第59回 NMR 討論会 (2020)

The 59th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2020)

講演要旨集 Abstracts

会期: 2020年11月17日(火)~19日(木)

会 場: G メッセ群馬

〒370-0044 群馬県高崎市岩押町 12 番 24 号

主 催:日本核磁気共鳴学会

第 59 回NMR討論会(2020)プログラム委員会

若松 馨 (群馬大学) [委員長] 林 史夫 (群馬大学) 行木 信一 (群馬大学) 細田 和男 (群馬大学) 寺脇 慎一 (群馬大学) 栃尾 尚哉 (理化学研究所) 西村 千秋 (帝京平成大学) 山口 秀幸 (味の素株式会社) 楠 英樹 (国立感染研研究所)

会場(G メッセ群馬)への交通案内





会場の案内



高崎駅からお越しの方は こちらのエントランスロビーより入場ください

ポスター・展示会場詳細図



- 株式会社 シゲミ
- ② 株式会社バイオネット研究所
- ③ 日本電子株式会社
- ④ 株式会社エルエイシステムズ
- ⑤ 大陽日酸株式会社

- ⑥ 株式会社リアクト
- ⑦ ブルカージャパン株式会社
- ⑧ 株式会社エムアールテクノロジー
- ⑨ 昭光サイエンス株式会社

討論会日程表



◆受付

Gメッセ群馬2Fメインホール前に設けます。

◆受付時間

- 11月17日(木) 8:30~17:00
- 11月18日(金) 8:30~17:00
- 11月19日(土) 8:30~16:00
- ◆事前参加登録済みの方

事前登録ならびに参加費の支払をお済ませの方は、事前に参加証をお送りしております。当日は必ず参 加証を持参ください。

参加証についている、「要旨集引換証」を切取り、事前参加受付にて要旨集と引き換えをしてください。 併せて、参加証についている「参加申告書(参加日ごと)」に体温を記入の上、受付に用意する「参加受 付ボックス」へ切り取って入れてください。

会場内では、参加証(名札)をご着用ください。

参加証のない方の入場は固くお断りします。

◆当日参加登録の方

当日参加登録をされる方は、受付前に置かれた当日参加登録用紙にご記入の上、参加費を添えて受付デ スクにお越しください。参加費のお支払いは現金のみとなります。

当日参加:	一般・会員	4,000円
	一般・非会員	13,000 円
	学生・会員	2,000 円
	学生・非会員	7,000円

引換にお渡しする参加証は、会場内では、参加証(名札)をご着用ください。大会会場内では必ず着用 してください。

翌日以降参加される場合には、参加証についている「参加申告書(参加日ごと)」に体温を記入の上、参 加日当日、受付に用意する「参加受付ボックス」へ切り取って入れてください。

◆懇親会

新型コロナウイルス感染症対策を鑑み、全体懇親会は中止となりました。

◆領収証の発行

参加証に添付されている領収証をお使いください。それ以外の領収書が必要な方は、参加証および参加 証に添付されている領収証を持参して受付デスクへお越しください。

◆講演要旨集

講演要旨集は日本核磁気共鳴学会会員ならびに非会員の事前登録者にお渡しいたします。 残部がある場合に限り、一冊につき 5,000 円で受付にて当日販売いたします。 ◆学会費の支払いと入会手続き

日本核磁気共鳴学会の本年度の学会費を未納の場合は、受付に設置する日本核磁気共鳴学会の受付でお 支払ください。

また、日本核磁気共鳴学会への入会も受け付けます。

日本核磁気共鳴学会の受付は2日目(11/18)のみとなります。

◆会場内のサービス・施設

・参加会場

参加会場内では密にならないように運営を行うため、椅子を入口に用意いたしますので、参加者ご自 身にて着席場所を確保いただきます。一人当たり2脚お持ちいただき、1脚は荷物置きとしてご利用 下さい。また、会期中は同じ椅子をご利用下さい(感染防止のため)。

・クローク

クロークは設置いたしません。セッション会場内にてご自身にて管理ください。

・インターネット

会場内でご利用いただけるインターネット接続サービスを用意いたします。

・呼び出し

会場内での呼び出しは、緊急の場合を除き、原則行いません。

◆禁止事項

飲食・喫煙

喫煙は1階エントランスを出た所にある喫煙所をご利用ください。そこ以外は禁煙となります。 会場内でのご飲食は可能です。

・携帯電話

口頭発表会場内での携帯電話による通話を禁止します。口頭発表会場内では、電源をオフにするかマ ナーモードに設定して、呼び出し音がならないようにお願いいたします。

◆ 2020 年度日本核磁気共鳴学会通常総会 今年度はオンラインで開催する予定ですので、討論会中には開催いたしません。

◆理事会・評議員会のご案内 理事会:討論会中には開催いたしません。 評議員会:11月17日の18時20分から開催いたします。

※食事の用意はございません。

- ◆第 59 回 NMR 討論会についてのお問い合わせ
 - ・会期中

Gメッセ群馬 〒 370-0044 群馬県高崎市岩押町 12番 24号 代表電話番号 027-322-2100 会期中の連絡先 070-5557-2239

・会期外

株式会社 klar(クラール) 〒 371-0805 群馬県前橋市南町 2-65-1 TEL:027-260-9525 FAX:027-260-9322 E-mail:nmr2020@klar.co.jp

座長・発表者へのご案内

座長の方へ

◆受付

座長の方は、担当時間の10分前までに、ホールA(一番奥)内の「座長席」(休憩を挟まない場合は 「次座長席」)までお越しください。

◆進行

進行は座長へ一任いたします。例年、終了時間が延びる傾向にあり、セッション終了後の予定に影響 が出ることが懸念されます。討論会日程の円滑な進行のために、ご担当されるセッションの予定通り の終了にご協力いただきますようお願いいたします。

講演者の方へ

◆講演方法

液晶プロジェクターを用いたプレゼンテーションのみとなります。

講演に使用するコンピュータは各自で持参してください。

なお、音声出力には対応しておりません。

バッテリー切れに備えて必ず電源アダプターを持参してください。

プロジェクターとの接続は HDMI もしくは VGA (D-sub) になっております。

一部のノートパソコン(特に Mac)では専用の出力ケーブルが必要になりますので、必ず持参してくだ さい。

バックアップ用として、発表データを USB メモリもしくは CD-ROM 等で持参してください。

◆講演の受付

講演前の休憩時間までに、講演会場内の「PC 受付」に講演に使用するコンピュータを持参してください。 なお、スリープモードやスクリーンセーバーの設定は解除してください。講演前の休憩時間を利用して、 動作確認の試写をおこなうことができます。

ご希望の方はお早めに会場までお越しください。

◆講演時間

持ち時間は、特別講演90分、進歩賞講演35分、一般演題20分です。時間経過はベルでお知らせしますが、 そのタイミングは以下のとおりです。持ち時間内での終了にご協力いただきますようお願いいたします。

	一鈴	二鈴(発表終了)	三鈴(質疑終了)
特別講演	70 分	80分	90分
進歩賞講演	25 分	30分	35 分
一般演題	14分	17分	20分

ポスター発表の方へ

◆作成要領

ポスター作成の使用言語は英語あるいは日本語とします。ただし、日本語で作成された場合には、図 の説明文には英語を用い、タイトル・名前・所属については英語も併記してください。また、発表者 の氏名は、左に〇印を付けるなどして明示してください。文字や図の大きさ、行間については、やや 離れた距離からでも判別できるように配慮をお願いいたします。

ポスターを貼付スペースのサイズは、1 題あたり縦 210cm ×横 90cm となっており、このサイズの 範囲で自由に作成していただいて結構です。

ただし貼付の際には(見やすさのために)床から 30cm 程度のスペースの確保を心掛けていただくよ うにお願いします。左上隅の約 20cm 四方のスペースに演題番号を表示してあります。 画鋲は各ポスターパネルに用意します。

◆展示場所

ポスター会場はメインホール内となります。

パネル左上隅に表示された演題番号をご確認の上、貼付・展示をお願いいたします。

◆掲示期間

会期中はポスターの張り替えを行いません。

全ての発表ポスターは 11 月 17 日(火)12:00 ~ 14:00 の間に掲示し、11 月 19 日(木)11:30 ~ 12:30 の間に取り外してください。

ポスター撤去時刻を過ぎても取り外されないポスターは事務局で撤去します。

◆ポスター発表時間

ポスター番号が偶数番号(P2, P4, …)の方は、11 月 17 日(火)14:00 ~ 15:30 の間にポスター討 論をおこなってください。

奇数番号 (P1, P3, …)の方は、11 月 19 日 (木) 10:00 ~ 11:30 にポスター討論をおこなってください。 若手ポスター賞対象のポスター(偶数の数字の後に "Y" が付加されている)も非対象のポスターと一 緒に 11 月 17 日 (火) 14:00 ~ 15:30 の間に討論してください。

また、発表者はポスターボードに備え付けられたリボンを付けて発表してください。

◆若手ポスター賞の発表と表彰

11月18日(水)の特別講演の後に行う予定です。

第 59 回 NMR 討論会(2020)

The 59th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2020)

会期:2020年11月17日(火)~11月19日(木) 会場:Gメッセ群馬 メインホール 〒370-0044 群馬県高崎市岩押町12番24号

1日目 11月17日 (火)

12:50~13:00 開会式

第 59 回 NMR 討論会(2020) 世話人 若松 馨(群馬大学)

13:00~14:00 一般演題1「溶液-1」

座長:池上貴久(横浜市立大学)

1L1 核緩和機構最適化安定同位体標識法を利用した高分子量蛋白質の動態構造解析

 ○宮ノ入洋平^{1、2},武田光広³,寺内勉^{4,5,6},甲斐荘正恒²
 1 大阪大学蛋白質研究所,2名古屋大学大学院理学研究科,3熊本大学大学院生命科学研究部, 4 東京都立大学大学院理学研究科,5 SAIL テクノロジーズ株式会社,6大陽日酸株式会社

1L2 NMR studies on the protonation state of cyanobacteriochrome

○三島正規 東京都立大学,理学研究科

1L3 ¹⁵N 直接検出 NMR 法による製剤・保存条件におけるモノクローナル抗体の非破壊的観測 ○徳永裕二^{1,2},竹内恒¹,奥出順也³,小里一友³,鳥澤拓也³,嶋田一夫^{1,4} 1 産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門,2バイオ産業情報化コンソーシアム,3中 外製薬株式会社,4理化学研究所・生命機能科学研究センター

14:00~15:30 ポスター1 (偶数)

15:30~16:30 一般演題2「DNP-1」

座長:西山裕介(株式会社 JEOL RESONANCE)

1L4 室温下でのダイヤモンド中 NV 中心とペンタセンによる¹³C pulsed-DNP

○宮西孝一郎¹, Takuya F. Segawa^{2,3}, 大木出⁴, 小野田忍⁵, 大島武⁵, 阿部浩之⁵, 高島秀 聡³, 竹内繁樹³, 武田和行⁶, Frederick T.-K. So^{3,4,5}, 寺田大紀^{3,5}, 五十嵐龍治^{5,8}, 香川晃徳^{1,7,8}, 北川勝浩^{1,7}, 水落憲和⁴, 白川昌宏^{3,5}, 根来誠^{5,7} 1 大阪大学大学院,2 Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Switzerland, 3 京都大学大学院工学研究科,4 京都大学化学研究所,5 量子科学技術研究開発機構 (QST), 6 京都大学大学院理学研究科,7 大阪大学先導的学際研究機構量子情報・量子生命研究セ ンター,8 JST さきがけ

1L5 分極剤濃度が高磁場 DNP 効率に与える影響のスピン拡散と緩和を考慮した高速定量的 シミュレーションによる評価

○深澤隼,藤原敏道,松木陽大阪大学蛋白質研究所

1L6 高磁場・極低温 MAS-DNP 法の新発展とその応用

○松木 陽^{1,2}, 杉下友晃¹, 高橋大樹³, 保母史郎³, 末松浩人³, 藤原敏道^{1,2} 1 大阪大学蛋白質研究所, 2 大阪大学先導的学際研究機構, 3 株式会社 JEOL RESONANCE

16:40~18:10 歴史解説

NMR を創った人たち:第1話 夜明け前 2,Rabi の分子線 NMR の成功と Gortpr の凝縮系 NMR の 失敗

寺尾武彦 (京都大学名誉教授)

2日目 11月18日 (水)

9:20~10:20 一般演題3「固体」

座長:石井佳誉(東京工業大学)

- 2L1 Nuclear Surface Acoustic Resonance with Spin-Rotation Coupling
 〇武田和行¹, 宇佐見康二²
 1 京都大学 大学院理学研究科 化学専攻, 2 東京大学 先端科学技術研究センター
- **2L2** Probing local ¹H spin network of rigid solids through ¹H SQ, DQ and TQ coherences
 ○西山裕介^{1,2}
 1 理研 -JEOL 連携センター, 2 株式会社 JEOL RESONANCE
- 2L3 高温 NMR によるフッ化物イオン伝導体の焼成過程のその場観測 ○村上美和 京都大学産官学連携本部

10:40~12:00 一般演題4「溶液-2」

座長:木川隆則(理化学研究所)

 2L4 固体 NMR による内向きプロトンポンプロドプシン Schizorhodopsin のレチナール結合 サイトの構造解析
 ○但馬聖也¹,神取秀樹²,井上 圭一³,川村出¹
 1 横浜国立大学 大学院理工学府,2 名古屋工業大学,3 東京大学

2L5 パルス磁場勾配 NMR によるコーヒー粕由来脂質成分の自己拡散係数測定
 ○金井典子¹,川村出¹,William S. Price²
 1 横浜国立大学大学院 理工学府, 2 Nanoscale Group, Western Sydney University, NSW, Australia

2L6 好冷性細菌 Anabaena variabilis 由来のグリシンリッチ ドメインを持たない RNA 結合タン パク質 RbpD の溶液構造の特徴

○森田勇人¹,田中邑樹¹,古板恭子²,杉木俊彦²,児嶋長次郎^{2,3} 1 城西大学 大学院理学研究科,2 大阪大学 蛋白質研究所,3 横浜国立大学 大学院工学研究 院

2L7 高速・高精度な MagRO による NMR 構造解析の完全自動化

○小林直宏¹,杉木俊彦²,南慎太朗³,佐久間航也^{3,5},長島敏雄¹,児嶋長次郎⁴,藤原敏道²,小杉貴洋³,古賀理恵³,古賀信康^{3,5},山崎俊夫¹
 1 理化学研究所 放射光科学研究センター,2 大阪大学 蛋白質研究所,3 自然科学研究機構
 生命創成探求センター,4 横浜国立大学大学院工学研究院,5 総合研究大学院大学

(Lunch)

13:00~13:30 企業発表

座長:出村誠(北海道大学)

13:40~14:20 進歩賞1

座長:藤原敏道(大阪大学蛋白質研究所)

高磁場・極低温 DNP 用装置、方法論の開発と応用

松木陽(大阪大学蛋白質研究所)

14:20~15:00 進歩賞2

座長:山本泰彦(筑波大学)

NMR による動的構造生物学の推進と創薬への応用

竹内恒(産業技術総合研究所細胞分子工学研究部門)

15:10~16:40 特別講演

座長:甲斐荘正恒(東京都立大学)

「*in situ* 動的構造」からみたタンパク質の機能解明 嶋田一夫(理化学研究所)

16:40~16:55 若手ポスター賞表彰式

16:55~17:00 次回世話人挨拶

片平正人 (京都大学)

3日目 11月19日(木)

9:00~10:00 一般演題5「溶液-2」

究院

座長:坂本泰一(千葉工業大学)

- 3L1 機能性長鎖ノンコーディング RNA SINEUP 機能ドメインの 2 次構造決定
 〇大山貴子¹,高橋葉月²,山崎俊夫¹,Piero Carninci²,石井佳誉^{1,3}
 1 理研放射光科学研究センター,2 理研生命医科学研究センター,3 東京工業大学 生命理工 学院
- 3L2 ヒト脂質輸送蛋白質 CERT がクラミジア封入体の膜蛋白質 IncD にハイジャックされる分子
 機序の溶液 NMR 解析
 〇杉木俊彦¹,熊谷圭悟²,新家粧子¹,小林直宏¹,藤原敏道¹,花田賢太郎²,児嶋長次郎^{1,3}
 1 大阪大学 蛋白質研究所,2国立感染症研究所 細胞化学部,3横浜国立大学大学院 工学研

3L3 小胞体膜貫通タンパク質 VAP のペプチド認識機構の研究

○古板恭子¹,平岡万里菜²,藤原敏道¹,児嶋長次郎¹² 1大阪大学蛋白質研究所,2横浜国立大学大学院理工学府

10:00~11:30 ポスター2(奇数)

(Lunch) ポスター撤去

12:30~13:50 一般演題6「DNP-2 他」

座長:松木陽(大阪大学蛋白質研究所)

3L4 固体 DNP-NMR による CdSe クラスター表面の構造解析

○野田泰斗¹, 栗原拓也^{1,2}, 鈴木克明³, 村田翔¹, 梶弘典³, 竹腰清乃理¹ 1 京都大学 大学院 理学研究科, 2 金沢大学 理工学域 物質科学類, 3 京都大学 化学研究所

3L5 固体 DNP-NMR による高分子担持触媒の構造解析

○田中真司,小川敦子,中島裕美子,佐藤一彦 産業技術総合研究所触媒化学融合研究センター

3L6 表面増強 NMR 分光法による低 y 四極子核の観測

○永島裕樹¹, Julien Trébosc^{2,3}, 今喜裕¹, 佐藤一彦¹, Olivier, Lafon^{2,4}, Jean-Paul Amoureux^{2,5,6}

1 産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター,2 リール大学, CNRS, Central Lille, Univ. Artois, UMR 8181, UCCS,3 リール大学, CNRS-2638, Fédération Chevreul,4 Institut Universitaire de France,5 ブルカーバイオスピン,6 理研 NMR 研究開発部門

3L7 Understanding of the quadrupolar interaction between solid-state NMR and NQR

🔾 Kazuhiko Yamada

Multidisciplinary Sciences Cluster, Research and Education Faculty,in charge of Science Research Center, Kochi University

14:00~15:00 一般演題7「溶液-3」

座長:児嶋長次郎(横浜国立大学)

3L8 四重鎖 DNA とフタロシアニン誘導体の複合体の解析

内山真見¹, 岡本千奈¹, 百武篤也¹, 〇山本泰彦¹², 池上崇久³ 1 筑波大学 大学院数理物質科学研究科 化学専攻, 2 筑波大学 エネルギー物質科学研究セン ター (TREMS), 3 島根大学 大学院自然科学研究科 環境システム科学専攻

3L9 高圧力 NMR で観るタンパク質の変性

○北原亮¹, Xue Mengjun², 若本拓朗³, Mulder Frans⁴ 1 立命館大学薬学部, 2 シントン大学化学, 3 立命館大学大学院生命科学研究科, 4 オーフ ス大学 iNANO

3L10 細胞内移行性を決める Ras 阻害環状ペプチドの構造的柔軟性

○竹内恒¹, 今井美咲², 徳永裕二¹, 藤崎美和², 鴨志田一², 滝沢 剛³, 半沢宏之³, 嶋田一夫⁴
 1 産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門, 2バイオ産業情報化コンソーシアム, 3 第
 一三共 RD ノバーレ, 4 理化学研究所

15:00~15:05 閉会式

ポスター発表

P1 固体 NMR を用いた Aβ(1-42) 線維への EGCG 添加による構造変化の検出 藤田健太郎¹,松田勇¹,石井佳誉^{1,2} 1 東東京工業大学 生命理工学院,2 理化学研究所 放射光科学研究センター NMR 研究開発部門

- P2Y 固体 ¹³C NMR 法とX線回析によるジブロモアントラセン類の結晶構造と運動性の関係
 ○三影昇平,神谷奈津美,小泉俊雄,浅野敦志
 1 防衛大学校・応用化学科
- P3 カルモジュリン融合タンパク質システムを使用した安定同位体標識セクロピン P1 の大量発現と NMR 構造解析

 ○谷昊¹,加藤貴純¹,石田博昭²,熊木康裕¹,塚本卓¹³,菊川峰志^{1,3},出村誠^{1,3}, Vogel Hans J.², 相沢智康^{1,3}
 1 北海道大学大学院生命科学院,2カルガリー大学生命科学学科,3北海道大学国際連携研究教育局

P4 Alpha-synuclein Aggregation Kinetics and Structural Insight in the Presence of β-amyloid Fibrils

Zixuan Wei¹, Tatsuya Matsunaga², Yoshiki Shigemitsu¹, Yoshitaka Ishii^{1,2}
 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2 NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center

P5 重原子水和物の希釈濃縮シフトに関する相対論的量子化学計算

○朝倉由光,中川直哉,桑原大介 電気通信大学大学院 情報理工学研究科

P6Y トリプレット DNP による p- ターフェニル擬単結晶の高偏極化

○森下裕貴¹, 久住亮介², 宮西孝一郎¹, 武田和行³, 根来誠⁴, 香川晃徳^{1,4,5}, 北川勝浩^{1,4}
 1 大阪大学大学院 基礎工学研究科, 2 京都大学大学院 農学研究科, 3 京都大学大学院 理学研究科,
 4 大阪大学先導的学際研究機構量子情報・量子生命研究センター, 5 JST さきがけ

P7 ¹H-¹⁹F 間の HOE (Heteronuclear Overhauser Effect) を利用したスピロ環の立体化学決定
 ○森田将夫¹,根本暢明²,大森建³
 1 公益財団法人 乙卯研究所,2(株) JEOL RESONANCE,3東京工業大学 理学院化学系

P8 固体 NMR によるプロトン伝導性アルギン酸 - ポリアクリル酸 - トリアゾール複合体の解析 ○渡邉陵太¹, 栗原拓也¹, 重田泰宏², 雨森翔悟², 井田朋智¹, 水野元博^{1,2}

1 金沢大学大学院自然科学研究科, 2 金沢大学ナノマテリアル研究所

P9 Rab32のNMR による解析

○鈴木拓巳,田島佳寿,川原裕之,伊藤隆,三島正規 東京都立大学・大学院・理学研究科

- P10Y
 アミロイド化傾向を有するタンパク質・ペプチドの凝集防止

 ○黒川優香¹,葛貫絵梨奈¹,日比健人¹,河野俊之²,寺脇慎一¹,若松馨¹

 1 群馬大学大学院 理工学府,2 北里大学大学院 医療系研究科
- P11 NMR を用いた液体金属中のナノ粒子分散・凝集状態評価法
 ○鄭智海¹, 大高雅彦¹, 桑原大介²
 1 日本原子力研究開発機構 高速炉サイクル研究開発センター 高速炉基盤技術開発部 ナトリウム機
 器技術開発 Gr, 2 電気通信大学 研究設備センター
- P12 生体内反応による核スピン量子もつれ生成の検証に向けた極低温溶解 DNP 装置開発
 ○香川晃徳^{1,2,3}, 土井徹¹, 根来誠², 北川勝浩^{1,2}
 1 大阪大学大学院基礎工学研究科, 2 大阪大学先導的学際研究機構 量子情報・量子生命研究セン

1 大阪大学大学院基礎工学研究科, 2 大阪大学先導的学際研究機構 量子情報・量子生命研究センター, 3JST さきがけ

- P13 オペランド NMR を用いた FeF₃ 正極の容量劣化要因の解明
 ○下田景士¹, 鹿野昌弘², 村上美和¹, 栄部比夏里²
 1 京都大 産官学連携本部、2 産総研 関西センター
- P14Y 光受容タンパク質 GAF ドメインにおける発色団のプロトン化状態の解析
 ○小泉太貴¹, 会津貴大¹, 宮ノ入洋平², 伊藤隆¹, 広瀬侑³, 三島正規¹
 1 東京都立大学大学院 理学研究科, 2 大阪大学 蛋白質研究所, 3 豊橋技術科学大学大学院 工学研究
 科
- P15 DIRECTION-HSQC 法による
 (株)東ソー分析センター
- P16 HIV Vif 5 者複合体は APOBEC3G と APOBEC3F の脱アミノ化を阻害する
 ○神庭圭佑¹,万里^{1,2},雲財悟³,森下了⁴,永田崇^{1,2},片平正人^{1,2}
 1 京都大学・エネルギー理工学研究所,2 京都大学・エネルギー科学研究科,3 法政大学・生命科学部,4 セルフリーサイエンス(株)
- P17 魚類の分析データサイエンスによるサケ科の特徴抽出及び可視化
 ○村田泉¹,魏菲菲²,坂田研二²,菊地淳^{1,2,3}
 1 横市院・生命医,2 理研 CSRS,3 名大院・生命農

- P18Y パルス磁場勾配 NMR によるコーヒー粕由来脂質成分の自己拡散係数測定
 ○金井典子¹,川村出¹, William S. Price²
 1. 横浜国立大学大学院 理工学府, 2. Nanoscale Group, Western Sydney University, NSW, Australia
- P19 NMR データサイエンスに基づく生分解性プラスチックの分解要因解析
 ○山脇涼¹,坪井裕理²,鄭章代²,伊藤研悟^{1,2},菊地淳^{1,2,3}
 1 横市院 生命医,2 理研 環境資源,3 名大院 生命農
- P20Y HIV-1 ゲノム RNA の 5' 末端の違いが構造と機能に与える影響
 ○大林カミーユ美智子¹, 篠原陽子¹, 増田貴夫², 河合剛太¹
 1 千葉工業大学, 2 東京医科歯科大学
- P21 機能的 MRI を用いた匂い刺激と行動を結びつけるマウスの脳活性化経路の解明:誘引性匂い物質 ムスコンによる刺激と独立成分解析の適用
 ○武田光広,椿原由美子,吉永壮佐,寺沢宏明 熊本大学大学院生命科学研究部
- P22 Band-selective CP 法を使った超高速 MAS における高効率 ¹³C-¹³C、¹³C-¹H 間磁化移動の実現
 ○松永達弥¹,高橋涼²,石井佳誉 ¹²
 1 理化学研究所放射光科学研究センター NMR 研究開発部門,2 東京工業大学生命理工学院
- P23 Vif-CBFβ-CUL5-ELOB-ELOC 複合体に結合するアプタマーの NMR 解析
 ○熊谷紀志¹,鈴木拓也¹,関川湧斗¹,神庭圭介²,万里²,永田佳代子³,高折晃史³,片平正人², 永田崇²,坂本泰一¹
 1 千葉工業大学,2 京都大学エネルギー理工学研究所,3 京都大学大学院医学系研究科
- P24Y 構造・成分多様性のある高分子試料の T₂ 緩和に基づく固体 NMR 信号分離法の開発
 ○山田隼嗣¹²,近山英輔²³,菊地淳¹²⁴
 1 名大院 生命農,2 理研 CSRS,3 新潟国情大 システム,4 横市院 生命医
- P25 高次構造・運動性評価のマテリアルズ・インフォマティクスを趣向した時間因子分解 NMR
 ○原光輝¹,山田隼嗣^{2,3},菊地淳^{1,2,3}
 1 横市院生命医,2 理研環境資源,3 名大院生命農
- P26 高分解能固体 NMR 測定の分解能向上を指向した側鎖重水素標識法のアミロイドタンパク質への 応用

○重光佳基¹, 寺見響¹, 松永達弥², 山崎俊夫², 石井佳誉^{1,2} 1 東京工業大学生命理工学院, 2 理研 RSC NMR 部門

P27 高磁場極低温 MAS-DNP 固体 NMR による空間選択的なスピン相関偏極成分の応用
 〇杉下友晃¹,松木陽¹²,藤原敏道^{1,2}
 1 大阪大学 蛋白質研究所,2 大阪大学先導的学際研究機構 量子情報・量子生命研究部門

P28Y 固体 DNP-NMR による高分子担持触媒の構造解析 ○田中真司,小川敦子,中島裕美子,佐藤一彦 1 産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター

P29 プリオン感染における「種の壁」を解明

志田俊信¹, ○鎌足雄司², 依田隆夫³, 山口芳樹⁴, Michael Feig⁵, 大橋祐美子⁶, 杉田有治⁷, 桑田一夫⁸, 田中元雅¹ 1 理化学研究所・脳神経科学研究センター, 2 岐阜大・科学基盤研究センター, 3 長浜バイオ大学, 4 東北医科薬科大学・薬学部, 5 Michigan State University, 6 神戸大学・理学研究科, 7 理化学研究所・ 計算科学研究センター, 8 岐阜大・連合創薬医療情報研究科

P30 9.4T の磁場下における²⁹Si-NMR のクライオ MAS プローブによる高感度測定

○戸田充^{1,2},水野敬^{1,2},中井利仁^{1,2},根本貴宏^{1,2},山腰良晃^{1,2},最上祐貴^{1,3},清水禎^{1,3} 1NIMS-JEOL 計測技術ラボ,2株式会社 JEOL RESONANCE,3国立研究開発法人物質材料研究機構

P31 NMR を用いたアダプター蛋白質 Drk の動態解析

○渡邉吏輝¹, プバティマキシンサイーシュ¹, 末元雄介¹, 木川隆則², 三島正規¹, 猪股晃介¹, 池谷鉄兵¹, 伊藤隆¹ 1 東京都立大学・大学院理学研究科・化学専攻, 2 理化学研究所・生命機能科学研究センター

P32Y ダイヤモンド NV 中心を使ったピコリットル NMR と単一細胞測定への展開

○森田航希¹,大木出¹,藤原正規¹,中野裕太²,吉本智貴²,徳田規夫^{1,2,3},水落憲和¹ 1 京都大学化学研究所,2 金沢大学大学院自然科学研究科,3 金沢大学ナノマテリアル研究所

P33 同軸チューブを用いた qNMR 測定法の最適化

○小倉立己^{1,2},若山正隆¹,曽我朋義¹,冨田勝¹ 1 慶應義塾大学 先端生命科学研究所,2(公財)庄内地域産業振興センター

P34 TDNMR によるスピン拡散の評価

○原英之 ブルカージャパン株式会社バイオスピン事業部

P35 溶解トリプレット DNP 法を用いた分子間結合の観測

○松井拓海¹,杉木俊彦²,宮西孝一郎¹,香川晃徳¹³⁴,北川勝浩¹³,藤原敏道²³,根来誠³ 1 大阪大学大学院基礎工学研究科,2 大阪大学蛋白質研究所,3 大阪大学先導的学際研究機構 量子 情報・量子生命研究センター,4 JST さきがけ

P36Y 固体 NMR による内向きプロトンポンプロドプシン Schizorhodopsin のレチナール結合サイトの 構造解析

○但馬聖也¹,神取秀樹²,井上圭一³,川村出¹ 1 横浜国立大学大学院理工学府,2名古屋工業大学,3東京大学

- P37 NDSB の添加によるユビキチン分子内の水素結合への影響
 ○中島弘稀¹,若松馨²,伊藤隆¹,三島正規¹
 1 東京都立大学院理学研究科,2 群馬大学院理工学府
- P38Y piRNA の生成に関与する RNA element の二次構造解析
 ○高瀬直美¹,石津大嗣^{2,3},平形樹生²,塩見美喜子²,河合剛太¹
 1 千葉工業大学,2 東京大学,3 慶応義塾大学
- P39 薬物ナノ懸濁液に含まれる薬物粒子の凝集評価 を目的とした時間領域 NMR 法の応用
 〇岡田康太郎,大貫義則
 富山大学薬学部
- P40高速 MAS 条件における半整数四極子核の高分解能 SPAM-MQMAS と SPAM-STMAS 測定
○佐々木彬子¹, Jean-Paul Amoureux¹⁻³
1 ブルカー, 2 リール大学, 3 理化学研究所 放射光科学研究センター NMR 研究開発部門

内藤晶¹、田制侑悟¹、Mijidorj Batsaikhan^{1.2},藤戸輝昭³、川村出¹、上田一義¹ 1 横浜国立大学 大学院工学研究院,2国立モンゴル大学 工学・応用科学科、3プローブ工房

P42Y Rapid Scan Nuclear Quadrupole Resonance
〇日部雄太,野田泰斗,竹腰清乃理,武田和行
京都大学大学院理学研究科 化学専攻

P43 PRE, PCS を用いたマルチドメイン蛋白質 Grb2 の立体構造解析

○田端真彩子¹,池谷鉄兵¹,美川務²,川端庸平¹,安藤考史¹,館野桂太¹,三島正規¹,伊藤隆¹ 1 東京都立大学・大学院理学研究科,2理化学研究所・生命機能科学研究センター

P44Y 多次元固体 MAS NMR を用いたヘリオロドプシンの立体構造解析

〇鈴木しぶき¹,長島敏雄²,金子莉奈¹,沖津貴志³,和田昭盛³,小林直宏²,山崎俊夫²,井上圭一⁵,神取秀樹⁴,川村出¹
 1 横浜国立大学大学院理工学府,2理研RSC,3神戸薬科大学,4名古屋工業大学,5東京大学

P45 800 MHz WB-SCM における単核 クライオコイル MAS 高感度測定

○水野敬^{1,2}、戸田充^{1,2}、中井利仁^{1,2}、根本貴宏^{1,2}、山腰良晃^{1,2}、最上祐貴^{1,3}、清水禎¹³
 1 NIMS JEOL 計測技術ラボ, 2(株)J EOL R ESONANCE, 3 国研物質・材料研究機構

P46 Structural Differences and Novel Polymorphs of Synthetic and Brain-derived Aβ42 Fibrils by ¹H-detected SSNMR

Ayesha Wickramasinghe^{1,2,3}, Yiling Xiao3, Naohiro Kobayashi², Toshio Yamazak^{1,2} Yoshitaka Ishii^{1,2,3} 1 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Kanagawa, Japan, 2 NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center, Yokohama, Kanagawa, Japan, 3 Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, USA

P47 ¹⁹F 高速 MAS NMR を用いた金属 – 有機構造体の CO₂ 吸着ダイナミクスの解析

○栗原拓也¹、犬飼宗弘²、西山裕介^{3,4}、堀毛悟史^{5,6,7,8}、水野元博^{9,10} 1 金沢大学理工研究域, 2 徳島大学大学院社会産業理工学研究部, 3 株式会社 JEOL RESONANCE, 4 理化学研究所, 5 京都大学高等研究院, 6 京都大学大学院工学研究科, 7 産総研・京大エネルギー 化学材料オープンイノベーションラボラトリー, 8 VISTEC, 9 金沢大学ナノマテリアル研究所, 10 金沢大学新学術創成研究機構

P48Y NMR 測定と量子化学計算による加硫天然ゴムの構造解析

○柏原功典¹,大内宗城²,北浦健大³,石井佳誉¹² 1 東京工業大学 生命理工学院,2 理化学研究所 放射光科学研究センター NMR 研究開発部門,3住 友ゴム工業株式会社 研究開発本部 分析センター

P49New cross polarization method for solid-state NMR measurement
〇中田拳太¹, 松永達也², 石井佳誉^{1,2}
1 東京工業大学 生命理工学院, 2 理化学研究所 放射光科学研究センター NMR 研究開発部門

P50 二次元時間領域 NMR 法から見る魚類肉質の多様性

○魏菲菲¹,伊藤研悟¹,坂田研二¹,菊地淳^{1,2,3} 1 理研 CSRS, 2 横市院・生命医, 3 名大院・生命農

P51 Towards structural determination of E22G mutated Aβ40 fibrils by solid-state NMR spectroscopy

○ Mohammad Jafar Tehrani¹, Yoshitaka Ishii^{1, 2}

1 Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2 RIKEN RSC NMR Science & Development Division, 2 理研 RSC NMR 部門

P52Y Adiabatic Pulse を用いた溶媒信号抑制パルスの開発および固体 NMR 測定への応用

松永達弥¹, ○岡部遼太郎², 石井佳誉^{1,2} 1 理化学研究所放射光科学研究センター NMR 研究開発部門, 2 東京工業大学生命理工学院

 P53
 クロマグロ稚魚におけるアミノ酸代謝と成長に関わる因子の探索

 ○赤木謙一¹,坂田研二¹,朝倉大河¹,菊地淳^{12.3}

 1 理研・CSRS,2横市院・生命,3名大院・生命農

- P54Y アドレナリン受容体細胞内第三ループと GPCR モジュレーター Spinophilin との新しい融合タンパ ク質を用いた相互作用解析
 ○葛貫絵梨奈¹,毒島いぶき¹,黒川優香¹,浦野智子¹,島崎安希子¹,河野俊之²,細田和男¹,寺 脇慎一¹,若松馨¹
 1 群馬大学大学院 理工学府,2 北里大学大学院 医療系研究科
- P55 ネオジム永久磁石を用いた高分子多層薄膜の磁場掃引一次元磁気共鳴イメージング ○生方輝¹,松葉瀬真二²,桑野一幸²,浅川直紀¹, 1 群馬大学大学院理工学府,2トヨタ自動車(株)
- P56 水中の有機物浄化に関わるモニタリング重要因子の抽出
 ○村山昂平¹,横山大稀²,菊地淳^{1,2,3}
 1横市院 生命医,2 理研 環境資源,3名大院 生命農
- P57 ヤエヤマサソリ由来カリウムチャネル阻害毒素 LaIT2 の構造機能相関解析
 ○田村真生¹,森田勇人²,大木進野¹
 1 北陸先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科,2 城西大学 大学院理学研究科
- P58Y 分子動力学法を用いた核スピンシングレット状態の緩和時間計算

○本山誠¹,宮西孝一郎¹,根来誠²,一条直規¹,香川晃徳^{1,2,3},水上渉²,北川勝浩^{1,2}
 1大阪大学大学院基礎工学研究科,2大阪大学先導的学際研究機構量子情報・量子生命研究センター,3JST さきがけ

P59 固体 NMR によるジホスホン酸イミダゾリウム結晶のプロトン伝導メカニズムの解析

 ○安念雅史¹, 畝亮太², 栗原拓也², 重田泰宏 3, 雨森翔悟³, 井田朋智², 水野元博^{1,2,3}
 1 金沢大学大学院新学術創成研究科, 2 金沢大学大学院自然科学研究科, 3 金沢大学ナノマテリア ル研究所

P60 二酸化炭素 - メタン変換光触媒である、黒色金ナノ粒子を担持した針状ナノシリカの固体高分解能 NMR

〇村田翔,野田泰斗,竹腰清乃理 京都大学理学研究科

特別講演

「in situ 動的構造」からみたタンパク質の機能解明

○嶋田一夫 理化学研究所 生命機能科学研究センター 生体分子動的構造研究チーム

in situ function-related dynamical analyses of proteins

Ichio SHIMADA
RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research,
Laboratory for Dynamic Structure of Biomolecules

Membrane proteins play fundamental roles in many biological processes. Over the past decade, our structural understanding of membrane proteins has dramatically progressed by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. However, these structures basically represent their static snapshots. Recently, accumulating evidence has suggested that membrane proteins are structurally dynamic. In this respect, solution NMR is the best approach for obtaining dynamic structural information about the membrane proteins under physiological conditions. In this lecture, we present our strategy for function-related dynamical analyses of the membrane proteins and our recent results.

膜タンパク質は生体内において重要な役割を果たすとともに最大の創薬標的タンパク質で ある。X線結晶構造解析および極低温電子顕微鏡法は、膜タンパク質の機能メカニズムの解 明に大きく貢献してきたが、これらの手法で得られる立体構造は基本的に静的なスナップ ショットであり、膜タンパク質が実際に機能している *in situ* での動的な構造や分子間相 互作用を必ずしも反映しない。一方、我々は核磁気共鳴法(NMR)を用いて、*in situ*での タンパク質の動的構造情報を得られるという NMR の特徴を最大限いかして、生物学的に重 要なタンパク質、細胞接着因子、G タンパク質共役受容体(GPCR)、イオンチャネルなどの 機能解明を行ってきた^{1,2,3,4}。一般に、NMR を用いて膜タンパク質のような高分子量タンパ ク質の機能解明を行う場合、その高分子量性に由来する NMR 測定制限および膜タンパク質 の不安定性がボトルネックとなる。申請者はこれらの問題を解消するための新規測定法お よび試料調製法を開発し、開発された方法論を用いて、生物学的に重要な系において動的構 造および相互作用の観点よりそれらの機能解明に成功してきた^{5,6}。 本講演では、我々の取ってきた戦略および最近の成果に関して発表する。

相互作用、膜タンパク質、動的構造、

しまだ いちお

参考文献:

 Shimada I, Ueda T, Kofuku Y, Eddy MT, Wüthrich K, "GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures."

Nat. Rev. Drug Discov. 18(1), 59-82 (2019)

 Takeuchi K., et al., "Conformational equilibrium defines the variable induction of the multidrug-binding transcriptional repressor QacR"

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 116(40):19963-19972 (2019)

 Kano H, Toyama Y, Imai S, Iwahashi Y, Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, Shimada I. "Structural mechanism underlying G protein family-specific regulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel"

Nat. Commun. 10(1):2008 (2019)

4. Toyama Y, et al., "Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses"

Nat. Commun. 8:14523 (2017), doi: 10.1038/ncomms14523

5. Nishida N, et al., "Novel Collagen-Binding Mode of the VWA Domain Determined by a Transferred Cross-Saturation Experiment"

Nat. Struct. Biol. (2003) 10, 53-58.

6. Takahashi H, et al., "A Novel NMR Method for the Determination of the Interface of Large Protein-protein Complexes"

Nat. Struct. Biol. (2000) 7, 220-223

一般演題要旨

1 大阪大学蛋白質研究所,2 名古屋大学大学院理学研究科,3 熊本大学 大学院生命科学研究部,4 東京都立大学大学院 理学研究科,5 SAILテクノロジーズ株式会社,6 大陽日酸株式会社

Relaxation optimized isotope labeling method for studying structural dynamics of supramolecular proteins

Yohei Miyanoiri ^{1,2}, Mitsuhiro Takeda ³, Tsutomu Terauchi ^{4,5,6}, Masatsune Kainosho ^{2,4}
I Institute for Protein Research, Osaka University, 2 Graduate School of Sciences, Nagoya University,
3 Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, 4 Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan
University, 5 SAIL Technologies, Inc., 6 TAIYO NIPPON SANSO CORPORATION

During the past few years, we have been developing the stereo-array isotope labeling (SAIL) method to elucidate the precise structures and dynamics of proteins, which are essential for understanding their biological functions. Using SAIL amino acids with transverse relaxation-optimized isotope labeling patterns (RO-SAIL), we successfully observed the extremely narrow aromatic / aliphatic ¹³C-¹H signals, and achieved the precise NOE signal assignments for the 82 kDa malate synthase G (MSG) protein. Recently, we have been applying this RO-SAIL method to various large molecular weight proteins, such as membrane proteins and molecular motor machinery, to study their interactions and structural dynamics. To expand the versatility of our method, we have further improved the RO-SAIL amino acids. In this meeting, we will present the latest data on the structures and dynamics of 500 kDa supramolecular proteins.

近年の構造生物学研究においては、生体高分子の立体構造と共に、それら [序論] の動態情報を理解することが重要視されている。溶液NMR法は、蛋白質動態を原子分解 能で捉えることが出来るユニークな手法であることから、生命機能の理解のみなら ず、創薬研究などへの応用展開についても注目されている。しかしながら、分子量増 大に伴うNMRシグナルの縮重や低感度化が大きな障壁となっており、適用範囲が限られ ていた。我々は、これまでに立体整列同位体標識技術(SAIL法)を駆使し、高分子量蛋 白質の動態構造を捉える手法の開発を進めてきた。その結果、横緩和過程をより最適 化したSAILアミノ酸を利用することにより、分子量80kDaに及ぶ高分子量蛋白質に関し ても、芳香環や脂肪族NMRシグナルを高感度に観測し、蛋白質動態の解明に必須となる NOEシグナル等を高精度に帰属できることを立証してきた¹⁾。また、並行して取り組ん できた蛋白質試料調製法の多様化により、観測目的とするアミノ酸残基のみを選択的 に安定同位体標識し、他の残基を完全重水素化した蛋白質を簡便かつ効率的に調製す る技術を確立した。このことから、NMR法の適用範囲は大きく拡大され、抗体や膜蛋白 質、分子モーターマシナリー、さらには高分子量酵素複合体といった様々な試料を対 象としたSAIL-NMR法の利用が展開されている²⁾。現在、更なる巨大蛋白質複合体を対象 安定同位体標識法、高分子量蛋白質、蛋白質動態

○みやのいり ようへい、たけだ みつひろ、てらうち つとむ、かいのしょう まさつね

とした構造動態解析や微量蛋白質の高感度観測を目指し、SAIL-NMR法の改良を進めて いる。本年会では、最近の進展について報告する。 [方法]

これまでに紹介してきた核緩和最適型のSAILアミノ酸(RO-SAIL a.a.)は、基本的に観測対象を ¹³C-¹H 対としていた。RO-SAIL法はCH-TROSY 測定との併用により、分子量80 kDa 程度の高分 子量蛋白質の¹³C-¹H 相関信号を高感度に観測することに成功している(Fig.1a)。本課題では、100 kDaを超える蛋白質複合体を対象とした高感度NMR測定法の確立を目指し、RO-SAIL a.a. に更な る改良を施した。具合的には、核緩和過程の最適化として、観測対象を¹Hに絞り、直接結合する 炭素をも¹²Cとした(Fig. 1b)。このように核緩和機構を極限まで排除したアミノ酸を用いて、目的 蛋白質を調製した。目的蛋白質として、分子量 82 kDaのリンゴ酸合成酵素 (Malate synthase G; MSG)および分子量 468 kDaのペプチド分解酵素 (tetrahedral shape aminopeptidase; TET)を取りあ げた。試料は、主としてRutgers Univ. 井上研究室で作成されたアミノ酸要求性BL21 (DE3) 株を用 いた大腸菌発現系で、重水素化M9最少培地を利用して調製した³)。 [結果と考察]

従来のRO-SAIL a.a.を用いることで、82 kDaのMSGについて、さまざまなアミノ酸残基の¹³C-¹H

シグナルを高感度かつ位置・立体選択的に観 測できることを示してきた。一方で、低温条 件下での高感度測定や、100 kDaを超える巨大 蛋白質複合体、大量調製が困難な試料につい ては、構造動態研究を展開するうえで十分な 感度を得ることには至っていなかった (Fig.1a)。今回、核緩和機構を極限まで排除し た改良型アミノ酸を用いることで、観測対象 の¹Hシグナルを、短時間で高感度に捉えるこ とに成功した。特に、従来法では困難であっ た低温度下でのMSGのNMR信号を高感度に 観測することが可能となった(Fig.1b)。さら に、468kDaのTET複合体においても、高感度 にNMR信号を捉えることにも成功した。この 結果は、溶液NMR法の観測対象を大幅に拡大 するだけでなく、アミノ酸残基側鎖の配座交 換運動や芳香環反転運動といった構造動態 解析法を拡張するものであり、様々な生体高 分子が有する高次な生命機能の解明に貢献 することが期待できる。



Fig. 1 New RO SAIL a.a. for studying large molecular proteins:(a)sructure of RO-SAIL ζ -Phe and CH TROSY spectrum of RO-SAIL ζ -Phe labeled MSG. (b) New RO-SAIL ζ -Phe and ¹H 1D spectrum of new RO-SAIL ζ -Phe labeled MSG.

[謝辞]

本研究の一部は科学研究費補助金基盤研究(C)および新学術領域「動的構造生命」の支援により実施された。

[参考文献]

- 1) Y. Miyanoiri, et al. (2020), Biochem. Biophys. Acta. Gen. Subj. 1864, 129439
- 2) D. Gauto, et al. (2019), J. Am. Chem. Soc. 141, 11183-11195.
- 3) Y. Miyanoiri, et al. (2016), J. Biomol. NMR 65, 109-119.

112 NMR studies on the protonation state of cyanobacteriochrome
〇三島正規¹²
東京都立大学 理学研究科

NMR studies on the protonation state of cyanobacteriochrome

∘Masaki Mishima

Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

Cyanobacteriochrome (CBCR) is a bilin-binding photosensors of phytochrome superfamily and photoconverts between two distinct light-absorbing states. The green/red CBCR is one of the most important CBCR subfamily for controlling the photosynthetic antenna components in cyanobacteria, and also for optogenetical application. RcaE, a sensor of the subfamily utilizes the change of the protonation state of the PCB for the green/red absorption, named "protochromic photocycle". In this study, NMR analyses revealed that the NH moieties of the PCB were fully protonated in the red-absorbing state Pr but one of them was deprotonated in the green-absorbing state (Pg). Direct observation of ¹⁵N was a quite powerful tool for the analysis of protonation state under fast exchange. This finding uncover the structural and chemical bases of the protochromic photocycle and provides new insights into our understanding of the diverse spectral tuning mechanisms in the CBCRs.

【序論】シアノバクテリオクロム(CBCR)は、フィトクロムスーパーファミリーに属するフォトセンサータンパク質で、発色団としてビリン(phycocyanobilin, PCB)をもち、2つの異なる光吸収状態の間でその構造を変化させ、シグナル伝達を担う。緑/赤色光を吸収するCBCRは、最も重要なCBCRサブファミリーの1つで、オプトジェネティクスへの応用も期待されている。このサブファミリーに属するRcaEでは、緑/赤の吸収変化に際して、赤色光吸収型(Pr)と緑色光吸収型(Pg)の間で、PCBが分子内の二重結合の異性化を起こすだけでなく、プロトン化状態の変化が起こることが示喩

起こることが示唆されており、その光変換 は「プロトクロミックフォトサイクル」と 呼ばれている。

本研究では¹⁵N直接観測を用いて、Prで は、PCBの4つのNHが全てプロトン化され おり、Pgでは、1つのNHで脱プロトン化が 起こること明らかにした(Fig. 1)。これは、 プロトクロミックフォトサイクルにおいて 実際にPCBのプロトン化状態が変化するこ とを直接に示し、大変意義深い。さらにX線 結晶構造解析等からの立体構造の知見にもと づいて、立体構造とPCBのプロトン化状態に ついて議論する。



Fig. 1 Proposed protophotomiccycle model Protonation/deprotonation occurs along with *cis/trans* isomerization.

シアノバクテリオクロム、プロトン化状態、¹⁵N 直接観測

○みしま まさき

【結果・考察】Pr状態での1.67Åの高分解能の 結晶構造解析から,RcaEのPCBではC15-C16 の二重結合がE型,C14-C15の配座がsyn型で あり、PCBが全体的にコンパクトな特徴的を もつことがわかった。またPCBが他のCBCR のものとは異なり、疎水的な環境に置かれて いることが明らかとなった。

次に PCBの前駆体である¹³C,¹⁵N標識の5aminolevulinic acidを用いて,PCBのみ選択的に ¹³C,¹⁵N標識した試料を作製し、2D¹H-¹⁵N HSQC を測定したが、PrでもPgにおいて、PCBの4つの うち1つのNHの信号しか得られなかった。そこで クライオBBFOプローブを用いて、¹⁵Nの1D直接測 定を行った。pH7.5においてPrでもPgでも4本の信 号が得られた。Prでは全て130-160ppm近傍に信号 が観測され、これはNH型の窒素の化学シフトであ ったのに対して、Pgでは258 ppm付近にPCBのB環 由来と考えられる脱プロトン化した状態(-N=C-) の信号を観測することに成功した。

さらに、この信号が確かに脱プロトン化した窒素によるものであることを確認するため、PrにおいてpHを塩基性に変化させて、1D¹⁵Nを測定したところpH 9からpH 10ではPgと同様の258ppm付近に信号を観測することができた(Fig.2)。これは、Pr状態のタンパク質を塩基性条件に置いたことにより脱プロトン化を引き起こされ、PCBがPgと同様に1つプロトンを失った状態になったものを考えられる。





The amide signals around 130-160 ppm correspond to NH moiety, and the signals around 258 ppm, indicated by black arrow, corresponds deprotonated -N=C-moiety.

結晶構造では、Glu217の側鎖がPCBの3つの窒素原子と水素結合を形成する位置にあった。変異体を用いた解析から、Pr形成にGlu217は必須であるが、Pgの形成にGlu217は必要でないことが分かっている。Glu217以外には特にプロトンを受容する候補は存在せず、従って、Pgへの変換の際に起こる脱プロトン化には、タンパク質側にプロトンアクセプターを必要としないことが示唆される。RcaEではPCBでは疎水的な環境にあることから、現在、"desolvation effect"によるPCBのNHのpKaのシフトが、脱プロトン化を駆動させるものと考えている。即ち、PCB結合クレフトが、PgではPrよりも、より強い疎水性条件に構造変化することで、desolvation effect を受けて、NHのpKaが中性側にシフトすることによりプロトンを失うと考えている。

【参考文献】

1) Hirose, Y et al., PNAS (2013), 110, 13

【謝辞】

NMR測定の一部は、文部科学省先端研究基盤教養促進事業「NMR 共用プラットフォーム」 (理研横浜)、大阪大学蛋白質研究所の「NMR共同利用研究課題」を利用しました。X線結晶構造 解析は名古屋大学シンクロトロン光研究センターの永江峰幸助教によるもの、研究全般について 豊橋技術科学大学の広瀬侑助教にご議論いただきました。

113 ¹⁵N 直接検出NMR法による製剤・保存条件におけるモノクロ ーナル抗体の非破壊的観測 ○徳永裕二^{1,2},竹内恒¹,奥出順也³,小里一友³,鳥澤拓也³,嶋田一夫^{1,4} 1産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門 2バイオ産業情報化コンソーシアム 3中外製薬株式会社

4理化学研究所・生命機能科学研究センター

Non-invasive observation of high molecular weight biologics monoclonal antibodies under formulated storage conditions via ¹⁵N direct detection NMR oYuji Tokunaga^{1,2}, Koh Takeuchi¹, Junya Okude³, Kazutomo Ori³, Takuya Torizawa³, Ichio Shimada^{1,4}

1 Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, AIST

2 Japan Biological Informatics Consortium

3 Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

4 RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

Noninvasive evaluation of tertiary structures is fundamental to the research, development, and use of the biologics. However, few methodologies are currently available for evaluating large molecular weight biologics, such as therapeutic monoclonal antibodies (mAbs; 150 kDa). Here, we have newly developed a ¹⁵N direct detection NMR technique, the ¹⁵N direct detection CRINEPT, which allows the observation of the main chain amide resonances of mAbs. The technique not only expands the range of proteins applicable to solution NMR studies but also allows the noninvasive structural analyses of intact mAbs under a wide range of temperature and solvent conditions. We successfully acquired the ¹⁵N-detected CRINEPT spectra of an intact mAb in its formulated solution at 4°C. The technique was able to discriminate heterogeneous galactosylation states, demonstrating the benefit of high resolution of the ¹⁵N direct detection.

【序論・研究の目的】 モノクローナル抗体(分子量150 kDa)などのタンパク質に代表されるバイオ医薬 は、世界医薬品売上の上位を占めるなど、今日の代表的な創薬モダリティとなった。近年では、初期の抗 体医薬の特許切れに伴い後発品であるバイオシミラーが市販されはじめるとともに、二重選択性抗体や 抗体一薬剤複合体に代表される高機能化抗体が現れ新しい局面を迎えている。バイオ医薬の主成分で あるタンパク質は、三次元的に折りたたまれた高次構造を形成することで機能を発揮するばかりでなく、 熱や振動などにより高次構造が部分的に壊れると免疫原性などの副作用を誘発する可能性も指摘され ているため、バイオ医薬の評価を高次構造に基づいて行うことが求められている。この際、高次構造が変 化した状態の存在比は数%以下など小さい可能性があること、またバイオ医薬は培養細胞を用いて産生 されるため糖鎖を含む翻訳後修飾などの化学組成も本来的に不均一であることを考慮し、不均一な状態 をありのままに観測することが重要である。

溶液NMR法は、溶液組成および温度などの事件条件に対する柔軟性が高いこと、またタンパク質を凍結、結晶化、または変性させるなどの前処理も必要ない非侵襲性を含む、バイオ医薬 高分子量タンパク質、バイオ医薬、¹⁵N直接検出

○とくなが ゆうじ、たけうち こう、おくで じゅんや、おり かずとも、とりざわ たくや、しま だ いちお の非破壊的な高次構造評価に有利な特徴を備えている。特に、¹H-¹⁵N 二次元相関スペクトル は残基分解能の情報を与えるため、局所的かつ微妙な高次構造の変化をも鋭敏に検出するこ とに長けている。これまでに、国内外の複数の研究者らが、モノクローナル抗体等のバイオ医薬 の¹H-¹⁵N二次元相関スペクトルの観測を実施しており、その高次構造評価における用途を提案 している。しかしながら、分子量150 kDaのモノクローナル抗体の主鎖アミドシグナルを製剤溶液 中、保存温度(4-8℃)における観測は前例がなかった。このことは、左記の条件においては分子 の見かけの分子量、すなわち回転相関時間が増大する結果、観測核の横緩和速度が増大し、 シグナルが検出限界以下まで広幅化してしまうためと考えられる。実際に、我々が既存の横緩和 最適化測定法である¹H-¹⁵N TROSY法および¹H-¹⁵N CRINEPT法を、Ala選択的¹⁵N標識を導入 した抗体医薬のアナログの製剤溶液組成中・保存温度4℃(以下、製剤・保存条件)における観 測に適用した結果、抗体に由来するシグナルを検出することはできなかった(Fig. 1A,B)。バイオ 医薬の多くは哺乳動物細胞を用いて産生されるため、重水素化が不可能であることも、高分子 量の抗体分子の観測をより厳しいものにしていると考えられる。これに対し、近年、TROSY測定に おける直接検出核として、従来の1H核に代えて15N核を用いる(15N直接検出TROSY法)ことで、 重水素化されていないタンパク質の高感度・高分解能測定が可能であることが示された[1]。この 優位性は、15N核が遠位のプロトンによる横緩和促進を受けにくいことに依拠しており、抗体の製 剤・保存条件における観測においても維持されるものと考えられる。しかしながら、製剤・保存条 件における¹⁵N直接検出TROSYスペクトル上にも、抗体由来のシグナルを観測することはできな かった(Fig. 1C)。これは、磁化移動および間接軸化学シフト展開の待ち時間における緩和が、 同条件においては致命的であるためと考えられる。そこで本研究においては、¹⁵N直接検出NMR においてさらなる横緩和最適化を試みた。これにより、製剤・保存条件におけるモノクローナル抗 体の¹H-¹⁵N 二次元相関スペクトルの高感度・高分解能観測を実現するとともに、試料の不均一 性に由来する高次構造の差異を非破壊的に検出した[2]。





【方法】 高分子量タンパク質に最適化した¹⁵N直接検出CRINEPT測定法の構築

本研究にて構築したパルス系列をFig. 2Aに示す。¹H核から¹⁵N核への磁化移動方式として、INEPT型のスピン結合(*L*結合)に加えて、高分子量において高効率となる交差相関緩和を併用するCRINEPT型を採用した。CRINEPT型の磁化移動においては磁化移動中の¹H核の再結像パルスが無くなることに着目し、磁化移動と¹H核の化学シフト展開を一挙に行うことでパルス系列全体の待ち時間を短縮した。この際、二次元スペクトルとしての測定感度は横緩和による減衰を考慮した磁化移動効率の*t1*方向の積分値に比例することとなる(Fig. 2B)。製剤・保存条件の抗体分子においては待ち時間ゼロから*t1*展開を行った場合に最高感度となることが想定された。時点 *b* において生成される¹⁵Nの横磁化は¹Hに対する逆位相

磁化ととして取り込み、絶対値モードでのフーリエ変 換を行った。逆位相シグナルが約90 Hzのスピン結合 により順位相シグナルより広幅となることは、製剤・保 存条件の抗体においてはアミド基¹Hの線幅は100 Hz 超となることを考慮すると、実際的な解析の妨げとは ならない。また、同条件においてはanti-TROSY成分 は検出限界以下に広幅化すると想定し、TROSY選択 のためのパルスユニットも省略した。このように構築し た¹⁵N直接検出CRINEPT法を用いた場合、製剤・保存 条件における抗体の測定感度は1オーダー以上改善 することが予想された(Fig. 2C)。







Ala選択的¹⁵N標識を導入した抗体医薬のアナログ(皮下投与用の製剤組成SC、保存温度)に¹⁵N直接 検出CRINEPT測定を実施した。この結果、既存の測定法(Fig. 1)とは対照的に、アミノ酸配列上のAla残 基数の31個中27個(87%)のシグナルが観測された(Fig. 3A)。また、¹⁵N直接検出とすることで、¹H直接検 出実験にて生じた製剤組成中に含まれる芳香族アミノ酸に由来する*t1*リッジ(Fig. 1A,B灰塗)が観測され なくなったため、抗体に由来するシグナルの化学シフト・強度をより高精度に測定することが可能となっ た。さらに、上記とは別の静脈内投与用の製剤組成*IV*では、高濃度の精製白糖を含有するため高粘度と なり、横緩和速度がさらに増大すると考えられるが、この条件においても¹⁵N直接検出CRINEPTスペクトル 上には26個のAla残基のアミドシグナルが観測された(Fig. 3B)。したがって、本測定法を用いることで、多 様な製剤条件における抗体のスペクトルを保存温度にて取得可能であることが示された。2種類の製剤条 件にて取得されたスペクトルを比較すると、一部のシグナルに化学シフトおよび強度の違いが認められた ことから、スペクトルの比較に基づき製剤条件に敏感な構造部位を同定可能であることが示唆された。





【結果2】¹⁵N直接検出CRINEPTスペクトルに基づく抗体の糖鎖修飾状態に依存した構造変化の検出 抗体医薬の大部分を占めるIgGはFc鎖に保存されたAsn297にN型糖鎖修飾を受ける。このような糖鎖 構造の違いは、薬理活性および体内動態に影響することが知られている。哺乳細胞を用いて産生される
抗体医薬においては、糖鎖構造の異なる成分が不均一に混在しており、また細胞の種類や培養条件によっても糖鎖構造は変化しうることから、抗体医薬の糖鎖構造を分析することは有効性および安全性の観点から極めて重要である。一方、糖鎖構造の違いが薬効・動態を左右することの高次構造に基づく理解は十分に進んでいない。そこで、¹⁵N直接検出CRINEPT法を適用することで、糖鎖構造の分析的評価お

よび糖鎖構造に依存した高次構造の変化についての A Fchomodimer 情報が得られるかについて検討した。対象として、抗 体のエフェクター機能と関係することが知られる糖鎖 末端におけるGal修飾の有無に着目した(Fig. 4A)。 Lys選択的¹⁵N標識を導入した抗体医薬のアナログに 対して¹⁵N直接検出CRINEPTを適用した。この結果、 糖鎖修飾部位から約10Å離れたLys-248のシグナル が、¹⁵N方向に広幅かつ非対称な形状を示した(Fig. B 4B)。これは、¹⁵N化学シフトおよび強度の異なる3個の シグナルが部分的に重なっているものであると考えら れた。そこで、酵素的に末端Galを付加(G2)および除 去(G0)した状態に制御した抗体のスペクトルを測定し た結果、酵素処理していない抗体の¹⁵N低磁場および 高磁場に相当するシグナルがそれぞれ見出された (Fig. 4C)。したがって、インタクトの抗体においては、 混在したG2, G1/G1'およびG0成分に由来するシグ ナルが、それぞれの存在量に対応したシグナル強度 にて観測されているものと考えられる(Fig. 4D)。実際 に、シグナル強度から推定したGal修飾状態の含有比 率は、質量分析と同様の傾向を示した。



Fig. 4. Analysis of galactosylation states of the mAb by ¹⁵N direct detection CRINEPT

【結論】新たに¹⁵N直接検出CRINEPT法を構築することにより、抗体医薬の製剤・保存条件における高次 構造情報を非破壊的に取得することに成功した。製剤溶液組成の違いに依存して部位特異的な化学シ フト変化が認められたことから、¹⁵N直接検出CRINEPT法を活用することで、抗体医薬の研究段階におけ る製剤溶液組成の検討を、高次構造情報と紐づけながら行うことが可能となる。また、近年開発されてき た高機能化抗体においては、抗体一薬剤複合体における薬剤修飾に伴う抗体の高次構造の変化や、二 重選択性抗体において動的に揺らいでいる2本のFab領域の相対配置の情報などの情報を取得すること で、新規開発の効率化に寄与できると期待される。また、運動性の高い糖鎖末端におけるGalの修飾状 態に依存した高次構造の違いを、構造形成領域に存在する遠位の観測プローブにおいて検出できたこ とから、¹⁵N直接検出CRINEPT法を用いることで、抗体依存性細胞傷害活性に強く影響する糖鎖根本の フコース修飾をはじめとした様々な糖鎖構造を分析するのみならず、糖鎖構造の違いが高次構造に与え る影響を解析することにも応用が見込まれる。¹⁵N直接検出CRINEPT法は、抗体ばかりでなくヒトの膜タン パク質など重水素化の難しい高分子量タンパク質の主鎖アミドシグナルの観測において、あまねく高感度 化をもたらす。よって、本技術はバイオ医薬にとどまらず、生物学および医学・薬学における基礎研究に 幅広く資するものである。

[1] Takeuchi K, Arthanari H, Shimada I, Wagner G, *J. Biomol. NMR* (2015) **63**(4):323-331.
 [2] Tokunaga Y, Takeuchi K, Okude J, Ori K, Torizawa T, Shimada I, *J. Med. Chem.* (2020) **63**(10):5360-5366.

部 浩之⁵, 高島 秀聡³, 竹内 繁樹³, 武田 和行⁶, Frederick T.-K. So^{3,4,5}, 寺田 大紀^{3,5}, 五十嵐 龍治^{5,8}, 香川 晃徳^{1,7,8}, 北川 勝浩^{1,7}, 水落 憲和⁴, 白川 昌宏^{3,5}, 根来 誠^{5,7} 1 大阪大学大学院, 2 *Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich*,

1 八國八字八字院, 2 Elagenossische Technische Hochschule (ETH) Zurich, Switzerland, 3 京都大学大学院工学研究科, 4 京都大学化学研究所, 5 量 子科学技術研究開発機構(QST), 6 京都大学 大学院理学研究科, 7 大阪大 学先導的学際研究機構 量子情報・量子生命研究センター, 8 JST さきがけ

¹³C pulsed-DNP using pentacene or NV- centers in diamond at room temperature °Koichiro Miyanishi¹, Takuya F. Segawa^{2,3}, Izuru Ohki⁴, Shinobu Onoda⁵, Takeshi Ohshima⁵, Hiroshi Abe⁵, Hideaki Takashima³, Shigeki Takeuchi³, Kazuyuki Takeda⁶, Frederick T.-K. So^{3,4,5}, Daiki Terada^{3,5}, Ryuji Igarashi^{5,8}, Akinori Kagawa^{1,7,8}, Masahiro Kitagawa^{1,7}, Norikazu Mizuochi⁴, Masahiro Shirakawa^{3,5}, Makoto Negoro^{5,7}

 Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 2 Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Switzerland, 3 Graduate School of Engineering, Kyoto University, 4 Institute for Chemical Research, Kyoto University, 5 National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology, 6 Graduate School of Science, Kyoto University, 7 Center for Quantum Information and Quantum Biology, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, 10 JST, PRESTO

We demonstrate room-temperature ¹³C hyperpolarization by dynamic nuclear polarization (DNP) using optically polarized triplet electron spins (triplet-DNP) in polycrystalline pentacene-doped [carboxyl-¹³C]benzoic acid and diamond containing NV⁻ centers based on hitherto unexplored mechanisms. In the benzoic acid sample, the ¹³C polarization was enhanced by the integrated solid effect (ISE) to 0.12 % through direct electron-to-¹³C polarization transfer, which contrasts with the previous works that relied on prior ¹H polarization followed by ¹H-¹³C cross polarization. The ISE scheme has successfully been applied for the first time to polarize naturally abundant ¹³C spins in the diamonds sample to 0.01 %.

ペンタセンの三重項状態の電子スピン偏極を利用するトリプレットDNPは室温、低磁場でも大きな核スピン偏極が得られ、共晶サンプルの作製によるホスト分子種の拡充や溶解トリプレットDNP手法の開発など実用化へ向けた研究が進められている[1]。 また、ダイヤモンド中のNV中心において光励起後に得られる電子スピン偏極を利用するDNPも行われており、その高い生体親和性や修飾性から、ナノダイヤモンドを用いたバイオセンシングやナノスケールMRIなどの応用が期待されている[2]。前者は pulsed-DNPによりプロトンスピンを高偏極化し、¹³Cスピンへとcross-polarizationで移す

Triplet-DNP、Hyperpolarization、Diamond

○みやにし こういちろう、たくや せがわ、おおき いずる、おのだ しのぶ、おおしま た けし、あべ ひろし、たかしま ひであき、たけうち しげき、たけだ かずゆき、ふれでりっ く そう、てらだ だいき、いがらし りゅうじ、かがわ あきのり、きたがわ まさひろ、ず おち のりかず、しらかわ まさひろ、ねごろ まこと ことに成功している。後者はCW-DNPにおいて ¹³Cスピンを直接偏極することに成功してい る。本研究では、ペンタセンをドープした [calboxyl-¹³C]安息香酸とNV中心を含んだマイ クロダイヤモンドの二つの系で、pulsed-DNPに よる¹³Cスピンの室温超偏極を行った。

NV中心とペンタセンに対する、スピンエコー検出による粉末ESRスペクトルをFig.1に示す。(a)はナノダイヤモンド(11.5 GHz)、(b)はDNP実験で用いたマイクロダイヤモンド(11.6 GHz)、(c)はペンタセン(11.6 GHz)の粉末ESRスペクトルである。(a),(b)中の*で示す範囲は窒素不純物由来の信号である。マイクロダイヤモンドは平均



Fig. 1 ESR powder spectra of (a) nanodiamonds, (b) microdiamonds, (c) pentacene.

粒径約500µmであり、粒数約200程度であるためナノダイヤモンドで得られる粉末ESRスペクトルと異なっている。また、ペンタセンのゼロ磁場分裂定数D,Eは1350MHz, 42MHzである一方、NV中心のゼロ磁場分裂定数D,Eは2870MHz, 0MHzであるため、ESRスペクトルはペンタセンに比べて約2倍広がっている。

それぞれの系でIntegrated Solid Effect (ISE)シーケンスのマイクロ波照射時間、スイープ磁場、マ イクロ波強度の最適化を行ってDNP実験を行った。得られた¹³Cスピン偏極率はダイヤモンドで 0.01%,安息香酸で0.12%であった。Fig.1(b),(c)の塗りつぶし部分は、最適化したISEシーケンスのスイ ープ範囲に相当している。ナノダイヤモンドに含まれるNV中心と窒素不純物の濃度比、およびESR信号 強度比から、塗りつぶし部分における三重項状態の平均の偏極率は約16%と見積もった。Fig. 2(a),(b)に いくつかのISEシーケンスの繰り返し周波数に対するDNP実験結果を示す。10Hzの繰り返し周波 数におけるDNP結果、電子スピンの平均偏極率、スイープ幅から見積もったDNPに寄与する電子 スピンおよび核スピンの割合を用いてISEシーケンスの回あたりの¹³Cスピンへの偏極移動確率を 見積もると、ダイヤモンドの系は安息香酸の系に比べて約3倍高かった。これはNV中心が長いコ ヒーレンス時間を持ち、マイクロ波照射時間が長いことに由来する。¹³CスピンのT₁測定を行うと、 ダイヤモンド中の¹³CスピンT₁は9±14秒、安息香酸中の¹³Cスピン*T*₁に474±30秒であり (Fig. 2 (c))、ダイヤモンド中の¹³Cスピンは安息香酸に比べて5倍短い核スピンT₁であった。講演では、こ れら二つの系のDNPを詳細に議論していく。



Fig. 2 Buildup curves of ¹³C polarization in (a) microdiamonds and (b) [carboxyl-¹³C]benzoic acid for several repetition frequencies of the ISE sequence. (c) Curves of longitudinal relaxation of ¹³C spins in microdiamonds and benzoic acid.

- [1] Kagawa, A. et al., J. Magn. Reson., 309, 106623 (2019).
- [2] Ajoy, A. et al., Science Advances, 4, 5, (2018).

115 分極剤濃度が高磁場DNP効率に与える影響のスピン拡散と緩和を考 慮した高速定量的シミュレーションによる評価 ○深澤隼¹,藤原敏道¹,松木陽¹ ¹大阪大学蛋白質研究所

Effect of biradical concentration on high-field solid-state DNP efficiency as analyzed by a fast and quantitative spin dynamics calculation considering the effect of spin diffusion and relaxation

○Jun Fukazawa¹, Toshimichi Fujiwara¹, and Yoh Matsuki¹ ¹Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

Although NMR signal enhancement by Dynamic Nuclear Polarization (DNP) is theoretically expected to be ~660 times, the ratio of the electron gyromagnetic ratio to that of the proton, actual DNP experiments show lower efficiency. We studied possible causes by using the simulation program we have developed, in which we calculate DNP enhancement by taking account of only the critical spin dynamics exactly and leaving others approximately, under the electron spin relaxation and magic angle spinning. We here present our analysis on the effects of intermolecular electron spin couplings, T_{1e} and T_{1H} depending on sample temperature, ¹H spin diffusion etc. by the numerical simulation, to explain why both too high and too low concentration of biradical is bad for the signal enhancement by DNP.

【序】

動的核分極(Dynamic Nuclear Polarization, DNP)は、電子スピンの分極を核スピンに移すこと によりNMRの感度を向上させる技術である。理論的には¹Hについて最大660倍の核磁化の増大が 期待でき、NMRの解析能力を大幅に向上させる。しかし実験的には、特に数+K以上の温度で高 磁場のマジック角試料回転(MAS)条件において、そのように大きな核磁化増大を得るのは困難 である。DNP効率を向上させるための実験手段としては、スピンハミルトニアンを決める常磁性 分子など試料系や、照射するESRサブミリ波およびNMRラジオ波の周波数、強度などパルスシー クエンスを、スピン系の試料温度依存も考慮して、最適化することが考えられる。高分解能固体 NMRのための高磁場DNPは、DNP用に設計して合成したバイラジカルや、高出力サブミリ波、極 低温での高速試料回転を用いる等の難しさのために、DNP効率向上のための実験的な最適化は容 易ではない。そこで我々は、それら実験パラメータや条件のDNPへの影響を検討して核分極を増 大させるために、効率的な数値シミュレーション法をこれまでに開発した。

MAS条件の高磁場DNPシミュレーションでは、GHzからHzにわたる広大な周波数領域のスピン相互作用を扱うため、高磁場近似を用いても時間領域での厳密な積分は膨大な計算時間を必要とする[1]。これを克服するために、およそMHz級以上のスピン相互作用により共鳴条件のみで生じる短時間状態遷移のみをLandau-Zener方程式を用いて正確に計算し、試料回転や緩和など長時間の事象を粗視化して考慮して計算効率を向上させた。分極剤分子にはTOTAPOL等のバイラジカルを想定し、交差効果が主要機構となる高磁場条件でシミュレーションを行った。

これまでにバイラジカル単分子中の2電子と1核の3スピン系にもう1つのバイラジカル分子の Dynamic Nuclear Polarization, DNP効率, シミュレーション

○ふかざわじゅん,ふじわらとしみち,まつきよう

2電子の影響を加えた5スピン系でDNPの素過程に関する計算を行い、濃度の影響について考察し, DNP効率がバイラジカル濃度に対し極大値を持つことの再現に成功したが、実験結果の再現には 不十分であった。今回はこの結果に加え[']Hスピンの拡散とラジカルによる近傍[']Hスピンの緩和の 促進に関する考察も行った。

【方法】

DNPにおける核の分極機構にはオーバーハウザー効果,固体効果,交差効果があるが,高磁 場固体DNPでは交差効果が主要になる[2]。この交差効果とは2電子のスピンのエネルギー差が核 スピンのエネルギーに等しくなった際に(交差効果条件),電子のフリップフロップとともに核 スピン励起が起こる効果である。これは3スピン系の現象であるため,正確な計算を行うためには 8×8行列のハミルトニアンをナノ秒の積分ステップで解く必要があり、計算量は膨大となりシミ ュレーションに掛かる時間は全く現実的ではないが,これが起こる前後で対象電子の共鳴周波数 変化速度が一定であると近似するとLandau-Zener方程式を用いて磁化交換比率を単純な式で求め ることが出来る。サブミリ波の照射による電子スピンの飽和,電子スピン間双極子相互作用によ るスピン交換および^IHスピンの拡散も同様に近似可能である。

このシミュレーションによると大部分のバイラジカルはDNPに寄与するが、一部は交差効果 条件を満たさず、核の緩和を促進する負の効果をもたらす。この効果をスピンの拡散の効果も含 め考慮する為、系全体の¹Hスピンの磁気的結合を、¹Hとバイラジカル分子がランダムに存在する 系を考え、そのうえで一つ一つの¹Hの磁化成長と緩和を追うことで系全体の¹H磁化の磁化成長を 考察した。

【結果・考察】

^IHとバイラジカル分子がランダムに存 在する系を考え、一定距離以下の間隔に存 在する^IH同士が磁気的に結合しておりその 間でスピン拡散が起こるとする。Fig.1に各 ^IHがバイラジカル分子から何段階の結合で 到達可能かという値でまとめたヒストグラ ムを示す。これにより、濃度についての^IH のスピン拡散による励磁に関して数値的な 考察が可能になる。結合段階が多くバイラ ジカルからのスピン結合的距離が長い^IHほ





ど磁化成長に対する緩和の相対的な効果が大きいと考えられる。

この他に、近傍バイラジカル分子が交差効果を阻害するという機構に関する考察も行う。この緩和の影響も^IHのスピン拡散の影響を受けるため、実際の^IH磁化の成長は両効果の影響を共に 考える必要がある。

References

- [1] K. R. Thurber, R. Tycko, J. Chem. Phys., **137**, 084508 (2012) [2] T. Mary et al. J. Chem. Phys. **128**, 052211 (2008)
- [2] T. Mary, et. al., J. Chem. Phys. 128, 052211 (2008)

116 高磁場・極低温MAS-DNP法の新発展とその応用 〇松木 陽^{1, 2},杉下友晃¹,高橋大樹³,保母史郎³,末松浩人³,藤原敏道^{1, 2} ¹大阪大学蛋白質研究所

- ² 大阪大学先導的学際研究機構
- ³株式会社JEOL RESONANCE

Methods and instruments for ultra-low temperature DNP and its application •Yoh Matsuki^{1, 2}, Tomoaki Sugishita¹, Hiroki Takahashi³, Fumio Hobo³, Hiroto Suematsu³, Toshimichi Fujiwara^{1, 2}

¹ Institute for Protein Research, Osaka University, ² Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, ³ JEOL RESONANCE Inc.

