第57回 NMR討論会（2018）

The 57th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2018)

講演要旨集

Abstracts

会　期：　**2018 年 9 月 18 日（火）～ 20 日（木）**
18-20 September 2018

会　場：　**札幌コンベンションセンター**
Sapporo Convention Center
〒060-0006　札幌市白石区東札幌6条1丁目

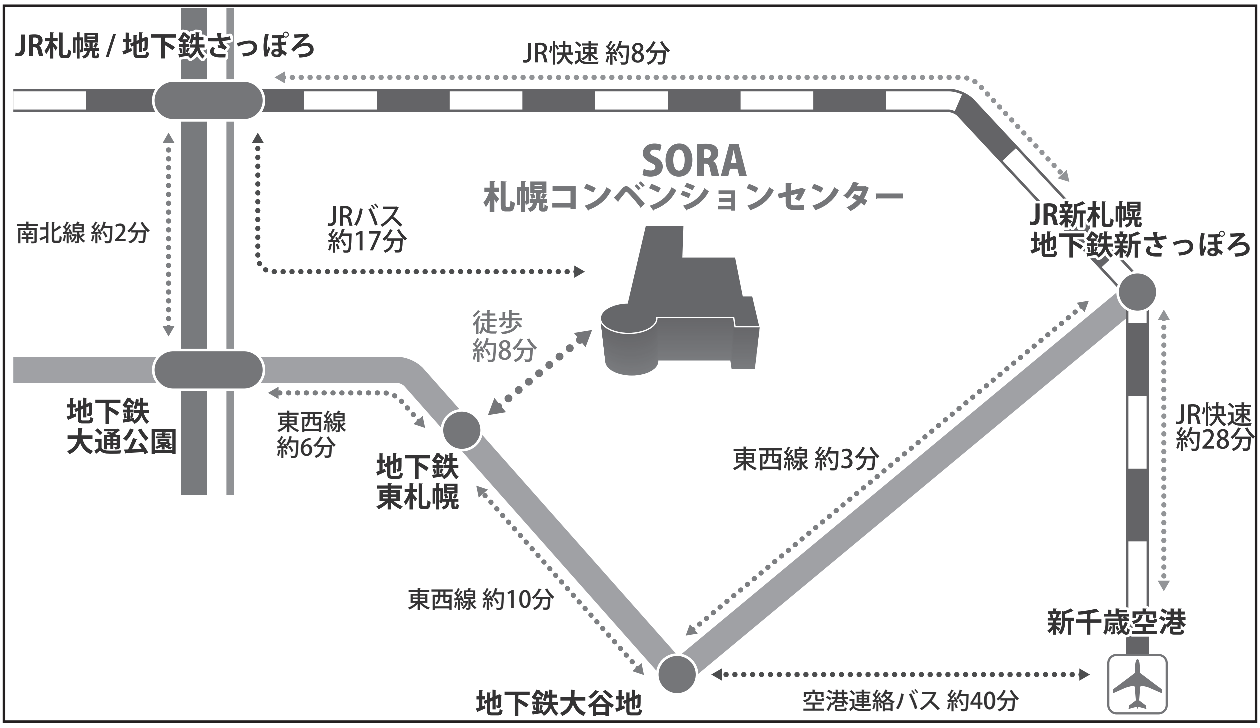
主　催：日本核磁気共鳴学会

共催・協賛：高分子学会，日本生物物理学会，日本分析化学会
分子科学会，日本磁気共鳴医学会

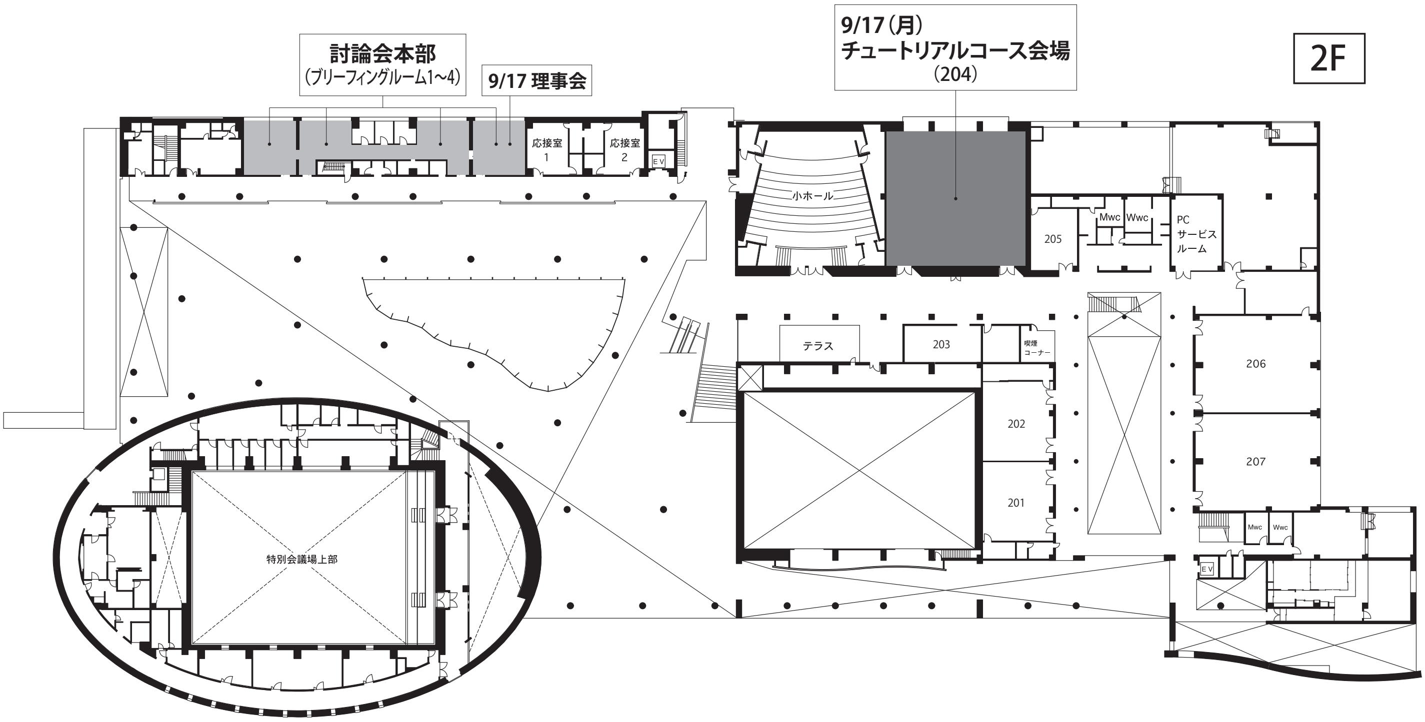
第57回NMR討論会（2018）プログラム委員会

出村　　誠（北海道大学）［委員長］
相沢　智康（北海道大学）
斉尾　智英（北海道大学）
福士　江里（北海道大学）
久米田博之（北海道大学）
熊木　康裕（北海道大学）
塚本　　卓（北海道大学）
平沖　敏文（北海道大学）
齊藤　貴士（北海道科学大学）
甲野　裕之（苫小牧工業高等専門学校）
河野　敬一（千歳科学技術大学）
木川　隆則（理化学研究所）

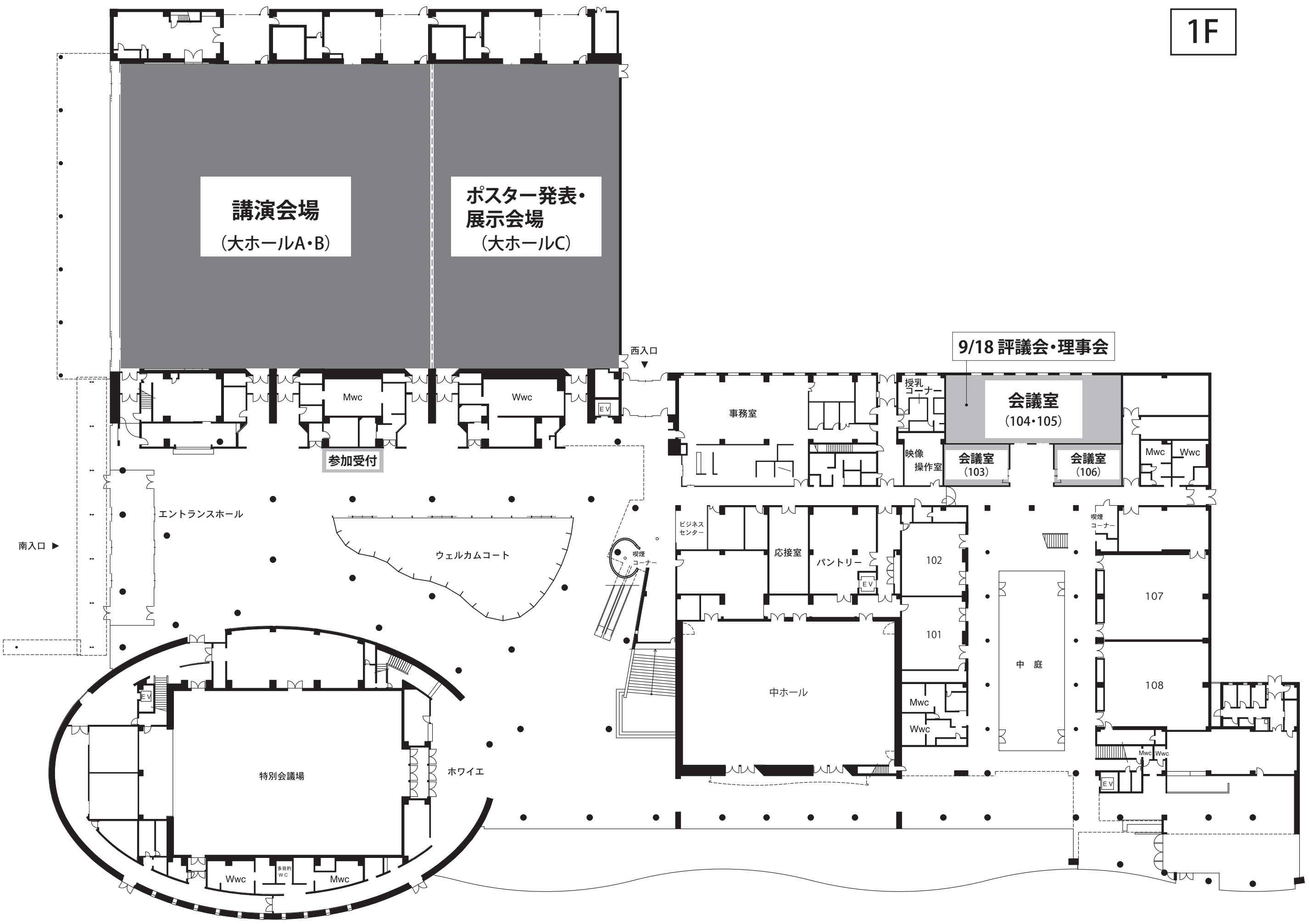
会場（札幌コンベンションセンター）への交通案内



会場の案内図



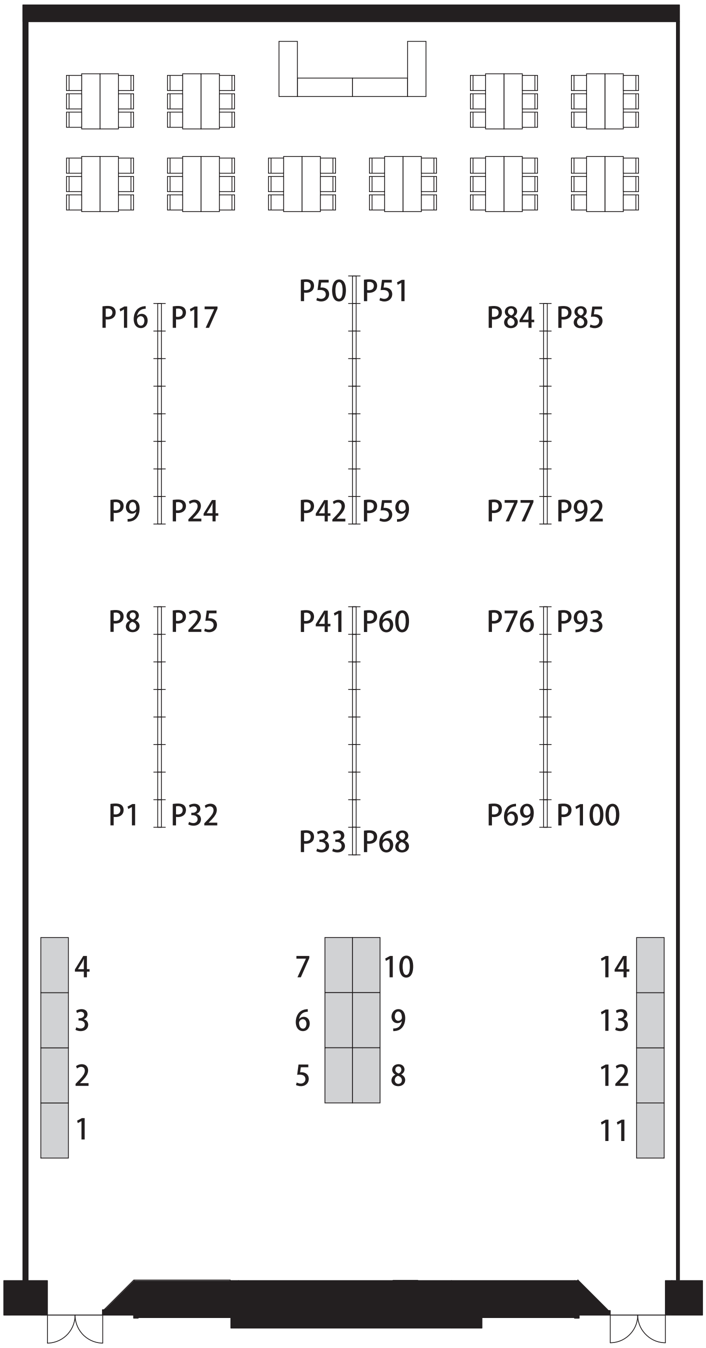
2F
討論会本部
（ブリーフィングルーム1～4）
9/17 理事会
9/17（月）
チュートリアルコース会場
（204）
応接室
1
応接室
2
EV
小ホール
205
Mwc
Wwc
PC
サービス
ルーム
テラス
203
喫煙
コーナー
206
202
207
201
Mwc
Wwc
EV
特別会議場上部



1F
講演会場
（大ホールA・B）
ポスター発表・
展示会場
（大ホールC）
西入口
9/18 評議会・理事会
授乳
コーナー
会議室
（104・105）
事務室
映像
操作室
会議室
（103）
会議室
（106）
Mwc
Wwc
Mwc
Wwc
EV
参加受付
エントランスホール
南入口
ウェルカムコート
ビジネス
センター
応接室
パントリー
EV
102
喫煙
コーナー
喫煙
コーナー
107
101
中庭
中ホール
108
Mwc
Wwc
Mwc
Wwc
EV
EV
特別会議場
ホワイエ
Wwc
Mwc

ポスター・展示会場詳細図

札幌コンベンションセンター1F　大ホールC



1・2	ブルカージャパン(株)	8	日本電子(株)
3	(株)シゲミ	9	(株)フレックス
4	(株)アフィニティサイエンス Wavefunction, Inc.	10	(株)ビジコムジャパン
		11	北海道大学・先端 NMR ファシリティ
5	日本カンタム・デザイン(株)	12	大陽日酸(株)
6	(株)エムアールテクノロジー	13	(株)システムプラス
7	昭光サイエンス(株)	14	(株)エルエイシステムズ

討論会日程表

Sep. 18 (TUE)

大ホール A･B	大ホール C
Opening	ポスター 貼付
Lecture 1 一般講演 1 L1-1 ～ 4	Exhibition 展示
Lecture 1 一般講演 1 L1-5 ～ 7	
Meeting of NMRSJ 総　会	
Lunch 昼　食	Lunch 昼　食
	Poster Session I ポスター セッション1 偶数番号 (若手ポスター賞)
Lecture 1 一般講演 1 L1-8 ～ 12	
Lecture 1 一般講演 1 L1-13 ～ 16	
Counsil, Executive Committee 評議会、理事会	Counsil, Executive Committee 評議会、理事会

Sep. 19 (WED)

大ホール A･B	大ホール C
Lecture 2 一般講演 2 L2-1 ～ 3	Exhibition 展示
Lecture 2 一般講演 2 L2-4 ～ 6	
Lunch 昼　食	Lunch 昼　食
Lecture 2 一般講演 2 L1-7 ～ 8	
Lecture 2 一般講演 2 L1-9 ～ 10	
Invited Lecture 招待講演 IL1 ～ 2	
Invited Lecture 招待講演　IL3	
Bunquet 懇親会 [会場：キリンビール園]	Bunquet 懇親会 [会場：キリンビール園]

Sep. 20 (THU)

大ホール A･B	大ホール C
Lecture 3 一般講演 3 L3-1 ～ 4	Exhibition 展示
	Poster Session II ポスター セッション2 奇数番号
Lunch 昼　食	ポスター 撤去
Lecture 3 一般講演 3 L1-5 ～ 8	
Lecture 3 一般講演 3 L1-9 ～ 12	

参加者へのご案内

1. 受付と参加登録

◇受付

受付は大ホール前に設けます。

受付時間：9 月 18 日（火） 8：30 ～ 17：30
9 月 19 日（水） 8：30 ～ 17：30
9 月 20 日（木） 8：30 ～ 15：30

・事前登録ならびに参加費の支払をお済ませの方は、会場での受付は不要です。事前にお送りした参加証（名札）をご着用のうえ会場にお進みください。参加証のケースは受付の付近に準備しております。

・当日参加の方は、受付前に置かれた当日参加用紙にご記入の上、受付デスクにお越しください。参加費と懇親会費（懇親会に出席される場合）をお支払いただきます。

当日参加	会員		非会員	
	正会員	学生会員	一般	学生
討論会参加費	4,000 円	2,000 円	13,000 円	7,000 円
懇親会費	7,000 円	4,000 円	7,000 円	4,000 円

◇参加証（名札）

会場内では必ず着用してください。参加証のない入場は固くお断りします。

懇親会にご参加の方は、懇親会会場でも参加証を必ずご着用ください。

◇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。

◇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事前送付しています。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。討論会終了後に、要旨集本文を第 57 回 NMR 討論会ホームページ（http://www.knt.co.jp/ec/2018/57NMR/）で公開します。

◇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、大ホール前の日本核磁気共鳴学会デスクでお支払ください。また、日本核磁気共鳴学会への入会も受け付けます。

2. 会場内のサービス・施設

◇クローク

大ホール前にクロークを設置しています。ただし、破損・紛失などの責任は負いかねますので、貴重品やコンピュータなどについては、各自でお持ちください。

なお懇親会会場にはクロークや荷物置場は準備しておりません。

利用時間：9 月 18 日（火） 8：30 ～ 18：30
9 月 19 日（水） 8：30 ～ 17：45
9 月 20 日（木） 8：30 ～ 16：30

◇インターネット

会場内では公衆無線 LAN サービス「Sapporo City Wi-Fi」をご利用いただけます。

◇呼び出し

会場内での呼び出しは、緊急の場合を除き、原則おこないません。

3. 禁止事項

◇飲食・喫煙

展示会場・ポスター会場付近に飲食可能なスペースを設置いたしますが、広さに限りがあります。館内のパブリックスペースは飲食可能です。

喫煙は館内の喫煙所をご利用ください。1 階エスカレーター下にあります。

◇携帯電話

口頭発表会場（大ホール）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。

4. 第57回NMR討論会についてのお問い合わせ

◇会期中

総合案内 札幌コンベンションセンター 1 階 大ホール前

会期中の連絡先 090-2077-0064

◇会期外

第 57 回 NMR 討論会 事務局

〒 060-0003 札幌市中央区北 3 条西 2 丁目 日通札幌ビル 6 階

株式会社近畿日本ツーリスト北海道 北海道 DM 支店 MICE センター内

Tel : 011-280-8855 Fax : 011-221-5489 E-mail : s-convention-1@or.knt-h.co.jp

5. 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、大ホール内の「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、セッション終了後に予定されている会議や懇親会の開催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ミニ D-sub15 ピンコネクターのみになっております。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 PC 受付までお越しください。

講演時間：持ち時間は、招待講演 35 分、一般講演 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いたします。

	一鈴	二鈴（発表終了）	三鈴（質疑終了）
招待講演	25 分	30 分	35 分
一般講演（日本語または英語）	13 分	15 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○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 件あたり、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：ポスター会場は大ホール C です。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、9 月 18 日（火）9：00 ～ 10：00 の間に掲示し、9 月 20 日（木）12：10 ～ 13：10 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、9 月 18 日（火）13：30 ～ 15：00 の間にポスター討論をおこなってください（若手ポスター賞登録者のポスターには全て偶数番号が割りあてられています）。

奇数番号（P1，P3，…）の方は、9 月 20 日（木）10:40 ～ 12:10 にポスター討論をおこなってください。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。

6. 2018年度日本核磁気共鳴学会通常総会開催通知

日時：2018 年 9 月 18 日（火） 12：00 ～ 12：30

場所：大ホール A/B

日本核磁気共鳴学会通常総会を開催しますので必ずご出席ください。やむをえず欠席される方は事前に委任状の提出をお願いいたします。委任状は NMR ニュースレターで電子メール送付されます。委任状にご記入の上、指定の提出先にメールで送信をお願いいたします（委任状は討論会受付デスクにも印刷したものを用意しておきますので、総会開始までに紙媒体で受付にご提出いただいても構いません）。

なお、委任状の提出は、総会を欠席する一般会員だけが必要であり、学生会員、賛助会員は必要ございません。

7. 理事会・評議員会の案内

<table>
<tr><td>理事会</td><td>9 月 17 日（月） 18：00 より</td><td>2F ブリーフィングルーム 4</td></tr>
<tr><td>評議員会</td><td rowspan="3">9 月 18 日（火） 18：30 より※</td><td rowspan="3">1F 会議室 104/105</td></tr>
<tr><td>新評議員会</td></tr>
<tr><td>新理事会</td></tr>
</table>

※通常総会で承認された新評議員も出席の必要があります。また、新理事会は新評議員会が終わりしだい開催します。

理事会・評議員会での食事の用意はございません。

チュートリアルコース

日　時：9月17日(月)／Monday 17 September 2018 13:00〜20:30(受付12:30〜)
会　場：札幌コンベンションセンター 2F 204会議室(受付：会場前)

第1部(13:00〜17:50)
13:00〜14:30

「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Gorterの凝縮系NMRの失敗」

寺尾　武彦　先生（京都大学名誉教授）

教科書では、長年にわたって積み重ねられた多数の研究成果が系統的に整理され、簡潔に淡々と記述されていて、学問が創られた背景にある含蓄に富んだ話はすっかり削ぎ落とされている。しかし、先人たちが歴史的な研究に取り掛かったきっかけや鍵となるアイデアの着想の経緯、あるいは回り道やつまずきなど創造の過程で辿った軌跡を知ることは、我々にとって間違いなく貴重な財産になるであろう。そのためには、研究を行なった本人の経歴や人物像、研究が行なわれた時代背景、研究環境、周辺の人々の関わりや反応など、学問が創られるに至った状況を様々な角度から知ることも極めて重要である。本講演では、時代を画した研究を行った人物にスポットを当てて、できる限りその研究が成功するに至った道のりや、研究が行われた現場を、様々な文脈において多面的に蘇らせる。うまくいけば、おそらくはその人物の人間性や生き方に根ざしているであろう、研究に対する姿勢やものの考え方、奥深い想いが浮かび上がってくるかも知れない。その試みを通して、研究者として歩み出した若い人たちに、“科学する”とはどういうことなのかを物語全体から感じ取ってもらえれることを願っている。今回は、昨年に引き続き Bloch と Purcell に先立って NMR を試みた Rabi と Gorter について話す。

14:40〜16:10

「より良いスペクトルを得るための基礎知識」

朝倉　克夫　先生（日本電子株式会社）

より良いスペクトルを得るために気をつけなければならにこととは何なのか、スペクトルの解釈に焦点があてられた大学の講義ではわからないことが多々ありますが、普段なにげなくおこなっている操作手順の中にも、最終的なスペクトルの質を左右する要素が含まれています。本講座では、NMR 装置を使いこなす上で美しい NMR スペクトルを得るために注意すべき点を、測定の準備からデータ処理の基礎に至るまで、その背景と共にご説明していきます。

16:20〜17:50

「低分子のNMRスペクトルの解析例」

佐藤　一　先生（ブルカージャパン株式会社）

いくつかの低分子量化合物を用いて、実際の NMR スペクトルを解析する例を紹介します。誤りなく、かつ、スムーズにシグナルの帰属を進めるために、複数個の二次元スペクトルを用いて、シグナルを関連付けながら解析していきます。

第2部(18:20-20:30)
18:20〜19:50

「ナイトミッション『未知化合物Xの構造を推定せよ』低分子のルーチン法と、追加で使える測定法」

福士　江里　博士（北海道大学大学院農学研究院）

「ここに、構造のわからない化合物があります。NMR で構造を決めてください」との依頼があったという想定で、構造を一緒に考えていきます。低分子化合物のルーチン法による構造解析には定石がありますが、それだけでは構造推定が難しい場面にも遭遇します。その際には、追加で測定すると便利な「準」ルーチン法も併用して、明快な構造解析を目指しましょう。測定法のチョイスや解析の進めかたは状況によって変わります。工夫しながら構造決定に到達する喜びを共有し、低分子の解析になじみが薄い方にはきっかけとなるような、また、日ごろ解析をされている方には知識を整理し今後のお役に立てていただけるような時間にしたいと思います。

20:00〜20:30
「Q and A」

第 57 回 NMR 討論会（2018）

The 57th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2018)

会期：2018年 9月18(火)～9月20(木)
September 18 (Tue) - 20 (Thu)
会場：札幌コンベンションセンター
Sapporo Convention Center
〒003-0006 北海道札幌市白石区東札幌6条1丁目1-1

第1日目　9月18日(火)／Day 1 (Sep. 18, Tue)

一般演題 1［会場：大ホール A･B]

9:30～10:50　　**座長：斉尾 智英**

9:30～9:50

L1-1　**NMR による抗菌ペプチド nukacin ISK-1 の溶液構造決定と熱力学的解析**

○藤浪大輔[1], Mahin Abdullah-Al[2], M Elsayed Khaled[2], 永尾潤一[3], 善藤威史[2], 園元賢二[2], 神田大輔[1] ([1] 九州大学・生体防御医学研究所, [2] 九州大学・農学研究院, [3] 福岡歯科大学・機能生物化学講座)

9:50～10:10

L1-2　**15N 直接検出 NMR 法による高分子量バイオ医薬の非侵襲的観測**

○徳永裕二[1,2], 竹内恒[1], 鳥澤拓也[3], 奥出順也[3], 嶋田一夫[1,4] ([1] 国立研究開発法人　産業技術総合研究所　創薬分子プロファイリング研究センター, [2] 一般社団法人　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] 東京大学大学院　薬学系研究科)

10:10～10:30

L1-3　**G タンパク質共役型内向き整流性カリウムチャネルのエタノール依存的な活性化機構の解明**

○外山侑樹[1,2], 加納花穂[1], 間瀬瑶子[1], 横川真梨子[1], 大澤匡範[1], 嶋田一夫[1] ([1] 東京大学大学院薬学系研究科, [2] 日本バイオ産業情報化コンソーシアム)

10:30～10:50

L1-4　**NMR と人工細胞膜を用いた不凍タンパク質の分子機能解析**

渡辺爽[1], 新井達也[1], 三浦愛[2], 久米田博之[3], ○津田栄[1,2] ([1] 北海道大学大学院生命科学院・生命融合科学コース・分子適応科学研究室, [2] 産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・AFP特別研究チーム, [3] 北海道大学先端生命科学院・国際連携研究教育局・グローバルステーション)

10:50～11:00　　**休憩**

一般演題 2［会場：大ホール A･B]

11:00～12:00　　**座長：伊藤 隆**

11:00～11:20

L1-5　**ケモカイン受容体―細胞内制御因子フロント間相互作用を標的とするユニークな作用機序をもつ抗がん剤候補化合物の NMR 解析**

○吉永壮佐[1], 辻辰一朗[1], 石田規人[1], 柚木芳[1], 武田光広[1], 寺島裕也[2,3], 遠田悦子[2,3], 松島綱治[2,3], 寺沢宏明[1] ([1] 熊本大学大学院 生命科学研究部, [2] 東京大学大学院 医学系研究科, [3] 東京理科大学 生命医科学研究所)

11:20〜11:40

L1-6　構造蛋白質である HIV-1p17 と p24 の動的と静的構造の NMR 解析

○西村千秋（帝京平成大学薬学部）

11:40〜12:00

L1-7　禁制コヒーレント遷移を用いたリガンドの動的構造最適化

○竹内恒[1], 水越弓子[1,2], 徳永裕二[1], 滝沢剛[3], 半沢宏之[3], 嶋田一夫[4]（[1]産業技術総合研究所　創薬分子プロファイリング研究センター, [2]バイオ産業情報化コンソーシアム, [3]第一三共RDノバーレ株式会社, [4]東京大学大学院薬学系研究科）

12:00〜12:30　Meeting of NMRSJ 総会

12:30〜13:30　Lunch

ポスターセッション［会場：大ホール C］

13:30〜15:00	**ポスターセッションⅠ（偶数番号、若手ポスター賞審査含む）** Poster Session Ⅰ（even numbers）including poster presentations for Young Scientists Poster Awards

一般演題 3［会場：大ホール A･B］

15:00〜16:40　**座長：川村 出**

15:00〜15:20

L1-8　セメント硬化体へのプロトン NMR 測定の適用

○胡桃澤清文（北海道大学大学院工学研究院）

15:20〜15:40

L1-9　磁場配向を利用した微結晶粉末からの異方的相互作用の解析：擬単結晶から磁場配向懸濁体へ

○久住亮介[1], 門間啓[1], 和田昌久[1], 木村恒久[1], 武田和行[2]（[1]京都大学大学院 農学研究科, [2]京都大学大学院 理学研究科）

15:40〜16:00

L1-10　^{7}Li NMR によるニッケルマンガン系正極の試料組成およびサイクル劣化挙動評価

○矢澤宏次[1], 田渕光春[2]（[1]（株）JEOL RESONANCE, [2]産業技術総合研究所）

16:00〜16:20

L1-11　N ドープにより複合アニオン化した Li_2S-P_2S_5 電解質の固体高分解能 NMR

○野田泰斗[1], 高倉希[1], 木村拓哉[2], 林晃敏[2], 辰巳砂昌弘[2], 竹腰清乃理[1]（[1]京都大学大学院理学研究科, [2]大阪府立大学工学研究科）

16:20〜16:40

L1-12　ラミネート Li 固体電池のオペランド NMR/MRI 観察

○拝師智之[1], 藤木聡[2], 村上雄斗[3], 寺田康彦[4], 相原雄一[2]（[1]株式会社エム･アール･テクノロジー, [2]株式会社サムスン日本研究所, [3]筑波大学理工学群応用理工学類応用物理主専攻, [4]筑波大学数理物質系物理工学域）

16:40〜16:50　休憩

一般演題４［会場：大ホール A･B］

16:50～18:10　座長：西山 祐介

16:50～17:10

L1-13　スピンロックパルスを用いない縦磁化間 CPMAS のすすめ

○神原孝之[1,2,3], 竹腰清乃理[2] ([1]東京工業大学　生命理工学院, [2]京都大学大学院　理学研究科, [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)

17:10～17:30

L1-14　ENDOR 共振器を用いた希釈冷凍機中での動的核偏極

○香川晃徳[1], 根来誠[1,2], 椿山大誠[1], 小林太郎[1], 北川勝浩[1] ([1]大阪大学大学院　基礎工学研究科, [2]JST　さきがけ)

17:30～17:50

L1-15　自作改良型 NMR 装置を用いた NMR スペクトルによる半導体中のドーパント位置の特定

○佐々木進[1], 坂井祐大[2], 池田宏輔[2] ([1]新潟大学工学部, [2]新潟大学自然科学研究科)

17:50～18:10

L1-16　高温超伝導バルク磁石での新規シムコイル検討

○仲村高志[1], 内海博明[2], 伊藤佳孝[3], 柳陽介[3], 野村師子[3] ([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]JEOL RESONANCE, [3]イムラ材料開発研究所)

18:30～20:00　Council, Executive Committee 評議会、理事会

第2日目　9月19日(水)／Day 2(Sep. 19, Wed)

Lecture Session 5［Main Hall］

9:30～10:30　Chairperson：Takanori Kigawa

9:30～9:50

L2-1　Structure-function investigation of deoxyribozymes composed of heme and G-quadruplex DNAs

〇Yasuhiko Yamamoto[1,2,3], Haruka Araki[1], Kosuke Hayasaka[1], Ryosuke Shinomiya[1], Yusaku Nakayama[1], Kentaro Ochi[1], Tomokazu Shibata[1], Atsuya Momotake[1], Masaki Hagihara[4], Dipankar Sen[5], Hikaru Hemmi[6] (1) Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8571, Japan、2) Tsukuba Research Center for Energy Materials Science (TREMS), University of Tsukuba, Tsukuba 305-8571, Japan、3) Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA), University of Tsukuba, Tsukuba 305-8577, Japan、4) Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University, Hirosaki 036-8560, Japan、5) Department of Chemistry, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia V5A 1S6, Canada、6) Food Research Institute, NARO, Tsukuba 305-8642, Japan)

9:50～10:10

L2-2　NMR approaches for revealing structure and dynamics of intrinsically disordered proteins（IDPs）

〇Shin-ichi Tate[1,4], Ryosuke Kawasaki[1], Ryohei Inoue[1], Cloud Lee[2], Naoya Tochio[1], Danny Hsu[2], Jie-Rong Huang[3] (1) Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima Univ., Japan、2) Academia Sinica, Taiwan、3) National Yang-Ming Univ., Taiwan、4) RcMcD, Hiroshima Univ., Japan)

10:10～10:30

L2-3　Functional roles of Mg^{2+} binding sites in ion-dependent gating of a Mg^{2+} channel, MgtE, revealed by solution NMR

Tatsuro Maruyama[1], Shunsuke Imai[1], Tsukasa Kusakizako[2], Motoyuki Hattori[3], Ryuichiro Ishitani[2], Osamu Nureki[2], Koichi Ito[4], Andrés D. Maturana[5], Ichio Shimada[1], 〇Masanori Osawa[1,6] (1) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Japan、2) Graduate School of Science, The University of Tokyo, Japan、3) School of Life Sciences, Fudan University, China、4) Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Japan、5) Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Japan、6) Faculty of Pharmacy, Keio University)

10:30～10:50　Break

Lecture Session 6［Main Hall］

10:50～11:50　Chairperson：Chojiro Kojima

10:50～11:10

L2-4　Conformational variation in membrane-associated H-Ras elucidated by in-cell ^{19}F-NMR spectroscopy

〇Hiromasa Yagi, Masaomi Ikari, Takanori Kigawa (RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research)

11:10～11:30

L2-5　E22G Pathogenic Mutation of β-amyloid（Aβ）Enhances Misfolding of Aβ40 by Unexpected Prion-like Cross Talk between Aβ42 and Aβ40

〇Yoshitaka Ishii[1,2], Yiling Xiao[2], Brian Yoo[2], Isamu Matsuda[1], Dan McElheny[2] (1) School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology、2) Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago)

11:30〜11:50

L2-6 **Super-fast collection of ^{1}H-detected SSNMR data under ultra-fast MAS for proteins in nano-mole scale**

○Ayesha Wickramasinghe[1,2], Yoshitaka Ishii[1,2] ([1]Department of Life Science, Tokyo Institute of Technology、[2]NMR Science and Development Division, RIKEN Yokohama Campus)

11:50〜13:30 Lunch

Lecture Session 7 [Main Hall]

13:30〜14:10 Chairperson : Kazuyuki Takeda

13:30〜13:50

L2-7 **DNP at 16.4 T and 30 K for Mesoscopic Molecular Domain Selection**

○Yoh Matsuki[1], Toshitaka Idehara[2], Yuki Endo[3], Takahiro Nemoto[3], Shigeo Fukui[4], Jagadishwar Sirigiri[5], Hiroto Suematsu[3], Toshimichi Fujiwara[1] ([1]Institute for Protein Research, Osaka University, Japan、[2]Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui, Japan、[3]JEOL RESONANCE Inc., Japan、[4]Cryovac Corp., Japan、[5]Bridge12 Technologies Inc., MA, USA)

13:50〜14:10

L2-8 **Understanding Hydrogen bonding structure by electron and NMR nano-crystallography**

Maria Candelaria Guzman Afonso[1], You-lee Hong[1], Henri Colaux[1], Hirofumi Iijima[2], Akihiro Saitow[2], Takuma Fukumura[2], Yoshitaka Aoyama[2], Souhei Motoki[2], Tetsuo Oikawa[3], Toshio Yamazaki[4], Daisuke Hashizume[5], Koji Yonekura[6], ○Yusuke Nishiyama[1,7] ([1]RIKEN-JEOL Collaboration Center, Kanagawa, Japan、[2]JEOL Ltd., Tokyo, Japan、[3]JEOL ASIA Pte. Ltd, Singapore、[4]RIKEN SPring-8 Center, Kanagawa, Japan、[5]RIKEN Center for Emergent Matter Science (CEMS), Saitama, Japan、[6]RIKEN SPring-8 Center, Hyogo, Japan、[7]JEOL RESONANCE Inc., Tokyo, Japan)

Lecture Session 8 [Main Hall]

14:30〜15:10 Chairperson : Takahisa Ikegami

14:30〜14:50

L2-9 **Investigation of Long-range Heteronuclear J couplings in Esters: Implications for ^{13}C Metabolic MRI by Side-Arm Parahydrogen-Induced Polarization**

○Neil James Stewart[1], Hiroyuki Kumeta[2], Mitsushi Tomohiro[1], Takuya Hashimoto[3], Noriyuki Hatae[4], Shingo Matsumoto[1] ([1]Division of Bioengineering and Bioinformatics, Graduate School of Information Science and Technology, Hokkaido University、[2]Department of Structural Biology, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University. Global Station for Soft Matter, Global Institution for Collaborative Research and Education, Hokkaido University、[3]Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Chiba University、[4]School of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido)

14:50〜15:10

L2-10 **Accounts of NMR signal reception based on Heisenberg-Langevin formalism**

○Kazuyuki Takeda[1], Koji Usami[2] ([1]Graduate School of Science, Kyoto University、[2]Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo)

Invited Lecture [Main Hall]

15:20～16:30 Chairperson : Shinichi Tate

15:20～15:55

IL1 **Quantitative and Qualitative proton-proton distances in fully protonated solids at fast magic spinning NMR**

〇Vipin Agarwal (Tata Institute of Fundamental Research, India)

15:55～16:30

IL2 **Protein conformational exchange in talin probed by high pressure NMR**

〇M. P. Williamson (University of Sheffield, UK)

Invited Lecture [Main Hall]

16:50～17:25 Chairperson : Sakae Tsuda

16:50～17:25

IL3 **Targeting KRAS Oncoprotein on Biological Membranes**

〇Mitsuhiko Ikura (University of Toronto, Canada)

第3日目　9月20日(木)／Day 3(Sep. 20, Thu)

一般演題 9［会場：大ホール A・B］

9:00〜10:20　座長：山本 泰彦

9:00〜9:20

L3-1　TiF_4の巨大^{19}F CSA; NMRとDFT計算による評価

○村上美和[1], 野田泰斗[2], 竹腰清乃理[2]（[1]京都大学　産官学連携本部, [2]京都大学大学院 理学研究科 化学）

9:20〜9:40

L3-2　プロトン伝導経路とゲスト分子吸着サイトを両立する配位高分子の合成と構造解析

○犬飼宗弘[1], 堀毛悟史[2], 西山裕介[3]（[1]徳島大学大学院社会産業理工学研究部, [2]京都大学 高等研究院 物質ー細胞統合システム拠点, [3]理化学研究所CLST-JEOL連携センター）

9:40〜10:00

L3-3　パルス磁場勾配NMRと緩和時間測定による高分子電解質膜中の水拡散挙動の解析(I)湿度依存性

○倉橋直也[1], 小具健一[2], 陸川政弘[1]（[1]上智大学理工学部　物質生命理工学科, [2]技術研究組合 FC-Cubic）

10:00〜10:20

L3-4　^{1}H NMR緩和時間測定：水分子内包フラーレンを配位子とする9族金属錯体の構造特性評価

○橋川祥史, 川﨑皓斗, 村田靖次郎（京都大学化学研究所）

ポスターセッション［会場：大ホール C］

10:40〜12:10	**ポスターセッションⅡ（奇数番号）** Poster Session Ⅱ（odd numbers）

12:10〜13:10　Lunch

一般演題 10［会場：大ホール A・B］

13:10〜14:30　座長：片平 正人

13:10〜13:30

L3-5　長いT_1を持つ分子の高感度溶液NMR測定法の開発

○古板恭子[1], 服部良一[1,2], 池上貴久[1,3], 藤原敏道[1], 児嶋長次郎[1,4]（[1]大阪大学　蛋白質研究所, [2]徳島文理大学薬学部, [3]横浜市立大学　生命医科学研究科, [4]横浜国立大学　大学院工学研究院）

13:30〜13:50

L3-6　溶液NMRにおける生体高分子の核超偏極技術の開発

○大木出[1], 藤咲貴大[2], 池上貴久[3], 白川昌宏[2], 水落憲和[1]（[1]京都大学 化学研究所, [2]京都大学 工学研究科, [3]横浜市立大学 生命医科学研究科）

13:50〜14:10

L3-7　従来型シグナル帰属によらず時間軸データを直接解析するタンパク質NMR解析

○葛西卓磨[1,2], 小野峻佑[2,3], 田中利幸[4], 池田思朗[5], 木川隆則[1,6]（[1]理化学研究所 生命機能科学研究センター, [2]科学技術振興機構 さきがけ, [3]東京工業大学 科学技術創成研究院, [4]京都大学大学院 情報学研究科, [5]統計数理研究所 数理・推論研究系, [6]東京工業大学 情報理工学院）

14:10〜14:30

L3-8　**In-cell NMR 法を用いたヒト生細胞内の DNA および RNA の構造とダイナミクスの解析**

○山置佑大[1], 永田崇[1,2], 清石彩華[2], 三宅雅之[2], 加納ふみ[3], 村田昌之[4], 片平正人[1,2] ([1]京都大学 エネルギー理工学研究所, [2]京都大学大学院　エネルギー科学研究科, [3]東京工業大学大学院　科学技術創成研究院, [4]東京大学大学院　総合文化研究科)

一般演題 11［会場：大ホール A･B］

14:40〜16:00　**座長：石井 佳誉**

14:40〜15:00

L3-9　**常磁性プローブを利用したマルチドメインタンパク質のアンサンブル構造解析**

○斉尾智英[1,2], 瀧下俊平[2], 平松蒼野[2], 浅田瑞枝[3], 中村敏和[3], 石森浩一郎[1,2] ([1]北海道大学 大学院理学研究院, [2]北海道大学 大学院総合化学院, [3]自然科学研究機構 分子科学研究所)

15:00〜15:20

L3-10　**レオロジー NMR によるアミロイド形成時のタンパク質構造変化の追跡**

○森本大智[1], Erik Walinda[2], 島田陽介[1], 岩川直都[1], Ulrich Scheler[3], 山本昭彦[4], 白川昌宏[1], 菅瀬謙治[1] ([1]京都大学大学院工学研究科分子工学専攻, [2]京都大学大学院　医学研究科, [3]Leibniz Institute of Polymer Research Dresden, [4]ブルカー･バイオスピン株式会社)

15:20〜15:40

L3-11　**血清中での抗体間の相互作用解析**

○谷中冴子[1,2], 山崎俊夫[3], 輿語理那[1,2], 矢木宏和[2], 加藤晃一[1,2] ([1]自然科学研究機構　生命創成探究センター／分子科学研究所, [2]名古屋市立大学大学院薬学研究科, [3]理化学研究所　放射光科学研究センター)

15:40〜16:00

L3-12　**クモ牽引糸の高強度・高弾性の起源と固体 NMR 構造解析**

○朝倉哲郎, 松田裕生, 田制侑悟, 西村明生, 片岡奈緒美, 今井亜希子(東京農工大学大学院　工学研究科)

偶数番号：1 日目（2018/9/18　13:30 ～ 15:00）
奇数番号：3 日目（2018/9/20　10:40 ～ 12:10）
Y：若手ポスター賞

P1　**受容体ニューロピリン 1 に結合する新規 HTLV-1 外被糖蛋白質配列の同定**
○楠英樹[1], 田中俊之[2], 河野俊之[3], 細田和男[4], 若松馨[4], 浜口功[1]（[1]国立感染症研究所, [2]筑波大学大学院生命環境科学研究科, [3]北里大学医学部　生化学, [4]群馬大学大学院理工学府　分子科学部門）

P2　**脂質バイセルに結合したシトクロム *c* の動的性質の NMR 研究**
○長尾聡, 小林紀, 廣田俊（奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学領域）

P3　**B 型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解明**
○横川真梨子, 石場智彬, 池田寿子, 藤田浩平, 横田旭美, 大澤匡範（慶應義塾大学 薬学部）

P4　**Y**　**タンパク質における水素結合経由の大きなスピン結合**
○高田夢人, 会津貴大, 伊藤隆, 三島正規（首都大・理）

P5　**常磁性 NMR を用いた Yeast Ubiquitin hydrolase 1（YUH1）の構造決定及びダイナミクス 解析**
○岡田真由[1], 池谷鉄兵[1], Rajesh Sundaresan[1], 野尻英里[1], 美川務[2], 八木宏昌[2], 木川隆則[2], 伊藤隆[1]（[1]首都大学東京大学院　理工学研究科　分子物質化学専攻, [2]理化学研究所　生命機能科学研究センター）

P6　**Y**　**qNMR による薬剤の溶解度および劣化度の検定とその蛋白質薬剤相互作用解析への応用**
○小篭蒼[1], 新家粧子[2], 小橋川敬博[3], 藤原敏道[2], 児嶋長次郎[1,2]（[1]横浜国立大学大学院理工学府, [2]大阪大学・蛋白質研究所, [3]熊本大学・大学院生命科学研究部）

P7　**山積される NMR 情報のデータクレンジング法検討およびツール開発**
○山田隼嗣[1,2], 黒谷篤之[2], 近山英輔[2,3], 菊地淳[1,2,4]（[1]名古屋大学大学院　生命農学研究科, [2]理化学研究所　環境資源科学研究センター, [3]新潟国際情報大学　情報文化学部, [4]横浜市立大学大学院　生命医科学研究科）

P8　**Y**　**抗プリオン活性を有する四重鎖 RNA の構造決定と高い活性の発現機構の解明**
○真嶋司[1,2], Joon-Hwa Lee[3], 鎌足雄司[4], 林智彦[1], 西川富美子[5], 永田崇[1,2], 西川諭[5], 木下正弘[1,2], 桑田一夫[6], 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]Department of Chemistry and RINS, Gyeongsang National University, [4]岐阜大学 科学研究基盤センター, [5]産総研, [6]岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科）

P9　**ESIPT 型蛍光色素 BTImP とアニオンとの錯形成の直接観測 ^{15}N-NMR による評価**
土屋早紀[1], 坂井賢一[1], ○河野敬一[1], 中根由太[2], 菊地毅光[2], 芥川智行[2]（[1]千歳科学技術大学　理工学部, [2]東北大学　多元物質科学研究所）

P10　**Y**　**Rheo-NMR 法を用いたパーキンソン病原因タンパク質αシヌクレインの線維化機構の解明**
○島田陽介, 岩川直都, 菅瀬謙治, 森本大智, 白川昌宏（京都大学大学院　工学研究科　分子工学専攻　白川研究室）

P11　**物質を介した魚類と水の関係性情報抽出**
○鈴木湫星[1], 松本朋子[2], 菊地淳[1,2,3]（[1]横浜市立大学院 生命医科学研究科生命医科学専攻, [2]国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター, [3]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

P12　**Y**　**フルオロキノロン誘導体と RNA との相互作用解析**
○長野来南[1], 上村孝[2], 中村慎吾[2], 河合剛太[1]（[1]千葉工業大学大学院 工学研究科, [2]株式会社 Veritas In Silico）

P13　**新規安定同位体標識技術を利用した高分子量蛋白質の動態構造解析法の開発**

○宮ノ入洋平[1,2], 武田光広[2,3], 寺内勉[4,5,6], 甲斐荘正恒[2,4] ([1]大阪大学　蛋白質研究所, [2]名古屋大学大学院　理学研究科附属構造生物学研究センター, [3]熊本大学大学院　生命科学研究部, [4]首都大学東京大学院 理工学研究科, [5]SAILテクノロジーズ株式会社, [6]大陽日酸株式会社)

P14 **Y**　**互いに識別し合う2種のLINEにおける相互作用の解析**

○大津舞菜, 河合剛太(千葉工業大学大学院 工学研究科)

P15　**NMRによる蛋白質のミトコンドリア内動態の解析**

○清水涼香[1], 美川務[2], 福嶋瑞穂[1], 池谷鉄兵[1,2], 鴨志田一[1], 木川隆則[2], 三島正規[1], 伊藤隆[1,2] ([1]首都大学東京大学院　理学研究科　化学専攻, [2]国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター)

P16　**High-pressure NMR reveals conformational fluctuation of major and minor forms of phosphorylated ubiquitin.**

○北沢創一郎, 柳恵一郎, 青島佑, 北原亮(立命館大学　薬学部)

P17　**拡散NMR法による高分子水溶液中の水分子の拡散現象観測**

○川口翼[1], 喜多理王[1], 新屋敷直木[1], 八木原晋[1], 福崎稔[2] ([1]東海大学理学部物理学科, [2]東海大学九州教養教育センター)

P18 **Y**　**核磁気共鳴法と中性子小角散乱法による Fc と Fc γ受容体の相互作用解析**

○與語理那[1,2], 谷中冴子[1,2], 矢木宏和[1], 井上倫太郎[3], 杉山正明[3], 加藤晃一[1,2] ([1]名古屋市立大学　大学院薬学研究科, [2]自然科学研究機構　生命創成探究センター／分子科学研究所, [3]京都大学　複合原子力科学実験所)

P19　**Solution structural studies of insecticidal peptide LaIT2 from Japanese scorpion, *Liocheles australasiae*, with heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy**

○田村真生[1], 十一浩典[2], 宮下正弘[2], 宮川恒[2], 森田勇人[1] ([1]城西大学大学院　理学研究科　物質科学専攻, [2]京都大学大学院　農学研究科 応用生命科学専攻)

P20　**Secondary structural analysis of the cyanobacterial RNA-binding protein RbpD from cyanobacterium *Anabaena variabilis* with heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy**

○田中邑樹[1], 佐藤直樹[2], 林秀則[3,4], 森田勇人[1] ([1]城西大学大学院 理学研究科物質科学専攻, [2]東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻・生命環境科学系, [3]愛媛大学 プロテオサイエンスセンター, [4]愛媛大学 理学部化学科)

P21　**NMRによる花成制御化合物の探索**

○新家粧子[1], 河原郁美[1], 中村歩美[2], 樋口佳恵[3], 木川隆則[3], 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　大学院工学府, [3]理化学研究所　生命機能科学研究センター)

P22　**黒酵母が作る新規β-グルカンの可逆的秩序－無秩序転移の解明**

○甲野裕之[1], 近藤修啓[2], 平林克樹[2], 尾形慎[3] ([1]苫小牧工業高等専門学校, [2]伊藤忠製糖株式会社, [3]福島工業高等専門学校)

