシンは発酵法により得た [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>] 均一標識アデノシンから誘導した。これらの標識ヌクレオシドは常法に従ってアミダイト体とし、DNA自動合成機によりオリゴマーに導入した。図1に示す5種のdodecamerはNa塩とした後、100 mM NaCl及び0.01% NaN<sub>3</sub>を含む10mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解してNMR測定に用いた。

NMR測定

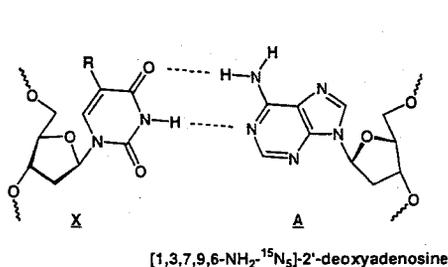
NMRスペクトルはBruker DRX800(800MHz)を用いて測定した。図2に示したように5位置換デオキシウリジン残基のイミノプロトンの化学シフトと<sup>1</sup>J<sub>NH</sub>には良い相関がみられた。

キーワード: 水素結合、水素結合を介したJカップリング定数、DNA、標識DNAの合成、<sup>15</sup>N選択的標識

いしかわ れい、こじま ちょうじろう、おの あきら、かいのしょう まさつね

また、両パラメータはヌクレオシドのイミノプロトンの pKa 値、また理論計算により求められた水素結合のエネルギー値 (4) ととも良い相関が得られた。(図 3, 4)

このような良い相関が得られたということは、5 位置換 dU を導入した DNA オリゴマーが Watson-Crick 型水素結合の置換基効果を研究する上で優れたモデルである事を示している。現在  $^2\text{h}J_{\text{NN}}$  など水素結合に関連した NMR パラメーターとの相関についても研究を進めている。



ODN I R = Me X = [N3-<sup>15</sup>N]-thymidine  
 ODN II R = H X = [N3-<sup>15</sup>N]-2'-deoxyuridine  
 ODN III R = Br X = [N3-<sup>15</sup>N]-5-bromo-2'-deoxyuridine  
 ODN IV R = F X = [N3-<sup>15</sup>N]-5-fluoro-2'-deoxyuridine  
 ODN V R = CN X = [N3-<sup>15</sup>N]-5-cyano-2'-deoxyuridine

Figure 1. Synthesized DNA sequences containing 2'-deoxyuridine derivatives. A Watson-Crick base pair formed by the <sup>15</sup>N enriched residues is shown.

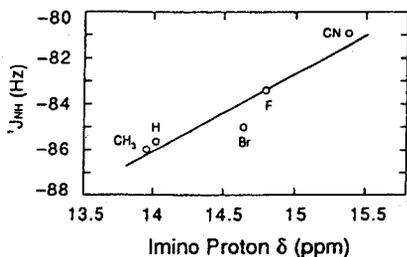


Figure 2. Correlation plot of the imino  $^1J(\text{N},\text{H})$  against the imino proton chemical shift for DNA duplexes containing 2'-deoxyuridine derivatives. The imino  $^1J(\text{N},\text{H})$  and imino proton chemical shift values were obtained in H<sub>2</sub>O at 275 K. The slope, y-intercept and correlation coefficient are  $-133.1 \text{ Hz}$ ,  $3.4 \text{ Hz}(\text{ppm})^{-1}$  and  $0.95$  for  $^1J(\text{N},\text{H})$ .

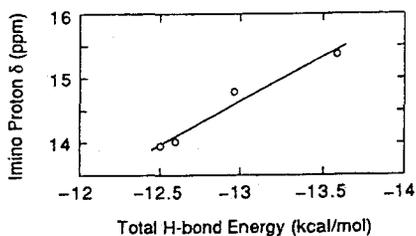


Figure 4. Correlation plots of the imino proton chemical shift of DNA duplexes containing 2'-deoxyuridine derivatives against the calculated total hydrogen bond energy of hydrogen bond formation between 9-methyladenine and 1-methyluracil derivatives. The slope, y-intercept and correlation coefficient are  $2.9 \text{ ppm}$ ,  $-1.4 \text{ ppm mol kcal}^{-1}$  and  $0.98$ .

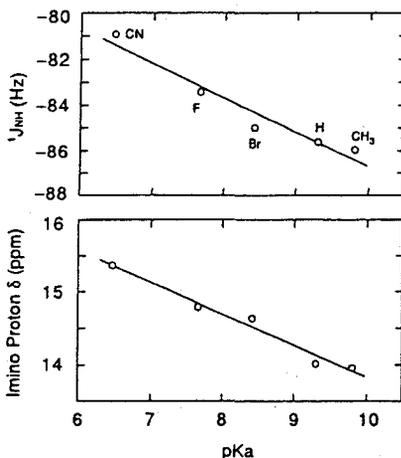


Figure 3. Correlation plots of the imino  $^1J(\text{N},\text{H})$  (top) and imino proton chemical shift values (bottom) of DNA duplexes containing 2'-deoxyuridine derivatives against the pK<sub>a</sub> values of 2'-deoxyuridine derivative nucleosides. The slope, y-intercept and correlation coefficient are  $-71.5 \text{ Hz}$ ,  $-1.5 \text{ Hz pK}_a^{-1}$  and  $0.97$  and  $18.2 \text{ ppm}$ ,  $-0.4 \text{ ppm pK}_a^{-1}$  and  $0.99$  for the imino  $^1J(\text{N},\text{H})$  and imino proton chemical shift, respectively.

#### 参考文献

1. Dangle, A. J. *et al.*, (1998) *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 6625-6626.
2. Pervushin, K. *et al.*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14147-14151.
3. Ishikawa, R. *et al.*, (2001) *Magn. Res. Chem.*, **39**, 000-000.
4. Kawahara, S. *et al.*, (1999) *J. Phys. Chem. A*, **103**, 8516-8523.

<sup>31</sup>P NMR を用いた細胞内代謝化合物の新規測定法  
(味の素(株)・発酵研<sup>1</sup>・中研<sup>2</sup>)

○野口泰志<sup>1</sup>、榛葉信久<sup>2</sup>、鈴木榮一郎<sup>2</sup>、杉本慎一<sup>1</sup>

**Real time NMR measurement system for metabolic status in microbial culture**

<sup>1</sup>Fermentation & Biotechnology Laboratories, <sup>2</sup>Central Research Laboratories,  
Ajinomoto Co., Inc.

Yasushi Noguchi\*<sup>1</sup>, Nobuhisa Shimba<sup>2</sup>, Ei-ichiro Suzuki<sup>2</sup>, & Shinichi Sugimoto<sup>1</sup>

**Abstract:** For formulation of an appropriate microbial culturing condition in the fermentor either for industrial or analytical purpose, precise control of the medium oxygen tension (DOT) is crucial. In a conventional method, DOT is monitored by a sensor equipped in a fermentor and is controlled by changing the gas agitation rate. Here, we report a novel and accurate system minimizing time-lag by an automated aeration flow control device and real time monitoring representative metabolites by NMR spectrometer in real time. Responses of *Escherichia coli* cells under various oxygen tensions were analyzed in this system to validate this system for the study of the microbial metabolism.

【序論】

微生物反応による物質生産プロセスにおいて、溶存酸素濃度に代表される培養環境の設定は重要な課題であり、in vivo <sup>31</sup>P NMR 法は、その最適化に有益な細胞内の代謝情報を与えてくれる。従来は NMR 試験管内に微生物反応溶液を懸濁し、反応の維持に最低限必要な基質を供給するのみで測定を行っていた。しかしながら、長時間におよぶ細胞の比活性の維持が困難であること及び、複雑な反応制御を要する微生物反応の解析には適応できないという大きな装置上の課題があった。そこで NMR 管と独立した外部還流型のバイオリアクターを新規設計し、NMR 管内においても溶存酸素濃度といった培養環境を適切に制御可能な測定システムを確立した。本報告では、方法論及び、具体的な適用例を挙げ、従来法と比較しながら本手法の有効性を示す。

【測定装置構成】

Fig. 1 に、従来法及び、新規に開発した in vivo<sup>31</sup>P NMR 測定装置構成を示す。本装置においては、実際に NMR 測定を行うサンプル管外にバイオリアクターを設置し、両間を定常的に還流することにより測定時の反応環境を適確に行うことが可能である(以下、還流法)。本装置の特徴として、溶存酸素濃度を NMR 管(A)に並列に設置した、DO モニター用のサンプル管内(B)の測定値を基準に通気流量をコントロールすることにより、測定時のサンプル管内の溶存酸素濃度を制御することがである。従って、本装置を用いることによって、従来困難であった溶存酸素濃度に依存した細胞内の代謝反応の変化を検出することが可能となった。

---

in vivo NMR、<sup>31</sup>P NMR、微生物反応

のぐちやすし、しんばのぶひさ、すずきえいいちろう、すぎもとしんいち

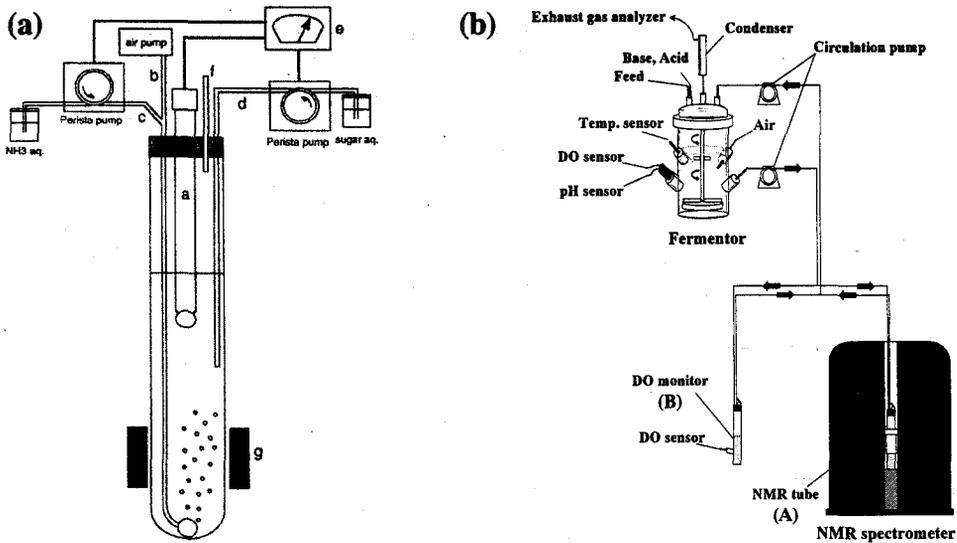


Fig.1. Schematic diagram of the experimental set-up of the mini-fermentor system (a) and the circulation-fermentor system (b) used for *in vivo* NMR.

【結果と考察】

Fig. 2 に、従来法<sup>1</sup>及び、新規開発した還流法を用いて測定した好気培養時の大腸菌の代表的な <sup>31</sup>P NMR スペクトルを示す。尚、各シグナルの帰属は、既に報告されている文献を参考にした<sup>2-3</sup>。従来は培養制御が困難であったため、比活性の高い微生物反応状況下の細胞内代謝化合物のシグナルを検出するのが困難であった。しかし、新法ではこの点が改善されているだけでなく分解能も大幅に向上しており、従来困難であった細胞内外の無機リン酸シグナルも容易に分別可能となった。

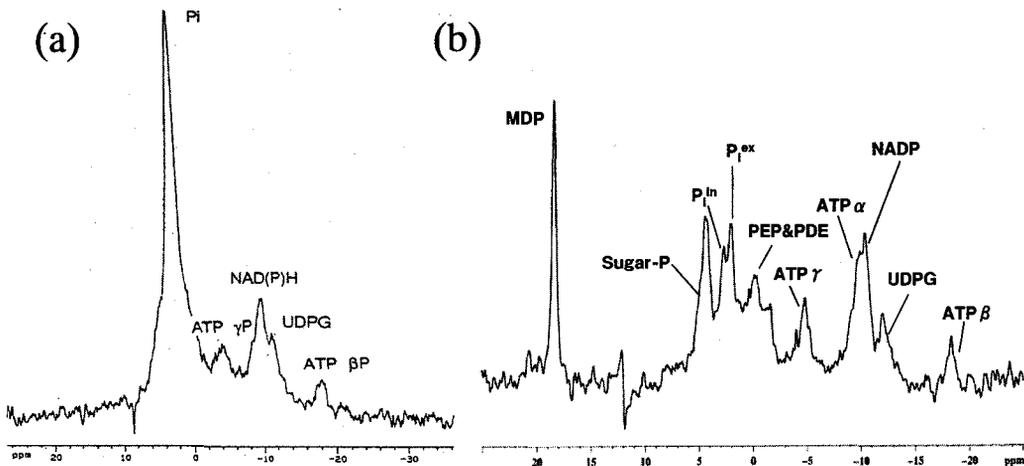


Fig.2. <sup>31</sup>P NMR spectra of aerobically respiring *E.coli* W3110 by the mini-fermentor system (a) and the circulation-fermentor system (b).

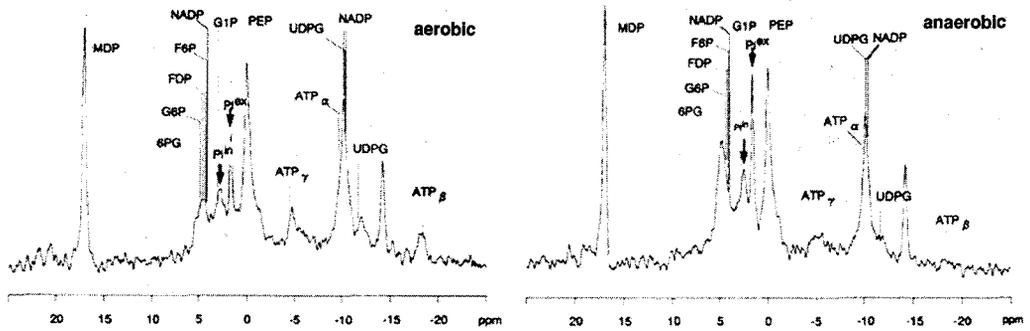


Fig.3.  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of *E. coli* W3110 under aerobic and anaerobic conditions.

還流法の応用例として、Fig.3.に好気条件下における大腸菌培養液の NMR サンプル管内の溶存酸素濃度 (DO) を微好気条件 (0.5%以下) に意図的に制御した前後の、スペクトルを示す。両者を比較すると、シフト後において、細胞内 ATP シグナルが消失する一方で、glucose-6-phosphate、fructose-6-phosphate といったの解糖系の中間代謝化合物シグナル強度の顕著な増加が観察された。同様に、Fig.4 には大腸菌増殖時の細胞内 ATP、ADP、糖リン酸、ホスホジエステル及び、UDP グルコース濃度の推移を示す。本実験によって、増殖から定常期のような実培養系での細胞内代謝化合物濃度のドラスティックな変化を解析できることが可能であることが分かった。

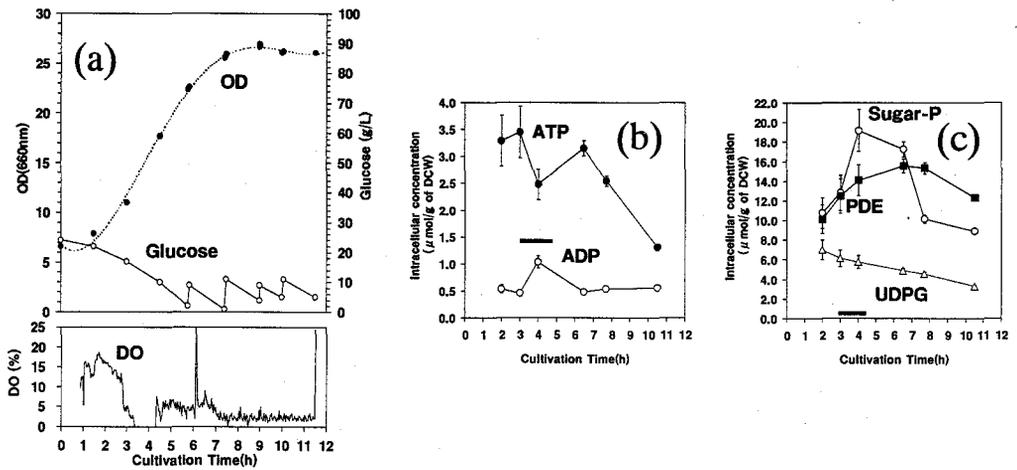


Fig.4. Culture and intracellular metabolite changes of aerobically respiring *E. coli* W3110.

#### 【まとめ】

本研究では、NMR 管と独立した外部還流型のバイオリアクターを新規に設計し、NMR 管内においても溶存酸素濃度といった培養環境を適切に制御可能な測定システムを確立した。また、増殖期における大腸菌の解

析結果から、本装置を用いることで、これまで困難であった長時間且つ複雑な反応制御を要するような反応プロセスの解析が容易に行えることが分かった。今後は、種々の微生物反応プロセスの最適化に本手法を活用していきたい。

【参考文献】

- 1) Takesada, H., Ebisawa, K., Toyosaki, H., Suzuki, EI., Kawahara, Y., Kojima, H., Tanaka, T., 2000. A convenient NMR method for in situ observation of aerobically cultured cells. *J Biotechnol.* 84(3), 231-6.
- 2) Castro, C. D., Koretsky, A.P. and Domach, M.M., 1999. Performance trade-offs in in situ chemostat NMR. *Biotechnol. Bioeng.* 15, 185-195.
- 3) de Graaf, A. A, Striegel, K., Wittig, R. M., Laufer, B., Schmitz, G., Wiechert, W., Sprenger, G. A. and Sahn, H., 1999 Metabolic state of *Zymomonas mobilis* in glucose-, fructose-, and xylose-fed continuous cultures as analysed by <sup>13</sup>C- and <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy. *Arch Microbiol.* 6, 371-385.

## ペプチドを安定同位体標識する方法の改良

(三菱化学生命研<sup>1</sup>、群大工<sup>2</sup>)○河野俊之<sup>1</sup>、林 和彦<sup>2</sup>、須貝真理子<sup>1</sup>、若松 馨<sup>2</sup>**An improved method to produce isotope-enriched peptides for heteronuclear NMR experiments**<sup>1</sup> Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, <sup>2</sup> Faculty of Engineering, Gunma University○ Toshiyuki Kohno,<sup>1</sup> Kazuhiko Hayashi,<sup>2</sup> Mariko Sugai<sup>1</sup> and Kaori Wakamatsu<sup>2</sup>

Transferred nuclear Overhauser effect (TRNOE) has been used to determine the conformation of a short peptide bound to a large protein. This method, however, possesses an inherent drawback: proton resonances of free peptide molecules through which the conformation of bound molecules is monitored, are often not well separated to allow unambiguous assignments of NOE cross peaks because linear short peptides do not usually adopt ordered conformations. Such a drawback can be solved by using peptides enriched with stable isotopes. Therefore, we introduced an ubiquitin-fusion system to express peptides in *E. coli*.

However, enhancement of the expression of the fusion protein should be welcome because the compounds used in stable-isotope enrichment are very expensive. A potential problem in the system above is that the employed ubiquitin gene is derived from *S. cerevisiae* and that *E. coli* and *S. cerevisiae* favor different subsets of codons. In this study, we have calculated the CAI (Codon Adaptation Index) for the yeast ubiquitin gene, then designed a new ubiquitin gene for which CAI may reach the maximal value. The effect of such designed gene on the yield of mastoparan-X will be discussed as an example.

分子量の大きな蛋白質に結合したペプチドの立体構造を決定するためには、transferred NOE (TRNOE) 法が有効である。TRNOE法は、小さな分子が大きな分子と結合・解離を繰り返しているとき、小さな分子が大きな分子に結合した時のNOEの情報を解離したときのNMRシグナルとして観測できるという大きなメリットを持っている。しかし、この方法を用いると観測されるシグナルの分離が悪いという問題が生じることがある。我々は、ペプチドを安定同位体標識し、多次元NMRで

キーワード: TRNOE, Multinuclear NMR, ubiquitin, codon usage, mastoparan-X

○こうのとしゆき, はやしかずひこ, すがいまりこ, わかまつかおり

TRNOEを観測すれば、この問題を克服できると考え、ペプチドをユビキチンとの融合蛋白質として大腸菌で安定かつ大量に発現させ、精製後にYUH1 (yeast ubiquitin hydrolase 1) というプロテアーゼを用いてペプチドを切り出す系を開発してきた。そして、G蛋白質を直接活性化できる14残基のアミノ酸からなるマストパランXを例にして、安定同位体標識を行った試料を調製し、多核多次元 TRNOE解析を行うことによって、マストパランX がG蛋白質に結合したときの TRNOE クロスピークの分離が向上し精度の高い立体構造を決定できることを示してきた。ユビキチン融合蛋白質として発現させることで、多次元NMR測定に十分な量のマストパランXを得ることができたが、炭素・窒素の二重標識を行うためには培地のコストがかかることから、さらに発現量を向上させることを目的として、ユビキチン遺伝子の改変を行った。

これまで我々が用いてきたユビキチンの遺伝子は酵母由来のものであり、大腸菌で発現させるためには最適なコドン使用とは言えない。そこで、酵母のユビキチンのアミノ酸配列は変えずに、コドンだけをすべて大腸菌に好ましいものに変えた遺伝子を人工設計し、DNAを完全合成することにより、コドン最適化ユビキチン融合蛋白質の発現系を構築した。この発現系を用い、マストパランXとの融合蛋白質の系で、コドン最適化の蛋白質の発現量への効果を検証したところ、オリジナルの酵母由来のユビキチン遺伝子を用いた融合蛋白質場合と比較して、融合蛋白質の発現量が2倍程度に向上したことがわかった。

このコドン最適化ユビキチン融合蛋白質の発現系を用いることにより、さまざまなペプチドの安定同位体標識が可能になり、TRNOE法や膜結合ペプチドへの適用などさまざまな応用が考えられる。

## メチル化DNA結合ドメイン-DNA複合体の立体構造と分子認識機構

○大木出<sup>12</sup>、下竹敦哉<sup>2</sup>、藤田直之<sup>3</sup>、Jee Jun-Goo<sup>2</sup>、池上貴久<sup>2</sup>、中尾光善<sup>3</sup>、  
白川昌宏<sup>12</sup> (<sup>1</sup>横浜市大・院総合理学、<sup>2</sup>奈良先端大・バイオ、  
<sup>3</sup>熊本大・医)

## Structure of the methyl-CpG binding domain in complex with methylated DNA

Oizuru Ohki<sup>12</sup>, Nobuya Shimotake<sup>2</sup>, Naoyuki Fujita<sup>3</sup>, Jun-Goo Jee<sup>2</sup>, Takahisa Ikegami<sup>2</sup>, Mitsuyoshi Nakao<sup>3</sup> and Masahiro Shirakawa<sup>12</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Integ. Sci., Yokohama City Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech., <sup>3</sup>Sch. Med., Kumamoto Univ.)

## Abstract

The solution structure of the methyl-CpG-binding domains (MBDs) of a mammalian methylation-dependent transcriptional repressor MBD1 in complex with methylated DNA was determined by means of multi-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. The structures of the MBD consist of a four-stranded  $\beta$ -sheet and an  $\alpha$ -helix packed approximately parallel to the  $\beta$ -sheet. Contacts to the methylated DNA are made at the face of the  $\beta$ -sheet, which is positioned within the major groove. DNA binding induces the folding of a long loop that contributes a major DNA interface, establishing a novel mode of DNA binding. The methyl groups at the methylation site are recognized through extensive hydrophobic contacts with aliphatic and aromatic portions of arginine, tyrosine, valine, and serine residues that are highly conserved among the MBD family. Discrimination of the CG sequence is due to the same arginine and tyrosine residues.

## 「はじめに」

脊椎動物のゲノムにおいて、CpG配列のメチル化は長期的な転写抑制、クロマチン構造の変化に重要な役割を果たしており、ゲノムインプリンティング等のエピジェネティックな現象、さらには多くの病気とも関わっている。このDNAのメチル化はメチル化CpGに特異的に結合するメチル化CpG結合ドメイン(MBD)を持つタンパク質群によって認識され機能している。本研究はこれらのタンパク質のうちの一つ、ヒト転写抑制タンパク質MBD1のMBDとメチル化DNA複合体の立体構造を溶液多次元NMR法を用いて決定したので報告する。

## 「方法」

MBD-DNA複合体の解析には、<sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C安定同位体ラベルした77残基のMBDと、化学合成した中央にメチル化DNA部位を含む12塩基対のDNA((5'-GTATmCGGATAC-3')<sub>2</sub>, mC:5メチルシトシン)を1:1で結合させたものを用いたNMR測定には1mM程度の試料を20mMのリン酸バッファー(pH6.5)に溶かしたのを用い、Bruker DRX800及びDRX500を用いて303Kで測定を行った。距離情報は主に、MBD分子内は4次元NOESY実験、DNA内及び分子間情報は同位体フィルターNOESY実験より得た。構造計算は、まずMBDは分子内情報のみで前もって構造を計算しておき、そこにMBDと50Å離してランダムに配向させたB型DNAを配置させた。次にNMR測定より得られた、分子間情報、角度情報を含む全ての構造情報のみ用いて計算して分子をドッキングさせ、エネルギーが安定したところで再度シミュレートドアニメーション計算を行った。

キーワード: メチル化DNA結合ドメイン、メチル化DNA、溶液多次元NMR法、蛋白質-核酸複合体、MBD1

おおいずる, しもたけのぶや, ふじたなおゆき, じーじゅんぐう, いけがみたかひさ, ふじたなおゆき,  
なかおみつよし, しらかわまさひろ

「結果および考察」

NMR測定より得られた2,022個の構造情報(91個の分子間NOE情報を含む)をもとに構造計算を行った。計算の収束度を示すRMSDの値は、計算より得られた20個の構造でタンパクおよびDNA全重原子で0.82 Åと非常に良い収束を示した(Fig.1左)。

MBD1のMBDは、βシートを介してDNAの広い溝側からメチル化CpG配列に結合し、さらにループの一つ(Fig.1右ではLoop L2)がDNAのリン酸骨格に巻きつくように構造変化を起こしていた。このループはMBD単独の状態ではヘテロNOEの値が小さくフレキシブルであるが、DNAとの結合によりしっかりした構造が誘導され、DNAのリン酸骨格を認識するようになる。この領域はMBDファミリーでアミノ酸配列が保存されており、またMeCP2タンパク質のMBDでも同じ現象が見られることからMBDに共通の特徴であると考えられる。

MBDの塩基配列特異的な相互作用はメチル化CpG部位の2塩基対のみでしか見られなかった。メチル化CpG部位のメチル基は、よく保存された2つのアルギニン、セリン、バリン、チロシンの5残基から形成された疎水性のポケットにより認識されていた。またCpG配列は同じアルギニン残基により静電的に認識されていた。これらの残基は互いに強く疎水的、静電的に相互作用しあって結合面をコンパクトで強固なものにしており、そのため限られた塩基配列としかコンタクトしないような立体配置になっていた。

MBDは他のβシートでDNAと結合するTn916インテグラーゼやAtERFのDNA結合ドメインと比較して、シートが結合する角度がきつくなってDNA塩基との結合面が小さくなっており、この結合面のコンパクトさがMBDの一つの特徴でもあるヌクレオソームDNAへの結合を可能にしているものと考えられる(Fig.2)。現在、MBDについてDNA結合の有無による運動性の変化を、<sup>15</sup>N核緩和時間やProtectionFactorの値を用いて解析しており、討論会ではDNA認識とダイナミクスの関係についても議論する。

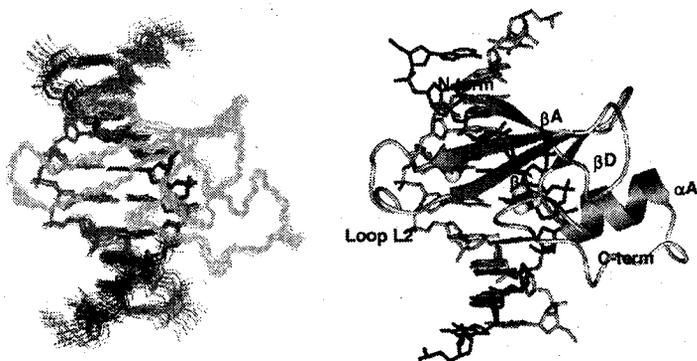


Fig.1 Backbone overlay of the 20 NMR structures and ribbon representation

● : methyl groups at the methyl-CpG

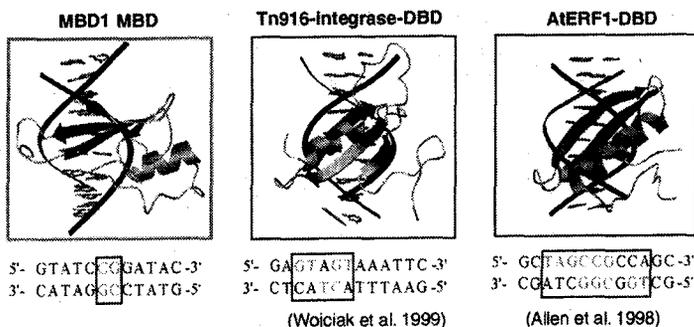


Fig.2 Comparison of the MBD with the other DNA binding domains

## 主鎖シグナルからのタンパク質グローバルフォールドの決定

○菊地淳<sup>1</sup>、伊藤隆<sup>1</sup>、木川隆剛<sup>2</sup>、横山茂之<sup>3</sup>理研GSCタンパク質構造<sup>1</sup>、理研GSCタンパク質施設<sup>2</sup>、東大院理<sup>1,2,3</sup>

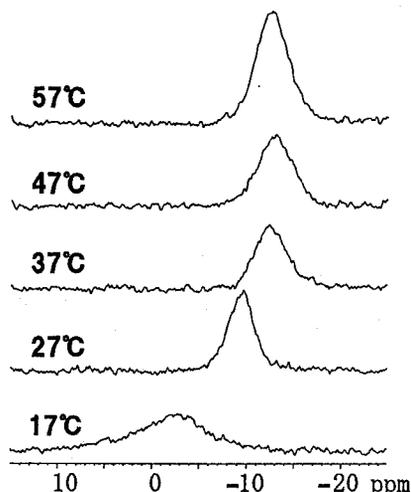
Global fold determination of proteins by both short and long-range structure information derived from main-chain signals.

○Jun Kikuchi<sup>1</sup>, Yutaka Ito<sup>1</sup>, Takanori Kigawa<sup>2</sup>, Shigeyuki Yokoyama<sup>1,2,3</sup><sup>1</sup>Prot.Struct.Team, GSC, RIKEN; <sup>2</sup>Prot.Prep.Team, GSC, RIKEN; <sup>3</sup>Dept.Biochem., Univ. Tokyo

The initial step of the solution structure determination of proteins by NMR is the main-chain sequential assignment. Since this step is well-established in current solution NMR technique, use of both short and long range structure information derived from the main-chain signals would be useful strategy for structural study of small and medium size proteins. First, we report several method to align proteins with respect to magnetic field. By use of residual dipolar coupling (RDC) data and small number of short range structure information (nOes and secondary chemical shifts), global fold of ubiquitin can be determined using conventional structure calculation program (CNS). Next, we have investigated a combination of a sparse NMR data and structure prediction algorithm, ROSETTA. We show nOe-based distance information is no longer necessary, but NH-RDC data can be effectively worked in the global fold determination of ubiquitin.

<緒言>タンパク質のNMR立体構造解析は主鎖シグナルの連鎖掃蕩から始まる。ここまでの方法論は比較的良く整備されているため、我々は主鎖シグナルから効率良く遠近位の構造情報を抽出、活用する戦略を立てようとしている。これは、Northeast SG (Montelione博士ら)がnOe距離情報を中心とする方針[1]なのに対し、Southeast SG (Prestegard博士ら)がresidual dipolar coupling (RDC)を中心とするアプローチ[2]をとっている事に近いかもしれない。前者のアプローチは最初のタンパク質溶液構造[3]以来16年もの積み重ねがあるため、短期的には多くの成果が期待できる。これは両者のSGプロジェクトの現在までの成果を見れば一目瞭然である。しかしながら、主鎖シグナルからの構造解析法を整備することは、以下のような理由で長期的展望でNMR法の潜在能力を発揮するのではないかと考えている。(1)研究者の主観が入り易い側鎖シグナルの掃蕩とnOe掃蕩のステップを簡略化できる。(2)重水素化を施した試料(より分子量の大きなタンパク質[4]や膜貫通型タンパク質等)のような難しい対象への道を開拓する。(3)相互作用解析のために頻繁に用いるHSQCスペクトル上で、化学シフト変化以外のユニークな情報が得られる、といったメリットがあると期待している。

<タンパク質の弱配向> タンパク質を磁場中で弱配向させると、静磁場に対して結合ベクトルの配向情報を抽出したり(ex. NH-RDC, <sup>15</sup>N-CSA)、距離情報(ex. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-RDC)を抽出することができる。しかし配向の度合いが強すぎると線幅が広幅化し、感度低下を起こしてしまう。逆に、弱すぎると制限情報として用いるには不向きなデータとなる。ゲノム産物の性質は多種多様なので、タンパク質の性質に応じてスクリーニングできるように種々の配向媒体を種々保持しておくことが望ましい。我々は既に、8種の配向媒体を立ち上げており、種々のタンパク質について配向データを測定している。図1は新規の弱配向媒体、ゲル状態ミセルの<sup>31</sup>P-NMRスペクトルを示している。広いpH、温度範囲での適用が可能なおことから、多くのゲノム産物の弱配向条件をカバーすると期待している[5]。これらの豊富タンパク質弱配向の経験から、条件のスクリーニングは概ね律速にならないと考えている。また、液晶作成に用いる界面活性剤やリン脂質のハンドリング技術、界面化学の知識を要する人材を育成することは、高分子量タンパク質の回転相関時間を下げるための条件検討、膜タンパク質の可溶化条件検討といったより難しい課題に挑戦していくために重要な知見であると考えている。

Figure 1. Changes of <sup>31</sup>P-NMR spectra of novel alignment media at different temperature

キーワード: タンパク質弱配向, 界面活性剤, リン脂質, 異方的構造情報, 立体構造予測

きくちじゅん, いとうゆたか, きがわたかのり, よこやましげゆき

<稀少なNMRデータからのグローバルフォールド決定>

図2.(a)はよく用いられる立体構造計算プログラム、CNSを用いて主鎖由来の近位構造情報からユビキチンのグローバルフォールドを決定しようとした例を示している。ここで用いた近位構造情報は、nOeは<sup>15</sup>N-NOESY-HSQC法より、主鎖二面角は2次化学シフトより、水素結合はHNCO-TROSY法より抽出した実測データである。このように主鎖のみからの稀少なNMRデータ下では、近位構造情報のみでは不十分である。ところが、2種類の水溶性ネマチック液層を用いて弱配向させ、NHに関するRDCデータを加えるとフォールドパターンをトレースすることができる(b)。測定に用いるIPAP-HSQC法(または<sup>1</sup>H-coupled HSQC法)は非常に感度の高い観測法であり、ユビキチンのような回転相関時間の低い(~4ns)タンパク質であれば0.1mM程度の低濃度で十分に観測できる。

(c,d)は立体構造予測プログラムROSETTA [6]と、稀少なNMRデータを組み合わせた場合を示している。たとえNHに関するRDCデータのみでも、ランダムに発生させた50個の初期構造よりスコアの低い10構造を選択しただけで、良く収束したユビキチンフォールドが得られる(d)。しかもプログラムROSETTAの場合はCNSと異なり、axial, rhombicityの配向係数を与える必要がないというメリットもある。一方で、(a)のCNS構造計算で用いた距離情報をそのままROSETTAに適用すると、かえってフォールドが崩れてしまう。これは立体構造予測プログラムを用いた場合、2次構造予測の精度が高いために近距離のnOeが入ると、かえって予測精度が落ちてしまうことを示している。従って遠位の構造情報と立体構造予測法との相性は高いことが予想され、NMR法の苦手としてきた遠位の構造情報をどのようにして抽出するかが、今後のHigh-throughput化戦略の重要なポイントと考えられる。

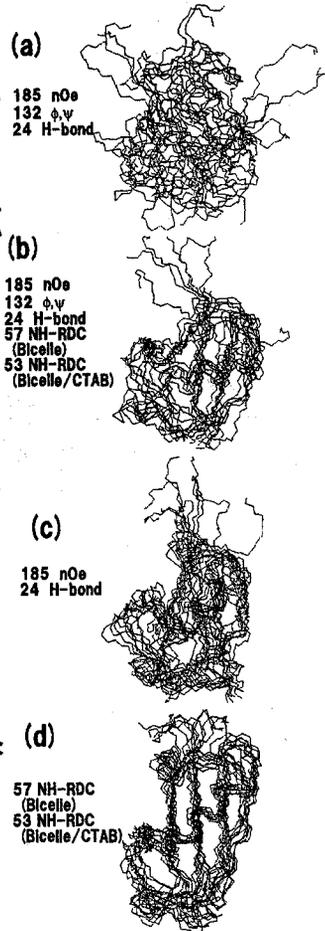


Figure 2. Comparison of global fold determination by sparse NMR data of ubiquitin using the program CNS (a,b) and ROSETTA (c,d).

<遠位構造情報と立体構造予測法との融合>

図3には構造プロトタイプとして、HSQCスクリーニングから先にとり得る戦略を図示している。短期的に調べておくべき問題点を先に列挙しておきたい。

第1に、立体構造予測法についてNMR分光学者の経験数は非常に少ない。従ってどのようなフォールドパターンの場合に予測が難しいのか未知数である。多くの試料を扱う可能性のあるGSCのような組織の場合、ノウハウの蓄積という面で貢献ができるのではないだろうか。

第2に、この戦略はグローバルフォールドの決定で留まっている。現状では小さなタンパク質の精密化の場合、nOe情報を効率良く収集し、立体構造計算を繰り返さなければならぬ。本発表の範囲ではないが、GSC内ではnOeを基本とする構造精密化の検討も行っている。グローバルフォールドから精密化が有意義と判断された場合、側鎖シグナルの帰属を丁寧に扱い、nOeの半自動帰属法と組み合わせ、時間をかけて精密化してもよい。

第3に、妥当な構造の選択法である。筆者は以前、<sup>1</sup>H化学シフト計算法がタンパク質構造の精度に鋭敏に反映されることを示した[7]。プログラムCNSで計算した構造の場合、例えば図2(a)と(b)は<sup>1</sup>H化学シフト計算の標準偏差の有意義な差(δ ~ 0.2ppm)が見られるものの、プログラムROSETTAより得られる構造(c)と(d)間には殆ど差がなく、しかも実測、計算化学シフトの一致度が悪い。これはROSETTAが局所構造を崩している部位があることに起因しており、今後の検討課題でもある。

最後に、本研究が側鎖重水素化を施した、側鎖シグナルの帰属、nOe解析そのものが困難な対象を想定していることにもう一度言及したい。特に膜貫通型タンパク質は結晶化が難しいと言われているものの、溶液、固体NMR法にとっても依然難しい対象である[8,9]。しかしながら、脂質2重層という特殊な環境から2次元的に配向した構造をとっているため、膜貫通部位に関しては立体構造予測法そのものに対する期待が高い。可溶化のための界面化学の知識さえ蓄積すれば、立体構造予測法と融合させた低分解能構造への道も開拓されるかもしれない。

<参考文献>

- 1) Moseley, H. N. & Montellone, G. T. (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, pp635.
- 2) Prestegard, J. H., Valafar, H., Glushka, J. & Tian, F. (2001) *Biochemistry*, 40, pp8677.
- 3) Williamson, M., Havel, T. F. & Wuthrich, K. (1985) *J.Mol.Biol.* 182, pp295.
- 4) Kikuchi, J., Iwahara, J., Kigawa, T., Murakami, Y., Okazaki, T. & Yokoyama, S. *J.Biomol.NMR*, submitted.
- 5) 菊地淳, 木川隆剛, 横山茂之. NMR法を用いた立体構造解析法および装置. 特許出願中.
- 6) Bowers, P., Strauss, C. E. M. & Baker, D. (2000) *J.Biomol.NMR*, 18, pp311.
- 7) Williamson, M., Kikuchi, J. & Asakura, T. (1995) *J.Mol.Biol.* 247, pp541.
- 8) Kikuchi, J., Asakura, T., Loach, P. A., Parkes-Loach, P. S., Shimada, K., Hunter, C. N., Conroy, M. J. & Williamson, M. (1999) *Biopolymers* 49, pp361.
- 9) Kikuchi, J., Williamson, M., Shimada, K. & Asakura, T. (2000) *Photosyn.Res.*, 63, pp259.

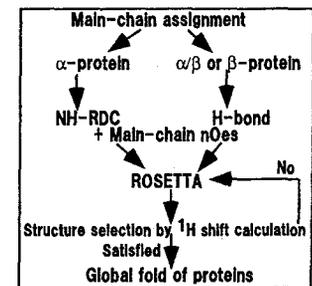


Figure 3. Proposed strategy of rapid global fold determination of proteins.

高圧 NMR による広い構造空間での蛋白質ダイナミクスの研究:

ユビキチンの2つのフォールド構造と巻戻り中間体

(神戸大学・自然科学) ○北原亮、山田博昭、赤坂一之

Conformational Fluctuation of Ubiquitin Revealed by High Pressure NMR: Two native conformers and a folding intermediate

Ryo Kitahara, Hiroaki Yamada, and Kazuyuki Akasaka

*Department of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan*

The presence of two native conformers ( $N_1$  and  $N_2$ ) and an unfolding intermediate (I) of ubiquitin at equilibrium have been demonstrated by high pressure  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  two-dimensional NMR under high pressure ( $\sim 3700$  bar at 0 and 20 °C) or low temperature ( $\sim -21$  °C at 2000 bar). The analysis of  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  pressure shifts of individual amide groups indicates that the  $N_2$  has a loosened core structure with weakened hydrogen bonds in the five-stranded  $\beta$ -sheet. Furthermore, hydrogen bonds of residues 67–72 belonging to  $\beta_5$  are substantially weakened or partially broken, giving increased freedom of motion for the C-terminal segment. The latter is confirmed by  $^{15}\text{N}$ -NMR relaxation measurements ( $T_1$ ,  $T_2$  and NOE). The structure of the intermediate is preferentially disordered in the entire segment between Lys33 and Arg42. The structural character is quite similar with the proline-trapped kinetic folding intermediate found in the minor folding pathway of ubiquitin in a pulse labeling H/D exchange NMR study [Briggs, M. S. and Roder, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2017-2021].

蛋白質の多様な構造に関する研究は、蛋白質の機能と構造の関係、蛋白質の巻戻り問題、プリオンに代表される蛋白質の異常構造への転移問題等様々な問題に知見を与える。我々は天然状態から逸脱した蛋白質の構造を捉える方法として高圧 NMR 法を用いた。高圧 NMR は、圧力つまり分子体積を軸に、もともと存在する蛋白質の多様構造間の平衡を部分モル体積の小さな方へシフトさせることによって、天然状態から逸脱した構造を観測可能とする原理に基づく方法である。これによって分光学的検出限界外にある“稀な”構造も、高圧下で安定に捕捉され検出可能になる<sup>1,2</sup>。細胞内でポリユビキチンを形成し蛋白質分解の信号となるユビキチンについて、これまで知られていない新しい構造がいわゆる天然構造と共存していることを初めて明らかにした<sup>1</sup>。

キーワード: 高圧 NMR、ユビキチン、巻戻り中間体

きたはら りょう、やまだ ひろあき、あかさか かずゆき

すなわち広い圧力範囲で全残基レベルでの高圧NMR実験 (-21-35°C、30-3700bar: HSQC,  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $^{15}\text{N}$ -NOE)を行うことによって、通常知られている天然構造とは $\beta$ シート中心部とC末端の構造が大きく異なるフォールド構造をもつもう一つの構造( $\text{N}_2$ )が、常温常圧下で15%程度存在し、マイクロ秒のオーダーで天然構造との間で転移を繰り返していることがわかった。この新しいフォールド構造はC末端部分(残基70-76)が天然構造よりも揺らぎが大きく、ポリユビキチン構造形成に有利な活性型構造と考えられる。さらに、低温もしくは高圧条件下では残基33-42の部分で構造の壊れた変性中間体(I)が存在し、その構造が巻戻り中間体の構造と極めて似ていることが分かった。この結果は、蛋白質の巻戻り中に過渡的に生じる中間体を高圧NMR法によって加圧下で安定に捕捉し、その構造を解析可能であることを示している。これらの結果からユビキチンは少なくとも2つのフォールド構造と中間体構造、変性構造の平衡状態にあることが分かった。構造変化に伴う部分モル体積の変化量( $\Delta V$ )と自由エネルギー変化量( $\Delta G$ )を図1にまとめた。

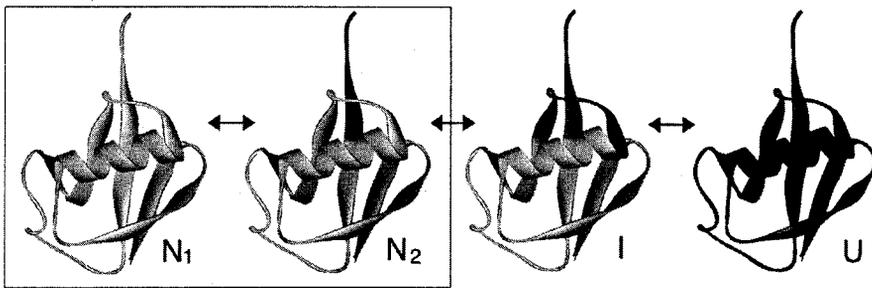


Figure 1 Schematic representation of the conformational ensemble of ubiquitin. Disordered parts are colored with dark gray.  $\Delta G^0$  and  $\Delta V^0$  for the transition from  $\text{N}_1$  and  $\text{N}_2$  are 4.2 kJ/mol and -24 mL/mol, respectively, at 20 °C.  $\Delta G^0$  and  $\Delta V^0$  for the transition from N ( $\text{N}_1$  and  $\text{N}_2$ ) to I are 15.2 kJ/mol and 58 mL/mol at 0 °C, and  $\Delta G^0$  and  $\Delta V^0$  for the transition from I to U are 16.1 kJ/mol and -27 mL/mol at 0 °C.

#### 参考文献

1. Kitahara, R., Sareth, S., Yamada, H., Ohmae, E., Gekko, K., and Akasaka, K. High pressure NMR reveals active-site hinge motion of folate-bound *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. (2000) *Biochemistry* 39, 12789-12795.
2. Kitahara, R., Yamada, H., and Akasaka, K. Two folded conformers of ubiquitin revealed by high pressure NMR. *Biochemistry* 40 (in press).

**High Pressure NMR Study Shows That the Variant Transthyretin (V30M) is Less Stable Than the Wild Type.**

○Tara Nath Niraula,<sup>1</sup> Katsuki Haraoka,<sup>2</sup> Yukio Ando,<sup>2</sup> Hua Li,<sup>1</sup> Hiroaki Yamada<sup>1</sup>,  
and Kazuyuki Akasaka<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Graduate school of Science and Technology, Kobe University  
1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan*

<sup>2</sup> *Department of Laboratory Medicine, Kumamoto University School of Medicine, 1-1-1  
Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan*

Transthyretin (TTR) is known to be amyloidogenic, and, in particular, its naturally occurring variants induce a type of hereditary systemic amyloidosis causing a class of diseases known as familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). We performed high pressure <sup>1</sup>H NMR measurements of both the wild type and a common familial variant (V30M) between 30-3000 bar at pH 7.1. We found that V30M mutation causes a significant instability of the tetrameric native state of TTR, increasing the fraction of unfolded monomers, which is believed to be the cause for the formation of fibrils leading to FAP.