Here, we introduce the first DNP NMR probe with a cold preamplifier and duplexer that enable to combine the sensitivity gain from DNP with that from reduced thermal noise for ultimate sensitivity. In addition, the probe is now triply tuned to ¹H, ¹³C and ¹⁵N for biological multi-dimensional experiments, and functionable with the previously reported closed-cycle helium MAS system for the ultra-low temperature DNP. The preamplifier and duplexer were cooled to ~65 K using the "return" helium gas when the sample was kept at ~40 K. With the RF circuit, amplifier and duplexer all significantly chilled, the thermal noise level was decreased by a factor of more than 2 compared with room temperature measurements. Combining the DNP enhancement factor of ~340 recently obtained at the currently lowest temperature (24 K, 6 kHz MAS) with the Curie enhancement, the depolarization effects together with the reduced thermal noise, the total sensitivity gain exceeded a factor of 3500 at $B_0 = 16.4$ T as compared with the room temperature NMR without DNP.

動的核分極(DNP)法は、電子スピンの高い分極を核スピンに移すことでNMRの感度を向上する発展途上の技術である。マジック角試料回転(MAS)条件下で行う高分解能DNP MAS NMR法は、この20年ほどで方法論と装置の両面で急速な発展を遂げ、中程度の磁場強度(例えば9.4 T、¹H周波数で400 MHz)、液体窒素を用いて得られる100 K程度の比較的マイルドな低温条件で数百倍の感度利得が実現し、主に化学、材料科学の分野で利用され始めた。一方で、蛋白質のような多信号系の分離観測に重要なより高磁場の条件(≫10 T)ではDNP効率が著しく低下する問題があり、長らく新たなブレークスルーが望まれていた。

我々は、従来の液体窒素を使う100 K付近のDNP法から脱却し、ヘリウムを用いる「極低温MAS-DNP法」を開拓、これを先進的なサブミリ波照射システムの開発などと合わせ、高磁場条件(16.4 T,700 MHz)でも1000倍をこえる感度利得が得られることを示した。また電気冷凍機で冷却したヘ リウムガスを常時循環させる「完全閉回路」ヘリウム試料回転装置を開発、希少なヘリウムを消 費せずに極低温(~20 K)MASを実現できるようにした。これらにより、極低温DNP法は高い効率で、 長時間の安定な運用に耐える実用的な技術に発展した。最近では高分極核スピン特有の「高温近 似の破れ」を積極的に利用する手法、すなわち2つの核スピンが勝手に絡み合って生じる「スピ ン相関項」を利用してスピン分極の絶対値を局所的に計測する方法[1]、バルク部分から来る巨大 な背景信号なしに物質の表面のみを選択的に観測する方法[2]など、複数の新手法を開発した。 動的核分極(DNP)、低温プリアンプ、閉回路ヘリウムMAS

○まつき よう、すぎした ともあき、たかはし ひろき、ほぼ ふみお、すえまつ ひろと、 ふじわら としみち 本年度は、この極低温DNPに低温信号検出を組み合わせる初めての試みについて報告 する。新DNPプローブは閉回路ヘリウムMASシステムと接続・運用できる¹H-¹³C-¹⁵N三重共 鳴プローブで、生体試料の超高感度測定を志向している。信号検出系の一部(プリアン プとデュプレクサ)をプローブ本体に内蔵し、スピン高分極化のため試料冷却に用いた 極低温ヘリウムガスを、プローブから排出する直前に検出器の冷却にも用いる一石二鳥 のシステムである。つまり、追加のランニングコストなしに、DNPによるスピン高分極 化と低温検出器による熱雑音低減を同時に実現、NMR感度を更に大きく向上できる。



実験ではトリペプチドMLF微結晶の $^{1}H^{-13}C$ CP測定を室温($T_{sample} = T_{preamp} = 300$ K)と極低温(T_{sample} =40 K, T_{preamp} =65 K) 条件で行い、信号と雑音の絶対強度を比 較した。試料回転サイドバンドなどの重 なりが少ない脂肪族炭素Ca、CBスペクト ル領域について、信号積分値は極低温で 9.4倍に上昇しており(Fig. 1(a))、試料 冷却によるキュリーの効果 *E*_{curie} =300/40=7.5を差し引いた信号増強を 1.25倍と見積もった。一方で雑音強度は peak-to-peak で 1/2.1 に 減 少 (Fig. 1(a); inset)、先の1.25倍と合わせ信号 雑音(S/N)比は約2.6倍向上と求まった。 コイル温度、プリアンプの室温・極低温 におけるノイズ温度と、回路のQ値から は理論上3.8倍程度のS/N比向上が見込 まれ、改善の余地はあるものの予測値を 大きく下回るものではなかった。プリア ンプのノイズ温度は追加の冷却で更に 多少改善の見込みである。

DNPによる信号増強率は、最近最低温 度を更新し、T = 24 K (MAS = 6 kHz)で、 $\varepsilon_{DNP} = 340$ が得られており、試料冷却によ るキュリー効果、DNPの脱分極効果を加 味した実質感度利得 ($\varepsilon_{DNP} \times \varepsilon_{Curie} \times \varepsilon_{\theta}$)は 1360となった (Fig. 1(b))。上記の低温

検出系からの利得を合わせると、DNPなしの室温NMRに対する感度利得は3500倍以上である。これは従来1年の信号積算で得るS/N比を3秒以下で得る感度、あるいは0.5 nmolの ¹³C炭素信号を4回積算で得る感度である。発表では「スピン相関項」を利用する分極絶対値 計測、物質表面選択観測法の応用測定についても最新の結果を紹介する。

[謝辞] 本研究は科学技術振興機構、先端計測分析技術・機器開発プログラムと、文部科学省先端研究基盤共用促進事業による援助を受けて行われた。

[文献][1] T. Sugishita, Y. Matsuki and T. Fujiwara, *Solid State NMR* **99**, 20-26 (2019) [2] Y. Matsuki, T. Sugishita, and T. Fujiwara, *J. Phys. Chem. C* **124**, 18609-18514 (2020) 2L1

Nuclear Surface Acoustic Resonance with Spin-Rotation Coupling 〇武田和行¹, 宇佐見康二² 1京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 2東京大学 先端科学技術研究センター

Nuclear Surface Acoustic Resonance with Spin-Rotation Coupling

Kazuyuki Takeda¹, Koji Usami²

1 Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

2 Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), the University of Tokyo

Abstract

Nuclear spins in a thin specimen put on a surface acoustic wave (SAW) cavity can be resonantly excited and detected through spin-rotation coupling. Since such a SAW cavity can have the quality factor of as high as 10^4 and the mode volume of as small as 10^{-2} mm³, the signal-to-noise ratio in detecting the resonance is estimated to be high, to the extent that detecting nuclear spin resonance of a single flake of an atomicallythin layer of two-dimensional semiconductor, which has so far been beyond hope with the conventional inductive method, can be a realistic target with the proposed scheme.

Overview

An ensemble system of spins S in a macroscopic body rotating at an angular velocity ω is known to be magnetized[1-4] as if it were exposed to a magnetic field $B_{\omega} = \omega/\gamma$, where γ is the gyromagnetic ratio. Development of the magnetization by rotation arises from the spin-rotation coupling. B_{ω} , called the Barnett field, is not a real magnetic field, but is introduced in such a way that the pseudo Zeeman coupling, $-\gamma S \cdot B_{\omega}$, coincides with the spin-rotation coupling $-S \cdot \omega$. The Barnett field is *static* when the body rotates steadily, as illustrated in Fig. 1(a).

Here, we theoretically explore the possibility of accessing nuclear spin resonance through the *alternating* Barnett field in the presence of a conventional, static, polarizing magnetic field B_0 [5]. Now the Barnett field has to be normal to B_0 and be rotating around it at the rate that matches with the Larmor frequency $\omega_0 = -\gamma B_0$, which can be several tens of MHz or even higher. Then, the direction of mechanical rotation needs to be altered one after another very rapidly (Fig. 1(b)). Towards this end, we propose to exploit a surface acoustic wave (SAW) device and attach on it a thin layer containing the nuclear spins of interest. The elastic medium carrying the surface wave undergoes elliptic backward rotation[6] (Fig. 1(c)), and the resultant acoustic vortex field and thereby the Barnett field oscillates at the SAW frequency. The oscillating Barnett field is a superposition of the resonantly rotating and the counter-rotating parts, and the former can cause transition between the spin states, creating spin coherence that leads to a detectable response to the SAW device.

Spin-rotation coupling, Barnett effect, Surface Acoustic Wave (SAW)

○たけだ かずゆき、うさみ こうじ

The presence of the spin-rotation coupling between electron spins and SAW has been predicted and confirmed through generation of alternating electron-spin currents[7]. Importantly, it is *not* the magnetic moment $\mu = \gamma S$ of the spin *but* its angular momentum S that is involved in the spin-rotation coupling. It follows that, for a given angular velocity ω of mechanical rotation, the spin-rotation coupling is independent of the gyromagnetic ratio γ . Therefore, even though the gyromagnetic ratios of nuclei are orders of magnitude smaller than that of electrons, the spin-rotation coupling for nuclei is expected to be comparable to that for electrons.

The proposed approach offers a new mechanism of Nuclear *Surface* Acoustic Resonance (NSAR), distinguishing itself from well-known nuclear acoustic resonance (NAR) in *bulk* materials, where the nuclear spins interact with acoustic waves through the dynamic electrical quadrupole coupling or dynamic Alpher-Rubin coupling[8]. The Barnett field induced by the SAW cavity can be confined in a volume far smaller than the size of the coil used in the conventional NMR experiments[9]. Moreover, the quality factor of the state-of-art SAW cavities can reach 10^4 [9], being two orders of magnitude higher than that of the conventional LC resonator. The small cavity volume and the large quality factor of the SAW cavity potentially leads to the improved signal-to-noise ratio (SNR), and thereby offering a vital tool to characterize structures and dynamics of thin samples.



Fig. 1. (a) Steady rotation causes a static Barnett field, whereas (b) an alternating Barnett field requires change in the direction of rotation one after another. (c) A surface wave is accompanied with alternating rotation.

References

- [1] S. J. Barnett, Phys. Rev. 6, 239 (1915).
- [2] M. Ono et al., Phys. Rev. **B92**, 174424 (2015).
- [3] H. Chudo et al., Phys. Express 7, 063004 (2014).
- [4] M. Arabgol and T. Sleator, Phys. Rev. Lett. 122, 177202 (2019).
- [5] K. Usami and K. Takeda, arXiv:2007.05645 (2020).

[6] K. S. Throne and R.D. Blandford, Modern Classical Physics: Optics, Fluids, Plasma, Elasticity, Relativity,

and Statistical Physics, (Princeton University Press, 2017).

[7] D. Kobayashi et al., Phys. Rev. Lett. 119, 077202 (2017).

- [8] R.A. Alpher and R. J. Rubin, J. Acoust. Soc. Am. 26, 452 (1954).
- [9] M.J.A. Schuetz et al., Phys. Rev. X 5, 031031 (2015).

2L2

Probing local ¹H spin network of rigid solids through ¹H SQ, DQ and TQ coherences 〇西山裕介^{1, 2} 1理研-JEOL連携センター 2株式会社JEOL RESONANCE

Probing local ¹H spin network of rigid solids through ¹H SQ, DQ and TQ coherences •Yusuke Nishiyama ^{1,2}

1 RIKEN-JEOL Collaboration Center 2 JEOL RESONANCE Inc.

¹H high resolution NMR spectra of rigid-solids are readily observed using very fast MAS > 70 kHz. A cluster of protons is ubiquitous due to its high natural abundance and thus, in principle, provides useful information for structural analysis through ¹H-¹H homonuclear correlation experiments. However, the limited ¹H chemical shift dispersion and complex ¹H-¹H network often obscures the local structures. Here we propose a new triple-quantum (TQ) recoupling sequences together with 3D TQ/DQ/SQ experiments to prove local three spin proximities.

¹H double-quantum $(DQ)/^{1}H$ SQ correlation spectra, where all the peaks come from correlated ¹H pairs, are very useful building block [1, 2]. Because of high DQ filtering efficiency (20~30%) of ¹H single pulse), ¹H DQ/¹H SQ correlation block is combinedly used with the other NMR dimensions [3, 4, 5] or used in constant time manner to improve resolution [6]. Similarly to ¹H $DQ/^{1}H$ SQ experiments, ¹H triple-quantum $(TQ)/^{1}H$ SQ experiments are proposed to probe three-spin connectivity [7]. The one of the practical problems of ${}^{1}\text{H}$ TQ/ ${}^{1}\text{H}$ SQ experiments is spectral complexity. The dense ¹H network results in numerous TQ/SQ correlations, making spectral analysis complicated or impossible in a worst case. In addition, low TQ filtering efficiency and intense t₁-noise in the TQ dimension makes TQ experiments very timeconsuming to overcome low signa-to-noise ratio. Although TQ coherence can be produced by applying DQ recoupling sequence to transversal magnetization [8, 9], this procedure distributes coherence to the other odd order coherences. As a result, the TQ efficiency (\sim 5%) is much lower than DQ. Intense t₁-noise is often observed in fast MAS solid-state NMR spectra where a pair of dipolar recoupling sequences is applied, for example, D-HMQC, DQ/SQ, TQ/SQ etc. As the dipolar Hamiltonian depend on the initial rotor phase γ , rotor-synchronization of sequences are needed to achieve perfect refocusing of dipolar Hamiltonians. However, instantaneous MAS fluctuation hampers rotor-synchronization, resulting in t₁-noise.

Here we first propose a novel TQ recoupling sequences to improve the TQ filtering efficiency by using three spin TQ Hamiltonian [10] then apply to novel 3D 1 H TQ/ 1 H DQ/ 1 H SQ correlation experiments to facilitate the TQ spectral interpretation [11].

Fast MAS, t1-noise, multi-quantum

oにしやま ゆうすけ

TQ Hamiltonian can more efficiently excite TQ coherences than DQ Hamiltonian, since the application of TQ Hamiltonian to longitudinal magnetization only produces 3N (N: integer) coherences, minimizing leakage to unwanted coherences. Although TQ Hamiltonian cannot be the first order, it is shown that second order average Hamiltonian can be used to design TQ recoupling sequence [12, 13] and demonstrated on ¹H adamantane and fully ¹³C labelled samples at moderate MAS rate. We have designed TQ recoupling sequences robust to t₁-noise. Since all the first order anisotropic Hamiltonian inevitably depend on the initial rotor phase, this t₁-noise is unavoidable. However, the rotor phase dependence can be removed in the second order average Hamiltonians, here we call γ -free sequence. We have designed γ -free ¹H TQ sequence and found that the TQ filtering efficiency (20~30%) can be comparable to DQ filtering efficiency (Fig. 1) [13]. The γ -free TQ/SQ spectra shows significantly low t₁-noise.



Fig. 1

¹H solid-state NMR spectra of N-acetyl-L-alanine at 70 kHz MAS. ¹H spin echo (black) and γ -free ¹H TQ filtered spectra using (red) R24₃⁸ and (green) R30₆¹⁰ are shown at the same vertical scale. TQ filtering is achieved by using second-order γ -free sequences. The variation of TQ filtering efficiency reflects the local three spin topology through different second order scaling factors.

References:

[1] Review: S.P. Brown, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosco. 50 (2007) 199-251.

[2] K. Saalwachter, F. Lange, K. Matyjaszewski, C.-F. Huang, R. Graf, J. Magn. Reson. 212 (2011) 204-215.

[3] M. Malon, M.K. Pandey and Y. Nishiyama*, J. Phys. Chem. B 121 (2017) 8123-8131.

[4] Y.-l. Hong, T. Asakura, Y. Nishiyama*, ChemPhysChem 19 (2018) 1841-1845.

[5] R. Zhang, † N.T. Duong, † Y. Nishiyama*, A. Ramamoorthy*, J. Phys. Chem. B. 121 (2017) 5944-5952.

[6] H. Colaux, Y. Nishiyama*, Solid State Nucl. Mang. Reson. 87 (2017) 104-110.

[7] U. Freidrich, I. Schnell, D.E. Demco, H.W. Spiess, Chem. Phys. Lett. 285 (1998) 49-58.

[8] M. Carravetta, J.S. auf der Gunne, M.H. Levitt, J. Magn. Reson. 162 (2003) 443-453.

[9] R. Tycko, J. Magn. Reson. 139 (1999) 302-307.

[10] Manuscript in preparation. Strong collaboration with Vipin Agarwal and Rongchun Zhang.

[11] R. Zhang*, N.T. Duong, Y. Nishiyama*, J. Magn. Reson. 304 (2019) 78-86.

[12] M. Eden, Chem. Phys. Lett. 366 (2002) 469-476.

[13] A. Brinkmann, M. Eden, J. Chem. Phys. 120 (2004) 11726-11744.

高温NMRによるフッ化物イオン伝導体の焼成過程のその場観測

2L3

〇村上美和 京都大学産官学連携本部

High temperature NMR studies on phase transition and dynamics in fluoride ion conductor

oMiwa Murakami

Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University

PbSnF₄ has long been known to show high anionic conductivity at room temperature, and recently, we applied solid-state NMR to study ion dynamics in tetragonal PbSnF₄ (β -PbSnF₄) and showed that the conductivity is defect-driven. It was also reported that cubic PbSnF₄ (γ -PbSnF₄) can be obtained by mechanical milling of SnF₂ and PbF₂ without thermal annealing. Further, annealing of the γ form at 200 °C leads to the β -PbSnF₄. Phase transition and ion dynamics in γ -PbSnF₄ is examined by using ¹⁹F/¹¹⁹Sn/²⁰⁷Pb solid-state NMR at 7 T and 14 T. By comparing with the corresponding NMR data of the β -PbSnF₄, we show that, while local structures around both Sn and Pb atoms are similar in the two forms, ion dynamics are markedly different. Further, we show that the γ -to- β phase transition is preceded by slowing down of a part of mobile fluoride ions at temperature ca. 100 °C below the transition temperature observed by DSC.

1. 緒言

室温付近で高いイオン伝導性を示すPbSnF4は、主に α (monoclinic)、 β (tetragonal)、 γ (cubic)の3つの結晶系 が報告されている¹。最近我々は、 β 相(Fig.1a)につい て、¹⁹F、¹¹⁹Sn、²⁰⁷PbのNMR線形やスピン格子緩和時間(*T*₁) の温度・磁場依存性を解析することにより、イオン伝導機 構がフッ素の欠陥の拡散であることを示した²。また、藤 崎らは中性子回折の解析から、ボールミルで原料を粉 砕混合して作製した試料が γ 相(Fig.1b)であり、Snと Pbが等価な構造であること、この γ 相を熱処理するこ とによって β 相が得られることを報告した³。本研究で は、NMR線形や*T*₁を用いて γ 相と β 相の構造とダイナミク



Fig.1 Crystal structure of β - (a) and γ -PbSnF₄ (b)

スを比較するとともに、高温NMR測定と複数核の同時観測を適用したPbSnF4の熱処理過程のその場観測を行うことにより、相転移挙動とダイナミクスの関係を解析した⁴。

2. 実験

γ-PbSnF₄はPbF₂とSnF₂をボールミルで粉砕・混合して作製した。β-PbSnF₄は、γ-PbSnF₄をアルゴ ン雰囲気下、200℃で焼成することにより合成した。NMR測定はJEOL社製ECA600 (14 T)と OpenCore NMR (14 T, 7T)で行った。

高温NMR測定、イオン伝導体、相転移挙動

○むらかみ みわ

3. 結果および考察

Fig.2のtopに β および γ 相の¹¹⁹Sn, ²⁰⁷Pb MAS NMR スペクトルを比較した(β :灰色、 γ :黒)。 γ 相の ²⁰⁷Pbはよりブロードな線形を示し、Pbの局所構造 の乱れを示唆している。一方、¹¹⁹Snの線形は β 相の サイドバンドパターンの包絡線になった。これ は、 γ 相のSnの局所構造が β 相と類似していること を示している。つまり、 γ 相の中性子回折では、Pb とSnが等価な構造が示唆されているのに対して、 ¹¹⁹Snと²⁰⁷PbのNMRの線形はSnとPbの局所構造に は違いがあることが示された。特に¹¹⁹Snの線形 は、 γ 相でも β 相と同様にSnの片側にFが配置して いる構造をとるものが多いことを示している。

次に、γからβへの構造転移を評価するために、γ 試料 を室温から200℃まで昇温して2時間保持した後、降温 していく過程をNMRでその場観測した(Fig.2の上から 119 Sn 50 °C 207 Pb Market Market So °C 400 °C 400

Fig.2 Temperature dependence of $^{119}Sn/^{207}Pb$ MAS NMR spectra of β -(grey) and γ -PbSnF4 (black)

下)。125℃で明確にβ相の線形が現れ、NMR線形からみた相転移温度は100℃から125℃の間であ ることがわかった。これはDSCで観測された相転移温度(137℃)に近かった。室温に戻した試料 のスペクトルはβのスペクトルに良く一致し、200℃で2時間という熱処理がγからβへの構 造転移に十分であることが判った。

Fig.3にγ相とβ相の T_1 の温度依存性を示した。NMR線形からは両者の局所構造が似ていることが示されたが、ダイナミクスは全く異なることが分かる。β相の¹¹⁹Snと²⁰⁷Pbでは観測温度範囲内に見られた T_1 の極小値がγ相では見られなかった。また、低温ではγ相の¹⁹Fの T_1 が長いが、温度を上げると50℃付近でβ相に追いついた。これは低温では遅いγ相のFの局所的な運動が

50℃付近でβ相での運動と同じになったことを示 している。NMRで¹⁹Fを直接観測した場合、Fの複 雑なダイナミクスが様々な運動の区別を難しく するため、講演ではCP測定の結果を使って、昇温 に伴うγ相のPb近傍のFの運動性の低下を説明す る。つまり、γ相からβ相への相転移は、NMR線形やDSC で観測される温度より低い温度で起こるFの運動性の 低下に起因すると考えている⁴。

謝辞:この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産 業技術総合開発機構(NEDO)の委託事業「革新型蓄電 池実用化促進基盤技術開発(RISING2)」(JPNP16001) の結果得られたものです。

- (1) J.M. Reau et al., Mater. Res. Bull. 13, 877 (1978).
- (2) M. Murakami et al., J. Phys. Chem. C 121, 2627 (2017).
- (3) F. Fujisaki et al., J. Solid State Chem. 253, 287 (2017).
- (4) M. Murakami et al., Sold State Ionics 355, 115398 (2020).

Fig.3 Temperature dependence of 19 F (circle), 119 Sn (triangle), and 207 Pb (square) T_1 for the γ form (filled) and the β form (open).

2L4 固体NMRによる内向きプロトンポンプロドプシン Schizorhodopsinのレチナール結合サイトの構造解析 ○但馬 聖也¹,神取 秀樹²,井上 圭一³,川村 出¹ 1 横浜国立大学 大学院理工学府 2 名古屋工業大学 3 東京大学

Structure of retinal chromophore in Schizorhodopsin as studied by solid-state NMR

Seiya Tajima ¹, Hideki Kandori², Keiichi Inoue³, Izuru Kawamura¹ *1 Yokohama National University, Graduate School of Engineering Science 2 Nagoya Institute of Technology 3 The University of Tokyo*

Schizorhodopsin (SzR) found from Asgardarcheota is a light-driven inward proton transporter. SzR has a unique Phe-Ser-Glu (FSE) motif around retinal, which motif is related to the function of rhodopsin. Moreover, SzR has Tyr71 on the extracellular side of the protonated Schiff base unlike typical rhodopsins, and the Y71F mutation induces a large blueshift and decreases pump activity. Here, we conducted solid-state NMR measurements of SzR embedded into POPC/POPE membrane and revealed the structure of hydrogen network around retinal in SzR. ¹⁵N NMR signal of protonated Schiff base in Y71F mutant appeared at lower resonance than WT-SzR1 and ¹⁵N NMR signals of Arg67 in Y71F disappeared. Our results indicated that Y71F mutant has a stronger interaction between Asp184 and protonated Schiff base and perturbs the hydrogen bond network involving Arg67. We showed that the Tyr71 plays an essential role in color tuning and the pump activity.

【緒言】

ロドプシンとはシッフ塩基結合 を介してタンパク質に結合したレ チナールを発色団として持つ7回膜 貫通型タンパク質である。ロドプ シンは光吸収によりレチナールが 異性化し、それをきっかけにして タンパク質の立体構造が変化する ことで、イオンポンプやシグナル 伝達など様々な機能を発現する。 近年では数多くの微生物型ロドプ シンが発見され、どのような機能



Fig. 1 Structure of the retinal binding site in BR (left) and SzR4 (right)^[2].

を発現するかはレチナール結合サイトの構造の違いが要因の一つとされる。

固体NMR、7回膜貫通型タンパク質、プロトン化シッフ塩基

○たじま せいや、かんどり ひでき、いのうえ けいいち、かわむら いずる

シゾロドプシンSchizorhodopsin(SzR)ファミリーはアスガルド属古細菌から見つかっ た微生物型ロドプシン群であり、最初に調べられたSzR1をはじめとして、SzRは細胞内 側にプロトンをポンプする^[1]。SzRはSer-Phe-Glu(SFE)モチーフを持ち、従来の外向きプ ロトンポンプロドプシンBRや内向きプロトンポンプロドプシンPoXeRなどいずれのロ ドプシンタンパク質と比べてレチナール周辺のアミノ酸配列が大きく異なっている。ま た、SzRは従来の内向きプロトンポンプより極めて輸送活性が高く、神経科学などで重 宝される光遺伝学の新たなツールとしても期待されている。

一方でどのような機構で内向きにプロトンを輸送するのかは不明である。本研究では、 細胞膜に埋め込んだSzRの固体NMR測定を実施し、SzRのレチナール結合サイトの構造 解析を行った。特にSzRのシッフ塩基の細胞側に存在するTyr71に着目した。この理由は 他の微生物型ロドプシンはこの位置にトリプトファンを持ち、SzRにユニークなアミノ 酸残基である。また、SzR1と相同性の高いSzR4の結晶構造が発表された^[2]。この変異体 Y71Fではレチナールの極大吸収波長が約20 nmほど短波長シフトし、内向きH⁺輸送活性 が大幅に減少する。本研究では野生型SzRとその変異体Y71Fの固体NMRスペクトルを比 較し、レチナール結合サイトの構造変化を調べ、Tyr71が水素結合ネットワークの維持 において重要な役割を有することを示した。

【実験手法】

大腸菌発現系によりU-¹⁵N, [ζ -¹³C]Tyr, [¹³C14, ¹³C20]Retinal-野生型SzR1およびSzR4、 U-¹⁵N, [14,20-¹³C]Retinal-SzR1-Y71F変異体を発現・精製した。この際、プロトン化シッフ塩基の¹⁵N信号とHisのイミダゾール環のピロール型窒素の信号との重なりを避けるために、Hisはリバース標識(非標識)している。次にPOPG:POPE=1:3の混合脂質膜を準備し、タンパク質と脂質をモル比1:20で再構成し、水和した膜試料を直径4.0 mmのジルコニア製MASローターにパッキングした。固体NMR測定では¹⁵Nおよび¹³C CP-MAS法とDARR法を用いた。測定にはBruker Advance III 600 MHzで4.0 mm E-free ¹H-¹³C-¹⁵N三重共鳴プローブを用いてMAS周波数10 kHz, プローブ設定温度5 ℃にて全て暗状態で測定を行った。¹³Cはアダマンタンを40.48 ppm (DSS), ¹⁵Nの基準はNH4Clを38.34 ppmとした。

【結果・考察】

① レチナールの構造

まず¹³C CP-MAS法とDARRにより、 野生型SzR1レチナールのC20は15.8 ppmに、C14は124.4 ppmにピークが現れ た。レチナールのC14,C20はレチナール の配座によってピーク位置に影響し、 SzR1の13-trans,15-anti型であることが 示唆された。対して、Y71F変異体では レチナールのC20が15.2 ppmに、C14が 124.8 ppmに野生型とほぼ同じ化学シフ ト値を示し、Y71F変異によってレチナ ールの構造は大きく変化しないことが 分かった。



Fig. 2 DARR of [ζ-¹³C]Tyr, [14,20-¹³C]Retinallabeled wild-type SzR1(Mixing time: 500 ms)

② Tyr71の水素結合様式

Fig. 2には野生型SzR1の¹³C DARRスペクトル(混合時間 500 ms)を示す。レチナールのC14とC20 との交差ピークに加えて、Tyr Cζとの交差ピークが156.4 ppmに観測された。この混合時間では長 距離の¹³C炭素間の交差ピークを示す^[3]。結晶構造によると^[2]、レチナールの14位と20位とともに7 Å以内に存在するTyr CζはTyr71しかないため、このピークをTyr71と帰属した。TyrのCζ位の化学 シフト値はTyrの水素結合様式に鋭敏に影響を受ける^[4]。チロシンの水酸基が水素結合ドナーとし て強く作用している場合には約160 ppmに、チロシンが水素結合していないまたは水素結合アクセ プターとして働く場合には約156 ppmにピークが現れる。そのため、SzR1のTyr71は水素結合アク セプターとして作用していると考えられる。

③ レチナールのプロトン化シッフ塩基の化学シフト

¹⁵N CP-MASでは、野生型SzR1のシッフ塩基(SB)のピークは163.1 ppmに現れた。シッフ塩基の化学シフト値はロドプシンの極大吸収波長と一定の相関があり、光吸収が長波長側にシフトするにつれて高磁場シフトする^[5]。また、プロトン化シッフ塩基結合を持つレチナールのモデル化合物はアニオンサイズと相関を持ち(Fig.4 点線)、右上側にプロットが位置する場合は対イオン相互作用が弱く、左下側に存在する場合は対イオン相互作用が強くなる傾向にある。SzR1の化学シフト値と極大吸収波



Fig. 3 ¹⁵N NMR signals of protonated Schiff base of wild-type SzR1(above) and Y71F mutant (below).

長をプロットしたところ、プロトン化シッフ塩基とその対イオンとして考えられるAsp184間の相 互作用が他の微生物型ロドプシンよりも弱いことが示唆された。これはSzR4でも同様の傾向であ った。

また、極大吸収波長が短波長シフ トしたY71F変異体では170.2 ppmに 現れ、野生型より7 ppmほど低磁場 側であった。そのため、Y71F変異体 では野生型と比較して対イオンで あるAsp184がシッフ塩基に近づ き、シッフ塩基と対イオンの相互作 用が強まったことが示唆された。こ れによって、レチナールと周辺アミ ノ酸残基との相互作用が変化した ことが考えられるため、周辺アミノ 酸残基のNMR信号を解析した。





④ <u>Arg67の周辺との相互作用</u>

野生型のSzR1ではArgのη位のピー クは71.4 ppmに加え、高磁場側の66.9 ppmと低磁場側の74.8 ppmに分裂した 2つのピーク(Wing Peak)も観測され た。Wing PeakはArgのグアニジル基の Nη1とNη2が周辺残基との相互作用に より等価でなくなるために現れる^[6]。 このようなwing peakはBRやKR2など のロドプシンにおいても観測されて いる。対して、Y71F変異体ではFig.5 に示すようにWing Peakは観測されな かった。そのため、Y71F変異によっ



Fig. 5 A comparison of Arg $^{15}N\zeta$ and $^{15}N\eta$ NMR signals between wild-type SzR1(above) and Y71F (below).

て、これに関わるArg67など周辺の水素結合ネットワークが変化し、Asp184がプロトン化シッフ塩 基(pSB)に近づく変化が固体NMRで観測されたと考えられる(Fig. 6)。固体NMRで観測したレチナ ールのシッフ塩基や周辺の水素結合ネットワークの変化は内向きプロトンポンプ活性に関与して いることが明らかとなった。

【結論】

本研究では光駆動型内向きプロトンポンプ SzR1の固体NMR測定により、SzR1のレチナー ルシッフ塩基近傍に存在するTyr71がシッフ 塩基やその周辺残基との水素結合ネットワー クを支える残基であることを示し、このこと がSzR1の波長制御や内向きプロトンポンプ機 能に重要な役割を果たしていることが示唆さ れた。



Fig. 6 View of the retinal-binding site of SzR1. The possible movement of Asp184 approaching pSB due to the Y71F mutation is shown by a pink arrow.

【参考文献】

[1] K. Inoue et al. (2020) Schizorhodopsins: A family of rhodopsins from Asgard archaea that function as light-driven inward H⁺ pumps. *Sci. Adv.* 6, eaaz2441.

[2] A. Higuchi et al. (2020) Crystal structure of schizorhodopsin reveals mechanism of inward proton pumping. BioRxiv, https://doi.org/10.1101/2020.07.28.224907

[3] K. Takegoshi et al. (2001) ¹³C⁻¹H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chem. Phys. Lett.* 344, 631–637

[4] J. Herzfeld et al. (1990) Solid-state carbon-13 NMR study of tyrosine protonation in dark-adapted bacteriorhodopsin. *Biochem.*, 29, 5567-5574

[5] J.G. Hu et al., (1997) The predischarge chromophore in bacteriorhodopsin: a ¹⁵N solid-state NMR study of the L photointermediate. *Biochem.*, 36, 9316-9322

[6] A.T. Petkova et al., (1999) Arginine Activity in the Proton-Motive Photocycle of

Bacteriorhodopsin:Solid-State NMR Studies of the Wild-Type and D85N Proteins. *Biochem.*, 38, 1562-1572

2L5 パルス磁場勾配NMRによるコーヒー粕由来脂質成分の自己 拡散係数測定 〇金井 典子¹, 川村 出¹, William S. Price²

- 1. 横浜国立大学大学院 理工学府
- 2. Nanoscale Group, Western Sydney University, NSW, Australia

Self-diffusion coefficients of the lipid fraction extracted from spent coffee grounds by pulsed gradient spin-echo NMR

o Noriko Kanai¹, Izuru Kawamura¹, William S. Price²

1. Graduate School of Science and Engineering, Yokohama National University

2. Nanoscale Group, Western Sydney University, Penrith, NSW, Australia

Pulsed gradient spin-echo NMR is a convenient and noninvasive means to measure selfdiffusion coefficients of molecules in solution based on random translational motion. In this study, we determined the diffusion coefficients of lipid fraction extracted from spent coffee grounds with the pulsed gradient stimulated-echo (PGSTE) and double stimulated echo (DSTE) sequences. Triacylglycerols and diterpenes, which may be in form of fatty acid esters in the lipids,¹ give similar diffusion coefficients. These diffusion experiments will complement the characterization of the extracted lipid fraction.

【緒言】 分子の自己拡散は、熱運動によって駆動されるランダムな並進運動である。 パルス磁場勾配NMR(PGSE NMR)ではこのような並進拡散によるミリ秒~秒オーダーの 運動に基づいた分子の自己拡散係数(D)を測定することができる²。

我々はPGSE NMRを用いることで、コーヒー粕に含まれる脂質主成分のトリアシルグ リセロール(TAG)の運動性を評価し、抽出したTAGを水中油滴型エマルションに用いて、 その液滴サイズ分布を調査することを目指している。本発表ではその予備検討として、 有機溶媒に溶解させた脂質画分のPGSE NMRによる拡散測定を行い、TAGおよびその他 の微量に含まれる生理活性物質の自己拡散係数を決定した。また、固体NMRおよび GC/MSによるTAGの脂肪酸組成分析についても報告する。



Fig. 1. (a) DSTE and (b) PGSTE sequences with half-sine shaped gradient pulses.

脂質、磁場勾配NMR、自己拡散係数

oかない のりこ、かわむら いずる、William S. Price



Fig. 2. Typical (a) ¹H-DSTE and (b) ¹H-PGSTE spectra of the extracted lipid fraction. As the intensity of the applied gradient increases, the echo intensity decreases due to the effect of diffusion. (c) Self-diffusion coefficients (D) were determined by regression of the function onto the attenuation of the echo signal (E).

【実験】 乾燥させたコーヒー粕10 gをn-ヘキサン中において室温で十分に攪拌させた 後、上澄み液を減圧除去し、約1.0 gの脂質画分を抽出した。この脂質を10 mg/mlの濃度 で、DMSO-d₆およびCDCl₃(D, 99.8%)に溶解させた二種類の試料を調製し、それぞれBBI、 diff30プローブを備えた500 MHzの分光計(Bruker Avance II)で¹H NMR拡散測定を行った。 CDCl₃中脂質試料には、対流効果を最小限に抑制できる二重誘導スピンエコー法(DSTE) を使用し、DMSO中脂質試料には、誘導スピンエコー法(PGSTE)を使用した(Fig.1)^{2,3}。全 ての拡散測定を2回繰り返し、脂質画分に含まれる各成分のDを決定した。

【結果および考察】 DSTE法で測定したスペクトルでは、コーヒー粕中で測定した脂 質の固体¹H MAS NMR⁴と類似した、TAGを主とするやや幅広なピークが得られた(Fig. 2 a)。これは、脂質画分がCDCl₃に十分に溶解しなかったことが原因と考えられる。しか し、TAG由来のピークから決定されたDは、(5.32±0.02)×10⁻¹⁰ m²s⁻¹であり、本脂質試料中のCDCl₃ と既知のCDCl₃のD⁵が近い値を示したことは、TAGのDの信頼性を保証している。

PGSTE法では、TAGに加えて微量成分のジテルペン類のカーウェオールおよびカフェストール、 さらにカフェインのシグナルから自己拡散係数を決定することができた(Fig. 2 b, c)。オーバーラ ップしたピークに関しては、双指数関数を用いた解析がさらに必要であると考えられる。この手 法で決定されたTAGのDは、(2.52±0.04)×10⁻¹⁰ m²s⁻¹であり、ジテルペン類のDはこれに極めて近 い値を与えた。ジテルペン類が遊離脂肪酸にエステル結合している報告¹もあり、様々な生理活性 を持つジテルペン類の構造を明らかにすることは興味深い点である。現在、GC/MSや二次元NMR 測定などの結果を組み合わせて、詳細な構造を解析中である。討論会ではこれらの構造解析デー タも含めて自己拡散係数について議論したい。

¹ Wang, X. et al., Food Chem. **2018**, 263, 251-257. ² Price, W. S., *NMR Studies of Translational Motion: Principles and Applications*, 1st ed., Cambridge University Press, Cambridge, 2009. ³ Jerschow, A.; Müller, N., J. Magn. Reson. **1997**, 9, 299-336. ⁴ Kanai, N. et al., *Biosci. Biotech. Biochem.* **2019**, 83, 803-809. ⁵ Virk, A. S. et al., J. Mol. Liq. **2016**, 214, 157-161.

2L6 好冷性細菌 Anabaena variabilis 由来のグリシンリッチドメインを持たない RNA 結合タンパク質 RbpD の溶液構造の特徴 〇森田 勇人¹,田中 邑樹¹,古板 恭子²,杉木 俊彦²,児嶋 長次郎^{2,3} 1 城西大学 大学院理学研究科 2 大阪大学 蛋白質研究所 3 横浜国立大学 大学院工学研究院

Structural features of cyanobacterial RNA binding protein, RbpD, lacking glycine rich domain, from *Anabaena variabilis*.

•Eugene Hayato Morita¹, Yuki Tanaka¹, Kyoko Furuita², Toshihiko Sugiki², Chojro Kojima^{2,3} I Graduate School of Science, Josai Unviersity

2 Institute for Protein Reearch, Osaka Unviersity

3 Faculty of Engineering, Yokohama National University

RNA-binding proteins are involved in proper control of gene expression, development, stress response, and so on. In cyanobacterium *Anabaena variabilis*, low temperature induces the expression of *rbp* gene family, including *rbpD*. However, the exact time-course and extent of response to cold were different among these genes. On the structural point of view, Rbps other than RbpD consist of an N-terminal RNA recognition motif (RRM) and a C-terminal glycine rich domain. RbpD only consists of an RRM domain. To elucidate the structural and functional differences of RRMs between RbpD and other Rbps (such as RbpA1 [1]), we solved the solution structure of RbpD overexpressed in *E.coli*, with heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy.

【緒言】

藍色細菌 Anabaena variabilis は、生育温度を 38℃ から 22℃ に低下させると低温 環境への適応の一環として、一連のRNA結合タンパク質をコードする遺伝子群(rbps)の発 現が誘導されることが知られている。これらのRNA結合タンパク質は、低温による発現誘 導が誘導される点では共通しているが、その発現の時間応答性や発現レベルについては 個々に異なっている。一般的に、RNA結合タンパク質は、様々な環境変化における遺伝子 発現調節、ストレス応答、細胞分化などに関与していることが知られており、rbpsがコー ドするタンパク質群(Rbps)も同様の機能を持っていることが考えられている。

Rbpタンパク質群をそのアミノ酸配列に基づく構造の観点から比較してみると、RbpD以 外のタンパク質は、1つのRNA結合モチーフ(RRM)と1つのグリシンリッチドメインか ら構成されているのに対し、RbpDは1つのRRMのみから構成されており、同じRRMでも RbpDとそれ以外のRbpタンパク質群の間では、構造や機能に差異があることが推測され た。本研究ではRbpDの溶液構造を解析することで、グリシンリッチドメインを持つRRM との溶液構造・生理機能との差異について考察することを目的とした。

藍色細菌1、RNA結合モチーフ2、溶液構造3

○もりたはやと、たなかゆうき、ふるいたきょうこ、すぎきとしひこ、こじまちょうじろう

【方法】

「試料調製」

RbpD をコードする遺伝子断片をpET-21aに組み込むことで作成した大腸菌大量発現用プラス ミドを大腸菌 Rosetta-GamiTMB (DE3)/pLysS に形質転換することで RbpD の大腸菌大量発現系 を構築した。構築した発現系を用いて M9 培地中で培養を行うことで、¹⁵N単独または¹⁵N/¹³C二 重標識 RbpD を作成した。作成した安定同位体標識 RbpD は、RbpD を発現した大腸菌を超音 波破砕後可溶性画分を高速遠心で分離し、ポリエチレンイミンならびに硫安分画処理を行うこと で粗精製を行い、その後陰イオン交換 (HiTrap Q_{FF}) ならびにサイズ排除 (HiLoad Superdex 75_{pg}) カラムクロマトグラフィーを行うことで 95% 以上の純度で抽出した。

「NMR測定ならびに構造計算」

精製した安定同位体標識 RbpD は、限外ろ過法で 0.2~0.25 mM に濃縮した。濃縮サンプルを 用いて大阪大学蛋白質研究所に設置されている AVANCEIII 800MHz (Bruker; Cryo Probe)により、 主鎖の帰属を行うための、¹H-¹⁵N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCACB, CBCA(CO)NHならびに、 側鎖の帰属を行うための、¹H-¹³C HSQC(aliphatic* & aromatic)、HBHA(CACO)NH, HCCH-TOCSY (aliphatic & aromatic)を測定した。溶液構造を計算するために必要なNOE情報は、主鎖、側鎖の帰 属 (MagRO-FLYAの自動帰属並びに手動による修正) に基づき、¹³C-edited NOESY (aliphatic & aromatic), ¹⁵N-edited NOESY の自動帰属により収集した。さらにtalos+による主鎖の二面各情報も 含めることでCYANAを用いた溶液構造計算を行い、自動帰属のミスを発見・修正することで最適 構造を求めた。

【結果と考察】

NOE distance restraints	
Intra (i-j =0)	274
Sequential (i-j =1)	295
Medium range (1< i-j <5)	139
Long range (i-j >4)	278
total	986
Dihedral angle restraints	
ф	62
ψ	62
total	124

図1 構造計算に用いた制限情報数



図2 最小エネルギー構造のリボン図

図1に示す距離並びに角度の制限に関する情報を入力することで、図2に示すRbpDの溶液構造 を求めることに成功した。アミノ酸配列で保存性が高いことが知られている大麦由来RRM+グリ シンリッチ領域タンパク質(今回構造解析に成功した原核生物のRRMの高等生物版)につい ては、その立体構造情報が得られていることから、両者の比較を行うことで、構造が強固な 部分の保存性ならびにグリシンリッチドメインとの接合部位周辺の構造の流動性について検 討を進めており、その結果について報告する。

【参考文献】

[1] E.H, Morita et al. J. Biomol. NMR 17 (2000) 351-352.

2L7高速・高精度なMagROによるNMR構造解析の完全自動化 ○小林直宏¹、杉木俊彦²、南慎太朗³、佐久間航也^{3,5}、長島敏雄¹、 児嶋長次郎⁴、藤原敏道²、小杉貴洋³、古賀理恵³、古賀信康^{3,5}、山崎俊夫¹ 1理化学研究所 放射光科学研究センター 2大阪大学 蛋白質研究所 3自然科学研究機構 生命創成探求センター 4横浜国立大学大学院 工学研究院 5総合研究大学院大学

Fast and accurate analysis of automated NMR structure study

 Naohiro Kobayashi¹, Toshihiko Sugiki², Shintaro Sakuma³, Koya Minami³, Toshio Nagashima¹, Chojiro Kojima⁴, Toshimichi Fujiwara², Takahiro Kosugi³, Rie Koga³, Nobuyasu Koga³ and Toshio Yamazaki¹ 1RIKEN, RIKEN Spring-8 Center
 2Institute for Protein Research, Osaka University

3ExCELLS, NINS.

4Graduate School of Engineering, Yokohama National Universitys 5SOKENDAI

The process of NMR structural analysis in solution consists of measurement, data processing, signal detection and assignment, generation of distance and dihedral angle constraints, calculation of structural models, and evaluation of consistency with measured experimental data. A variety of automated methods and tools have been developed, if the protein is a small protein (5~15kDa) with good properties (high concentration, high solubility and so on), the process can be completed within a few weeks, but there is still room for further improvement. In this study, we have automated the entire process of structure determination, focusing on 13 artificial protein structures with novel folds, and have achieved a maximum throughput of 3~4 days for complete signal assignments and structure determination, supported by nonlinear sampling and deep learning techniques. This is an important milestone in the automation of NMR



自動化、深層学習、人工蛋白質

○こばやし なおひろ、すぎき としひこ、みなみ しんたろう、さくま こうや、ながしま と しお、ふじわら としみち、こすぎ たかひろ、こじま ちょうじろう、こが りえ、こがのぶ やす、やまざき としお 溶液NMRの構造解析行程はスペクトル測定、データ処理、信号検出・帰属、距離・二面角制限な どの作成、構造モデル計算、実測データとの整合性評価から構成される。様々な自動化手法、ツ ールが開発され今日では性質の良い小型タンパク質(5~15kDa程度)なら数週間あれば高精度に完 了できるが、手作業に頼らざるを得ない工程は数多く存在し、客観的評価方法の確立も今持って 十分ではないため、更なる高速化の余地や課題は残されている。本研究では新規フォールドを有 する13件の人工タンパク質構造解析(Fig.1)を中心とした高速かつ高精度な構造決定全行程を自動 化し、非線形サンプリング法や深層学習技術による支援によって最速で3~4日で完了するという 高速化を実現・実践した。これらの解析を通じて確立されたストラテジーはNMR構造解析の自動 化における重要なマイルストーンとなりうるだろう。

本研究では分子研古賀らのグループによって設計された熱安定性、溶解度ともに優れた新規フ ォールドの人工タンパク質群を対象とする[1,2]。それぞれ解析直前まで配列を解析者が知ること なく600~900MHz Cryo-probeのマシンを用い1~2週間で測定を実行する。測定に際しては自動化に よる信号帰属を行うために極力少ない測定実験 (Fig.2) に絞ることでデータ間・装置間で生じる オフセットズレなどを最小限に抑える。また非線形測定(NUS)を用いることで3Dでは25%ほどの 測定期間短縮を実現し、ISTあるいはILRSによるデータ復元を実行する。続いてMagRO [3,4] によ る深層学習技術を用いた高速信号検出と信号折り返し復元機能で高精度なNMRピークテーブル を用意する。アミノ酸配列、全ピークテーブルを用いて初期工程ではFLYA計算を実行する。続い てMagROによりFLYA計算による出力結果を選別抽出し、TALOS+による主鎖二面角予測計算を実 行後にCYANA計算を実行する。中間工程では初段で計算されたCYANA構造を元に3D-NOESYピ ークテーブルを自動的にリファインさせる[5]。最終工程では¹H-¹⁵N RDCをPALESにより構造との 再現性を評価する(全ての構造でrms>0.9, Q-value<0.4)。RDCのデータ処理工程も自動化され信号が 重なっていても深層学習により厳密な信号位置を特定可能である。この指標に加え設計構造との 比較(全て構造で収束部位での違いはrmsd(Cα)<1.5Åであった)を最終的に設計者が行うことで構 造の正しさを二重に検証することになる。更にAmberによる一般化ボルンを用いる短め(30ps)の MD計算を経てPDB登録可能なレベルまで達することができた。13件中、10件は10日以内の測定・



<Spetra@600MHz> 2D: ¹³N-HSQC, ¹³C-HSQC 3D: BEST-HNCACB, BEST-HNCACB(CO), BEST-HNCO, HCCH-TOCSY, ¹⁵N-edited NOESY, ¹³C-edited NOESY <Spectra@900MHz> 2D: IPAP-¹⁵N-HSQC

Fig.2 Time line of NMR measurements, assignment analysis and structure calculations for the most successful case (nfH02).

SP: spectrum acquisition, AS: assignments,

解析で完了し、中でもnfH02, nfk07はピーク処理など人の手 を全く介すことのない完全自動化が成立した。All-α-protein であるNomurは信号重なり合いが激しく、もっとも解析期間 (4week)を要したが追加された4Dスペクトルを用いることで 全信号帰属・構造モデル構築を達成した。また3Dスペクト ルを用いる¹H-¹⁵N RDCあるいは¹Hα-¹³Cα RDCなどを併用す ることで構造の正しさを示すことに成功した。単に簡単なサ ンプルだけでなく難度の高いサンプルについても解析可能で あることを示すこと、慎重を期すべき新規フォールドであ っても全て信頼性の高い帰属・構造モデリングが可能であ ることを示すことができた。

References

- (1) Koga R. & Koga N. Biophys. Physicobiol. (2019) 16, 304-309
- (2) Koga N. et al, *Nature* (2012) **491**(7423), 222-227.
- (3) Kobayashi N. et al, J. Biomol. NMR (2007) 39(1), 31-52.
- (4) Kobayashi N. et al, Bioinformatics (2019) 34(24), 4300-4301
- (5) Kobayashi N. et al, 第57回NMR討論会, 札幌 (2018)

3L1 機能性長鎖ノンコーディングRNA SINEUP機能ドメインの2次構造決定 〇大山 貴子¹、高橋葉月²、山崎俊夫¹、Piero Carninci²、石井佳誉^{1,3} 1理研放射光科学研究センター 2理研生命医科学研究センター 3東京工業大学 生命理工学院

Secondary structure determination of functional long non-coding RNA SINEUP • Takako Ohyama¹, Hazuki Takahashi², Toshio Yamazaki¹, Piero Carninci², Yoshitaka Ishii^{1,3} 1 RIKEN RSC 2 RIKEN IMS 3 Dept. of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

The discovery of that large variety of non-coding RNAs are widely presented in living cells was one of the biggest surprises in genomics in the past two decades. It is revealed that about 28,000 kinds of lncRNA are annotated in human genome. Some of them have essential functional roles in controlling cellular activities by modulating translation and transcription. However, the mechanism of their functions are still unclear in most of the cases. It is partly because dynamic nature and other molecular properties of RNA makes it extremely challenging to analyze atomic-level structures of lncRNAs. Here we report the secondary structure of 167-nt functional domain of lncRNA "SINEUP" that enhances protein expression. This functional domain consists SINE B2 which is one of short interspersed nuclear element (SINE). Moreover, we identified the 89-nt active site of SINE B2. Our study showed that our NMR approach is likely applicable to determine secondary structure of lncRNA.

近年、トランスクリプトーム解析により、ヒトでは約2万8千種の長鎖ノンコーディ ングRNA(lncRNA)のゲノム上でのマップが報告されている。これらの一部は自然免疫応 答やがんの転移等に関わることが示唆されているが、ほとんどの1ncRNAは機能も構造も 未知である。一部の機能が示された1ncRNAについても、RNAは主要な立体構造解析手法 (X線結晶構造解析、核磁気共鳴分光法、低温電子顕微鏡法)のいずれも化学的性質から 解析困難な分子であるため、分子レベルの作用機序解析はほとんど進んでいない。本研 究では、タンパク質の翻訳量を上昇させる特異な性質を持つ機能性1ncRNA "SINEUP" の機能ドメインであるSINE B2(167塩基)の2次構造を決定した。さらに活性部位と考え られる89塩基の領域を同定した。活性部位は高次構造を形成している可能性が示唆され た。本研究はNMRが100塩基を超える構造未知の機能性1ncRNAの2次構造解析に有効であ ることも示した。

結果と考察 はじめに、167塩基のSINE B2について、5'と3'の両末端を系統的に切除したRNA片を調製し、¹H NMRのイミノプロトン領域を全長167塩基 SINE B2(FL)と比較した。31-137、41-127は全長とは異なる化学シフト値のシグナルが複数観測された。この long non-coding RNA

○おおやま たかこ、たかはし はづき、やまざき としお、ぴえろ かるにんち、いしい よしたか

ことから、31-137、41-127では全長の構造とは異なる構 造が部分的に形成されていることが示唆される。21-147、31-119ではこれらのFLとは異なる化学シフト値の シグナルは観測されなかった。FL、21-147、31-119が配 列相同部位では同一の構造が形成されていると考えら れる。さらに、FLは少なくとも3つ(1-20と148-167、21-31と120-147、31-119)のドメインで分割可能であるこ とが示された。さらに31-119は¹⁵N-¹H HMQCスペクトルと ¹H-¹H NOESYスペクトルから2つのGU対と1つのUU対を含 むことが示された。この89塩基の31-119フラグメント はFLの80%程度のタンパク質の翻訳量の上昇効果を示 し、FL中の構造を保っていることから、同領域がSINE B2 の活性部位と同定された。

つぎに、FLについて複数の2次構造予測ソフトウェア により2次構造予測を行った。これらの予測結果とNMR により得られたドメイン構造、31-119の領域に含まれ る非ワトソンクリック型塩基対の数を比較したとこ ろ、RNAfoldとRNAstructureにより得られた2次構造予

測がNMRにより得られたドメイン構造、非 ワトソンクリック型塩基対の数ともに一 致していた。この2次構造予測を基に Fig. 1Aに示す通り配列を4つのドメインに 分割した。隣接する2ドメイン毎に切り出 したRNA片のイミノ領域のNMRスペクトル をFLと比較したところ、各RNA片のイミノ プロトンシグナルはFLの相同シグナルと ほとんど同じ化学シフト値を示した。RNA 片のシグナル帰属を基にFL(167 塩基、~ 55kDa)のシグナル帰属を存った。また、帰 属により得られた2次構造をFig. 1Bに示 す。帰属の詳細は発表にて議論する。

2次構造予測(Fig.1A)とNMRにて決定し た2次構造(Fig.1B)はいくつかの部位で異 なっていた。特にTドメインには大きな違 いが見られ、2次構造予測ではステムを形 成している。しかし、TMおよびFLのNMRス



Fig. 1. Schematic drawing of secondary structure of SINE B2. A predicted by RNAfold, B determined from NMR analysis.



Fig.2. Imino proton region of FL and fragments. a FL, b 31-117, c 31-118 and d 31-119. Eliminating nucleotides U118 and G119 causes diminishing signal intensities of 43-58 stem (indicated by arrow). Signals that were not observed in FL are indicated by star.

ペクトルにおいて、予測されたステムと一致するイミノプロトンシグナルとNOEは観測 されなかった。更に、31-119の3'末端を1塩基ずつ切除したところ、U118、G119が存在 しないとC2ドメインの43-58ステムは形成されずさらに非FL型の塩基対(星印)が形成さ れることが示された(Fig.2)。このことから43-58ステムとU118、G119は高次構造を形成 する可能性が示唆される。このように、FLは2次構造予測とは異なる2次構造を形成し、 さらに活性部位である31-119に高次構造を形成している可能性が示唆された。

ここの ここの

Solution NMR study for molecular basis of interaction between the human ceramide transfer protein (CERT) and the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein IncD

∘Toshihiko Sugiki ¹, Keigo Kumagai², Shoko Shinya¹, Naohiro Kobayashi¹, Toshimichi Fujiwara¹, Kentaro Hanada², Chojiro Kojima^{1,3}

IInstitute for Protein Research, Osaka University

2Department of Biochemistry and Cell Biology, National Institute for Infectious Diseases (NIID) 3Graduate school of Engineering, Yokohama National University

The ceramide transfer protein (CERT) mediates the transport of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in eukaryotic cells. The obligate intracellular bacterium *Chlamydia trachomatis* forms unique membrane vesicles, "inclusion", in the eukaryotic host cells, and hijacks CERT protein by utilizing specific interaction between the CERT PH domain and the inclusion-resident membrane protein IncD. Although the arrest of CERT protein is essential for proliferation of *C. trachomatis*, molecular mechanisms of the CERT PH domain-IncD interaction remain unknown. In this study, we developed novel experimental protocol for preparation of recombinant IncD protein and investigated interaction mode between the CERT PH domain and the IncD by solution NMR spectroscopy.

クラミジア・トラコマティス(Chlamydia trachomatis)は、先進諸国における性感染症の 最大の起因病原体であるだけでなく、衛生・医療の状況が整っていない地域では結膜への度重な る感染と炎症が原因となって失明を引き起こすなど、世界的に公衆衛生上の脅威であり続けてい る病原性細菌である。クラミジアは偏性細胞内寄生細菌であり、宿主細胞内の様々な物質を横 取りすることで増殖する。つまりクラミジアは、細菌でありながらウイルスのような振る舞いで 増殖するというユニークな特徴をもつ。

クラミジアは、ヒトの細胞内にてinclusion(封入体)と呼ばれる脂質二重膜小胞を形成し、宿主の免疫系から姿をくらますとともに宿主細胞内の様々な物質を搾取しながら 増殖する。クラミジア封入体膜上に発現している膜貫通型蛋白質IncDは、宿主のセラミ ド輸送蛋白質CERTのPH domainを特異的に認識することでCERTを選択的に捕捉し、本 来小胞体からゴルジ体へと輸送されるはずのセラミドを封入体側へと搾取していると 考えられている(Fig.1)。しかしIncDがCERTのPH domainを特異的に認識・捕捉する機 CERT、クラミジア・トラコマティス、膜蛋白質

Oすぎき としひこ, くまがい けいご, しんや しょうこ, こばやし なおひろ, ふじわら とし みち, はなだ けんたろう, こじま ちょうじろう 序は不明である。

そこで本研究では、CERT PH domainとIncDの相互作用様式を原 子レベルで明らかにし、クラミジア がCERTを特異的に捕捉する分子機 序を解明することを目的として、下 記の実験を行った。

(1) CERT PH domainおよびIncD蛋白質 試料の調製

相互作用実験のための試料として CERT PH domainおよびIncDの遺伝子組 換え蛋白質の調製を進めた。



Fig. 1. Schematic illustration of intracellular situations in a normal (the left panel) and a presence of the infection of *Chlamydia trachomatis* (the right panel).

可溶性蛋白質であるCERT PH domainは、安定同位体¹⁵Nの均一標識体を大腸菌発現系にて大量 発現ののち各種クロマトグラフィーにより精製した¹。

一方、膜貫通型蛋白質であるIncDは発現・可溶化・精製・再構成等が高難度であり、試料調製 が難航した。IncDは、N末領域とC末領域を細胞質側に露出するトポロジーをもつ二回膜貫通型蛋 白質であり、そのN末領域とC末領域がCERT PH domainとの結合に必要であるが、膜貫通領域は CERT PH domainとの相互作用には関与しない事が報告されていた²。しかしIncDから膜貫通領域 を除去した蛋白質(IncDのN末領域とC末領域をタンデムに連結した蛋白質)ではCERT PH domain への結合活性が顕著に減弱してしまう事から、CERT PH domainと結合するにはIncDのN末領域と C末領域が膜貫通型蛋白質としての本来のトポロジーを維持している必要がある²。上記の知見に 基づき、IncDの二回膜貫通領域を他の可溶性蛋白質で置換することによって、IncD全体としては 二回膜貫通型蛋白質のトポロジーを維持しつつもIncD全体を可溶性蛋白質として扱うことを可能 にする"全可溶型IncD"を作ることを試みた。

具体的には、IncDの膜貫通領域を、同様の長さの可溶性のαヘリックスで置換し、かつその可 溶性αヘリックス同士が逆並行のダイマーを形成するように設計した(Fig.2)。この"全可溶型 IncD"蛋白質は、文字通り完全な可溶性蛋白質として大腸菌発現系で大量発現することに成功し、 界面活性剤による可溶化も不要で各種クロマトグラフィーにより精製することにも成功した。

(2) CERT PH domainと"全可溶型IncD"の相互作 用実験

均一¹⁵N標識CERT PH domainに全可溶型IncD を滴定して¹H-¹⁵N HSQC測定を行い、全可溶型 IncDの濃度依存的な化学シフト値の摂動の解析 により、CERT PH domain上のIncD結合部位を高 精度に同定することに成功した。当日の発表時 にはCERT PH domain-IncD相互作用様式の詳細 についても報告・議論する予定である。

[References]

1. Sugiki T et al. (2012) JBC 287: 33706-

2. Kumagai K et al. (2018) BBRC 505: 1070-



Fig. 2. Schematic illustration of strategy for preparation of "whole soluble" IncD protein.

3L3

小胞体膜貫通タンパク質VAPのペプチド認識機構の研究 o古板恭子¹、平岡万里菜²、藤原敏道¹、児嶋長次郎^{1,2} 1大阪大学蛋白質研究所 2横浜国立大学大学院理工学府

NMR study on the peptide recognition mechanism of the endoplasmic reticulum membrane protein VAP

Kyoko Furuita¹, Marina Hiraoka², Toshimichi Fujiwara¹, Chojiro Kojima^{1,2}
 IInstitute for Protein Research, Osaka University
 2Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University

VAMP-associated protein (VAP), an endoplasmic reticulum membrane protein, is involved in diverse cellular functions including lipid transport, neurotransmission, and autophagy, and also viral replication through protein-protein interactions at membrane contact sites. VAP is known to bind an "FFAT motif", which consists of multiple acidic residues and a subsequent 'EFFDAxE' sequence. Recently, it has been shown that VAP can also bind an extremely diverse amino acid sequence in which multiple residues other than the first phenylalanine residue of the FFAT motif ('EFFDAxE') are substituted. These sequences are referred to as FFAT-like motifs. In this study, we performed solution NMR study on the interaction between VAP and eight FFAT-like motifs that have been shown to bind VAP. Furthermore, we found that RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2 contains an FFAT-like motif and investigated its interaction with VAP.

【はじめに】 小胞体膜貫通タンパク質VAMP-associated protein(VAP)は、膜コンタクトサイトに おけるタンパク質問相互作用により、脂質恒常性やオートファジー等の細胞機能に関与してい る。またいくつかのRNAウイルスのタンパク質と結合することが知られており、ウイルスの複製 にも関与している。VAPはその細胞質側にあるMSPドメインで、FFATモチーフと呼ばれる複数 の酸性残基と「EFFDAXE」配列からなるペプチドモチーフを結合することが知られている。近 年、VAPはFFATモチーフの1つ目のフェニルアラニン以外の複数の残基が置換された極めて多 様なアミノ酸配列を結合できることが分かってきた[1]。これらの配列はFFAT-likeモチーフと呼 ばれている。VAPとFFATモチーフの相互作用はよく解明されている[2]が、FFAT-likeモチーフと の相互作用の詳細は明らかではない。本研究では、溶液NMRを用い、VAPに結合することが報 告されている8種類のFFAT-likeモチーフとVAP-AのMSPドメイン(VAP-A_{MSP})との相互作用部位 や結合力を検討した。またその知見を元に新型コロナウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRp)がVAPに認識されうる配列を含むこと、実際にその配列がVAP-A_{MSP}と結合することを 見出した。

【材料と方法】 ¹⁵N標識VAP-A_{MSP}は大腸菌による発現系を用いてGST融合タンパク質 として発現させ、アフィニティークロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィ ーを用いて精製した。FFAT-likeもしくはFFATモチーフを含むペプチド(Table 1)は 化学シフト摂動実験、タンパク質間相互作用、新型コロナウイルス

○ふるいた きょうこ、ひらおか まりな、ふじわら としみち、こじま ちょうじろう

	Peptide	Amino acid	
	name	sequence	
FFAT-like	FIP200	DFMSAVNEFV	
motif	ULK1	EYCNGGDLAD	
	Kv2.1	DSFISCATDFP	
	Kv2.2	DSFTSCATDFT	
	SNX2_1	DLFTSTVSTL	
	SNX2_2	DLFAEATEEV	
	PTPIP51_1	VYFTASSGAT	
	PTPIP51_2	TFTDAESEGG	
FFAT motif	OSBP	EFFDAPEIIT	

Table 1. Peptide used in this study.

GenScriptより購入した。NMRサンプルは、 溶媒に50 mM K-Pi (pH 6.9), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA (95/5 % H₂O/D₂O) を用い、VAP-A_{MSP}濃度80 µ Mで調製した。 測定は600 MHzのAVANCE III HD NMR装置 を用い、303 Kで行った。

【結果と考察】 FFAT-likeモチーフとVAP-A_{MSP}との相互作用を調べるため、¹⁵N標識 VAP-A_{MSP}のみ、あるいは¹⁵N標識 VAP-A_{MSP} に非標識FFAT-likeモチーフを含むペプチド をモル比1:1で混合した試料の¹H-¹⁵N HSQC 曲型的なFFATモチーフを含むOSBPのペプ

スペクトルを測定した。また比較のため、典型的なFFATモチーフを含むOSBPのペプ チドを用いて同様の測定を行なった。その結果、FFAT-likeモチーフ8種類中6種類につ いて、ペプチドの添加によるVAP-A_{MSP}のスペクトルの変化が見られた。しかしなが ら、その程度はFFATモチーフを含むOSBPペプチドを添加した場合と比較すると小さ かった。FFAT-likeモチーフを含むペプチドの添加により信号が変化した残基を、VAP-A_{MSP}と OSBPのFFATモチーフからなる複合体の立体構造上に表示したところ(Figure 1)、いずれの場 合も信号が変化した残基はFFATモチーフの結合サイトに局在していた。以上の結果から、 FFAT-likeモチーフ間でVAP-A_{MSP}との結合力にばらつきがあること、FFAT-likeモチーフはFFAT モチーフと比較して結合は弱いこと、少なくともFIP200、Kv2.1、Kv2.2、SNX2_1、SNX2_2、及 びPTPIP51_1のペプチドはFFATモチーフと同じ領域に結合することが分かった。

当日は、VAP-A_{MSP}と各FFAT-likeモチーフとの結合力と配列の関係や、VAP-A_{MSP}と新型コロナウイルスのRdRpとの相互作用についても議論する予定である。

【参考文献】

- [1] S.E. Murphy, T.P. Levine, Biochim. Biophys. Acta. 1861 (2016) 952–961.
- [2] K. Furuita, J. Jee, H. Fukada, M. Mishima, C. Kojima , J. Biol. Chem. 285 (2010) 12961–70.



Figure 1. The solution structure of the complex between VAP- A_{MSP} and the FFAT motif of OSBP (PDB ID: 2RR3). VAP- A_{MSP} is shown in a ribbon diagram (light gray) and OSBP is shown in a stick model (black). Residues that showed a chemical shift change (> 0.008 ppm) or a decrease in peak intensity (> 20%) by the addition of each peptide are shown in spherical models (dark gray). In case more than six residues showed chemical shift changes, only the top five residues are shown in spherical models.

31 3**1** 3**1** 3**1** 4 ()野田泰斗¹,栗原拓也^{1,2},鈴木克明³,村田翔¹,梶弘典³,竹腰清乃理¹ ¹京都大学 大学院 理学研究科 ²金沢大学 理工学域 物質科学類 ³京都大学 化学研究所

DNP NMR for surface structural analysis of CdSe clusters

OYasuto Noda¹, Takuya Kurihara^{1,2}, Katsuaki Suzuki³, Syo Murata¹, Hironori Kaji³, and Kiyonori Takegoshi¹
 ¹Graduate School of Science, Kyoto University
 ²Department of Chemistry, Graduate School of Natural Science & Technology, Kanazawa University
 ³Institute for Chemical Research, Kyoto University

The surface structure of Cysteine-capped CdSe magic-sized clusters is elucidated with DNP MAS NMR. ¹¹¹Cd-{¹⁵N} *J*-HMQC revealed a surface Cd site coordinated with N for the first time, which was considered as Cd coordinated by S and two Se from the chemical shift. The other surface Cd peak observed in a CP/MAS ¹¹¹Cd spectrum was assigned to Cd coordinated by S and three Se by comparison with the *J*-HMQC spectrum. The CSA parameters of N-coordinated Cd was obtained, which are consistent with the assignment due to the chemical shift.

【背景】

構成原子数が数個から数十個の物質であるクラスターは特定の原子数で特異的に安定化することが知られている。このようなクラスターはマジックサイズクラスターとよばれ、多くはバルクとは異なる構造と物性を有する。発表者のグループはシステインで保護された水溶性CdSeマジックサイズクラスター(以降、CdSe-Cys)の構造解析をしてきており、これまでに保護システインの詳細な構造と運動性を明らかにしてきた。^[1-3] 一般にシステインはCdSeクラスターと結合できる官能基としてチオール基、アミノ基、カルボキシル基を有している。CdSe-Cysの保護システインにおいては、チオール基はすべて水素が外れてカドミウムが結合し、アミノ基は約43%が約2.47Åとやや長い結合長でカドミウムに結合し、カルボキシル基はすべて対イオンのナトリウムと結合しCdSeクラスターとは結合していないことを解明した。^[1.2] さらに、室温で硫黄と窒素が結合している保護システインは運動性が低く、硫黄のみが結合している保護システインは活合サイトを中心に回転運動していることも解明した。^[3] 一方、CdSe-CysのCdSeクラスター表面の構造はよく分かっていない。同じカドミウムに硫黄と窒素の両方が配位しているのか、別のカドミウムにそれぞれ配位しているのか、もしくは何も配位していないカドミウムが存在するのか評価されていない。CdSe-Cysの表面構造はCdSe-Cysの発光効率や電子授受といった機能を左右する重要な因子である。本研究では、CdSe-CysのCdSeクラスター表面の構造をDNP MAS NMRを用いて解明することを目的に行った。

【実験】

CdSe-Cysは既報と同じ手法^[1-3]を用いて、¹¹¹Cdと⁷⁷Seで同位体標識したCdSeクラスターを¹⁵N同位体標 識したL-Cysteineを用いて合成した。DNPのラジカル剤として20 mMのAMUPolを溶媒(水と重水とd化グリ セロール)に溶かし、約30 mgのCdSe-Cysと混合した。DNP MAS NMRは9.4 Tの静磁場中でBruker AvanceNEO 400WB NMR上で行った。¹H-¹¹¹Cd-¹⁵N三重共鳴DNPプローブを使用し、搬送周波数を

固体 DNP-NMR、J 相関、表面構造解析

○のだ やすと、くりはら たくや、すずき かつあき、むらた しょう、かじ ひろのり、たけごし きよのり

各々400.420、84.949、40.573 MHz、試料温度を100 K、MAS速度を12 kHz、待ち時間を12.8 sとした。

【結果と考察】

Fig. 1に{¹H}-¹¹¹Cd CP/MASスペクトルと¹¹¹Cd-{¹⁵N} 1D J-HMQCスペクトルを示す。接触時間を0.1 msと短くしてCdSe-Cysの表面サイトだけを測定したところ578 ppmに信号を観測 した。¹¹¹Cd-{¹⁵N} 1D J-HMQC では578 ppm の信号は消え て、スピニングサイドバンドに埋もれていた474 ppm の信号 が現れた。Cdは4つの結合手を有すること、及び、保護シス テインに2種類の配位構造があることから、表面CdはCd-NSSe₂とCd-SSe₃の2種類があると考えられる。これらのことか ら、474 ppmの信号はCd-NSSe₂、578 ppmの信号はCd-SSe₃ と帰属した。この帰属は、Cdとシステインの錯体の溶液NMR でNの配位数が増えるほど信号が低周波数側にシフトする 結果と一致している。今回、Nが結合した表面Cdのみを初め て選択的に観測することに成功した。

J-HMQCスペクトルをFig. 2に示すようにフィッティングし化 学シフト異方性(δ_{aniso})と非対称性パラメータ(η)を求めた。 得られた値をアミンで保護された(CdSe)₁₃の¹¹³Cdの値ととも にTable 1に示す。(CdSe)₁₃の表面Cdは3つのSeおよび1つの Nと結合していると考えられ、Table 1に示したように δ_{aniso} が大 きい一方で η はほぼ0であることから、N-Se結合を軸に $C_{3\nu}$ 的 にSeが配位している。^[4]一方、CdSe-Cysは δ_{aniso} が大きいこ とに加えて η も大きい。このことは、表面CdはFig.2の内挿図 に示すようにSe2つに加えてシステインのNとSが5員環で2座 配位していると考えると説明できる。化学シフト異方性パラメ ータの結果は2つの表面ピークを化学シフト値により帰属した 結果と矛盾しない。



Fig. 1. ¹¹¹Cd spectra obtained through CP at a contact time of 0.1 ms (black) and *J*-HMQC (grey). Asterisks denote spinning-side bands.



Fig. 2. *J*-HMQC spectrum (black) and fitting curve (grey). Asterisks denote spinning-side bands. Inset shows an expected coordination model around a surface Cd.

	$\delta_{ m iso}$ / ppm	$\delta_{ m aniso}$ / ppm	η
CdSe-Cys (this work)	477.0	-358.1	0.63
Amin-capped (CdSe)13 ^[4]	576	320	0.05

Table 1. Chemical shift anisotropy parameters of CdSe clusters.

【謝辞】

本研究はJSPS科研費16H06440とJSPS特別研究員奨励費18J11973の助成を受けて実施された。

【参考文献】

[1] T. Kurihara, Y. Noda, and K. Takegoshi, J. Phys. Chem. Lett. 8 (2017) 2555.

[2] T. Kurihara, Y. Noda, and K. Takegoshi, ACS Omega 4 (2019) 3476.

[3] T. Kurihara, A. Matano, Y. Noda, and K. Takegoshi, J. Phys. Chem. C 123 (2019) 14993.

3L5

固体DNP-NMRによる高分子担持触媒の構造解析 ○田中 真司¹,小川 敦子¹,中島 裕美子¹,佐藤 一彦¹ 1産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター

DNP-enhanced solid-state NMR spectroscopy for structural characterization of polymer-supported catalysts

Shinji Tanaka¹, Atsuko Ogawa¹, Yumiko Nakajima¹, Kazuhiko Sato¹
 1 Interdisciplinary Research Center for Catalytic Chemistry, AIST

While solution-state NMR has been widely utilized for the development of molecular catalysts, solidstate NMR has been sparsely applied for the analysis of solid-state catalysts due to low sensitivity. In recent decades, dynamic nuclear polarization (DNP) enhanced solid-state NMR spectroscopy has enabled the detailed structural characterizations of solid materials. DNP-NMR of catalyst species on inorganic supports was achieved using biradical polarizing agents, which induce a polarization transfer via cross-effect under microwave irradiation. For catalysts supported on organic polymers, however, non-porous structure prevents the effective distribution of biradical species over the sample, resulting in the insufficient signal enhancement. We have recently developed the rational guideline for DNP sample preparation from insoluble organic polymers. Herein we further studied on this guideline and demonstrated that DNP-NMR is a powerful tool for the structural characterization of catalyst species supported on organic polymer.