P23　**セルロース誘導体の置換基分布状態の解明**

○甲野裕之, 沼田純(苫小牧工業高等専門学校)

P24 **Y**　**Concerted Action of Molecular Chaperones in Protein Unfolding**

○朱浩傑[1],　斉尾智英[1,2], Walid A. Houry[3],　石森浩一郎[1,2] ([1]北海道大学大学院　総合化学院, [2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, [3]Department of Biochemistry University of Toronto)

P25　**魚醤のNMRメタボロミクス**

○小椋賢治, 林万里, 太田龍一, 松本祐奈, 小柳喬(石川県立大学　生物資源環境学部　食品科学科)

P26 **Y** **複雑系代謝物群の構造・運動性相関スペクトルの俯瞰的解析技術の開発**

○伊藤研悟[1,2], 坪井裕理[1], 伊達康博[1,2], 菊地淳[1,2,3] ([1]理化学研究所 環境資源科学研究センター, [2]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科, [3]名古屋大学大学院 生命農学研究科)

P27 **ATP によるタンパク質の線維化阻害機構の解明**

○西澤茉由, Erik Walinda, 森本大智, 菅瀬謙治, 白川昌宏(京都大学大学院工学研究科分子工学専攻)

P28 **NMR を用いた自然免疫受容体 Mincle による糖脂質認識機構の解析**

○古川敦[1], 須知佑介[1], 久米田博之[2], 松丸尊紀[1,3], 齊藤貴士[1,4], 前仲勝実[1] ([1]北海道大学大学院　薬学研究院, [2]北海道大学大学院　先端生命科学院, [3]慶應大学　理工学部化学科, [4]北海道薬科大学　薬学部薬学科)

P29 **炭疽病菌から分泌される細胞死誘導タンパク質の立体構造解析の検討**

○山口真紀[1], 梅本史絵[1], 高塚梨沙[1], 高原浩之[1], 久米田博之[2], 小椋賢治[1] ([1]石川県立大学　生物資源環境学部食品科学科, [2]北海道大学　先端生命科学院)

P30 **ワカサギ不凍タンパク質の立体構造解析の検討**

○竹本茉由[1], 廣瀬光[1], 中野明日香[1], 新井達也[2], 津田栄[3], 小椋賢治[1] ([1]石川県立大学　生物資源環境学部　食品科学科, [2]北海道大学大学院 先端生命科学院, [3]産業技術総合研究所　生物プロセス研究部門)

P31 **NMR を用いたシアノバクテリア由来 GAF ドメインの構造解析**

○会津貴大[1], 広瀬侑[2], 伊藤隆[1], 三島正規[1] ([1]首都大学東京大学院 理工学研究科, [2]豊橋技術科学大学 大学院工学研究科)

P32 **山廃酒母の熟成過程における成分変化の解析**

○高松美里, 上井史絵里, 鶴貝采映, 小栁喬, 小椋賢治(石川県立大学　生物資源環境学部　食品科学科)

P33 **水溶液中の重原子イオンとキレート化合物のスピン分極シフトの研究**

○桑原大介, 横山拓海, 佐藤立樹, 田崎健太, 中川直哉(電気通信大学　情報理工学研究科)

P34 **疎な多変量解析を用いたスペクトル - 機能相関解析法の開発**

○栗田順一, 平尾優佳, 西村善文(横浜市立大学大学院　生命医科学研究科)

P35 **NMR 法を用いたエピガロカテキンガレートの相互作用解析**

○金場哲平[1], 高橋知也[2,3], 黒田大祐[4], 長門石曉[3,5,6], 津本浩平[3,5,6,4] ([1]ブルカージャパン株式会社バイオスピン事業部アプリケーション部, [2]花王株式会社　ヘルスケア食品研究所, [3]東京大学大学院　工学系研究科　バイオエンジニアリング専攻, [4]東京大学大学院　工学系研究科　医工学RSセンター, [5]東京大学大学院　工学系研究科　化学生命工学専攻, [6]東京大学　医科学研究所)

P36 **Y** **NMR によるヒストンシャペロン NAP1 とヒストン H2A-H2B の相互作用解析**

○大友秀明, 森脇義仁, 栗田順一, 西村善文(横浜市立大学　生命医科学研究科)

P37 **HP1αの N 末端天然変性領域のリン酸化によるヘテロクロマチン形成機構の解明**

○古川亜矢子[1], 米澤健人[2], 安達成彦[2], 清水伸隆[2], 千田俊哉[2], 志村諒[3], 寺田透[3], 清水謙多郎[3], 中山潤一[4], 西村善文[1] ([1]横浜市立大学大学院　生命医科学研究科, [2]高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所　放射光科学研究施設, [3]東京大学大学院　農学生命科学研究科, [4]基礎生物学研究所　クロマチン制御研究部門)

P38 **ヒト単純ヘルペスウイルス由来糖ペプチドと免疫受容体 PILRα相互作用解析**

○野村尚生[1], 柿田浩輔[2], 古川敦[3], 穴田仁洋[2], 橋下俊一[2], 松永茂樹[2], 齊藤貴士[4], 前仲勝実[1,3] ([1]北海道大学大学院　薬学研究院, [2]北海道大学大学院 薬学研究院 薬品製造化学研究室, [3]北海道大学大学院 薬学研究院 生体分子機能学研究室, [4]北海道薬科大学 薬学科)

P39 **NMR 分光法によるロスマリン酸誘導体ーアミロイドβ_{42}の結合解析**

○上井幸司[1], 久米田博之[2,3], 坂本和[4], 杉浦亜美[1], 関千草[1], 中野博人[1], 徳樂清孝[1], 馬渡康輝[1] ([1]室蘭工業大学大学院工学研究科, [2]北海道大学　先端生命科学院, [3]北海道大学　国際連携研究教育局　ソフトマターグローバルステーション, [4]室蘭工業大学応用理化学系学科)

P40 ^{13}C NMR 化学シフト予測・部分構造検索機能を有するCAST/CNMRシステムの公開

○越野広雪[1], 朝倉克夫[2], 栗本智充[3], 小市俊悟[4], 佐藤寛子[5,6] ([1]理化学研究所 環境資源科学研究センター, [2]日本電子株式会社, [3]株式会社JEOL RESONANCE, [4]南山大学 システム数理学科, [5]情報・システム研究機構, [6]チューリッヒ大学 化学科)

P41 生きた真核細胞中での蛋白質立体構造決定

○池谷鉄兵[1], 田中孝[1], 鴨志田一[1], 三島正規[1], 白川昌宏[2], Peter Guentert[1,3,4], 伊藤隆[1] ([1]首都大学東京 大学院理学研究科, [2]京都大学 大学院工学研究科, [3]Goethe University Frankfurt, Institute of Biophysical Chemistry and Center for Biomolecular Magnetic Resonance, [4]ETH Zürich, Laboratory of Physical Chemistry)

P42 **Y** 免疫応答に関与するHOIL-1Lによる直鎖型ダイユビキチンの認識機構

○石井公貴[1], Erik Walinda[2], 岩川直都[1], 森本大智[1], 菅瀬謙治[1], 白川昌宏[1] ([1]京都大学大学院 工学研究科, [2]京都大学大学院 医学研究科)

P43 免疫抑制剤結合タンパク質FKBP12の薬剤認識における動的構造解析

○平河卓也, 岩川直都, 森本大智, 菅瀬謙治, 白川昌宏(京都大学大学院 工学研究科)

P44 **Y** アルキル側鎖を有する液晶性ポリエステルのアルカンガスの透過性のNMR法による評価

○庄司大槻, 吉水広明(名古屋工業大学大学院)

P45 Optimized Sample Storage Strategy for Metabolic Profiling of Human Feces

○包克非[1], 北田直也[1], 稲村勇雅[1], 熊木康裕[2], 大西裕季[2], 塚本卓[1,2,3], 菊川峰志[1,2,3], 出村誠[1,2,3], 中村公則[2], 綾部時芳[2], 中村幸志[5], 玉腰暁子[5], 相沢智康[1,2,3], 山野めぐみ[1], 山村凌大[4] ([1]北海道大学大学院 生命科学研究研究院 蛋白質科学研究室, [2]北海道大学・大学院先端生命科学研究院, [3]北海道大学・国際連携研究教育局, [4]北海道大学・大学院医学院, [5]北海道大学・大学院医学研究院)

P46 **Y** NMRメタボロームを用いた昆虫食に関する研究

○池田華子[1], 稲村勇雅[1], 久米田博之[2,3], 熊木康裕[2], 大西祐季[2], 塚本卓[1,2,3], 菊川峰志[1,2,3], 出村誠[1,2,3], 岡松滋美[4], 仲宗根豊一[4], 伊東昌章[5], 相沢智康[1,2,3] ([1]北海道大学 理学部, [2]北海道大学大学院先端生命科学研究院, [3]北海道大学GI-CoRE ソフトマターGS, [4]沖縄UKAMI養蚕, [5]沖縄工業高等専門学校)

P47 Deep-MagRO: 深層学習を応用した高速かつ高精度な統合的NMR解析システム

○小林直宏[1], 杉木俊彦[1], 永田崇[2], Peter Güntert[3,4,5], 児嶋長次郎[6], 藤原敏道[6] ([1]大阪大学蛋白質研究所, [2]京都大学エネルギー理工学研究所, [3]Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University, [4]Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, [5]Laboratory of Physical Chemistry, ETH Zürich, [6]横浜国立大学大学院工学院)

P48 **Y** calmodulin融合発現系を用いた抗菌ペプチド大量発現のNMR解析への応用

○加藤貴純[1], 大沼幸暉[1], 石田博昭[2], 塚本卓[1,3], 菊川峰志[1,3], 出村誠[1,3], Hans J. Vogel[2], 相沢智康[1,3] ([1]北海道大学大学院 生命科学院, [2]Department of Biological Science, University of Calgary, [3]北海道大学 GI-CORE ソフトマターGS)

P49 NMR解析に向けた凝集性を抑制した一本鎖抗体（scFv）の作製

○小橋川敬博[1], 翁力棟[2], 福田夏希[2], 豊田湧也[2], 久米田博之[3], 佐藤卓史[1], 山内聡一郎[2], 新家粧子[4], 児嶋長次郎[4,5], 森岡弘志[1] ([1]熊本大学大学院生命科学研究部(薬), [2]熊本大学大学院薬学教育部, [3]北海道大学大学院先端生命科学院, [4]大阪大学蛋白質研究所, [5]横浜国立大学大学院工学府)

P50 **Y** NMRメタボロミクスによるブタ生育状態の解析

○北田直也[1], 山野めぐみ[1], 稲村勇雅[1], 久米田博之[2,3], 熊木康裕[2], 大西裕季[2], 塚本卓[1,2,3], 菊川峰志[1,2,3], 出村誠[1,2,3], 相沢智康[1,2,3] ([1]北海道大学大学院 生命科学院, [2]北海道大学大学院 先端生命科学研究院, [3]北海道大学GI-CoREソフトマターGS)

P51 分子運動を利用した固体 ^{2}H NMRスペクトルの分離

○飯島隆広[1], 清水禎[2] ([1]山形大学学術研究院, [2]物質・材料研究機構)

P52 固体 NMR によるポリヒドロキシ酪酸／ポリカプロラクトンブレンドの解析評価
○西田雅一[1], 早川由夫[1], 安田洸平[2], 西田政弘[2] ([1]産業技術総合研究所, [2]名古屋工業大学大学院)

P53 層状複水酸化物の固体 NMR 解析
○宮本佳子, 日野上麗子(パナソニック株式会社)

P54 **Y** チオリシコン系ガラスの構造および結晶生成メカニズムの解析
○浜辺啓汰[1], 宇都野太[2], 山口展史[2], 岩舘泰彦[1], 大窪貴洋[1] ([1]千葉大学大学院 融合理工学府, [2]出光興産 先進技術研究所)

P55 固体 NMR による酸素欠陥発光ガラスの構造解析
○小島充, 岩舘泰彦, 大窪貴洋(千葉大学大学院 融合理工学府)

P56 **Y** ^{15}N 標識化人工石炭の局所構造：超高速 MAS 下での ^{1}H-^{15}N doubleCP 法による解析
○奥下慶子[1], 畑友輝[1], 杉本義一[2], 高橋貴文[1], 金橋康二[1] ([1]新日鐵住金株式会社 技術開発本部, [2]産業技術総合研究所)

P57 固体 NMR 法を用いたガングリオシド膜上におけるアミロイドβの構造解析
○矢木真穂[1,2,3], 加藤晃一[1,2,3], 西村勝之[2] ([1]自然科学研究機構　生命創成探究センター, [2]自然科学研究機構 分子科学研究所, [3]名古屋市立大学　大学院薬学研究科)

P58 **Y** ^{13}C 固体 NMR による新規選択的スペクトル抽出法の開発及び定量測定への適用
○朝田麻実子(アステラス製薬株式会社　製薬技術本部　物性研究所)

P59 CdSe マジックサイズクラスターの固体 NMR による構造解析
○栗原拓也, 野田泰斗, 竹腰清乃理(京都大学大学院理学研究科)

P60 CdSe クラスターを保護するシステインの特異な運動の解析
○俣野晃広, 栗原拓也, 野田泰斗, 竹腰清乃理(京都大学大学院　理学研究科)

P61 光照射固体 NMR によるレチナール蛋白質の光中間体の定常捕捉とレチナール配座の解析
○内藤晶[1], 槇野義輝[1], 川村出[1], 藤原敏道[2], 松木陽[2], 加茂直樹[3], 須藤雄気[4] ([1]横浜国立大学大学院工学研究院, [2]大阪大学蛋白質研究所, [3]北海道大学大学院先端生命科学院, [4]岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

P62 **Y** 1H NMR 緩和時間法によるセメント間隙中水移動過程の解明
○坂田渚彩[1], 舘幸男[2], 岩舘泰彦[1], 大窪貴洋[1] ([1]千葉大学大学院　工学研究院, [2]日本原子力研究開発機構 核燃料サイクル工学研究所)

P63 固体 NMR によるβ_2-microglobulin アミロイド線維の立体構造解析
○田巻初, 宗正智, 後藤祐児, 藤原敏道, 松木陽(大阪大学 蛋白質研究所)

P64 **Y** Xe-129 NMR を用いた低温における PPO への Xe 収着による可塑化現象の観察
○石谷創, 吉水広明(名古屋工業大学大学院)

P65 ポリ（γ-グルタミン酸）とその複合体の固体 NMR を用いた構造解析
○藤井美暉子, 斎藤京子, 前田史郎(福井大学大学院工学研究科生物応用化学専攻)

P66 アルギン酸 / イミダゾール複合体膜のプロトン伝導性とイミダゾールの挙動解析
○梶本翔[1], 近井琢磨[2], 雨森翔悟[3], 井田朋智[2], 水野元博[2,3] ([1]金沢大学理工学域物質化学類, [2]金沢大学院自然科学研究科, [3]金沢大学新学術創成研究機構)

P67 固体 NMR によるポリブタジエン /5CB 複合体の内部構造と液晶の配向挙動の解析
○安念雅史[1], 雨森翔悟[3], 井田朋智[2], 水野元博[2,3] ([1]金沢大学理工学域物質化学類, [2]金沢大学大学院自然科学研究科, [3]金沢大学新学術創成研究機構)

P68 **Y** ポリ -4- メチルペンテン 1 の結晶相における気体拡散の異方性評価
○野村優友, 吉水広明(名古屋工業大学大学院　工学研究科)

P69　**ポリ（アクリル酸）複合体の固体 NMR による構造解析**
○杉森諭, 川畑優璃, 前田史郎（福井大学大学院　工学研究科　生物応用化学専攻）

P70 **Y** **シクロヘキサンの液体 - 液体転移の解析**
○須藤亜紀乃[1], 辰巳創一[2], 水口朋子[2], 藤原進[2], 武田和行[1], 野田泰斗[1]（[1]京都大学大学院理学研究科, [2]京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科）

P71　**分極剤濃度が高磁場 DNP 効率に与える影響の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）

P72　**1 スピンラベル試料を用いた DARR 交換 1 次元 NMR による炭素間距離解析**
○大橋竜太郎[1], 大木忍[2], 出口健三[2], 最上祐貴[2], 丹所正孝[2], 清水禎[2], 水野元博[1]（[1]金沢大学大学院　自然科学研究科, [2]物質・材料研究機構）

P73　**固体 NMR を用いた Alite（$3CaO \cdot SiO_2$）の水和硬化過程の解析**
○高橋貴文, 金橋康二（新日鐵住金株式会社　先端技術研究所）

P74　**固体 NMR によるポリビニルピロリドン中に存在する水の状態分析**
○石田宏之, 中田克, 古島圭智, 松田景子（株式会社東レリサーチセンター）

P75　**超偏極 MAS-DNP 固体 NMR による絶対偏極率測定法の開発と偏極の不均一性評価**
○杉下友晃, 深澤隼, 松木陽, 藤原敏道（大阪大学　蛋白質研究所）

P76　**NMR を用いた代謝・運動性プロファイルから見る魚類多様性**
○魏菲菲[1], 伊藤研吾[1], 坂田研二[1], 朝倉大河[1], 清水智子[1], 伊達康博[1,2], 菊地淳[1,2,3]（[1]理化学研究所環境資源科学研究センター, [2]横浜市立大学生命医科学研究科, [3]名古屋大学大学院生命農学研究科）

P77　**タンパク質の固体 NMR 分解能向上のための側鎖選択的重水素標識法の開発**
○宮崎勇輝[1], 高橋涼[1], 松田勇[1], 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]理化学研究所 RSC NMR 研究開発部門）

P78　**体毛からの有用情報抽出のための試料調製と NMR 解析条件検討**
○塚本楓[1], 坂田研二[2], 菊地淳[1,2,3]（[1]横浜市立大学大学院　生命医科学研究科, [2]特定国立研究開発法人理化学研究所　環境資源科学研究センター, [3]名古屋大学大学院　生命農学研究科）

P79　**MATPASS 法を用いた蓄電池正極の Li 脱離・挿入挙動解析**
○下田景士[1], 矢澤宏次[2], 村上美和[1], 松原英一郎[3]（[1]京都大学産官学連携本部, [2]（株）JEOL RESONANCE, [3]京都大学大学院 工学研究科）

P80　**褐炭の酸及び熱処理による改質における構造変化の固体 NMR による検討**
○出田圭子[1], 下原孝章[1], 上田守男[2], 宮脇仁[1], 尹聖昊[1], 齋藤公児[3], 持田勲[2]（[1]九州大学 先導物質化学研究所, [2]九州環境管理協会, [3]新日鉄住金株式会社 技術開発本部）

P81　**高次元固体 NMR 測定の高速化**
○高橋涼[1], 宮崎勇輝[1], Ayesha Wickramasinghe[1,2], 松田勇[1], 松永達也[2], 神原孝之[1], 山崎俊夫[2], 石井佳誉[1,2]（[1]東京工業大学大学院　生命理工学院　石井研究室, [2]理化学研究所　NMR 研究開発部門）

P82 **Y** **NMR 測定を用いたゴム状高分子に収着した気体の拡散性評価**
○松下晴香, 吉水広明（名古屋工業大学大学院）

P83　**1H 検出と Hadamard 法を使った高速固体二次元相関測定**
○堤遊[1], Jean-Paul Amoureux[2]（[1]ブルカージャパン株式会社, [2]リール第1大学）

P84 **Y** **固体 MAS NMR による光駆動型ナトリウムイオンポンプロドプシン KR2 のアルカリ金属イオン依存的な構造変化の解析**

○金子莉奈[1], 重田安里寿[2], 長島敏雄[3], 山崎俊夫[3], 井上圭一[4,5,6], 神取秀樹[5], 川村出[1,2] ([1]横浜国立大学大学院 理工学府　化学生命系理工学専攻　川村研究室, [2]横浜国立大学大学院　工学府, [3]理研RSC NMR, [4]東京大学, [5]名古屋工業大学　大学院工学研究科, [6]JST・さきがけ)

P85 **固体 NMR による自己組織化ペプチドの構造解析**

○川村出[1,2], 白方宏樹[2], 尾澤夢実[1], Batsaikhan Mijiddorj[1], 上田一義[1], 内藤晶[1] ([1]横浜国立大学大学院 工学研究院, [2]横浜国立大学大学院 理工学府)

P86 **Y** **Cross-seeding of 40- and 42-residue Alzheimer's *β*-Amyloids**

松田勇[1,3], ○石黒貴也[1], 石井佳誉[1,2,3], Yoo Brian[3] ([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, [3]Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago)

P87 **PHIP-SAH 法を用いた ^{13}C 標識ピルビン酸の励起技術の開発**

○加瀬優希[1], 蛸島健介[2], 内尾佳貴[2], 松元慎吾[2], Neil J Stewart[2] ([1]北海道大学　工学部　情報エレクトロニクス学科　生体情報コース, [2]北海道大学大学院　情報科学研究科　生命人間情報科学専攻)

P88 **パラ水素誘起偏極法による磁場サイクル型 ^{13}C 励起装置の開発**

○福江優香[1], 内尾佳貴[2], Neil J Stewart[2], 平田拓[2], 松元慎吾[2] ([1]北海道大学工学部　情報エレクトロニクス学科　生体情報コース, [2]北海道大学大学院　情報科学研究科　生命人間科学専攻)

P89 **超偏極キセノンガス生成供給装置普及版の製作と応用**

○藤原英明[1,2], 今井宏彦[3], 木村敦臣[1] ([1]大阪大学大学院医学系研究科, [2]MRメドケム研究所合同会社, [3]京都大学大学院情報学研究科)

P90 **Y** **Multiplexed HyperCEST detection of genetically-reconstituted gas vesicle nanoparticles in human cancer cells in vitro.**

○水島良太[1,2,3], 井上加奈子[4], 永井里奈[2], 岩根敦子[2], 渡邊朋信[2], 木村敦臣[3] ([1]東京医科大学, [2]理化学研究所生命機能科学研究センター, [3]大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻, [4]大阪大学超高圧電子顕微鏡センター)

P91 **パラ水素誘起偏極法による INEPT 型 ^{13}C 励起装置の開発**

○友広潤志, Neil J Stewart, 平田拓, 松元慎吾(北海道大学大学院　情報科学研究科　生命人間情報科学専攻)

P92 **Y** **時間領域におけるスパース性仮定に基づくベースライン補正法の提案**

○中尾朋喜, 泉顕也, 内海博明(株式会社 JEOL RESONANCE)

P93 **TD-NMR によるゴムの架橋状態の評価**

○原英之(ブルカージャパン株式会社バイオスピン事業部)

P94 **Y** **内積 NMR：共分散 NMR の改良版**

○小林洋太, 竹腰清乃理, 野田泰斗, 武田和行(京都大学大学院 理学研究科化学専攻)

P95 **クライオコイル MAS プローブにおけるリンギング対策**

○最上祐貴[1], 清水禎[1], 水野敬[2], 戸田充[2], 根本貴宏[2], 竹腰清乃理[3] ([1]物質・材料研究機構, [2]株式会社　JEOL RESONANCE, [3]京都大学　理学研究科)

P96 **Y** **パラ水素誘起分極法による ^{13}C 標識ピルビン酸代謝の *in vivo* 超偏極 ^{13}C NMR 計測手法の開発**

○本間章太郎, Neil J Stewart, 内尾佳貴, 松元慎吾(北海道大学大学院　情報科学研究科　生命人間情報科学専攻)

P97 **周期的匂い刺激と独立成分解析を利用したマウス全脳の嗅覚応答の検出**

○武田光広, 林芙優, 杠直哉, 吉永壮佐, 寺沢宏明(熊本大学大学院生命科学研究部)

P98 **Y** **磁場配向微結晶懸濁体の *in situ* 固体 NMR 測定　- 磁場配向プローブの開発 -**

○門間啓[1], 久住亮介[1], 和田昌久[1], 木村恒久[1], 武田和行[2] ([1]京都大学大学院　農学研究科, [2]京都大学大学院理学研究科)

P99 **高温超電導 RF コイルによる四極子核 NMR プローブの開発（1） − RF コイルの Q 値向上と測定試料の大容量化 −**

○高橋雅人[1], 加藤翔太[2], Techit Tritrakarn[2], 岡村哲至[2], 入江晃太朗[3], 星晴貴[3], 齊藤敦[3], 山田和彦[4] ([1]理化学研究所放射光科学研究センター, [2]東京工業大学大学院 工学院, [3]山形大学大学院 理工学研究科, [4]高知大学教育研究部)

P100 Y **高温超電導 RF コイルによる四極子核 NMR プローブの開発（2） − RF コイルの Q 値向上と測定試料の大容量化 −**

○加藤翔太[1], Techit Tritrakarn[1], 岡村哲至[1], 高橋雅人[2], 入江晃太朗[3], 星晴貴[3], 齊藤敦[3], 山田和彦[4] ([1]東京工業大学 工学院, [2]理化学研究所 放射光科学研究センター, [3]山形大学大学院 理工学研究科, [4]高知大学 教育研究部)

第1日目
9月18日(火)
一般演題
Day 1 (Sep. 18, Tue)

L1-1

NMRによる抗菌ペプチドnukacin ISK-1 の溶液構造決定と熱力学的解析

○藤浪大輔[1]，Abdullah Al Mahin [2]，Khaled M Elsayed [2]，永尾潤一[3]，善藤威史[2]，園元謙二[2]，神田大輔[1]
1九州大学・生体防御医学研究所
2九州大・農学研究院
2福岡歯科大・機能生物化学講座

NMR and thermodynamic analyses of the antimicrobial peptide nukacin ISK-1

○Daisuke Fujinami [1], Abdullah Al Mahin [2], Khaled M Elsayed [2], Jun-ichi Nagao [3], Takeshi Zendo [2], Kenji Sonomoto [2], and Daisuke Kohda [1]
1 Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
2 Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University
3 Department of Functional Bioscience, Fukuoka Dental College

Nukacin ISK-1 is a 27-residue antimicrobial peptide, containing two lanthionines, one methylanthionine, and one dehydrobutyrine. The nukacin ISK-1 exerts antimicrobial activity through binding to lipid II, an essential intermediate in cell wall biosynthesis. Here, we performed the NMR structure determination and the thermodynamic analysis of nukacin ISK-1. Unexpectedly, nukacin ISK-1 exists in two structural states in aqueous solution, with an interconversion rate on a time scale of seconds. The two structures differ in the relative orientations of the two lanthionine rings. Chemical shift perturbation induced by the titration of lipid II revealed that only one state was capable of binding to lipid II. The thermodynamic analysis of the chemical exchange between the two states showed that ΔH and ΔS values of the N-terminal region were both lower than those of the C-terminal globular region, suggesting conformational change occurs non-cooperatively.

【序論】

Nukacin ISK-1は表皮ブドウ球菌*Staphylococcus warneri*により産生される27残基よりなる抗菌ペプチドで、分子内に非天然アミノ酸（lanthionine、methylanthionine、dehydrobutyrine）を持つ（Fig. 1）。これまでの研究によりNukacin ISK-1は細胞壁前駆体であるlipid IIに結合し細胞壁の生合成を阻害することで抗菌活性を発揮することが明らかになった[1]。本研究では、nukacin ISK-1とlipid IIの相互作用の構造基盤を明らかにするためにnukacin ISK-1の溶液構造決定とlipid IIとの相互作用解析を行った。

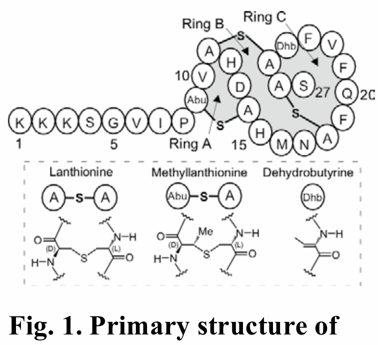


Fig. 1. Primary structure of nukacin ISK-1.

【方法】

Nukacin ISK-1の$^{13}C/^{15}N$安定同位体標識体は*S. warneri*を培養したCHL培地（クロレラ工業社）の上澄から精製した。NMR測定はBruker Avance 600にて行った。

抗菌ペプチド、化学交換、熱力学的解析

○ふじなみだいすけ、あぶどぅるあるまひん、かれいどえるさいーど、ながおじゅんいち、ぜんどうたけし、そのもとけんじ、こうだだいすけ

【結果と考察】

Nukacin ISK-1の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルはK2~S27（state A）とK2'~S27'（state B）に帰属される２組のクロスピークからなっていた（Fig. 2）。313 KでNOESYを測定し各状態の構造決定を試みたが、NOEピークよりもstate Aとstate B間のEXSYピークが顕著に現れ、NOEに基づいた構造計算が困難であった。２つの異なる温度（283 Kと326 K）でNOESYを測定したところ、283 Kではstate Bが、326 Kではstate Aが優勢になり、各状態でのNOEを150組程度集めることができた。このNOEに基づき構造計算をそれぞれ行い、state A（主鎖RMSD=1.75Å）とstate B（主鎖RMSD=1.59 Å）の構造を独立に決めることができた。二つの構造を比較すると、二つのlanthionine環（Ring AとRing C）のトポロジーが異なっていた（Fig. 3）。また両構造ともN末端テイル（S4~I7）の構造は収束していなかった。

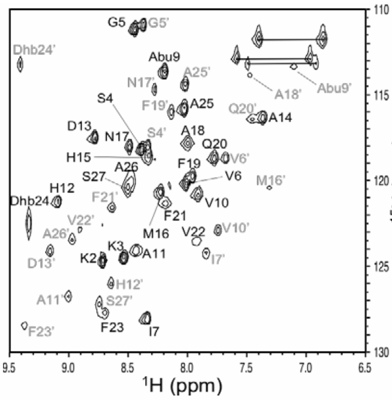


Fig. 2. ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of nukacin ISK-1 at 313 K.

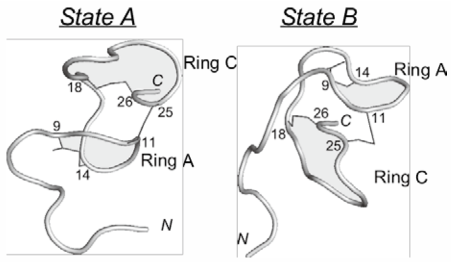


Fig. 3. Cartoon representation of nukacin ISK-1 in state A and state B.

続いて、化学シフト摂動法によりnukacin ISK-1とlipid IIの相互作用解析を行った。lipid IIはC55のウンデカプレニル脂肪鎖を持つため水への溶解性に乏しい。そのため最初に重水素化した界面活性剤n-octyl-β-glucoside（β-OG）ミセルをnukacin ISK-1に滴定し、そこに乾固したlipid IIを段階的に加えた。lipid IIの添加に伴いstate Aは比較的大きな化学シフト変化を示したが、state Bは顕著な化学シフト変化を示さなかった（Fig. 4）。Ile7の化学シフト変化量に基づきβ-OGミセルとlipid IIに対するstate Aの解離定数K_dを求めたところ、それぞれ1.7±0.8 mMと2.2±1.4 μMであった。state AのC末端側にある疎水性残基（F19~Dhb24）はβ-OGおよびlipid IIの添加に伴い化学シフトが変化した。一方、N末端領域にある残基（Ile7~V10）はlipid IIの添加のみで化学シフトが変化した。この結果から、我々はC末端側にある表面に露呈した疎水性残基がlipid IIのウンデカプレニル脂肪鎖との結合に、N末端領域にあるアミノ酸がリン酸基との結合に関与していると推測した（Fig. 5）。

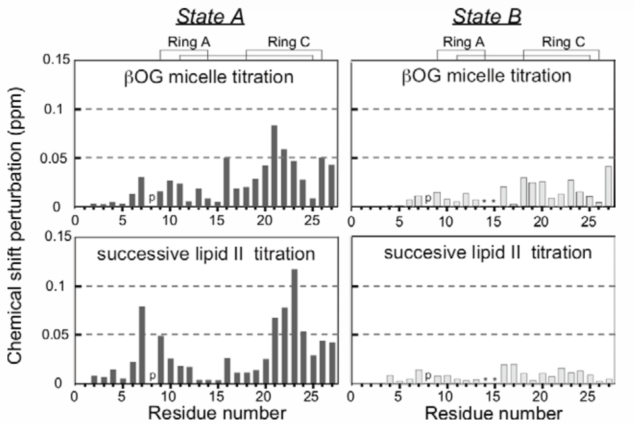


Fig. 4. Chemical shift perturbations of the ^{1}H-^{15}N crosses peaks of nukacin ISK-1 in two-step titration.

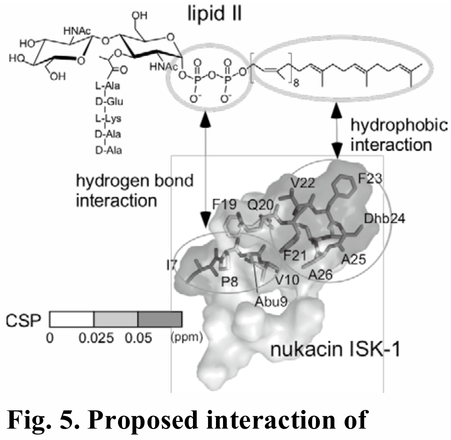


Fig. 5. Proposed interaction of nukacin ISK-1 with lipid II.

続いて、state Aとstate Bの間の平衡について熱力学的解析を行った。288 K～323 Kの間で5 Kごとにstate Aとstate Bの存在比（p_Aとp_B）を^{1}H-^{15}N HSQCピーク強度から求め、平衡定数K（p_A/p_B）を導出した。温度の逆数に対してln$K$をプロットし、近似曲線の傾きと切片の値からΔH°とΔS°を各残基ごとに求めた。例としてN末端テイル（S4~I7）にあるV6と球状領域（Abu9~S27）にあるA14のvan't Hoff プ

ロットをFig. 6に示す。求めたΔH°とΔS°の値から各残基においてstate Aの存在比p_Aの温度変化を計算した（Fig. 7）。

過去にタンパク質の構造変化におけるΔH°とΔS°を各残基毎に求めた例が他グループより報告されている。タンパク質の折りたたみなど多くの構造変化は協同的に起こるため残基間でのΔH°とΔS°はほぼ同じ値を取るが[2]、コイルドコイルタンパク質の折りたたみなどいくつかの例では残基ごとにΔH°とΔS°の値が異なっている[3]。Nukacin ISK-1の場合では、N末端テイルにある残基ではΔH°とΔS°ともに0に近い値を示した。一方、球状領域にある残基ではΔH°とΔS°ともに比較的大きな負の値を示した（Fig. 6）。このことはstate Aとstate B間の構造変化において、N末端テイルと球状領域が独立に構造変化を起こしていることを示す。球状領域においてはどの残基もある程度似た負のΔH°とΔS°値を示したことから各残基が弱い協同性を持って同時に構造変化を起こしていると解釈した。これはstate Aとstate Bの間の構造変化がlanthionine環の「輪くぐり」によって起こることに起因しているのかもしれない。ΔS°が負になることからstate Bの方が構造的な自由度が小さいことが示唆された。実際にstate BではF21を中心に多くの疎水性残基側鎖が内部を向いており、疎水性コアが形成されている（Fig. 8）。

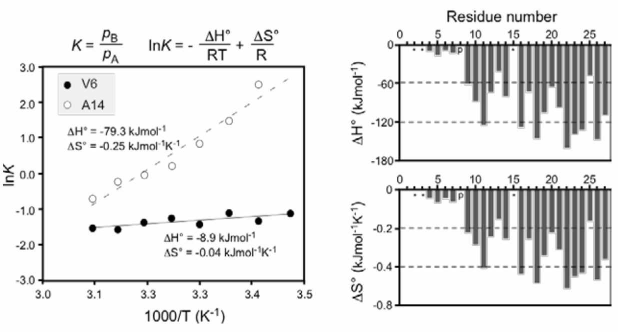


Fig. 6. van't Hoff plot of nukacin ISK-1.

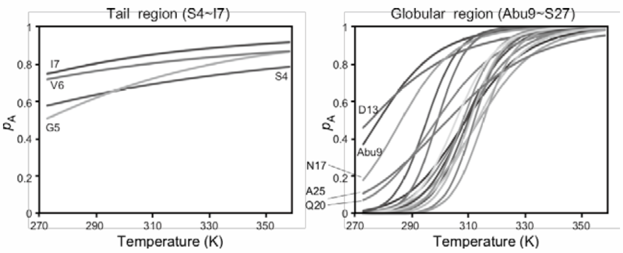


Fig. 7. Temperature dependency of the population shift of nukacin ISK-1

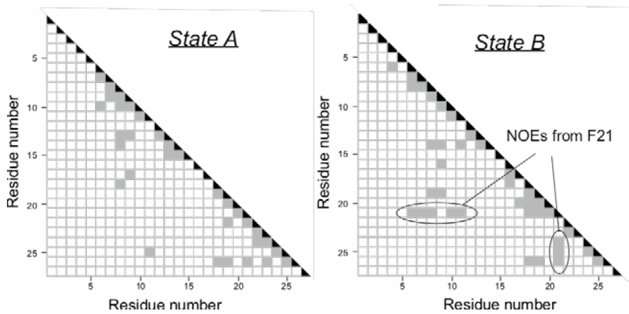


Fig. 8. NOE contact map of nukacin ISK-1

次に、state Aとstate Bの間の化学交換速度の温度変化を調べた。^{15}N edited ^{1}H -^{1}H NOESYのスペクトル上のautoピークとEXSYクロスピークの強度の情報から化学交換速k_{ex}を求めた（Fig. 9）。さらに298 K～323 Kの間で5 Kおきにk_{ex}を各残基について求め、求めたk_{ex}の値から反応速度k_{AB}（state A→ state B）とk_{BA}（state A←state B）を導出し、温度の逆数に対してln(hk)/(k_BT)をプロットした（Eyringプロット、k:反応速度、h:プランク定数、k_B:ボルツマン定数）。近似曲線の傾きと

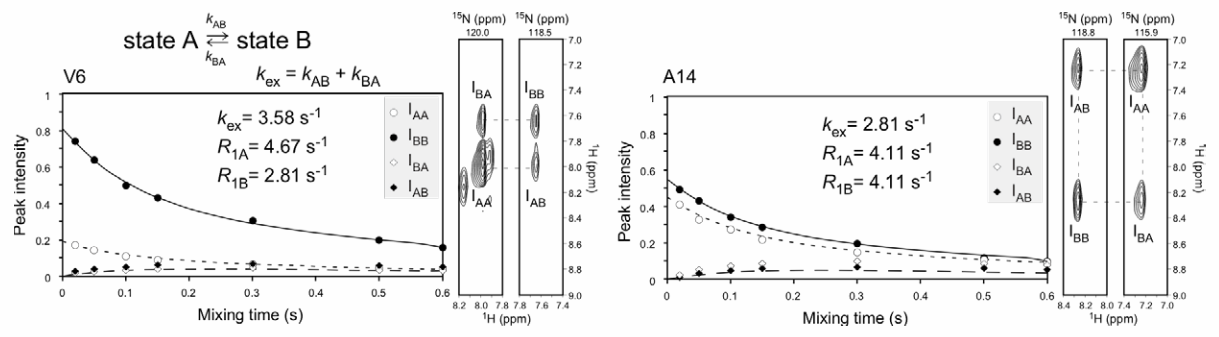


Fig. 9. Chemical exchange rate (k_{ex}) estimation.

切片の値からΔH‡とΔS‡を各残基ごとに求めた（Fig.10）。

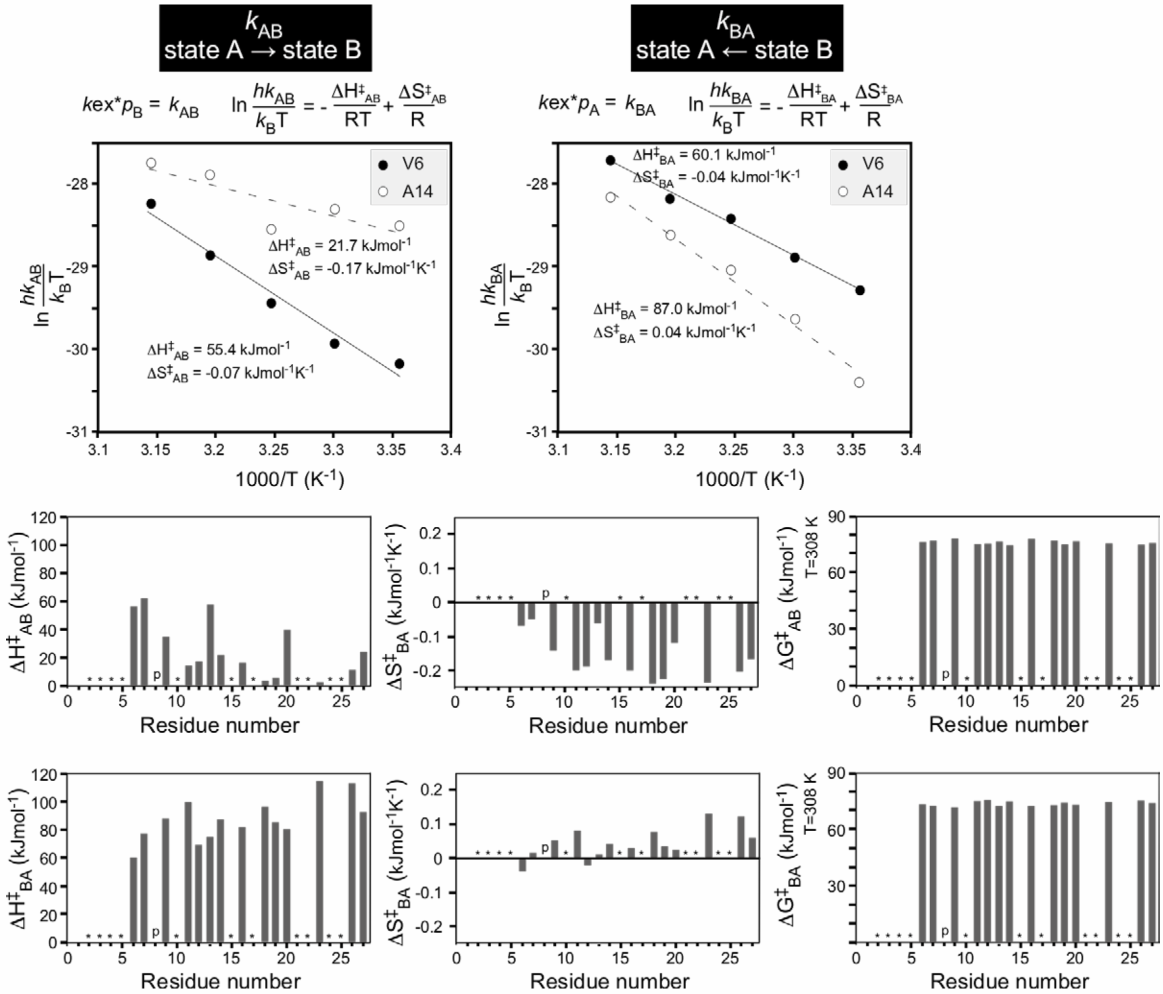


Fig. 10.　Eyring plot of nukacin ISK-1.

得られたΔS‡をN末端テイルと球状領域で比較した。N末端テイルにあるV6とI7ではゼロに近い値を示した。このことは遷移状態の構造的な自由度がstate A≈ 遷移状態 ≈state Bであることを示唆する。一方球状ドメインでは、state A→遷移状態への構造変化では比較的大きな負のΔS‡になり、state B→遷移状態ではやや小さな正のΔS‡になった。このことは構造的な自由度の大きさがstate A＞ 遷移状態 ≳state Bであることを示す。現在、得られた遷移状態における熱力学的なパラメーターを構造に基づいて解釈することはできていない。今後は分子動力学計算を行い、遷移状態における構造情報を得たいと考えている。

【参考文献】

1. Islam, M. R. *et al.* Ring A of nukacin ISK-1: A lipid II-binding motif for type-A(II) lantibiotic. *J. Am. Chem. Soc.* **134,** 3687–3690 (2012).
2. Sadqi, M., Fushman, D. & Muñoz, V. Atom-by-atom analysis of global downhill protein folding. *Nature* **442,** 317–321 (2006).
3. D'Avignon, D. A. G. L. B., Holtzer, M. E. & Holtzer, A. Thermodynamics and Kinetics of a Folded-Folded' Transition at Valine-9 of a GCN4-Like Leucine Zipper. *Biophys. J.* **76,** 2752–2759 (1999).

L1-2

^{15}N 直接検出NMR法による高分子量バイオ医薬の非侵襲的観測

○徳永 裕二[1,2]，竹内 恒[1]，鳥澤 拓也[3]，奥出 順也[3]，嶋田 一夫[1,4]
1産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター
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東京大学大学院薬学系研究科

Non-invasive observation of high molecular weight biologics aided by nitrogen-detected NMR

○Yuji Tokunaga[1,2], Koh Takeuchi[1], Takuya Torizawa[3], Junya Okude[3], Ichio Shimada[1,4]
1Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery (molprof), AIST
2Japan Biological Informatics Consortium
3Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.
4Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo

Biologics, including monoclonal antibodies (mAbs), constitute a therapeutic modality for various diseases. Correct tertiary structures, especially under the same conditions as the final formulation, are required for efficacy and safety of biologics. NMR is a potential method to analyze the structural characteristics of biologics under storage conditions. However, conventional NMR techniques cannot deal with this task, as biologics are mostly non-deuterated high-molecular-weight proteins and tumble slowly in highly concentrated solution stored at 4°C, which additively accelerate the transverse relaxation rate. In this research, we introduced a ^{15}N-detected CRINEPT experiment, which was optimized for extremely slow-tumbling biologics. We successfully obtained 2D backbone fingerprints of an mAb under formulation and discriminated the galactosylation variants at the sugar chain end.

【序論・研究の目的】 溶液NMR法は、バイオ医薬品の非侵襲的かつ立体構造に基づく品質評価を可能とする原理的特徴を持つものの、抗体などの重水素化が困難な高分子量タンパク質の保存温度における観測は、^{1}H核の速い緩和に阻まれ困難であった。本研究では、近年開発された^{15}N直接検出TROSY法を高分子量領域に最適化することにより課題を克服し、NMRによる品質評価法の確立を目指す。

【方法】 高分子量タンパク質に最適化した ^{15}N 検出型 ^{1}H–^{15}N CRINEPT 測定法の構築

^{15}N直接検出TROSY法を用いることにより、重水素化されていないタンパク質であっても、高分解能の直接観測軸方向に先鋭なシグナルを与えるスペクトルを、溶液中にて高感度に取得可能である【参考文献1】。しかしながら、分子量100 kDa超の高分子量タンパク質においては、^{1}H–^{15}Nスピン結合（J結合）を介した磁化移動および逆位相磁化の再結像に要する時間（約5ミリ秒ずつ）、および化学シフト展開期における、横緩和による磁化の減衰は甚大となり、測定感度を大幅に損なう。本研究では、(1)高分子量にて高効率となる交差相関緩和を利用したCRINEPT磁化移動を^{15}N検出実験に適用することで至適磁化移動時間を短縮し、さらに(2)磁化移動と化学シフト展開期を融合し、かつプロトン方向の位相再結像を省略することにより、励起パルスから信号取り込み開始までの時間を最小限とした（Fig. 1A）。

高分子量タンパク質、バイオ医薬、^{15}N直接検出

○とくなが ゆうじ、たけうち こう、とりざわ たくや、おくで じゅんや、しまだ いちお

【結果1】 150 kDa 抗体分子の製剤・保存条件における^{1}H–^{15}N二次元相関スペクトル測定

医療用抗体にAla選択的^{15}N標識を導入し、^{1}Hおよび^{15}N検出型の二次元^{1}H–^{15}N TROSYおよびCRINEPTスペクトルを測定した。テストバッファー中、32℃の条件においては、いずれの測定も良好なスペクトルを与えた（Fig. 1B）。これに対し、安定化剤としてアミノ酸および界面活性剤を含有する製剤溶液組成–1にて、保存温度である4℃の条件では、^{1}H検出測定および^{15}N検出TROSY測定においては抗体に由来するシグナルは検出されず、^{15}N検出CRINEPT測定においてのみ、良好なスペクトルを観測した(Fig. 1C)。アミノ酸配列上のAla残基数31個に対し、20個強のシグナルが観測されており、約70%のシグナルを検出できていることが確認された。また、高濃度の精製白糖を含有する、より高粘度の製剤溶液組成–2においても、4℃にて同等のスペクトルを取得可能であった(Fig. 1D)。したがって、同測定法は多様な製剤条件に対して頑強であることが示された。一方、溶液条件の変更に伴い一部のシグナルに化学シフトおよび強度の変化が認められたことから、同測定が溶液条件に依存した局所構造の変化を鋭敏に反映し、製剤の同一性評価に有用であることが示唆された。

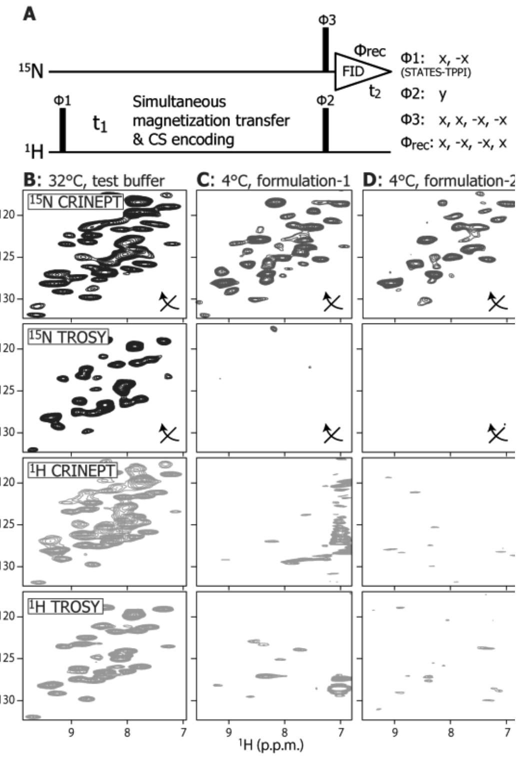


Fig. 1: ^{15}N-detected CRINEPT experiments for a therapeutic mAb under formulation

【結果2】 医薬抗体分子における糖鎖修飾状態の解析

バイオ医薬の立体構造評価における^{15}N検出CRINEPT法の活用として、抗体の糖鎖修飾状態の解析を検討した。抗体Fc鎖のAsn297におけるN型糖鎖の様式は、培養細胞の種類や培養条件の変化に敏感であるばかりでなく、薬理活性および体内動態にも影響することが知られており、開発および生産段階における修飾状態の評価は非常に重要である。ここでは、最もタンパク質主鎖から離れた、糖鎖末端におけるGal修飾の有無に着目し、Lys選択的^{15}N標識を施した抗体試料の^{15}N検出CRINEPTスペクトルを取得した。この際、酵素的に末端Galを付加（G2）または除去（G0）状態に制御した対照サンプルを調製し、酵素未処理（intact）の抗体とともに測定に供した。この結果、G2およびG0のスペクトル上にて、互いに異なる化学シフトを有するシグナルが見出された（Fig. 2A）。Intactにおいては、G2およびG0の両者に由来するシグナルとともに、G2およびG0の中間の化学シフトを有するシグナルGxが観測された（Fig. 2B）。これらのシグナル強度はG0>Gx>G2であり、Gx=G1と仮定すると、質量分析から推定された成分含有率と同様の傾向を示した。一方、NMRデータからは、質量分析にて区別が困難である、Fc二量体中のG1/G1とG0/G2を識別できる可能性があり、質量分析と相補的な情報を与えることで、より高精度な品質評価が期待できる。このように、^{15}N検出CRINEPT法により抗体医薬の微細な構造変化を検出可能であることが例証され、溶液NMR法に基づくバイオ医薬の非侵襲的な立体構造評価の端緒が開かれた。

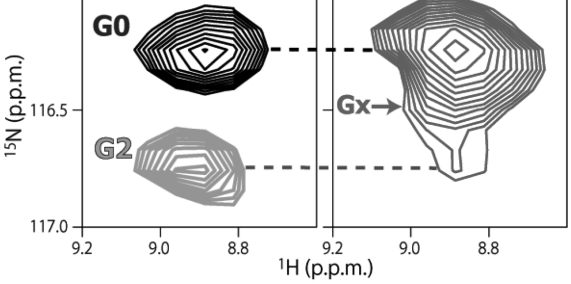


Fig. 2: Expanded regions of ^{15}N-CRINEPT spectra of mAbs in different glycosylation states

[1] Takeuchi K, Arthanari H, Shimada I, Wagner G, *J. Biomol. NMR* (2015) **63**(4):323-331.