#### INTRODUCTION

Transthyretin (TTR) is a tetrameric protein composed of identical 127 amino acids, the sub-units having a predominant  $\beta$ -sheet structure<sup>1</sup>. The protein is known to be amyloidogenic, in particular various mutants of TTR induce a type of hereditary systemic amyloidosis causing a class of diseases known as familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)<sup>2,3</sup>. Mutants at different positions of amino acid sequence can give rise different diseases in different order of aggressiveness, symptoms and age of onsets according to the clinical, biochemical, and geographical characteristics. More than 80 single or double amino acid substitutions of TTR have been identified, of which the majorities are associated with clinical manifestations of amyloidosis. Almost all the TTR variants cause FAP, and each FAP shows its own phenotype<sup>11</sup>. In addition, the wild type TTR can also form amyloid fibrils, which induce senile systemic amyloidosis. The amyloid fibril formation of both the wild type and mutant TTR is easily observed under acidic condition *in vitro*<sup>12</sup>, and is believed to be caused by the dissociation of the tetramer into monomers. However, study on the conformational state of the dissociated monomers and of thermodynamic stability of tetrameric TTR at a neutral pH close to physiological condition is seldom performed, nor a quantitative comparison of the thermodynamic stability of the FAP-causing mutant TTR and the wild type TTR has not been carried out.

---

Transthyretin Amyloid High pressure NMR

たら など にらうら、はらおか かつぎ、あんど ゆきお、り か、やまだ ひろあき、あかさか かずゆき

## EXPERIMENTAL

As a clue to understanding the cause of FAP, thermodynamic stability of the most common type FAP-causing mutant of TTR (V30M) was compared with that of the wild type TTR at neutral pH (pH 7.1). The experiment was performed on the pressure axis between 30-3000 bar at temperatures of 4 °C and 37 °C, using the on-line cell high pressure <sup>1</sup>H NMR spectroscopy at 750 MHz, a detailed description of which is described elsewhere<sup>4,5</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

For both proteins, reversible changes of the <sup>1</sup>H NMR spectra with pressure were observed, which was interpreted as indicating a shift of the equilibrium between the folded tetramer and the monomers which are disordered and hydrated. This interpretation was consistent with the NMR diffusion measurement carried out at 30 bar and at 2000 bar.

Thermodynamic analysis on pressure axis gave Gibbs energy differences ( $\Delta G_0$ ) at 1 bar associated with the tetramer-monomer transition to be 86.4±2.3 for the wild type and 67.8±1.0 kJ/mol for the V30M variant, which were accompanied by the loss of partial molar volumes ( $\Delta V_0$ ) of 221.7 ± 12.7 and 214.0 ±13.4 ml/mol tetramer, respectively (Table 1). The result indicates that the thermodynamic stability of the V30M mutant is much lower (by  $\Delta\Delta G_0 = 18$  kJ/mol tetramer) than that of the wild type, giving a higher probability of occurrence of disordered monomers in the mutant protein than in the wild type. This will increase the change of fibril formation from disordered monomers, which would eventually lead to FAP.

**Table 1. Thermodynamic parameters of transthyretin obtained from high pressure NMR experiment**

Parameters	TTR-wild type	TTR-mutant (V30M)
Change of free energy ( $\Delta G^0$ ) <sup>a</sup> for denaturation	86.4 ± 2.3 kJ / mol	67.8 ± 1.0 KJ / mol
Change in partial molar volume ( $\Delta V$ ) for denaturation <sup>b</sup>	-221.7 ± 12.7 ml /mol	-214.0 ±13.4 ml /mol
Mid pressure of denaturation	1420 bar	640 bar

<sup>a</sup> Value obtained for the equilibrium between native tetramer and denatured monomer.

<sup>b</sup> Dissociation of tetramer

## REFERENCES

1. Hamilton, J. A., Steinrauf, L. K., Barden, B. C., Liepnieks, J., Benson, M. D., Holmgren, G., Sandgren, O. & Steen, L. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 2416-2424 (1993).
2. Tawara, S., Nakazato, M., Kangawa, K., Matsuno, H. & Araki, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 880-888 (1968).
3. Costa, P. P., Figueira, A. & Bravo, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4499-4503 (1978).
4. On-Line Cell High Pressure Nuclear Magnetic Resonance Technique: Application to Protein Studies. Akasaka, K. and Yamada, H. *Methods in Enzymology 338: Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules Part A* (James, T. L., Doetsch, V. and Schmitz, U., eds.), Academic Press, 134-158(2001).
5. Yamada, H., Nishikawa, K., Honda, M., Shimura, T., Akasaka, K., and Tabayashi, K. *Rev. Sci. Inst.* 72, 1463-147(2001).

## Growth-blocking peptide(GBP)の運動性

(生研機構<sup>1</sup>、富山医薬大薬<sup>2</sup>、北大理<sup>3</sup>、北大低温研<sup>4</sup>)○相沢智康<sup>1, 2</sup>、三浦和紀<sup>1, 2</sup>、河野隆英<sup>2</sup>、小金澤 望<sup>3</sup>、松原公明<sup>2</sup>、藤谷直樹<sup>3</sup>、熊木康裕<sup>3</sup>、水口峰之<sup>2</sup>、早川洋一<sup>4</sup>、出村 誠<sup>3</sup>、新田勝利<sup>3</sup>、河野敬一<sup>2</sup>

## Backbone dynamics of growth-blocking peptide (GBP)

Tomoyasu Aizawa<sup>1, 2</sup>, Kazunori Miura<sup>1, 2</sup>, Takahide Kouno<sup>2</sup>, Nozomi Koganesawa<sup>3</sup>, Kimiaki Matsubara<sup>2</sup>, Naoki Fujitani<sup>3</sup>, Yasuhiro Kumaki<sup>3</sup>, Mineyuki Mizuguchi<sup>2</sup>, Yoichi Hayakawa<sup>4</sup>, Makoto Demura<sup>3</sup>, Katsutoshi Nitta<sup>3</sup> and Keiichi Kawano<sup>2</sup><sup>1</sup>Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, <sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University, <sup>3</sup>Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, <sup>4</sup>Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University

Growth-blocking peptide (GBP) is one of the cytokines derived from a lepidopteran insect, *Pseudaletia separata*. The backbone dynamics of a <sup>15</sup>N-labeled recombinant growth-blocking peptide (GBP) were probed by measurements of <sup>15</sup>N NMR relaxation. In this study, recombinant GBP was expressed in *Escherichia coli* as thioredoxin (Trx) fusion proteins for highly efficient production and facilitative purification. The <sup>15</sup>N longitudinal (T<sub>1</sub>) and transverse (T<sub>2</sub>) relaxation rates and the steady-state heteronuclear {<sup>1</sup>H}-<sup>15</sup>N NOE values were obtained at 500MHz. NMR relaxation data were analyzed using "model-free" approach.

Growth-blocking peptide, GBP (NH<sub>2</sub>-Glu-Asn-Phe-Ser-Gly-Gly-Cys-Val-Ala-Gly-Tyr-Met-Arg-Thr-Pro-Asp-Gly-Arg-Cys-Lys-Pro-Thr-Phe-Tyr-Gln-OH)は、鱗翅目昆虫であるアワヨトウ幼虫から単離された、1組のジスルフィド結合を有するペプチドで、寄生や低温といったストレスによって、幼虫の血中での濃度が高まり、その成長を抑制する活性を持つことが知られている。最近の研究で、このGBPと相同性の高いペプチド(その保存されたN末端配列から、ENFファミリーと呼ばれる)が多種類の鱗翅目昆虫から見つかっており、昆虫幼虫に対する麻痺活性、拍動の制御のほか、血球細胞活性化活性、細胞増殖活性といった細胞レベルでの活性もあることが明らかになってきた。このことから、ENFファミリーペプチドは、多機能のサイトカインであると考えられている。

現在までに幾つかのENFファミリーペプチドで、NMR法を用いてその溶液中での立体構造解析がなされており、いずれもその基本的構造は収束した立体構造を持たないN末端の数残基とβシートから成るコア領域から形成されていることが明らかになっている。

キーワード: 多次元NMR、同位体ラベル、ペプチド、サイトカイン

あいざわともやす、みうらかずのり、こうのたかひで、こがねさわのぞみ、まつばらきみあき、ふじたになおき、くまきやすひろ、みずぐちみねゆき、はやかわよういち、でむらまこと、につかつとし、かわのけいいち

本研究では、大腸菌を用いた大量発現系を利用して、 $^{15}\text{N}$  ラベル GBP を調整し、その運動性について検討した。安定同位体ラベルを用いたタンパク質の運動性の解析は、近年盛んに行なわれているが、分子量の小さいペプチドでは、菌体内で目的ペプチドが分解されやすい、精製が困難など、微生物を用いた発現系構築、試料調整の難しさから、安定同位体ラベルしたペプチドの研究例は多くない。よって、このように分子量の小さいペプチドの動的構造の解析からはこれまでにない、興味深い知見が得られると期待される。

ENF ペプチドでは、収束した立体構造を持たない N 末端残基も活性に重要な役割を果たすことがわかってきており、この部位とレセプターの相互作用も興味深い。

実験に用いた、 $^{15}\text{N}$  ラベル GBP は、チオレドキシシン融合タンパク質として大腸菌を用いて発現させた。菌体内では可溶性のタンパク質として存在する融合タンパク質を、菌体破碎後、HisTag を利用し精製、Enterokinase を用いて、チオレドキシシンと目的ペプチドの切断を行なった後、逆相 HPLC で精製を行なった。最少培地を用いた系でも、培地 1 L あたりおよそ 5 mg 程度のペプチドを得ることができたので、窒素源として  $^{15}\text{N}$  を用いた培養を行ない、 $^{15}\text{N}$  ラベル GBP を作製した。

NMR スペクトルの測定には、Bruker 社製 DMX-500 NMR 分光器を用い、得られた試料を約 1mM の軽水溶液とし、いくつかの pH 及び温度条件で NMR 測定を行ない、主鎖アミド基の  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  シグナルの帰属を行なった。その後、この試料について、その運動性を議論するため、 $^{15}\text{N}$  核の、 $T_1, T_2$ , および  $^1\text{H}\cdot^{15}\text{N}$  NOE の測定を行なった (Fig. 1)。また、これらの結果をモデルフリー理論に基づき解析し、その運動性について評価した。

また GBP 変異体についても同様の解析を行なったので、その解析結果も報告する。

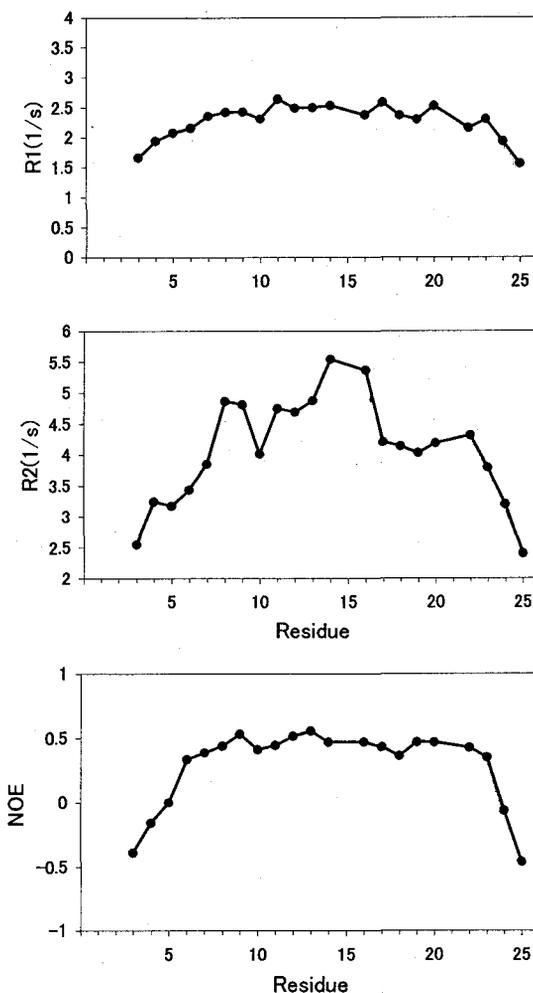


Fig.1  $^{15}\text{N}$ -relaxation parameters,  $T_1$ ,  $T_2$  and  $\{^1\text{H}\}\cdot^{15}\text{N}$  NOE for GBP measured at 500MHz,  $10^\circ\text{C}$ .

謝辞 本研究は一部、生研機構基礎技術推進事業により行なわれた。

**$\omega$ -conotoxin MVIIC 改変体の構造機能相関**

(三菱生命研) ○小林邦子、佐々木亨、佐藤一紀、河野俊之

**Structure activity relationship of the analogue  
of  $\omega$ -conotoxin MVIIC**

Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences

Kuniko Kobayashi, Toru Sasaki, Kazuki Sato, and Toshiyuki Kohno

The peptide  $\omega$ -conotoxin MVIIC ( $\omega$ -CTX MVIIC) derived from a venom of the fish-hunting sea snail *Conus magus* has 26 amino acids residues. This peptide blocks P- and Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents by binding with high affinity to voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels. It also blocks N-type  $\text{Ca}^{2+}$  current but its affinity is low. We have succeeded in making the analogue of  $\omega$ -CTX MVIIC which maintains high affinity to P/Q-type channels but loses affinity to N-type channel. According to the spectra of the amide proton region of the wild type and the analogue, chemical shifts did not change in five residues. All these residues are located in the  $\beta$ -strands which form a triple-stranded  $\beta$ -sheet in the wild type. Thus, the analogue maintains the core structure of the wild type, and the charge distribution in the peptide surface gives rise to distinctive activity of analogue.

[序]

$\omega$ -conotoxin MVIIC ( $\omega$ -CTX MVIIC) は魚を捕食するイモガイの一種 *Conus magus* の毒液由来のペプチドで、26アミノ酸残基から成り、分子内の6個のCysが3本のジスルフィド結合を形成している。このペプチドは、P/Q型のカルシウムチャンネルに結合して細胞内へのカルシウムイオンの流入を阻害するが、N型のカルシウムチャンネルに対しても弱い結合活性を持つ。我々は、 $\omega$ -CTX MVIICをもとにして、チャンネル選択性の非常に高い改変体の作成に成功した。野生型のアミノ酸残基を3個入れ替えた(S17K、S19R、K25R) この改変体は、野生型のP/Q型結合活性はそのまま保持しているが、N型カルシウムチャンネルに対する活性は大幅に低下し

キーワード : conotoxin、カルシウムチャンネル阻害ペプチド、2次元  $^1\text{H-NMR}$ 

○こばやしくにこ、ささきとおる、さとうかずき、こうのとしゆき

た。野生型と改変体の活性の違いが構造の面ではどうなっているのか。この観点から、 $\omega$ -CTX MVIIICの改変体の構造を解析し、野生型の構造と比較することにした。

#### [実験]

野生型および改変体のペプチドを化学合成し、9 mM、pH 4.0でサンプル調製した。NMR測定にはBruker製 DRX-500を使用して、軽水中での2次元  $^1\text{H}$ -NMR測定 (DQF-COSY、TOCSY、NOESY) を3種の温度 (288 K、298 K、310 K) で行った。立体構造決定にはX-PLORを用いた。

#### [結果および考察]

野生型および改変体のアミドプロトンのケミカルシフト値の比較によって、以下の知見が得られた。改変体において、野生型と比べてケミカルシフト値がほとんど移動しなかった ( $\pm 0.01$ 未満) のものが、C8、C20、G21、R22、G24の5残基あった。特に、C20とG24は隣接残基を置換したにも関わらず、その影響を受けていない。これらの5残基はいずれも、野生型において $\beta$ 鎖上に存在する。野生型では3本のジスルフィド結合によってペプチドがコンパクトに折り畳まれ、 $\beta$ シートを中心にコアが形成されている。したがって、改変体でも $\beta$ シートの骨格部分は野生型とほぼ同一の構造を保っていると考えられる。現在、詳細な立体構造を解析中であるが、改変体のペプチド表面の電荷分布が野生型と異なるために、改変体特有の活性を生じていると予想される。

## フリー HIV プロテアーゼの NMR による運動性に関する研究

加藤悦子<sup>1</sup>、伊島理恵子<sup>2</sup>、John Louis<sup>2</sup>、Dennis A Torchia<sup>2</sup>、山崎俊正<sup>1</sup>  
(生物研<sup>1</sup>、NIH<sup>2</sup>)

## Study of flexibility in free HIV-1 protease by NMR

Etsuko Katoh<sup>1</sup>, Rieko Ishima<sup>2</sup>, John Louis<sup>2</sup>, Dennis A Torchia<sup>2</sup>,  
and Toshimasa Yamazaki<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>National Institute of Agrobiological Sciences,

<sup>2</sup>National Institutes of Health

Crystal structures have shown that the HIV-1 protease (HIVPr) flaps, domains that control access to the active site, are closed when the active site is occupied by a ligand. While flap structures ranging from closed to semi-open are observed in the free protease, crystal structures reveal that even the semi-open flaps block access to the active site, suggesting that the flaps are mobile in solution. In order to characterize the secondary structure and analyze the dynamics for the flaps of the free protease, we have determined the sequential assignments and relaxation parameters of HIVPr whose catalytic Asp25 is replaced by Asn (D25N HIVPr) in solution. D25N HIVPr is inactive, but retains all the structural characteristics of the wild type protease. The relaxation analysis shows that residues in the flap are flexible on the sub-ns time scale, in contrast with previous observations on the inhibitor-bound protease.

## [緒言]

エイズの病因ウイルスである HIV の増殖には成熟型の *gag* タンパク質と *pol* タンパク質が必要である。これらのタンパク質はポリタンパク質として発現された後、*pol* 遺伝子の産物である HIV プロテアーゼ (HIVPr) によって切断され、それぞれの機能を発揮する。HIVPr 阻害剤はこのポリタンパク質の切断を阻害し、ウイルス粒子の成熟を抑制する。このため、HIVPr 阻害剤は現在最も期待される抗 HIV 薬剤の 1 つであり、活発な開発競争が世界各地で展開されている。現在までに数百を越す阻害剤と HIVPr 複合体の構造が解明されているが、フリーの構造や運動性が解明された例は少ない。特に溶液中では HIVPr 自身が自己消化により分解されてしまうために NMR による解析を行うことは非常に難しい。本研究では活性サイトである Asp25 に変異を導入した変異体 (D25N HIVPr) を用いて、HIVPr のフリー状態での運動性を NMR により研究した。

## [実験]

<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識した D25N HIVPr は大腸菌を用いた系により大量合成した。NMR 測定には 0.6mM の D25N HIVPr タンパク質を水溶液に溶解し NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20 mM), NaNO<sub>3</sub> (2mM) により pH 5.8 に調整したものをを用いた。すべての NMR 測定は、Bruker DMX750 および DMX500 を用い 20°C で行った。

## [結果と考察]

D25N HIVPr は触媒基 Asp25 が Asn に置換されているために不活性型ではあるが、天然型と同等の複合体形成能を保持するようにデザインされた変異体である。D25N HIVPr が天然型の立体

キーワード: AIDS、HIV プロテアーゼ、緩和時間

かとう えつこ、いしま りえこ、じょん るいす、でにす とーしゃ、やまざき としまさ

構造を保持しているかどうかを検討することは、今後D25N HIVPrを用いて基質の認識機構を解明する研究を行う上で重要である。そこで、D25N HIVPr単体および阻害剤との複合体について定法によりシグナルの帰属を行い、その結果を従来報告されているHIVPrの結果と比較した。この結果、D25N HIVPrは天然型とほぼ同様な立体構造を形成していること、及び阻害剤の認識機構も天然型と同様であることが確認できた。D25N HIVPrは単体状態でも長時間にわたるNMR測定中も安定であり、動的構造の精密解析が可能であることは注目に値する。Fig.1には、阻害剤(DMP323)と複合体を形成しているHIVPr(1)と本研究から得られたD25N HIVPr単体のオーダーパラメータ( $S^2$ )を示す。両者には基質の取り込みを制御するフラップ(Ile47-Gly52)部分の運動性に顕著な相違があった。この部分は複合体形成時においては阻害剤と直接結合しながら完全に閉じた構造をしており、低い運動性を示す( $S^2 > 0.8$ )。一方、D25N HIVPr単体におけるこの部分の $S^2$ は0.6~0.75であり、ナノ秒からピコ秒のタイムスケールで大きく運動している。結晶状態のHIVPr単体についてはフラップ部分が完全に閉じた状態と半開状態(Fig.2)が報告されているが(2,3)、半開状態でも基質を取り込むことは不可能である。従って、溶液中におけるHIVPr単体は上記の2つの構造に加えて、基質の取り込みを可能にするように、より大きくフラップを開いた構造との平衡状態にあるものと結論される。

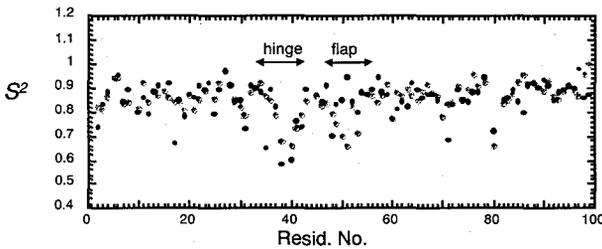


Fig.1. Order parameters ( $S^2$ ) plotted as a function of residue number for the free D25N HIVPr (◆) and the inhibitor (DMP323)-bound HIVPr (■).  $S^2$  was derived from model-free analysis of the  $^{15}\text{N}$  relaxation parameter,  $T_1$ ,  $T_2$  and NOE.

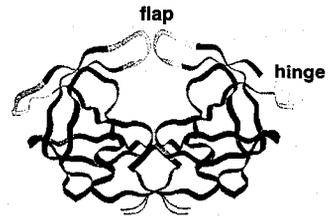


Fig.2. X-ray structure of the free HIVPr, colored gray ribbon to indicate residues undergoing rapid large amplitude motions ( $S^2 < 0.75$ ).

D25N HIVPr は活性サイトに変異を導入することにより、活性が消失する一方、立体構造と分子認識機構は同様であることが本実験により確認できた。このことは、D25N HIVPr を用いて従来困難であった HIVPr と基質との相互作用を、直接的に観測できることを示している。

#### References

- 1 Nicholson, L.K., Yamazaki, T., Torchia, D.A., Gresiek S., Bax, A., Stahl, S.J., Kaufman, J.D., Wingfield, P.T., Lam, P.Y.S., Jadhav, P.K., Hodge, C.N., Domaille, P.J. and Chang, C-H. (1995) *Nature Struct. Biol.* **2**, 274-279.
- 2 Pillai, B. Kannan, K.K. and Housur, M.V. (2001) *Proteins* **43**,57-64
- 3 Lapatto, R., Blundell, T., Hemmings, A., Overington, J., Wilderspin, A., Wood, S., Merson, J.R., Whitte, P.J., Denley, D.E., Geoghegan, K.F. (1989) *Nature* **342**, 299-302.

ナトリウムチャンネルのIII-IVリンカーの溶液構造  
(京大院薬) ○宮本和英、中川照眞、黒田義弘

Solution Structure of III-IV Linker on Sodium Channels

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

○ Kazuhide Miyamoto, Terumichi Nakagawa, and Yoshihiro Kuroda

The sodium channel consists of one  $\alpha$ - and two  $\beta$ -subunits. The  $\alpha$ -subunit is mainly responsible for the function as ionic channels. The  $\alpha$ -subunit consists of four homologous domains, I-IV, each with six transmembrane segments, S1-S6. The IFM (Ile-Phe-Met) motif in the III-IV linker, which tethers between domains III and IV of the sodium channel, is known to interact with its receptor consisting of domain III S4-S5 loop and domain IV S4-S5 loop, and occludes the inner mouth of the sodium channel. This is called a fast inactivation process. We have previously studied the structure of a fragment peptide (K1480-K1496, MP3A) of the III-IV linker that involves the inactivation particle (I1488-F1489-M1490) by circular dichroism (CD) and  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopies. We found that T1491 is an important structural determinant for the IFM motif. Presently, in order to characterize the structure of the IFM motif in the III-IV linker more thoroughly, we have synthesized the peptide (MP-5A) that corresponds to the region of K1482-A1517 in the III-IV linker and investigated the structure in SDS micelles by CD and  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopies. It was found that a large hydrophobic cluster is formed by the IFM motif, Y1497-Y1498, and M1501, which can be related to the fast inactivation process of the sodium channel. It is concluded that the fast inactivation of sodium channel is achieved by the environmental polarity-dependent conformational switching at I1488-F1489 in the IFM motif.

膜電位依存性 Na チャンネルは、神経や筋などの興奮性細胞に存在し、膜電位を介してカリウムチャンネルと機能的に共役して、活動電位の発生および伝搬の役割を担う膜タンパク質である。Na チャンネルのドメインⅢとドメインⅣを結ぶ 53 残基のアミノ酸配列から成るⅢ-Ⅳリンカー領域中に存在する疎水性アミノ酸配列 Ile-Phe-Met(IFM motif)は、IFM motif のレセプターである二つのリンカー(ドメインⅢのセグメント 4 とセグメント 5 を結ぶリンカーおよびドメインⅣのセグメント 4 とセグメント 5 を結ぶリンカー)と疎水性相互作用することにより、チャンネルのイオン透過孔を細胞質側から塞ぎ、Na イオンの細胞内への流入を抑制する(不活性化)。最近、我々は rat brain type-IIA および human heart(hh) Na チャンネルの IFM motif を含む 17 残基から成るペプチドにおいて、Ile1488(hh では 1485)の主鎖 NH と Thr1491(hh では 1488)の側鎖 OH が水素結合し得る距離にあることを見出した[1,2]。今回、我々は不活性化機構をより詳細に解明する為、Na チャンネルの IFM motif を含む 36 残基から成るペプチド(K1482-A1517, MP-5A)を合成し、そのペプチドの

---

ナトリウムチャンネル、III-IV リンカー、不活性化、溶液構造、NMR

みやもとかずひで、なかがわてるみち、くろだよしひろ

立体構造を CD スペクトルおよび NMR を用いて研究した。不活性化状態を模倣する為に、ペプチドは SDS ミセル溶液に溶かした。

ペプチドの二次元 NMR (COSY, NOESY, TOCSY, DQF-COSY) および三次元 NMR (NOESY-TOCSY) からプロトンの帰属を行い、距離および二面角( $\phi$ )の拘束ファイルを作成した。この拘束ファイルに基づいた simulated annealing を InsightII/Discover で行うことにより MP-5A の立体構造を決定した。その結果、IFM motif、Y1497、Y1498、および M1501 が疎水性クラスターを形成しており、それが IFM motif の構造を安定化させていることが分かった。Rohl 等は MP-5A に対応するアミノ酸配列を持つペプチドのリン酸緩衝液中の構造に関して同様の疎水性クラスターを報告している[3]。MP-5A と彼等の構造を比較すると (Fig. 1)、IFM motif 中の Ile と Phe の側鎖の方向が立体的に異なっていることが分かった。このことにより、IFM motif 中の F を C に置換した ICM に対する methanethiosulfonate 試薬の反応性の実験に基づく仮説、即ち、不活性化ゲートの開閉が III-IV リンカーのコンフォメーション変化により生じるという従来の仮説を分子構造化学的に説明することができた。以上の結果から、IFM motif 中の Ile および Phe の側鎖のコンフォメーション変化が不活性化ゲートの開閉制御因子であると結論した[4]。

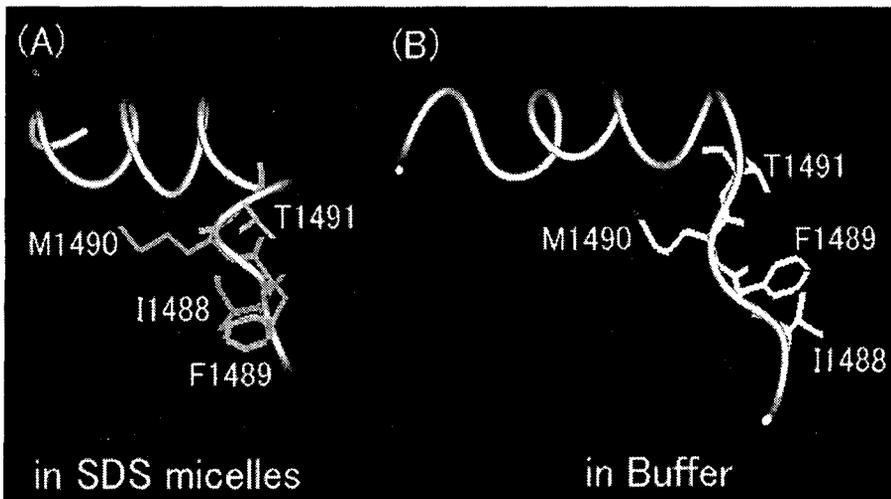


Fig. 1 Comparison of the structures at the IFM motif in the III-IV linker (A) determined presently for MP-5A in SDS micelles and (B) determined by Rohl et al. for the III-IV linker peptide in a phosphate buffer[3].

#### [参考文献]

- 1) Y. Kuroda, K. Miyamoto, M. Matsumoto, Y. Maeda, K. Kanaori, A. Otaka, N. Fujii, T. Nakagawa, *J. Peptide Res.*, 56, 172-184(2000).
- 2) K. Miyamoto, K. Kanaori, T. Nakagawa, Y. Kuroda, *J. Peptide Res.*, 57, 203-214(2001).
- 3) Rohl, C.A. et al., *Biochemistry* 38, 855-861 (1999).
- 4) K. Miyamoto, T. Nakagawa, Y. Kuroda, *Biopolymers* 59, 380-393(2001).

耐熱性シトクロム *c* におけるヘム活性中心の構造解析

(筑波大化学<sup>1</sup>、筑波大 TARA センター<sup>2</sup>、阪大院薬<sup>3</sup>、阪大産研<sup>4</sup>、東大院農<sup>5</sup>)  
 照井教文<sup>1</sup>、立入直紀<sup>1</sup>、〇皆川和久<sup>1</sup>、亀田恒徳<sup>1</sup>、山本泰彦<sup>1</sup>、長谷川 淳<sup>2</sup>、  
 内山 進<sup>3</sup>、小林祐次<sup>3</sup>、三本木至宏<sup>4</sup>、五十嵐泰夫<sup>5</sup>

Structural Analysis of Heme Active Site in Thermostable Cytochrome *c*

N. Terui<sup>1</sup>, N. Tachiiri<sup>1</sup>, O.K. Minakawa<sup>1</sup>, T. Kameda<sup>1</sup>, Y. Yamamoto<sup>1</sup>, J. Hasegawa<sup>2</sup>, S. Uchiyama<sup>3</sup>,  
 Y. Kobayashi<sup>3</sup>, Y. Sambongi<sup>4</sup>, and Y. Igarashi<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, Univ. of Tsukuba,

<sup>3</sup>Graduated School of Pharm. Sci., Osaka Univ., <sup>4</sup>Inst. of Sci. and Indust. Res., Osaka Univ.,

<sup>5</sup>Dept. of Biotech. Univ. of Tokyo

Despite the fact that Cytochrome *c*<sub>552</sub> from *Hydrogenobacter Thermophilus* (HT Cyt *c*<sub>552</sub>) and Cytochrome *c*<sub>551</sub> from *Pseudomonas Aeruginosa* (PA Cyt *c*<sub>551</sub>) possess remarkably similar structural properties, they exhibit considerably different thermostability and additionally there is a sizable difference in their redox potentials. In order to elucidate the structure-function relationship in these proteins, their heme active site structures have been characterized using paramagnetic NMR and compared with those of a quintuple mutant of PA Cyt *c*<sub>551</sub> and horse heart Cyt *c*. The temperature dependence study of oxidized HT Cyt *c*<sub>552</sub> revealed anomalous magnetic properties of its heme active site, such that none of the resolved signals obey simple Curie law and paramagnetically shifted signals exhibit line broadening at both low and high temperatures. These results clearly manifest a unique electronic nature of the heme active site in HT Cyt *c*<sub>552</sub>.

**序論** タンパク質などの生体分子を材料として工学的に利用する場合、分子の安定性がしばしば問題となる。私たちは、バイオ電子素子などへの応用が期待されている電子伝達タンパク質の安定性を増大させる分子設計原理の解明のために、好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter Thermophilus*) 由来のシトクロム *c*<sub>552</sub> (HT Cyt *c*<sub>552</sub> (Fig. 1))の耐熱性発現機構および酸化還元電位調節機構を分子レベルで明らかにすることを目指している。HT Cyt *c*<sub>552</sub> は分子量約 8000、アミノ酸 80 残基からなる *c* 型ヘムタンパク質で、生体条件下では 100°C でも変性しない。一方、緑膿菌 (*Pseudomonas Aeruginosa*) 由来のシトクロム *c*<sub>551</sub> (PA Cyt *c*<sub>551</sub>) は、HT Cyt *c*<sub>552</sub> との一次配列の相同性が 56% と高いにもかかわらず、熱変性温度は HT Cyt *c*<sub>552</sub> よりも約 40°C 低い。本研究では、HT Cyt *c*<sub>552</sub>、PA Cyt *c*<sub>551</sub>、Cyt *c*<sub>551</sub> mutant (PA Cyt *c*<sub>551</sub> の 5 個のアミノ酸残基が HT Cyt *c*<sub>552</sub> での対応するアミノ酸残基に置換された変異体 (F7A/V13M/F34Y/E43Y/V78I)) および標準的シトクロム *c* のひとつであるウマ心筋シトクロム *c* (HH Cyt *c*) のヘム活性部位の分子構造と機能を、耐熱性発現および機能調節の分子機構の解明という観点から詳細に比較した。

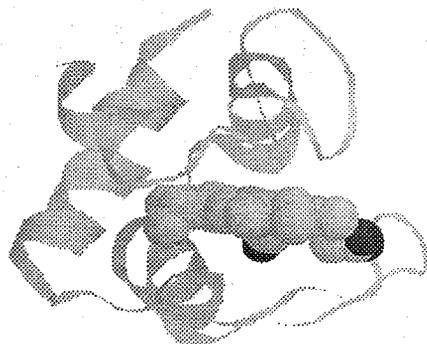


Fig. 1 Molecular structure of HT Cyt *c*<sub>552</sub> (Hasegawa *et al.* (1999)). The protein moiety is presented in ribbon model and heme is indicated in spacefill model. RasMol was used to draw this figure.

**実験** HT Cyt *c*<sub>552</sub>、PA Cyt *c*<sub>551</sub> および Cyt *c*<sub>551</sub> mutant は遺伝子工学的手法を用いて調製した。また、HH Cyt *c* は Sigma 社より購入したものをそのまま用いた。PA Cyt *c*<sub>551</sub> および Cyt *c*<sub>551</sub> mutant の <sup>15</sup>N フルラベル体は <sup>15</sup>N ラベルをしたアミノ酸を用いて非ラベル体と同様の手法を用いて調製した。タンパク質濃度を約 1mM でリン酸緩衝液に溶解させ、還元型にはジチオオナイトを、酸化型にはフェリシアン化カリウムを 10 当量加えて NMR 試料とした。NMR 測定は、標準的測定パラメータを用いて、筑波大学分析センターの Bruker 社製 AVANCE600/500 で行った。サイクリックボルタメトリー (CV) 測定は、タンパク質濃度約 0.1mM で、0.1M NaClO<sub>4</sub> を含む 20mM リン酸緩衝液 (pH 約 7) に溶解させ測定試料とし、タンパク質と電極の電子移動を促進させるために電極表面を 4-mercaptopyridine により装飾した直径 1.6mm の金ディスク電極を用い、筑波大学分析センターの電気化学アナライザー (ALS 600A-G) で行った。

**結果および考察** ヘムタンパク質の機能と構造の関係を NMR により解明するために、ヘム鉄の 3d 軌道に存在する不対電子によって誘起される常磁性シフトを解析した。ヘムタンパク質の機能はヘムの電子構造と密接な関係があり、その電子構造は常磁性シフトに鋭敏に反映されるからである。酸化型 HT Cyt *c*<sub>552</sub>、PA Cyt *c*<sub>551</sub>、および Cyt *c*<sub>551</sub> mutant の <sup>1</sup>H NMR スペクトルで観測される常磁性シフトしたヘム側鎖メチルプロトンシグナルの温度依存性を Fig. 2 に示す。HT Cyt *c*<sub>552</sub> および Cyt *c*<sub>551</sub> mutant は熱耐性が高いので 85°C においても変性し

**Keyword** : 耐熱性タンパク質、ヘムタンパク質、常磁性 NMR、人工変異体、安定同位体標識

てるいのりふみ、たちいりなおき、みなかわかずひさ、かめだつねのり、やまもとやすひこ、はせがわじゅん、うちやますずむ、さんぼんぎよしひろ、いがらしやすお

ないことが知られているが、Fig. 2 のスペクトルから 85°C でも活性部位の構造も保持されていることがわかる。また、5°C では HT Cyt  $c_{552}$  のヘムメチルプロトンのシグナルは著しくブロードニングしている。この現象は、今回測定した他の Cyt  $c$  では観測されていないため、HT Cyt  $c_{552}$  のヘムの電子構造が低温側で特有の変化をしていると考えられる。また、常磁性シフトしたいくつかのシグナルの Curie プロット(常磁性シフト vs. 絶対温度の逆数)は Curie 則に従わないことも、HT Cyt  $c_{552}$  のヘムの電子構造の異常な温度依存性を反映している (Fig. 3)。シトクロム  $c$  のヘムの電子構造では基底状態と励起状態のエネルギー差が比較的小さいため、常

磁性シフトはそれぞれのエネルギー状態に対応する電子構造の寄与を受けると考えられる。この寄与の割合が温度に依存して変化するため、常磁性シグナルが Curie 則に従わなくなると考えられる。ヘムの電子構造に摂動を与える原因としては、軸配位子の配向の変化が考えられる。シトクロム  $c$  では、軸配位子の His は Cys-X-X-Cys-His (X: 任意のアミノ酸) の一次構造上保存されているアミノ酸配列に含まれている。この配列中の 2 つの Cys はヘム側鎖とチオエーテル結合でつながっており、His の結合および配向は比較的安定であると考えられる。一方、HT Cyt  $c_{552}$  では軸配位子 Met を含むループ部分は、Pro-Met-Pro-Pro という特異な配列により Met-Fe の配位結合を安定化していると考えられるが、比較的構造の自由度が高いため熱運動の影響を受けやすく、その結果 Met のコンフォメーションが温度により変化するため常磁性シグナルが摂動を受けたと考えられる。Fig. 3 に HT Cyt  $c_{552}$  のヘム側鎖メチルおよび軸配位子である Met 59  $C_2H_3$  プロトンシグナルの温度依存性を示すが、温度による各シグナルのシフト変化からもこの考察が支持される。

HT Cyt  $c_{552}$  と HH Cyt  $c$  の CV 測定により得られたピーク電位から計算したそれぞれの酸化還元電位 ( $E^0$ ) は、HT Cyt  $c_{552}$  で +10mV、HH Cyt  $c$  で +40mV であり、それぞれの  $E^0$  の差はこれらのタンパク質で報告されている値 (Ueyama *et al.* (1996)) と一致した。一方、PA Cyt  $c_{551}$  および Cyt  $c_{551}$  mutant の  $E^0$  は、CV の電流変化から +100mV - +200mV であると見積もられた。また、耐熱性シトクロム  $c$  の  $E^0$  は著しい温度依存性を示すことが報告されている (Taniguchi *et al.* (1996))。この結果は、上述したヘム-Met 配位結合の温度依存性に関して構造化学的に解釈可能であると考えられる。また、本研究で用いた Cyt  $c$  の  $E^0$  の比較から、ヘム-Met 配位結合は Cyt  $c$  の  $E^0$  の調節にも重要であることが明らかとなった。

**結論** HT Cyt  $c_{552}$  のヘム-Met 配位結合は大きな温度依存性を示すことが示唆された。ヘムはこのタンパク質の熱安定性に寄与しているが、Met は分子表面のループ部分に存在するため、熱運動による構造変化の影響を比較的大きく受けることが考えられる。また、HT Cyt  $c_{552}$  のヘムメチルプロトンシグナルの異常な温度依存性より、この Cyt  $c$  のヘムの電子構造への励起状態の寄与が示唆された。

**謝辞** 本研究は文部科学省科学研究費補助金特定領域研究 (A)「強相関ソフトマテリアルの動的制御」(No. 413/13031005)により行われている。

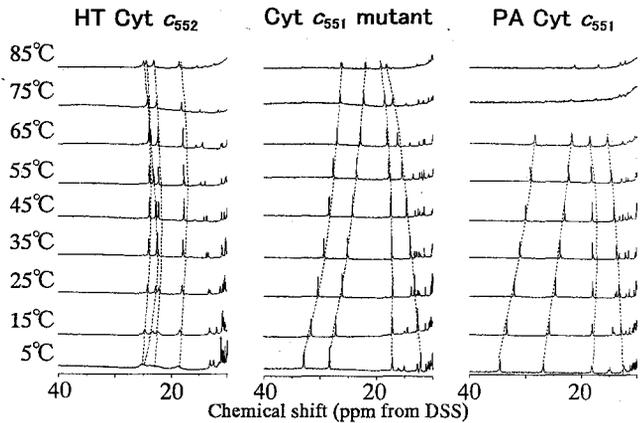


Fig. 2 Temperature dependence of downfield portions of 600MHz  $^1H$  NMR spectra of oxidized cytochromes  $c$ . The corresponding heme methyl proton signals are connected by a broken line.

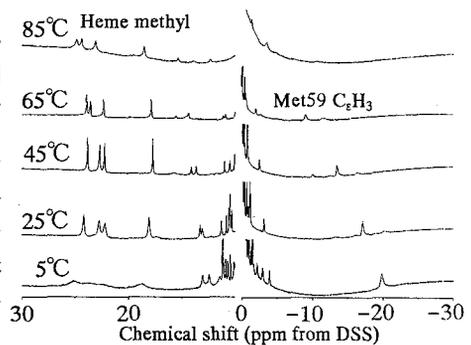


Fig. 3 Temperature dependence of  $^1H$  NMR spectra of oxidized HT Cyt  $c_{552}$ . Heme methyl proton signals are broadened at 5°C. The side chain protons of axial Met exhibit a large downfield shift with decreasing temperature.

フッ素化ヘムをもつヘムタンパク質の <sup>19</sup>F NMR 緩和および常磁性シフトの解析

(筑波大学化学系<sup>1</sup>、長岡工業高等専門学校<sup>2</sup>、日本ブルカー<sup>3</sup>、旭硝子 中研<sup>4</sup>)  
 平井佑紀<sup>1</sup>、○長尾 聡<sup>1</sup>、照井教文<sup>1</sup>、亀田恒徳<sup>1</sup>、山本泰彦<sup>1</sup>、鈴木秋弘<sup>2</sup>、  
 井町美佐子<sup>3</sup>、笹倉英史<sup>4</sup>

<sup>19</sup>F NMR Relaxation and Paramagnetic Shift Analysis of Hemoproteins Reconstituted with Ring-fluorinated Heme

Y. Hirai<sup>1</sup>, O.S. Nagao<sup>1</sup>, N. Terui<sup>1</sup>, T. Kameda<sup>1</sup>, Y. Yamamoto<sup>1</sup>, A. Suzuki<sup>2</sup>, M. Imachi<sup>3</sup> and H. Sasakura<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>Dept. of Materials Eng., Nagaoka Natl. Coll. of Tech.,  
<sup>3</sup>Bruker Japan and <sup>4</sup>Reserch Center, Asahi Glass Co., Ltd.

The <sup>19</sup>F NMR spectral properties of ring-fluorinated hemes and porphyrins (Fig. 1) were studied. The fluorine atoms are directly bound to the porphyrin ring in 2-MF and 3,7-DF, and they are connected to the ring via carbon atom in 7-PF. In order to investigate the contribution of chemical shift anisotropy (CSA) to the relaxation of <sup>19</sup>F NMR signals of 3,7-DF and 7-PF, their spectra were observed at two field strength and analysed in terms of Eqs. (1) - (4), because the CSA term is proportional to the square of magnetic field strength as given in Eq. (3). The comparison of the field-dependent line width of signals between 3,7-DF and 7-PF clearly manifested that the CSA contribution to the nuclear relaxation in the latter is substantially smaller than that in the former due to rapid rotation of CF<sub>3</sub> group around C-C single bond.

序論 ミオグロビン(Mb)、ヘモグロビン(Hb)、セイヨウワサビペルオキシゲナーゼ(HRP)などのb型ヘムタンパク質は活性部位としてヘム(鉄-ポルフィリン錯体)をもっているが、ヘムとタンパク質の間には共有結合がないのでヘムを除去してアポタンパク質を調製することができる。このアポタンパク質にフッ素原子を側鎖にもつフッ素化ヘム(Fig. 1)を加えると、フッ素化ヘムはタンパク質内部に取り込まれ、再構成ヘムタンパク質が得られる。

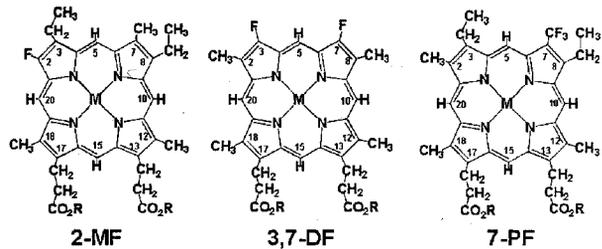


Fig. 1 Molecular structure of ring-fluorinated porphyrins and hemes used in the study. Porphyrin; M = 2H, R = CH<sub>3</sub>. Heme; M = Fe<sup>2+</sup> or Fe<sup>3+</sup>, R = H.