触媒は、均一系(分子触媒)と不均一系(固体触媒)に大別することができる。これらのうち、 後者は再利用性の高さや分離・除去の容易さから実用面で好適とされている。しかし、固体触媒 の分析手法は分子触媒と比較して限定されており、確かな構造解析に基づく触媒の改良が困難で あった。溶液 NMR は分子触媒の開発において不可欠な分析ツールであるのに対し、固体 NMR の 固体触媒への活用例は限られていた。固体触媒の活性点は試料全体の重量に対し少量であるため、 一般的な固体 NMR では十分なシグナル感度を得ることができないことが一因と考えられる。近 年、動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization; DNP)を利用する固体 NMR が、固体材料の高感度 解析手法として注目されている¹。DNP-NMR では、適切なラジカル化合物共存下、強力なマイク ロ波照射により電子スピンから原子核への分極移動を引き起こすことで、¹H 核において最大で 660 倍の感度向上が見込まれる。特に、安定ビラジカル分子を偏極剤として用いる交差効果 (Crosseffect)による DNP-NMR が大きく発展を遂げており、固体担持型触媒の構造解析に応用されてき た。しかし、シリカやアルミナなどの無機物への適用例は数多いものの、架橋型ポリスチレン等 の高分子担体への適用例は限られていた。高分子担体は酸塩基耐性の高さから精密有機合成で幅 広く用いられる材料であり、DNP-NMR による高感度構造解析手法を確立することで更なる発展 に寄与できると考えた。

我々はこれまでに、不溶性高分子材料の DNP-NMR 測定プロトコルとして、各サンプルの有機 溶媒への膨潤度からサンプル調製の最適条件を予測する方法を報告した²。また一方で、エポキシ 樹脂原料として有用なグリシジルエステルを、アンモニウム塩触媒によるエステル交換反応で効 率的に合成する手法を報告している³。今回、本触媒系を高分子担持型へと発展させるにあたり、

DNP-NMR、担持型触媒、高分子材料

oたなかしんじ、おがわあつこ、なかじまゆみこ、さとうかずひこ

DNP-NMR による精密構造 解析が極めて有用であるこ とを実証したので報告す る。

市販のメリフィールド樹 脂と三級アミンの反応から 4 種類の触媒 (1-Cl, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl) を調製した (Scheme 1a)。また、**3-Cl**のア ニオン交換反応により、3-OH と 3-NO₃ を調製した (Scheme 1b)。さらに、比較と して三級アミン触媒 5 を調 製した (Scheme 1c)。これら の担持型触媒は、通常の固 体¹³C CPMAS NMR により、 確認できるが、シグナルの 広がりと重なりからN周り の化学的環境を明確化する ことは困難であった。そこ で、DNP-NMR による天然 存在比での¹⁵N 核観測を試 みた。それぞれの触媒に対 U, 1,1,2,2-tetrachloroethane $(TCE) \succeq$ dimethyl sulfoxide (DMSO) 中での膨潤度を 測定した結果、1-CI は DMSO中で良好な膨潤度を 示し、4-Cl と5 では TCE 中 が良好であった。2-Cl, 3-Cl, 3-OH, 3-NO3 は、TCE と DMSOのどちらにも良い膨 潤度を示した。膨潤度測定 の結果に基づき、偏極剤溶



Scheme 1. Preparation of PS-supported quaternary ammonium salts and tertiary amine from Merrifield resin (a) (b) preparation of **3-OH**, **3-NO**₃, and **3-NO**₃-**15N** by anion exchange reaction of **3-CI**, (c) preparation of PS-supported tertiary amine **5**.





Figure 1. DNP ¹⁵N CPMAS NMR of 2-CI, 3-CI, 3-NO₃, and 5.

液として AMUPol/DMSO-d₆と TEKPol/TCE のいずれかを選択し、DNP¹⁵N CPMAS NMR 測定を行った。結果の一部を Figure 1 に示した。2-Cl は第4級アンモニウムに由来するシグナルが 57.5 ppm に一種類観測され、3-Cl と 3-NO₃ については低磁場側にショルダーを含むシグナルがそれぞれ 62.5, 62.2 ppm に観測された。また、3-NO₃の硝酸イオンに帰属できるシグナルが 378.8 ppm に観測され、アニオン交換が良好に進行していることが裏付けられた。一方、5 では 30~67 ppm の間 に複数のシグナルが観測され、NMR 測定温度 (103 K) において複数のコンフォマーが存在する ことが示唆された。アルキルアンモニウム塩は塩基性条件で三級アミンへと分解し易いことが知られているが、本測定により、触媒調製が想定通りに進行していることを明確に確認できた。こ れらの触媒を用いたグリシジルエステル合成反応や、触媒活性種、劣化化学種の DNP-NMR 観測 についても併せて報告する。

謝辞:この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託業務 (JPNP16010) の結果得られたものです。

Griffin, R. G. et al. J. Chem. Phys. 2008, 128. 052211.
 Tanaka, S. et al. Phys. Chem. Chem. Phys. 2020, 22, 3184-3190.
 Tanaka, S. et al. ACS Catal. 2018, 8, 1097-1103.

3L6

表面増強NMR分光法による低γ四極子核の観測

○永島 裕樹^{1*}, Julien Trébosc^{2,3}, 今 喜裕¹, 佐藤 一彦¹, Olivier, Lafon^{2,4*}, Jean-Paul Amoureux^{2,5,6*} ¹産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター, ²リール大学, CNRS, Central Lille, Univ. Artois, UMR 8181, UCCS, ³リール大学, CNRS-2638, Fédération Chevreul, ⁴Institut Universitaire de France, ⁵ブルカーバイオスピン, ⁶理研 NMR研究開発部門

Observation of Low-γ Quadrupolar Nuclei by Surface-Enhanced NMR Spectroscopy

⊖Hiroki Nagashima^{1*}, Julien Trébosc^{2,3}, Yoshihiro Kon¹, Kazuhiko Sato¹, Olivier Lafon^{2,4*}, Jean-Paul Amoureux^{2,5,6*}

¹Interdisciplinary Research Center for Catalytic Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)., ²Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, Univ. Artois, UMR 8181, UCCS., ³Univ. Lille, CNRS-2638, Fédération Chevreul., ⁴Institut Universitaire de France., ⁵Bruker Biospin., ⁶Riken NMR Science and Development Division.

We introduce a novel NMR approach that extends the capabilities of indirect dynamic nuclear polarization (DNP) under magic-angle spinning to probe the local environment of half-integer spin quadrupolar nuclei. Compared to conventional methods, this novel method based on the refocused INEPT scheme with adiabatic dipolar recoupling greatly improves the sensitivity of DNP-NMR for the detection of quadrupolar isotopes with small dipolar couplings to protons, including notably those located in the subsurface of inorganic materials or with low gyromagnetic ratio (γ). This technique has been demonstrated to identify the atomic-level surface structure of γ -Al₂O₃ hydrated titania-supported MoO₃, and Al doped ZnO nanoparticles.

[背景]

固体触媒などに代表されるナノ材料の特性において、材料の表面に局在した特徴的な構造は決定的な役割を持つ。これらのナノ材料の表面構造と特性との相関性を理解した上で、的確な材料設計を進めることは重要である。そのため、表面構造を原子スケールレベルで調べる手段の発展はこれからもナノ材料科学を進展させる鍵となる。固体NMRは、他の分光法と比べて感度が低く、加えて表面を選択的に観測ができないために、ナノ材料の表面構造の観測にはほとんど利用されてこなかった。近年、低感度を克服する手法として、動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization: DNP)を利用した固体NMRの手法が発展した^[1]。DNP-NMRはラジカル溶媒を試料に加えることで、ラジカル分子が試料表面近傍に局在し、表面を選択的に高感度化できる。ラジカル → 溶媒¹H核 → 表面観測核、の流れで表面NMR信号を観測する方法はDNP Surface-Enhanced NMR Spectroscopy (SENS)と呼ばれている^[2]。これまでのDNP-SENSの報告は、主に¹³C, ¹⁵N, ²⁹Siなどの核スピン量子数I=1/2の原子核の観測が中心であり、I>1/2の四極子核の観測には適用が進まなかった。四極子核は周期律表の75%程を占め、¹⁷Oを筆頭に構造解析上重要な原子核が多く、また、低感度な原子核が多いため、DNP-NMRの適用が望まれてきた。

DNP-NMR、四極子核、表面構造解析

○ながしま ひろき, とれぼすく じゅりあん, こん よしひろ, さとう かずひこ らふぉん おりびえ, あむるー じゃんぽーる [DNP-SENSによる四極子核観測法の開発]

¹H と四極子核間の分極移動に対して、我々は DNP-SENS に適した新しい分極移動法 Adiabatic D-RINEPT を開発した(図 1)^[3]。Adiabatic D-RINEPT は、Adiabatic dipolar recoupling(SR4₁²(tt))の活用 と、間に CW 照射を行い、¹H-¹H coupling による減衰を抑制し、¹H と四極子核間の高効率な分極 移動を達成する。一見複雑に見えるが、事前の簡易的なパルス調整のみで実施可能である。



Figure 1. Pulse sequence diagram of Adiabatic D-RINEPT. QCPMG acquisition is utilized to further enhance the signal. This sequence is employed in the polarization transfer ¹H to quadrupolar nuclei for DNP-SENS.

[金属酸化物ナノ粒子の表面構造解析][3]

エンリッチしていない3つの金属酸化物ナノ粒子に対して Adiabatic D-RINEPT を活用した DNP-SENS の結果を報告する。まず、固体触媒担体として重要な γ -Al₂O₃の表面 ¹⁷O NMR スペクト ルの観測に成功した(図 2)。D-RINEPT では Recoupling 照射時間を変えることで OAl_x と HOAl_yの 信号を分けて観測できる。取得した表面上 OAl_xの ¹⁷O NMR スペクトルからは OAl₃及び 2 種類の OAl₄ サイトが観測された。一方、HOAl_y では複数のサイトが観測された。

固体酸触媒として機能する複合酸化物 MoO₃/TiO₂の表面 ¹⁷O NMR スペクトルを観測することに 成功した。MoO₃/TiO₂の表面上では MoO₃ 粒子だけでなく、オキソモリブデートの形成を確認し

た。加えて、OH 基では、強ブレンステッド酸点のピークが観測された。これからオキソモリブデート構造由来の強ブレンステッド酸 点が触媒反応に重要な役割を果たしていることが示唆される。同様 に、表面 ⁹⁵Mo, ^{47,49}Ti NMR スペクトルの観測に成功した。

Al doped ZnO ナノ粒子は透明電極等の応用が期待されている。 ZnO に Al をドープにより電気伝導性が向上されるが、Al 量が多く なると逆に電気伝導性が低下する。DNP-SENS により、表面 ⁶⁷Zn, ¹⁷O,²⁷Al NMR スペクトルを取得した。その結果、表面上に ZnAl₂O₄ や Al₂O₃ が形成していることが明らかとなった。ZnAl₂O₄ は直接励 起のバルク ⁶⁷Zn NMR スペクトルからは観測されないため、表面に 局在していると考えられる。これら副生成物は絶縁体のため、表面 に形成すると電気伝導性の低下を引き起こすと考えられる。



by DNP-SENS. $v_R = 12.5$ kHz.

[謝辞]

この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託業務 (JPNP16010)の結果得られたものです。

[参考文献]

[1] K.-N. Hu., et al., J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 10844–10845.

[2] A. Lesage., et al., J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 15459–15461.

[3] H. Nagashima., et al., J. Am. Chem. Soc., 2020, 142, 10659–10672.

3L7

Understanding of the quadrupolar interaction between solidstate NMR and NQR

 Kazuhiko Yamada¹
 ¹Multidisciplinary Sciences Cluster, Research and Education Faculty, in charge of Science Research Center, Kochi University

Experimental and theoretical investigations on the quadrupolar interactions between nuclear quadrupole resonance (NQR) and solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy are discussed. Solid-state ³⁵Cl NMR spectra of *p*-dichlorobenzene were observed by solenoid and cross-coil coils, while the strength in external magnetic fields stepwise increases from zero to a few hundred mT. Let us define regions where the quadrupolar interactions and the Zeeman interactions are dominant, as NQR-region and NMR-region, respectively. The fact that a cross-coil cannot detect NQR signals makes it possible to experimentally distinguish the point between NQR-region and NMR-region, as magnetic fields increase. The purpose of the present work is to understand the quadrupolar interaction between NQR and solid-state NMR spectroscopy from a single viewpoint.

Introduction

The quadrupolar interaction is one of the nuclear spin interactions in solid-state NMR spectroscopy, and is observed for nuclear spin with quantum number, I, more than one-half, *i.e.*, quadrupolar nuclei. Assuming that the Zeeman interaction dominates, the quadrupolar interaction is treated by perturbation theory, and such a resonant frequency can be expressed by mathematical formulas, defined as the first-order or the second-order. On the other hand, without external magnetic fields, the nuclear quadrupole moment in quadrupolar nuclei interacts with the local electric-field-gradient (EFG) to split their spin energy levels, which is the origin of NQR spectroscopy. In general, NQR spectroscopy can handle larger quadrupolar interactions and might provide very sharp signals. The resonant frequency of a peak position is called a quadrupolar frequency, which becomes an important parameter for investigation of molecular structures or electric properties. Not necessary, but very often for I = 3/2, a small external magnetic field may be applied so that quadrupole coupling constant, C_Q , and the asymmetric parameter, η_Q , can be obtained from the NQR spectra, broadened by the Zeeman interaction. In this case, the Zeeman interaction is treated by perturbation theory, and the resonant frequency can be expressed by mathematical formulas, similarly to the cases of solid-state NMR spectroscopy. Both solid-state NMR and NQR spectroscopy deal with the quadrupolar interactions, but the two techniques are considered as a different method. The purpose of the present work is to try to understand the quadrupolar interactions between the two techniques, from a single viewpoint.

It is helpful for this purpose to use a numerical calculation, which involves the diagonalization of the combined Zeeman-quadrupolar Hamiltonian, so that the line shape affected by the quadrupolar interactions in the intermediate region can be simulated. It is also useful to employ both solenoid and cross coils, and compare the results under the experimental conditions in which external magnetic fields are varied from zero to a few hundred mT.

Quadrupolar interactions, Solid-state NMR, NQR $% \left(\mathcal{M}_{\mathcal{M}}^{2}\right) =\left(\mathcal{M}_{\mathcal{M}}^$

○やまだ かずひこ
Experimental

p-dichlorobenzene was purchased from FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Tokyo, Japan) and was used without further purification. All the experiments were performed using a home-made NMR system based on PulseBlasterDDS-II-300 and RadioProcessorTM (SpinCore Technologies, Inc., USA). An NMR probe with a cross-coil was kindly provided by Dr. Masato Takahashi (RIKEN Yokohama, Japan). As shown in Figure 1, variable superconducting magnet was used and the external magnetic fields were changed from zero to a few hundred mT.

Results and Discussion

Figure 2 shows solid-state ³⁵Cl NMR spectra of p-

dichlorobenzene, observed by a solenoid coil, at (a) zero magnetic field and (b) 1.45 mT. The former is a pure ³⁵Cl NQR spectrum, while the latter is an NQR spectrum broadened by the Zeeman interaction, which is in NQR-region. If the external magnetic field becomes much stronger, then the Zeeman interaction will dominate. In other words, NQR-region will change to NMR-region at a



Figure 2. Solid-state ³⁵Cl NMR spectra of *p*-dichlorobenzene, observed by a solenoid coil, at (a) zero and (b) 1.45 mT.

certain point, while the strength in external magnetic fields increases. Although a solenoid coil can observe both NQR and NMR signals, in principle, it is impossible to observe NQR signals by a cross-coil, since linearly they are polarized. Therefore, a cross-coil is effective only in NMR region. Assuming that ³⁵Cl MR signals are detected by a cross-coil, while the strength in external magnetic fields gradually increases from zero tesla, it is possible to experimentally distinguish the point between NQRregion and NMR-region. In the present talk, I will discuss how to describe the quadrupolar interactions in such an intermediate region, and provide insight into nuclear spin phenomena between NQR and solid-state NMR spectroscopy.



Figure 1. Variable superconducting magnet, used in the present work.

3L8

四重鎖DNAとフタロシアニン誘導体の複合体の解析

内山真見¹, 岡本千奈¹, 百武篤也¹, 〇山本泰彦^{1,2}, 池上崇久³

1 筑波大学 大学院数理物質科学研究科 化学専攻

- 2 筑波大学 エネルギー物質科学研究センター(TREMS)
- 3 島根大学 大学院自然科学研究科 環境システム科学専攻

Characterization of a Complex between a Phthalocyanine Derivative and a G-quadruplex DNA

Mami Uchiyama¹, China Okamoto¹, Atsuya Momotake¹, OYasuhiko Yamamoto^{1, 2}, and Takahisa Ikeue³ *1 Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8571, Japan*

1 Depuriment of Chemistry, Oniversity of Isukuba, Isukuba 505-6571, Japan

- 2 Tsukuba Research Center for Energy Materials Science(TREMS), Univ. of Tsukuba, Tsukuba 305-8571, Japan
- 3 Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Shimane University, Matsue 690-8504, Japan

光線力学治療の光増感剤や四重鎖核酸標的薬としての応用が期待されているフタロシアニン誘 導体と四重鎖 DNA の相互作用を解析した。8 つのカチオン性側鎖をもつガリウムフタロシアニン 誘導体(GaPc)は、塩基配列 d(TTAGGGT)の四重鎖 DNA に対して、まず、G4 G-カルテットに、次 に、G6 G-カルテットに、いずれも主にπ-πスタッキングと静電的相互作用により段階的に結合 して、1:1 複合体、そして 2:1 複合体を形成することが明らかになった。

Interaction between a phthalocyanine (Pc) derivative bearing eight *N*-methylpyridinium groups at peripheral β -positions (2,3,6,7,10,11,14,15-octakis-[*N*-methyl-(4-methylpyridinium-3-yloxy) phthalocyaninato] chloro gallium(III) iodide (GaPc)) and a tetrameric parallel G-quadruplex of a heptanucleotide d(TTAGGGT) has been investigated to elucidate the molecular recognition of G-quadruplex DNA by the Pc derivative. We found that GaPc exhibits stepwise binding to the DNA with binding constants of ~10⁷ and ~10⁴ M⁻¹ for the A3G4 and G6T7 steps, respectively, to form a 2:1 complex. Considering the similarity in the local structural environment between the A3G4 and G6T7 steps of the DNA, the remarkably large difference in the GaPc-binding affinity between the sites indicated that the intermolecular electrostatic interaction between GaPc and the DNA is significantly affected by the environmental polarity of the binding-site.

序論 四重鎖核酸は、染色体の末端 領域テロメアの維持、ガン関連遺伝 子の翻訳などの多くの生物学的に重 要な過程に関わっている。グアニン が豊富な塩基配列が形成する四重鎖 構造は、グアニン塩基4つが水素結 合により環状に連結したG-カルテッ ト(Fig. 1A)の形成を通して安定化さ れている。本研究では、フタロシア ニン誘導体(GaPc (Fig. 1B))とDNA塩 基配列d(TTAGGGT)が形成する四重 鎖DNAの相互作用を解析した。



Fig. 1. G-カルテット(A)、フタロシアニン誘導体(GaPc)(B) と DNA 塩基配列 d(TTAGGGT)が形成する四重鎖 DNA の 模式図(C)。

フタロシアニン誘導体、四重鎖DNA、分子認識

うちやま まみ、おかもと ちな、ももたけ あつや、〇やまもと やすひこ、いけうえ たかひさ

結果と考察 d(TTAGGGT)の四重鎖DNAの¹H NMRスペクトルでは、Gカルテットの形成に 関与するグアニンのイミノプロトンに由来 するシグナルが10 ppmよりも低磁場側にシ フトして観測される(Fig. 2のシグナルG4, G5, G6)。GaPcを添加すると、GaPc濃度に依存し て、GaPcと四重鎖DNAの1:1複合体(G4_{1:1}, G5_{1:1}, G6_{1:1})と2:1複合体(G4_{2:1}, G5_{2:1}, G6_{2:1})の シグナルがそれぞれ分離して観測された(Fig. 2の1Dスペクトル)。1:1複合体と2:1複合体の シグナルの帰属は、化学交換を介したDNAの シグナルとの磁化移動に基づく2D交差ピー クの観測により行った(Fig. 2)。

反磁性錯体GaPcのフタロシアニンの環電 流効果のため、1:1複合体のイミノプロトンシ グナルはいずれも、DNAでの対応するシグナ ルに対して高磁場シフトした(G4_{1:1} -2.15 ppm、G5_{1:1}-0.79 ppm、G6_{1:1}-0.32 ppm)。観測 されたシフト変化から、1:1複合体でGaPcは d(TTAGGGT)の四重鎖DNAのA3とG4の間 (A3/G4間)に結合していることが明かになっ た。また、2:1複合体のシグナルも、1:1複合体 での対応するシグナルに対して、高磁場シフ トし(G4_{2:1}-0.31 ppm、G5_{2:1}-0.73 ppm、G6_{2:1} -2.15 ppm)、1:1複合体のG6とT7の間(G6/T7 間)にGaPcが結合して2:1複合体が生じること が明らかになった。

反磁性ヘム錯体は、d(TTAGGGT)の四重鎖 DNAのG6/T7間に特異的に結合して1:1複合 体を形成し、G6に-2.5 ppmのシフト変化が誘 起される(G4とG5には、それぞれ-0.4と-0.9 ppm)¹。G6/T7間に結合したヘムとフタロシア ニンで、G6に誘起される高磁場シフトが異な るのは、ヘムのポルフィリン環とフタロシア



Fig. 2. GaPc と d(TTAGGGT)の四重鎖の 2:1 混合水 溶液の NOESY スペクトル(90% H₂O/10% ²H₂O, 50mM potassium phosphate buffer, pH 6.80, and 300mM KCl at 25 °C)。Mixing time (τ_m) = 150 ms。 I_(Gn/Gn+1), I_{1:1}(Gn/Gn+1)</sub>は、DNA、1:1 複合体それぞれで 観測された分子内 NOE、EX1_{Gn}、EX2_{Gn}はそれぞれ DNA と 1:1 複合体、1:1 複合体と 2:1 複合体の間で 観測された化学交換を介した磁化移動による交差 ピークを示す(n=4,5 or 6)。四重鎖 DNA への GaPc の結合反応で、一段階目の A3/G4 間への結合と二 段階目の G6/T7 間への結合の親和性が大きく異な るので、GaPc は段階的に四重鎖 DNA に結合する。

ニンは同じ環状18π電子系でも、環電流効果はフタロシアニンの方が小さいことに起因する²。

d(TTAGGGT)の四重鎖DNAのA3/G4間とG6/T7間の構造化学的環境は概ね同じであるので、GaPc とG4、G6 G-カルテットそれぞれとのπ-πスタッキングによる安定化エネルギーは同様であると 考えられる。したがって、GaPcの8つのカチオン性側鎖とDNAのリン酸主鎖の静電的相互作用エ ネルギーが、溶媒からより隔離されているA3/G4間の方がG6/T7間よりも大きいことが、A3/G4間 に対するGaPcの高い親和性に反映されていると考えられる³。

- 引用文献 1. H. Shimizu et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 2015, 88, 655-652.
 - 2. R. J. Abraham and C. J. Medforth, Magn. Reason. Chem., 1988, 26, 803-812.
 - 3. M. Uchiyama et al., Chem. Lett., 2020, 49, 530-533.

謝辞 本研究は、科研費(16KT0048、19H02824)で行われた。

3L9

高圧力NMRで観るタンパク質の変性

○北原亮¹,シュー メンジュン²,若本拓朗³,フランス ムルダー⁴
 1立命館大学薬学部
 2ワシントン大学化学
 3立命館大学大学院生命科学研究科
 4オーフス大学 iNANO

Protein unfolding studied by high-pressure NMR

Ryo Kitahara¹, Mengjun Xue², Takuro Wakamoto³, Frans A.A. Mulder²
1College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University
2Department of Chemistry, University of Washington
3Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University
4iNANO, University of Aarhus

Proteins exist as ensembles of multiple conformations from the basic folded to the totally unfolded. Although transitions into lowly populated high-Gibbs energy states may lead to protein misfolding and aggregation, characterization of structure and stability of them are largely challenging. High-pressure NMR spectroscopy combined with H/D exchange and R_2 relaxation dispersion techniques were used to characterize the high energy states of the cavity enlarged variant L99A of T4-lysozyme in the pressure range of 0.1–250 MPa. We demonstrated that how internal cavities destabilized the protein. The energetic penalty of empty internal cavities of the protein was estimated to be 0.25 kJ/mL (36 cal/Å³) (Xue et al. PNAS 116, 21031-21036, 2019).

Introduction

水溶液中のタンパク質は立体構造を形成した最安定状態(いわゆる天然状態)と変性 した状態の様々なコンフォメーションを取ることができる。NMRやX線結晶構造解析、 低温電子顕微鏡によって解明される多くは1気圧で最安定な構造である。最安定状態を 逸脱したギブズエネルギーの高い状態(高エネルギー状態)は、機能発現や分子凝集に 関わる場合があるため、その構造や物性の研究が必要である。立体構造の変化は部分モ ル体積の変化を伴うため、圧力増加とともにキャビティーが壊れ水和した部分変性状態 を安定化することができる。R2緩和分散法は、数%程度存在する高エネルギー状態の存 在率や化学シフト、交換速度定数の情報を与える測定手法であり、数十マイクロ秒~ミ リ秒スケールで生じるダイナミクスに対して有効である。水素/重水素交換法は、溶媒交 換から測定開始までに数十分かかることから、それより遅く稀に生じる構造変化の検出 に優れた手法である。T4リゾチームのキャビティー拡張型変異体L99Aには、表面に露出 したPhe114側鎖が拡張された疎水性キャビティーに入り込んだ高エネルギー構造 (Excited state)が報告されており[1]、我々は加圧によりExcited stateが安定化すること

をHSQC信号の減弱に基づき示唆した[2]。今回、野生型およびキャビティー拡張型変異

高圧、キャビティー、変性

○北原亮, シュー メンジュン, 若本拓朗, フランス ムルダー

体L99Aについて、高圧力下でR2緩和分散測定(1 bar-1500 bar)、水素/重水素交換測定(1 bar-2500 bar)を行い多様な変性中間体の存在を見出した[3]。

Methods

T4 リゾチームのC54T/C97AをWT*として用いた。キャビティー拡張型変異体L99Aは、C54T/C97A/L99A変異を有する。WT*、L99Aともに25 mM NaClを含む50 mMリン酸緩衝溶液を用い、最終濃度0.4 mMに調整した (pH 5.5)。*R*2緩和分散測定は¹H-500 MHz, 700 MHz (Bruker Biospin AVANCEIII)を用いて行い、水素/重水素交換は¹H-600 MHz (Bruker Biospin AVANCE)を用いて行った。耐圧NMRセルは、セラミクスセル (Daedalus Innovation)を用いた。

Results & Discussion

 R_2 緩和分散測定から、表1に示すように1barでは2% のExcited stateの存在率が加圧とともに増加し、1500 bar では16%となった。交換速度定数 k_{ex} の圧力依存性解析か ら、Ground stateとExcited state間の活性化体積 $\Delta V \neq$ と部分 モル体積差 ΔV_{GE} は $\Delta V \neq_{GE} = -28\pm 2$ mL/mol, $\Delta V \neq_{EG} = 9\pm 1$ mL/mol, $\Delta V_{GE} = -37\pm 2$ mL/molとなった。

水素/重水素交換測定から、図1に示すように部位毎で 異なるΔGの圧力依存性が得られた。WT*では、N末端側 ドメインがC末端側ドメインに比べ安定であるが、L99A ではC末端ドメインにおける疎水性キャビティーの拡張 により、N末端側ドメインに比べ安定性が低くなった。 また、疎水性キャビティーを取り囲む複数のαへリック ス毎に安定性が異なることがわかった。図2は、αへリ ックスを1つのユニットとして、協同的に変性するユニ ットとそのΔV°を示す。少なくともPUF1, PUF2, PUF3の

3つの変性中間体があることが わかった。全体の変性に必要な ΔV° は100 mL/mol (166 Å³)であり、 結晶構造から算出される疎水性 キャビティーの体積と一致する。 得られた ΔV° と ΔG° から、疎水性キ ャビティーを創出するためには 0.25 kJ/mL (36 cal Å⁻³)のエネルギ ーが必要であることがわかった。

Table 1. Pressure dependence of k_{ex} and P_{E}

Pressure (bar)	k _{ex} (s ⁻¹)	р _Е (%)
1	1190±130	2.1±0.1
200	1130±110	2.7±0.1
500	990±140	4.8±0.2
700	1090±140	5.4±0.2
1000	940±190	10.1±0.8
1500	810±170	16.0±1.5







Fig. 2 Partially unfolded states and ΔV . The N-terminal domain is colored by blue.

References

- 1. G. Bouvignies et al. Nature 477, 111-114 (2011).
- 2. A. Maeno et al. Biophys. J. 108, 133-145 (2015).
- 3. M. Xue et al. PNAS USA 116, 21031-21036 (2019).

3L10 細胞内移行性を決めるRas阻害環状ペプチドの構造的柔軟性 〇竹内恒¹, 今井美咲², 徳永裕二¹,藤崎美和², 鴨志田一², 滝沢剛³, 半沢 宏之³,嶋田一夫⁴ 1産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門 2バイオ産業情報化コンソーシアム 3第一三共RDノバーレ

Conformational plasticity of cyclic Ras-inhibitor peptides defines cell permeabilization activity

oKoh Takeuchi¹, Imai Misaki², Yuji Tokunaga¹, Miwa Fujisaki², Hajime Kamoshida², Takeshi Takizawa³, Hiroyuki Hanzawa³, and Ichio Shimada⁴

1 Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, AIST

4理化学研究所

2 Japan Biological Informatics Consortium

3 Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd.

4 Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN

Cyclorasins 9A5 and 9A54 are 11-mer cyclic peptides that inhibit the Ras–Raf protein interaction. The peptides share a cell-penetrating peptide (CPP)-like motif, however, only 9A5 can permeabilize cells to exhibit cell-based activity. To unveil the structural origin underlying their distinct cellular permeabilization activities, we compared the 3D structures of 9A5 and 9A54 in water and in less polar solvent DMSO by solution NMR. We found that 9A5 changes its extended conformation in water to a compact amphipathic structure in DMSO. However, the conformation of 9A54 cannot readily change, due to the steric hindrance between two neighboring bulky amino-acid sidechains; Tle-2 and dVal-3. We found that the bulkiness of these sidechains defines the cell permeabilization activities, indicating that the conformational plasticity confers the cell permeabilization activity to the cyclic peptides.

環状ペプチドなどの中分子は、低分子では対応が困難な標的に対しても活性を発揮で きることから、新たな創薬モダリティとして注目を集めている。中分子の最も魅力的な 標的の一つは、細胞内タンパク質 - タンパク質相互作用(PPI)である。しかし、多くの 環状ペプチドは細胞内移行性を持たず、細胞内で活性を発揮できるものは僅かである。 また、環状ペプチドの細胞内移行機構は明らかでない。

Cyclorasin 9A5(以下9A5)は、Ras-Raf間のタンパク質相互作用(PPI)を阻害する活性を持つ11アミノ酸残基の環状ペプチドであり、細胞実験でもRas依存的なシグナルを阻害する[1]。一方、Cyclorasin 9A54(以下9A54)は、試験管内ではRas-Raf間のPPIを9A5よりも強く阻害するが、細胞を用いたアッセイでは活性を示さなかった。しかしながら、両者はともに細胞透過性ペプチド様の配列(CPP-likeモチーフ)を保持しており、9A5のThr-2, dAla-3, Fpa-9が、9A54ではさらに疎水的な Tle-2, dVal-3, F₂pa-9となって中分子、環状ペプチド、PPI阻害剤、細胞内到達性、構造変化

Oたけうち こう、いまい みさき、とくなが ゆうじ、ふじさき みわ、かもしだ はじめ、たきざ わ たけし、はんざわ ひろゆき、しまだ いちお いることから、一次配列か らは、むしろ9A54の方が、 高い細胞内移行性を示すと 期待される(Fig.1)。本研究 では、この予想外の細胞内移 行性の違いを明らかにするた め、異なる極性を持つ溶媒中 で、溶液NMR法を用いた立体 構造決定を行った。

立体構造決定は定法に従い NOEの強度を距離情報に変換

し、極性の高い水溶液中と極性の低い A
 DMSO中における立体構造を、XPLOR-NIH
 により決定をした。その結果、高い細胞内移
 行性を示す9A5は、溶媒の極性に応じて柔軟
 に立体構造を変化させ、水中では比較的延
 びた構造を示すのに対して、DMSO中では、
 コンパクトな両親媒性構造へと変化するこ
 とが明らかとなった(Fig. 2A)。一方、細胞
 内移行性を示さない9A54は、9A5と同様の
 構造変化を起すことができなかった(Fig. 2B)。

9A5と9A54のDMSO中での構造を比較す ると、9A5は残基番号2,3を頂点とするタイ トなターン構造を形成し (Fig. 3A)、コンパ クトな構造を取れることが分かった。一方、 当該部位は、9A5と9A54で配列が異なる部 分に相当し、同様の構造を9A54が形成しよ うとすると、付加されたメチル基が立体障 害を起こしてしまう(Fig. 3A矢印)。さら に、既に報告のあるcyclorasinアナログにつ いて、当該残基の嵩高さと細胞内移行性を 比較したところ、両者が逆相関することが 明らかとなった(Fig.3B)。以上の結果は、 連続した嵩高いアミノ酸残基Tle-2とdVal-3 の立体障害により、9A54が細胞内移行性を 示す構造への転換を起こせないこと。また、 NMRにより明らかとなった9A5の溶媒環境 に応じた柔軟な構造変化が、環状ペプチド の細胞内移行性を左右する重要な要素であ ることを示している。

[1] Upadhyaya et al. Angew. Chem. Int. Ed.
(2015), 54, 7602 – 7606.







Fig. 2. NMR structures of (A) 9A5 and (B) 9A54



Fig. 3. (A) Turn conformation of 9A5 in DMSO (B) Sidechain bulkiness and permeabilization activity.

ポスター発表要旨

P1 固体NMRを用いたAβ(1-42)線維へのEGCG添加による構造変化の検出 ○藤田健太郎¹,松田勇¹,石井佳誉^{1,2} ¹東京工業大学 生命理工学院 ²理化学研究所 放射光科学研究センター NMR研究開発部門

Detection of structural changes by adding EGCG to A β (1-42) fibrils using solid-state NMR

oKentaro Fujita¹, Matsuda Isamu¹, Yoshitaka Ishii^{1,2}

¹School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology ²NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center

Alzheimer's disease has become a major social problem with the aging of the population, but its fundamental treatment has not been developed yet. In this study, we prepared fibril of 42-residue amyloid- β (A β (1-42)), which are the causative proteins of Alzheimer's disease, and analyzed the structural changes using solid-state NMR when EGCG, a kind of catechin contained in green tea, was added to fibrils. The structural change was detected from the ¹³C chemical-shift changes of A β (1-42) with/without EGCG by 2D ¹³C -¹³C solid-state NMR measurement. In this study, we suggest that EGCG may act on a specific structure of A β (1-42) to cause defibrillation or to alter the structure. This study aims to gain structural understanding of A β (1-42) fibril that are interacting with EGCG and contribute to the development of therapeutic drugs.

【背景】

高齢化に伴い、アルツハイマー病は大きな社会問題となっているが、その根本的な治療薬はいまだに開発されていない。アミロイド $\beta(A\beta)$ とは膜タンパクAPP(Amyloid precursor protein)の一部が切り出されて産生される40~43残基からなる疎水性のタンパク質である。アルツハイマー病では、A β が会合して線維を形成し、脳内に老人斑として蓄積する。凝集したA β による毒性により、脳神経が変性され、アルツハイマー病の発症につながるというメカニズムが示唆されてきた。脳内には40残基と42残基のA β が主なアイソフォームとして存在するが、老人斑の主成分である42残基のA β (1-42)が特に線維化が速く、神経毒性が高い。A β (1-42)線維は、分子内に β シートを複数もつS字型のモノマーが連なって構成されており、分子間における疎水性相互作用や水素結合によって安定化されたクロス β シート構造をとることが分かっている¹。近年、A β (1-42)に作用する低分子化合物が数多く探索されているが、その1つにEGCG(Epigallocatechin gallate)がある。EGCGは緑茶に多く含まれるポリフェノールで、緑茶中のカテキンの約半分を占めている成分である。EGCGはA β (1-42)の凝集を阻害するほか、A β (1-42)繊維を減少させるという報告もあるが、詳しい作用機序が解明されていない²。本研究の目的は、アルツハイマー病の原因とされているA β (1-42)線維にEGCGを添加した時のA β (1-42)の状態を透過型電子顕微鏡(TEM)や固体NMRを用いて解析し、A β (1-42)のその結合部位と、線維が起こす構造変化を明らかにすることである。

アルツハイマー病、A β 42、EGCG

○ふじた けんたろう, まつだ いさむ, いしい よしたか

【実験・結果と考察】

A β (1-42)線維は、A β (1-42)モノマーをペプチド合成機で合成し、HPLCによって精製した後、 室温でインキュベーションして作製した。A β (1-42)線維のサンプルを2つに等分し、一方にのみ EGCGを加えて両者をさらにインキュベーションした。次に、A β (1-42)線維にEGCGを添加した試 料と、コントロールとして添加していない試料の分子レベルでの構造的な違いを明らかにするた めに、固体NMRによる測定を行い、両者を比較した。固体NMRでは5残基のみを¹³C標識したA β (1-42)線維を作製し、DARR法を用いた2D¹³C-¹³C測定を行い、スペクトルを比較して構造変化を起 こしているかどうかの検討を行った。合計で6種類のラベルサンプルを作製し、NMR測定により比 較・解析を行った。

NMR測定の結果、V18F19A21G33L34を¹³C標識したA β (1-42)に関して、コントロールではA21 のピークが3つ存在していたが、EGCGの添加によって2つ消滅して1つのみになった。またコント ロールにおけるL34の2種類のピークの強度比がEGCGの添加によって逆転した。つまり、EGCGは 特定の構造をとるA β (1-42)線維に対して作用し、線維の脱線維化か構造変化を誘起する効果があ る可能性があることが示唆された。

EGCGが作用するA β (1-42)線維を特異的に作製することができればEGCGのA β (1-42)線維に及 ぼす影響をより深く洞察できると考えた。当研究室からの先行研究³によると、低温(4°C)で作製さ れたA β (1-42)線維は常温で作製されたものと構造が異なるということが報告されている。この論 文において低温で作製された線維のスペクトルと、本研究において常温で作製された線維に EGCGを添加して消滅したスペクトルのA21・L34における化学シフトが類似していることから、 EGCGは低温で作製された線維構造に特異的に作用するのではないかという仮説を立てた。論文 によると、低温条件で形成された線維はSPAと呼ばれるオリゴマー由来である可能性があること が示唆されており、SPAはアルツハイマー病の患者の脳由来の毒性オリゴマー(ASPD)と構造的に 類似していることが示されている。このことからも、EGCGがアルツハイマー病の治療への効果を 示すことに繋がる仮説であり、実験して検証する必要があると考えた。仮説を検証するために、 新たに低温条件でインキュベーションしたA β (1-42)線維に対して上記と同様にDARR法を用いた 2D¹³C-¹³C測定を行った。この実験の詳細については当日報告する予定である。

【参考文献】

1.Xiao Y et al., Nat. Struct. Mol. Biol. 6, 499-505(2015)

2.Palhano FL et al., J. Am. Chem. Soc. 135,7503-7510(2013)

3. Xiao Y et al, J. Biol. Chem., 295, 458-467 (2020)

P2Y 固体¹³C NMR法とX線回析によるジブロモアントラセン類の 結晶構造と運動性の関係 ○三影昇平¹,神谷奈津美¹,小泉俊雄¹,浅野敦志¹, ¹防衛大学校・応用化学科

Relationship between crystal structure and mobility of dibromoanthracenes investigated by solid state ¹³C NMR and X-ray diffraction

OShohei Mikage¹, Natsumi Kamiya¹, Toshio Koizumi¹, Atsushi Asano¹ ¹Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Kanagawa, Japan

To apply the organic crystals for an electric device widely, it is better for the crystal to be flexible. We recently found that both 9,10-dibromoanthracene (DBAn) and 1,8-DBAn form a needle-shaped crystal, but the 2,6-DBAn does not form such a crystal. Furthermore, the 9,10-DBAn needle-shaped crystal shows bendable property, while the 1,8-DBAn crystal does not bend. This difference in the bending property between the 9,10- and 1,8-DBAn crystals was caused by the crystal packing structure. In this study, we investigate the molecular mobility of the three DBAns for both powder and crystal by the temperature dependence of T_1^{C} . The slow motion region of 9,10-DBAn molecules rather than 2,6- and 1,8-DBAn molecules presumably suggests the difference in formation of the crystal packing.

<u><緒言></u>

π共役系分子からなる有機材料は電子を容易に受け渡せるため、有機半導体や有機薄膜太陽電池などの様々なデバイスへの応用が期待されている。このような材料を効果的に利用するには、効率的なキャリア移動が重要となるため、分子が密に詰まった結晶が 有利である。一般に、有機分子の結晶は硬く脆い。そのため、デバイス等への幅広い応用のためには、柔軟性を兼ね備えた材料の開発が不可欠である。しかし、有機材料の結晶に柔軟性を持たせることは容易ではない。

最近我々は、単純な構造であるジブロモアントラセンが、結晶であるにも関わらず屈 曲性を有することを見出した¹⁾。すなわち、9,10-ジブロモアントラセンが最長5 cmの針 状結晶を形成し、さらにその結晶は折れることなく曲がり、元に戻るという性質を示し た。その一方、1,8-ジブロモアントラセンは同様に針状結晶を形成したが、曲がらず硬 い結晶であった。また、2,6-ジブロモアントラセンは針状結晶を形成しなかった。そこ で本研究では、これらの結晶と粉末の運動性を固体¹³C NMR法から解析し、X線回折か ら求めた結晶構造との関連性について検討した。

<実験・解析>

和光純薬から9,10-ジブロモアントラセン(9,10-DBAn)を、1,8-DBAnと2,6-DBAnは東京 化成工業から購入した。各種結晶は溶媒蒸発法により作製した。単結晶構造解析は Bruker AXS社製のSMART APEX IIを用いて行い、X線源にMoKα線(λ=0.71 Å)を用いた。 ジブロモアントラセン、緩和時間、固体NMR

○みかげしょうへい、かみやなつみ、こいずみとしお、あさのあつし

固体高分解能¹³C NMRスペクトルは、VARIAN社製NMR systems 400WBを用いて測定さ れた。マジック角試料回転(MAS)速度は10 kHz、高出力¹Hカップリング(DD)はTPPM法 を用いて128kHzのパワーで行った。用いた¹Hの90度パルス幅は1.6 μ s、交差分極(CP)の ラジオ波強度は¹Hが65.8 kHz、¹³Cが53.2 kHzである。¹³Cのスピン-格子緩和時間(T_1^{C})は、 Torchia法を用いて積算回数 8 回で行い、繰り返し時間を¹Hのスピン-格子緩和時間(T_1^{H}) の 5 倍に設定した。 T_1^{H} が温度に依存して変化するため、9,10-DBAnでは170~220 s、 1,8-DBAnでは210~260 s、2,6-DBAnでは330 sに繰り返し時間を設定した。温度は25℃およ び30℃~100℃までの10℃刻みである。

<結果・考察>

Fig. 1 に9,10-DBAn (a)、1,8-DBAn (b)、2,6-DBAn (c)の構造式ならびに結晶の写真を示した。 9,10-DBAnと1,8-DBAnは針状結晶となったが、2,6-DBAnは平板状となり針状にはならなかった。 針状結晶となった9,10-DBAnと1,8-DBAnの屈曲試験を行ったところ、9,10-DBAn (d)は容易に曲が り、すぐに元に戻ることから、柔軟な結晶を形成していることが示された。一方、見た目は同じ 針状結晶となった1,8-DBAn (e)は、曲げることができず、ある程度の力をかけると折れてしまった。





単結晶構造解析を行ったところ、9,10-DBAnと1,8-DBAnは同じ針状結晶でも全く異なるパッキング構造を形成していることがわかった。9,10-DBAnは、a 軸方向に対してface-to-faceで slip-stackingしたパッキング構造の繊維状ラメラ(Fibril lamella)構造をとる。そのため、応力を加えた際に、9,10-DBAn分子が結晶中ですべることによって屈曲状態を維持することができると考えられる。一方、1,8-DBAnは部分的にface-to-face構造を有するものの、a軸方向から見ると交差するような形で分子が配置しており、ラメラを形成していないことがわかった。以上により、官能基の位置の違いによって結晶化の際に異なるパッキング構造を取ることが示された。

両者ともアントラセン骨格をもち、同様の形状の結晶を形成するが、異なるパッキング様式を とっていた。つまり、臭素の置換位置の違いがアントラセンの分子運動を変え、結晶化過程のパ ッキング形成に影響したと考えられる。そこで、固体¹³C NMR法から*T*₁^Cの温度依存性を観測し、 分子運動を検討した。 **Fig. 2** に各種ジブロモアントラセンの粉末状態 (左側) と結晶状態 (右側) の固体¹³C CPMAS NMRスペクトルを示した。9,10-DBAnでは、127 ppm付近に幅広で非対称なピークが現れるのみで ある。1,8-DBAnでは127 ppmと131 ppm付近、2,6- DBAnでは125 ppmと130 ppm付近の2ヶ所にピ ークが観測された。これら131 ppmと125 ppmのピークは、化学シフトから図中に矢印で示した炭 素由来と帰属された。粉末と結晶のスペクトルを比較すると、ピーク形状、線幅に大きな違いは 観測されなかった。ただし、*T*₁^Hは9,10-DBAn、1,8-DBAn、2,6-DBAnの順に粉末で35 s、42 s、63 s、 結晶で44 s、48 s、65 sと、粉末と結晶で大きな違いはないが、針状結晶を形成する9,10-DBAnと 1,8-DBAnの値が2,6-DBAnに比べて20 s以上短くなっていた。



Fig. 2. Observed ¹³C CPMAS NMR spectra of (a) 9,10-DBAn, (b) 1,8-DBAn, and (c) 2,6-DBAn powders (left) and crystals (right).

Fig. 3に各種ジブロモアントラセンの T_1^c の温度依存性を示す。すべてのジブロモアントラセン の T_1^c は、200 sを超える長い値を示した。9,10-DBAnの粉末では、温度上昇に伴って T_1^c は約350 s から減少し、100℃で約240 sとなった。結晶の T_1^c は全ての温度域で粉末より短くなり、温度上昇 に伴って約240 sから100℃で約200 sと減少した。一方、1,8-DBAnと2,6-DBAnはほとんど温度依存 性を示さなかった。さらに、1,8-DBAnでは T_1^c は約340 s近傍、2,6-DBAnでは約420 s近傍と、 9,10-DBAnに比べて100 s以上長い値を示した。これらの測定結果は、9,10-DBAnの分子運動がstrong collision limit側の領域にあり、1,8-DBAnと2,6-DBAnの分子運動は T_1^c 最小値近傍にあることを示し た。

剛体球の単純な運動を想定した T_1^c の最小値は約0.17 sであるため、これらジブロモアントラセンの T_1^c は、単純な運動で再現できないことは明らかである。また、1,8-DBAnや2,6-DBAnで粉末と結晶で T_1^c にほとんど違いが観測されないことから、分子の秩序の度合いは T_1^c に大きな影響を与えないと言える。おそらく、アントラセン骨格の長軸方向に対しての振動が T_1^c の主な運動成分と考えられる。

観測された T_1^c の温度依存性が、剛体球を想定した温度依存性と似た傾向にあると仮定し、剛体球の運動を仮定した T_1^c の理論曲線(式(1))を平行移動(ファクターとして ξ を導入)して実測の値を

再現できるかシミュレーションした。Fig. 3に実線または破線でその結果を示した。相関時間と温度の換算にはアレニウス型を用いた(式(2))。

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1^C} &= \xi \frac{\hbar^2 \gamma_{\rm H}^2 \gamma_{\rm C}^2}{\gamma_{\rm CH}^6} \left\{ \frac{\tau}{1 + (\omega_{\rm H} - \omega_{\rm C})^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_{\rm C}^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1 + (\omega_{\rm H} + \omega_{\rm C})^2 \tau^2} \right\} & \dots (1) \\ \tau &= \tau_\infty exp(E_{\rm a}/RT) & \dots (2) \end{aligned}$$

1,8-DBAnと2,6-DBAnの T_1^{C} の温度依存性は、 $\tau_{\infty} = 100 \text{ ps}$ 、活性化エネルギー(E_a)が7.0 kJ/molで 実測を良く再現した。9,10-DBAnの T_1^{C} の温度依存性を再現するため、 τ_{∞} を100 psに固定し、 E_a の

み変化させたところ、粉末で9.1 kJ/mol、結晶で 8.7 kJ/molとすると実測を良く再現することがわ かった(Fig. 3a)。このことは、9,10-DBAnの結晶 中の分子運動の障壁が、粉末状態と比較して0.4 kJ/mol低いことを表しており、結晶状態の方が運 動し易い状態にあることを示している。つまり、 9,10-DBAnの結晶は運動しやすいパッキング構 造を形成することで屈曲性を有していることが 示された。また、他のジブロモアントラセンよ り粉末状態での分子運動が遅い領域にあること が、9,10-DBAnが柔軟な結晶を形成できる条件で はないかと考えられた。





Fig. 3. Logarithm of T_1^{C} values against the inverse temperature for 9,10-DBAn (a), 1,8-DBAn (b), and 2,6-DBAn (c).

<u><参考文献></u> 1) 三影昇平、ジブロモアントラセンからなるエラスティック結晶の創製、修士論文 (2020)

P3 カルモジュリン融合タンパク質システムを使用した安定同 位体標識セクロピンP1の大量発現とNMR構造解析 〇谷 昊¹,加藤 貴純¹,石田 博昭²,熊木 康裕¹,塚本 卓^{1,3},菊川 峰志 ^{1,3},出村 誠^{1,3}, Vogel Hans J.²,相沢 智康^{1,3} 1北海道大学 大学院生命科学院 2カルガリー大学 生命科学学科 3北海道大学 国際連携研究教育局

Overexpression of stable isotope-labeled cecropin P1 by using calmodulin-fusion protein system and NMR researches

Gu Hao¹, Kato Takasumi¹, Ishida Hiroaki², Kumaki Yasuhiro¹, Tsukamoto Takashi^{1,3}, Kikukawa Takashi^{1,3}, Demura Makoto^{1,3}, Vogel Hans J.², Aizawa Tomoyasu^{1,3}

1 Graduate School of Life Science, Hokkaido University

2 Department of Biological Sciences, University of Calgary

3 Global Institution for Collaborative Research and Education, Hokkaido University

Cecropin P1 (CP1), isolated from *Ascaris suum* inhabiting in the intestine of pigs, is a wellstudied α -helical antimicrobial peptide (AMP). However, it is difficult to obtain a large amount of recombinant CP1 by using *Escherichia coli* (*E. coli*) system because of high toxicity of CP1 and degradation by endogenous proteases. In this study, we applied calmodulin (CaM), which has many successful cases as a new fusion partner for overexpression of recombinant AMP, to enhance the expression of CP1. As a result, a large amount of stable isotope-labeled CP1 was generated for structural analysis in a membrane-mimic condition by nuclear magnetic resonance (NMR), and the structure of CP1 in a dodecylphosphocholine (DPC) micellar environment was investigated.

Construction of fusion proteins

In previous work, to enhance the expression of CP1, thioredoxin (Trx) was utilized as a fusion protein to attempt to reduce the toxicity of CP1. But the effect was not ideal. The final scale of yield was just 0.10 mg per 1.0 litter Luria-Bertani (LB) media. Many studies confirmed CaM could control various of AMPs to restrict their toxicity and protect the target AMPs from the proteolysis to increase the yield of



overexpression [1]. As a classic α -helical AMPs, CP1 is likely to get benefit from this novel expression system as well. In the reported CaM fusion protein expression system, for purification, a Tobacco Etch Virus (TEV) cleavage site was used to remove fusion CaM. However, it led to an undesirable N-terminal glycine probably influencing the characteristic of CP1. To get rid of it, this research changed the TEV site to enterokinase (EK) cleavage site. The latter had no such worries (**Fig. 1**)

cecropin P1、calmodulin、stable isotopic label ○こく こう,かとう たかすみ,いしだ ひろあき,くまき やすひろ,つかもと たかし, きくかわ たかし,でむら まこと,ぼげる はんす じぇ,あいざわ ともやす

Overexpression, purification and activity assay

Transformed E. coli cell BL21 (DE3) was grown in LB media and M9 minimal media. Fusion protein with was induced 1.0 mM ß -D-1thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h at 37 °C. For purification, immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), EK digestion, dialysis and high-performance reverse-phase liquid chromatography (RP-HPLC) were proceeded to get 3.7 mg intact CP1 from 1 litter LB media. Finally, over 100 times larger amount of CP1 was obtained compared with Trx fusion protein system (Fig. 2). In order to investigate the antibacterial activity of CP1 prepared by the method developed in this study, the minimum bactericidal concentration (MBC) was measured for E. coli ML-35 strain which is Gram-



negative bacterium. The result showed that CP1 completely inhibited bacterial growth at a concentration of $3.2 \,\mu\text{M}$ or less (**Fig. 3**), which is same as the results of previous studies that examined the antibacterial activity of CP1 against Gram-negative.

Structure analysis by NMR

The complete structure of chemical synthesized CP1 in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) had been identified in 1992 [2]. In order to further investigate the structure in the membrane mimetic environment, ¹⁵N, ¹³C isotope-labeled CP1 was overexpressed and purified for NMR research. The sample was dissolved with 10% D₂O and 40 mM DPC in a pH 5.0 condition. Standard triple-resonance experiments were performed for signal assignment and for NOE information. The results proved recombinant CP1 produced by CaM fusion protein system had a α -helical structure in membrane mimic environment (**Fig. 4**). This system can safely produce large quantities of recombinant stable isotope-labeled CP1, which provides strong support for various researches.



Fig. 4. ¹H-¹⁵N HSQC spectrum and NMR structure of CP1

References

 [1] Ishida H, Nguyen LT, Gopal R, Aizawa T, Vogel HJ. Overexpression of Antimicrobial, Anticancer, and Transmembrane Peptides in Escherichia coli through a Calmodulin-Peptide Fusion System. *J Am Chem Soc.* 2016;138(35):11318-11326.

[2] Sipos D, Andersson M, Ehrenberg A. The structure of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 in solution, determined by proton-NMR. *Eur J Biochem.* 1992;209(1):163-169.

P4

Alpha-synuclein Aggregation Kinetics and Structural Insight in the Presence of β-amyloid Fibrils

 ○ウェイ ズシュアン¹、松永 達也²、重光 佳基¹、 石井 佳誉^{1, 2}
 ◦ Zixuan Wei¹, Tatsuya Matsunaga², Yoshiki Shigemitsu¹, Yoshitaka Ishii^{1, 2}
 ¹ School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

² NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center

Amyloid proteins, such as β -amyloid (A β) and α -synuclein (α -syn), misfold into amyloid oligomers and fibrils, which are regarded as pathological hallmarks of various neurodegenerative diseases. Dementia with Lewy bodies (DLB) and Parkinson's disease (PD), both major neurodegenerative disorders, are resulted by α -syn aggregation and formation of Lewy bodies (LB). Recent studies suggested that deposition of LB was often found in half cases of Alzheimer's (AD), implying possibility of correlation between A β and α -syn aggregation. In this study, we examine effects of heterogeneous cross-seeding of A β fibril in α -syn misfolding. Aggregation kinetics of α -syn monomers in the presence of "seed" A β fibril was monitored via Thioflavin T (ThT) fluorescence assay. We will also report the impact of the cross-seeding on structures of the resultant fibrils characterized by solid-state NMR (SSNMR).

Background

A major hallmark of PD's brain is the formation of LB, which are comprised mainly of misfolded α -syn. AD is characterized pathologically by accumulation of A β plaques and tau tangles. In up to half cases of AD, DLB pathology is also observed (Hamilton 2000). Previous studies suggested that α -syn, A β 40 and A β 42 have a cross-seeding effect on each other's aggregation (Ono *et al.* 2012). Cross-seeding effect indicates acceleration of misfolding for an amyloid protein through interactions with "seed" fibril made from another amyloid protein, which often result in shortening of the lag phase of aggregation. However, variations in cross-seeding efficiency, which typically depends on the amino-acid sequence, are not well understood. Also, structural data are rarely available for amyloid fibrils derived from such cross-seeding interactions. To discover overlapping pathology of AD and PD, we obtained structural insight via transmission electron microscopy (TEM) and SSNMR analysis.

Experiments

E. coli BL21 (DE3) strain was transformed by a plasmid pET28a α -syn. A single colony was amplified and grew to 1 L of M9 medium and harvested 4 h after induction. Salting out, followed by ion-exchange chromatography, was applied to purify α -syn and the sample was then dialyzed at 4°C for 32 h in a 20 mM phosphate buffer (pH 7.4). Then, α -syn at 150 μ M was Incubated in the phosphate buffer at 37°C under orbital shaking. To investigate seeding and cross-seeding effect, mature A β 42 and α -syn fibrils are sonicated and added into samples as "seed" α -synuclein; Cross-seeding; SSNMR

○ウェイ ズシュアン、まつなが たつや、しげみつ よしき、いしい よしたか

before the incubation. Aggregation kinetics was observed via ThT fluorescence, which give strong fluorescence signals upon amyloid fibril formation. The morphology of unseeded, seeded, or cross-seeded products was visualized under TEM. Uniformly labeled ¹³C, ¹⁵N α -syn fibrils were collected via centrifuge and lyophilized to be packed into 1 mm rotors for further SSNMR characterization of ¹³C-¹³C 2D SSNMR.

Results

Based on ThT fluorescence curve, which monitored aggregation pathways of α -syn, fluorescence increased hyperbolically in the presence of both α -syn seed (self-seed) and A β 42 seed (cross-seed), whereas sigmoidal curve was observed in absence of seeds. Self-seeding promoted aggregation with a higher aggregation rate than cross-seeding, also with higher reproducibility. We will discuss the morphological and structural differences of the self- and cross-seeded α -syn fibrils observed by TEM and SSNMR, which may suggest some new insight into the interactions between AD and DLB pathogenesis.

References

(1) Hamilton, R. Lewy Bodies in Alzheimer's Disease: A Neuropathological Review Of 145 Cases Using A -Synuclein Immunohistochemistry. Brain Pathology 2006, 10 (3), 378–384.

(2) Ono, K.; Takahashi, R.; Ikeda, T.; Yamada, M. Cross-Seeding Effects of Amyloid B-Protein And A-Synuclein. Journal of Neurochemistry 2012, 122 (5), 883–890.

P5

重原子水和物の希釈濃縮シフトに関する相対論的量子化学 計算 〇朝倉由光¹,中川直哉¹,桑原大介¹

1 電気通信大学大学院 情報理工学研究科

Relativistic quantum chemical calculations for dilution-concentration shifts in heavy atom hydrates

Yoshimitsu Asakura ¹, Naoya Nakagawa ¹, Daisuke Kuwahara ¹
 I Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications

When measuring NMR resonance lines for nuclei that have been ionized from a salt in solution to become solvated ions, the resonance frequency changes with the concentration of the solution. The amount of this shift, i.e., the difference between the chemical shift in the infinitely diluted state and the saturated state (the dilution-concentration shift), basically increases with the atomic number, while it remains relatively small for alkali metals and alkaline earth metals even for the elements in the 5th and 6th period. In this study, we analyze the frontier molecular orbitals in the solvated complex structure and calculate the absolute NMR shielding constants for various heavy atoms by relativistic quantum chemistry calculations to clarify the factors determining the magnitude of the dilution-concentration shifts.

溶液中で塩から電離し溶媒和イオンとなった原子核についてNMR共鳴線を測定すると、溶液の 濃度によって共鳴周波数が変化することが知られている。この変化の量(無限希釈状態と飽和状 態の化学シフトの差:希釈濃縮シフト)は基本的に原子番号が大きくなるほど増えるものの、ア ルカリ金属やアルカリ土類金属では第5、6周期の元素においても比較的小さいままという特徴が ある。希釈濃縮シフトが発生する化学的原因の一つとして溶液中の原子核が形成する錯体構造の 変化、すなわち下記のような原子核M(電荷m)、溶媒S(配位数1)、カウンターイオンX(電荷n)によ る平衡状態の存在が実験・理論計算より分かっている[1]。

$$[\mathsf{MS}_l]^{+m} + \mathsf{X}^{+n} \leftrightarrows [\mathsf{MS}_l \mathsf{X}]^{+(m+n)} \tag{1}$$

本研究ではこの平衡状態のモデルを踏まえ、溶媒和錯体構造におけるフロンティア分子軌道の解 析およびNMR絶対遮蔽定数の相対論的量子化学計算より希釈濃縮シフトの大きさを決定づけてい る要因を明らかにする。

MR遮蔽定数の相対論計算については、分子中で重原子に隣接した軽原子の遮蔽定数に現れる HALA効果と、重原子自身の遮蔽定数に現れるHAHA効果という括りで議論が行われている。このう ちHALA効果のメカニズムについてはフロンティア分子軌道の量子化学計算を用いた周期表全体に わたる統一的な説明がなされており[2]、それによればフロンティア分子軌道のπ性/σ性がそれ ぞれ遮蔽/反遮蔽を引き起こすことと、スピン軌道相互作用が誘起する電子変形密度(SO-EDD)に よる軽原子周辺の電子の疎密との間に対応があると示唆されている。本研究で着目しているのは 量子化学計算、スピン軌道相互作用、化学シフト

○あさくらよしみつ,なかがわなおや,桑原大介

もう一方の相対論効果HAHA効果であり、こちらのメカニズムはいまだ不明な点が多い。HALA効果の例を参考にし、構造最適化をした溶媒和錯体のフロンティア分子軌道を調べ、それが実験値の示す希釈濃縮シフトの大きさ、正負の方向とどのような関係があるか等を考察する。

研究内容

(1)の平衡状態のうち、溶媒のみと錯体分子を形成している状態をAとし、溶媒分子のほかカウ ンターイオンとも結合した状態をBとする。一般に平衡状態において測定される共鳴線の化学シフ ト δ は、ABそれぞれの状態における化学シフト δ_A 、 δ_B と分子がA状態にある時間の割合 α を用い て次式で表される。

$$\delta = \alpha \delta_{\rm A} - (1 - \alpha) \delta_{\rm B} \tag{2}$$

以下では重原子水和物として硝酸鉛を水和させた鉛水和物について δ_A 、 δ_B を計算した結果を紹介 する。AをPb(H₂0)²⁺、BをPb(H₂0)⁷(NO₃)⁺としてまずADF 2019.304による構造最適化をした。初期 構造における水分子の配置は実験結果を参考にhemi-directedとなるようにした。汎関数をZORAωB97X、基底関数は各原子中の全電子についてそれぞれH: DZ、N: TZP、0: TZP、Pb:TZ2Pとした。 また溶媒効果にCOSMO/Waterを用い、さらにスピン軌道相互作用を取り入れて計算を行った。計算 の結果得られた構造がFig. 1である。次にこの構造についてそれぞれNMR遮蔽定数の計算をした。

3 種 類 の 汎 関 数 (GGA: BP86, Hybrid: PBE0, Hybrid: B3LYP) で計算し、その後基準物質のテ トラメチル鉛の遮蔽定数との差より化学シフ トを求め実験値とともにFig. 2にまとめた。 計算結果より aを求めてみる。硝酸鉛の無限 希釈状態と飽和状態の化学シフトの実験値は それぞれ-2858ppm、-3028ppmであり、これと BP86による計算値 δ_{A} =-2742ppm、 δ_{B} =-3284ppm を式(2) へ代入すると、無限希釈状態では a

=0.7897、飽和状態では *a*=0.4723に なる。*a*からは解離定数が求まるた め、解離定数の妥当性や解離定数と 希釈濃縮シフトの関係については 今後検討する予定である。HALA効果 の場合と同様に、フロンティア分子 軌道に着目した周期表の全原子に わたる性質を考察するために、現在 我々は他の硝酸塩を水和させたモ デルについても化学シフトの計算 を行い、実験値を再現するよう試み ている。

[1]Alkan, F., Small, T., Bai, S.,

Dominowski, A. & Dybowski, C. J Struct

Chem 57, 369–375 (2016).

[2]Vícha, J., Komorovsky, S., Repisky, M., Marek, R. & Straka, M. J. Chem. Theory Comput. 14, 3025–3039 (2018).



Fig. 1. Pb(H2O) 72+, Pb(H2O) 7(NO3)+最適化構造



Fig. 2. 硝酸鉛における ²⁰⁷Pb 希釈濃縮シフト

P6Yトリプレット DNP による p-ターフェニル擬単結晶の高偏極化
〇森下 裕貴1, 久住 亮介 2, 宮西 孝一郎1, 武田 和行3, 根来 誠4,
香川 晃徳1.4.5, 北川 勝浩1.41 大阪大学大学院 基礎工学研究科, 2 京都大学大学院 農学研究科,
3 京都大学大学院 理学研究科, 4 大阪大学先導的学際研究機構量子情

報・量子生命研究センター,5 JST さきがけ

High polarization of pseudo-single-crystal p-terphenyl with triplet-DNP

•Yuki Morishita 1, Ryosuke Kusumi 2, Koichiro Miyanishi 1, Kazuyuki Takeda 3, Makoto Negoro 4, Akinori Kagawa 1,4,5, Masahiro Kitagawa 1,4

1 Graduate School of Engineering Science, Osaka University,2 Graduate School of Agriculture, Kyoto University,3 Graduate School of Science, Kyoto University,4 Center for Quantum Information and Quantum Biology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University,5 JST, PRESTO

Dynamic nuclear polarization (DNP) using electron spins in the photo-excited triplet state (triplet-DNP) can lead to nuclear spin polarization of up to several tens of percent even at ambient temperatures and in low magnetic fields. Triplet-DNP can be combined with a dissolution technique to prepare hyperpolarized nuclear spins in solution. Even though rapid dissolution prefers powder samples, the effect of the large anisotropies of the zero-field splitting tensor and of electron-spin polarization of the photo-excited triplet state in such randomly-oriented systems is to significantly degrade the efficiency of the buildup of nuclear polarization. Here, we demonstrate triplet-DNP in a magnetically oriented microcrystal array (MOMA) of pentacene doped *p*-terphenyl. Using this "powder" sample where the individual microcrystals are nevertheless aligned three dimensionally in a polymer matrix, we show successful dynamic proton polarization of up to 5.2 %, which is 4.4 times higher than that obtained in the conventional powder sample.

トリプレットDNPは光励起三重項電子を用いることで室温・低磁場でも高い核スピン偏極が得られる。我々は高温水溶液で素早く溶解できる粉末サンプルを用いてトリ プレットDNPの液体NMR, MRIへの応用研究を行っている[1]。しかし、微結晶がラン ダムに配向している粉末では、三重項電子は配向によって異なる偏極率を持ち、ESR スペクトルも大きく広がっているため、DNPで得られる核スピン偏極率は単結晶に比 べて低下してしまう。一方、微結晶を変調型の回転磁場を用いて配向させた後、その 配向を光硬化樹脂などを用いて固定することにより、微結晶の三次元磁場配向体(擬単 結晶, Magnetically Oriented Microcrystal Array(MOMA))を作製しNMRに応用する研究が 行われている[2]。本研究では、その技術を用い、ペンタセンをドープした*p*-ターフェ ニルの微結晶から擬単結晶を作製した。擬単結晶を用いてトリプレットDNPを行った 結果、ランダム配向サンプルと比較して4.4倍の¹Hスピン偏極を得た。

本研究ではBridgman法で作製した0.05 mol%でペンタセンをドープした 20%重水素化した トリプレットDNP、磁場配向

○もりしたゆうき、くすみりょうすけ、みやにしこういちろう、たけだかずゆき、ねごろまこと、 かがわあきのり、きたがわまさひろ p-ターフェニルの単結晶を 元にして、粉末、ランダム配 向、擬単結晶試料の3つの試 料を作製した。単結晶を乳鉢 で30分粉砕し、ふるいを用い てサイズ分離を行うことで、 結晶サイズ75μm-20μmの微



結晶粉末を作製した。その Fig 1. Orientational dependence of ESR spectra of photo-excited triplet 後、粉末をUV硬化モノマー state of pentacene. in (a) single crystal, (b) MOMA.

(変性アクリレートXVL90K,3.2 Pa・s)に分散させた懸 濁液(10 wt%)を二日間静置した。8 Tの超伝導磁石に 備え付けた試料回転装置内に懸濁液を置き、周波数変 調型の回転磁場(90°毎に10および40 rpmと回転速度を 変化させた変調磁場)を60分印加した後、90分間のUV 照射により配向状態の試料を硬化させることで擬単結 晶を作製した。また、磁場を印加せずに懸濁液をUVで 硬化させた試料もランダム配向試料として作製した。

上記の4つの試料についてペンタセンの配向度を調 べるためにESRスペクトルの磁場依存性を測定した。 単結晶においては2つの格子サイトが存在しているの で、スペクトルの分裂が見られた(Fig.1(a))。擬単結晶の ESRスペクトルが磁場に対する角度依存性を持ってい ることから、ペンタセンの長軸が配向していることを 確認できたが、単結晶のようなスペクトルの分裂は見



Fig 2. Experimental buildup curves of 1H polarization by triplet-DNP in single crystal (circles), MOMA (triangles), UV-cured suspension (squares), and powder (diamonds) samples of pentacene-doped p-terphenyl.

られなかった(Fig.1(b))。ESRの信号強度が最大となる角度で単結晶と擬単結晶のトリプレット DNPを行った。トリプレットDNPで用いたISEシーケンス及び装置はこれまで我々のグループで用 いてきたものと同じである[3]。それぞれのサンプルの¹H偏極率(P_{fin})は、単結晶10.29%、擬単結 晶5.20%、ランダム配向1.18%、粉末0.77%であった(Fig.2)。またそれぞれのサンプルのスピン格 子緩和時間(T₁)とDNPによるスピン偏極の時定数(T_{build})を表1に示す。擬単結晶とランダム配向 の偏極率を比較することで、磁場配向によって4.4倍の¹Hスピン偏極が得られることがわか る。単結晶に比べて擬単結晶の偏極率が2倍程度低いのは、T₁が短いことが原因と考えら れ、微結晶のサイズを大きくすることで改善されると考えられる。また、ランダム配向 の偏極率が粉末の1.5倍程度高いのはUV硬化に伴う収縮により、微結晶粉末がわずかに 配向したことが考えられる。

本研究は、戦略的創造研究推進機構(CREST)、科学技術振興機構(JST)の支援を受けて行われた。

[1] Kagawa, Akinori, *et al.* Journal of Magnetic Resonance **309**, 106623 (2019).

[2] Kusumi, Ryosuke, *et al.* Journal of Magnetic Resonance 223, 68 (2019).
[3] Tateishi, Kenichiro, *et al.* Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 111, 7257 (2014).

of	Table 1. Values of	$P_{\rm fin}$, $T_{\rm build}$, and	T_1	obtained by parameter
9).	fitting.			

	P_{fin} (%)	T_{build} (min)	T_1 (min)
single crystal	10.29	3.1	12.3
MOMA	5.20	2.2	5.4
UV-cured suspension	1.18	2.1	5.3
powder	0.77	2.3	5.6

P7 ¹H-¹⁹F間のHOE (Heteronuclear Overhauser Effect)を利用したスピロ環の立体化学決定 〇森田将夫¹,根本暢明²,大森建³ 1公益財団法人 乙卯研究所 2(株) JEOL RESONANCE 3東京工業大学 理学院化学系

Determination of Stereochemistry of Spirocenter utilizing {¹⁹F}-¹H HOE (Heteronuclear Overhauser Effect)

oMasao Morita¹, Nobuaki Nemoto², and Ken Ohmori³

1 Research Foundation ITSUU Laboratory

2 JEOL RESONANCE Inc.

3 Department of Chemistry, School of Science, Tokyo Institute of Technology

Synthetic organic chemists have relied on the ¹H-¹H NOE (<u>N</u>uclear <u>O</u>verhauser <u>E</u>ffect) for the stereochemical determination of natural organic compounds and products. However, the information obtained from {¹H}-¹H NOE alone is often insufficient for stereochemical determination, and in such cases, we must rely on X-ray crystal analysis. Although X-ray crystallography is a universal tool, it has many disadvantages, such as difficulty in crystallization and inability to measure a small amount of sample. We have successfully utilized the {¹⁹F}-¹H HOE (<u>H</u>eteronuclear <u>O</u>verhauser <u>E</u>ffect) to determine the stereochemistry of a compound with a spiro-centered structure, which has been difficult to determine from the {¹H}-¹H NOE alone.

これまで有機合成化学者は、合成した天然有機化合物および生成物の立体化学決定の際に¹H-¹H 間のNOE (Nuclear Overhauser Effect)を汎用してきた。しかし、 $\{^{1}H\}$ -¹H NOEのみで得られる情報 だけでは立体化学決定に及ばないことも多く、その場合はX線結晶解析に頼るのみであった。万能 と思われるX線結晶解析であるが、結晶化しにくいまたはサンプル量が少なすぎる等の場合は測 定できないなど、欠点も多く存在する。そこで今回、我々は $\{^{19}F\}$ -¹H HOE (Heteronuclear Overhauser Effect)を積極的に利用することで、これまで $\{^{1}H\}$ -¹H NOEから得られる情報のみでは立体化学決定 が困難であったスピロ中心構造を備えた化合物の立体化学決定に成功したのでここに報告する。

【背景】

以前、フッ素原子を含む中間体を利用し天然有機化合物ペレニポリドAの初の全合成を達成し

た¹。しかしながら、中間体から付加脱離反応 を経て得られる誘導体**1**および**2**のスピロ中 心の立体化学決定は、 $\{{}^{1}H\}$ - ${}^{1}H$ HOEから得られ る情報では不可能であった。そこで、フッ素 原子へと視点を移し、 $\{{}^{19}F\}$ - ${}^{1}H$ HOEを利用し て誘導体**1**のフッ原子周辺の空間的情報得る ことでスピロ中心の立体化学を決定すること にした(Figure 1)。

フッ素原子、スピロ中心化学、{¹⁹F}-¹H HOE

○もりたまさお、ねもとのぶあき、おおもりけん



【材料と方法】

まず30 mg の1及び2をCDCl₃-dに溶かした。ここで述べる全てのNMR実験は、5 mm室温動作 ROYALプローブ™を装備した、9.38 Tで動作する(それぞれ400 MHz (¹H)および376 MHz (¹⁹F)に相 当) JNM-ECZ400S分光計(JEOL RESONANCE Inc.)を使用して試料温度25.0℃でおこなった。また、 データ処理は、Delta-NMR software version 5.3(JEOL RESONANCE Inc.)を利用した。そして、得 られた時間領域データに対してはhamming-windowをかけ、zero-fill後、Fourier変換を行った。

【結果】

1及び2の{¹⁹F}-¹H HOESY²実験のt₁ first increment 1次元(1D)スペクトル をFigure 2に示す。1(上段)では¹⁹Fと 4.8 ppm付近の¹Hの間にHOEが観測 されたが、2(下段)では観測されな かった。このように、1と2の立体化 学がNMR的手法により決定できた。 この結果は、これまでの化学変換を 伴う決定法の結果と矛盾するもの ではなかった。



【考察】

単純なシーケンスつまり90°(¹⁹F)-90°(¹⁹F)-τ_{mix}-90°(¹H)-Acq.のよう なシーケンスではなく、今回は磁場 勾配パルスを用いたコヒーレンス 経路選択をおこなうシーケンスを

Figure 2. The HOESY t₁-first increment one dimensional (1D) spectra of **1** (top) and **2** (bottom). The mixing time (τ_{mix}) is 300 ms. The coherence pathway selection using field gradient pulses is applied. During the observation period (¹H), ¹⁹F decoupling is not carried out. The peak around 4.8 ppm is (is not) observed in **1** (**2**), respectively.

使用した。コヒーレンス経路選択をおこなうことで、不要な信号を効果的に消去できるため、こ の場合有効である。なお、スピン拡散の影響を見積もるため、混合時間_{でmix}を変化させた実験(HOE build-up実験)を行い、HOEの強度が_{tmix}~300 ms付近で最大となったため(data not shown)、_{tmix}を 300 msとした。ところでこの方法は、常に生成物の立体化学決定に頭を抱える有機合成化学者の 視点からすると、問題としている立体中心の近傍に水素原子が少ないものの近傍にフッ素原子が 存在する場合には大変有用である。そのため、医薬品等の構造によく見られるフッ素原子を含む 他の分子に対しても応用可能である。また、以前であれば¹Hと¹⁹Fのパルスを同時出力できる溶液 NMR装置は非常に限られていたが(例えば2005年当時、日本国内で稼働していたと思われる¹Hと ¹⁹Fのパルスを同時出力可能な日本電子製JNM-ECA分光計は10台程度)、近年、特に400 MHz(¹H) 分光計などの比較的低磁場装置では、単一の高周波パワーアンプ(HF-PA)から¹Hと¹⁹Fを出力させ ることは標準的な装置でも可能となった。よって今後、この方法は汎用的な手法として広がりを 見せると思われる。

【文献】

- 1) Morita, M.; Ohmori, K.; Suzuki, K. Org. Lett. 2015, 17, 5634–5637.
- 2) Yu, C.; Levy, G.C. J. Am. Chem. Soc. 1984, 106, 6533-6537.