L1-3

Gタンパク質共役型内向き整流性カリウムチャネルのエタノール依存的な活性化機構の解明

○外山侑樹[1,2], 加納花穂[1], 間瀬瑶子[1], 横川真梨子[1], 大澤匡範[1], 嶋田一夫[1]
1. 東京大学大学院薬学系研究科
2. 日本バイオ産業情報化コンソーシアム

Structural basis for the ethanol action on G-protein–activated inwardly rectifying potassium channel revealed by NMR spectroscopy

○Yuki Toyama[1,2], Hanaho Kano[1], Yoko Mase[1], Mariko Yokogawa[1], Masanori Osawa[1] and Ichio Shimada[1]
1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo
2. Japan Biological Informatics Consortium (JBiC)

Ethanol exerts physiological effects by modulating the activities of signaling proteins, such as ion channels. G protein-activated inwardly rectifying potassium channel (GIRK) is the primary *in vivo* target of ethanol. Mutational studies of GIRK have shown that ethanol directly binds to the cytoplasmic region, however, very little is known about the molecular mechanisms underlying the ethanol action. Here, by utilizing solution NMR spectroscopy, we characterized the changes in the structure and dynamics of GIRK induced by ethanol binding. We demonstrated that ethanol binds to GIRK with the apparent dissociation constant of 1.0 M, and that ethanol activates GIRK by shifting the conformational equilibrium of GIRK and stabilizing the cytoplasmic ion gate in an open conformation.

エタノールはイオンチャネルなどシグナル伝達を担うタンパク質に結合し、その機能を変調することによって様々な生理応答を誘起する。心拍数の制御や抑制性神経伝達などの生理応答を担うGタンパク質共役型内向き整流性カリウムチャネル (G protein-activated inwardly rectifying potassium channel, GIRK) は、エタノールの主要な標的タンパク質の1つである。GIRKの電気生理解析やGIRKノックアウトマウスを用いた解析から、GIRKは生理的な濃度域のエタノール存在下で開口すること、そしてエタノール依存的なGIRKの開口は、エタノールの鎮痛作用や快情動に関与していることが明らかとされている。

これまでにGIRKの結晶構造解析や変異体の電気生理解析によって、エタノールがGIRKを活性化する構造機構が調べられてきた。しかしながら、エタノールとGIRKの相互作用は解離定数 (K_d) が数百mM以上と極めて弱いこと、そしてエタノールはK^+透過ゲートの動的構造を変調するという性質のために、エタノールの生理的な結合部位や、エタノールがGIRKのK^+透過を亢進させる詳細な構造機構は明らかとなっていない。そこで本研究では、低親和性の相互作用を解析することが可能で、かつGIRKのK^+透過ゲートの動的構造を解析することが可能な溶液NMR法を用いて、エタノールがGIRKを活性化する構造機構を明らかとすることを目的とした。

カリウムチャネル、エタノール、methyl-TROSY

○とやまゆうき, かのうはなほ, ませようこ, よこがわまりこ, おおさわまさのり, しまだいちお

エタノール依存的な活性化を担うことが報告されているGIRKの細胞内領域（$GIRK_{CP}$）を対象として、エタノール依存的なNMRスペクトルの変化を解析した。$GIRK_{CP}$は4量体を形成し、その分子量は96 Kと大きいため、側鎖メチル基を観測するmethyl-TROSY法を適用した。{u-[^{2}H,^{15}N]; Alaβ, Ileδ1, Leuδ1, Valγ1, Metε-[$^{13}CH_3$]} $GIRK_{CP}$を調製し、エタノール依存的な^{1}H-^{13}C HMQCスペクトルの変化を解析したところ、GIRKの多量体界面に位置する疎水性のポケット、ならびにK^+透過ゲートであるG-loop領域に位置するメチル基に顕著な化学シフト変化が観測されていることが分かった。また、エタノール濃度依存的化学シフト変化量から、エタノールとGIRKの見かけのK_dは1.0 Mと算出された (Fig.1)。

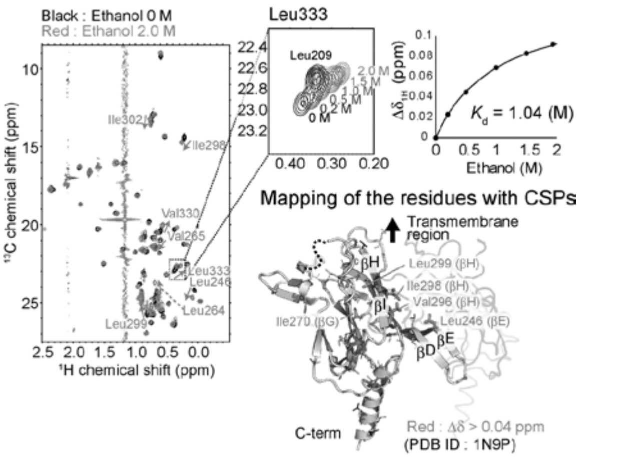


Fig.1 Ethanol concentration-dependent changes in ^{1}H-^{13}C HMQC spectra of $GIRK_{CP}$, and mapping of the residues with chemical shift changes.

エタノール依存的な$GIRK_{CP}$の動的構造の変化を解析するために、側鎖メチル基^{1}H-^{13}C多量子遷移を対象としたCPMG緩和分散解析、ならびにmethyl-HDR解析を行った。その結果、G-loopゲートは交換速度3,300 s^{-1}で交換する構造平衡状態にあることが分かった。そして、K^+透過活性の変化した変異体、ならびにエタノール結合状態の解析から、平衡状態にある各状態はG-loopが開いた構造と閉じた構造に対応しており、エタノールの結合により開状態へ平衡が遷移していることが示された (Fig.2)。

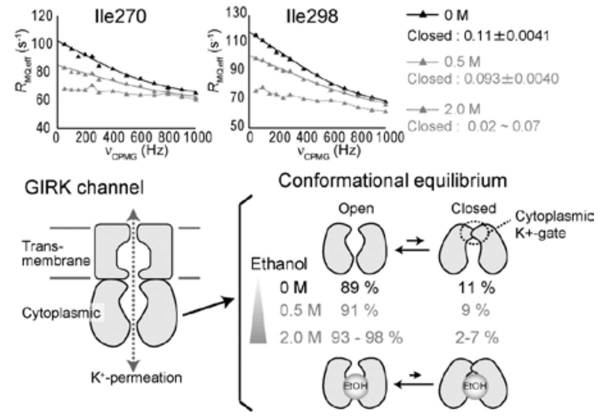


Fig.2 (Top) ^{1}H-^{13}C MQ CPMG relaxation dispersion curves of the G-loop residues in the presence of 0-2 M ethanol. (Bottom) Schematic representations of the conformational exchange processes of the cytoplasmic G-loop gate of GIRK.

さらに、膜貫通領域を含む全長の状態での構造平衡状態を調べるために、膜貫通領域の一部を原核生物由来K^+チャネルの配列に置換したキメラ体（GIRKキメラ）を用いた解析を行った。GIRKキメラと$GIRK_{CP}$では、平衡状態にある各状態の存在割合が変化しており、GIRKキメラにおけるG-loop開状態の存在割合は、GIRKの電気生理解析における開口確率とよく一致していることが分かった。また、GIRKキメラにおいても、エタノール結合に伴い、G-loopゲートの構造平衡が開状態に遷移していることが示唆された。

以上の結果に基づき、エタノールはGIRK細胞内領域の多量体界面の疎水性ポケットに、見かけのK_d 1.0 Mで結合していることを明らかとした。そしてエタノールの結合は、GIRK細胞内領域のG-loopゲートの構造平衡を遷移させ、開状態を安定化することで活性化を誘起するという構造機構を提唱した。

【参考文献】

Toyama, Y., Kano, H., Mase, Y., Yokogawa, M., Osawa, M., and Shimada, I (2018) Structural basis for the ethanol action on G-protein–activated inwardly rectifying potassium channel 1 revealed by NMR spectroscopy. ***Proc Natl Acad Sci U S A.*** 115(15), 3858-3863.

L1-4

ＮＭＲと人工細胞膜を用いた不凍タンパク質の分子機能解析

渡辺　爽[1]，新井達也[1]，三浦　愛[2]，久米田博之[3]，○津田　栄[1,2]
1北海道大学大学院生命科学院・生命融合科学コース・分子適応科学研究室
2産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・AFP特別研究チーム
3北海道大学先端生命科学院・国際連携研究教育局・グローバルステーション

NMR analysis of cell-protection function of antifreeze protein utilizing nanodisc

Akira Watanabe [1], Tatsuya Arai [1], Hiroyuki Kumeta[2], Ai Miura [3], and ○Sakae Tsuda[1,3]
1 Lab of Biomolecular Adaptation Science, Faculty of Life Science, Hokkaido University
2 Global Station for Soft Matter, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University
3 AFP Research Team, Bioproduction Research Institute, Natl Inst Adv Industrial Science & Technology

A typical ice block is composed of numerous single ice crystals created in water during freezing. These crystals grow and merge together to form an ice block, if the temperature is held below 0°C. Antifreeze proteins (AFPs) and antifreeze glycoproteins (AFGPs) accumulate on surfaces of the embryonic ice crystals to make them ultimately small. This function is expected to innovate new cryo-technologies applicable for any water-containing materials, from industry to medicine. In addition, fish-derived AFPs bind to the lipid bilayer to prolong the lifetime of cells under hypothermic condition (+4°C), a function that may be applicable to short-term cell preservation or “cell pausing”. To clarify such unique functions of AFPs and AFGPs at a molecular level, we determined their NMR structure with utilizing $^{13}C/^{15}N$ heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy. The artificial lipid-bilayer Nanodisc (~ 9 nm) was also prepared to examine ^{15}N-AFP-nanodisc interaction under various solution condition with monitoring the HSQC spectral change.

不凍タンパク質(Antifreeze Protein：AFP)は，低温環境に適応した動植物が有している機能性分子であり、氷結晶結合機能と細胞保護機能の２つを併せ持つことが知られている。水が凍るとき，冷やされた水の内部には，目に見えないほどに小さな氷（単結晶の氷，氷核とも言う）が無数に発生する。AFPはそれらに瞬時に結合して成長を止めることで水を氷核で埋め尽くすように凍らせ,細胞や組織を守ると考えられている。この機能によって生じる水溶液の凝固点効果度は熱ヒステリシス（Thermal Hysteresis：TH）と呼ばれ、その大きさは食塩がおこすモル凝固点降下度の2−３,000倍にもなる。AFPのNMR構造の解析は，その氷結晶結合機能の理解に役立つと考えられる。一方，細胞保護機能はAFPが脂質二重膜に何らかの作用を及ぼすことによると考えられており，AFPを用いることで肝臓や膵臓の細胞を4℃で10日間生かし続けられること等が証明されている。しかし，AFPと細胞は約１万倍大きさが異なるため、それらの結合状態を直接観察してメカニズム解析を行うことは極めて困難であった。この問題は人工脂質二重膜・ナノディスクを用いることで解決すると考えられた。本研究では，魚類I–III型AFPと菌類AFPの$^{13}C/^{15}N$ラベル体ならびに直径約100Åの（DMPC）ナノディスクを作製することで，AFPのNMR構造と細胞膜相互作用メカニズムの解析を行った。実験にはAgilent社製UNITY-500型高分解能NMR装置のほか北海道大学オープンファシリティの600MHzと800MHzのNMR装置を用いた。種々の3次元NMRスペクトルはNMRPipeを用いてSparky形式に変換しCYANAにより水溶液構造を算出した。ナノディスクの作製にはApolipoprotein（分子量33kDa)を膜足場蛋白質として用いリン脂質はDMPCとした。

不凍タンパク質、氷結晶結合機能、細胞保護機能，ナノディスク

わたなべ あきら，あらい たつや，みうら あい，くめた ひろゆき，○つだ さかえ

本研究で用いたAFPは国内に生息する魚類や菌類から2001–5年に津田らが発見したもので，百種類以上の異性体が存在する。それらの生化学性質や物理化学的性質にはバリエーションがあるものの，分子表面に必ず疎水性度の高い領域が存在する点が共通している。そこで，水和水構造に注目した構造解析を水溶液NMRの手法を用いて行った（図１)。魚類AFPI—IIIと菌類β−AFPの連鎖帰属を完了し，3D NOESYを用いて主鎖近傍にある水分子を探索した。その結果，氷結晶結合能力の高いAFPIII異性体の18番目のスレオニン側鎖に結びついている水分子が，同能力の低い異性体には存在していないことが示唆された**[1]**。菌類AFP（β−AFP）の疎水性領域には水和水が固く結びついていること**[2]**，魚類AFP（AFPIII）の疎水性領域には５角形を基調とした水和水ネットワークが広がっていること**[3]** などが示され，特定の水和水の配置がAFPに氷結晶結合機能をもたらすと考えられた。

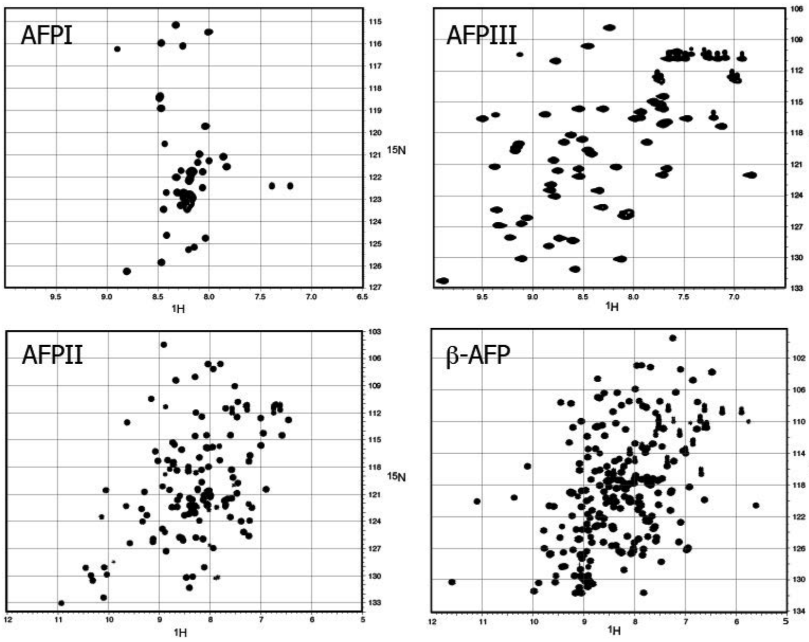


図１. AFPI (40res, 3.3kDa)，AFPII (127res, 14kDa)，AFPIII (65res, 7kDa)，β-AFP (223res, 23kDa) の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル.

^{15}Nでラベルした魚類AFPI—IIIの水溶液中にナノディスク（図２）の水溶液を添加したときにAFPの^{1}H-^{15}N HSQCが如何に変化するかを観測した。実験は4℃から30℃の間で温度を変化させながら行った。その結果，22℃を境にしてAFPIの信号強度が大きく変化することが示された。この強度変化は分子末端に近いほど大きかったことから，AFPIは分子全体がナノディスクの親水性表面に横たわるようにして結合すると推察された。AFPIの分子末端には多くの水和水が配置していると考えられるため，細胞保護機能と水和水も密接に関係すると推察された。

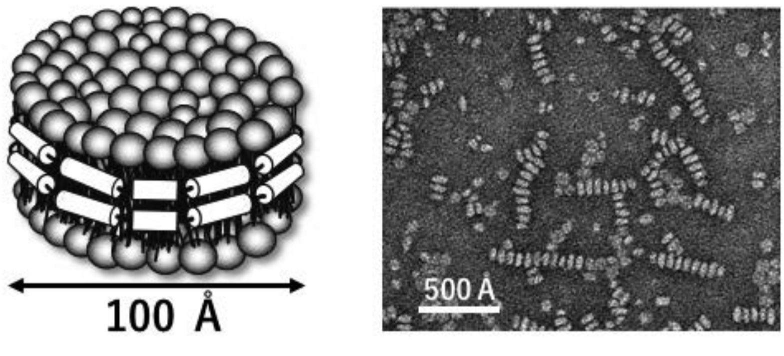


図２. 直径約 100 Å の DMPC ナノディスクの模式図と透過型電顕画像.

References

[1] Kumeta H, Ogura K, Nishimiya Y, Miura A, Inagaki F, and Tsuda S. (2013) ***J. Biomol. NMR*** 55: 225–230.

[2] Kondo H, Hanada Y, Sugimoto H, Hoshino T, Garnham CP, Davies PL, and Tsuda, S. (2012) ***Proc Natl. Acad. Sci*** **USA** 109 (24): 9360–9365.

[3] Mahatabuddin S, Fukami D, Arai T, Nishimiya Y, Shimizu R, Shibazaki C, Kondo H, Adachi M, and Tsuda S. (2018) ***Proc Natl. Acad. Sci*** **USA** 115 (21): 5456–5461.

L1-5 ケモカイン受容体―細胞内制御因子フロント間相互作用を標的とするユニークな作用機序をもつ抗がん剤候補化合物のNMR解析

○吉永　壮佐[1]，辻　辰一朗[1]，石田　規人[1]，柚木　芳[1]，武田　光広[1]，
寺島　裕也[2,3]，遠田　悦子[2,3]，松島　綱治[2,3]，寺沢　宏明[1]
[1]熊本大学大学院生命科学研究部，[2]東京大学大学院医学系研究科，
[3]東京理科大学生命医科学研究所

Comprehensive NMR analyses of an anti-tumor candidate with a unique molecular mechanism of the action targeting the interaction between chemokine receptors and their cytoplasmic regulator FROUNT

○Sosuke Yoshinaga[1], Tatsuichiro Tsuji[1], Norihito Ishida[1], Kaori Yunoki[1], Mitsuhiro Takeda[1],
Yuya Terashima[2,3], Etsuko Toda[2,3], Kouji Matsushima[2,3] and Hiroaki Terasawa[1]
[1]Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, [2]Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, [3]Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo University of Science, Noda, Chiba, Japan

Leukocytes are recruited by chemokines from cancer tissues, resulting in the development of malignant tumors.　This study aimed at the discovery and development of anti-tumor agents targeted to the interaction between chemokine receptors and their cytoplasmic regulator FROUNT.　We have determined the three-dimensional structure of the Chemokine Receptor-Binding Domain (CRBD) of FROUNT by NMR. Among the anti-tumor candidate compounds that were screened for the inhibitory activity, one was covalently bound to the hydrophobic site spatially close to the chemokine receptor-binding site of CRBD.　In addition, the bound anti-tumor candidate was replaced by a naturally existing compound in the cells, and generated a new covalent complex of CRBD under the reducing conditions mimicking the intracellular environment. We report our comprehensive NMR analyses to reveal the unique molecular mechanism of the action of the anti-tumor candidate.

【背景・目的】白血球は、ケモカインに誘引されて血中からがん組織に入り込み、マクロファージへと分化し、がん細胞の増殖・浸潤・転移を促進する。マクロファージは、細胞膜に発現するＧタンパク質共役受容体 (GPCR) によってケモカインを認識し、その方向へ遊走する。我々は、ケモカイン受容体 CCR2 および CCR5 と結合し、遊走シグナルを伝達する細胞内制御因子フロントを同定した[1,2]。さらに、受容体のＣ末端に位置する細胞膜近傍領域 (Pro-C) がフロントとの結合に必須であることを示した[3]。NMR を用いた Pro-C の細胞膜結合状態およびフロント結合状態の立体構造の解析結果に基づいて、フロントとケモカイン受容体の結合制御モデルを提起した[4]。また、全長フロントの調製法を確立し[5]、フロント上のケモカイン受容体結合領域 Chemokine Receptor-Binding Domain (CRBD) を同定した[6,7]。また、最近、フロント―ケモカイン受容体間相

創薬、抗がん剤、ケモカイン受容体結合ドメイン

○よしながそうすけ，つじたついちろう，いしだのりひと，ゆのきかおり，たけだみつひろ，
てらしまゆうや，とおだえつこ，まつしまこうじ，てらさわひろあき

互作用の阻害活性を指標にしたスクリーニングにより取得した低分子化合物が、がん細胞の増殖・浸潤・転移を抑制することを明らかにした。

本研究は、フロントの立体構造に基づいて、取得した抗がん剤候補化合物の作用機序を明らかにすることを目的とする。

【方法】CRBD は、大腸菌の大量発現系を用いて調製した [7, 8]。CCR2 Pro-C は、ペプチド合成品を用いた。NMR 測定は、すべて、Bruker AVANCE III 600 MHz の分光計と CryoProbe を用いて 25℃にて行った。CRBD の NMR 信号帰属、および、立体構造決定に必要な ^{1}H 間距離と主鎖二面角の情報取得は、^{15}N 標識体あるいは ^{13}C/^{15}N 標識体を用いた定法の多核多次元測定法により行った [9]。NMR 滴定実験は、すべて、^{1}H–^{15}N HSQC 測定により行った。CRBD—抗がん剤候補化合物複合体、および、CRBD—細胞内含有化合物複合体の主鎖信号の帰属は、別途、定法の多核多次元測定法により行った。NMR スペクトル解析には、TopSpin、NMRPipe、Olivia、Sparky、立体構造計算には CYANA を用いた。分子量の確認は、Bruker impact II を用いた ESI-QTOF/MS による質量分析にて行った。

【結果・考察】CRBD は凝集傾向が高かったため、ケモカイン受容体結合能を保持したまま、溶解度を向上させる変異を施した CRBD を解析に用いた。NMR により立体構造を決定した結果、CRBD は、５本のヘリックスからなるヘリカルバンドル構造をとることが分かった。

抗がん剤候補化合物の結合部位を同定するため、NMR 滴定実験を行った結果、化合物は、slow exchange の化学シフト変化を CRBD の NMR 信号に生じさせた。また、滴定後、信号変化が完了するのに数時間かかることが分かった。この結果は、複合体形成の際に化学反応が起きていることを示唆した。質量分析を行ったところ、化合物が共有結合した複合体が生じることが分かった。一方、CRBD に対するケモカイン受容体 CCR2 Pro-C の NMR 滴定実験を行った結果、fast exchange の化学シフト変化を生じさせた。Pro-C により化学シフト変化を生じた領域は、化合物により化学シフト変化を生じた領域と、立体構造上、近接していた。CRBD—化合物複合体への Pro-C 滴定実験では、CRBD 単体において化学シフト変化を生じた領域に大きな変化は見られなかった。共有結合した化合物が、CRBDのケモカイン受容体との結合を立体的に阻害することが予想された。

次に、細胞内還元環境を模した溶液条件に、CRBD—抗がん剤候補化合物複合体をさらしたところ、新たな^{1}H–^{15}N HSQCスペクトルパターンが得られた。化学シフト変化および質量変化の解析により、CRBD に結合していた抗がん剤候補化合物が細胞内に元々存在する化合物と置換し、新たな共有結合複合体が生じることが分かった。この複合体への Pro-C 滴定実験において、大きな化学シフト変化は見られなかった。

したがって、抗がん剤候補化合物は、フロントと結合してケモカイン受容体との相互作用を阻害するのみならず、生体内に元々存在する化合物との結合を誘起し、ケモカイン受容体結合能をもたない複合体を生じるユニークな作用機序をもつことが考えられた。

【参考文献】1) Terashima, Y. *et al.*, *Nat. Immunol.* **6**, 827–835 (2005), 2) Toda, E. *et al.*, *J. Immunol.* **183**, 6387–6394 (2009), 3) Toda, E. *et al.*, *Biochem. J.* **457**, 313–322 (2014), 4) Esaki, K. and Yoshinaga, S. (co-first authors) *et al.*, *FEBS J.* **281**, 5552–5566 (2014), 5) Esaki, K. *et al.*, *Protein Expr. Purif.* **77**, 86–91 (2011), 6) Esaki, K. *et al.*, *Genes Cells* **23**, 70–79 (2018), 7) Sonoda, A. *et al.*, *Mol. Biotechnol.* **59**, 141–150 (2017), 8) Yoshinaga, S. *et al.*, *Biomol NMR Assign.* in press

L1-6 構造蛋白質であるHIV-1p17とp24の動的と静的構造のNMR解析

○西村千秋[1]
1帝京平成大学薬学部

Dynamic and rigid structures of HIV-1 p17 and p24 proteins

○Chiaki Nishimura [1]
[1]*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University*

p17 matrix and p24 capsid proteins are sequentially produced in the infected cell by HIV-1. The activation process of two proteins is discussed structurally and functionally. The p17 has the flexible structure at the C-terminal regions including helix 5 and C-terminal tail. This flexible structure enables HIV-1 protease to cleave both proteins. On the other hand, the N-terminal end of p24 N-terminal domain including the N-terminal beta-structures is flexible. This N-terminal structure can be also important for the HIV-1 protease digestion and hexamer formation. Furthermore, the isomer formation at Proline 90 is important for the cyclosphilin-A binding of p24. It is concluded that the major form in the NMR spectra is trans-form. Minor form of cis-conformation is important to recognize the cyclophilin-A. Thus, the structure-function relationship of the p17 and p24 proteins for the viability will be discussed.

HIV-1のGag蛋白質は、まずp17マトリックス蛋白質、そしてp24カプシド蛋白質の順に引き続き連続して合成されていき、HIV-1 proteaseがそれら蛋白質間を切断して成熟化させる。本研究では両蛋白質の関連性、お互いに及ぼす影響をNMRを用いて調べた。

<u>p17マトリックス蛋白質野生株[1]</u>（図１）

HIV-1のp17マトリックス蛋白質を作成して、シグナル帰属に続き、緩和実験とアミドプロトン交換実験を行った。モデルフリーの解析を行い、オーダーパラメター―を求めた。

p17の中でα1-2ループとα3-4ループの揺らぎが大きいことがわかり、他の分子との相互作用の領域として考えられた。一方、最も構造が固いコアに存在するヘリックスは4であった。p24との関連が考えられるのはヘリックス5であり、p17の最もC端側のヘリックスとして大きな揺らぎを持ち、C端以降に存在するp24と柔軟な関係を保持させていた。この揺らぎ構造は、E105、E106、E107の連続配列やK112、K113、K114などの連続配列による静電的な影響を受けているのかもしれない。

<u>p17マトリックス蛋白質E12A変異体[3]</u>

さらにp17に存在する塩橋E12-H89の役割をE12Aを用いてNMR解析した。p17の3量体形成には、N端のミリスチル化が重要であり、そのことが膜への局在化を担っている。さらに3量体形成には、E12-H89間の塩橋も必要と考えられている。

塩橋が作られないE12A変異体の安定性を、尿素変性滴定によって野生株と比較し調べた。面白いことにE12Aの方が安定化していた。考えられるメカニズムとして、親水性の残基間で塩橋は作

HIV-1、ダイナミクス、化学シフト

○にしむら　ちあき

られるが、その塩橋が比較的に分子内部で結合する場合には、親水性のものが分子内部に入ることによる負の効果が優先し、野生株の方が不安定化するのかもしれない。次にE12Aの種々の緩和測定を行い、モデルフリーの分析によるオーダーパラメターを求めた。野生株以上にこの変異体では、ヘリックス5が化学交換しており、構造の多形性が考えられた。またα1-2ループにおいても、化学交換の可能性が示唆された。NOEやオーダーパラメターより、E12Aの個々のループの運動性が野生株よりも下降していることがわかった。さらに化学シフトの値から、E12A変異体のそれぞれヘリックス1、4、と5のC端側において、ヘリックス含量が増加していることが示された。

<u>p24カプシド蛋白質へのタグの影響[2]</u>（図２）

一方p24のNドメインのN端のP1とD51も塩橋を作り、塩橋のない状態ではN端の構造が大きく影響を受けた。そこで、NタグとCタグを切らずに存在させておき、タグの存在による全体の安定性への影響をNドメインを用いて調べた。N端にタグが残っているものの性質は、不安定で揺らぎ構造が存在した。一方、C端にタグが残っているものは、揺らぎも少なく安定であった。C端タグの方が溶媒に露出しており、安定性に影響が少ないことが推察された。これらの結果は、プロテアーゼがp24のN端側を切断することは、C端側よりも立体障害などによりやや難しいことを示していた。

<u>p17とp24蛋白質のHIV-1プロテアーゼによる切断とp24とシクロスフィリンAの相互作用</u>

野生株と感染性のない変異体の2次構造を化学シフトの値をもとに比較した。N端の領域に構造変化が見られた。ロングレンジにプロテアーゼの切断に対して影響を及ぼしたと結論した。またP90の前では、シス-トランスの異性化が観測された。この構造変化とシクロスフィリンAとの相互作用が関連すると思われた。メジャーな形はトランスであり、シスの形が安定であり相互作用に関連すると考えられた。

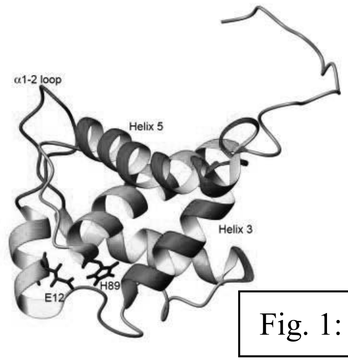


Fig. 1: p17

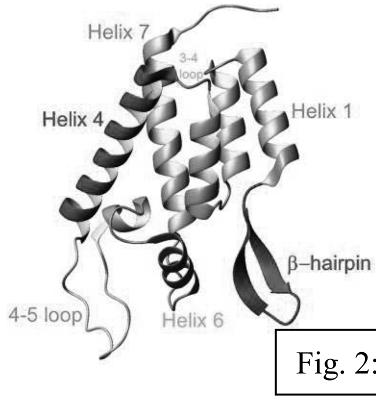


Fig. 2: p24NTD

<u>文献</u>

1. Ohori, Y., Okazaki, H., Watanabe, S., Tochio, N., Arai, M., Kigawa, T., and Nishimura, C.*: Flexible and rigid structures in HIV-1 p17 matrix protein monitored by relaxation and amide proton exchange using NMR: Biochim. Biophys. Acta 1844, 520-526, 2014

2. Okazaki, H., Kaneko, C., Hirahara, M., Watanabe, S., Tochio, N., Kigawa, T., and Nishimura, C.*: Long-range effects of tag sequence on marginally stabilized structure in HIV-1 p24 capsid protein monitored using NMR: Biochim. Biophys. Acta 1844, 1638-1647, 2014

3. Konagaya, Y., Miyakawa, R., Sato, M., Matsugami, A., Watanabe, S., Hayashi, F., Kigawa, T., and Nishimura, C.*: Effect of Glu12-His89 interaction on dynamic structures in HIV-1 p17 matrix protein elucidated by NMR: PLoS One 11, e0167176, 2016

<u>謝辞</u>

本研究のNMR測定は、NMR共有プラットフォーム（理化学研究所横浜）を利用しました。

L1-7

禁制コヒーレント遷移を用いたリガンドの動的構造最適化

○[1]竹内恒，[1,2]水越弓子,[1]德永裕二，[3]滝沢剛，[3]半沢宏之、[4]嶋田一夫
[1]産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター
[2]バイオ産業情報化コンソーシアム
[3]第一三共RDノバーレ株式会社
[4]東京大学・大学院薬学系研究科

Dynamic structure guided optimization of ligand using forbidden coherence transfer method

○Koh Takeuchi[1], Yumiko Mizukoshi[1,2], Yuji Tokunaga[1], Takeshi Takizawa[3], Hiroyuki Hanzawa[3], and Ichio Shimada[4]
[1] *Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tokyo, Japan*
[2] *Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), Tokyo, Japan*
[3] *DaiichiSankyo RD Novare Co.Ltd, Tokyo, Japan*
[4] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan*

Thermodynamic property of protein-ligand interactions is a critical factor to define its binding specificity. Improved binding specificity can be achieved by introducing multiple spatially defined interactions to the ligand-receptor interface. The introduction of these interactions results in restricted local dynamics and improved surface complementarity of the ligand in the bound state. Here, we present an NMR strategy to evaluate the local dynamics and the surface complementarity, using a single set of experiments, based on forbidden coherence transfer (FCT). The FCT analyses successfully identified the ligand site that shows a significant amplitude of motion and insufficient surface complementarity in the binding interface and a substitution to the ligand significantly improved the affinity and the enthalpic contribution of the interaction. Thus, the FCT analyses provide a useful local dynamics and structural information for the rational design of a ligand with higher affinity and preferable thermodynamic properties.

【目的】タンパク質とリガンドとの相互作用における結合特異性の向上は、水素結合や芳香族−芳香族、芳香族−メチル相互作用といった、空間的に規定されたエンタルピー的相互作用を複数導入することによって実現される。このような相互作用の導入は、結合時のリガンドの局所運動性の低下と、空間相補性の向上に反映される。本研究では、禁制コヒーレント遷移（FCT）法を用いて、結合時のリガンドの局所運動性と空間相補性を評価するNMR手法を確立し、リガンドの動的構造最適化を行う基盤技術の確立を目的とした。
【方法】本研究ではこれまでタンパク質の運動性解析に主に用いられてきたFCT法を、結合時のリガンドの局所運動性と空間相補性を評価するNMR手法として応用した (Fig. 1) 。FCT法ではリガンドのメチル基の多量子遷移と単量子遷移由来のシグナル強度比 (FCT値) を観測する。FCT値の時間変化は、メチル基の運動性・空間相補性情報を反映しており、それぞれオーダーパラメーター(S^2) および周辺水素密度を2.5Å距離に換算した水素数: *C*値として定量的に評価可能である。

Dynamics, Ligand optimization

○たけうち　こう、みずこし　ゆみこ、とくなが　ゆうじ、たきざわ　たけし、はんざわ　ひろゆき、しまだ　いちお

【結果】FCT法をMAPキナーゼの一種p38αとその低分子性阻害剤287に適用した。287は強い阻害活性を示し（IC_{50}: 2.2 nM）、結合エネルギーに対するエンタルピーの寄与が大きい良好な結合特性を持つ。そこで、まず運動性情報のみを抽出するため、p38αを重水素化してFCT法を適用した。その結果、287に含まれる2個のメチル基はともに高いS^2値を示し、287の運動性が、結合時に抑制されていることが明らかとなった。またp38αの重水素化率を低下させたところ、FCTの収束値が大幅に低下した。このことは、287結合時の空間相補性が高いことを示している。一方、p38α-287の間で特異的結合に寄与する残基に変異を導入し、FCT 解析を行ったところ、多くの変異体で、結合時の287の運動性が上昇した。よってFCT法は特異的結合にともなう運動性抑制を検出可能であった。

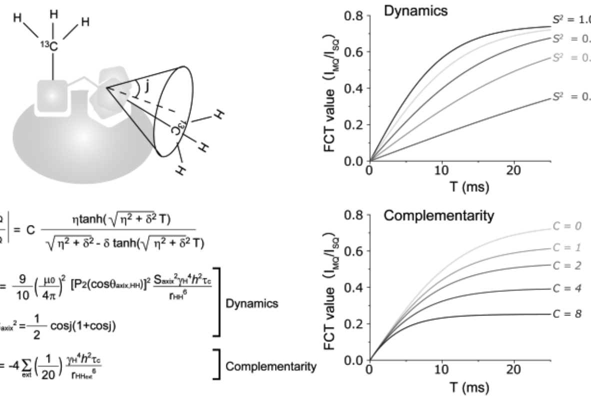


Fig. 1. Schematic representation of FCT analysis. Dynamics and surface complementarity are mainly reflected to the slope and convergence values in FCT build up, respectively.

また、初期のヒット化合物など、結合力が弱いリガンドに対応するため、FCT法の交換系への拡張（Ex-FCT）を行った。解析にはp38α-MEF2Aペプチド相互作用を用いた。MEF2Aペプチドはp38αへの結合配列中に5個のメチル基を持ち、うち3個（Val-7 γ1/γ2, Ile-9 δ1）がp38αとの結合界面に存在する。MEF2Aと野生型p38αの結合は非交換系であるが、p38^{DCS}変異体との結合は、その様式を維持しながらも交換系になる。そこで、野生型p38αとp38^{DCS}変異体をそれぞれ用いたFCT法, Ex-FCT法の結果を比較した結果、両者はよく合致した。興味深いことに、結合界面に位置する3個のメチル基はすべて0.5以下のS^2値を示し、結合時にも運動性を保持していた（Fig. 2A）。さらにEx-FCT値の変化から空間相補性の解析を行ったところ、X線から算出された周辺プロトン密度とEx-FCT法のC値はよく合致した（Fig. 2B）。さらに、Val-7 γ2は結合界面にありながらC値が1以下と相補性が低く、周辺に空間があることが示唆された。そこで、Val-7をIleに置換した変異体を作製し、空間相補性の改善を企図した。その結果、当該部位のC値が改善し（Fig. 2C）、特異的結合を示唆する熱力学的特性が改善した（Fig. 2D）。このことは、FCT法を用いて標的に結合したリガンドの動的構造を解析することで、結合親和性や熱力学的特性を改善する構造最適化を指南できることを示している。

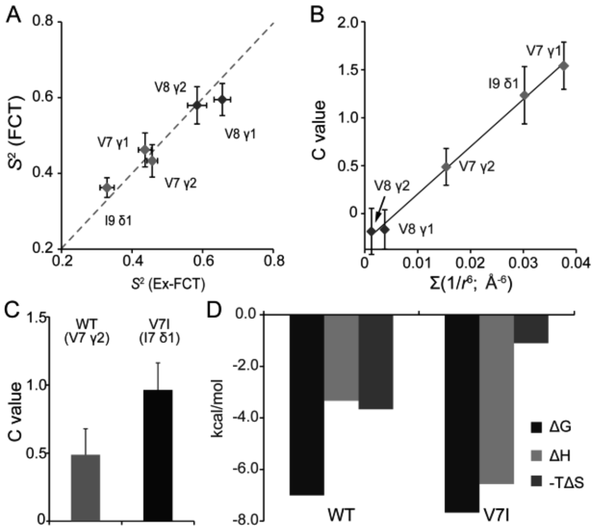


Fig. 2. Dynamic structure guided optimization of a ligand using FCT method.

そこで、さらにFCT法を化合物に多く含まれる^{19}F核へと展開し、^{19}Fを含む低分子阻害剤AST-487とp38αとの相互作用に適用した。その結果、AST-487に含まれるCF_3基は、結合時においても低いS^2値（0.64）を示し、AST-487のCF_3基が結合時にも運動性を維持していることが明らかとなった。以上の研究により、FCT法を用いてリガンドの動的構造最適化を行う基盤が整った。

【参考文献】Mizukoshi et al, *Angew Chemie*, 55, 14606, (2016); Tokunaga et al, *Molecules*, 22, E1492, (2017).

L1-8 プロトンNMRによるセメント硬化体の空隙構造測定

○胡桃澤清文[1]
1　北海道大学大学院工学研究院

Application of proton NMR to hardened cement paste

○Kiyofumi Kurumisawa[1]
1Faculty of engineering, Hokkaido University

Proton NMR was applied to measure the pore structure of hardened cement pastes. As a result, it was clarified that different signals can be obtained depending on the difference in the water to cement ratio and the difference in the replacement ratio of blast furnace slag.

１．序論

セメント硬化体の拡散性能を評価するためには拡散試験を行う必要があるが、空隙構造を把握することが可能であれば拡散試験を行わなくても拡散性をある程度評価することが可能である。したがって、水銀圧入法などによって得られた空隙構造から拡散係数を予測する手法が提案されている。一方、水銀圧入法では測定前に試料を乾燥させる必要があるため真の空隙構造を測定できていないことが指摘されている。そこで低温示差走査型熱量計を用いたサーモポロメトリー法が試験体の乾燥を行うことなく測定が可能な手法として提案されているが、これは試料量を数十ミリグラムで測定を行う必要があるため試料を代表する数値を得るためには多くの実験を行う必要があり、結果として測定時間が多く必要となる。そこで近年では^{1}H NMR測定がそれらの問題を解決するために提案されている[1)]。^{1}H NMR測定は試料を非破壊で測定することが可能であり、装置によっては比較的大きな試料の測定も可能である。Mullerらはプロトン NMR測定からセメント硬化体の空隙構造を解析しており、白色セメント硬化体や白色セメントにシリカフュームを混和した硬化体に対して適用しているが、フライアッシュや高炉スラグ微粉末などの混和材を含むセメント硬化体に対しては適用を行っていない。そこで本研究では国内で広く利用されている高炉スラグ微粉末を混和したセメント硬化体に^{1}H NMR測定を適用した。

２．実験概要

セメントはNMR測定に影響を及ぼす鉄分が少ない白色セメント（WPC）を用い、練混ぜ水には純水を用いた。WPCは密度3.05g/cm^{3}、ブレーン比表面積3510cm2/g、高炉スラグ微粉末（BFS）は密度2.91g/cm^{3}、ブレーン比表面積4110cm^{2}/gのものを使用した。水粉体比（W/B）は0.3，0.5、0.7の3条件とし、高炉スラグ微粉末のセメント置換率はW/B0.3及び70%とした。以後試験体は、水粉体比―置換率にて表記する。養生は20℃水中養生を行った。練り混ぜはミキサーを用いて行い、練り混ぜ後所定の型枠に打設を行い、1日後に脱型し養生を行った。NMR測定用の試料は直径8mmのNMR測定用の試験管に打設を行い、

プロトンNMR、緩和時間、空隙構造、セメント硬化体

○胡桃　澤清文　くるみさわ　きよふみ

硬化後に水を試験管に加えそのまま測定材齢まで養生を行った。¹H NMR測定においては、まず試験管上部の余剰な水を廃棄し試験に用いた。測定はCPMG法とSolid echo法の2つを適用し緩和時間T_2を観測した。CPMG法は液体状態のプロトンの測定を主に行うことができ、Solid echo法では固体成分のプロトンと液体成分のプロトンの分離を行うことが可能である。今回の測定では0.47TのNMR装置を用いて測定を行った。高磁場のNMRを用いるとセメントに含まれる磁性成分が観測結果に影響を及ぼすことが指摘されているため低磁場のNMR装置を用いている[2)]。90°パルスは2.5μs 、180°パルスは5.0μsを用いた。CPMG法では、パルス間隔(90°～τ～180°のτ)を40μs、データ観測ポイント数を256 回、観測ポイント間の時間を85μs、積算回数を32回、繰返しの待ち時間(積算の間隔)を5sとした。Solid echo法では、パルス間隔(90°～τ～90°のτ)を15μs、データ観測ポイント数を1024回、積算回数64回、繰返しの待ち時間を0.5sとした。既往の研究においてはτを変化させて測定を行っている研究例もあるが異なるτによる測定を予備検討した結果、単一のτと同様の測定結果であったため本研究では単一のτの測定結果を用いた。解析にはCONTIN法とDiscrete法が提案されているが本研究ではDiscrete法を用いて行った。

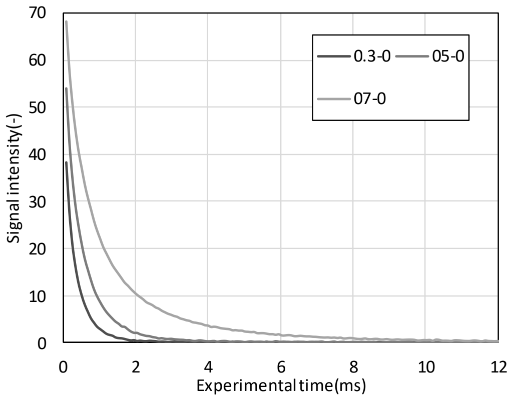


Fig.1 CPMG result of different W/C specimen

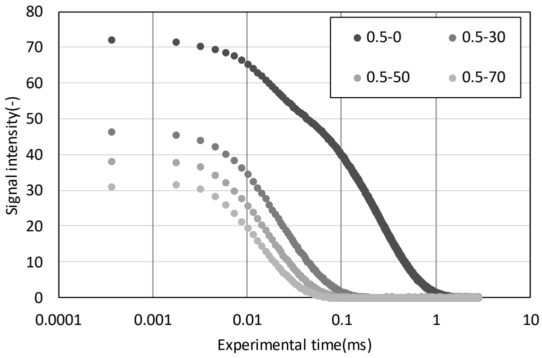


Fig.2 Solid echo result of different replacement ratio of BFS

3．実験結果と考察

Fig.1に異なる水セメント比のCPMG法によって測定した結果を示す。水セメント比の増加とともに緩和時間の長い信号が観測されている。つまり、水セメント比の増加とともに大きな空隙が含まれていることが示された。Fig.2にSolid echo法によって異なる高炉スラグ置換率の試験体の測定結果を示す。高炉スラグ置換率が増加するほど信号の観測時間が短くなっていることがわかる。このことから高炉スラグ置換率の増加とともに硬化体内部に含まれている液状水が減少していることが示された。

4．結論

プロトンNMR測定を異なる水セメント比の硬化体及び異なる高炉スラグ置換率の硬化体に適用し解析した結果、その信号は大きく変化することが示された。つまり、水セメント比の増加とともに粗大な空隙が含まれている量は増加し、高炉スラグ置換率の増加とともに硬化体に含まれている液状水の量は低下することが示されプロトンNMR測定が有効な手法であることが示された。

参考文献

1)Muller, A. C. A.,et.al. (2013). Use of bench-top NMR to measure the density, composition and desorption isotherm of C–S–H in cement paste. Microporous and Mesoporous Materials, 178, 99-103.

2)Scrivener, K., Snellings, R., & Lothenbach, B. (Eds.). (2015). A Practical Guide to Microstructural Analysis of Cementitious Materials. CRC Press.

L1-9 磁場配向を利用した微結晶粉末からの異方的相互作用の解析：擬単結晶から磁場配向懸濁体へ

○久住 亮介[1]，門間 啓[1]，和田 昌久[1]，木村 恒久[1]，武田 和行[2]
1 京都大学大学院　農学研究科
2 京都大学大学院　理学研究科

Applications of magnetic orientation to analysis of anisotropic interactions: magnetically oriented microcrystal array and suspension

○Ryosuke Kusumi[1], Hiroshi Kadoma[1], Masahisa Wada[1], Tsunehisa Kimura[1], and Kazuyuki Takeda[2]
1 Graduate School of Agriculture, Kyoto University
2 Graduate School of Science, Kyoto University

A magnetically oriented microcrystal array (MOMA), in which microcrystals are aligned three-dimensionally by a frequency-modulated rotating magnetic field, has a potential to be an alternative to a single crystal. A combination of the MOMA and the single-crystal rotation method is a powerful tool of determination of the anisotropic interactions, e.g., chemical shift tensor and quadrupolar coupling tensor, from microcrystalline powder. For further applications, we developed a probe which enables to directly measure the solid-state NMR spectra of a magnetically oriented microcrystal suspension (MOMS).

1. はじめに

強磁場下では，反(弱)磁性体も磁場に応答することが知られている．さらに，特殊な動的磁場を用いると，微結晶粉末を三次元的に配向させることが可能である(擬単結晶法，Magnetically Oriented Microcrystal Array (MOMA))[1,2]．この擬単結晶法を利用すれば，大きなサイズの単結晶が得られない試料からでも，数mm以上の巨大な“単結晶”を得ることが可能となる．本発表では，微結晶粉末の擬単結晶化と固体NMRへの応用による化学シフトテンソル等の異方的相互作用の決定例を紹介するとともに，特殊角での試料管の回転が可能なプローブを新たに開発し，磁場配向した微結晶懸濁体の*in situ*固体NMR測定を試みた結果を報告する．

2. 変調回転磁場による微結晶粉末の擬単結晶化

結晶, 液晶, 高分子短繊維は化学結合の電子分布異方性に起因した磁化率異方性を有しており，磁場による配向制御が可能である．磁化率異方性はχ_1，χ_2，χ_3の3つの主値をもつ磁化率テンソル($\chi_1 > \chi_2 > \chi_3$)で表される．対象が二軸性結晶であれば，高次元の配向を達成することができる．静磁場下では，磁化容易軸χ_1が磁場に平行となるよう一軸配向する．回転磁場を用いると，困難軸χ_3を磁場回転面と垂直な方向に一軸配向させることができる．さらに，静磁場と回転磁場の概念を組み合わせた変調回転磁場を印加すると，結晶を三次元的に配向させることが可能となる．微結晶をあらかじめUV硬化モノマー中に懸濁させておき，三次元配向させた後にUV照射により媒体を固化すると，微結晶が三次元配向した複合体(擬単結晶)が得られる．

擬単結晶，単結晶NMR，*in situ*固体NMR

○くすみ りょうすけ，かどま ひろし，わだ まさひさ，きむら つねひさ，たけだ かずゆき

3. 擬単結晶の固体NMRへの応用例: 化学シフトテンソルの決定

擬単結晶は，微結晶粉末からの各種異方的相互作用の評価に有効である．以下，L-アラニン微結晶粉末の^{13}C化学シフトテンソルを決定した例[3)]を述べる．

Fig. 1に，固体NMR用に作製したL-アラニン擬単結晶を示す．擬単結晶化は，微結晶粉末を配向固定用のUV硬化モノマーに分散させ，得られた懸濁液を超伝導磁石内の試料回転装置にセットして行った. 8 Tの磁場下で周波数変調型の回転磁場を40分間印加後,UV照射によりモノマーを硬化させた．変調回転磁場の印加の際には，90°毎に30および140 rpmとなるよう試料の回転速度を変化させた．

Fig. 2に，擬単結晶をMASプローブにセットし，MAS軸周りに回転させて^{13}C CP測定を行った結果を示す．粉末スペクトルではブロードな共鳴ピークしか得られないが，擬単結晶では微結晶の三次元配向を反映して共鳴ピークが先鋭化している．また，各共鳴ピークの化学シフトは回転角度ψに依存して系統的に変化していることから，化学シフト異方性を主軸方向を含む形で解析可能であることが分かる．この化学シフトのψ依存性についてのフィッティング解析により，L-アラニンの化学シフトテンソルを主軸方向を含む形で決定することができた．その他，同手法により, フェニルホスホン酸の^{31}P化学シフトテンソル[4)]やロッシェル塩の^{23}Na四極子相互作用テンソルの決定にも成功している[5)].

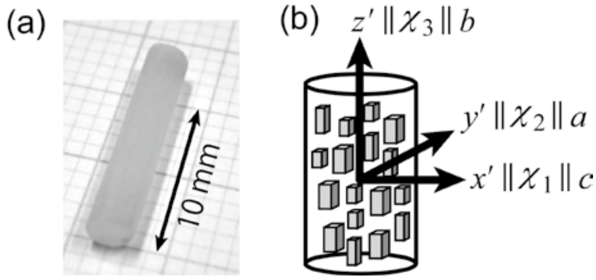


Fig. 1 (a) Photo of an L-alanine MOMA and (b) schematic of three-dimensional alignment of the microcrystals in the MOMA[3)].