このようにして得られた再構成ヘムタンパク質は活性部位であるヘムに直接結合したフッ素原子をもつため、<sup>19</sup>F NMR により活性部位の構造化学的研究が可能となる。本研究では、フッ素化ヘムの錯体やフッ素化ヘム再構成ヘムタンパク質で観測される<sup>19</sup>F NMR シグナルの緩和機構および常磁性シフトについて検討した。

ヘムの中心金属である鉄は酸化数とスピン状態により不対電子をもつ場合がある。ヘム鉄に不対電子が存在する常磁性の状態では、核磁気の緩和において反磁性緩和機構に加えて常磁性緩和機構が作用する。したがって、観測される緩和速度 R<sub>obs</sub> (緩和時間の逆数)は次式のように表される。

$$R_{obs} = R_{dia} + R_{para} \quad (1)$$

ここで、R<sub>dia</sub> は反磁性錯体における緩和速度、R<sub>para</sub> は常磁性緩和の寄与である。一方、ポルフィリン環のように化学シフト異方性(CSA)の大きな系では、反磁性緩和機構において CSA による寄与が無視できない。

$$R_{dia} = R_{Dipole} + R_{CSA} + R_{etc.} \quad (2)$$

ここで、R<sub>Dipole</sub> は双極子-双極子相互作用による寄与、R<sub>CSA</sub> は CSA による寄与、R<sub>etc.</sub> はその他による寄与である。このうち、横緩和速度への CSA の寄与 R<sub>2CSA</sub> は次式のように共鳴周波数 ω<sub>1</sub> の二乗に比例する。

$$R_{2CSA} = 1/40 \cdot \omega_1^2 \delta_z^2 (3J(\omega_1) + 4J(0)) \quad (3)$$

$$J(\omega_1) = 2\tau_r / (1 + \omega_1^2 \tau_r^2) \quad (4)$$

そこで、様々な磁場強度の分光計を用いてポルフィリンの<sup>19</sup>F NMR シグナルの線幅を測定し、線幅から横緩和速度を求めることにより緩和速度の磁場強度依存性を求めることができる。緩和速度の磁場強度依存性が大きいほど、そのポルフィリンのフッ素は大きな CSA の影響を受けていることがわかる。

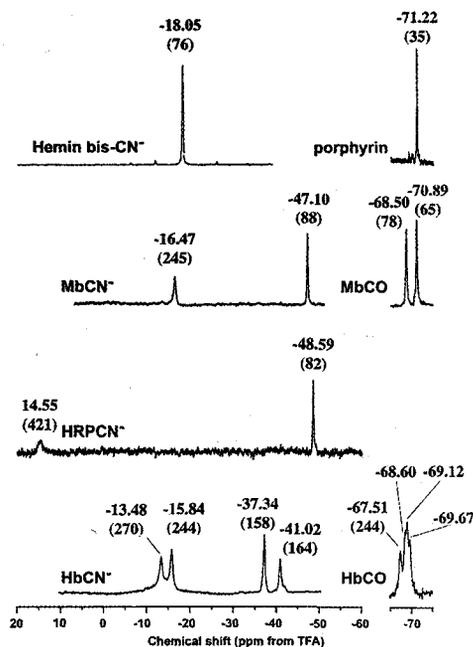
Keyword : <sup>19</sup>F NMR, 化学シフト異方性、常磁性 NMR, フッ素置換ヘム、ヘムタンパク質  
 ひらいゆうき、ながおとし、てるいのりふみ、かめたつねのり、やまもとやすひこ、いまちみさこ、ささくらひでし

**結果および考察** 3,7-DF ポルフィリン、3,7-DF ビスシ  
 アノ体、反磁性および常磁性 3,7-DF 再構成 Mb、HRP、  
 Hb の 376MHz  $^{19}\text{F}$  NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。反  
 磁性であるポルフィリン、Mb(CO)、Hb(CO)のシグナルの  
 シフト値は、それぞれの状態でのポルフィリン $\pi$ 共役  
 系の電子構造を鋭敏に反映している (*Bull. Chem. Soc.*  
*Jpn.*, **73**, 2309-2316 (2000), *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**,  
 455-462 (2000))。また、シグナルの線幅は、35Hz(ポル  
 フィリン; Mw=0.6k)、65、78Hz(Mb(CO); Mw=17k)、  
 244Hz(Hb(CO); Mw=64k)であり、分子量の増大と共に  
 顕著に増加している。反磁性錯体での  $T_2$  緩和機構に  
 おける CSA 以外の寄与の磁場強度依存性が無視でき  
 ると仮定すると、式(3)のように CSA が磁場強度の二乗  
 に比例するという関係を基に複数の磁場強度において  
 観測されたシグナルの線幅を比較することでフッ素原子  
 の受けている CSA の寄与を直接決定することが可能  
 となる。565MHz  $^{19}\text{F}$  NMR スペクトルの 3,7-DF ヘムと再  
 構成した Mb(CO)シグナルの線幅は低磁場側から 119、  
 134Hz であり、磁場強度に大きく依存することがわかる。  
 この結果は、3,7-DF ヘムおよびポルフィリンで観測され  
 るシグナルの  $T_2$  緩和機構への CSA による寄与の大きさを  
 反映している。一方、7-PF ポルフィリンに由来するシ  
 グナルの線幅は、4Hz(376MHz)および 5Hz(565MHz)で  
 あり、磁場依存性がほとんど観測されなかった。この結  
 果は、7-PF のフッ素の受ける CSA が小さいことを示して  
 いるが、i) このフッ素は  $\text{sp}^3$  炭素に導入されている、ii)  
 $\text{CF}_3$  基は C-C 単結合まわりに高速回転する、iii) 2-MF  
 や 3,7-DF のフッ素に比べてポルフィリン環から遠いためポルフィリン環の環電流効果による磁氣的異方性の  
 影響が少ない、などの理由から、当然の帰結であると考えられる。

一方、常磁性錯体および常磁性ヘムタンパク質において観測されるシグナルの  $T_2$  緩和機構には、反磁性錯  
 体における寄与に加えて、式(1)に示されるような常磁性緩和機構の内容としてキュリースピン緩和、コンタ  
 クト項、擬コンタクト項を考慮する必要がある。常磁性シフトした  $^{19}\text{F}$  NMR シグナルのシフト値を、フルオロ基または  
 トリフルオロメチル基と同一のピロール環に結合しているメチル基のプロトンシグナルで観測される常磁性シフト  
 と組み合わせることで解析することにより、そのピロール環の不对電子密度についての情報を容易に得ることができ  
 る。したがって、反磁性錯体での緩和機構、不对電子密度が関係するコンタクト項、擬コンタクト項をそれぞれ  
 決定することにより、キュリースピン緩和を見積もることが可能となる。

## 結論

フッ素化ヘムで観測される  $^{19}\text{F}$  NMR シグナルの緩和機構では、反磁性錯体、常磁性錯体を問わず CSA の  
 寄与が無視できないことが明らかになった。ただし、その寄与の大きさは、フッ素原子の導入様式、磁場強度、  
 温度、錯体の分子量、ヘム鉄のスピン状態などに依存する。たとえば、2-MF、3,7-DF のように、ポルフィリン環  
 に直接フッ素を導入した場合には、全体の緩和速度に対する CSA の寄与が反磁性錯体では 80%以上、常磁  
 性の場合には最大 50%程度であると推測された。したがって、2-MF や 3,7-DF 再構成ヘムタンパク質の  $^{19}\text{F}$   
 NMR スペクトルは高磁場でシグナルの線幅が著しくブロードニングする場合があると予想される。一方、7-PF  
 と 3,7-DF の磁場強度依存性の比較から明らかのように、タンパク質の機能と構造に与える影響が小さい場合  
 には、 $\text{CF}_3$  基としてフッ素をもつヘムを利用するほうが高磁場での  $^{19}\text{F}$  NMR によるフッ素化ヘム再構成タンパク  
 質のシグナルの観測には都合がよいと言える。また、常磁性錯体の場合には、シグナルの磁場強度依存性お  
 よび不对電子密度の解析から、分子運動と密接な関係にあるキュリースピン緩和の寄与が決定できる。



**Fig. 2** 376MHz  $^{19}\text{F}$  NMR spectra of 3,7-DF porphyrin, hemin bis-CN<sup>-</sup> and reconstituted hemoproteins, observed at 25°C. Chemical shifts and linewidth are indicated nearby each signals and in the parentheses, respectively. The spectra of paramagnetic and diamagnetic derivatives are shown in left and right columns, respectively.

酵素の活性, 耐熱性, 構造, Dynamics の関係:  
イヌミルクリゾチームに対する  $\text{Ca}^{2+}$ -binding の効果

(産総研<sup>1</sup>、北大院・理<sup>2</sup>、バリアンジャパン<sup>3</sup>)

○小橋川敬博<sup>1,2</sup>, 久米田博之<sup>1,2</sup>, 三浦和紀<sup>1</sup>, 根本暢明<sup>3</sup>,  
小柴琢己<sup>2</sup>, 出村誠<sup>2</sup>, 新田勝利<sup>2</sup>, 津田栄<sup>1</sup>

Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ -binding to Enzymatic Activity, Structure, Backbone Dynamics and Thermal Stability of Canine Milk Lysozyme

Yoshihiro Kobashigawa<sup>1,2</sup>, Hiroyuki Kumeta<sup>1,2</sup>, Kazunori Miura<sup>1</sup>, Nobuaki Nemoto<sup>3</sup>,  
Takumi Koshiba<sup>2</sup>, Makoto Demura<sup>2</sup>, Katsutoshi Nitta<sup>2</sup>, Sakae Tsuda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Structural Biology Research Group, Research Institute of Biological Resources,  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST).

<sup>2</sup>Division of Biological sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University.

<sup>3</sup>Varian Technologies Japan Ltd.

Canine milk lysozyme (denoted as CML) catalyses the hydrolysis of  $\beta$ -1,4 glycoside linkage at the bacterial cell wall. This member of lysozyme tightly bind 1 mol of  $\text{Ca}^{2+}$ -ion, which significantly increases its thermal stability. We examined detailed  $\text{Ca}^{2+}$ -induced change of CML. It appeared that CML increases the activation energy, bacteriolytic activity and the optimum temperature, and decreases the binding and release rates for a substrate and product analogue according to  $\text{Ca}^{2+}$ -binding. The backbone dynamics on the fast (pico- to nanosecond) time-scale is not influenced by  $\text{Ca}^{2+}$ -binding through the molecule, while significantly reduced at two of six substrate-binding subsites. The backbone dynamics of  $\text{Ca}^{2+}$ -bound CML in the slow (micro- to millisecond) time-scale is significantly depressed in the substrate-binding region. These results suggest that  $\text{Ca}^{2+}$ -binding reduces the flexibility of the active site, which presumably results in improvement of thermal stability at the expense of substrate-binding and product-release rates.

**【緒言】**リゾチームは細菌の細胞壁の構成成分である *N*-acetylglucosamine と *N*-acetylmuramic acid の間の  $\beta$ -1,4 glycoside の加水分解反応を触媒する酵素である。イヌミルクリゾチーム (Canine Milk Lysozyme: CML) は 1 個の  $\text{Ca}^{2+}$  を結合し、それにより熱安定性が向上することが知られている<sup>(1)</sup>。我々は、CML に対する  $\text{Ca}^{2+}$  結合の効果についてより詳細に知るために (1) 溶菌活性の温度依存性、(2) 立体構造、(3) 主鎖の内部運動性、(4) 基質および反応生成物の類似体である *p*-aminophenyl-tri-*N*-acetyl- $\beta$ -chitotrioside (PAP-tri-NAG) に対する結合および解離速度を  $\text{Ca}^{2+}$ -free および  $\text{Ca}^{2+}$ -bound state について調べた。それらの結果から、酵素活性、内部運動性、耐熱性の相関を立体構造に基づいて議論した。

**【実験】**CML は大腸菌体内に不溶性顆粒として発現させ、Disulfide Isomerase の 1 種である Thioredoxin を用いて巻き戻し反応を行った<sup>(2), (3)</sup>。NMR スペクトルの測定には Varian Unity-INOVA500 を用いた。帰属は pH 4.5, 20°C, 10% 重水中において測定した一連の多次元 NMR スペクトル群を用いて行った。主鎖の内部運動性は <sup>15</sup>N-relaxation を model-free を用いて解析することにより求めた。NMR データの処理には NMRpipe を用い、スペクトルの解析には XEASY, PIPP, STARP, CAPP のプログラム群を用いた。

**【結果と考察】**図 1 は  $\text{Ca}^{2+}$ -free CML (X-ray)<sup>(1)</sup> と  $\text{Ca}^{2+}$ -bound CML (NMR) の重ねあわせ構造を示している。2 つの状態間で基本構造の変化は見られなかった。基本構造は 4 本の  $\alpha$ -helix と 3 本の  $\beta$ -sheet から形成されており、cleft により 2 つのドメインに分かれている。

表 1 は CML の酵素活性のパラメーターを示している。 $\text{Ca}^{2+}$  の結合により耐熱性および酵素反応の至適温度が上昇した。また、PAP-tri-NAG に対する結合速度と解離速度の低下、および基

Key words:  $\text{Ca}^{2+}$ -binding, <sup>15</sup>N-relaxation, dynamics, enzyme, lysozyme

こばしがわ よしひろ, くめた ひろゆき, みうら かずのり, ねもとのぶあき, こしば たくみ,  
でむら まこと, にった かつとし, つだ さかえ

質結合領域での遅いタイムスケール( $\mu\text{s} \sim \text{ms}$ )の内部運動性の低下が観測された。多くの酵素において、基質結合部位周辺の遅いタイムスケールの内部運動が基質結合および生成物解離を促すことが示されており、本研究結果はそれと一致していた。また、速いタイムスケール( $\text{ps} \sim \text{ns}$ )の内部運動性に関しては、6つある基質結合サブサイトのうち2つで低下したものの、分子全体ではあまり変化していなかった。ここまでの結果

は、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合により基質結合部位周辺の内部運動性が低下し、それが酵素活性を下げる方向に作用していることを示唆している。しかしながら、実際には溶菌活性は  $\text{Ca}^{2+}$ の結合により向上していた。多くの抗菌蛋白質において蛋白質の正電荷と細菌表面の負電荷との静電相互作用が活性発現において必須因子の一つであることが示されている。 $\text{Ca}^{2+}$ 結合に伴う正電荷の増加が酵素と細菌表面との相互作用を強め、それにより溶菌活性が上がったと考えられる。

以上の結果より、 $\text{Ca}^{2+}$ の結合は CML の構造よりもむしろ内部運動性の方に影響を与えることが明らかになった。そして、内部運動性への影響は分子全体に対して均一というよりもむしろ局所的に起こることが明らかになった。その分子運動の低下は主に基質結合領域に集中しており、それが CML の耐熱性の向上、基質結合速度および生成物解離速度の低下に関わっていることが示唆された。

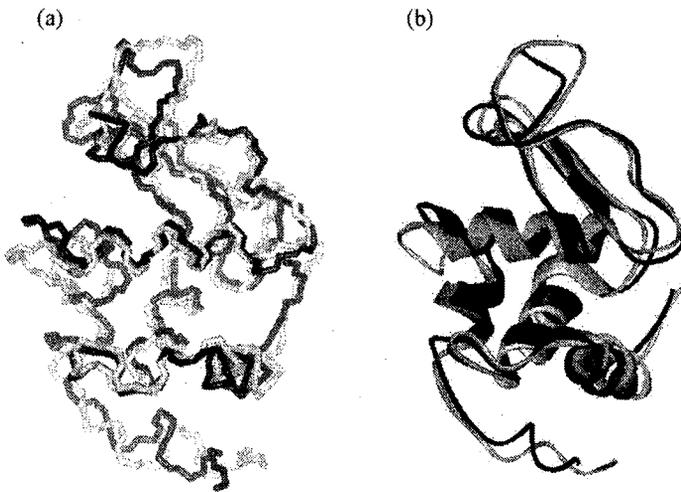


図 1: Superimposition of the structures of  $\text{Ca}^{2+}$ -bound (black) and  $\text{Ca}^{2+}$ -free CML (gray).

表 1: Enzymatic characterization of  $\text{Ca}^{2+}$ -free and  $\text{Ca}^{2+}$ -bound CML.

	$\text{Ca}^{2+}$ -free CML	$\text{Ca}^{2+}$ -bound CML
Activation Energy (kJ/mol/K)	41.6	50.4
Optimum Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	35	50
Relative Activity at 30 $^{\circ}\text{C}$ (%)	46	100
$k_{\text{on}}$ (1/s)	$8.80 \times 10^2$	$4.02 \times 10^2$
$k_{\text{off}}$ (1/s)	$2.69 \times 10^{-3}$	$1.24 \times 10^{-3}$
Melting Temperature <sup>(1), (3)</sup> ( $^{\circ}\text{C}$ )	39.01	65.13

## 参考文献

- [1] Koshiba et al. Structure and theramodynamics of the extraordinary stable molten globule state of canine milk lysozyme. *Biochemistry*, **39**, 3248-3257 (2000).
- [2] Kobashigawa et al. Hydrogen Exchange Study of Canine Milk Lysozyme: Stabilization Mechanism of the Molten Globule. *Proteins. Struct. Funct. Genet.*, **40**, 579-589 (2000).
- [3] Koshiba et al. Expression of a Synthetic Gene Encoding Canine Milk Lysozyme in Escherichia coli and Characterization of the Expressed Protein. *Protein. Eng.*, **12**, 429-435 (1999).

## 安定同位体ラベルしたペプチドの発現系の改良

(群馬大・工<sup>1</sup>、CREST・JST<sup>2</sup>、三菱化学生命研<sup>3</sup>)○田所大<sup>1</sup>、鈴木千紗<sup>1</sup>、落合研次<sup>1,2</sup>、野口真路<sup>1,2</sup>、林和彦<sup>1</sup>、  
窪田健二<sup>1</sup>、須貝真理子<sup>3</sup>、河野俊之<sup>3</sup>、若松馨<sup>1,2</sup>

Improvement of an expression system for stable isotope-labeled peptides

(<sup>1</sup>Gunma Univ., <sup>2</sup>CREST JST, <sup>3</sup>Mitsubishi Kagaku Inst. Life Sci.)<sup>1</sup>Tadokoro, D., <sup>1</sup>Suzuki, C., <sup>1,2</sup>Ochiai, K., <sup>1,2</sup>Noguchi, S., <sup>1</sup>Hayashi, K., <sup>1</sup>Kubota, K.,<sup>3</sup>Sugai, M., <sup>3</sup>Kohno, T., <sup>1,2</sup>Wakamatsu, K.

Uniform labeling with <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C of peptides is quite useful for detailed structure analysis of short peptides, and labeled peptides can be obtained as fusion proteins with ubiquitin expressed in *E. coli* cells. Some peptide-ubiquitin fusion proteins, however, are not expressed at all or at a very low amount, due to toxicities of the peptide portion, under labeling conditions. Here we report that such toxic peptides can be expressed at a reasonable amount in *E. coli* cells by choosing appropriate host strains and culture media.

## [要旨]

ペプチドを <sup>15</sup>Nや <sup>13</sup>Cでラベルし多核多次元NMRで解析すると短いペプチドの立体構造を詳細に解析できるようになる。安定同位体でラベルしたペプチドはユビキチンとの融合蛋白質として大腸菌で発現できるが、ペプチドによってはその毒性のために融合蛋白質の発現レベルが低かったり、ラベル条件下で全く発現しない物も存在する。今回、ホスト大腸菌や培地条件などを検討することによって従来発現が困難であったペプチドが調製できるようになったので報告する。

## [方法および結果]

## 1. ホスト大腸菌の検討 1 (basalな発現の抑制)

大腸菌における外来蛋白質の発現にはT7ファージのRNA polymerase (RPase)の強い転写活性を利用したT7発現系が頻用されており、ペプチドとユビキチンの融合蛋白質もこのT7系で発現している。T7 RPase自体は大腸菌のchromosomeに組み込んだDE3 lysogenによって発現され、プラスミドに組み込んだ目的遺伝子の5'上流にあるT7/lac promoterにT7 RPaseが結合することによって転写・翻訳が開始される。T7 RPaseの発現もIPTGで誘導されるが、IPTG非存在下での発現抑制は厳密ではなく、basalに少量のT7 RPaseが生産されている。そこで、融合蛋白質として発現させるペプチドがマガイニン2などのように毒性を持っている大腸菌に与える負荷が大きい場合、発現誘導前にbasalに発現されている蛋白質によって大腸菌の増殖が抑制されて融合蛋白質の発現量が低下する。

---

キーワード： 安定同位体ラベル、ペプチド、発現系、codon usage

たどころ だい、すずき ちさ、おちあい けんじ、のぐち しんじ、はやし かずひこ、くぼた けんじ、すがい まりこ、こうの としゆき、わかまつ かおり



立体選択的重水素化グリシンの蛋白質 NMR への応用  
(CREST<sup>1</sup>, 都立大<sup>2</sup>, 理研 GSC<sup>3</sup>)

○大木進野<sup>1</sup>, 小野明<sup>1</sup>, 寺内勉<sup>1</sup>, 瀧上和幸<sup>2</sup>, 早野俊哉<sup>1,3</sup>, 甲斐荘正恒<sup>1,2</sup>

Application of Stereospecific-deuterated Gly to Protein NMR  
(CREST<sup>1</sup>, Tokyo Metropolitan Univ.<sup>2</sup>, and RIKEN GSC.<sup>3</sup>)

*S. Ohki<sup>1</sup>, A.M. Ono<sup>1</sup>, T. Terauchi<sup>1</sup>, K. Fuchigami<sup>2</sup>, T. Hayano<sup>1,3</sup>, and M. Kainosho<sup>1,2</sup>*

Two kinds of glycine, in which one of the two protons at the C $\alpha$  position is selectively replaced by a deuteron, were chemically synthesized. Each amino acid was incorporated into the 18.2kDa protein, peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase b (EPPIb), using *in vitro* protein expression system with a cell-free extract prepared from *E.Coli* A19. Well-resolved <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC spectra of the labeled proteins were obtained. The utility of stereospecific-deuterated Gly will be discussed in this presentation.

[序] 近年の蛋白質 NMR 構造の決定に関わる重水素の利用は、主として線幅の減少と NMR スペクトルの単純化を目的としている。これらは NMR で研究対象にできる蛋白質の分子量限界を引き上げようとする目標と深く関連している。このような研究を通じて、蛋白質の非選択 (random-fractional) 重水素化や疎水残基側鎖のみのプロトン化など幾つもの方法が提案されてきた。しかしながら、蛋白質のポリペプチド鎖の立体配座を決定する上で重要な Gly 残基に関しては、立体選択的帰属への重水素利用は幾つか報告されてはいるものの、試料調製の際の Gly-Ser 間の代謝変換の制御を含めた効果的な Gly 残基の標識方法はこれまで開発されていない。Gly 残基を含む主鎖の立体配座を決定するためには、Gly の  $\alpha$  位メチレン・プロトン由来の構造情報を立体選択的に入手する必要がある。言うまでも無く、Gly の 2 つの  $\alpha$  位プロトンが異なる化学シフトを持ち、それらに関する NOE 情報が独立に得られたとしても、立体特異的な信号の

立体選択的重水素化、無細胞蛋白質発現系、立体特異的帰属、  
スペクトル単純化。

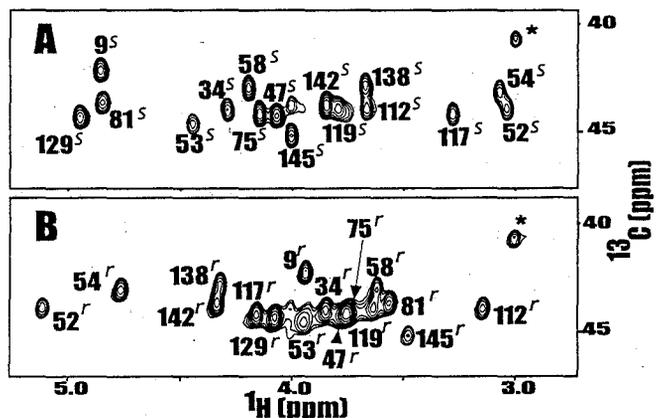
おおきしんや、おのあきら、てらうちつとむ、ふちがみかずゆき、  
はやのとしや、かいのしょうまさつね。

帰属が確実に行われない限り立体構造情報としては有用なものとはなりえない。 $^3J_{\text{HNHC}\alpha}$  値を利用して Gly 残基を含む主鎖 2 面角 ( $\phi$ ) 情報を得る場合にも、他のアミノ酸残基と異なり Gly 残基の  $\alpha$  位がメチレンであることが決定的な障害となる。既に我々は, *in vivo* アミノ酸代謝を積極的に利用してこれらの問題を解決する試みを本討論会で報告しているが、この方法では標識率の大幅な低下は避けられなかった (文献 1)。本報告では、無細胞蛋白質合成系を用いて代謝拡散・希釈を完全に押さえた蛋白質中の Gly 残基の立体選択的重水素化と得られた標識蛋白質からの NMR 情報の取得に関して述べる。

[試料]  $C_{\alpha}$  位置の 2 つのプロトン (*pro-R* 及び *pro-S*) をそれぞれ立体選択的に重水素化した  $ul\text{-}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]\text{-Gly}$  を化学合成した。これら 2 種類の Gly をそれぞれ取り込ませた大腸菌由来の蛋白質, peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase b (EPPIb, 18.2kDa), を無細胞蛋白質合成系を用いて調製した。

[結果と考察] 得られた 2 種類の蛋白質の  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルを測定した (図 1)。これらのスペクトルは大幅に単純化され,  $ul\text{-}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]\text{-Gly}$  で標識した EPPIb のスペクトルに比較して  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}\alpha$  領域に現れる信号の数が半分になった。その結果, EPPIb の 16 個の Gly 残基の信号を全て分離して観測することができた。また, 2 種類の試料を用いて得られるスペクトルを合わせて解析することにより, Gly 残基周囲の構造情報に関して確実な立体化学的区別が可能となる。例えば, Gly 残基の 2 つの  $\alpha$  位プロトンに関して独立な NOE 情報をそのまま構造計算に利用できることを意味しており, 本手法が構造決定の迅速化と同時に精密化にも有用であることは明らかである。

図 1. Gly 選択標識した EPPIb の  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル。それぞれ *pro-R* (A), *pro-S* (B) のみを立体選択的重水素化。スペクトル内の数字は残基番号, \* は impurity.



[参考文献] (1) 楯真一, 山口絵美, 市川代志子, 甲斐荘正恒. 第 35 回 NMR 討論会要旨集 (1996), pp. 461-464.

HMG-2 AドメインのNMRによる立体構造解析

(北陸先端大・新素材センター<sup>1</sup>、東京理大・基礎工<sup>2</sup>)

○栗田順一<sup>1</sup>、仲谷幸司<sup>1</sup>、島原秀登<sup>1</sup>、吉田充輝<sup>2</sup>、楯真一<sup>1</sup>

Structural Study of the A-Domain of the HMG2 protein by NMR spectroscopy

Jun-ichi Kurita<sup>1</sup>, Kouji Nakatani<sup>1</sup>, Hideto Shimahara<sup>1</sup>, Mitireru Yoshida<sup>2</sup>, Shin-ichi Tate<sup>1</sup>

Center for New Material, Japan Advanced Institute of Science and Technology<sup>1</sup> (JAIST),

Department of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo<sup>2</sup>

**Abstract**

HMG2 belongs to the HMG1/2 subfamily and its characteristic functional motif to DNA binding is called as an HMG-1/2 box or simply HMG box. HMG1 and HMG2 are closely related archetype members of the HMG1/2 subfamily but they show significant functional differences in cell metabolisms. Both HMG1 and HMG2 have two HMG boxes, called as A-domain and B-domain. The solution structures of A and B-domain of the HMG1 and B-domain of the HMG2 were already solved by NMR spectroscopy in several previous studies. Therefore, structure determination of the A-domain of the HMG2 must be needed to discuss functional differences between HMG1 and HMG2 in the cause of structure differences. In this study, the structure of the A-domain of the HMG2 is determined by NMR spectroscopy.

**Introduction**

HMG2 is a member of a family of ubiquits and abundant non-histone nuclear proteins known as the high-mobility-group (HMG) proteins. HMG2 belongs to the HMG-1/2 subfamily and its characteristic functional motif to DNA binding is called as an HMG-1/2 box or simply HMG box. HMG2 has two HMG boxes, A and B, linked by a short basic region to an acidic C-terminal tail domain. Each HMG box may perform an architectural role in chromatin and bind to DNA without sequence specify but with preference for distorted or pre-bent DNA. The solution structures of the two HMG-boxes in HMG1 solved by NMR, both having shown distinctive L-shaped structures of comprising three  $\alpha$ -helices. HMG1 and HMG2 are closely related archetype members of the HMG1/2 subfamily but they show significant functional differences in cell metabolisms. We have studied these differences between HMG1 and HMG2 in the field of structural biology. In our previous study, we already determined the solution structure of the B-domain of the HMG2. This time, we will present structure of the A-domain of the HMG2 and discuss the functional differences in the cause of structural differences.

**Keywords:** HMG protein, NMR, protein structure

くりたじゅんいち、なかたにこうじ、しまはらひでと、よしだみちてる、たてしんいち

## Experiment

[Non-stable-isotope-nuclei labeled], [ $^{15}\text{N}$ -uniform labeled] and [ $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -uniform labeled] HMG2A (C22S) was prepared with *E.coli* (*BL21*) protein expression system and purified in conventional ways.

Back-borne and side-chain NMR signals were assigned with three or two dimensional NMR experiments which are HNCACB, HNC(O), HNCA, CBCACONH, HCCH-COSY, HCCH-TOCSY and so on.

Distance restraints were generated from NOE intensities of the  $^{15}\text{N}$ -edited NOESY-HSQC,  $^{13}\text{C}$ -edited NOESY-HSQC and NOESY spectrum. The protein structure was determined by Program X-PLOR 3.851 and ARIA 1.0 with restrained molecular dynamics.

## Result and Discussion

The back-born rmsd of the 41 refinement structure which are determined with program X-PLOR is 0.49 Å (fig 1). In the structure detail, it has characteristic three  $\alpha$ -helices, which is called as an HMG-box motif. And, its helix arrangement resembles closely that of the HMG-1A.

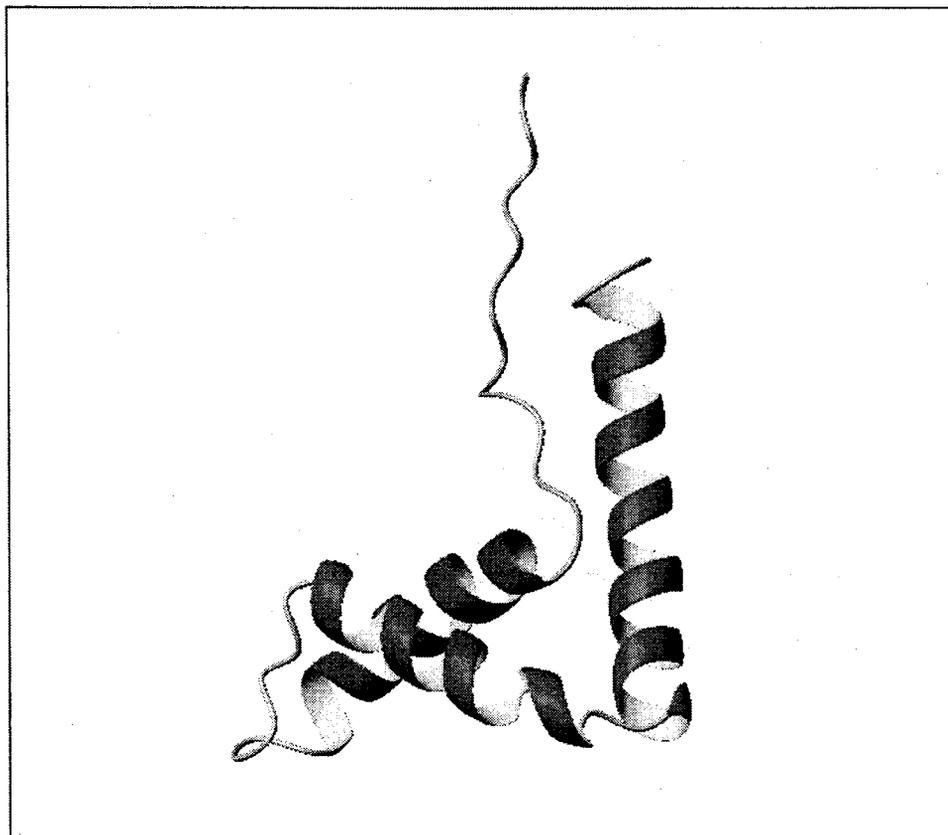


Fig.1 Structure of the A domain of the HMG2

In our previous structural study of the B-domain of the HMG2, we had presented that helix arrangement of the B-domain of the HMG2 resemble to not only that of the B-domain of the HMG1 but also that of the A-domain of the HMG1. In detail, most important particular of the HMG-box motif is the second helix and its bending form to bind DNA. Because the second helix locate surface and interact to DNA. However, to compare trifling differences of the second helix bending is difficult due to artifitial influence cannot be disregarded from restrained molecular dynamics. Thereupon, to detect trifling differences of helix bending, we employ two type directional cosine value of the N-H bond vector of the back-borne to diffusion axis as index value. To employ directional cosine value, the helices bending can be characterized without artificial influence that is generated from restrained molecular dynamics (fig2, 3). As the results of these analyses, we conclude that B-domain of the HMG2 like to A-domain of the HMG1. In this study, we prove that A-domain of the HMG2 resembles closely that of the HMG-1A with above method.

### **Conclusion**

For above discussions, HMG1 has two DNA binding domains that are A-domain-like and B-domain-like domains. And HMG2 has also two DNA binding domains, but both domains are A-domain-like domains. It has been widely known that HMG2 shows more preferential affinity to negatively super-coiled DNA than HMG1 and A-domain of the HMG1 shows more preferential affinity to negatively super-coiled DNA than B-domain of the HMG1. Therefore, we conclude that more preferential affinity of the HMG2 to negatively super-coiled DNA due to HMG2 has two A-domain-like HMG boxes.

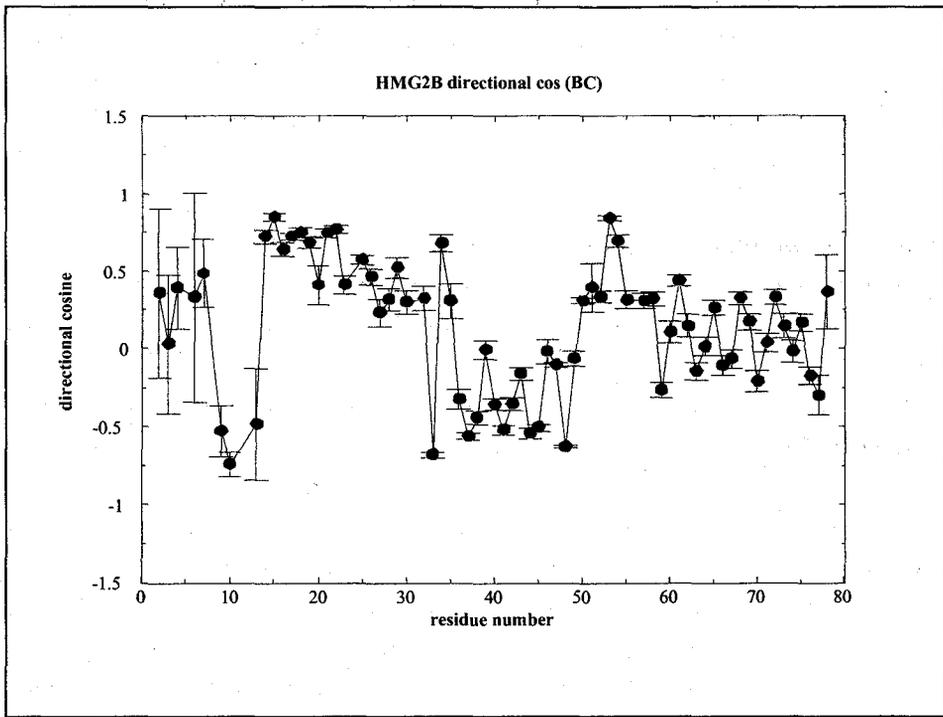


Fig 2. Directional cosine profile of the B-domain of the HMG2 in bicelle

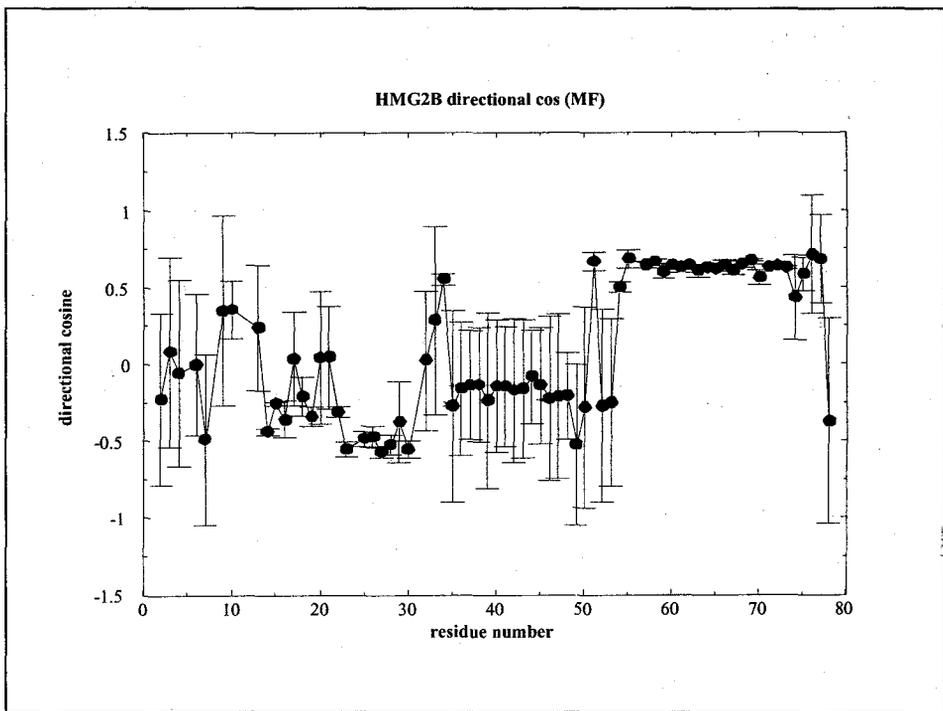


Fig 3. Directional cosine profile of the B-domain of the HMG2 in molecular frame

## DinI 蛋白質による RecA 蛋白質活性の制御機構に関する研究

(<sup>1</sup>理研・遺伝生化学, <sup>2</sup>埼玉大学大学院理工学研究科, <sup>3</sup>横浜市大・院総合理  
<sup>4</sup>CREST/JST)

○吉益雅俊<sup>1,2,3,4</sup>, 伊藤隆<sup>1,3,4</sup>, 本多賢吉<sup>1,3,4</sup>, 斎藤雅子<sup>1,3,4</sup>, 美川務<sup>1,3,4</sup>  
 柴田武彦<sup>1,2,3,4</sup>

## Analysis of the regulation of RecA activity by DinI protein.

<sup>1</sup>Cellular and Molecular Biology Laboratory, RIKEN; <sup>2</sup>Grad. Schl. Sci. Eng., Saitama Univ.; <sup>3</sup>Grad. Schl. of Integrated Science, Yokohama City Univ.; <sup>4</sup>CREST, JST (Japan Science and Technology)

○Masatoshi Yoshimasu<sup>1,2,3,4</sup>, Yutaka Ito<sup>1,3,4</sup>, Masayoshi Honda<sup>1,3,4</sup>, Masako Saito<sup>1,3,4</sup>, Tsutomu Mikawa<sup>1,3,4</sup> and Takehiko Shibata<sup>1,2,3,4</sup>.

DinI protein negatively regulates the SOS response in *Escherichia coli* by inhibiting activities of RecA. The solution structure of DinI was already determined by NMR spectroscopy. DinI consists of two  $\alpha$ -helices and a three-stranded  $\beta$ -sheet, with a bipolar character in the electrostatic potential at the protein surface. The NMR experiments suggested that DinI tightly binds to intact RecA. For the determination of DinI-interaction surface on RecA, we performed NMR titration experiments of <sup>15</sup>N-DinI in the presence of either N-, central or C-terminal domain of RecA. The C-terminal domain failed to reveal any DinI-binding so far. In addition, we will report the relationship of DinI-binding and ssDNA-binding activities of RecA based on the analysis of TRNOE experiments of RecA-DinI complex with various length of ssDNA.

<序>

DinI は, DNA の損傷によって誘導される大腸菌の SOS 応答に働く蛋白質のひとつである. SOS 応答は単鎖 DNA に結合した RecA が LexA リプレッサーの自己消化反応を促進することにより誘起される. DinI はこの自己消化反応を抑えることにより SOS 応答を抑制的に制御する働きを持つと考えられている.

現在のところ DinI と RecA が強く結合することはわかっているものの, DinI-RecA 間の認識機構および活性抑制の詳細は十分に明らかにされているとは言えない. 本研究ではこれらの問題を明らかにするために, NMR を用いて解析を試みた.

Keywords: DinI, RecA, 蛋白質間相互作用, 蛋白質核酸相互作用

よします まさとし, いう ゆたか, ほんだ まさよし, さいとう まさこ,  
 みかわ つとむ, しばた たけひこ

### <材料と手法>

本研究では、RecA における DinI との相互作用部位を同定するために、まず、RecA の3つのドメイン (N 末端、中央、C 末端ドメイン) をそれぞれ調製した。次に、 $^{15}\text{N}$  で標識された DinI と未標識の RecA 各ドメインをそれぞれ数段階の濃度比で混合し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC を測定することでタイトレーション実験をおこなった。

短い ssDNA は RecA 存在下で、RecA 結合 ssDNA に由来する TRNOE を示す。これを利用して、DinI との結合が RecA のもつ ssDNA 結合活性に影響を与えるか否かを調べた。この実験は未標識 RecA と  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識 DinI を調製し、これら2つを混合した試料に様々な長さの ssDNA を過剰に加えて、2D NOESY を測定することによって行った。

### <結果および考察>

$^{15}\text{N}$  標識された DinI に未標識の RecA の C 末端ドメインを、1:0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1, 2 の比率で加えながら DinI の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの測定を行ったところ、intact の RecA とのタイトレーション実験で見られたような強い結合を示すシグナル変化は見られなかった (fig.1)。このことから C 末端ドメインは DinI と RecA の相互作用に直接的に寄与している可能性は低いと考えられた。現在、N 末端、中央ドメインについても同様の実験を進めている。

また TRNOESY の実験から、RecA と 4 mer の ssDNA の結合が DinI によって阻害されないことが明らかになった。我々は現在さらに 8mer, 12mer, 16mer の ssDNA を用いて同様の解析を進めており、RecA の DinI 結合活性と ssDNA 結合活性が ssDNA の長さに依存しているかどうかについて明らかにしてゆく。

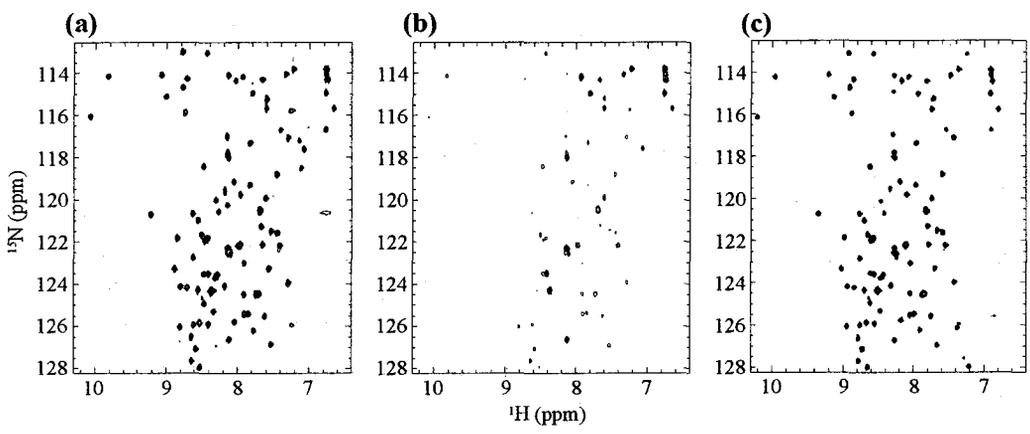


Figure:

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -DinI alone (a),  $^{15}\text{N}$ -DinI in the presence of 0.1mM RecA (b) and  $^{15}\text{N}$ -DinI in the presence of 0.2 mM RecA C terminal domain (c). The concentration of  $^{15}\text{N}$ -DinI in these three samples was set at 0.1 mM. Samples were dissolved in a 10%  $^2\text{H}_2\text{O}$  buffer containing 20 mM sodium phosphate (pH 6.5) and 50 mM NaCl. All of these spectra were acquired at 298K on a Bruker DRX600 spectrometer.

プリンリプレッサー-DNA結合ドメイン変異体の構造解析  
(横浜市大大学院総合理1、電通大電子物性2)

○堤 れい子<sup>1</sup>、長土居 有隆<sup>1</sup>、鈴木 咲良<sup>1</sup>、  
三瓶 巖一<sup>2</sup>、溝渕 潔<sup>2</sup>、西村 善文<sup>1</sup>

**Structural Analyses of Two Mutant DNA-binding Proteins from Purine Repressor**

<sup>1</sup>Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University

<sup>2</sup>Department of Applied Physics & Chemistry,  
The University of Electro-Communications

○Tsutsumi Reiko<sup>1</sup>, Aritaka Nagadoi<sup>1</sup>, Sakura Suzuki<sup>1</sup>,  
Gen-ichi Sanpei<sup>2</sup>, Kiyoshi Mizobuchi<sup>2</sup>  
and Yoshifumi Nishimura<sup>1</sup>

Purine repressor, PurR, regulates the expression of genes that are concerned with purine biosyntheses. PurR consists of 341 amino acids and has two domains; a DNA-binding domain (DBD) at the N-terminus and a corepressor-binding domain (CBD) at the C-terminus. PurR binds to DNA specifically with a corepressor. The three dimensional structure of the ternary complex of PurR bound to both a corepressor and a specific DNA was determined by X-ray crystallography. To understand the detailed molecular mechanisms of the DNA-binding of PurR, we have examined the two mutant proteins of the DNA-binding domain, V50C and L54C, in which Val 50 and L54 are replaced by a cysteine residue, respectively. The dimerization of each mutant protein by a disulfide bond results in binding to a specific DNA. Each of the three-dimensional structures of specific DNA complexes of V50C and L54C has been analyzed by multidimensional NMR spectroscopy.