P8固体NMRによるプロトン伝導性アルギン酸-ポリアクリル酸-トリアゾール複合体の解析 ○渡邉 陵太¹, 栗原 拓也¹, 重田 泰宏², 雨森 翔悟², 井田 朋智¹, 水野 元博^{1,2} 1金沢大学大学院自然科学研究科 2金沢大学ナノマテリアル研究所

Analysis of Proton Conductive Alginic Acid-Polyacrylic Acid-Triazole Composites by Solid State NMR

 ORyota Watanabe¹, Takuya Kurihara¹, Yasuhiro Shigeta², Shogo Amemori², Tomonori Ida¹, Motohiro Mizuno^{1,2}

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University ²Nanomaterials Research Institute, Kanazawa University

Composites of polymer and triazole (Tz) are known to exhibit high proton conductivity at high temperatures. [1] High proton conductivity of these composites is considered to originate from the continuous proton transfer (Grotthuss Mechanism) induced by the reorientation motion of Tz molecules in polymer. However, to our best knowledge, the detailed motion of Tz has not been clarified yet. Therefore, in this study, we prepared polymer-Tz compounds and investigated the mobility of Tz by solid-state ²H NMR measurement. Then, we aimed to clarify the proton conduction mechanism from the relationship between the mobility of Tz and the proton conductivity.

【序論】

高温でも高いプロトン伝導性を示す固体電解質としてポリマ ーとトリアゾール (Tz) の複合体が期待されている。[1]これら の複合体はポリマーに取り込まれた Tz の再配向運動に伴うプ ロトンホッピング (グロータス機構)によって、プロトン伝導 が生じていると考えられている。しかし、Tz の詳細な運動状態 は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、ポリマーと Tz の複合体を作製し、固体²H NMR 測定により、Tz の運動性 について調べた。そして、Tz の運動性とプロトン伝導性との関 係からプロトン伝導メカニズムの解析を行った。柔軟性の異な る二種類のポリマー (ポリアクリル酸 (PAA) とアルギン酸 (AA))の複合体に Tz を加えることで、Tz の運動性をコント ロールし、プロトン伝導性と Tz の運動性の関係をより明確に することを目指した。



Fig.1. Grotthuss mechanism of Tz

プロトン伝導,固体電解質,固体重水素NMR

○わたなべりょうた,くりはらたくや,しげたやすひろ,あめもりしょうご,いだとものり, みずのもとひろ

【実験】

Tz 溶液、AA 懸濁液、PAA 溶液を混合し、数日間撹拌した。その後、混合液をシャーレに移し、 十分に乾燥させると、薄い無色透明な膜[(1-x)AA-xPAA-yTz (x、y はそれぞれ PAA、Tz の割合を 示す)]が得られた。それぞれの膜について DSC 測定、交流インピーダンス法によるプロトン伝導 率測定、固体 ²H NMR 測定を行った。固体 ²H NMR 測定では、炭素と結合した水素を重水素化し た Tz (Tz(d₂))で作製した(1-x)AA-xPAA-yTz(d₂)を試料とし、四極子エコー (QE) 法を用いてスペ クトルを得た。

【結果・考察】

DSC の測定から、複合体中の PAA の割合 が増えると、ガラス転移が生じることが確認 された。0.1AA-0.9PAA-0.75Tz では、転移温 度は Tg=299.7 K であった。PAA が混合して いない AA-0.75Tz ではガラス転移は確認さ れなかった。Fig. 2 に AA-0.75Tz と 0.1AA-0.9PAA-0.75Tz のプロトン伝導率の温度変化 の結果を示す。0.1AA-0.9PAA-0.75Tz はガラ ス転移温度以上で AA-0.75Tz よりも高いプ ロトン伝導率を示した。

Fig. 3 に AA-0.75Tz(d₂)と 0.1AA-0.9PAA-0.75Tz(d₂)の固体 ²H NMR スペクトルの温 度変化を示す。0.1AA-0.9PAA-0.75Tz(d₂)で は、ガラス転移点を過ぎた 323 K からブロ ードな成分と 0 kHz 付近にシャープな成分 が観測された。ブロードな成分は静止状態 の Tz、シャープな成分は等方回転運動を している Tz に対応する。スペクトル中の シャープな成分の割合は温度上昇に伴い 増大し、373 K 以上ではシャープな成分の みとなった。それに対し、AA-0.75Tz では、 高温でも、はっきりとしたシャープな成分 は現れず、Tz の運動性が高くないことが 分かる。

これらのことから、0.1AA-0.9PAA-0.75Tz ではガラス転移に伴うポリマーの 柔軟性の増大により Tz の運動性が向上す るため、プロトン伝導率も増大すると考え られる。



Fig.2. Temperature dependence of proton conductivity for AA-0.75Tz, 0.1AA-0.9PAA-0.75Tz



Fig.3. Temperature dependence of ²H NMR spectra for (a) $0.1AA-0.9PAA-0.75Tz(d_2)$, (b) $AA-0.75Tz(d_2)$

【参考文献】

[1] Seyda T. Gundy, Ayhan Bozkurt, Polymer Journal, 2008, 40, 104-108

P9

Rab32のNMRによる解析 〇鈴木拓巳,田島佳寿,川原裕之,伊藤隆,三島正規 東京都立大学・大学院・理学研究科

Analysis of Rab32 by solution NMR

∘Takumi Suzuki, Kazu Tajima, Hiroyuki Kawahara, Yutaka Ito, Masaki Mishima ¹ Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

Rab protein is a low molecular weight G protein, which takes active state and inactive state and acts as a molecular switch in the cell. It has two switch regions whose structures changes occur depending on whether they are active or inactive. BAG6 binds to the switch I region and induces polyubiquitination.

We study Rab32, one of the Rab family proteins. Rab32 is unstable because the switch I region is hydrophobic, but after consideration of the conditions, we established the conditions for high yield. Further, a binding experiment of Rab32 and BAG6 was conducted by NMR, and a significant chemical shift perturbation was observed. In the future, we will further improve the stability of Rab32 and proceed to analyze the Rab32/BAG6 complex.

【序論】

Rabタンパク質はRasスーパーファミリー に属する低分子量Gタンパク質で、Rabの中で もRab1-46が存在しており、小胞体輸送に関 与し、細胞内分子スイッチとして機能する。 一方、BAG6は複数のドメインを持つマルチ ドメインタンパク質であり(Fig.1 upper)、凝 集しやすい疎水性のポリペプチドと相互作 用し、プロテアソームにおける分解へ導く。 特に立体構造形成に欠陥のある膜タンパク 質や、Gタンパク質を、分解に導く機能を持 ち、タンパク質の品質管理において重要な役 割を担い、プレエンプティヴ(pre-emptive: 予防的)なタンパク質品質管理を担うこと から注目されている(Fig.1 lower)。さらに、 Rab8やRab32では、GDP型において、疎水的な switch I 領域が露出し、そこにBAG6が結合す



Fig. 1 Schematic drawing of Rab32 and BAG6 (Upper) Rab32. Region (20-201) was used. (Lower) BAG6. Ubl and Build domain are involved in the interaction for Rab protein.

ることによってポリユビキチン化を誘導すると考えられており、これが細胞内でのRab8 やRab32の寿命をコントロールしていることが明らかになりつつある⁽¹⁾。

本研究では、BAG6によるRab32の分子認識機構やBAG6の構造を明らかにするため、NMR による構造解析に取り組んでいる。

Rabタンパク質, BAG6, 溶液NMR

○すずきたくみ,たじまかず,かわはらひろゆき,いとうゆたか,みしままさき

【実験】

大腸菌の発現系を用いて安定同位体標識した Rab32の¹⁵Nラベル体を精製し、2D-¹H¹⁵N HSQCの測 定を行った。続いて、標識をしていないBAG6を精 製した後、Rab32:BAG6=1:0, 1:1, 1:2の条件にお いて結合実験を行った。また、Rab32の¹³C, ¹⁵Nラベ ル体を精製し、2D-¹H¹⁵N HSQC, 3D-HNCACB, 3D-CBCA (CO) NH, 3D-HN (CA) CO, 3D-HNCOの測定を行 った。

【結果】

Bufferなど種々の条件検討により、Rab32の収 量を改善することに成功した。NMR測定について は当初、温度条件を303 Kで測定しており、24時 間以内にほとんど全てのタンパク質がアグリゲ ーションを起こし、沈殿した。また分離の良いピ ークを得るのは困難であった。そこで、温度と bufferの条件検討をすることにより、Rab32の



Fig.2 2D-¹**H**⁻¹⁵**NHSQC spectrum of Rab32** Buffer: 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 μM GDP, 20 mM CHAPS

2D-¹H¹⁵N HSQCスペクトルを得ることに成功した(Fig.2)。また得られたRab32は、経時変化 測定の結果等から、精製直後で、Bag6と結合するGDP型になっていると判断できた。

そこで、非標識のBAG6とのtitrationを行い、2D-1H¹⁵N HSQCスペクトルでの化学シフト変化を観測することに成功した。現在、3D-HNCACB, 3D-CBCA(CO)NH, 3D-HN(CA)CO, 3D-HNCOを測定し、主鎖の帰属を進めている。

【展望】

今後は比較のためにGTPアナログを使用することによるGTP型Rab32のスペクトルを測定した い。主鎖の帰属とBAG6とのtitrationから、どの残基が複合体形成に寄与しているかを解析し、 さらには、複合体での立体構造解析をしていく。BAG6において、Rab32との結合に関与するN末端 200残基の領域はさらにUb1ドメインとBuildドメインに分けられるが、それぞれドメインごとに 発現させ、結合実験への関与を解析する等、複合体形成に必要な最小領域の解析も並行して行 う。また、Rab32に関して依然、高濃度で(1 mM)長時間NMRを測定するのが困難なため、高活性型 Sortase A⁽³⁾によるドメインライゲーションを活用した可溶性タグの付加によるRab32の安定化も 試みたい。

【参考文献】

- (1) Takahashi, T., et al., EMBO rep, 2019, 20, e46794
- (2) Wachtel, R., et al., Nat. Commun., 2018, 9,44
- (3) Aizu, T., et al., Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2020 1864, 129419

アミロイド化傾向を有する **P10Y** タンパク質・ペプチドの凝集防止 ○黒川優香¹, 葛貫絵梨奈¹, 日比健人¹, 河野俊之², 寺脇慎一¹, 若松馨¹ 1 群馬大学大学院 理工学府 2 北里大学大学院 医療系研究科

Prevention of aggregation of proteins and peptides with amyloid tendency oKurokawa Yuka¹, Kuzunuki Erina¹, ¹Hibi Kento¹, Kohno Toshiyuki², Terawaki Shin-ichi¹, Wakamatsu Kaori¹

1 Faculty of Science and Technology, Gunma University 2 School of Medicine, Kitasato University

The proteins and peptides that have a sequence to form amyloid tend to aggregate during purification and the interaction analysis with their target peptides/proteins. Unfortunately, some of intracellular loops of GPCR which are the binding site for their target proteins possess such amyloid forming sequences. In NMR analyses of their interaction, NMR-specific conditions such as deuterium oxide, DSS, and NMR tube surface bring about aggregations. We previously reported that Choline-O-Sulfate (COS) prevents self-aggregation of m4 muscarinic receptor fragment peptide (m4-peptide). Here we report that COS also prevents aggregation of m4 peptide by DSS, self-aggregation of GST-fusion of α 2-adrenergic receptor fragment (GST- α 2-peptide), and aggregation of GST-α2-peptide with its binding partner spinophilin, facilitating preparation and analysis of difficult peptides/proteins.

一序論一

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)による細胞内シグナル伝達はGPCRの細胞内第三ル ープ(3iL)とターゲットタンパク質との相互作用によって伝達されることが多いが、 3iLにはアミロイド化傾向を示すアミノ酸配列を有するものがある。このような3iLは 精製中に凝集するだけでなく、ターゲットタンパク質との相互作用をNMRで解析する 時に凝集することが多い。凝集させる原因として、化学シフト基準物質であるDSS、 重水中の不純物、NMRサンプル管のガラス表面がある。Choline-O-Sulfate (COS)はヒ ト・アミリンのアミロイド化やm4ムスカリン受容体部分ペプチド(m4I3C(14))の凝集 を防止することを以前報告したが、他にも様々な凝集を防止することが分ってきたの で本学会で報告する。

一実験—

1. DSSが引き起すペプチド凝集のCOSによる防止 m4I3C(14)はDSSの存在下で凝集する。この凝集がCOSによって防止できるかを調べる とともに、定量NMR用のDSSも凝集を引き起すのかを、 1D¹H-NMRで解析した。

凝集防止、アミロイド化、Choline-O-Sulfate(COS)

○くろかわゆか、くずぬきえりな、ひびけんと、こうのとしゆき、てらわきしんいち、わかまつ かおり

2. GST-a2Aアドレナリン受容体ペプチド(a2A ADR N359)融合タンパク質の凝集防止

COS存在下と非存在下で融合タンパク質を限外濾過で濃縮し、濃縮限界を調べた。

3. [¹⁵N]MBP-spinophilinのGST-α2A ADR N359によるtitration COS存在下と非存在下でのtitrationを比較した。

一結果—

サンプルの組成を右の表に、調製後の
 サンプルの写真をFig.1に示す。m4I3C(14)
 にDSSを添加すると白色沈殿が生じた
 (②,③)。一方、1 M COS 存在下では
 白濁も起らなかった(⑤,⑥)。この現
 象は従来のDSSでも純度の高い定量
 NMR用のDSSでも違いはなかった。

	m4I3C(14) mM	DOX mM	DSS(sigma) mM	q-NMR用 DSS(wako) mM	COS M
sample(1)	1	5	_		
sample(2)	1	5	5		
sample(3)	1	5		5	
sample(4)	1	5			1
sample(5)	1	5	5		1
sample(6)	1	5		5	1

サンプル①、②の¹H NMRスペクトルをFig.2に、サン プル④、⑤のスペクトルをFig.3に示す。COS無添加の場 合には、DSSの添加により、m4I3C(14)のシグナル強度 が低下していることがわかる。一方、COS存在下で は、m4I3C(14)のシグナル強度に違いは認められな かった。なお、m4I3C(14)の存在によりDSSのシグナ ルもブロードニングする。m4I3C(14)の¹Hシグナル 高はDSSの種類によってあまり違いはなかったが、 DSSのシグナルは定量NMR用の方がブロードニン グの程度が少なかった。



Fig. 2 m4I3C(14) \pm DSS



Fig. 1 DSS による沈殿形成と COS による防止



Fig. 3 m4I3C(14) \pm DSS+COS

2. 融合タンパク質の濃縮はCOS非存在下では0.2 mMが限界だったが、1 M COS存在下では1 mM でも目詰りを起さなかった。

3. COS非存在下ではtitrationに伴い凝集が生じ、HSQCシグナル強度が顕著に低下したが、COS存 在下では凝集せず、高濃度のGST-α2A ADR N359までtitration可能になった。

—考察—

COSは凝集しやすいサンプルの精製を促進するだけでなく、相互作用解析中に生じる 凝集体の形成も防止するので大変有用である。単独のタンパク質の凝集をCOSよりも強 く防止する化合物を合成してあるので、それらは更に有用であると期待される。今後検 討する予定である。

P11 NMRを用いた液体金属中のナノ粒子分散・凝集 状態評価法 O鄭 智海⁻¹, 大高 雅彦⁻¹, 桑原大介²

 1 日本原子力研究開発機構 高速炉サイクル研究開発センター 高速炉基盤技術開発部 ナトリウム機器技術開発Gr
 2 電気通信大学 研究設備センター

Evaluation of Dispersion and Aggregation of Nanoparticles in Liquid Metal via NMR

oChikai Tei¹, Masahiko Ohtaka¹, Daisuke Kuwahara²

1 Advanced and Innovative Sodium System Technology Development Gr Fast Reactor (FR) Fundamental Technology Development Dept. FR Cycle System R&D Center, Oarai R&D Institute

2 Coordinated Center for UEC Research Facilities, UEC

Evaluation of nanoparticles in liquid phase dispersants has been carried out by using methods such as particle size measurement and transmission electron microscopy. It is difficult to apply it to chemically active liquid metals (impermeable to visible light) that cannot be handled in the atmosphere. In this study, the NMR methods based on evaluating the interfacial state of sodium-nanoparticles in liquid metallic sodium (Na) was investigated for metallic nanoparticle dispersions. There are two types liquid Na in contact with the surface of the nanoparticles (atomic state bound to the particle surface) and liquid Na away from the particle surface (free atomic state). The relaxation time of each depends on the bound state of the atoms. The clear difference in relaxation times and the relative specific surface area estimated from the relaxation times are also obtained, leading to the development of methods for assessing the state of nanoparticles in liquid metal.

【序論】

次世代の原子炉システムとしてナトリウム冷却型高速炉の研究開発を進めている。本原子炉シ ステムで冷却材として用いる金属ナトリウムは、伝熱特性、材料との共存性に優れ、核的性質も 良好であるといった利点を有する一方で、化学的に活性であるためプラントの安全性及び補修性 に影響を及ぼす可能性があるという弱点がある。本弱点の回避方策の一つとして、金属ナノ粒子 を分散させナトリウムの化学的活性度の低減を目指す研究開発を進めている。^[1-2] 化学的活性度 の低減効果は、分散媒であるナトリウムと分散させるナノ粒子の界面において原子間相互作用が 生じうる表面積と相関があると考えられるため、ナトリウム中におけるナノ粒子の分散・凝集状 態が考慮されたナトリウムと濡れる比表面積としての定量評価と併せ評価する必要がある。液相 分散媒中のナノ粒子の粒子径測定には、動的光散乱法が適用されているが、可視光を透過しない 液体金属ナトリウムに対する適用は不可能であるため、有効な測定評価法が存在しないのが現状 である。

上記の背景に基づき、NMRを用いた評価法の検討に着手した。本稿では、NMRを用いた液体 金属中のナノ粒子分散・凝集状態評価法について報告する。

液体金属、ナノ粒子、緩和時間

○てい ちかい、おおたか まさひこ、くわはら だいすけ

【目的】

液体金属Na中にナノ粒子が分散された"ナノ流体"を対象に、NMR横緩和時間の測定により、 分散・凝集状態、界面の濡れの状態の評価手法としての適用性予備検討を行った。NMRで測定さ れる横緩和時間は、分子や核スピンの運動性に依存し、運動性が低いほど短くなる性質がある。 ナノ粒子が分散された液体原子の場合を考えると、その横緩和時間は、ナノ粒子表面の原子ある いは分子の束縛状態に依存し、粒子表面に接触している原子では短く、粒子表面には接触してい ない原子の場合には長くなるものと考えられる。^[3]すなわち、ナノ粒子の液体中の濡れ比表面積 (液体中ナノ粒子の表面原子と分散媒原子が直に接する面積)が大きいほど、束縛される原子の 割合が多いので、全体の運動性が落ち、横緩和時間が遅くなるものと想定しており、実験にて検 討を行う。

【実験方針】

上記の背景と目的に基づき以下に示す実験的なNMRを用いた測定の適用性評価を行った。

分散媒として扱いやすい水を用い、ナノ粒子を分散させた際に生じる横緩和時間を測定し基本 適用性を評価した上で、ナトリウムへの適用性検討を行った。

前者の実験では、実験パラメータとして、分散媒中でのナノ粒子質量濃度の差、すなわちナノ 粒子界面と分散媒中の水分子が接する濡れ比表面積の差として、その結果として生じる横緩和時 間の差異が明確に測定可能かを評価する基本適用性検討を行った。後者の実験では、溶融したナ トリウム中にナノ粒子を分散させた実際のナノ流体を実験に供し、液体ナトリウム中にナノ粒子 を分散させた条件でも、水の場合と同様に横緩和時間の差異として測定可能かを確認した。

【結果と考察】

<u>基本適用性検討</u>

粒径30nm~60nmチタン金属ナノ粒子を脱気水中に5wt%、10wt%の割合で分散させ、各々を ϕ 5mmのNMR測定管に封入したものを試料として用いた。測定方法はCPMG法、横緩和時間として T_2 を測定した。測定条件は、観測核¹H、共鳴周波数20MHz、測定温度44.8℃、積算回数1回とした(測定装置:TD-NMR Spin track(Resonance systems社製)。



Fig. 1 *T*₂ Measurement Relaxation Curves (CPMG) of blank water, 5%wt titanium nanoparticles water and 10%wt titanium nanoparticles water.

Figure 1に測定結果のT₂ 緩和曲線を示す。各条件における¹H T₂緩和時間は、チタンナノ粒子を 含まない場合が3.106[s]、チタンナノ粒子を分散させた場合が、5wt%の場合0.861[s]、10%wtの場合 0.088[s]と、オーダーが異なる明確な差異をもって得られた。本結果は、チタンナノ粒子の分散割 合に応じた比表面積と相関する束縛される水分子の量の差異に起因するとした想定と整合する結 果が得られたと考えられる。以上、緩和時間T₂の測定より、分散媒とナノ粒子の濡れ比表面積の 評価が可能となる基本適用性を確認した。

液体ナトリウムへの適用性検討

上記の結果のとおり基本適用性が確認できた事から液体ナトリウムへの適用を検討した。試料 としてナトリウムとナノ流体を用いて、水を分散媒として用いた場合と同様に測定方法として CPMG法、T₂緩和時間を測定した。(測定装置: ECA-500(電気通信大学)、観測核²³Na、共鳴 周波数132.255MHz、測定温度135℃、積算回数8回)



Fig. 2 One-dimensional NMR spectra of metallic sodium



Fig. 3 One-dimensional NMR spectra of nanofluid

予備検討として、ナトリウムとナノ流体の²³Naの1次元NMRスペクトル測定を実施した。結果を Fig. 2とFig. 3にそれぞれ示す。ピークの中心は両者1178[ppm]で静磁場の約0.12%に相当しており 理論上のナイトシフト効果とほぼ一致した結果が得られた。⁴¹この結果から、ナノ粒子分散の有無 に関わらず、ナトリウム原子の測定には支障がない事を確認した。



Fig.4とFig.5はナトリウムの融点を十分に上回る約135℃でサンプル(チタンナノ粒子を18.8wt%) を封止したチューブを加熱してナトリウムを液体状態として測定したナノ流体の²³Naの*T*₂緩和 曲線を示す。それぞれのT₂緩和時間を測定した。ナトリウムのT₂緩和時間(5.5[ms])はナノ流体の²³Na T₂緩和時間(2.6[ms])の約2倍以上あり、水の場合の結果と同様、ナノ粒子が分散した場合には²³Na T₂緩和時間が短くなることが示された。以上の結果から、ナトリウム中に分散したナノ粒子の分散凝集評価への適用性を有するものと考えている。詳細な考察に関しては、当日の発表にて行う予定である。

【謝辞】

TD-NMR Spin track を使用した水の横緩和時間測定に協力を頂いた三洋貿易株式会社に感謝の 意を表する。

【参照文献】

- [1]. Nucl. Eng. Des. 2010, 240, 2664-2673
- [2]. Nucl. Sci. Eng. 2010, 47, 12, 1165-1170
- [3]. Magn. Reson. Chem. 2016, 54, 521–526
- [4]. Phys. Lett. A. 2015, 379, 705–709

P12生体内反応による核スピン量子もつれ生成の検証に向けた極低温 溶解DNP装置開発 ○香川 晃徳^{1,2,3}、土井 徹¹、根来 誠²、北川 勝浩^{1,2} ·大阪大学大学院基礎工学研究科 ·大阪大学先導的学際研究機構 量子情報・量子生命研究センター ·JSTさきがけ

Development of dissolution DNP instruments for verifying generation of nuclear spin quantum entanglement by in vivo reactions

 •Akinori Kagawa^{1,2,3}, Toru Doi¹, Makoto Negoro², Masahiro Kitagawa^{1,2}
 ¹Graduate School of Engineering Science, Osaka university, Osaka, Japan
 ²Center for Quantum Information and Quantum Biology, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka university, Osaka, Japan
 ³JST, PRESTO

Recently, M. P. A. Fisher conjectured a quantum dynamical selection (QDS) rule for small molecules such as pyrophosphoric acid. The conjecture indicates that enzymatic chemical reactions dependent on whether the nuclear spin state in the small molecules is a singlet state or a triplet state. We apply dynamic nuclear polarization (DNP) to experimentally verify the QDS rule. The population ratio between the singlet state and the triplet state in the equilibrium is 1:3 at room temperature. We expect that the amount of the product for the chemical reactions can be changed by using hyperpolarized nuclear spins. To verify the QDS rule, we have developed DNP instruments and obtained ³¹P spin polarization of more than 50% for pyrophosphoric acid.

近年、M. P. A. Fisherらによってquantum dynamical selection (QDS) ruleと呼ばれる理論的 な提案がされている[1,2]。QDSはピロリン酸のような核スピンを2つ含んだ小分子を対象にしてい る。そのような小分子が酵素中に取り込まれることによって回転の自由度が制限されると考えてい る。回転の自由度が制限されるとパラ水素のように、回転の自由度と核スピンの量子状態があら わになってくる。そのため酵素中での反応が理想的な場合にはシングレット状態でのみ起こり、生 成された物質は量子もつれを持っているというのがQDS ruleである。我々は溶解DNP法を用い て、QDSを実験的に検証することを目指している。室温下ではシングレット状態とトリプレット状態 のポピュレーションの比はボルツマン分布から1:3である。この比をDNPによって大きく変化するこ とができれば、代謝反応などで生成される分子の生成量も変化することを期待している。本発表 では、QDSを検証するために作製してる溶解DNP装置について報告する。

溶解DNP装置はLarsenらによって開発され、その後NMRへの様々な応用がなされている [3,4]。近年、極低温下で溶解し、液体NMR装置へ転送する手法ではなく、圧縮へリウムを用い て固体状態で液体NMRへ転送し溶解するbullet-DNP装置が開発されている[5]。固体サンプル を転送するため、従来法より転送速度が速くなり、高偏極状態の緩和を抑えることが期待できる。 我々も、QDSの検証のためにbullet-DNP装置を作製している(Fig. 1)。DNP部分では静磁場可 変なため、4.8 T、6.7 Tでの実験が可能である。サドルコイルを設置したオーバーサイズ共振器 動的核偏極、量子もつれ

○かがわ あきのり、どい とおる、ねごろ まこと、きたがわ まさひろ
内でDNPを行う。サドルコイル近傍に可変コンデンサを配置することで、調整できる共鳴周波数 は広くした。試料はスルホランとDMSOの1:1の溶媒にピロリン酸(3 M)、偏極源であるラジカル分子とし てBDPAを用いた。スルホランにBDPAを入れ、超音波処理後、DMSOとピロリン酸を加え、再び超音波処 理し試料を調整した。一般的に溶解DNPでラジカル分子として用いられるOX063と比較するBDPAは安価 である。

2つの異なる磁場でDNP実験を行った結果、4.8 Tの方が数倍以上高い³¹Pスピン偏極が得られることが わかった。これは高磁場になることで、他のスピン偏極材の分子と比較すると電子スピンのスペクトル幅が 細いBDPAでは偏極移動効率が小さくなるためであると考えられる。照射するマイクロ波の周波数は広が った電子スピンパケットをDNPに参加させるために40MHz程度の周波数掃引を1kHzで行った。BDPAの 添加量は20、40、60 mMで実験を行い、ビルドアップが速く、かつ偏極が高いのは60 mMであった。さらに デガスによる溶存酸素の除去や、サンプルのガラス化においてペレット状にすることによって、1.3 Kでの DNPにおいて50%程度の高い偏極が得られた(Fig. 2)。これはこれまで報告されている³¹PスピンのDNP結 果[6]と比較しても、十分高い値であり、QDSの実験的な検証において酵素反応によって生成される分子 量を判別できる高い偏極が得られたと考えている。発表では固体試料を溶解して行った液体NMRの結果 についても報告する。



本研究は、さきがけ「量子技術を適用した生命科学基盤の創出」の支援によって行われています。

50

40

30

20

10

and 4.5 K.



Serre

Fig. 1 Bullet-DNP instruments

参考文献

- [1] Fisher M. P. A., Ann. Phys., 362, 593 (2015)
- [2] M. P. A. Fisher, et al., 115 (20), E4451 (2018)
- [3] Ardenkjær-Larsen J.H. et al., PNAS, 100, 18, 10158-10163 (2003)
- [4] Kayvan R. Kashari et al., Roy. Soc. Chem., 137, 3427-3429 (2012)
- [5] Karel Kouřil et al., Nature commun., 10, 1733 (2019)
- [6] Nardi-Schreiber et al., Nature commun., 8, 341 (2017)

P13 オペランドNMRを用いたFeF₃正極の容量劣化要因の解明 ○下田景士¹, 鹿野昌弘², 村上美和¹, 栄部比夏里² 1 京都大 産官学連携本部

2 産総研 関西センター

Capacity fading mechanism of conversion-type FeF₃ electrode studied by electrochemical operando NMR

• Keiji Shimoda¹, Masahiro Shikano², Miwa Murakami¹, Hikari Sakaebe²

1 Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University

2 Research Institute of Electrochemical Energy, AIST

FeF₃ has attracted considerable attention as a positive electrode material for next-generation rechargeable lithium ion batteries, because of its low cost, low risk, and high energy density. However, the conversion reaction of the FeF₃ electrode is known to suffer from capacity fading during repeated discharge–charge cycles. Herein, we find an interesting correlation between capacity fading behavior and spectral evolutions in electrochemical operando NMR measurements. The operando ⁷Li NMR spectra demonstrate the reversible formation of Fe nanoparticle by the conversion process during the early discharge–charge cycles. On the other hand, the Fe formation is gradually suppressed after repeated cycles. Another factor associated with capacity degradation is the electrolyte decomposition occurring at high voltages, which results in a resistive film coating the electrode surface. We conclude that the film accumulation on repeated discharging inhibits the conversion to metallic Fe and LiF, leading to a characteristic capacity fading behavior of FeF₃.

リチウムイオン二次電池(LIB)は、携帯電話や電気自動車のエネルギー貯蔵源として実用化され て久しいが、より幅広い利用のためには高容量・低コスト化などの改善が必要とされる。FeF3はコ ンバージョン反応(FeF3 + 3Li ≠ Fe + 3LiF)を仮定した場合、理論容量が712 mAh/gとなるため、低 コスト、低リスクで高いエネルギー密度を持つ次世代型LIB正極材料として注目されている。一方 で、FeF3は充放電サイクルに伴う容量劣化が大きいことが問題視されている[1]。本研究では、充 放電測定と同時にNMRスペクトルを取得する電気化学オペランドNMR測定を実施することで、 FeF3電極の容量劣化の要因について考察した[2]。

活物質であるFeF₃は試薬を使用した。FeF₃:アセチレンブラック(導電助剤):PVDF (バインダー)を 70:25:5構成とした合剤電極、Li対極、1M LiPF₆電解液(EC:DMC=1:1)を使用したラミネートセルを 作製し、電気化学オペランドNMR測定を実施した。充放電評価はカットオフ電位を1.0 – 4.5 V vs. Li/Li⁺として、35.6 mA/gまたは71.2 mA/gの定電流密度で実施した。容量劣化を検証する目的で30 サイクルまでオペランドNMR測定を継続した。NMR測定は14.1 Tで行った。Hahn echo法を用いて 繰り返し時間1 sで1スペクトル当たり15 min積算とした。充放電サイクル後に解体した電極試料は グローブボックス内で1.6 mm径試料管に詰められ、⁷Li, ¹⁹F, ³¹P MAS NMR測定を実施した(rotorsynchronized Hahn echo法使用)。⁷Li, ³¹P測定は繰り返し時間5 s, MAS速度60 kHzで、¹⁹F測定は0.5 s, 40 kHzとした。スペクトル強度は試料重量で規格化した。

オペランドNMR、FeF3コンバージョン正極、リチウムイオン二次電池

○しもだ けいじ, しかの まさひろ, むらかみ みわ, さかえべ ひかり

初期サイクルにおけるLi//FeF3電極セルのオペランド⁷LiNMRスペクトルを図1に示す。放電反応 (Li挿入)に伴ってスペクトルが分裂する挙動が観察された。これは、コンバージョン反応によって 金属Feが生じたことが原因であると考えられる。コンバージョン反応の進行度(=金属Feの量)と スペクトルの分裂幅には相関があることがわかった。充放電サイクルが進行するに従って、スペ クトルの分裂が抑えられることが示された。このことから、充放電サイクルに伴う容量劣化は金 属Feができなくなる、つまりコンバージョン過程が抑制されることに起因すると考えられる。

解体試料の¹⁹F MAS NMRスペクトルでもスペクトルの分裂が観察された。この結果は既報[3]とは異な る。充放電サイクルが進行するとスペクトルの分裂幅は小さくなり、10サイクル以降で放電時にPVDFとLiF のスペクトルが観察された。また、充放電サイクルが進行すると充電時にもLiFが増加することが示さ れた。このことはFeF3まで戻らなくなることを意味する。以上の結果から、FeF3は金属Feまで反応 しなくなり、且つFeF3まで戻らなくなることで容量が低下し、妹尾ら[1]の結果を考慮すると最終 的には不活性化した活物質はFeF2 + LiFとなると考えられる。さらに、³¹P MAS測定からは電解液 分解に起因するfluorophasphate種の増減が確認された。放電回数が増えると表面被膜成分が増加す ることが観察された。オペランド及びMAS NMRスペクトルの変化を総合すると、容量劣化の主要 因は、充放電を繰り返すことで表面被膜が厚くなりコンバージョン反応を阻害することであると 考えられる。

本研究はNEDO「革新型蓄電池実用化促進基盤技術開発事業(RISING2)」の助成の下で行われた。

[1] Senoh et al., ACS Appl. Mater. Interfaces 11, 30959 (2019).

[2] Shimoda et al., J. Power Sources 477, 228772 (2020).

[3] Yamakawa et al., J. Am. Chem. Soc. 131, 10525 (2009).



Fig. 1 Operando ⁷Li NMR spectra of the Li//FeF₃ cell during the initial cycle.

P14Y 光受容タンパク質GAFドメインにおける発色団のプロトン化状態の解析 ○小泉太貴¹, 会津貴大¹, 宮ノ入洋平², 伊藤隆¹, 広瀬侑³, 三島正規¹ ¹東京都立大学大学院 理学研究科 ²大阪大学 蛋白質研究所 ³豊橋技術科学大学大学院 工学研究科

Analysis of protonation state of chromophore in GAF domain of photoreceptor protein

°Taiki Koizumi¹, Takahiro Aizu¹, Yohei Miyanoiri², Yutaka Ito¹, Yuu Hirose³, Masaki Mishima¹

¹Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

² Institute for protein research, Osaka University

³ Department of Environmental and Life Sciences, Toyohashi University of Technology

A cyanobacterium synthesizes a photosynthetic pigment which absorbs red light under red-light condition. Conversely, under green-light condition, a photosynthetic pigment which absorbs green light is synthesized. This phenomenon is called "complementary chromatic acclimation". RcaE protein, a photosensor protein, plays a central role phosphorylating transcriptional factors in a wavelength dependent manner. To elucidate the molecular mechanism of the structural change due to light absorption of RcaE, we are working on NMR structural analysis and X-ray crystallography of RcaE red light absorption form (Pr) and green light absorption form (Pg). We would like to discuss the findings obtained regarding the three-dimensional structure and the protonation state of the chromophore.

<序論>

ある種のシアノバクテリアは、効率よく光を受容するために、赤色光下では、赤色光を吸収し、 逆に緑色光下では、緑色光を吸収する光合成色素を合成する。この現象は、補色順化と呼ばれ、 光受容タンパク質であるRcaEタンパク質が、転写調節タンパク質を波長依存的にリン酸化するこ とで制御されている。RcaEは705アミノ酸残基からなるマルチドメインタンパク質であり、色素結 合GAFドメインやC末端にはヒスチジンキナーゼドメインを持つ(Fig.1)。また、RcaEは光吸収を担 うGAFドメインのシステイン残基がテトラピロール発色団の1つであるフィコシアノビリン (PCB)とチオエーテル結合で結合しており(Fig.1)、赤色光/緑色光をそれぞれ吸収することでPCBの ピロール環の1つに*cis-trans*異性化 (*EZ*異性化)を引き起こし(Fig.2)、RcaE全体に対しても構造変 化を及ぼすと考えられている¹⁾。また、RcaEタンパク質は他のCBCR(シアノバクテリオクロム) や植物のフィトクロムとは異なり、発色団であるPCBとタンパク質の相互作用におけるプロトン 化・脱プロトン化が光吸収メカニズムに関与することが示唆されている(Fig.3)。そこで、私た ちは未だ解明されていないプロトン化・脱プロトン化による光吸収メカニズムの解明を目的とし、 赤色光吸収型(Pr)と緑色光吸収型(Pg)に対して溶液NMRを用いた解析や、X線結晶構造解 析を行っている。そこで、立体構造と発色団のプロトン化状態について得られた知見について議 論したい。

光受容タンパク質、構造解析、溶液NMR

○こいずみ たいき, あいづ たかひろ, みやのいり ようへい, いとう ゆたか, ひろせ ゆう, み しま まさき

<実験>

・溶液NMRによるRcaEタンパク質の解析

大腸菌の発現系を用いて安定同位体標識したRcaE GAFドメインとPCBの共発現,精製を行い,赤色光照射下,緑色光照射下において,以下の一連の測定から蛋白質側の帰属を行った。2D¹H¹⁵N HSQC, 3D-HNCACB, 3D CBCA(CO)NH, 3D HN(CA)CO, 3D HNCO, 3D C(CO)NH, 3D H(CCO)NH, 4D HC(CO)NH, 2D CT¹³C HSQC, 3D¹³C edited NOESY, 3D¹⁵N edited NOESY, 3D HNHB, 3D HN(CA)HB, 3D HCGCBCO, 2D CGCBCO。



Fig.1 Domain organization of RcaE

・X線結晶構造解析によるRcaEタンパク質の立体構造解析

発色団であるPCBとRcaEタンパク質の立体構造情報の取得を目的にX線結晶構造解析に取り組 んだ。大腸菌の発現系を用いてRcaE GAFドメインとPCBの共発現,精製を行い,サンプルを調製 した。赤色光、緑色光を照射し、それぞれ暗所下で結晶化のスクリーニング実験を行い,Pr条件で 結晶を得た。

・発色団PCBとRcaEタンパク質のプロトン化・脱プロトン化メカニズムの解明

発色団であるPCBとの相互作用やPCBの構造を調べるため、PCBの前駆体である¹³C,¹⁵N標識の5aminolevulinic acidを培地に添加することで,PCB選択的標識(タンパク質側が非標識)の試料を得た。発色団であるPCBの側面からプロトン化・脱プロトン化メカニズムを解明するため、赤色光吸 収型においてpHタイトレーションを行い、それぞれのpHにおいて1D¹⁵Nスペクトルを測定した。 ¹³C,¹⁵N標識PCBの¹⁵Nの1D測定はクライオBBFOを用いて行った。

次に, RcaEタンパク質の側面からプロトン化・脱プロトン化のメカニズムを解明するために, グルタミン酸217(Glu217)に着目し,研究に取り組んだ。グルタミン酸217は緑色光吸収型(Pg) において側鎖が「COOH」の中性状態で存在していると考えられる(Fig.2)。帰属を確定する ために,グルタミン酸217の変異体作成と共に,Glu217を残し,他のグルタミン酸を変異させた変 異体の作成に取り組んだ。その際,電荷を持った状態を保つため,アスパラギン酸への変異体作 成を行った。また,E217側鎖カルボキシル基のpKaを決定するために, pHタイトレーションを行

った。カルボキシの観測には,クライ オDCHプローブとTCIプローブを用 いて¹³C直接観測のCGCBCO測定を 行った。通常のプロトン励起・プロト ン観測よりも,構造的な揺らぎ等で引 き起こされる交換による信号の減衰 の影響が少ない点で有効な測定法で あると考えている。また¹³COの直接 観測であるため,¹³Caliphaticに対する 同種核デカップリングを導入するこ とで,分裂のない信号として分離の良 い観測を行った。



Fig.2 Conformational changes of PCB by light irradiation.

Proposed mechanism of photochromic photocycle deduced from the biochemical assay and homology model ¹).

<結果>

・溶液NMRによるRcaEタンパク質の立体構造解析

赤色光吸収型,緑色光吸収型それぞれにおいて,ピークの分離の良い2D-¹H¹⁵N HSQC スペクトルを得ることに成功した(Fig.4)。緑色光吸収型において主鎖の帰属を行い,約98%のアミノ酸残基の帰属に成功した。また,側鎖の帰属を行い,約95%の側鎖シグナルの帰属に成功した。解析によって得られた距離情報,角度情報を利用し構造計算を行った。その結果,RcaEタンパク質の立体構造を取得することに成功した。また,赤色光吸収型においても主鎖の帰属を行い,約96%のアミノ酸残基の帰属に成功した。また,側鎖の帰属を行い,約96%の側鎖シグナルの帰属に成功した。また,PCB選択標識のサンプルで¹H-¹⁵N HSQCを測定した結果,それぞれ1つの信号が観測された(Fig.5)。



Fig.4 ¹H-¹⁵N HSQC spectra of RcaE GAF A : RcaE GAF in Pr state B : RcaE_GAF Pg in state 0.45 mM RcaE dissolved in 50 mM K-phosphate (pH 6.9), 50 mM KCl was measured at 303K.

・X線結晶構造解析によるRcaEタンパク質の立体 構造解析

赤色光吸収型(Pr),1.67Åの高分解能の結晶構 造解析から,PCBのコンフォメーションを議論す るのに十分な原子モデルが得られた。RcaEタンパ ク質のPCBではC15-C16の二重結合がE型であっ たが,C15でsyn型であり,全体的にコンパクトな 点が特徴的である (Fig.6)。しかし,緑色光吸収 型(Pg)においては結晶を取得することが出来 ず,構造情報を取得することが未だ出来ていな い。

・発色団であるPCBとRcaEタンパク質のプロトン化・ 脱プロトン化メカニズムの解明

PCBを選択的に¹³C,¹⁵Nでラベルしたサンプルを用い て、¹H-¹⁵N HSQCを測定した結果,赤色光吸収型,緑色 光吸収型のそれぞれにおいて,一つのN-Hシグナ ルのみが観測された(Fig.5)。このシグナルは化学 ジフト²⁾からD環由来と考えている。



Fig.5 ¹H-¹⁵N HSQC spectra of RcaE GAF (¹³C, ¹⁵N PCB selectively labeled sample) Both states have one N-H signal of PCB marked with

Both states have one N-H signal of PCB marked with dotted circle.



Fig.7 Interaction site between RcaE and PCB. The side chain carboxyl group of Glu217 forms a hydrogen bond with NH of PCB. Glu217 is shown in a

dotted circle.

1D-15Nスペクトルを測定し、 pH7.5の赤色光吸収型 (Fig.8A)と緑色光吸収型 (Fig.8B)のスペクトルを比較 した結果、緑色光吸収型 (Fig.8B)にのみ,260 ppm付近 にPCBのB環由来と考えられる脱プロトン化した状 態 (N=C) の信号を取得することに成功した。そこで、 pH10の強制的に脱プロトン化した状態の赤色光吸収 型において緑色光吸収型 (Fig.8B)と同様のスペクト ルを観測することに成功し(Fig.8C),プロトン化・ 脱プロトン化の光吸収メカニズムへの寄与を直接的 に取得することに成功した。

また、側鎖が電荷を失った「COOH」形で存在する と示唆されるGlu217のpKaを決定する為に、¹³C detection CGCBCO (¹³Caliphatic decoupling³⁾)を用いた。 また、3DC(CO)NH, 3D/4DHC(CO)NH, 3DHCGCBCO から、グルタミン酸側鎖の帰属を行った(Fig.9)。

<展望>

今後は,赤色光照射下における緑色光吸 収型 (Pg) においてもRcaEのGAFドメイン, PCBの構造を明らかにする必要がある。緑 色光吸収型は極めて溶解度高く,結晶性を高 めることが結晶化に重要と思われる。そこ で、結晶化を促進するMBPタグを新たに導 入した発現系の構築を行い、結晶構造の取 得に取り組む予定である。

また、赤色光吸収型のpH10において観測 されたB環由来と考えられるシグナルの帰 属を確定させるため、PCBの部位特異的な ラベル体を用いて測定を行いたい。また,結 晶構造によって示唆されたRcaEとPCB間の 水素結合の直接観測も試みる。

<参考文献>

1) Hirose, Y et al., PNAS (2013), 110, 13

<謝辞>

¹³C同種核デカップリングの導入はBrukerの金場哲平博士にアドバイスを頂きました。本研究に おけるNMR測定の一部は、文部科学省先端研究基盤教養促進事業「NMR 共用プラットフォー ム」(理研横浜)を利用しました。また、発色団であるPCBの1D-15Nの測定に関しては大阪大学蛋 白質研究所の「NMR共同利用研究課題」を利用しました。RacEタンパク質の結晶構造取得に関 しては、名古屋大学シンクロトロン光研究センター シンクロトロン光利用研究部門の永江峰幸 助教にご協力いただきました。



Fig.8 1D¹⁵N spectra of RcaE GAF (¹³C,¹⁵N labeled PCB)

The amide signals around 130-160 ppm correspond to NH moiety, and the signal around 260 ppm corresponds deprotonated -N=C- moiety.



Fig.9 Assignments of CO side chain of the glutamic acids.

A selected region of ¹³Caliphatic-decoupled ¹³Cdetection CGCBCO.

2) Rockwell, N et al., Biochemistry (2015) 54, 2581 3) Ying. J et al., J Magn Reson. (2014) 241: 97.

P15 DIRECTION-HSQC法による糖鎖—タンパク質相互作用の解析 〇田中孝¹, 谷本典之¹ ¹ (株)東ソー分析センター

NMR analysis of oligosaccharide-protein interactions using the 2D ¹H-¹³C DIRECTION-HSQC technique

•Takashi Tanaka¹, Noriyuki Tanimoto¹

¹ TOSOH Analysis and Research Center Co.,Ltd.

The interaction studies of oligosaccharides and proteins by NMR spectroscopy is well-established by utilising Saturation Transfer Difference (STD) technique and other several methods, whilst the STD profiles, particularly, are sometimes shown the illegal regions which are not involved in the interactions. In this study, we applied the Difference of Inversion RECovery rate with and without Target IrradiatION (DIRECTION) technique to evaluate the oligosaccharides – protein interactions. We constructed the 2D ¹H-¹³C DIRECTION-HSQC experiment to overcome the severe overlap of the ¹H signals of oligosaccharides, demonstrated by utilising several oligosaccharide-protein interaction systems, and compared with corresponding 2D ¹H-¹³C STD-HSQC analysis.

NMRによる糖鎖—タンパク質相互作用の代表的な解析手法には、Saturation Transfer Difference (STD)法をはじめ、幾つかの方法を 用いた報告がなされている¹⁾。特にSTD法では エピトープマッピングが可能とされている。 方で、しばしばエピトープ以外の構成単糖にも STDが観測されることがあり、特に糖鎖の分子 量が大きくなり各¹H核の縦緩和時間(T_I)のば らつきが大きくなる程、正確にエピトープを捉 えることが難しくなると予想される。

そこで本研究では、複数の糖鎖—タンパク質 相互作用系を用い、Difference of Inversion RECovery rate with and without Target IrradiatiON

(DIRECTION) 法による解析を試みた。 DIRECTION法は、タンパク質の¹Hシグナルに対 しonまたはoff resonanceで飽和パルスを照射し た際のリガンドの¹H- R_I の差を解析する手法であ

DIRECTION-HSQC、糖鎖、相互作用解析

○たなかたかし、たにもとのりゆき

る²⁾。本手法は薬剤一タンパク質相互作用系で検証されており、STD法と比較してより



Fig. 1. a) 'H-NMM spectrum of the mixed aqueous solution of LAT and ECL. The structure and the isolated signals of LAT are shown on the spectrum. **b**) The pulse sequence of 2D 1 H- 13 C DIRECTION-HSQC. The Gaussian-shape pulses (50 or 200Hz) at 0.8ppm and -40ppm were used for the irradiated and the reference experiment, respectively. The T_1 delays were varied from 0.1 to 1.0s.

正確なファーマコフォアマッピングに実績がある^{2,3)}。

本研究では測定系として、糖鎖はラクトース(LAT、2糖残基)及び2種類のN-結合型 糖鎖(9及び11糖残基)、タンパク質はアメリカデイゴ由来凝集素(Erythrina Crista-galli Agglutinin: ECA)及び西洋ニワトコ由来凝集素(Sambucus Nigra Agglutinin: SNA)を モデルとして用いた。糖鎖を構成する単糖は、互いに似た構造であることから¹H核のピ ークが縮重し、1Dの¹H DIRECTION法による部位特異的な詳細解析は不可能であった (Fig.1a)。そこで、DIRECTION法と2D¹H-¹³C HSQCを組み合わせた、2D¹H-¹³C DIRECTION-HSQCを用いて測定した(以降、DIRECTION-HSQC)。測定中のサンプル の経時変化を全ての2Dスペクトル上で平均化するため、パルスプログラムは擬似的に 4Dとした(Fig.1b)。DIRECTION-HSQCによる解析結果と比較するため、同様に2D¹H-¹³C STD-HSQC測定(以降、STD-HSQC)を併せて実施した。

LAT-ECA相互作用系についてDIRECTION-HSQC(Fig.2a)と STD-HSQC(Fig.2b) による相互作用プロファイルを比較したところ差異が観測された。この相互作用プロフ ァイルを評価するため、LAT-ECL複合体の結晶構造⁴⁾(Fig.2c&d、PDB-ID:1GZC)と 比較した。結晶構造では、ガラクトース残基(Gal)がECAの相互作用部位に潜り込み、 グルコース残基(Glc)は外側に位置している。また、LATのGal残基3、4位、及びGlc 残基3位の水酸基がECAのアミノ酸残基と水素結合を形成していると報告されており、

Gal残基6位も相互作用界面近傍に位置することから、少なくともGal残基 についてはDIRECTION-HSQC法により複合体の結晶構造に近い相互作用 プロファイルが得られていると考え られる。一方で、Glc残基については、 2、3、4位が比較的相互作用界面に近 く、STD-HSQC法による相互作用プロ ファイルの方が複合体の結晶構造を より満足する結果を与えていた。今後、 LAT/ECA比等を変えて解析する等、更 なる検証が必要と考えている。

本研究では、他の糖鎖-レクチン相 互作用系についても同様の解析を試 みている。当日の発表では、それらに ついても報告する予定である。



Fig. 2. a) DIRECTION epitope mapping of lactose (LAT) interacting with Erythrina Crista-galli Agglutinin (ECA). The differences between the apparent longitudinal relaxation rates with irradiation of ECA (R_I^{irr}) and those without irraciation ($R_I^{\text{non-irr}}$) for each proton of LAT are shown. **b**) STD-based epitope mapping of LAT interacting with ECA. The STD factor (I_{std}/I_0) is used to evaluate the epitope. The error bars were estimated from spectral noise. **c**) The ribbon model of crystal structure of ECA in complex with black dashed lines. **d**) The surface model of crystal structure of ECA in complex with LAT.

References

- 1) Bewley, C.A. and Shahzad-ul-Hussan, S. Biopolymers. 99, 1-18 (2013).
- 2) Mizukoshi, Y. et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 51, 1362-1365 (2012).
- 3) Fukunishi, T. et al. J. Mol. Graph. Model. 31, 20-27 (2011).
- 4) Svensson, C. et al. J. Mol. Biol. 321, 69-83 (2002).

P16 HIV Vif 5者複合体はAPOBEC3GとAPOBEC3Fの脱アミノ化を阻害する ○神庭圭佑¹, 万里^{1, 2}, 雲財悟³, 森下了⁴, 永田崇^{1, 2}, 片平正人^{1, 2}

- 1 京都大学・エネルギー理工学研究所
- 2 京都大学・エネルギー科学研究科
- 3 法政大学·生命科学部
- 4 セルフリーサイエンス(株)

Vif five-membered complex inhibits the deamination reaction by APOBEC3G and APOBEC3F

oKeisuke Kamba¹, Li Wan^{1,2}, Satoru Unzai³, Ryo Morishita⁴, Takashi Nagata^{1,2}, Masato Katahira^{1,2} *1 Institute of Advanced Energy, Kyoto University 2 Graduate School of Energy Science, Kyoto University 3 Department of Frontier Bioscience, Hosei University 2 CellFree Sciences Co.,Ltd.*

APOBEC3G (A3G) and APOBEC3F (A3F) target newly synthesized minus strand DNAs of retro viruses, and deaminate cytosines within them into uracils. HIV viral-infectivity-factor (Vif) protein neutralizes A3F and A3G. Vif forms a five-membered complex (Vif complex) by hijacking the components of human E3 ubiquitin ligase (Culin5, Elongin B, and Elongin C) and a transcription factor CBF β . We investigated the effects of Vif complex on deaminase activities of A3G and A3F. We prepared Vif complex and its components individually. We found that the Vif complex inhibits deamination activity of both A3G and A3F, but individual component of the Vif complex in the free form did not fully inhibit the deamination activity of A3G and A3F. We carefully inspected the interaction between A3G, Vif complex, and DNA. We found that Vif complex binds A3G- and A3F directly; these bindings might be responsible for the inhibition of deaminase activity of A3G and A3F.

【背景】

APOBECファミリータンパク質は、1本鎖DNA中のシトシンをウラシルに脱アミノ化 する抗ウイルス因子である。ヒトのAPOBEC3G (A3G)、APOBEC3F (A3F) は、HIV-1の新生一本 鎖DNAに作用し、ウイルスの遺伝情報を不活性化する¹。一方、HIV-1は、Vifタンパク質によりA3G、 A3Fを無力化する。Vifはヒト細胞内で転写因子CBFβと、E3ユビキチンリガーゼ関連タンパク質 (Elongin B、Elongin C、Culin5) とともに「Vif五者複合体」を形成する¹。Vifの主たる働きは、 Vif五者複合体としてA3GとA3Fをユビキチン化することで、それらを分解に導くことだ と言われてきた¹。

これまでVifが直接APOBECと結合すると考えられていたが、近年Vif五者複合体中のCBFβが A3Fと相互作用し、その結果A3Fのユビキチン分解が亢進することが明らかになった²。一方、Vif 由来のペプチドをA3Gに添加すると、その脱アミノ化活性が阻害されるということを示す報告が なされている³。本研究では、Vif五者複合体及びその構成タンパク質存在下で、A3G、A3Fの脱ア タンパク質間相互作用、酵素反応、複合体

○かんばけいすけ、まんり、うんざいさとる、もりしたりょう、ながたたかし、かたひらまさと

ミノ化を評価した。更に、これら構成タンパク質各々とA3G、A3Fが相互作用するかを検証した。 【実験手法】

A3G、A3Fの脱アミノ化活性は、生化学的手法 (UDGアッセイ)、及び実時間NMR法^{4,5} (基質DNA のシグナル変化を追跡) で評価した。タンパク質間相互作用は、溶液NMR法 (CSP法)、サイズ排除クロマトグラフィー、分析超遠心で評価した。タンパク質とDNAの相互作用は、ゲルシフトアッセイ、蛍光異方性測定、分析超遠心で評価した。これらを併用し、A3FとA3Gの脱アミノ化阻害及びA3FとA3Gとの相互作用に関する、Vif五者複合体中の責任領域を探索した。

【結果・考察】

Vif五者複合体は、A3G、A3Fの両方に脱アミノ化の阻害効果を示した。更に、A3G上のVif結合 部位を除いた変異体 (A3Gx)の脱アミノ化も阻害した。この結果は当初の想定を覆すものである。 更に、基質DNAの量に対して10倍量のA3Gx、基質DNAの量に対して1/100量のA3Gxの二条件にお いて、Vif五者複合体はA3Gxに対して阻害効果を示した。他方、Vif複合体からCulin5を除いた四 者Vif複合体はA3Gxに対する阻害効果を示したが、その強さはVif五者複合体の1/5程度であった。 一方で、Culin5、Elongin B-Elongin C複合体、CBFβのいずれも、単独ではA3Gxに対する阻害効果 が低かった。この阻害効果の責任領域を探索するために相互作用実験を行った。

はじめに、Vif五者複合体とAPOBECの相互作用に着目する。Vif五者複合体とA3Fの結合は $K_d < 1$ µMであり、A3FにVif五者複合体を添加すると、A3Fの¹H-¹⁵N HSQCスペクトルのシグナル強度が 減少した。同様の変化がVif結合部位を持たないA3Gxについても観測された。Culin5を除いたVif 四者複合体、Culin5、Elongin B-Elongin C複合体、CBFβのいずれを添加した場合も、A3Gxのシグ ナル強度が、Vif五者複合体と比較すると弱いながらも減少した。そこで、分析超遠心を用いて A3GxとVif五者複合体との相互作用を確認すると、Vif五者複合体はA3Gxと複合体を形成していた。 加えてその構成タンパク質いずれについても、弱いながらも相互作用が観測された。従って、A3Gx、 及びA3FとVif五者複合体の相互作用が脱アミノ化阻害の主たる原因である可能性が高い。

DNAと、Vif五者複合の結合は $K_d 1 \mu$ M程度であった。これに対して、DNAのA3Gxに対する結合 は $K_d > 100 \mu$ Mであった。DNAと、Culin5、Elongin B-Elongin C複合体、及びCBFβに対する親和性 は、いずれもDNAのA3Gxに対する親和性より低かった。DNAとVif五者複合体の親和性はA3Gx とVif五者複合体の親和性より10倍以上高い。このことから、Vif五者複合体がDNAに結合するた めに、A3Gxの脱アミノ化反応が阻害されているように思われた。ところが興味深いことに、 [A3Gx]<<[Vif五者複合体]<<[DNA]の濃度条件下でもVif五者複合体がA3Gxの活性を阻害すること を見出した。この場合、Vif複合体と結合していないDNAが大過剰に存在する。つまり、Vif五者 複合体とDNAの結合が、APOBECタンパク質の阻害の主たる原因である可能性が低いことを強く 示唆している。

以上より、Vif五者複合体中の構成タンパク質全てがA3Gxと相互作用することにより、A3Gxの 活性が阻害されることが示唆された。同様にVif五者複合体は、A3F等、他のAPOBECタンパク質 の活性も阻害することが示唆される。

【参考文献】

1 Harris and Dudley. Virology. 479-480 131-145 (2015)

- 2 Hu et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 26 1176-1183 (2019)
- 3 Britan-Rosich et al., J. Mol. Biol. 410 1065–1076 (2011)
- 4 Kamba et al., Phys. Chem. Chem. Phys., 20 2976-2981 (2018)

5 Wan et al., Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj., 1864 129346 (2020)

P17 魚類の分析データサイエンスによるサケ科の特徴抽出及び可視化 〇村田 泉¹, 魏 菲菲², 坂田研二², 菊地 淳^{1,2,3} ¹横市院・生命医, ²理研 CSRS, ³名大院・生命農

Characterization and visualization of Salmonoid from analytical data science of fish diversity •Izumi Murata¹, Feifei Wei², Kenji Sakata², Jun Kikuchi^{1,2,3}

¹Gurad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., Japan, ²RIKEN CSRS, Japan, ³Grad. Sch. Bioagri.Sci., Nagoya Univ., Japan

In the future of 2050, the United Nations predicts that the world population will reach almost 10 billion peoples, and there are concerns about imbalances in food supply, mainly protein sources, and water stress. Even fishery products supplying with low water stress, especially salmon family fish has good feed conversion rate, therefore its aquaculture is popular worldwide. In our laboratory, various fishes are sampled from natural environments, and individual information of fish has been accumulated by various data science methods namely using NMR [1-5]. The purpose of this study is characterization and visualization of salmon family from the analytical data by comprehensively integrating chemical, biological, and physical information on the meat quality among fish diversity, especially in salmon family.

【背景・目的】

2050 年将来、国際連合の予測では世界人口はほぼ 100 億人に達するといわれており、蛋白 源を中心とする食料供給の不均衡化が危惧されている。水産物の中でも、特にサケ科魚類は 飼料から魚肉への転換効率が良く、世界的にも養殖が普及している。当研究室では天然環境 から様々な魚類をサンプリングし、NMR を端緒とした様々な情報抽出方法により魚の個体 情報や NMR による高分子・低分子の代謝物データを蓄積してきた[1-5]。本研究では、そ れら魚類多様性ビッグデータとサケ科魚類とをプロファイル化し、特有な肉質を化学的情 報、生物学的情報、物理学的情報を網羅的に統合解析することにより、サケ科の特徴抽出と 可視化を目的とした。

【方法】

ここでは、過去に蓄積してきた魚類多様性データとサケ科魚類を比較した。まず、魚個体の 全長・体長・体重を計測し、更に BMI(肥満度)を算出し表現系情報とした。これらの魚体を 解剖し、筋肉と腸内容物をサンプリングした。次その筋組織を KPi/D₂O 抽出し、700MHz-NMR 装置により Watergate、2D*J*-res、diffusion-edited 及び HSQC を計測した。

プロファイリング、機械学習、統合解析

○むらたいずみ、うぇいふぇいふぇい、さかたけんじ、きくちじゅん

2DJ-res のスペクトルはプロジェクションの ROI 化により数値化した。更にオートグラフに より、筋肉サンプルの物性情報を定量化した。

また、サケ科を中心とする魚種の腸内細菌叢の解析のため、次世代シーケンサーにより微 生物叢データを獲得した。全ての計測データは数値マトリックス化し、これらの異種データ を機械学習や統計学で汎用されているプログラミング言語である R 言語を用いて統合的に 解析を行い、特徴抽出と可視化を行った。

【結果・考察】

魚肉のうち成分プロファイルが呈味を反映し易い肉質と捉え、まず初めに、当研究室で蓄積してきた魚類多様性のデータとサケ科の 2DJ-res をもとに比較解析を行った。決定木型の 機械学習アルゴリズムであるランダムフォレストにより判別モデリングしたところ、サケ 科とその他の魚種は高精度で識別された(Fig. 1)。

更に Gini 係数から判別モデルにおいて特 に重要度の高い上位 20 の ROI 情報を抽出し た(Fig. 2)。このことから NMR による 2DJ-res の低分子化合物は魚種間の肉質の違いを示 す重要因子であることが示唆された。

次に、サケ科において重要であると考えら れる代謝物が他の分析因子と因果関係があ るのかを探索するために NMR による 2DJres・diffusion-edited とオートグラフによる物 性情報、表現型情報を交えてベイジアンネッ トワークを構築した(Fig. 3)。このネットワー クによると主要な低分子化合物と高分子や 物性情報、表現型情報に何らかの関連がある ということが明らかとなった。更に NGS に よる生物学的情報も追加し、サケ科における より統合的な特徴を可視化したい。

【参考文献】

[1] S. Yoshida et al., *Sci. Rep.* 4, 7005 (2014).[2] Y. Date & J. Kikuchi. 90, *Anal. Chem.* 1805 (2018). [3] F. Wei et al., *Sci. Rep.* 8, 3478 (2018). [4] M. Mekuchi et al., *PloS One* 13, e0197256 (2018). [5] T. Asakura et al., *Anal. Methods* 10, 2160-8 (2018). [6] T. Asakura, et al., *Anal. Chim. Acta* 1037, 230236 (2018).







Fig. 3. Bayesian network of integrated data

P18Y パルス磁場勾配NMRによるコーヒー粕由来脂質成分の自己 拡散係数測定 〇金井 典子¹,川村 出¹, William S. Price²

- 1. 横浜国立大学大学院 理工学府
- 2. Nanoscale Group, Western Sydney University, NSW, Australia

Self-diffusion coefficients of the lipid fraction extracted from spent coffee grounds by pulsed gradient spin-echo NMR

o Noriko Kanai¹, Izuru Kawamura¹, William S. Price²

1. Graduate School of Science and Engineering, Yokohama National University

2. Nanoscale Group, Western Sydney University, Penrith, NSW, Australia

Pulsed gradient spin-echo NMR is a convenient and noninvasive means to measure selfdiffusion coefficients of molecules in solution based on random translational motion. In this study, we determined the diffusion coefficients of lipid fraction extracted from spent coffee grounds with the pulsed gradient stimulated-echo (PGSTE) and double stimulated echo (DSTE) sequences. Triacylglycerols and diterpenes, which may be in form of fatty acid esters in the lipids,¹ give similar diffusion coefficients. These diffusion experiments will complement the characterization of the extracted lipid fraction.

【緒言】 分子の自己拡散は、熱運動によって駆動されるランダムな並進運動である。 パルス磁場勾配NMR(PGSE NMR)ではこのような並進拡散によるミリ秒~秒オーダーの 運動に基づいた分子の自己拡散係数(D)を測定することができる²。

我々はPGSE NMRを用いることで、コーヒー粕に含まれる脂質主成分のトリアシルグ リセロール(TAG)の運動性を評価し、抽出したTAGを水中油滴型エマルションに用いて、 その液滴サイズ分布を調査することを目指している。本発表ではその予備検討として、 有機溶媒に溶解させた脂質画分のPGSE NMRによる拡散測定を行い、TAGおよびその他 の微量に含まれる生理活性物質の自己拡散係数を決定した。また、固体NMRおよび GC/MSによるTAGの脂肪酸組成分析についても報告する。



Fig. 1. (a) DSTE and (b) PGSTE sequences with half-sine shaped gradient pulses.

脂質、磁場勾配NMR、自己拡散係数

oかない のりこ、かわむら いずる、William S. Price



Fig. 2. Typical (a) ¹H-DSTE and (b) ¹H-PGSTE spectra of the extracted lipid fraction. As the intensity of the applied gradient increases, the echo intensity decreases due to the effect of diffusion. (c) Self-diffusion coefficients (D) were determined by regression of the function onto the attenuation of the echo signal (E).

【実験】 乾燥させたコーヒー粕10 gをn-ヘキサン中において室温で十分に攪拌させた後、上澄み液を減圧除去し、約1.0 gの脂質画分を抽出した。この脂質を10 mg/mlの濃度で、DMSO- d_6 およびCDCl₃(D, 99.8%)に溶解させた二種類の試料を調製し、それぞれBBI、diff30プローブを備えた500 MHzの分光計(Bruker Avance II)で¹H NMR拡散測定を行った。CDCl₃中脂質試料には、対流効果を最小限に抑制できる二重誘導スピンエコー法(DSTE)を使用し、DMSO中脂質試料には、誘導スピンエコー法(PGSTE)を使用した(Fig.1)^{2,3}。全ての拡散測定を2回繰り返し、脂質画分に含まれる各成分のDを決定した。

【結果および考察】 DSTE法で測定したスペクトルでは、コーヒー粕中で測定した脂 質の固体¹H MAS NMR⁴と類似した、TAGを主とするやや幅広なピークが得られた(Fig. 2 a)。これは、脂質画分がCDCl₃に十分に溶解しなかったことが原因と考えられる。しか し、TAG由来のピークから決定されたDは、(5.32±0.02)×10⁻¹⁰ m²s⁻¹であり、本脂質試料中のCDCl₃ と既知のCDCl₃のD⁵が近い値を示したことは、TAGのDの信頼性を保証している。

PGSTE法では、TAGに加えて微量成分のジテルペン類のカーウェオールおよびカフェストール、 さらにカフェインのシグナルから自己拡散係数を決定することができた(Fig. 2 b, c)。オーバーラ ップしたピークに関しては、双指数関数を用いた解析がさらに必要であると考えられる。この手 法で決定されたTAGのDは、(2.52±0.04)×10⁻¹⁰ m²s⁻¹であり、ジテルペン類のDはこれに極めて近 い値を与えた。ジテルペン類が遊離脂肪酸にエステル結合している報告¹もあり、様々な生理活性 を持つジテルペン類の構造を明らかにすることは興味深い点である。現在、GC/MSや二次元NMR 測定などの結果を組み合わせて、詳細な構造を解析中である。討論会ではこれらの構造解析デー タも含めて自己拡散係数について議論したい。

¹ Wang, X. et al., Food Chem. **2018**, 263, 251-257. ² Price, W. S., NMR Studies of Translational Motion: Principles and Applications, 1st ed., Cambridge University Press, Cambridge, 2009. ³ Jerschow, A.; Müller, N., J. Magn. Reson. **1997**, 9, 299-336. ⁴ Kanai, N. et al., Biosci. Biotech. Biochem. **2019**, 83, 803-809. ⁵ Virk, A. S. et al., J. Mol. Liq. **2016**, 214, 157-161.

P19 NMRデータサイエンスに基づく生分解性プラスチックの分解 要因解析 〇山脇涼¹,坪井裕理²,鄭章代²,伊藤研悟^{1,2},菊地淳^{1,2,3} ¹横市院 生命医,²理研 環境資源,³名大院 生命農

Analysis of Decomposing Factor for Biodegradable Polymers by NMR Data Science

oRyo Yamawaki¹, Yuuri Tsuboi², Akiyo Tei², Kengo Ito^{1,2}, Jun Kikuchi^{1,2,3}
 ¹Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., Japan; ²RIKEN CSRS, Japan; ³Grad. Sch, Bioagri. Sci., Nagoya Univ., Japan

Recently, the disposal of plastics has become global issues contrary to those environmental stability. Then, biodegradable polymers, which are decomposed by microorganism in environment, are attracted public attention but they have challenges point that they can't use long term. In this study, we conducted decomposing experiments for biodegradable polymers to reveal decomposing factor and their contribution rate. And, we aimed to propose the prediction model of polymer degradation that considers decomposing factors. We built prediction model that conduct machine learning and Bayesian estimation after dimension compression of data by PCA. At this meeting, we repot contribution rate and degradation factors based on the importance computed from the machine learning.

【背景・目的】

近年、プラスチックの高すぎる安定 性が仇となりプラスチック廃棄処理 問題が顕在化している。そのため、特 定の環境中で微生物の働きにより無機化 される生分解性プラスチックに注目が集 まっているが、それらは物性の安定性に 乏しく長期の利用に向かない点が課題と なっていた。故に、分解速度を制御する ためより細かい分解過程の解明が必要と されている。昨年のNMR討論会におい て、当研究室ではポリ乳酸(PLA)を対象 に分解実験と解析を行い、¹³C CP/MASス ペクトルの形状変化と、分解の程度や物 理強度との関係について論じた。その後



Fig. 1. Network visualization among decomposing and physical factors by solid-state NMR components.

の研究で関係可視化に成功し、分解の程度と物理強度との間にトレードオフの関係があることが 示唆された(Fig.1)。本会では、NMRスペクトルにより分解の程度を見出せたことに注目し、分解 過程にある加水分解を促進する要因を参考に分解実験での分解環境に差をつけ[1]、複雑系での分 解に関わる要因の特定、およびその寄与率を明らかにすることを試み、分解環境も考慮した分解 予測モデルの確立をめざした。

高分子物性、固体NMR、計測インフォマティクス

○やまわきりょう、つぼいゆうり、ていあきよ、いとうけんご、きくちじゅん

【方法】

本研究では、まず PLA ペレットからプレス機を用いて成形処理過程を変化させ、大きさ 10mm× 30mm、厚さ 0.5mm のシート状のサンプルを作成した。次に、土壌を詰めた容器にサンプルを埋 没させ 60 ℃の恒温槽内に保管し、コンポストを模した分解環境にサンプルを曝露させることで 分解実験を行った。その際、土壌の水分率、および曝露期間を変化させ、分解環境の指標を得た。 また分解実験前後のサンプルは回収し、異方性 ¹H NMR および ¹³C CP/MAS の計測を含む、様々 な計測に供し NMR スペクトルや重量減少率などの分解指標を得た。また、¹H NMR から非晶部 情報を抽出し得る MAPE と結晶部情報を抽出し得る DQ を引いた残渣を中間成分と定め[2]、結晶 比率を算出することとした。分解予測モデルは、説明変数を主成分分析(PCA)による情報圧縮を行 った後に、機械学習とベイズ最適化を掛け合わせることで構築した(Fig. 2)。得られたデータのう ち重量減少率などの分解指標を目的変数、水分率や分解時間などの実験条件と NMR スペクトル を説明変数としてデータセットを作成し、分解予測モデルに供することとした。



Fig. 2. Scheme of prediction model of polymer decomposition.

【結果・考察】

サンプルの作成方法で3種類のシートを作成 し、土壌の水分率が20%、50%、80%、分解期間 が7日、14日、21日になるよう分解実験を行い、 計27種のサンプルを得た。これに分解実験に供 する前のサンプルも加えた計30種のサンプルに 関してNMRを中心とした測定を行い、得られた データを分解予測モデルに供した。PCAのスコ アを確認したところ、作成条件ごとに分かれる 傾向にあり、入力データとして適切であると判 断した(Fig.3)。



Fig. 3. PCA score plot for prediction model.

現在、機械学習の予測精度向上を目指し、分解指標を重量減少率から分子量分布変化に置き換 え、データ前処理法も改善している。さらに本会では機械学習の重要度を基に、各要因の寄与率 についても議論する。

【参考文献】

[1] Drumright, R. E., Gruber, P. R. and Henton, D. E. Adv. Mater. 12, 1841–1846 (2000).

[2] Schäler, Kerstin, et al. Solid state nuclear magnetic resonance, 72 (2015): 50-63.



HIV-1ゲノムRNAの5'末端の違いが構造と機能に与える影響 ○大林カミーユ美智子¹, 篠原陽子¹, 増田貴夫², 河合剛太¹ ¹千葉工業大学, ²東京医科歯科大学

Influence of the 5'-terminal sequences on the structure and function of the HIV-1 genomic RNA

°Camille Michiko Obayashi¹, Yoko Shinohara¹, Takao Masuda², Gota Kawai¹ ¹ Chiba Institute of Technology, ² Tokyo Medical and Dental University

The 5'-UTR of HIV-1 genomic RNA is known to form the specific structure and has important functions. Especially, there are three kinds of 5'-terminal sequences, G1, G2 and G3, with different localization in the cell and virion particle as well as reverse transcription efficiencies. RNA fragments with 36-38 residues, named TP, corresponding to the junction of TAR and PolyA stems of the 5'-UTR were designed, and it was found that those structures and thermal stabilities were affected by the number of the G residue at the 5' end. In the present study, one of the three fragments, TP-G1G-36 was subjected to the NMR analysis to determine the solution structure. By using the residue-specific stable-isotopic labelled RNA as well as the sub-fragments, TAR-G1G-19 and PolyA-17, the signals of TP-G1G-36 were successively assigned and the solution structure was determined.

序論 TP-G1G-105 本研究で 100 UCGGAGUU GUGAUGAA は、HIV-1プロ G GCUC-UCUGGCUAACUA ĠĠĠĂ-ĂĊĊ—ĊĂĊŮĠĊ ÁĠĊĊIJĊĂĂ ύÚ UAAA ウイルスDNA の3つの転写開 PolyA-17 TAR-G1G-19 TP-G1G-36 始点から転写 а 5 35' ь и ^и с и с и и о о о 100 h 100 h 3 5'∪3' bu^Ucucu Ucucu uččču saug^A Af godska kočca custova godska se sa godska se sa godska se sa se s Godska se sa s されたRNAの UGAUG^AAf cc_gdddd Add ċảċὑĠċ_Ġѧ_g сC 構造の比較を 60 e d Ь 行い, それら Fig. 1. Design of model RNAs の構造とウイ ルスの生活環

との関係を明らかにすることを目的としている.これまでに、TARとPolyAの接合部に 対応する36~38残基のRNA(TP)を設計し(Fig.1),それらの構造や熱的安定性が5' 末端のG残基の個数によって変化することを明らかにした.

今回は、TP-G1G-36について、重要な残基を標識したRNAのNMR解析を行い、さらに、TP-G1G-36とその断片であるTAR-G1G-19とPolyA-17のスペクトルを比較することによって、TARとPolyAの接合部の構造を決定した.

HIV-1,位置特異的安定同位体標識,RNA

○おおばやしかみーゆみちこ,しのはらようこ,ますだたかお,かわいごうた

方法

測定に用いた試料は、北海道システム・サイエンス社に委託して化学合成した. 安定同位体標識アミダイトユニットを大陽日酸社から購入し、北海道システム・サイエンス社に委託して残基特異的に導入した. 600 MHz NMR分光計(Avance600, Bruker Biospin)を用いて測定を行った. 溶媒として重水(99.98 atom%, 大陽日酸社)を5%含む50 mM 塩化ナトリウム含む20 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)を用いた. それぞれ283 Kの条件でイミノプロトンスペクトル, HOHAHAスペクトルおよびNOESYスペクトルを測定した. RNAの濃度は, 0.08 mMから0.1 mMであった.

結果

TP-G1G-36とその断片のTAR-G1G-19 とPolyA-17のイミノプロトンスペクト ルを比較すると、断片の単純な和では なく、TARとPolyAの接合部分付近の シグナルが変化していることがわかっ た(Fig. 2).

TAR-G1G-19とPolyA-17のNMRシグ ナルを連鎖帰属し,それを参考に, TP-G1G-36のNMRシグナルを連鎖帰属 した.また,残基特異的安定同位体標



Fig. 2. Imino proton spectra of the model RNAs

識を行ったTP-G1G-36を用いて、シグナルの帰属を確認した.その結果、TP-G1G-36の 2つのステムの末端の塩基対の間に弱いNOEが観測された.

次に, TAR-G1G-19, PolyA-17およびTP-G1G-36の立体構造をそれぞれ決定した(Fig. 3). その結果, その接合部の構造に差があるが塩基対は同様に形成されていた. TP-

G1G-36において,2つのステムは同軸の一つ のステム構造を形成していた.また,3'末端 の残基はステムの外側に位置していた.