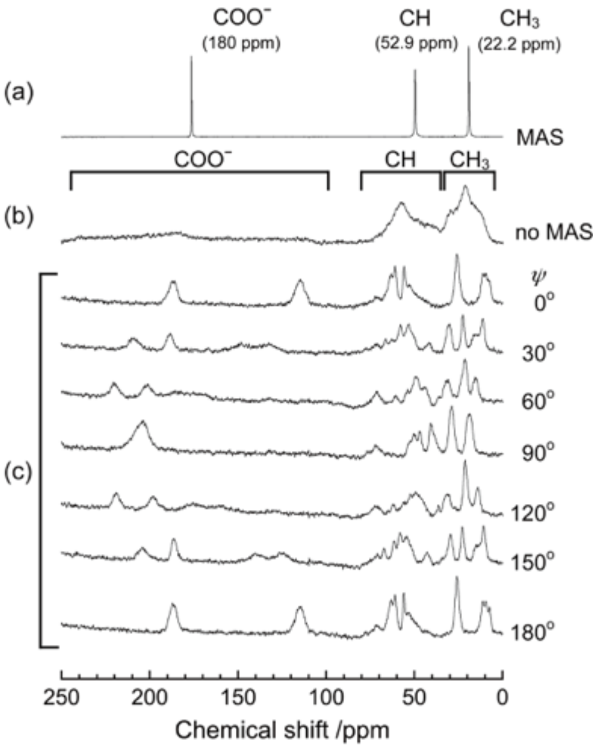


Fig. 2 ^{13}C CP spectra of L-alanine obtained for (a) microcrystals with MAS (15 kHz), (b) microcrystals without MAS, and (c) a MOMA without MAS[3)].

4. 磁場配向プローブによる磁場配向微結晶懸濁体の*in situ*固体NMR

擬単結晶法では試料をUV硬化モノマーに分散させる必要があるため，タンパク質やナノ結晶といった物質への応用が困難であった．また，NMR装置の他に擬単結晶作製用の強磁場と配向装置を準備しなければならない．そこで我々は，NMRの強磁場を活用して液状媒体中の微結晶を磁場配向させつつ，媒体を固化させることなく固体NMR測定が可能なプローブを開発した[6)]．同プローブにより，静磁場と垂直に一軸配向したL-アラニン微結晶の*in situ*測定に成功している．

参考文献

1), T. Kimura et al., *Langmuir* **21**, 4805 (2005); 2), T. Kimura et al., *Langmuir* **22**, 3464 (2006); 3), R. Kusumi et al., *J. Magn. Reson.* **223**, 68 (2012); 4), R. Kusumi et al., *Cryst. Growth Des.* **15**, 718 (2015); 5), 奥村学ら，第55回NMR討論会 (2016); 6), 門間啓ら，第57回NMR討論会にてポスター発表予定 (2018).

L1-10 ^{7}Li NMRによるニッケルマンガン系正極の試料組成およびサイクル劣化挙動評価

○矢澤宏次[1]，田渕光春[2]
1（株）JEOL RESONANCE
2産業技術総合研究所

^{7}Li NMR solid state study on composition and deterioration in charge/discharge cycle of layered lithium nickel manganese oxides

○Koji Yazawa[1], Mitsuharu Tabuchi[2]
1JEOL RESONANCE Inc.
2National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

NMR is extremely useful tool for characterizing local structure of materials for lithium ion battery (LIB) because it is able to observe Li ion directly. In this study, we report composition and deterioration in charge/discharge cycle of layered lithium nickel manganese oxides synthesized under air and nitrogen by ^{7}Li solid state NMR spectroscopy. In order to obtain high resolution ^{7}Li spectra without spinning side band originated from paramagnetic interaction, we used an ultra fast spinning magic angle spinning system and a recent pulse technique, magic angle turning and phase adjusted sideband (MATPASS). ^{7}Li MATPASS spectra showed clear peaks originated from Li in Li layer and in transition metal layer, respectively, for the both sample. However, the sample synthesized under air exhibited narrower linewidth indicating formation of Ni rich and Mn rich domains, and suggesting that these domains relates to the Li rich phase. We will report the results of after cycled samples as well in the presentation.

【緒言】

ニッケルマンガン系正極材料は高電位サイクル特性と電解質との低反応性を併せ持ち、またCo等の高価な原材料も必要としないため、次世代LIB正極材料として非常に期待されている。本研究ではニッケルマンガン系正極材料の試料素性およびサイクル劣化挙動評価にNMRを用いた。NMRはLi原子を直接観測できるため、LIB構成材料の化学構造や組成の情報を得る有効な手段である。 NMR観測可能なLiは^{6}Liと^{7}Liの２種類の同位体がある。^{7}Liは高い天然存在比と磁気回転比から^{6}Liの約30倍の感度で観測できるため、一般的に^{7}Liが観測に用いられる。しかしながら、LIB正極材料では、近接する常磁性遷移金属による常磁性相互作用で多くのスピニングサイドバンド(SSB)が生じてしまい、特に磁気回転比の高い^{7}Liでは、SSBの重なりが大きいため、一般的な固体NMRプローブ（回転周波数～20kHz）ではスペクトルの解析が困難であった。

本研究では近年開発された超高速MASプローブとmagic-angle turning and phase adjusted sideband separation (MATPASS)法[1]を組み合わせて用いることで、1mg程度の微量試料でSSBフリーの^{7}Li高分解能スペクトルを取得し、各種合成条件やサイクル劣化過程での正極中のLiイオンの状態の解析を行った。

電池、固体NMR、常磁性

○やざわこうじ、たぶちみつはる

【実験】

試料はNi-Mn前駆体とLi_2CO_3をLi/M=2(M=Ni, Mn)の比率で混合し、空気中（650℃、5時間）で1次焼成し、その後、空気中および窒素中（850℃、8時間）で2次焼成したものを用いた。NMR装置はJNM-ECZR600（JEOL RESONANCE）を用い、超高速試料回転は1mmHXMASプローブを用い回転速度50-70kHzで行った。１次元スペクトルはスピンエコー法を、SSBフリーの^{7}Liスペクトルは MATPASS法を用いて取得した。

【結果と考察】

Fig.1 に空気中で焼成した $LiNi_{1/2}Mn_{1/2}O_2$ の 2D MATPASS スペクトルを示す。これをチルト処理し、足し合わせることで SSB フリーの ^{7}Li スペクトルが得られる(pj-MATPASS)。通常の 1D スピンエコー測定では得られない高分解能スペクトルが得られた。次に空気中、および窒素中で焼成した試料の比較を行った。以前の研究から空気中で焼成した試料の方が優れたサイクル耐性を示すことがわかっている。Fig.2 に両試料の pj-MATPASS スペクトルを示す。両試料とも 500-900ppm に Li 層中の Li (Li_{Li})、1300-1500ppm に遷移金属層中の Li (Li_{TM})由来のピークを示した。しかしながらそのスペクトル形状は異なっており、空気中で形成された試料の方が線幅が細く、特に Li 層中、遷移金属層中ともに Ni 近傍のピークにおいてそれが顕著であった。このことから空気中で焼成した試料の方が、Mn リッチな部位と Ni リッチな部位がよりはっきりとわかれていることが示唆された。発表ではサイクル劣化試料の NMR 解析についても報告する。

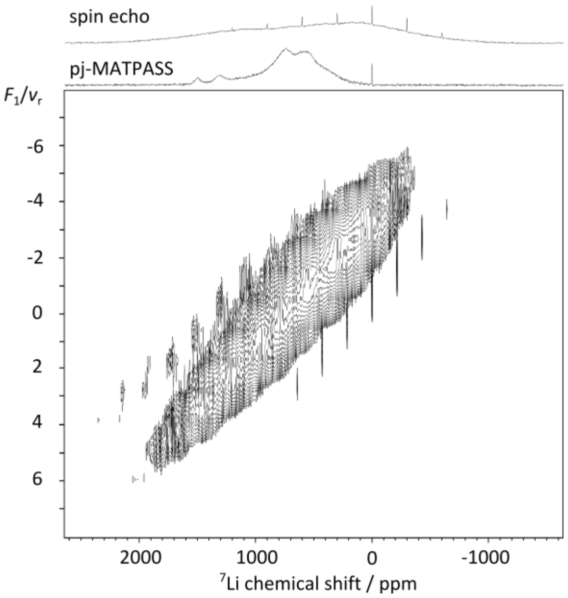


Fig. 2　2D MATPASS spectrum of $LiNi_{1/2}Mn_{1/2}O$ synthesized under air atmosphere. Isotropic spectrum (pj-MATPASS) is obtained from summation of ssbs after shearing. Spin echo spectrum obtained at 70kHz MAS is also shown.

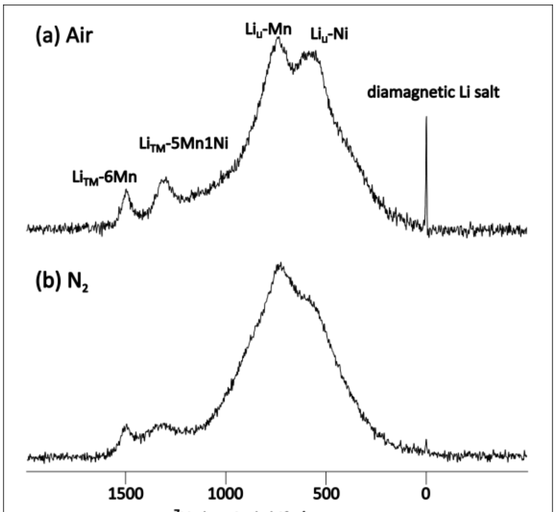


Fig. 1　pj-MATPASS spectra of $LiNi_{1/2}Mn_{1/2}O$ synthesized under (a) air and (b) nitrogen atmosphere.

【参考文献】

(1)　Hung, I.; Zhou, L.; Pourpoint, F.; Grey, C. P.; Gan, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1898–901.

L1-11 N ドープにより複合アニオン化した Li_2S-P_2S_5 電解質の固体高分解能NMR

〇野田泰斗[1], 高倉希[1], 木村拓哉[2], 林晃敏[2], 辰巳砂昌弘[2], 竹腰清乃理[1]
[1] 京都大学大学院理学研究科
[2] 大阪府立大学工学研究科

High-resolution NMR of anion-mixed Li2S-P2S5 electrolytes by nitrogen doping

○Yasuto Noda[1], Nozomi Takakura[1], Takuya Kimura[2], Akitoshi Hayashi[2], Masahiro Tatsumisago[2], Kiyonori Takegoshi[1]
[1] *Graduate School of Science, Kyoto University*
[2] *Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University*

Recently, it was reported that nitrogen doping with Li_2S-P_2S_5 glass and glass-ceramic solid electrolytes enhances the chemical stability as well as the Li^+ conductivity.[1] However, the structure of the compounds and the Li^+ conduction pathway have been unrevealed due to the difficulty of structure analysis. Thus it is unclear how nitrogen doping contributes to the enhancements. In this study, we performed solid-state NMR to analyze the local structure of the Li_2S-P_2S_5 Li^+ electrolyte system doped with nitrogen. The ^{31}P MAS NMR spectra of glasses showed a new peak at 65 ppm, whose intensity linearly increased with the amount of nitrogen dopant. Thus we conclude that the peak at 65 ppm is attributed to phosphorus binding to nitrogen, and the nitrogen contributes to the enhancement of the chemical stability and Li^+ conductivity.

【緒言】

リチウムイオン電池の安全性向上を目指し、現行の有機溶液の Li^+イオン伝導体に置き換わる高い Li^+イオン伝導度を有す固体電解質の開発が進められている。現在、硫化物系で Li^+イオン伝導度の高い固体電解質が合成されているが、水と反応して硫化水素を発生する問題点が指摘されている。最近、Li_2S-P_2S_5 系ガラスおよびガラスセラミック電解質において、窒素を添加して合成すると化学的安定性と Li^+イオン伝導度が増すことが報告された[1]。ただし、構造や Li^+イオンがどのように伝導しているかは定まっておらず、安定性と伝導度の向上に窒素が貢献しているのか判断がつかない状況である。

構造解析が進んでいない原因の1つは、窒素イオンと酸素イオンの X 線散乱断面積がほとんど等しく XRD による判別が困難なことである。NMR では窒素と酸素は共鳴周波数とスピン数が大きく異なり、明確に判別することができる。さらに、空間や化学結合を通して相関をとることにより、距離や化学結合の有無を解析することが可能である。そこで、本研究では$(75\text{-}1.5x)Li_2S\cdot25P_2S_5\cdot xLi_3N$ 電解質について固体高分解能 NMR を用いてガラス状態で N と結合している P が存在するか検証し、ガラスセラミック状態で N と結合している P が存在するならばどの相に存在するか解析することを目的とした。

固体電解質、複合アニオン、固体高分解能NMR

〇のだやすと、たかくらのぞみ、きむらたくや、はやしあきとし、たつみさごまさひろ、たけごしきよのり

【実験】

アルゴン雰囲気下でボールミリングにより合成された(75-1.5x)Li_2S・25P_2S_5・$x$$Li_3N$ 系について、x = 0, 10, 20 のガラス試料と、x = 10 のガラスを転移点で加熱することにより得られたガラスセラミック試料の ^{7}Li MAS NMR、^{31}P MAS NMR の定量測定を行った。^{31}P MAS NMR は信号がガウス関数であるとしてピークを分離し、信号を過去の報告[2]に基づき帰属した。

【結果・考察】

図 1 に ^{31}P MAS NMR 結果を示す。組成比と過去の報告[2]より 80 ppm 付近のメインピークは PS_4^{3-}と帰属され、N をドープしていなくても出現した 0～40 ppm 付近のマイナーピークは酸化物由来のピーク、105 ppm 付近のピークは $P_2S_6^{4-}$などによるものと考えられる。(a)～(c)のガラスにおいて、65 ppm 付近のピークは N ドープ量と相関してピーク強度が高まっており、ガラス状態で N と P が結合していると結論づけられた。ガラスセラミックス(d)については、メインピークに線幅の細い部分、太い部分の少なくとも 2 つあることが判明した。一般的にガラスはピークが太く、構造の整っている結晶ではピークが細いため、細いピークがセラミックス由来だと考えられる。また、同量 N ドープを行ったガラス(b)およびガラスセラミックス(d)について、ガラスセラミックスの方が N 結合由来のピーク強度が高くなっている。ただし、ガラスセラミックスの N 由来ピークがガラス中の N と結合する P か、ガラスセラミックス中の N と結合する P か判別はつかない。これを解明すべく、^{31}P-^{31}P 距離および J を介した二次元相関実験を行い、当日報告する予定である。

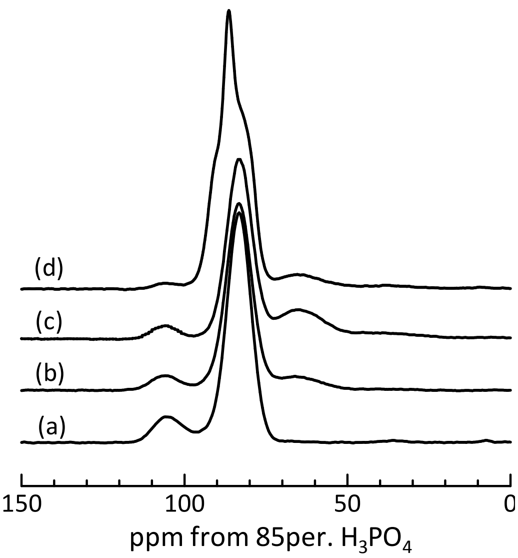


Fig. 1. ^{31}P MAS NMR spectra of the (75-1.5x)Li_2S·25P_2S_5·$x$$Li_3N$ glassy samples with x = 0 (a), 10 (b), and 20 (c), and glass-ceramics sample (d).

【謝辞】

本研究は JSPS 科研費 新学術領域研究「複合アニオン化合物の創製と機能」(JP16H06440)の助成を受けて実施された。

【参考文献】

[1] Fukushima, A. Hayashi, H. Yamamura, M. Tatsumisago, Solid State Ionics **304** (2017) 85-89.

[2] H. Eckert et al., Chem. Mater. **2** (1990) 273-279.

L1-12 ラミネートLi固体電池のオペランドNMR/MRI観察

○拝師智之 [1]，藤木聡 [2]，村上雄斗 [3]，寺田康彦 [3]，相原雄一 [2]
1）株式会社エム・アール・テクノロジー(つくば市)，
2）株式会社サムスン日本研究所
3）筑波大学数理物質科学研究科

Operand ^{7}Li-NMR/MRI for a laminated all-solid-state rechargeable lithium battery

○Tomoyuki HAISHI [1], Satoshi FUJIKI [2], Yuto MURAKAMI [3], Yasuhiko TERADA [3], Yuichi AIHARA [2]
[1)] MRTechnology, Inc., Tsukuba, Ibaraki, JAPAN, [2)] Samsung R&D Institute Japan Co. LTD
[3)] Applied physics, University of Tsukuba., Tsukuba, Ibaraki, JAPAN

Synopsis: A experimental method of *operand* ^{7}Li-NMR/MRI for aluminum-laminated rechargeable Li batteries with acquiring a charge / discharge curve *in-situ* has developed. we performed NMR/MRI measurements of an aluminum-laminated all-solid-state lithium battery in a proper orientation of the B_1 excitation pulse to the sample's lamination plane with a 200 μm sealing gap. A Charge / Discharge operation of the Li battery was performed while *in-situ* NMR/MRI measurement.

緒言：NMR/MRIによるリチウムイオン電池の計測は，^{1}H，^{7}Li，および^{19}FといったNMR原子核を独立かつ直接的に観測できることから，電池の研究開発に有用な手法となっている。これまでNMR/MRI計測と電池構成との相性の問題で，先行研究の内容は先駆的ではあるが，試料形状は限定的なものとなっていたが，本研究グループは本学会にて一般的なアルミラミネート型のリチウム二次電池[(Ref.1]について，充放電させながらのin-site MRI計測の実例[(Ref.2]を示した。今回は，組み立てられたフルセル2次電池の標準評価法である充放電チャートを，自作した全固体Li電池について繰返し取得しながら，9.4T/54mm-NMR装置でオペランドNMR/MRI計測を実施した。

NMR/MRI system and Li battery samples:

A 9.4-Tesla wide-bore NMR magnet, digital NMR/MRI console (DTRX6/ S7D/ iPlus, MRTe, Japan), a home-built 3-axis gradient coil, and rectangle solenoid rf coil were employed. Fig.1 shows two orientations of the rf coil' slot and in-parallel-to-B_0 position (right hand side) was used for experiments. The TX power for the B_1 excitation was less than 50 W for 120 μs pulse width. The aluminum-laminated film of 110 μm was consisted by Al-foil of 30 μm thickness, PET (polyethylene terephthalate), and Nylon. Two laminate films of (28 mm)^2 square with tab thickness of 200 μm and 3 mm sealing width were used to enclose a battery stack. Measurement homogeneity for space of (20 mm)^2 in the laminated sample was confirmed by MRI of an all-solid-state electrolyte package. A whole battery package (500 μm thickness) with the lamination was (29 mm)^2 square with Al/Cu current collectors.

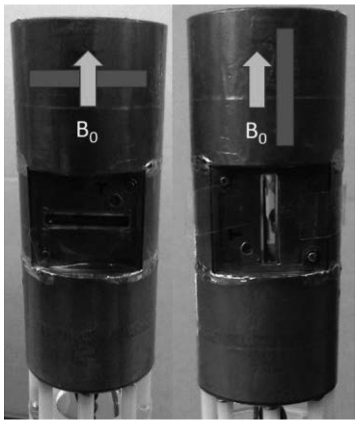


Fig.1. rf probe with gradient coil: B_0 is in perpendicular, or parallel to the rf slot's plane.

---

laminate, MRI, Lithium
○はいしともゆき，ふじきさとし，むらかみゆうと，てらだやすひこ，あいはらゆういち

Operand NMR/MRI experiments and results:

The aluminum-laminated all-solid-state rechargeable Li batteries (NCA/ Solid- Electrolyte/ Li-foil) were prepared for *operand* NMR experiments. Fig.2 shows one of the rechargeable Li batteries and Fig.3 is an MRI of Li-deposition. The ^{7}Li NMR spectra *in-situ* (Fig.4) and the Charge/ Discharge curve (Fig.5) were acquired with a portable power supply of EF-7100P/ CADAS (Electrofield inc, Osaka-pref.). The C/D current was set to 0.2mA, and voltage limits were set to 3.64/2.5V. For the measurement of ^{7}Li-NMR spectra followed by MRI, pulse sequence parameters were below: TR = 50 ms, width = 120 μs, sampling rate =1 μs, deadtime delay = 50 μs, 2048 points, T_{acq} = 51 sec / 14min. 2D-CSI for MRI.

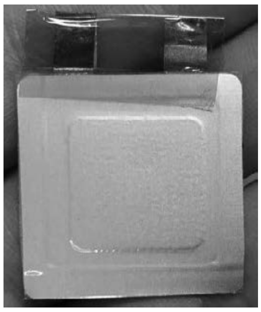


Fig.2. All-solid Li B
28 mm x 28mm

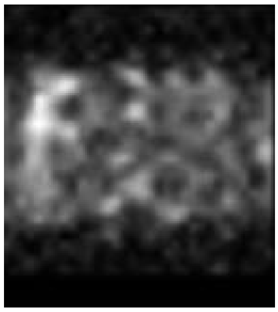


Fig.3. Li-deposition.
SOC 100% on Au/Cu

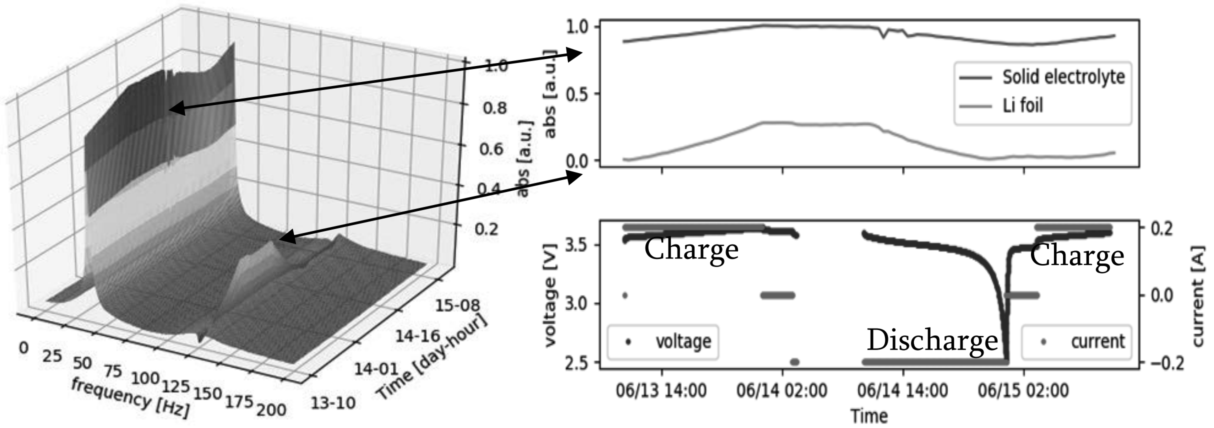


Fig.3. ^{7}Li-NMR *operand* spectrum in C/D

Fig.4. Li-signal's amplitude change as in the C/D operation.

Discussion:

The C/D power supply and its software were optimized for C/D operations of multi-batteries, but these were not directly synchronized with NMR/MRI pulse sequences. For the further research, all the data should have logged in absolute time.

Conclusion:

^{7}Li NMR/MRI of aluminum-laminated all-solid-state Li batteries during the operation of acquiring charge / discharge curves were successfully done at 9.4T/54mm of ^{7}Li-156MHz. There was increased rf noise as the C/D operation, but it was not severe, and the NMR/MRI data were not degraded. The combined acquisition of NMR spectrum and MRI indicates the battery's state of charge and off course the C/D curve is the most useful for the understanding of battery characteristics. We conclude that the *operand* NMR/MRI measurements during the acquisition of the Charge / Discharge curves were successfully developed.

参考文献

1) 「アルミラミネート型全固体リチウム二次電池の7Li-NMRイメージング法：正極、固体電解質，およびLi箔について」:拝師智之，藤木聡，相原雄一，第55回NMR討論会予稿集(広島)，2016

2) 「液系ラミネートLi-ion電池のin-situ NMR/MRI観察」:拝師智之，藤木聡，相原雄一，第56回NMR討論会予稿集(八王子)，2016

L1-13 スピンロックパルスを用いない縦磁化間CPMASのすすめ

○神原孝之[1,2,3]，竹腰清乃理[2]
[1]東京工業大学 生命理工学院　[2]京都大学大学院 理学研究科
[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

Introduction to longitudinal cross-polarization magic-angle spinning NMR without spin-locking pulses

○Takayuki Kamihara[1,2,3] and K. Takegoshi [2]
[1]*School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan*
[2]*Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan*
[3]*NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center, RIKEN, Yokohama, Japan*

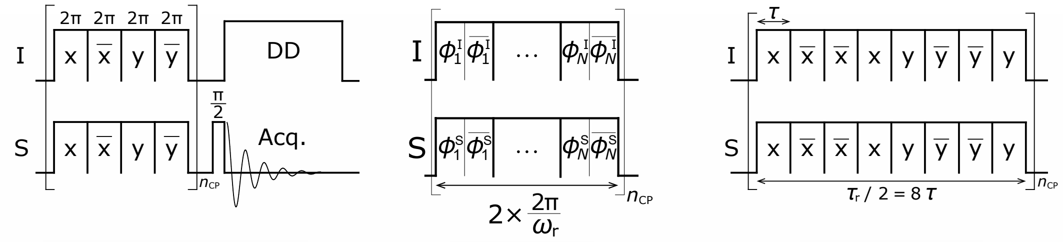
Cross polarization (CP) is a common technique to provide heteronuclear polarization transfer via dipolar interaction in solid-state NMR. In most of CP schemes, which utilize spin-locking pulses, the polarization transfer occurs in the transverse plane. Generally, spin locking is disturbed by some interactions such as chemical shift anisotropy and dipolar interaction, and the locked polarization also suffers from T1rho relaxation. These effects sometimes lead to inefficient CP. In this work, we propose two longitudinal CP schemes free from such degrading effects, which do not require spin-locking pulses. One CP scheme we named “CPZ” utilizes the concept of symmetry-based recoupling, and the other scheme named “OD-CPZ” utilizes rotational resonance (R2) extended to heteronuclear spin systems. Both employ composite pulses with opposite phases to gain the robustness for RF inhomogeneity.

交差分極法（cross polarization; CP）は固体高分解能NMRにおける異種核間の分極（磁化）移動法で、低感度核の感度向上や測定時間の短縮などに主に利用されている。これまでに数多くのCP法が提案されてきたが、そのほとんどがスピンロックパルスと呼ばれるラジオ波（RF）照射を用いた横磁化間の分極移動を利用している。一般に、化学シフト異方性や双極子相互作用といった核の位置における局所磁場の影響を受けてスピンロック効率が落ち、さらにスピンロック下にある横磁化は$T_{1\rho}$と呼ばれる時定数で減衰するため、結果としてCP効率が損なわれるという問題がある。これらの影響を避けるためには強いRF照射を用いればよいが、プローブへのダメージや試料の熱変質のおそれも大きくなる。そこで本研究では、スピンロックパルスを用いないことで弱いRF照射でも効率が落ちず、かつRF磁場の不均一性にも強い縦磁化間のCP法であるCPZ法と、同じ縦磁化間のCP法でRFオフセットの差を利用した周波数選択的CP法であるOD-CPZ法を提案する。

CPZ（COMPOZER with Z rotation）法[1)]は、静止試料における縦磁化間CP法であるCOMPOZER[2)]をマジック角回転（MAS）に適応させたものである。CPZでは４つの２πパルスの代わりに、POST-C7[3)]に代表されるsymmetry-based recouplingパルス列[4)]を用いた。I核に$C8_2^3$、S核に$C8_2^1$の対称性を用いることで照射位相の回転速度差をMAS速度に合わせ、化学シフト異方性の影響を抑えつつ、同種核間デカップリングの下で異種核間のリカップリングを実現した。

固体NMR、縦磁化間CPMAS、周波数選択励起

○かみはらたかゆき、たけごしきよのり



(a) COMPOZER (b) CPZ (c) OD-CPZ

Fig. 1. Pulse sequences of longitudinal CP

OD-CPZ（offset-driven CP along the z axis）法[5]では、COMPOZERの照射位相を継承しつつ、両核におけるRF照射の周波数オフセットの差（または和）をMAS周波数に合わせることで、周波数選択的なリカップリングを実現した。これは、化学シフトの差をMAS周波数に合わせることによって同種核間のリカップリングが起こるrotational resonance（R2）[6,7]という現象を異種核間に拡張したものである。

どちらの手法も位相反転した同じパルスと組にして用いることで、RF磁場の不均一性の影響を軽減し、さらにスピンロックパルスを用いないことで、弱いRF照射を用いても十分なCP効率が確保できる。例として、CPZ法を用いて^{19}F–^{13}CのCPを行った場合、通常はCPが起こらないとされる^{19}Fのパルス強度（磁場7 T、^{19}F: 282 MHzで10 kHz程度）でもCPによる信号増強が確認されている[8]。

Figure 2にOD-CPZによるL-ヒスチジンの^{13}C信号の選択励起の結果を示す。磁場9.4 T（^{1}H: 400 MHz）、20 kHzのMAS下で、直接^{1}Hに結合した^{13}Cの信号（Fig. 2(c)–(f)）は選択的に励起することができた。一方、^{1}Hに結合していない^{13}C（Fig. 2(g), (h)）に関しては、複数のリカップリング条件が重なってしまうため、それほど高い選択性は得られなかったが、より高磁場、あるいはより高速のMASを用いることでリカップリング条件の重なりが軽減されるため、十分な信号選択性が確保できる。当日の発表では、高磁場・高速MASを用いたOD-CPZによる信号選択励起の結果も併せて示す予定である。

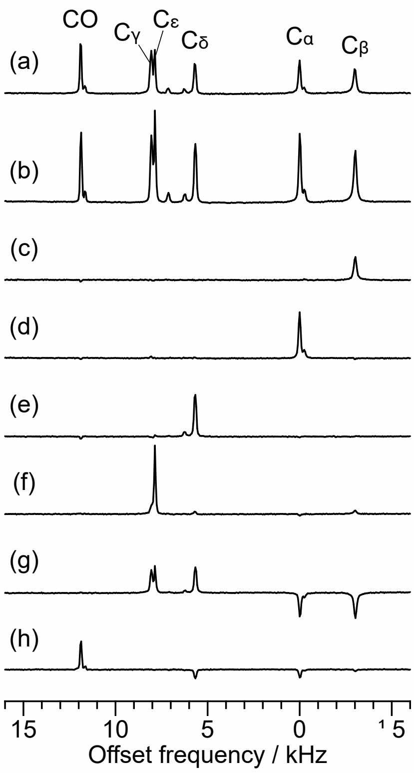


Fig .2. Stacked experimental plots of ^{13}C 1D OD-CPZ spectra of U-^{13}C-L-histidine (c)–(h). For comparison, the spectra of (a) Bloch decay and (b) CW-CP are also plotted.

参考文献

1) Kamihara, Murakami, Noda, Takeda, and Takegoshi, *J. Magn. Reson.* **245**, 94–97 (2014).
2) Fukuchi, Ramamoorthy, and Takegoshi, *J. Magn. Reson.* **196**, 105–109 (2009).
3) Hohwy, Jakobsen, Edén, Levitt, and Nielsen, *J. Chem. Phys.* **108**, 2686–2694 (1998).
4) Brinkmann and Levitt, *J. Chem. Phys.* **115**, 357–384 (2001).
5) Kamihara and Takegoshi, *J. Chem. Phys.* **146**, 154202 (2017).
6) Andrew, Clough, Farnell, Gledhill, and Roberts, *Phys. Lett.* **21**, 505–506 (1966).
7) Raleigh, Harbison, Neiss, Roberts, and Griffin, *Chem. Phys. Lett.* **138**, 285–290 (1987).
8) 神原ら、第52回NMR討論会要旨集, **P112**, pp. 374-377 (2013).

L1-14 ENDOR共振器を用いた希釈冷凍機中での動的核偏極

○香川晃徳[1]，根来誠[1,2]，椿山大誠[1]，小林太郎[1]，北川勝浩[1]
1 大阪大学大学院基礎工学研究科
2 JST さきがけ

Dynamic Nuclear Polarization using an ENDOR cavity in a dilution refrigerator

○Akinori Kagawa [1], Makoto Negoro[1,2], Taisei Tsubakiyama [1], Taro Kobayashi [1], Masahiro Kitagawa [1]
1 Graduate School of Engineering Science, Osaka University
2 JST PRESTO

Recently, quantum simulations, which one quantum system mimics an another quantum system of interest, have been implemented. Roumpous *et al.* have proposed that magnetic phase transition can be simulated by highly polarized nuclear spins and multiple-pulse sequences. In order to realize the quantum simulation, we developed dynamic nuclear polarization (DNP) instrument with a dilution refrigerator. The cooling power is very low at temperatures below 1K. We constructed an ENDOR (Electron Nuclear DObule Resonance) cavity to efficiently control nuclear and electron spins for the refrigerator. Single crystals of CaF_2 doped with Tm^{2+} was used for DNP experiments. We obtained ^{19}F spin polarization of more than 80%.

量子多体系は粒子数が増えるにつれて、指数的に解析が困難になる。近年、そのような量子多体系を解析するための手法である量子シミュレーションが注目されている[1]。量子シミュレーションでは、解析したい量子系より制御・観測等が容易な他の量子系を用いて、ハミルトニアンを模倣する。Abragamらは、DNPによって核スピンを高偏極化した後に、回転座標系での断熱消磁（ADRF: Adiabatic Demagnetization in the rotating frame）を行うことで磁気相転移を実現している[2]。断熱的にハミルトニアンを変化させることで、そのハミルトニアンの基底状態である磁気秩序に相転移する。Roumpousらは高偏極化した核スピンに、さらに多重パルスを照射し、核スピン間のハミルトニアンを制御することで、磁気相転移の量子シミュレーションが実現できることを示した[3]。本研究では、その理論提案を実現するために、極低温下で核スピンを高偏極化する動的核偏極(DNP: Dynamic Nuclear Polarization)が行える装置を開発した。

磁気相転移に必要な数十%以上の核スピン偏極を得るために、極低温、高磁場下でDNPを行う。そのような極低温では冷凍機の冷却能力が低いために、高効率で電子スピンと核スピンを操作できるENDOR（Electron Nuclear DOble Resonance）共振器が必要である。本研究ではWeisらによって提案されたリボンコイルを用いたENDOR共振器を採用した[4]。ENDOR共振器は、ソレノイドコイルに厚さ1μmの銅箔を貼り付けた石英ロッドを挿入することで、円筒型のTE011空洞共振器を形成する（Fig. 1.）。石英ロッドの挿入長を変えることで、共振周波数を調整することができる。また一般的にENDOR共振器に用いられるサドルコイルと比較して高効率な核スピン操作が可能である。

試料はフッ化カルシウム単結晶を用いた。フッ化カルシウムには不対電子スピンを持ったTm^{2+}がドープされており、その電子スピン偏極を核スピンへ移し高偏極化を行う。Tm^{2+}のドープ量は

動的核偏極、極低温、量子シミュレーション

○かがわ　あきのり、ねごろ　まこと、つばきやま　たいせい、こばやし　たろう、きたがわ　まさひろ

^{19}Fスピン数に対して6000分の1程度である。この不対電子スピンのg値は約3.45であり、Tmの核スピンとの超微細結合は1.1 GHzである。実験は1K以下で電子スピンの偏極が99%以上となる約2.8Tで行った。この時、電子スピン、^{19}Fスピンの共鳴周波数は、それぞれ約138GHz、115MHzである。NMRの共鳴周波数の表皮深さは6μm程度であり、1μmの銅箔を80%以上透過できる。NMR共振用の可変コンデンサは希釈冷凍機の外に配置しており、希釈冷凍機内で固定コンデンサによるプレチューニングしている。

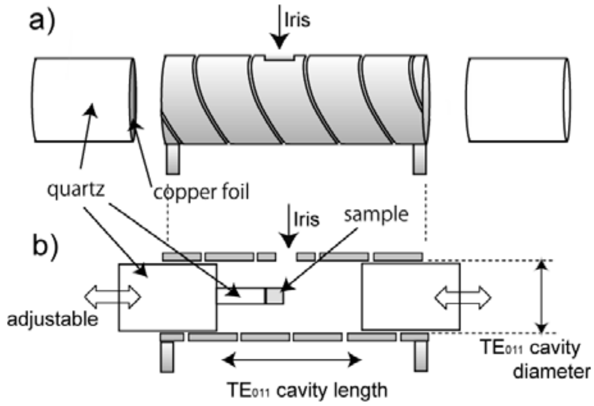


Fig. 1. Helix ENDOR cavity from different view. b) is a sectional view of a).

フッ化カルシウム中のTm^{2+}の電子スピンの共鳴スペクトルは数十Hz程度であり、^{19}Fスピンの共鳴周波数より小さいため、DNPのメカニズムは固体効果である。本研究では、マイクロ波周波数を掃引し、数十MHzに広がった全ての電子スピンをDNPに利用することで偏極移動の効率化を図った。1msの掃引時間で30秒間DNPを行った時のマイクロ波周波数の掃引幅に対する相対的な^{19}Fスピンの信号強度を図2に示す。信号強度が最も高かった掃引幅40MHzにおいて、掃引時間を変化させた結果、10μsの掃引時間において、単一周波数の場合と比較して信号強度が約1.9倍上昇した。熱による核スピン緩和を抑制するために、マイクロ波パワーを-3.5dBmから徐々に下げながらDNPを300min行った結果、約83%の^{19}Fスピン偏極が得られた。この時のπ/2パルスとtipパルスで観測したNMR信号を図3に示す。偏極率が非常に高い場合、局所的に核スピンが感じる磁場が等しくなるため、tipパルスで観測すると線幅が大幅に細くなる。今後は、この高偏極化した核スピン状態に多重パルス系列を照射し、双極子ハミルトニアンを制御することで磁気相転移の量子シミュレーションの実現を目指す。

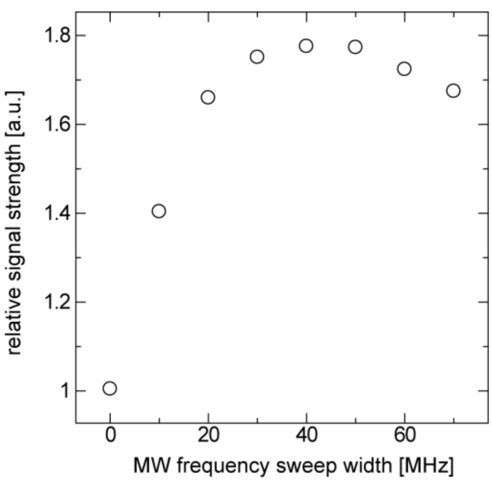


Fig. 2. Relative ^{19}F signal strength as a function of sweep width.

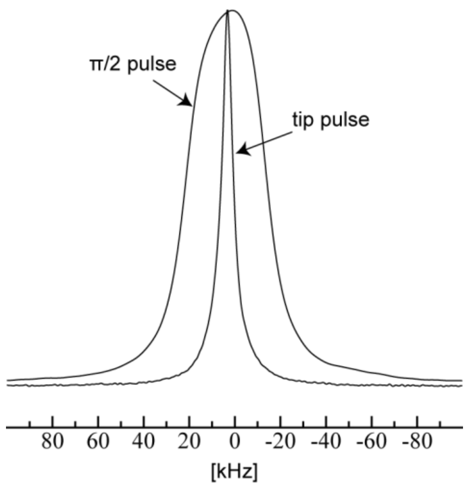


Fig. 3. ^{19}F-NMR signals at polarization of 83%.

[1] I. M. Georgescu, *et al*., Rev. Mod. Phys. **86**, 153 (2014).
[2]A. Abragam and M. Goldman, *Nuclear Magnetism: Order and Disorder* (Clarendon Press, Oxford, 1982).
[3]G. Roumpos, *et al*., Phys. Rev. B **75**, 094415 (2007).
[4]V. Weis, *et al*., J. Magn. Reson. 140, 293 (1999).

L1-15

自作改良型NMR装置を用いたNMRスペクトルによる半導体中ドーパント位置の特定

○佐々木　進[1]，坂井　祐大[2]，池田　宏輔[2]
1 新潟大学工学部
2 新潟大学自然科学研究科

NMR Spectra Obtained by Home-Built Spectrometer Identify the Locations of Dopants in Semiconductors

○Susumu Sasaki [1], Masahiro Sakai, Kohsuke Ikeda [2]
1 Niigata University, Faculty of Engineering
2 Niigata University, Graduate of Science and Technology

Although doping in semiconductors is a useful method of controlling the electric properties, it is not straightforward to identify the locations of the dopants: whether the dopants replace the positions of the host atoms or they are embedded in interstitial sites. In principle, NMR can be a very powerful method to solve these issues. However, most NMR spectrometers employ the magic-angle spinning (MAS) with an aim of clarifying the peak frequencies of the material, which means that the other physical information is completely lost. In contrast, by developing our own NMR spectrometers, we have clarified many physical findings of various materials. Here, by using our spectrometer, we have succeeded in identifying the doped sites in doped GaAs substrates.

半導体は不純物をドープすることで多彩な機能を発現する。なかでも GaAs は，量子ホール効果・光デバイスに加え，近年では量子情報の舞台としても注目されている。しかしながら「ドープされた不純物がホストの GaAs 中のどの位置に入るか？」という基本的な情報については，我々の知る限り，実験的に明らかにした報告は見当たらない。

核スピンは，言わば物質に“作り付け”のプローブであるため，物質内部の微視的な情報を得ることができる極めて強力な手法である。実際，NMR[1]は，これまで超伝導体や磁性体の多岐にわたる物性の発現機構を明らかにしてきた[2]。本来ならば，Ga および As 核スピンからの信号の周波数スペクトルにより，ドーパントのサイト選択性に関する知見が得られてしかるべきである。しかしながら，市販の NMR 装置による報告では，いずれの結果も鋭い 1 本の共鳴線を観測するだけで，ドーパントのサイト選択性については何らの知見も得られていない[3]。文献[3]で明らかなように，市販の装置では，MAS によってピーク周波数を正確に求めることを前提としているため「ピーク周波数以外の情報は，すべて“削ぎ落とされて”いる」。

我々は，市販の測定システムに頼らず，独自にゼロから組み上げた NMR 装置に常に改良を重ね，様々な新たな知見を得てきた。たとえば，GaAs 基板の上に交互に積層された GaAs 層と $Al_{0.3}Ga_{0.7}As$ 層において，Al 核スピンをプローブとした超高感度 NMR により，これまで観測されないと考えられてきた歪みの空間分布を観測している[4]。

ドーパントサイトの特定，MASに依らないNMR，ミクロな物性情報
○ささき　すすむ，さかい　まさひろ，いけだ　こうすけ

今回，超高感度に加え MAS を用いない測定法を用いることで，GaAs 基板におけるドーパントのサイト選択性を明らかにすることに成功した。具体的には，これまで観測されてこなかった Ga および As 核スピンの周波数スペクトルの Si-doped および Cr-doped GaAs 基板（Cr-doped GaAs におけるドープ量は 10^{15}cm^{-3}，As-doped GaAs では 10^{19}cm^{-3}）に対する相違を明確にした。これによりドーパントの位置を同定し，以下の知見を得た。

① Cr-doped GaAs においては，Cr は選択的に As を置換している。換言すると，Ga サイトは“無傷”である。
② ドープされた Cr は，最近接の Ga 核スピンの位置に弱い磁場を生じている。
③ Si-doped GaAs においては，Si は両サイトに均等に置換している，もしくはホストの原子の隙間に均一に入っている。
④ 以上の知見は，第一原理計算に基づく予備的な結果でも強く示唆されている。

講演では，特に，市販の NMR 装置で行われる測定法と，今回我々が自作改良型 NMR 装置を用いた測定法との相違点を中心に，スペクトルの結果の詳細と知見に至る過程を詳細に議論する。

参考文献

[1] M. H. Levitt, *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance* , John Wiley & Sons, Ltd (2008).
[2] 川畑有郷，安岡弘志，「遍歴電子系の磁性と超伝導」裳華房 (1992).
[3] O. H. Han *et al*. *J. Chem. Phys.* **89**, 6046 (1988).
[4] 西森ら，「GaAs 半導体中格子歪み分布の核スピンによる観察」第 76 回　応用物理学会秋季学術講演会（名古屋国際会議場，2015 年），14a-4D-6.

L1-16 高温超伝導バルク磁石での新規シムコイル検討

○仲村 高志[1]，内海 博明[2]，野村 師子[3]，柳 陽介[3]，伊藤 佳孝[3]
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
2JEOL RESONANCE
3イムラ材料開発研究所

Investigation of new shim coil with high temperature superconducting bulk magnet

○Takashi NAKAMUR [1], Hiroaki UTSUMI[2], Mitsuko NOMURA[3], Yousuke YANAGI[3], Yoshitaka ITOH[3]
1 RIKEN Spring-8 Center NMR Science and Development Division,
2 JEOL RESONANCE Inc.,
3 IMRA Material R&D Co., Ltd.

We are developing a cryogen-free superconducting magnet by conduction cooling in a refrigerator that enables high-resolution NMR observation using bulk superconductors. Based on the latest results, we confirmed that the magnetic field homogeneity of a bulk magnet can not be corrected by symmetrical coils using conventional room temperature shim coils, and examined a shim coil that can be effectively applied to a bulk magnet.

我々は、高温超伝導バルク体を用いた高分解能 NMR 観測を可能とする冷凍機を用いた伝導冷却無冷媒の超伝導磁石を開発している[1]。高温超伝導体は臨界温度が高いため比熱が大きな温度領域で用いることができる。このことで従来の線材としての用いられかたばかりでなく、塊（バルク）の状態でも磁石として用いることが可能となった[2]。これは金属超伝導体(NbTi,Nb_3Sn)では不可能で、高温超伝導体の発見とともに見出された新しい応用技術といえる。さらに、バルク磁石の大きさは直径 64 mm、高さ 134 mm と非常にコンパクトなので、図 1 のように本体はワイドボアの固体 NMR プローブと同等の大きさで冷凍機や真空容器を含めても他の分析装置と同等の設置面積（2 m X 2 m）となり、天井高（2.5 m 以上）の要請がなく、NMR が初めて大型の分析装置でなくなる。また、冷媒を用いないためクエンチ時のヘリウムガス充満による危険性もなく、空冷で電気負荷が 1.2 kW とヘアドライヤーと同等で装置移動も可能な装置にできる。

NMR 磁石に必要な仕様は、磁場強度の高度な安定性と均一度であり、さらに強度自身を高くする（>3 T）要請もある。そのすべて実現できるのは超伝導磁石だけであり、NMR 磁石はそのために発展してきた。我々は、これが高温超伝導バルクという新しい応用形態でも可能かを確かめるため研究を始めた。2007 年に、非常に不均一ではあるが NMR 信号を初めてバルク磁石において観測した[3]。その後、昨年報告した[4]ように、高分解能 NMR が観測されるに至った。しかし、スペクトルを詳細に検討するとまだ不均一だと考えられる成分が観測されている。

高温超伝導バルク体、超伝導磁石

○なかむら たかし、うつみ ひろあき、のむら みつこ、やなぎ ようすけ、いとう よしたか

では、これらの不均一成分がどこから来るのかを検証し、磁場補正が可能であれば、分析装置に資するNMR磁石が達成できる。加えて、極小の磁石では均一空間と室温ボアサイズが制限される。このために磁石の室温シムにも従来の磁石と異なるコンセプトの薄型のシムが実装されることが望まれる。以前我々は、シングルシムというアイデアを着想し、MRIによる磁場均一度の計測から逆計算し、均一な磁場をバルク磁石に形成するテーラーメードのひと筆書きのシムコイルを設計し、それの有効性を示した[1]。残念ながら、この方法では一つ一つのバルク磁石に対し、個別のコイルを設計しなければならず、製品化には筋が悪い、そこで、同様のアプローチではあるが、着磁時に円周方向に発生する不均一性を補正するために超伝導テープ材で作成した超伝導円筒をバルク磁石内部に配置した。静磁場着磁時に磁場均一性を維持するように超伝導円筒上に超伝導電流が誘起され、バルク磁石の磁場均一度が劇的に改善され[5]、高分解能NMRが観測されることは昨年の討論会で報告した。我々はさらに、磁場均一度を改善する方法として、2011年にJuchemらが７　Tの人体用MRI[6]と9.4Tマウス用MRI［7］に提案したマルチシムコイルをバルク磁石用に改良し、適応することでよりブロードな成分を補正するための基礎的検討を実施した。図２に示すように一次のシムコイルとその外側に２ターン８　mm角のコイルを配置し、一次のシムを最適化した後に8 mm角のシムコイルの効果を測定した。コイルの大きさ、ターン数と配置を最適化することによって均一度の変化を検証している。これらの結果については、当日に報告する。

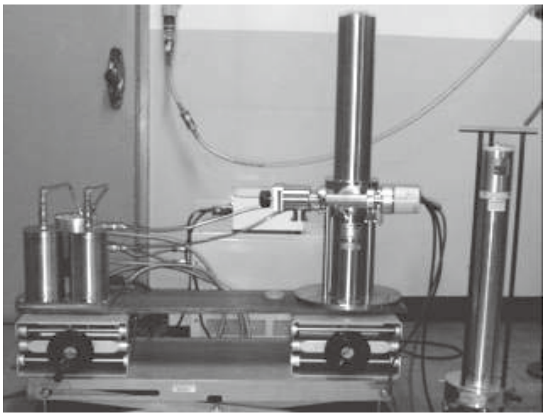


Fig. 1 Photograph of a Superconducting Bulk Magnet
In the center is a superconducting bulk magnet that it is as large as the wide-bore type solid state NMR probe on the right side.

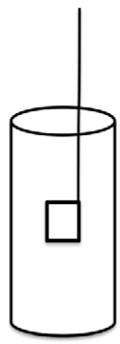


Fig. 2 Schematic view in which a 2 turn coil of square 8 mm square is placed outside the primary shim coil.

参考文献

[1] T. Nakamura, et al. (2015) *J. Magn. Reson.* **259** 68-75.
[2] M. Kimura, M. Tanaka, H. Horiuchi, et al. (1991) *Physica* C **174** 272
[3] T. Nakamura, Y. Itoh, M. Yoshikawa, T. Oka and J. Uzawa (2007) *Concepts in Magn. Res. B (MRE)* **31**(2) 65-70
[4] 仲村ほか (2017) 第56回NMR討論会.
[5] Y. Itoh, Y. Yanagi And T. Nakamura (2017) TEION KOGAKU **52** 25-32 (in Japanese)
[6] C. Juchem, et al. (2011) *J. Magn. Reson.* **212** 280-288.
[7] C. Juchem, et al. (2011) *Magnetic Resonance in Medicine* **66** 893–900

第2日目

9月19日（水）

一般演題

Day 2 (Sep. 19, Wed)

L2-1

Structure-function investigation of deoxyribozymes composed of heme and G-quadruplex DNAs

○Yasuhiko Yamamoto[1-3], Haruka Araki[1], Kosuke Hayasaka[1], Ryosuke Shinomiya[1], Yusaku Nakayama[1], Kentaro Ochi[1], Tomokazu Shibata[1], Atsuya Momotake[1], Masaki Hagihara[4], Dipankar Sen[5], and Hikaru Hemmi[6]
[1]*Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8571, Japan*
[2]*Tsukuba Research Center for Energy Materials Science (TREMS), University of Tsukuba, Tsukuba 305-8571, Japan*
[3]*Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA), University of Tsukuba, Tsukuba 305-8577, Japan*
[4]*Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University, Hirosaki 036-8560, Japan*
[5]*Department of Chemistry, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia V5A 1S6, Canada*
[6]*Food Research Institute, NARO, Tsukuba 305-8642, Japan*

Heme in both its ferrous and ferric states binds selectively to the 3'-terminal G-quartet of all parallel-stranded monomeric G-quadruplex DNAs formed from inosine(I)-containing sequences, i.e., d(TAGGGTGG GTTGGGTGIG) (18mer) and d(TAGGGTGGGTTGGGTGIGA) (18mer/A), through a π-π stacking interaction between the porphyrin moiety of the heme and the G-quartet, to form 1:1 complexes. These complexes exhibited enhanced peroxidase activities, compared with heme alone. These findings provide novel insights as to the design of heme-deoxyribozymes.