プリンリプレッサーは大腸菌のプリン生合成に関与する遺伝子発現を制御するリプレッサータンパク質である。PurR は 341 アミノ酸残基から成り、N末側の 56 アミノ酸残基が DNA 結合ドメイン (DBD) で、C 末側の約 280 残基がコリプレッサー結合ドメイン/二量体形成ドメイン (CBD) である。PurR の特異的 DNA との結合は、コリプレッサーの CBD への結合と、特異的 DNA の存在下でのみ可能である。これまで、PurR-コリプレッサー-DNA 複合体の立体構造が X 線結晶構造解析によって決定されている[1]。DNA 複合体中での PurR DBD の構造は、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフを含む 4 本の  $\alpha$ -ヘリックスを構成し、第 2 ヘリックスで DNA のメジャーグループを認識し、第 4 ヘリックスでマイナーグループを認識していた。

キーワード：リプレッサー、プリン生合成、DNA結合ドメイン、コリプレッサー、  
多次元NMR法

つつみ れいこ、ながどい ありたか、すずき さくら、さんべい げんいち、  
みぞぶち きよし、にしむら よしふみ

また DBD 単独 (56 a.a.) の立体構造が NMR 法によって決定されている。この構造では第 1 ヘリックスから第 3 ヘリックスの領域は複合体中と同じ構造であったが、第 4 ヘリックス領域はランダムな構造であった。また DBD 単独では特異的 DNA との結合は認められなかった[2]。以上のことから、PurR と特異的 DNA との結合には二量体化、及び第 4 ヘリックスの形成が必須である考えられている。

私達は PurR の DNA 結合能と立体構造との相関についてより深い考察を得ることを目的に、DBD の点突然変異体 V50C と L54C を作製した。これらの変異体は、DNA 複合体中で空間的に近接した第 4 ヘリックス領域のアミノ酸残基である 50 番目の Val、54 番目の Leu をそれぞれ Cys に置換したものである。これらの変異体はともにジスルフィド結合によって二量体化され、特異的 DNA と複合体を形成した。現在 NMR 分光法によって 2 つの変異体の DNA 複合体の構造解析を行っている。V50C、L54C とともに主鎖の帰属はほぼ完了し、V50C については側鎖の帰属まで完了し、さらに構造解析を進めている。

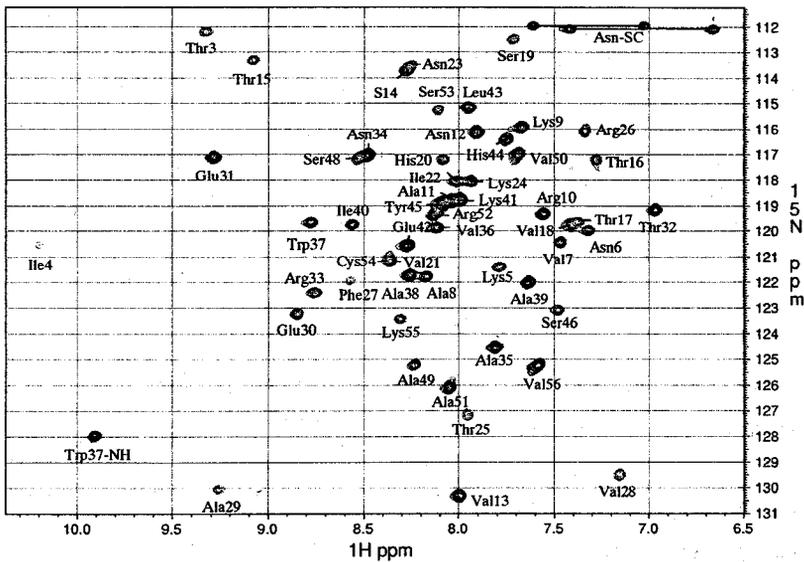


Fig.1. PurR L54C DNA 複合体の  $1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC

- [1] M. A. Schumacher, K. Y. Choi, H. Zalkin and R. G. Brennan (1994) *Science* **266**, 763-770
- [2] A. Nagadoi, S. Morikawa, H. Nakamura, M. Enari, K. Kobayasi, H. Ymamoto, G. Sanpei, K. Mizobuti, M. A. Schumacher, R. G. Brennan and Y. Nishimura (1995) *Structure* **3**, 1217-1224

## ICADのC末端ドメインのNMRによる構造解析

(理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター)

○福島径、黒田裕、菊地淳、小柴生造、横山茂之

## Solution Structure of the C-terminal Domain of ICAD

OKei Fukushima, Yutaka Kuroda, Jun Kikuchi, Seizou Koshiba, Shigeyuki Yokoyama

Genomic Sciences Center (GSC), RIKEN

ICAD is an Inhibitor of CAD (Caspase Activated DNase) that cleaves chromosomal DNA into nucleosomal fragments at the final stage of apoptosis. Here, we report the solution structure of the C-terminal domain of ICAD, determined on the basis of 841 NOE's distance constraints complemented with restraints derived from HN residual dipolar coupling. An independent validation for the residual dipolar coupling values was provided by a strong correlation between the inertial tensor derived from the residual dipolar coupling and that derived from  $^{15}\text{N}$   $T1/T2$  data. These results illustrates the improvement that can be obtained by introducing HN residual dipolar coupling information in the structure determination of  $\alpha$ -helical proteins such as the C-terminal Domain of ICAD.

## [序論]

Apoptosisの最終段階でDNAを分解するタンパク質CAD (Caspase Activated DNase)のinhibitor, ICAD(Inhibitor of CAD)のC末端ドメインの溶液NMR構造を決定した。制限情報として841のNOEをrestraintとして用いた。さらに、タンパク質を弱配向させることにより得られる残余双極子相互作用をタンパク質分子全体でとらえた構造情報として用いた。また、 $^{15}\text{N}$ 核の緩和測定から双極子相互作用から得られるタンパク質分子全体の配向が信頼できることを確認できた。これらの配向情報はICADのように $\alpha$ -ヘリックスしかもたないようなタンパク質の構造決定においても有効であった。

## [実験]

安定な構造をもつICADのC末端ドメイン(225-307)精製系を確立後、 $^{15}\text{N}$ および $^{15}\text{N},^{13}\text{C}$ ラベルサンプルを調製し、主鎖帰属用として $^{15}\text{N}$  NOESY-HSQC,  $^{15}\text{N}$  TOCSY-HSQC, HNCA, HN(CO)CA, HNC(O), CBCANH, CBCA(CO)NH; 側鎖帰属用として $^{15}\text{N}$  TOCSY-HSQC,  $^{13}\text{C}$  HSQC, HCCH-TOCSY, HCCH-COSY; NOE restraintには $^{15}\text{N}$  NOESY-HSQC,  $^{13}\text{C}$  NOESY-HSQCを用いた。Residual Dipolar Couplingの測定にはICADを配向させるために20mg/ml Pf1 phageを加え $^{15}\text{N}$  IPAP HSQCを使用。スペクトルの処理及び構造計算にはNMRPipe, NMR view, CNSを使用した。NMRサンプルは500 $\mu\text{M}$ ~3mM ICAD、20mM Phosphate buffer (pH6.5), 5mM DTT, 298Kを使用し、測定にはBruker DRX600を使用した。

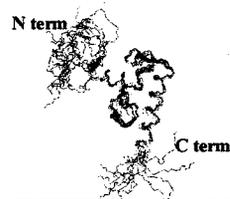


Fig.1 Superposition of the 10 NMR structures with lowest energy

キーワード: 溶液NMR、CAD、apoptosis、ドメイン、dipolar coupling、構造解析

ふくしまけい、くろだゆたか、きくちじゅん、こしばせいぞう、よこやましげゆき

### [結果と考察]

決定した ICAD の C 末端ドメインの溶液構造は 4 つの  $\alpha$  ヘリックス ( $\alpha 1$ :239-247,  $\alpha 2$ :257-265,  $\alpha 3$ :268-275,  $\alpha 4$ :280-300) からなっていた (Fig.1)。N 及び C 末端 (N:225-238, C:301-307) は構造が収束せず、HXNOE の測定を行ったところ構造が保持されているとされる 0.6 を下回っていた。

ヘリックス蛋白質で構造未知であったこの構造を決定するに際して、15N ラベル sample だけでなく 15N, 13C ラベル sample を調製し各種多核 NMR 測定を行ったのは有効であった。さらに、HN の Residual Dipolar Coupling ( $D_{NH}$ ) を測定しタンパク質の配向情報も構造計算に利用した (Fig.2, Fig.3)。Fig.2 は 20mg/ml Pf1 phage で配向させたときの ICAD の 15N IPAP HSQC である。Fig.3 では Inertial tensor ( $I_x, I_y, I_z$ ) に対する ICAD の Alignment tensor ( $A_x, A_y, A_z$ ) を示してある。ICAD の  $A_z$  が Phage との静電的相互作用により  $I_z$  とは異なる角度で配向していた。この Alignment tensor は液晶の種類によって異なる角度をとることが報告されている。各アミノ酸残基の  $D_{NH}$  の解析はタンパク質がうまく配向する液晶との組み合わせを選択できれば容易に得ることができる。さらに液晶の種類を変えるなどして同じタンパク質を溶液中で異なる方向へ配向させることも可能であり、その場合には新たに Alignment tensor を得ることができる。構造計算の途中 NOE の少ない段階では  $D_{NH}$  の構造情報を加えることによって構造が収束しにくかった  $\alpha 1$  の配向が決まった。最終計算では、まったく  $D_{NH}$  を用いなくても  $\alpha 1$  の配向は決まったが、 $D_{NH}$  を用いるとより構造が収束したので  $D_{NH}$  の情報を用いることは有効であると考えている。

構造決定したのち、ICAD の C 末ドメインの各アミノ酸残基の運動性をみる手段として、15N の緩和時間  $T1, T2$  の測定があるが、 $T1/T2$  の値は HN の結合ベクトル情報を含んでいる。 $T1/T2$  の実測値に構造計算で求めた各 HN の座標を与えることによってタンパク質分子全体に関する長軸・短軸方向の情報 diffusion tensor ( $D_x, D_y, D_z$ ) を得ることができる (Fig.4)。Fig.4 では NOE,  $D_{NH}$  から求めた構造の長軸方向 ( $I_z$ ) と  $T1/T2$  実測値から求めた長軸方向 ( $D_z$ ) がほぼ一致している。これにより、構造計算の結果がより信頼のおけるものであることと考えている。

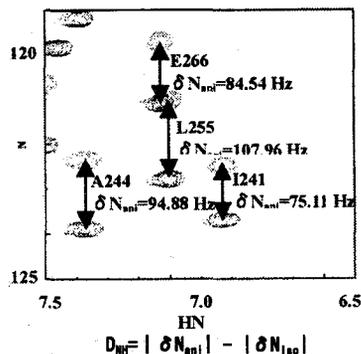


Fig.2 Small section of the IPAP-[1H-15N]-HSQC spectrum of ICAD

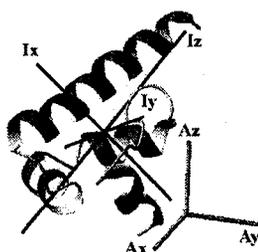


Fig.3 Schematic representation of the overall molecular Alignment tensor and Inertial tensor

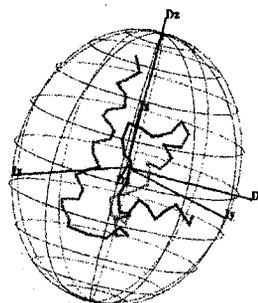


Fig.4 Schematic representation of the overall molecular Diffusion tensor and Inertial tensor

**An inexpensive method for generating  $u\text{-}^{15}\text{N}/\text{aro-}^1\text{H}$  ( $\alpha, \beta$   $^2\text{H}$ ) Phe, Tyr and Trp incorporated,  $u\text{-}^2\text{H}/^{15}\text{N}$  labelled proteins for NMR resonance assignment.**

(<sup>1</sup>理研・遺伝生化学, <sup>2</sup>横浜市大・院総合理)

○Sundaresan Rajesh<sup>1,2</sup>, 柴田武彦<sup>1,2</sup>, 伊藤 隆<sup>1,2</sup>

**An inexpensive method for generating  $u\text{-}^{15}\text{N}/\text{aro-}^1\text{H}$  ( $\alpha, \beta$   $^2\text{H}$ ) Phe, Tyr and Trp incorporated,  $u\text{-}^2\text{H}/^{15}\text{N}$  labelled proteins for NMR resonance assignment.**

○Sundaresan Rajesh,<sup>1,2</sup> Takehiko Shibata<sup>1,2</sup> and Yutaka Ito<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Cellular & Molecular Biology Lab., RIKEN; <sup>2</sup>Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University.

**ABSTRACT**

Recently various methods have been proposed to selectively re-introduce protons in completely deuterated proteins for TROSY based NMR measurements of larger proteins. To this effect we report a novel inexpensive method to generate  $u\text{-}^{15}\text{N}/\text{aro-}^1\text{H}$  ( $\alpha, \beta$   $^2\text{H}$ ) Phe and Tyr and  $u\text{-}^{15}\text{N}/\text{aro-}^1\text{H}$  ( $\alpha, \beta, \delta_1$   $^2\text{H}$ )  $\text{aro-}^1\text{H}$  Trp labelled proteins in a completely  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  background. The feasibility of this approach in resonance assignment of aromatic protons and results using three different proteins, a 26 kDa YUH1 protein, Ubiquitin and C-terminal peptide of RecA<sub>268-330</sub>, will be presented.

**INTRODUCTION**

Deuteration of non-exchangeable protons alleviates most of the problems associated with rapid  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  transverse relaxation in NMR studies of larger proteins. Complete deuteration is also a prerequisite for the application of triple-resonance NMR with  $^2\text{H}$ -decoupling that promise to extend the size limits in protein NMR spectroscopy. However this removes most of the valuable proton nuclei that are the source of NOE-based distance restraints. Recently, selective protonation of methyl groups of residues together with residual dipolar couplings was shown to be sufficient for determining the global fold of a 42 kDa protein. Further, use of these methyl- $^1\text{H}$  amino acids along with  $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$  labelled Phe and Tyr was shown to be sufficient for rapid structure calculation of proteins, since these residues (ILVAFY) constitute the hydrophobic core of proteins. On these lines we introduce an elegant and inexpensive one shot method to obtain  $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$  labelled aromatic amino acids (Phe, Tyr, Trp) that are highly deuterated at the  $\alpha$ - and  $\beta$ - carbons atoms, incorporated into a completely  $^2\text{H}/^{15}\text{N}$  labelled protein. Naturally available shikimic acid, a stable metabolic precursor of aromatic amino acids, has been utilised for this purpose. The labelling efficiency of this method was tested on three different proteins, a 26 kDa YUH1, 8.5 kDa Ub and 7 kDa RecA<sub>268-330</sub> C-terminal domain.

**EXPERIMENTAL METHODS**

To prepare 99.99%  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  labelled proteins (YUH1, Ub, RecA C-terminal domain), in which the

---

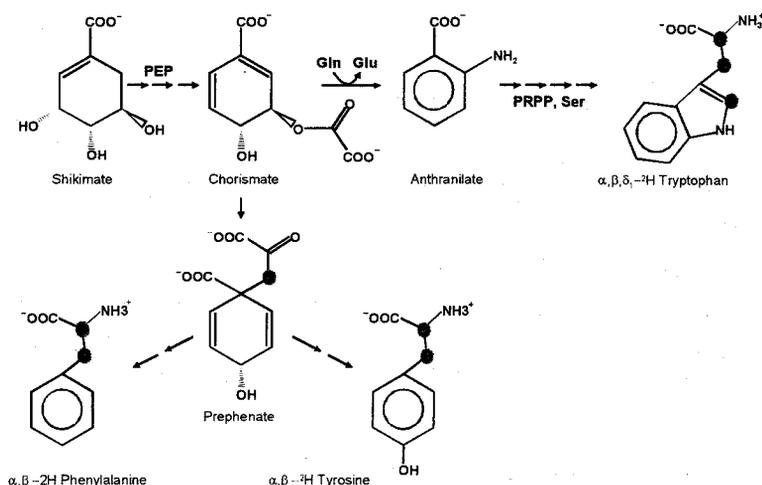
Selective protonation, Aromatic amino acids, Deuteration

Rajesh S., しばた たけひこ, いたう ゆたか

aromatic side chains of Phe, Tyr and Trp are protonated, the bacterial cells (*E. coli* BL21 DE3) harbouring the respective expression vectors were grown at 37°C on a minimal medium containing  $^2\text{H}$ -glucose,  $^{15}\text{N}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 99.99%  $\text{D}_2\text{O}$ . The aromatic amino acid precursor shikimic acid (completely  $^1\text{H}$ ), was added to the cells prior to induction with IPTG. Protein samples were also prepared that were 50%  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  labelled (YUH1) and  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  labelled (Ub and RecA<sub>268-330</sub>). NMR spectra consisting of 3D  $^{15}\text{N}$  separated NOESY-HSQC and 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY (in  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{D}_2\text{O}$ ), collected at 30°C on a Bruker DRX600 spectrometer, were used to verify the aromatic assignments in the above protein samples.

## RESULTS AND DISCUSSION

Shikimic acid is a universal metabolic intermediate in the aromatic amino acid biosynthetic pathway and can be transported into the microbial cytoplasm from the culture medium. Our strategy was to use shikimic acid to obtain selectively ring protonated aromatic amino acid labeled proteins in a completely deuterated background. Commercially available shikimic acid is completely protonated and is inexpensive. When added to a completely deuterated,  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  culture medium,  $\alpha$ -,  $\beta$ - deuterated  $^{15}\text{N}$  labeled aromatic amino acid ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta_1$ - deuterated in case of Trp) incorporated proteins could be obtained (Figure 1). We have tested for the incorporation of shikimic acid into three different proteins, i) YUH1 (26 kDa, containing 12 Fs, 7 Ys, 3 Ws); ii) Ubiquitin (8.5 kDa, containing 2 Fs, 1 Y); and iii) RecA Cterminus<sub>268-330</sub> (7 kDa, containing 1 F, 3 Ys, 2 Ws). Analysis of the 3D  $^{15}\text{N}$ -separated NOESY-HSQC and 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY in  $\text{D}_2\text{O}$  spectra revealed no significant scrambling of shikimic acid into other amino acids. The  $\alpha$ - and  $\beta$ - protons of Phe and Tyr and  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\delta_1$ - protons of Trp were specifically replaced with  $^2\text{H}$ , whereas specific protonation of the aromatic positions of Phe, Tyr and Trp was observed. This shikimic acid labeling method, together with use of selectively methyl- $^1\text{H}$  aliphatic amino acids allows the measurement of aromatic-methyl, aromatic-aromatic, aromatic-NH, methyl-methyl, methyl-NH and NH-NH NOEs that can be used in the global fold determination of large proteins.



**Figure1:** Biosynthetic route for incorporation of shikimic acid into  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $^2\text{H}/^{15}\text{N}$  labelled aromatic amino acids in *E. coli*, grown under  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  and 99.9%  $\text{D}_2\text{O}$  condition.

NMRによるリボヌクレアーゼ T<sub>1</sub>の変性過程の解析(東京薬大・生命科学<sup>1</sup>, 中央分析<sup>2</sup>, 薬<sup>3</sup>)○松浦久恵<sup>1</sup>, 佐久間千勢子<sup>2</sup>, 田代桜子<sup>3</sup>, 神藤平三郎<sup>3</sup>, 小島正樹<sup>1</sup>, 高橋健治<sup>1</sup>Unfolding of Ribonuclease T<sub>1</sub> Studied by NMR SpectroscopyHisae Matsuura<sup>1</sup>, Chiseko Sakuma<sup>2</sup>, Sakurako Tashiro<sup>3</sup>, Heisaburo Shindo<sup>3</sup>, Masaki Kojima<sup>1</sup>,  
and Kenji Takahashi<sup>1</sup><sup>1</sup>School of Life Science, <sup>2</sup>Central Analytical Laboratory, and <sup>3</sup>School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy  
and Life Science

RNase T<sub>1</sub>, a guanyloribonuclease secreted by *Aspergillus oryzae*, is a single-chain globular protein consisting of 104 residues. So far, various studies on unfolding/refolding of this protein have been performed. It was reported that the unfolding of RNase T<sub>1</sub> was a reversible, two-state transition and that the refolding process was rate-limited by proline-peptide isomerization. In the present study we performed thermal unfolding experiments using 2D NMR. Based on the native structure, we assigned the local conformational change at each temperature. The results showed that the molecule was unfolded with the concomitant and extensive distortion of the secondary structures whereas the proline-peptide bonds involving Pro39 and Pro55 remained in *cis*-form. In addition, we calculated residual structure with NOE information at the high temperature as distance constraints.

[序]リボヌクレアーゼ T<sub>1</sub>(RNase T<sub>1</sub>)は、コウジカビ *Aspergillus oryzae* が生産する、104 アミノ酸残基から成る 1 本鎖球状蛋白質で、RNA 中のグアノシン-3'-リン酸部分を特異的に切断する。本酵素の立体構造は、2 個の β シートと 1 個の α ヘリックスよりなる。リボヌクレアーゼ類の変性・再生実験は古くから行われており、本酵素に関しては、以下のことがわかっている。

1) 変性は可逆で、二状態転移でよく近似できる、2) 分子中に 2 本存在する S-S 結合を切断、カルボキシメチル化しても、安定性は減少するが、正しく巻き戻る、3) 巻き戻り過程の速度論的解析から、数ミリ秒以内に大部分の二次構造が形成し、その後分から時間のオーダーで、2 段階のプロリンペプチド結合のシス→トランスの異性化(Ser44-Pro55 の異性化→Tyr38-Pro39 の異性化)により正しい構造が形成される。

一方、変性過程に関しては、二状態転移から予想される単純な指数関数型減衰を示す以上のことは知られていない。本研究では、熱変性の過程を残基・原子レベルで明らかにするため、二次元 NMR を用いて解析し、変性に伴う分子内各部の変化とその推移を、native 構造を基にして考察した。

リボヌクレアーゼ T<sub>1</sub>, 熱変性, 変性状態

まつらひさえ, さくまちせこ, たしろさくらこ, しんどうへいさぶろう, こじままさき, たかはしけんじ

[方法] 二次元 NOESY,  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC 測定は, 蛋白濃度 1mM, pH5.6, 混合時間 150ms(NOESY)で Bruker DRX-500 で, 40°C~60°Cの各温度で測定した. 常温におけるシグナルの化学シフト値を参考にして, 各温度のスペクトルの帰属を行い, シグナルの移動, 強度変化を解析した. また, 56°Cにおける残余 NOE から, XPLOR により distance geometry 計算を行った.

[結果と考察]40°C~52°C, 52~54°C, 54~56°C, 56~60°Cの各過程で, 消失した NOE ピーク, 強度が減少した NOE ピークを帰属した. 帰属の結果から, 以下のことがわかった.

40~52°C: 1)ほとんど構造変化は観察されなかった.

52~54°C: 1)  $d_{\text{N}}(i, i+3)$ 等ヘリックスに特徴的な NOE が消失し, ヘリックスが崩壊した. 2)ループ領域, ループに近い二次構造領域で NOE が消失した.

54~56°C: 1)  $\beta$  シートを構成するストランド間およびストランド内の NOE が消失し,  $\beta$  シート構造が崩壊した. 2)long-range の分子の離れた部位間の NOE が消失し, 分子全体に渡って三次構造が崩壊した.

56~60°C: 殆どの NOE ピークが消失した.

56°Cにおいて観測された 310 個の NOE の大部分は, C 末端側の  $\beta$  シートに由来しており, 変性過程において最後まで構造を保っている領域であると考えられる. Distance geometry 計算結果からもこれを裏付ける残余構造が得られた. 一方, 56°Cにおいて Ser44-Pro55, Tyr38-Pro39 の両プロリンペプチド結合はシス型のままであった. このことは, 巻き戻り過程の律速段階であるプロリンペプチド結合の異性化は, 変性過程では律速段階になっていない, 即ち, 巻き戻り過程と変性過程はミクロのレベルでは異なった経路をとることを示している.

さらに詳細な構造情報を得るため,  $^{15}\text{N}$  同位体標識を行い, 種々の温度で  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC スペクトルを測定した. 現在解析を進めている.

区分安定同位体標識を利用した  $H^+$ -ATPase $\beta$ サブユニットの主鎖の帰属

○八木宏昌、山崎俊夫、吉田賢右\*、阿久津秀雄

阪大・蛋白研、\*東工大・資源研

The backbone assignment of  $H^+$ -ATPase $\beta$  subunit using segmental isotope labelling method

○Hiromasa Yagi, Toshio Yamazaki, Masasuke Yoshida\* and Hideo Akutstu

Institute for Protein Reserch, Osaka Univ. \*Reserch Laboratory of Resources Utilization, Tokyo institute of Technology.

The $\beta$  subunit, which is the catalytic region for  $H^+$ -ATPase, is consisting of 473 amino acids. In order to understand the conformational change on the nucleotide binding, we have made assignments of the backbone signals. To dissolve the signal overlappig, four kinds of proteins, which were labelled in the regions of 1-124, 1-270, 271-473 and 390-473, respectively, were prepared by the selective isotope labelling method using inecin.  $^{15}N$ - $^1H$  HSQC resonances of all four segmentally isotope labelled proteins coincide with those of the uniformly labeled protein. It suggests that the refolded protein is intact. The number of observed signals decreased in the obtained spectra, allowing assignment of resonances. For three out of four spectra the assignments roughly completed. The chemical shift changes of some resonances on nucleotide binding were observed.

#### 【緒言】

$H^+$ -ATP 合成酵素は膜内在性で疎水性の  $F_0$  と膜表在性で親水性の  $F_1$  からなっている。 $F_1$  は $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体で回転触媒活性を示し、 $\beta$ サブユニットが触媒サブユニットとなっている。1994年にミトコンドリア由来の  $F_1(MF_1)$ の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の結晶構造が解かれ、複合対中の $\beta$ サブユニットの構造が明らかとなった。我々が対象としている好熱性細菌 PS-3 由来の $\beta$ サブユニット( $TF_1\beta$ )はモノマーでも安定に存在することが出来、またヌクレオチドの結合も起きることが知られている。モノマーの構造と複合体中の結晶構造とを比較する事を目標とし $\beta$ サブユニット単体の NMR 測定を行った。 $\beta$ サブユニットはモノマーでも 473 アミノ酸残基からなっているためシグナルの重なりが激しい。そこでインティンを用いた区分安定同位体標識の手法を利用した。

#### 【実験】

インティン反応を利用して以下に示すように 124(A)、1-270(B)、270-473(C)、390-473(D)残基をそれぞれ選択的に標識した 4 種の $\beta$ サブユニットを作製した。インティンは *Pyrococcus furiosus* 由来の PI-*PfuI* を用いた。

帰属は 3D HNCA, 3D HN(CO)CA, 3D HN(CO)CACB の測定で行った。その際すべてのタンパクには 80%重水素を導入し、TROSY タイプで行った。NMR 測定は Bruker DRX800 を用いた。

$H^+$ -ATP 合成酵素 $\beta$ サブユニット、区分安定同位体標識、インティン

やぎひろまさ、やまざきとしお、よしだまさすけ、あくつひでお

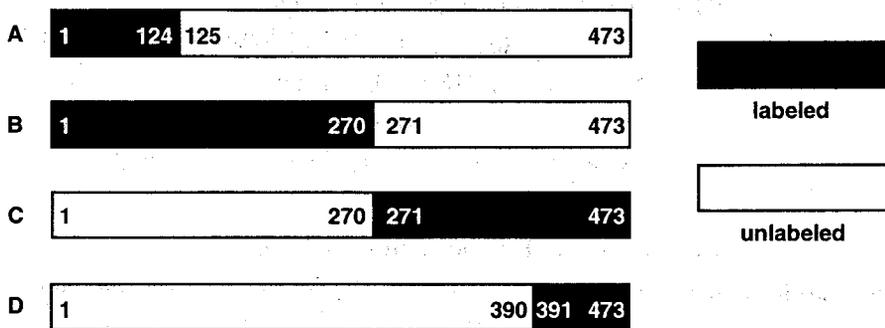


Fig.1 Four kinds of preparation of the segmentally isotope labelled  $\beta$ bunit

【結果および考察】

A, B, C, Dそれぞれと全長の  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC スペクトルを比較すると、ピークの位置がそれぞれ全く重なった。これはインテン反応が正常に行われ、 $\beta$ サブユニットの立体構造が変化していないことを示している。現在、A, C および D の主鎖の帰属がほぼ完成し、残る B の帰属を行っている。またヌクレオチド結合によって幾つかのシフトするシグナルも観測され、結晶構造とよく一致した結果が得られた。

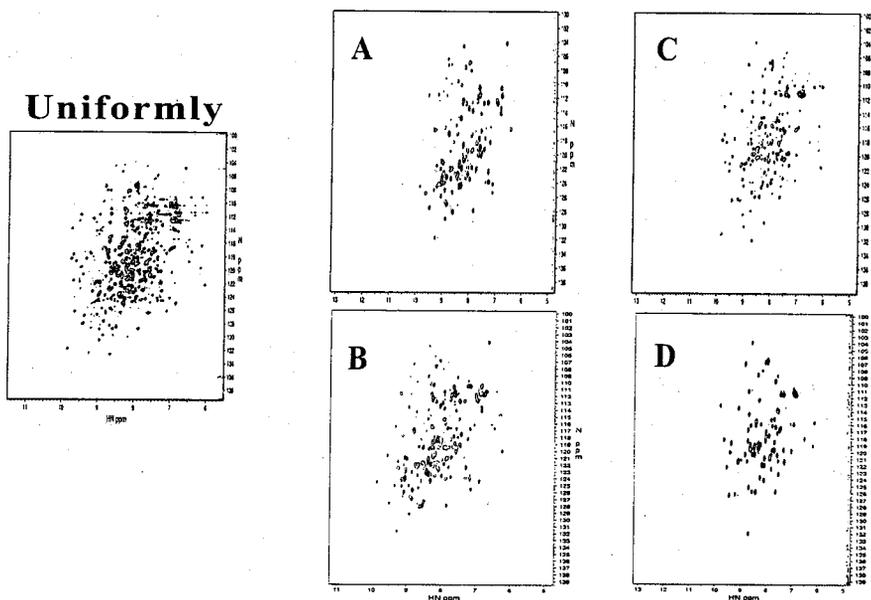


Fig.2 The proteins  $^{15}\text{N}$ -labelled in the region of 1-124(A), 1-270(B), 271-473(C) and 391-473(D)

## DNA 相同組換え反応機構の解明を目指した

## RecA 蛋白質の構造生物学的及び生化学的研究

(1) 理研・生体超分子構造・機能研究協力グループ,

<sup>2</sup> 理研・遺伝生化学, <sup>3</sup>CREST/JST)○齋藤雅子<sup>1,2</sup>, 美川 務<sup>1,2,3</sup>, 伊藤 隆<sup>1,2,3</sup>, 柴田武彦<sup>1,2,3</sup>**Structural and biochemical analyses of RecA protein****for the elucidation of reaction mechanisms in DNA homologous recombination**Masako Saito<sup>1,2</sup>, Tsutomu Mikawa<sup>1,2,3</sup>, Yutaka Ito<sup>1,2,3</sup> & Takehiko Shibata<sup>1,2,3</sup><sup>1</sup>Research Group for Bio-Supramolecules, RIKEN;<sup>2</sup>Cellular and Molecular Biology Laboratory, RIKEN; <sup>3</sup>CREST, JST

RecA plays a central role in DNA recombination of prokaryotes. RecA promotes "homologous search and paring" between ssDNA and dsDNA. By preparing the central domain of RecA derived from *T. thermophilus* (cdRecA), we are investigating its DNA-binding activity by using NMR titration analyses.

To check the physical properties of cdRecA, we prepared a uniformly <sup>15</sup>N-labeled sample. When mixed with 18mer poly(dC) ssDNA, Mg<sup>2+</sup> and ATP<sub>γ</sub>S, chemical shift changes were observed in a significant number of <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC cross peaks, suggesting the ssDNA-binding activity of cdRecA. The complete assignment of backbone resonance of the central domain is in progress using <sup>2</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-labelled cdRecA. Chemical shift perturbation experiments will follow the assignments in order to map amino acid residues responsible for bindings with Mg, ADP/ATP and ssDNA molecules.

【序】 RecA は DNA 相同組換え反応において中心的な役割を果たす蛋白質である。近年、この類似蛋白質が次々と発見され、DNA 組換え反応の基本的な機構が全ての生物を通じて共通であることが示唆された。

RecA の全体構造は X 線結晶構造解析によって解かれているが、RecA の活性に重要である DNA 結合部位は未だ解明されていない。そこで我々は NMR を用いて RecA の DNA 結合部位を同定することを試みた。しかしながら、全長の RecA は分子量が 35,000 もあり、フィラメントを形成しやすいため、NMR での詳細な分析は難しいと考えられる。

RecA、DNA 相同組換え、蛋白質核酸相互作用

さいとう まさこ、みかわ つとむ、いとう ゆたか、しばた たけひこ

RecA と古細菌や高等真核生物の RecA 類似蛋白質では全体の構造としては異なるが、RecA の中央ドメインに相当する領域だけは全ての生物の RecA 類似蛋白質において高度に保存されている。そのため RecA の中央ドメインは組換え反応そのものを行う機能部位であると考えられる。そこで RecA の中央ドメインに注目し、NMR 分光法を用いた DNA 結合部位の同定、立体構造の決定を目指して研究を進めている。

【方法】 材料は安定で物理化学的測定に適していることから高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 由来のものとした。 $^{15}\text{N}$  標識された RecA の中央ドメインを大腸菌内で大量発現させ、精製した。この試料を用い、塩、緩衝液、pH などの条件を検討することで、2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの測定条件の最適化を行った。さらに、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{ATP}\gamma\text{S}$ 、ssDNA の存在下で 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC を測定した。

【結果および考察】 蛋白質が高濃度であっても会合しにくい条件を検討するために、塩の種類や塩濃度を変えて 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC を測定した。その結果、500mM LiSCN 存在下での測定において最も良いスペクトルが得られた。また、pH による条件検討も試みた。pH 7.5 緩衝液中と pH 6.5 緩衝液中で 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC を測定した結果、pH 6.5 緩衝液中においてシグナル強度の増加が見られた。そこで、500mM LiSCN、pH 6.5 MES 緩衝液中で測定することとした。

さらに、 $\text{Mg}^{2+}$ ・ $\text{ATP}\gamma\text{S}$ ・ssDNA 存在下で 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC を測定したところ、 $\text{Mg}^{2+}$ ・ $\text{ATP}\gamma\text{S}$ ・ssDNA を加えることによるスペクトルの変化を確認した。このことにより、RecA が中央ドメインのみで DNA 結合能・ATP 結合能を保持していることが明らかになった。

現在、 $^2\text{H}$  $^{13}\text{C}$  $^{15}\text{N}$  標識されたサンプルを調製して、主鎖の帰属に必要な各種の 3 次元 NMR 測定を行っている。今後、主鎖の帰属を行い、どのアミノ酸が DNA などの基質の認識に重要であるか調べていくつもりである。

## 光受容蛋白質 Photoactive Yellow Protein の構造解析

(横浜市大・総合理<sup>1</sup>、奈良先・バイオ<sup>2</sup>、奈良先・物質<sup>3</sup>)○ 塩沢久美子<sup>1,3</sup>、朽尾豪人<sup>1</sup>、JeeJun-Goo<sup>2</sup>、池上貴久<sup>2</sup>、  
今元泰<sup>3</sup>、片岡幹雄<sup>3</sup>、白川昌宏<sup>1</sup>

## Structure of Photoactive Yellow Protein

(Yokohama City Uni. Integrated science<sup>1</sup>, NAIST Biological Science<sup>2</sup>, NAIST Material Science<sup>3</sup>) ○Kumiko Shiozawa<sup>1,3</sup>, Hidehito Tochio<sup>1</sup>, JeeJun-Goo<sup>2</sup>, Takahisa Ikegami<sup>2</sup>, Yasushi Imamoto<sup>3</sup>, Mikio Kataoka<sup>3</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>1</sup>)

Photoactive yellow protein (PYP) was isolated from *Ectothiorhodospira halophila* and is proposed to be a photoreceptor for negative phototaxis of this bacterium. It is a relatively small water-soluble protein, consisting of 125 amino acids (14kDa). PYP exhibits rhodopsin-like property due to the trans to cis photoisomerization of a bound chromophore, unique *p*-coumaric acid, ligated to the unique cysteine residue at position 69 via a thioester bond. PYP forms a prototypical PAS domain. PAS domains have been found in proteins involved in regulations of intracellular signal, sensing, and circadian rhythm. Because of these biological significance, the structures of PYP at ground state have been solved by X-ray crystallography and NMR spectroscopy, which nevertheless are different with each other. The NMR analyses of the solution structure of PYP will be discussed.

<序>Photoactive Yellow Protein(以下PYP)は、好塩性紅色硫黄細菌(*Ectothiorhodospira halophila*)の産生する光受容蛋白質であり、負の走光性に関与する受容体であると言われている。

多くの光受容蛋白質はレチナル蛋白質のように膜蛋白質であるのに対し、PYPは比較的分子量(14 kDa, 125 a.a.)かつ水溶性であり、更にレチナル蛋白質等と同様の光反応の動作原理を持つことから、これまで光受容蛋白質のモデルとして高次構造解析及び多くの研究がなされてきた。

PYPはC69にチオエステル結合を介して結合している

クマル酸を発色団として有する。この発色団は、光( $\lambda_{max}=446nm$ )を吸収することでtrans-cis異性化に伴う蛋白質の構造を変化を引き起こし、その結果プロトンの授受が行われる。PYPはこの現象を利用して、細菌の負の走光性に関与していると考えられているが、光の細胞内伝達経路や相互作用する蛋白質等は未解明である。

光照射に伴う発色団及び周辺の構造変化の具体的特徴を以下に述べる。

基底状態で、trans-pクマル酸のフェノール部分の水酸基は、近傍のY42、E46、T50と水素結合ネットワークを形成し脱プロトン化状態である。それが光照射により、cis-pクマル酸に異性化し、フェノール部分の水酸基は近傍アミノ酸E46からプロトンを享受し中性となる。そして、その水素結合ネットワークは大きく変化し結果的に蛋白質の大きな構造変化が生じる。ひき続き、発色団はプロトンを放出し基底状態に戻る。つまり、共役二重結合系をもつ発色団がイオン化することで可視光の吸収能を得ており、光吸収によるtrans-cis異性化で反応が開始 → 発色団が中性になることで近紫外中間体(M中間体)が生成 → 水素結合ネットワークの大きな変化 → 蛋白質高次構造に変化 → 発色団がプロトン放出 → 基底状態に戻ると考えられている。

Key Words: 光受容蛋白質、多次元核磁気共鳴

しおざわくみこ とちおひでひと ジージュングー いけがみたかひさ いまもと  
やすし かたおかみきお しらかわまさひろ

このことから、光サイクル反応機構の詳細を調べる為に立体構造情報（各状態間の変化）を得ることは意義がある。

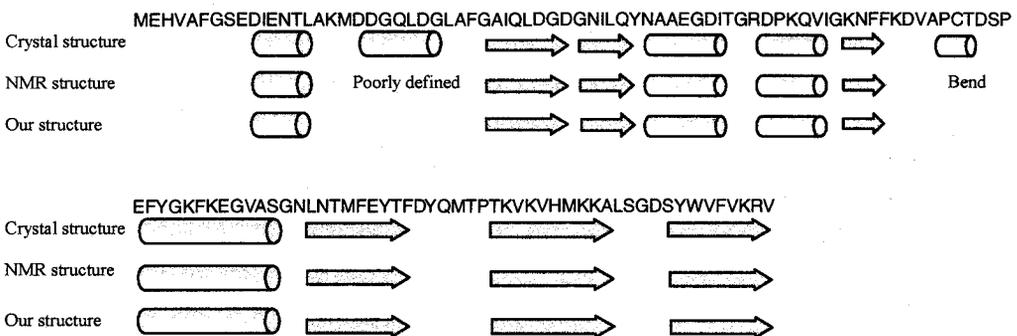
これまでに基底状態の PYP について NMR、X 線による構造解析は行われている。しかしながら、両者の構造には重要な差異が見られる。N 末端側 19-23 残基（以下 Region.1）および発色団周辺の構造が異なっていた。まず、Region.1 は X 線構造では  $\alpha$ -helix なのに対し NMR 構造では運動性が高い領域のため二次構造が決まらなかった。次に発色団に関しては、NMR 構造では溶媒に露出していたのに対し、結晶構造では、R52、Y98 により溶媒からブロックされ疎水性コアに存在していた。

このように、高次構造に立脚した研究を行うことは、生体の可視光受容とその伝達機構を詳細に研究する上で重要だと考えられる。我々は、光反応サイクルにおける PYP の構造変化の詳細解明を目指して、基底状態における PYP のより精密な構造解析を多次元多重共鳴 NMR 法により進めつつある。

<実験>本研究では、野生型 PYP を用いた。

PYP の主鎖、側鎖も  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  の帰属及び構造情報抽出のために、均一  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識 PYP、 $^{15}\text{N}$  標識 PYP そして  $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識 PYP を調製した。これらの蛋白質をリン酸緩衝液 (pH 6.5, 20mM potassium phosphate, 1.0mM EDTA, 20mM KCl) を用いて調製し NMR 測定試料とした。主鎖シグナルの帰属のために、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ - HSQC CBCA(CO)NH、CBCANH、HBHA(CBCACO)NH、HNCO、 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -HSQC を測定した。側鎖シグナルの帰属のために、C(CO)NH、H(CCO)NH、HCCH-TOCSY を測定した。そして構造情報を得るために、NOESY- $^{15}\text{N}$ -HSQC、NOESY- $^{13}\text{C}$ -HSQC、 $4\text{D}^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -NOESY、HNHA、 $^{13}\text{C}$ -CT-HSQC を測定した。測定は、Bruker 社 DMX500、DRX800 を用いてすべて 303K で行った。データ処理及び解析は、それぞれ NMRPipe、NMRView と Pipp を用いて行った。

<結果と考察>NMR 実験から、主鎖と側鎖の帰属は完了した。CSI (Chemical Shift Index) 及び NOE の解析から、Region.1 (NOE が少ないため) と発色団周辺以外の領域の二次構造は、先の NMR 構造とほぼ同様であることが明らかになった。 $\beta$ -strands のトポロジーは NOE の解析から判明した。現在は、Crystallography & NMR systems (CNS) を用いて立体構造の計算中である。ポスターでは、発色団周辺の詳細な構造解析について議論する。



Comparison of Secondary structure assignment of PYP

## Ubiquitin (Ub) -Yeast Ubiquitin Hydrolase1 (YUH1)

## 複合体タンパク質 (35 k Da) の NMR 解析

(理研・遺伝生化学<sup>1</sup>, 横浜市大・院総合理<sup>2</sup>, 三菱化学生命研<sup>3</sup>, 北里大理<sup>4</sup>)○ 倉島かおり<sup>1,2</sup>, Sundaresan Rajesh<sup>1,2</sup>, 田中剛史<sup>3</sup>, 須貝真理子<sup>3</sup>,  
小寺義男<sup>3,4</sup>, 柴田武彦<sup>1,2</sup>, 河野俊之<sup>3</sup>, 伊藤隆<sup>1,2</sup>

## NMR studies of the 35kDa complex of Ubiquitin(Ub)-Yeast Ubiquitin Hydrolase1(YUH1)

○Kaori Kurashima<sup>1,2</sup>, Sundaresan Rajesh<sup>1,2</sup>, Takeshi Tanaka<sup>3</sup>, Mariko Sugai<sup>3</sup>, Yoshio Kodera<sup>3,4</sup>,Takehiko Shibata<sup>1,2</sup>, Toshiyuki Kouno<sup>3</sup> & Yutaka Ito<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Cellular & Molecular Biology Laboratory, RIKEN, <sup>2</sup>Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, <sup>3</sup>Mitsubishi Kasei Institute of Life Science, <sup>4</sup>Department of Physics, Kitasato University

Yeast Ubiquitin Hydrolase1 (YUH1, 236 residues) is a member of the Ub C-terminal hydrolase family of deubiquitinating enzymes. We have been investigating the structural basis behind the high specificity of YUH1 for Ub-fusion proteins, using multidimensional NMR. For the present analysis we employed a 95%-<sup>2</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-YUH1 in the covalent complex with unlabeled Ub (total MW: 35K), prepared by reducing the thiolester intermediate using NaBH<sub>4</sub>, and have been analyzing its structure. We had earlier reported the backbone assignment for YUH1-Ub complex. As the next step, we report the side-chain <sup>13</sup>C resonance assignments of YUH1-Ub complex using the CCNNH and CC(CO)NNH pulse sequences with the magnetization starting from the side chain <sup>13</sup>C nuclei. Structural analysis using limited NOEs from selectively protonated YUH1-Ub complex together with residual dipolar couplings is being carried out.

【序】 YUH1 (236 残基) は、脱 Ub 化酵素である Ubiquitin C-terminal Hydrolase (UCH) ファミリーに属している蛋白質で、poly-Ub や Ub との融合蛋白質を認識して Ub 切断反応を行う。わたしたちは YUH1 と Ub の相互作用の系について NMR を用いて解析を行い、これまでに Ub, YUH1 それぞれの単体および複合体における主鎖シグナルの帰属と、タイトレーション実験による、Ub, YUH1 それぞれの相互作用部位の同定を行ってきた。さらに Ub と YUH1 の高い親和性と、UbC 末端の切断反応のメカニズムを理解するために、Ub-YUH1 の反応中間体であるチオール反応中間体を還元することで Ub-YUH1 の共有結合複合体 (35 k Da) を作成し、NMR による解析を進めている。今回は主鎖の帰属を踏まえて、また共有結合複合体の高次構造解析への一歩として側鎖 <sup>13</sup>C 核の帰属を行ったので報告する。

キーワード: Ub-YUH1 複合体. 蛋白質間相互作用. 側鎖 <sup>13</sup>C 核.

くらしまかおり, スンダレサン・ラジェシュ, たなかたけし, すがいまりこ, こでらよしお, しばたけひこ, こうのとしゆき, いたうゆたか

【実験】 YUH1 と Ub の一方が 95%- $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識されている、他方が標識されていない蛋白質混合溶液を作成し、チオール反応中間体を、還元剤  $\text{NaBH}_4$  で反応させることで、安定な 2 種の共有結合複合体試料 ( $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -YUH1/Ub,  $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Ub/YUH1) を調製した。

これらの試料を用いて、側鎖  $^{13}\text{C}$  シグナルの帰属のために、側鎖の  $^{13}\text{C}$  核の磁化から磁化を伝達するように修正した CCNNH, CC(CO)NNH パルス・シーケンスを作成し、測定および帰属をおこなった。

【結果, 考察】 主鎖  $^1\text{H}_\text{N}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  シグナルの帰属の結果, Ub 側については全ての残基について, YUH1 側については N 末端 3 残基と 7 番目の Loop 領域を除いた全ての残基について帰属を行うことが出来た。YUH1 の N 末端と 7 番目の Loop は複合体において構造多形になっている可能性がある。また側鎖  $^{13}\text{C}$  核の解析の結果, YUH1, Ub 双方とも, 上記の主鎖帰属が可能であったほとんどの残基について  $^{13}\text{C}$  核シグナルの帰属を行うことが出来た。

現在は Ub-YUH1 共有結合複合体のグローバル・フォールドの決定を進めている。このためにまず、疎水残基のみ選択的  $^1\text{H}$  標識された試料を作成し、選択的に NOE を観測することによって共有結合複合体のコア領域の構造情報を得る試みを行っている。さらに残余双極子カップリングを測定することで長距離の構造情報を収集し構造解析を行っていく方針である。

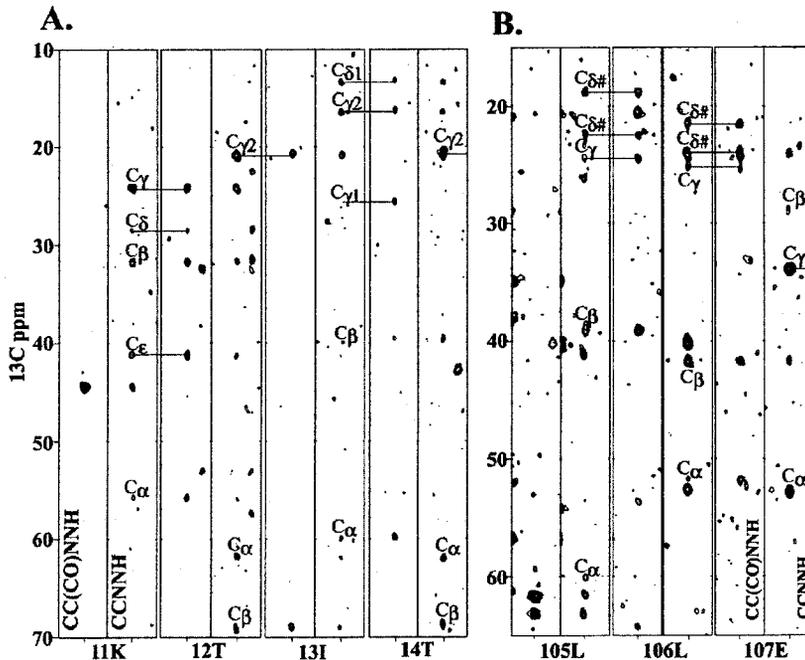


Figure:

Strips from the 3D CC(CO)NNH and CC NNH spectra showing sequential side-chain  $^{13}\text{C}$  resonance assignments for residues Lys11-Thr14 of Ub(A), and for residues Leu105-107 of YUH1(B) in the covalent complex.