考察

イミノプロトンスペクトルの比較から, TP-G1G-36において,2つのステムループ間 に相互作用があることが示唆された.この 相互作用が,5'末端のGの数の違いによって 影響を受けている可能性がある.

今後は、この相互作用の違いが、3つの転 写開始点から転写されたRNAの機能へ与え る影響を明らかにしたい.



Fig. 3 The solution structures of the RNA fragments

参考文献

1. Masuda, T. et al., Scientific Reports 5, 17680 (2015).

2. Huang, H. et al., BBRC 516, 1145-1151 (2019).

3. 篠原陽子, 增田貴夫, 河合剛太, 第91回日本生化学会大会, 2018年9月(京都).

P21 機能的 MRI を用いた匂い刺激と行動を結びつけるマウスの 脳活性化経路の解明:誘引性匂い物質ムスコンによる 刺激と独立成分解析の適用

○武田 光広¹,椿原 由美子¹,吉永 壮佐¹,寺沢 宏明¹ ¹熊本大学大学院生命科学研究部

Elucidation of the activation pathways associating odor stimulation to behaviors in mouse brain by functional MRI: applications of attractive odorant, muscone, and independent component analysis

•Mitsuhiro Takeda¹, Yumiko Tsubakihara¹, Sosuke Yoshinaga¹, Hiroaki Terasawa¹ ¹Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

Olfaction is an important sense in humans and animals. Olfactory perception starts from the binding of the olfactory substance to olfactory receptors on the olfactory epithelium. Then, the signal is initially transduced to the olfactory bulb, and then to olfactory cortex and higher-order brain regions, which evokes odor-specific behaviors. To associate the binding of odorant substances to the receptors and resulting behaviors, we are aimed at elucidating the signal transduction pathways over the whole brain of mice. Mice has a well-developed olfactory system and thus serves as a useful model for studying olfaction. To address the problem drives from a low sensitivity, we developed previously functional MRI methods that combine periodic stimulation and independent component analysis. In this study, we applied this method to mice stimulated by muscone, which is an odorant secreted from musk and attract male mice.

【背景・目的】嗅覚はヒト・動物の重要な感覚の一つである。嗅覚のメカニズムは、基礎学術的 見地のみならずアロマテラピーやフェロモンを利用した家畜の繁殖促進等の産業利用の点からも 重要な研究課題である。匂い物質は嗅上皮の嗅覚受容体に結合すると、その情報が一次中枢であ る嗅球へと伝わる。さらに嗅球から大脳の高次中枢へと伝わることで、匂い固有の行動が誘起さ れる [1]。我々は、発達した嗅覚システムを持つマウスを対象として、匂いの受容と行動とを結 びつけるシグナル伝達経路を脳全体にわたり明らかにすることを目的としている。機能的 MRI は、非侵襲的に深部も含めて脳機能を可視化できるため、脳内のシグナル伝達経路を解析する上 で有力な手法となる。実際、匂い刺激を与えたマウスの嗅球における活性化を機能的 MRI によ り捉えた報告がある [2]。しかし、嗅球だけでなく高次中枢も含めた機能解析は、従来の方法で は検出感度が低く難しい。我々は、脳全体にわたり匂い刺激による活性化を機能的 MRI により 検出するため、匂い刺激を周期的に与え、その結果生じてくる周期的な応答を、独立成分解析 (ICA: Independent component analysis)を利用して検出する方法を開発した [3]。

本発表では、雄マウスに対して誘引効果を示すジャコウジカ由来のムスク化合物 muscone によ り刺激した雄マウスに開発手法を適用した。Muscone は雄マウスに対して誘引行動を引き起こす ことが報告されている [4]。また、嗅球および嗅覚野を対象として、c-Fos 抗体を用いた免疫染色 による解析が行われており、muscone 刺激により活性化する部位が同定されている [5]。

機能的MRI、匂い

○たけだみつひろ、つばきはらゆみこ、よしながそうすけ、てらさわひろあき

【方法】マウス脳用の 2 チャンネル極低温プローブを備えた、7 T 小動物用 MRI BioSpec 70/20 (Bruker Biospin)を用いた。7 から 10 週齢の C57BL/6 雄マウスを medetomidine 腹腔内麻酔下で撮像した。アルコシステム社と共同で開発した匂い曝露装置を利用して、muscone による刺激を行った [6]。Bregma: -2.6 mm~+5.2mmを撮像領域として、TR が 2 秒のグラジエントエコー型 EPI の連続撮像を行いながら、5 秒間匂い刺激・55 秒間待機のサイクルを 24 回繰り返すことで、機能画像を取得した。また、機能画像を空間標準化するため、T2 強調画像およびグラジエントエコー型 EPI を全脳(Bregma -5.2 ~ +5.2 mm)にわたり撮像した。機能画像の撮像中、直腸温度が 37.0 ± 1.0 °C、呼吸数が 144 ± 20 bpm に保持された 3 例のデータを解析に用いた。前処理として、SPM8 による動き補正および平滑化処理を行った。MELODIC (FSL)を利用し、全脳 EPI 画像および T₂ 強調画像を介して、取得した機能画像のマウス標準脳[7]に対する空間的標準化を行った。その後、3 例のデータを入力してグループ ICA 解析を行った。ICA 解析により同定された成分から、匂い刺激と同一の周期を持つ成分を選り抜いた。続いて目視により、血管や脳領域外に検出されている成分を擬陽性信号として取り除いた。活性化マップを Allen 脳アトラスの脳区分に従い作成された annotation map [8] と重ね合わることで、活性化が生じた脳部位を同定した。

【結果】Muscone による匂い刺激を与えた3例の雄マウスのデータ解析の結果、18 個の活性化成 分が検出された。嗅球の腹側、嗅覚野内の梨状皮質・嗅結節に加えて、線条体、神経路、無名質お よび側座核に活性化が検出された。

【考察】嗅球腹側・梨状皮質・嗅結節は、c-Fos 抗体を用いた免疫染色解析においても muscone 刺激による活性化が検出されている [5]。そのため、本解析は muscone 刺激による活性化を正しく検出できたと考えられる。線条体、神経路、無名質および側座核は、今回新たな活性化部位として検出された。側座核は、報酬、快感に重要な役割を担うため、muscone 刺激による誘引行動との関連も考えられる。検出された活性化部位は、Muscone が結合する嗅覚受容体MOR215-1 および MOR214-3 [9] に起因したシグナル伝達経路に含まれてくると考えられる。検出感度の活性化部位における信号強度の時間経過を調べて、刺激後に活性化が生じるまでの時間を互いに比較することで、シグナル伝達の順序に関する情報が得られることが期待される。

【結語】周期的匂い刺激と ICA 法を組み合わせた機能的 MRI 解析を適用することで、muscone により刺激したマウス脳における活性化部位を検出した。活性化部位として、免疫染色解析より 検出されている部位に加えて、線条体、神経路、側座核、無名質が新たに同定された。

【参考文献】

[1] Touhara, K. and Vosshall, L.B., Annu. Rev. Physiol (2009). 71, 307–332.

- [2] Xu, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) 100, 11029-11034.
- [3] Yuzuriha, N. et al., Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. (2016) 24, 1722.
- [4] Horio, N. et al, Nat. Commun. 10, 209 (2019)
- [5] Shirasu, M. et al., Neuron (2014) 81, 165-178.
- [6] Hayashi F, et al. Proc Intl Soc Mag Reson Med. (2018) 26, 2309.
- [7] Hikishima et al., Sci. Rep. (2017)7, 85.
- [8] Takata. et al., bioRxiv (2020). doi: 02.17.953547
- [9] Sato-Akuhara et al., J Neurosci. (2016) 36, 4482-91

P22 Band-selective CP法を使った超高速MASにおける 高効率¹³C-¹³C、¹³C-¹H間磁化移動の実現 〇松永 達弥¹,高橋 涼²,石井 佳誉^{1,2} 1 理化学研究所放射光科学研究センターNMR研究開発部門

2 東京工業大学生命理工学院

Development of high efficient ¹³C-¹³C and ¹³C-¹H magnetization transfer with band-selective CP on Ultrafast MAS.

Tatsuya Matsunaga¹, Ryo Takahashi², Yoshitaka Ishii^{1,2}
 1 NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center

2 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

Recent development of ultra-fast MAS (UFMAS) at a spinning rate over 60 kHz has realized high-resolution ¹H-detected multidimensional solid state NMR (SSNMR). However, schemes for magnetization transfer including cross polarization (CP) still has considerable room for improvement in UFMAS conditions. This is particularly true for multi-dimensional biomolecular SSNMR since remaining magnetization after 3-4 transfer periods typically required for such experiments is often only 5–15% of the initial ¹H magnetization. For multidimensional measurement, homonuclear dipolar recoupling schemes are as important as heteronuclear ones. Here, we demonstrate that band-selective homonuclear CP (BSH CP), which was previously used at a moderate MAS rate, provides highly efficient polarization transfer for UFMAS and realized effective and selective recoupling in both directions of ¹³CO-¹³Ca and ¹³Ca-¹³CO. We also discuss simulation results for a novel ¹H-¹³C CP scheme which we introduced last year in this conference.

近年の60 kHzを超える超高速MAS(UFMAS)やCross Polarization(CP)をはじめとした磁化移 動手法の発展により、固体NMRにおいても比較的短時間の高次元測定が可能となり、生体分子の 構造解析などで広く用いられている。元々、CPは磁化強度が強く、比較的短い縦緩和時間T₁を持 つ¹Hの磁化を低磁気回転比の核に移動させる事で固体NMRの信号感度を向上させる目的で開発さ れた異種核間磁化移動手法である。加えて、これは多次元固体NMR測定で¹H⁻¹³C間や¹³C⁻¹⁵N間とい った異種間双極子相互作用の観測に大きく貢献し、様々な手法が開発された。これと同時に、 ¹³C⁻¹³C間をはじめとする同種核間双極子相互作用の観測手法も大いに注目を集め発展してきた。 有名なものとして、同種核間の二量子コヒーレンスを利用したhomonuclear rotary resonance (HORROR)¹や、HORRORに断熱的強度変調パルスを適用したdipolar recoupling enhancement through amplitude modulation (DREAM)²、MAS回転と同期したRFパルス群を使ったradio frequency-driven dipolar recoupling (RFDR)³などがあるが、いずれもUFMAS条件の下では磁化 の移動効率が限られていた。

本発表で取り扱うband-selective homonuclear (BSH) CPはDREAMを元にした同種核間双極子相互 作用リカップリング手法で、20–30 kHzの中速MAS下で用いられてきた⁴。我々はUFMAS下では 利用されてこなかったこの手法がUFMAS下で非常に効率的な選択的磁化移動を示すことに気づ UFMAS、Multidimensional NMR、Homonuclear recoupling

○まつなが たつや、たかはし りょう、いしい よしたか

き、タンパク質試料に対し¹³CO-¹³Ca、¹³Ca-¹³COの双方向でこれまでの¹³C-¹³C磁化移動の手法と比べて最高レベルの効率での磁化移動を達成した。

Figure 1はRFDR、DREAM、BSH CPの3つの同種核 間リカップル手法を使って測定した¹H¹³Ca¹³COス ペクトルの¹³CO領域である。サンプルは¹³C,¹⁵Nラベ ル化したimmunoglobulin-binding protein GのB1ドメ イン (GB1)を使い、70 kHzのUFMAS下で測定を行 った。同種核間リカップルの前に、Ca選択的な¹H-¹³C 間APHH CP⁵による¹³Ca磁化の増強と、EBURPパル ス⁶による¹³CO信号の抑制を行っている。同様にし て行った2D測定により、BSH CPによる¹³Ca¹³COク ロスピークの面積強度は、平均でRFDRの約1.7倍、 DREAMの約1.3倍となる事が分かった。これはBSH CPによる¹³Ca-¹³CO間磁化移動効率が約50%と非常 に高いためである。当日はこの¹³C-¹³C間磁化移動に 関する詳細な結果報告と、数値シミュレーションに よるその解析を紹介する。

また、去年の第58回NMR討論会にて我々は¹Hへ のオフセットパルス照射を使ったUFMAS下での ¹H-¹³C CP手法、relaxation optimized tilted-angle CP (ROTA CP)に関する発表を行った⁷。ROTA CPでは ¹Hスピンロック中の余分な磁化減衰を抑える事で



Fig. 1. ¹³CO region of ¹H¹³Ca¹³CO spectra of uniformed ¹³C, ¹⁵N-labeled GB1. Methods for Ca-CO homonuclear recoupling are RFDR (left), DREAM (center) and BSH CP (right), respectively.

非常に高効率の磁化移動を可能にした。この手法による¹³C-¹H間の磁化移動についての実験、および数値シミュレーション解析による進展報告を、上記のBSH CPに関する紹介と併せて行う。

参考文献

- 1. N.C. Nielsen, H. Bildsoe, and H.J. Jakobsen, J. Chem. Phys. 101 (1994) 101.
- 2. R. Verel, M. Bladus, M. Ernst, and B.H. Meire, Chem. Phys. 287(1998G8.
- 3. A.E.Bennett, R.G. Griffine, J.H. Ok, S. Vega, J. Chem. Phys. 96 (1992) 8624.
- 4. V. Chevelkov, K. Giller, S. Becker, and A. Lange, J. Magn. Reson. 230 (2013) 205.
- 5. S. Hedeger, B.H. Meier, N.D. Kurur, G. Bodenhausen, R.R. Ernst, Chem. Phys. Lett. 223 (1994) 283.
- 6. H. Geen and R. Freeman, J. Magn. Reson. 93 (1991) 93.
- 7. T. Matsunaga, I. Matsuda, T. Yamazaki, and Y. Ishii, 58th Japan NMR conference, YP14.

P23 Vif-CBFβ-CUL5-ELOB-ELOC複合体に結合するアプタマーの NMR解析 ○熊谷紀志¹,鈴木拓也¹,関川湧斗¹,神庭圭介²,万里²,永田佳代子³, 高折晃史³,片平正人²,永田崇²,坂本泰一¹ 1千葉工業大学 2京都大学エネルギー理工学研究所, 3京都大学大学院医学系研究科

NMR analysis aptamers that bind to the Vif-CBF β -CUL5-ELOB-ELOC complex

oKazuyuki Kumagai¹, Takuya Suzuki¹, Yuto Sekikawa¹, Keisuke Kamba³,Li Wan², Kayoko Nagata³,
Akifumi Takaori-Kondo³, Masato Katahira^{2,4}, Takashi Nagata^{2,4}, Taiichi Sakamoto¹ *1Chiba Institute of Technology 2Institute of Advanced Energy 3Kyoto University, Graduate School of Energy Science, Kyoto University*

APOBEC3G (A3G), a host factor with antiviral activity, has been shown to inhibit HIV-1 growth by introducing mutations into the HIV-1 genome. Viral infectivity factor (Vif), on the other hand, forms the Vif – CBF β – CUL5 – ELOB – ELOC complex (Vif complex) and guides A3G to the proteasome degradation pathway by polyubiquitination. To develop aptamer therapeutics against HIV-1, we have selected RNA aptamers that bind to Vif complex by SELEX experiment. Based on the predicted secondary structure and the results of the mutational analysis, we obtained a truncated aptamer. Here, we report NMR analysis of the short aptamer.

抗ウイルス活性を持つ APOBEC3G (A3G)は HIV-1 のゲノム RNA のシトシン(C)を脱アミノ化すること で、ウラシル残基(U)に変換させる働きを持つ宿主 因子である. この A3G のはたらきによって、HIV-1 のゲノムに変異が起こり、HIV-1 の増殖が阻害され ることが明らかになっている. 一方、HIV-1 のタン パク質である Viral infectivity factor (Vif)は、 Vif-CBFβ-CUL5-ELOB-ELOC complex (Vif complex) の5者複合体を形成し、A3G をポリユビキチン化す る(Fig. 1, 2)¹⁾. このポリユビキチン化によって、 A3G はプロテアソーム分解経路で分解され、HIV-1



Fig. 1 Vif complex の機能

が増殖できるようになることが知られている.そこで本研究では, Vif complex を標的 として SELEX 実験を行い,抗ウイルス活性をもつアプタマーを作製することにより,新 たな AIDS 治療薬を開発することを目的としている.

Vif complex, RNAアプタマー

○くまがいかずゆき,すずきたくや,せきかわゆうと,かんばけいすけ,りわん,ながたかよこ, たかおりあきふみ,かたひらまさと,ながたたかし,さかもとたいいち すでに私たちは、Vif complex を標的として 8 ラウン ドの Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX)実験を行い、次世代シーケンサーで 配列解析を行ったところ、多くのアプタマー候補を得た. 表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて、Vif complex との 親和性を解析したところ、選別された RNA のうち 39 番 目に配列が多かったアプタマー(VN39)が強い結合(K_d は 約 10 nM)を示した(Fig. 3).さらに、Doped-SELEX 法 によって、Vif complex との結合に重要と考えられる残 基(Fig. 3 の赤丸)を同定した.そこで本研究では、 87 残基の VN39 を短鎖化し、NMR によりアプタマーの立 体構造を明らかにすることを目的とした.

方法

VN39を短鎖化したRNAとして,VN39_32 (32残基) と VN39_34 (34残基)を設計した(Fig. 3).VN39_32と VN39_34を調製するための鋳型DNAを北海道システムサ イエンス社に依頼合成し,T7 RNAポリメラーゼを用い た試験管内転写合成法により調製した.ポリアクリル アミドゲル電気泳動により精製した後,限外ろ過膜 (Sartorius社)により20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5),50 mM NaC1に交換し,10%重水,283 Kの条 件で測定を行った.NMRスペクトルの測定にはAVANCE 600分光計 (Bruker Biospin社)を用いた.NMRスペク トルの測定データの解析にはTopspin (Bruker Biospin 社)を用いた.

結果および考察

VN39_32のVif complexとの結合を調べたと ころ, Kaは約30 nMであり, vif complexとの 親和性が約1/3 になったが,結合力を維持し ていた.そこで,NOESYスペクトルを測定しイ ミノプロトン領域の解析を試みたが,NOEシグ ナルが重なったため,解析が困難であった. そこで,VN39_34をデザインし,イミノプロト ンスペクトルを測定したところ,VN39_32と部 分的に類似したスペクトルが得られた(Fig. 4). NOESYスペクトルを解析したところ,G:U 塩基対に特徴的な強いNOEシグナルが観測さ れ,G1:C33,G2:C32,G3:U31,C4:G30が塩基 対を形成していることが示唆された. 参考文献 ELOB ELOC Vif CUL5 PDBID:4N9F

Fig. 2 Vif complex の結晶構造



Fig. 3 VN39(左), VN39_32(中), VN39_34(右)の二次構造モデル. 赤丸は, Doped-SELEXの結果,重要 と考えられた残基. 白丸はプライマ ー結合配列.



Fig. 4 VN39_32 と VN39_34 のイミノプロトン スペクトル

1) Yingying Guo, Liyong Dong, Xiaolin Qiu, et al. Nature, 505, 229-233, 2014



構造・成分多様性のある高分子試料の 72*緩和に基づく固体 NMR信号分離法の開発 〇山田隼嗣^{1,2},近山英輔^{2,3},菊地淳^{1,2,4} ¹名大院 生命農、²理研 CSRS、³新潟国情大 システム、⁴横市院 生命医

Solid-state NMR Signal Deconvolution Method Based on T₂^{*} Relaxation for Macromolecular Samples with Structural and Compositional Diversity

oShunji Yamada^{1,2}, Eisuke Chikayama^{2,3}, Jun Kikuchi^{1,2,4}

¹Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ., ²RIKEN CSRS, ³Dept. Inform. Sys., Niigata Univ. of Int. and Inform. Stud., ⁴Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ.

Solid-state NMR (ssNMR) spectroscopy, especially anisotropic interactions, carries high-order structure and dynamic information of the sample. Therefore, the separation of ssNMR signals is an important issue for extracting the information hidden in the NMR spectrum of polymer samples having diversity in highorder structures and components. In this study, we report a technique for separating broad-spectrum of ssNMR based on T_2^* relaxation using the short-time Fourier transform (STFT) and nonnegative matrix factorization (Fig. 1). And, the application example of generative topographic mapping regression for visualization and prediction of integrated data of STFT processed NMR signals and various physical properties (Fig. 2) are shown. These data, especially the ¹H anisotropic spectrum are expected to be used as high-order structure descriptors for data-driven science.

【背景・目的】

固体核磁気共鳴(ssNMR)分光法、特に異方性相互作用は、固体試料の高次構造や 動的情報を有している[1]。したがって、ssNMR信号の分離は、高次構造や成分に多様 性のある高分子試料のNMRスペクトルに秘められた情報を抽出するための重要課題で ある。先行研究において、異なる運動性(*T*₂*緩和)成分を含む溶液NMR信号を対象に 短時間フーリエ変換(STFT)および非負値行列因子分解(NMF)を用いた信号分離法 を報告した[2]。本研究では、固体状態で複数の相構造、または成分を持つ高分子試料 の広幅スペクトルを対象とした信号分離法を開発した。また、STFTデータを高次構造 記述子として活用しNMR信号や物性値を可視化および予測するために、Generative Topographic Mapping Regression (GTMR)[3]の適用を検討した。

【方法】

多相ポリマーであるポリカプロラクトン (PCL) やポリ乳酸 (PLA) の¹H静的、magic-andpolarization-echo (MAPE) フィルター、double-quantum (DQ) フィルター、¹³C Cross-Polarization/ magic-angle spinning (CP/MAS) のssNMR信号、多成分試料として*E. gracilis*細胞[4]の¹H高速MAS のssNMR信号は、MASプローブを備えたBruker 500 MHz NMR装置を使用して測定した。信号分 離法は、PythonのNMRデータ処理用のnmrglueおよびNMF用のNIMFAを用いて実装した。熱重量 示差熱分析 (TG-DTA) および示差走査熱量分析 (DSC) を用いて、ガラス転移点 (Tg) 、融点 (Tm) および熱分解温度 (Td) を測定した。STFT処理したNMR信号と物性値の統合データの可 視化および予測のために、GTMRを行った。

FID信号処理、行列因子分解、短時間フーリエ変換

○やまだしゅんじ、ちかやまえいすけ、きくちじゅん

【結果・考察】

本研究では、T2*緩和パターンに基づいて複数の相構 造、または成分を持つ高分子試料の広幅スペクトルを 分離するため、STFTおよびNMFを使用して、ssNMR 信号分離法を開発した。一般に、STFTを使用して、 短い時間間隔でFIDを周波数領域データに変換し、時 間軸と周波数軸の行列を生成することができるが、部 分的な時間での各スペクトルの分解能は低い。そこ で、STFTを使用して、短い時間間隔でFIDを周波数領 域データに変換し、時間軸と周波数軸の行列を生成し たのち、最初のセグメントから時間間隔を増やしなが ら段階的に行列をゼロの値に置き換え、逆STFTする ことで複数のFIDを生成し、そのFIDから段階的に信号 をゼロにした高分解能なスペクトルを含む行列を作成 した。作成した行列にNMFを適用することで、多相お よび多成分スペクトルに含まれる成分のT2*緩和パター ンに基づいて、NMR信号が分離された。本手法によ り、1次元ssNMRスペクトルを高いSNRで評価し、 ssNMRスペクトルから複数の相構造(Mobile成分は狭 幅なMAPEフィルターのssNMRスペクトル、Rigid成分 は広幅なDQフィルターのssNMRスペクトルに類似) の信号(Fig. 1a)および含有成分(タンパク質、脂 質)の信号(Fig. 1b)を分離できた。

さらに、STFT処理したNMR信号と各種物性値の統合 データにGTMRを適用することで、次元削減により2次 元マップ上にデータを可視化すると共に、所望の物性

(Tg、Tm、Td) となるSTFTピーク強度を予測した (Fig. 2)。

本会ではNMR信号分離法の各種ポリマーデータへの 応用やデータポイントの補間法の適用についても議論 する。本手法により生成したSTFTデータや構造・成分 多様性情報は、ssNMRを使用した高分子材料の複雑さ のシミュレーションや機械学習などマテリアルズ・イ ンフォマティクスに重要な高次構造記述子としての活 用が期待される。特に、¹Hの異方性スペクトルに対す る本手法の適用は、小型NMRの簡易計測データからの 材料・食品等の製造および品質管理に関わる計測ビッ グデータ蓄積や、その後の人工知能(AI)活用へ展開 できると考えている。



Fig. 1. ¹H ssNMR signal dconvolution under non-MAS of PCL (a), under fast MAS of *E. gracilis* (b)



Fig. 2 Prediction of NMR signals and physical properties using GTMR

【参考文献】

[1] K. Saalwächter, *In NMR Methods for Characterization of Synthetic and Natural Polymers*, (2019). [2]
S. Yamada, et al., *Int. J. Mol. Sci.* 21, (2020). [3] H. Kaneko, *Mol. Inf.* 38, (2019). [4] T. Komatsu, et al., *Environ. Sci. Technol.* 49, (2015).

P25

高次構造・運動性評価のマテリアルズ・インフォマティク スを趣向した時間因子分解NMR 〇原光輝¹,山田隼嗣^{2,3},菊地淳^{1,2,3} ¹横市院生命医、²理研環境資源、³名大院生命農

Time factorization NMR toward structure and dynamics evaluation in materials informatics

oKoki Hara¹, Shunji Yamada^{2,3}, Jun Kikuchi^{1,2,3}

¹Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., ²RIKEN CSRS, ³Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.

Polymers materials exhibit multiphase structure due to enormous chemical and structural diversity monomers and their polymerization, packing, as well as cross-linking. In recent years, the use of materials informatics based on data-driven approach has been promoted in the designing new materials. However, there are challenges such as lack of evaluation and description methods and databases of polymer properties. The purpose of this study is to develop a method for evaluating the domain structure and properties of polymer materials by using NMR data, frequency-domain information, time-domain information based on short-time Fourier transforms, and simulation modeling of domain structures.

【背景】ポリマー材料はモノマー構造や 重合度⁽¹⁾、成型条件による架橋構造や絡 み合い⁽²⁾等から形成される多相構造⁽³⁾に より化学的及び構造的多様性を示す。近 年、ポリマー開発において従来の実験的 手法に加え、理論的な量子化学計算、分 子記述子に基づく計算科学的手法、及び ビッグデータを活用した機械学習法等と いったデータ駆動型の材料開発を行うマ テリアルズ・インフォマティクス(MI)を 用いた研究が推進されている。しかし、 ポリマー物性の多様性の評価法、複雑な



高分子構造の表記法、及びデータベース不足

Fig.1. Concept of "time factorization NMR" toward structure and dynamics evaluation in materials informatics

等の課題が多く存在している⁽⁴⁾。そこで本研究では、高次構造と物性における関係性 評価のため、拡散NMR情報を用いてドメイン構造シミュレーションを行った事例⁽³⁾を 参考に、固体NMR(Nuclear Magnetic Resonance)の周波数領域情報に加え、時間領域情 報として短時間フーリエ変換(STFT)を行うことで得られた緩和時間情報⁽⁵⁾、及びドメ イン構造モデルに基づくシミュレーションからポリマー材料におけるドメイン構造と 物性の評価法について検討した。さらに、Resource Description Framework (RDF)⁽⁶⁾とい うweb上にあるリソースのメタ情報を記述する枠組みを利用して、関連する公共データ ベースとの相互運用について検討し、収集したデータを用いたポリマー材料における 高次構造の記述子計算、及び機械学習を適用し、評価した(Fig.1.)。

固体NMR、緩和解析、材料シミュレーション

○はらこうき、やまだしゅんじ、きくちじゅん

【方法】 各種ポリマー材料の¹H 固体 NMR(異方性、Double quantum (DQ) Filter、 Magic and polarization echo (MAPE) Filter)デ ータにフーリエ変換を行い得られたスペ クトルデータの成分分離を行うために PythonのCurve fitを用いて、voigt関数フィ ッティングを行った。次に同様のデータに STFT⁽⁶⁾ を行い、得られた時間領域データ の成分分離を行うために、 T_2 緩和関数フィ ッティングを行った。

【結果・考察】まず、Polycaprolactone(PCL) 由来の異方性データ、DQ Filter、MAPE Filterの情報をフーリエ変換することで得ら れた周波数領域データにフィッティングを 行い、可動相、中間相、硬質相に成分分離を 行った。次に各データにSTFTを適用し (Fig.2a.)得られた時間領域データに対し、フ ィッティングにより、T2緩和時間情報に基 づき相構造を評価することができた (Fig.2b.)。加えて、NMRから得られた周波数 領域データと時間領域データにフィッティ ングして成分分離した結果から高次構造モ デルを考案し、そのモデルに基づくシミュ レーション法を適用することで、固体NMR データに3種の計算科学的手法を駆使した高 次構造・運動性評価法についても検討してい



Fig.2. Spectral fitting of different mobility domains by the short-time Fourier transform of ¹H wide-line spectra of PCL

る。本会では、これらの結果に加え、今回のシミュレーションデータをRDF化することで得られ るポリマーデータベースのポリマーに関するメタデータとの関連性についての評価も報告する。

【参考文献】

[1] E. U. Mapesa, D. P. Street, M. F. Heres, S. H. Kilbey II, and J. Sangoro. *Macromolecules*. 53, 5315-5325(2020).

[2] F. Campise, D.C. Agudelo, R. H. Acosta, M. A. Villar, E. M. Valles, G. A. Monti, and D. A. Vega. *Macromolecules*. 50, 2964-2972 (2017).

[3] H. Schneider, K. Saalwächter and M. Roos. Macromolecules. 50, 8598-8610 (2017).

[4] D. J. Audus, J. J. de Pabro. ACS Macro Lett. 6, 1078-1082 (2017).

[5] S. Yamada, A. Kurotani, E. Chikayama and J. Kikuchi. Int. J. Mol. Sci. 29, 2978 (2020).

[6] H. Zhao, Y. Wang, A. Lin, B. Hu, R. Yan, J. McCusker, W. Chen, D. L. McGuinness, L. Schadlr, and L. C. Brison. *APL Materials* 6 (2018)

P26 高分解能固体NMR測定の分解能向上を指向した側鎖重水素 標識法のアミロイドタンパク質への応用 •重光 佳基¹, 寺見 響¹, 松永 達弥², 山崎 俊夫², 石井 佳誉^{1,2} 1東京工業大学生命理工学院 2理研RSC NMR部門

Application of side chain deuteration to amyloid proteins to improve resolution by solid-state NMR

•Yoshiki Shigemitsu¹, Hibiki Terami¹, Tatsuya Matsunaga², Toshio Yamazaki², Yoshitaka Ishii^{1,2} 1 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology 2 NMR Science and Development Division, RSC, RIKEN

¹H detected solid-state NMR spectroscopy is a powerful tool to elucidate determination of protein structure such as amyloid fibril. ¹H line broadening due to ¹H-¹H dipolar interactions, however, cannot be completely eliminated even with the 100 kHz ultra-fast MAS. This often hampers signal assignment or structure analysis of proteins. Last time, we reported a method to selectively deuterate side chains at high deuteration level with *E. coli* expression system while remaining the protons at the α -positions. We applied this side chain deuteration method to β -amyloid protein (A β) expression. In this presentation, we would like to discuss simplification and/or resolution of NMR spectra between side chain deuterated labeled using this method and conventional uniformly labeled method.

¹H観測を用いた固体NMR法は、アミロイド線維等の非結晶性高分子量タンパク質の 立体構造解析に有用な手法であるとして着目されている。ところが、主に¹H-¹H双極子 相互作用によって、特に高分子量タンパク質では信号の分解能が制限されてしまう。60 kHzを超える高速MAS測定は双極子カップリングのような異方的なスピン相互作用を除 去し分解能を向上させるのに有力な方法である¹。しかし、¹H-¹H双極子相互作用による ¹H信号の広幅化は、100 kHzの超高速MAS測定を用いても完全には除去できないことが 近年報告された²。

¹Hの信号強度を向上させる方法として、¹Hを²Hに置き換えることで¹H-¹H双極子相互 作用を最小化することが知られている³。²H標識されたタンパク質のアミドプロトンを back-exchangeする手法⁴や残った¹Hを固体NMRで観測する手法⁵が考案されている。しか し、前者は立体構造解析を行うため側鎖間の距離情報を十分に得られず、後者は¹Hが少 なすぎること原因で感度不足に陥ることがままある。タンパク質の選択的安定同位体標 識の方法の1つであるSAIL法は固体NMR測定において上述の問題点を解決できる可能 性を有している^{6,7}。このタンパク質の選択的重水素標識法の可能性を広げるために当研 究室では他のアプローチを検討し、大腸菌発現系を用いてアミノ酸側鎖を²Hに標識しつ つも、α位を¹Hに保つことで信号の分解能を向上させる標識法を前年の討論会にて報告 した。本手法はアミノ酸生合成経路におけるアミノ基転移反応に着目している。

側鎖重水素標識、固体NMR、アミロイドβ

○しげみつ よしき、てらみ ひびき、まつなが たつや、やまざき としお、いしい よしたか

このアミノ基転移反応によりα-ケト酸がアミノ酸へと変換される際にα位に溶媒由来の水素が導入される。この反応を利用して、²H,¹³C標識したグルコース由来の重水素標識α-ケト酸のα位に 軽水由来の¹Hを導入することで側鎖のみを重水素標識することをGB1を用いて示した。

本年の討論会では、上述の標識法をβ-アミロイドタンパク質(Aβ)への適応を試み た。このAβからアミロイド線維を調製し。従来の均一な安定同位体標識などを用いて 調製したアミロイド線維との比較を、NMRスペクトルの単純化や分解能を中心に議論 する。

References

- 1. Andreas, L.B. *et al.*, High-resolution proton-detected NMR of proteins at very fast MAS. *Journal of Magnetic Resonance* **253**, 36–49 (2015).
- Penzel, S. et al. Spinning faster: protein NMR at MAS frequencies up to 126 kHz. *J Biomolecular NMR* 73, 19–29 (2019).
- 3. LeMaster, D.M. & Richards, F.M. NMR Sequential assignment of *Escherichia coli* thioredoxin utilizing random fractional deuteriation. *Biochemistry* **27**, 142–150 (1988).
- 4. Löhr, F. *et al.*, A strategy to obtain backbone resonance assignments of deuterated proteins in the presence of incomplete amide 2H/1H back-exchange. *Journal of Biomolecular NMR* **25**, 291–311 (2003).
- 5. Asami, S. *et al.*, High resolution H-1-detected solid-state NMR spectroscopy of protein aliphatic resonances: access to tertiary structure information. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 15133–15135 (2010).
- Kainosho, M. *et al.*, Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations. *Nature* 440, 52–57 (2006).
- 7. Miyanoiri, Y. *et al.*, Highly efficient residue-selective labeling with isotope-labeled Ile, Leu, and Val using a new auxotrophic *E. coli* strain. *Journal of Biomolecular NMR* **65**, 109–119 (2016).

P27高磁場極低温MAS-DNP固体NMRによる空間選択的なスピン相 関偏極成分の応用 〇杉下友晃¹,松木陽^{1,2},藤原敏道^{1,2} ¹大阪大学 蛋白質研究所 ²大阪大学先導的学際研究機構 量子情報・量子生命研究部門

Application of space-selective spin-correlated polarization components observed by solid-state NMR with high-field DNP and MAS under ultra-low temperature OTomoaki Sugishita¹, Yoh Matsuki^{1,2}, and Toshimichi Fujiwara^{1,2}

¹Institute for Protein Research, Osaka University

²Quantum Information and Quantum Biology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University

Recent development of dynamic nuclear polarization (DNP) under a high magnetic field has enabled the observation of a spin-correlated component, i.e. a high-order term in the density operator for the hyperpolarization. Using unique characteristics of this component, we can quantify the ¹H spin polarization through the ¹³C spin in an ¹H-¹³C spin system, reflecting ¹³C polarization heterogeneity depending on the distance from the polarizing agent. The analysis of the experimental results for the polarization measurement with numerical simulations provides information of spin diffusion and paramagnetic relaxation by the biradical. In addition, the spin-correlated component is applied to surface-only spectroscopy. The high-resolution ¹³C-¹³C DQ-SQ experiments using the component permit the chemical shift perturbation measurements, revealing the subtle differences between the bulk and surface structure due to the differential molecular packing.

我々は近年、15T以上の高磁場・40K以下の極低温下でMAS-NMRの感度を大幅に向上させる、 交差効果を利用した動的核分極法(Cross-Effect DNP)を大きく発展させ、温度による感度利得も含 めると従来の固体NMR測定の約1000倍の高感度をも達成できるようになってきた。本質的に低感 度な分光法であるNMRではスペクトルの高感度化は常に重要な課題であり、構造生物学や材料科 学への応用においてもこの高磁場DNPの利用例がますます増加しつつある。

このような極低温高磁場DNPによる超偏極条件下で、その状態を表す密度演算子に関して通常 NMRで平衡状態の初期磁化として選択される線形成分のみならず、ゼーマン分極の高次項として のスピン相関成分が無視できない大きさになってくる。このスピン相関は双極子結合に因らない ゼーマン効果由来である点においてユニークであり、特に以下のような特徴をもつ。

i) *I-S*の2スピン系において、Sスピンの線形成分と*I-S*スピン相関成分との強度比をとること によって、(1)に示されるように、系における*I*スピン偏極率が得られる。

$$2\mathrm{Tr}\{I_z\rho\} = \mathrm{Tr}\{2I_zS_z\rho\}/\mathrm{Tr}\{S_z\rho\}$$
(1)

ii) *I-S*スピン相関成分やこれを利用して計算された偏極率は、*I*スピン、*S*スピン双方におけるスピン拡散や常磁性緩和による影響を反映する。

動的核分極(DNP)、偏極率、局所構造

○すぎしたともあき、まつきよう、ふじわらとしみち

iii) DNPによる超偏極のスピン拡散において、線形成分の大きさは近似的に分極剤からの距離に対してsech関数で減衰するのに対し、2スピン相関成分はsechの2乗として効いてくるために、より超偏極領域選択性の高いプローブとして機能する。

これらの特徴から、以下のスピン相関の応用が考えられる。 (1) 偏極率測定

従来はサブミリ波照射がある場合とない場合のシグナル強度 比(enhancement factor)を利用して、熱平衡磁化を経由した間接 的な偏極評価を行っていたが、サブミリ波照射なし条件では核ス ピンから電子スピンへの逆向きの偏極移動である脱分極現象が 生じ、正確な偏極率を与えないことが分かっている。一方で、ス ピン相関成分を利用した偏極率は各成分の測定を全てサブミリ



Fig. 1. Pulse sequence for observing the spin-correlated signals separated from the ¹³C magnetization.

波照射下で行うために、熱平衡状態を経由せず、正確な¹Hの絶対偏極率を測定することができる¹。 実際にスピン相関成分を1次元NMRで選択的に観測できるパルスシークエンス(Fig. 1)を開発し 偏極率を計測したところ、スピン拡散やスピン緩和による影響がほぼ定常状態とみなせる条件に おいて、脱分極による影響のない、試料内の正確な¹H平均偏極率が計測できた。この結果から、本 手法を用いることによって、DNP研究に欠かせないバイラジカル分極剤やサブミリ波照射系のセッ トアップの評価を、より正確に行えるようになったといえる。

一方で、DNP によるスピン拡散やスピン緩和によって¹³C磁化が分極剤からの距離に依存して不 均一になっている場合、¹H偏極率が¹³Cを通して測定されるという本研究の特徴(式(1))上、¹³Cの不 均一なシグナル強度を反映して分極剤周辺の¹H偏極が強調された偏極率を与える。このような試 料内偏極のダイナミクスを精査することはスピン拡散や緩和現象の解析に役立つと考えられ、実 際にシミュレーションによって本手法による偏極率の挙動を評価した。その結果も発表する。 (2)表面構造解析

DNPを用いた従来の表面構造解析法であるSurface-Enhanced Spectroscopy (SENS)は、表面以外のバルクか らのNMR信号が十分弱いことを前提としている。¹³C-NMR 測定などではバルク信号が無視できず、表面構造のみを 選択的に評価することができない。一方で、スピン相関 成分を用いれば、この成分が超偏極領域に特異的に生じ ることを利用して、分極剤の近接する表面領域(<130nm) の構造情報を選択的に得ることができると考えられる。



Fig. 2. Pulse sequence for observing the spin-correlated signals as ¹³C-¹³C DQ coherence.

Methionine-Leucine-Phenylalanine (MLF)¹³C完全標識ペプチドの微結晶サンプルに対して、スピン相関項由来の¹³C-¹³C同種核DQ-SQ測定(Fig. 2)を行った。この測定から得られたスペクトルと、リカップリングパルスによって復活させた通常の¹³C-¹³C双極子相互作用由来のDQ-SQ測定スペクトルを比較したところ、PheのC^β由来のピーク等、一部に顕著な化学シフト変化がみられた。この結果はバルクと表面における分子構造のパッキングに関連した差異を示していると考えられる²。

OReferences

¹ T. Sugishita, Y. Matsuki and T. Fujiwara. (2019) Absolute ¹H polarization measurement with a spin-correlated component of magnetization by hyperpolarized MAS-DNP solid-state NMR, *Solid State NMR*, **99**, 20-26. ² Y. Matsuki, T. Sugishita, and T. Fujiwara. (2020) Surface-only spectroscopy for diffusion-limited systems using

² Y. Matsuki, T. Sugishita, and T. Fujiwara. (2020) Surface-only spectroscopy for diffusion-limited systems using ultra-low temperature DNP MAS NMR at 16.4 T, *J. Phys. Chem. C*, **124**, 18609-18514.

P28

固体DNP-NMRによる高分子担持触媒の構造解析 ○田中 真司¹,小川 敦子¹,中島 裕美子¹,佐藤 一彦¹ 1産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター

DNP-enhanced solid-state NMR spectroscopy for structural characterization of polymer-supported catalysts

•Shinji Tanaka¹, Atsuko Ogawa¹, Yumiko Nakajima¹, Kazuhiko Sato¹ 1 Interdisciplinary Research Center for Catalytic Chemistry, AIST

While solution-state NMR has been widely utilized for the development of molecular catalysts, solidstate NMR has been sparsely applied for the analysis of solid-state catalysts due to low sensitivity. In recent decades, dynamic nuclear polarization (DNP) enhanced solid-state NMR spectroscopy has enabled the detailed structural characterizations of solid materials. DNP-NMR of catalyst species on inorganic supports was achieved using biradical polarizing agents, which induce a polarization transfer via cross-effect under microwave irradiation. For catalysts supported on organic polymers, however, non-porous structure prevents the effective distribution of biradical species over the sample, resulting in the insufficient signal enhancement. We have recently developed the rational guideline for DNP sample preparation from insoluble organic polymers. Herein we further studied on this guideline and demonstrated that DNP-NMR is a powerful tool for the structural characterization of catalyst species supported on organic polymer.

触媒は、均一系(分子触媒)と不均一系(固体触媒)に大別することができる。これらのうち、 後者は再利用性の高さや分離・除去の容易さから実用面で好適とされている。しかし、固体触媒 の分析手法は分子触媒と比較して限定されており、確かな構造解析に基づく触媒の改良が困難で あった。溶液 NMR は分子触媒の開発において不可欠な分析ツールであるのに対し、固体 NMR の 固体触媒への活用例は限られていた。固体触媒の活性点は試料全体の重量に対し少量であるため、 一般的な固体 NMR では十分なシグナル感度を得ることができないことが一因と考えられる。近 年、動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization; DNP)を利用する固体 NMR が、固体材料の高感度 解析手法として注目されている¹。DNP-NMR では、適切なラジカル化合物共存下、強力なマイク ロ波照射により電子スピンから原子核への分極移動を引き起こすことで、¹H 核において最大で 660 倍の感度向上が見込まれる。特に、安定ビラジカル分子を偏極剤として用いる交差効果 (Crosseffect)による DNP-NMR が大きく発展を遂げており、固体担持型触媒の構造解析に応用されてき た。しかし、シリカやアルミナなどの無機物への適用例は数多いものの、架橋型ポリスチレン等 の高分子担体への適用例は限られていた。高分子担体は酸塩基耐性の高さから精密有機合成で幅 広く用いられる材料であり、DNP-NMR による高感度構造解析手法を確立することで更なる発展 に寄与できると考えた。

我々はこれまでに、不溶性高分子材料の DNP-NMR 測定プロトコルとして、各サンプルの有機 溶媒への膨潤度からサンプル調製の最適条件を予測する方法を報告した²。また一方で、エポキシ 樹脂原料として有用なグリシジルエステルを、アンモニウム塩触媒によるエステル交換反応で効 率的に合成する手法を報告している³。今回、本触媒系を高分子担持型へと発展させるにあたり、

DNP-NMR、担持型触媒、高分子材料

oたなかしんじ、おがわあつこ、なかじまゆみこ、さとうかずひこ

DNP-NMR による精密構造 解析が極めて有用であるこ とを実証したので報告す る。

市販のメリフィールド樹 脂と三級アミンの反応から 4 種類の触媒 (1-Cl, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl) を調製した (Scheme 1a)。また、**3-Cl**のア ニオン交換反応により、3-**OH** と 3-NO₃ を調製した (Scheme 1b)。さらに、比較と して三級アミン触媒 5 を調 製した (Scheme 1c)。これら の担持型触媒は、通常の固 体¹³C CPMAS NMR により、 確認できるが、シグナルの 広がりと重なりからN周り の化学的環境を明確化する ことは困難であった。そこ で、DNP-NMR による天然 存在比での¹⁵N 核観測を試 みた。それぞれの触媒に対 U, 1,1,2,2-tetrachloroethane $(TCE) \succeq$ dimethyl sulfoxide (DMSO) 中での膨潤度を 測定した結果、1-CI は DMSO中で良好な膨潤度を 示し、4-Cl と5 では TCE 中 が良好であった。2-Cl, 3-Cl, 3-OH, 3-NO3 は、TCE と DMSOのどちらにも良い膨 潤度を示した。膨潤度測定 の結果に基づき、偏極剤溶



Scheme 1. Preparation of PS-supported quaternary ammonium salts and tertiary amine from Merrifield resin (a) (b) preparation of **3-OH**, **3-NO**₃, and **3-NO**₃-**15N** by anion exchange reaction of **3-CI**, (c) preparation of PS-supported tertiary amine **5**.

5







液として AMUPol/DMSO-d₆と TEKPol/TCE のいずれかを選択し、DNP¹⁵N CPMAS NMR 測定を行った。結果の一部を Figure 1 に示した。2-Cl は第4級アンモニウムに由来するシグナルが 57.5 ppm に一種類観測され、3-Cl と 3-NO₃ については低磁場側にショルダーを含むシグナルがそれぞれ 62.5, 62.2 ppm に観測された。また、3-NO₃の硝酸イオンに帰属できるシグナルが 378.8 ppm に観測され、アニオン交換が良好に進行していることが裏付けられた。一方、5 では 30~67 ppm の間 に複数のシグナルが観測され、NMR 測定温度 (103 K) において複数のコンフォマーが存在する ことが示唆された。アルキルアンモニウム塩は塩基性条件で三級アミンへと分解し易いことが知られているが、本測定により、触媒調製が想定通りに進行していることを明確に確認できた。こ れらの触媒を用いたグリシジルエステル合成反応や、触媒活性種、劣化化学種の DNP-NMR 観測 についても併せて報告する。

謝辞:この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)の委託業務 (JPNP16010)の結果得られたものです。

Griffin, R. G. et al. J. Chem. Phys. 2008, 128. 052211.
 Tanaka, S. et al. Phys. Chem. Chem. Phys. 2020, 22, 3184-3190.
 Tanaka, S. et al. ACS Catal. 2018, 8, 1097-1103.

P29

プリオン感染における「種の壁」を解明 志田俊信¹,○鎌足雄司²,依田隆夫³,山口芳樹⁴,Michael Feig⁵,大橋祐美 子⁶,杉田有治⁷,桑田一夫⁸,田中元雅¹ 1理化学研究所・脳神経科学研究センター,2岐阜大・科学基盤研究センタ ー,3長浜バイオ大学,4東北医科薬科大学・薬学部,5Michigan State University,6神戸大学・理学研究科,7理化学研究所・計算科学研究セン ター,8岐阜大・連合創薬医療情報研究科

Short disordered protein segment regulates cross-species transmission of a yeast prion

Toshinobu Shida1, OYuji O. Kamatari2, Takao Yoda3, Yoshiki Yamaguchi4, Michael Feig5, Yumiko Ohhashi6, Yuji Sugita7, Kazuo Kuwata8, Motomasa Tanaka1

1RIKEN Center for Brain Science, 2Life Science Research Center, Gifu University, 3Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, 4Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Medical and Pharmaceutical University, 5Michigan State University, 6Graduate School of Science, Kobe University, 7RIKEN Research Center for Computational Science, 8United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Sciences, Gifu University.

Soluble prion proteins contingently encounter foreign prion aggregates, leading to cross-species prion transmission. However, how its efficiency is regulated by structural fluctuation of the host soluble prion protein remains unsolved. In the present study, through the use of two distantly related yeast prion Sup35 proteins, we found that a specific conformation of a short-disordered segment governs interspecies prion transmissibility. Using a multidisciplinary approach including high-resolution NMR and molecular dynamics simulation, we identified critical residues within this segment that allow interspecies prion transmission in vitro and in vivo, by locally altering dynamics and conformation of soluble prion proteins. Remarkably, subtle conformational differences caused by a methylene group between asparagine and glutamine sufficed to change the short segment structure and substantially modulate the cross-seeding activity. Thus, our findings uncover how conformational dynamics of the short segment in the host prion protein impacts cross-species prion transmission. More broadly, our study provides mechanistic insights into cross-seeding between heterologous proteins.

背景

哺乳類が患う神経変性疾患の中で、「プリオン病」はプリオンタンパク質を介した感染性を示 すという大きな特徴があります。ウシからヒトへのプリオン病の感染がまれなように、プリオン タンパク質のごく少数のアミノ酸配列の違いによって、異種間でのプリオン感染性は大きく減少 します。ウシからヒトへの異種間のプリオン感染は、生体内に存在する可溶性プリオンタンパク 質が、異種由来のプリオンタンパク質凝集体と偶発的に凝集反応することで引き起こされると考 えられています。このような現象は「種の壁」として知られていますが、体内の可溶性プリオン

プリオンタンパク質、Sup35、天然変性タンパク質

しだとしのぶ, ○かまたりゆうじ, よだたかお, やまぐちよしき, Michael Feig, おおはしゆみ こ, すぎたゆうじ, くわたかずお, たなかもとまさ
タンパク質が、どのように異種間のプリオン感染効率を制御しているかは不明のままでした。 そこで、我々は、これまでプリオン感染現象の解明に大きく貢献してきた酵母プリオンタンパ ク質の実験系を用いて、種の壁を越えるプリオン感染の分子メカニズムの問題に取り組むことに しました。その際、これまでの哺乳類および酵母プリオン感染研究では、近縁種由来のタンパク 質(アミノ酸配列の類似性が高い)が用いられてきましたが、本研究では二つの遠縁種由来のタ ンパク質(アミノ酸配列の類似性が低い)を用いることで、種の壁の分子構造基盤がより明らか にできるのではないかと考えました。また、異種由来のプリオンタンパク質凝集体ではなく、生 体内に存在する可溶性プリオンタンパク質を調べることで、感染性の制御機構についての知見が 得られるのではないかと考えました。

研究手法と成果

我々は、S. cerevisiae (SC) およびK. lactis (KL) という二つの遠縁酵母種由来のSup35プリオ ンタンパク質を用いて研究を行いました。これまでのSup35タンパク質研究においては、SCを用 いた研究が長らく行われ、プリオン感染時の表現型などの判別がより確立されています¹⁾。この ような経緯を踏まえて、上記2種の酵母を用いた感染研究を進めるにあたっては、SCを感染され る側と設定しました。また、この2種間での感染メカニズムを調べる上で、SCに内在する可溶性 Sup35タンパク質が、どのようにKL由来のSup35タンパク質凝集体との反応性を獲得するか調べ ました²⁾。

可溶性Sup35タンパク質の凝集形成に関わる領域は天然変性であり、特定の折り畳まれた立体 構造をとりません。このような構造上の特性を持つタンパク質を用いて異種間プリオン感染解析 を行うため、高分解能の核磁気共鳴(NMR)法実験を中心に、試験管内での系統的な遺伝子変 異解析、酵母を用いた生体内でのプリオン感染実験、分子動力学計算を用いたシミュレーション などの多様な研究手法を取り入れました。

まず、SCとKL由来の可溶性Sup35タンパク質の動きを、NMR測定法による速い時間スケールの 構造揺らぎを観察できる¹H-¹⁵N異種核NOE測定によって比較したところ、動きが大きく異なって いる短い領域が存在することが分かりました(図1)。この領域は、凝集体形成の中心部位として 知られるアミノ末端の約70アミノ酸残基内に存在しており、同じタンパク質であっても、種が異 なると局所的に違いが存在することを示しています。



図1 遠縁酵母由来の可溶性の Sup35 タンパ ク質の短い天然変性領域における動きの違い

アミノ末端の 70 アミノ酸残基における SC (左)および KL(右)Sup35 タンパク質の ¹H-¹⁵N 異種核 NOE 値。それぞれの残基につ いて、正の NOE 値は遅い動き、負の NOE 値は速い動きを示す。二つのタンパク質の 動きを比較すると、紫で示した SC 残基 14 ~30 および KL 残基 16~31 において、動き が大きく異なることが分かる。なお、欠落 している残基は、プロリンまたは重複して

いる残基か、正確に定量化するにはシグナルが弱い残基を示す。

このようなSup35タンパク質の局所的な動きの違いが感染性に関係しているのかを調べるため に、SC由来のSup35タンパク質の動きが大きく異なっていた領域内において、KL由来の同領域の アミノ酸残基に置換したキメラタンパク質を作製しました。その結果、たった5アミノ酸残基の 置換だけでも、局所的に動きと構造がKL由来の可溶性Sup35タンパク質のように変化し、試験管 内および酵母内での異種間プリオン感染が生じることを見いだしました。さらに、このようなア ミノ酸置換を含んだ短い天然変性領域内においては、メチレン基(-CH₂-)の有無というアミ ノ酸側鎖間のわずかな構造の違い(グルタミンとアスパラギンの違い)でさえ、短い天然変性領 域の構造を大きく変化させ、KL由来のプリオンタンパク質凝集体との凝集反応を制御できるこ とが明らかになりました(図2)。

以上の結果から、生体内に存在する可溶性Sup35タンパク質に含まれる短い天然変性領域での特定の揺らいだ構造が、遠縁種由来の異種間プリオン感染効率を高度に制御していることが明らかになりました。



図2 局所的な構造の動きが種特有タンパク質凝集体への反応性を制御するモデル図 可溶性のSC由来Sup35タンパク質の短い天然変性領域を、KL由来Sup35タンパク質が持つアミノ 酸配列に置換したキメラタンパク質を用いて研究を行なった。その結果、置換パターンA(左)と B(右)に代表されるように、5アミノ酸残基置換領域内の1カ所のアミノ酸側鎖のメチレン基(-CH₂-)の有無の違い(Aではグルタミン、Bではアスパラギン)で反応性が大きく異なるタンパ ク質を見いだした。黒線はアミノ酸の主鎖、青線はアミノ酸側鎖を示す。これらのアミノ酸配列 は非常に類似しているものの、置換パターンAではKL由来Sup35タンパク質凝集体との凝集反応が 起こるがBでは起きないといった、KL由来Sup35タンパク質凝集体に対しての反応性(感染効率) が大きく異なるという結果を得た。

今後の期待

本研究成果は、酵母におけるプリオン感染現象の解明にとどまらず、哺乳類におけるプリオン感 染現象である種の壁の解明に貢献すると期待できます。酵母プリオンタンパク質Sup35と異な り、哺乳類におけるプリオンタンパク質は折り畳まれた立体構造を取っていますが、10残基程度 の短いループ構造の天然変性領域を含んでいます。これまでの研究では、このループ構造が哺乳 類種間においてわずかに異なっていることが示され、異種間プリオン感染に関与していることが 示唆されてきました。しかし、このような微細な構造の違いがどのように異種間プリオン感染性 を制御しているかは、十分に理解されていませんでした。本研究により一つのメチレン基の違い のみで天然変性領域の立体構造が変化し、異種間プリオン感染性を変化させることが明らかにな ったため、上記に述べたループ構造領域の小さな違いが哺乳類におけるプリオンの感染性を高度 に制御している可能性が示されました。

より広義には、神経変性疾患において頻繁に観察されている、異なるタンパク質間での共凝集 反応の理解に役立つと期待できます。これらの疾患に関連するタンパク質の多くは、凝集してな い状態では天然変性領域を含む一方で、凝集する際は異なるタンパク質と共凝集することがしば しば観察されてきました。本研究成果は、そのような可溶性の状態のタンパク質が、異なるタン パク質凝集体と共凝集反応を起こし、神経変性疾患を引き起こす現象の理解にも役立つと期待で きます。また、このような異なるタンパク質間での共凝集反応は、生体内で有害な影響を与える 可能性があるため、それらのタンパク質内の天然変性領域の構造は、疾患予防の効果的な治療標 的になりうると考えられます。

References

- Y. Ohhashi, Y. Yamaguchi, H. Kurahashi, Y. O. Kamatari, S. Sugiyama, B. Uluca, T. Piechatzek, Y. Komi, T. Shida, H. Müller, S. Hanashima, H. Heise, K. Kuwata, M. Tanaka. Molecular basis for diversification of yeast prion strain conformation, Proc Natl Acad Sci U S A. 115, 2389-2394 (2018)
- Shida T, Kamatari YO, Yoda T, Yamaguchi Y, Feig M, Ohhashi Y, Sugita Y, Kuwata K, Tanaka M. Short disordered protein segment regulates cross-species transmission of a yeast prion. Nat Chem Biol. 16, 756-765, (2020)

P30 9.4T の磁場下における²⁹Si-NMRのクライオMASプローブによる高 感度測定 ○戸田充^{1,2},水野敬^{1,2},中井利仁^{1,2},根本貴宏^{1,2},山腰良晃^{1,2},最上祐貴 ^{1,3},清水禎^{1,3} ¹NIMS-JEOL計測技術ラボ ²株式会社 JEOL RESONANCE

3国立研究開発法人物質材料研究機構

High sensitivity ²⁹Si-NMR measurement with the cryo-coil MAS probe at *B*-field of 9.4T

∘Mitsuru Toda^{1,2}, Takashi Mizuno^{1,2}, Toshihito Nakai^{1,2}, Takahiro Nemoto^{1,2}, Yoshiaki Yamakoshi^{1,2},

Yuki Mogami^{1,3}, Tadashi Shimizu^{1,3}

¹NIMS-JEOL Laboratory for Analytical Technology

² JEOL RESONANCE Inc.

³ National Institute for Materials Science

²⁹Si is essential in many industrial materials such as, cements, glasses, semicondutors and rubbers. NMR is one of the primary spectroscopic probes of the local environment of a nucleus, which is effective to explore the properties and qualities of such Si involved materials. However, NMR measurements often take a long time for ²⁹Si because of the low natural abundance (4.67%), and relatively long- T_1 time. Through high sensitivity ²⁹Si-NMR measurements for well-known solid samples such as silica (SiO₂) and pyrex glass, we have confirmed the advantages of using the cryo-coil MAS-NMR probe for the evaluation of small signals and the analysis of spectral distortions.

クライオコイルMASプローブ は、コイル、プリアンプなど検 出系を極低温まで冷却し、熱雑 音を下げるなどの効果で、試料 の温度を変えることなく、固体 高分解能NMRの感度を従来機 より4倍以上向上できる装置であ る^{1,2}。Fig.1にφ4試料管に詰めた シリカ試料において、128回積 算、50秒繰り返し、MAS回転 9 kHzで、2時間弱の測定で得た ²⁹Si-MAS NMRの室温測定と極低 温測定の結果を両方示す。室温





測定において明確ではなかったQ2ピークが、低温測定のデータでは明らかにQ3、Q4ピークから 分離されている。

クライオコイルMAS、²⁹Si-NMR、高感度プローブ

○とだみつる、みずのたかし、なかいとしひと、ねもとたかひろ、やまこしよしあき、もがみゆ うき、しみずただし Fig.2に積算回数1024回のデー タ(16時間測定)のシリカ試料 の測定結果を示す。解析プログ ラムとしてDmfit³を用い、ガウ ス曲線を仮定してT₂、積分強度、 ピーク位置を求めた結果を図中 に示す。シリカにおいてQ2ピー クを評価するにはCP-MAS測定 が一般的だが⁴、クライオコイル MASならφ4試料管でもQ2サイ トを定量評価出来る。

Fig.3には、同じく積算回数 1024回(16時間測定)のパイレ ックス試料の測定結果を示す。 スペクトル歪の由来を複数ピー クの寄与に分解して示した⁵。

以上の解析は、クライオコイ ルMASプローブによる高感度測 定のメリットを示しているが、 実際の測定に当たっては、ノイ ズ対策やリンギング対策などの 困難があった。とくにノイズ対 策については、9.4Tの磁場下で共 振周波数が79.4MHzと、FMラジ オの搬送周波数と一致すること から、十分に考慮した。²⁹Si-NMR はクライオコイルMAS開発当初 より応用先として有望視され、 幾つかの試料で実証試験を行っ たので、結果を報告する。



Fig. 2. Deconvolution of silica ²⁹Si-MAS NMR resonance at 9.4 T by Dmfit into Q2, Q3 and Q4 Gaussian lines. Peak positions, T_2 and integral intensities are listed in the figure.



Fig. 3. Deconvolution of pyrex ²⁹Si-MAS NMR resonance at 9.4 T by Dmfit into Si(0Al), Si(1Al), Si(XAl) (X= 2 or 3) Gaussian lines. 0, 1 and X distinguish the local chemical environmental of the Si ions by numbers of SiOAl bridges. Considering the content ratio of boron in pyrex sample, Al atoms could be altered to boron; however, we have adopted notation of aluminosilicates for convenience.

[References]

- 1. T. Mizuno, *et al.*, "Development of a magic-angle spinning nuclear magnetic resonance probe with a cryogenic detection system for sensitivity enhancement" *Rev. Sci. Instrum.* 79, 044706 (2008)
- 2. T. Mizuno and K. Takegoshi, "Development of a cryogenic duplexer for solid-state nuclear magnetic resonance", *Rev. Sci. Instrum.* 80, 124702 (2009)
- 3. D. Massiot, *et al.*, "Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra", Magn. Reson. Chem., 40 (2002), 70-76
- 4. G. Engelhardt, H. Koller, "²⁹Si-NMR of Inorganic Solids", Solid-State NMR II: Inorganic Matter. Springer-Verlag, Berlin, (1994)
- G. Tricot, "The Structure of Pyrex[®] Glass Investigated by Correlation NMR Spectroscopy", *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 26764–26770

P31

NMRを用いたアダプター蛋白質Drkの動態解析 ○渡邉 吏輝¹, プバティ マキシン サイーシュ¹, 末元 雄介¹, 木川 隆則², 三島 正規¹, 猪股 晃介¹, 池谷 鉄兵¹, 伊藤 隆¹ ¹東京都立大学・大学院理学研究科・化学専攻 ²理化学研究所・生命機能科学研究センター

NMR studies of a *Drosophila* multi-domain adaptor protein Drk ORiki Watanabe¹, Pooppadi Maxin Sayeesh¹, Yusuke Suemoto¹, Takanori Kigawa², Masaki Mishima¹, Kousuke Inomata¹, Teppei Ikeya¹, Yutaka Ito¹

¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University ²RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

Drosophila Drk (Downstream receptor kinase), which consists of 211 amino acid residues, is a multi-domain protein consisting of SH3 domains existing at the N- and C-termini and SH2 domain sandwiched between these domains. Drk plays a role in connecting proliferation and differentiation signals from receptors on the cell membrane to Sos, which is an activator of Ras. Solution NMR studies on the N-terminal SH3 fragment (NSH3) have demonstrated that NSH3 exists in a 1:1 equilibrium between fold and unfold, but the structure of full-length Drk has not yet been revealed. By employing amino acid selective ¹³C/¹⁵N-labelling, we recently found that the equilibrium of NSH3 in the full-length Drk is presumably biased toward unfold. In order to confirm that finding, we initiated the backbone resonance assignment of the full-length Drk in all regions by using 3D triple-resonance NMR spectroscopy. In addition, we prepared the C-terminal SH3 fragment (CSH3) and investigate the difference in folding stability from NSH3.

【序論】

ショウジョウバエDrk(211残基)はSH3-SH2-SH3の3つのドメインを持つアダプター蛋白質であり, Rasが関与するシグナル伝達経路において, レセプターからの増殖・分化シグナルを下流に伝える役割を果たしている.

これまでの溶液NMRを用いた解析から, Drk のN末端SH3ドメイン(NSH3)は, 希薄溶液中 でfoldとunfoldの1:1の平衡にあることが判明し ている^{1,2}.私たちはこれまで,NSH3単独の試 料に対してリゾチームや合成高分子であるポリビ ニルピロリドン(PVP)をクラウダーとして添加する ことで,平衡状態がunfold状態に偏ることを明 らかにした.大腸菌やHeLa細胞を用いたincell NMR解析でも,NSH3はクラウダー環境と



Figure 1. Schematic drawings of the hypothesis on the folding stability of Drk NSH3 domain on its own (a) and in the full length protein (b).

マルチドメイン蛋白質, 異種核多次元NMR, フォールディング安定性

○わたなべ りき, ぷばてい まきしん さいーしゅ, すえもと ゆうすけ, きがわ たかのり, みしま まさき, いのまた こうすけ, いけや てっぺい, いとう ゆたか 同様にunfold状態に偏っているといることを示唆する結果が得られている.全長Drk中でのNSH3の挙動については不明であったが,無細胞蛋白質合成系を用いて調製したAla-¹³C/¹⁵N,Lys⁻¹⁵N,およびGly⁻¹³C/¹⁵N,Leu⁻¹⁵Nの2種の選択的安定同位体標識全長Drkを 用いて解析を行った結果,Lys6,Leu47由来の主鎖¹H⁻¹⁵N相関シグナルについてはunfold状 態のシグナルのみが観測された.この結果は,全長Drkでは,NSH3は希薄溶液状態でも unfold状態に大きく平衡がシフトしていることを示唆している(Figure 1).

本研究では、Lys6、Leu47について得られた上記の知見をNSH3ドメイン全体について確認 するために、全長 Drkの主鎖 NMRシグナルの帰属を試みた.また、NSH3を取り除いた DrkSH2CSH3、およびDrkCSH3についても試料を調製しNMR測定を行うことで、全長 Drkに 対するNSH3の寄与と、NSH3とCSH3のフォールディング安定性の差について解析を行った.

【結果と考察】

全 長 Drk , DrkSH2CSH3 , DrkCSH3は大腸菌内の大量発現系 を用いて安定同位体標識試料を調製 した.全長 Drkについては均一 ²H/¹³C/¹⁵N標識を行い,6種の TROSY型3次元三重共鳴NMRスペ クトル[HNCA, HN(CO)CA, HN(COCA)CB, HN(CO)CA, HN(CO, HN(CA)CO]を測定し解析を 行うことで,主鎖¹H/¹³C/¹⁵Nシグナル の帰属を進めている.Figure 2には3D TROSY-HNCA および TROSY-HN(CO)CAスペクトルを用いた解析例 を示した.

DrkSH2CSH3, DrkCSH3につい ては¹⁵N標識試料を調製し, 2D¹H-



Figure 2. Selected ${}^{1}H^{N}{}_{-}{}^{13}C$ strips extracted from the 3D TROSY-CT-HN(CO)CA and TROSY-CT-HNCA spectra of full length Drk measured at 288K. Each strip corresponds to the ${}^{15}N$ frequency of the residue indicated. Cross-peaks due to intra-residual correlations are indicated by boxes.

¹⁵N HSQCスペクトルを測定して,全長Drkと比較を行った.DrkNSH3はunfold型とfold型が 混在する¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを示すのに対し,DrkCSH3はfold型のみが観測されたことか ら,CSH3は単独でも安定な立体構造を保持していることが判明した.DrkCSH3単独での¹H-¹⁵N相関シグナルとDrkSH2CSH3中のCSH3由来の¹H-¹⁵N相関シグナルはよく一致していた. このことは,SH2ドメインとCSH3ドメインが比較的独立して存在していることを示唆する.一方で 全長DrkとDrkSH2CSH3のスペクトルの比較では,異なる位置に出現するシグナルが多く観測 されたことから,NSH3ドメインは他のドメインに対して相互作用をしている可能性が示唆される.

今後は、全長Drk中でのドメイン間相対配置の決定を行うことで、ドメイン間相互作用をより詳細に解析していく.またクラウディング環境が、Drkの立体構造や各ドメインのフォールディング安定性に与える影響についても明らかにしていきたい.

【参考文献】

[1] Zhang, O. & Forman-Kay, J.D. Biochemistry 34, 6784-6794 (1995); [2] Zhang, O. & Forman-Kay, J.D. Biochemistry 36, 3959-3970 (1997)

P32Y ダイヤモンドNV中心を使ったピコリットルNMRと 単一細胞測定への展開 ○森田航希¹,大木出¹,藤原正規¹,中野裕太²,吉本智貴²,徳田規夫^{1,2,3},水落憲和¹ 1京都大学化学研究所、2金沢大学大学院自然科学研究科 3金沢大学ナノマテリアル研究所

Development of picoliter sample volume NMR system by using NV Center in diamond.

oKoki Morita¹, Izuru Ohki¹ Masanori Fujiwara¹ Yuta Nakano², Tomoki Yoshimoto², Norio Tokuda^{2,3}, Norikazu Mizuochi¹

1 Institute for Chemical Research, Kyoto University. 2 Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University. 3 Nano Materials Research Institute, Kanazawa University.

One of the major challenges of life science is to investigate and understand the molecular structure, interaction, and dynamics of living molecules in living cells as they are. NMR is one of the few techniques that makes it possible, but it requires a huge number of molecules and cells to observe, making it difficult to examine individual molecules. However, with the progress of nanoscale photo-detection NMR method using diamond NV center in recent years, the limitation is being removed. Using this technique, we are aiming for NMR detection of several molecules of protein, and have already succeeded in measuring proton NMR of 1000 or less organic molecules *in vitro*. In this poster, we would like to introduce new NMR measuring system highly suitable to living matter, and achieved spectral resolution of 1 ppm.

生きた細胞や生体内の分子の構造や相互作用・動的変化をありのままの状態で個々に調べ、理解することは生命科学の大きな挑戦の1つである。NMRはそれを可能とする数少ない手法であるが、観測には膨大な数の分子や細胞(核スピン数で10¹⁵個以上)が必要であった。しかし、ここ数年のダイヤモンド窒素-空孔中心(NV中心)を用いたナノスケールNMRの進展によって、個々の生体高分子を調べていく事が可能となりつつある。我々はこれまで単一NV中心を用いて極少量(核スピン数で10⁴個)のNMR測定を行ってきた。今回、センサとして用いるNV中心層を増やして検出体積を上げ、更に新たな量子測定プロトコルを用いる事で生体系計測に適したNV-NMR 装置を作成した。この装置を用いることで、細胞一個の体積と同じ10ピコリットル(10 μm³)の検出体積で、1 ppmの化学シフト分解能でのNMR測定に成功した。

超高感度な量子センサであるNV中心により、ピコリットルオーダーという極小スケールの NMR測定が実現しつつある。ダイヤモンド中のNV中心に存在する三重項電子は室温下において 安定であり、レーザーとマイクロ波を用いてスピン操作を行い、その蛍光からスピン状態を測定 することによって、室温状態では超電導量子干渉計(SQUID)に匹敵する非常に高感度な磁場セン サとして利用できる[1]。NV中心は感度の高さに加え、原子サイズであることから非常に小体積 中の核スピンの磁場を検出することができ、理論上単一核スピンの検出が可能である[2]。 溶液NMR、ダイヤモンドNV中心、手法開発

○もりたこうき、おおきいずる、ふじわらまさのり、なかのゆうた、よしもとともき、とくだ のりお、みずおちのりかず NV中心を用いた核スピン検出は、主にダイヤモンド表面近傍の単一NV中心を共焦点顕微鏡系 で観測することで行われてきた。その結果、NV中心近傍(5 nm)³体積中の¹H核スピン検出など NMRシグナル自体の測定には成功[3]していたものの、NV中心の電子スピンのT₂緩和時間が短い ことと、単一NV中心による測定体積が小さく分子拡散により相互作用が途切れてしまうという 二つの理由からスペクトルの線幅が広く、高分解能での測定を行うことが困難だった。しかし、 2017年に新たに報告されたQdyne法あるいはCASR法と呼ばれるあらたな測定法[4,5,6]により、電 子スピンのT₂に依存せず長時間にわたって測定を行うことが可能になり、更に集団NV中心を用 いた測定体積の拡大により分子拡散の影響を軽減することに成功した。これにより有機低分子を 使った高分解能¹H NMRスペクトルが得られている[6]。

本研究では、Qdyne法と集団NV中心を用いた高分解能NMR測定を、多核・多次元NMR測定を 行えるよう改良し、少数生体分子や生体系での構造解析等を目指している。そのために、集団NV 中心の測定が可能な全反射光学系(TIRF)の立ち上げを今回新たに行った(Fig.1)。これは、共焦点 系と比較して測定体積の拡大と、更に基板上の生体分子試料へのレーザーによる損傷低減が可能 であることが大きな特長である。TIRF系における測定体積は、励起するNV層の体積、すなわち 照射するレーザー光の径とNV層の厚さにより決定される。今回、13 µmのNV層の基板とレーザ ースポット径20 µm程度を用いて、約10ピコリットル(≒(20 µm)³)へと測定体積を拡大した。これ はヒトの細胞一つとほぼ同じ大きさであり、将来的に単一細胞内でのタンパク質の立体配位や動 態解析などを目指してのことである。なお、測定には、感度向上のためNV中心の軸が(111)方向 に揃うよう合成したダイヤモンド基板を使用した[7]。このTIRF系とQdyne法を用いて、核スピン を模した交流磁場を、1 ppmの化学シフト分解能で検出に成功した(Fig.2)。今後は、単一細胞内で のタンパク質の構造解析を目標として、更に系の立ち上げを進める。講演では測定法の詳細につ いて議論したい。



Fig.1 Illustration of TIRF setup for nuclear spin detection. Aiming for small sample volume (10 picoliter) and high spectral resolution, we constructed new optical system.



Fig.2 Spectrum of AC magnetic field measurement. Using TIRF system and Qdyne method, high spectral resolution (about 1 ppm) is achieved.

References

[1] Herbschleb et al., Nature communications (2019). [2] Cujia et al., Nature (2019). [3] Staudacher et al., Science (2013). [4] Schmitt et al., Science (2017). [5] Boss et al., Science (2017). [6] Glenn et al., Nature (2018). [7] Fukui et al., Applied Physics Express (2014).

[謝辞]本研究は光・量子飛躍フラッグシッププログラム(Q-LEAP)、京大化学研究所の国際共同利用・共同研究(grant # 2020-109)、科学研究費(JSPS)18K06083・20H00453の支援を受けています。

P33

同軸チューブを用いたqNMR測定法の最適化
 ○小倉立己^{1,2},若山正隆¹,曽我朋義¹,冨田勝¹
 1慶應義塾大学先端生命科学研究所
 2(公財)庄内地域産業振興センター

Optimization of qNMR acquisition method using coaxial tube •Tatsuki Ogura^{1, 2}, Masataka Wakayama¹, Tomoyoshi Soga¹, Masaru Tomita¹ 1 Institute of Advanced Biosciences, Keio University 2 Shonai Regional Industry Promotion Center

Coaxial tube use combined two tubes filled different solutions, and use for qNMR external method. Because the sample is not needed to mix with the deuterium solvent, the solution is able to reuse for other analytical instruments such as mass spectrometry. However, qNMR using the coaxial tube was few reported. Here, we examined the optimization of qNMR acquired conditions using coaxial tube that had different diameters of the insert tube. The qNMR spectra were acquired using 1.7-4.1 mm diameters insert and evaluated stability of peak integral and S/N ratio in each tube and scans. The stabilities were high in 32 scans and 1.7 mm insert. For making similar qNMR condition of 1.7 mm tube, qNMR was performed in H_2O/D_2O (9:1) Glu solution in 5 mm tube. The peak area and S/N ratio of 1.7 mm tube were higher than 5 mm tube. Thus, in the case of a high H_2O solution, qNMR using a coaxial tube showed a possibility of suitable than 5 mm tube.