Introduction Heme (Fig. 1A) is incorporated, as a prosthetic group, into various apoproteins to form a series of hemoproteins which play vital roles in biological systems. Despite such ubiquitous occurrence of heme in nature, no functional role *in vivo* has yet been attributed to heme incorporated into nucleic acids. The RNA world hypothesis[1] has provided a strong stimulus for exploring new catalytic properties for nucleic acids, and heme is most likely an ancient compound, a likely player in the postulated RNA world. In fact, the heme-bound nucleic acids have been shown to recapitulate some catalytic functions of contemporary hemoproteins, lending credence to heme's link to a primordial RNA world.[2] Hence, these nucleic acids could be regarded as prototypes for redox-catalyzing ribozymes in the primordial RNA world.

In this study, we characterized the structure-function relationship of complexes between heme and unimolecular G-quadruplex DNAs formed from inosine(I)-containing sequences, i.e., d(TAGGGTGGGTTG GGTGIG) (18mer) and d(TAGGGTGGG TTGGGTGIGA) (18mer/A). We found that heme binds to the 3'-terminal G-quartet (Fig. 1B) of G-quadruplex DNAs of 18mer and 18mer/A (Fig. 1C). We also found that peroxidase activity of the heme-18mer/A complex was larger than that of the heme-18mer one, indicating that the 3'-terminal A acts as an acid-base catalyst to promote the catalytic reaction.

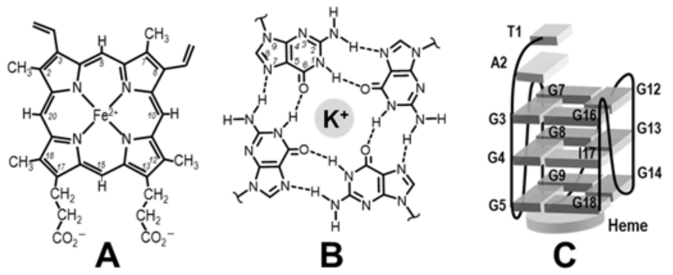


Fig. 1. Molecular structures of heme (A) and G-quadruplex (B) and a schematic representation of a complex between heme and G-quadruplex DNA formed from d(TAGGGTGGGTTGGGTGIG) (C).

ＤＮＡ、ヘム、デオキシリボザイム

○ やまもと やすひこ、あらき はるか、はやさか こうすけ、しのみや りょうすけ、しばた ともかず、ももたけ あつや、なかやま ゆうさく、おち けんたろう、はぎはら まさき、せん でぃぱんかー、へんみ ひかる

Results and Discussion Analysis of observed intramolecular NOEs (results not shown) indicated that an all parallel-stranded monomeric G-quadruplex DNA is formed from 18mer. In the spectrum of a carbon monoxide (CO) adduct of a complex between heme and the G-quadruplex DNA (see Fig. 1C), the imino proton signals of the guanines of the 5'-terminal G-quartet, i.e., G3, G7, G12, and G16, were upfield-shifted by ~0.5 ppm, and those of the guanines and inosine sandwiched between the terminal G-quartets, i.e., G4, G8, G13, and I17, by ~1.0 ppm, and those of the guanosines of the 3'-terminal G-quartet, i.e., G5, G9, G14, and G18, by ~2.5 ppm, due to the ring current effect of the heme porphyrin moiety (Fig. 2). These shift changes indicated that heme binds to the 3'-terminal G-quartet (Fig. 1C). We found that 18mer/A shares common structure properties with 18mer. Heme bound to 18mer or 18mer/A exhibited peroxidase activity, and the activity of the heme-18mer/A complex was larger than that of the heme-18mer one (results not shown), indicating that the 3'-terminal A of 18mer/A acts as an acid-base catalyst to promote the catalytic reaction.

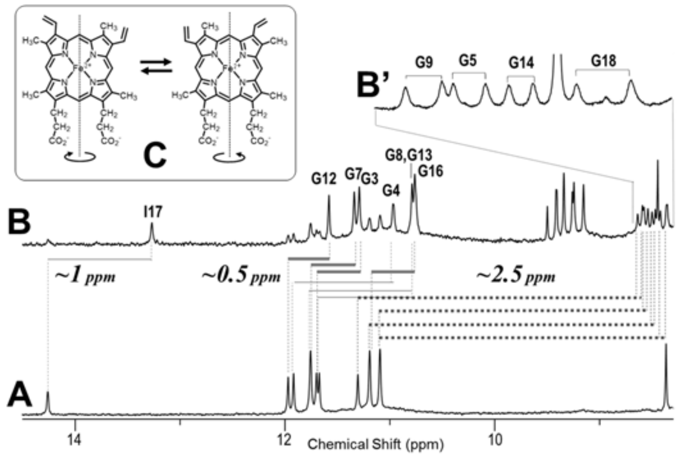


Fig. 2. Downfield-shifted portions of 600 MHz ^{1}H NMR spectra of d(TAGGGTGGGTTGGGTGIG) (18mer) (A) and a carbon monoxide adduct of a complex prepared from 1:1 mixture of 18mer and heme(Fe^{2+}) (B) in 90% $^{1}H_2O$/10% $^{2}H_2O$, 100 mM KCl, 50 mM potassium phosphate buffer at pH 6.80 and 25 ºC. A shift region, ~8.20 - ~8.70 ppm, of trace B is expanded in (B'). The ~1:1 splitting of the 3'-terminal G-quartet imino proton signals in (B') is due to the presence of the two heme orientations differing by 180º rotation about the pseudo C_2 axis with respect to the DNA. Assignments of guanine and inosine imino are indicated with the spectra. The upfield shift changes of the imino proton signals observed upon the heme addition indicated the specific stacking of heme(Fe^{2+}) onto the 3'-terminal G-quartet of the DNA, as illustrated in Fig. 1C (see text).

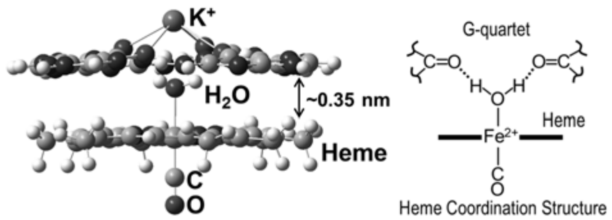


Fig. 3. Heme coordination structure in the heme-DNA complex. A water molecule (H_2O) sandwiched between the heme and G-quartet planes is coordinated to heme Fe atom and the axial H_2O forms hydrogen bonds with carbonyl oxygen atoms of the constituent guanine bases.

The nature of an axial ligand to heme Fe atom has a profound impact on the reactivity of heme. In the heme-DNA complex, a water molecule (H_2O) accommodated between the heme and G-quartet planes is coordinated to heme Fe atom as an axial ligand, and then two hydrogen bonds are formed between the H_2O molecule and carbonyl oxygen atoms of the guanine bases (Fig. 3). Due to such a unique physicochemical environment of the H_2O molecule in the complex, the polarization of the H_2O molecule is considerably greater than that of an ordinary one. The electronic nature of the heme in the complex is affected by the coordination of such a highly polarized H_2O molecule to the heme Fe atom.

References

1. W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618.
2. L. C. Poon *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 1877-1884.
3. Y. Yamamoto *et al.*, *Biochemistry,* **2015**, *54*, 7168-7177.

Acknowledgements This work was financially supported by JSPS KAKENHI (No. 16KT0048) and Bilateral Open Partnership Joint Research Project (No. BBD29011). Some of the ^{1}H NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE-600 spectrometer at the Chemical Analysis Center, University of Tsukuba.

L2-2

NMRによる天然変性タンパク質の構造動態解析

川嵜亮祐[1]，井上涼平[1]，Cloud Lee[2]，栃尾尚哉[1]，Danny Hsu[2]，
Jie-rong Huang[3]，○楯 真一[1,4]
1広島大・院理・数理分子，2台湾中央研究院，3台湾国立陽明大学
4クロマチン動態数理研究拠点

NMR approaches for revealing structure and dynamics of intrinsically disordered proteins (IDPs)

Ryosuke Kawasaki[1], Ryohei Inoue[1], Cloud Lee[2], Naoya Tochio[1], Danny Hsu[2], Jie-Rong Huang[3],
and Shin-ichi Tate[1,4]
[1]Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima Univ., Japan
[2]Academia Sinica, Taiwan
[3]National Yang-Ming Univ., Taiwan
[4]RcMcD, Hiroshima Univ., Japan

Intrinsically disordered proteins (IDPs) including the proteins harboring folded domains linked by intrinsically disordered regions (IDRs) constitute of about 50% of protein regions in mammalian cells. Studies to find out the functions exerted explicitly by IDPs have been focused. To precisely gain the structure and dynamics of IDPs, we have applied the ensemble structure analysis to various IDPs, in which RDC and PRE in combination with SAXS are elaborately used. Through the research with the NMR/SAXS ensemble structure analyses, we have shown that IDPs are not randoms coil, but they tend to populate specific conformations while they travel across substantially large conformational spaces: the biased conformations appear to be functionally relevant.

In the presentation, some technical details in the ensemble analyses will be described with the other NMR techniques essentially used in exploring the conformational dynamics of IDPs to emphasize the validity of NMR in the IDP research.

The widespread of intrinsically disordered proteins (IDPs) and the hybrid proteins that consist of the folded domains tethered by intrinsically disordered regions (IDRs) are now realized. The eukaryotic proteomes have a higher fraction of IDR than prokaryotic proteomes: eukaryotes are predicted from the genomic sequence to contain IDRs in 52-67% of their proteins while bacteria and archaea have 16-45 and 26-51 % of their proteins, respectively [1]. IDPs/IDRs are often involved in signaling and gene regulatory networks. The advanced regulatory networks in eukaryotes and especially in multicellular eukaryotic organisms may rely on the explicit functions associated with IDPs/IDRs to properly function [2].

NMR，アンサンブル構造解析，タンパク質動的構造
かわさきりょうすけ，いのうえりょうへい，くらうどりー，とちおなおや，だにーすー，
じーろんふぁん，たて　しんいち

Our group has been interested in exploring the unique functions associated with IDPs/IDRs on various target proteins. In this work, we will describe the functional significance of the ensemble structure of a type of hybrid proteins consisting of the folded domains with IDRs connecting them.

Pin1, a Pro isomerase, is one of the well-characterized enzymes [3-5], which engages in a phosphorylation-dependent signal transduction to switch the signaling flow by changing the *cis/trans* conformation of Pro in the phosphorylated Ser or Thr – Pro (pS/pT-P) dipeptide motif. Pin1 consists of two domains linked by 10-residue IDR. Both of the domains recognize pS/pT-P motif with different affinity: the enzyme domain (PPIase domain) has typically ten times lower affinity to the substrate binding domain (WW domain) (Fig. 1). Although the sole PPIase domain retains enzymatic activity at higher than that of the full-length Pin1, cells requite the full-length of Pin1 to survive, which demonstrates the two domains linked by the IDR cooperatively work.

To explore how these domains achieve efficient Pro-isomerase activity in cells, we compared the ensemble structures of Pin1 and its functionally impaired mutants based on the SAXS, RDC and PRE data [6]. The data demonstrated that the structural property of the 10-residue IDR populates specific domain conformation ensembles that optimally function as isomerase, while the mutation disturbs the ensembles reduced the activity. This work proposes that the ensemble-structure and function relationship of Pin1, which has ever been readily grasped without the use of extensive ensemble structure analysis using NMR.

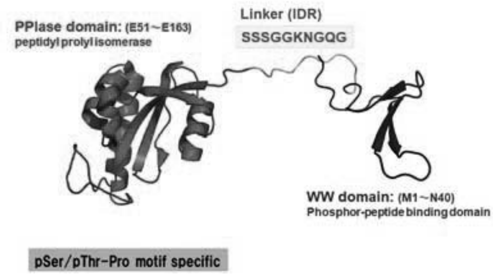


Fig.1: Pin1 comprising two domains with the 10-residue IDR

References

[1] A.K. Dunker, Z. Obradovic, P. Romero, E.C. Garner, C.J. Brown, Intrinsic protein disorder in complete genomes, Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform., 11 (2000) 161-171.

[2] V.N. Uversky, A.K. Dunker, Understanding protein non-folding, Biochim Biophys Acta, 1804 (2010) 1231-1264.

[3] J. Wang, N. Tochio, R. Kawasaki, Y. Tamari, N. Xu, J.-i. Uewaki, N. Utsunomiya-Tate, S.-i. Tate, Allosteric Breakage of the Hydrogen Bond within the Dual-Histidine Motif in the Active Site of Human Pin1 PPIase, Biochemistry, 54 (2015) 5242-5253.

[4] J. Wang, R. Kawasaki, J.-i. Uewaki, A.U.R. Rashid, N. Tochio, S.-i. Tate, Dynamic Allostery Modulates Catalytic Activity by Modifying the Hydrogen Bonding Network in the Catalytic Site of Human Pin1, Molecules, 22, 992 (2017).

[5] N. Xu, N. Tochio, J. Wang, Y. Tamari, J.-i. Uewaki, N. Utsunomiya-Tate, K. Igarashi, T. Shiraki, N. Kobayashi, S.-i. Tate, The C113D Mutation in Human Pin1 Causes Allosteric Structural Changes in the Phosphate Binding Pocket of the PPIase Domain through the Tug of War in the Dual-Histidine Motif, Biochemistry, 53 (2014) 5568-5578.

[6] S.-i. Tate, Protein Structure and Dynamics Determination by Residual Anisotropic Spin Interactions, in: NMR. Soc. Japan (Ed.) Experimental Approaches of NMR Spectroscopy, Springer, Place Published, (2018), pp. 601-636.

L2-3

Mg^{2+}チャネルMgtEのイオン依存的ゲーティングにおける、各Mg^{2+}結合部位の機能的役割

丸山 達朗[1], 今井 駿輔[1], 草木迫 司[2], 服部 素之[3], 石谷 隆一郎[2],
濡木 理[2], 伊藤 耕一[4], Andrés D. Maturana[5], 嶋田 一夫[1], ○大澤 匡範[1,6]
1東京大学・大学院薬学系研究科
2東京大学・大学院理学系研究科
3復旦大学・生命科学部
4東京大学・大学院新領域創成科学研究科
5名古屋大学・大学院生命農学研究科
6慶應義塾大学・薬学部

Functional roles of Mg^{2+} binding sites in ion-dependent gating of a Mg^{2+} channel, MgtE, revealed by solution NMR

Tatsuro Maruyama[1], Shunsuke Imai[1], Tsukasa Kusakizako[2], Motoyuki Hattori[3], Ryuichiro Ishitani[2], Osamu Nureki[2], Koichi Ito[4], Andrés D. Maturana[5], Ichio Shimada[1], ○Masanori Osawa[1,6]
1Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Japan
2Graduate School of Science, The University of Tokyo, Japan
3School of Life Sciences, Fudan University, China
4Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Japan
5Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Japan;
6Faculty of Pharmacy, Keio University

Magnesium ions (Mg^{2+}) are divalent cations essential for various cellular functions. Mg^{2+} homeostasis is maintained through Mg^{2+} channels such as MgtE, a prokaryotic Mg^{2+} channel whose gating is regulated by intracellular Mg^{2+} levels. Our previous crystal structure of MgtE in the Mg^{2+}-bound, closed state revealed the existence of seven crystallographically-independent Mg^{2+}-binding sites, Mg1–Mg7. The role of Mg^{2+}-binding to each site in channel closure remains unknown. Here, we investigated Mg^{2+}-dependent changes in the structure and dynamics of MgtE using nuclear magnetic resonance spectroscopy. Mg^{2+}-titration experiments, using wild-type and mutant forms of MgtE, revealed that the Mg^{2+} binding sites Mg1, Mg2, Mg3, and Mg6, exhibited cooperativity and a higher affinity for Mg^{2+}, enabling the remaining Mg^{2+} binding sites, Mg4, Mg5, and Mg7, to play important roles in channel closure. This study revealed the role of each Mg^{2+}-binding site in MgtE gating, underlying the mechanism of cellular Mg^{2+} homeostasis.

Introduction

Mg^{2+} are the most abundant divalent metal ions within cells. They bind to a number of proteins and nucleic acids, regulating a wide range of biological processes such as ATP utilization, enzyme activation, and maintenance of genomic stability[1,2]. Cellular Mg^{2+} homeostasis is maintained by a class of transmembrane proteins termed Mg^{2+} transporters. The MgtE family of Mg^{2+} transporters in bacteria, which operates as Mg^{2+}

Magnesium ion channel, ion-dependent gating, methyl TROSY
まるやま たつろう, いまい しゅんすけ, くさきざこ つかさ, はっとり もとゆき, いしたに りゅういちろう, ぬれき おさむ, いとう こういち, まつらな あんどれす D., しまだ いちお, ○おおさわ まさのり

channels[3], is homologous to the eukaryotic SLC41 family. Our prior electrophysiological study of MgtE from *Thermus thermophilus* revealed that MgtE facilitates Mg^{2+} uptake across the cell membrane at intracellular Mg^{2+} concentrations lower than 5–10 mM, whereas at higher Mg^{2+} concentrations, MgtE does not allow further Mg^{2+} uptake[3].

We have reported the crystal structure of full-length MgtE in the Mg^{2+}-bound, closed state, which revealed that it forms a homodimer comprised of an N-terminal cytoplasmic (CP) region (residues 1–263) and a C-terminal transmembrane (TM) region (residues 264–450) (Fig. 1A)[3]. The CP region consists of three parts, an N domain (residues 1–131), a cystathionine-β-synthase (CBS) domain (residues 132–245), and a plug helix (residues 246–263); the plug helix connects the latter with the TM region.

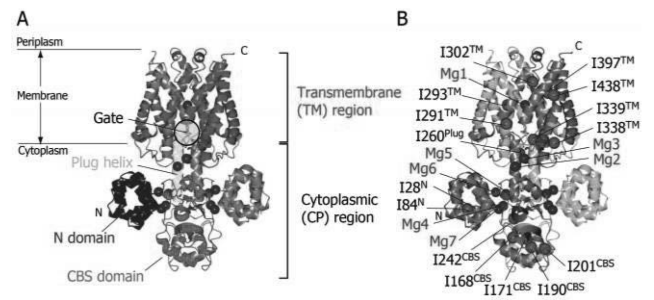


Fig. 1. Structure of MgtE in the Mg^{2+}-bound, closed state. (A) The MgtE dimer (PDB:2ZY9), highlighted in one subunit. Mg^{2+} are shown as spheres. (B) Ile Cδ1 atoms in one subunit are shown as spheres.

In the crystal structure, seven crystallographically independent Mg^{2+}-binding sites (Mg1–Mg7) can be identified (Fig. 1B). Electrophysiological investigation of MgtE Mg^{2+}-binding site mutants indicated that every Mg^{2+}-binding site in the CP region (Mg2–Mg7) contributes to the formation of the MgtE closed state[3]. However, the concentration of Mg^{2+} required to saturate each Mg^{2+}-binding site remains unknown, as does the site(s) to which Mg^{2+}-binding causes the changes in the structure and dynamics of each portion of MgtE, resulting in the closed MgtE state.

In the present study, we used solution NMR spectroscopy to investigate Mg^{2+}-dependent changes in the structure and dynamics of full-length MgtE. Mg^{2+}-titration experiments using the wild-type and mutant forms of MgtE revealed the functional roles of each Mg^{2+}-binding site. This study thus revealed the Mg^{2+}-dependent gating mechanism of MgtE that underlies cellular Mg^{2+} homeostasis.

Results and Discussion

Mg^{2+}-concentration dependence of the NMR spectral changes

We observed a series of methyl-TROSY spectra of Ile δ1 methyl groups in {u-^{2}H, Ileδ1-[$^{13}CH_3$]}MgtE solubilized in *n*-dodecyl-β-maltoside micelles at the Mg^{2+} concentrations ranging from 0 to 5.0 mM. At 0 mM Mg^{2+}, three markedly strong signals (I28^N, I84^N, and I260^{Plug}) were observed, together with nine weak and/or broad signals (I168^{CBS}, I171^{CBS}, I190^{CBS}, I201^{CBS}, I293^{TM}, I338^{TM}, I339^{TM}, I397^{TM}, and I438^{TM}). However, signals for I242^{CBS}, I291^{TM}, and I302^{TM} were not observed.

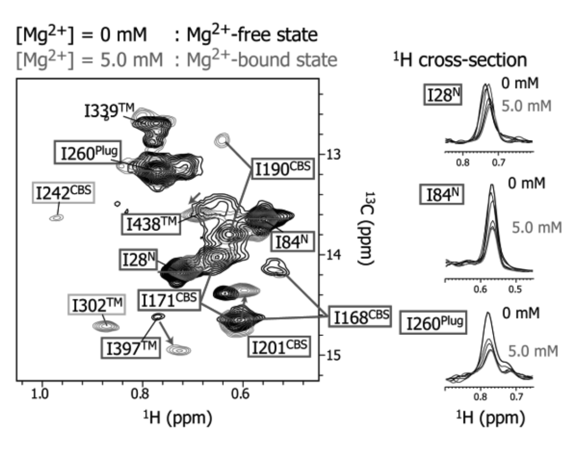


Fig. 2 An overlay of methyl-TROSY spectrum of MgtE in the Mg^{2+}-bound state on that in the Mg^{2+}-free state

As the Mg^{2+} concentration increased, different types of changes were observed. The three strong signals (I28^N, I84^N, and I260^{Plug}) exhibited decreased intensities (Fig. 2, right panel), whereas three new signals appeared for the three residues (I242^{CBS}, I291^{TM}, and I302^{TM}) previously unobserved at 0 mM Mg^{2+}(Fig. 2). In addition, among the nine weak and/or broad signals, six signals exhibited chemical shift changes: I397^{TM} and I438^{TM} in a fast-to-intermediate exchange regime, and I201^{CBS}, I293^{TM}, and I338^{TM} in a slow exchange regime (Fig. 2, arrow). The other three (I168^{CBS}, I171^{CBS}, I190^{CBS}) of the nine weak and/or broad signals became split in the Mg^{2+}-bound state (Fig. 2). Only the signal for I339^{TM} exhibited no significant change. The NMR spectral changes apparently saturated at 4.0 mM Mg^{2+}, above which the NMR spectra were essentially identical. It has been reported that at 4 mM Mg^{2+}, or above, the MgtE channel closes[3], suggesting that the NMR spectra at Mg^{2+} concentrations lower, or higher, than 4 mM reflect the open or closed states of MgtE, respectively.

Mg^{2+}-dependent changes in chemical shift and signal intensity of the Ile residues were well-fitted with a Hill equation, resulting in Mg^{2+} concentration reaching the half maximal values of the changes ($[Mg^{2+}]_{1/2}$) of 0.8–2.5 mM, with Hill coefficient values of 1.8–7.6. This result indicates that Mg^{2+} binding to multiple sites cooperatively affects the conformation and dynamics of the Ile residues at different locations in the MgtE molecule. Fig. 3 shows an overlay of the Hill plots that normalize the change from the Mg^{2+}-free state to the Mg^{2+}-bound state. The functionally more important Mg^{2+} concentrations are those at which the NMR spectral changes saturate (hereafter, referred to as $[Mg^{2+}]_{sat}$), above which each Ile residue adopts the closed MgtE conformation. The normalized plots in Fig. 3 indicate that the apparent $[Mg^{2+}]_{sat}$ values are 3 mM for the Ile residues in the plug helix and the TM region, and 4 mM for those in the N and CBS domains.

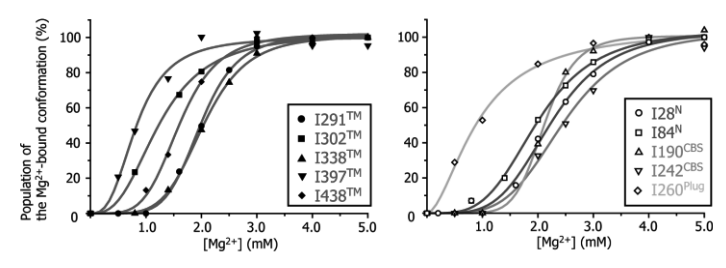


Fig. 3. Superposition of the changes in the population of the Mg^{2+}-bound conformation of the Ile δ1 methyl signals, versus the Mg^{2+} level.

Role of each Mg^{2+} binding site in the Mg^{2+}-induced conformational change in MgtE

In order to uncover the role of Mg^{2+} binding to each site in the structural changes related to channel closure, we prepared seven mutants in which, based on the MgtE crystal structure, each of the sites (Mg1 to Mg7) was disabled by mutation of its Mg^{2+}-coordinated acidic residue(s), and investigated the effect of the mutations on the Mg^{2+}-dependent NMR spectral changes.

Mg^{2+}-titration experiments for the wild-type and mutant forms of MgtE indicated that all the Ile residues in the TM region (Ile^{TM}) were affected by Mg^{2+} binding to the Mg1, Mg2, Mg3, and Mg6 sites, whereas mutation of the Mg4-, Mg5-, or Mg7-binding sites did not affect the Mg^{2+}-induced changes in the structure and dynamics of the TM region (Fig. 4). Considering saturation of the changes for Ile^{TM} at 3 mM Mg^{2+} (Fig. 3), Mg^{2+} binding to the Mg1, Mg2, Mg3, and Mg6 sites is suggested to saturate at 3 mM, which completes the Mg^{2+}-dependent conformational changes in the TM region. Moreover, since mutation at the Mg1-, Mg2-, Mg3-, or Mg6-binding sites affected Mg^{2+}-dependent changes in Ile residues in the CP region, Mg^{2+} binding to these sites is also required for the structural/dynamic changes in the

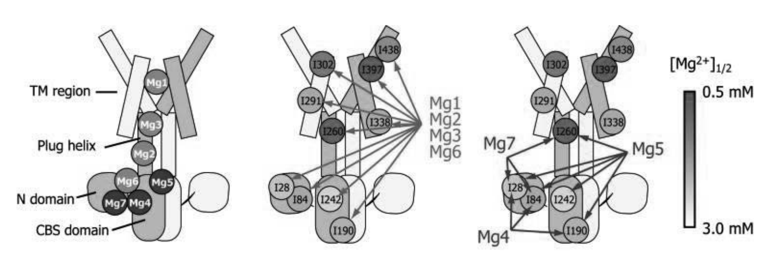


Fig. 4. Schematic summary of the effects of mutations at each Mg^{2+}-binding site on Mg^{2+}-dependent changes in the conformation and dynamics. Ile residues are coloured by $[Mg^{2+}]_{1/2}$ values in the wild-type.

CP region as well as in the TM region.

Conversely, Mg^{2+} binding to the remainder of the sites, Mg4, Mg5, and Mg7, regulates Ile residues only in the CP region consisting of the N and CBS domains as well as the plug helix, with no effect on the TM region. Specifically, binding at Mg4 affects Ile residues in the N and CBS domains, binding at Mg5 affects Ile residues in the N and CBS domains, as well as the plug helix, and binding at Mg7 affects Ile residues in the N domain and the plug helix (Fig. 4). Mg^{2+}-dependent changes in the Ile residues in the CP region saturate at 4 mM, strongly suggesting that Mg^{2+} binding to the Mg4, Mg5, and Mg7 sites saturates at 4 mM. This changes the conformation of the CP region including the N and CBS domains, resulting in the formation of the Mg^{2+}-bound closed state, as observed in the crystal structure[3].

Physiological relevance of MgtE gating

Fig. 5 schematically summarizes a model of the Mg^{2+}-dependent gating of MgtE. The present study revealed that gating of MgtE occurs at Mg^{2+} concentrations of 4 mM. Below this threshold, MgtE adopts an open state, and allows the transport of extracellular Mg^{2+} into cells; thus, the intracellular Mg^{2+} level is maintained higher than the threshold. Consequently, under physiological conditions, MgtE is not in the Mg^{2+}-free state. The roles of the cooperative Mg^{2+} binding to the Mg1-, Mg2-, Mg3-, and Mg6-binding sites are likely to include the formation of an ion-conducting pore in the TM region mainly by the Mg1-binding site, and adjustment of the Mg^{2+}-binding affinities of the Mg4, Mg5, and Mg7 sites, enabling the CP region to act as an Mg^{2+} sensor for gating in response to increases in intracellular Mg^{2+} levels above 4 mM.

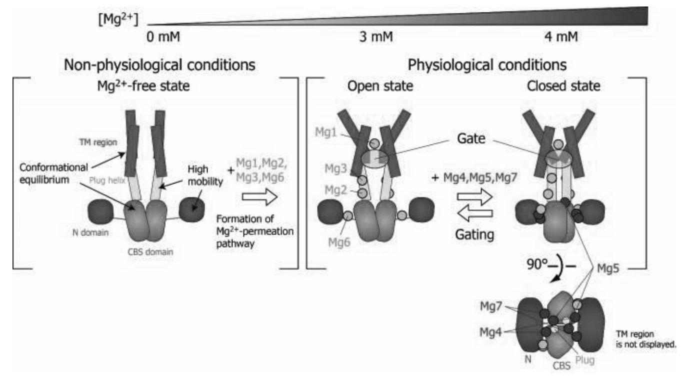


Fig. 5 Roles for each Mg^{2+} binding site in the gating of MgtE

Conclusion

NMR analysis in combination with a high resolution crystal structure has provided site-specific information on changes in the protein conformation and dynamics of MgtE in relation to its function. By translating this information to SLC41 family members, human orthologues of the prokaryotic MgtE protein, it may be possible to identify a binding site for a novel ligand, which could be used to develop a novel treatment for diseases caused by abnormal Mg^{2+} levels, including cardiovascular disease, diabetes, and high blood pressure.

References

1. Hartwig A. 2001. Role of magnesium in genomic stability. *Mutation Research* **475**:113–121.
2. Cowan JA. 2002. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biometals* **15**:225–235.
3. Hattori M, Iwase N, Furuya N, Tanaka Y, Tsukazaki T, Ishitani R, Maguire ME, Ito K, Maturana A, Nureki O. 2009. Mg^{2+}-dependent gating of bacterial MgtE channel underlies Mg^{2+} homeostasis. *The EMBO Journal* **28**:3602–3612.
4. Maruyama T, Imai S, Kusakizako T, Hattori M, Ishitani R, Nureki O, Ito K, Maturana A,D, Shimada, I, Osawa M. 2018. Functional roles of Mg^{2+} binding sites in ion-dependent gating of a Mg^{2+} channel, MgtE, revealed by solution NMR. *eLIFE*, **7**, e31596

L2-4

Conformational variation in membrane-associated H-Ras elucidated by in-cell ^{19}F-NMR spectroscopy

○Hiromasa Yagi, Masaomi Ikari, and Takanori Kigawa
RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

In-cell NMR spectroscopy has been proven to be a powerful tool that can obtain structural information of proteins at the atomic-scale in living cell. The utility of this method in eukaryotic cells, however, has still been limited only for the small cytoplasmic proteins. Here, we present the utility of in-cell NMR for monitoring cyclical biochemical reaction states and conformational changes in a membrane-associated protein. We site-specifically labelled H-Ras with ^{19}F nucleus by incorporation of *p*-trifluoromethoxyphenylalanine at the position of Tyr32 and delivered it into HeLa cells. The in-cell ^{19}F signals of the delivered H-Ras enabled the identification of distinct GTP-bound active and GDP-bound inactive forms of H-Ras in endoplasmic compartments or plasma membranes. In-cell NMR can thus be used to observe fine-scale conformational changes in membrane-associated proteins, presaging the use of this technique in integrated structural and functional studies.

Ras is one of the small GTPase family members and functions as a molecular switch to control the intracellular signaling mainly on the plasma membranes or endoplasmic compartments. Activation via nucleotide exchange from GDP to GTP induces the change of Ras conformation, allowing the interaction with series of effector molecules to release downstream signaling. However, it is still unclear how Ras recognize a proper effector among diverse candidates at an appropriate circumstance within the cellular activity. To understand the detail structure of Ras associated with membranes is therefore particularly important how Ras regulates downstream signaling through its effectors. Herein, we demonstrate that the site-specific ^{19}F-labelling enables the detection of in-cell NMR signals of H-Ras, associating with membrane compartments.

In-cell NMR spectroscopy is a technology that can obtain atomic-scale structural information of proteins in living cells, allowing characterization of the target molecules in their physiological environment. Sensitivity of in-cell NMR, however, is usually worse compared to that of *in vitro* spectra due to heterogeneous molecular crowding environment within the cells. The sensitivity of membrane-associated proteins would be even worse because of strongly restricted rotational motion of the molecules. Therefore, we adopted a site-specific incorporation of *p*-trifluoromethoxyphenylalanine (OCF_3Phe) (Figure 1A) into H-Ras and measured ^{19}F-NMR signals of H-Ras in HeLa cells. A ^{19}F-labelling of proteins is very attractive for in-cell NMR experiments as fluorine is the second most sensitive stable NMR-active nucleus and the 100% naturally abundant isotope that can readily be observed in simple 1D spectrum without any concerning natural backgrounds of fluorine in most biological samples. In addition, ^{19}F-NMR resonance of a trifluoromethyl group of the OCF_3Phe is intrinsically narrow because of short effective rotational correlation times arising from fast trifluoromethyl group rotation.

In-cell NMR, site-specific ^{19}F-labelling, H-Ras

We successfully obtained site-specific ^{19}F-labelled H-Ras by incorporation of OCF_3Phe at the position of Tyr32 (^{19}F-Y32 H-Ras) located on the switch I region, which is one of the solvent exposed nucleotide binding loop (Fgure 1B). The *in vitro* ^{19}F NMR signals of ^{19}F-Y32 H-Ras clearly distinguished GDP-bound inactive and GMPPNP-bound active forms (Figue 1C) and only the signal of GMPPNP-bound active form was perturbed with adding effector molecules (Figue 1C).

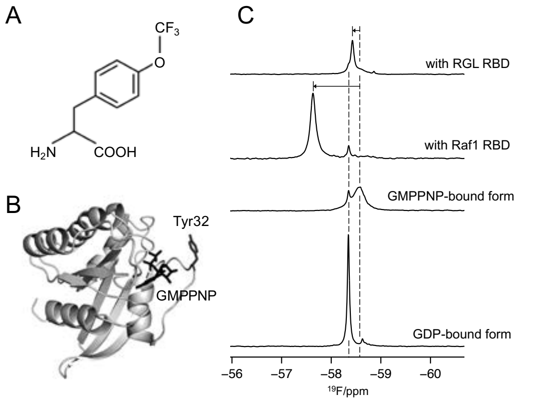


Figure 1. Site-specific ^{19}F-labelling of H-Ras.
(A) Structure of *p*-trifluoromethoxyphenylalanine (OCF_3Phe). (B) Structure of H-Ras GMPPNP-bound form (PDB ID = 5p21) with the position of Tyr32. (C) *In vitro* 1D ^{19}F-NMR signals of ^{19}F-Y32 H-Ras.

The protein delivery into HeLa cells was achieved by electroporation. By 22 after electroporation, significant localization of the delivered H-Ras at the plasma membrane (PM) and the endoplasmic compartments (ER or Golgi) was confirmed with fluorescent labelled samples (Figure 2). In contrast, the delivering H-Ras C181S/C184S double mutant, which is palmitoyl-deficient mutant, exhibited the localization at the endoplasmic compartments but no PM localization (Figure 2). These results show that the delivered H-Ras undergoes the sequential modifications at its C-terminal region by cellular machineries and behaves the same manner with the endogenous H-Ras.

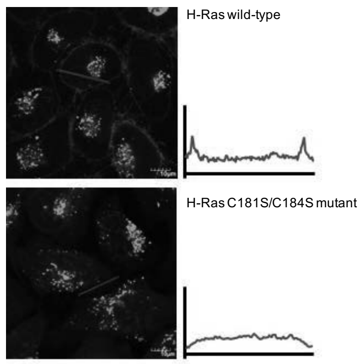


Figure 2. The fluorescent images of HeLa cells at 22 h after protein delivery by electroporation. A fluorescence intensity line scan profiles were generated along the gray lines and shown is in the right column.

The delivered ^{19}F-Y32 H-Ras bound with GDP into HeLa cells displayed an in-cell ^{19}F-NMR signal at the chemical shift corresponding to the GDP-bound inactive form *in vitro* (Figure 3). On top of this, the spectrum contained an extremely broader component. This broader component could reflect an active form of H-Ras, as the ^{19}F-Y32 H-Ras bound with GMPPNP exhibits an intrinsically broader signal *in vitro*. The delivered ^{19}F-Y32 H-Ras therefore was considered to be activated via nucleotide exchange from GDP to GTP by endogenous guanine nucleotide exchange factors (GEFs) that is mainly catalyzed on the PM and could also be at the endoplasmic compartments. As the delivered H-Ras is localized at the PM and the endoplasmic compartments, the observed peak should arise from the H-Ras associating with either the PM or the endoplasmic compartments, and thus in-cell NMR could monitor significant cellular events in living cells. In contrast, delivering the ^{19}F-Y32 H-Ras bound with GMPPNP only showed a broader component (Figure 3), indicating that the bound GMPPNP was trapped and was unable to be hydrolyzed within the cells. As a consequence, ^{19}F signal was always observed as the active form.

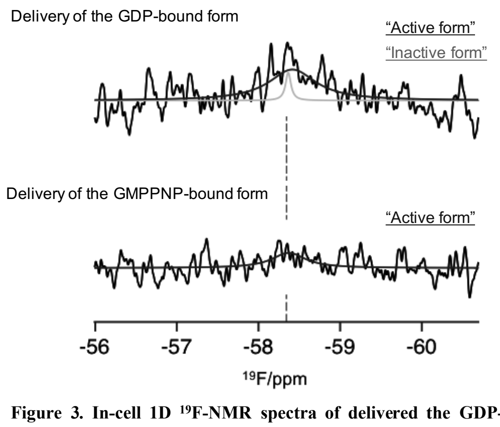


Figure 3. In-cell 1D ^{19}F-NMR spectra of delivered the GDP- and GMPPNP-bound ^{19}F-Y32 H-Ras into HeLa cell 22h after electroporation. Black and gray lines represent deconvolved components with active and inactive forms, respectively. Dash line is corresponding to the chemical shift of GDP-bound form of ^{19}F-Y32 H-Ras *in vitro*.

In this study, we will also discuss the in-cell NMR results of delivering several mutants of ^{19}F-Y32 H-Ras into HeLa cells and their behaviors within the cells.

L2-5 E22G Pathogenic Mutation of β-amyloid (Aβ) Enhances Misfolding of Aβ40 by Unexpected Prion-like Cross Talk between Aβ42 and Aβ40

○ Yoshitaka Ishii [1,2], Yiling Xiao,[2] Brian Yoo,[2] Isamu Matsuda,[1] and Dan McElheny [2]

1 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
2 Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago

Cross-seeding of misfolded amyloids is believed to induce cross-species infection of prion diseases. Despite increasing evidence that misfolded Aβ mimics prions, interactions of misfolded 42-residue Aβ42 with more abundant Aβ40 in AD are elusive. Through ^{13}C SSNMR and other experiments, this study demonstrates that an E22G pathogenic ("Arctic") mutation of Aβ40 can enhance misfolding of Aβ via cross-seeding from WT Aβ42 fibril, suggesting unexpected cross talk of Aβ isoforms that potentially promotes early onset of AD. Other data on cross seeding of WT Aβ40 and Aβ42 will be presented.

This work involves two separate topics on structures, kinetics, and functions of amyloid-β using solid-state NMR (SSNMR). Misfolded fibrillar aggregates of Aβ are a primary component of senile plaque, a hallmark of Alzheimer's disease (AD). Increasing evidence suggests that formation and propagation of misfolded aggregates of 42-residue Aβ42, rather than the more abundant 40-residue Aβ40, provokes the Alzheimer's cascade. Our group recently presented the first detailed atomic model of Aβ42 amyloid fibril based on SSNMR data.[1] The result revealed a unique structure that was not previously identified for Aβ40 fibril. Based on the results and additional SSNMR data, we first discuss how amyloid fibril structures affect "prion-like" propagation across different Aβ isoforms, including WT Aβ40 and E22G pathogenic mutant of Aβ40.[2] The results indicate drastic effects of minor sequence differences in the cross-propagation properties for the Aβ isoforms.

Secondly, we present our ongoing efforts to analyze a structural conversion from amyloid oligomer to fibril for Aβ42. Oligomeric amyloids of Aβ42 are believed to play important roles in AD. In this study, we isolated metastable oligomers of Aβ42 termed "SPA". ^{13}C chemical-shift comparison and immunological analysis using a conformation specific antibody suggest that SPA has a similar conformation with amylospherioid (ASPD), toxic spherical assembly of Aβ that was identified from brains affected by AD.[3] The results provide insight into amyloid misfolding of Aβ42 in Alzheimer's disease.

References:

[1] Nat. Struct. Mol. Biol. 22, 499-505 (2015)
[2] J. Am. Chem. Soc. 140: 2781–2784 (2018).
[3] J. Am. Chem. Soc. 137, 6480–6483 (2015)

Cross seeding、Alzheimer’ s beta、Solid-state NMR

L2-6

Super-fast collection of ^{1}H-detected SSNMR data under ultra-fast MAS for proteins in nano-mole scale

Ayesha Wickramasinghe [1,2], Yoshitaka Ishii[1,2]

[1] *Department of Life Science, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta 4259, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8503*

[2] *NMR Science and Development Division, RIKEN Yokohama Campus, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045*

Solid-state NMR (SSNMR) spectroscopy with magic angle spinning (MAS) is a powerful analytical technique in structural biology as it can provide atomic-level structure and dynamic information particularly for insoluble biological systems which are not amenable to X-ray crystallography or solution NMR spectroscopy. Almost all the structural calculations in SSNMR are initiated with site-specific chemical shift assignments. These resonance assignments require acquisition of set of multidimensional SSNMR experiments (typically 3D and 4D) to establish sequential signal assignment of the polypeptide chain. In order to obtain reliable resonance assignments, multidimensional spectra with sufficient sensitivity and resolution are crucial. Both requirements need the acquisition of experiments with long experimental times. Nevertheless, such long experimental times are generally impractical due to the limitations in precious instrument time of SSNMR spectrometers. However, the recent advancements in SSNMR has enabled the acquisition of ^{1}H-detected SSNMR spectra with sufficient sensitivity and resolution under ultra-fast MAS (UFMAS) within reasonable experimental times by incorporating the paramagnetic assisted condensed data collection (PACC) with paramagnetic doping[1] into the biological systems of interest. Additional reductions in experimental times are attainable using non-uniform sampling (NUS) protocols[2]. NUS data collection is a technique that allows one to reduce the experimental time in multidimensional SSNMR experiments by sparse sampling of data points in indirect dimensions. We demonstrate super-fast collection of multidimensional SSNMR data in several seconds by a combination of ^{1}H-detection with

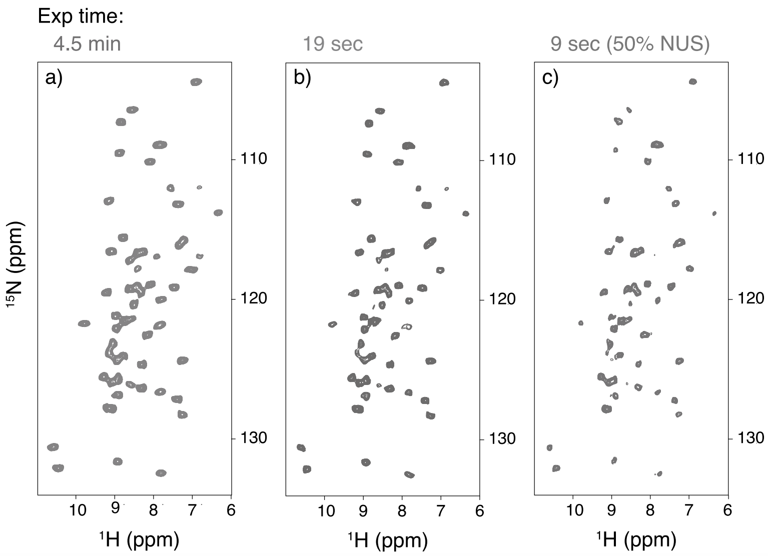


Figure 1. Comparison of (a) a traditional ^{1}H-detected 2D ^{15}N/^{1}H correlation spectrum (16 scans for each t_1 point) with (b,c) super-fast 2D spectra (2 scans for each t_1 point) collected at 100 kHz MAS (b) without NUS and (c) with NUS at 50% random sampling rate for uniformly ^{13}C- and ^{15}N- labeled GB1 microcrystals (180 μg) with 20 mM Cu-EDTA. Recycle delay was set to 0.2 s for (a) and 0.1 s for (b,c).

SSNMR, Ultra-fast MAS, Protein NMR

UFMAS, PACC, and NUS method using only 180 μg of uniformly ^{13}C- and ^{15}N- labeled GB1 microcrystals doped with 20 mM Cu-EDTA (Figure 1)[3].

We further discuss our recent progress in sequential signal assignment and structural elucidation of 42 residue amyloid-β (Aβ(1-42)) fibrils and E22G pathogenic mutation of 40 residue amyloid-β (Aβ(1-40) E22G) fibrils by ^1H-detected SSNMR using UFMAS.

References

1. Wickramasinghe, N., Parthasarathy, S., Jones, C., Bhardwaj, C., Long, F., Kotecha, M., Mehboob, S., Fung, L., Past, J., Samoson, A., Ishii, Y. Nanomole-scale protein solid-state NMR by breaking intrinsic ^1H T_1 boundaries, *Nature Methods* (2009) 6, 215-218
2. Sun, S., Yan, S., Guo, C., Li, M., Hoch, J., Williams, J., Polenova, T. A Time-Saving Strategy for MAS NMR Spectroscopy by Combining Nonuniform Sampling and Paramagnetic Relaxation Assisted Condensed Data Collection, *Journal of Physical Chemistry B* (2012) 116, 13585-13596
3. Ishii, Y., Wickramasinghe, A., Matsuda, I., Endo, Y., Ishii, Y., Nishiyama, Y., Nemoto, T., Kamihara, T. Progress in proton-detected solid-state NMR (SSNMR): Super-fast 2D SSNMR collection for nano-mole-scale proteins, *Journal of Magnetic Resonances* (2018) 286, 99-109

L2-7 高磁場・極低温DNPを用いるメゾスコピックスケールの分子ドメイン選択的観測法

○松木　陽[1]，出原敏孝[2]，遠藤由宇生[3]，根本貴宏[3]，福居滋夫[4]，Jagadishwar Sirigiri[5]，末松浩人[3]，藤原敏道[1]
[1]大阪大学・蛋白質研究所,
[2]福井大学・遠赤外領域開発研究センター
[3](株)JEOL RESONANCE
[4](株)クライオバック
[5]Bridge12 Technologies Inc, MA, USA

DNP at 16.4 T and 30 K for Mesoscopic Molecular Domain Selection

○Yoh Matsuki[1], Toshitaka Idehara[2], Yuki Endo[3], Takahiro Nemoto[3], Shigeo Fukui[4], Jagadishwar Sirigiri[5], Hiroto Suematsu[3], and Toshimichi Fujiwara[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University, Japan*
[2]*Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui, Japan*
[3]*JEOL RESONANCE Inc., Japan*
[4]*Cryovac Corp., Japan*
[5]*Bridge12 Technologies Inc., MA, USA*

Sensitivity enhancement of MAS NMR by dynamic nuclear polarization (DNP) suffers from its decreasing efficiency at high field conditions (B_0 > 10 T). To overcome this issue, we have been developing a helium-temperature MAS DNP probe system, an advanced submillimeter wave irradiation (dual-gyrotron) system and novel polarizing agents as well as glass matrices. Last year, we have reported the total sensitivity gain $\varepsilon^{\mathrm{T}}(=\varepsilon^{\mathrm{DNP}}*\varepsilon^{\mathrm{Curie}})$ exceeding 1000 at T = 35 K, establishing a way for highly efficient high-field MAS DNP NMR. Based on this ability, in this presentation, we will propose two novel DNP NMR methods for selective observation of mesoscopic (10-100 nm) molecular segment around a polarizing agent. The method is based on the use of 2nd order spin-correlated term or the 'polarization wave' generated using the dual gyrotron system. These mesoscopic spatial editing techniques should be useful to study geometry of large protein aggregates/assemblies having a localized polarizing agent.

固体NMR法の感度は電子スピン分極を核スピンに移して利用する動的核分極(DNP)法で劇的に向上できる可能性があるが、その効率は外部磁場強度の上昇とともにしばしば大きく悪化する。これは高価な高磁場DNP装置の費用対効果比を下げるし、蛋白質の様な多信号系の解析では高磁場-高分解能条件が命だからこれは大問題である。

この問題の克服に向けて我々は、極低温MAS DNPプローブの開発[1]、2台の周波数可変ジャイロトロンを同時に用いるサブミリ波照射システムの開発[2]、新規分極剤や有機マトリクスの開発を含む、多角的なアプローチで取り組んできた。この結果、DNPによる信号増強($\varepsilon^{\mathrm{DNP}}$)と試料冷却

Dynamic Nuclear Polarization (DNP), Magic-Angle Spinning NMR, Sensitivity Enhancement, High-Field Condition

○まつきよう、いではらとしたか、えんどうゆうき、ねもとたかひろ、ふくいしげお、じゃがでぃしゅわーしりじり、すえまつひろと、ふじわらとしみち

によるキュリー磁化の増大率(ε^{Curie})をあわせた総合感度利得ε^{T} (= $\varepsilon^{DNP}\times\varepsilon^{Curie}$)は昨年、外部磁場$B_0$=16.4 T(^{1}H周波数で700MHz)の条件で1000倍に達した。

我々は、こうして得られた高磁場下の高スピン分極、あるいは2台のジャイロトロンを用いて作る「分極波」を使い、分極剤分子の周囲数10nmオーダーの分子ドメインを選択的に観測する新手法を2つ開発中で(Fig. 1a,b)、本発表では主にこれらについて議論する。

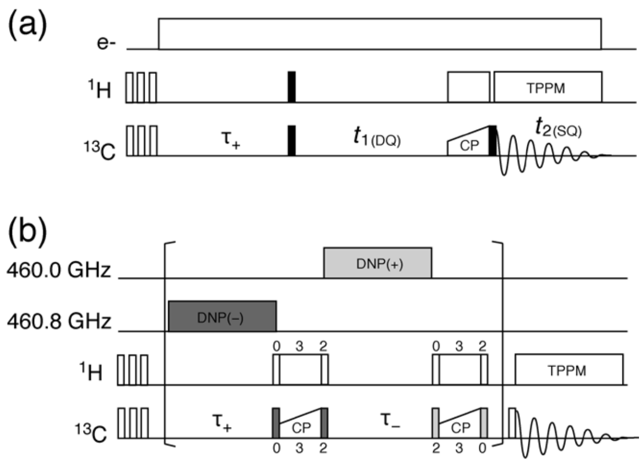


Fig. 1 Novel DNP-NMR methods for mesoscopic molecular domain selection based on (a) the 2nd order spin-correlated term converted to the double-quantum coherence, and (b) on the 'polarization wave' generated by the alternating excitation of positive/negative DNP using our dual gyrotron system.