アカザラガイ閉殻筋トロポニン C の C 末端半分子の溶液構造解析

(<sup>1</sup>東大院・農生科・応生化、<sup>2</sup>東大・生物生産工セ、<sup>3</sup>海洋バイオ研・清水研、  
<sup>4</sup>バリアンテクノロジーズジャパン、<sup>5</sup>北大院・水産科、)

○湯本史明<sup>1</sup>、永田宏次<sup>2</sup>、岩崎わかな<sup>1</sup>、足立恭子<sup>3</sup>、小林由枝<sup>3</sup>、  
根本暢明<sup>4</sup>、尾島孝男<sup>5</sup>、西田清義<sup>5</sup>、田之倉優<sup>1</sup>

**Solution structure analysis of the C-terminal half of Akazara scallop troponin C**

Fumiaki Yumoto<sup>1</sup>, Koji Nagata<sup>2</sup>, Wakana Iwasaki<sup>1</sup>, Kyoko Adachi<sup>3</sup>, Yoshie Kobayashi<sup>3</sup>,  
Nobuaki Nemoto<sup>4</sup>, Takao Ojima<sup>5</sup>, Kiyoyoshi Nishita<sup>5</sup>, Masaru Tanokura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,  
<sup>2</sup>Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, Tokyo, <sup>3</sup>Marine Biotechnology Institute, Shimizu,  
Shizuoka, <sup>4</sup>Varian Technologies Japan Ltd., Tokyo, <sup>5</sup>Department of Marine Bioresources Chemistry,  
Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido

Troponin C (TnC), consisting of four EF-hand motifs (I-IV), is responsible for Ca<sup>2+</sup>-regulated contraction of skeletal muscles. Vertebrate fast skeletal TnCs are capable of binding four Ca<sup>2+</sup>, while Akazara scallop (*Chlamys nipponensis akazara*) TnC binds only one Ca<sup>2+</sup> at its C-terminal EF hand motif (at Site IV), because all the other EF-hand motifs (Sites I-III) lack critical residues for the coordination of Ca<sup>2+</sup>.

To analyze the Ca<sup>2+</sup>-dependent structural changes and functional regulation of Akazara TnC, we have been doing structural analysis of its C-terminal half, a 73-residue polypeptide consisting of two EF-hand motifs (III and IV), in the presence of Ca<sup>2+</sup>. Triple-resonance NMR data were collected with a sample containing <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-labeled C-terminal half of Akazara TnC and nonlabeled Akazara TnI fragment (TnI<sub>129-183</sub>) at a molar ratio of 1:1.2 to prevent aggregation. The NMR data indicate that the C-terminal half of Akazara TnC contains four  $\alpha$ -helices and two short  $\beta$ -strands. The solution structure will be presented, and the structure-function relationship will be discussed.

Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質、トロポニン C、多核多次元 NMR、溶液構造

ゆもとふみあき、ながたこうじ、いわさきわかな、あだちきょうこ、こばやしよしえ、

ねもとのぶあき、おじまたかお、にしたきよよし、たのくらまさる

[序] トロポニン C (TnC) は、骨格筋の収縮を制御する  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質である。脊椎動物骨格筋の速筋や遅筋、あるいは心筋に由来する TnC は 1 分子あたり  $\text{Ca}^{2+}$  を 4 つあるいは 3 つ結合することによって、その機能が制御される。これらの  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位は N 末端側からサイト I、II、III、IV と呼ばれる EF ハンドモチーフで構成されている。一方、ホタテガイの一種であるアカザラガイの閉殻筋で見出される TnC は、 $\text{Ca}^{2+}$  をサイト IV において 1 つしか結合しない。したがって、アカザラガイ TnC の場合は C 末端側に存在するサイト IV への  $\text{Ca}^{2+}$  結合のみで制御されていることになる。脊椎動物 TnC の場合とは異なる、アカザラガイ TnC の  $\text{Ca}^{2+}$  による構造変化と機能制御機構を明らかにするため、我々は NMR による溶液構造解析を進めている。アカザラガイ TnC は、全長あるいは  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位を含む TnC C 末端半分子ともに、単独では、濃度 1 mM で自己会合していたが、TnI の TnC C 末端半分子結合領域 (TnI<sub>129-183</sub>) との複合体形成により自己会合が抑制され、NMR による解析が可能となった。

[方法] アカザラガイ TnC C 末端ドメインの主鎖および側鎖のシグナルは、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識 TnC C 末端半分子と非標識 TnI<sub>129-183</sub> とのモル比 1:1.2 の混合サンプルを用い、Varian INOVA 750 にて測定した多核多次元 NMR スペクトル ( $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB, (HCA)CO(CA)NH, HNCO, C(CO)NH, H(CCO)NH, HCCH-COSY, HCCH-TOCSY) を使って帰属した。データ解析には、NMRPipe および Sparky を用いた。 $^{15}\text{N}$ -edited NOESY,  $^{13}\text{C}$ -edited NOESY, HNHA 実験から得られた距離および角度情報を基に、DYANA を用いて構造計算を行った。

[結果・議論] TnI<sub>129-183</sub> との複合体において、アカザラガイ TnC C 末端半分子は、4 本の  $\alpha$ ヘリックスと 2 本の短い  $\beta$ ストランドをもつことがわかった (Fig. 1)。この 4 本のヘリックスを N 端側から順に E, F, G, H と呼ぶと、E と F, G と H がそれぞれヘリックスループ-ヘリックスモチーフを形成し、さらに E と H, F と G がヘリックス間で相互作用していた。また、2 本の短い  $\beta$ ストランドは、逆平行  $\beta$ シートを形成していた。現在、構造精密化を進めている。本発表では、アカザラガイ TnC の構造機能相関について議論する予定である。



Fig. 1 Amino acid sequence and secondary structure of Akazara scallop TnC C-domain, complexed with TnI<sub>129-183</sub>

**$^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -NMR を用いた RecA と DNA との相互作用の解析**

(<sup>1</sup>理研・遺伝生化学, <sup>2</sup>横浜市大・院総合理, <sup>3</sup>CREST・JST, <sup>4</sup>日本  
ブルカー)

○本多賢吉<sup>1,2</sup>, 西田幸治<sup>1</sup>, 美川務<sup>1,2,3</sup>, 伊藤隆<sup>1,2,3</sup>, Markus Waelchli,<sup>4</sup> 柴田武彦<sup>1,2,3</sup>

 **$^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -NMR studies of RecA-DNA interactions**

Masayoshi Honda<sup>1,2</sup>, Koji, Nishida<sup>1</sup>, Tsutomu Mikawa<sup>1,2,3</sup>, Yutaka Ito<sup>1,2,3</sup>, Markus Waelchli<sup>4</sup>,  
and Takehiko Shibata<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>Cellular & Molecular Biology Laboratory, RIKEN; <sup>2</sup>Graduate School of Integrated Science,  
Yokohama City University; <sup>3</sup>CREST, JST; <sup>4</sup>Bruker Japan)

*E. coli* RecA (352 a.a.) plays a key role in DNA homologous recombination. The active form of RecA binds ssDNA and dsDNA and forms helical nucleoprotein filament, to promote strand exchange reaction between homologous regions in the ssDNA and dsDNA. In addition to L2 loop, a putative DNA binding region, C-terminal domain was revealed to be responsible to dsDNA binding by our former NMR studies.

In this study we are aiming at incorporation of  $^{19}\text{F}$  nuclei into RecA by feeding  $^{19}\text{F}$ -Trp and measuring  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  intermolecular TRNOE in order to investigate RecA-DNA interactions. F203W mutagenesis introduced  $^{19}\text{F}$  nuclei into L2. In addition to full-length  $^{19}\text{F}$ -RecA molecules, a  $^{19}\text{F}$ -labelled C-terminal domain was prepared and tested for  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  NOE experiments. Various  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  TRNOE experiments using these samples are in progress.

【はじめに】 RecA 蛋白質 (352 アミノ酸残基) は大腸菌における DNA 相同組換え反応の主要因子である。RecA は ssDNA, dsDNA とフィラメント状の複合体を構築し, DNA 鎖間の相同配列を認識し, 鎖交換反応を行う等の複雑な反応を触媒する。RecA は配列非特異的に DNA 分子と結合するが, 200 残基目付近にある, 種間でよく保存されたループ (L2) が, DNA クロスリンク法や種々の変異体実験から DNA の組換え活性の中心であると考えられている。また私たちの NMR を用いた解析から, 268 残基目以降の C 末端ドメインが dsDNA 結合に関与していることが示されており, 相互作用部位も特定されている。RecA 全体の構造は既に X 線結晶解析法によって解明されているが, DNA との相互作用のメカニズムは未だ原子分解能での解明には至っていない。NMR 法を用いて RecA の上記の領域と ssDNA, dsDNA との相互作用を解析することができれば, 相同組換えのメカニズムの理解に非常に有用な知見を得ることができる。しかしながら全長 RecA はフィラメント構造を構築して DNA と相互作用するため, 分子量の問題から NMR を用いた研究は非常に困難である。そこで本研究では NMR で感度良く観測することが可能な  $^{19}\text{F}$  核を (実際には  $^{19}\text{F}$  標識アミノ酸を) 目的の蛋白質に部位特異的に導入しその付近の選択的な構造情報を取り出すことを試みた。

キーワード : RecA, DNA Homologous recombination,  $^{19}\text{F}$ , Protein-DNA interaction

ほんだ まさよし, にしだ こうじ, みかわ つとむ, いたう ゆたか, Markus Waelchli, しばた たけひこ

【方法】 本研究では RecA における組換え活性の中心と考えられる L2 に  $^{19}\text{F}$  核を導入し、この領域と短い ssDNA との間で分子間 TRNOE を観測する事ができるか否かを検証することを目的に以下の方法で実験を進めた。RecA に短い ssDNA を過剰に加えると分子内 TRNOE が観測されることは既に検証済みである。まず  $^{19}\text{F}$  核導入のために  $^{19}\text{F}$ -Trp を選択した。しかし、L2 には Trp 残基がないので、Phe-203 残基を Trp に置換した F203W 変異体を作成した。Phe-203 残基は DNA と相互作用するであろうと推定されている残基であるが、このアミノ酸置換によって RecA の DNA に対する生物活性は損なわれないという報告が既になされている。野生型 RecA および RecA(F203W)について、効率よく  $^{19}\text{F}$ -Trp 標識蛋白質を調製するための培養条件の最適化を行った。

次に  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  NMR 測定の予備実験のための試料として、 $^{19}\text{F}$ -Trp、 $^{15}\text{N}$  ユニフォーム標識した RecA の C 末端ドメイン ( $^{19}\text{F}$ -Trp/ $^{15}\text{N}$ -RecACterm) を調製した。C 末端ドメインには Trp が 2 残基存在する。この試料について、1 次元および 2 次元の  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  分子内 NOE 測定実験を行った。続いてこの試料に 2 本鎖 DNA (d(CCGGTGATAGAC-GTCTATCACCGG)) を加え、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC を測定することでタイトレーション実験を行った。また同時に  $^{19}\text{F}$  の 1 次元 NMR 測定を行った。

【結果・考察】  $^{19}\text{F}$ -Trp/ $^{15}\text{N}$ -RecACterm について、2D  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  NOE、2D  $^{19}\text{F}$ - $^1\text{H}$  NOE 実験を行い、異種核分子間 NOE を観測することができた。また 2 つの  $^{19}\text{F}$  シグナルの一方を照射し  $^1\text{H}$  で観測する 1 次元 NOE 測定を行い、同様の NOE を観測することができた。次の 2 本鎖 DNA を加えたタイトレーション実験では  $^{15}\text{N}$ -RecACterm とまったく同様の HSQC 上のケミカルシフト変化を観測した。一方これと並行して行った  $^{19}\text{F}$  の 1 次元測定では 2 つの  $^{19}\text{F}$  シグナルのうち、立体構造の座標から DNA と相互作用していると考えられる Trp に由来するシグナルが、DNA 濃度依存的に化学シフト変化を示した。現在は dsDNA を過剰に加えた状態で、 $^{19}\text{F}$ - $^1\text{H}$  分子間 TRNOE の測定を試みている。

また、 $^{19}\text{F}$  標識した 2 種の全長 RecA (野生型および RecA(F203W)) について、1 次元  $^{19}\text{F}$  スペクトルを測定した結果、非常にブロードながらも  $^{19}\text{F}$  シグナルを観測することができた。今後は ssDNA を加えた試料を調製し、全長 RecA に対しても  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  2 重共鳴 NMR 法による相互作用解析を行なっていく予定である。

#### 【文献】

Nishinaka, T *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 6623-6628 (1997)  
Aihara, H. *et al.*, *J.Mol.Biology* **274**, 213-221 (1997)

## 高等植物の His-Asp リン酸転移情報伝達系 B 型レスポンスレギュレータの DNA 認識機構

○細田和男<sup>1</sup>、加藤悦子<sup>1</sup>、八田知久<sup>1</sup>、水野猛<sup>2</sup>、山崎俊正<sup>1</sup>  
(農業生物資源研究所<sup>1</sup>、名古屋大学農学部<sup>2</sup>)

### DNA recognition by B-motif, a signature motif of type-B response regulators for His-Asp phosphorelay signal transduction system in higher plant

Kazuo Hosoda<sup>1</sup>, Etsuko Katoh<sup>1</sup>, Tomohisa Hatta<sup>1</sup>, Takeshi Mizuno<sup>2</sup>,  
and Toshimasa Yamazaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Agrobiological Sciences,  
<sup>2</sup>School of Agricultural Sciences, Nagoya University

B-motif is a signature motif of type-B response regulators for His-Asp phosphorelay signal transduction system in *Arabidopsis thaliana*. Based upon the NMR solution structure of B-motif determined by us, we have proposed a structure-based hypothesis that the type-B regulators function by binding of B-motif to its DNA target. In this study, we have identified DNA-binding sites of B-motif by analyzing NMR chemical shift changes upon complex formation with its target DNA. In addition, we have determined the DNA-bound structure of B-motif by NMR. The spatial arrangements of residues in B-motif interacting with DNA as well as its DNA-bound structure strongly suggest that B-motif binds to DNA in a similar manner as homeodomain, using the solvent exposed surface of  $\alpha$ 3-helix and its surrounding regions, and the N-terminal arm before  $\alpha$ 1-helix.

#### [緒言]

近年、高等植物においてもバクテリア型His-Aspリン酸転移情報機構が多様な環境シグナル応答に利用されていることが明らかにされ注目されている。シロイヌナズナにおいては、これまでに20種類以上のレスポンスレギュレータ(ARR)が同定されており、レシーバ領域の下流に60残基程度の共通配列(Bモチーフ)が存在するか否かにより2つのサブファミリー(A型とB型)に大別される。昨年、我々はARR10のBモチーフ(ARR10-B)の溶液構造は3本の $\alpha$ -ヘリックス( $\alpha$ 1:H12-L25,  $\alpha$ 2:P32-M39,  $\alpha$ 3:R46-K61)からなるMyb様のヘリックスバンドル構造であることを明らかにし、この解析結果に基づき、B型レギュレータはBモチーフがDNAと結合することにより機能を発現するという仮説を提唱した。本研究では、1) ARR10-BのDNA認識部位の特定と2) DNAと複合体を形成したARR10-Bの立体構造決定を行い、DNA認識機構を解析した。

#### [実験]

<sup>15</sup>N標識及び<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N標識したARR10-B (T179-S242) は大腸菌を用いた系により大量合成した。NMR測定はARR10-B (1mM)、NaCl (150mM)を溶解した20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>緩衝液(pH 7.0)について、Bruker DMX750を用いて15°C及び30°Cで行った。NMRによるDNA滴定実験は、<sup>15</sup>N-ARR10-B溶液に2種類の12bp DNA (DNA#1:CACTGATTCAGG, DNA#2:GCAAGATTCGGC)を一定量ずつ加え<sup>15</sup>N-HSQC測定により15°Cで行った。DG法とSA法を併用した構造計算はX-PLOR3.1を用いて行った。

キーワード : His-Asp リン酸転移情報伝達、B モチーフ、DNA 結合タンパク質、ARR  
ほそだ かずお、かとう えつこ、はった ともひさ、みずの たけし、やまざき としまさ

## [結果と考察]

ARR10-B の DNA 認識部位を特定するために NMR による滴定実験を行った。DNA#1 ( $K_d = 5.4 \mu\text{M}$ ) と DNA#2 ( $K_d = 0.6 \mu\text{M}$ ) いずれの場合にも、ARR10-B と DNA の複合体形成比は 1:1 であることが明かとなった。但し、前者は fast exchange 様式で複合体を形成するのに対して、後者は slow exchange 様式で複合体を形成する。また、DNA#2 との複合体形成に伴い大きな化学シフトの変化を示す残基は、柔軟性に富む N-末端領域(V8-W10)、 $\alpha 2$  から  $\alpha 3$  にかけて形成される helix-turn-helix (HTH)モチーフ領域に分布している(Fig. 1)。殊に、HTHモチーフの第2ヘリックスに相当する $\alpha 3$ に集中しており、これが DNA 認識ヘリックスであることが示唆される。DNA#1 との複合体形成に際しても同様の残基が大きな化学シフト変化を示すが、V8-W10のシグナルは消失してしまう。これらの結果は、V8-W10 及びそれに近接する残基と DNA との緊密な相互作用が ARR10-B の DNA 結合能の向上に寄与していることを示唆している。

ARR10-B/DNA#2 複合体(1:1.2)の NMR 解析から得られた束縛条件(834 個)を用いて、DNA と複合体を形成している ARR10-B の高次構造を決定した。当然のことながら、複合体中の ARR10-B の構造は単体の溶液構造と類似しているが、詳細に比較検討すると重要な相違点が認められる。1) DNA 認識ヘリックスと想定される $\alpha 3$  は C-末端側に 3 残基伸長している。2)単体では柔軟性に富む N-末端領域(殊に V8-W10)は、DNA との結合に伴い $\beta$ ストランド構造を形成するようになり、その相対位置を $\alpha 3$ ヘリックス方向に移動する。この結果、N-末端領域は DNA と直接に相互作用するようになり、V8-W10 領域が大きな化学シフト変化を示すものと推測される。Fig. 2 には、DNA#2 との複合体形成に伴い大きな化学シフト変化を示す残基を複合体中の ARR10-B 構造上に表示した。この構造及び DNA 認識残基の空間配置は、ホメオドメイン(ENG)/DNA 複合体の X 線結晶構造(1)に観測されるそれと非常に高い類似性を示す。以上のことから、ARR10-B は、ENG と同様に、 $\alpha 3$ ヘリックスが DNA のメジャーグループと、N-末端領域がマイナーグループと相互作用し安定な複合体を形成するものと考えられる。現在、より詳細に ARR10-B/DNA 相互作用様式を解明するために、分子間 NOE の解析を進めている。

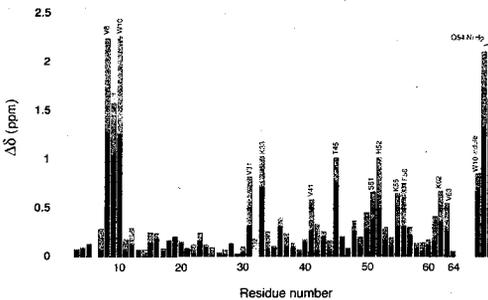


Fig.1. NMR chemical shift perturbation of ARR10-B upon complex formation with DNA#2. Chemical shift changes calculated with the function  $\Delta\delta = \Delta\delta_{HN} + 0.17\Delta\delta_{15N}$  are plotted against residue number.

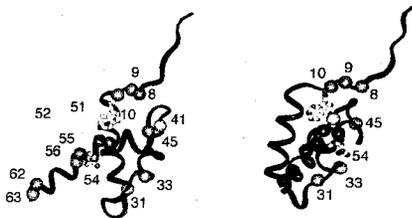


Fig.2. Two views of the DNA-bound ARR10-B structure. Spheres identify the backbone amides displaying large chemical shift changes ( $\Delta\delta > 0.5 \text{ ppm}$ ) upon complex formation with DNA#2. Note that the side chains of W10 and Q54 shown in stick models were also perturbed.

## References

- 1 Kissinger, C.R., Liu, B., Martin-Blanco, E., Kornberg, T.B., Pabo, C.O. (1990) *Cell* **63**, 579-590.

## Human cystatin A の多量化機構と繊維形成

(東京都立大学 理学研究科)

○ 大野綾子<sup>1</sup>、甲斐荘正恒<sup>1</sup>

### Oligomerization mechanism and fiber formation of human cystatin A

(*JST & Graduate School of Science and Tokyo Metropolitan University*)

Ayako Ohno and Masatsune Kainosho

A proteinaceous cysteine proteinase inhibitor, cystatin A (11kDa), can form a stable dimer following thermal or acid denatured states. Similar phenomena have been observed for other cystatin superfamily proteins. Much attention has been directed to these phenomena, since a thermally unstable L68Q cystatin C mutant, which has been known to form a dimer even under physiological conditions, may cause the familial HCCAA syndrome through amyloid fibril deposition. As already shown by us, the cystatin A dimer adopts a symmetrical “domain-swapped” structure, having two monomer-like domains connected by a short flexible linker. Since the recently reported crystal structure of cystatin C dimer also has a similar domain-swapped form, domain swapping seems to be a common tendency for cystatin superfamily proteins and thus related to amyloid fibril formation. We have detected the oligomeric forms, such as trimer and tetramer, and amyloid-like aggregates, by SDS-PAGE and electron micrograph, respectively, for cystatin A solutions incubated above the denaturation temperature. This is the first experimental proof for the mechanism of amyloid fibril formation of cystatin superfamily proteins.

シスタチンはシステインプロテアーゼの阻害蛋白質で、動物から植物に至るまで広く存在している。シスタチンは一次配列の相同性からシスタチンスーパーファミリーと名づけられた一群の類縁蛋白質群を構成している。このスーパーファミリーは分子量やジスルフィド結合の有無等により、更に三種類のファミリーに分類される。ファミリー1に属するシスタチンA (11kDa)は熱変性温度が83.3℃と高く、熱的に安定な蛋白質である。シスタチンAは熱や酸などの変性状態から巻き戻すことにより、安定な不活性型の二量体を形成することが知られている。

キーワード： プロテアーゼインヒビター、ドメインスワップ機構、多量体形成、アミロイド繊維化、ダイナミクス

おおのあやこ、かいのしょうまさつね

この二量体形成はシスタチン A のみならず、他のシスタチン類においても見られる共通の性質である。特に、ファミリー2 に属するシスタチン C の変異体(L68Q)は熱的に不安定であり、生理学的条件下においても容易に二量体形成することから、遺伝性のシスタチン C アミロイド脈間障害 (HCCAA) を引き起こすアミロイドファイバー形成と二量体形成との関連が指摘されてきた。従って、シスタチン類の二量体形成機構及び立体構造を明らかにすることはアミロイド繊維形成の機構の解明にもつながる可能性があり、生理学的に重要な意味を持つことが期待される。我々は、既に昨年、多次元 NMR によるシスタチン A 二量体の立体構造決定を行い、この二量体が N 末端 (残基番号 1- 47 番) のユニットと C 末端側 (残基番号 51- 98 番) のユニットが入れかわったドメインスワップダイマーであることを明らかにした。この溶液構造中では二つのユニットが磁氣的に等価となっており、両ユニット間のリンカー領域が柔軟な運動性を持っていることが示唆され、これらの事実がアミロイド繊維形成と関連する可能性を示唆した[文献 1]。また、最近になって、シスタチン C(wild type)の X 線結晶構造決定が行われ、結晶中で同様のドメインスワップダイマー構造を形成していることが偶然明らかにされた [文献 2]。以上の結果より、ドメインスワップ型のダイマー形成機構がファイバー形成に関与している可能性が強く示唆された。また、溶液構造中に見られるようなシスタチン二量体中のリンカー部分の柔軟性もファイバー形成機構に関連があると考えられる。このような推定から、我々はシスタチン A 二量体の原子座標を用いて多量体形成モデルを構築し、シスタチン A がドメインスワップ機構により二量体以上の逐次的な多量体を形成しうることを示した。また、実験的にもシスタチン A が逐次的な多量体を形成することを SDS-PAGE により確認した。さらに、多量体形成条件下でシスタチン A がアミロイドファイバー様の会合体を形成することをコンゴレッド染色及び電子顕微鏡を用いて確認した。これらはシスタチン類のアミロイド繊維形成機構の解明に関連する実験的事実として極めて重要である。

[文献 1] 大野綾子、田代充、児嶋長次郎、楯真一、須田真輔、梶裕之、甲斐荘正恒  
第 5 回構造生物学シンポジウム 講演要旨集 p 72-74 (2000)

[文献 2] Janowski, R., Kozak, M., Jankowska, E., Grzonka, Z., Grubb, A.,  
Abrahamson, M., Jaskolski, M. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 316-320 (2001)

## コリシン E6 の RNase 活性ドメインと ImmE6 複合体 の立体構造

(東大院農<sup>1</sup>、理研 GSC<sup>2</sup>)

○ 池谷鉄兵<sup>1</sup>、伊藤隆<sup>2</sup>、畑中稔<sup>2</sup>、板倉健人<sup>1</sup>、大野光宏<sup>1</sup>、横山茂之<sup>2</sup>、  
清水謙多郎<sup>1</sup>、正木春彦<sup>1</sup>

### **Solution structure of the RNase active domain of colicin E6 in the complex with its inhibitor protein**

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, The University of Tokyo, <sup>2</sup>Protein Research Group Genomic Sciences Center, RIKEN(The Institute of Physical and Chemical Research)

○ Tepei Ikeya<sup>1</sup>, Yutaka Ito<sup>2</sup>, Minoru Hatanaka<sup>2</sup>, Takehito Itakura<sup>1</sup>, Mituhiro Ohno<sup>1</sup>, Shigeyuki Yokoyama<sup>2</sup>, Kentaroh Shimizu<sup>1</sup> and Haruhiko Masaki<sup>1</sup>

### **Abstract**

Colicins are plasmid-encoded cytotoxins produced by *E.coli*, which are secreted into the medium and kill sensitive strains of competing bacteria. The function of colicin E3, E4 and E6 is to induce a nucleolytic break in 16S ribosomal RNA. The Col-plasmid also includes the gene for a colicin inhibitor protein (Imm) that neutralizes a colicin inside the bacterial cell in order to avoid suicide.

We attempted to determine the solution structure of colicin E6-CRD-ImmE6 complex to understand how these amino acids participate in its ribosome-inactivating properties and its inhibition. We had determined the individual three-dimensional structure of the E6-CRD and ImmE6. We purified U-<sup>15</sup>N and U-<sup>13</sup>C /<sup>15</sup>N E6-CRD-ImmE6 complex and analyzed the solution structure using triple resonance NMR experiments.

---

RNase、タンパク質間相互作用、リボソーム、立体構造解析、インヒビター

いけやてっぺい、いとうゆたか、はたなかみのる、いたくらたけひと、おおのみつひろ、よこや  
ましげゆき、しみずけんたろう、まさきはるひこ

はじめに

コリシンは、Colプラスミドにより SOS 応答時に生産され、このプラスミドを持たない大腸菌を殺すタンパク質性毒素である。このうちコリシン E3、E4、E6 は、16S-rRNA を特異的に切断する RNase 活性を持つ。また、Col プラスミドはコリシン遺伝子とともに免疫インヒビター (Imm) をコードしており、コリシンタンパク質の生産と同時にインヒビターである Imm タンパク質も発現し、宿主大腸菌の自殺を防いでいる。

RNase 活性を示すコリシンの中で、E3 と E6 は、活性ドメイン(CRD)と Imm ともに高い相同性を持っているが、これまでの生化学的、分子生物学的な解析から、CRD-Imm による阻害特異性は非常に厳密で、わずか 1-2 残基の相違アミノ酸がこれに関与するということが明らかになっている。そこで、これらのアミノ酸が立体構造の上で阻害特異性にどう寄与しているか明らかにするため、NMR による構造解析を試みた。

我々は、これまでに NMR を用いてコリシン E6 の活性ドメイン(E6-CRD)、および(そのインヒビターである) ImmE6 の構造を決定している。今回、新たに E6-CRD と ImmE6 との複合体の構造解析を行なうために、 $^{15}\text{N}$ -標識、および  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -三重標識したサンプルを調整し、各種の異核種多次元 NMR 測定を行なった。

## 方法

主鎖  $^1\text{H}_\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  核シグナルの帰属のためには、HNCACB と CBCA(CO)NNH の測定を、側鎖のプロトン核及び  $^{13}\text{C}$  核シグナルの帰属のためには、H(CCCO)NNH、HCCH-TOCSY、CC(CO)NNH 測定を行い、原子間の距離情報を得るために  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC と  $3\text{D}^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC の測定を行った。またデータ処理には、Azara プログラムを、スペクトルの解析には Ansig プログラムをそれぞれ使い、構造計算には CNS を用いた。

## 結論

これまでの NMR タイトレーションの結果から、CRD と Imm の結合中心はそれぞれ、N 末端から 48-51 番目、46-48 番目の領域であることがわかっている。現在までの NOE 解析の結果から、CRD の 45-50 番目のランダムコイル領域は、結合による大きな構造変化が示唆された。CRD の推定酵素活性中心 (E67,D69,E76) は、Imm との結合領域とは離れて位置していることから、この複合体形成にともなう構造変化が、活性中心の構造変化を導いているものと思われる。現在、 $3\text{D}^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC と  $3\text{D}^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC の解析から得られた距離情報をもとに CNS を用いて構造計算を進めている。

**p47<sup>phox</sup> のタンDEM SH3 ドメインと p22<sup>phox</sup> PRR の相互作用**

(北大・院薬<sup>1</sup>, CREST/JST<sup>2</sup>, 九大・生体防御医研<sup>3</sup>)

○小椋賢治<sup>1</sup>, 湯沢 聰<sup>2</sup>, 横地政志<sup>2</sup>, 住本英樹<sup>3</sup>, 稲垣冬彦<sup>1</sup>

**Interaction between tandem SH3 domain of p47<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> PRR**  
Kenji Ogura<sup>1</sup>, Satoru Yuzawa<sup>2</sup>, Masashi Yokochi<sup>2</sup>, Hideki Sumimoto<sup>3</sup>,  
and Fuyuhiko Inagaki<sup>1</sup>

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University<sup>1</sup>,  
CREST/JST<sup>2</sup>,  
and Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University<sup>3</sup>

A tandem SH3 domain, which consists of two SH3 domains connected with a 17 residues-linker, of p47<sup>phox</sup> is thought to cooperatively interact with a proline-rich region (PRR) of p22<sup>phox</sup>. We investigated the interaction mechanism between the tandem SH3 domain of p47<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> PRR using NMR spectroscopy. A titration experiment of p22<sup>phox</sup> PRR to <sup>15</sup>N-labeled p47<sup>phox</sup> suggests that two SH3 domains cooperatively bind to p22<sup>phox</sup> PRR by non-canonical recognition of SH3 domain.

[序論]

好中球の活性酸素発生系にて活性酸素発生を触媒する NADPH オキシダーゼは細胞質因子 (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> および活性型 Rac) と膜タンパク質シトクロム b558 の複合体である。活性酸素発生の休止状態において、細胞質因子とシトクロム b558 は結合できないが、Rac の活性型への移行が引き金となって細胞質因子複合体は構造変化を起こし、シトクロム b558 に結合できるようになる。この複合体形成の中心的役割を担う分子間相互作用は、細胞質因子のひとつ p47<sup>phox</sup> とシトクロム b558 のサブユニット p22<sup>phox</sup> の結合である。その結合様式は、p47<sup>phox</sup> のリンカーを介して結合した二つの SH3 ドメイン領域 (タンDEM SH3) が、p22<sup>phox</sup> の 1ヶ所のプロリンに富む領域 (PRR) を共有して結合すると言われており、その認識機構は SH3 による標的認識としては新規であるものと予想されている。

本研究の目的は、p47<sup>phox</sup> のタンDEM SH3 ドメインと p22<sup>phox</sup> の PRR の相互作用を NMR を用いて解析することである。

p47<sup>phox</sup>, SH3, p22<sup>phox</sup>

おぐらけんじ, ゆざわさとる, よこちまさし, すみもとひでき, いながきふゆひこ

## [実験]

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  均一ラベル p47<sup>phox</sup> タンデム SH3(138 残基)は大腸菌の大量発現系により, GST 融合タンパク質として生産した. GST アフィニティー粗精製後, GST を protease で切断, イオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーにより最終精製タンパク質を得た. 得られたタンパク質を濃度 0.3mM にてリン酸緩衝液(pH 7)に溶解し, NMR 測定試料とした. p22<sup>phox</sup> PRR を含むペプチドフラグメント(配列:KQPPSNPPPRPPAE)はシグマジェノシスジャパン社に合成を依頼し, 入手した. NMR スペクトル測定には, Nalorac 8mm 径プローブ(形式: IDTG500-8)を装着した Varian UNITY INOVA 500 分光計を使用した. 温度 30°Cにて  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, HNCO, HN(CO)CA, HNCA, HNCACB, CBCA(CO)NH および C(CO)NH スペクトルを測定した. NMR データ処理は, RedHat 7.1J Linux が動作する PC にて, NMRPipe/Wish および自家製スペクトル解析支援ソフトウェア Olivia を使用しておこなった.

## [結果と考察]

タンデム SH3 ドメインのプロリン(8 個)と N 末端を除いた 129 残基のうち, 126 残基の主鎖原子を連鎖帰属した. 二つの SH3 ドメインを繋ぐリンカー部(17 残基)の信号は他部位よりもシャープな線形を示した. このことは, リンカー部が flexible であり, 二つの SH3 ドメインが独立に振舞っていることを示唆する.

p47<sup>phox</sup> タンデム SH3 ドメインに対して p22<sup>phox</sup> PRR ペプチドを滴定しながら,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定し, 信号の変化を追った. ペプチド添加により, NMR スペクトルの線幅は増大した. また, その化学シフトは slow exchange state で変化した. そして, 化学シフト変化はタンパク質に対してペプチド 1 当量でほぼ飽和した. これらの結果は, p47<sup>phox</sup> タンデム SH3 ドメインが p22<sup>phox</sup> PRR ペプチド結合にともない, 分子全体の形状がアメリカンクラッカー型から球状に変化したこと, また, タンデム SH3 の p22<sup>phox</sup> PRR に対する親和性が極めて強い( $\sim\mu\text{M}$  以下)ことを示唆する. p22<sup>phox</sup> PRR ペプチドの結合により影響を受けたアミノ酸残基は, タンデム SH3 ドメインの両方のドメイン全体に分布していたが, C 末端側ドメインよりも N 末端側ドメインのほうが強い相互作用を示した. さらに, N 末端側ドメインでは PRR 結合サイト周辺がペプチド結合の影響を強く受けているのに対して, C 末端側ドメインでは PRR 結合サイトよりも他の部位が影響を強く受けていた. 以上の実験結果は, 二つの SH3 ドメインが向かい合い PRR 結合部位でペプチドを挟むという単純な構造モデルでは説明できない.

## Vav C 末端側 SH3 の構造と標的配列の認識機構

(北大院薬<sup>1</sup>、CREST/JST<sup>2</sup>) ○新沼さおり<sup>1</sup>、小椋賢治<sup>1</sup>、堀内正隆<sup>1</sup>、湯沢聡<sup>2</sup>、川崎政人<sup>2</sup>、横地政志<sup>2</sup>、稲垣冬彦<sup>1</sup>

Solution structure of Vav C-terminal SH3 and the mechanism of target recognition

Saori Niinuma<sup>1</sup>, Kenji Ogura<sup>1</sup>, Masataka Horiuchi<sup>1</sup>, Satoru Yuzawa<sup>2</sup>,

Masato Kawasaki<sup>2</sup>, Masashi Yokochi<sup>2</sup>, and Fuyuhiko Inagaki<sup>1</sup>

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University<sup>1</sup>

CREST/JST<sup>2</sup>

Vav is a protein expressed mainly in hematopoietic cells, and participates in signal transduction of cell proliferation and cell differentiation. Vav contains many functional domains which interact with many other proteins. Here, we analyzed three dimensional structure of C-terminal SH3 domain of Vav (VcSH3) complexed with the proline rich region (PRR:NLPLPPPPPRG) of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNPk) which contains hexa proline sequence by NMR. We elucidated the recognition mechanism of PRR of hnRNPk by VcSH3.

## =序論=

Vav は主に血球系の細胞に発現する、2つの SH3 ドメインをはじめとする複数の機能ドメインを持つタンパク質である。SH3 ドメインはプロリンに富む領域(PRR)を認識するが、その配列は SH3 ドメインの種類によって異なり、Vav の C 末端側の SH3 ドメイン(VcSH3)では、少なくともプロリンが5つ連続して並んだ配列を認識する。VcSH3 との Binding site が明らかとされているタンパク質には hnRNPk(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K)があり、その PRR には hexa proline が存在する。hnRNPk は RNA 結合タンパク質の1つで、核内で転写された RNA を核外に輸送する働きをもっている。本研究において VcSH3 と hnRNPk の PRR ペプチド複合体の立体構造解析を NMR を用いて行うことによって、VcSH3 の標的配列認識機構を明らかにすることができ、シグナル伝達および核輸送に関する両者の機能の理解、さらにその他の VcSH3 結合タンパク質の認識部位を推定する知見が得られるものと期待される。

キーワード: Vav, SH3, hnRNPk

名前: ○にいぬまさおり、おぐらけんじ、ほりうちまさたか、ゆざわさとる、かわさきまさと、よこちまさし、いながきふゆひこ

## =実験と結果=

VcSH3(782~844aa)の遺伝子を pET20b に組み込み、His タグ融合タンパク質として作成したコンストラクトを用いて大腸菌株 BL21(DE3)を形質転換し、大量発現系を構築した。菌体破碎物上清を Ni-NTA カラムによる粗精製後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより最終精製サンプルを得た。各種溶媒条件下で溶解度を検討したところ、pH4.0 において最も溶解度が高いことが分かった。pH 4~7 の範囲で CD スペクトルを測定し、いずれの pH でも高次構造が保持されていることを確認した。NMR 測定サンプルの溶媒条件は 50 mM Acetate(pH 4.0), 5mM DTT, 5mM NaN<sub>3</sub>、濃度は 1mM とした。hnRNPK の PRR(NLPLPPPPPPRG)は依頼合成したものをを用いた。NMR 測定には Varian UNITY plus 600 を用いた。

VcSH3-PRR 複合体サンプルについて HNC(O)CA、HN(CO)CA、HNCA、CBCA(CO)NH、HNCACB、HBHA(CO)NH、C(CO)NH を測定し、当研究室で開発された帰属支援ソフトウェア Olivia を用いて VcSH3 主鎖連鎖帰属を行った。4D HCCH-TOCSY、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C CT-HSQC、DQF COSY、NOESY、TOCSY スペクトルにより VcSH3 側鎖の帰属を行った。<sup>13</sup>C-filtered COSY、<sup>13</sup>C-filtered NOESY、<sup>13</sup>C-filtered TOCSY、<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-filtered NOESY、<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-filtered TOCSY スペクトルによりペプチドの帰属を行った。3D <sup>15</sup>N-edited NOESY、3D <sup>13</sup>C-edited NOESY、3D F<sub>1</sub>-<sup>13</sup>C-filtered, F<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C-edited NOESY、3D F<sub>1</sub>-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-filtered, F<sub>2</sub>-<sup>15</sup>N-edited NOESY スペクトルにより、分子内および分子間の距離情報を得た。

VcSH3 に対する hnRNPK の PRR ペプチド滴定実験から、相互作用に関与する残基を特定した。<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトル上で信号が特に大きく動いた残基は、G819、W820、Q817、I829、N835 であった。これらの残基のうち、W820、I829、N835 は SH3 が PRR と相互作用するコンセンサスな残基とほぼ同じであるが、Q817 と G819 はコンセンサス部分には含まれていない残基であった。このことより、VcSH3 の PRR 認識には、一般的な認識部位だけではなく、その他の周辺領域も関与している可能性が考えられる。

現在、NOESY による distance restraints および  $\phi\phi$  二面角予測プログラム TALOS による dihedral angle restraints に基づき、ARIA/CNS を用いて SGI OCTANE2 上で VcSH3-ペプチド複合体の立体構造計算を行っている。

インハウス Web 上で稼動する NMR スペクトルデータベース  
システムの作成

(NMRDBTech) ○早水紀久子

 **$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral Databases on an Intranet System**

Kikuko Hayamizu (NMRDBTech, hayamizu.k@aist.go.jp)

The SDBS-NMR (SDBSWeb: <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/>) had been built from 1982 in a main-frame computer which was finished at the end of March, 1999. The transfer of the systems including the databases and new input tools by using a personal computer (PC) are necessary. Since the NMR spectral databases contain the chemical structures with spectral assignment, the database structure is complicated. The input tools for the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral databases have been made by using an ISIS/Base system as the manual input tools and a Java applet for the display the spectral patterns dynamically on an intranet system.

$^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$ NMR データベース (SDBS-NMR) は構築開始から長い歳月を経て相当量のデータを集積してインターネットで一般公開サービスをしている。これらには大型汎用計算機やワークステーションを利用してきた。最近の PC の機能を十分に活かした PC ベースの NMR データベースシステムを作成し、このシステムはデータの検索・表示・追加・更新などの全ての機能を備えている。Web システムを利用しグループ内でアクセス可能で小規模なデータ集積にも利用できるようにした。

## 1. PC によるデータベースシステムの基本方針

汎用性が高く化学の世界でのシェアが大きいデータベース管理システム (DBMS) を採用して、大型計算機で作成したデータベースのロジックと矛盾しないシステムを作成することを基本方針とした。NMR のデータベースでは帰属をつけること、これを化学構造式を用いて表示できることが他の化学系データベースと著しく異なる。いくつかの DBMS を試してみたが ISIS/BASE を採用すれば、 $^{13}\text{C}$ NMR でも  $^1\text{H}$ NMR でも従来の大型計算機での表記と類似した形で表されることが分かったので、ISIS/BASE をインプットツールに利用することとした。

SDBS-NMR が長い歳月を経ても価値あるデータベースである最大の理由は最初の設計思想が優れていたためであり、データの精度、付加項目など現時点で変更の必要性を感じる点はほとんどない。大型計算機のデータと整合性を取るために 1,2 の項目の追加をただだけで、従来のデータ項目を踏襲した。PC 入力の利便性のために作業時間は大幅に短縮されたが、スペクトル解析能力や間違えのないデータ入力への集中力の保持に関して従来と全く変わらない。

NMR データベース、イントラネット、データベース構築、検索、表示

はやみずきくこ

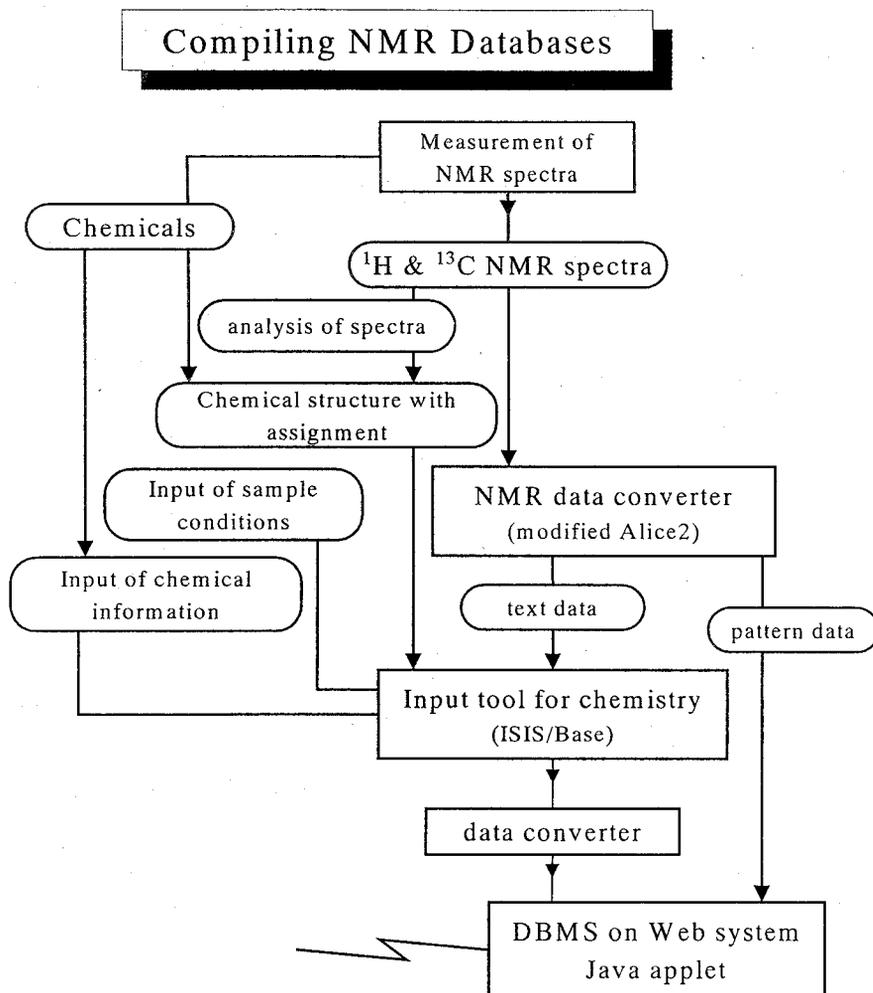


Figure 1. The flow diagram of the NMR database system

## 2. システムの概要

マイクロソフトネットワークを利用して中心にサーバーを設置してシステム、データベースを集中的に管理し、データ構築者は個別の PC から作業をする方式にした。また現在の PC 環境やテキストデータ取扱の容易さに着眼してマニュアル入力部分を最小にする方式をとった。

概要を Fig. 1 に示した。NMR データの処理には機能追加した Alice2 を用いた。このシステムにより新規な  $^1\text{H}$ NMR データ約 200 件と  $^{13}\text{C}$ NMR データ約 800 件をデータベース化してインターネット公開している。またこのシステムは Java applet を採用したために intranet システムとしてスペクトルの拡大機能を保有し、データベースの観覧システムとしても利用できる。

参照文献： 早水紀久子 Journal of Computer Aided Chemistry, 2, 1-10(2001).

( <http://www.chemistry.or.jp/journals/jcac/index.html> )

固体 NMR と分子動力学法による絹の繊維化機構の解明  
(東京農工大・工<sup>1</sup>, 生研機構<sup>2</sup>)○山根努<sup>1,2</sup>, 梅村幸輔<sup>1</sup>, 朝倉哲郎<sup>1</sup>

Study on Fiber Formation Mechanism of *Bombyx mori* Silk Fibroin  
with Solid-State NMR and Molecular Dynamics Simulation  
(Tokyo University of Agriculture and Technology<sup>1</sup>)  
(Bio-oriented Technology Research Advancement Institution<sup>2</sup>)  
Yamane Tsutomu<sup>1,2</sup>, Umemura Kôtsuke<sup>1</sup> and Asakura Tetsuo<sup>1</sup>

In our previous studies, we determined the molecular structure of *Bombyx mori* silk fibroin with silk I and silk II forms by using mainly solid-state NMR. The silk I form was a repeated type II  $\beta$ -turn structure and the silk II form was heterogeneous structure (two types of anti-parallel  $\beta$ -sheet and distorted  $\beta$ -turn structures). In this study, we attempted molecular dynamics simulation of silk I embedded in water molecules under stretching and shearing forces. This simulation could reproduce the heterogeneous structures of silk II form which was observed from the NMR studies quantitatively.