【序論】定量NMR (qNMR) はサンプル中の¹H数がピーク面積と比例関係にあるこ とを利用した分析法であり、質量分析計 (MS) や赤外分光法 (IR) と比較して定量性 の高い分析法として知られている¹⁾。同軸チューブを用いたqNMRは外標準法の一つで あり、標準物質とサンプルを異なる測定管に充填した後組み合わせることで、同一ス

ペクトル上での定量解析が可能となる²⁾。 またNMR測定で必須となる重水素溶媒と サンプルを混合せずに分析できることか ら、NMRで定量したサンプルを他分析装 置に直接利用可能である。しかしなが ら、同軸チューブを用いたqNMR測定に関 する報告は少なく、確立された分析法が 報告されていないことが現状である。

本研究では内管径の異なる同軸チュー ブを用いたqNMR測定を行い、積算回数お よびH₂O/D₂O比によるqNMR測定の評価お よび最適化検討を行った。



Fig. 1 Scheme of qNMR using coaxial tube

qNMR、同軸チューブ、定量性

○おぐらたつき,わかやままさたか,そがともよし,とみたまさる

【方法】測定管としてシゲミ製の同軸チューブ(内管下部外径: φ 1.7~4.1mm)を用意した。 D₂O 溶媒に標準物質として DSS-d6 を溶解し、10mM の DSS 溶液を調整した。また対象物質とし て Sodium L-glutamate を MilliQ 水に溶解し、0.1-100mM の Glu 溶液を調整した。DSS 溶液を同軸 チューブの内管、Glu 溶液を外管に充填した後、2 本を組み合わせて 1 つの測定管とした。この 測定管を Jeol 製の 600MHz NMR にセットし、¹³C デカップリング¹H-NMR 測定を行った(Fig. 1)。測定条件として、装置温度 25°C、緩和時間 60 秒とし、積算回数を 8~1024 回の間で測定を 行った。またロック信号強度は 500 以上となるように設定した。得られたデータは Delta ソフト ウェア (ver.5. 3. 1, Jeol 製)を用いて解析し、各ピークの面積値および S/N 比を取得、測定安定 性評価に用いた。

【結果と考察】積算回数による測定安定性およびS/N比の変動を評価するため、積算8~1024回 における測定安定性評価を行った。ピーク面積値は積算回数による変化はほとんどなかったが、 積算32回以上では測定間の安定性が高くなった。S/N比は積算回数による変動性の差は小さかった。 以上のことから、同軸チューブでのqNMR最適化検討には積算回数32回の条件を用いることとし た。

内管径によるqNMR測定への影響を評価するため、各内管径における100mM溶液の繰り返し測定を行い、ピーク面積およびS/N比から測定安定性の評価を行った(Fig.2)。測定管によるピーク面積値の変化はほとんどなかった。4.1mm径の内管を用いた測定では、スペクトルの分解能が他の測定管よりも劣っていた。Gluのピーク面積値はサンプル管による変動はほとんどなかったが、S/N比は内管径が細いほど高くなった。このことから、Glu溶液の容積が増加することで、S/N比が改善されるものと考えた。

1.7mm管と同等のH₂O/D₂O(9:1) 比になるように、通常の5mm管にGlu溶液を充填し、同軸チューブとの検出感度比較を行った。1.7mmおよび2.5mm径におけるピーク面積およびS/N比は5mm 管よりわずかに高く、安定性も高かった。以上のことから、H₂Oを多量に含んでいるサンプルの定量分析には、同軸チューブを用いる方が良い可能性が示された。



Fig. 2. ¹H-NMR spectra of 100 mM Glu solution of each insert diameter (Scans:32).

【参考文献】

- 1) Pauli et al., Journal of Medicinal Chemistry, 57, 9220-9231 (2014)
- 2) Bharti and Roy, Trend in Analytical Chemistry, 35, 5-26 (2012)

P34 TDNMRによるスピン拡散の評価 ○原 英之 ブルカージャパン株式会社バイオスピン事業部

Evaluation of spin diffusion by time-domain NMR

OHideyuki HARA BioSpin Division, Bruker Japan K.K.

The relaxation times of block copolymers and semi-crystalline materials are observed to contain a rigid component with short relaxation times and a long mobile component. These components interfere with each other, causing a phenomenon called spin diffusion. This phenomenon of spin diffusion can be observed by selective excitation of the rigid and mobile components. With MSE, it is possible to obtain a relaxation curve corresponding to the FID with no dead time. Using the MAPE-filter, the effect of dipole interaction can be suppressed and as a result only the mobile component can be extracted. Using the DQ (Double Quantum)-filter, the effect of the dipole interaction can be selectively extracted and only the rigid component can be extracted. By observing the signal in the MSE a certain time after these selective excitation pulses, we can observe the spin diffusion that occurs between the filter pulses. This can be used to estimate the heterogeneity and domain size of block copolymers and semi-crystalline materials. In this presentation, we will introduce a new method for determining the spin diffusion.

【序論】

TD-NMR はプロトンの緩和時間から運動性を評価する分析手法です。ブロックコポリマーや半 結晶性の材料の緩和時間は、緩和時間の短いリジッド成分と長いモバイル成分を含んだ状態で観 測されます。これらの成分は、お互い干渉し、スピン拡散という現象を起こします。リジッド成 分とモバイル成分を選択励起することでこのスピン拡散の現象を観測することが可能です。MSE ではデッドタイムをなくした FID に相当する緩和曲線を得ることが可能です。MAPE-filter を用い ると、双極子相互作用の影響を抑制することができ、結果としてモバイル成分のみを抽出できま す。DQ(Double Quantum)-filter を用いると、双極子相互作用の影響を選択的に取り出すことができ、 リジッドな成分のみを抽出できます。これらの選択励起パルスのあと、一定時間後に MSE で信号 を観測することで、フィルターパルスとの間に起こるスピン拡散を観測することができます。 固体中のスピン拡散を観測することでブロックコポリマーや半結晶性の材料の不均一性やドメイ ンサイズの推定などに用いられます。本発表でははこのスピン拡散を求めるパルス系列、手法を 紹介します。

TD-NMR, spin diffusion, polymer

○はら ひでゆき

【装置および測定法】

TDNMR 測定は minispec mq20(Bruker BioSpin)を用いました。測定は 40 度で行い、パルス系列は観測パルスとして MSE(magic-sand wich echo)を用い、フィルターパルスとして MAPE(magic-and-polarization-echo)および DQ(double-quantum) fileter パルスを用いました。試料は ポリエチレンおよびプロピレン・エチレンコポリマーを用いました。

【結果および考察】

図1にスピン拡散のモデル図を示します。モバイル成分をもつAとリジッド成分をもつBの2 つのドメインがある場合、Aを選択励起させ、一定時間たつとBのスピンが拡散を起こし、やが てABが平衡状態に戻ります。このスピン拡散の現象を図2に示すパルス系列、フィルターを用 いて観測しました。プロピレン・エチレンコポリマーをもちいて観測したところ、スピン拡散の 様子が観測されました。発表では2種類のフィルターを用いた時のスピン拡散の様子を紹介しま す。



Fig.1 Principle of spin diffusion experiments(upper),

magnetization profiles(middle) and corresponding MSE signal(bottom).



Fig.2 Comparison of NMR signal, demonstrating the effects of MSE refocusing and magnetization filters.

溶解トリプレットDNP法を用いた分子間結合の観測

〇松井 拓海¹,杉木 俊彦²,宮西 孝一郎¹,香川 晃徳^{1,3,4}, 北川 勝浩^{1,3},藤原 敏道^{2,3},根来 誠³
1 大阪大学大学院基礎工学研究科
2 大阪大学蛋白質研究所
3 大阪大学先導的学際研究機構 量子情報・量子生命研究センター
4 JST さきがけ

Study of molecular interactions with dissolution Triplet-DNP

Takumi Matsui ¹, Toshihiko Sugiki ²,Koichiro Miyanishi¹,Akinori Kagawa^{1,3,4},Masahiro Kitagawa^{1,3}, Toshimichi Fujiwara^{2,3},Makoto Negoro³ *I Graduate School of Engineering Science, Osaka University I Institute for Protein Research, Osaka University Center for Quantum Information and Quantum Biology, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University*

4 JST, PRESTO

P35

Dissolution Dynamic Nuclear Polarization (D-DNP) provides high signal enhancements in solution NMR and has opened new applications in the chemical and biochemical sciences. Recently, we have constructed DNP using photoexcited triplet electron spins (Triplet-DNP) apparatus combined with dissolution apparatus for solution NMR with high resolution. Triplet-DNP can hyperpolarize the nuclear spins in low magnetic fields and at room temperatures. In this study, we obtain the chemical shift changes of molecular interactions between a hyperpolarized ligand (salicylic acid) and a protein (human serum albumin (HSA)) without heat denaturation using the apparatus. In ¹³C NMR spectra of [carboxyl-¹³C] salicylic acid, the chemical shift changes w/ and w/o HSA are 32 Hz and w/ and w/o HSA and warfarin, which is an inhibitor, are 12 Hz in 11.7 T.

動的核偏極(DNP)法により、飛躍的に高感度化した試料を溶解することで液体NMRを測定す る技術が開発されている[1]。これにより、微量物質の解析やリアルタイム測定が可能となり、創 薬や医療診断など幅広い分野への応用が期待できる[2,3]。我々は従来のDNP法と比較すると低磁 場、室温で高偏極化が可能なトリプレットDNP法の研究を行っている。これまでに、低磁場でト リプレットDNP法によって高偏極化した試料を、高磁場、高均一な磁場下で溶解し液体NMRを 行う装置を開発した[4]。本研究では、トリプレットDNP法の創薬NMRへの応用を目指して、ト リプレットDNP法を用いてタンパク質とリガンドの結合を観測する系を構築し、実験を行った。

本研究で作製した実験装置の全体像をFig.1に示す。タンパク質は熱により変性してしまう恐 れがあり、高温である試料溶解用溶媒に混ぜることはできないため、溶媒と別々に転送する機構 を採用した。トリプレットDNPには電磁石(0.39 T)、溶解後のNMR測定には超伝導磁石(11.7 T) を用いた。トリプレットDNPで用いた実験パラメータや装置はこれまで我々のグループで用いて きたものと同じである[5]。

溶液NMR、トリプレットDNP、創薬

○まついたくみ、すぎきとしひこ、みやにしこういちろう、かがわあきのり、きたがわまさひろ、 ふじわらとしみち、ねごろまこと 測定試料として、トリプレットDNPで高偏極 化されるリガンドにサリチル酸、タンパク質に ヒト血清アルブミン(HSA)を選定した。トリプ レットDNPを行うため、ペンタセンを0.06 mol%ドープした安息香酸-d6とサリチル酸を モル比1:1で混合した共晶[5]を作製し、粉末状 にした。サリチル酸のカルボキシル基の炭素は ¹³Cに、カルボキシル基とヒドロキシル基の水 素は重水素に置換されている。まずトリプレッ トDNPによって芳香環上の¹Hスピンを高偏極 化した後に、CP(Cross Polarization)によって¹³C スピンの高偏極化を行った。高偏極化された



粉末状の試料(1.5 mg)は、固体のまま超伝導磁 Fig. 1. Schematic diagram of our dissolution Triplet-DNP 石内のプローブに転送される。転送後、60℃に熱した炭酸ナトリウム水溶液 150 µl (5 wt%) によっ てサンプルを溶解した。その後、HSA (35 mg)を含む炭酸ナトリウム水溶液 250 µlを室温の状態で 試料へ転送した。

Fig. 2に溶解トリプレットDNP実験により得た サリチル酸の¹³Cスペクトルを示す。実験はすべて 30°パルスで測定した。HSA存在下のスペクトル はサリチル酸のみのものと比較して、化学シフト が32 Hz、低磁場側へ移動しており、サリチル酸と HSAの結合による変化が観測できている。

次に、阻害剤としてワルファリンを加えたHSA 溶液を用いて同様の実験を行った。得られたスペ クトルはサリチル酸のみの場合と比較して、化学 シフトの変化は12 Hzであった。HSAのみを加えた 場合と比べると化学シフトの変化量は減少してお り、HSAとワルファリンが結合することで、サリ チル酸とHSAの結合が阻害されている様子が観測 できた。

本研究は、JST、戦略的創造研究推進機構

(CREST)、光・量子飛躍フラッグシッププログラム(Q-LEAP)の支援を受けて行われた。

no HSA

Fig. 2. ¹³C NMR spectra of hyperpolarized [carboxyl-¹³C] salicylic acid. [SA], [war], [HSA] are the concentrations of salicylic acid, warfarin and human serum albumin respectively.

References

[1] Ardenkjær-Larsen J.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 10158 (2003)

[2] Keshari, K. R. and Wilson, D. M., Chem. Soc. Rev., 43, 1627 (2014)

[3] Golman, K., Zandt, R. I. and Thaning, M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 11270 (2006).

- [4] Kagawa, A. et al., J. Magn. Reson., 309, 106623 (2019).
- [5] Kagawa, A. et al., J. Phys. Chem. A , 122, 9670 (2018).



3 東京大学

Structure of retinal chromophore in Schizorhodopsin as studied by solid-state NMR

Seiya Tajima ¹, Hideki Kandori², Keiichi Inoue³, Izuru Kawamura¹ *1 Yokohama National University, Graduate School of Engineering Science 2 Nagoya Institute of Technology 3 The University of Tokyo*

Schizorhodopsin (SzR) found from Asgardarcheota is a light-driven inward proton transporter. SzR has a unique Phe-Ser-Glu (FSE) motif around retinal, which motif is related to the function of rhodopsin. Moreover, SzR has Tyr71 on the extracellular side of the protonated Schiff base unlike typical rhodopsins, and the Y71F mutation induces a large blueshift and decreases pump activity. Here, we conducted solid-state NMR measurements of SzR embedded into POPC/POPE membrane and revealed the structure of hydrogen network around retinal in SzR. ¹⁵N NMR signal of protonated Schiff base in Y71F mutant appeared at lower resonance than WT-SzR1 and ¹⁵N NMR signals of Arg67 in Y71F disappeared. Our results indicated that Y71F mutant has a stronger interaction between Asp184 and protonated Schiff base and perturbs the hydrogen bond network involving Arg67. We showed that the Tyr71 plays an essential role in color tuning and the pump activity.

【緒言】

ロドプシンとはシッフ塩基結合 を介してタンパク質に結合したレ チナールを発色団として持つ7回膜 貫通型タンパク質である。ロドプ シンは光吸収によりレチナールが 異性化し、それをきっかけにして タンパク質の立体構造が変化する ことで、イオンポンプやシグナル 伝達など様々な機能を発現する。 近年では数多くの微生物型ロドプ シンが発見され、どのような機能



Fig. 1 Structure of the retinal binding site in BR (left) and SzR4 (right)^[2].

を発現するかはレチナール結合サイトの構造の違いが要因の一つとされる。

固体NMR、7回膜貫通型タンパク質、プロトン化シッフ塩基

○たじま せいや、かんどり ひでき、いのうえ けいいち、かわむら いずる

シゾロドプシンSchizorhodopsin(SzR)ファミリーはアスガルド属古細菌から見つかっ た微生物型ロドプシン群であり、最初に調べられたSzR1をはじめとして、SzRは細胞内 側にプロトンをポンプする^[1]。SzRはSer-Phe-Glu(SFE)モチーフを持ち、従来の外向きプ ロトンポンプロドプシンBRや内向きプロトンポンプロドプシンPoXeRなどいずれのロ ドプシンタンパク質と比べてレチナール周辺のアミノ酸配列が大きく異なっている。ま た、SzRは従来の内向きプロトンポンプより極めて輸送活性が高く、神経科学などで重 宝される光遺伝学の新たなツールとしても期待されている。

一方でどのような機構で内向きにプロトンを輸送するのかは不明である。本研究では、 細胞膜に埋め込んだSzRの固体NMR測定を実施し、SzRのレチナール結合サイトの構造 解析を行った。特にSzRのシッフ塩基の細胞側に存在するTyr71に着目した。この理由は 他の微生物型ロドプシンはこの位置にトリプトファンを持ち、SzRにユニークなアミノ 酸残基である。また、SzR1と相同性の高いSzR4の結晶構造が発表された^[2]。この変異体 Y71Fではレチナールの極大吸収波長が約20 nmほど短波長シフトし、内向きH⁺輸送活性 が大幅に減少する。本研究では野生型SzRとその変異体Y71Fの固体NMRスペクトルを比 較し、レチナール結合サイトの構造変化を調べ、Tyr71が水素結合ネットワークの維持 において重要な役割を有することを示した。

【実験手法】

大腸菌発現系によりU-¹⁵N, [ζ -¹³C]Tyr, [¹³C14, ¹³C20]Retinal-野生型SzR1およびSzR4、 U-¹⁵N, [14,20-¹³C]Retinal-SzR1-Y71F変異体を発現・精製した。この際、プロトン化シッフ塩基の¹⁵N信号とHisのイミダゾール環のピロール型窒素の信号との重なりを避けるために、Hisはリバース標識(非標識)している。次にPOPG:POPE=1:3の混合脂質膜を準備し、タンパク質と脂質をモル比1:20で再構成し、水和した膜試料を直径4.0 mmのジルコニア製MASローターにパッキングした。固体NMR測定では¹⁵Nおよび¹³C CP-MAS法とDARR法を用いた。測定にはBruker Advance III 600 MHzで4.0 mm E-free ¹H-¹³C-¹⁵N三重共鳴プローブを用いてMAS周波数10 kHz, プローブ設定温度5 ℃にて全て暗状態で測定を行った。¹³Cはアダマンタンを40.48 ppm (DSS), ¹⁵Nの基準はNH4Clを38.34 ppmとした。

【結果・考察】

① レチナールの構造

まず¹³C CP-MAS法とDARRにより、 野生型SzR1レチナールのC20は15.8 ppmに、C14は124.4 ppmにピークが現れ た。レチナールのC14,C20はレチナール の配座によってピーク位置に影響し、 SzR1の13-trans,15-anti型であることが 示唆された。対して、Y71F変異体では レチナールのC20が15.2 ppmに、C14が 124.8 ppmに野生型とほぼ同じ化学シフ ト値を示し、Y71F変異によってレチナ ールの構造は大きく変化しないことが 分かった。



Fig. 2 DARR of [ζ-¹³C]Tyr, [14,20-¹³C]Retinallabeled wild-type SzR1(Mixing time: 500 ms)

② Tyr71の水素結合様式

Fig. 2には野生型SzR1の¹³C DARRスペクトル(混合時間 500 ms)を示す。レチナールのC14とC20 との交差ピークに加えて、Tyr Cζとの交差ピークが156.4 ppmに観測された。この混合時間では長 距離の¹³C炭素間の交差ピークを示す^[3]。結晶構造によると^[2]、レチナールの14位と20位とともに7 Å以内に存在するTyr CζはTyr71しかないため、このピークをTyr71と帰属した。TyrのCζ位の化学 シフト値はTyrの水素結合様式に鋭敏に影響を受ける^[4]。チロシンの水酸基が水素結合ドナーとし て強く作用している場合には約160 ppmに、チロシンが水素結合していないまたは水素結合アクセ プターとして働く場合には約156 ppmにピークが現れる。そのため、SzR1のTyr71は水素結合アク セプターとして作用していると考えられる。

③ レチナールのプロトン化シッフ塩基の化学シフト

¹⁵N CP-MASでは、野生型SzR1のシッフ塩基(SB)のピークは163.1 ppmに現れた。シッフ塩基の化学シフト値はロドプシンの極大吸収波長と一定の相関があり、光吸収が長波長側にシフトするにつれて高磁場シフトする^[5]。また、プロトン化シッフ塩基結合を持つレチナールのモデル化合物はアニオンサイズと相関を持ち(Fig.4 点線)、右上側にプロットが位置する場合は対イオン相互作用が弱く、左下側に存在する場合は対イオン相互作用が強くなる傾向にある。SzR1の化学シフト値と極大吸収波



Fig. 3 ¹⁵N NMR signals of protonated Schiff base of wild-type SzR1(above) and Y71F mutant (below).

長をプロットしたところ、プロトン化シッフ塩基とその対イオンとして考えられるAsp184間の相 互作用が他の微生物型ロドプシンよりも弱いことが示唆された。これはSzR4でも同様の傾向であ った。

また、極大吸収波長が短波長シフ トしたY71F変異体では170.2 ppmに 現れ、野生型より7 ppmほど低磁場 側であった。そのため、Y71F変異体 では野生型と比較して対イオンで あるAsp184がシッフ塩基に近づ き、シッフ塩基と対イオンの相互作 用が強まったことが示唆された。こ れによって、レチナールと周辺アミ ノ酸残基との相互作用が変化した ことが考えられるため、周辺アミノ 酸残基のNMR信号を解析した。





④ <u>Arg67の周辺との相互作用</u>

野生型のSzR1ではArgのη位のピー クは71.4 ppmに加え、高磁場側の66.9 ppmと低磁場側の74.8 ppmに分裂した 2つのピーク(Wing Peak)も観測され た。Wing PeakはArgのグアニジル基の Nη1とNη2が周辺残基との相互作用に より等価でなくなるために現れる^[6]。 このようなwing peakはBRやKR2など のロドプシンにおいても観測されて いる。対して、Y71F変異体ではFig.5 に示すようにWing Peakは観測されな かった。そのため、Y71F変異によっ



Fig. 5 A comparison of Arg ${}^{15}N\zeta$ and ${}^{15}N\eta$ NMR signals between wild-type SzR1(above) and Y71F (below).

て、これに関わるArg67など周辺の水素結合ネットワークが変化し、Asp184がプロトン化シッフ塩 基(pSB)に近づく変化が固体NMRで観測されたと考えられる(Fig. 6)。固体NMRで観測したレチナ ールのシッフ塩基や周辺の水素結合ネットワークの変化は内向きプロトンポンプ活性に関与して いることが明らかとなった。

【結論】

本研究では光駆動型内向きプロトンポンプ SzR1の固体NMR測定により、SzR1のレチナー ルシッフ塩基近傍に存在するTyr71がシッフ 塩基やその周辺残基との水素結合ネットワー クを支える残基であることを示し、このこと がSzR1の波長制御や内向きプロトンポンプ機 能に重要な役割を果たしていることが示唆さ れた。



Fig. 6 View of the retinal-binding site of SzR1. The possible movement of Asp184 approaching pSB due to the Y71F mutation is shown by a pink arrow.

【参考文献】

[1] K. Inoue et al. (2020) Schizorhodopsins: A family of rhodopsins from Asgard archaea that function as light-driven inward H⁺ pumps. *Sci. Adv.* 6, eaaz2441.

[2] A. Higuchi et al. (2020) Crystal structure of schizorhodopsin reveals mechanism of inward proton pumping. BioRxiv, https://doi.org/10.1101/2020.07.28.224907

[3] K. Takegoshi et al. (2001) ¹³C⁻¹H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chem. Phys. Lett.* 344, 631–637

[4] J. Herzfeld et al. (1990) Solid-state carbon-13 NMR study of tyrosine protonation in dark-adapted bacteriorhodopsin. *Biochem.*, 29, 5567-5574

[5] J.G. Hu et al., (1997) The predischarge chromophore in bacteriorhodopsin: a ¹⁵N solid-state NMR study of the L photointermediate. *Biochem.*, 36, 9316-9322

[6] A.T. Petkova et al., (1999) Arginine Activity in the Proton-Motive Photocycle of

Bacteriorhodopsin:Solid-State NMR Studies of the Wild-Type and D85N Proteins. *Biochem.*, 38, 1562-1572

P37

NDSBの添加によるユビキチン分子内の水素結合への影響

○中島弘稀¹,若松馨²,伊藤隆¹,三島正規¹
1 東京都立大学院理学研究科
2 群馬大学院理工学府

Effect of adduction of NDSB on hydrogen bonds in ubiquitin

OHiroki Nakajima¹, Kaori Wakamatu². Yutaka Ito¹, Masaki Mishima¹
IGraduate School of Science, Tokyo Metropolitan University
2Graduate School of Science, Gunma University

Non-surfactant sulfobetaine (NDSB) has been shown to be effective in preventing the aggregation and stabilizing proteins in solution. To understand the mechanism how NDSB stabilizes proteins, we analyzed how NDSB addition changes the hydrogen bonds of protein. By adding NDSB-195 to ²H-¹³C-¹⁵N-labeled protein, long-range TROSY HNCO was measured. We are currently analyzing hydrogen bonds based on the observed NMR spectra.

<序論>

溶液中のタンパク質の変性・凝集を防止することは溶液NMR測定に限らず,生化学 や応用面でも大変重要な課題である。ポリオールやアミン,アミノ酸などのオスモラ イトが変性・凝集防止に有効であることが知られてり,これらの変性・凝集防止剤は 変性状態の自由エネルギーを上昇させることで変性を防止していると考えられてい る。このような変性防止剤として,非界面活性剤性スルフォベタイン(NDSB)がある。 これは疎水基が小さく疎水的な作用が乏しいため、ミセルを形成せず,正負の両イオ ンが隣接していない位置にあるが,総電荷はpHに依らずゼロである点が特徴である。 一般的な安定化剤のポリオールは溶液の粘性を上昇させ,アミンやアミノ酸はpHを変 動させてしまうのに対し,NDSB類ではその性質から溶液の液性に対する影響が小さく かつタンパク質を安定化することが出来る。

NDSBがタンパク質を安定化するメカニズムとしては、タンパク質の静電ポテンシャルの減弱によるイオン相互作用の低下や疎水相互作用の低下などが考えられる。しか

しながら,その正確な安定化メカニズムは解明されて いない。また酵母ユビキチンを用いた解析では,ルー プ部分の運動性を増大させることも示されている¹⁾。

本研究では、NDSBの中でも分子量の小さなNDSB-195(Fig.1)を用いて、ヒト由来のユビキチンの水素結合 長の変化を^{h3}J_{NC}から解析することで、NDSBがタンパク 質を安定化させるメカニズムを解明すること目的に、 NMRによる解析を行った。



Fig.1 Structure of NDSB-195

溶液NMR, 水素結合, NDSB

○なかじまひろき,わかまつかおり,いとうゆたか,みしままさき

<方法>

試料調製には大腸菌の発現系を用いた。水 素結合経由のJ カップリングの測定は長い展 開時間を有する測定のため、測定感度が大変 低い。そこで感度向上のため、重水培養を行 い、²H,¹³C,¹⁵Nラベル体を培養・精製した。帰 属は、HNCACB、CBCA(CO)NH、HN(CA)CO、 HNCOより行った。さらに、水素結合経由のJカップリング(^{h3} J_{NC})を捉えるために、Longrange TROSY HNCOの測定を行った。¹⁵Nから ¹³C'への磁化の展開期間において180度パル スを移動させるspin echo differenceタイプの測 定を行い、

$${}^{h3}J_{NC'} \approx \frac{\sqrt{\frac{I_{cross} \times \text{NS}_{ref}}{I_{ref} \times \text{NS}_{cross}}}}{2\pi T}$$

上式より水素結合経由のJ値を算出した²⁾。同 試料にAmiconによるバッファー交換で1M NDSB-195 を 添 加 し , 同 様 に Long-range TROSY HNCOの測定を行い,水素結合経由の ^{h3}J_{NC}J値を解析した。

<結果>

Fig.2のグラフはNDSB-195を添加前と添加 後で測定された水素結合経由のJ値を縦軸に はNDSB 無し, 横軸にはNDSB 有りの測定結 果から算出された^{h3}J_{NC}J値をとった。

Fig.3は^{h3}J_{NC}·値の増減を結晶構造上にマッ ピングしたものである。^{h3}J_{NC}·値が増大してい たのはαヘリックス上ではK29N-N25CO, I30N-V26CO, Q31N-K27CO, D32N-A28CO, K33N-K29CO, E34N-I30CO間の水素結合経由 の値で,これは分子の内側に位置していた。 またαヘリックス上の外側に位置している V26N-T22CO, A28N-E24CO間の水素結合経由の ^{h3}J_{NC}·値は減少していた。



Fig.2 Comparison of ^{h3}J_{NC},

 ${}^{h3}J_{NC}$, in the absence of NDSB (vertical) and those in the presence of NDSB (horizontal).



Fig.3 Mapping of changing J value Left panel: Residues whose ${}^{h3}J_{NC'}$ value is decreased were highlighted by thick gray. Right panel: Residues whose ${}^{h3}J_{NC'}$ value is increased were highlighted by thick gray.

今後の展望としては、NDSBの添加濃度を変化させ、^{h3}J_{NC}·値がどのように変化するのか、安定 性の評価とともに解析していきたい。

References

1) Wang H, J. Pept. Sci. (2016) 22, 174

2) Cordier F, et al. (2008) Nature Protocols 3, 235



piRNAの生成に関与するRNA elementの二次構造解析 ○高瀬 直美¹, 石津 大嗣^{2,3}, 平形 樹生², 塩見 美喜子², 河合 剛太¹ ¹千葉工業大学, ²東京大学, ³慶応義塾大学

Secondary structure analysis of the RNA element involved in the piRNA biogenesis

ONaomi Takase¹, Hirotsugu Ishizu^{2, 3}, Shigeki Hirakata², Mikiko C. Siomi², Gota Kawai¹ ¹Chiba Institute of Technology, ²University of Tokyo, ³Keio University

PIWI-interacting RNA (piRNA) is known to repress transposons in germ cells. In *Drosophila* the *Traffic jam* mRNA carries piRNA in its 3' UTR and a *cis* element (*tj-cis* element), which is also located in the 3' UTR, is involved in the piRNA biogenesis. It was demonstrated that the *tj-cis* RNA (100 nt) corresponding to the *tj-cis* element consists of two structural domains, 5'-half (50 nt) and 3'-half (50 nt). In the present study, the secondary structure of a 47 nt RNA (SL-123, a part of 5'-half) was analyzed by the NMR method. It was suggested that the structure of each stem loop was stablized by the interaction between stem loops.

序論

PIWI-interacting RNA (piRNA) は、生殖細胞に特異的な小分子RNAであり、トランスポゾンの発現を抑制している.本研究では、ショウジョウバエのpiRNA をコードしている*traffic jam*(*tj*)遺伝子の3'-UTRに存在する領域(Fig. 1, *tj-cis* element)に着目し¹,その構造と機能の解析を進めている.*tj-cis* elementに対応する100残基のRNAを*tj-cis* RNAと呼び、NMR法を用いた二次構造の解析により、構造決定することを目的としている.

これまでの解析から, *tj-cis* RNAは5'側の領域に3つ のステムループ構造, 3'側の領域にシュードノット構 造を持つ, 2つの構造ドメインからなることが示唆さ れた.そこで今回は, 5'側の3つのステムループ(SL-123, Fig. 2)に着目し,さまざまな断片を作製し, 二次構造および立体構造の解析を進めた.



piRNA, cis-element, secondary structure

○たかせなおみ,いしづひろつぐ,ひらかたしげき,しおみみきこ,かわいごうた

方法

全長配列から,SHAPE法によるデータや vsfold5を用いて予測した二次構造予を元 に,RNAの断片化を行った.RNAの二次構 造をさまざまな断片のNMRスペクトルと比較す ることによって推定する手法は、すでにいくつ かのRNAで成功を収めている^{2,3}.

試料は、ジーンデザイン社および北海道 システム・サイエンス社に委託して化学合 成した.安定同位体標識アミダイトユニッ トを大陽日酸社から購入し、北海道システ ム・サイエンス社に委託して残基特異的に 導入した.測定には、600 MHz NMR分光 計(Avance600, Bruker Biospin)を用いた. 結果



【3つのステムループそれぞれの二次構造解析】

イミノプロトンスペクトルを比較したところ,設計した各ステムループ単体とステムループ がつながった断片ではシグナルが異なっていることが分かった(Fig. 3).しかし,各ステム ループについて,塩基とリボースのシグナルを連鎖帰属した結果,SL-2とSL-3については予測 されているステム構造が形成さていることがわかった.SL-1については,ループ部分にもG-A ミスマッチを含む4つの塩基対が形成されていることが示唆された.

【各ステムループの立体構造解析】

各ステムループのNMRスペクトルの解析によって得られた情報を元に立体構造計算を行った.その結果, SL-1, SL-2およびSL-3の立体構造が得られた.次に,立体構造計算によって得られた構造を元に,AMBERによるMDシミュレーションを行った結果,各ステムループ構造の安定性を確認できた.

考察

各ステムループ単体ではイミノプロトンのシグナルもあまり観測されないため、 構造が安定ではないことが考えられる.しかし、SL-12においてイミノプロトンシグ ナルが観測されたことから、SL-1とSL-2のループ間の相互作用や末端部分が相互作 用し、構造が安定化している可能性が考えられた.同様なシグナルがSL-123でも観 測されている.今後は、作製した各ステムループの構造モデルをつないだモデルのMDシミ ュレーションを行ない、各ステムの安定性の解析を試みる.

参考文献

1) Ishizu, H. et al., Cell Reports 12, 429-440 (2015).

- 2) Okui, S. et al., J. Biochem, 159, 341-350 (2016).
- 3) Ohyama, T., et al., Nucleic Acids Res. (2020). (doi: 10.1093/nar/gkaa598)

P39

薬物ナノ懸濁液に含まれる薬物粒子の凝集評価 を目的とした時間領域NMR法の応用 ○岡田康太郎,大貫義則 富山大学薬学部

Application of time domain NMR technique to investigate an agglomeration of drug nanoparticles in suspension

oKotaro Okada, Yoshinori Onuki

Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama

This study investigated an agglomeration of drug nanoparticles in a suspension using nuclear magnetic resonance (NMR) relaxation. The nanosuspension was prepared by wet bead milling using indomethacin and polyvinylpyrrolidone as a drug and stabilizer, respectively. Transmission profiles using a dispersion analyzer based on multilight scattering technology confirmed that agglomeration occurred at 25 °C immediately after wet bead milling. During the storage period, the ¹H T_2 relaxation time (T_2) of water rapidly increased at the beginning of the storage. In a suspension system, because the T_2 value of water is known to reflect the surface area of the particle, the observed rapid increase in T_2 value indicated an agglomeration of nanoparticles. Therefore, it was shown that the measurement of T_2 relaxation of a nanosuspension could evaluate the agglomeration process.

【序論】

薬物ナノ懸濁液は、薬物粒子をナノメートルサイズまで微細化した医薬製剤であ り、薬物の溶解性・吸収性を著しく向上させるため、次世代の製剤として期待されて いる。懸濁液は熱力学的に不安定であり、ナノ粒子が凝集・沈降する挙動を迅速・非 破壊に評価する手法が求められている。その課題に対し、時間領域NMR法の応用を試 みた。薬物を水中に懸濁させたナノ分散液を調製し、T2緩和時間の測定を行った。 【方法】

モデル薬物として非晶質インドメタシン(IMC)を1% (w/w)、安定化剤としてポリビニルピロリドン(PVP) もしくはポロキサマー407を1%(w/w)含むナノ懸濁液を 湿式ビーズミル粉砕にて調製した。非晶質IMCは溶融急冷 法にて作成され、媒体は水とした。

調製したナノ懸濁液を25℃にて6時間保存し、懸濁液に含まれる水の¹H T_2 緩和をCPMGパルスシーケンスにて経時的に測定した(minispec mq20; Bruker)。得られた T_2 緩和の減衰について、式1へのフィッティングを行い、 T_2 緩和時間を算出した。併せて懸濁液の透過光強度について、スタビリティテスターを用いて評価した(ST-1;英弘精機)。

М





Figure 1. Chemical structures of drug and stabilizer.

(1)

$$(t) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right)$$

緩和、薬物ナノ懸濁液、凝集

○おかだこうたろう、おおぬきよしのり

【結果・考察】

最初に、調製した各ナノ懸濁液について、調製直後か ら25℃にて6時間保存し、溶媒分子の¹H T_2 緩和を経時的 に測定した。得られた T_2 緩和の減衰は、式1に良好にフィ ットし、 T_2 緩和時間を算出した。解析の結果、IMC-PVP ナノ懸濁液は、経時的な T_2 緩和時間の延長を示し、3時間 後にプラトーに達した。一方、IMC-ポロキサマー407ナ ノ懸濁液は、 T_2 緩和時間の変化を示さなかった(Fig. 2)。 また、両ナノ懸濁液は、保存の前後で一次粒子径の変化 を示さなかった。

一般に、懸濁液中に含まれる粒子表面の溶媒分子 は、その動きが束縛されており、バルクの溶媒分子と 比してその運動性は低下する。また、粒子表面および バルクの溶媒分子の交換速度は、NMRの観測時間スケ ールよりも速く、式2のように平均化されたT₂緩和時間 が観測される¹⁾。



Figure 2. The ¹H T_2 relaxation time of indomethacin–PVP and indomethacin–poloxamer 407 nanosuspensions as a function of storage period at 25 °C. The T_2 relaxation was measured without dilution of nanosuspensions. Each plot represents the mean \pm standard deviation (n = 3).

$$\frac{1}{T_2} = \frac{(1-p_b)}{T_{2f}} + \frac{p_b}{T_{2b}}$$
(2)

ここで、*T*_{2f}および*T*_{2b}は、それぞれ粒子表面およびバルクの溶媒分子の*T*₂緩和時間、*p*_b は粒子表面の溶媒分子の存在比率を示す。

最後に、IMC-PVPナノ懸濁液において、 T_2 緩和時間が延長した原因を明らかにするため、透過光強度の測定を行った。透過光強度の測定は、沈降、凝集などの懸濁液の安定性を評価できる。解析の結果、IMC-PVPナノ懸濁液において、試料の場所によらない一様な透過光の増加が観測され、ナノ粒子の凝集が示された(Fig. 3a and b)。一方、IMC-ポロキサマー407ナノ懸濁液において、透過光強度の変化は観測されず、ナノ粒子の凝集は示されなかった(Fig. 3c and d)。

一般に、粒子が凝集した場合、粒子表面における溶媒分子の存在比率は低下し、T2緩 和時間は延長する。IMC-PVPナノ懸濁液において、ナノ粒子の凝集が示されたことを考 慮すると(Figure 3aおよびb)、Figure 2において観測された経時的なT2緩和時間の延長 は、ナノ粒子の凝集に由来すると考えられる。本手法は溶媒分子のT2緩和を観測対象と するため、薬物や安定化剤の種類に依存しない、汎用的な凝集の評価方法であると考え られる。



Figure 3. (a and c) Transmission profiles of (a) indomethacin–PVP and (c) indomethacin–poloxamer 407 nanosuspensions during storage at 25 °C. The x-axis represents the vertical position of the sample bottle: positions "0" and "1" correspond to the bottom and top of the suspension, respectively. The y-axis expresses the transmission signals. (b and d) Mean transmission values as a function of storage period at 25 °C for (b) indomethacin–PVP and (d) indomethacin–poloxamer 407 nanosuspensions. The nanosuspensions were prepared by 12 h of wet bead milling and the transmission profiles were measured without dilution of nanosuspensions.

【参考文献】1) Cooper C. L. et al. Soft Matter, 9, 7211-7228 (2013).

P40

高速MAS条件における半整数四極子核の高分解能SPAM-MQMASとSPAM-STMAS測定

○佐々木 彬子¹, Jean-Paul Amoureux¹⁻³

- 1 ブルカー,2 リール大学,
- 3 理化学研究所 放射光科学研究センター NMR研究開発部門

Accelerating high-resolution SPAM-MQMAS and SPAM-STMAS under fast MAS conditions

• Akiko Sasaki¹, Jean-Paul Amoureux¹⁻³ *1 Bruker, 2 University of Lille-France, 3 RIKEN RSC NMR Science & Development Division*

In 2004 and 2005, a soft-pulse-added-mixing (SPAM) concept was introduced by Gan and Amoureux to enhance the S/N ratio of two-dimensional MQMAS and STMAS spectra. Recently, we established an efficient procedure upon implementation of SPAM-MQMAS and SPAM-STMAS experiments, demonstrating its ease in experimental setup with the aid of numerical simulations. Here, we show the applicability of SPAM concepts under fast MAS conditions, aiming to discuss precautions upon making a judicious choice of high-resolution methods of half-integer quadrupolar nuclei in materials investigations.

Background

Despite that quadrupolar nuclei account for more than 70% of NMR-active nuclei, their applications in solid-state NMR are severely limited, owing to the presence of quadrupolar interaction that causes a loss of sensitivity and resolution, even under magic-angle spinning (MAS) conditions. Two-dimensional MQMAS and STMAS experiments are well-established methods to remove quadrupolar interaction and obtain high-resolution spectra of half-integer quadrupolar nuclei. Although MQMAS has been widely employed, its low sensitivity is a limiting factor in practical applications. On the contrary, STMAS, despite that it requires accurate adjustment of spinning axis and stable spinning frequency, exhibits higher sensitivity and has shown its success as a complementary technique to MQMAS.

A variety of sensitivity enhancement techniques have been proved useful in MQMAS and/or STMAS contexts, although their optimization process may sometimes be found time-consuming due to the presence of multiple parameters. In 2004 and 2005, Gan¹ and Amoureux^{2–4} introduced a soft-pulse-added-mixing (SPAM) concept to enhance S/N ratios. Recently, we established a general procedure upon implementation of SPAM-MQMAS and SPAM-STMAS experiments, demonstrating its effectiveness and ease in experimental setup with the aid of numerical simulations.⁵ We have shown that, compared to conventional z-filter, a maximum signal enhancement of 2 is observed in conventional SPAM, and of 4 in fully-truncated SPAM, respectively. For a given experimental time, we suggested to use an echo:antiecho ratio, E:AE = 4:1 to maximize resolution and sensitivity simultaneously. Here, we present the applicability of SPAM concepts under fast MAS conditions, using ⁸⁷Rb (I = 3/2) and ⁹³Nb (I = 9/2) nuclei, and discuss precautions upon making a judicious choice of high-resolution methods of half-integer quadrupolar nuclei.

MQMAS, STMAS, quadrupolar nuclei

○ささき あきこ、じゃんぽーる あむーる

Experimental, results and discussion

All experiments were performed using a Bruker Avance NEO spectrometer with a 14.1 T widebore magnet, for ⁸⁷Rb (I = 3/2) and ⁹³Nb (I = 9/2) nuclei. Powder samples (Rb₂SO₄, Cs₄Nb₁₁O₃₀, Nb₃(NbO)₂(PO₄)₇) were packed as purchased or as synthesized. A conventional 1.3 mm probe at MAS frequencies (v_R) of 20-62.5 kHz was used. Four sets of MQMAS and STMAS experiments were performed: (i) conventional z-filter, (ii) conventional SPAM with E = AE, (iii) fully-truncated SPAM with AE = 0, and (iv) partly-truncated SPAM with E:AE = 4:1. All simulations were performed using the SIMPSON density matrix simulation program.

We first note that the isotropic spectral width increases proportionally to v_R , and is doubled in STMAS with respect to MQMAS under identical v_R , which reduces the risk of signal aliasing. Also, under higher v_R , MQMAS efficiency decreases while STMAS efficiency increases, especially for large C_Q values. Upon implementation of SPAM under various v_R , our numerical simulations indicated that, irrespective of v_R , the optimum pulse lengths are identical for z-filter and SPAM, and hence further optimization process is not required upon varying v_R . This was confirmed experimentally using ⁸⁷Rb (I = 3/2: $C_Q = 2.7-5.3$ MHz) and ⁹³Nb (I = 9/2: $C_Q = 16-30$ MHz) nuclei, and the expected SPAM signal enhancements (of 2-4) were obtained both at $v_R = 20$ and 62.5 kHz. Overall, we suggest that SPAM-STMAS under fast MAS conditions is a practically promising approach to expand the range of C_Q that can be investigated by high-resolution NMR of half-integer quadrupolar nuclei.



Fig. 1. (a) Z-filter and SPAM versions of MQMAS and STMAS experiments. (b) Examples of 87 Rb (I = 3/2) MQMAS and STMAS spectra of Rb₂SO₄ at v_R = 20 and 62.5 kHz.

References

- 1 Z. Gan and H. T. Kwak, J. Magn. Reson., 2004, 168, 346–351.
- 2 J. P. Amoureux, L. Delevoye, S. Steuernagel, Z. Gan, S. Ganapathy and L. Montagne, J. Magn. Reson., 2005, 172, 268–278.
- 3 J. P. Amoureux, A. Flambard, L. Delevoye and L. Montagne, Chem. Commun., 2005, 3472-3474.
- 4 J. P. Amoureux, L. Delevoye, G. Fink, F. Taulelle, A. Flambard and L. Montagne, J. Magn. Reson., 2005, 175, 285–299.
- 5 A. Sasaki, Y. Tsutsumi and J. P. Amoureux, Solid State Nucl. Magn. Reson., 2020, 108, 101668.

P41 In situ マイクロ波照射 NMR 分光法と MD シミュレーション によるエタノールーへキサン混合溶液のマイクロ波加熱過 程の解明 内藤 晶¹、田制侑悟¹、Mijiddorj Batsaikhan^{1,2},藤戸輝昭³、川村 出¹、上田一義¹ ¹横浜国立大学 大学院工学研究院

²国立モンゴル大学 工学・応用科学科、³プローブ工房

Microwave heating processes of ethanol-hexane mixed solution as revealed by in situ microwave irradiation NMR and MD simulation

Akira Naito¹, Yugo Tasei¹, Batsaikhan Mijiddorj^{1,2}, Teruaki Fujito³, izuru Kawamura¹, Kazuyoshi Ueda¹

1 Graduate School of Engineering, Yokohama National University

2 School of Engineering and Applied Sciences, National University of Mongolia

3 Probe Laboratory Inc.

Microwave heating is widely used to accelerate organic synthesis reaction. However, role of nonthermal microwave effect on the chemical reaction has not yet been well characterized. The microwave heating processes of an ethanol-hexane mixed solution were investigated using *in situ* microwave irradiation NMR spectroscopy and MD simulation. The temperature of the solution under microwave irradiation was estimated from the temperature dependence of the ¹H chemical shift (chemical shift calibrated (CSC)-temperature. The CSC-temperature of CH₂ and CH₃ protons reflect bulk temperature of solution by thermal microwave effect. The lower CSC-temperature of the OH proton can be attributed to a non-thermal microwave effect. Microwave induced ordered molecules interact each other to form hydrogen bonds as non-thermal microwave effect.

序論 近年、マイクロ波加熱を用いて、有機化学反応速度や収率が大幅に向上することが報告されている。しかし、マイクロ波が有機化学反応を促進する分子機構についてはまだ不明な点が多い。本研究では発表者等が開発したマイクロ波照射NMR分光器[1-3]を用いてエタノールーへキサン混合溶液についてマイクロ波照射加熱過程を分子レベルで解明する試みを行った[4]。マイクロ波照射時の溶液温度はエタノールの CH₂, CH₃, OH プロトンの

マイクロ波加熱、マイクロ波照射NMR、エタノールーヘキサン混合溶液

○ないとうあきら、たせいゆうご、みじどり ばさいはん、ふじとてるあき、かわむらいず る、うえだかずよし 化学シフト値の温度変化から求めた CSC-temperature として測定した。OHプロトンはマ イクロ波非加熱効果によって水素結合を形成するため、溶液温度より低い温度を示すこと が判明した。本発表ではマイクロ波非加熱効果が有機反応速度の促進に重要な役割を果た していることを報告する。

実験

マイクロ波照射 NMR 分光器の開発

マイクロ波照射 NMR 分光器は固体 NMR 分光器(CMX Infinity 400)にマイクロ波発信 機(最大 1.3 kW, 2.45 GHz) とマイクロ波の照射が可能な 2 重共鳴 NMR プローブを組み 合わせて開発した [1-3]。マイクロ波発信機から発信したマイクロ波は導波管を通って超電 導磁石近傍に伝送し、導波管一同軸ケーブル変換器によって、同軸ケーブルに変換した。同

軸ケーブルは超電導磁石の内部を通っ て、プローブヘッドまで伝送し、マイク ロ波共振回路に導入した。マイクロ波 共振回路は銅箔のキャパシターとコイ ルで形成され、キャパシター内に試料 を挿入する設計とした。ラジオ波共振 回路はマイクロ波共振回路の外側に設 置することが重要であった。ラジオ波 コイルがマイクロ波共振回路の内側に あるときにはラジオ波コイルはマイ クロ波によって急激に加熱され昇華 して喪失した。



Fig. 1. Schematic diagram of the in situ microwave irradiation NMR spectrometer [1,3].

試料溶液の温度測定

エタノールーヘキサン混合溶液の温度はエタノールおよびヘキサンの CH₃, CH₂, OH の ¹H NMR 信号の化学シフト値の温度変化の関係から決定した。このようにして決定した温 度は Chemical shift calibrated (CSC)-temperature と命名した。実験では各グループの ¹H 化学シフト値の温度変化をプロットして CSC-temperature と ¹H 化学シフトの比例関係を 求めた。マイクロ波照射時の温度は同じ試料について in situ NMR 測定を行い、¹H 化学シ フト値の変化からマイクロ波照射時の溶液の CSC-temperature を見積もった。

<u>MD シミュレーション</u>

メタノールーへキサン混合溶液の MD シミュレーションは振動電場の存在下および非存在下の両方の場合について計算を行った。MD シミュレーションは Gromacs-2018.7 を用いて CHARMM36 force field を使用して行った。振動電場の最大電圧は 0.5 V/nm、周波数は 2.45 GHz で x-方向に印加した。4500 個の ヘキサン分子と 4500 個のエタノール分子を一辺が 11.4 nm の立方体に充填し、一定の容積、温度、圧力の条件で、エネルギー最適化を行った。シミュレーションは 1 fs step で行い、1 ps 間隔でデータ格納を行った。

結果と考察

エタノールーヘキサン混合溶液のマイクロ波加熱過程の観測

エタノールーヘキサン(1:1)混合溶液のマイクロ波加熱に対する CSC-temperature の変 化をマイクロ波 (135 W) 照射時間に対してプロットした (Figure 2(a))。エタノールおよ びヘキサンの CH₂および CH₃ プロトンの CSC-temperature は 1 分以内に 3 5 ℃上昇し た。その後, 徐々に上昇して、1 0 分後には 5 8 ℃に上昇した。エタノールとヘキサンの CH₂ および CH₃ プロトンはほぼ同じ温度を示したことから、これらのプロトンは溶液とおなじ 温度を示していると考えられる。一方、メタノールの OH プロトンは 1 分以内に 3 5 ℃上 昇し、その後、徐々に上昇して、1 0 分後には 4 2 ℃に上昇した。この結果、OH プロトン は CH₂, CH₃ プロトンに比べて、1 6 ℃低い温度までしか上昇しないことが判明した。

Figure 2(b)に55℃で測定したエタノール—へキサン混合溶液とマイクロ波を10分照 射後の¹H NMR スペクトルを示す。ここで、CH₂, CH₃プロトンはほとんど重なっている が、マイクロ波照射時の OH プロトンは 0.2 ppm 低磁場に現れることが観測された。OH プロトンが CH₂、CH₃プロトンより低い CSC-temperature を示すのは、非加熱マイクロ波 効果によることが考えられる。



Fig. 2. (a) Plot of CSC-temperature of CH_2 , CH_3 , OH protons in ethanol and CH_2 , CH_3 protons in hexane as a function of microwave irradiation time. (b) ¹H NMR spectrum for the mixture of ethanol and hexane (1:1) solution regurated at 55 °C (black) and that under microwave (135 W) irradiation for 10 min (orange) [4].

マイクロ波加熱過程の物理化学的考察

定圧条件下で溶液がマイクロ波エネルギーを吸収すると dG = dQ(heat)+dW(work)-TdS のようにギブスのエネルギーが上昇する。このとき、dQは熱エネルギーであり、温度上昇 を生じる加熱マイクロ波効果を表している、dW は分子の電場への配向エネルギーや水素 結合エネルギー変化であり、非加熱マイクロ波効果を表している(Figure 3(b))。特に OH 基 が配向すると水素結合の形成が促進され、OH 基のプロトンの電子密度は減少し、¹H 化学 シフト値が低磁場に変化するため、 OH 基の CSC-temperature が低い温 度を示すことが説明できる。

MD シミュレーション

エタノールーへキサン(1:1)混 合溶液について MD シミュレーショ ンを行った結果、電場の振動に対し て、電気双極子モーメントが 36 ps の 位相のずれを伴って同位相で振動す ることが判明した。さらにマイクロ波 照射に伴い OH 基の水素結合数が増 加する結果が得られた [Fig.3]。この 結果はマイクロ波照射によって、OH 基の ¹H の電子密度が減少し化学シ フト値が低磁場に移動することを支 持している。



Fig. 3. (a) Energy flow pathway under conventional thermal heating. (b) Energy flow pathway under microwave heating. OH orientations by MD simulation are also shown [4].

結論

エタノールーへキサン混合溶液をマイクロ波照射した場合、CH₂,CH₃,プロトンに対する CSC-temperature は加熱マイクロ波効果により、10分で58℃上昇した。一方OHプロ トンに対する CSC-temperature は 16℃低い値を示した。OH プロトンの CSCtemperature が低いのは非加熱マイクロ波効果により水素結合形成が促進され、¹H化学シ フト値が低磁場にシフトするためであることが判明した。マイクロ波非加熱効果により極 性分子は電場に沿ってコヒーレントに配向する。この分子のコヒーレントな配向は分子間 相互作用が増加するため有機化学反応を促進する効果が存在すると考えられる。

文献

- Tasei, Y et al. Mechanism for microwave heating of 1-(4'-cyanophenyl)-4-propylcyclohexane characterized by in situ microwave irradiation NMR spectroscopy. J Magn. Reson. 2015, 254, 27-34.
- Tasei, Y et al. The microwave heating mechanism of N-(4-methoxybenzyliden)-4-butylaniline in liquid crystalline and isotropic phases as determined using in situ microwave irradiation NMR spectroscopy. Phys. Chem. Chem. Phys. 2015, 17, 9082-9089.
- Naito, A et al. Photoirradiation and microwave irradiation NMR spectroscopy. Methodology and application of life science and materials science. The NMR Society of Japan. Ed. Springer Ch. 5, pp135-170, 2018
- Tasei, Y et al. Thermal and non-thermal microwave effects of ethanol and hexane mixed solution as revealed by in situ microwave irradiation NMR spectroscopy and MD simulation. Submitted for publication 2020.



Rapid Scan Nuclear Quadrupole Resonance ○日部 雄太¹,野田 泰斗¹,竹腰 清乃理¹,武田 和行¹ 1 京都大学大学院理学研究科 化学専攻

Rapid Scan Nuclear Quadrupole Resonance

Yuta Hibe¹, Yasuto Noda¹, K. Takegoshi¹, Kazuyuki Takeda¹
¹Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

Nuclear quadrupole resonance (NQR) provides information as to the electronic structure in materials of chemical interest through the electric field gradient tensor at a nuclear spin with its spin quantum number greater than 1/2. A major challenge in NQR is finding unknown resonance frequencies, which often distribute over a wide range. Towards time-efficient survey of NQR signals, we bring in this study rapid scan and frequency-comb excitation together, so that the frequency range over the probe bandwidth is scanned in a single run of the sequence. The gaps arising during excitation as a result of comb modulation can serve as windows for data sampling. This approach offers much more efficient protocol compared to traditional frequency stepping approaches.

[序論]

核四極子共鳴(NQR)はゼロ磁場下で固体物質中のI>1/2の原子核(四極子核)において、四極子 相互作用によるエネルギー分裂に対応する共鳴周波数から電場勾配に関する情報を取得する手法 である。四極子核を持つ元素は周期表の約7割を占め、多くの重要物質に含まれている。NQRは強 くて均一かつ安定な磁場を必要とせず、四極子核周りの電子状態に関する有用な情報が得られる。

しかし、NQRにおいて未知の共鳴周波数を探索することは難しい。Interleaved subspectrum sampling (ISS)^[1]法を用いて、緩和による磁化回復の時間中に他の領域を捜査して効率的に信号を 探索することもできるが、それでも照射周波数を次々と変えながら実験を行う必要がある。

本研究で我々は、プローブの共振帯域内における共鳴条件の有無を一度の実験で判別すること を可能にする効率的なNQR信号の探査手法を提案する。以下に詳述するこの手法のポイントは、 SWIFT MRI^[2]法に用いられているhyperbolic secant (HS) pulse^[3]によるラピッドスキャン励起と、励 起帯域の拡張のための周波数コム^[4]を組み合わせること、および周波数コム生成のために時間領 域に生じるパルス間のギャップを活用してデータ取得を行うことにある。

[手法]

コム変調HSパルス

周波数掃引幅がプローブの帯域幅 ΔF の1/n(nは整数)で与えられるHSパルス $g_1(t)$ は任意の実数 μ と $\beta = (1/2\mu)(\Delta F/n)$ を用いて

$$g_1(t) = \omega_{\max}[\operatorname{sech}(\beta t)]^{1-i\mu} \tag{1}$$

で与えられ、振幅 $\omega_1(t)$ および変調周波数 $\Delta\omega(t)$ はそれぞれ $\omega_1(t) = \omega_{\text{max}}\operatorname{sech}(\beta t), \quad \Delta\omega(t) = \mu\beta \tanh(\beta t)$ (2)

Nuclear Quadrupole Resonance (NQR), Rapid Scan NQR, 周波数掃引

○ひべ ゆうた、のだ やすと、たけごし きよのり、たけだ かずゆき



Fig. 1 (a) The profile of the amplitude $\omega_1(t)$ and frequency $\Delta \omega_1(t)$ of a HS pulse $g_1(t)$. (b) Fourier transformation $G_1(\omega)$ of $g_1(t)$.

で表される^[3](Fig. 1 a)。例として $\mu = 5$ の場合に $g_1(t)$ をフーリエ変換して得られる励起関数 $G_1(\omega)$ をFig. 1bに示す。周波数の掃引を断熱条件が破れる程度に速く行うことで、ラピッドスキャンによる磁化の励起が可能となる。

HSパルス $g_1(t)$ を周期Tのコム関数 $\delta_T(t) = \sum_{k=-\infty}^{\infty} \delta(t - kT)$ で変調して得られるパルス $g_2(t) = \delta_T(t) \cdot g_1(t)$ の励起関数 $G_2(t)$ は、積のフーリエ変換がそれぞれのフーリエ変換の合成積であることを用いて

$$G_2(t) = \delta_{2\pi/T}(\omega) * G_1(\omega) \tag{3}$$

で表される。 $2\pi/T = \Delta F/n$ となるようにTを選べば、 $G_1(\omega)$ が周期的に複製されて周波数領域をくまなくカバーする励起関数となる(Fig. 2左)。実際は、 δ 関数の代わりに有限の幅 t_p をもつ励起を行うことになる。この時の変調関数は幅 t_p の矩形関数 $\Pi(t/t_p)$ を用いて $\Pi(t/t_p) * \delta_T(t)$ と表され、励起パルス $g_3(t)$ および励起関数 $G_3(t)$ は

$$g_{3}(t) = \left[\sqcap \left(t/t_{p} \right) * \delta_{T}(t) \right] \cdot g_{1}(t)$$

$$G_{3}(\omega) = \left[\operatorname{sinc}(\omega t_{p}/2) \cdot \delta_{2\pi/T}(\omega) \right] * G_{1}(\omega)$$
(4)
(5)

となる(Fig. 2右)。このようにコム変調を用いて、ラピッドスキャン励起をΔF/nおきに同時に行い、 共振回路の全帯域を励起することができる。

Coarse survey

コム変調を行うことにより生じる 送信器の出力がオフの期間を、ラピッ ドスキャンのデータサンプリングに 用いることができる。その帯域幅は $1/T = \Delta F/n$ であるため、周波数領域 で信号は折り返して見える。結果とし て、プローブの帯域幅 ΔF における共 鳴の有無を判別することができる。信 号が検出された場合にのみ、次に述べ るfine surveyによって共鳴周波数を決 定する実験を行えばよい。

Fine survey

周波数コムHSパルスによって出来 た横磁化を利用する。得られたラピッ ドスキャン信号の最も大きい部分を 横磁化が最大であると仮定し、その部 分で周波数コムHSパルスを打ち切



Fig. 2 (left) The profiles of $g_2(t)$ and $G_2(\omega)$. (right) The profiles of $g_3(t)$ and $G_3(\omega)$. The inset shows timings of data sampling.

り、直後にFID信号を取り込む。その際のサンプリング間隔を1/ΔF以下にすれば信号の折り返し はなくなる。したがって共鳴周波数を決定することができる。

プローブの帯域幅を超える周波数帯を探索したい場合にも、上記の手法を利用することが可能 である。興味のある周波数帯をプローブの帯域幅程度の大きさの部分に区切り、プローブのチュ ーニングを合わせて順番にcoarse surveyを行う。ラピッドスキャン信号が現れたら、fine surveyに 切り替えてFIDを取得してフーリエ変換を行えば共鳴周波数を決定できる。

[実験条件]

本手法を用いたNQR周波数の探索法を実証するために、塩素酸カリウム(KClO₃)の³⁵Cl、酸化銅(I)(Cu₂O)の⁶³Cuと⁶⁵Cuを対象としたNQR実験を行った。これらの核のスピン量子数はいずれも3/2 であり、77Kでそれぞれ単一の周波数28.953 MHz^[5]、26.704 MHz^[6]、24.714 MHz^[6]で共鳴すること が知られている。また測定のために、直径12 mm、長さ12 mm、5.5巻きのコイルを用いて、23.08–32.37 MHzでインピーダンス整合が取れるプローブを自作した。プローブの帯域幅は24–27 MHzに おいては約400 kHz、28.9 MHzにおいては約500 kHzであった。

Coarse surveyでは、掃引周波数が50 kHzのHS関数に周期 $T = 20 \,\mu s$ 、パルス幅 $t_p = 2 \,\mu s$ 、ギャッ $\mathcal{T}_{t_g} = 18 \,\mu s$ のコム変調を適用した励起を行い、500点のデータサンプリングを行った。また、fine surveyにおいては、サンプリング間隔を1 μs 、サンプリング点数を2048とした。積算間の待ち時間 は1秒に設定した。すべての実験は試料とプローブを液体窒素に入れて温度77 Kで行った。

[結果・考察]

KCIO₃の³⁵CI NQRについて、周波数掃引中心の共鳴周波数からのオフセットが0、50 kHzだった 時のラピッドスキャン信号をFig. 3 (a), (b)に示す。オフセット50 kHzの信号は、折り返しによりオ フセット0の信号と同様のふるまいを示した。次に同じシーケンスを途中まで実行して、ラピッド スキャン信号が最大になった時間(Fig. 3 (a), (b)破線)で励起を打ち切り、十分短いサンプリング間 隔でFIDを取得した。Fig. 3 (c), (d)に示すように、共鳴周波数を正しく反映したFID信号が得られた。



Fig. 3 Rapid scan ³⁵Cl NQR signals with frequency offsets of (a) 0 kHz and (b) 50 kHz obtained in the coarse survey mode by acquiring the signal during the gaps of the comb-modulated HS excitation. (c, d) Corresponding FID signals obtained in the fine survey mode by aborting rapid scan at t = 5.1 ms (dash line) and then immediately starting acquisition with a dwell time of 1 µs.

次に、共鳴周波数からの掃引中心のオ フセットを、0、±10、±50、±100、±150、 ±200 kHzに設定し、同様の測定を行って フーリエ変換した結果をFig. 4に重ねて 示す。Fig. 2右に示した励起関数に対応し た強度で信号が観測された。これより、 共鳴周波数が帯域幅内にあれば、スピン を励起して共鳴周波数を決定できること が示された。

Cu₂Oの⁶³Cuおよび⁶⁵Cu NQRにおいて は、24-27 MHzの帯域で信号の探索を行っ た。プローブの帯域幅が400 kHzであった ため、プローブのインピーダンスマッチ ングと周波数掃引の中心を24.2+0.4m MHz (*m*=0,1,...,7)に合わせ、それぞれにつ いてcoarse surveyを行った結果、*m*=1,6の 帯域で信号が検出された。次にそれ以外 の帯域における探索は打ち切って、*m*=1,6 の場合についてfine surveyを行った。得ら







れたFIDをフーリエ変換して得られたNQRスペクトルをFig. 5に示す。得られた2つの共鳴周波数 は26.706 MHzと24.713 MHzであり、信号の強度比は2:1であった。⁶³Cuと⁶⁵Cuの天然存在比が69.17% と30.83%であり、四極子モーメントが-22.0 fm²と-20.4 fm²である^[7]ことから、前者を⁶³Cu、後者を ⁶⁵Cuと帰属した。

[結論]

本研究において我々は、周波数コムを組み合わせたHS pulseをNQR周波数の探索に用いることで、プローブの帯域幅内に存在するNQR周波数を正確に決定し、さらに広範囲に複数の共鳴周波数が存在しても、少ない探索回数で共鳴周波数を決定できることを実証した。この手法をNQR周波数が未知の物質に対して適用することで、周波数探索の時間を大幅に短縮し、物質の局所構造や物性を知る手法としてNQRがより広く用いられるようになることが期待される。

[謝辞]

本研究は、JSPS科研費(18H01941)の助成を受けて行われた。

References

[1] H. Scharfetter, M. Bödenler and D Narnhofer, J. Magn. Reson. 286 (2018), 148–157.

- [2] D. Idiyatullin, C. Corum, J. Y. Park and M. Garwood, J. Magn. Reson. 181 (2006), 342-349.
- [3] M. S. Silver, R. I. Joseph and D. I. Hoult, Phys. Rev. A 31 (1985), 2753-2755.
- [4] A. M. Waeber et al., Nat. Phys. 12 (2016), 688-963.
- [5] T. Kushida, G. B. Benedek and N. Bloembergen, Phys. Rev. 104 (1956), 1364–1377.
- [6] H. W. Wijn and J. L. Wildt, Phys. Rev. 150 (1966), 200-201.
- [7] R. K. Harris et al., Pure Appl. Chem. 73 (2001), 1795–1818.

P43

PRE, PCSを用いたマルチドメイン蛋白質Grb2の立体構造解析 〇田端 真彩子¹,池谷 鉄兵¹,美川 務²,川端 庸平¹,安藤 考史¹, 館野 桂太¹,三島 正規¹,伊藤 隆¹ ¹東京都立大学・大学院理学研究科 ²理化学研究所・生命機能科学研究センター

Structural analysis of a multi-domain protein Grb2 using PRE and PCS restraints

OMaako Tabata¹, Teppei Ikeya¹, Tsutomu Mikawa², Youhei Kawabata¹, Takami Ando¹, Keita Tateno¹, Masaki Mishima¹ and Yutaka Ito¹

¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University ²RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

Human Grb2 is an adapter protein involved in the Ras-mediated signal transduction pathway. Grb2 consists of three functional domains, nSH3-SH2-cSH3, which are connected with flexible linkers. The relative orientation of the domains and the inter-domain interactions are expected to be responsible for its biological functions. Since the SAXS study of full-length Grb2¹ has suggested the results inconsistent with the crystal structure², structural analyses in aqueous solution have been awaited. Paramagnetic relaxation enhancements (PREs) and pseudocontact shifts (PCSs) provide unique long-range structural constraints for determining structures of multidomain proteins. In this study, we performed the 3D structure determination of full-length Grb2 using the PRE and PCS restraints obtained by introducing various paramagnetic tags into multiple positions in Grb2.

【序論】

ヒトGrb2(217残基)は原がん遺伝子産物Rasが関与するシグナル伝達経路で働くアダプター タンパク質である.3つの機能ドメイン(nSH3-SH2-cSH3)が柔軟なリンカーで繋がれており,SH2 を介して細胞膜上のレセプターと,またSH3ドメインを介してプロリン・リッチ・モチーフを持つタン パク質と結合することで情報を伝える.Grb2の生物活性発現と制御には,ドメイン間相対配置と ドメイン間の相互作用が寄与している可能性がある.

全長Grb2のX線結晶構造は既に報告されているが²,X線小角散乱結果からは,溶液状態で は結晶構造と異なったドメイン間相対配置を取る可能性が示唆されており¹,詳細な溶液状態で の立体構造解析が希求されていた.そこで,本研究では,生理的条件での構造・機能相関の解 明を目指して,溶液NMRの手法を用いたGrb2の立体構造決定を試みた.一般に,従来の NOEを用いた解析だけでは,マルチドメイン蛋白質のドメイン間相対位置を決定することが困難 である.本研究では,Grb2に様々な常磁性タグを導入し,paramagnetic relaxation enhancement (PRE)およびpseudocontact shift (PCS)を観測することで得られる長距離の構造 情報(約10~40 Å)を用いて,立体構造解析を試みた.

PRE, PCS, 蛋白質立体構造解析

Oたばた まあこ, いけや てっぺい, みかわ つとむ, かわばた ようへい, あんどう たかみ, たての けいた, みしま まさき, いとう ゆたか
【実験】

まず, Grb2試料の安定性向上のために, 既報1に従っ て, 2つのCys残基を置換したGrb2 (C32S/C198A)を調 製することにした. 大腸菌内発現系を用いて¹³C/¹⁵N標識 を行い, 主鎖および側鎖NMRシグナルの帰属のための 3D NMR測定および解析を行った.

次に、常磁性タグとの結合のために、Cys残基を新た に導入した3種の変異体、①A13C/C32S/C198A, ②C32S/S137C/C198A、③C32S/C198A/N208Cを調 製した.それぞれの¹⁵N標識と精製を行い、側鎖SH基へ の化学修飾で常磁性タグを導入したのち、PREまたは PCSの測定を行った.初めに、スピンラベルMTSLを結 合した試料を作成し、PRE測定を行った.PREより得られ た距離拘束情報と、化学シフトから得られる二面角拘束 情報を利用し、CYANAプログラムを用いて構造計算を



Figure 1. ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of fulllength Grb2(C32S/C198A) at pH 7.2 and 298K in the presence of two types of peptides derived from EGFR and Sos.

行っている.現在は距離情報の不足を補うため,常磁性金属結合タグを用いたPCSの取得に取り組んでいる.常磁性金属結合タグとしては,DOTA-M8-SPy,DO3MA-3BrPy,Maleimide-DOTA,4PhSO2-PyMTAを使用している.なお,Grb2を単量体として存在させるため,全ての測定はSH2およびSH3ドメインに結合する2種類のペプチド(EpYINSQVおよびVPPPVPPRRR)の存在下で行った. 【結果と考察】 SH2 CSH3

Grb2(C32S/C198A) については,先 行研究の帰属結果³を参考にすることで, 上記2種のペプチド共存下で約76%の主 鎖NMRシグナルの帰属に成功した. 続い て,上記3種のCys導入変異体につい て,側鎖SH基にMTSLを導入し,¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを測定することで PRE 情報を得た. Figure 2には, Grb2(C32S/S137C/C198A および C32S/C198A/N208C)について得られた PREデータを示した.このようにして得ら れたPRE由来の距離情報に従来のNOE 由来の距離情報を加えて, CYANAプロ グラムを用いて計算を行った結果,結晶



Figure 2. Residue resolved NMR signal intensity ratio derived from PRE measurements. The asterisks indicate the positions of the paramagnetic centres, and unassigned residues are shown in gray. (a) C32S/S137C/C198A, (b) C32S/C198A/N208C

構造と有意な差がある立体構造が得られた.この結果は,溶液状態では結晶中とは異なるドメイン間相対配置を取っている可能性,もしくは,上記の2種のペプチド添加によって,生物学的に 意味のある何らかの構造変化が起きた可能性,のいずれかを示唆するものと考えられる.

現在は、上記Cys導入変異体に各種ランタノイド金属結合タグを導入し、PCS情報の取得を 試みている. PCS情報は常磁性中心からの距離に加えて角度の情報も含んでいるため、Grb2 の溶液構造の正確性・精密性の更なる向上が期待される.

【参考文献】

[1] Yuzawa, S. et al., J. Mol. Biol, 2001, 306, 527-537; [2] Maignan, S. et al., Science, 1995, 268, 291-293; [3] Yuzawa, S. et al., J. Biomol. NMR, 2003, 27, 185-186.



3 神戸薬科大学, 4 名古屋工業大学, 5 東京大学

Conformation of a seven-helical transmembrane heliorhodopsin by solid-state magic angle spinning NMR

oShibuki Suzuki¹, Toshio Nagashima², Rina Kaneko¹, Takashi Okitsu³, Akimori Wada³,
Naohiro Kobayashi², Toshio Yamazaki², Keiichi Inoue⁵, Hideki Kandori⁴, Izuru Kawamura¹ *I Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University. 2 RIKEN RSC. 3 Kobe Pharmaceutical University 4 Nagoya Institute of Technology. 5 University of Tokyo*

Heliorhodopsin (HeR) is a seven-helical transmembrane protein with a retinal chromophore that constitutes a new rhodopsin family different from microbial- and animal-type rhodopsins [1]. A crystal structure of TaHeR from the archaebacterium *Thermoplasmatales archaeon* provides completely new insights on hydrophobic interior of the extracellular part of the protein, unique dimer association in a membrane and formation of extremely slow photocyclic reaction [2]. Here, we investigate the structure of retinal chromophore and water accessibility in TaHeR embedded in POPC/POPE membrane by solid-state NMR. We report the signal assignments of ¹³C and ¹⁵N backbone and sidechain chemical shifts. In addition, using the assignments, site-specific H/D exchange measurements under dark/light conditions were recorded. We have identified several unaffected H/D exchanges to several transmembrane residues.

【序論】ヘリオロドプシン(HeR)はレチナール発色団を有する膜貫通タンパク質であり、アミノ酸配列相同性、膜タンパク質トポロジー及び機能の観点からこれまで発見されてきた微生物型

及び動物型ロドプシンとは異なる第3のロドプシンファミリーに 属している[1]。古細菌*Thermoplasmatales archaeon*由来のTaHeRの 結晶構造から、タンパク質の膜貫通へリックスバンドルの細胞外 側よりの内部は疎水性、膜におけるユニークな二量体の形成 (Fig.1)、および非常に遅いフォトサイクルの形成が明らかとなっ た[2]。一方で光を利用してどのような機能を示すのかはいまだ明 らかになっていない。そのため、反応中心部位であるレチナール 分子周辺だけでなく、タンパク質の立体構造変化を明ら かにすることは機能—構造相関において重要である。



Fig. 1. Crystal structure of TaHeR

本研究では、固体NMRによってPOPC/POPE膜中に再構成したTaHeRのレチナール発色団の構造決定およびTaHeRの主鎖と側鎖の信号帰属を行った。さらに、明暗条件下でのH/D交換測定を記録した。

固体NMR、膜タンパク質、重水素-水素交換

○すずきしぶき,ながしまとしお,かねこりな,おきつたかし,わだあきもり,こばやしなおひろ,やまざきとしお,いのうえけいいち,かんどりひでき,かわむらいずる

【実験方法】TaHeRのアミノ酸配列をコードしたプラスミドDNAを大腸菌BL21株に形質転換し, ¹³C標識グルコース,¹⁵N標識塩化アンモニウムを加えたM9培地で培養した。IPTGを用いた発現誘 導後に安定同位体標識all-trans型レチナールを加えて培養することで均一¹³C,¹⁵N標識, 14, 20位-¹³Cレチナール標識TaHeRを大量発現させた。大腸菌の破砕,界面活性剤によるタンパク質の可溶 化,Ni⁺-NTAアガロースによる精製後,吸収スペクトルで定量し,POPE:POPG=3:1のリポソームに タンパク質と脂質のモル比1:20で再構成した。水和率をおよそ300%に調整し,固体NMR試料管に パッキングした。同様にHILVWYとHILVFMKのアミノ酸をそれぞれ非標識にしたリバースラベ ル標識体も準備した。固体NMR測定はBruker 600 MHz分光計と4.0 mm径試料管用の¹H-¹³C-¹⁵N三 重共鳴プローブを用い,¹³Cと¹⁵Nの化学シフト基準物質はDSS,NH4Clを用いた。マジック角回転 MAS条件で¹³Cおよび¹⁵N CP-MAS、2次元¹³C-¹³C相関PDSD測定を行い,主にレチナールの構造を 解析した。また,直径3.2 mmの試料管,Bruker 700 MHzの固体NMR分光計を用いて3次元NMRに よるアミノ酸残基の連鎖帰属を試みた。また、脂質二重膜に再構成したTaHeRを暗室で3時間重 水素バッファーで撹拌した試料と重水素バッファー中に明/暗で30分ずつの撹拌を3セット行った 試料を作成した。直径3.2 mmの試料管,Bruker 700 MHzの固体NMR分光計を用いて¹H-¹⁵Nの接触 時間を短く設定し、明暗条件下でのH/D交換測定を行った。

【結果・考察】レチナール分子においては、¹³C-¹³C相関PDSD法でTaHeRのスペクトルを測定した 結果、13-*trans*, 15-*anti*型の配座であることが確認された。また、¹⁵N CP-MAS法によりTaHeRのスペ クトルを測定したところ、レチナールのプロトン化シッフ塩基の¹⁵Nの化学シフト値は178.9 ppm であった。HeR中のレチナールの¹³Cの化学シフト値とプロトン化シッフ塩基の¹⁵Nの化学シフト値 を他の微生物型ロドプシンの化学シフト値とを比較して、レチナールの¹³C のシフト値の差と¹⁵N 化学シフト値と極大吸収波長との相関関係に示されるように、レチナール分子の構造上の大きな 違いを特定した。

均一標識されたTaHeRの3次元NMR測定データと連鎖帰属のためにMagRO-NMR viewを用いて

アミノ酸残基の信号帰属を進めた。この帰属を用い て、H/D交換測定の帰属を行った。Fig.2に二次元NCA の帰属をまとめた。膜貫通領域部位のGly171はH/D交 換がほとんど観測されなかったことから水のアクセ スはほぼないと考えられた。細胞質側膜外のFGループ に位置するGly218は明暗条件変化でピークが消失し たことから水とのアクセスを許すような光誘起タン パク質構造変化が生じたと考察した。Bへリックスの 細胞外側のGly68, ABループのβシート中のThr61も明 暗条件変化においてピーク減少が観測された。この 結果より、細胞外界面や細胞外シートにも構造変化



Fig. 2. NCA of TaHeR in POPC/POPE

が起きていることが示唆された。一方で、ABループ中のLeu62, Ser64は明暗条件変化の影響を示さ なかった。溶液にさらされているにも関わらず、細胞外シートは光反応中でもある程度構造を維 持すると考えられる。これらの結果はヘリオロドプシンの光活性状態を考慮する上で有益な情報 となる。討論会では、他の帰属情報も含めて発表する予定である。

【参考文献】

[1] A. Pushkarev et al. (2018) Nature, 558, 595-599.