A. <u>高次のスピン相関項を利用する方法</u>

DNPによって強い外部磁場(16.4 T)のもとにおよそ5%を超える高いゼーマン分極を得ると、定常状態の密度行列においても高次の項が無視できないくらいに大きくなる。つまり最低次数の線形項($\propto I_z$ or $\propto S_z$)だけを取り扱う通常の高温近似が崩れる。我々はまずDNPによる高スピン分極下、二次のスピン相関項($\propto I_z S_z$)を直接観測するシンプルな測定を行って近似の破綻を実証した。次に線形項とスピン相関項信号の強度比からプロトンのスピン分極率を直接計算、この結果からスピン相関項は分極剤分子周辺数十nmの領域に優先的に成長している可能性を見出した。この空間選択的に育つスピン相関項は90度パルスによって^{1}H-^{13}C異種核二量子コヒーレンスに変換できるから、これによればラジカル分子の位置で規定されるメゾスコピックな分子ドメインに対して^{1}H-^{13}C 2D DQ-SQスペクトル(Fig. 1a)を空間選択的に取得できると考えられる。

B. <u>サブミリ波周波数ジャンプを利用する方法</u>

ニトロキシラジカルを用いるクロス効果-DNPでは、電子の共鳴周波数を挟んで両側に、核のゼーマン周波数(~700 MHz)だけ離れたそれぞれ正と負のDNPマッチング条件がある。分極の立ち上げ中、2台のジャイロトロンでそれぞれを交互に励起すると、ラジカル分子周辺に正負の分極が交互に生成され波打った、「分極波」のような状態が作れるが、スピン分極の移動は弾道的というよりは拡散的な振る舞いを見せるから、ラジカル分子から離れた位置ではこの正負の分極波が互いに打ち消し合いゼロに向かう。一方、ラジカル近傍では常に正負の分極がサブミリ波周波数の切り替えに合わせて交互に生まれており、これをラジオ波パルスの位相反転を同期して追いかけると(Fig. 1b)、ラジカル分子近傍の数10nmの領域にだけ高スピン分極を蓄積できると考えられる。

発表ではこれらの新手法について、原理の検証実験と最新の応用法を議論する。

[文献]

[1] Y. Matsuki et al., *J. Magn. Reson.* **2015**, 259, 76-86. [Open Access]

[2] Y. Matsuki et al., *J. Magn. Reson.* **2016**, 264, 107-111.

[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・プラットフォーム形成事業による援助を受けて行われた。

L2-8

Understanding Hydrogen bonding structure by electron and NMR nano-crystallography

Maria Candelaria Guzman Afonso[1]†, You-lee Hong[1]†, Henri Colaux[1], Hirofumi IIjima[2], Akihiro Saitow[2], Takuma Fukumura[2], Yoshitaka Aoyama[2], Souhei Motoki[2], Tetsuo Oikawa[3], Toshio Yamazaki[4], Daisuke Hashizume[5], Koji Yonekura[6]*, ○Yusuke Nishiyama[1,7]*

1 RIKEN-JEOL Collaboration Center, Kanagawa, Japan,
2 JEOL Ltd., Tokyo, Japan,
3 JEOL ASIA Pte. Ltd, Singapore,
4 RIKEN SPring-8 Center, Kanagawa, Japan,
5 RIKEN Center for Emergent Matter Science (CEMS), Saitama, Japan,
6 RIKEN SPring-8 Center, Hyogo, Japan,
7 JEOL RESONANCE Inc., Tokyo, Japan

Here, we will present a combined approach of electron diffraction (ED) and solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) to solve the structure from nano- to micro-crystalline samples, namely electron and NMR nano-crystallography. Although single crystal X-ray diffraction (SCXRD) is widely used to solve the crystalline structure, the limited scattering power of X-ray requires single crystals larger than 10 μm. When the crystalline size is limited to less than 10μm, powder XRD can be used with a milligram scale of pure powder samples. However, there are multiple samples where only nano- to microcrystalline samples are available with some contaminations, e.g. pharmaceutical tablets, MOF, etc. ED potentially provides the solution for such a case. Since the electron interacts to material 10^4 to 10^5 times stronger than X-ray, ED gives diffraction patterns even from nano-sized single crystals. The 3D structures can be solved using diffraction tomography, rotation electron diffraction, and continuous rotation methods, which give 3D reciprocal space. While ED has been used for structural solution for a long time, its application is mostly limited to inorganic samples with high critical electron dose. The recent development of high-sensitivity camera paves a way to structural solution of beam-sensitive organic crystals with very low dose [1]. However, the discrimination of carbon, nitrogen and oxygen atoms and precise determination of hydrogen position is still challenging. To solve this difficulty in ED, solid-state NMR can provide complemental information to reconstruct the structure including hydrogen positions, since NMR can directly detect ^{13}C, ^{14}N, ^{15}N, and ^{1}H [2].

As a proof of concept, first we solve the structure of monoclinic L-histidine whose structure is already solved using SCXRD. The sample is kept around 100 K to reduce the beam damage and high-sensitivity camera (Ultrascan, Gatan) is used. A set of ED patterns is observed under continuous rotation. To cover the missing cone, five data sets are merged. The 3D structure is successfully solved using standard SCXRD software. However, carbon, nitrogen and oxygen atoms are miss-assigned, and most hydrogen atoms are

NMR Crystallography, Electron crystallography, solid-state NMR

マリア　カンデラリア　グズマン　アフォンソ、ユーリー　ホン、アンリ　コロ、いいじま　ひろふみ、さいとう　あきひろ、ふくむら　たくま、あおやま　よしたか、もとき　そうへい、おいかわ　てつお、やまざき　としお、はしずめ　だいすけ、よねくら　こうじ、○にしやま　ゆうすけ

invisible. To complete the structural analysis, NMR crystallography is performed. First, $^{1}H/^{14}N$ 2D correlation solid-state NMR spectrum gives two NH pairs with one peak at a lower ^{14}N frequency. This clearly shows that monoclinic L-histidine is Zwitterion and one of nitrogen on the imidazole ring is protonated [3]. Given the information, four possible structures are obtained. The structures are further optimized by the quantum computation with the gauge including projected augmented wave (GIPAW) method. The chemical shifts of ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N are also calculated. One structure is exclusively chosen from the comparison of calculated and experimental chemical shifts, and matches well with the known structure. The electron and NMR nano-crystallography is also applied to cimetidine form B whose structure is unknown to our best knowledge. Because of instability of this polymorph, the contamination of form C is always found, hampering the structural determination using powder XRD. On the other hand, the ED pattern from a single crystal is easily found in the TEM image and the initial structure can be solved by ED reconstruction. Four candidates are obtained because of ambiguity of hydrogen positions. NMR crystallography clearly ruled out three of them and solves the final structure. The position of hydrogen is further verified by ^{1}H-^{15}N distance measurements with good agreement.

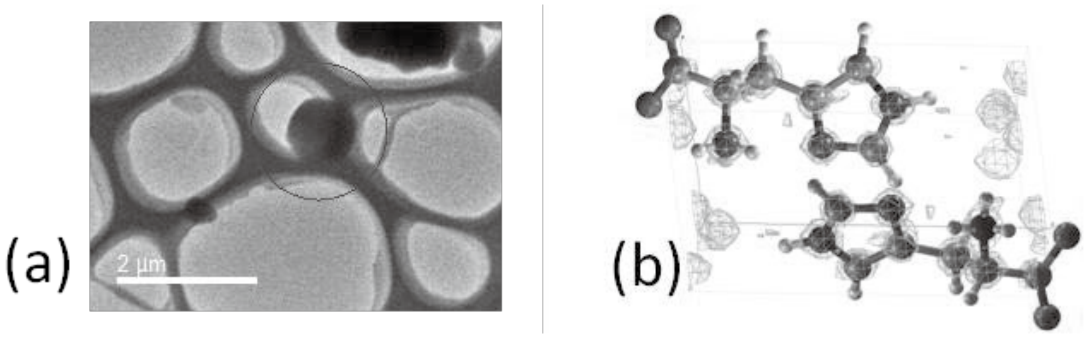


Figure 1. (a) TEM image of microcrystalline monoclinic L-histidine. (b) Potential map obtained from ED with continuous rotation method and final structure refined by NMR crystallography.

References

[1] e.g. L. Palatinus, P. Brazda, P. Boullay, O. Perez, M. Klementova, S. Petit, V. Eigner, M. Zaarour, S. Mintova, Hydrogen positions in single nanocrystals revealed by electron diffraction, Science 355 (2017) 166-169.

[2] Lalit Rajput†, Manas Banik†, Jayasubba Reddy Yarava, Sumy Joseph, Manoj Kumar Pandey, Yusuke Nishiyama* and Gautam R. Desirajua*, Exploring the salt-cocrystal continuum with solid-state NMR using natural abundance samples: implications for crystal engineering, IUCrJ 4 (2017) 466-475. DOI: 10.1107/S205225251700687X

[3] Tetsuo Oikawa, Manabu Okumura, Tsunehisa Kimura and Yusuke Nishiyama*, Solid-state NMR meets electron diffraction: Determination of crystalline polymorphs of small organic microcrystalline samples, Acta Cryst. C73 (2017) 219–228. DOI: 10.1107/S2053229617003084

L2-9

パラ水素誘起偏極サイドアーム型の超偏極13C MRIに資するエステル化合物の長距離J値の決定

○スチュアート ニール ジェームス[1] 久米田博之[2] 友広潤志[1] 橋本卓也[3] 波多江典之[4] 松元慎吾[1]

[1]北海道大学大学院情報科学研究科生命人間情報科学専攻。 [2]北海道大学先端生命科学学院、北海道大学国際連携研究教育局ソフトマターグローバルステーション。 [3]京都大学大学院理学研究科化学専攻、千葉大学大学院理学研究院。 [4]北海道医療大学大学院薬学研究科

Investigation of Long-range Heteronuclear J couplings in Esters: Implications for ^{13}C Metabolic MRI by Side-Arm Parahydrogen-Induced Polarization

○Neil James Stewart[1], Hiroyuki Kumeta[2], Mitsushi Tomohiro[1], Takuya Hashimoto[3], Noriyuki Hatae[4], Shingo Matsumoto[1]

[1] Division of Bioengineering and Bioinformatics, Graduate School of Information Science and Technology, Hokkaido University. [2] Department of Structural Biology, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University. Global Station for Soft Matter, Global Institution for Collaborative Research and Education, Hokkaido University. [3] Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Chiba University. [4] School of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido.

To optimize polarization transfer efficiency (PTE) in Side-arm Parahydrogen-induced polarization (SA-PHIP) for ^{13}C metabolic MRI applications, long-range heteronuclear $^{n}J_{CH}$ couplings in metabolite precursors were investigated experimentally by dedicated NMR sequences and numerically by density functional theory (DFT) simulations. NMR and DFT J_{CH}s were strongly correlated. sel-HSQMBC-TOCSY enabled $^{4-5}J_{CH}$ values <1.0Hz to be measured. Density matrix simulations of parahydrogen to ^{13}C PTE guide magnetic field cycling- and INEPT-type polarization transfer for target precursors to maximize PTE.

<u>Introduction</u>: Side-arm parahydrogen induced polarization (SA-PHIP) presents a cost-effective method for hyperpolarization of ^{13}C metabolites (e.g. pyruvate) for metabolic MRI [1]. The timing and efficiency of spin order transfer methods, such as magnetic field cycling (MFC: diabatic demangetisation and adiabatic remagnetisation) and PH-INEPT that convert PH spin order to ^{13}C, crucially depend on the heteronuclear J coupling network between PH protons and ^{13}C after

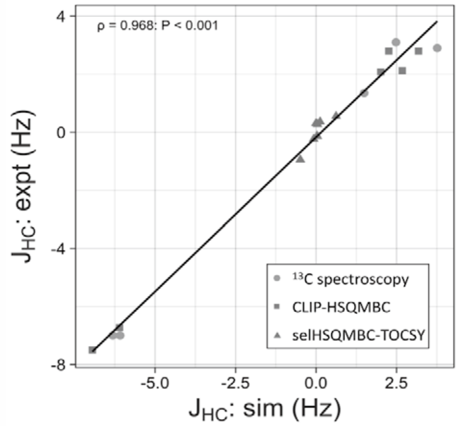


Fig. 1. Correlation of DFT-simulated and experimentally-measured J_{CH}

Long-range heteronuclear J couplings, parahydrogen-induced polarization, ^{13}C NMR/MRI

○スチュアートニール、久米田博之(くめたひろゆき)、友広潤志(ともひろみつし)、橋本卓也(はしもとたくや)、波多江典之(はたえのりゆき)、松元慎吾(まつもとしんご)

parahydrogenation of the target [2,3]. Here, heteronuclear ${}^{n}J_{HC}$ (1<n≤5) couplings of metabolite esters relevant for SA-PHIP were investigated experimentally by NMR pulse sequences and numerically by DFT simulations.

Methods: ${}^{1}H$ NMR spectra and proton-coupled ${}^{13}C$ spectra data were acquired on a JEOL 400 MHz spectrometer. The CLean In-Phase multiplets (CLIP)-HSQMBC technique [4] was used to quantify ${}^{n}J_{HC}$ for n ≤ 3, and the selective-HSQMBC-TOCSY approach [5] was used to estimate ${}^{n}J_{HC}$ for n ≤ 5 (≤ 0.5 Hz) with a Bruker 800 MHz spectrometer. For numerical simulations, molecular conformational searches were performed using Spartan and DFT simulations were carried out using Gaussian. Simulations of MFC and PH-INEPT+ polarization transfer were carried out in Matlab using a density matrix / product operator approach [6].

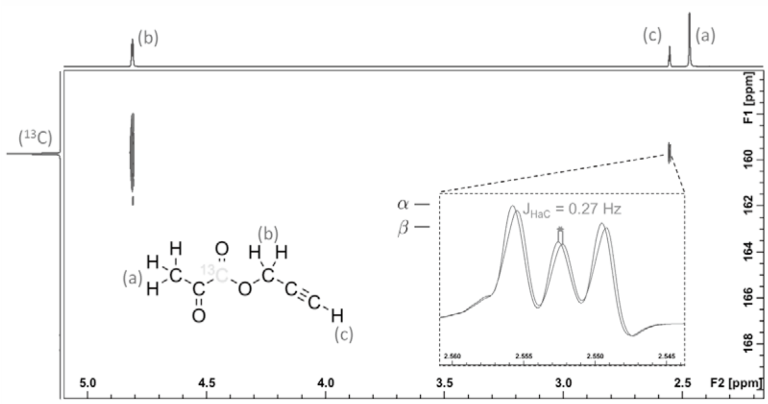


Fig. 2. Example of J_{CH} estimation using sel-HSQMBC-TOCSY

Results: Experimental and DFT-simulated ${}^{n}J_{HC}$ values were strongly correlated ($P < 0.001$; Fig. 1). CLIP-HSQMBC revealed couplings that could not be resolved by spectroscopy, but did not typically show crosspeaks for ${}^{4-5}J_{HC}$. IP/AP sel-HSQMBC-TOCSY allowed estimation of $|{}^{4-5}J_{HC}| \leq 0.5$ Hz (see e.g. Fig. 2). Simulations of ${}^{13}C$ polarization by spin order transfer by MFC and PH-INEPT+ showed that efficient transfer requires a large difference in J_{HC} between the two PH atoms and ${}^{13}C$, and at least one $J_{HC} \gg 0$. In allyl acetate, ${}^{4-5}J_{HC}$ were extremely small and MFC in a three-spin (para-H_2 + ${}^{13}C$) system predicted a low ${}^{13}C$ polarization. However, considering the entire J coupling network (including homonuclear J_{HH}), simulations revealed that ≈34% ${}^{13}C$ polarization may be obtained (at the experimental optimum remagnetization time of 5 sec, Fig. 3).

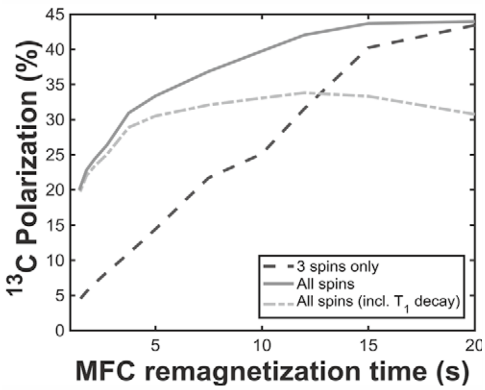


Fig. 3. Simulated [1-^{13}C]allyl acetate polarization in MFC for 3 or all spins

Conclusion: This work should facilitate improved characterization of polarization transfer efficiency in SA-PHIP by using accurate heteronuclear and homonuclear J coupling constants. Our results suggest that high experimental polarization transfer should be realizable in allyl esters for high quality in vivo metabolic MRI of hyperpolarized ${}^{13}C$ acetate / pyruvate.

参考文献: [1] Reiniri et al. *Nat Comms*, **6** (2015). [2] Bar et al. *J Magn Reson*, **225** (2012). [3] Cavallari et al. *J Phys Chem B*, **119** (2015). [4] Sauri et al. *Org Biomol Chem*, **11** (2013). [5] Sauri et al. *Angew Chem*, **51** (2012). [6] Sørensen et al. *Prog NMR Spec*, **16** (1984).

L2-10

Accounts of NMR signal reception based on Heisenberg-Langevin formalism

○Kazuyuki Takeda[1], Koji Usami[2]
1 Graduate School of Science, Kyoto University
2 Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo

In learning the fundamentals of NMR, one may have encountered controversial explanations about signal reception. In early days, attempts to explain the NMR signals in terms of spontaneous emission were made, whereas Hoult and Ginsberg showed experimental evidence for which spontaneous emission (of radiation in free space) cannot have appreciable effects in magnetic resonance phenomena[1]. Surprisingly, spontaneous emission has revisited by recent report by Beinfait et al. of cavity-enhanced spin relaxation[2]. There, the rate of electron-spin relaxation was successfully accelerated by three orders of magnitude by the Purcell effect, which promotes spontaneous emission in the presence of a resonator. Now the role of spontaneous emission in magnetic resonance appears perplexing. The purpose of this work is to provide consistent accounts of signal reception.

It is important to point out the gap on the usage of the term "spontaneous emission" between researchers in different fields. Many take it as being associated with electromagnetic radiation *in free space*. Its rate constant, also well known as Einstein's *A* coefficient, is derived from the Fermi's golden rule applied to a two-level system in an empty box. It follows that the scope of usage of the *A* coefficient must be restricted to free space radiation.

Whereas others, in particular physicists, often use "spontaneous emission" with a broader sense, including cases in which the system of interest is coupled to the electromagnetic fields in a resonator. In the context of NMR, Jeener and Henin put forward a model of NMR signals, in which the electromotive force (emf) due to nuclear induction is transported through the transmission line[3].

Here, we analyze the latter, i.e., spontaneous emission, *not of radiation in free space, but of an eigenmode in a transmission line*, with two approaches. The first deals with the expected signal intensity that would have been caused by a single spin in a resonator, and then consider the contribution of a macroscopic numbers of the individual spins in the sample. Since the spins are subject to a common field, the effect of having a large number of spins is not to simply count up the contributions of the individual spins, but to result in collective enhancement. This effect, known as Dicke's coherent spontaneous emission or *superradiance*, is well established in atomic physics but remains controversial in magnetic resonance[1,4]. We argue that the outcome of superradiance gives consistent result, if spontaneous emission of cavity eigenmode (again, ***not*** of radiation in free space!) is taken into account.

Heisenberg-Langevin equation, superradiance, Purcell effect

○たけだかずゆき、うさみこうじ

The second approach is based on the Heisenberg-Langevin formalism that deals with open quantum systems[5]. Here, an ensemble of nuclear spins and the LC circuit are treated as coupled harmonic oscillators, while dissipation of coherence to environment is incorporated through their couplings to the bosonic environmental degree of freedom. To explicitly deal with the collective behaviour of an ensemble spin system, we introduce Holstein-Primakoff transformation[6], so that the macroscopic magnetization is represented in terms of boson creation and annihilation operators.

It should be stressed that the scope of our discussion is restricted to signal detectors of an LC resonator composed of a coil terminated with a capacitor. It is, however, important to keep in mind that the tuned coil is not a necessary condition for signal reception. Indeed, Hoult and Ginsberg performed an elegant experiment using an open-loop coil, and proved the existence of emf, i.e., NMR signal, across the gap of the untuned coil with a vanishing quality factor in their quest of the quantum origin of emf induced by the precessing spins[1].

What we address in this work is not the very origin of the emf, but its outcome when the coil is closed and coupled to a transmission line. A quantum mechanical description of such a system was given by Jeener and Henin[3], who proved the equivalence between the equation of motion using the classical electromagnetic field and the equation of motion using the quantized field; it has given justification to treat phenomena in the conventional magnetic resonance experiments using the classical approach. This, however, does not imply that the quantum description is only academic and is outside the scope of interest in practice, On the contrary, we *need* the quantum description, in partucular when one goes beyond the usual Faraday induction and tries to resort to other, quantum-mechanicam reception schemes. An example of such is force detection of NMR signals using a cantilever. Another which is of potential importance is Electro-Mechano-Optical (EMO) NMR[7], where radiofrequency NMR signals are transduced to light via the electro-mechanical and opto-mechanical couplings associated with a membrane oscillator. We believe that the theory presented here can be helpful to understand such unusual and exotic NMR phenomena.

References

[1] D.I. Hoult, N.S. Ginsberg, J. Magn. Reson. 148 (2001) 182–199. doi:10.1006/jmre.2000.2229.

[2] A. Bienfait, J.J. Pla, Y. Kubo, X. Zhou, M. Stern, C.C. Lo, C.D. Weis, T. Schenkel, D. Vion, D. Esteve, J.J.L. Morton, P. Bertet, Nature. 531 (2016) 74–77. doi:10.1038/nature16944.

[3] J. Jeener, F. Henin, J. Chem. Phys. 116 (2002) 8036–8047. doi:10.1063/1.1467332.

[4] D.I. Hoult, Concepts Magn. Reson. Part A. 34A (2009) 193–216. doi:10.1002/cmr.a.

[5] C.W. Gardiner, M.J. Collett, Phys. Rev. A. 31 (1985) 3761–3774. doi:10.1103/PhysRevA.31.3761.

[6] T. Holstein, H. Primakoff, Phys. Rev. 58 (1940) 1098–1113. doi:10.1103/PhysRev.58.1098.

[7] K. Takeda, K. Nagasaka, A. Noguchi, R. Yamazaki, Y. Nakamura, E. Iwase, J.M. Taylor, K. Usami, Optica. 5 (2018) 152. doi:10.1364/OPTICA.5.000152.

IL-1

Quantitative and Qualitative proton-proton distances in fully protonated solids at fast magic spinning NMR

Vipin Agarwal

TIFR Centre for Interdisciplinary Sciences (TCIS),
Tata Institute of Fundamental Research, Sy. No. 36/P, Gopanpally,
Serilingampally Mandal, Hyderabad -500 107, India

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy of protons in protonated solids is challenging. Perdeuteration, fast magic angle spinning (MAS) and homonuclear decoupling schemes, in conjunction, with high magnetic fields have improved the resolution of protons. This has led to major developments in correlation spectroscopy of protons concatenated to other rare nuclei. However, in solids the real strength of proton NMR lies in deciphering spatial proximity of protons as they provide a direct means to structure of molecules and also an understanding of interactions that induce inter-molecular packing. The currently used dipolar recoupling techniques have been designed to recouple rare nuclei. The same sequences are not optimal for proton recoupling because in contrast to strong dipolar coupling network of protons the multi-spin dipolar-coupling network of the rare spins is weak due to large chemical shift dispersion and weaker dipolar coupling.

In this presentation, we introduce two new recoupling sequences particularly suited for recoupling of protons, namely band-selective spectral spin-diffusion (BASS-SD) and selective recoupling of proton (SERP). Both sequences selectively recouple protons in a fully protonated sample. However, the recoupling Hamiltonians for the two sequences are significantly different. The BASS-SD provides an estimate of qualitative proton-proton distances and is particularly useful in structure determination of macromolecules. In contrast, SERP recoupling provides a quantitative measure of proton-proton distances in fully protonated samples. The SERP recoupling should be particularly suitable to NMR crystallography approaches for structures determination of pharmaceutical molecules by directly measuring ^{1}H-^{1}H distances. In this presentation we discuss the ideology, strengths, weaknesses and applications of proton selective recoupling sequences in fully protonated solids.

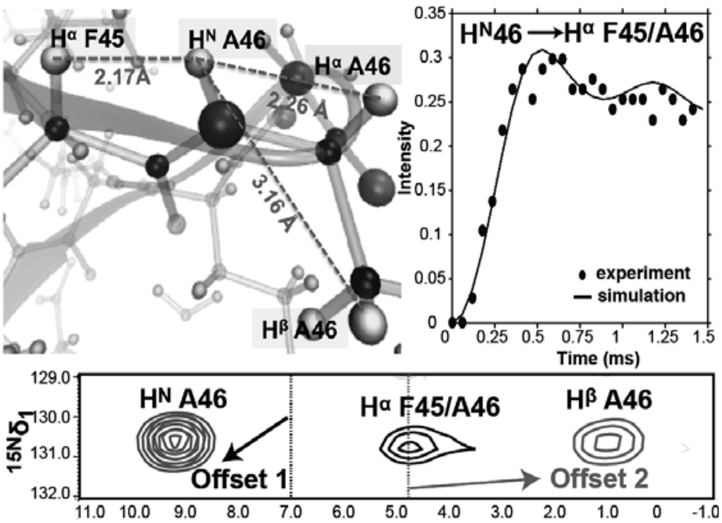


Figure 1. H^{N}A46→H^{α}F45/A46 Transfer of magnetization vs duration of SERP recoupling. The H^{α}F45/A46 distances to H^{N}A46 are similar and the H^{α} chemical shift is overlapped. A simulation (black solid line) was performed with the distances obtained from X-ray structure and plotted with a similar build up obtained from experiments (black dots). The proton offsets were set to 6.85 (thick dotted line) and 4.85ppm (thin line) to selectively observe H^{N} to H^{α} or H^{β} correlations in Ubiquitin

Solid-state NMR, ^{1}H-^{1}H selective recoupling, fully protonated solids

IL-2

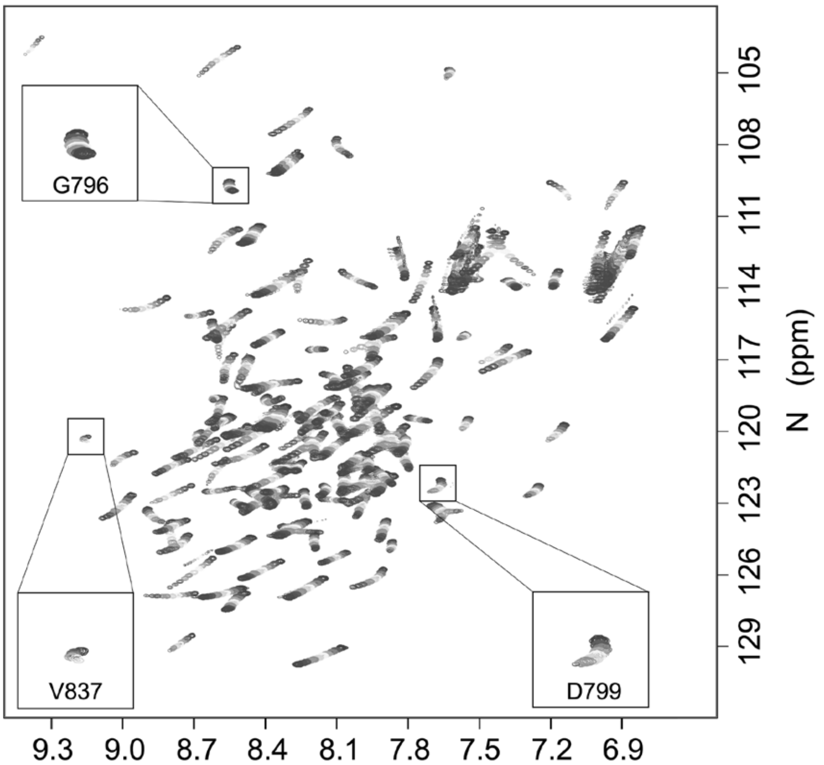
Protein conformational exchange in talin probed by high pressure NMR

Mike P Williamson[1], Nicky Baxter[1], and Igor Barsukov[2]
[1]*University of Sheffield, Sheffield, UK*
[2]*University of Liverpool, Liverpool, UK*

Talin mediates attachment of the cell to the extracellular matrix. It is targeted by the Rap1 effector RIAM to focal adhesion sites, and subsequently undergoes force-induced conformational opening to recruit the actin-interacting protein vinculin. The conformational switch involves the talin R3 domain, which binds RIAM when closed and vinculin when open. We applied hydrostatic pressure to R3 and measured ^{1}H, ^{15}N and ^{13}C chemical shift changes. These were fitted using a simple model that assumes linear pressure-dependent changes with compression plus a Boltzmann-weighted population change:

$$\delta = \frac{(\delta_1^0 + p\Delta\delta_1) + (\delta_2^0 + p\Delta\delta_2)exp\left(-[\Delta G + p\Delta V]/_{RT}\right)}{1 + exp\left(-[\Delta G + p\Delta V]/_{RT}\right)}$$

Singular Value Decomposition was used to reduce experimental noise. This method is straightforward to do, and can also be applied to improve chemical shift titration data. The results gave complete chemical shifts for the two conformations in exchange. Analysis using TALOS-N indicates that R3 at atmospheric pressure is 50% closed and 50% open: the closed form is a four-helix bundle, while in the open state helix 1 is twisted out. The exchange rate is around 2000 s^{-1}, and the change in volume between the two states is -26 ml mol^{-1}. In contrast, a mutant of R3 that binds RIAM with an affinity similar to wild-type but more weakly to vinculin is shown to be 0.84 kJ mol^{-1} more stable when closed. These results demonstrate that R3 is thermodynamically poised to bind either RIAM or vinculin, and thus constitutes a good mechanosensitive switch.



HSQC pressure titration of R3 (red to blue, 1 bar to 2.5 kbar). Some very curved shift changes are highlighted.

Baxter et al *Structure* 2017 **25**:1856-1866.

Keywords: pressure, conformational change, singular value decomposition, chemical shift

IL-3

Targeting KRAS Oncoprotein on Biological Membranes

Mitsuhiko Ikura (伊倉光彦)
Princess Margaret Cancer Centre and Department of Medical Biophysics,
University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada, M5G 1L7

RAS proteins are frequently mutated in cancer (~30% of all human tumours) and an estimated world-wide death pole of RAS-associated cancers exceeds 2 million/yr. Despite of enormous efforts in the RAS research over three decades, there is no clinically approved RAS inhibitor and the RAS protein remains to be a challenging target for cancer therapy development. This is largely owing to the lack of understanding of how mutant RAS functions and alters related signaling pathways in the RAS-driven tumours. Fully-processed RAS is prenylated and methylated at the carboxy-terminus, which enables RAS to anchor to the plasma membrane where it functions. There is a large gap in our understanding of how the lipidated RAS protein functions at the surface of the plasma membrane. To overcome these outstanding issues in the RAS field, we sought to develop better conformational and functional assays for the RAS protein both in isolation and on lipid bilayers (i.e., nanodiscs) using NMR spectroscopy. We elucidated how oncogenic mutations in K-RAS, the most important isoform in human cancer, alter the structure and function especially when the protein is anchored to the membrane. I will discuss how the biological membrane influences K-RAS in wild-type and mutants. Using the NMR-based approaches, we are also exploring how we could inhibit K-RAS at the membrane surface. (Supported by CCS, CFI & PMCF)

Cancer, small GTPase, Drug Discovery

第3日目
9月20日（木）
一般演題
Day 3（Sep. 20, Thu）

L3-1 TiF_4の巨大^{19}F CSA; NMRとDFT計算による評価

○村上美和[1]，野田泰斗[2]，竹腰清乃理[2]
1京都大学産官学連携本部
2京都大学大学院理学研究科化学

Anomalous ^{19}F chemical-shielding anisotropy of unshared fluorine in TiF_6-octahedra in TiF_4 by NMR and DFT calculation

○Miwa Murakami[1], Yasuto Noda[2], Kiyonori Takegoshi[2]
1 Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University
2 Graduate School of Science, Kyoto University

^{19}F high-resolution solid-state NMR with using fast magic-angle spinning (MAS) reveals 12 isotropic signals for 12 crystallographic sites[1] of fluorine in TiF_4. It was notable that 6 isotropic signals appearing at 420~480 ppm bear large chemical-shielding anisotropy ($\Delta\sigma \sim 1000$ ppm), while the $\Delta\sigma$ values of other 6 sites, whose isotropic shifts are ca. 0~25 ppm, are moderate (300~400 ppm). With these, we thought that this compound is suitable for examination of theoretical calculation of ^{19}F chemical shift and performed DFT calculation with the GIPAW method implemented in NMR-CASTEP code. The observed isotropic signals were assigned to the 12-fluorine sites by referring the calculated isotropic shifts. It was shown that the 6 isotropic signals at 420~480 ppm with $\Delta\sigma \sim 1000$ ppm are assigned to unshared fluorine in TiF_6-octahedra (F3, F4, F7, F8, F10, F11). Indeed, the calculated $\Delta\sigma$ values are 890~980 ppm for these fluorines being consisted with the experimental results. Details of calculation and origins of large CSA will be discussed.

フッ化チタンTiF_4はFig.1に示す様に、3つのTiから成る環構造（以下、Ti_3F_{15}環；Fig.2の挿入図）が*b*軸方向に積層した構造を持っており、結晶学的に非等価な12サイトのフッ素を持つことが知られている[1]。14 Tの磁場でTiF_4の^{19}F MAS NMRスペクトルを測定したところ、Fig.2(c)に示す様に、大きなCSAを反映した多数のサイドバンドが観測された。このような広い信号分布と大きなCSAを持つ系は^{19}Fシフトの理論計算の条件検討や計算結果の精度の確認に適していると考え、NMR-CASTEPのGIPAW法を用いたDFT計算を行い検討した。

TiF_4試料（Sigma-Aldrich社製）は、アルゴン雰囲気のグローブボックス中でAgilent社の1.2 ϕ MAS試料管に詰めてMAS NMR測定に用いた。NMR測定には4.7 T、7 T、14 T（^{19}Fの共鳴周波数は188.4 MHz、282.8 MHz、564.6 MHz）の3つの静磁場を用いて、Hahn echo法で測定した。

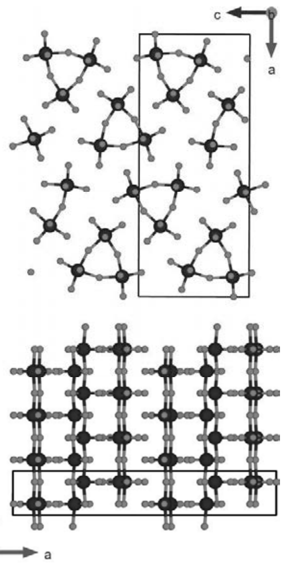


Fig. 1. Crystal structure of TiF_4. Large ball: Ti, small ball: F.

フッ化チタン、^{19}F CSA、DFT計算

○むらかみみわ、のだやすと、たけごしきよのり

Fig.2に4.7 T、7 T、および14 Tで測定したTiF_4の^{19}F MASスペクトルを示す（回転周波数 = 50 kHz）。4.7 Tや7 Tでは2つのサイトが１本に出ているペアがあったが、14 Tでは12本の等方ピークを分離観測することが出来た。等方信号を横向きの括弧で示した。得られた等方信号から、12サイト中の6サイトの等方シフトは420~480 ppmと大きな高周波数シフトがあり、その回転サイドバンドから1000 ppmにも達する異常に大きな化学シフト異方性(CSA)を示すことが判った。残りの6サイトについてはシフトが0~25 ppm、CSAは~400ppmとさほど特徴的な値ではなかった。これらの信号を帰属するために、GIPAW法による計算を行った。交換相互作用エネルギーは一般勾配近似下でPBE汎関数を、内殻励起はウルトラソフト擬ポテンシャルを用いて、特に、必要なcutoffエネルギーに着目して計算を行った。その結果、cutoff エネルギーとしては、最低 600 eV 程度が必要であることが判った。計算された等方化学シフトと実測値を比べることで、測定された信号を帰属した。その結果、等方シフトが420~480 ppmと遮蔽が小さく大きなCSAをもつ6つの信号は、TiF_6八面体中で共有されていないTi_3F_{15}の環の外周の F (F3、F4、F7、F8、F10、F11) であることが分かった。Fig.3に化学シフトの測定値と計算値の関係を示す。計算結果は測定結果を良く再現している。

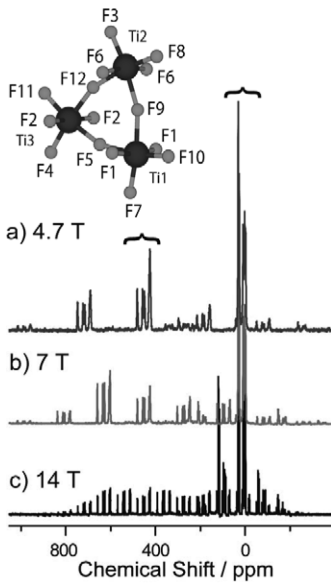


Fig. 2. ^{19}F MAS spectra of TiF_4 and the Ti_3F_{15} ring.

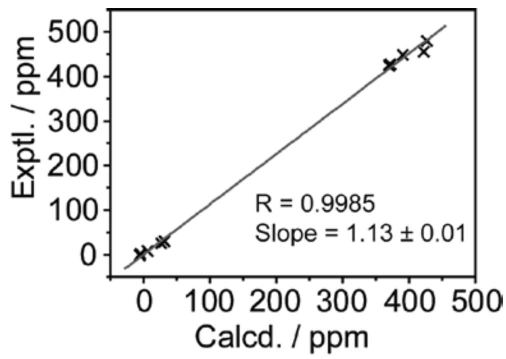


Fig. 3. Correlation between the experimental and the calculated isotropic chemical shifts for the 12 fluorine sites.

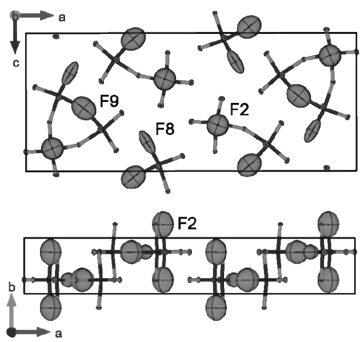


Fig. 4. An ORTEP drawing showing the representation of the ^{19}F chemical-shielding tensor calculated for F1, F8, and F9 of TiF_4.

計算で得られた CSA の値は環外周 F で$\Delta\sigma$ = 890~980 ppm と大きく、環内 F (F5, F9, F12)で$\Delta\sigma$ = 300~315 ppm、環間 F (F1, F2, F6)で$\Delta\sigma$ = 380~385 ppm であった。Fig.4 に計算で得た CSA テンソルの ORTEP 図を示した。どの F も Ti-F 結合軸方向にσ_{33}軸があり、環間の F2 はどちらかというと *b* 軸方向に配向している。発表では、計算の詳細や回転同期 DANTE 法で分離測定した各信号のサイドバンドパターンと計算の比較の他、電子軌道の考察についても示す。

[1] H. Bialowons, M. Müller, B.G. Müller, Z. Anorg. Allg. Chem. 1995, 621, 1227-1231.

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）の革新型蓄電池実用化促進基盤技術開発(RISING2)の結果得られたものです。

L3-2 プロトン伝導経路とゲスト分子吸着サイトを両立する配位高分子の合成と構造解析

○犬飼　宗弘[1]，堀毛　悟史[2]，西山　裕介[3]
1　徳島大学大学院社会産業理工学研究部
2　京都大学 高等研究院 物質－細胞統合システム拠点
3　理化学研究所CLST-JEOL連携センター

A coordination polymer with two separate anhydrous proton conduction pathway and guest accessible porosity

○Munehiro Inukai [1], Satoshi Horike [2], Yusuke Nishiyama [3]
1 Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences 2-1, Tokushima University
2 Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Institute for Advanced Study, Kyoto University
3 RIKEN CLST-JEOL Collaboration Center

As a new platform for the proton conduction, metal organic frameworks (MOFs) and coordination polymers (CPs) have been recently attracted in chemists and material researchers because of their advantages for crystallinity and designability. Herein, we present to composite anhydrous proton conduction pathway and guest accessible porosity which are spatially separated. Aligned $H_2PO_4^-$ provides high anhydrous proton conductivity (0.1 mS/cm) and porosity for hydrophilic solvent, including H_2O and MeOH. Moreover we fabricated a glass state coordination polymer and discussed its amorphous structure and functions through solid-state NMR analyses.

【緒言】
固体中でプロトンが高速で拡散するプロトン伝導体は、燃料電池の固体電解質として期待されている。中でも、低中温域(100-200℃)、かつ低加湿もしくは無加湿環境下において、高いプロトン伝導性を示す固体電解質は、システムの小型化や触媒の低使用量を可能とし、車載用燃料電池の観点から、注目を浴びている。近年、金属イオンと有機配位子が自己集合で組み上がる配位高分子(coordination polymers: CPs)/金属有機構造体(metal organic frameworks: MOFs)が、プロトン伝導のプラットフォームとして、注目を浴び始めている[1]。無数のナノ空間、結晶の多様性、高い結晶性、柔軟な結晶骨格を活かしたイオン伝導性配位高分子の研究が世界中で行われている。また配位高分子が持つ吸着、磁性、強誘電などの機能とプロトン伝導の複合化は、機能の多様化の観点から注目されている。本研究では、プロトン伝導経路とゲスト分子吸着サイトを両立する配位高分子を新たなに合成し、X線回折と固体NMRを用いて、構造と伝導機構を明らかにした。得られた配位高分子を融解・冷却することでガラス化し、ガラス構造の解析も行った。^{1}H-^{1}H 相関NMRスペクトルより、配位高分子のネットワークを維持したまま、非結晶化していることが明らかにした。

配位高分子、超高速MAS NMR、プロトン伝導体

○いぬかいむねひろ、ほりけさとし、にしやまゆうすけ

【合成と構造解析】

酸化亜鉛(1 mmol)、5-Chlorobenzimidazole (1 mmol, Clbimと呼ぶ)、リン酸水溶液(3 mmol)を乳鉢の中で混ぜた。その混合物に溶媒としてメタノール(200 μl)を加えて、室温下で固相合成を行い、メタノールで洗浄することで、薄茶色の粉末を得た(**1**と呼ぶ)。単結晶X線回折から得られた**1**の結晶構造をFig. 1(a)に示す。負に帯電した2次元シート$[Zn_2(HPO_4)_2(H_2PO_4)]^{-1}$、及びシート間の水素化した$ClbimH^+$、$H_2PO_4^-$、MeOHから組み上がっている。シート間に位置する非配位の$H_2PO_4^-$は、隣合う$H_2PO_4^-$間の距離が2.59 Å (O-O間の距離)であることから、プロトン輸送経路として期待できる。加えて、シート間のMeOHを除去することで、吸着サイトとなる空隙が期待できるとするプロトン伝導が。**1**を120℃、12 hの条件で加熱真空引きを行い、MeOHを**1**から取り除いた。得られた化合物(**2**と呼ぶ)のXRDパターンは、**1**のパターンと少し異なっており、構造の変化を示唆している。**1**と**2**の^1H-^1H DQNMR, ^1H-^{31}P CPMAS、^{13}C CPMASスペクトルを比較することにより、**2**の構造解析を試みた。

^1H-^{31}P CPMAS測定により、シート間の$H_2PO_4^-$の有無を調べた。**1**と**2**の両スペクトルにおいて、$H_2PO_4^-$に帰属できる0 ppmのピークを確認した。次に、**2**の^1H-^{13}C CPMASスペクトルにおいて、メタノールに帰属できる43 ppmのピークの消失を確認した。以上より、加熱真空引きにより、メタノールのみを除去できたことが明らかとなった。^1H-^1H 2D DQNMRにより、**2**の結晶構造を考察した。3-7 ppmに$ClbimH^+$(C-H)、8-11 ppmにリン酸のOH、12.7と15.7 ppmに$ClbimH^+$(N-H)に帰属できるピークを確認した。1のスペクトルと比較すると、^{31}PのNMRと同様にメタノールのピークが消失している。メタノールの除去に起因する15.7 ppm(N-H)を除き、ほぼ全てのピークに大きな変化は確認できなった。以上より、メタノールは抜けたが、結晶構造は維持していることが考えられる。

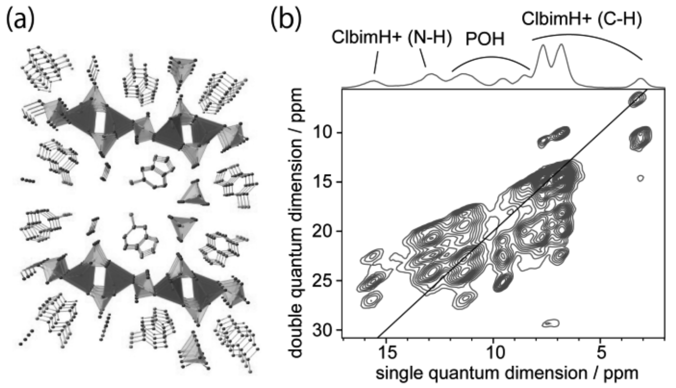


Fig. 1 (a) Crystal structure of **1** and (b) ^1H-^1H double quantum NMR spectrum of **2**.

【吸着能とプロトン伝導性】

2の吸着等温線より、MeOHとH_2Oの室温吸着を確認した。2次元シートを構築しているリン酸イオンのOH^-がゲスト分子の捕捉サイトとなっていることが予想できる。ACインピーダンス測定により、無加湿環境下におけるプロトン伝導度を測定した。110-140℃においてプロトン伝導が確認でき、0.1 mS/cm(140℃)に達した。活性化エネルギーは8.1 eVと見積もった。得られた活性化エネルギーは、一般的なプロトン伝導性のリン酸化合物(約0.6 eV)と比較しても大きく、リン酸イオン同士が強く水素結合で結びついていることが予想される。次に、2を加熱し融解、そして急冷することで、ガラス化した配位高分子を合成した。ガラス状態の配位高分子は、配位高分子が持つプロトン伝導性や吸着特性に高い成形性を付加することができるため、高く注目されている。一方、非結晶のため構造解析が困難であり、構造と機能に関する詳細な報告は極めて限られている。発表当日はガラス化した配位高分子の構造解析に加えて、ガラス化配位高分子のプロトン伝導能と吸着能についても合わせて報告をする予定である。

【参考文献】

[1] S. Horike, S. Kitagawa, et al., *Acc. Chem. Res*. 2013, **46**, 2376-2384, H. Kitagawa, et al., *Chem. Soc. Rev.* 2013, **42**, 6655, K. Kim, et al., *Angew. Chem. Int. Ed*. 2013, **52**, 2688

L3-3 パルス磁場勾配NMRと緩和時間測定による高分子電解質膜中の水拡散挙動の解析(I)湿度依存性

○倉橋 直也[1]，小具 健一[2]，陸川 政弘[1]
1 上智大学 理工学部
2 技術研究組合 FC-Cubic

Analysis of water diffusion behavior in polymer electrolyte membranes using pulsed field gradient NMR and spin relaxation measurements I. Humidity dependence

○Naoya Kurahashi[1], Kenichi Ogu[2], Masahiro Rikukawa[1]
1 Faculty of Science and Technology, Sophia University
2 Fuel Cell Cutting-Edge Research Center Technology Research Association

The proton conduction mechanism of polymer electrolyte membranes (PEMs) used in the polymer electrolyte fuel cells has not been sufficiently elucidated. In this study, water mobility in PEMs was evaluated by pulsed field gradient NMR and proton spin relaxation measurements. Hydrocarbon-based PEMs containing a lot of strong acid groups showed the same diffusion coefficient as Nafion® 117 under high humidity conditions. As a result of the spin-spin relaxation measurements, the environment of water molecule is greatly different between Nafion® and hydrocarbon-based PEMs despite similar diffusion coefficients. To evaluate the micro diffusion behavior in PEMs, we performed the *q*-space imaging based restricted diffusion analysis, and sub-micro meter spatial measurements were succeeded.

緒言

固体高分子形燃料電池に用いられる高分子電解質膜（PEM）は高いプロトン輸送性が要求されるため、スルホン酸基等の強酸基が導入されており、プロトンはH_3O^+の形で輸送される。[1] H_3O^+の生成と移動には水が不可欠であるため、プロトン輸送性を理解するためにPEM中の水分子運動を評価する必要がある。PEMの高いプロトン輸送性は、強酸基を含む親水部と疎水部の規則的な相分離構造によってプロトンチャンネルが形成することで発現すると考えられているが、[2,3] チャンネル内部の水分子ダイナミクスの実験的研究は不足している。[4,5] そこで本研究ではプロトンのスピン-格子緩和時間測定、スピン-スピン緩和定数測定、パルス磁場勾配-NMR、*q*-空間解析によって、巨視的な水分子の拡散と、微視的な運動性の評価を試みた。

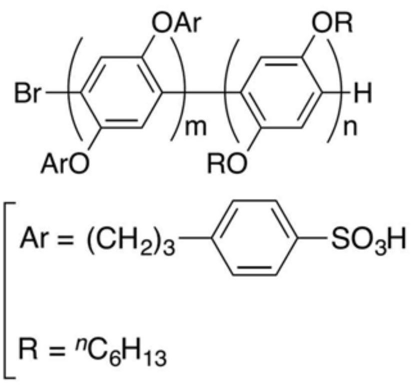


Figure 1. Structure of hydrocarbon-based polymer electrolyte S_mH_n. The *m* and *n* represent degrees of polymerization of the hydrophilic and hydrophobic parts.

磁場勾配NMR、拡散、高分子電解質

○くらはし なおや、おぐ けんいち、りくかわ まさひろ

実験

測定試料として市販の Nafion® 117 膜、および当グループで開発した強酸基を持つ炭化水素系共重合体膜（S_mH_n）を使用した。炭化水素系高分子膜は、強酸基を持つ親水部(S)と疎水部(H)の割合の異なる三種類の試料（$S_{31}H_{81}$、$S_{42}H_{38}$、$S_{54}H_{27}$）を用意した。PEMは大きさ約 3 mm × 20 mm の短冊状に切断し、直径 5 mm のサンプル管に面方向をそろえて挿入した。ただし $S_{42}H_{38}$と$S_{54}H_{27}$は成膜性が悪かったためランダムな方向に挿入した。

分光器として Bruker AVANCE III HD 400 MHz、プローブとしてDiff BBを使用した。拡散測定のプロシージャはパルス磁場勾配-スピンエコー法を採用し、半サイン型の磁場勾配パルスを用いた。拡散測定のパルスシーケンスを Figure 2 に示した。ただし Δ は拡散時間、δはパルス照射時間、g は磁場勾配パルスの強度である。また、スピン-格子緩和定数（T_1）測定には反転回復法を、スピン-スピン緩和定数（T_2）測定にはcpmg法を用いた。

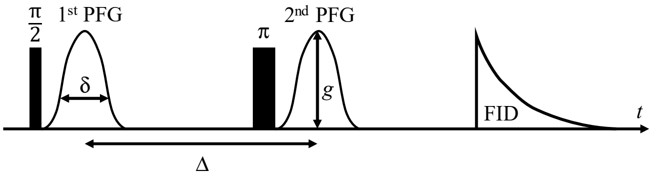


Figure 2. A Pulse sequence of pulsed field gradient spin-echo method.