[緒言] カイコやクモは、絹の水溶液から、室温で短時間に同じ太さの鋼鉄線に匹敵する、または、それを超える極めて強い糸を作成する。しかもその糸は弾性を持ち、生分解性である。環境にやさしい素材の開発が強く望まれる昨今、絹繊維の形成メカニズムを見習うことは重要であろう。そのためには、まず、絹の繊維化前の構造を、原子座標レベルで決定することが必要である。しかし、その試料は X 線や電子線回折による詳細な構造解析のために配向を試みると、容易に繊維化後の構造に変化してしまう。したがって、配向しない高分子系でも原子座標レベルで構造決定できる、いくつかの固体 NMR 構造解析法を用いて、その構造を決定した<sup>1)</sup>。さらに、この手法を繊維化後の絹構造の決定にも適用することにより、その不均一構造を解明することができた。すなわち、絹繊維は教科書に載っているような逆平行  $\beta$  シート構造のみで形成されていないことが明らかになった<sup>2)</sup>。

本研究では、決定された繊維化前の構造から、カイコ体内での繊維化の際の条件、すなわち、水の存在下での延伸張力、ずりの作用を考慮して繊維化過程をシミュレーションすることを試みた。その結果、得られた繊維化後の構造は、固体 NMR から明らかとなった、絹繊維の不均一構造を十分に説明できることが明らかとなった。

---

家蚕絹フィブロイン、固体 NMR、分子動力学法、Silk I、Silk II

やまね つとむ、うめむら こうすけ、あさくら てつお

[計算] 1. MD 計算による Silk I から Silk II への構造変化のシミュレーション 水存在下(濃度 30w/w%)での Silk I 型構造を出発点として、蚕の首振り運動に伴う張力(図 1A)と吐糸口の圧糸部のずり(図 1B)との 2 つの力を印加した状態下での MD シミュレーションを行った。

シミュレーションは力場として pcff を用い、NPT アンサンブルにより、水分子のモデルとして TIP3P を用いた。この際、水分子は、系の濃度が液状絹と同じ濃度(30w/w%)となるように発生させた。張力 0.1GPa、ずり応力として、0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0GPa を Parrinello-Rhman の方法により印加した計 5 種類のシミュレーションを試みた。また、

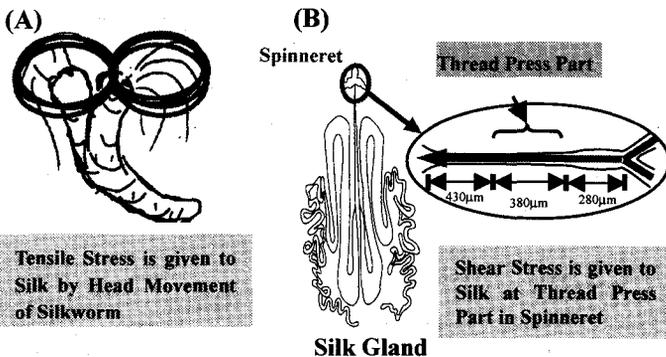


Figure 1: External forces in fiber forming process in silkworm. (A) Head movement of silkworm is source of tensile stress. (B) Liquid silk in thread press part in the spinneret receives shear stresses.

1step を 1fs とし、温度は Andersen の方法により 298K に保持した。これらの計算は 1step=1fs とし、各シミュレーションとも 200ps (200,000step)の計算を行った。

2. 蚕の絹繊維形成の際の離水過程のシミュレーション 1.のシミュレーションで得られた後半 100ps のシミュレーションに関して、1ps 毎に構造をサンプリングし、計 100 個の構造を得た。これらの構造から、水分子を取り除き、構造最適化計算を行い、離水後の絹繊維の構造とした。これらの計算は Acceralys 社製の Discover/InsightII(ver. 4.0.0P+)を用い Silicon Graphics 社製のワークステーション Octane 上で行った。

## [結果と考察]

1. これまでに我々の固体 NMR 研究により得られた絹フィブロイン構造に関する知見 繊維化前の固体構造 Silk I 構造に関し、内部回転角( $\phi, \psi$ )と  $^{13}\text{C}$  NMR 化学シフトの相関に基づく化学シフト等高線マップ、二次元固体スピン-拡散  $^{13}\text{C}$  NMR、REDOR の測定を組み合わせ、図 2 に示す構造 (repeated  $\beta$ -turn typeII) を決定した<sup>1)</sup>。一方、繊維化後の構造、Silk II 型構造については、Ala C $\beta$  領域の詳細な解析から、16.6, 19.6 および 22.2 ppm の 3 成分からなる不均一構造をとり、各々、空間配置の異なる逆平行 $\beta$ シート構造(図 3A と図 3B)<sup>3)</sup>及び、角度分布の広い $\beta$ ターン構造(図 3C)に対応することが明らかとなった。繊維化は結晶部(AGSGAG)<sub>n</sub> で優先して起こり、3 成分の割合は、各々、23%, 45%, 32%であった。以上の繊維化前後の絹フィブロインの構造から、分子動力学法による繊維化のシミュレーションを試みた。

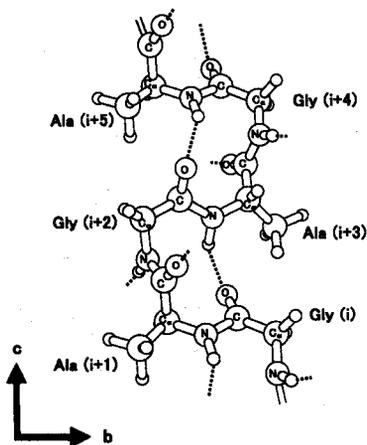


Figure 2: The repeated  $\beta$ -turn type II structure (silk I).

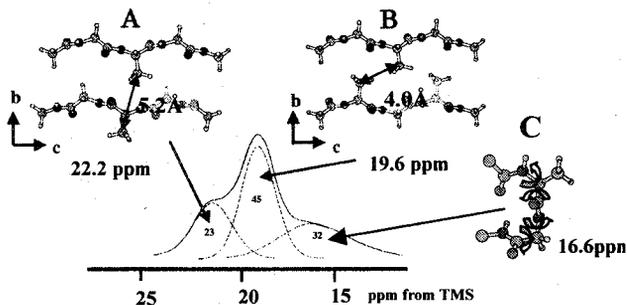


Figure 3: Ala  $^{13}\text{C}_\beta$  CP/MAS NMR peak of Cp fraction of *B. mori* silk fibroin with silk II form. Anti-parallel  $\beta$ -sheet structure (A and B) and distorted  $\beta$ -turn structure (C).

## 2. MD 計算による Silk I から Silk II への構造変化

水の存在下、ずり応力 0.5GPa 以上を印加したシミュレーションにおいて約 100ps 以内に、(AG)<sub>n</sub> 分子について、Silk I 構造から  $\beta$  スtrand 構造への転移が観測された。転移後のトラジェクトリーから得られたアラニンの  $(\phi, \psi)$  の分布を図 4(A) に示す。この図より、シミュレーションで用いた系中のアラニンは、その大部分が  $(\phi, \psi) = (-150^\circ, 150^\circ)$  を中心とする  $\beta$  シート構造の周辺に存在していることがわかる。この時点で、各分子鎖は部分的に分子間水素結合を形成しているが、水中に孤立しており、シート構造を形成していない。

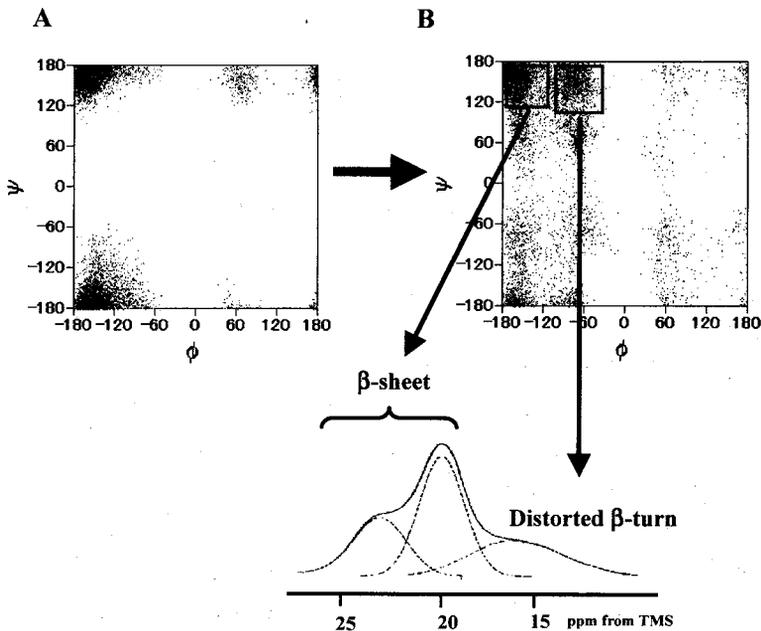


Figure 4: Conformational probability maps of Ala residue in (AG)<sub>n</sub> in water under stretching and shear stress after MD simulation (A) and after removal of water (B). (C) The  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectrum (Ala C $\beta$  region) of Cp fraction with silk II is also shown.

## 3. 蚕の絹繊維吐糸後の離水過程のシミュレーション

2. のシミュレーションで得られた最終状態から、更に、離水した状態での構造決定を行った。1ps 毎に構造をサンプリ

ングし、計100個の構造を得た。これらの構造から水分子を取り除き、構造最適化計算を行い分子の凝集状態を模倣し、離水後の構造とした(図4B)。

100個の構造中のアラニン残基の内部回転角( $\phi, \psi$ )は、 $\beta$ シート構造( $\phi, \psi$ ) = (-150°, 150°), および Silk I 型構造に相当する  $\beta$  ターン構造 ( $\phi, \psi$ ) = (-60°, 130°) 周辺に多く分布していることがわかる。この2つの領域を、( $\phi, \psi$ ) = (-150° ± 20°, 150° ± 20°), ( $\phi, \psi$ ) = (-60° ± 30°, 130° ± 30°) とし、領域内のアラニン残基の割合を調べたところ65%と35%であり、図2で示した結果から得られた割合、68%と32%をよく再現する<sup>4)</sup>。

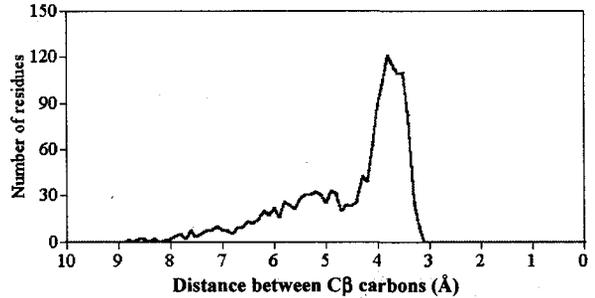


Figure 5: Distribution of atomic distance between Ala C $\beta$  carbon atoms after MD simulation and removal of water.

また、Silk II に含まれるアラニン残基のメチル基の空間配置が異なる2種類の $\beta$ シート構造は、近接アラニン残基のメチル基間の距離から、分類することができる。すなわち、図3Bの構造では、メチル基の距離が4.0Å程度であるのに対し、図3Aの構造では5.2Åにある。このことから、図4で $\beta$ シート構造の領域に含まれるアラニン残基のメチル基について、近接アラニン残基のメチル基間距離を調べ、その距離に関する分布を調べたものを図5に示す。この図より、約4.0Åと約5.2Å程度のところにピークが存在し、そのピークの面積比が約1:2程度であった。これは<sup>13</sup>C CP/MAS 固体 NMR による結果(図3)と一致する。

以上の結果から、カイコ体内における繊維化過程は、本シミュレーションで考慮した張力やずり応力を印加した環境下において分子鎖が伸び、さらに、離水過程において Silk II 型構造にみられる不均一性が生じたと考えられる。

本研究は一部、生物系特定産業技術研究推進機構基礎技術推進事業により行われた。

#### [参考文献]

- 1) T. Asakura, J. Ashida, T. Yamane, T. Kameda, Y. Nakazawa, K. Ohgo, K. Komatsu, *J. Mol. Biol.*, **306**, 291 (2001).
- 2) T. Asakura, J. Yao, T. Yamane, Y. Nakazawa, and K. Ohgo, *submitted*.
- 3) Y. Takahashi, M. Gehoh, K. Yuzuriha, *Int. J. Biol. Macromolecules*, **24**, 127 (2000).
- 4) T. Asakura, J. Yao, T. Yamane, K. Umemura and A. S. Ulrich, *submitted*.

## P126

帰属支援・シグナル解析統合ソフトウェア"Olivia"の開発、  
これを用いた帰属解析の信頼性向上と高速化技術について  
(CREST/JST<sup>1</sup>, 北大薬<sup>2</sup>) ○横地政志<sup>1</sup>, 稲垣冬彦<sup>1,2</sup>

Olivia: A free integrated software for assignment and analysis of multiple NMR spectra realizes speedy and reliable assignment and provides improvement in sharing assignment processes

CREST/JST<sup>1</sup>, Hokkaido University of Pharmaceutical Sciences<sup>2</sup>

Masashi Yokochi<sup>1</sup>, Fuyuhiko Inagaki<sup>1,2</sup>

We have developed a new system for assignment and analysis of multiple NMR spectra. It works as a stable platform for automatic assignment algorithm. We classified ordinary assignment processes into four phases (Atom Type Assignment, Spin Clustering, Assignment of Spin Cluster and NOE Assignment) and found a generalized approach for each phase (Random Pattern Sampling Method, Consistent Spin Clustering with BMRB Database, Assignment through Virtual Object and Connection between Assignment Table and Related Spectra using HTML). These generalized approaches promise great efficiency and accuracy in assignment analysis. Also Olivia enables one to share the NMR assignment processes that have ever been impossible in essence.

[序] 多次元NMR分光スペクトルは生体高分子のすべての解析の(構造解析、ダイナミクス解析、相互作用解析のための)標準技術である。帰属の完全性はどんな解析においても、その正確さを保証する最も重要な基盤である。現代のNMR分光法は複数の多次元分光スペクトルを照合することで帰属の信頼性あるいは完全性を保証しようとする。しかし、帰属決定に関わった複数のスペクトルをすぐに呼び出して確認する技術やその精度を逐一客観的に評価を下す技術に関して、NMR分光法は未だ発展段階にある。このことはNMRを用いたハイスループットな構造研究を行う場合のボトルネックになりつつある。

[方法] 我々は次の3つの目標を実現するソフトウェアを開発した。

1. 完全自動帰属を目標とした高精度、高速度な技術とそれを効率よく運用する基盤作りの双方の発達を促すこと。
2. 帰属解析途中において実時間で参照できる帰属精度を検証するための客観的帰属評価基準を可能な限り導入を図ること。
3. 帰属プロセスの共有化及び電子化。

誌面が限られているので、本要旨では帰属プロセスの共有化に関してOliviaがどのように解決を試みたのか説明する。

NMRの帰属プロセスの共有化は従来の解析では解決されてこなかった問題である。しかしスペクトルを含めた帰属プロセスの共有化には明らかな利点が期待される。

キーワード: NMRPipe, BMRB Database

ふりがな: よこちまさし、いながきふゆひこ

まず解析の初期段階で当事者以外からの客観的判断を容易に受けることができる。さらに帰属プロセスを残すことによって次に述べる従来のNMR解析の大きな欠点を解決できる。すなわちこれまでの帰属データの保存方法では帰属テーブルとスペクトル上のシグナルとのリンクが簡単に切れてしまうために、例えば当事者以外の人が見直したいと思っても、相当の労力がなければ非常に困難であった。また前任者が帰属判断に迷った箇所や、見直さなくてもよい箇所を区別することができなかった。

そこで異なった2つの実験のシグナルの間で、等価な共有結合(Covalent Bond)間のJカップリングを経て移動する磁気スピニコヒーレンスの結びつけ(Connectivity)に注目して、我々はこれを”Bond Connectivity”あるいはソフトウェア的な言葉で単に”リンク”と呼んだ。リンクは2つの実験の間の帰属情報を結びつけていると同時に、あるシグナルに対して帰属を行えば、そのシグナルに関連づけられた全てのシグナルの帰属が変更される。新しい実験のシグナルを既存のリンクに追加すると、新しい実験とこれまでの帰属とを簡単に同調させられる。またスペクトルの必要最小限の領域を整形して、ひとつの画面上に関連スペクトルを呼び出せばリンクを評価したり修正したりして人が追跡できる。それ故、帰属テーブルとピークテーブルの間をリンクによる階層(レイヤー)を用意することで、帰属プロセスを共有化することができる。リンク階層はこれまで当事者だけが覚えていたスペクトルと帰属の在処を指示する。(当事者が行ってきたことを肩代わりできる)リンク階層をソフトウェア的に確立することで、スペクトルと帰属を同時にアクセスする権限は開放され、スペクトル、ピークテーブル、帰属テーブルのもとに全ての解析者は平等になる、すなわち帰属プロセスは共有化できる。

このリンク階層を利用して構築し直した自動帰属解析、BMRB Databaseを利用した帰属評価基準の導入によって極めて効率的で汎用的なソフトウェアを開発できた。これらの成果を全ての研究開発者と共有し、よりよいNMR解析プラットフォームを目指すために、このソフトウェアのソースコードを無料公開する。

#### [Availability]

- Support Multichain • Support Amino Acid Selective Label • TROSY Shift Calibration
- Main Chain Assignment • Side Chain Assignment • Aromatic Ring Assignment • Noesy Analysis
- Strip Buffer Acceleration • Spectra Viewer Service • User-Memo Postal Service
- Automatic Assignment • Automatic Feedback 3D → 2D • Spin Clustering • Assessment Service
- Sharing Assignment Service • Experimental Info Service • Tcl/Tk (NMRWish) Script Generation
- CSI, TALOS Form Generation • 3J HNCQ Analysis (H Bond) • HTML Form Generation
- Bookmark Service

[実施結果] 本研究室では、様々なタンパク質の帰属を例にしてOliviaの調整を行っており、主鎖に関して80残基程度のタンパク質では約半日で帰属を確定することができた。またTROSYを使い重水素化した200残基程度のタンパク質の主鎖帰属に対しても初心者が十分に解析できることを証明できた。

[ソースコード公開] 必要上の手続きを(論文投稿、特許申請)終えた後に、以下のウェブサイトにて完全に公開する予定である。 <http://fermi.pharm.hokudai.ac.jp/olivia/>

\* Olivia is abbreviation of "Objective, chemical shift Library based and stereo View Assignment software".

## Overtone パルスを用いた REDOR 現象の観測

(分子研) 桑原 大介

The observations of REDOR phenomena with overtone radio-frequency pulses  
(Institute for Molecular Science) Daisuke Kuwahara

The intensity reductions of an NMR resonance line for powdered *N*-acetyl-*D,L* valine (NAV) were observed in REDOR experiments with  $^{14}\text{N}$  overtone radio-frequency (RF) pulses. First, the REDOR experiments with normal overtone RF pulses employing a constant frequency were performed. As a result, moderate reductions of the line intensity were observed. We tried to establish the calculation method of the line intensity for the REDOR experiments. In addition, we tried to perform the REDOR experiments with adiabatic overtone RF pulses in order to invert  $^{14}\text{N}$  overtone polarizations. The details will be presented in the conference.

<はじめに>

Rotational echo double resonance (REDOR) NMR 法は、固体状態の蛋白質の構造決定を行う際に X線結晶解析とともに広く用いられている。REDOR の実験を行うには測定対象となるスピン系を  $^{13}\text{C}$  と  $^{15}\text{N}$  で同位体置換するが要求されるが、これに対して TRAPDOR (transfer of populations in double resonance) NMR 法[1] に代表されるように、99.6%の天然存在比をもつ  $^{14}\text{N}$  を用いることにより 異種核間双極子相互作用の復活を試みることも幾つか行われている。本研究では、固体粉末試料中の  $^{14}\text{N}$  スピンに overtone RF pulse を照射することにより REDOR 現象の観測を行うことができるのであろうかという問題に取り組んだ。さらにそれが可能な場合でも、その有効性はどうかを考察した。さらに  $^{14}\text{N}$  を使った REDOR の実験結果をシミュレートするための理論を構築することを試みた。そしてもう一つの面白い試みとして、断熱的に  $^{14}\text{N}$  スピンの反転を行うことが出来るかどうかを 実験的にさらに理論的に考察したい。

Key words: REDOR、overtone

著者ふりがな：くわはらだいすけ

<実験 1>

最初の実験は、通常の（照射周波数が一定の）overtone ラジオ波パルスを用いて行った。実験で使用したパルス系列は、

$^{13}\text{C}$  : CP -  $T_r/2$  -  $(\pi)$  -  $T_r/2$  - (no pulse) -  $T_r/2$  -  $(\pi)$  -  $T_r/2$  - acquisition

$^{14}\text{N}$  : (pulse)

である。試料には *N*-acetyl-*D,L* valine (NAV) 粉末を用いた。試料回転周波数は 2000Hz であった。 $^{14}\text{N}$  スピンには約 250W の  $^{14}\text{N}$  overtone RF pulse を加えた。その時の  $^{14}\text{N}$  overtone  $\pi/2$  pulse は約 60 $\mu\text{s}$  であった。窒素核に直接結合した CH 炭素の共鳴線に、約 15% の強度の減少が観測された。

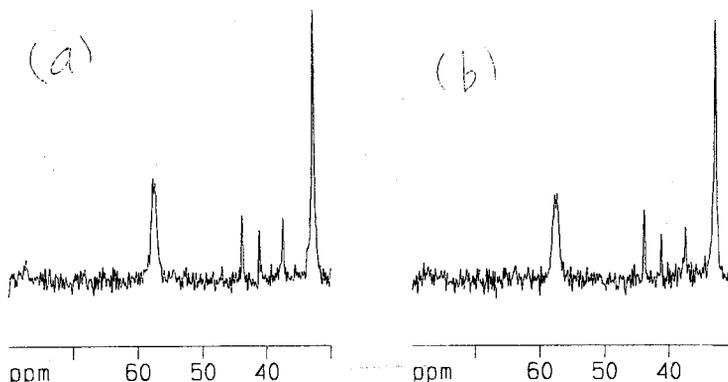


Figure 1.  $^{13}\text{C}$  MAS NMR spectra for powdered NAV. Figure 1(a) was measured without  $^{14}\text{N}$  overtone RF pulse. Figure 1(b) was measured with  $^{14}\text{N}$  overtone RF pulse.

<実験 2>

実験 2 は、通常の  $^{14}\text{N}$  overtone RF pulse を adiabatic overtone RF pulse に代えて上記の REDOR 実験を行うというものである。それにより、固体粉末試料中で様々な配向を持っている  $^{14}\text{N}$  spins の overtone polarizations の大部分を、反転に近い位置までもってこることができると考えられる。本実験の詳細については、会場において報告したい。

<参考文献>

[1] Grey, C. P.; Eijkelenboom, A. P. A. M.; Veeman, W. S. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 1995, 4, 113.

## 化学シフトに対する相対論的効果の計算

(北見工大) ○馬場雄久、福井洋之

**Relativistic effects on nuclear magnetic shieldings**

(Kitami Institute of Technology) T. Baba and H. Fukui

**Abstract:** A two-component relativistic SCF perturbation theory, based on the Douglas-Kroll-Hess (DKH) transformation, was applied to the calculation of nuclear magnetic shielding tensors of hydrogen halides, HX (X=F, Cl, Br, I). Relativistic calculations were performed at four different levels by using the unrestricted coupled Hartree-Fock (CHF) scheme and gauge-including atomic orbitals (GIAOs). At the level I calculation, both the scalar relativistic (SR) and spin-orbit (SO) interactions were included in the unperturbed Hamiltonian, but the magnetic perturbations were treated nonrelativistically. At the level II to IV calculations, the mass-velocity effect on the magnetic perturbations was introduced. The cross term between the nuclear attraction potential and the magnetic vector potential was introduced at the level IV calculation.

Forty years ago, Schneider, Bernstein, and Pople reported that the  $^1\text{H}$  NMR of hydrogen halides, HX (X=F, Cl, Br, I), shows a large high-field shift when X=Br or I. Although older NMR textbooks have explained this heavy atom effect in terms of a large diamagnetic shielding due to the large number of electrons around the heavy atom, the heavy atom effect is currently explained by the spin-orbit (SO) coupling effect. Several relativistic calculations have been proposed for the  $^1\text{H}$  shieldings of hydrogen halides, however, calculations for the halogen atom shieldings are rather scarce. Recently, Visscher *et al.* reported the results of four-component relativistic random phase approximation (RPA) calculations for both the proton and halogen nuclear shielding constants of hydrogen halides. The four-component relativistic calculation includes all relativistic effects on the magnetic shieldings. However, this method is still very costly, primarily due to the use

Relativistic Effect · Nuclear Magnetic Shielding

ばばたけひさ、ふくいひろゆき

of large basis sets which are needed for a proper description of the small component. On the other hand, the two-component relativistic calculation has an advantage in that this method requires fewer computational resources. However, including all relativistic effects is rather difficult in two-component methods. Answering the question as to whether the two-component calculations of magnetic shieldings can reproduce four-component results is important. We computed the relativistic effects on the nuclear magnetic shieldings of hydrogen halides at four different levels of a two-component method.

We used a two-component relativistic SCF perturbation theory, based on the Douglas-Kroll-Hess (DKH) transformation. Calculations were performed via the unrestricted coupled Hartree-Fock (CHF) scheme using gauge-including atomic orbitals (GIAOs). At the level I calculation, both the scalar relativistic (SR) and spin-orbit (SO) interactions were included in the zeroth-order Hamiltonian. However, the magnetic perturbation Hamiltonians were treated nonrelativistically. The level I calculation was found to be insufficient to explain the full relativistic effect on the halogen atom shieldings. In order to reproduce the full relativistic effect, the mass-velocity effect on the magnetic perturbation Hamiltonians was introduced at the level II to IV calculations. Inclusion of the mass-velocity effects into all of the perturbation Hamiltonians, made at levels III and IV, improved the results greatly. The cross term between the nuclear attraction potential and the magnetic vector potential was introduced approximately at the level IV calculation. The level III calculation agreed most closely with the four-component relativistic RPA calculation by Visscher *et al.*

## NMR スペクトル解析支援ツールの開発

(北陸先端大知識<sup>1</sup>、北陸先端大新素材センター<sup>2</sup>)○辰本将司<sup>1</sup>、佐藤賢二<sup>1</sup>、栗田順一<sup>2</sup>、島原秀登<sup>2</sup>、楯真一<sup>2</sup>

## Development of support tool for NMR spectrum analysis

(Knowledge Science, JAIST<sup>1</sup>, Center for New Materials, JAIST<sup>2</sup>)Shouji Tatsumoto<sup>1</sup>, Kenji Satou<sup>1</sup>, Jun'ichi Kurita<sup>2</sup>, Hideto Shimahara<sup>2</sup>, Shin-ichi Tate<sup>2</sup>

This paper presents a novel software for NMR spectrum analysis. Our program can analyze input from four triple-resonance experiments (although, generally, only three are required): HNCA, HNCACB, CBCACONH, HN(CO)CA (not required) and the protein sequence. Peak-picking allows the manual observation of a signal of any point. We believe that experimentation and good observation sensitivity help increase the efficiency of the measurement. This original tool makes it possible to interactive manipulate backbone resonance assignment on a web browser. In order to avoid false assignment, two segments are considered disjoint, unless their connectivity can be established. We evaluated our program by analyzing ubiquitin and HMG2B. In the case of ubiquitin, the analysis took only one minute and did not require any human intervention. Even in the case of the much more complex HMB2B, the analysis took about one hour in spite of minimal human intervention.

構造ゲノム解析プロジェクトの中で、NMRによるタンパク質構造解析は、50-200 残基程度のタンパク質を対象とした網羅的な立体構造決定と相互作用などの機能解析に有効な手法として期待されているが、現実には完全な立体解析の自動化が可能な段階には達しておらず、早急な構造解析の自動化技術の確立が求められている。そこで我々は、主鎖のNMRシグナル自動解析を目的とした独自のツールを開発した。これまでに主鎖の自動帰属を行う上での問題として、S/N やタンパク質の運動性に由来するスピン緩和の理由による、シグナルのオーバーラップや、[弱い]シグナルや[見えない]シグナルの存在が挙げられている。これらの問題に対して、計算機で無理やり連鎖帰属を確定するよりも、interactive に人間の操作に任せる方が現実的であるとの判断で、計算機による帰属と人手による帰属を同じ画面上で同時に操作できるようなツールを作成した。このツールでは、実験による測定の効率化と観測感度の良さを考えて、最小の実験データセット [HNCA, HNCACB, CBCACONH, オプションとして HN(CO)CA] と配列データ [SEQUENCE] を用いて主鎖の帰属を行う。このツールを用いて、ユビキチンおよび HMG2B の主鎖帰属をおこなったところ、シグナルの分離が良好なユビキチンの場合には、我々のツールのみで僅か 1 分で完全な主鎖の帰属を確定することができた。また  $\alpha$ -helix に富むためにシグナルの重なりが多く見られる HMG2B のケースでも、ほとんどの部分を計算機で確定し、残る部分も解析者が判断することで 1 時間弱の作業で完全帰属を確定できた。

タンパク帰属、自動解析、タンパク質構造

たつもとしょうじ、さとうけんじ、くりたじゅんいち、しまはらひでと、たてしんいち

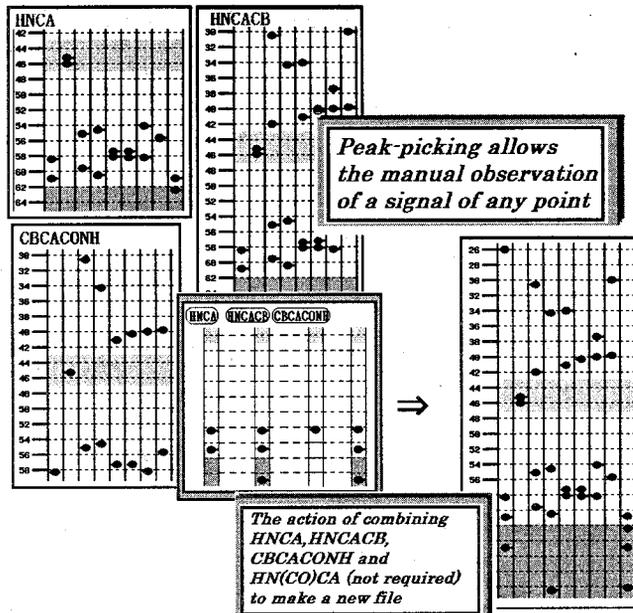


Figure 1: The design concept of system.

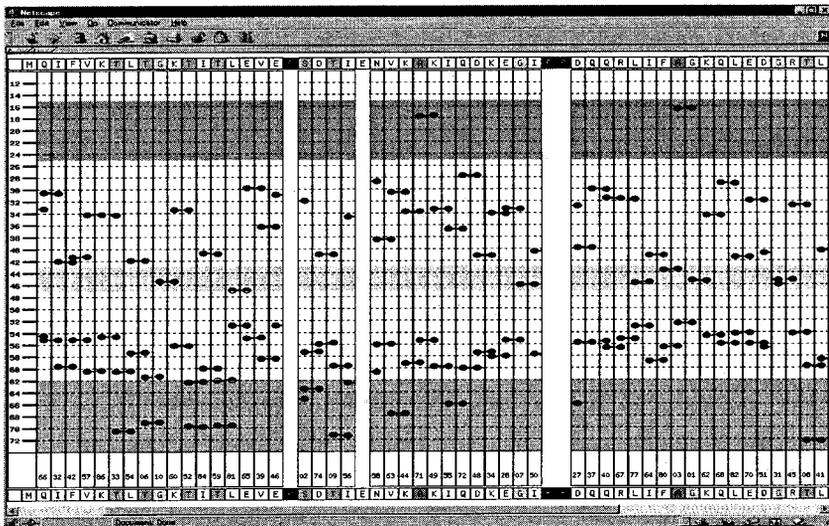


Figure 2: Screen shot of the web interface.

二通りの表示を選択することが可能で、それぞれ interactive に並び替える。

「セグメント表示」

-計算機上で最大の連鎖帰属を確定した単位「セグメント」で表示し手動で並び替える。

「自動並び替え表示」

-最適なパラメータを自動で組み合わせ、配列情報をもとにアミノ酸毎に自動で並び替える。

## P130

A Mini tool for resonance assignments using NMRView and tcl/tk

(三共株式会社 バイオメデイカル研究所<sup>1)</sup>、ユトレヒト大学<sup>2)</sup>)

半沢宏之<sup>1)</sup>, Rolf Boelens<sup>2)</sup>

Hiroyuki Hanzawa and Rolf Boelens

Biomedical Research laboratories, Sankyo Co.,Ltd., Bijvoet Center for Biomedical Research,  
Utrecht University

Resonance assignments of the protein NMR is a first and essential step for structural study, such as structure determination and relaxation analysis. Despite the availability of software packages, it sometime takes considerable time to complete the sequential assignment. NMRView is tcl/tk based software which allow considerable flexibility in analysing the data. As an example, we present some scripts using NMRView command and tcl/tk which facilitate the sequential assignment of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N labelled protein.

### 1. Introduction

The recent advance in solution NMR techniques made it possible to assign the resonances in medium sized protein and basic assignment strategy has been established for the <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N labelled proteins. However in order to deal with several 3D data set and facilitate the analysis, the suitable tools are required. NMRview<sup>1)</sup> is a free, scriptable and still developing software, aimed at the graphical analysis of NMR spectra. The Tcl/tk language and NMRView command allow considerable flexibility that can be used to analyse the data and keep control of the progress being made. We will present our attempt to take full advantage of this package for sequential assignment of the protein NMR spectra.

---

resonance assignment, protein

はんざわ ひろゆき、ロルフ ブーレンス

## 2. Results

Our approach consists of two parts, modified strips module in NMRView and independent tcl/tk scripts (uu-list.tcl)

As a first step, strips plot module in NMRView was improved for our purpose as follows

- The peak number of  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC peak file is used for selecting and displaying the strip.
- Some buttons were added to facilitate the zooming and moving of the displayed spectra.
- Additional functions were included to transfer the chemical shifts (CA, CB etc) from NMRView to peak lists in uu-list.tcl

Uu-list is a text editor for peak list and each “line” contains the information regarding one  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{H}$  HSQC peak such as chemical shifts of CA, CB etc. The assignment process is sorting these “lines” in the peak list using chemical shift values and amino acid sequences of the protein. To facilitate the analysis, the following functions can be executed just by clicking “line” and pressing button: select lines, show candidates of next/previous residues, move the lines.

Using these scripts, the following protocol for sequential assignment can be easily speeded up.

- Peak pick 2D-HSQC, 3D-CBCA(CO)NH and CBCANH etc in NMRView
- Start uu-list.tcl and read 2D-HSQC peak file in NMRView format
- Add chemical shifts of CA(i), CA(i-1), CB(i), CB(i-1) etc looking at the strips in NMRView
- Search previous/next residue using chemical shift list in uu-list.tcl

The assignments which have been obtained can be transferred back to NMRView for further steps such as side chain assignments.

These scripts are currently being used in NMRView 5.0.2.linux in our laboratory. From experiences and preferences of many researchers, some improvement in graphical interface has been made. Although it takes a little time to make tools using tcl/tk, we think that the flexible environment is the ideal solution for analysis of NMR data.

### Reference

- 1) Johnson, B.A. and Blevins, R.A. (1994) J. Biom. NMR. 4. 603-614

## 三次元 MR 画像からの泡多面体構造の自動抽出法の研究

(筑波大学物理工学系)○佐々木英典

Study of a method for automatic-extraction of bubble polyhedrons  
from a 3D MR image data set of foam  
Hidenori SASAKI

A method to automatically extract bubble polyhedrons from a 3D MR image data set of foam was studied. The method consists of two-level quantization of image intensity, thinning of the edges of foam polyhedrons in three dimension, and detection of branch points. For noiseless image data sets, the proposed method worked well. However, for real MR image data sets, the automatic extraction method did not work well because of the noise and image inhomogeneity. Thus it was concluded that noise elimination and inhomogeneity correction were important for automatic extraction of bubble polyhedrons from a 3D image data set of foam.

## &lt;はじめに&gt;

2つの異なった物質が混合した系の代表的例である泡構造は、Kelvin 問題<sup>1),2),3)</sup>との関連において、その構造のもつ特殊性から大きな関心を集めている。これに関し、面をもたない(オープンセル構造)泡の空間的構造の統計的性質を求めるための方法として、MRIで撮像されたデータから頂点や辺を検出し、さらにそれから多角形や多面体を推定する手法が近年発表された。<sup>4),5)</sup> 本研究では、この手法の中でも特に自動化について非常に重要な部分を占める、MRIにて撮像されたオープンセル構造体のデータから、辺を抽出する新しい手法の開発を行う。

辺を抽出する手法として、以前の研究では、平滑化フィルターを用いた頂点領域の推定と、推定された頂点の組み合わせを試し、稜の存在の可能性を線積分により判定する方法が試みられた。<sup>6)</sup>この方法では、頂点の位置を決める閾値およびフィルターのかけ方が非常に微妙な調整を必要とすることと、湾曲した稜の存在の可能性が低く見積もられることなどが難点であった。今回の研究では、細線化という手法を用いたことにより、少なくとも上記の難点を克服できることが可能であると考えられる。また、以前の研究では時間の短縮のため部分空間内での辺の探索を行っていたが、<sup>7)</sup>今回の方法では部分空間を使うとかえて複雑に処理する必要が生じるため、すべての処理を撮像された全体の空間の中で行う。これによって、構造のスケールを判別し部分空間の大きさを決める必要がなくなった。

## &lt;三次元細線化による稜の抽出法&gt;

三次元 MR データをまずフィルタにかけ、撮像時のノイズを除去した上で、二値化を行う。これに三次元細線化処理を施し、線の相関の情報を失わないようにしながらすべての線を限界まで細くする。細線化後の各画素とその周囲の画素から、その画素が辺上にある画素か分岐する画素かを判断する。それから、辺上の画素のまとまりに隣接する分岐点を検出し、これを組み合わせることで1つの辺が始点と終点という二つの座標として得られる。ほかのまとまりについても同様の事を行えば、辺の集合が得られる。

## &lt;実験&gt;

本研究で対象とする試料は、ポリウレタンフォーム(Fig.1)を試験管に入れ、硫酸銅水溶液に浸して撮像したものである。撮像された空間内に存在するものは、2種類の均一な物質であるため、ノイズが存在

---

キーワード: 構造解析、細線化、オープンセル構造体

著者ふりがな: ささき ひでのり

しない場合、撮像された三次元画像は2種類の画素値をとる。この画像では、硫酸銅水溶液の水素原子が高い画素値をとるため、泡多面体の稜は低画素値で描出される。現在あるソフトウェアは閾値の高いものを描画することを目的としているため、撮像されたデータの各画素値の補数を取り、ポリウレタンフォームの領域の画素値が硫酸銅水溶液の画素値より高くなるようにしたデータを使用する。

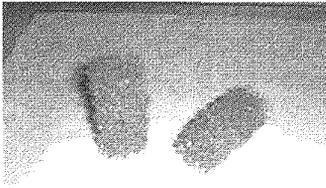


Fig.1 Polyurethane Form

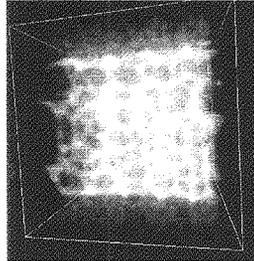


Fig.2 Volume Texture Image

### <結果と考察>

等値面サーフェスの全体の画像を回転させてみると、領域により、オープンセルの多面体の内部にサーフェスができているところや、その一方で稜が途切れているところがあり、局所的に似たような傾向が見られる。この三次元画像のポリウレタンフォームの領域をはっきりと二値化した状態で抽出するには、局所的な閾値の設定が必要である。白色雑音を低減した後に、領域ごとの閾値を特性関数によって決めることによってより精度のよい稜の検出ができると考えられる。また、分岐点が少なく見積もられる現象に関しては、前記のこととあわせ、デジタル的なフィルターを細線化の前に行うことで、少なくともできると期待される。

数値ファントムを使用した実験では、いかなる場面においても二値化さえできれば100%の精度で稜を検出できることが実証された。これにより、細線化のプロセスの改良より、その前のノイズの除去と、多面体であるという構造を利用した無駄な稜の除去および、細線化プロセスの多段使用などがこれ以降の開発で重要な部分であると考えられる。

### <むすび>

泡多面体の三次元画像から多面体の辺を抽出する方法について検討した。まず、MRIによって撮像された三次元画像をノイズ低減後二値化し、それを細線化して得られる分岐画素と線画素を組み合わせることで稜の集合を推定する方法を考えたが、まだまだよい精度が得られていない。データを撮像してから稜を抽出するまでの間のすべてのプロセスを検証し、少しでも精度を上げるためのルールの変更または最適なフィルターの挿入が必要である。

### <参考文献>

- 1) J.Gray,Nature ,367,598-599(1994)
- 2) W.Thomson(Lead Kelvin),Phil.Mag.24,503(1887)
- 3) D.Weaire and R.Phelan,Phil.Mag.Lett.69,107-110(1994)
- 4) K.Kose, J.Magn.Reson,A118
- 5) K.Kashiwagi and K.Kose,NMR in Biomed.10,13-17(1997)
- 6) 平成10年度筑波大学大学院理工学研究所修士論文  
安立直剛「三次元MR画像からの泡多面体の自動抽出法の開発と泡構造の解析」
- 7) 平成7年度筑波大学第三学群工学システム学類卒業研究論文  
柏木克也「三次元NMR画像からの三次元物体形状の自動抽出法の研究」



著者索引		Paul-Ellis	P039	浅川直紀	P037
		Peter J. McDonald	1L08	朝倉哲郎	1L03
(数字・アルファベット)		Peter Stilbs	P086	朝倉哲郎	P009
A. B. Koudriavtsev	P070	Prusnier Stanley	3L02	朝倉哲郎	P022
Beat H. Meier	2SL2	R. James Kirkpatrick	P068	朝倉哲郎	P125
Bengt Jonsson	P086	Riqiang Fu	P002	浅野敦志	P017
Dae Han Chang	P030	Rolf Boelens	P130	浅野敦志	P021
David A. Aremu	P084	Sarah Burton	P039	浅見修	3L12
Dennis A. Torchia	P100	Seiko Shigeta	P061	芦田淳	1L06
DeSimone J. M.	P069	Sundaresan Rajesh	P111	芦田淳	P009
Dominique Marion	2SL3	SundaresanRajesh	P116	芦田淳	P072
Fumito Matsuura	P061	Takehiko Shibata	P111	阿曾幸男	P018
G. Hunter	P070	Tatsuo Munakata	P061	阿曾幸男	P074
Hiroaki Yamada	P097	Timothy A. Cross	P002	足立恭子	P117
Hua Li	P097	W. Linert	P070	安達雅幸	P015
James Thomas	3L02	Warren S. Warren	2SL4	阿部智彦	P008
JeeJun-Goo	P094	William S. Price	P086	阿部英喜	P027
JeeJun-Goo	P115	Xiaoqiang Hou	P068	荒川規	1L04
John M. Louis	P100	Xu B.	P069	荒川規	P034
Johnson Jr. C. S.	P069	Yukiko Ando	P097	荒木潤	P088
Johnston K. P.	P069	Yuko Kato	P061	安藤勲	1L05
Katsuki Haraoka	P097	Yutaka Ito	P111	安藤勲	P010
Kazuyuki Akasaka	P097	(あ行)		安藤勲	P016
Klaus Schmidt-Rohr	2SL1	相澤嵩史	P089	安藤勲	P071
Klaus Schmidt-Rohr	P011	相沢智康	3L04	阿武泉	P050
Klaus Schmidt-Rohr	P013	相沢智康	P098	飯田貴之	P032
Lee Jr. C. T.	P069	相原雄一	P024	五十嵐泰夫	P102
M. Danchev	P070	青木雅昭	1L13	生島豊	P089
Markus Waelchli	P118	赤井智子	P040	池上貴久	P094
Masako Fujiwara	P061	赤坂一之	2L02	池上貴久	P115
Masaya Ohta	P061	赤坂一之	3L02	池田武義	P073
Myagmarsuren	P037	赤坂一之	P096	池田哲郎	3L08
Gomboo		秋葉悦男	P024	池田博	P051
Naoyuki Fujii	P061	阿久津秀雄	P003	池田龍一	1L07
Nath Niraula Tara	P097	阿久津秀雄	P005	池谷鉄兵	P121
Olle Soderman	P086	阿久津秀雄	P113	石井文明	P025

石川裕之	P030	岩崎わかな	P117	大東弘二	P025
石川麗	2L03	上杉晴一	3L08	岡伸一郎	3L07
石川麗	P091	上原宏樹	P026	岡田重益	1L13
石田信昭	P080	植松淑子	P071	岡田輝政	P051
石田信昭	P082	植村邦彦	P082	岡千寿	3L11
石田秀治	P065	丑田公規	P063	荻野孝史	P077
伊島理恵子	P100	内野新一	P019	荻野孝史	1L12
泉川大輔	P060	内山進	3L07	小椋賢治	3L09
泉 康彦	P090	内山進	P102	小椋賢治	P122
五十部誠一郎	P082	宇津澤慎	1L13	小椋賢治	P123
磯村武範	P012	宇津澤慎	P050	尾島孝男	P117
板倉健人	P121	梅木辰也	P089	落合研次	P105
伊藤隆司	3L09	梅村幸輔	P125	越智虎之	P087
伊藤紀幸	3L05	江口剛史	P043	小野晶	2L03
伊藤允好	P075	江口剛史	P044	小野晶	P091
伊藤泰男	P020	江口太郎	P020	小野明	P106
伊藤隆	P095	榎園能章	3L08	小野功	3L13
伊藤隆	P108	恵良聖一	P081	小野典彦	3L13
伊藤隆	P114	遠藤一央	P030	尾身洋典	P020
伊藤隆	P116	遠藤政治	1L13	(办行)	
伊藤隆	P118	大木出	P094	海藤彰	P033
伊藤隆	P121	大木忍	P046	甲斐莊正恒	2L03
稲井嘉人	P081	大木忍	P047	甲斐莊正恒	P062
稲垣冬彦	3L09	大木忍	P048	甲斐莊正恒	P088
稲垣冬彦	P122	大木進野	P106	甲斐莊正恒	P091
稲垣冬彦	P123	大久保征治	P062	甲斐莊正恒	P106
稲垣冬彦	P126	大久保忠恭	3L07	甲斐莊正恒	P120
乾延彦	P011	大郷耕輔	1L03	蔭山博之	P073
井上仁	P084	大崎光	P081	梶野勉	3L12
井上義夫	P037	大島孝友	P032	梶原康宏	P085
井上良三	1L02	大城由紀	1L02	梶弘典	P011
井原俊英	P053	大坪伸将	P065	梶弘典	P012
今城文雄	P033	大野綾子	P120	梶弘典	P013
井町美佐子	P103	大野真希	P035	片岡弘	P073
今藤真吾	P087	大野光宏	P121	片岡幹雄	P115
今元泰	P115	大橋竜太郎	P001	片平正人	3L08