[2] W. Shihoya et al. (2019) Nature, 574, 132-136.

P45^{800 MHz WB-SCM}における単核クライオコイル MAS 高感度測定

 ○水野敬^{1,2}、戸田充^{1,2}、中井利仁^{1,2}、根本貴宏^{1,2}、山腰良晃^{1,2}、 最上祐貴^{1,3}、清水禎^{1,3}
 ¹NIMS-JEOL 計測技術ラボ,
 ²(株)JEOL RESONANCE,
 ³(国研)物質・材料研究機構

High-sensitive solid-state NMR measurement by being equipped with the Cryo-coil MAS probe in the 18.8 T WB-SCM

Takashi Mizuno^{1,2}, Mitsuru Toda^{1,2}, Toshihito Nakai^{1,2}, Takahiro Nemoto^{1,2}, Yoshiaki Yamakoshi^{1,2},
 Yuuki Mogami^{1,3}, Tadashi Shimizu^{1,3}

¹ JEOL-NIMS Laboratory for Analytical Technology, ² JEOL RESONANCE Inc., ³ National Institute for Material Science

We have demonstrated sensitivity enhancement on solid-state NMR by being equipped with the 4 mm 800 MHz single-tuned Cryo-coil MAS NMR probe in the 18.8 T WB-SCM of NIMS. The enhancement factor by using the Cryo-coil MAS was attained at ca. 5 times compared with the conventional probe. We also exhibited natural-abundant ⁴³Ca MAS-NMR spectrum of calcite with 600 scans whose S/N is high enough to analyze its lineshape. In addition, the Cryo-coil MAS has a dead-time within 100 us shorter than that of previously reported, which is expected to be useful for high-sensitive solid-state NMR measurement especially for a variety of inorganic low- γ nuclei.

近年、高磁場SCMによる無機物低γ核種、特に⁴³Ca NMRの測定が盛んに行われるように なってきた^[1,2]。高磁場下での測定は、ゼーマン相互作用を強めて高い核スピン分極を得る だけでなく、2次の四極子相互作用がスケールダウンされるために線形線幅が狭小化する利 点がある。一方、我々が開発してきたクライオコイルMASプローブは、試料を室温・大気 圧下にマジック角回転させつつ、NMR信号検出コイル・プリアンプ等の受信系を低温へリ ウムガスで20 K以下に冷却し、熱雑音を低減することで、通常の固体高分解能NMRプロー ブの数倍程度の信号感度増強を図るプローブである^[3,4]。したがって、高磁場SCMとクライ オコイルMASプローブの両者を組み合せることで相乗的な感度向上効果を得られること が期待される。

今回、NIMS強磁場ステーションの800WB-SCMに、4mm 800MHz 単核クライオコイル MASプローブを導入した。これにより、従来プローブと比べてどの程度の感度向上効果が 得られるか、また、スペクトルの線形解析により四極子結合定数等を精度よく求め得るレ ベルの感度をどのくらいの積算回数で得られるかをデモンストレーションしたので、その 結果を報告する。

まず、同一等重量試料・同一実験条件下で、市販の室温プローブ (3.2 mm 800MHz CPMAS プローブ) および4mm 800MHz 単核クライオコイルMASプローブにより取得された⁴³Ca プローブ、高感度、無機物

○みずのたかし、とだみつる、なかいとしひと、ねもとたかひろ、やまこしよしあき、も がみゆうき、しみずただし MAS-NMRスペクトルのS/Nを比較したところ、クライオコイルMASプローブの室温プローブに対する感度向上率は約5倍であることが示された(Fig.1)。次に、クライオコイルMAS プローブによるカルサイト(六方晶 CaCO₃)の天然存在比⁴³Ca MAS-NMR測定結果を示す (Fig.2)。600回の積算回数で四極子結合定数を求めるに遜色ないS/Nを得ることができた。

Sample [weight]: CaSO₄ [50.6 mg]; Carrier Freq.: 53.84965 MHz (⁴³Ca); Scans: 12500; Repetition time: 10 s; Pulse width: 2.5 us; Dead time: 125 us; Spinning Speed: 10 kHz; Magnet:18.8T WB-SCM (JASTEC); Spectrometer: JNM-ECZ800 (JRI); Reference: CaCl₂ 3M aqueous = 0 ppm.



g the

Figure 1. Natural-abundant ⁴³Ca MAS-NMR spectra with 4mm 800X Cryo-coil MAS probe (JRI) (a), and by using the 3.2mm 800HX MAS probe (JRI) (b).

これまでのクライオコイルMASプローブの研究成果報告^[5,6]では、特に低周波核種になれ ばなるほど、リンギング等のアーティファクトの影響で、500 us以上のデッドタイムを要求 されることも珍しくなく、高感度測定のメリットを十分に活かせなかった。今回の報告で 提示したスペクトルは50 us ~ 150 usのデッドタイムで取得され、ベースラインの歪みを取 り除かれており、それゆえに2次の四極子相互作用の特徴的な線形を感度良く得ることがで きた。本プローブは、30 MHzから200 MHz までの広帯域にチューニングレンジを設定する ことができるため、様々な無機物NMRの高感度測定に貢献することが期待される。



Figure 2. Natural-abundant ⁴³Ca MAS-NMR spectrum obtained by using the 4mm 800X Cryo-coil MAS probe (a), and the expanded spectrum of (a) with the fitting plot by DMFIT[7] (b). Experimental condition is shown as follows: Sample [weight]: calcite CaCO₃ [64.0 mg]; Carrier Freq.: 53.84965 MHz (⁴³Ca); Scans: 600; Repetition time: 120 s; Acquisition time: 300 ms; Pulse width: 2.9 us; Dead time: 50 us; Spinning Speed: 16 kHz; window function: single exponential -15 Hz; Reference: CaCl₂ 3M aqueous = 0 ppm. The fitted parameters are shown as follows: δ_{sso} [ppm]=21.757, *Cq*[MHz]=1.37, η =0.07. line broadening[Hz]=29.0. cf. see [8]

References [1]D.L. Bryce, Dalton Trans., 39, 8593 (2010), [2]A. Sutrisno et al., PCCP, 13, 16606 (2011), [3]T. Mizuno et al., RSI 79, 044706 (2008), [4]T. Mizuno et al., RSI 80, 124702 (2009), [5]T. Nakai et al., Chem. Phys. Lett. 678, 265 (2017), [6]S. Uchida et al., Nanoscale 11, 5460 (2019), [7]D. Massiot, et al., Magn. Reson. Chem., 40, 70 (2002). [8]C. Gerveis et al., Chem. Phys. Lett. 464, 42 (2008).

P46

Structural Differences and Novel Polymorphs of Synthetic and Brainderived Aβ42 Fibrils by ¹H-detected SSNMR

<u>Ayesha Wickramasinghe</u>^{1,2,3}, Yiling Xiao³, Naohiro Kobayashi², Toshio Yamazaki,² Yoshitaka Ishii^{1,2,3}

¹School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Kanagawa, Japan

²NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center, Yokohama, Kanagawa, Japan

³Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, USA

Misfolded fibrillar aggregates of amyloid- β (A β) is a hallmark in Alzheimer's disease (AD).¹ Among different A β species present in AD brain, 42-residue A β (A β 42) fibril is considered as the most pathogenic species since it exhibits higher neurotoxicity and aggregation propensity. Thus, structural characterization of A β 42 fibril is crucial for understanding the mechanism of AD. However, due to their insoluble and non-crystalline nature, it has been difficult to characterize A β 42 fibril and other amyloid fibrils by conventional structural tools such as solution NMR and X-ray crystallography. SSNMR spectroscopy has been a powerful tool to determine the atomic level structures of A β fibrils. While a handful of polymorphs having varied structures are reported by SSNMR for less pathogenic 40-residue A β (A β 40) fibrils,²⁻⁴ essentially only one unique structure having S-shaped β -sheet arrangement is indicated by previous studies on A β 42 fibril samples prepared at a physiological pH.⁵⁻⁷ These SSNMR studies on A β 42 fibrils relied on ¹³C-detected SSNMR, which is effective, but generally requires a large amount of sample (~5-30 mg) to record NMR spectra with sufficient sensitivity.

In this work, we present the first structural characterization for A β 42 fibril by a suite of ¹H-detected 3D and 4D SSNMR experiments under ultra-fast MAS (UFMAS) at 90 kHz. Our target is a novel polymorph of A β 42 fibril prepared at pH of 7.4 from bacterial expressed protein. In contrast to previous studies on A β structures that relied on ¹³C-detected SSNMR,²⁻⁸ our approach using ¹H-detected SSNMR allows one to extract structural profile on A β 42 fibril samples for 17-100 times less sample amount. Excellent sensitivity of NMR spectra by ¹H-detected SSNMR and dramatic enhancement of ¹H resolution by UFMAS at 90 kHz permitted us to complete the site-specific chemical shift assignment for a fully protonated A β fibril, for the first time, with the aid of an automated assignment software called MagRo-NMRView (an upgraded version of Kujira, a package of integrated tools for NMR analysis)⁹ together with some manual corrections, within a few weeks (12.7 days) using only ~60 nmol (~300 µg) of fibril sample.

We recorded CANH, CA(CO)NH and CA(CON)CAH 3D experiments, and CACONH 4D experiment to assign chemical shifts of backbone ${}^{13}C_{\alpha}$, ${}^{15}N$, ${}^{1}H_N$, ${}^{1}H_{\alpha}$ and ${}^{13}CO$ nuclei of A β 42 fibril. Here, we were able to assign 98% of ${}^{13}C_{\alpha}$, 83% of ${}^{15}N$ and ${}^{13}CO$, 93% of ${}^{1}H_{\alpha}$, and 86% of ${}^{1}H_N$ resonances of the structured region. Additionally, 80% of ${}^{13}C$ and 54% of ${}^{1}H$ resonances from the side chains were assigned using a combined analysis of CCH and CX(CA)NH 3D experiments and, C-C correlation 2D experiment. Moreover, torsion angles predicted by the TALOS-N software¹⁰ from the assigned chemical shifts to identify the secondary structure elements show the A β 42 fibril analyzed here is composed of 5 β - strands in the residues G9-H14, L17-E22, S26-I32, L34-V36 and G38-I41. A comparison of the locations of the β -strands

Aβ fibrils, ¹H-detection, SSNMR

and the secondary chemical shifts suggest that the structure of the A β 42 fibril species studied here is distinct from any of the previously reported A β 42 fibril structures.⁵⁻⁸

Here, we also present the feasibility of SSNMR-based high-throughput screening for the trace amounts of patient-derived A β fibrils prepared by incubating monomeric isotope-labeled A β 42 with 1% (w/w) of brain-A β (~0.5 µg or ~100 pmol; the sample kindly provided by Prof. Stephen Meredith at Univ. Chicago) as seed by ¹H-detected SSNMR under UFMAS at 90 kHz. We will compare ¹³C and ¹⁵N chemical shifts of the AD brain-derived A β 42 fibril sample with those reported in the previous studies on AD brainderived A β 40 and A β 42 fibrils.¹¹

References

- 1. Alzheimer's Association, Alzheimer's & Dement. (2019) 15, 321-387
- A.T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2002) 99(26), 16742-16747
- 3. I. Bertini, L. Gonnelli, C. Luchinat, J. Mao, A. Nesi, J. Am. Chem. Soc. (2011) 133(40), 16013-16022
- M. Huber, O. Y. Ovchinnikova, A. K. Schutz, R. Glockshuber, B. H. Meier, A. Bockmann, *Biomol. NMR Assign*. (2015) 9(1), 7-14
- Y. Xiao, B. Ma, D. McElheny, S. Parthasarathy, F. Long, M. Hoshi, R. Nussinov, Y. Ishii, *Nat. Struct.* Mol. Biol. (2015) 22, 499-505
- M. T. Colvin, R. Silvers, Q. Z. Ni, T. V. Can, I. Sergeyev, M. Rosay, K. J. Donovan, B. Michael, J. Walls, S. Linse, R. G. Griffin, J. Am. Chem. Soc. (2016) 138, 9663-9674
- M. A. Walti, F. Ravotti, H. Arai, C. G. Glabe, J. S. Wall, A. Bockmann, P. Guntert, B. H. Meier, R. Riek, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2016) 113, E4976-E4984
- L. Gremer, D. Scholzel, C. Schenk, E. Reinartz, J. Labahn, R. B. G. Ravelli, M. Tusche, C. Lopez-Iglesias, W. Hoyer, H. Heise, D. Willbold, G. F. Schroder, *Nat. Struct. Biol.* (2017) 358, 116-119
- N. Kobayashi, J. Iwahara, S. Koshiba, T. Tomizawa, N. Tochio, P. Guntert, T. Kigawa and S. Yokoyama, J. Biomol. NMR (2007) 39(1), 31-52
- 10. Y. Shen, A. Bax, J. Biomol. NMR (2013) 56(3), 227-241
- 11.J. X. Lu, W. Qiang, W. M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, R. Tycko, Cell (2013) 154(6), 1257-1268

P47¹⁹F高速MAS NMRを用いた金属-有機構造体のCO2吸着ダイ
ナミクスの解析
〇栗原 拓也¹、犬飼 宗弘²、西山 裕介^{3,4}、堀毛 悟史^{5,6,7,8}、水野 元博^{9,10}
¹金沢大学理工研究域、²徳島大学大学院社会産業理工学研究部、³株式会社

¹金沢大学理工研究域、²徳島大学大学院社会産業理工学研究部、³株式会社 JEOL RESONANCE、⁴理化学研究所、⁵京都大学高等研究院、⁶京都大学大学 院工学研究科、⁷産総研・京大エネルギー化学材料オープンイノベーション ラボラトリー、⁸VISTEC、⁹金沢大学ナノマテリアル研究所、¹⁰金沢大学新学 術創成研究機構

CO₂-adsorption dynamics of a metal-organic framework studied by ¹⁹F ultrafast MAS NMR

°Takuya Kurihara¹, Munehiro Inukai², Yusuke Nishiyama^{3,4}, Satoshi Horike^{5,6}, Motohiro Mizuno^{7,8}

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, ²Graduate School of Technology, Industrial and Social Science, Tokushima University, ³JEOL RESONANCE Inc., ⁴RIKEN-JEOL Collaboration Center, ⁵Institute for Advanced Study, Kyoto University, ⁶Graduate School of Engineering, Kyoto University, ⁷AIST-Kyoto University Chemical Engineering Materials Open Innovation Laboratory, ⁸School of Molecular Science and Engineering, Vidyasirimedhi Institute of Science and Technology, ⁹Nanomaterials Research Institute, Kanazawa University, ¹⁰Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University.

Metal-organic frameworks (MOFs) have attracted attention as gas sorption and separation materials by utilizing their porosity. In this work, we investigated CO₂-adsorption dynamics of $[Zn(SiF_6)(pyrazine)_2]_n$ (SIFSIX-3-Zn) MOF composed of Zn^{2+} -pyrazine square grids and SiF_6^{2-} pillars by solid-state NMR. ¹⁹F 2D exchange NMR under ultra-fast MAS revealed exchange motion between F coordinating to Zn^{2+} and F having no coordination with a motional rate of ~10¹ Hz. This exchange also occurred under CO₂ atmosphere with decreasing the exchange rate, indicating correlation between the SiF₆²⁻ motion and CO₂ uptake. The dynamics of the SiF₆²⁻ pillars would play a key role in gas capture and separation of SIFSIX-3-Zn.

<u>背景</u>

金属-有機構造体 (metal-organic frameworks, MOFs) は金属イオンと配位子の自己集 合によって形成される3次元構造を持つ錯体であり、多孔性を有することからガスの貯 蔵や分離のための材料として、盛んに研究されている。ガスの吸着や選択分離のメカニ ズムを明らかにすることは、応用の観点からも、またより性能のよいガス吸着や分離能 を持つMOFの設計・開発のための基礎研究としても、非常に重要である。固体NMRはガ ス分子のMOF中でのダイナミクスやMOF骨格との相互作用、またガス吸着に関連した MOF骨格のダイナミクスを調べることが可能であり、同位体濃縮した配位子やガス分子 を用いたstatic測定による研究が主に行われている。一方でMAS法を用いた測定は、static 測定ほどその報告例は多くないものの、高分解能なスペクトルによりstatic測定とは異な る情報が取得でき有用な手法である。

¹⁹F高速MAS、金属--有機構造体、ガス吸着

○くりはら たくや、いぬかい むねひろ、にしやま ゆうすけ、ほりけ さとし、みずの もとひろ

SIFSIXと呼ばれるMOFは、2価の金属イオンとピリジン系の有機配位子から成る2次元格子状シートをSIF₆²⁻アニオンが架橋した3次元構造を有し、高いガス吸着・分離能を示すことが知られている。金属イオンをZn²⁺、ピラジンを有機配位子とするSIFSIX-3-Zn([Zn(SiF₆)(pyrazine)₂]_n, Figure 1)は、CO₂/CH₄やC₂H₂/C₂H₄の分離・貯蔵の観点から、特に注目されているSIFSIX系MOFのひとつである。^[1,2]最近の研究では、DFT計算や、CO₂吸着下での単結晶XRDおよびMAS NMRにより、F-CO₂の強い相互作用がCO₂の吸着や分離に効いている可能性が報告されている。^[3,4]より詳細な吸

着・分離の機構の理解には、CO2とピラジ ンとの相互作用やMOF骨格のダイナミク スを固体NMRで調べることが効果的と 考えられるが、¹Hおよび¹⁹Fが多く存在す る系であり強い双極子相互作用が存在す るため、固体NMRによる解析の妨げとな ることが予想される。そこで本研究では、 高速MAS法を用いることでこの問題を解 決し、MOF骨格のダイナミクスやCO2と の相互作用を明らかにすることを目指 す。



Figure 1. (a) Crystal structure and (b) local structure around Zn^{2+} of SIFSIX-3-Zn.

<u>実験条件</u>

SIFSIX-3-Znは先行研究の方法^[5]に従い合成し、70℃で一晩真空乾燥を行った後、Ar雰囲気下およびCO₂雰囲気下でMAS試料管にパッキングした。測定は14.1 TマグネットにおいてJEOL ECZ600R分光計を使用し、1 mm MASプローブを用いて¹⁹F測定を、3.2 mm MASプローブを用いて¹Hおよび¹³C測定を行った。MAS速度はそれぞれ70 kHz、12 kHzとした。3.2 mm試料管は気密性が保たれるよう自作したものを使用し、専用のガス配管を用いて¹³C濃縮CO₂を導入した。^[6]

<u>結果・考察</u>

Figure 2abにArおよびCO2雰囲気下でサ ンプルパッキングを行い測定した^IH MASおよび¹³C CP/MASスペクトルを示 す。SIFSIX-3-Zn中のピラジンは4つすべ てのHおよびCが化学的に等価であり、H は7.58 ppm、¹³Cは144.06 ppmにそれぞれ1 つのピークのみが観測された。CO2下で は¹H、¹³Cともにピークがわずかに低周波 側にシフト(7.40 ppm、143.92 ppm)し、CO₂ との相互作用や吸着による微妙なMOF の構造の変化によるものと考えられる。 またCO2雰囲気下でのCP/MASスペクト ルでは122.4 ppmにも信号が観測され、吸 着したCO2に由来するものと帰属でき る。また、このCO2のピークは、400 ppm 以上の範囲にわたって広がるスピニング サイドバンドが確認された。これらの結



Figure 2. (a) ¹H 1-pulse and (b) ¹³C CP/MAS spectra of SIFSIX-3-Zn packed under Ar (upper) and ¹³CO₂ atmosphere (lower) into a 3.2 mm MAS rotor.

果より、吸着したCO2は¹H-¹³C 双極子相互作用を介したCP 測定が可能であり、また¹³C化学シフト異方性による広幅な 線形を持つ程度には分子運動が制限された状態でMOF中に トラップされているとわかる。

Figure 3に示す¹⁹Fスペクトルには2つのメインピークと2つ のマイナーピークが観測された。強度比や¹⁹F DQ-SQ測定か ら、-152.2 ppmのピークをZnに配位した¹⁹F (以降、Fzn)、-132.2ppmのピークをZnに配位していない¹⁹F (以降、Fnc) と帰属し た。マイナーピークは不純物である可能性が高く、精製した 試薬を用いた再合成などを行い確認する予定である。CO2下 ではFncのピークが低周波側、Fznが高周波側へシフトした。 CO2と強く相互作用すると考えにくいFznの方が大きくピー クシフトしたことから、CO2の吸着によって特にc軸方向の セルの長さが変化していると予想される。¹⁹Fの緩和時間 (Table 1) はCO2下においてどちらの¹⁹Fも長くなっており、 SiF6²⁻アニオンに運動性があり、それがCO2との相互作用で 低下していることが考えられる。

SiF₆²⁻の運動性を詳細に調べるために¹⁹F 2次元交換測定 を行った結果をFigure 4に示す。 F_{Zn} と F_{nc} の間の化学交換が起 きていることを示すクロスピークが現れ、交換時間を長くす るにつれてクロスピークが大きくなる様子が見られた。この 結果は、SiF₆²⁻が10¹ Hzオーダーの速度で90度回転している



Figure 3. ¹⁹F 1-pulse spectra of SIFSIX-3-Zn packed under Ar (upper) and CO₂ atmosphere (lower) into a 1 mm rotor.

Fable 1.	19 F T_1	relaxation	time	(in	s))
----------	-----------------	------------	------	-----	----	---

_	F _{nc}	F_{Zn}	
under Ar	0.070	0.096	
under CO ₂	0.174	0.295	

ことを示唆しており、これまでSIFSIX系MOFは基礎~応用まで盛んに研究されているが、このような骨格のダイナミクスをとらえたのは初めてである。CO₂雰囲気下では交換が遅くなる様子も 観測され、更に低温での測定ではより交換が遅くなった。これより吸着によってSiF₆²⁻の運動性が 落ちること、またCO₂吸着下であっても運動があることが示された。¹³CNMRの結果より、CO₂は 細孔内に強くトラップされていることが示唆されたが、このSiF₆²⁻の運動によりトラップされた CO₂のMOF内部への拡散が可能となると考えられ、CO₂の貯蔵に関わる機能であると予想される。 現在、ピラジン分子の重水素化を行っており、これを用いてSIFSIX-3-Znを合成し、²H測定により ピラジンの運動性を調べる予定である。発表当日はその結果も合わせて議論する。



Figure 4. (a) ¹⁹F 2D exchange spectrum of SIFSIX-3-Zn packed under Ar and (b) exchange time dependence of cross peak area intensity.

<u>参考文献</u>

- [1] P. Nugent et al., Nature 495 (2013) 80.
- [2] X. Cui et al., Science 353 (2016) 141.
- [3] K. A. Forrest et al., Cryst. Growth Des. 19 (2019) 3732.
- [4] B. E. Desveaux et al., J. Phys. Chem. C 123 (2019) 17798.
- [5] K. Uemura et al., Eur. J. Inorg. Chem. (2009) 2329.
- [6] M. Inukai et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 22 (2020) 14465.

<u>謝辞</u>

本研究はJSPS科研費20K15298の助成を受け実施された。



NMR測定と量子化学計算による加硫天然ゴムの構造解析 〇柏原功典¹,大内宗城²,北浦健大³,石井佳誉^{1,2} ¹東京工業大学 生命理工学院 ²理化学研究所 放射光科学研究センター NMR研究開発部門 ³住友ゴム工業株式会社 研究開発本部 分析センター

Structure analysis of vulcanized natural rubber by NMR measurement and quantum calculation

Kousuke Kashihara¹, Muneki Oouchi², Takehiro Kitaura³, Yoshitaka Ishii^{1, 2}
 ¹School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
 ²NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center
 ³ Chemical Analysis Center, Research & Development HQ., Sumitomo Rubber Industries, LTD.

Vulcanized natural rubber is used for a wide range of rubber products including vehicle tires. Its chemical structure is considered to be a cross-linked structure of 1,4-poly-isoprene connected with chemical bonds between a carbon atom and a sulfur atom that are formed upon sulfur vulcanization. Some structures of vulcanized natural rubber have been reported from NMR measurements and quantum calculations.[1,2,3] However, due to the complexity of the system, some other vulcanized structures may remain to be uncovered. In order to identify more detailed chemical structures of vulcanized natural rubber samples as well as quantum calculations for various structural models. ¹³C chemical shifts of various structural models obtained by quantum calculations were compared with the experimental NMR chemical shifts. We also assigned the signals obtained by the NMR measurements to estimate the chemical structure.

【研究背景】

加硫天然ゴムはタイヤや輪ゴム等の製品に幅広く使われる材料であり、天然ゴムに硫 黄や様々な加硫促進剤を加えて反応させることで作られる。これにより、加硫天然ゴム は未加硫の天然ゴムと比べて強度や粘度を持つようになる。天然ゴムはほぼシス体の 1,4-イソプレン単位からなるポリマーであり、加硫天然ゴムの化学構造は硫黄原子とイ ソプレンの炭素原子が結合してできる架橋構造が考えられている。NMR測定と量子化学 計算を用いた加硫天然ゴムの構造推定に関しては多くの報告が存在する。[1,2,3]しか しながら、加硫天然ゴムの構造の複雑さのため、新規の架橋構造が存在する可能性は十 分考えられる。本研究の目的は高磁場NMR測定と量子化学計算から、加硫天然ゴムのよ り詳細な構造を定めることである。加硫天然ゴムの構造を定めることで加硫の反応機構 の理解が進み、NMR測定を通じて加硫天然ゴムの物性評価に貢献できる。

加硫天然ゴムの化学構造の推定のために、加硫天然ゴムの固体NMR、溶液NMR測定と 様々な構造のモデルに対する量子化学計算を行った。量子化学計算で得られた構造モデ ルの化学シフトと¹³C NMRのスペクトルから得られた様々なピークの化学シフトを比較 することで、¹³C NMR測定で得られた信号の帰属を行い、化学構造の推定を行った。

天然ゴム、架橋構造、加硫

○かしはらこうすけ おおうちむねき きたうらたけひろ いしいよしたか

【実験内容・計算内容】

溶液状(ゲル状)と固体状の加硫天然ゴムを作製し、それぞれを溶液NMR、固体NMRで測定した。溶液NMRの測定では¹Hと¹³Cの1次元NMRの測定、¹H-¹H, ¹H-¹³C, ¹³C-¹³C等の2次元NMR測定を行った。 行った。固体NMRの測定では¹Hと¹³Cの1次元NMRの測定、¹H-¹³Cの2次元NMR測定を行った。

加硫天然ゴムの構造モデルはラジカル反応で生成する構造を基に考え、Gaussianで化学 シフト計算を行った。NMR測定と量子化学計算の結果から考えられる加硫天然ゴムの構造、 試料の調製法の詳細についてはポスターにて発表する。

【結果】

ゲル状と固体状の加硫天然ゴムについて¹³Cの1次元NMRのスペクトルによると強度の高い 5本の信号と共に、強度の低い信号が数多く出ていることが分かった。強度の高い5本の信 号はポリイソプレンの5つの炭素原子に帰属される。0-70ppmの領域に存在する強度の低い 信号は加硫によって生じた信号だと考えられるが、ゲル状と固体状の加硫天然ゴムで信号 の出かたが違っていた。ゲル状と固体状の加硫天然ゴムの製法の違いから反応の仕方が異 なることで、構成される構造が違っていると考えられる。ゲル状の試料に対して帰属を行っ たところ、従来考えられていた架橋構造に加え、環骨格を持った構造などの新規な構造の存 在が示唆された。これらのピークの帰属の詳細についてはポスターにて発表する。

【謝辞】

試料調製や解析をしていただいた、株式会社ワールドインテック堀江美記様に感謝しま す。

【参考文献】

- [1]. S. Kawahara et al. Network Polymer., 33, 259-266(2012)
- [2]. J.L.Koenig et al. 日ゴム協誌., 71, 68-77(1998)
- [3]. J. Ukawa et al. Kobunshi Ronbunshu., 64, 301-308(2007)

P49

New cross polarization method for solid-state NMR measurement 〇中田拳太¹, 松永達也², 石井佳誉^{1,2} ¹東京工業大学 生命理工学院 ²理化学研究所 放射光科学研究センター NMR研究開発部門

New cross polarization method for solid-state NMR measurement

oKenta Nakata¹, Tatsuya Matsunaga², Yoshitaka Ishii^{1,2}

¹School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology ²NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center

Solid-state NMR (SSNMR) has been rapidly growing as one of the strongest tools for characterizing the structure of biomolecules such as amyloid-β. However, it still takes long experimental time to collect SSNMR spectra of dilute spins such as ¹³C and ¹⁵N especially when an isotope labeled sample is not available. In this study, we aim to establish a new cross polarization (CP) approach for enhancing sensitivity in CP-MAS spectra of natural abundance ¹³C spins. Our approach includes to employ an efficient frequency selective CP method and to acquire several ¹³C CPMAS signals consecutively in one scan per a recycle delay for ¹H magnetization recovery.

[背景]

近年、固体 NMR は試料の超高速 MAS(UFMAS)や交差分極法(CP)技術などによって、生体高 分子などの構造解析ツールとして急速な発展を遂げている。特に CP を使った測定では、¹H 磁化 の移動による信号強度の増加だけでなく、低磁気回転比核の非常に長い縦緩和時間 T₁に代わり、 比較的短い¹HのT₁に対応した繰り返し時間での積算測定が可能なため、測定時間の大幅な短縮 に役立っている。しかし、同位体ラベルした生体高分子試料の作成が難しい場合、天然存在比の 低い¹³C や¹⁵N などの稀少原子核の固体 NMR 観測は、既存の技術を用いても未だに非常に多く の積算が必要である。また、¹HT₁が極端に長い試料では、それに伴って測定の繰り返し時間が延 びるため、測定が更に長時間化する。このような試料に対してもこれまでに固体 NMR の測定時 間を短縮するための手法がいくつか開発されてきた。その1つである FB(Flip Back)法は、¹³C CPMAS 信号を取得した直後に、¹H 磁化を縦方向へ戻すことで、¹H の磁化緩和にかかる時間を短 縮する手法である¹。しかし、この手法を用いても、天然存在比試料の測定感度は十分とは言えず、 さらなる感度増加手法が求められている。我々のグループは近年、UFMAS で有効な新しい選択 的 CP 法(ROTA CP)を開発し、従来の CP 法より高効率での選択的 CP が起きることを確認した ²。また、ROTA CP 法は CP 過程における ¹H 磁化の余分な減衰を抑える効果が見られており、本 研究では、この特性を利用した UFMAS 下での新たな FB 手法の開発と応用に取り組んでいる。 本発表では ROTA CP 法を利用して、1回の測定繰り返し中に連続で複数回の¹³C CPMAS 信号 を取得する事で感度増加を行う手法を紹介する。

UFMAS、CPMAS、天然存在比試料 ○なかた けんた,まつなが たつや,いしい よしたか [実験]

600MHz 固体 NMR で、同位体標識を施したラベルアラニンを試料とし、ROTA CP 法で選択 的に H_aから C_aの磁化移動を起こすことができるかを確認し、従来の CP 法と比較した。従来の CP を行なった直後では、アラニンの3つの H_aと H_βと H_N ピークは、全て 20%ほど減少した。 またこの際の ¹³C ピーク強度は、C_a: C_β=1:2 であった。一方、H_aから C_aへ選択的な ROTA CP を行うことで、H_aピーク強度が、約 80%ほど減少したが、H_βや H_Nのピーク強度の減少は、 10%ほどに留めることができ、¹³C ピーク強度は、C_a: C_β=3:1 となった。

天然存在比試料のアラニンを試料とし、FB 法に選択的 ROTA CP を用いた場合に、1回の繰り 返し時間で、¹³C CP 信号を2回連続で取得する方法と3回連続で取得する方法で、それぞれの測 定の感度を測定し、FB 法を用いない ROTA CP 1回測定の測定感度と比較し、C_aピークの感度上 昇が起きるか確認した。なお、RFDR を¹H デカップリングと¹H スピン拡散のために用いた。(元 論文 nishiyama らを引用する³)ROTA CP 1回測定の C_aピーク感度と比較して、2回連続測定で 最大 20%、3回連続測定では最大 25%の感度が上昇した。

当日の発表では、¹HT₁が長い試料も含む他の試料を用いた結果も併せて紹介する。

References

1. J. Tegenfeldt et al., J. Magn. Reson., 1969, 1976(36), 453-457

2. T.Matsunaga (2019), Development of high-efficient CP with optimization of spin-lock relaxation under fast MAS, The

58th Annual meeting of Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2019)

3. Nghia Tuan Duong et al, Phys. Chem. Chem. Phys., 2018, 20, 25829-25840



二次元時間領域NMR法から見る魚類肉質の多様性
 ○魏菲菲¹、伊藤研悟¹、坂田研二¹、菊地淳^{1,2,3}
 ¹理研CSRS, ²横市院・生命医, ³名大院・生命農

Two-dimensional NMR relaxometry for characterizing fish muscle diversity

oFeifei Wei¹, Kengo Ito¹, Kenji Sakata¹, Jun Kikuchi^{1,2,3}

¹ RIKEN CSRS, Japan, ² Gurad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., Japan, ³ Grad. Sch. Bioagri.Sci., Nagoya Univ., Japan

Relaxation is a sensitive probe to investigate geometrical, physical and chemical property of spins at molecular levels. Two-dimension (2D) NMR relaxometry is a powerful technique to characterize molecular dynamics using longitudinal (T_1), transverse (T_2) relaxation times as well as self-diffusion coefficients. During the past decade, the fast 2D Inverse Laplace Transform (ILT) algorithm which removes the computational barrier for data inversion had greatly promoted the wide applications of 2D NMR relaxometry to extract valuable information from T_1 - T_2 maps. In the present study, a platform of 2D NMR relaxometry for characterizing fish muscle diversity was established using a low-field time domain NMR system. The multi-dimensional NMR data of fish muscle in Laplace domain was processed using 2D-ILT, and the physical and chemical properties were comprehensively evaluated to provide new insights into the diversity of marine fish resources.

分子運動性を調べる手法として、水素原子核の緩和時間(スピン-格子緩和(T₁)およびスピン -スピン緩和(T₂))を観測する時間領域NMR法がある。図1で示すように、縦緩和時間T₁は分子運 動性の高い低分子で長く、分子が大きくなるにつれ短くなるが、さらに分子量が増すと再び長く

なる傾向が見られる。一方、横緩 和時間T2はT1のように中程度の 分子量で極小値を持つことはな く、運動性の高い低分子では長 く、運動性の低い高分子では短い という単調減少の傾向となる。組 成の複雑な生体試料に対して、試 料中のプロトンの緩和挙動は高 分子成分の分子構造や含有量、高 分子と低分子の間の相互作用お よび低分子成分の状態や含有量



technique to characterize molecular dynamics by using monotonic property of T_2 and significant change range of T_1 .

などに大きな影響を受け、それぞれ特有のコンホメーションから協同的な特性を持つと考えられる。*T*₁と*T*₂と分子運動性との関連特性から、時間領域NMRを二次元に展開することにより、複雑系の物理・化学的評価に更なる有用な情報を提供できるではないかという発想は、1980年代に提出されたが、データ処理の障壁を取り除く高速2D逆ラプラス変換 (Inverse Laplace Transform; ILT) 肉質、二次元時間領域NMR、魚類多様性

○うえい ふえいふえい、いとう けんご、さかた けんじ、きくち じゅん

と呼ばれるアルゴリズムが提案された2002年までは幅広く応用されなかった。近年、二次元時間 領域NMR法は様々な領域に応用され、高分子材料やオイルシェールなどの性能評価で脚光を浴び

た (1-3)。一方、 我々は溶液 NMR 法を用い て多様な魚類 筋組織の低分 子·高分子代謝 等の化学的性 質に着目し、ビ ッグデータを 蓄積してきた (4-9)。そこで本 研究では、魚類 筋肉の $T_1 \ge T_2 \ge$ 二次元に展開 するパルスシ ーケンスを用 い、得られた物 理化学的性質 を用いて、魚類 における多様



Figure 2. (A) IR-CPMG sequence for T_1 - T_2 experiment; (B) raw signals of the fish muscle sample using IR-CPMG; (C) 2D T_1 - T_2 map of fish muscle obtained using 2D-ILT to invert the signal acquired with IR-CPMG sequence.

性の評価を目的とした。

本研究では多様な魚種を対象とし、筋肉組織を約8 mmのキューブ状に切り出し、10 mm NMRチューブに入れ、時間領域NMR装置 (minispec mq NF series, 20 MHz, Bruker) により計測を行った。Inversion-Recovery-Car-Purcell-Meiboom-Gill (IR-CPMG; 図2A) の パルスシーケンスを整備し、パラメーターの条件検討についてはウルメイワシの魚肉を 用いて行った。IRの後にCPMGを接続することで、*T*₁-エンコードされた*T*₂信号が観測さ れた (図2B)。得られた信号強度はUpen2DTool (10) を用いて多次元ILTでデータ処理を 行った結果、図2Cで示された*T*₁-*T*₂の2Dマップが得られた。魚肉試料中の運動性の異なる ミクロスコピックプールが検出され、水分子以外に運動性の遅い脂質成分などに由来す るプールも検出された可能性が示唆された。本会では、このような手法で多種多様な魚 肉の物理および化学的性質を抽出し、多変量解析や機械学習などの手法と併用して魚類 における多様性の評価を行った結果を報告する。

参考文献

(1) P. J. McDonald, et al., Physical Review E, 2005, 011409; (2) Q. Du, et al., Journal of Magnetic Resonance, 2020, 106643; (3) T. Monaretto, et al., Journal of Magnetic Resonance, 2020, 106666; (4) S. Yoshida, et al., Scientific Reports. 2014, 7005; (5) T. Misawa, et al., Analytical Chemistry, 2016, 6130; (6) T. Asakura, et al., Analytical Methods, 2018, 2160; (7) F. Wei, et al., Scientific Reports, 2018, 3478; (8) Y. Date, et al., Analytical Chemistry, 2018, 1805; (9) F. Wei, et al., Molecules, 2020, 1966; (10) V. Bortolotti, et al., SoftwareX, 2019, 100302.

Towards structural determination of E22G mutated $A\beta 40$ fibrils by solid-state NMR spectroscopy

○ Mohammad Jafar Tehrani¹ and Yoshitaka Ishii^{1, 2}

¹ Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology ² RIKEN RSC NMR Science & Development Division

Amyloid beta (A β) fibrils are a main component of the extracellular amyloid plaques, a major pathological hallmark for Alzheimer's disease (AD).¹ E22G or Arctic mutation within the A β sequence is linked with early onsets of AD or familial AD (FAD).² E22G mutation can be considered as a unique mutation that enhances assembly of A β into amyloid oligomers and promotes FAD, unlike other mutations on the same residue such as E22K (Italian) and E22Q (Dutch), which mainly promote amyloid angiopathies and hemorrhage. Structural detection of the fibrils resulting from the E22G mutation has been of high importance because of the unique features. Unfortunately, E22G A β is known to exhibit extreme structural heterogeneity, which has long hindered its structural determination. At least, five different fibril structures have been observed so far by electron microscopy and solid-state NMR techniques.³⁻⁴

In this study, we aim to establish a protocol to prepare a homogeneous E22G 40-residue A β (A β 40) fibril sample in a single conformer that is suited for structural elucidation by solid-state NMR spectroscopy (SSNMR). We report the effects of agitation modes and incubations with seed fibrils through template-dependent polymerization⁵ onto conformations of E22G A β 40 that were monitored by 2D ¹³C SSNMR. We also carefully monitor the structural morphology of the resulting fibrils by transmission electron microscopy (TEM).

References:

- 1) Selkoe, D. J, Nat. Cell. Biol., 2004, 6, 1054-1061.
- 2) Nilsberth, C. et al., Nat. Neurosci., 2001, 4, 887-893.
- 3) Norlin, N. et al., J. Struct. Biol., 2012 180, 174–189.
- 4) Elkins, M. R. et al., J. Am. Chem. Soc., 2016, 138, 9840-9852.
- 5) Yoo, B. K. et al., J. Am. Chem. Soc., 2018, 140, 2781–2784.

SSNMR, E22G, Amyloid beta

O Mohammad Jafar Tehrani and Yoshitaka Ishii



Adiabatic Pulseを用いた溶媒信号抑制パルスの開発および **固体NMR測定への応用** 松永 達弥¹, 〇岡部 遼太郎²、石井 佳誉^{1, 2} 1理化学研究所放射光科学研究センターNMR研究開発部門 2東京工業大学生命理工学院

Development of solvent suppression pulse with adiabatic pulse and application for biological solid-state NMR experiments

Tatsuya Matsunaga¹, oRyotaro Okabe², Yoshitaka Ishii^{1,2}

1 NMR Science and Development Division, RSC, RIKEN

2 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

¹H-detecting solid-state NMR (SSNMR) has become prevalent for ultrafast magic-angle spinning (UFMAS) with 60 kHz or faster sample spinning. In UFMAS, ¹H signal of solvent molecules can be an obstacle to 1H NMR analysis of protein. Currently, a series of saturation pulses is irradiated before magnetization transfer for ¹H detection to suppress solvent signal. However, effect of the conventional solvent suppression method is inadequate because of strong dependency on factors such as RF frequency. In this research, we developed a new method for solvent suppression of SSNMR experiment with adiabatic pulse. The new solvent suppression shows robustness against chemical shift difference. It enables us to achieve suppressing ¹H signal of multiple solvents at one time. We demonstrated the new solvent suppression though calculation and ¹H MAS NMR measurement. Furthermore, we worked on application of the new method to acquire high-resolution signal from biological sample.

[Background of the Research]

試料回転速度が60 kHzを超えるultrafast Magic Angle Spinning (UFMAS)は低磁気回転比核(¹³C, ¹⁵N) スペクトルだけでなく、¹Hスペクトルの高分解能化が可能である。UFMAS下の高分解能¹H NMRは生体分子の解析など幅広く応用されている。しかし、高分解能¹H NMRには、必要な信号 に加えて不要な信号も検出されてしまうという問題がある。タンパク質をはじめとした固体生体 分子サンプルの精製や保管の際使用される水や有機溶媒がその一例である。この溶媒分子に由来 する¹H信号はタンパク質の¹H NMR測定を行う際に障害となってしまう。したがって、固体NMR において溶媒の¹H信号を抑制する手法が重要である。

タンパク質の¹H固体NMR測定で溶媒信号を抑制する際には、溶液NMRで使用されるsuppression pulseを照射する手法が採用されている。従来の手法では一定強度のパルス磁場をかけ続ける continuous wave (CW)照射や、2種類のCWを組み合わせたMISSISSIPPI^[1]がsuppression pulseとして 用いられてきた。溶液NMRではこれらの既存のパルス系列にグラジエントコイルによる傾斜磁場 を組み合わせる事で信号減衰を速めている。しかし、固体NMR装置ではグラジエントコイルが使 えないため、溶媒NMRに比べて信号減衰の効率が悪い。一般的に固体試料の磁化緩和速度が溶液 試料のものと比べて速いことも、溶媒信号の抑制を妨げる要因となりえる。また、強力なパルス を長い時間照射することでRFコイルに対する負担が大きくなるため、できる限り solvent suppression pulseの照射時間と強度を抑えることが望ましい。

solid-state NMR, protein analysis, solvent suppression

まつなが たつや、〇おかべ りょうたろう、いしい よしたか

昨年度の本討論会で、固体NMRのための溶 媒信号抑制手法としてSuppression of Liquid with Adiabatic Pulse (SLAP)の開発を報告した。 本発表では既存手法との比較を通して固体 NMR測定における溶媒信号抑制の新手法の 有効性を検証する。従来手法の問題点の多く はパルスの組み合わせから生じるRF 不均一 性による磁化のリフォーカスと、最適な照射 オフセット周波数が異なる溶媒の¹Hごとに受 ける有効磁場のばらつきにあると考えられ



Fig.1. Schematic of CW pulse (a) and adiabatic pulse (b) to rotate magnetization around y axis.

る。SLAPはadiabatic pulse^[2](Fig.1)を用いることにより、既存の手法よりもRF inhomogeneityによる 磁化のリフォーカスが起こりにくいようなパルス系列となっている。また、adiabatic pulseはCW pulseに比べてoffset周波数の影響を受けにくく、複数種類の溶媒が存在する場合でも安定した信号 抑制効果が見込まれる。

[Methods and Results]

1. Solvent suppression pulse照射に際した磁化の強度変化のシミュレーション

RF 不均一性の存在下での磁化の減衰効果を検証するため、suppression pulseによる磁化減衰のシ ミュレーションを行った。パルス照射時間に対する磁化の強度変化を数値計算により求めた。こ れにより、solvent suppression pulseを照射した際の溶媒の¹H磁化の挙動を追跡した。既存手法であ るMISSISSIPPIを用いた際にはパルス照射位相を切り替える操作により周期的に磁化のリフォー カスが起こることが確認された。一方で、適切な条件のもとでSLAPを用いた場合には溶媒の¹H磁 化をより効果的に分散させることで可能であり、溶媒由来の¹H信号の抑制に寄与することが確認 された。磁化の緩和の効果を無視した条件でSLAPが溶媒¹H磁化を減衰する効果を計算で示すこと により、実際の¹H MAS NMR実験でもSLAPが優位に機能するということを裏付けることができた。

2. タンパク質サンプルの固体NMR測定による新規solvent suppression pulseの評価

60-70 kHzのUFMAS条件下でタンパク質のサンプルに対して¹H検出¹H-¹³C 相関固体NMRスペクトルを取得し、各種suppression pulseによる溶媒信号を抑制する効果を比較した。Suppression pulseの効果が弱い場合には、タンパク質サンプルに含まれるH₂Oや有機溶媒のMethyl¹H由来の信号が消えずにスペクトルに現れた。一方で新規手法によるsolvent suppressionが機能する場合には、長くて強力なパルスを照射しなくてもスペクトル中の溶媒の信号は効果的に抑えられていることが確認できた。

新しいsolvent suppression pulseの照射条件を最適化することにより、生体分子の多次元NMR測定に対する応用範囲の拡大を試みた。固体NMR測定に際して感度が低いため溶媒やバックグラウンド由来の¹H信号を排除が困難で¹H観測での信号の解析が難しいタンパク質由来のサンプルから必要なデータを効率よく取得する方法を検討した。

参考文献

[1] Zhiheng Yu et al., "NIH Public Access" 377, no. 2 (2009): 364–77

[2] J Baum, R. Tycko, and A. Pines, "Broadband Adiabatic," Physical Review A 32, no. 6 (1985): 3435–47.

P53

クロマグロ稚魚におけるアミノ酸代謝と成長に関わる因子 の探索 ○赤木 謙一¹,坂田 研二¹,朝倉 大河¹,菊地 淳^{1,2,3} ¹理研・CSRS,²横市院・生命医,³名大院・生命農

Investigation of factors involved in growth and amino acid metabolism in juvenile bluefin tuna

oKen-ichi AKAGI¹, Kenji SAKATA¹, Taiga ASAKURA¹, Jun KIKUCHI^{1,2,3}
¹RIKEN CSRS, Japan, ²Gurad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., Japan, ³Grad. Sch. Bioagri.Sci., Nagoya Univ., Japan

The sustainable use of biological marine resources is an urgent issue for humanity. The development of an efficient diet is essential for the efficient artificial cultivation of bluefin tuna. We used solution NMR to analyze the factors that are important for the growth of juvenile bluefin tuna. The results suggested the importance of compounds with an indole ring such as histidine in the diet. In addition, the juvenile bluefin tuna were fed a mixture of $^{13}C/^{15}N$ stable isotope amino acids in their diet, which provided insight into amino acid metabolism.

【背景·目的】

日本は島国であり、国家の周辺は海洋で占められている。古来より、そこから得られる多様な 生物海洋資源は日本人にとって、重要な食資源のみならず経済的資源でもあった。海洋資源を持 続的に利用していくためには、それらを人工的に維持管理する養殖が必須となる。日本料理を代 表する食材の一つであり寿司ネタにも用いられるクロマグロは、その味覚に加え経済的効果にお いても重要な魚類である。クロマグロ養殖において困難な開発ステージは、仔魚から幼魚期にい たる成長段階であり、この段階における成長効率のよい飼料開発は、安定的かつ効率的な人工養 殖用原魚供給にとって不可欠である。

そこで我々は、非侵襲的にサンプリングが可能な糞便に着目した飼料吸収評価法[1],魚類の組織代謝プロファイリング法[2],機械学習による成長因子探索法[3],および¹³C安定同位体追跡技術法[4]を援用することにより、クロマグロ稚魚の飼料吸収消化特性の評価を行った。

【方法】

配合飼料にアミノ酸等の栄養素を添加した20種の飼料を作製し、クロマグロ稚魚に給餌した。 試験期間中,糞便は時系列でサンプリングを行い,試験最終日には稚魚を採集した。これら糞便 (320)・筋組織等(260)の試料は凍結乾燥した後,100 mM Kpi (D₂0),pH 7.4,600 uL(1 mM DSS)緩衝液により水溶性代謝物群を抽出し,700 MHz-NMR装置により2D,*F* res,及び¹H-¹³C HSQC計 測を行った。2D,*F* resのプロジェクションデータはフリーソフトrNMRにより数値化・マトリクス 化し,各試料間でのシグナル強度比較に加え,クロマグロ稚魚の重量を目的変数とし,筋組織の スペクトルデータを説明変数とし,アンサンブル型ディープニューラルネットワーク(EDNN)によ り,成長モデリングと代謝物因子探索を行った。

アミノ酸代謝,機械学習,メタボロミクス

○あかぎ けんいち, さかた けんじ, あさくら たいが, きくち じゅん

また配合飼料中に¹³C/¹⁵N安定同位体標識アミノ酸を添加した飼料を給餌した稚魚を時系列でサンプリングを行い,¹H⁻¹³C HSQC, ZQF⁻TOCSY等のパルスプログラムを用いて筋組織中に取り込まれる水溶性画分,およびクロロホルム画分の評価を行った。

【結果・考察】

飼料と糞便から得られたNMRスペクトルのシグナル強度を比較した結果, 糞便中では飼料に含まれるヒスチジンやタウリン等のシグナル強度が低いことからこれらの代謝物はクロマグロ稚魚にとって消化吸収しやすい代謝物であることが示唆された。

NMRスペクトルデータを説明変数,魚体の重量を目的変数と し,EDNNによりモデル精度の検証を行った結果,クロマグロ稚 魚の成長に水溶性代謝物群が関係することが示唆された。ま たこの回帰結果に関わる重要因子を算出した結果,ヒスチジ ン,クレアチンといった代謝物が重要であることがわかった (Fig1.)。

¹³C/¹⁵Nアミノ酸混合飼料を給餌した結果では多くのアミノ 酸が筋組織中に吸収される直接的証拠データが得られ,また 時系列で¹³Cラベル率が増加する重要栄養素も抽出された。特 に、ヒスチジンは時系列でラベル率が上昇している結果とな った。それに加えて、クレアチン,グアニジノ酢酸(クレアチ ン合成の中間体)、イノシン酸(IMP)についても同様に筋組織 に吸収されていることが確認された。筋組織のクロロホルム 画分については、給餌5日目以降にトリグリセライド由来と 考えられるシグナルに¹³C-¹³Cカップリングが生じた。これら の結果から、取り込まれたアミノ酸から脂質合成経路への代 謝の一端が捉えられたと考えられる。



本会では, 遊離アミノ酸由来の¹⁵Nアミノ領域シグナルや, 代謝物定量性についても議論したい。

参考文献:

- T. Asakura, K. Sakata, S. Yoshida, Y. Date, and J. Kikuchi, "Noninvasive analysis of metabolic changes following nutrient input into diverse fish species, as investigated by metabolic and microbial profiling approaches," *PeerJ*, vol. 2014, no. 1, 2014.
- [2] S. Yoshida, Y. Date, M. Akama, and J. Kikuchi, "Comparative metabolomic and ionomic approach for abundant fishes in estuarine environments of Japan," *Sci. Rep.*, vol. 4, pp. 1–9, 2014.
- [3] T. Asakura, Y. Date, and J. Kikuchi, "Application of ensemble deep neural network to metabolomics studies," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1037, pp. 230–236, 2018.
- [4] G. Tokuda *et al.*, "Metabolomic profiling of 13C-labelled cellulose digestion in a lower termite: Insights into gut symbiont function," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 281, no. 1789, 2014.

P54Y アドレナリン受容体細胞内第三ループと GPCRモジュレーターSpinophilinとの 新しい融合タンパク質を用いた相互作用解析 〇葛貫 絵梨奈¹, 毒島 いぶき¹, 黒川 優香¹, 浦野 智子¹, 島崎 安希子¹, 河野 俊之², 細田 和男¹, 寺脇 慎一¹, 若松 馨¹ 1 群馬大学大学院 理工学府

2 北里大学大学院 医療系研究科

Interaction of a novel fusion protein between the adrenergic receptor intracellular third loop and the GPCR modulator Spinophilin

•Erina Kuzunuki¹, Ibuki Busujima¹, Yuka Kurokawa¹, Tomoko Urano¹, Akiko Shimazaki¹, Toshiyuki Kohno², Kazuo Hosoda¹, Shin-ichi Terawaki¹, and Kaori Wakamatsu¹

- 1 Faculty of Science and Technology, Gunma University
- 2 School of Medicine, Kitasato University

G protein-coupled receptors (GPCR) play important roles in signal transductions, and their functions are regulated by many different modulator proteins. Spinophilin (SPL) is known to modulate activities of α -adrenergic receptors. The putative receptor-binding domain (RBD) in SPL does not contain typical domain sequences, nor be expected to adopt a defined conformation in its free state. To analyze the interaction of the RBD of SPL with the third intracellular loop (3iL) of α 2A-adrenergic receptor (α _{2A}-ADR), we have narrowed down the ADR binding region in the SPL and the SPL binding site in the ADR. We found that these peptides fused to an appropriate protein exhibit excellent NMR spectrum of the peptide free from protein signals. This peptide-protein fusion was found useful for interaction analyses because they were less susceptible to aggregation.

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)による細胞内シグナル伝達は、ホルモン応答 や神経伝達など様々な生理現象に関与している。本研究では、GPCRの一種である α_{2A}-アドレナリン受容体(α_{2A}-ADR)とそのシグナリングを制御する因子である Spinophilin (SPL)に注目した。SPLは、多くのGPCRと結合することが報告されてい る。しかし、SPLのGPCR結合領域(Receptor Binding Domain:RBD)は単独で構造を

もたないと予測されており、RBDがどの ようにADRを認識するかなど、その詳細 はわからず、相互作用部位は報告によっ て異なっている⁽¹⁾⁻⁽³⁾。そこでα_{2A}-ADRと SPLとの結合領域の絞り込みを行い、相互 作用様式の決定及び複合体の立体構造 決定を目標とし、HSQC解析を行った。



Fig. 1. Domain structures of α_{2A} -ADR and Spinophilin

スピノフィリン、α2A-アドレナリン受容体

○くずぬきえりな,ぶすじまいぶき,くろかわゆか,うらのともこ,しまざきあきこ,こうのと しゆき,ほそだかずお,てらわきしんいち,わかまつかおり まず、α_{2A}-ADRのSPL結合部位を全長の約1/2 (Fig. 1-(A):ADR-A)に、SPLのRBDを約1/2 (Fig. 1-(c):SPL-c)に絞り込んだ。pull down assayによって結合を確認した後、[¹⁵N]SPL-cを調製し、ADR-Aを添 加して¹H-¹⁵N HSQCを測定した。シフト変化は観測されたものの、シグナルの分離は不十分であった。こ の測定結果を踏まえ、SPLの新規コンストラクトを作製した (Fig. 1-(d):SPL-d)。また、同様にα_{2A}-ADRも約 1/9とさらに短くしたものを作製した (Fig. 1-(B):ADR-B)。pull down assayによって両者の結合を確認し、結 合領域をSPLは70残基程度、α_{2A}-ADRは20残基程度に絞り込むことができた。

次に、[¹⁵N]SPL-d, GST-α_{2A}-ADR-Bのタイトレーションを行った。その結果、全くシフトしていないシグナ ルと、単調にシフトするシグナルを観測できたが、GST-α_{2A}-ADR-BをSPL-dの2当量添加後から凝集が生 じてしまい、観測できるシグナルが弱くなってしてしまった。そこで、pull down assayと同様にSPL-d, α_{2A}-ADR-B両者ともMBP-SPL-d, GST-α_{2A}-ADR-Bで測定を行うことで、凝集を防ぐことができると考えた。

そこで、[¹⁵N] MBP-Tag(Fig. 2)と [¹⁵N] MBP-SPL-d (Fig. 3)の¹H-¹⁵N HSQCを測定した。 Fig. 2とFig. 3を比 較すると、運動性 の低い領域である MBP-Tag 部 分の みブロードニング



Fig. 2. ¹H-¹⁵N HSQC of [¹⁵N]MBP-Tag Fig. 3. ¹H-¹⁵N HSQC of [¹⁵N]MBP-SPL-c

し、運動性の高い領域であるSPL-d部分のみシャープなシグナルとして観測できた。なお、Fig. 3枠内が SPL-dの主鎖の残基に由来するシグナルである。融合タンパク質で測定を行っても、MBP-Tagのシグナ ルはSPL-dのシグナルを妨げず、SPL-dの主鎖の残基のほぼすべてのシグナルを観測することができた。

さらに、[¹⁵N]MBP-SPL-d, GST-α_{2A}-ADR-Bのタイトレ ーションを行った(Fig. 4)。 融合タンパク質で測定を行 うことで、結合時に分子量が 大きいタグ部分が立体障害 となり、凝集を防止し、GSTα_{2A}-ADR-BをSPL-dの10当 量添加することができた。 ¹H-¹⁵N HSQCを用いたタイ



Fig. 4. Titration of [¹⁵N]MBP-SPL-d with GST-α_{2A}-ADR-B

トレーションにおいて、複合体形成に伴うSPLのシグナル変化は小さく、結合強度などの情報を得ることは困難だった。このことから、複合体形成に伴うSPLの主鎖の構造変化は小さい可能性が考えられる。現在、 直接相互作用していると考えられる側鎖の情報を¹H-¹³C HSQCで解析を進めている。また、α₂A-ADRに 関しても新しい系での¹H-¹⁵Nおよび¹H-¹³C HSQCによる相互作用解析について報告する。

References:

- (1) Sarrouilhe, D., et al., Biochimie. 88, 1099-1113(2006).
- (2) Richman, J.G., et al., J. Biol. Chem. 276, 15003-15008(2001).
- (3) Wang, Q., et al., J. Biol. Chem. 277, 50589-50569(2002).

P55 ネオジム永久磁石を用いた高分子多層薄膜の磁場掃引一次 元磁気共鳴イメージング 〇生方 輝,1 松葉瀬 真二,2 桑野一幸,2 浅川直紀,1 1 群馬大学大学院理工学府 2 トヨタ自動車(株)

Field-sweep one-dimensional MRI for multilayer polymeric films using static magnetic field gradient from neodymium ferromagnet

OAkira Ubukata,1 Shinji Matsubase,2 Kazuyuki Kuwano,2 Naoki Asakawa1

1 Division of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University 2 TOYOTA MOTOR COOPERATION

Magnetic resonance imaging (MRI) technique of solids is one of intriguing methodologies for experimental visualization of spatial distribution of inhomogeneous solids. Here, we demonstrate the possibility for low-cost one-dimensional (1D) MRI of multilayer films using an external static magnet field gradient(MFG) from a neodymium ferromagnet. We show the results of magnetic-field-sweep 1D 19F MRI experiment for three layered films of PTFE(500um)/Aluminum(10um)/PTFE(500um). The obtained result could lead to one of low-cost MRI instrument for thin films.

緒言

核磁気共鳴を用いた磁気共鳴イメージング(magnetic resonance imaging;MRI)法は,生体などの貴重 な研究対象の非侵襲内部計測法として,主に,医療診断・地質調査・考古学等を中心として用いられてき た.これまで,パルス磁場勾配(pulsed field gradient;PFG)法の有用性が際立っていたために,PFG 法に 基づく MRI 法のみの進歩がこの約 50 年間顕著であったと言える.一方,固体試料へのマイクロイメージ ングのための PFG 法の適用は,磁場勾配強度が不足することから困難とされてきた.そのため,一部の 専門家によって強力な磁場勾配を利用する手法の研究開発が行われてきた.

本研究では、小型の永久磁石(ネオジム磁石)の近傍の静的かつ強力な磁場勾配を用いた MRI 技術 の開発,特に、高分子多層膜に対する膜深さ方向の安価なデプスプロファイリング法の確立を目指した [1].本研究で開発される手法では、ネオジム磁石を利用することにより 100T/m 程度の強力な磁場勾配 条件下で核磁気共鳴実験を行う.また、検出コイルと試料の位置が空間的に分離している ex situ 検出で あるため、特殊形状試料に対する NMR/MRI 計測が可能となる.さらには、磁場勾配源としてネオジム磁 石を用い、磁気共鳴用として電磁石を用いる磁場設計であるため、磁気共鳴のための静磁場と磁場勾配 を独立に調節可能となる.この方法により、試料中に含まれる分子の分子運動のゆらぎの周波数特性で あるスペクトル密度関数の空間分布イメージングが可能となるかもしれない.

本研究では、デプスプロファイリング、すなわち一次元イメージング法の確立を目指した. 10 µm 厚の アルミホイル膜を 500 µm 厚のポリテトラフルオロエチレン(PTFE)膜二枚でサンドイッチした多層膜を試料 として一次元 19F MRI 計測を試みた.

multilayer film, neodymium magnet, field-sweep MRI

○うぶかた あきら, まつばせ しんじ, くわの かずゆき, あさかわ なおき

結果と考察

平板状ネオジム磁石(表面の磁束密度:0.30T)の表面から 2mmの距離の場所に PTFE/Al/PTFE を設置し, 共鳴周波数 28.2MHz の条件で, 電磁石の静磁場を掃引することにより 19F 一次元 MRI を試みた. このブラー画像に対して, 平板状ネオジム磁石の磁場の空間プロファイルを想定して Landweber iteration 解析を行ったところ, Fig.右下のような再構成画像を得た. PTFE 一層に要した磁場掃引ポイント数から算 出したところ, 空間分解能は約 10 µm であった.



Fig. ポリテトラフルオロエチレン(PTFE;500 mm)/アルミニウム(10mm)/PTFE(500 mm)三層膜の静磁 場掃引型1次元 19F MRI 計測の例. 静磁場には常伝導磁石,磁場勾配にはネオジム磁石を用いた. 実験で得られたブラー画像を用いた Landweber iteration 解析により, 再構成元画像を得た.

参考文献

[1] Asakawa et al., Polym.J., 44, 855(2012).

P56

水中の有機物浄化に関わるモニタリング重要因子の抽出 〇村山 昂平¹,横山 大稀²,菊地 淳^{1,2,3} ¹横市院 生命医,² 理研 環境資源,³名大院 生命農

The importance extraction of monitoring factors related to the purification of organic matter in aqueous environment.

oKohei Murayama¹, Daiki Yokoyama², Jun Kikuchi^{1, 2, 3}

¹ Grad. Sch. Med. Sci., Yokohama City Univ. Japan; ² RIKEN CSRS, Japan; ³ Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ., Japan

Fouling through the membrane filtration is a problem in the wastewater treatment of membrane bioreactor. The occurrence of fouling can be controlled by changes in the C/N balance, temperature and aeration of the wastewater. The purpose of this study is to analyze the changes in organic matter profile of wastewater incubated with different environmental factors by NMR with machine learning calculations. Environmental variation of 12 wastewater samples were prepared, then time-series of samples were analyzed by PCA and spectral ANOVA to profile the organic matter in the wastewater. Both incubation dates and amount of aeration contributed significantly to the changes in membrane fouling.

【背 景】

食料生産や生物工学等、バイオプロセスは「動脈」の生産活動に注視されがちであるが、廃棄物・排水処理等の「静脈」プロセス管理もSDGs達成には重要である[1]。近年、膜分離活性汚泥法(MBR)という排水処理技術のバイオプロセス導入が検討されている。MBRはろ過膜を直接反応槽に浸漬して処理水と活性汚泥を分離する排水浄化方法である。これは、従来法と比較して処理が簡易であるため設備を小型化でき、膜トラブルがない限り活性汚泥が処理水へ流入することがないため安定的に高い処理能力を持続させることができる。また、ろ過膜の孔の大きさが微細であることから、病原菌などの微生物も除去可能であるため処理水の水質を向上させることができ、河川や海に放流する際の環境負荷の軽減が見込め、細菌を介する感染症蔓延予防や、環境問題への貢献も期待できる。

MBRの排水処理において問題となるのが、特定の有機物群(多糖類、タンパク質等)が膜フィルターに吸着することで目詰まりが起きるファウリング現象である[2]。ファウリングが進行すると膜差圧が上昇し、同じ水量ろ過するために必要なエネルギーが増大し、膜差圧を正常に戻すための膜洗浄や膜交換等におけるランニングコストが発生する。この問題の解決には、有機物浄化に関わるエネルギー負荷を軽減するモニタリング重要因子の抽出が求められる。ろ過膜のファウリング発生は排水のC/Nバランス、温度、曝気量を変化させることで制御可能であることが知られている。これらの環境要因変化に伴い排水中の有機物組成が変化すればファウリング発生に関与するモニタリング重要因子の特定ができる可能性がある。本研究では、環境要因の異なる排水を培養したものをNMRで計測し、有機物プロファイルの変化を機械学習計算で網羅的に解析することを目的とした。

プロファイリング、ピーク分離、機械学習

○むらやま こうへい、よこやま だいき、きくち じゅん

【方 法】

環境要因(C/Nバランス(メタノール添加1倍、2倍、 4倍)、温度(25°C、35°C)、曝気量(1.3 L/min、5.2 L/min))を変えた12種類の排水サンプルをポリ容器 中に用意した(Fig. 1)。排水を培養し、経時的に1.5 mLの試料を採取した。凍結乾燥し、KPi/D₂Oで溶解 した後に抽出、遠心分離を行い、上清をNMR試料 管に加えた。溶液NMR(700 MHz)のWatergate、 Diffusion-EditedおよびHSQCで計測し排水中の有 機物プロファイルを取得した。得られたスペクトルを 数値化し、統計計算ソフトRにより機械学習および統 計解析処理を行った。

【結果・考察】

時系列サンプリングしたデータを用いて主成分分 析(PCA)を行った。目的変数にPC1、PC2、説明変 数に培養日数を含む環境要因を設定して分散分析 (ANOVA)を行うと培養日数と曝気量に統計的有意 性を確認でき(Fig. 2A)、一般化線形混合モデル (GLMM)でPC1と培養時間の回帰を行ったところ、 両者には正の相関がみられた(p<0.001, Fig. 2B)。ま た、弱曝気処理に比べて強曝気処理サンプルは、 PC1の正の方向にプロットされた(GLMM p<0.001)。 PC1のローディングを示すと、化学シフト0.75-1.0、 1.5 ppm付近の有機物が分解され3.0-4.0 ppm付近 の代謝物のシグナル強度が相対的に増大しており、 排水中の有機物組成が経時変化していることが示唆 された(Fig. 2C)。化学シフト0.01 ppmごとの相対強 度を目的変数としてANOVAを行った(Fig. 3)。C/N バランスや温度といった環境要因の変化は限られた 代謝変化のみに寄与するのに対し、曝気量変化は 排水中の有機物プロファイル全体を変化させること が明らかとなった。培養日数や曝気量の変化でシグ ナル強度が増減する物質に着目することでファウリン グを誘引する重要因子を抽出できると考えられる。本 会ではこれらの結果に加えて*J*-res、Diffusion-Edited、HSQCを用いた排水中有機物の帰属や行列 因子分解を駆使したピーク分離を行い得られた結果 について議論する。

【参考文献】

[1] The 2030 Agenda for Sustainable Development.

[2] Okabe, S. et al., Environ. Sci. Technol. 2007, 41, 2, 632.



Fig. 1 Schematic diagram of the experimental system.



Fig. 2 A) *p*-value of ANOVA, where objective variables are PC1, PC2 and factors are incubation day, C/N, temperature, aeration rate. **B**) Score plot of PCA. Explanatory variables are relative intensity of NMR spectra of wastewater. **C**) Loading plot of PC1 and PC2.



Fig. 3 ANOVA in NMR spectra of wastewater incubation. The significant regions are colored on an actual NMR spectrum as an example.

P57 やエヤマサソリ由来カリウムチャネル阻害毒素LaIT2の構造 機能相関解析 〇田村 真生¹,森田 勇人²,大木 進野¹

- 1 北陸先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科
- 2 城西大学 大学院理学研究科

Structure-function relationship of a K⁺-channel inhibitor toxin, LaIT2, from *Liocheles australasiae*

oMaiki Tamura¹, Eugene Hayato Morita², Shinya Ohki¹

I Graduate School of Advanced Institute of Science and technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)

2 Department of Chemistry, Graduate School of Science, Josai University

Yaeyama scorpion, *Liocheles australasiae*, mainly inhabits in the Yaeyama island in Japan. It has been known that this scorpion has venom including β -toxin acting on K⁺-channels (β KTx) and this venom has insecticidal activity [1]. Lacking three-dimensional structure of LaIT2 prevents understanding its structure-function relationship. To clear this issue, we tried to overexpress LaIT2 with *Escherichia coli (E. coli)* and to analyze its solution structure using NMR. In this study, we have succeeded to overexpress the recombinant LaIT2 (rLaIT2) using *E. coli*. We obtained approximately 0.5 mg of rLaIT2 from *E. coli* cultured in 1L of M9 medium. The labeled rLaIT2 was subjected to measure HSQC, CBCA(CO)NH, HNCA, HNCACB, HCCH-TOCSY, ¹⁵N-edited NOESY, ¹³C-edited NOESY and ¹⁵N-edited TOCSY. The results of NMR analysis suggested that the LaIT2 has α - β - β structure in the C-terminal region.

【緒言】

日本に生息しているサソリは2種類存在し、そのうち1種が八重山諸島に生息するヤエヤマサソ リである。ヤエヤマサソリから得られたペプチド毒素はカリウムチャネルに作用し(βKTx)、昆虫 に活性を示すが、哺乳類にはほとんど活性を示さないことが明らかとなっている。ヤエヤマサソ リから抽出された複数種のペプチド毒素のうち一番含有量の多いLaIT1 (36 aa) について殺虫活 性は認められたが、抗菌活性は認められなかった。また、LaIT1はβ-sheet (β1: Lys²²-Cys²³ と β2: Cys²⁹-Val³⁰)を持つことが明らかとなっており、構造も解明されている。2番目に含有量の多いL aIT2 (59 aa)については、殺虫活性、抗菌活性ともに認められ、3つのジスルフィド結合(Cys³¹-Cy s⁵⁶とCys³⁸-Cys⁵⁶とCys⁴²-Cys⁵⁸)を持ことが明らかとなっている[1,2]。LaIT1は抗菌活性を示さない が、LaIT2では抗菌活性が確認された。加えて、LaIT1とLaIT2の配列相同性は低く、LaIT2はLaIT 1と全く異なる構造と機能を持つことが予測された。しかし、LaIT2の構造と機能の関係性を紐解 くのは立体構造データが欠如しているため、困難である。この問題を明らかにするため、私達は LaIT2の大腸菌を用いた大量発現とNMRスペクトルによる溶液構造解析を試みた。

ペプチド毒素、立体構造、構造機能相関

oたむらまいき、もりたはやと、おおきしんや

【方法】

cDNA(LaIT2)をpET-32aのNcoI/XhoIサイトに挿入後、pET-32a/LaIT2をRosetta-gamiTMB (DE3)/pLysSに形質転換した。この発現系をLB (50 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) 寒天培地を使い12時間37℃で培養した。次に、得られたコロニーをLB (50 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) 液体培地 (3 ml) を使い12時間37℃で培養した。遠心分離 (5,000 rpm, 4 ℃, 10 min)で菌体だけ回収し、500 mlのM9中でOD₆₀₀ = 0.5になるまで37℃で培養した。OD₆₀₀ = 0.5付近でIPTGを終濃度0.2 mMになるように添加し、その後3時間37℃で培養した。1Lから約1.2g の菌体を回収した。得られた全菌体をLysis Buffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0) に溶か し超音波破砕した後、遠心分離 (18,000 rpm, 4 ℃, 20 min)で溶液と沈殿に分けた。得られた溶液 にTrx-LaIT2が含まれていることSDS-PAGEで確認した後、Trx-LaIT2をNi²⁺-NTA で精製し、 MWCO 3.5 kDaの透析膜を用いて、4℃で合計36時間透析した。 その後、25℃, 24時間でTrx-Tag の除去し、得られたrLaIT2を質量分析とSDS-PAGEで確認した。その後、rLaIT2をHPLCで単離 し、NMR測定実験に移行した。

安定同位体標識されたrLaIT2についてBruker AVANCE III 800 MHzを用いて一連の測定(HSQC, CBCA(CO)NH, HNCA, HNCACB, HCCH-TOCSY, ¹⁵N-edited NOESY, ¹³C-edited NOESY, ¹⁵N-edited TOCSY)をした。得られたスペクトルを解析し全てのアミノ酸について帰属が完了した。得られた820個のNOE距離情報を入力し、CYANAを用いて構造計算を行った。

【結果・考察】

本研究では、サソリ由来のペプチド毒素LaIT2 を大腸菌内で安定同位体標識LaIT2を発現させる 系を確立させた。また、CYANAを用いて構造計 算を行った結果C末端に α - β - β 構造を有すること が明らかとなった。Fig.1はLaIT2のHSQCスペク トルであり、Fig.2 はLaIT2の立体構造である。

現在、1-34残基の構造計算を行っており、N末 端側にはNOE距離情報が少ないことから二次構 造を持たないことが示唆されている。本討論会 では、LaIT2の立体構造について詳細に報告する とともに、構造を基にしてその構造と機能の相 関について議論する予定である。

【参考文献】

 Shoichiro Horita *et al.*, Biochem.
 Biophys. Res. Commun. 411 (2011) 738-744.

[2] Hironori Juichi *et al.*, J Pep Sci. (2018);24: e3133.



Fig.2 Solution structure of LaIT2



- 2 大阪大学先導的学際研究機構 量子情報・量子生命研究センター
- 3 JST さきがけ

Prediction of singlet lifetimes using molecular dynamics method

∘Makoto Motoyama¹, Koichiro Miyanishi¹, Makoto Negoro², Naoki Ichijo¹, Akinori Kagawa^{1,2,3}, Wataru Mizukami², Masahiro Kitagawa^{1,2}.

1 Graduate School of Engineering Science, Osaka University

2 Quantum Information and Quantum Biology Center, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University

3 JST, PRESTO

Dissolution Dynamical Nuclear Polarization (DNP) has been applied for a variety of fields including chemistry, biology, and medical science. However, some of these applications are limited by the lifetime of the nuclear spin polarization. To prolong the lifetime, molecular units which have the long longitudinal relaxation time have been developed and the nuclear singlet state, which is decoherence-free against the dipolar relaxation between the spin pairs, has been studied experimentally and theoretically. Here, we predict the lifetimes of the nuclear spin polarization using molecular dynamics method (MD) and quantum chemistry simulations. To achieve precise calculations, we take the components such as intramolecular and intermolecular dipolar interaction, chemical shift anisotropy and spin rotation interaction into account. In particular, the relaxation rate of intermolecular dipolar interactions is precisely calculated using MD method for various solvents and the calculated values agree with experimental values on the same order.