結果と考察

相対湿度95 %で加湿した Nafion® 117 の25 ℃におけるパルス磁場勾配-スピンエコー測定および解析結果を Figure 3 に示す。ここから Nafion® 117 中の水分子は巨視的には単一の拡散係数（$4.2\times10^{-10}\ m^2/s$）を示すことがわかった。この測定を Nafion® 117、$S_{31}H_{81}$、$S_{42}H_{38}$、$S_{54}H_{27}$ に対して、それぞれ相対湿度 10 % から 95 %、温度 25 ℃ の条件で測定したところ Figure 4 のような結果を得た。高加湿下において、親水部の多い炭化水素系高分子電解質 $S_{42}H_{38}$、$S_{54}H_{27}$ は Nafion® 117と同等の拡散係数を示した。また、相対湿度 10 % から 90 % までは拡散係数が一貫して上昇しているが、95 % では低下したものがあった。同様の加湿条件で T_2 緩和定数を測定したところ拡散係数と類似した傾向を示した。T_2 緩和定数はスピン同士の近距離相互作用が大きいほど短くなるとされることから、湿度95%では過度の加湿によって膜中に水分子が密に詰まり、ミクロな運動が阻害されたと考えられた。また Nafion® と炭化水素系高分子では T_2 緩和定数が大きく異なっていたことから、プロトンのミクロな環境が大きく異なると推測された。

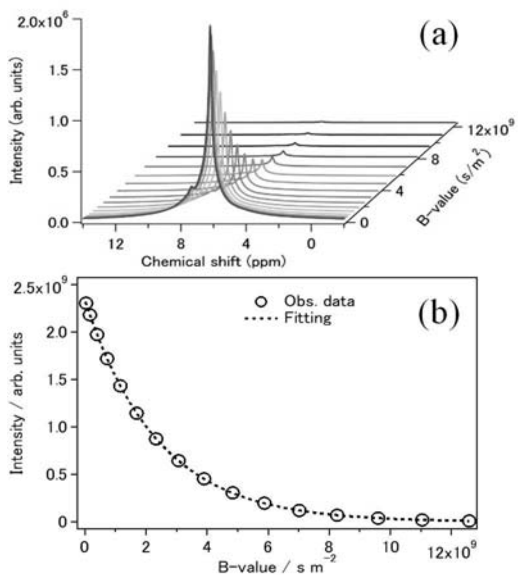


Figure 3. (a) Pulsed field gradient spin-echo signal of 95%RH humidified Nafion® 117. As pulsed field gradient increases, spin-echo signal intensity decreases. (b) Plot of the signal intensity with the square of pulsed field strength. The white circle shows the measurement result, and the dotted line shows the fitting result.

PEMのプロトンチャンネル内での水分子運動性を明らかにするために q-空間解析による制限拡散解析を試みた。この方法は MRI で用いられている q-空間イメージング法の応用であり、次のような原理にしたがう。拡散による粒子の変位密度 $\Delta\rho$ は、拡散前の粒子数密度 ρ_0 と変位の確率 P の積で表され、スピンエコー信号強度(I)は $\Delta\rho$ に比例する。自由空間での拡散であれば、変位の確率密度関数 P は拡散方程式に適切な境界条件を与

えることで得られるため、拡散係数を直接計算することができる（Stejskal-Tannerの式）。[6] 壁や構造のある領域内の拡散（制限拡散）では変位の確率密度関数が未知であるが、信号強度の磁場勾配パルス強度依存性をフーリエ変換することで変位の確率密度関数を分離して評価できる（式1）。[7] このため、様々な大きさの磁場勾配パルスでスピンエコー信号を取得し、測定結果を q-空間（磁場勾配パルスによって作られる波数ベクトル空間）でフーリエ変換することで拡散空間の大きさを評価した。ここで得られる関数 P は拡散時間 Δ の間の変位確率であるので、自由空間での拡散であれば拡散時間の伸長に伴い P の広がりは大きくなり、制限拡散であれば拡散時間を変化させても P が変化しないと予想される。

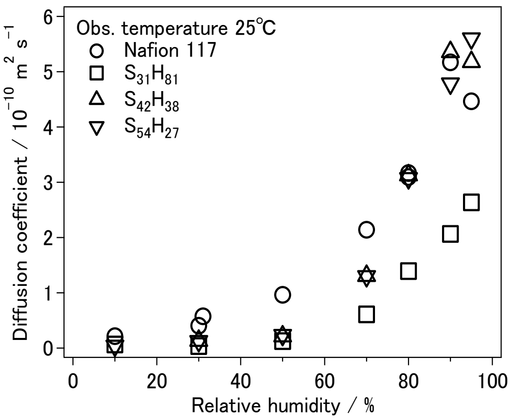


Figure 4. Humidity dependence of water diffusion coefficient in PEMs measured at 25 ℃.

$$I = \int \rho_0 P\, dr \xrightarrow{\text{Fourier transform}} P = \int \frac{I}{\rho_0} dq \quad \left(q \equiv \frac{\gamma g \delta}{2\pi}\right) \qquad (1)$$

(r: 任意の位置, γ: 磁気回転比)

この手法で拡散解析が可能であることを確認するために、自由空間の拡散である純水での測定を行った。本測定は温度 25 ℃, δ を1.0 ms, Δ を5.0, 10.0, 20.0 msと変化させ、それぞれ勾配磁場パルスの大きさを128段階に変化させて測定した。信号強度をq-空間の大きさでフーリエ変換した結果を Figure 5(a) に示す。細部の構造を観察するためにゼロパディングを行い、総データ点数を 4096 として計算した。ただし、実際の空間分解能はゼロパディング前と変化していない。純水では三次元自由空間の拡散であるため、拡散時間の伸長に伴い P の幅も伸長した。P の半値幅の拡散時間依存性から拡散係数を求めたところ 3.4×10^{-9} m^2 / s と得られ、先行研究の結果（2.3×10^{-9} m^2/ s）[8]と比較的一致したことから q-空間解析によって拡散の評価が可能であると結論された（Figure 5(b)）。

同様の測定を相対湿度80%で加湿した Nafion® 117膜に対して行った。拡散時間を変化させたところ、拡散時間 5.0 ms から 10.0 ms への変化は純水の場合と類似していたのに対し 10.0 ms から 20.0 ms では ±0.4 μm までの領域は変化せず、その外側では純水と類似した変化を示した（Figure 6）。この結果は 0.8 μm 以上の領域に拡散できない水分子の存在を意味することから Nafion® 117 中には大きさ 0.8 μm 程度の空間が存在する可能性がある。

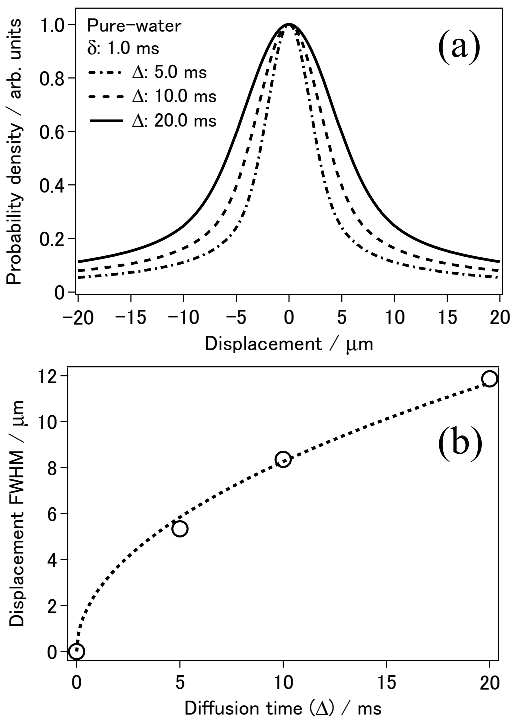


Figure 5. (a) Displacement probability function due to diffusion of pure water calculated by q-space analysis. The displacement increases as the diffusion time increases. (b) White circles are plot of the full width at half maximum of displacement against diffusion time. Dotted line is fitted assuming free diffusion, the diffusion coefficient was found to be 3.4×10^{-9} m^2 / s.

結言

以上のように、パルス磁場勾配-NMR, スピン緩和測定を組み合わせることで、高分子電解質膜中の巨視的な水拡散からミクロなプロトン環境の違いまで評価することができ、q-空間解析によって制限拡散をサブミクロンの空間分解能で評価することができた。

謝辞

本研究は、NEDO委託事業「固体高分子形燃料電池利用高度化技術開発事業/普及拡大化基盤技術開発/触媒·電解質·MEA内部現象の高度に連成した解析、セル評価」の委託を受けて行われた。

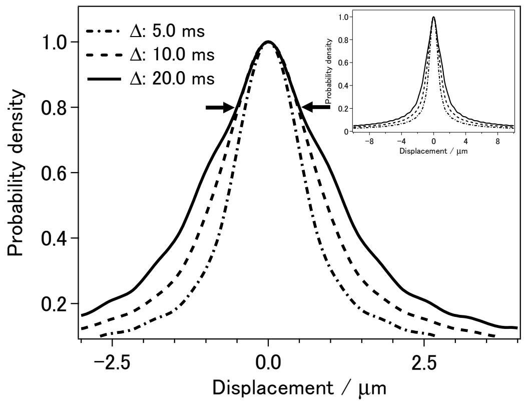


Figure 6. Displacement probability functions due to diffusion of humidified Nafion® 117 calculated by q-space analysis. Even when the diffusion time is changed, does not extend outward beyond 0.4 µm was found (arrow). The upper right is the whole plot.

参考文献

1 D. W. Shin, M. D. Guiver, Y. M. Lee, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 4759.

2 G. Titvinidze, K. D. Kreuer, M. Schuster, C. C. De Araujo, J. P. Melchior, W. H. Meyer, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 4456.

3 A. Roy, X. Yu, S. Dunn, J. E. McGrath, *J. Memb. Sci.* **2009**, *327*, 118.

4 T. Mabuchi, T. Tokumasu, *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*.

5 J.-C. Perrin, S. Lyonnard, F. Volino, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 3393.

6 E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 288.

7 P. T. Callaghan, A. Coy, D. MacGowan, K. J. Packer, F. O. Zelaya, *Nature* **1991**, *351*, 467.

8 M. Holz, R. H. Stefan, A. Sacco, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 4740.

L3-4 [1]H NMR緩和時間測定：水分子内包フラーレンを配位子とする9族金属錯体の構造特性評価

○橋川 祥史[1]，川﨑 皓斗[1]，村田 靖次郎[1]
[1]京大化研

[1]H NMR Relaxation Time: Evaluation of Structural Features on Group 9 Metal Complexes of $H_2O@C_{60}$

○Yoshifumi Hashikawa,[1] Hiroto Kawasaki,[1] Yasujiro Murata[1]
[1]*Institute for Chemical Research, Kyoto University*

The encapsulated water molecule inside the fullerene C_{60} cage can freely rotate even at cryogenic temperatures while the structural modification of the external sphere of C_{60} drastically influences its dynamic behavior. This change can be detected by ^{1}H NMR relaxation times of the entrapped H_2O molecule. In this study, regarding the rotational behavior of the entrapped water molecule, we have examined the effect of the coordination by group 9 metals (M = Co, Rh, Ir) to the C_{60} cage based on X-ray structures, cyclic voltammetry, and infrared ray and UV-vis measurements, as well as ^{1}H NMR chemical shifts and relaxation times. The results showed that the spin-rotation mechanism is dominant for the relaxation of H_2O in CpM(CO)C_{60}, which is caused by the more restricted rotation of H_2O compared with $H_2O@C_{60}$. The theoretical calculations suggest that the positive potential is located under the C–C bond where the metal coordinates in an η^2-fashion. This positive potential is considered to provide the rotational restriction of entrapped H_2O molecules in the order of Co < Rh < Ir.

フラーレンC_{60}の内部空間には単一の水分子を導入することができる．最近我々は，内包された水分子の動的挙動を調べることによって，C_{60}外部骨格の局所構造の電子状態を説明可能であることを示した．たとえば，炭素原子の1つを窒素原子に置き換えた$C_{59}N$においては，窒素原子の内側に正のポテンシャルが誘起されることに由来し，内包された水分子との間にCoulomb引力が生じる．その結果，内包水分子の運動性が著しく抑制されることが^{1}H NMR緩和時間測定によって明らかとなった[1]．また，骨格上にヘテロ原子を導入した場合には，炭素－ヘテロ原子間に結合分極が生じ，その程度に応じて内包水分子の緩和時間が変化することを示してきた[2] (Figure 1).

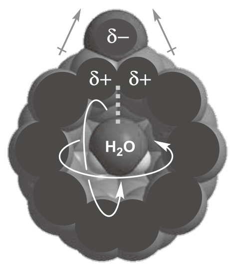


Figure 1. Restricted motion of H_2O inside C_{60}E (E = CR_2, NR_2, O).

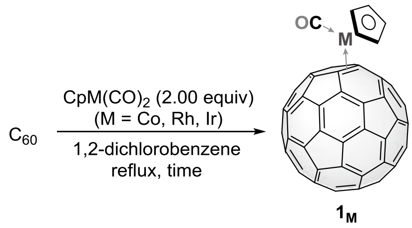
今回我々は，この手法をC_{60}をη^2配位子とする9族金属錯体に適用することで，炭素－金属結合の特性を評価した．一般的に，炭素－金属結合の評価には赤外分光法や単結晶X線構造解析が用いられており，多くの金属において同一の配位子をもつ同族錯体が合成され，相対論効果を実証するモデル分子として報告されている．しかし，9族金属錯体においては，光電子分光法による評価が数例報告されているにすぎず[3]，適切な実験系モデル分子の設計が求められる．

フラーレン，水分子，緩和時間

○はしかわよしふみ，かわさきひろと，むらたやすじろう

これに対し，我々はC_{60}を配位子にもつCo錯体（$\mathbf{1_{Co}}$）の合成を報告しており[4]，安定に取り扱うことが可能である．C_{60}のもつ二重結合は通常のものに比べsp^3性が高く，η^2配位構造というよりはむしろメタラシクロプロパンの構造特性を強く反映した局所構造をとることができ，これが$\mathbf{1_M}$の安定性に寄与していると考えられる．また，一般的なC_{60}金属錯体にみられるハプトロピック転移[5]は観測されず，溶液中でも高い安定性を保つことが明らかとなっている．そこで，この錯体合成法を同族元素であるRhおよびIrに展開することで，金属錯体$\mathbf{1_{Rh}}$, $\mathbf{1_{Ir}}$の合成を行なった（Scheme 1）．また，水分子を60%内包する$H_2O@C_{60}$[6]を用いて対応する金属錯体$H_2O@\mathbf{1_M}$ (M = Co, Rh, Ir)を合成した．^{1}H NMR測定の結果，錯体合成に用いた$CpM(CO)_2$のプロトンシグナルは相対論効果を明確に反映し，電気陰性度にしたがって変化するのに対し，$\mathbf{1_M}$では高周期金属錯体ほど低磁場にシフトすることがわかった．DFT計算の結果，Cp環の電子密度の低下が示唆され，π逆供与の強さを反映しているといえる．興味深いことに$\mathbf{1_M}$においては，COストレッチングに対応するIR吸収バンドは錯体間でほとんど差はなく，本錯体の構造特性はCp–M–C_{60}の電子構造に由来すると考えられる．また，CoおよびRh錯体の単結晶X線構造解析の結果，水分子を内包した場合でも結合長の明確な変化はみられなかった．

Scheme 1. Synthesis of $CpM(CO)C_{60}$ ($\mathbf{1_M}$)



entry	metal source	time	$\mathbf{1_M}$[a]
1	$CpCo(CO)_2$	1 h	48%
2	$CpRh(CO)_2$	2 h	43%
3[b]	$CpIr(CO)_2$	1 h	34%

[a]Isolated yield. [b]1-Chloronaphthalene was used as solvent.

そこで，$H_2O@\mathbf{1_M}$のODCB-d_4溶液を用いて260–360 Kの温度範囲において緩和時間測定を行なった (Figure 2)．その結果，T_1はスピン-回転機構による緩和の寄与が高く，高周期金属錯体ほど長くなる傾向がみられた．また，T_1は$H_2O@C_{60}$の場合に比べ約2倍程度長い値であり，明確に水分子の運動性が抑制されていることを示している．この要因を明らかにするために，理論計算を行なったところ，金属－炭素結合の裏側には正のポテンシャルが存在するものの，電荷密度計算では炭素原子が負電荷をもつことが示唆された．最適化構造から，η^2配位している炭素－炭素結合長は，$\mathbf{1_{Co}} < \mathbf{1_{Rh}} < \mathbf{1_{Ir}}$の順に長くなっており，$d$-$\pi^*$逆供与の寄与を反映していることがわかった．このわずかな差はX線構造では議論することができず，内包水分子の緩和時間が，金属－炭素結合を評価する上で極めて有効であることを示している．

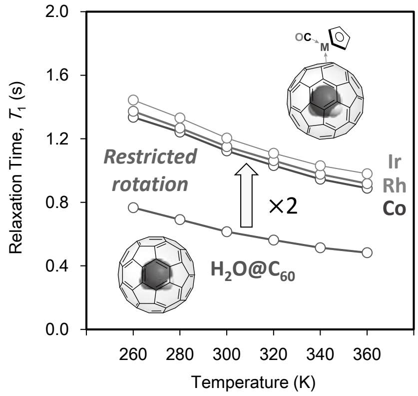


Figure 2. Variable temperature ^{1}H NMR relaxation time of $H_2O@C_{60}$ and $H_2O@\mathbf{1_M}$.

References

[1] (a) Hashikawa, Y.; Murata, M.; Wakamiya, A.; Murata, Y. *J. Am. Chem. Soc*. **2016**, *138*, 4096–4104. (b) Hashikawa, Y.; Murata, Y. *J. Am. Chem. Soc*. **2017**, *139*, 18468–18471.

[2] Hashikawa, Y.; Murata, M.; Wakamiya, A.; Murata, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 55, 13109−13113.

[3] (a) Lichtenberger, D. L.; Calabro, D. C.; Kellogg, G. E. *Organometallics* **1984**, *3*, 1623−1630. (b) Li, X.; Bancroft, G. M.; Puddephatt, R. J.; Hu, Y.-F.; Tan, K. H. *Organomettallics* **1996**, 15, 2890−2904.

[4] Hashikawa, Y.; Murata, M.; Wakamiya, A.; Murata, Y. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 6348−6351.

[5] (a) Nagashima, H.; Yamaguchi, H.; Kato, Y.; Saito, Y.; Haga, M.; Itoh, K. *Chem. Lett*. **1993**, 2153–2156. (b) Douthwaite, R. E.; Green, M. L. H.; Stephens, A. H. H.; Turner, J. F. C. *J. Chem. Soc*., *Chem. Commun*. **1993**, 1522−1523. (c) Oprunenko, Y. F.; Gloriozov, I. P. *J. Organomet. Chem.* **2013**, *732*, 116−121.

[6] Kurotobi, K.; Murata,Y. *Science* **2011**, *333*, 613−616.

L3-5

長いT_1を持つ分子の高感度溶液NMR測定法の開発

○古板恭子[1]、服部良一[1,2]、池上貴久[1,3]、藤原敏道[1]、児嶋長次郎[1,4]
1大阪大学　蛋白質研究所
2徳島文理大学　薬学部
3横浜市立大学　生命医科学研究科
4横浜国立大学　大学院工学研究院

Sensitivity-enhanced solution NMR method for molecules possessing long T_1

○Kyoko Furuita[1], Yoshikazu Hattori[1,2], Takahisa Ikegami[1,3], Toshimichi Fujiwara[1] and Chojiro Kojima[1,4]
1 Institute for Protein Research, Osaka University
2 Faculty of pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University
3 Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University
4 Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University

NMR measurements of molecules having long longitudinal relaxation time (T_1) take a lot of time, since long repetition delays are required. We have developed a novel sensitivity enhancement method for solution-state NMR utilizing such long T_1, based on the double-acquisition method developed by M. Fukuchi *et al*. for solid-state NMR. In our method, FID signals are acquired twice in a single scan as in-phase (IP) and antiphase (AP) signals. In this study, we applied this method to the ^{13}C-detected ^{1}H-flip HCACO experiment. IP and AP spectra of ^{1}H-flip HCACO were successfully measured using the double-acquisition method with ^{13}C-labeled valine. Peak splitting by ^{13}C'-^{13}C$^{\alpha}$ J coupling in the direct dimension was successfully removed by the virtual decoupling method using the IP and AP spectra. The peak intensity of ^{1}H-flip HCACO was increased by 2-fold compared to the usual ^{1}H-flip HCACO experiment, which corresponds to 1.4-fold increase in sensitivity.

【導入】　長いT_1を持つ分子、例えば低分子や超高磁場下の高分子のNMR測定では長い繰り返し時間が必要とされるため、時間当たりの感度が低い。固体NMR分野で開発された感度向上法であるDouble-acquisition法（文献１）は、1回のスキャンに２回のデータ取得をするが、1回目のデータ取得の間、2回目に取得される成分はZ方向に向けられて保存される。そのため、T_1が長いほど効率的な感度上昇が可能である。私たちはこれまでに、長いT_1を持つ分子の溶液NMR測定の高感度化を目指し、Double-acquisition法を改変し、HSQC及び^{13}C観測CACO測定に適用してきた。今回、新たにこの手法を^{13}C観測^{1}H-flip HCACO測定（文献２）に適用したので報告する。

【材料と方法】　全ての測定は、Bruker社製600 MHz NMR装置（AVANCE III HD）を用いて行った。データ処理にはTOPSPIN 3.5及びNMRPipeを使用した。データ解析には、TOPSPIN 3.5を使用した。^{13}C/ ^{15}N標識バリンのサンプルは、100% D_2O中でおよそ1.5 mM濃度で調製した。

縦緩和、^{13}C直接観測、感度向上

○ふるいた　きょうこ、はっとり　よしかず、いけがみ　たかひさ、ふじわら　としみち、こじま　ちょうじろう

【結果と考察】　double-acquisition法を^{1}H-flip HCACO測定に適用した。この測定法を以後dHCACOと呼ぶ。^{1}H-flip HCACOでは、まず^{1}Hを励起し、^{13}Cαに磁化移動して周波数ラベルし、その後^{13}C'に磁化移動して検出する。励起された^{1}Hのうち、CαとJカップリングしない（またはJカップリングが小さい）^{1}Hは、縦緩和を促進するため、Z軸方向に戻される(^{1}H-flip)。dHCACOでは、1スキャンにつき２回のデータ取得を行うが、一方はIP、もう一方でAP信号を検出する。

^{13}C/ ^{15}N標識バリンのサンプルについて、dHCACO測定を行った。その結果、良好なIPおよびAPダブレットのスペクトルを得ることに成功した（Fig. 1A,B）。通常^{13}C'観測測定では、直接観測軸において^{13}Cα-^{13}C'カップリングによりピークが分裂する。この分裂を取り除くため、よく用いられる方法にvirtual decoupling法がある。Virtual decoupling法は、IPとAP等の２種類のスペクトルを測定し、それらの足し引きによってダブレットの片側のみを含むスペクトルを作り、それぞれのピーク位置をダブレットの中心へ$1/2J_{CC}$ずつシフトさせて足し合わせることで、J分裂のないスペクトルを作り出す方法である。dHCACO測定で得られたIPおよびAPスペクトルを用いてvirtual decouplingを行ったところ、J分裂のないスペクトルを得ることができた(Fig. 1C)。

double-acquisition法の効果を検証するため、バリンのdHCACOスペクトルを標準的な^{1}H-flip HCACOスペクトルと比較した。その結果、dHCACOでは、1.95倍にピーク強度が向上していた。double-acquisition法ではノイズの強度は$\sqrt{2}$倍であるため、これは1.38倍（$=1.95/\sqrt{2}$）の感度上昇に相当する。

本研究により、double-acquisition法が^{1}H-flipの^{13}C観測測定に適用可能であり、測定感度を向上させることが示された。すでに、^{1}H-flipにより^{13}C観測の測定時間が1/5に短縮できることが示されているが（文献２）、本研究で示したdouble-acqusition法を組み合わせることで、さらなる^{13}C観測測定の高速化が期待される。発表では、dHCACO測定のパルス系列およびタンパク質への適用結果についても報告する予定である。

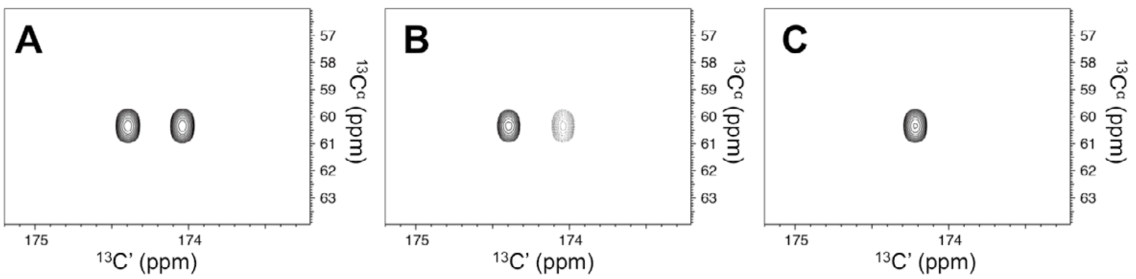


Fig. 1. **^{13}C/ ^{15}N標識バリンのdHCACOスペクトル。(A) In-phaseスペクトル、(B) Antiphaseスペクトル、(C) virtual decouplingスペクトル。**

【参考文献】

1. Fukuchi, M., Inukai, M., Takeda, K. & Takegoshi, K. Double-acquisition: Utilization of discarded coherences in a 2D separation experiment using the States method. *J. Magn. Reson.* **194,** 300–302 (2008).
2. Bermel, W., Bertini, I., Felli, I. C. & Pierattelli, R. Speeding up 13C direct detection biomolecular NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **131,** 15339–15345 (2009).

L3-6 溶液NMRにおける生体高分子の核超偏極技術の開発

○大木出[1]，藤咲貴大[2]，池上貴久[3]， 白川昌宏[2]，水落憲和[1]
[1]京都大学・化学研究所
[2]京都大学・工学研究科
[3]横浜市立大学・生命医科学研究科

Perspectives for hyperpolarization in biomolecular solution NMR

○Izuru Ohki[1], Takahiro Fujisaku[2], Takahisa Ikegami[3], Masahiro Shirakawa[2], Norikazu Mizuochi[1]
[1] *Division of Materials Chemistry, Institute for Chemical Research, Kyoto University*
[2] *Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University*
[3] *Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*

It is one of the big challenges of life science to investigate molecular structures, interactions, dynamics in biological systems by NMR, but low sensitivity has become a bottleneck. Recently, hyperpolarization techniques of nuclear spins which improves low NMR sensitivity mainly using parahydrogen, DNP, diamond NV centers etc. has greatly advanced, and the way to solve the bottleneck has come to be seen. Using these techniques, we are trying to improve the sensitivity of biological molecules or solvents under ambient conditions. In this presentation, we would like to discuss the progresses and problems of each hyperpolarization technique when applied to biological systems, especially focusing on SABRE by parahydrogen.

細胞や生体系において、分子の構造や相互作用、動的構造変化を生きた状態で調べ、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、生体系への適用には感度の低さ（測定には10^{17}個以上の核スピンが必要）が問題となってきた。このNMRの感度の低さは、磁場中でのαスピンとβスピンのエネルギー準位差（Zeemanエネルギー）が極めて小さいため、熱平衡により両準位に存在するスピン占有数がほぼ等しくなることに由来する。例えば、一般的な溶液NMR測定条件である室温、10 T磁場においては両準位の占有数差（=偏極率）は0.004%しかなく、核スピンが10万個存在していても大部分は打ち消し合い、実質スピン数個分のNMRシグナルしか得られない。

超偏極（Hyperpolarization）は、この低い偏極率を100%に近づけるけることで、NMRシグナル強度を最大数万倍まで増幅する手法である[1)]。基本的には、特殊な条件下で偏極率が100%になるスピン系（極低温下でのラジカル分子の電子スピンや水素分子の核スピン、あるいは光励起した三重項電子スピン等）を、核スピンにうまく接触させて偏極を移動することにより得られる。これまで、超偏極は極低温や特殊な化学構造を持つ有機分子等の制限された条件で達成される事が多かったが、近年では、dissolution DNP [2)]、Overhauser DNP [3)]、光励起Triplet DNP [4)]、パラ水素SABRE [5)] 等の手法の発展により、より生理的な室温、溶液条件下で生体分子、あるいは溶媒分子に偏極を移動させる事が可能になってきた。既にdissolution DNPにおいては、超偏極させた水（HDO）から溶液状態の蛋白質のアミドプロトンに２段階で偏極を移す事で、蛋白質の多次元NMRスペクトルを高感度に測定することに成功している[6)]。しかし、DNPを用いる手法は、極低温あるいは高磁場下で電子から核への偏極移動を行う必要があるため特殊なNMR装置が必要であり、利用や導入は容易ではない。

溶液NMR，超偏極，パラ水素

○おおきいずる，ふじさくたかひろ、いけがみたかひさ、しらかわまさひろ、みずおちのりかず

本研究では、DNPと比べて装置も取扱いも容易であるパラ水素（核スピンが超偏極した水素分子）を用いた偏極移動法（SABRE）に着目し、これを生体高分子に適用可能な形に改良し、生体系（*in cell/in situ/in human*）においても分子動態を高感度に観測できるような汎用的で導入も容易な技術に発展させることを目指している。このSABRE法は2009年にDuckettらにより開発された新しい超偏極技術であり、遷移金属触媒上でパラ水素の核スピンから標的分子の核スピンへと化学交換を利用して偏極を移すため、連続的な偏極移動が可能なところが大きな利点である（Fig. 1）。標的分子には有機低分子が用いられることが多いが触媒に配位可能であれば良く、分子構造の自由度が高いのが特徴となっている。また、偏極移動には特殊な装置は必要としない。これまでに、触媒にイリジウム、標的分子に^{15}Nピリジンを用い、室温・溶液状態で、パラ水素（液体窒素下で作成。偏極率47%）を低磁場（^{1}H: 3 mT, ^{15}N: 500 nT）で系にバブリング後、溶液NMR装置に移して測定（Fig. 2）する事で、^{1}H、^{15}Nシグナルをそれぞれ20、2,400倍に増幅することに成功している）。現在、蛋白質へ偏極を移動することを目指して標的を溶媒分子に変え、水の偏極に成功している。

発表ではこれらに加えて、本研究室で進めているダイヤモンドNV中心を用いた高感度ナノNMR測定[7-10]の手法も合わせ、各偏極技術の比較、生体高分子・生体系への適応範囲、偏極寿命の問題点、長寿命化、フロー系による連続偏極技術等についても議論したい。

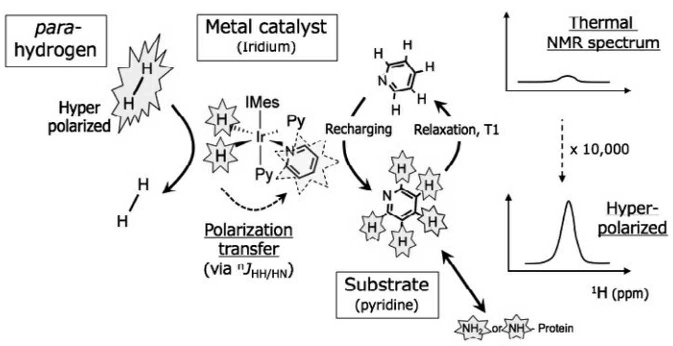


Figure 1. Polarization transfer cycle by SABRE method

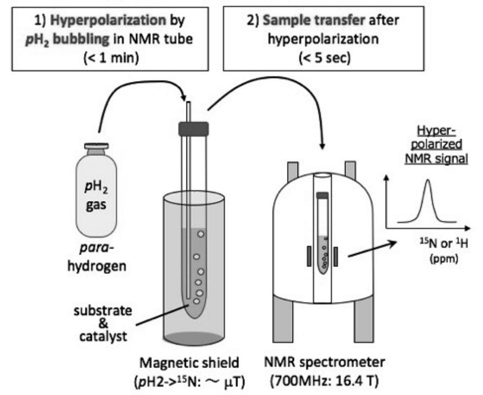


Figure 2. Simple setup for SABRE experiment
(pH2→^{15}N transfer)

[References]

1. Ardenkjaer-Larsen *et al.,* Facing and overcoming sensitivity challenges in biomolecular NMR spectroscopy. *Angew. Chem.*54, 9162 (2015).
2. Ardenkjaer-Larsen *et al.,* Increase in signal-to-noise ratio of >10,000 times in liquid-state NMR, *PNAS* 100, 10158 (2003).
3. Bentum *et al.,* Quantitative analysis of high field liquid state dynamic nuclear polarization, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 17831 (2011).
4. Henstra *et al.,* High dynamic nuclear polarization at room temperature, *Chem. Phys. Lett.* 165, 6 (1990).
5. Adams *et al.,* Reversible interactions with para-hydrogen enhance NMR sensitivity by polarization transfer. *Science* 323, 1708 (2009).
6. Olsen *et al.,* Optimizing water hyperpolarization and dissolution for sensitivity-enhanced 2D biomolecular NMR, *J. Magn. Reson.* 264, 49 (2016).
7. Lovchinsky *et al,* Nuclear magnetic resonance detection and spectroscopy of single proteins using quantum logic. *Science* 351, 836 (2016).
8. Aslam, Wrachtrup *et al,* Nanoscale nuclear magnetic resonance with chemical resolution. *Science* 357, 67 (2017).
9. Schmitt, Jelezko *et al,* Submillihertz magnetic spectroscopy performed with a nanoscale quantum sensor. *Science* 356, 832 (2017).
10. Glenn, Walsworth *et al.*, High-resolution magnetic resonance spectroscopy using a solid-state spin sensor. *Nature* 555, 351 (2018)

[謝辞] 本研究は科学研究費(JSPS)基盤研究(A) 16H02088 の助成により行われた。

L3-7 従来型シグナル帰属によらず時間軸データを直接解析するタンパク質NMR解析法

○葛西 卓磨[1,2]，小野 峻佑[2,3]，田中 利幸[4]，池田 思朗[5]，木川 隆則[1,6]
1 理化学研究所 生命機能科学研究センター
2 科学技術振興機構 さきがけ
3 東京工業大学 科学技術創成研究院
4 京都大学大学院 情報学研究科
5 統計数理研究所 数理・推論研究系
6 東京工業大学 情報理工学院

Integrated assignment and characterization of proteins without chemical shift determination

○Takuma Kasai[1,2], Shunsuke Ono[2,3], Toshiyuki Tanaka[4], Shiro Ikeda[5], Takanori Kigawa[1,6]
1 RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research
2 PRESTO, JST
3 Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology
4 Graduate School of Informatics, Kyoto University
5 Department of Statistical Inference and Mathematics, The Institute of Statistical Mathematics
6 School of Computing, Tokyo Institute of Technology

Conventional NMR analysis consists of two segregated processes, to assign resonances and to interpret spectra for characteristics, such as structural information, dynamics, and interaction. We integrated these two processes to omit chemical shift determination and to separate overlapped signals. SiCode (Stable isotope encoding), a fractional combinatorial dual amino-acid selective labeling is employed for the assignment of uniquely occurring amino acid pairs. We demonstrate ^{15}N relaxation measurement by factorizing whole spectra as a single tensor. Each component contains amino-acid information for the assignment and relaxation parameters, enabling analysis without chemical shift determination. Overlapped signals are decomposed according to differences in both amino acids and relaxation. Raw time-domain data, including non-uniformly sampled data, can directly be analyzed by this method because overlapped signals can be separated and chemical shift values are unnecessary.

典型的なNMR解析においては、まずシグナル帰属を行い、次にその帰属結果を用いて別のスペクトルを解釈して、構造情報・運動・相互作用などの分子の「特性」の情報を得る。工程が分かれているため、下流工程である特性測定においては、帰属用スペクトルそのものではなく、化学シフトテーブルという単純化された情報を用いればよいという利点がある一方、生のスペクトルに含まれていたはずの豊富な情報は欠落していて活用されない。また、特性測定のためのスペクトルでシグナルが重なってしまうと、仮にそれぞれの帰属がついていたとしても区別がつかない。

そこで我々は、このふたつの工程を統合して扱う新たな測定・解析法を開発した。帰属用のスペクトルと特性測定用のスペクトルの双方に、互いの解析に役立つ情報を仕込んでおき、すべてのスペクトルを統一的に情報処理することで、互いがもつ情報を活かしてより正確に解析をおこ

アミノ酸選択的安定同位体標識、non-uniform sampling、非フーリエ変換NMR

○かさいたくま、おのしゅんすけ、たなかとしゆき、いけだしろう、きがわたかのり

なうことができる。

互いのスペクトルの解析に役立つ情報をもたせるために、我々が開発したアミノ酸選択的安定同位体標識法である符号化標識法（Stable isotope labeling; SiCode）[1]を用いた。符号化標識法では、複数の標識体を用い、アミノ酸ごとに異なる定量的な安定同位体標識パターンを対応させる。^{15}N-HSQCと2次元HN(CO)を測定し、観測されたシグナル強度比から、各アミドシグナルがどのアミノ酸由来であるか知ることができる。デュアル選択標識[2]と同様、i位とi-1位のアミノ酸を決定することができるので、アミノ酸配列中に一度しか現れないアミノ酸ペアについては、この情報のみで帰属が可能である。

本発表では、^{15}N緩和測定への利用例を紹介する（Fig.1）。符号化標識体を用いて、アミノ酸情報を得るための^{15}N-HSQCと2次元HN(CO)、および^{15}N緩和情報を得るためのT_1, T_2, 異種核NOEを測定し、これらすべてのスペクトルを統合してテンソル分解をおこなう。分解された各成分は各アミドに対応しており、各成分の強度から、符号化標識と同様のアミノ酸情報と、緩和時定数等の情報が得られる。「化学シフトの決定」という従来型のシグナル帰属を行わなくとも、アミノ酸情報と緩和情報が直接対応づけられて得られていることから、アミノ酸配列中に一度しか現れないアミノ酸ペアについては、緩和測定ができたことになる。

^{15}N緩和測定では、^{1}H-^{15}N 2次元スペクトルが広く用いられている。^{1}H-^{15}N 2次元平面でシグナルが重なった場合には正確な緩和測定が困難である。そのようなシグナルについては諦めたり、時間のかかる3次元測定をおこなったりする。本法では、たとえ2次元平面で重なったとしてもテンソル分解で正しく分離されればよい。アミノ酸の違い、すなわち標識率の違いにより生じるシグナル強度の違いだけでなく、すべてのスペクトルを統一的に扱っていることから、緩和速度の違いもシグナル分離に活用されている。緩和測定も符号化標識体でおこなっていることから、緩和測定スペクトルにもアミノ酸情報が含まれる。

化学シフトの決定が不要であることから、データが周波数軸である必要もなく、測定した時間軸データをそのままテンソル分解してもよい。不均一サンプリング(non-uniform sampling)データもそのまま解析が可能で、測定時間短縮に役立つ。

本法は、従来型のシグナル帰属すなわち「化学シフトの決定」が不要であること、緩和等の特性の違いをも重複シグナル分離に活用することから、帰属が困難な試料やシグナル重複の多い試料の解析に役立つ新たな手法になると期待される。

[1]Kasai T et al, J Biomol NMR, 2015, 63:213-221

[2]Kainosho M and Tsuji T, Biochemistry, 1982, 21:6273-6279

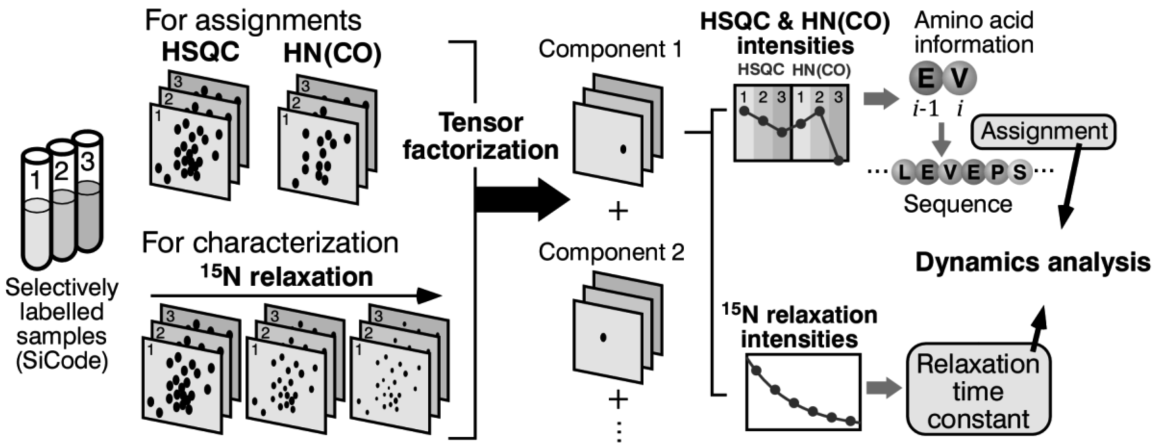


Fig. 1. Schematic representation of the proposed method

L3-8 In-cell NMR法を用いたヒト生細胞内のDNAおよびRNAの構造とダイナミクスの解析

○山置佑大[1]，永田崇[1,2]，清石彩華[2]，三宅雅之[2]，加納ふみ[3]，村田昌之[4]，片平正人[1,2]
1京都大学・エネルギー理工学研究所、2京都大学大学院・エネルギー科学研究科、3東京工業大学大学院・科学技術創成研究院、4東京大学大学院・総合文化研究科

In-cell NMR studies on structure and dynamics of DNA and RNA introduced inside the living human cells

○Yudai Yamaoki[1], Takashi Nagata[1,2], Ayaka Kiyoishi[2], Masayuki Miyake[2], Fumi Kano[3], Masayuki Murata[4], and Masato Katahira[1,2]
1 Institute of Advanced Energy, Kyoto University, 2 Graduate School of Energy Science, Kyoto University, 3 Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, 4Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

The interior of the living cell is extremely crowded with biomolecules. It has long been considered that the structures and functions of macromolecules, such as proteins and nucleic acids, inside the living cells are different from those in *in vitro* conditions. In-cell NMR is a promising method to obtain relevant information. So far, NMR spectra of nucleic acids (NAs) were reported mostly in *Xenopus laevis* oocytes. Since we are interested in the properties in living human cells, we introduced NAs into those cells using a pore forming toxin streptolysin O (SLO) and observed their NMR signals. The observation of the imino-proton signals directly indicates the formation of hydrogen-bonding inside the living human cells. Our current focus is to evaluate the dynamics of NAs by measuring imino-proton/water exchange.

【研究背景および本研究の目的】細胞内のように様々な生体分子が密に存在する分子込み合い環境では、蛋白質や核酸などの生体高分子の構造、ダイナミクス、安定性および活性などが*in vitro*の希薄溶液中とは異なると考えられている。生きた細胞内においてこれらの性質を評価するのに適した手法としてin-cell NMR法があり、主に蛋白質を対象としてこれまで多くの報告がなされてきた[1]。一方、核酸を対象としたin-cell NMR法の報告は非常に限られており、ほとんどがマイクロインジェクション法によってアフリカツメガエルの卵母細胞内に対象とする核酸を導入する系であった[2]。今回我々は、細菌毒素ストレプトリシンO (SLO)を用いてヒト生細胞内に核酸を導入した。そして、ヒト生細胞内においてDNAおよびRNAのイミノプロトンシグナルを観測することに世界に先駆けて成功した[3]。さらに、長時間のin-cell NMR測定を可能とするためバイオリアクターシステム[4]を導入した。アガロースゲルを利用したバイオリアクターシステム[5]を改変し、簡便かつ安定に培地を供給可能にした(Fig. 1)。これにより可能となったイミ

in-cell NMR、核酸、バイオリアクター

○やまおきゆうだい，きよいしあやか，みやけまさゆき，かのうふみ，むらたまさゆき，ながたたかし，かたひらまさと

ノプロトン/水交換速度解析により、生細胞内における核酸構造のダイナミクスを評価する試みについても議論したい。

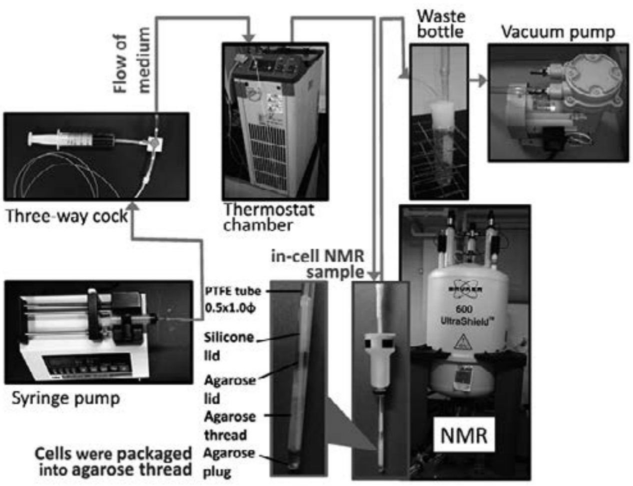


Fig. 1. Bioreactor system for in-cell NMR measurement using agarose gel.

【実験】*In vitro*においてヘアピン構造を形成するRNA (5'-GGCACUUCGGUGCC-3'、2'-OMe化体)を、SLOによって表面に細孔を形成したHeLa細胞とインキュベーションした。その後、$CaCl_2$を添加し、SLOによる細孔をリシールすることで細胞内に封入した。これらの細胞を、ライボビッツL15培地で調製した3%低融点アガロース水溶液と混合し、内径0.5 mmのPTFEチューブ内で凝固させ、細胞を含むゲルチューブを調製した。ゲルチューブをNMR試料管内に注入し、in-cell NMR測定試料とした。10% D_2Oを含むL15培地を供給しながら測定した。

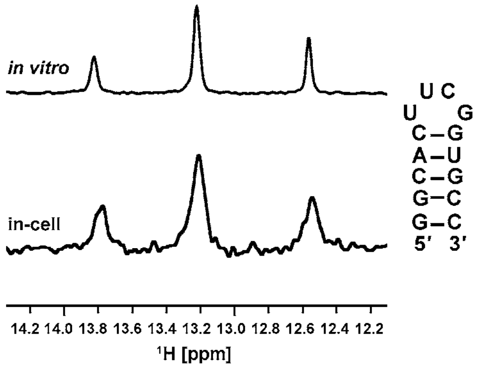


Fig. 2. NMR spectra of hairpin RNA measured under *in vitro* condition (top) and in-cell condition using bioreactor system (bottom).

【結果と考察】SLO法によりヘアピンRNAを導入したHeLa細胞を試料とし、バイオリアクターシステムを用いてNMRスペクトルを測定した。このスペクトルにおいて、イミノプロトン領域に3本のシグナルが観測された。このシグナルパターンは*in vitro*において得られたスペクトルのシグナルパターンと良く一致していた(Fig. 2)。細胞外へと漏れ出たRNA分子は、バイオリアクターシステムにより試料管外に排出されるため、観測されたシグナルは導入したヘアピンRNAのうち細胞内に留まったものに由来する。核酸のイミノプロトンは溶媒交換性であり、塩基対中のように水素結合を形成し、溶媒との交換が抑えられた場合にのみシグナルが観測される。したがって、細胞内におけるイミノプロトンシグナルの観測は、導入したRNAが細胞内において塩基対を形成していることを強く示唆している。さらにイミノプロトンシグナルの化学シフト値は核酸のコンフォメーション変化に敏感である。そのため、*in vitro*およびin-cellで得られたスペクトルのシグナルパターンの一致は、細胞内においても*in vitro*における構造と似たヘアピン構造が保持されていることを示している。

一方で、*in vitro*またはin-cell条件下におけるRNAに対するインバージョンリカバリー法を用いたイミノプロトン/水の交換速度解析の結果からは、細胞内のRNAヘアピン構造は*in vitro*よりも不安定化していることが示唆された。つまり、細胞内では*in vitro*構造と似たRNAヘアピン構造が保持されている一方、その構造安定性が*in vitro*よりも低下している可能性がある。

References [1] Luchinat, E. and Banci, L. (2017) *IUCrJ*, 4, 108-118. **[2]** Giassa, I.C., Rynes, J., Fessl, T., Foldynova-Trantirkova, S. and Trantirek, L. (2018) *FEBS Lett*., 592, 1997-2011. **[3]** Yamaoki, Y., Kiyoishi, A., Miyake, M., Kano, F., Murata, M., Nagata, T. and Katahira, M. (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20, 2982-2985. **[4]** Kubo, S., Nishida, N., Udagawa, Y., Takarada, O., Ogino, S. and Shimada, I. (2013) *Angew. Chem. Int. Ed*., 52, 1208-11. **[5]** Breindel, L., DeMott, C., Burz, D.S. and Shekhtman, A. (2018) *Biochemistry*, 57, 540−546.

L3-9 常磁性プローブを利用したマルチドメインタンパク質のアンサンブル構造解析

○斉尾 智英[1,2]，瀧下 俊平[2]，平松 蒼野[2]，浅田 瑞枝[3]，中村 敏和[3]，
石森 浩一郎[1,2]
1北海道大学 大学院理学研究院
2北海道大学 大学院総合化学研究院
3分子科学研究所

Conformational ensemble of a multidomain protein tracked by paramagnetic lanthanide probe

○Tomohide Saio[1,2], Shunpei Takishita[2], Soya Hiramatsu[2], Mizue Asada[3], Toshikazu Nakamura[3],
Koichiro Ishimori[1,2]
1Graduate School of Science, Hokkaido University
2Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University
3Institute for Molecular Science

Despite the fact that multi-domain proteins are abundant and play important roles in the cell, the mechanisms are often not well understood, due to the lack of structural information. The structural study for multi-domain proteins is often challenging owing to their dynamic properties. Although long-range structural information obtained from paramagnetic lanthanide probe is useful in the structural analysis, the information is sometimes hindered due to the fast conformational exchanges that averages the resonances from each of the states. To overcome this averaging issue, we have exploited distance measurement by ESR. Ensemble analysis with combined use of paramagnetic information from NMR and inter-metal distance distribution from ESR succeeded in resolving the averaged paramagnetic effects and thus visualizing multiple conformational states.

[背景]

複数のドメインから構成され，その相対配置を大きく変化させることによって機能するマルチドメインタンパク質の作用機序を明らかにするためには，その動的な立体構造変化をバイアスなく観測することが重要である．そこでは常磁性ランタノイドプローブ法の活用が有効なツールとなる．常磁性ランタノイドイオンからの空間的な位置に依存して観測される, pseudocontact shift (PCS) などの常磁性効果を定量的に解析することによって，マルチドメインタンパク質の溶液中での立体構造とその変化を解析することが可能になる[1]．しかし，NMR解析においては交換による平均化の問題が存在する．例えば，タンパク質が溶液中で複数のコンフォメーションとして存在し，かつその状態間で交換が十分に早い場合はNMR信号が平均化され，その場合の化学シフト値 (すなわちPCSから得られる距離・角度情報) はいずれのコンフォメーションにも対応しない．交換がある状態で常磁性ランタノイドプローブ法の情報を正しく活用するためには，他の手法と組み合わせ，平均化によって失われた情報を再構築する必要がある．本研究では

常磁性ランタノイド，マルチドメインタンパク質，アンサンブル解析

○さいお ともひで，たきした しゅんぺい，ひらまつ そうや，あさだ みずえ，なかむら としかず，いしもり こういちろう

特に，ESRによってランタノイドイオン間の距離情報を取得し，PCSと相補的に用いることによって平均化問題の解消を試みた．具体的には，3つのドメインから構成される47 kDaマルチドメインタンパク質MurDを対象とした解析を行った．Caged Lanthanide NMR Probe-5 (CLaNP-5) [2]によってMurDの任意の位置にランタノイドイオンを固定し，MurDの立体構造，特にdomain 3のコンフォメーションについて解析を行った (Fig.).