勝岡史城	3L03	北原亮	P096	黒田裕	P110
加藤悦子	P100	木戸義勇	P048	黒田義弘	P101
加藤悦子	P119	衣笠晋一	P053	黒津卓三	P017
加藤晃一	3L12	紀ノ定保臣	P081	黒津卓三	P021
金久保光央	P089	木下美雪	P053	桑田一夫	3L02
金森審子	P065	木村敦臣	P079	桑原和弘	P027
兼清真人	P071	木村敦臣	1L10	桑原大介	1L06
金橋康二	1L08	木村敦臣	P075	桑原大介	P127
金橋康二	P004	木村一雄	P059	小泉美香	P080
金橋康二	P039	木村憲喜	1L07	小泉美香	P082
加納正隆	1L07	木村英昭	P010	河野隆英	P098
狩野広美	P080	木本博喜	P021	河野俊之	P003
狩野広美	P082	吉良敦史	1L04	河野俊之	P093
上平美弥	1L02	吉良敦史	P028	河野俊之	P099
神村学	3L04	空閑重則	P088	河野俊之	P105
神谷貴史	1L10	日下康成	P014	河野俊之	P116
紙谷浩之	3L05	楠英樹	3L03	古布村亮次	P008
亀田恒徳	P102	楠正美	P126	甲本忠史	P026
亀田恒徳	P103	久保健太	P036	小金澤望	P098
川上勝	2L02	窪田健二	P105	小神将	P088
川口謙	P059	熊谷 恵	1L11	越野広雪	P063
川崎政人	P123	熊木康裕	P098	越野広雪	P064
河野敬一	3L04	熊倉誠一郎	P078	小柴生造	P110
河野敬一	P098	久米田博之	3L11	小柴琢己	P104
河南るり子	1L04	久米田博之	P104	小嶋茂雄	P018
神奈木玲児	P065	倉島かおり	P116	小嶋茂雄	P074
神成さらら	P043	栗田順一	2L01	児嶋長次郎	2L03
神成さらら	P044	栗田順一	P107	児嶋長次郎	P091
木内信	3L04	栗田順一	P129	小島正樹	P112
木川隆則	2L04	栗原範明	P043	巨瀬勝美	1L13
木川隆則	P095	栗原範明	P044	巨瀬勝美	P050
菊地淳	P095	栗原範明	P051	巨瀬勝美	P083
菊地淳	P110	栗本英治	3L12	小竹健一郎	P045
木曾真	P065	黒木重樹	1L05	小玉啓文	P045
北浦良	P023	黒木重樹	P010	小寺義男	P116
北川進	P023	黒木重樹	P016	後藤敦	P046

後藤敦	P047	佐々木亨	P099	末松浩人	P051
後藤敦	P048	佐々木英典	P083	須貝真理子	P093
小橋川敬博	3L11	佐々木英典	P131	須貝真理子	P105
小橋川敬博	P104	笹倉英史	P103	須貝真理子	P116
小林邦子	P099	佐藤一紀	P099	杉浦眞喜子	P075
小林将俊	1L05	佐藤賢二	P129	杉沢寿志	P004
小林祐次	3L07	佐藤一	P085	杉沢寿志	P043
小林祐次	P102	佐藤寛子	P064	杉沢寿志	P044
小林由枝	P117	三瓶巖一	P109	杉本慎一	P092
小松 耕平	P009	三本木至宏	P102	鈴木秋弘	P103
小松耕平	P022	塩沢久美子	P115	鈴木淳司	P060
小森佳彦	P038	忍久保正治	P030	鈴木榮一郎	3L01
小森佳彦	P042	柴田武彦	P108	鈴木榮一郎	P092
(さ行)		柴田武彦	P114	鈴木咲良	P109
齋藤公児	1L08	柴田武彦	P116	鈴木千紗	P105
斎藤公児	P004	柴田武彦	P118	鈴木智幸	P035
齋藤公児	P039	嶋田一夫	3L06	住本英樹	3L09
齋藤剛	P053	島原秀登	2L01	住本英樹	P122
斎藤功夫	P089	島原秀登	P107	瀬尾芳輝	1L12
斉藤肇	1L02	島原秀登	P129	瀬川新一	3L10
斉藤肇	1L04	清水謙多郎	P121	瀬戸治男	P055
斉藤肇	P028	清水隆興	1L10	曾我美勝	P081
斉藤肇	P029	清水禎	P046	(た行)	
斉藤肇	P034	清水禎	P047	田井利弘	P012
斉藤肇	P076	清水禎	P048	高石慎也	1L07
斎藤雅子	P108	下池田勇一	P004	高崎涉	P078
齋藤雅子	P114	下里隆一	P078	高須昭則	P081
齋藤唯理亜	P073	下竹敦哉	P094	高瀬俊和	P045
酒井康成	3L05	白川昌宏	3L05	高野博幸	P082
坂本恵子	3L10	白川昌宏	P094	高橋征三	P077
佐久間千勢子	P112	白川昌宏	P115	高橋健治	P112
櫻井愛子	P067	白水美香子	2L04	鷹股亮	1L12
桜井謙資	P032	神藤平三郎	P062	高山俊夫	P042
桜井智司	P051	神藤平三郎	P112	竹内敬人	P052
櫻井実	P037	榛葉信久	3L01	竹腰清乃理	1L01
佐々木曉嗣	P016	榛葉信久	P092	竹腰清乃理	P001

竹腰清乃理	P006	辻暁	P034	中井利仁	1L06
竹腰清乃理	P007	辻暁	P076	中井利仁	P072
竹腰清乃理	P008	辻田義治	P035	中江一浩	P032
武田和行	P008	津田栄	3L11	長尾聡	P103
武田寛之	P031	津田栄	P104	中尾奈穂子	1L09
田代桜子	P062	土屋真純	P071	中尾光善	P094
田代桜子	P112	堤耀広	P019	中川照眞	P101
田代満	P062	堤耀広	P025	永阪文惣	P020
立入直紀	P102	堤耀廣	P031	中澤靖元	1L03
橘秀樹	3L10	堤耀廣	P036	永嶋一臣	P069
辰本将司	P129	堤耀廣	P060	永田宏次	P117
楯真一	2L01	堤れい子	P109	中田忠	P064
楯真一	3L13	津野久幸	P045	仲谷幸司	P107
楯真一	P107	津村憲史	P025	長土居有隆	P109
楯真一	P129	出来成人	P073	中西昭男	1L13
田所大	P105	出村誠	P098	中野博明	3L07
田中克巳	P052	出村誠	P104	中原勝	1L09
田中剛史	P116	寺内勉	P106	中別府雄作	3L05
田中俊之	3L03	寺尾武彦	1L01	中村新治	1L01
田辺豪	P026	寺尾武彦	P001	中村新治	P007
谷生道一	1L04	寺尾武彦	P006	仲村高志	P027
谷生道一	P028	寺尾武彦	P007	中村亘男	P020
谷生道一	P029	寺尾武彦	P008	成相裕之	P056
谷生道一	P034	寺沢宏明	3L09	成相裕之	P057
田之倉優	P117	照井教文	P102	新沼さおり	P123
田畑博史	P057	照井教文	P103	西尾聡子	1L03
田宮由香	P087	土肥義治	P027	西川実希	P052
田宮由香	P090	枳尾豪人	P115	西田清義	P117
張潤萍	P053	戸所泰人	P003	西田幸治	P118
趙晨華	P022	土肥輝美	1L02	西則雄	P017
陳丹平	P040	富永里香	P084	西村勝之	P002
津崎剛	1L13	虎谷秀一	P076	西村善文	P109
辻暁	1L02	(な行)		新田勝利	3L11
辻暁	1L04	内藤晶	1L02	新田勝利	P098
辻暁	P028	内藤晶	P076	新田勝利	P104
辻暁	P029	内藤成弘	P082	根本暢明	3L11

根本暢明	P104	林繁信	P033	藤原敏道	P005
根本暢明	P117	林繁信	P038	藤原久徳	P078
野口真路	P105	林繁信	P041	藤原英明	1L10
野口泰志	P092	林繁信	P042	藤原英明	P075
野坂篤子	1L02	早野俊哉	P106	藤原英明	P079
野瀬卓平	P071	早水紀久子	P024	瀨上和幸	P106
野田康夫	3L10	早水紀久子	P124	文野浩一	P058
野田祐紀子	3L09	原田拓志	3L12	降旗一夫	P055
野間弘昭	P068	春山英幸	P078	細田和男	P119
野村薫	P088	半沢宏之	P078	堀田芳生	P016
(は行)		半沢宏之	P130	堀井文敬	P011
拝師智之	1L13	坂東寿則	P024	堀井文敬	P012
拝師智之	P050	樋岡克哉	P043	堀井文敬	P013
拝師智之	P083	樋岡克哉	P044	堀井文敬	P014
灰野裕美	P075	疋田純	P084	堀井文敬	P015
端健二郎	P046	平井諒子	P015	堀内正隆	P123
端健二郎	P047	平井健一	3L10	堀毛悟史	P023
端健二郎	P048	平井佑紀	P103	本多賢吉	P108
橋田広人	P066	平沖敏文	P031	本多賢吉	P118
橋本征太郎	1L13	平沖敏文	P036	(ま行)	
橋本征太郎	P083	平沖敏文	P060	前田史郎	P032
長谷川憲一	P043	平賀隆	P049	牧秀志	P056
長谷川憲一	P044	平林忠道	P081	牧秀志	P057
長谷川潤	1L04	廣田洋	2L04	正木春彦	P121
長谷川淳	P102	廣田洋	P065	増井大二	P040
畑田清隆	P089	福井洋之	P128	益田晶子	P063
畑中稔	P121	福島徑	P110	増田憲二	P014
八田知久	P119	福田敦子	P021	増田憲二	P015
服部峰之	P049	福田邦昭	P078	増田容子	P066
馬場雄久	P128	福家一則	P012	増田善雄	P089
濱田辰夫	P036	藤井直之	P045	町田進	P048
濱田季之	P065	藤木洋	3L13	松浦久恵	P112
早川洋一	3L04	藤田直之	P094	松木陽	P005
早川洋一	P098	藤谷直樹	P098	松島秀	P081
林和彦	P093	藤原伸也	P045	松田善正	1L13
林和彦	P105	藤原敏道	P003	松田善正	P050

松林伸幸	1L09	三好利一	P033	山本泰彦	P102
松原公明	P098	村上政隆	1L12	山本泰彦	P103
松原康史	P054	飯塚舜介	P084	湯沢聰	P122
松原康史	P067	本橋ほづみ	3L03	湯沢聰	P123
三浦愛	3L11	森慎一郎	P079	湯本史明	P117
三浦和紀	3L04	森田啓之	1L12	横川昭徳	P060
三浦和紀	3L11	諸橋昭雄	3L03	横田達夫	P056
三浦和紀	P098	(や行)		横地政志	3L09
三浦和紀	P104	八木宏昌	P113	横地政志	P122
美川務	P108	矢澤哲夫	P040	横地政志	P123
美川務	P114	安田秀世	P062	横地政志	P126
美川務	P118	柳川康洋	1L10	横山敬一	3L01
三島正規	3L05	柳下元	P003	横山茂之	2L04
水口峰之	3L04	八名純三	P089	横山茂之	P065
水口峰之	P098	矢野達也	P011	横山茂之	P095
水野和子	P066	矢吹一人	P022	横山茂之	P110
水野和子	P087	山口芳樹	3L12	横山茂之	P121
水野和子	P090	山崎俊夫	P113	吉岡澄江	P018
水野敬	P001	山崎俊正	P100	吉岡澄江	P074
水野敬	P006	山崎俊正	P119	吉岡大	1L13
水野猛	P119	山崎博実	P089	吉田卓也	3L07
水野元博	P030	山崎由香子	1L13	吉田賢右	P113
溝淵潔	P109	山崎由香子	P050	吉田充輝	P107
三森文行	1L11	山下宏一	P063	吉永壮佐	3L09
皆川和久	P102	山下伸一郎	P032	吉益雅俊	P108
宮内弘世	3L10	山田博昭	3L02	吉水広明	P035
宮崎義憲	P073	山田博昭	P096	吉村純子	P089
宮下博之	3L08	山田真路	P017	李華	3L02
宮島徹	P056	山根一祐	1L11	(わ行)	
宮田和彦	P029	山根努	P125	若井千尋	1L09
宮の入洋平	3L08	山根祐治	1L05	若松馨	P003
宮部亮	P046	山延健	P026	若松馨	P093
宮部亮	P047	山本隆一	P037	若松馨	P105
宮部亮	P048	山本裕之	P015	渡辺道直	3L08
宮本和英	P101	山本雅之	3L03		

キーワード索引	2次元 $^1\text{H-NMR}$	P099	diffusion	P086
(数字・アルファベット)	2次元スピン拡散固体 NMR	P009	DinI	P108
$^{129}\text{Xe}$	$^{31}\text{P}$ NMR	P092	dipolar coupling	P013
$^{129}\text{Xe}$ NMR	$^{31}\text{P}\rightarrow^{17}\text{O}$ CP/MAS	P039	Distance measurement	P002
$^{129}\text{Xe}$ NMR 化学シフト値	$^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ 同位体効果	P054	DLM モデル	P019
$^{129}\text{Xe}$ 化学シフト	3次元	P003	DNA	P017
$^{13}\text{C}$ NMR	400MHz	P051	DNA	2L03
$^{13}\text{C}$ NMR	$^{73}\text{Ge}$ NMR	P052	DNA	P091
$^{13}\text{C}$ NMR	Allergenic-Pentasaccharitol	P061	DNA 結合ドメイン	3L03
$^{13}\text{C}$ NMR	ALUMINIUM	P056	DNA 結合ドメイン	P109
$^{13}\text{C}$ -NMR	Amyloidosis	P097	DNA 結合蛋白質	P119
$^{15}\text{N}$ -relaxation	Aromatic amino acids	P111	DNA 相同組換え	P114
$^{15}\text{N}$ 選択標識	ATPase@サブユニット	P113	DNA 相同組換え	P118
$^{15}\text{N}$ 選択標識	background gradients	P086	DQCOSY	P084
$^{15}\text{N}$ 直接観測	beta-turn	P022	dynamics	P104
$^{17}\text{O}$ NMR	BmPP	3L04	D イオン伝導機構	P042
$^{17}\text{O}\rightarrow^{31}\text{P}$ CP/MAS	BMRB Database	P126	ENTHALPY	P057
$^{17}\text{O}$ -MQMAS	Ca $^{2+}$ -binding	P104	ENTROPY	P057
$^{18}\text{O}$	Ca $^{2+}$ 結合タンパク質	P117	enzyme	P104
$^{19}\text{F}$ NMR	CAST/CNMR	P064	Flory-Huggins 理論	P025
$^{19}\text{F}$ NMR 緩和	CCQM	P053	Free energy	P097
$^{19}\text{F}$ -NMR	Cdc24p	3L09	GBP	3L04
$^1\text{H}$ NMR	codon usage	P105	Gellan Gum	P060
$^1\text{H}$ NMR スペクトル	COMPLEX	P056	Growth Blocking Peptide	3L04
$^1\text{H}$ CRAMPS	conotoxin	P099	High-pressure	P097
$^1\text{H-T}_2$	CP/MAS $^{13}\text{C}$ NMR	P014	His-Asp リン酸転移情報伝達	P119
1次元応用測定	CPMAS	P032	HIV プロテアーゼ	P100
$^{27}\text{Al}$ -MQMAS	CPMAS	1L06	HMG protein	P107
$^{29}\text{Si}$ NMR	CPMG	P037	hnRNPK	P123
2D	Cross polalization	P006	Homonuclear polarization	1L01
selective-TOCSY-DQFCOSY	CsHSO4-CsH2PO4 系	P042	transfer in solids	
2D	DADAS 90 calculation	P061	HR(High resolution)-HMBC 法	P055
selective-TOCSY-NOESY	DECONVOLUTION	P057	HSQC	P084
$^2\text{H}$ -NMR	DECONVOLUTION	P056	ICAD/DF45	P110
$^2\text{H}$ -NMR 法	Deuteration	P111	III-IV リンカー	P101
2次元	dextran	P018	in situ 体積磁化率	P087

in vivo NMR	1L11	NMR	P101	RecA	P118
in vivo NMR	P092	NMRPipe	P126	RecA	P108
InP	P048	NMR イメージング	P016	recoupling	P013
isotactic-poly(1-butene)	P033	NMR セル	P089	REDOR	P127
LC-NMR	P059	NMR データベース	P124	REDOR	1L03
Lec-Goldburg irradiation	P006	NMR 緩和	P019	REDOR	P002
lyophilized formulation	P018	NMR 交差緩和	P025	REDOR	P009
lysozyme	P104	NMR 構造	P062	relaxation	P013
Maf	3L03	NOE シグナル帰属	3L13	relaxation time	P018
Magic angle spinning	1L01	Nuclear Overhauser effect in	1L01	resonance assignment	P130
MAS	P043	solids		RF inhomogeneity	P002
MAS	P003	OH - $\pi$ interaction	P013	RNase	P121
Mastoparan X	P003	overtone	P127	RNA 結合蛋白質	3L08
MAT 法	P012	p22phox	P122	ROESY-TOCSY (ROTO)	P061
MBD1	P094	p47phox	P122	rotary resonance	P007
MD calculation	P061	Pake doublet	P042	RRF	3L07
methylcellulose	P018	Paralytic Peptide	3L04	Selective protonation	P111
molecular mobility	P018	Parkin	P062	SFAM	P002
MQMAS	P040	PB1 ドメイン	3L09	SH3	P122
MQ-MAS	P004	PBLG	P071	SH3	P123
MQ-MAS	P044	PC モチーフ	3L09	Signal assignment in solids	P001
MRI	1L13	PGSE	P086	Silk II 型	P125
MRI	P082	phenoxy resins	P013	Silk I 型	P125
MRI	P081	PHOSPHATE	P057	solid state NMR	P002
MR マイクロスコープ	P050	PHOSPHATE	P056	spin diffusion	P007
MULTINUCLEAR	P056	Photoactive Yellow Protein	P115	Spinning Sideband(SSB)	1L06
MULTINUCLEAR	P057	phox	3L09	SS 結合再生反応中間体	3L10
Multiple $^{13}\text{C}$ $^{15}\text{N}$ -labeled	P001	pH 依存性	P079	STARFI イメージング	1L08
peptide		pH 依存性	P076	STEAM	1L11
NMR	P090	poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)	P031	Structural determination in	P001
NMR	P100	(PBLG)		solids	
NMR	P110	Protein folding	3L10	$T_1$	P060
NMR	P097	PVA	P015	$T_1$ 緩和時間	1L12
NMR	P065	Quadrupolar interaction	P006	$T_2$	P037
NMR	3L08	radiation damping	P086	$T_2$	P031
NMR	3L12	RecA	P114	$T_2$	P060

T <sub>2</sub> 緩和時間	1L11	安定同位体標識	P093	カルシトニン	1L02
TOCSY	P061	安定同位体標識	P102	塊重合	P021
TOSS	1L06	安定同位体ラベル	P105	回転緩和	1L09
TOSS-t1-deTOSS パルスシー ケンス	P030	イオン吸着 イオン伝導度	P068 P024	外部複基準法 外部複基準法	P066 P087
TOSS Ó	1L06	イメージング	P080	外部複基準法	P090
Transthyretin	P097	インテイン	P113	化学シフト	1L09
TRNOE	P118	イントラネット	P124	化学シフト	P128
TROSY	P111	インヒビター	P121	化学シフト異方性	1L06
ubiquitin-like domain	P062	インフルエンザウイルス	P076	化学シフト異方性	2L01
Ub-YUHI 複合体	P116	一次標準測定法	P053	化学シフト異方性	P072
unified scale	P087	遺伝子修復酵素	3L05	化学シフト異方性	P075
UV 照射	P017	遺伝的アルゴリズム	3L13	化学シフト異方性	P103
Vav	P123	ウニコナゾール	P075	化学シフト予測	P064
WISE	P040	エリ蚕絹フィブロイン	1L03	架橋深度	P024
Xe-129	1L10	エンジニアリングプラスチ ック	P012	拡散 拡散イメージング法	P069 P016
α-helix 構造	1L03	ック			
π共役系高分子 (あ行)	P037	永久磁石 液晶	1L13 P071	拡散係数 拡散係数	1L05 P073
アクリル酸	P021	液晶	P072	拡散の影響	1L10
アクリル酸エステル誘導体	P021	液晶利用	2L01	核磁気共鳴映像法(MRI)	P078
アクリロニトリル-ブタジエ ン共重合体ゴム	P035	易動度 塩素化ベンゼン	P073 P054	核四極子相互作用 核偏極	P088 P049
アジュバント関節炎ラット	P078	オープンセル構造体	P131	加水分解	3L05
アストログリア細胞	P084	オフマジックアングルスビ ニング	P072	画像解析 画像処理	P082 P083
アミノ酸	1L05	ニング			
アミノ酸	P036	温度	P058	家族性パーキンソン病	P062
アミロイド	1L02	温度依存性	P079	活性相関	P065
アミロイド繊維化	P120	温度ジャンプ	2L02	含ケイ素ポリマー	P010
アモルファス性 AlPO <sub>4</sub>	P039	温度測定	P079	含水率	P081
アルカリアースクロライド	P058	(か行)		緩和	P069
アンチモン酸	P014	ガラス	P040	緩和時間	1L10
圧力	P058	ガラス材質効果	1L10	緩和時間	3L07
安定化機構	1L03	ガラス転移	P025	緩和時間	P021
安定同位体標識	P003	カルシウムチャネル阻害ペ プチド	P099	緩和時間	P023
安定同位体標識	P005	プチド		緩和時間	P068

緩和時間	P074	コドン頻度	P093	光励起三重項状態	P008
緩和時間	P100	ゴム状高分子	P035	固体 $^{13}\text{C}$ NMR	1L07
緩和試薬	1L04	コリプレッサー	P109	固体 NMR	1L02
緩和試薬	1L12	コンパクト MRI	1L13	固体 NMR	1L04
キチン微結晶	P088	コンフォメーション	P033	固体 NMR	P003
キトサン	P032	コンフォメーション変化	P029	固体 NMR	P005
キラル液晶	P075	コンホメーション	P011	固体 NMR	P022
技術開発	P046	コンホメーション	P027	固体 NMR	P023
技術開発	P047	高圧	P069	固体 NMR	P027
技術開発	P048	高圧	P089	固体 NMR	P028
帰属	P072	高圧 NMR	3L02	固体 NMR	P034
絹フィブロイン	P022	高圧 NMR	P020	固体 NMR	P038
絹フィブロイン	P125	高圧 NMR	P096	固体高分解能 $^{13}\text{C}$ NMR	P029
吸着	P077	光学異性体	P075	固体高分解能 NMR	P026
強磁場	P047	交換速度	P077	固体高分解能 NMR	P032
金属ゲルマニウム	P052	抗菌活性	3L06	固体高分解能 NMR	P076
金属水素化物	P041	高次構造	1L04	固体高分解能 NMR 法	P017
クモ牽引糸	P009	高磁場	P004	固体分散体	P074
グローバルフォールド	P095	高磁場 NMR	P008	骨粗鬆症	1L13
空気軸受	P043	合成高分子	P081	混合金属錯体	1L07
区分安定同位体標識	P113	構造解析	P064	(さ行)	
ゲスト	P023	構造解析	P110	サーフェイスレンダリング	P083
ケミカルシフトイメージン	P080	構造解析	P131	サーモトロピック液晶高分	P030
グ		構造ゲノム科学プロジェクト	2L04	子	
ケミカルシフトの温度依存	P087	ト		サイトカイン	P098
性		構造相転移	P037	細孔系	P070
ケミカルシフトの温度依存	P090	構造転移	1L02	細孔サイズ	P070
性		構造のゆらぎ	3L10	細線化	P131
ケミカルシフトの濃度依存	P087	酵素標識法	3L01	細胞極性	3L09
性		高耐圧	P044	細胞質側表面電荷	P034
ゲル	P081	高分解能 NMR	3L06	酸化損傷	3L05
結晶	P027	高分子	P012	三次元構造	3L03
結晶化	P033	高分子	P019	三次元構造	P065
結晶構造	P026	高分子	P020	残余双極子カップリング	P095
検索	P124	高分子電解質	P024	残余双極子結合	P088
原子価移動	1L07	高分子複合体	P032	残余双極子効果	2L01

シアリルルイス X	P065	水素	P041	タンパク質構造	P129
ジスルフィド結合	3L12	水素拡散	P041	タンパク質弱配向	P095
シッフ塩基	P028	水素結合	1L09	タンパク質分子機能	2L04
ジニコナゾール	P075	水素結合	2L03	耐熱性タンパク質	P102
シフト試薬	P077	水素結合	P023	多核種多次元 NMR	P107
磁化移動	P081	水素結合	P091	多核多次元 NMR	P117
自己拡散	P071	水素結合の直接測定	3L05	多孔性錯体	P023
自己拡散係数	P024	水素結合を介した Jカップリ	2L03	多次元 NMR	3L03
実装	P044	ング定数		多次元 NMR	3L11
自動化	3L13	水素結合を介した Jカップリ	P091	多次元 NMR	P093
自動解析	P129	ング定数		多次元 NMR	P098
磁場配向	P088	水素交換反応速度	3L10	多次元 NMR	P119
磁場配向誘起シフト	P072	水和	P040	多次元 NMR 法	P109
重水素 NMR	P031	水和	P066	多量体形成	P120
自由体積	P035	ゼオライト	P038	炭酸イオン	P068
自由体積理論	P025	セレクトチン	P065	蛋白質核酸相互作用	P108
重炭酸イオン	P068	生体膜	3L06	蛋白質核酸相互作用	P114
収着	P035	繊維形成	1L02	蛋白質-核酸複合体	P094
重溶媒置換	P045	選択的安定同位体標識	3L12	蛋白質間相互作用	P108
小果実	P080	ゾル-ゲル転移	P031	蛋白質間相互作用	P116
常磁性 NMR	P102	相互作用	3L06	蛋白質立体構造決定	3L13
常磁性 NMR	P103	相対論的効果	P128	中間体	3L02
常磁性金属イオン	P060	相転移	P033	超並列型 MR マイクロスコ	P050
状態相関 2次元法	2L02	相溶性	P025	プ	
情報伝達	P115	側鎖 $^{13}\text{C}$ 核	P116	超偏極希ガス NMR	1L10
試料シャトル	P008	(た行)		超偏極希ガス NMR	P079
新規帰属法	P085	ダイナミクス	3L07	超臨界水	1L09
神経細胞	P084	ダイナミクス	3L08	超臨界流体	P020
人工変異体	P102	ダイナミクス	P012	超臨界流体	P089
診断	1L13	ダイナミクス	P096	直流電場 NMR	P073
スクリーニング	3L01	ダイナミクス	P120	データベース	P064
スピン-格子緩和時間	1L09	タンパク帰属	P129	データベース構築	P124
スピン拡散	P015	タンパク質フォールディング	2L02	低温効果	3L11
スピン拡散	P074	グ		定量化	P083
スピン-格子緩和時間	P041	タンパク質間相互作用	P121	定量性	P053
スピン-格子緩和速度	P058	タンパク質基本構造	2L04	ドメイン	P110

ドメインスワップ機構	P120	パルスNMR	P021	分子シャペロン	3L12
トランスグルタミナーゼ	3L01	パルス NMR	P071	分子動力学法	P125
銅イオン	P016	パルス磁場勾配NMR法	P063	ペプチド	P098
同位体効果	P041	パルス磁場勾配スピネコ	1L05	ペプチド	P105
同位体ラベル	P098	ーNMR法		へマグルチニン2	P076
糖鎖	P085	ハロゲン架橋錯体	1L07	へムタンパク質	P102
糖鎖構造	P063	パン	P082	へムタンパク質	P103
同種核二量子双極子相互作用	P005	発現系	P105	ベンゼン	P031
動的核偏極 (DNP)	P008	反強磁性一次元系	1L07	並列化	P050
(な行)		ヒアルロン酸	P063	並列型MR マイクロスコープ	P050
ナトリウムチャンネル	P101	ヒトリゾチーム	3L11	変性状態	P112
ナノ空間	P038	光受容蛋白質	P115	ポリ (4-メチルチアゾール)	P037
ナノ複合体	P014	光ポンピング	P048	ポリ (ブチレンアジベート-	P027
内部組織形態	P080	光ポンピング	P049	ブチレンテレフタレート) 共	
ニトロアニリン	P038	微生物代謝	P092	重合体	
二次元固体 NMR	P011	微生物反応	P092	ポリアラニルグリシルグリ	P009
二次元固体 NMR	P012	病原性	3L02	シン	
二次元スピン拡散 NMR	1L03	表示	P124	ポリエチレンオキサライド	P024
二量子 NMR	P011	標識 DNA の合成	P091	ポリエチレンナフタレート	P011
ネットワーク	P082	微量	P067	ポリオキシメタレート	P014
ネマティック相	P030	微量成分の構造解析	P059	ポリゴン	P083
熱変性	P112	ブタノール	P066	ポリシロキササン	P010
熱力学	P096	フッ素置換ヘム	P103	ポリブチレンナフタレート	P026
燃料電池	P042	プリオン	3L02	ポリペプチド	P019
脳脊髄液	1L12	プリン生合成	P109	ポリマーゲル電解質	P073
脳組織	P077	プロテアーゼインヒビター	P120	ポリメタクリル酸ゲル	P016
脳代謝	1L11	プロテインジスルフィドイ	3L12	芳香環フリッパーフロップ	P036
脳代謝物	P084	ソメラゼ		(ま行)	
(は行)		プロトン交換	P068	マーチングキューブ法	P083
ハイスループット	2L04	不活性化	P101	マジック角試料回転	P005
ハイスループット NMR	P045	不確かさ評価	P053	巻戻り中間体	P096
バクテリアセルロース	P015	不定形耐火物	1L08	膜貫通 $\alpha$ -ヘリックス	1L04
バクテリオロドプシン	P028	分子運動	P027	膜障害性ペプチド	3L06
バクテリオロドプシン	P029	分子運動	P033	膜蛋白質	1L04
バクテリオロドプシン	P034	分子挙動	P038	膜タンパク質	P028
		分子交換	P069	膜蛋白質	P029

膜融合誘起機構	P076	リチウム	P073
麻痺ペプチド	3L04	リプレッサー	P109
マイクロフィブリル	P015	リボソーム	P121
水	P077	リボヌクレアーゼ T <sub>1</sub>	P112
水分子	1L12	リラクゼーション	3L11
水分子	P058	立体安定化液晶	P088
脈絡叢	1L12	立体化学	P064
無機-有機複合体	P014	立体構造解析	P121
無細胞タンパク質合成	2L04	立体構造決定	P107
無細胞蛋白質合成系	P106	立体選択的重水素化	P106
メタノール	P090	量子計算機	P046
メチル化 DNA	P094	レギュレータ	P119
メチル化 DNA 結合ドメイン	P094	レンダリング	P080
メリフィールド樹脂	1L05		
毛細管	P069		
(や行)			
ユビキチン	P093		
ユビキチン	P096		
ゆらぎ	3L08		
融合タンパク質	P093		
誘導適合	3L08		
揺らぎ	P029		
溶液 MAS	P067		
溶液 NMR	3L01		
溶液構造	P101		
溶液構造	P117		
溶液 3 重共鳴プローブ	P051		
溶液多次元 NMR 法	P094		
溶液多次元 NMR 法	P115		
溶媒シグナル消去	P059		
溶媒露出度	P095		
(ら行)			
ラメラ構造	P022		
ラングミュアモデル	P020		
リカップリング	P005		
リゾチーム	3L10		

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
Chin Yu Chin Yu	Department of Chemistry, National Tsing Hua University 101, Section 2 Kuang Fu Road, Hsinchu, Taiwan 300	cyu@chem.nthu.edu.tw	
Chin-Pan Chen Chin-Pan Chen	Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica 128 Academia Road, Sec. 2, Nankang, Taipei, Taiwan 115	bmchinp@ccvax.sinica.edu.tw	
Ding-Kwo Chang Ding-Kwo Chang	Institute of Chemistry, Academia Sinica 128, Yen Chiou Yuan Rd., Sec. 2, Nankang, Taipei, Taiwan 115	dkc@chem.sinica.edu.tw	
Hsien-Ming Kao Hsien-Ming Kao	Chemistry Department, National Central University 38 Wu-chuan Li, Chung-li, Tao-yuan, Taiwan 320	hmkao@cc.ncu.edu.tw	
J. M. Brown J. M. Brown	Martek Biosciences Corp Stable Isotope Group 6480 Dobbin Road Columbia, MD 21045 U.S.A	410-740-0081	
Jya-Wei Cheng Jya-Wei Cheng	Department of Life Science, National Tsing Hua University 101, Section 2 Kuang Fu Road, Hsinchu, Taiwan 300	lscjw@life.nthu.edu.tw	
Koudriavtsev Andrei Borisovich Koudriavtsev Andrei Borisovich	D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia Analytical Centre 305-8571 Miusskaya sq. 9 125047 Moscow Russia	akoudri@online.ru (after 1st October: ikeda@chem.tsukuba.ac.jp)	
Lian-Pin Hwang Lian-Pin Hwang	Department of Chemistry, National Taiwan University 1 Roosevelt Road, Section 4, Taipei, Taiwan	nmra@po.iams.sinica.edu.tw	
Markus Waelchli Markus Waelchli	ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1235 212 mrw@bruker.co.jp	0298-58-0322
Niraula Tara Nath Niraula Tara Nath	神戸大学大学院 自然科学研究科 分子集合科学集合体物性 657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1	078-803-6529 962d935n@yku.kobe-u.ac.jp	078-803-6529
Suraj Manrao Suraj Manrao	Martek Biosciences Corp Stable Isotope Group 6480 Dobbin Road Columbia, MD 21045 U.S.A	410-740-0081 sibs@clark.net	410-740-1328
Ping-Chiang Lyu Ping-Chiang Lyu	Department of Life Sciences, National Tsing Hua University 101, Section 2 Kuang Fu Road, Hsinchu, Taiwan 300	lspc@life.nthu.edu.tw	
Rajesh Sundaresan Rajesh Sundaresan	理化学研究所 生体超分子構造機能研究協力グループ 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7224 rajesh@louise.riken.go.jp	045-508-7364
Shang-Bin Liu Shang-Bin Liu	Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica P. O. Box 23-166, Taipei, Taiwan 106	sbliu@po.iams.sinica.edu.tw	
Shan-Ho Chou Shan-Ho Chou	The Institute of Biochemistry, National Chung-Hsing University 250, Kuo-kwang Road, Taichung, Taiwan 402	shchou@dragon.nchu.edu.tw	

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
UEMI miriam UEMI miriam	国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1	03-3700-1141 223 miyata@nihs.go.jp	03-3707-6950
Wen-Guey Wu Wen-Guey Wu	Department of Life Sciences, National Tsing-Hua University 101, Section 2 Kuang Fu Road, Hsinchu, Taiwan 300	wgwu@life.nthu.edu.tw	
相沢 智康 あいざわ ともやす	富山医科薬科大学 薬学部構造生物学研究室 930-0194 富山県富山市杉谷 2630 番地	076-434-5061 aizawa@ms.toyama-mpu.ac.jp	076-434-5061
相見 敬太郎 あいみ けいたろう	東京工業大学大学院 理工学研究科有機・高分子物質専攻 安藤(慎)研究室 152-8552 目黒区大岡山 2-12-1	03-5734-2880 kaimi@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
青木 和子 あおき かずこ	ダイキン工業(株) 化学事業部 第二研究開発部 305-0841 茨城県つくば市御幸が丘3番地	0298-58-5067 kazuko.aoki@daikin.co.jp	0298-58-5082
赤坂 一之 あかさか かずゆき	理化学研究所・播磨研究所 細胞情報伝達研究室 679-5148 兵庫県佐用郡三日月町光都1丁目1-1	0791-58-0802 akasaka8@spring8.or.jp	07915-8-2835
阿久津 秀雄 あくつ ひでお	大阪大学蛋白質研究所 物性部門 565-0871 吹田市山田丘3-2	06-6879-8597 akutsu@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
浅川 直紀 あさかわ なおき	東京工業大学大学院生命理工学研究科 生体分子機能工学 専攻 226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259	045-924-5796 nasakawa@bio.titech.ac.jp	045-924-5827
朝倉 哲郎 あさくら てつお	東京農工大学 工学部生命工学科 184-8588 東京都小金井市中町2-24-16	042-383-7733 asakura@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733
浅野 敦志 あさの あつし	防衛大学校 応用化学科 239-8686 横須賀市走水1-10-20	0468-41-3810 3596 asanoa@nda.ac.jp	0468-44-5901
芦田 淳 あしだ じゅん	バリアンテクノロジーズジャパン NMR応用部 108-0023 東京都港区芝浦 4-16-36	03-5232-1238 jun.ashida@varianinc.com	03-5232-1264
東 利雄 あずま としお	藤沢薬品工業 物性研究所 532-8514 大阪市淀川区加島2-1-6	06-6390-1824 toshio_azuma@po.fujisawa.co.jp	06-6304-1392
阿曾 幸男 あそ ゆきお	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1	03-3700-1141 227 aso@nihs.go.jp	03-3707-6950
穴井 孝弘 あない たかひろ	日本電子株式会社 AID 1G 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2236 anai@jeol.co.jp	042-546-8086
阿部 孝政 あべ たかまさ	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7-22	045-503-9212 tabe@gsc.riken.go.jp	045-503-9210
天野 まゆみ あまの まゆみ	大阪大学蛋白質研究所 物性部門 565-0871 吹田市山田丘3-2	06-6879-8598 amano@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599

## 参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
荒川 規 あらかわ ただし	姫路工業大学理学部 生体物質構造学Ⅱ 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1	0791-58-0182 arkw@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182
荒木 潤 あらかき じゅん	東大大学院 農学生命科学研究科 生物材料科学専攻 生物 素材科学研究室 113-8657 文京区弥生1-1-1	03-5841-7513 jun@sbp.f.u.tokyo.ac.jp	03-5684-0299
荒田 洋治 あらかた ようじ	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9294 arata@postman.riken.go.jp	045-503-9155
安藤 勲 あんどう いさお	東京工業大学大学院理工学研究科 物質科学 152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2139 iando@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
安藤 慎治 あんどう しんじ	東京工業大学理工学研究科 有機高分子物質専攻 152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2137 sando@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
飯島 隆広 いじま たかひろ	金沢大学理学部 化学科理論化学研究室 920-1192 金沢市角間町	076-264-5686 ijima@wiron1.s.kanazawa-u.ac.jp	076-264-5742
飯田 貴之 いいた たかゆき	福井大学工学部 生物応用化学科 910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8635 takayuki@acbio2.acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8487
池田 龍一 いけだ りゅういち	筑波大学 化学系 305-8571 つくば市天王台1-1-1	0298-53-4250 ikeda@chem.tsukuba.ac.jp	0298-53-4250
池谷 鉄兵 いけや てつぺい	東京大学農学生命科学研究科 生物情報工学研究室 113-8657 東京都文京区弥生1丁目1番1号	03-5841-5449 tikeya@bi.a.u.tokyo.ac.jp	03-5841-8002
石井 大輔 いしい だいすけ	京都大学大学院農学研究科森林科学専攻 天然繊維工学分 野 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-6248 ishiidai@kais.kyoto-u.ac.jp	075-753-6300
石川 裕之 いしかわ ひろゆき	金沢大学 理学部理論化学研究室 920-1192 石川県金沢市角間町	076-264-5686 ishikawa@wiron1.s.kanazawa-u.ac.jp	076-264-5742
石川 麗 いしかわ れい	東京都立大学大学院 理学研究科化学専攻有機構造生物化 学 192-0397 東京都八王子市南大沢1-1	0426-77-1111 3538 ishikawa@nmr.chem.metro-u.ac.jp	無
石田 信昭 いしだ のぶあき	独立行政法人食品総合研究所 分析科学部 305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12	0298-38-8057 nobu@nfri.affrc.go.jp	0298-38-7996
泉 康彦 いずみ やすひこ	福井大学 機器分析センター 910-8507 福井市文京 3-9-1	0776-27-8580 izuquiz@acbio2.acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8882
泉 康彦 いずみ やすひこ	福井大学 大学院工学研究科 910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8580 mizuno@acbio.acbio.fukui-u.ac.jp	無
井田 朋智 いだ ともりの	金沢大学理学部化学科 理論化学研究室 920-1192 石川県金沢市角間町	076-264-5686 ida_t@wiron1.s.kanazawa-u.ac.jp	076-264-5742

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
射手園 佳子 いてその よしこ	日本ロシュ研究所 化学部機器分析グループ 247-8530 鎌倉市梶原200	0467-47-2209 yoshiko.itezono@roche.com	0467-45-6815
伊藤 隆 いとう ゆたか	理化学研究所 遺伝生化学研究室 230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29	045-508-7224 ito@louise.riken.go.jp	045-508-7364
乾 延彦 いぬい のぶひこ	京都大学化学研究所 材料物性基礎3 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 inui@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
井上 匡子 いのうえ きょうこ	理化学研究所 横浜研究所 ゲノム科学総合研究所センター タンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22 CRT 室	045-503-9229 kyokoino@gsc.riken.go.jp	045-503-9228
井町 美佐子 いまち みさこ	ブルカー・バイオスピン株式会社 マーケティング部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1235 220 mi@bruker.co.jp	0298-58-0322
岩下 孝 いわした たかし	(財)サントリー生物有機科学研究所 618-8503 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1	075-962-6044 iwashita@sunbor.or.jp	075-962-2115
岩瀬 由紀子 いわせ ゆきこ	福岡大学薬学部 中央機器室 814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1	092-871-6631 wase@fukuoka-u.ac.jp	092-863-0389
植木 定雄 うえき さだお	ブルカー・バイオスピン株式会社 マーケティング部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 443 su@bruker.co.jp	0298-58-0322
鵜澤 洵 うざわ じゆん	理化学研究所 植物科学研究センター 351-0198 和光市広沢2-1	048-467-4174 juzawa@postman.riken.go.jp	048-467-4170
内田 健一 うちだ けんいち	帝京大学 理工学部 320-8551 宇都宮市豊郷台1-1	028-627-7265 kuchida@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp	無
内野 新一 うちの しんいち	北海道大学大学院工学研究科 量子物理工学専攻 物質物理 工学講座 060-8628 札幌市北区北 13 条西 8 丁目	011-706-6639 6642 schwarz@eng.hokudai.ac.jp	011-716-6175
梅本 公子 うめもと きみこ	国際基督教大学 理学科化学 181-8585 東京都三鷹市大沢3丁目10-2	0422-33-3256 umemoto@icu.ac.jp	0422-33-1449
江口 太郎 えぐち たらう	大阪大学大学院理学研究科 化学専攻物理化学講座 560-0043 豊中市待兼山町1番16号	06-6850-5778 eguchi@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-6850-5785
恵良 聖一 えら せいいち	岐阜大学医学部 第2生理学教室 500-8705 岐阜市司町 40	058-267-2225 era@cc.gifu-u.ac.jp	058-267-2962
大木 出 おおき いずる	横浜市立大学大学院総合理化学研究科 生体超分子システム科 学 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7214 i-ooki@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7361
大木 進野 おおき しんや	東京都立大学理学部 有機第1 192-0397 八王子市南大沢1の1	0426-77-1111 3552 ohki@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-4873

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
大久保 征治 おおくぼ せいじ	東京薬科大学薬学部 第一薬品分析化学 192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1	0426-76-4542 y961045@educ.ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4542
大島(坂本) 曜子 おおしま(さかもと) ようこ	東邦大学薬学部 中央機器室 NMR 274-8510 千葉県船橋市 三山 2-2-1	047-472-1282 sakamoto@phar.toho-u.ac.jp	047-472-1282
大竹 亮子 おおたけ りょうこ	味の素株式会社 中央研究所分析研究部 210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1	044-210-5923 7366 ryoko_ohtake@ajinomoto.com	044-211-7609
大西 充洋 おおにし みつひろ	福井大学工学部 生物応用化学科 910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8635 s270151@icpc00.icpc.fukui-u.ac.jp	0776-27-8487
大野 綾子 おおの あやこ	東京都立大学 理学研究科有機構造生物化学研究室 192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1	0426-77-1111 3551 ayako@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-2544
大橋 竜太郎 おおはし りゅうたろう	京大大学院理学部理学研究科 化学教室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4014 ryu@kuchem.kyoto-u.ac.jp	無
大橋 若奈 おおはし わかな	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造機能研究グループ 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9314 wohashi@gsc.riken.go.jp	045-503-9210
大山 真 おおやま まこと	明治製菓株式会社 薬品総合研究所 222-8567 横浜市港北区師岡町 760	045-545-3125 makoto_oyama@meiji.co.jp	045-545-3199
岡田 輝政 おかだ てるまさ	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2236 teokada@jeol.co.jp	042-546-8068
小川 潔 おがわ きよし	旭化成株式会社 ライフ総研 製剤研究所 410-2321 静岡県田方郡大仁町三福632-1	0558-76-7085 ogawa.kg@om.asahi-kasei.co.jp	0558-76-2947
荻野 孝史 おぎの たかし	国立精神・神経センター神経研究所 187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1	042-341-2711 5252 ogino@ncnp.go.jp	042-342-7521
小椋 賢治 おぐら けんじ	北海道大学大学院薬学研究所 構造生物学分野 060-0812 札幌市北区北12条西6丁目	011-706-3750 ogura@pharm.hokudai.ac.jp	011-706-4979
小澤 慶児 おざわ けいじ	三菱東京製薬株式会社 製薬技術開発センター物性分析研究室 314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14	0479-46-4621 4302205@mitsubishi-pharm.co.jp	0479-46-6113
小野 晶 おの あきら	東京都立大学大学院理学研究科 化学専攻 192-0397 八王子市南大沢 1-1	0426-77-2545 akira@nmr.chme.metro-u.ac.jp	0426-77-2525
小野 功 おの いさお	徳島大学工学部 知能情報工学科 770-8506 徳島県徳島市南常三島 2-1	088-656-9139 isao@is.tokushima-u.ac.jp	088-656-9139
垣田 信吾 かきた しんご	協和発酵工業(株) 東京研究所 194-8533 東京都町田市旭町3-6-6	042-725-2555 2220 skakita@kyowa.co.jp	042-726-8330