【概要】

DNPによって高偏極化したサンプルを水溶液で高速に溶かして高偏極化溶液を作る溶解 DNP 技術によって、高感度な化学反応のセンシングや生体内 MRI が実現されている[1,2]。これらの応 用先をさらに広げるために、長寿命な核スピン偏極を持つ物質の探索やシングレット状態を用い た核スピンの長寿命化が実験・理論の両面から研究されている。シングレット状態はシングレッ トスピンペア間の双極子相互作用によって緩和せず、その他の相互作用による緩和にも耐性を持 っことが知られている[3]。そのためシングレット状態の緩和時間予測を行うには、分子内のその 他の核スピンとの双極子相互作用(intraDD)、化学シフト異方性(CSA)、スピン回転緩和(SR)、溶媒 分子との双極子相互作用(interDD)、など縦緩和時間の計算では影響の小さかった相互作用の緩和 レートを高い精度で計算する必要がある[4]。これらの相互作用緩和時間の計算は、多くの場合量 子化学計算で得られる溶質分子の情報を元にして行われ、interDDの効果は無視されるか簡素なモ 緩和時間計算、量子化学/分子動力学計算、シングレット状態

○もとやま まこと、みやにし こういちろう、ねごろ まこと、いちじょう なおき、 かがわ あきのり、みずかみ わたる、きたがわ まさひろ デルで見積もられるのみであった。本研究において我々は量子化学計算だけでなく、分子動力学 法を用いることで溶質分子と溶媒分子との位置関係を顕わに考慮した高精度な緩和時間計算を行 った。

【理論】

核スピン緩和が時間に依存した摂動*H*₁(*t*)によって引き起こされる場合を考える。時間依存しな いハミルトニアン*H*₀における相互作用系において、実験室座標系での核スピンの時間発展は下記 のマスター方程式で表される。

$$\frac{d}{dt}\tilde{\rho}(t) = -\int_0^\infty \left[\overline{\tilde{H}_1(t), \left[\tilde{H}_1(t+\tau), \tilde{\rho}(t)\right]}\right] d\tau = \Gamma \tilde{\rho}(t)$$
(1)

上線はアンサンブル平均、チルダは H_0 における相互作用系、 $\tilde{\rho}(t)$ は時刻tにおける密度行列、 $\tilde{H}_1(t)$ は時刻tにおける各相互作用ハミルトニアン、 Γ はリウヴィル形式での緩和超演算子を表す。特に、スピンペアがシングレット状態のとき、密度行列とペア間の双極子相互作用ハミルトニアンは可換であるため右辺が0となり、緩和しない状態となっている。(1)式を解くにあたって、下記に示すようなハミルトニアンを球面調和関数で表したものを用いる。

$$[H_1^{\Lambda}(t)]^L = c^{\Lambda} \sum_{m=-l}^{l} (-1)^m [A_{lm}^{\Lambda}(t)]^L [T_{l-m}^{\Lambda}(t)]^L$$
(2)

 Λ は相互作用の種類を表し、lは相互作用の種類によって1または2の値を取る。 c^{A} は相互作用の 種類によって決まる係数、A(t)はハミルトニアンの分子運動によって変化する部分、Tはスピン演 算子を含む分子運動によって変化しない部分である。 $[\cdot]^{L}$ は座標系を実験室系にとる事を表して いる。(2)式を用いることで、(1)式は(3)式となる。

$$\boldsymbol{\Gamma} = -c^{\Lambda^2} \sum_{m=-l}^{l} \sum_{m'=-l'}^{l'} (-1)^m [T^{\Lambda}_{l-m}]^L [T^{\Lambda}_{l'm'}]^L \times \int_0^\infty G^{\Lambda}_{ll'mm'}(\tau) \, e^{-i\omega\tau} d\tau \,, \tag{3}$$

$$G_{ll'mm'}^{\Lambda}(\tau) = \overline{[A_{lm}^{\Lambda}(t)]^{L} [A_{l'm'}^{*\Lambda}(t+\tau)]^{L}}$$
(4)

緩和時間を求めるには、分子運動による相関関数 $G^{\Lambda}_{ll'mm'}(\tau)$ を計算する必要がある。そこで(5)式を 用いて各相互作用ハミルトニアンの主軸系Pへ座標変換を行う。

$$[A_{lm}^{A}(t)]^{L} = \sum_{p=-l}^{l} \left[A_{lp}^{A}(t) \right]^{P} D_{pm}^{l} \left(\Omega_{PL}(t) \right)$$
(5)

 $\Omega_{PL}(t)$ は実験室座標と主軸座標間のオイラー角、 $D_{pm}^{l}(\Omega_{PL}(t))$ はウイグナーの回転行列である。(5) 式を用いて(4)式を計算すると以下のようになる。

$$G_{ll'mm'}^{\Lambda}(\tau) = \sum_{p=-l}^{l} \sum_{p'=-l'}^{l'} \overline{\left[A_{lp}^{\Lambda}(t)\right]^{p} \left[A_{l'p'}^{*\Lambda}(t+\tau)\right]^{p} D_{pm}^{l} \left(\Omega_{PL}(t)\right) D_{p'm'}^{l'} \left(\Omega_{PL}(t+\tau)\right)}$$
(6)

更に、相関が指数関数的に減衰するという仮定とウイグナーの回転行列の直交性を用いて(6)式は 以下のように変形できる。

$$G_{ll'mm'}^{\Lambda}(\tau) = \frac{\delta_{ll'}\delta_{mm'}}{2l+1} \sum_{p=-l}^{l} \left[A_{lp}^{\Lambda}(t)\right]^{P} \left[A_{lp}^{*\Lambda}(t)\right]^{P} exp(-\tau/\tau_{l}^{\Lambda})$$
(7)

この(7)式における相関時間 τ_l^A を、分子動力学法を用いて溶質分子と溶媒分子との位置関係を顕わ に考慮して計算を行っていく。特に、本研究では重水、メタノール、アセトン、ジメチルスルホ キシドなどのいくつかの溶媒における各分子内相互作用の相関時間 τ_l^A と溶媒との双極子相互作用 による相関時間 $\tau_l^{interDD}$ を、分子動力学法を用いて求め、緩和時間の正確な計算を行った。

【計算手法】

今回行った計算のフローチャートをFig.1(a)に示す。本研究では、量子化学計算としてGaussian16、 DALTON、分子動力学法として Amber18 を用いた。初めに Gaussian16 を用いて計算対象分子の構 造最適化を行う。汎関数及び基底関数は B3LYP/6-31G*を用いた。その構造情報から Gaussian16 を 用いて MP2/aug-cc-pVTZ で化学シフトテンソルの計算を行い、DALTON を用いて B3PW91/6-31G* でスピン回転テンソルの計算を行った。分子動力学法に関しては、力場として leaprc.protein.ff14SB 及び leaprc.gaff を用い、温度 293K でエネルギー最小化、NPT 計算、NVT 計算、NVE 計算を順に 行った。水以外の溶媒に関しては簡単のため重水素化されていないモデルを使用し、水に関して は TIP4P 及び SPC/HW を使用した。(4)式に示す相関のアンサンブル平均を計算するために、相関 のない複数のデータセットを準備した。具体的には、Fig.1 (b)に示すように 500 ps ごとに NVT 計 算の結果を用いて NVE 計算の結果を行った。得られた 50 個のデータセットから、(4)式に示す相 関のアンサンブル平均を計算し、その結果を指数関数フィッティングすることで分子運動による 相関時間で¹を求めた。



Fig.1 (a) Flowchart for relaxation time calculation. (b) Flowchart of NVT and NVE calculation for correlation time τ_1^A estimation.

【計算結果・考察】

これまでに報告されているプロトンスピンの縦緩和時間(T₁)およびシングレット状態の緩和時間(T₅)の実験結果と上記の計算手法で行ったシミュレーション結果を Table.1 に示す。本研究室で 得られた 4-クロロ安息香酸(PCBA)の実験結果[5]に対しては、T₁、T₅の両方が誤差 47%以内で計算 することが出来た。また、DMSO 中の 2-クロロアクリロニトリル(CAN)に関しては誤差 33%以内 であった。一方、D₂O中の CAN の緩和時間は 218%の誤差となった。この原因として、CAN の様 な軽い分子の運動においては、衝突する溶媒分子の質量の違いによる影響が大きくなると考えら れる。そこで軽水(TIP4P)ではなく重水用のパラメータ(SPC/HW)を用いて緩和時間を計算したとこ ろ、誤差 27%まで改善することができた。また、緩和時間の溶媒依存性を調べるために、重水、 メタノール、アセトン、ジメチルスルホキシドの 4 種類の溶媒で緩和時間が実測されている 3-ク ロロチオフェン-2-カルボン酸(CI-TC)[8]の緩和時間を計算した。その結果、縦緩和時間は最大 20% の誤差、シングレット状態の緩和時間は最大 47%の誤差で計算することができた。Fig.2 に各溶媒 における緩和レートの内訳を示す。この図からシングレット状態での緩和においては溶媒分子と の双極子相互作用による影響が大きいことが分かる。

本研究では分子動力学法を用いて緩和時間の溶媒依存性を考慮することで、様々な分子に対し て縦緩和時間とシングレット状態の緩和時間の推定が可能なことを示した。今後、この手法を用 いた長い寿命を持つ分子の探索や、溶媒中での他の分子との相互作用を考慮した新規の計算手法 の開発を行っていく予定である。

Table 1 Experimental and calculation value of relaxation time 0.0175

		Exp.		Calc.	
molecule	solvent	$T_1[s]$	$T_S[s]$	$T_1[s]$	$T_S[s]$
PCBA	D2O(TIP4P)	5.3[5]	15[5]	6.7(+26%)	22(+47%)
CAN	DMSO	7.75[6]	141[6]	5.20(-33%)	187(+33%)
CAN	D2O(TIP4P)		109[7]	16.7	347(+218%)
CAN	D2O(SPC/HW)	—	109[7]	6.0	138(+27%)
CI-TC	Methanol	32.8[8]	236[8]	29.5(-10%)	348(+47%)
CI-TC	Acetone	47.0[8]	183[8]	44.4(-6%)	262(+43%)
CI-TC	DMSO	11.9[8]	134[8]	10.2(-14%)	117(-13%)
CI-TC	D2O(TIP4P)	18.2[8]	132[8]	14.5(-20%)	75.4(-43%)



Fig.2 The individual contributions of relaxation rate for Cl-TC in each solvent.

本研究は、戦略的創造研究推進機構(CREST)、科学技術振興機構(JST)の支援を受けて行われた。

References

[1] Buratto, Roberto, et al. ChemMedChem 9 (2014): 2509-2515.

[2] Golman, Klaes, and Mikkel Thaning. Proc Natl Acad Sci USA 103 (2006): 11270-11275.

[3] Levitt, Malcolm H. Annu Rev Phys Chem 63 (2012): 89-105.

[4] Pileio, G. Long-lived Nuclear Spin Order. The Royal Society of Chemistry (2020).

[5] Miyanishi, Koichiro, et al. Quantum Sci. Technol. 5 (2020): 025004.

[6] Carravetta, Marina, and Malcolm H. Levitt. J. Am. Chem. Soc. 126 (2004): 6228-6229.

[7] Pileio, G. J. Chem. Phys.134 (2011): 214505.

[8] Kiryutin, Alexey S, et al. ChemPhysChem 20 (2019): 766-772.

P59 固体NMRによるジホスホン酸イミダゾリウム結晶のプロトン 伝導メカニズムの解析 ○安念 雅史¹, 畝 亮太², 栗原 拓也², 重田 泰宏³, 雨森 翔悟³, 井田 朋智², 水野 元博^{1,2,3} 1 金沢大学大学院新学術創成研究科 2 金沢大学大学院自然科学研究科

3 金沢大学ナノマテリアル研究所

Analysis of Proton Conduction Mechanism of Imidazolium Diphosphonate Crystal by Solid State NMR

•Masashi Annen¹, Ryota Une², Takuya Kurihara², Yasuhiro Shigeta³, Shogo Amemori³, Tomonori Ida², Motohiro Mizuno^{1,2,3}

1 Graduate School of Frontier Science Initiative, Kanazawa University

2 Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

3 Nanomaterials Research Institute, Kanazawa University

Among proton-conducting materials, organic crystals have attracted attention from the viewpoint of the diversity of the constituent molecules. Various proton conducting materials containing imidazole have been studied as one of them. In this study, imidazolium crystals using diphosphonic acid (1,5-pentylenediphosphonic acid and 1,10-decyldiphosphonic acid) were synthesized and the temperature dependence of the proton conductivity of them were investigated using AC impedance measurement. The purpose of this study was to elucidate the proton conduction mechanism by analyzing the molecular motions of these samples by solid-state ²H NMR, and by analyzing the local structure of the crystals using solid-state ¹³C, ³¹P NMR and single crystal XRD.

【序論】様々なプロトン伝導物質の中で、有機結晶は構成する分子の多様性などの観点 から注目されている。その中の1つとしてイミダゾール(Im)を含んだプロトン伝導性有 機結晶があげられる。イミダゾール系のプロトン伝導体の中で水素結合を形成しやすい ジカルボン酸イミダゾリウム塩結晶が高いプロトン伝導性を示すことが報告されてい る^[1]。このような系では水素結合ネットワークを介したホッピング機構によりプロトン が伝導し、その際、イミダゾールの分子運動が重要な役割を果たすのではないかと考え

られている。本研究では、プロトン供与体として ホスホン酸基を有するペンチレンジホスホン酸 (PDPA)とデシルジホスホン酸 (DDPA)を用いた。 ジホスホン酸とイミダゾールの組成比が1:2で ある有機結晶 (PDPA-2Im, DDPA-2Im)を作製し、プ ロトン伝導率の温度変化を調べた。これらの試



Fig.1 Imidazole (left) and diphosphonic acid (right). n=5 is PDPA. n=10 is DDPA.

料について固体²H NMRで分子運動を、固体¹³C, ³¹P NMRや単結晶XRDを用いて結晶の局所 構造を解析し、プロトン伝導メカニズムを考察した。

プロトン伝導、有機結晶、固体NMR

○あんねんまさし、うねりょうた、 くりはらたくや、 しげたやすひろ、 あめもりしょうご、 いだとものり、 みずのもとひろ
【実験】ジホスホン酸とImを1:2のモル比で混合し、加熱融解させることで試料を調製 した。プロトン伝導率の測定には交流インピーダンス法を用いた。固体NMRの測定には JEOL ECA-300分光器を用いた。²H NMRスペクトルの測定には四極子エコー法を用いた。 スペクトルの測定にはImの炭素に結合した水素のみを重水素化したImd3とジホスホン 酸の試料を用いた。

【結果・考察】Fig.2 に各試料のDSC測定の昇 温過程の結果を示す。PDPA-2Imは430 K付近に 融点のみを持つこと、DDPA-2Imは368 K(T_o)で 固相-固相転移を起こし、400 K付近に融点を持 つことがわかった。

Fig.3 にプロトン伝導率の温度変化を示す。 PDPA-2Imは413 Kで1.4×10⁻⁴ S/cm、DDPA-2Imは 393 Kで4.2×10⁻⁴ S/cmの最大値を示した。 PDPA-2ImとDDPA-2Imは温度上昇に伴って指数 関数的に伝導率が増加した。DDPA-2Imでは転移 以上において伝導率の温度変化の傾きが変化 していることがわかる。

Fig.4 に固体²H NMRのスペクトルを示す。 PDPA-2Imのスペクトルでは静止状態のImによ るブロードな成分と等方回転運動をしている Imによるシャープな成分が観測された。シャー プな成分の割合は温度上昇に伴い増加した。 PDPA-2Imでは温度上昇に伴う等方回転運動を しているImの増大が伝導率の上昇に大きく寄 与していると考えられる。DDPA-2Imにおいても シャープな成分とブロードな成分が存在して いるがシャープな成分の割合はPDPA-2Imより も高い。DDPA-2Imのプロトン伝導率がPDPA-2Im よりも高いのは等方回転運動をしているImの 割合が多いことが関係していると考えられる。 また、T。以上でブロードな成分の線形が変化し ていることがわかる。スペクトルの線形を解析 するとImが面内回転運動をしていることがわ かった。DDPA-2ImのT。以上ではImの面内回転運 動を起こすImと等方回転運動を起こすImがと もにプロトン伝導の上昇に大きく寄与してい ると考えられる。

【参考文献】

[1] K. Pogorzelec-Glaser, J. Garbarczyk,
Cz. Pawlaczyk and E. Markiewoez, *Mat. Sci Pol.*, 24(2006) 245-252



Fig.2 DSC curves of PDPA-2Im and DDPA-2Im







Fig.4 ²H NMR spectra for PDPA-2Imd₃ (left) and DDPA-2Imd₃ (right)

P60 二酸化炭素-メタン変換光触媒である、黒色金ナノ粒子を 担持した針状ナノシリカの固体高分解能NMR 。
 の村田翔¹,野田泰斗¹,竹腰清乃理¹
 「京都大学理学研究科

Solid-State High-Resolution NMR for Black-Gold Supported Dendritic Fibrous Nanosilica with Photocatalyst Conversion of Carbon Dioxide to Methane

◦Sho Murata¹, Yasuto Noda¹, and Kiyonori Takegoshi¹ ¹Graduate School of Science, Kyoto University

The photo conversion from CO₂ to methane is one of the candidates for preventing the global warming and reducing the high energy demand of the world. In this reaction, efficient photo catalyst is needed. In this research, we use black gold supported dendritic fibrous nanosilica as photo catalyst of the conversion reaction. We study the reason why black gold supported dendritic fibrous nanosilica generates high methane yield by high resolution solid-state NMR. We characterized the photocatalyst without gas in dark situation by ¹H,¹³C, and ²⁹Si NMR first. Results for the photocatalyst in working under photo irradiation in mixture of CO₂ and H₂ atmosphere will also be discussed.

背景・目的

二酸化炭素と水素源からメタンを生成する光変換 反応は、二酸化炭素濃度の減少と、エネルギー源で あるメタンガスの生成に繋がる点で、環境問題の解 決に有用な反応である。この反応においては反応効 率を高める光触媒が重要であり、金属微粒子の局在 表面プラズモン共鳴が高効率な光触媒の開発に用 いられている。^[1] その一つとして黒色金ナノ粒子を

担持した針状ナノシリカ (dendric fibrous nanosilica; DFNS) がある。^[2] 針状ナノ シリカは、構造に起因して体積に対する表面積の割合が大きく、反応分子がシリ カの細孔に容易に侵入できるようになっている(Fig.1a)。針状ナノシリカに 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTS) を加えることで、針状ナノシリカ表面にプロ ピルアミノ基が付加される (Fig.1b)。ここでアミノ基は二酸化炭素をナノ粒子上に 捕捉する役割をしている。表面にプロピルアミノ基を付加した針状ナノシリカに金 ナノ粒子を担持し(Fig.1c)、金ナノ粒子の大きさと粒子間距離を制御すると変換 効率の高い光触媒となることが報告されている。^[2] ここで金ナノ粒子は可視光か ら近赤外光までの高い吸収能を持っており、黒色金ナノ粒子とよばれている。本 研究では二酸化炭素-メタン変換において本光触媒が反応効率を高めている



Fig.1 Synthesis of (a) DFNS, (b) DFNS-APTS, and (c) black gold supported DFNS-APTS.



Fig. 2 Fabricated MAS module for tests of photo irradiation.

機構を解明するために¹H、¹³C、²⁹Si 固体高分解能 NMR を行った。最初に比較のために光照射せずに NMR 測定を行った。発表では光照射下での NMR 測定の結果をもとに、本触媒が二酸化炭素 – メタン 変換反応において高い触媒活性を示す理由について議論する予定である。

光触媒、高分解能固体NMR、黒色金ナノ粒子

○むらた しょう、のだ やすと、たけごし きよのり

実験

試料は文献[2, 3]に基づいて合成された 3 試料(針状ナノシリカ、それに APTS を付加、それに Au 担持)をタタ基礎研究所の *Dr. Vivek Polshettiwar* からご提供いただいた。以下では 3 試料を順に DFNS、 DFNS-APTS、black gold supported DFNS-APTS と書く。¹H と ¹³C では 7.05T の磁場、²⁹Si では 9.4 T の 磁場を用いた。またすべての測定で 5 mm 試料管を使用した。¹³C は CP-NMR 法、¹H、²⁹Si は単パルス NMR 法で測定した。¹H、¹³C、²⁹Si の観測周波数はそれぞれ 300.48449 M Hz、75.5629 MHz、79.50408 MHz で、待ち時間はそれぞれ 3.5 s、3 s、10 s とした。次に光照射下での NMR 測定は初めての試みであ ったので、MAS モジュールを用いて(Fig. 2)通常の試料管と異なり光が通過するサファイア試料管(もしく は石英試料管)における MAS 回転のテストと、光ファイバーを用いた光照射のテストを行った。

結果

Fig. 3 に DFNS と DFNS-APTS、black gold supported DFNS-APTS の²⁹Si MAS NMR スペクトルを示す。いずれも-120 から -100 ppm の範囲に信号が観測された。この信号は DFNS のシ リカと帰属でき、APTS を付加したり黒色金粒子を担持してもほ とんど変化しなかった。DFNS に APTS を付加すると-65 ppm に 信号が観測された。これはプロピルアミンが結合している表面 Si の信号と帰属でき、黒色金粒子の担持により信号強度が小さ くなった。

Fig. 4 に{¹H-}¹³C CP/MAS NMR スペクトルを示す。DFNS-APTS では主に 3 つの信号が 8.5 ppm、21.1 ppm、41.8 ppm を 中心に出現し、それぞれ表面 Si に直接結合した CH₂ (peak 1)、 その隣の CH₂ (peak 2)、そしてアミノ基に結合した CH₂ と帰属さ れる。^[4] 黒色金粒子を担持すると peak 1 が小さくなると共に peak 2 が 2 つに分裂し、peak 3 は先鋭化した。

黒色金粒子の担持の有無によるプロピルアミンの運動性の 違いを¹Hの緩和時間とCPの接触時間依存性により探ったS。 まず¹Hの T_1 は両方とも0.4 s 程度であり有意な差はなかった。 片や接触時間依存性では、黒色金粒子担持前では $T_{1\rho}$ が0.3 ms であるのに対し、担持後では44 msと非常に長くなった。こ れらから、黒色金粒子担持前のプロピルアミンはスピンロック強 度70 kHz と同程度の運動をしていると考えられる。

以上、光を照射していない状態での光触媒の評価をしてきた。当日の発表では、二酸化炭素、水素源を試料管に密閉し、 光照射のもとで NMR 測定を行い本光触媒が二酸化炭素-メ タン変換反応効率を高める機構を議論する。

本研究は JSPS 科研費 16H06440 の助成を受けて実施された。

参考文献

- [1] T. P. Araujo et al., Curr. Opin. Coll. Inter. Sci. 39, 110 (2019).
- [2] M. Dhiman et al., Chem. Sci., 10, 6594 (2019).
- [3] A. Maity et al., *Nat. Protocol* 14, 2177 (2019).
- [4] I. Shimizu et al., Coll. Polym. Sci. 275, 293 (1997).



Fig. 3 ²⁹Si MAS NMR spectra of (a) DFNS, (b) DFNS-APTS, and (c) black gold supported DFNS-APTS.



索引

著者検索

Aizawa Tomovasu	
Alifumi Takaani Kanda	
	P
Akiko Sasaki	P
Akiko Shimazaki	P5
Akimori Wada	P4
Akinori Kagawa	1L4, P6Y, P12, P35, P5
Akira Naito	P
Akira Ubukata	P
Akiyo Tei	P
Atsuko Ogawa	3L5, P2
Atsushi Asano	P
Atsuya Momotake	3
Ayesha Wickramasinghe	P46, P
	[B]
Batsai khan Mijiddorj	P
	[C]
Camille Michiko Obayashi	P2
Chikai Tei	P
China Okamoto	3
Chojiro Kojima	2L6, 2L7, 3L2, 3
-	[D]
Daiki Terada	1
Daiki Yokoyama	P
Daisuke Kuwahara	P5. P
Demura Makoto	
	[E]
Fisuke Chikavama	P2
Frina Kuzunuki	
Fugene Havato Morita	216 P
Eugene mayato monta	[F]
Feifei Wei	P17 P
Frans A A Mulder	
Frederick T -K So	1
Fumio Hobo	1
	[6]
Gota Kawai	P20Y P3
oota hawai	1201, 10
G11 Hao	
Gu Hao	[µ]
Gu Hao	[H] 31
Gu Hao Hajime Kamoshida	[H] 3L3L3L3L3L3L
Gu Hao Hajime Kamoshida Hazuki Takahashi	[H] 3L3
Gu Hao Hajime Kamoshida Hazuki Takahashi Hibi Kento	[H] 3L 3L
Gu Hao Hajime Kamoshida Hazuki Takahashi Hibi Kento Hibiki Terami	[H] 3L 3L 9 9 91 91 91
Gu Hao Hajime Kamoshida Hazuki Takahashi Hibi Kento Hibiki Terami Hideaki Takashima	[H] 3L 3L P1 P1 P
Gu Hao Hajime Kamoshida Hazuki Takahashi Hibiki Terami Hideaki Takashima Hideki Kandori	[H]3L 9 P1 P 1 1 2L4, P36Y, P4
Gu Hao Hajime Kamoshida Hazuki Takahashi Hibiki Terami Hideaki Takashima Hideki Kandori Hideyuki HARA	[H]3L 9 P1 P 1 1 1 2L4, P36Y, P4 P
Gu Hao Hajime Kamoshida Hazuki Takahashi Hibiki Terami Hideaki Takashima Hideki Kandori Hideyuki HARA Hikari Sakaebe	[H]3L 9 P1 P 1 1 1 2L4, P36Y, P4 P P
Gu Hao Hajime Kamoshida Hazuki Takahashi Hibiki Terami Hideaki Takashima Hideki Kandori Hideyuki HARA Hikari Sakaebe Hiroaki Terasawa	[H] 3L 3L 3L 33 P1 P1 P1 2L4, P36Y, P4 P P P P P
Gu Hao Hajime Kamoshida Hazuki Takahashi Hibiki Terami Hideaki Takashima Hideki Kandori Hideyuki HARA Hikari Sakaebe Hiroaki Terasawa Hiroaki Terasawa	[H] 3L 3 P1 P 1 2L4, P36Y, P4 P P P P P P P P 3 3 P1 P1 P36Y, P4 P36Y, P4 P36Y, P4 P P36Y, P4 P36Y, P4 P36Y, P4 P P36Y, P4 P36Y, P4 P40Y, P4P40Y, P4
Gu Hao Hajime Kamoshida Hazuki Takahashi Hibiki Terami Hideaki Takashima Hideki Kandori Hideyuki HARA Hikari Sakaebe Hiroaki Terasawa Hiroki Nagashima	[H] 3L 3 P1 P 1 2L4, P36Y, P4 P P P P P P P P P P P P P P P _
Gu Hao	[H] 3L 3 P1 P1 P1 P2L4, P36Y, P4 P2L4, P36Y, P4 P2 P2 P2 P2 P2 P2 P3 P2 P2 P2 P3 P3 P3 P3 P3 P3 P3 P3 P3 P3
Gu Hao	[H] 3L 3 P1 P1 P1 P2L4, P36Y, P4 P2L4, P36Y, P4 P2 P2 P2 P2 P2 P3 P2 P3 P2 P3 P3 P3 P3 P3 P3 P3 P3 P3 P3
Gu Hao	[H] 3L 3 P1 P1 P2L4, P36Y, P4 P P P P P P P P 1 3 2 L4, P36Y, P4 P P P 1 3 1 3 1 3 1 3 1 3 1 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
Gu Hao	[H] 3L 3 P1 P1 P2L4, P36Y, P4 P P P P P P P 1 3 2 L4, P36Y, P4 P P P 1 3 1 1 1
Gu Hao	[H] 3L 3L 3L 3 P1 P P P 2L4, P36Y, P4 P P P P P P P P P P P P P
Gu Hao	[H] 3L 3 3 P1 P P 1 2L4, P36Y, P4 P P P P 9 P 1 33 1 1 1 P 1 33 1 1 1 P3 3L 31 3L
Gu Hao	[H] 3L 3 3 P1 P P 1 2L4, P36Y, P4 P P P P 9 P 1 33 1 33 1 P 1 33 1 P 1 33 31
Gu Hao	[H] 3L 3 3 P1 P P 1 2L4, P36Y, P4 P P P P P P P 33 P 1 33 P 1 P 33 P 33 I 1 P3 31 II 1 II 1 II 1 II 1 II 1 III 1
Gu Hao	[H] 3L 3 3 P1 P P 1 2L4, P36Y, P4 P P P P P P 1 33 1 1 33 1 1 P3 3L [0] P5
Gu Hao	[H] 3L 3 3 P1 P P 1 2L4, P36Y, P4 P P P P P P 1 33 1 1 1 P3 3L [I] P5 1L3, 3L 1L3, 3L
Gu Hao	[H] 3L 3 3 P1 P P 1 2L4, P36Y, P4 P P P P P I 33 I 33 I 33 I 1 P3 3L II P5 IL3, 3L 1L3, 3L
Gu Hao	[H] 3L 3 3 P1 P P 1 2L4, P36Y, P4 P P P P P 1 33 9 P 1 33 1 1 93 31 1 1 1 1 1 1 1 <t< td=""></t<>
Gu Hao	[H] 3L 3 3 P1 P P 1 2L4, P36Y, P4 P P P P 9 P 9 S3 1 S3 1 S3 1 S3 1 S4 1 S4 1 S4 1 S4 1 S4 1 S5 1 S4 1 S5 1 S4 1 S4 1 S5 1 S4 1 S4 1 S5 1 S4 1 S5 1 S4 1 S4 1 S4 1 S4 1 S4 1 S4 1 S5 1 S4 1 S4 1 S4
Gu Hao	[H] 3L 3 3 P1 P P 1 2L4, P36Y, P4 P P P P 9 P 9 33 1 34 1 93 3L 10 1 P5 1L3, 3L 1L3, 3L 1L3, 3L 2L4, 2L5, P18Y, P36Y, P41, P4

Jean-Paul Amoureux3L6,	P40,	3L6,	P40
Julien Trébosc			3L6
Jun Fukazawa			1L5
Jun KikuchiP17, P19, P24Y, P25,	P50,	P53,	P56
Junya Okude			1L3

	[K]
K. Takegoshi	P42Y
Kaori Wakamatsu	P10Y, P37, P54Y
Kato Takasumi	P3
Katsuaki Suzuki	3L4
Kayoko Nagata	P23
Kazu Tajima	PS
Kazuhiko Sato	3L5, 3L6, P28Y
Kazuhiko Yamada	3L7
Kazuo Hosoda	P54Y
Kazuo Kuwata	P29
Kazutomo Ori	1L3
Kazuyoshi Ueda	P41
Kazuyuki Kumagai	P23
Kazuyuki Kuwano	P55
Kazuyuki Takeda	1L4, 2L1, P6Y, P42Y
Keigo Kumagai	3L2
Keiichi Inoue	2L4, P36Y, P44Y
Keiji Shimoda	P13
Keisuke Kamba	P16, P23
Keita Tateno	P16, P23
Ken Ohmori	P7
Kengo Ito	P19, P50
Ken-ichi AKAGI	P53
Kenji Sakata	P17, P50, P53
Kenta Nakata	P49
Kentaro Fujita	P1
Kentaro Hanada	3L2
Kikukawa Takashi	P3
Kiyonori Takegoshi	3L4, P60
Koh Takeuchi	1L3, 3L10
Kohei Murayama	P56
Kohno Toshiyuki	P10Y
Koichiro Miyanishi	1L4, P6Y, P35, P58Y
Koji Usami	2L1
Koki Hara	P25
Koki Morita	P32Y
Kotaro Okada	P39
Kousuke Inomata	P31
Kousuke Kashihara	P48Y
Koya Minami	2L7
Kumaki Yasuhiro	P3
Kurokawa Yuka	P10Y
Kuzunuki Erina	P10Y
Kyoko Furuita	2L6, 3L3
	[L]
Li Wan	P16, P23
	[M]
Maako Tabata	P43
Maiki Tamura	P57
Makoto Motoyama	P58Y
Makoto Negoro	1L4, P6Y, P12, P35, P58Y
Mami Uchiyama	3L8
Marina Hiraoka	3L3
Masahiko Ohtaka	P11
Masahiro Kitagawa	1L4, P6Y, P12, P35, P58Y
Masahiro Shikano	P13
Masahiro Shirakawa	1L4
Masaki Mishima	1L2, P9, P14Y, P31, P37, P43
Masanori Fujiwara	P32Y
Masao Morita	P7
Masaru Tomita	P33
Masashi Annen	P59
Masataka Wakayama	P33

Masato Katahira	P16, P23
Masatsune Kainosho	1L1
Matsuda Isamu	P1
Mengiun Xue	3L9
Michael Feig	P29
Mijiddori Batsalkhan	P41
Mikiko C. Siomi	P38Y
Mitsuhiro Takeda	1L1, P21
Mitsuru Toda	P30
Mitsuru Toda	P45
Miwa Fujisaki	3L10
Miwa Murakami	2L3, P13
Mohammad Jafar Tehrani	P51
Motohiro Mizuno	P8, P47, P59
Motomasa Tanaka	P29
Mulder Frans	3L9
Munehiro Inukai	P47
Muneki Uouchi	P48Y
NT 1 · 17 1 1 ·	
Naoniro Kobayashi	P46, 2L7, 3L2, P44Y, P46
INAOKI ASAKAWA	P55
Naoki Ichijo	P58Y
Naomi Takase	P38Y
Naoya Nakagawa	P5
Natsumi Kamiya	Р2Ү
Nobuaki Nemoto	P7
Nobuyasu Koga	2L7
Norikazu Mizuochi	1L4, P32Y
Noriko Kanai	2L5, P18Y
Norio Tokuda	РЗ2Ү
Noriyuki Tanimoto	P15
	[0]
Olivier Lafon	3L6
	[P]
Piero Carninci	3L1
Pooppadi Maxin Sayeesh	P31
	[R]
Rie Koga	2L7
Riki Watanabe	P31
Rina Kaneko	P44Y
Ryo Kitahara	3L9
Ryo Morishita	P16
Ryo Takahashi	P22
Ryo Yamawaki	P19
Ryosuke Kusumi	РбҮ
Ryota Une	P59
Ryota Watanabe	P8
Ryotaro Okabe	P52Y
Ryuji Igarashi	1L4
	[S]
Satoru Unzai	P16
Satoshi Horike	P47
Seiya Tajima	2L4
Seiya Tajima	РЗбҮ
Shibuki Suzuki	P44Y
Shigeki Hirakata	РЗ8Ү
Shigeki Takeuchi	1L4
Shin-ichi Terawaki	P54Y
Shinji Matsubase	P55
Shinji Tanaka	3L5, P28Y
Shinobu Onoda	1L4
Shintaro Sakuma	2L7
Shinya Ohki	P57
Sho Murata	P60
Shogo Amemori	P8, P59
Shohei Mikage	P2Y
Shoko Shinya	
Shunji Yamada	P24Y. P25
Sosuke Yoshinaga	P21
	121

	[T]
Tadashi Shimizu	P30
Taiga ASAKURA	
Taiichi Sakamoto	
Taiki Koizumi	
Takahiro Aizu	
Takahiro Kosugi	
Takahiro Nemoto	P30
Takahisa Ikeue	
Takako Obyama	
Takako Oliyalila	
Takanni Anuo	
Takanon Kigawa	
Takao Masuda	
Takao Yoda	
Takashi Mizuno	P30
Takashi Nagata	P16
Takashi Okitsu	
Takashi Tanaka	
Takehiro Kitaura	
Takeshi Ohshima	
Takeshi Takizawa	
Takumi Matsui	
Takumi Suzuki	
Takuro Wakamoto	
Takuya F. Segawa	
Takuya Kurihara	3L4, P8, P47
Takuya Suzuki	
Takuva Torizawa	
Tatsuki Ogura	
Tatsuva Matsunaga	P4 P22 P26 P49
Tanaya Wananaga	P31
Tepper Ikeya	131
Terawaki Shin-Ichi	
Тегиакі Ријно	
Tomoaki Sugisnita	IL6
Tomoki Yoshimoto	
Tomoko Urano	
Tomonori Ida	P8
Tomoyoshi Soga	
Toru Doi	
Toshihiko Sugiki	2L6, 2L7, 3L2
Toshihito Nakai	РЗС
Toshimichi Fujiwara	1L5, 1L6, 2L7, 3L2, 3L3, P27
Toshinobu Shida	
Toshio Koizumi	
Toshio Nagashima	2L7,
Toshio Yamazaki	2L7, 3L1. P26. P44Y
Toshivuki Kohno	·····
Tsukamoto Takashi	
Tsutomu Mikawa	
Tsutomu Torouchi	
1 Sutoniu Tel aucini	[V]
V	[4]
vogel Hans J	
117 ·	[W]
Wataru Mizukami	
William S. Price	2L5, P18Y, 2L5,
	[X]
Xue Mengjun	
	[Y]
Yasuhiko Yamamoto	
Yasuhiro Shigeta	P8
Yasuto Noda	3L4, P42Y
Yiling Xiao	
Yoh Matsuki	
Yohei Miyanoiri	
Yoko Shinobara	
Vochiaki Vemekeek!	DOC
Yoshiaki Yamakoshi	РЗС

Yoshiki Yamaguchi					P29
Yoshimitsu Asakura					P5
Yoshinori Onuki					P39
Yoshitaka Ishii 3L1, P1	, P4, P22,	P26, P46,	P48Y,	P49, P5	51, P52Y
Youhei Kawabata					P43
Yugo Tasei					P41
Yuji O. Kamatari					P29
Yuji Sugita					P29
Yuji Tokunaga				1I	L3, 3L10
Yuka Kurokawa					P54Y
Yuki Mogami					P30
Yuki Morishita					P6Y
Yuki Tanaka					2L6
Yumiko Nakajima				3I	.5, P28Y
Yumiko Ohhashi					P29
Yumiko Tsubakihara					P21
Yusuke Nishiyama				2	2L2, P47
Yusuke Suemoto					P31
Yuta Hibe					P42Y
Yuta Nakano					P32Y
Yutaka Ito		PS), P14Y,	P31, F	°37, P43
Yuto Sekikawa					P23
Yuu Hirose					P14Y
Yuuki Mogami					P45
Yuuri Tsuboi					P19
	[Z	<u>z]</u>			
Zixuan Wei					P4

五十音順 [あ]

[00]	
相沢智康	P03
会津貴大	P14Y
赤木謙一	P53
浅川直紀	P55
朝倉大河	P53
朝倉由光	P05
浅野敦志	P02Y
阿部浩之	1L4
雨森翔悟	P08, P59
安藤考史	P43
安念雅史	P59
[[1]	
池上崇久	3L8
池谷鉄兵	P43, P31
石井佳誉P52Y, 1	P01, P22, P48Y, P04, 3L1, P26
石田博昭	P03
石津大嗣	РЗ8Ү
井田朋智	P08, P59
一条直規	P09, P37, P14Y, P43, P31
伊藤研悟	P50, P19
伊藤隆	P09, P37, P14Y, P43, P31
犬飼宗弘	P47
井上圭一	2L4, P36Y, P44Y
猪股晃介	P31
今井美咲	3L10
[ɔ]	
魏菲菲	P50
上田一義	P41
宇佐見康二	2L1
内山真見	3L8
畝亮太	P59
生方輝	P55
浦野智子	P54Y
雲財悟	P16
[お]	
大内宗城	P48Y
大木出	P32Y, 1L4
大木進野	P57
大島武	1L4

大貫義則	P39
大橋祐美子	P29
大林カミーユ美智子	子P20Y
大森建	P07
大山貴子	3L1
岡田康太郎	P39
岡部遼太郎	P52Y
岡本千奈	3L8
沖津貴志	
奥出順也	1L3
小倉立己	P33
小野田忍	11.4
小里一友	
	[m]
田悲井正相	
▲ 川豆油 二	P12 P35 P58V P06V
据3.曲	214
他沉爽	
怕尿切與	
月 十止八 hu 恭	F10, F23
加藤貝純 ヘサ曲マ	PU3
亚 井興丁 ムフガケ	2L5,P18Y
玉丁利佘	
	P29
仲谷佘津美	P02Y
鴨志田一	3L10
河合剛太	РЗ8Ү
川端庸平	P43
川原裕之	P09
川村出	2L5, P18Y, 2L4, P36Y, P41, P44Y
神取秀樹	2L4, P36Y, P44Y
神庭圭介	P23
神庭圭佑	P16
	[き]
木川隆則	P31
木川隆則 菊川峰志	P31 P03
木川隆則 菊川峰志 菊地淳	P31 P03 P03 P56, P25, P24Y, P50, P53, P19
木川隆則 菊川峰志 菊地淳 北浦健大	P31 P03 P03 P56, P25, P24Y, P50, P53, P19 P48Y
木川隆則 菊川峰志 菊地淳 北浦健大 北川勝浩	P31 P03 P03 P56, P25, P24Y, P50, P53, P19 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y
木川隆則 菊川峰志 菊地淳 北浦健大 北川勝浩 北原亮	P31 P03 P03 P56, P25, P24Y, P50, P53, P19 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9
木川隆則 菊川峰志 菊地淳 北浦健大 北川勝浩 北原亮	P31 P03 P03 P56, P25, P24Y, P50, P53, P19 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9
木川隆則 菊川峰志 菊地淳	P31 P03 P03 P03 P56, P25, P24Y, P50, P53, P19 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P06Y
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P06Y P23
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P06Y P23 3L2 P54Y, P10Y P23 P23 P23
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P06Y P23 3L2 P03
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P10Y P12, P35, P06Y, P10Y P12, P35, P10Y P12, P12, P35, P10Y P12, P12, P12, P12, P12, P12, P12, P12,
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P10Y P66Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y P54Y
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P48Y P12, P35, P06Y, P53Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12 P12, P35, P06Y, P58Y P12 P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P54Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y P20
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12 P12, P35, P06Y, P58Y P06Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P55
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P48Y P12, P35, P06Y, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P06Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P48Y P12, P35, P06Y, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P06Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P50, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P06Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2]
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P24Y, P50, P53, P19 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2]
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P06Y, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P06Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P06Y, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P10Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P50, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P06Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P24Y, P50, P53, P19 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P25, P24Y, P50, P53, P19 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P10Y, P10Y, P10Y P10Y, P10Y P10Y, P10Y P10Y, P10Y P10Y, P10Y P10Y
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P24Y, P50, P53, P19 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P66Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P12, P35, P06Y, P58Y P23 P47, P08, 3L4, P59 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P03 P03 P03 P03
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P24Y, P50, P53, P19 P48Y P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P06Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P12, P35, P06Y, P58Y P23 P47, P08, 3L4, P59 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P12, P35, P06Y, P54Y P23 P11, P05 [2] P14Y P03 3L3, 2L6, 2L7, 3L2 P44Y
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P06Y, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P06Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P10Y, P54Y P10
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P03 P03 P03 P03
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P03 P03 P03 P03
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P06Y, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P06Y P06Y P23 312 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P10Y, P54
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P06Y, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y 3L9 [<] P54Y, P10Y P06Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P10Y, P53, P50 P11
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P06Y, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P06Y P06Y P23 312 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P10Y, P53, P50 P11, P12
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P06Y, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P06Y P23 3L2 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P10Y, P53, P50 P11, P11 P12, P12
木川隆則	P31 P03 P03 P03 P03 P12, P35, P06Y, P53, P19 P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P12, P35, P06Y, P58Y P06Y P06Y P23 312 P03 P47, P08, 3L4, P59 P10Y, P54Y P29 P55 P11, P05 [2] P14Y P02Y P10Y, P54Y P10Y, P53, P50 P13 P14

館野昌弘	-P381]		品見美紀丁
田泰宏	P13			眨野昌弘
観光佳碁 -P26, EHB信	8, P59	P08,		〔田泰宏
田崎信	6, PO4	P26,		意光佳基
論女希子 113,3 新水箱 113,3 所本箱 113,3 所本箱 113,3 所本第二 113,3 所本第二 113,3 所本第二 113,3 所本第二 113,3 所本第二 113,3 所家龍子 [4] 二日常 113,3 「本第二 113,3 「本第二 113,3 「「第二 114,3 「「第二 114,3 <t< td=""><td> P29</td><td></td><td></td><td>5田俊信</td></t<>	P29			5田俊信
田一夫 ────────────────────────────────────	-P54]		局崎安希子
请水嶺 [1] JIII 昌会	3L10	1L3, 3		}田一夫
F田県士 [4] 川昌宏 [4] 「家粧子 [4] 「家枕浴 3L2, 2L7, P35, 575, 52, 52, 52, 52, 52, 52, 52, 52, 52, 5	P30			青水禎
111 [4] Swith 7 [4] kk/kh /	P13			「田景士
新家報子 [4] 未松浩人	1L4			1川昌宏
kbild kkild kkild kkild skild skild <t< td=""><td> 3L2</td><td></td><td>[+1</td><td>「家粧子</td></t<>	3L2		[+1	「家粧子
未元雄介 31.2、2L7、P35、 冬木皮膚 31.2、2L7、P35、 ※下友晃 第下友晃 ※町有治 第 命木如明 第 命木和已 [七] 潮川湧斗 [七] 「【七】 第 [七] 高新星史 [七] 高新星史 [七] 高新星中 [七] 高新星中 [七] 高新星中 [七] 「時酒 31.10、 竹皮膚 31.10、 竹皮膚 31.10、 竹皮膚 31.10、 竹皮膚 31.10、 竹皮膚 921、 武田和行 221、 三日馬型 921、 二日馬車 214、 日間所指 214、 日間所指 110、 四丁葉 110、 日中之 111、 日中之 111、 日中之 111、 日日東言 111、 日日東言 111、 日日東三 111、 日日東三 111、 日日東三 111、 日日東三 111、 </td <td> 1L6</td> <td></td> <td>[9]</td> <td>₹松浩人</td>	1L6		[9]	₹松浩人
S木俊彦 312, 217, P35, S木友見 57友見 S下友見 57友見 S木花日 6 S木木田 6 S木木田 [世] 朝川速斗 [七] 雪泉明惑 [七] S編集月 [七] S編集月 5 S編集月 [七] S編集月 [10] Thy [10] Thy [11] Bigfth [12] Bigfth [12] Bigfth [12] C1 [13] Bigfth [12] C1 [13] Bigfth [12] C1 [13] Bigfth [12] C1 [13] Bigfth	P31			€元雄介
第左友晃 第右太郎 第右太郎 第右太郎 第木招 第右太郎 常木招 [七] 第小兒 [七] 第小兒 [七] 第小兒 [七] 常我明義 [七] 第新星史 [七] 第新星史 [七] 第新星史 [七] 第新星史 [七] 第新星史 [七] 第編集月 [七] 第編集月 [七] 第編集月 [七] 第編集月 [七] 第編集月 [七] 第編集日 [七] 第編集日 [七] 第編集日 [七] 第編集日 [七] [1] [1] [1] [1] [1] [1] [1] [1] [1] [1] [1] [1] [2] [1] [2] [2] [3] [2] [4] [2] [5] [2] [4] [2] [5] [5] <t< td=""><td>i, 2L0</td><td>3L2, 2L7, P35,</td><td></td><td>《木俊彦</td></t<>	i, 2L0	3L2, 2L7, P35,		《木俊彦
第万友晃 第月有治 第本有已 第本有已 第本市日 [世] 第川勝斗 [老] 算我朋義 [老] 第新見史 [老] \$	1L6			《下友晃
第日有治 含木2明 合木拓巳 合木拓巳 合木拓巳 合木石巳 合木石巳 合木石巳 二 本七 ふき 【世】 別川涛斗 【行】 着我明義 【た】 新斯晃史 高高秀聡 高編太周 高編太周 高編太周 高編太周 高編太周 二 高編太周 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二	P27			/下友晃
鈴木垣巴 [七] 鈴木垣巴 [七] 御川湧斗 [七] 雪我朋義 [七] 雪我朋義 [左] 高橋家里 [左] 高橋家里 [左] 高橋家里 [左] 高橋家里 [左] 高橋家里 [左] 高橋京島秀聡 [左] 高橋京都三 [五] 「「「」 [左] 「「「」 [左] 四川光広 [2] 四川市行 [2] 四川市行 [2] 四川市行 [2] 四川市 [5] 四川支 [5] 四川支 [5] 四川支 [5] 四川支 [5] 四川支 [5] 「」 [5] 「」 [5] 「」 [5] 「」 [5]	P29			/田有治
鈴木拓也 [世] 鈴木石之ぶき [世] 別川湧斗 [七] 算我明義 [七] 「新見史 [左] 高新麗直美 [五] 高橋集月 [五] 高橋東月 [五] 高橋東月 [五] 高橋東月 [五] 高橋東月 [五] 高橋東月 [五] 高橋東川 [五] 高橋東川 [五] 「物素樹 [五] 「竹「「「」 [五] 「四月 [五] 「四月 [五] 「四月 [五] 「四月 [五] 「四月 [五] 「四月 [五] 四月 [五] 四月 [五] 四月 [5] 四月 [5] 四日 [5] 四日 [5] 四日 [5] 「四月 [5] 「四月 [5] 「四月 [5] 「四月 [5] 「四月 [5] 「四月 [5] 「四月<	3L4			补克明
第本托也 [世] 第小儿ぶき [七] 第小別湧斗 [七] 算我朋義 [七] 富林東男 [左] 高橋葉月 高橋葉月 高橋葉月 高橋葉月 高橋葉月 高橋葉月 高橋葉月 二 二月 二 四月 二 二日 二 二日 </td <td> P09</td> <td></td> <td></td> <td>补拓巳</td>	P09			补拓巳
【世】 期川湧斗 【老】 算我朋義 【老】 當時又史 「た」 高島秀聡 「「た」 高橋菜月 「「た」 高橋菜月 「「市」 高橋菜月 「「市」 高橋菜月 「「市」 高橋菜 「「市」 高橋菜 「「市」 「「「「「「「「「」 「「」 「「「」 「」 「「」 「」 「「」 「」 「「」 「」 「「」 「」 「「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」 「」	P23			补拓也
Itel Implies [*] Implies [*] Implies [*] Implies [*] Implies Implies <	-P44]	[14]	沐しぶき
[₹] ^j 4JIIl §AJIIL	P23		[t]	訓]) 湧斗
[太] 高析泉史 高橋菜月 高橋菜月 高橋菜月 高橋菜月 高橋菜月 高橋菜月 高橋菜月 高橋涼 竜沢剛 竹内繁樹 竹内繁樹 一 竹内繁樹 一 二 高橋涼 竜沢剛 「方別 「御清乃理 一 四形広 二 日島住寿 三 三 三 三 二	D23		[そ]	許明義
高島秀聡 」 高橋次樹 」 高橋次樹 二 高橋次樹 二 高橋次 二 二 7 京橋次 21,10,427,1 町 21,17,427,1 町島佳寿 21,1,1427,1 町島佳寿 21,1,1427,1 町自島佳寿 二 1日申孝 31,5,1 町中三醋 31,5,1 町中三醋 31,5,1 町中三醋 1,5,1 町中三醋 1,5,1 町中三醋 1,5,1 町山支生 1,5,1	r 33		[た]	7我加我
高橋葉月 高橋菜月 高橋菜月 高橋菜月 高橋菜 御門,四 竹肉繁樹 竹肉繁樹 竹肉繁樹 竹肉紫樹 竹肉紫樹 竹肉紫樹 「竹肉紫樹 「竹肉紫樹 「竹肉紫樹 「日二 二日	P23			新晃史
高橋葉月 」 高橋太樹 二 高橋次樹 二 資内繁樹 3L10, 竹内檀 3L10, 竹肉常湯乃理 -P42Y, P60, 武田和行 -2L1, P42Y, 1 田島佳寿 2L1, P42Y, 1 国島佳寿 2L1, P42Y, 1 国島佳寿 2L1, P42Y, 1 国島佳寿 2L1, P42Y, 1 田島佳寿 2L4,1 田制伯倍 3L5,1 田中麦	1L4			写島秀聡
高橋葉月	-P38]		5瀬直美
高橋大樹	3L			高橋葉月
高橋涼 3 竜沢剛 3 竹内塩 3 竹内塩 3 竹内塩 3 竹内塩 3 竹内紫樹 P21, 小田北広 P21, 八田和行 2 10 1 11 1 12 1 13 1 14 1 15 1 11 1 12 1 14 1 15 1 14 1 15 1 14 1 15 1 14 1 15 1 14 1 15 1 14 1 15 1 15 1 16 1 17 1 16 1 17 1 16 1 17 1 17 1 <	1L6			5橋大樹
範沢剛	P22			馬橋涼
竹内繁樹 3L10, 竹陵清乃理 P42Y, P60, 武田光広 P21, 武田和行 2L1, P42Y, I 田島佳寿 2L4, 田島佳寿 2L4, 田申真司 3L5, 田中孝 3L5, 田中之雅 1 田中己樹 3L5, 近山英輔 [5] 近山英輔 [5] 近山英輔 [7] 繁智海 [7] 鄭智海 [7] 鄭自興 [7] 鄭自興 [7] 鄭智海 [7] 鄭智海 [7] 「7] [7] 鄭智海 [7] 「7] [7] 鄭雪 [7] 「7] [7] </td <td>- 3L10</td> <td></td> <td></td> <td>〕沢剛</td>	- 3L10			〕沢剛
竹樹着 3L10, 竹腰清乃理 P42Y, P60, 武田光広 P21, 武田和行 2L1, P42Y, I 田島佳寿 2L4, 田朝伯悟 3L5, 町中夏司 3L5, 田中夏司 3L5, 田中夏樹 3L5, 日中孝 1 田中夏樹 3L5, 日中夏七 (5) 近山英輔 [5] 近山英輔 [5] 近山英輔 [7] 繁智海 [7] 鄭智海 [7] 鄭田 [7] 鄭智海 [7] 鄭智海 [7] [7] [8]	1L4			访内繁樹
竹腰清乃理 P42Y, P60, 武田和方 P21, 武田和方 2L1, P42Y, I 田島佳寿 2L4, 田朝佑悟 2L4, 田朝佑悟 3L5, 田中夏司 3L5, 田中夏司 3L5, 田中夏司 3L5, 田中夏司 3L5, 田中夏樹 3L5, 日中夏七 [5] 丘山英輔 [5] 丘山英輔 [5] 反山英輔 [7] 家本卓 [7] 鄭智海 [7] 「1 [7] 鄭智海 [7] 「2] [7] 「2] [7]), 1L3	3L10,		访内恒
武田和行 P21, 武田和行 2L1, P42Y, 1 田島佳寿 1 田島生寿 2L4, 田申真司 2L4, 田申真司 3L5, 田中真司 3L5, 田中真司 3L5, 田中真司 3L5, 田中真司 3L5, 田中之報 1 田中之報 1 日中之報 1 「つ」 (5) 広山英輔 [5] 広山英輔 [7] 家本卓 [7] 「不) (7) 鄭智海 [7] 鄭貴子 [7] 鄭智海 [7] 「1 [7] 鄭智海 [7] 「7] [7] 「7] [7] <td>), 3L4</td> <td>P42Y, P60,</td> <td></td> <td>丁腰清乃理</td>), 3L4	P42Y, P60,		丁腰清乃理
武田和行 2L1, P42Y, I 田島佳寿 2L4, 国場聖也 2L4, 田申真司 3L5, 田中真司 3L5, 田中真司 3L5, 田中之瑞 3L5, 田中之端 3L5, 田中之端 3L5, 田中之端 3L5, 田中之端 3L5, 田中之端 5 広山英輔 [5] 広山英輔 [5] 広山英輔 [7] 家本卓 [7] 「7] 鄭智海 鄭二 [7] 鄭智海 [7] 鄭智海 [7] 鄭智海 [7] 鄭智海 [7] 鄭二 [7] 鄭智海 [7] 鄭智海 [7] 鄭智海 [7] 鄭二 [7] [7] [7]	, 1L1	P21,		代田光広
田島佳寿	P06Y	2L1, P42Y, J		代田和行
国馬聖也 214. 田申衛 214. 田申真司 31.5. 田中之邪 31.5. 田中己樹 31.5. 四山之前 31.5. 四山	P09			3島佳寿
田制侑悟	4,P36Y	2L4,J		日馬聖也
館野桂太 31.5. 田中真司 31.5. 田中之雅 31.5. 田中己樹 31.5. 日中己樹 63 谷本典之 63 五山英輔 [5] 近山英輔 [5] 灰山英輔 [7] 家本卓 6 春原由美子 [7] 鄭智海 [7] 丁白誠雪山美子 [7] 鄭田貴美子 [7] 鄭田貴美 [7] 鄭太子 [7] 「7] [7] 鄭智海 [7] 「7] [7] 鄭田貴美子 [7] 「7] [7] 鄭田貴美子 [7] 「7] [7] 鄭田貴美子 [7] 「7] [7] 「7] [7] 「7] [7]	P41			3制侑悟
田中真司	P43			自野桂太
田中孝 田中元雅 田中邑樹 谷本典之 田瑞真彩子 田樹真生 [5] 近山英輔 [つ] 家本卓 春原由美子 平井裕理 [て] 鄭智海 鄭章代 七村献 吉内勉 与別数 写 上井徹	5,P28Y	3L5,!		3中真司
田中元雅 田中邑樹 今本典之 田瑞真彩子 田村真生 [5] 近山英輔 [つ] 家本卓 春原由美子 平井裕理 [7] 幣智海 (て] 幣智海 「7] 幣智海 「7] 幣智海 「7] 幣智海 「7]	P15]中孝
田中邑樹 今本典之 田瑞真彩子 田村真生 [5] 近山英輔 [つ] 家本卓 春原由美子 平井裕理 [7] 鄭智海 「7] 鄭智海 「7] 鄭智海 「7] 鄭智海 「7] 「7] 「7] 「7] 「7] 「7] 「7] 「7] 「7] 「7]	P29			9中元雅
公本典之 田端真彩子 田村真生 「ち」 近山英輔 「つ」 家本卓 海原由美子 平井裕理 【て】 鄭智海 「て」 鄭智海 「て」 鄭智海 「て」 鄭智海 「た」 上村献 「こ」 上井徹 四田村夫 四日村夫	2L6			日中邑樹
田端真彩子 田村真生	P1?			本典之
田村真生 [5] 近山英輔 [7] 家本卓	D41			
[5] 近山英輔 [つ] 家本卓 零月由美子 平井裕理 [て] 鄭智海 「て] 丁 上村蔵 「と]	14]端真彩子
近山英輔 [つ] 塚本卓	P43			3端真彩子 3村直牛
家本卓 [7] 審督海 [7] 鄭智海 [7] 「日本 [7]	P43 P57		[5]	1端真彩子 1村真生
春原由美子 平井裕理 [7] 郡智海	P43 P57 P24Y		[5] [ว]	1端真彩子 1村真生 江山英輔
平井裕理 [7] 鄭智海	P57 P243 P0?		[ち] [つ]	1端真彩子 1村真生 近山英輔 禄本卓
[7] 鄭智海	P43 P57 P24 P03	·······	[ち] [つ]	1端真彩子 1村真生 江山英輔 禄康由美子
聯督海	P37 P24 P03 P21 P19]]	[5] [7]	1端真彩子 1村真生 〔山英輔 章本卓 潁由美子 『井裕理
^郡 章代	P43 P57 P24 P03 P21		[5] [7] [7]	1端真彩子 1村真生 近山英輔 禄本卓 塚原由美子 7井裕理
出村誠	P43 P24 P24 P03 P13 P11		[5] [7] [7]	1端真彩子
特内勉	P43 P57 P03 P21 P19 P11		[ቴ] [つ] [τ]	1端真彩子 1村真生 近山英輔 禄本卓 禄原由美子 野井裕理 『智海 『章代
寺沢宏明	P43 P57 P57 P03 P13 P11 P15 P03		[5] [つ] [τ]	1端真彩子
寺見響	P24 P24 P03 P21 P11 P11 P15 P13		[෪] [つ] [7]	1端真彩子
寺脇慎一	P24 P24 P24 P21 P11 P11 P11 P13 P13 P13		[෪] [つ] [7]	1端真彩子 1村真生
[と] 上井徹 恵田規夫			[෪] [つ] [7]	1端真彩子 1村真生
上井徹	P243 P243 P00 P22 P11 P11 P15 P00 1L1 P22 P26 P543	P10Y, J	[෪] [つ] [7]	1端真彩子
密田規夫	P243 P243 P00 P2 P11 P11 P11 P11 P12 P22 P243	P10Y, 1	[t] [c] [7] [7] [5]	1端真彩子
1.5.10 · ·	- P24) - P24) P22 P12 P12 P12 P22 P22 P26 P54) P12	P10Y, 1	[෪] [つ] [て] [7]	1端真彩子 1村真生
恵永裕二 1L3, :	- P243 - P243 P243 P22 P12 P15 P15 P15 P26 P543 P12 P12	P10Y, 1	[෪] [つ] [て] [7]	瑞真彩子 山英輔 近山英輔 減加支払 減加支払 減加支払 第 二 第 二
^当 田充		P10Y, 1	[₺] [フ] [フ] [෭]	瑞真彩子 山英輔 近山英輔 武本卓 京山黄葉子 野井裕理 郡章代 小山菜明 京次宏明 デ服慎一 二井徹 奥大裕二

冨田勝	P33
鳥澤拓也	1L3
	[な]
内藤晶	P41
中并利仁	P30
中川直哉	P05
永島裕樹	3L6
長島敏夫	2L7
長島敏雄	P44Y
中島弘稀	P37
永田佳代子	P23
中田拳太	P49
水田宗	P16, P23
中野裕太	P32Y
	[(2]
西山裕介	2L2, P47
	[ね]
根来誠	P58Y, P12, P06Y, P35, 1L4
根本暢明	P07
根本貨宏	P30
	[の]
野田泰斗	3L4, P42Y, P60
	[[4]]
花田賢太郎	3L2
原光輝	P25
原英之	P34
半沢宏之	3L10
	[v]
日比健人	P10Y
日部雄太	P42Y
平岡万里菜	3L3
平形樹生	РЗ8Ү
広瀬侑	P14Y
	[ふ]
深澤隼	1L5
藤崎美和	3L10
藤田健太郎	P01
藤戸輝昭	P41
藤原敏道	-1L5, 3L3, P27, 3L2, P35, 1L6, 2L7
藤原正規	P32Y
毒島いぶき	P54Y
古板恭子	3L3, 2L6
	[[£]
細田和男	P54Y
保母史郎	1L6
堀毛悟史	P47
	[ま]
松井拓海	P35
松木陽	1L6, P27, 1L5
松田勇	P01
松永達也	P04, P49
松永達弥	P22, P52Y, P26
松葉瀬真二	P55
万里	P16, P23
	[み]
三影昇平	P02Y
美川務	P43
三島正規	1L2, P37, P09, P31, P14Y, P43
水落憲和	РЗ2Ү
水上渉	P58Y
水野敬	P45, P30
水野元博	P47, P08, P59
南慎太朗	2L7
宮西孝一郎	1L4, P58Y, P06Y, P35
宮ノ入洋平	1L1, P14Y
	[む]
村上美和	2L3, P13
村田泉	P17
村田翔	P60, 3L4

村山昂平		P56
	[も]	
最上祐貴		P30
本山誠		P58Y
百武篤也		3L8
森下裕貴		P06Y
森下了		P16
森田勇人		-2L6, P57
森田将夫		P07
森田航希		P32Y
	[や]	
山口芳樹		P29
山腰良晃		P30
山崎俊夫	3L1, 1	P26, P44Y
山田和彦		3L7
山田隼嗣]	P24Y, P25
山本泰彦		3L8
山脇涼		P19
	[よ]	
横山大稀		P56
吉永壮佐		P21
吉本智貴		P32Y
依田隆夫	P09, P37, P14Y,	P43, P31
	[わ]	
若松馨	P37, P	10Y, P54Y
若本拓朗		3L9
若山正隆		P33
和田昭盛		P44Y
渡邉吏輝		P31
渡邉陵太		P08

キーワード検索

数字

	20 J
15N 直接検出	1L3
19F 高速 MAS	P47
1H-detection	P46
29Si-NMR	P30
7 回膜貫通型タンパク質	2L4, P36Y
アル・	ファベット
	[A]
Amyloid beta (A β)	P51
antimicrobial peptides	РЗ
Arctic mutation (E22G)	P51
A β fibrils	P46
Αβ42	P1
	[B]
Barnett effect	2L1
	[C]
calmodulin	P3
CERT	3L2
Choline-O-Sulfate (COS)	P10Y
cis-element	P38Y
CPMAS	P49
CYANA	2L6
	[D]
Diamond	1L4
DIRECTION-HSQC	P15
DNP-NMR	3L6
DNP 効率	1L5
Dynamic Nuclear Polarization	1L5
	[E]
EGCG	P1
	[F]
fast MAS	2L2
FID 信号処理	P24Y
field-sweep MRI	P55
	[H]
Heteronuclear Overhauser Effect	P7
HIV-1	P20Y
Homonuclear recoupling	P22
Hyperpolarization	1L4
	[J]
J 相関	3L4
	[L]
long non-coding RNA	3L1
	[M]
MQMAS	P40
Multidimensional NMR	P22
multilayer film	P55
multi-quantum	2L2
	[N]
NDSB	P37
neodymium magnet	P55
NQR	3L7
Nuclear quadrupole resonance (NQR)	P42Y
N- 結合型糖鎖	P15
	[P]
PCS	P43
piRNA	P38Y
PRE	P43
protein analysis	P52Y
	[Q]
qNMR	РЗЗ
quadrupolar interaction	3L7
quadrupolar nuclei	P40
	[R]
Rab	Р9
rapid scan NQR	P42Y
RNA	P20Y

RNA 結合モチーフ	2L6
[S]	
secondary structure	P38Y
Solid-state NMR (SSNMR)	P51
Solid-state NMR	3L7, 2L2, P52Y
solvent suppression	P52Y
spin-rotation coupling	2L1
SSNMR	P46
stable isotopic label	РЗ
STMAS	P40
Sup35	P29
surface acoustic wave (SAW)	2L1
נדז	
TDNMR	P34
Triplet-DNP	1L4
[U]	
UFMAS	P22, P49
[V]	
Y15N 直接観測	1L2
Vif	P23

五十音順 [あ]

		L 03					
アプタマー							P23
アミノ酸代謝							P53
アミロイド化							P10Y
アミロイド線維							P26
アルツハイマー病							P1
α 2A アドレナリン受容体							P54Y
安定同位体標識法							1L1
		[い	1				
イオン伝導体							2L3
位置特異的安定同位体標識。							P20Y
異種核多次元 NMR							P31
		٢ż	1				
エタノール・ヘキサン混合法	容液	• •					P41
液体金属							P11
1XTT LEAP		۲a	1				
オペランド NMR							P13
		Г'n	. 1				110
ガス吸差		۳.	1				P47
ルペシフト							D5
ルチンフトレジンフト444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444444<l< td=""><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>21 2</td></l<>							21 2
加藤							D10V
加城神)生							1 401 D 40V
米 ()							r401 21.10
頃小 マクテト							3L10
被扣							P39
版和I件机							PZ3
板和时间							PZY, PII
緩和時間計具							P58Y
L		[ð	1				01.0
+ヤビディー							3L9
機械字習						P17	, P53, P56
機能的 MRI							P21
焦肉							P50
凝集							P39
凝集防止							P10Y
局所構造							P27
金属 - 有機構造体							P47
		[<]				
クライオコイル MAS							P30
クラミジア・トラコマチス							3L2
		[け	1				
計測インフォマティクス							P19
		[2	1				
固体 DNP-NMR						3L4,	3L5, P28Y
固体 NMR	P25,	1L6,	2L4,	P19,	P26,	P36Y,	P44Y, P59
固体NMR							P2Y
固体重水素 NMR							P8

固体電解質	P8
光受容タンパク質	P14Y
光触媒	P60
好冷性細菌	2L6
構造解析	2L7
構造機能相関	P57
行列因子分解	P24Y
酵素反応	P16
高圧	3L9
高温 NMR 測定	2L3
高感度	P45
高感度プローブ	P30
高磁場・極低温	1L6
高分解能固体 NMR	P60
高分子	3L5, P28Y
高分子物性	P19
高分子量タンパク質	1L3
高分子量蛋白質	1L1
黒色金ナノ粒子	P60
[さ]	
细胞添温迁州	
和印色力组织自己	3L10
和心22週7日 ビージョン	3L10 P25
和加加22回日日 材料シミュレーション [し]	3L10 P25
和加加20回日日 材料シミュレーション レ] シアノバクテリオクロム	3L10 P25 1L2
和1702回日日 材料シミュレーション	3L10
和応辺通信ビー 材料シミュレーション	3L10
MIRUSUMATE 材料シミュレーション	
MIRUSUBIAE 材料シミュレーション	
MIRUSUBICIE 材料シミュレーション	
和応辺過活ビー 材料シミュレーション	3L10 P25 1L2 P2Y 1L5 P58Y 3L6
和応辺過活ビー 材料シミュレーション	3L10 P25 IL2 P2Y IL5 P58Y 3L6
MIRUZumicitz 材料シミュレーション 【し】 シアノバクテリオクロム ジブロモアントラセン シミュレーション シングレット状態 四極子核 四重鎖 DNA 脂質 磁場勾配 NMR 磁場和向	3L10 P25 1L2 P2Y 1L5 P58Y 3L6 3L8 2L5, P18Y P58Y 9582 959 9582 95787 9578 9578 9578 9578 9578 9578 9578 9578 9
MIRUSUBICIE 材料シミュレーション [し] シアノバクテリオクロム ジブロモアントラセン シミュレーション シングレット状態 四極子核 四重鎖 DNA 脂質 磁場勾配 NMR 磁場和向 NMR 磁場和向 自己拡散係数	3L10 P25 1L2 P2Y 1L5 P58Y 3L6 3L8 2L5, P18Y P6Y P6Y P6Y P6Y P18Y
MIRUSDERICE 材料シミュレーション [し] シアノバクテリオクロム ジブロモアントラセン シミュレーション シングレット状態 四極子核 四重鎖 DNA 脂質 	3L10 P25 1L2 P2Y 1L5 P58Y 3L6 3L8 2L5, P18Y P6Y P6Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y
MIRL/D_minite 材料シミュレーション 【し】 シアノバクテリオクロム ジブロモアントラセン シミュレーション 四極子核 四重鎖 DNA 脂質 磁場勾配 NMR 磁場和向 自己拡散係数 自動解析 手法開発	3L10 P25 1L2 P2Y 1L5 P58Y 3L6 3L8 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P32Y
和池辺辺西はビー 材料シミュレーション 【し】 シアノバクテリオクロム ジブロモアントラセン シミュレーション 四極子核 四重鎖 DNA 脂質 磁場和配入 協動配向 自己拡散係数 自動解析 手法開発 周波数掃引	3L10 P25 1L2 P2Y 1L5 P58Y 3L6 3L8 2L5, P18Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y P32Y P32Y P42Y
和池辺過活ビー 材料シミュレーション	3L10 P25 1L2 P27 1L5 P58Y 3L6 3L8 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P215, P18Y P215, P18Y P215, P18Y P224, P18Y P242Y P42Y
和池辺過店ビー 材料シミュレーション	3L10 P25 1L2 P27 1L5 P58Y 3L6 3L8 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P215, P18Y P220 P42Y P44Y 3L5, P28Y
Minicipied Classical Constraints 材料シミュレーション 【し】 シアノバクテリオクロム ジブロモアントラセン シミュレーション シングレット状態 四極子核 四重鎖 DNA 脂質 磁場勾配 NMR 磁場和配向 自己拡散係数 自動解析 手法開発 周波数掃引 重水素 - 水素交換 触媒 新型コロナウイルス	3L10 P25 1L2 P27 1L5 P58Y 3L6 3L8 2L5, P18Y 2L5, P18Y 2L5, P18Y 2L5, P18Y 2L5, P18Y P6Y 2L5, P18Y P42Y P44Y 3L5, P28Y

[す]

スピノフィリン	P54Y
スピロ環	P7
スピン拡散	P34
スピン軌道相互作用	P5
水素結合	P37
[7]	
創薬	P35
相互作用	P15
相転移挙動	2L3
側鎖重水素標識	P26
[た]	

[た]	
ダイナミクス	3L10
ダイヤモンド NV 中心	P32Y
タンパク質間相互作用	P16, 3L3
多様性	P50
短時間フーリエ変換	P24Y
蛋白質動態	1L1
蛋白質立体構造解析	P43
[7]	
定量性	P33
天然ゴム	P48Y
天然存在比試料	P49
天然変性タンパク質	P29
[と]	
トリプレット DNP	P6Y, P35
統合解析	P17
動的核分極 (DNP)	P27
動的核分極 (DNP) 法	1L6

動的核偏極		P12
同軸チューブ		P33
	[な]	
ナノ粒子		P11
	[に]	
二次元時間領域 NMR		P50
匂い		P21
	[は]	
バイオ医薬		1L3
発色団		P14Y
	[7]]	
ピーク分離		P56
去而構造解析		316 314
衣面伸起开机	r & 1	510, 514
フォールディング安定州	[35]	D21
フタロシアニン		210
		3L8
ノリオンダンハク貨		P29
		P45
プロトン化シッフ塩基		2L4, P36Y
プロトン化状態		1L2
プロトン伝導		P8, P59
プロファイリング		P17, P56
複合体		P16
分子認識		3L8
	[^]	
ペプチド毒素		P57
偏極率		P27
変性		3L9
	[[6]]	
ポリマー		P34
	r = 1	101
マイクロ波加熱	. ~ J	P41
マイクロ波昭射 NMP		P41
マルチドメイン座白質		I41 D21
ベルノー・ハイン 虫口貝		F 31 D44V
限タンハク頁		P441
限蛋日質		3L2
4 - 100 d 4	[0]	
無機物		P45
	[め]	
メタボロミクス		P53
	[や]	
薬物ナノ懸濁液		P39
	[ゆ]	
有機結晶		P59
	[よ]	
容量劣化		P13
溶液 NMR]	P37. P35. P32Y. P9
	101	,,,
リチウムイオン二次雷池		P13
立休化学		D7
		F7
立伊伊坦		107 1'07
□□147冊辺肝切		r14r
重于もつれ		P12
重于化字 / 分子動力学計算		P58Y
量 千化学計算		P5

協賛企業・団体

■広告

NMR 共用プラットフォーム

株式会社 シゲミ 株式会社センダガス

大陽日酸株式会社

中山商事株式会社

日本電子株式会社

株式会社バイオネット研究所

ブルカージャパン株式会社

■企業展示■

株式会社エムアールテクノロジー 株式会社エルエイシステムズ 株式会社 シゲミ 昭光サイエンス株式会社 大陽日酸株式会社 日本電子株式会社 株式会社バイオネット研究所 ブルカージャパン株式会社 株式会社リアクト

(敬称略、五十音順、作成:2020年10月30日)



国立大学法人北海道大学 協力機関 日本電子株式会社、ブルカージャパン株式会社 <u>NMR共用プラットフォームポータルサイト</u> <u>URL: http://nmrpf.jp/</u>



5mmの用フローブでの測定例

FAX

5mm φサンプルチューブにシ	5mm φサンプルチューブに濃	5mm φ対称ミクロ形サンプル
ムが十分調整可能な液高に	度を上げるために溶媒を減	チューブに 5mm ゆサンプルチ
注入。	らしたが、液高が低いため	ューブの半分の量注入。シ
	シム調整できない。	ム調整問題なし。
液高: 30mm	液高:15mm	液高:15mm
量:410 µ L	量:210µL	量:210µL

2.5mm · 3mm · 5mm · 8mm · 10mm のラインアッフがあります。

平成21年度「日本化学会科学有効賞」受賞製品

042-624-2207 電話 ・ 株式会社 シゲミ 042-622-0937

http://www.shigemi.co.jp mail:shigemi-corp@nifty.com



各種分析機器向け冷媒供給のトータルサポート

*一般高圧ガス販売・冷媒供給作業

各種一般高圧ガス、液体ヘリウム、液体窒素、ガス関連機器等販売 各NMRメーカー、SCMへの冷媒充填作業。

液体ヘリウム、液体窒素、非磁性容器所有。

(

自社冷媒供給作業講習修了者による安全・安心作業。

*液体窒素蒸発防止装置の販売・据付及びメンテナンスサポート

超電導マグネット維持に欠かせない冷媒供給 煩わしい供給スケジュール管理も含めてトータルサポート可能。 迅速対応、ニーズに合わせたご提案を致します。

URL: www.sendagas.co.jp









本社・昭島製作所 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2 TEL:(042)543-1111(大代表) FAX:(042)546-3353 www.jeol.co.jp ISO 9001⋅ISO 14001 認証取得

JEOLグループは、「理科学・計測機器」「産業機器」「医用機器」の3つの事業ドメインにより事業を行っております。 「理科学・計測機器事業」電子光学機器・分析機器・計測検査機器 「産業機器事業」半導体関連機器・産業機器 「医用機器事業」医用機器

NMR分析のオンリーワン・ソフト

ALICE10bn Windows10 対応版

■データ処理・印刷・保存を素早く簡単に行える ■最新のWindows UIを備えたWindows 10 (32/64bit) 完全対応版



株式会社バイオネット研究所

http://www.bio-net.co.jp/





構造生物学研究を変える 1.2 GHz NMR



Fig. 2D $^1\text{H-}{}^{13}\text{C}$ plane of 3D BEST-TROSY HNCOCACB 0.5 mM Ubiquitin $^{13}\text{C}/{}^{15}\text{N},$ 3 mm TCl CryoProbe

世界初の安定で均質な Ascend 1.2 GHz NMR 磁石

高分子量のタンパク質や変性タンパク質、その複合体は、NMRスペクトルの狭い領域に多くのシグナルが観測されるために、解析が 困難でした。1.2 GHz NMRの威力で分離が大幅に改善されます。

For more information please visit: www.bruker.com

ブルカージャパン株式会社 バイオスピン事業部

info.bbio.jp@bruker.com

本社(横浜営業所) 〒221-0022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9 TEL:045-444-1390 大阪営業所 〒532-0004 大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29 テラサキ第2ビル2F TEL:06-6394-8989

Innovation with Integrity

NMR

謝 辞

進歩賞をご支援賜るとともに、副賞を授与して下さった株式会社 JEOL RESONANCE とブルカージャパン株式会社に心より御礼申し上げます。

若手による優秀なポスター発表に対し、「JEOL RESONANCE 賞」、「大陽日酸賞」 および「二社合同賞」を設けてご支援賜った株式会社 JEOL RESONANCE と大陽 日酸株式会社に心より御礼申し上げます。

 第 59 回NMR討論会(2020)
 会期:2020年11月17日(火)~19日(木)
 会場:Gメッセ群馬
 〒370-0044 群馬県高崎市岩押町12番24号
 編集・発行:第 59回 NMR 討論会事務局
 〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1
 群馬大学大学院理工学府分子科学部門 若松研究室内 15L,0277-30-1439

(無断で複製・転載を禁じます)

第59回 NMR討論会講演要旨集

二〇二〇 高 崎