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
梶 弘典 かじ ひろのり	京都大学化学研究所 材料物性基礎3 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3149 kaji@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
片岡 弘 かたおか ひろし	産業技術総合研究所 生活環境系界面イオニクス研究グループ 563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31	0727-51-9618 hiroshi.kataoka@aist.go.jp	0727-51-9714
片平 正人 かたひら まさと	横浜国立大学大学院 環境情報研究院 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-7	045-339-4264 masakata@ynu.ac.jp	045-339-4264
門 良一 かど りょういち	京都産業大学 理学部物理 603-8555 京都市北区上賀茂本山	075-705-1634 kador@cc.kyoto-su.ac.jp	075-705-1640
加藤 悦子 かとう えつこ	農業生物資源研究所 生体高分子グループ 305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2	0298-38-7072 ekatoh@nias.affrc.go.jp	0298-38-8399
加藤 晃一 かとう こういち	名古屋市立大学大学院薬学研究科 生命分子構造学研究室 467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1	052-836-3447 kkato@phar.nagoya-cu.ac.jp	052-836-3447
加藤 貴子 かとう たかこ	神戸薬科大学 薬品分析学 658-8558 神戸市東灘区本山北町4-19-1	078-441-7591 gk015032@st.kobepharmaceutical-u.ac.jp	078-441-7591
加藤 祐子 かとう ゆうこ	東和大学 工業化学科 バイオ工学コース 815-8510 福岡市南区筑紫丘1-1-1	092-541-1511 971 yukato@tohwa-u.ac.jp	092-552-2707
金久保 光央 かなくぼ みつひろ	産業技術総合研究所・超臨界流体研究センター 983-8551 仙台市宮城野区苦竹 4-2-1	022-237-5211 m-kanakubo@aist.go.jp	022-237-5224
金沢 洋子 かなざわ ようこ	日本シエリング(株) 創薬研究所 532-0004 淀川区西宮原2-6-64	06-6396-2518 yokanazawa@schering.co.jp	06-6398-2462
狩野 広美 かの ひろみ	農業生物資源研究所 生理機能研究グループ光合成研究チーム 305-8602 つくば市観音台 2-1-2	0298-38-8378 無	0298-38-7408
神谷 貴史 かみや たかし	大阪大学保健学科 医用工学講座藤原研究室 565-0871 吹田市山田丘1-7	06-6879-2577 ka38@sahs.med.osaka-u	06-6879-2577
亀田 恒徳 かめた つねのり	筑波大学 化学系 305-8571 茨城県つくば市天王台1-1-1	0298-53-7369 tkameda@staff.chem.tsukuba.ac.jp	0298-53-7369
河合 剛太 かわい ごうた	千葉工業大学 工学部工業化学科 275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1	047-478-0425 gkawai@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
川上 勝 かわかみ まさる	神戸大学 自然科学研究科 657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1	078-803-6529 kmasaru@kobe-u.ac.jp	078-803-6529
川口 謙 かわぐち けん	東レリサーチセンター 構造解析研究室 248-8555 鎌倉市手広1111番地	0467-32-9976 ken_kawaguchi@trc.toray.co.jp	0467-32-0414

参加者名簿

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
川島 裕之 かわしま ひろゆき	産業技術総合研究所 エネルギー利用研究部門 305-8569 つくば市小野川16-1	0298-61-8413 h.kawashima@aist.go.jp	0298-61-8408
河野 敬一 かわの けいいち	富山医科薬科大学薬学部 構造生物学研究室 930-0194 富山市杉谷 2630	076-434-5061 kawano@ms.toyama-mpu.ac.jp	076-434-5061
木川 隆則 きかわ たかのり	理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター タンパク質発現・ 解析高度化施設 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22	045-503-9203 kigawa@jota.gsc.riken.go.jp	045-503-9201
菊地 淳 きくち じゅん	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・ 機能研究グループ 230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22	045-503-9203 kikuchi@gsc.riken.go.jp	045-503-9201
菊池 純子 きくち じゅんこ	塩野義製薬中央研究所 物理化学部門 553-0002 大阪市福島区鷺洲 5-12-4	06-6458-5861 273 junko.kikuchi@shionogi.co.jp	06-6458-0987
氣田 佳喜 きだ よしき	日本電子株式会社 第2設計技術本部 196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2240 ykida@jeol.co.jp	042-546-8760
北川 進 きたがわ すずむ	京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻機能化学講 座 606-8501 京都市左京区吉田本町	075-753-5652 kitagawa@sbchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4979
北原 亮 きたはら りょう	神戸大学大学院 自然科学研究科 657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1	078-803-6529 970d830n@yku.kobe-u.ac.jp	078-803-6529
木下 美雪 きのした みゆき	産業技術総合研究所 計測標準研究部門 有機分析科 高分 子標準研究室 305-8565 茨城県つくば市東1-1-1中央第5	0298-61-4618 m-kinoshita@aist.go.jp	0298-61-4487
木村 敦臣 きむら あつおみ	大阪大学 医学部保健学科 565-0871 吹田市山田丘1-7	06-6879-2577 kimura@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-6879-2577
木村 一雄 きむら かずお	東レリサーチセンター 構造解析研究室 248-8555 鎌倉市手広1111番地	0467-32-9976 kazuo_kimura@trc.toray.co.jp	0467-32-0414
木村 憲喜 きむら のりよし	和歌山大学 教育学部化学教室 640-8510 和歌山市栄谷930番地	073-457-7365 nkimura@center.wakayama-u.ac.jp	073-457-7515
木村 英昭 きむら ひであき	東京工業大学大学院理工学研究科 物質工学専攻 安藤(勲) 研究室 152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2880 hkimura@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
木村 雅晴 きむら まさはる	住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所 分析物性グル ープ 554-8558 大阪市此花区春日出中3-1-98	06-6466-5171 kimuram5@sc.sumitomo-chem.co.jp	06-6466-5172
木村 由美子 きむら ゆみこ	日本大学薬学部 分析センター 274-8555 千葉県船橋市習志野台 7-7-1	047-465-7362 kimura@pha.nihon-u.ac.jp	047-465-7362
木本 博喜 きもと ひろき	防衛大学校 応用化学科 239-8686 横須賀市走水1-10-20	0468-41-3810 3581 hero@nda.ac.jp	0468-44-5901

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
吉良 敦史 きら あつし	姫路工業大学大学院理学研究科 生体物質構造学Ⅱ 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1	0791-58-0182 a-kira@creta.sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182
日下 康成 くさか やすなり	京都大学化学研究所 材料物性基礎3 611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 kusaka@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
日下部 武敏 くさかべ たけとし	京大工学研究科附属環境質制御研究センター 環境質制御分野(清水研) 520-0811 大津市由美浜 1-2	077-527-6730 kusatake@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp	077-524-9869
楠 英樹 くすのき ひでき	筑波大学 先端学際領域研究センター 305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1	0298-53-7310 hkusu@tara.tsukuba.ac.jp	0298-53-6065
久保 健太 くぼ けんた	北海道大学工学研究科 量子物理工学専攻分子物理 060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6642 kkubo@eng.hokudai.ac.jp	011-706-6175
熊澤 茂則 くまざわ しげのり	静岡県立大学 食品栄養科学部 422-8526 静岡県静岡市谷田52-1	054-264-5525 kumazawa@smail.u-shizuoka-ken.ac.jp	054-264-5551
久米田 博之 くめた ひろゆき	産業技術総合研究所北海道センター 生体物質設計研究グループ 062-8517 札幌市豊平区月寒東2条17丁目2-1	011-857-8919 332 h.kumeta@aist.go.jp	011-857-8983
倉島 かおり くらしま かおり	横浜市立大学大学院総合理学研究所 分子生理学研究室 230-0045 横浜市鶴見区末広町一丁目 7-29	045-508-7224 kura@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7363
栗田 順一 くりた じゅんいち	北陸先端科学技術大学院大学 新素材センター楯研究室 923-1211 石川県能美郡旭台 1-1	0761-51-0634 j-kurita@jaist.ac.jp	無
栗本 智充 くりもと ともみつ	日本電子(株) システム技術本部 第1グループ 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2235 kurimoto@jeol.co.jp	042-546-7225
黒子 弘道 くろす ひろみち	奈良女子大学大学院 人間文化研究科 630-8506 奈良市北魚屋西町	0742-27-8717 kurosu@cc.nara-wu.ac.jp	0742-27-8717
黒田 幸夫 くろだ ゆきお	ブルカー・バイオスピン株式会社 技術サービス部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 333 yk@bruker.co.jp	0298-58-0322
黒田 義弘 くろだ よしひろ	京都大学薬学研究科 製剤機能解析学分野 606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29	075-753-4530 yokuroda@pharm.kyoto-u.ac.jp	075-753-4578
黒津 卓三 くろつ たくぞう	防衛大学校 応用化学 239-8686 横須賀市走水 1-10-20	0468-41-3810 2283 kurotu@nda.ac.jp	0648-44-5501
黒野 益夫 くろの ますお	大日本製薬(株) 化学研究所 構造化学研究G 564-0053 大阪府吹田市江の木町33-94	06-6337-5898 masuo-kurono@dainippon-pharm.co.jp	06-6338-7656
桑田 一夫 くわた かずお	岐阜大学医学部 生理学第2講座 500-8705 岐阜市司町 40	058-267-2227 kuwata@cc.gifu-u.ac.jp	058-267-2962

参加者名簿

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
桑原 大介 くわはら だいすけ	分子科学研究所 分子物質開発研究センター 444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38	0564-55-7471 kuwahara@ims.ac.jp	0564-55-7448
桑原 和弘 くわはら かずひろ	理化学研究所 高分子化学研究室 351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	048-467-9404 kkuwa@postman.riken.go.jp	無
小泉 美香 こいずみ みか	食品総合研究所 分析科学部 305-8642 つくば市観音台 2-1-12	0298-38-8057 mkoizumi@nfri.affrc.go.jp	0298-38-7996
河野 俊之 こうの としゆき	三菱化学生命科学研究所 構造生物学ユニット 194-8511 東京都町田市南大谷11号	042-724-6285 tkohno@libra.ls.m-kagaku.co.jp	042-724-6296
甲野 裕之 こうの ひろゆき	ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1235 229 hk@bruker.co.jp	0298-58-0322
古布村 亮次 こむら りょうじ	京都大学大学院 理学研究科化学専攻 分子構造化学研究室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4015 ryojik@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000
小神 将 こがみ まさる	東京都立大学大学院 理学研究科化学専攻 192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1	0426-77-1111 3552 kogami@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-4873
小久保 州洋 こくぼ くにひろ	花王株式会社 構造解析センター 321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606	0285-68-7425 3044449@kastanet.kao.co.jp	0285-68-7418
越野 広雪 こしの ひろゆき	理化学研究所 分子構造解析室 351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	048-462-1111 3112 koshino@postman.riken.go.jp	048-462-4627
小柴 生造 こしば せいぞう	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造機能研究グループ 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9203 koshiba@postman.riken.go.jp	045-503-9201
児嶋 長次郎 こじま ちょうじろう	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 生体高分子構造学講座 630-0101 奈良県生駒市高山町 8916-5	0743-72-5571 kojima@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5579
小島 登貴子 こじま ときこ	埼玉県工業技術センター北部研究所 生物工学部 360-0031 埼玉県熊谷市末広2-133	048-521-0614 56 tkojima@tech-lab.pref.saitama.jp	048-525-6052
巨瀬 勝美 こせ かつみ	筑波大学 物理工学系 305-8573 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5335 kose@bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
小玉 啓文 こだま ひろふみ	中外製薬株式会社 化学研究所 412-8513 静岡県御殿場市駒門1-135	0550-87-6727 kodamahrf@chugai-pharm.co.jp	0550-87-5326
小橋川 敬博 こばしがわ よしひろ	北海道大学大学院理学研究科 生物科学専攻 060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目	011-706-2985 kob@sci.hokudai.ac.jp	011-706-2771
小林 邦子 こばやし くにこ	三菱化学生命科学研究所 構造生物学研究ユニット 194-8511 東京都町田市南大谷11号	042-724-6285 kuniko@libra.ls.m-kagaku.co.jp	042-724-6296

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
小林 俊達 こばやし としたつ	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 生体 高分子構造学講座 630-0101 奈良県生駒市高山町8916-5	0743-72-5577 t-kobaya@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5579
小森 佳彦 こもり よしひこ	産業技術総合研究所 物質プロセス研究部門物性解析グルー プ 305-8565 茨城県つくば市東1-1-1中央第5	0298-61-4515 y.komori@aist.go.jp	0298-61-4515
齋藤 剛 さいとう たけし	産業技術総合研究所計測標準研究部門 有機分析科高分子 標準研究室 305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 つくば中央5-2	0298-61-4618 takeshi.saito@aist.go.jp	0298-61-4487
斉藤 肇 さいとう はじめ	姫路工業大学 生命科学科生体物質構造学II講座 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1	0791-58-0181 saito@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182
齋藤 雅子 さいとう まさこ	理化学研究所 生体超分子構造・機能研究協力グルー プ 230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29	045-508-7224 saitoh@louise.riken.go.jp	045-508-7364
坂倉 正義 さくら まさよし	東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 113-0033 文京区本郷7-3-1	03-5841-4812 sakakura@mol.f.u-tokyo.ac.jp	03-5841-4811
坂部 一郎 さかべ いちろう	テッソ株式会社 12TMG 236-8605 神奈川県横浜市金沢区大川 5-1	045-786-5505 i.sakabe@chisso.co.jp	045-786-5515
佐久間 千勢子 さくま ちせこ	東京薬科大学 中央分析センター 192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1	0426-76-4041 sakumac@ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4041
櫻井 愛子 さくらい あいこ	シーエーシーズ株式会社横浜分析センター 有機分析グルー プ 227-0033 神奈川県横浜市青葉区鶴志田町1000番地	045-963-3166 1800929@cc.m-kagaku.co.jp	045-963-4261
佐々木 暁嗣 ささき あきつぐ	東京工業大学大学院理工学研究科 物質科学専攻 152 東京都目黒区大岡山 2-12-1	03-5734-2880 asasaki@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
佐々木 英典 ささき ひでのり	筑波大学 物理工学系巨瀬研究室 305-0821 茨城県つくば市天王台1-1-1	0298-53-5214 sasaki@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	無
佐々木 啓孝 ささき ひろたか	東京大学大学院理学系研究科化学専攻 天然物化学研究室 113-0022 東京都文京区本郷7-3-1	03-5841-4646 hsasaki@chem.s.u-tokyo.ac.jp	03-5841-8059
佐藤 一 さとう はじめ	ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1235 225 one@bruker.co.jp	0298-58-0322
佐藤 寛子 さとう ひろこ	国立情報学研究所 情報メディア研究系情報検索部門 101-8430 東京都千代田区一ツ橋2-1-2	03-4212-2579 hsatoh@nii.ac.jp	03-3556-1916
沢辺 紀子 さわべ のりこ	東京理科大学 薬学部 162-0826 東京都新宿区市ヶ谷船原町 12 番地	03-3260-6725 5050 bunkouns@ps.kagu.sut.ac.jp	03-3268-3045
塩沢 久美子 しおざわ くみこ	横浜市立大学大学院総合理学研究科 生体超分子 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7214 s-kumiko@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7361

## 参加者名簿

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
嶋田 一夫 しまだ いちお	東京大学 大学院薬学系研究科 113-0033 文京区本郷7-3-1	03-5841-4810 shimada@iw-nmr.f.u-tokyou.ac.jp	03-3815-6540
島田 裕康 しまだ ひろやす	持田製薬(株)総合研究所 合成研究室 412-8524 静岡県御殿場市神場字上ノ原722	0550-89-7881 1336 hshimada@mochida.co.jp	0550-89-0945
清水 禎 しみず ただし	物質・材料研究機構 ナノ物性研究グループ 305-0003 茨城県つくば市桜3-13	0298-59-5000 SHIMIZU.Tadashi@nims.go.jp	0298-59-5010
下池田 勇一 しもいけだ ゆういち	日本電子株式会社 応用研究センター 196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2241 yshimoik@jeol.co.jp	042-542-3132
白川 昌宏 しらかわ まさひろ	横浜市立大学大学院総合理学研究科 計測科学 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7213 shira@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7361
神藤 平三郎 しんどう へいさぶろう	東京薬科大学 薬学部 192-0392 東京都八王子市堀内1432	0426-76-4537 shindo@ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4537
杉浦 眞喜子 すぎうら まきこ	神戸薬科大学 中央分析室 658-8558 神戸市東灘区本山北町4-19-1	078-441-7591 makiko-s@kobepharma-u.ac.jp	078-441-7591
杉沢 寿志 すぎさわ ひさし	日本電子(株) 分析機器技術本部第1グループ 196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 sugisawa@jeol.co.jp	042-546-8068
鈴木 智香子 すずき ちかこ	三共株式会社 バイオメディカル研究所 研究第1グループ 140-8710 品川区広町1-2-58	03-3492-3131 3356 chikakos@shina.sankyo.co.jp	03-5436-8567
澄川 弘美 すみかわ ひろみ	社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム 生物情報解析研 究センター 135-0064 江東区青海 2-41-6	03-3599-8090 hsumikawa@jbirc.aist.go.jp	03-3599-8099
関 宏子 せき ひろこ	千葉大学 分析センター 263-8522 千葉市稲毛区弥生町1-33	043-290-3810 seki@cac.chiba-u.ac.jp	043-290-3813
関根 寿代 せきね ひさよ	大正製薬株式会社 リード探索研究室 330-8530 さいたま市吉野町1-403	048-669-3027 3139 h.sekine@po.rd.taisho.co.jp	048-652-7254
千賀 武志 せんが たけし	富士写真フイルム株式会社 足柄研究所 250-0123 神奈川県南足柄市中沼 210	0465-73-7080 takeshi_senga@fujifilm.co.jp	0465-73-7923
高瀬 茂弘 たかせ しげひろ	藤沢薬品工業株式会社 探索研究所 300-2698 茨城県つくば市東光台 5-2-3	0298-47-8611 655 shigehiro_takase@po.fujisawa.co.jp	0298-47-8313
高橋 圭子 たかはし けいこ	東京工芸大学工学部応用化学科 生物有機化学 243-0297 神奈川県厚木市飯山1583	046-242-9620 takahasi@chem.t.kougei.ac.jp	046-242-3000
高橋 栄夫 たかはし ひでお	産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター 135-0064 東京都江東区青海 2-41-6	03-3599-8112 hid@jbirc.aist.go.jp	03-3599-8099

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
高山 俊夫 たかやま としお	産業技術総合研究所つくばセンター 物質プロセス研究部門物 性解析グループ 305-8565 茨城県つくば市東1-1-1	0298-61-4515 takayama-t@aist.go.jp	0298-61-4515
高山 陽子 たかやま ようこ	塩野義製薬(株)創薬研究所 物理化学部門 553-0002 大阪市福島区鷺洲 5-12-4	06-6458-5861 5278 yohko.takayama@shionogi.co.jp	06-6458-0987
竹内 敦子 たけうち あつこ	神戸薬科大学 中央分析 658-8558 神戸市東灘区本山北町4-19-1	078-441-7592 takeuchi@kobepharma-u.ac.jp	078-441-7592
竹腰 清乃理 たけごし きよのり	京都大学大学院理学研究科 化学教室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4015 takeyan@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000
武田 寛之 たけだ かんじ	北海道大学大学院工学研究科 分子物理工学分野 060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6642 ktakeda@eng.hokudai.ac.jp	011-706-6175
田代 充 たしろ みつる	東京都立大学 理学部化学科 192-0367 八王子市南大沢1-1	0426-77-1111 3525 tashiro@nrm.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-2525
立入 直紀 たちいり なおき	筑波大学化学系 山本研究室 305-8571 茨城県つくば市天王台 1-1-1	0298-53-7370 tachiiri@dmb.chem.tsukuba.ac.jp	
辰本 将司 たつもと しょうじ	北陸先端科学技術大学院大学 遺伝子知識システム講座 923-1292 石川県能美郡辰口町旭台1-1	0761-51-1878 s-tatsu@jaist.ac.jp	0761-51-1797
楯 真一 たて しんいち	北陸先端科学技術大学院大学 新素材センター 923-1292 石川県能美郡辰口町旭台1-1	0761-51-1461 tate@jaist.ac.jp	0761-51-1455
田中 剛史 たなか たけし	三菱化学生命科学研究所 河野ユニット 194-8511 東京都町田市南大谷11号	042-724-6285 takeshi@libra.ls.m-kagaku.co.jp	042-724-6296
田中 俊之 たなか としゆき	筑波大学 応用生物化学系 305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1	0298-53-6706 ttanaka@tara.tsukuba.ac.jp	0298-53-6706
田中 彬嗣 たなか よしつぐ	九州大学薬学部 NMR 測定室 812-8582 福岡市東区馬出3-1-1	092-642-6551 y.tanaka@adm.phar.kyushu-u.ac.jp	092-642-6551
谷生 道一 たにお みちかず	姫路工業大学理学部 生命科学科生体物質構造学II 講座 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1	0791-58-0182 tanio@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182
田之倉 優 たのくら まさる	東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 113-8657 東京都文京区弥生1-1-1	03-5841-5165 amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp	03-5841-8023
田畑 祥生 たばた さちお	シーエーシーズ 横浜分析センター 227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田 1000 番地	045-963-3166 2100502@cc.m-kagaku.co.jp	045-963-4261
田宮 由香 たみや ゆか	福井大学 大学院工学研究科 910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8580 mizuno@acbio.acbio.fukui-u.ac.jp	無

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
田村 友美 たむら ともみ	ブルカー・バイオスピン株式会社 マーケティング部 532-0004 大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29テラサキ第二ビル2階	06-6394-8989 tot@bruker.co.jp	06-6394-9559
田村 充 たむら みつる	田村技術士事務所 代表 103-0007 東京都中央区日本橋浜町3-16-9-804	03-3664-6515 PFG00657@nifty.ne.jp	無
張 秋瑾 ちょう しゅうきん	東京水産大学 食品生産学科 108-8477 東京都港区港南 4-5-7	03-5463-0403 matsukaw@tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0403
趙 晨華 ちょう しんか	東京農工大学 工学部生命工学科朝倉研究室 184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16	042-388-7025 czhao@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733
辻 暁 つじ さとる	姫路工業大学 理学部 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1	0791-58-0182 tuzi@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182
辻谷 浩二 つじたに こうじ	京都大学化学研究所 材料物性基礎3 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 tsujitani@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
津田 栄 つだ さかえ	産業技術総合研究所 生物遺伝子資源研究部門 062-8517 札幌市豊平区月寒東 2 条 17 丁目 2-1	011-857-8912 sakae.tsuda@aist.go.jp	011-857-8983
堤 耀広 つみ あきひろ	北海道大学大学院工学研究科 量子物理学専攻物質物理 工学講座 060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6639 atsutsu@eng.hokudai.ac.jp	011-716-6175
堤 れい子 つみ れいこ	横浜市立大学大学院総合理学研究科 西村研究室 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番29	045-508-7216 tsutsumi@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7362
津野 慎治 つの しんじ	富士写真フイルム株式会社 富士宮研究所 418-8666 静岡県富士宮市大中里200	0544-26-7642 shinji_tsuno@fujifilm.co.jp	0544-26-7691
津野 久幸 つの ひさゆき	日本電子(株) 応用研究センター 196-8558 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2241 htsuno@jeol.co.jp	042-542-3132
津村 憲史 つむら けんじ	北海道大学大学院工学研究科 量子物理学専攻分子物理工 学分野 060-8628 札幌市北区北 13 条西 8 丁目	011-706-6642 tsumuken@eng.hokudai.ac.jp	無
出村 誠 でむら まこと	北大院理 生物科学 060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目	011-706-2771 demura@sci.hokudai.ac.jp	011-706-2771
寺尾 武彦 てらお たけひこ	京都大学大学院理学研究科 化学教室分子構造化学研究室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4011 terao@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000
堂本 竹雄 どうもと たけお	ブルカー・バイオスピン株式会社 マーケティング部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 442 td@bruker.co.jp	0298-58-0322
土江 松美 どえ まつみ	大阪市立大学理学部 物質分子系専攻 558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138	06-6605-2597 matsumi@sci.osaka-cu.ac.jp	06-6605-2597

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
徳永 達裕 とくなが たつひろ	山之内製薬株式会社 分析代謝研究所 305-8585 つくば市御幸が丘21番地	0298-54-1624 tokunaga@yamanouchi.co.jp	0298-52-9585
戸所 泰人 とどころ やすと	大阪大学蛋白質研究所 物性部門 565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2	06-8679-8598 todo@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
虎谷 秀一 とらや しゅういち	姫路工業大学 理学研究科生命科学専攻 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3丁目2番1号	045-339-4232 naito@ynu.ac.jp	045-339-4251
鳥澤 拓也 とりざわ たくや	CREST (東京都立大学理学部化学科甲斐荘研) 192-0397 八王子市南大沢 1-1	0426-77-1111 3551 torizawa@nmr.chem.metro-u.ac.jp	042677-4873
内藤 晶 ないとう あきら	横浜国立大学大学院 工学研究院 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-4232 naito@ynu.ac.jp	045-339-4251
中江 一浩 なかえ かずひろ	福井大学工学部 生物応用化学科 910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8635 myura@acbio2.acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8487
長尾 聡 ながお さとし	筑波大学化学系 山本研究室 305-8571 茨城県つくば市天王台 1-1-1	0298-53-7369 s_nagao@dmb.chem.tsukuba.ac.jp	0298-53-7369
長岡 直美 ながおか なおみ	大阪大学大学院理学研究科 化学専攻構造物理化学研究室 560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-16	06-6850-5779 naomi@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-6850-5785
永阪 文惣 ながさか ぶんそう	帝人(株) 構造解析研究所 191-8512 東京都日野市旭ヶ丘4-3-2	042-586-8121 bunsow@hino.teijin.co.jp	042-586-8123
中澤 靖元 なかざわ やすもと	東京農工大学 工学部生命工学科 184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16	042-383-7733 yasumoto@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733
中村 昭正 なかむら あきまさ	協和発酵工業(株) 医薬総合研究所 開発研究所分析代謝研 究 411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188	0559-89-2020 akimasa.nakamura@kyowa.co.jp	0559-89-2073
中村 新治 なかむら しんじ	京都大学大学院理学研究科 分子構造 606-8502 京都市左京区北白川追分町京都大学	075-753-4015 nakashin@kuchem.kyoto-u.ac.jp	0754-753-4000
仲村 高志 なかむら たかし	理化学研究所 分子構造解析室 351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	048-467-9362 nakamura@rikennmr.riken.go.jp	048-462-4627
中村 壮史 なかむら たけふみ	味の素株式会社中央研究所 分析研究部 210-8681 川崎市川崎区鈴木町1-1 KA 棟	044-210-5830 takefumi_nakamura@ajinomoto.com	044-210-5872
中村 真子 なかむら なおこ	協和発酵工業(株) 東京研究所 分析 194-8533 東京都町田市旭町3-6-6	042-725-2555 2222 naoko.nakamura@kyowa.co.jp	042-726-8330
中村 亘男 なかむら のぶお	大阪大学大学院理学研究科 化学専攻 560-0043 豊中市待兼山町 1 番 16 号	06-6850-5791 nobuo@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-6850-5785

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
仲村 尚子 なかむら ひさこ	京都大学化学研究所 材料物性 3 611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 hisako@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
名川 吉信 ながわ よしのぶ	産業技術総合研究所 界面ナノアーキテクニクス研究センター 305-8562 茨城県つくば市東1-1-1つくば中央第4	0298-61-3021 y-nagawa@aist.go.jp	0298-61-3029
新沼 さおり にいぬま さおり	北海道大学大学院薬学研究所 構造生物学分野 060-0812 北海道札幌市北区北12条西6丁目	011-706-3750 nyabe@pharm.hokudai.ac.jp	011-706-4979
西岡 英子 にしおか えいこ	参天製薬株式会社 合成グループ 533-8651 大阪府大阪市東淀川区下新庄 3-9-19	06-6321-7035 eiko.nishioka@santen.co.jp	06-6370-1651
西川 実希 にしかわ みき	神奈川大学 理学部化学科 259-1293 神奈川県平塚市土屋2946	0463-59-4111 2821 s956746@educ.info.kanagawa-u.ac.jp	無
西崎 知子 にしざき ともこ	三共株式会社 バイオメディカル研究所 研究第1グループ 140-8710 東京都品川区広町 1-2-58	03-3492-3131 3311 tomonz@shina.sankyo.co.jp	03-5436-8567
西田 琢磨 にしだ たくま	三井金属鉱業株式会社 総合研究所 362-0021 埼玉県上尾市原市 1333-2	048-775-3213 t_nishida@mitsui-kinzoku.co.jp	048-775-6373
西村 勝之 にしむら かつゆき	横浜国立大学 大学院工学研究院 240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台 79 番 5 号	045-339-4224 nishimur@ynu.ac.jp	045-339-4251
西村 卓也 にしむら たくや	京都大学化学研究所 材料物性基礎 3 611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 nishimura@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
西村 善文 にしむら よしふみ	横浜市立大学 大学院総合理学研究科 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-26	045-508-7216 nisimura@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7362
西山 裕介 にしやま ゆうすけ	分子科学研究所 相関領域研究系 分子クラスター部門 444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38 番地	0564-55-7459 nisiyama@ims.ac.jp	0564-54-2254
沼田 泰夫 ぬまた やすお	帝人(株) 構造解析研究所 191-8512 東京都日野市旭ヶ丘4-3-2	042-586-8121 y.numata@teijin.co.jp	042-586-8123
野口 滋 のぐち しげる	第一製薬株式会社 製薬技術研究所 134-8630 東京都江戸川区北葛西1-16-13	03-3680-0151 3204 noguczow@daiichipharm.co.jp	03-5696-8339
野口 泰志 のぐち やすし	味の素株式会社 栄養健康科学班 210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1	044-210-5898 yasushi_noguchi@ajinomoto.com	044-211-7609
野田 康夫 のだ やすお	関西学院大学 理学部 662-8501 兵庫県西宮市上ヶ原一番町1-155	0798-54-6230 yasuonoda@kwansei.ac.jp	0798-51-0914
野間 弘昭 のま ひろあき	産業技術総合研究所九州センター 基礎素材研究部門 841-0052 佐賀県鳥栖市宿町807-1	0942-81-3636 h-noma@aist.go.jp	0942-81-3690

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
野村 誠 のむら まこと	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 生体高分子構造学講座 630-0101 奈良県生駒市高山町8916-5	0743-72-5577 m-nomura@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5579
端 健二郎 はし けんじろう	物質・材料研究機構 ナノマテリアル研究所 ナノ物性研究グループ 305-0003 茨城県つくば市桜3-13	0298-59-5082 HASHI.Kenjiro@momokusa.nims.go.jp	0298-59-5010
橋田 広人 はした ひろと	福井大学 大学院工学研究科 910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8580 mizuno@acbio.acbio.fukui-u.ac.jp	無
橋本 征太郎 はしもと せいたろう	筑波大学理工学系 先端 NMR イメージング研究室 305-8573 茨城県つくば市天王台1-1-1	0298-53-5214 seitarou@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	無
長谷川 憲一 はせがわ けんいち	日本電子 開発本部 196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2244 hasegawa@jeol.co.jp	042-546-8068
長谷川 淳 はせがわ じゅん	第一製薬株式会社 創薬開拓研究所 134-8630 東京都江戸川区北葛西1-16-13	03-3680-0151 3466 haseg7li@daiichipharm.co.jp	03-5696-4266
蜂谷 達雄 はちたに たつお	大日本製薬株式会社 製品研究所分析研究グループ 553-0001 大阪市福島区海老江 1-5-51	06-6454-8177 tatsuo-hachitani@dainippon-pharm.co.jp	06-6458-3723
服部 峰之 はっとり みねゆき	産業技術総合研究所 光技術研究部門 305-8568 茨城県つくば市梅園 1-1-1	0298-61-5537 mhattori@ni.aist.go.jp	0298-61-5540
馬場 雄久 ばば たけひさ	北見工業大学 化学システム工学科 090-8507 北海道北見市公園町165	0157-26-9414 take@gaea.chem.kitami-it.ac.jp	0157-24-7719
浜島 斉 はまじま ひとし	三和化学研究所 創薬研究グループ 511-0406 三重県員弁郡北勢町塩崎363	0594-72-6221 363 h_hamajima@mb4.skk-net.com	0594-82-0072
濱田 季之 はまだ としゆき	理化学研究所、ゲノム科学総合研究センター 基本構造機能研究チーム 230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22 西研究棟 W103	045-503-9210 thamada@jota.gsc.riken.go.jp	045-503-9210
林 繁信 はやし しげのぶ	産業技術総合研究所 物質プロセス研究部門物性解析グループ 305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5	0298-61-4515 hayashi.s@aist.go.jp	0298-61-4515
林 文晶 はやし ふみあき	理化学研究所 たんぱく質構造・機能研究グループ 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7-22	045-503-9229 fhayashi@gsc.riken.go.jp	045-503-9228
早水 紀久子 はやみず きくこ	産業技術総合研究所 電力エネルギー研究部門 305-8565 つくば市東1-1 つくば中央第5	0298-61-6295 hayamizu.k@aist.go.jp	0298-61-6295
原 雄一 はら ゆういち	中外製薬株式会社 分析技術研究所 171-8545 東京都豊島区高田3-41-8	03-3987-5016 harayui@chugai-pharm.co.jp	03-3987-3477
原田 治幸 はらだ はるゆき	京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 分子設計学講座 606-8501 京都市左京区吉田本町	075-753-5937 haruyuki@mds.moleng.kyoto-u.ac.jp	075-751-7611

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
半沢 宏之 はんざわ ひろゆき	三共株式会社 バイオメディカル研究所 140-8710 東京都品川区広町1-2-58	03-3492-3131 3356 hiroyu@shina.sankyo.co.jp	03-5436-8567
樋岡 克哉 ひおか かつや	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 hioka@jeol.co.jp	042-546-8068
平沖 敏文 ひらおき としふみ	北海道大学工学研究科 量子物理学 060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6640 hiraoki@eng.hokudai.ac.jp	011-716-6175
廣田 洋 ひろた ひろし	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9211 hirota@gsc.riken.go.jp	045-503-9210
福井 洋之 ふくい ひろゆき	北見工業大学 化学システム工学科 090-8507 北見市公園町165	0157-26-9402 fukui@gaea.chem.kitami-it.ac.jp	0157-24-7719
福島 径 ふくしま けい	理化学研究所横浜研究所ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7-22	045-503-9205 keifuku@jota.gsc.riken.go.jp	045-503-9201
福見 俊夫 ふくみ としお	産業技術総合研究所 総括研究員 563-8577 大阪府池田市緑ヶ丘1-8-31	563-8577 To40.Fukumi@aist.go.jp	0727-51-9633
福家 一則 ふけ かずのり	京都大学化学研究所 材料物性基礎3 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 t30y5062@ip.media.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
藤田 春雄 ふじた はるお	京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻 606-8501 京都市左京区吉田本町	075-753-5643 fujita@sbchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-5917
藤原 敏道 ふじわら としみち	大阪大学タンパク質研究所 物性部門 565-0871 吹田市山田丘 3-2	06-6879-8598 tfjwr@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
藤原 久徳 ふじわら ひさのり	三共株式会社 薬剤動態研究所 140-8710 東京都品川区広町1-2-58	03-3492-3131 4153 fujijst@shina.sankyo.co.jp	無
藤原 英明 ふじわら ひであき	大阪大学医学部 医用工学講座 565-0871 吹田市山田丘1-7	06-6879-2573 fujiwara@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-6879-2573
藤原 正子 ふじわら まさこ	日本電子データム㈱ 共通技術部A1グループ 196-0022 東京都昭島市中神町1156番地	042-542-1182 masako@jeol.co.jp	042-542-4059
文野 浩一 ふみの こういち	立命館大学理工学部応用化学科 525-8577 滋賀県草津市野路東1-1-1	077-566-1111 k-fumi@mail.se.ritsumeai.ac.jp	077-561-2659
降旗 一夫 ふりはた かずお	東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 136-0086 東京都文京区弥生1-1-1	03-5841-5460 furihata@iam.u-tokyo.ac.jp	03-5841-8485
古田 浩祐 ふるた ひろすけ	杏林製薬(株)創薬研究所 創薬研究2部 329-0114 栃木県下都郡野木町野木 2399-1	0280-56-2201 303 hirosuke.furuta@mb2.kyorin-pharm.co.jp	0280-57-1293

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
逸見 光 へんみ ひかる	独立行政法人食品総合研究所 状態分析研 305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12	0298-38-8033 hemmi@nfri.affrc.go.jp	0298-38-8033
細田 和男 ほそだ かずお	独立行政法人 農業生物資源研究所 生態高分子研究グループ 超分子機能研究チーム 山崎グループ 305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2	0298-38-7072 khos@nias.affrc.go.jp	無
堀井 文敬 ほりい ふみたか	京都大学化学研究所 材料物性基礎3 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3150 horii@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
堀毛 悟史 ほりけ さとし	京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻機能化学講座 606-8501 京都市左京区吉田本町	075-753-5658 horike@molrec2.synchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4979
本多 賢吉 ほんだ まさよし	横浜市立大学総合理学研究科鶴見キャンパス 分子生理学研究室 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7224 honda@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7364
前田 史郎 まえだ しろう	福井大学 工学部生物応用化学科 910-8507 福井市文京 3-9-1	0776-27-8635 maeda@acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8747
前田 能崇 まえだ よしたか	京都大学薬学研究科 薬品機能解析学分野 606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29	075-753-4531 f60y0060@ip.media.kyoto-u.ac.jp	075-753-4578
牧 秀志 まき ひでし	神戸大学 工学部応用化学科 657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1	078-803-6187 maki@cx.kobe-u.ac.jp	078-803-7643
増井 大二 ますい ひろつぐ	科学技術振興事業団 さきがけ研究21 563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31	0727-51-9648 masui-hiro@aist.go.jp	0727-51-9627
益田 晶子 ますだ あきこ	理化学研究所 ビーム分配技術開発室 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1	048-467-8000 aki@postman.riken.go.jp	048-432-4668
増田 憲二 ますだ けんじ	京都大学化学研究所 材料物性 3 611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 masuda@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
増田 容子 ますだ ようこ	福井大学 大学院工学研究科 910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8580 mizuno@acbio.acbio.fukui-u.ac.jp	無
益富 豊 ますとみ ゆたか	日本新薬㈱ 構造合成研究G 305-0003 茨城県つくば市桜3-14-1	0298-50-6241 y.masutomi@po.nippon-shinyaku.co.jp	0298-50-6217
町田 洋一郎 まちだ よういちろう	住友化学工業株式会社 筑波研究所 物性科学グループ 300-3294 茨城県つくば市北原6番	0298-64-4182 3104 machiday@sc.sumitomo-chem.co.jp	0298-64-4746
松浦 久恵 まつうら ひさえ	東京薬科大学 生命科学部 192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1	0426-76-7153 s977098@educ.ls.toyaku.ac.jp	0426-76-7157
松川 真吾 まつかわ しんご	東京水産大学 食品生産学科 108-8477 東京都港区港南 4-5-7	03-5463-0403 matsukaw@tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0403

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
松木 陽 まつき よう	大阪大学蛋白質研究所 物性部門 565-0871 大阪府吹田市山田丘3番2号	06-6879-8598 yoh@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
松田 裕生 まつだ ひろのり	帝人(株) 構造解析研究所 191-8512 東京都日野市旭ヶ丘4-3-2	042-586-8121 h.matsuda@teijin.co.jp	042-586-8123
松田 善正 まつだ よしまさ	筑波大学 物理工学系巨瀬研究室 305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1	0298-53-5214 matsuda@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
松林 伸幸 まつばやし のぶゆき	京都大学化学研究所 界面物性部門 I 611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0774-38-3073 nobuyuki@scl.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3076
松原 康史 まつばら こうし	シーエーシーズ株式会社 横浜分析センター 有機分析グループ 227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地	045-963-3166 3709437@cc.m-kagaku.co.jp	045-963-4261
三浦 和紀 みうら かずのり	富山医科薬科大学薬学部 構造生物学研究室 930-0194 富山県富山市杉谷 2630	076-434-5061 kmiura@ms.toyama-mpu.ac.jp	076-434-5061
三島 正規 みしま まさき	横浜市立大学総合理学研究科 計測科学 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7215 misima@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7361
水野 和子 みずの かずこ	福井大学機器分析センター 利用相談室 910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8580 mizuno@acbio.acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8222
水野 敬 みずの たかし	京都大学大学院理学研究科 化学教室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4015 mizuno@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000
水野 元博 みずの もとひろ	金沢大学理学部 化学科理論化学研究分野 920-1192 金沢市角間町	076-264-5686 mizuno@wiron1.s.kanazawa-u.ac.jp	076-264-5742
溝上 潤 みぞかみ じゅん	京都大学大学院理学研究科化学専攻 分子構造化学研究室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4015 mizokami@kuchem.kyoto-u.ac.jp	無
三森 文行 みつもり ふみゆき	国立環境研究所 生体機能評価 305-0053 茨城県つくば市小野川16-2	0298-50-2352 mitumori@nies.go.jp	0298-50-2880
皆川 和久 みなかわ かずひさ	筑波大学化学系 山本研究室 305-8571 茨城県つくば市天王台 1-1-1	0298-53-7369 minawaku.dmb.chem.tsukuba.ac.jp	0298-53-7369
皆川 美由紀 みながわ みゆき	(株) 科学技術研究所分析部 305-8571 京都品川区北品川3-10-2	03-3474-6662 minagawa@ist.sankyo.co.jp	03-3474-6662
宮ノ入 洋平 みやのいり ようへい	横浜国立大学大学院 化学生命大講座 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5	045-339-4271 m00db143@ynu.ac.jp	045-339-4264
宮部 亮 みやべりょう	物質・材料研究機構 ナノマテリアル研究所 ナノ物性研究グループ 305-0003 茨城県つくば市桜3-13	0298-59-5048 MIYABE.Ryo@nims.go.jp	0298-59-5010

## 参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
宮本 和英 みやもと かずひで	京都大学大学院薬学研究科 薬品機能解析学分野 606-8501 京都市左京区吉田下阿達町46-29	075-753-4531 kazuhide@scl.kyoto-u.ac.jp	075-753-4578
三好 利一 みやよし としかず	産業総合技術研究所 高分子基盤技術センター 高次構造制御チーム 305-8565 つくば市東 1-1-1	0298-61-6283 t-miyoshi@aist.go.jp	無
村上 美和 むらかみ みわ	京都大学化学研究所 材料物性基礎3 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 murakami@moimat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
村林 美香 むらばやし みか	武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 医薬品化学第一研究所 532-8686 大阪市淀川区十三本町2-17-85	06-6300-6618 Murabayashi_Mika@takeda.co.jp	06-6300-6086
飯塚 舜介 めしつか しゅんすけ	鳥取大学医学部医学科 医療環境学 683-8503 米子市西町86	0859-34-8286 mesh@grape.med.tottori-u.ac.jp	0859-34-8068
森 慎一郎 もり しんいちろう	大阪大学保健学科 医用工学講座藤原研究室 565-0871 吹田市山田丘 1-7	06-6879-2577 shinshin@zd5.so-net.ne.jp	06-6879-2577
森 貴志 もり たかし	福井大学工学部 生物応用化学科 910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8635 s270643@icpc00.icpc.fukui-u.ac.jp	0776-27-8487
森 輝雄 もり てるお	シーエーシーズ(株)水島分析センター 有機分析グループ 712-8054 岡山県倉敷市潮通 3-10	086-457-2630 3707337@cc.m-kagaku.co.jp	086-457-2631
森山 祥彦 もりやま よしひこ	京都府立医科大学 化学教室 603-8334 京都市北区大將軍西鷹司町13	075-465-7659 moriyama@koto.kpu-m.ac.jp	075-465-7651
八木 宏昌 やぎ ひろまさ	大阪大学 蛋白質研究所 565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2	06-6879-8598 hyagi@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
八島 秀仁 やしま ひでひと	ブルカー・バイオスピン株式会社 マーケティング部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 442 yas@bruker.co.jp	0298-58-0322
安田 聡子 やすだ さとこ	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9203 sn@jota.gsc.riken.go.jp	045-503-9201
山口 芳樹 やまぐち よしき	名古屋市立大学大学院薬学研究科 生命分子構造学研究室 467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1	052-836-3449 yyoshiki@phar.nagoya-cu.ac.jp	052-836-3450
山田 英二 やまだ えいじ	北海道大学工学部 NMR研究室 060-8628 札幌市北区北13西8	011-706-6795 eiya@eng.hokudai.ac.jp	011-757-1981
山田 周作 やまだ しゅうさく	京都大学化学研究所 材料物性 3 611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 shusaku@104.net	0774-38-3148
山根 努 やまね つとむ	東京農工大学工学部 生命工学科 184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16	042-388-7025 tyamane@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
山根 祐治 やまね ゆうじ	東京工業大学大学院 理工学研究科 物質科学専攻 152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2880 yyamane@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
山延 健 やまのべ たけし	群馬大学工学部 材料工学科 376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1	0277-30-1331 yamano@eng.gunma-u.ac.jp	0277-30-1333
山本 昭彦 やまもと あきひこ	ブルカー・バイオスピニング株式会社 技術サービス部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1236 338 ay@bruker.co.jp	0298-58-0322
山本 泰彦 やまもと やすひこ	筑波大学 化学系 305-8571 つくば市天王台 1-1-1	0298-53-6521 yamamoto@staff.chem.tsukuba.ac.jp	0298-53-6521
湯本 史明 ゆもと ふみあき	東京大学農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 田之倉研 113-8657 文京区弥生1-1-1 東京大学農学部2号館別館263室	03-5841-5166 aa07045@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp	03-5841-8023
横川 昭徳 よこがわ あきのり	北海道大学大学院 工学研究科量子物理工学専攻 060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6642 akino@eng.hokudai.ac.jp	011-706-6175
横田 達夫 よこた たつお	神戸大学大学院 自然科学研究科 657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1	078-803-6187 011t567n@y01.kobe-u.ac.jp	078-803-7643
横地 政志 よこち まさし	北海道大学薬学部 構造生物学分野 060-0812 札幌市北区北12条西6丁目	011-706-3976 yokochi@pharm.hokudai.ac.jp	011-706-4979
横山 茂之 よこやま しげゆき	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9196 yokoyama@biochem.s.u-tokyo.ac.jp	045-503-9195
吉岡 澄江 よしおか すみえ	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1	03-3700-1141 227 yoshioka@nihs.go.jp	03-3707-6950
吉田 卓也 よしだ たくや	大阪大学大学院薬学研究科 高分子化学分野 565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6	06-6879-8222 yo@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8221
好田 真由美 よしだ まゆみ	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9229 myoshida@gsc.riken.go.jp	045-503-9228
吉永 壮佐 よしなが そうすけ	北海道大学大学院薬学研究科 構造生物学分野 060-0812 札幌市北区北12条西6丁目	011-706-3976 sosuke@pharm.hokudai.ac.jp	011-706-4979
吉益 雅俊 よしまさ まさとし	理化学研究所 遺伝生化学研究室 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7224 yosimasu@louise.riken.go.jp	045-508-7364
吉水 広明 よしみず ひろあき	名古屋工業大学工学部 材料工学科有機材料コース 466-8555 名古屋市昭和区御器所町	052-735-5272 yosimizu@mse.nitech.ac.jp	052-735-5272
李 華 り か	理化学研究所横浜研究所ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9202 lihua@gsc.riken.go.jp	045-503-9228

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	Tel e-mail	Fax
若松 馨 わかまつ かおり	群馬大学工学部 生物化学工学科 376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1	0277-30-1439 wakamats@bce.gunma-u.ac.jp	0277-30-1439
和田 武 わだ たけし	ブルカー・バイオスピン株式会社 マーケティング部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 442 wad@bruker.co.jp	0298-58-0322
渡邊 永治 わたなべ えいじ	立教大学 理学部化学科 秋山研究室 171-8501 東京都豊島区西池袋3-34-1	03-3985-2368 eiji-jun@umin.ac.jp	無
渡部 徳子 わたなべ とくに	東京水産大学 食品生産学科 108-8477 東京都港区港南 4-5-7	03-5463-0403 tokuko@tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0643

(2001年10月21日までの予約登録分)