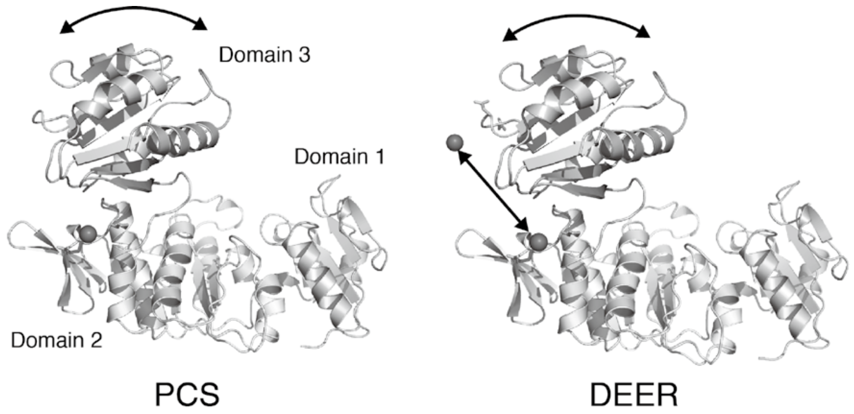


Fig. The structure of MurD consisting of the three domains (PDB code: 1e0d). The lanthanide ion (sphere) was fixed on the domain 2 for PCS observation (left), and on the domain 2 and 3 for DEER distance measurement (right).

[方法]

MurD domain 3のコンフォメーションを追跡するために，MurDのタンパク質表面にシステイン変異を導入し，ジスルフィド結合2点によってCLaNP-5タグを固定し，ランタノイドイオンを固定した．NMRによるPCS観測のためには，domain 2の1箇所にCLaNP-5を導入した試料を用いた (Fig.)．ESRによる距離測定のためには，domain 2とdomain 3のそれぞれ1箇所ずつにランタノイドイオン, 特にガドリニウムイオン (Gd^{3+}) を固定した試料に対してdouble electron-electron resonance (DEER) 測定を行った (Fig.)．DEER測定は10 Kの凍結試料に対して測定した.

[結果・考察]

阻害剤が結合したMurDについて観測されたPCSは，closed状態として決定された結晶構造 (PDB code: 3uag) から計算された理論値と良い対応を示したのに対し，apo状態のMurDについて観測されたPCSは，open 状態として決定された結晶構造 (PDB code: 1e0d) からの理論値から大きくずれる場合が多かった．PCSに基づいたrigid-body計算によってdomain 3の位置の最適化を試みたが，観測PCSを満たす一状態を見つけることはできなかった．さらに，ESR DEER測定によって，domain 2とdomain 3に固定したGd^{3+}間の距離分布を計測した結果, 複数の距離成分が検出された. 以上より, apo状態のMurDが複数のコンフォメーション間の速い交換として存在すると考えられた．観測されたPCS情報と，DEER測定によって得られた距離分布に基づいたアンサンブル解析を行った結果，apo MurDのコンフォメーション平衡を構成する，少なくとも3種の主要な状態を明らかにすることに成功した.

[引用文献]

(1) Saio, T.; Ogura, K.; Kumeta, H.; Kobashigawa, Y.; Shimizu, K.; Yokochi, M.; Kodama, K.; Yamaguchi, H.; Tsujishita, H.; Inagaki, F. *Sci. Rep.* 2015, 5, 16685.

(2) Keizers, P. H. J.; Saragliadis, A.; Hiruma, Y.; Overhand, M.; Ubbink, M. *J. Am. Chem. Soc*. 2008, 130 (44), 14802.

L3-10 レオロジーNMRによるアミロイド形成時のタンパク質構造変化の追跡

○森本大智[1], Erik Walinda[2], 島田陽介[1], 岩川直都[1], Ulrich Scheler[3], 山本昭彦[4], 白川昌宏[1], 菅瀬謙治[1]
1京都大学大学院・工学研究科
2京都大学大学院・医学研究科
3Leibniz Institute of Polymer Research Dresden
4ブルカー・バイオスピン株式会社

Tracking protein structural changes in amyloid formation by using Rheo-NMR spectroscopy

○Daichi Morimoto[1], Erik Walinda[2], Yosuke Shimada[1], Naoto Iwakawa[1], Ulrich Scheler[3], Akihiko Yamamoto[4], Masahiro Shirakawa[1], and Kenji Sugase[1]
1Graduate School of Engineering, Kyoto University
2Graduate School of Medicine, Kyoto University
3Leibniz Institute of Polymer Research Dresden
4Bruker BioSpin K.K.

Abnormal protein aggregation is a common hallmark of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Despite the growing interest in their pathogenesis, no existing method can capture aggregate nucleation and subsequent growth at atomic resolution in real time. In this study, we have recently established high-sensitivity Rheo-NMR spectroscopy that enables us to detect atomic-level structural changes of a protein during amyloid formation in real time. By using the newly developed Rheo-NMR, we detected site-specific structural information on amyloidogenic proteins such as polyubiquitin chains, superoxide dismutase 1, and α-synuclein during their amyloid formation at atomic resolution. Notably, in the formation of polyubiquitin fibrils, we detected the chemical shift changes of the side chains of residues located in flexible regions such as the edges of the alpha-helix and loops. These observations are consistent with our hydrogen-deuterium exchange results of polyubiquitin fibrils that the intrinsically flexible regions became highly solvent-protected in the fibril structure. Thus, inter-molecular associations and secondary structure changes in the identified flexible regions can take place in the course of fibril formation.

アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患に共通する病理学的特徴は、神経細胞に異常なタンパク質凝集体（アミロイド）が蓄積することである。これまで、アミロイドの物質的、構造学的特徴は深く研究されているが、その形成機序に関しては原子レベルの情報が不足している。そこで本研究では、NMR管内の試料に剪断流を加えることの出来るレオロジーNMR法を用いて、アミロイドが形成する「その場」を原子レベルかつリアルタイムで解析することを目指した。だが、既存のレオロジーNMR法は感度が低く、低濃度もしくは高分子量試料に関しては適していないため、我々はクライオプローブ装着のNMR装置に適用できるレオロジーNMR法を新たに開発した[1]。

レオロジーNMR，アミロイド

○もりもとだいち，ゔぁりんだえりっく，しまだようすけ，いわかわなおと，
しぇらーうるりっひ，やまもとあきひこ，しらかわまさひろ，すがせけんじ

先行研究において、翻訳後修飾因子であるポリユビキチンがアミロイドを形成することを見出した[2]。そこで、M1結合型ヘキサユビキチンを用いて、開発したレオロジーNMR装置によって線維が形成するかどうかを検証したところ、35 Hzのスピナー回転による剪断流によって、チオフラビンT陽性のアミロイド線維を形成した(Fig. 1)。加えて、アミロイド形成に際し、$^{1}H-^{13}C$ HSQCスペクトル中の複数のクロスピークについて、化学シフト変化があることが分かった(Fig. 2)。変化の大きかった残基は、天然構造で高次構造を形成していない領域に主に分布しており、特にプロリン残基は全て含まれていた。このことから、プロリンのシス-トランス異性がヘキサユビキチンの線維形成に関わっていることが示唆されるとともに、天然構造で比較的柔軟な構造を取っている領域に位置する残基が線維形成に伴う構造変化に関与していると考えられる。

また、レオロジーNMR測定で特定した構造変化領域では、線維の重水素交換実験で、特徴的なプロファイルが得られた。線維を重水素交換し、DMSO中で変性させ、溶液NMR測定することで重水素交換の度合いを定量化したところ、線維形成前に高次構造を形成していないループ領域が、線維状態では重水素交換から保護されていることが分かった(Fig. 3)。これは、線維形成時にこれらの領域が構造変化を引き起こし、溶媒と接することが少ない線維のコアを形成していることが考えられる[3]。このように、レオロジーNMRで捉えた線維形成における構造変化領域は、重水素交換実験により、線維のコア構造を形成することが示された。

本発表では、これらのポリユビキチンのアミロイド形成の結果に加え、筋萎縮性側索硬化症関連タンパク質superoxide dismutase 1やパーキンソン病関連タンパク質α-synucleinに関するアミロイド形成に関する最新のレオロジーNMRデータを発表する予定である。

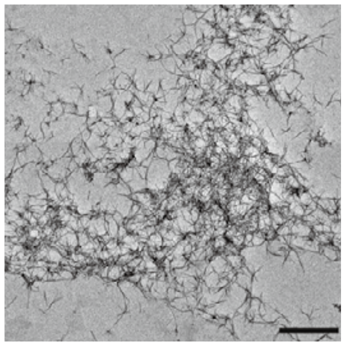


Fig. 1. Electron microscopy image of sheared M1-linked hexaubiquitin[1].

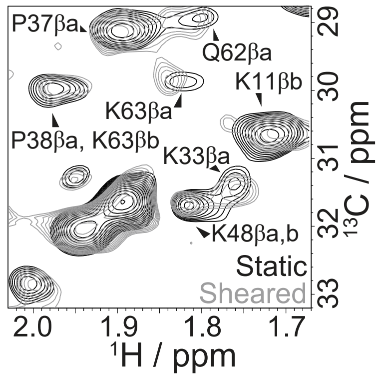


Fig. 2. Cross-peak changes in the $^{1}H-^{13}C$ HSQC spectra of M1-linked hexaubiquitin during fibril formation[1].

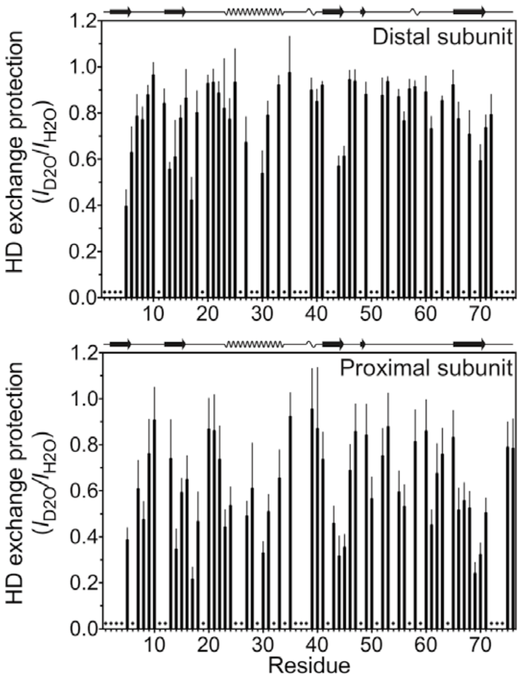


Fig. 3. Hydrogen exchange profiles of M1-linked diubiquitin fibrils[3].

References
[1] Morimoto, *et al*., Anal. Chem., 2017, 89 (14), 7286-7290.
[2] Morimoto, *et al*., Nat. Commun., 2015, 6, 6116.
[3] Morimoto, *et al*., Polymers, 2018, 10 (3), 240.

L3-11 血清中での抗体間の相互作用解析

○谷中冴子[1,2]，山崎俊夫[3]，輿語理那[1,2]，矢木宏和[2]，加藤晃一[1,2]
1自然科学研究機構　生命創成探究センター/分子科学研究所
2名古屋市立大学　大学院薬学研究科
3理化学研究所　放射光科学研究センター

Application of tailored deuteration to *in-serum* NMR of antibody interactions

○Saeko Yanaka[1,2], Toshio Yamazaki[3], Rina Yogo[1,2], Hirokazu Yagi[1,2], Koichi Kato[1,2],
1 Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences
2 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University
3 RIKEN SPring-8 Center

We have been developing *in-serum* NMR method focusing on antibody glycoproteins. Observation of the full-length IgG was hindered by its large molecular mass (150 kDa). Here we applied transverse relaxation optimization by tailored deuteration of selected amino acid residues using a mammalian expression system. We obtained mouse IgG2b labeled with [δ2-^{13}C; Hα, Hβ, Hγ, Hδ1–$^{2}H_7$]leucine, which exhibited significant reductions of varying magnitudes in peak intensity in human serum. Intensity attenuation was far more pronounced in the peaks originating from the Fab portion. Similar spectral changes were induced by Fab fragments derived from human serum polyclonal IgG. This raises the possibility that the preexisting antibodies in serum are reactive with the Fab portion of other antibodies and thereby influence their antigen binding activities. Our approach offers a useful probe for the characterization of molecular interaction networks in multimolecular crowded systems.

分子が混み合った血中の環境では、様々な蛋白質同士が衝突しあい、希釈溶液中では無視されてきた弱い相互作用が増強される。このような非特異的相互作用は抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品を設計開発する際に問題となる。しかし、このような血中環境と希釈溶液中での相互作用の違いはこれまで見落とされてきた。本研究では、血中の混み合い環境での抗体と血中因子との特異的あるいは非特異的な相互作用を明らかにすることを目的とし、NMR を用いた相互作用の観測と解析を行なった。

これまで我々は動物細胞発現系を用いて免疫グロブリン G（IgG）に安定同位体標識を施す技術を開発してきた。これを用いて、糖タンパク質である IgG の Fc 領域（分子質量 52kDa）について NMR 観測および解析に成功し、Fc 領域と血清成分との相互作用についても明らかにしてきた。しかしながら、動物細胞発現系では重水素化を施すことができず、IgG は NMR での計測を行うには高分子量（150kDa）であるため、線幅が広幅介してしまい、IgG 全長の観測と解析は実現できていなかった。そこで、部位選択的に重水素化を施すことによりスペクトルの改善に取り組んだ。これにより、IgG すべてのロイシンのメチル基について良好なシグナルを得られることを確認した（Fig. 1）。

血清存在下で Fc 領域のシグナルを観測したところ、Fab, Fc 双方に由来する多くのシグナルが選択的な減弱を示した(Fig. 2)。このことは、Fc が血清中の成分と何らかの相互作用をしていることを意味する。血清中の主要な蛋白質成分はアルブミンとポリクローナル IgG である。

血清、抗体、混み合い環境
○やなかさえこ、やまざきとしお、よごりな、やぎひろかず、かとうこういち

そこで、これらの蛋白質と安定同位体標識 IgG との相互作用を検討したところ、IgG は血清中のポリクローナル IgG の Fab 領域と相互作用することが明らかとなった(Fig. 2)。これらの結果は、特定の抗原によって感作されていない血液環境においても、そこに内在するポリクローナル IgG によって、抗体が認識され、免疫機能に影響を与え得ることを示唆している。

本研究で開発した NMR 観測手法は、バイオ医薬品の評価や血中環境での分子認識メカニズムの解明など様々な応用展開が期待される。

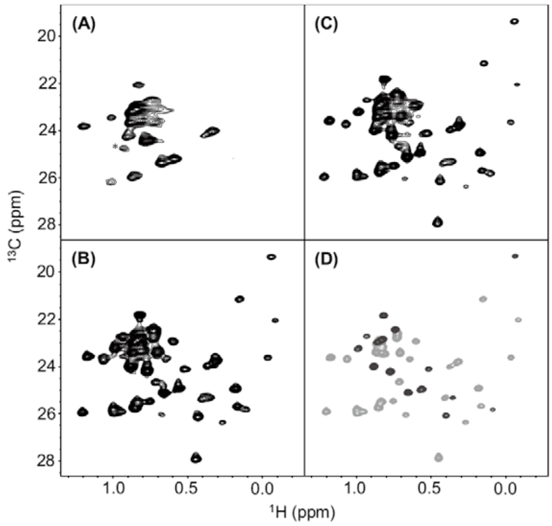


Fig. 1 Methyl-TROSY spectraof mouse IgG labeled with a[δ2-^{13}C]leucine, b [δ2-^{13}C;Hα, Hβ, Hγ, Hδ1–$^{2}H_7$]leucine, and c [δ2-^{13}C; Hα, Hβ, Hγ,Hδ1–$^{2}H_7$]leucine plus [$^{2}H_7$] glucose. d Superposition of methyl-TROSY spectra of the Fab (gray) and Fc (black) fragments derived from mouse IgG2b labeled with [δ2-^{13}C; Hα, Hβ, Hγ, Hδ1–$^{2}H_7$]leucine plus [$^{2}H_7$]glucose.

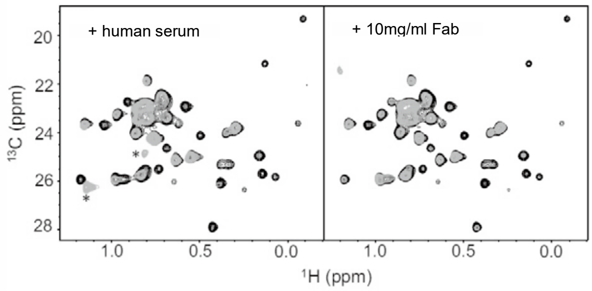


Fig. 2 Methyl-TROSY spectra of mouse IgG obtained in 5 mM sodium phosphate buffer containing 50 mM NaCl and 10% (v/v) D_2O are shown in black and the NMR spectra with serum or with 10 mg/ml Fab derived from human serum IgG are shown in gray. The peak originating from the serum component is indicated by an asterisk.

References

(1) Yanaka S, Yagi H, Yogo R, Yagi-Utsumi M, Kato K. Stable isotope labeling approaches for NMR characterization of glycoproteins using eukaryotic expression systems. *J Biomol NMR* 1-10 (2018)

(2) Kato K, Yanaka S, Yagi H. Technical basis for nuclear magnetic resonance approach for glycoproteins In: Experimental approaches of NMR spectroscopy-Methodology and application to life science and materials science- *Springer (Singapore)*, 415-438 (2018)

(3) Yanaka S, Yamazaki T, Yogo R, Yagi H, Kato K. An NMR approach for characterizing antibody interactions in serum environment. *Molecules* **22**:1619 (2017)

L3-12 クモ牽引糸の高強度・高弾性の起源と固体NMR構造解析

○朝倉哲郎[1], 松田裕生[1], 田制侑悟[1], 西村明生[1], 片岡奈緒美[1], 今井亜希子[1]
1. 東京農工大学大学院 工学研究科

Origin of High Strength and High Elasticity of Spider Dragline Silk Fiber and The Solid-State NMR Analysis

○Tetsuo Asakura, Hironori Matsuda, Yugo Tasei, Akio Nishimura, Naomi Kataoka, Akiko Imai
Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japan

Spider dragline silks have attracted researchers in many field because of the toughest protein fibers known in nature. The primary structures are repeated ones of polyalanine (PLA) and Gly-rich regions. For the first time, we could determine the relative percentages of "rectangular" and "staggered" packing arrangements in the PLA regions from deconvolution analyses of the Ala ^{13}Cβ peaks. For analysis of the Gly-rich region, ^{13}C selectively labeled 47-mer model peptides were synthesized and the ^{13}C CP/MAS NMR was used to determine the fractions of the conformations of individual ^{13}C labeled Gly and Ala residues. Although the fraction of β-sheet components tended to increase and the fraction of random coil component decrease toward both chain ends, significant change in the fractions was observed depending on the amino acid position. These results were successfully rationalized through molecular dynamics simulation. On the basis of these results, the presence of 3_{1}- helix in the Gly-rich region proposed previously was disproved clearly.

＜緒言＞
クモ牽引糸は天然で最も強くタフな繊維と言われる。その特性を生かして実用化に向けた新たな材料を創製しようとする研究が世界中で始まってきた。その一次構造は、アラニン連鎖（PLA）領域とグリシンリッチ（Gly-rich）領域が交互に繰り返された構造をとっており、前者が高強度、後者が高弾性の源であると考えられる。本研究は、固体 NMR を駆使して、クモ牽引糸の詳細な構造とダイナミクスを解明することを目的とした。クモ牽引糸の PLA 領域については、一連のアラニンオリゴペプチドの研究成果 [1] を基盤として、パッキング構造の解明を行った。一方、不規則な一次構造を有する Gly-rich 領域は、基本的にアモルファスであるため、構造解析は容易ではない。そこで、クモ牽引糸の Gly-rich 領域と同じ一次構造を有する 47 量体のモデルペプチドを合成、部位選択的に ^{13}C ラベル化を行って、各残基のコンフォメーションの分率を決定した。さらに、分子動力学計算を行い、同じ部位の分率を理論的に決定、比較した。研究対象は 2 種類の女郎グモから得られた絹、ならびにオニグモの配列を有する人工クモ絹である。
＜実験＞
PLA 領域のパッキング構造研究のため、本学構内で採取した女郎グモに[3-^{13}C]Ala 水溶液を与え、[3-^{13}C]Ala-クモ牽引糸を得た。また、[3-^{13}C]Ala-人工クモ絹は、スパイバー（株）から恵与された。一方、$(E)_4(A)_6$GGAGQGGYGGLGSQGAGRGGLGGQGAG$(A)_6(E)_4$（47 量体）を Gly-rich 領域を反映したモデルペプチドとし、適宜、部位選択的に ^{13}C ラベルを行い、固相法を用いて合成した。^{13}C 固体 NMR 測定は、Brucker Avance 400 NMR 装置を用い、さらに、ダイナミクスの情報を得るために、併せて ^{13}C 固体 NMR スピン―格子緩和時間、T_1 の測定も行った。MD 計算は、MD ソフトウェア LAMMPS ならびに力場 OPLS-AA を用いて行った。さらに、レプリカ交換 MD (REMD) によるサンプリングや STRIDE アルゴリズムを適用して構造解析を行った。

クモ牽引糸、パッキング構造、^{13}C CP/MAS NMR、

○あさくらてつお、まつだひろのり、たせいゆうご、にしむらあきお、かたおかなおみ、いまいあきこ

＜結果と考察＞

１．クモ牽引糸のアラニン連鎖領域の構造

我々は、一連のアラニンオリゴペプチドの ^{13}C CP/MAS NMR 研究から、鎖長が 6 と 7 の間でメチルピークの線形が著しく異なることを見出し、 β-sheet 面の重なり具合が異なる 2 種類のパッキング構造、前者は Rectangular (R と略) 構造、後者は Staggered (S と略) 構造に対応することを報告してきた。[1]

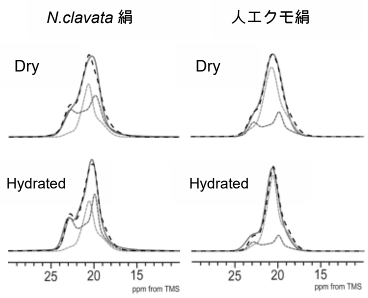


Fig 1 Observed and simulated Ala Cβ peaks with exclusively β-sheet structures in dry and hydrated states. (Left) [3-^{13}C]Ala-*N.clavata* silk fibers and (Right) [3-^{13}C]Ala-recombinant spider silk. The observed patterns (red solid lines) were reproduced by superpositions (black broken lines) of the Ala C β peak patterns of $(Ala)_6$ (orange broken lines) and $(Ala)_7$ (green broken lines).

そこで、2 種類のクモ絹（*N.clavata* 絹と人工クモ絹）のアラニンメチルピーク (β-sheet 領域のみ)の線形を注意深く観察すると、R と S の構造が混在していることがわかった。
最終的に、*N.clavata* 絹の R 構造の割合を、乾燥状態で 49±8%, 含水状態で 40±7%、一方、人工クモ糸の場合は、乾燥状態では 62±11%、含水状態では 81±5%と決定できた（Fig.1）。[2]
すなわち、この 2 種類のパッキング構造の割合は、クモ糸の種類や乾燥・含水のような周囲の環境によって異なった。
従って、クモは、周囲の環境によって、牽引糸の PLA 領域 (β-sheet) のパッキング構造を変えていると言える。

２．クモ牽引糸のグリシンリッチ領域の構造とダイナミクス

不規則な Gly-rich 領域の一次構造領域を解析するために、その一次構造を保持し、長い鎖長を有するモデルペプチドを合成した。その際、両端にグルタミン酸連鎖を付与して水溶性とし、クモの繊維化機構に習って pH を下げて β-sheet 構造を形成させた [3]。適宜、^{13}C 固体 NMR 解析用に部位特異的にラベル化を行った。[2-^{13}C]Gly[3-^{13}C]Ala[1-^{13}C]Gly の連続した ^{13}C ラベル連鎖を Gly-rich 領域中、部位をかえて導入した。
そして、[3-^{13}C]Ala と[1-^{13}C]Gly の各 ^{13}C ラベルピークについて、構造依存化学シフトに基づいてピーク分離を行うことで、残基毎のコンフォメーション分率を決定した。

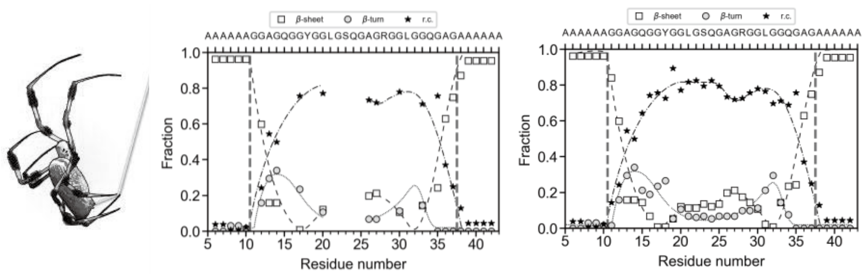


Fig.2 Plots of the fractions of several conformations (β-sheet, β-turn and random coil) of Gly and Ala residues against the ^{13}C labeled position in the Gly-rich region of 47-mer peptides. (left): determined by ^{13}C CP/MAS NMR and (right): calculated by MD.

Fig.2（left）に実測結果をまとめたように、β-sheet 構造を有する両端の$(Ala)_6$連鎖近傍に位置する Gly-rich 域の残基は、β-sheet の割合が多いが中央に向かって急激に減少、反対に中央では random coil の割合が多くなる。しかしながら、その割合の変化は一様ではなく、一次構造の配列に依存してかなり異なる。さらに β-turn 構造も一定の割合で出現するが、両端の$(Ala)_6$部分から少し離れたところで最も多い。これらの実験結果の特徴は、MD 計算（Right）によって十分に再現することができた [3]。
尚、Gly-rich 領域については、これまで、固体 NMR 研究に基づいて 3_1-helix 構造を取るという提案がなされてきた。[4-6] しかしながら、その場合、メチルピークは、17.4ppm にシングルピークを示すはずであるが、それは観測されなかった。従って、本研究によって 3_1-helix 構造は明確に否定された。[3]

＜参考文献＞1. Asakura, T. et al., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, 51, 1212–1215. 2. Asakura, T. et al., *Macromolecules* **2018**, 51,1058-1068. 3. Asakura, T. et al., *Macromolecules* **2018**, 51, 3608-3619.
4. Kummerlen, J. et al., *Macromolecules* **1996**, 29, 2920-2928. 5. van Beek, J. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **2002**, 99, 10266–10271. 6. Gray, G.et al., *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 2023–2035.

＜謝辞＞本研究は一部、平成 26 年度科研費基盤 A(課題番号 26248050)ならびに ImPACT プロジェクトにより実施された。^{13}C ラベル化人工クモ糸を恵与頂いたスパイバー㈱にお礼申し上げる。

ポスター発表要旨

Poster Abstracts

P1 受容体ニューロピリン1に結合する新規HTLV-1外被糖蛋白質配列の同定

○楠英樹[1]，田中俊之[2]，河野俊之[3]，細田和男[4]，若松馨[4]，浜口功[1]
1 国立感染症研究所　血液・安全性研究部
2 筑波大学大学院　生命環境科学研究科
3 北里大学医学部　生化学
4 群馬大学大学院理工学府　分子科学部門

Identification of the novel neuropilin-1-binding sequence in HTLV-1 envelope glycoprotein

○Hideki Kusunoki [1], Toshiyuki Tanaka[2], Toshiyuki Kohno[3], Kazuo Hosoda[4], Kaori Wakamatsu[4], Isao Hamaguchi[1]
[1]Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases
[2]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
[3]Department of Biochemistry, Kitasato University School of Medicine
[4]Department of Chemistry and Chemical Biology, Graduate School of Engineering, Gunma University

Entry of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) into host cells is mainly mediated by interactions between the viral envelope glycoprotein surface unit (SU) and three host receptors: glucose transporter type 1, heparin/heparan sulfate proteoglycan, and neuropilin-1 (Nrp1). Here, we analyzed the interaction between HTLV-1 SU and Nrp1 using nuclear magnetic resonance and isothermal titration calorimetry. We found that two SU peptides, residues 85–94 and residues 304–312, bound directly to the Nrp1 b1 domain with affinities of 7.4 and 17.7 μM, respectively. The binding modes of both peptides were almost identical to each other. Our results suggest that the C-terminal region of HTLV-1 SU contains a novel site for direct binding of virus to the Nrp1 b1 domain.

序論

ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-1）は成人T細胞白血病（ATL）の原因ウイルスである。その外被糖蛋白質（ENV）は表面蛋白質（SU/gp46）と膜融合蛋白質（TM/gp21）から構成される。HTLV-1のエントリー（感染）は、SUとその受容体の1つであるニューロピリン１（Nrp1）との相互作用を介して生じると考えられている。Nrp1は分子量約130kDaからなる1回膜貫通型蛋白質であり、5つの細胞外ドメイン（a1, a2, b1, b2, cドメイン）を持つ。現在、SUのアミノ酸残基90–94（KKPNR配列）がNrp1 b（b1/b2）ドメインの特にb1ドメインとの結合に関与していると考えられている[1]。

Nrp1 b1ドメインと相互作用する分子において、(R/K)XX(R/K)モチーフ（Xは任意のアミノ酸）のC末端のR/Kが必須である[2]。そこで、SUのC末端側となる残基308–312（SRSRR配列）に注目し、これら残基を含むペプチドとNrp1 b1ドメインとの相互作用解析を実施した。これらの結果から、HTLV-1 SUのC末端側がNrp1 b1ドメインと直接結合する可能性が示唆された[3]。

HTLV-1、ニューロピリン1（Nrp1）、分子間相互作用

○くすのきひでき、たなかとしゆき、こうのとしゆき、ほそだかずお、わかまつかおり、はまぐちいさお

結果と考察

HTLV-1 SUのアミノ酸残基90–94とSUのC末端側となる残基308–312を含むペプチド[SU(85–94), FPHWIKKPN**R**、SU(304–312), (W)PTLGSRSR**R**、WをN末端に付加]をそれぞれ^{15}Nで安定同位体標識したNrp1 b1ドメイン溶液に添加するNMR滴定実験を行った。その結果、Nrp1 b1ドメインのアミドシグナル変化が観測された。各ペプチドを5等量添加したとき、各アミドシグナルはほとんど変化しなくなった。5等量の各ペプチド存在下で有意に変化したアミドシグナルの残基をNrp1 b1ドメインの構造にマッピングしたところ、b1ドメインの(R/K)XX(R/K)モチーフ結合サイトに結合することが明らかになった（Fig. 1）。SU(85–94)/Nrp1 b1ドメインとSU(304–312)/Nrp1 b1ドメインの結合親和性（K_d）を等温滴定カロリメトリー法で調べたところ、それぞれ、7.4 μM と17.7 μMであった。一方で、アミノ酸残基90–94（KKPNR配列）を中心に含むペプチド[SU(88–97), WIKKPN**R**NGG]とSU(304–312) のR312A変異体ペプチド[SU(304–312)-R312A, (W)PTLGSRSR**A**、WをN末端に付加]をNrp1 b1ドメイン溶液に過剰に添加してもアミドシグナル変化はほとんど生じなかった。これらの結果から、HTLV-1 SUペプチドのC末端にあるアルギニン残基が、Nrp1 b1ドメインとの結合に重要であることが示唆された。

Nrp1 b1ドメインの(R/K)XX(R/K)モチーフ結合サイトに存在するアミノ酸残基（Y297, D320, S346, T349, Y353）などをアラニンに置換したNrp1 b1変異体を作製し、SU(85–94)とSU(304–312)に対する結合をGSTプルダウンアッセイで調べた。その結果、NMR滴定実験で得られた結果（Fig. 1）を支持し、これらのアラニン置換体（Y297A, D320A, S346A, T349A, Y353A）では各ペプチドの結合が弱くなることが確認された。本研究結果から、HTLV-1 SUのSRSRR配列を持つC末端側がNrp1 b1ドメインと直接結合する可能性を新たに見出した。

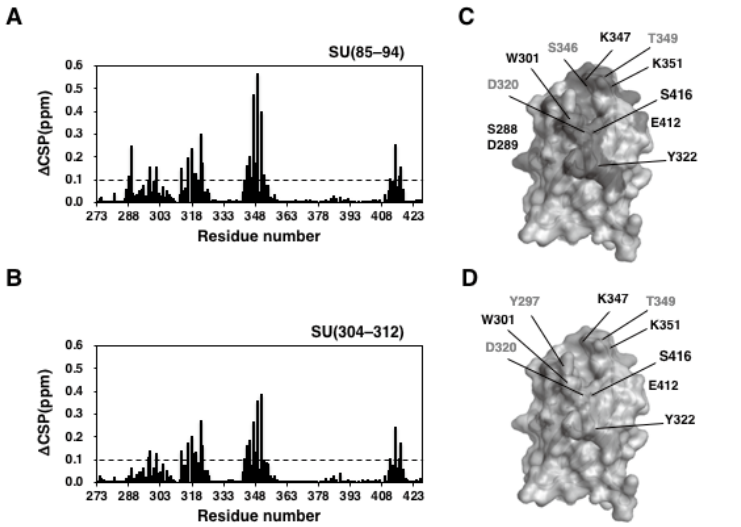


Fig. 1 Analysis of the SU(85–94) and SU(304–312) binding sites in the Nrp1 b1. (A and B) Chemical shift perturbations (ΔCSP, in ppm) of the backbone amide signals of Nrp1 b1 induced by binding of (A) SU(85–94) and (B) SU(304–312). (C and D) PyMOL models of the Nrp1 b1 domain (PDB code 1KEX) showing the residues affected (≥0.1 ppm of ΔCSP) by (C) SU(85–94) and (D) SU(304–312).

References

(1) Lambert, *et al.*, Blood **113** (2009), 5176–5185.

(2) Teesalu, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **106** (2009), 16157–16162.

(3) Kusunoki, *et al.*, BBA-Proteins and Proteomics **1866** (2018), 541–548.

P2 脂質バイセルに結合したシトクロム*c*の動的性質のNMR研究

○長尾 聡・小林 紀・廣田 俊
奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学領域

NMR study on dynamic properties of cytochrome *c* bound to lipid bicelles

○Satoshi Nagao, Hisashi Kobayashi, Shun Hirota
Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology

Cytochrome *c* (cyt *c*) is a heme protein located in mitochondria, where it transfers electrons in the respiratory chain. Cyt *c* associates with the inner mitochondrial membrane by interaction with cardiolipin (CL), which may increase the peroxidase activity of cyt *c*. Although the cyt *c*−CL interaction plays an important role to alter the cyt *c* function, the detailed mechanism of the function conversion is unclear. In this study, we performed the solution NMR analysis of cyt *c* bound to lipid bicelles.

シトクロム*c* (cyt *c*)はミトコンドリア膜間部で電子伝達を担うタンパク質であるが、ミトコンドリア内膜中に存在するリン脂質であるカルジオリピン(CL)との相互作用により、アポトーシス誘導に重要なペルオキシダーゼ活性を発現する。Cyt *c* とCLの相互作用はcyt *c*の機能変換に関与するとされているが、cyt *c*のCLとの相互作用部位や、CL結合状態のcyt *c*の構造の詳細は不明である。本研究では、分子量が小さい脂質二分子膜バイセルを用いることで、溶液NMRによる原子レベルでのcyt *c*と脂質膜の相互作用解析を可能にし、CL含有膜およびCL模倣膜とのcyt *c*の相互作用部位および脂質膜結合状態のcyt *c*の構造を調べた。

まず、CL含有バイセルを用いた溶液NMR解析により、CL含有膜に対するcyt *c*の相互作用部位の特定を試みた。CLを1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC)および1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC)と緩衝液中で混合することで、サイズが約9 nmと小さく均一なCL含有バイセルを作製した。CL含有バイセルの存在下および非存在下でcyt *c*の^{1}H–^{15}N HSQCスペクトルを測定し、CLとの相互作用に関与するアミノ酸残基を主鎖NH信号の化学シフト摂動(CSP)により検出したところ(**Figure 1**)、cyt *c*表面の広い領域のアミノ酸残基が特定された (**Figure 2**)。CSPが観測されたアミノ酸残基の中には、CLと静電的に相互作用するとされているLys残基が7つ含まれていた。7つのLys残基のうちcyt *c*表面で反対側に位置する2つのLys残基の一方をAla置換したK8AおよびK72A変異では、いずれもCL含有バイセルの添加に伴い、

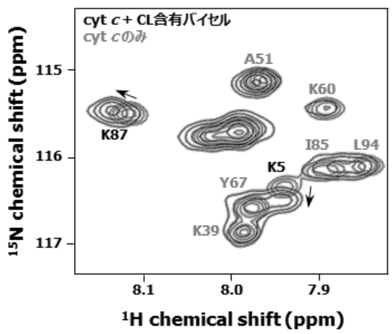


Figure 1. CL 含有バイセルの添加に伴う主鎖 NH 信号の CSP。

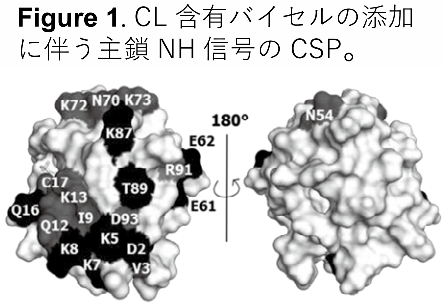


Figure 2. CSP が大きいアミノ酸残基の cyt *c* 構造へのマッピング。

シトクロム*c*、脂質膜、相互作用解析

○ながおさとし、こばやしひさし、ひろたしゅん

変異導入部位近傍だけでなく、cyt *c*の広い領域にCSPの減少が観測された。この結果より、CLとの相互作用部位に含まれる複数のLys残基はバイセル中のCL分子と、それぞれ独立ではなく、協同的に相互作用することが示された。[1] さらに、Cyt *c*のCL含有バイセルとの相互作用部位は、ミトコンドリアでのcyt *c*の酸化還元パートナーである複合体IIIや複合体IVとの相互作用部位と類似していた。[2,3]この結果は、cyt *c*が酸化還元パートナーと同様の機構で内膜中のCL分子を認識することを示しており、ミトコンドリア内膜上でのcyt *c*とパートナー分子との動的な相互作用が示唆された。

次に、CL模倣脂質分子である負電荷リン脂質の1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (DMPG)を用いて様々なサイズのDMPG/DHPCバイセルを作製し、DMPG/DHPCバイセルとのcyt *c*の膜結合状態を解析した。溶液NMRを用いたCSP解析により、cyt *c*の小さいサイズのDMPG/DHPCバイセルとの相互作用部位はCL含有バイセルとの相互作用部位と類似していることが明らかとなった。一方、吸収及び円二色性スペクトル測定より、大きいサイズのバイセルでは、膜結合によりcyt *c*の活性部位のヘムの軸配位子であるMet80はヘム鉄から解離し、一部のαヘリックス構造が崩れた部分変性構造をとることが明らかとなった。部分変性したcyt *c*の^{1}H–^{15}N HSQCスペクトルでは、構造を失った領域のアミノ酸残基の信号が観測され(**Figure 3**) 、これらの信号はアミノ酸選択^{15}N標識法を用いたHSQC信号の帰属によりLys39からLys60までのアミノ酸残基由来であることが示された。また、cyt *c*とDMPG/DHPCバイセルの混合溶液にDHPCを添加してバイセルのサイズを減少させると、cyt *c*のHSQCスペクトルは小さいバイセルと相互作用した場合と一致した。以上の結果より、cyt *c*の膜結合状態はバイセルのサイズに依存して天然様構造とLys39からLys60が変性した部分変性構造の間で動的に変化することが示された。

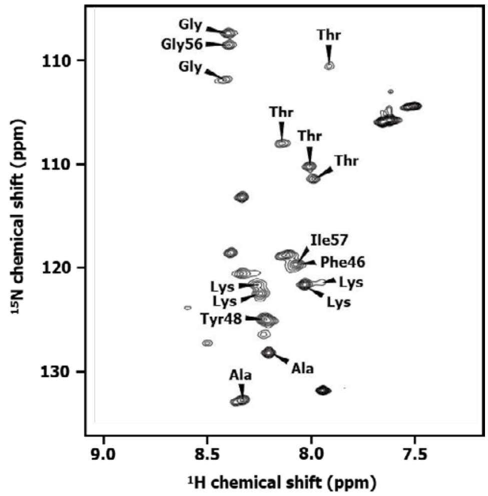


Figure 3. 大きいサイズの DMPG/DHPC バイセルと相互作用したときの cyt *c* の ^{1}H–^{15}N HSQC スペクトル。

結論

バイセルと溶液NMRを組み合わせた手法により、cyt *c*のCL含有膜との相互作用部位を特定し、その相互作用部位では複数のLys残基が協同的にCLと相互作用することを明らかにした。また、cyt *c*はCL模倣脂質分子であるDMPGからなるDMPG/DHPCバイセルのサイズに依存した膜結合状態をとり、天然様構造とヘム配位構造変化を伴った部分変性構造の間で動的な挙動をとることが明らかとなった。本研究により、未解明であったcyt *c*のCL含有脂質膜への相互作用部位がアミノ酸残基レベルで明らかになり、cyt *c*の膜結合の挙動が示された。以上より、脂質膜上でのタンパク質の動的挙動の解析において、バイセルと溶液NMRを組合せた本手法が強力な解析法となることが示された。

参考文献

1) H. Kobayashi, S. Nagao, S. Hirota, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 14019–14022 (2016).
2) K. Sakamoto, M. Kamiya, M. Imai, K. Shinzawa-Itoh, T. Uchida, K. Kawano, S. Yoshikawa, K. Ishimori, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 12271–12276 (2011).
3) S. R. N. Solmaz, C. Hunte, *J. Biol. Chem.* **283**, 17542–17549 (2008).

P3

Ｂ型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解明

○横川真梨子[1]，石場智彬[2]，池田寿子[1]，藤田浩平[1]，横田旭美[1]，大澤匡範[1]
1 慶應義塾大学　薬学部
2 慶應義塾大学　大学院薬学研究科

Structural mechanism of viral assembly of hepatitis B virus

○Mariko Yokogawa[1], Tomoaki Ishiba[2], Hisako Ikeda[1], Kohei Fujita[1], Terumi Yokota[1], Masanori Osawa[1]
1 *Faculty of Pharmacy, Keio University*
2 *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University*

Chronic hepatitis B is a global health problem caused by the hepatitis B virus (HBV) infection, which leads to liver cirrhosis and liver cancer. There are two types of drugs for the treatment of HBV infection: nucleotide analogue and interferon. However, these drugs can hardly eliminate HBV completely from the infected cells. We aim to obtain structural basis for HBV infection useful for development of innovative anti-HBV drugs. In this study, we focused on the interaction between capsid, an assembly of core protein (Cp), and envelope protein of HBV that is important for viral assembly. Our NMR study revealed that Cp directly binds to the region containing residues 110-130 in the preS2 region of HBV. This interaction would be important for viral assembly.

【序論】

B型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染は、肝硬変や肝癌などの重篤な疾患につながる。現在は、核酸アナログやインターフェロンがHBV治療薬として用いられている。しかし、これらの薬剤のみではHBVを完全に排除することは困難であるため、既存薬とは作用点が異なる治療薬の開発が求められている[1]。

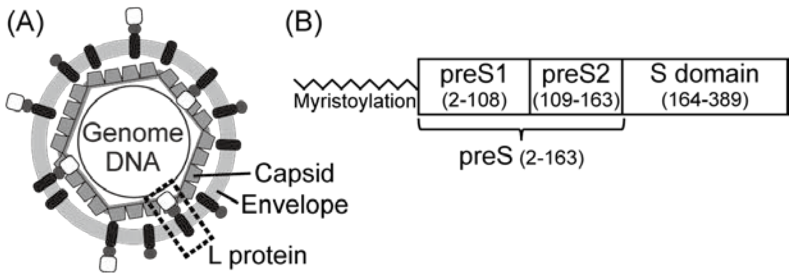


Fig. 1　Schematic of HBV
(A) HBV virion　(B) L protein

HBVは、ゲノムDNAを内封したキャプシドが外殻に覆われた構造をもつ (Fig. 1 (A))。外殻に存在するLタンパク質は、Sドメインと呼ばれるC末端の膜貫通領域と、そのN末端の162残基からなるpreSと呼ばれる領域からなり、preSは107残基のpreS1と55残基のpreS2に分けられる (Fig. 1 (B))。キャプシドは、183残基からなるコアタンパク質 (Cp) 二量体の会合体である。肝細胞内で増幅したHBVはウイルス粒子を形成して細胞外に出ていくが、このウイルス粒子の形成には、Lタンパク質のpreSとCpの結合が重要である[2]。そこで本研究は、このpreSとCpの相互作用に着目し、両者の結合様式を原子分解能で明らかとすることでHBV粒子の形成機構を解明し、この結合を阻害する新規抗HBV薬を創製することを目的とした。

HBV，タンパク質ータンパク質相互作用

○よこがわまりこ，いしばともあき，いけだひさこ，ふじたこうへい，よこたてるみ，おおさわまさのり

【方法】

Lタンパク質のpreS、preS1、preS2およびCpのN末端149残基からなるCp二量体は、それぞれ大腸菌にて発現し、精製した。^{13}C, ^{15}Nにより標識したpreS1とpreS2をそれぞれ調製し、三重共鳴測定により主鎖NMRシグナルの帰属を確立した。^{15}N標識したpreS、preS1、preS2を調製し、^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定した。また、^{15}N標識したpreS1またはpreS2を用いて、Cp二量体との相互作用をNMR法により解析した。

【結果・考察】

PreS1およびpreS2の^{1}HN, ^{13}Cα, ^{13}Cβの化学シフト値から、preS1とpreS2がともに、単独では特定の立体構造を形成していないことが分かった。また、^{15}N標識したpreS1、preS2、preSの^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを比較した結果、preSのスペクトルのほぼ全てのシグナルの化学シフト値が、preS1またはpreS2のいずれかのシグナルの化学シフト値とよく一致した。このことは、preS中のpreS1領域とpreS2領域は互いに相互作用しないことを示している。

^{15}N標識したpreS1あるいはpreS2にCp二量体を添加したところ、preS1ではスペクトル変化はほとんど観測されなかったのに対して (Fig. 2 (A), (B))、preS2では24個の主鎖シグナルに化学シフト変化または顕著な強度減少が観測されたことから (Fig. 2 (C), (D))、Cp二量体がpreS2と直接結合することが分かった (Fig. 2)。化学シフト変化または強度減少が観測された残基は、preS2の残基番号110-130の領域に集中したことから、Cp二量体はこの領域に特異的に結合することが示唆された。

現在、Cp二量体中のpreS2結合領域の同定、および結合親和性の解析による結合様式の解明を試みている。また、より生理条件に近い系で解析を行うため、Cp二量体が90個または120個会合したキャプシドを用いてpreS2との相互作用を解析する予定である。

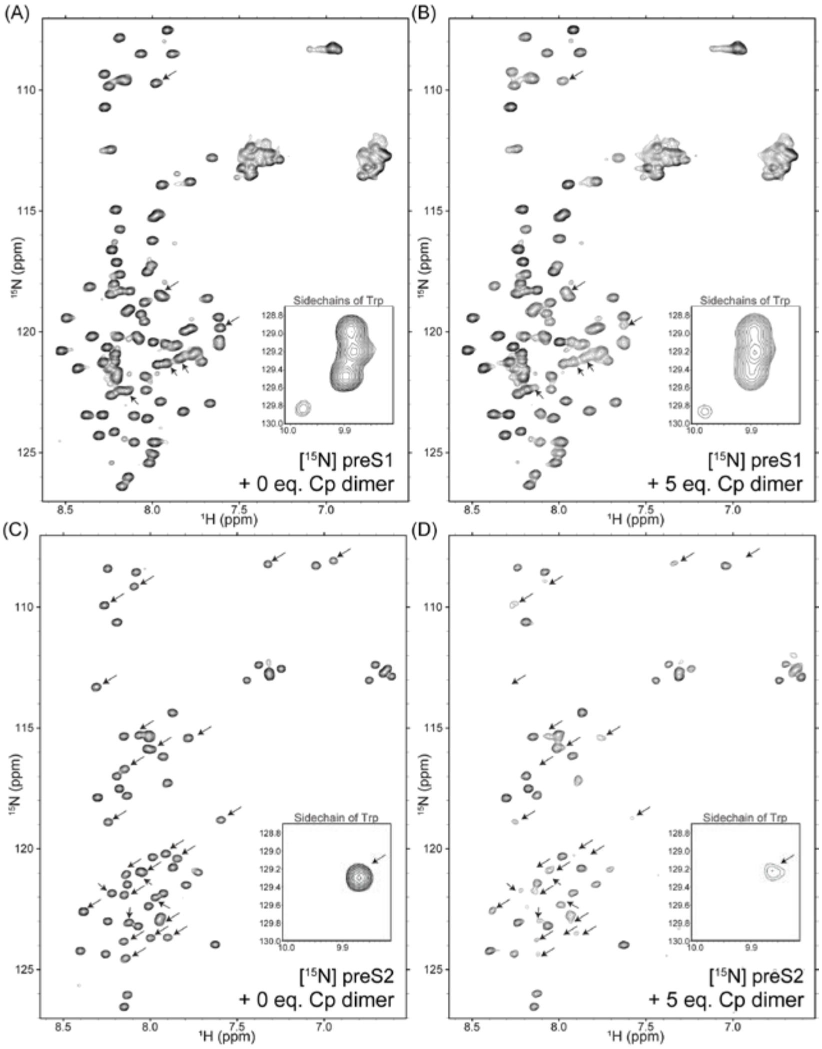


Fig. 2　Interaction analyses between preS1 or preS2 and Cp
^{1}H-^{15}N HSQC spectra of (A) free preS1, (B) preS1 in the presence of Cp dimer, (C) free preS2, and (D) preS2 in the presence of Cp dimer. Signals with large intensity reductions upon binding to Cp dimer were indicated by arrows.

References

(1) Tu T. and Urban S. (2018) *Current Opinion in Virology* 30, 68-79

(2) Bruss V. and Thomssen R. (1994) *Journal of Virology* 68, 1643-1650

P4

タンパク質における水素結合経由の大きなスピン結合

○高田夢人[1]，会津貴大[1], 伊藤隆[1], 三島正規[1]
1首都大学東京・理学研究科

Remarkably large scalar coupling across hydrogen bond in protein

○Takada Yumeto[1], Aizu Takahiro[1], Yutaka Ito[1], Masaki Mishima[1]
1Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

Scalar spin couplings via hydrogen bonds and its multidimensional NMR observation provide the direct evidence of presence of hydrogen bonds. It is thus possible to directly identify the hydrogen bond donor and acceptor based on the signal assignments. Since the size of the scalar spin coupling is quite sensitive to the geometry of the hydrogen bonds, it is meaningful to consider the relationship between the bond geometries and the spin couplings. In general, scalar spin coupling via hydrogen bonds in protein are small (1 Hz or less) such as hydrogen bonds between amide and carbonyl groups. Interestingly, we have identified a large scalar spin coupling via a hydrogen bond of about 7 Hz in size between the amide in backbone and the nitrogen in side chain of histidine in the protein Cpc2.

【背景】

生体分子の立体構造形成や、生化学反応を分子レベルで理解する基盤として、生体分子内あるいは分子間の弱い相互作用について理解することが重要である。中でも、特に水素結合を正確に同定し、その結合の性質を理解することが重要である。しかし、一般的に、水素結合の存在や、水素結合におけるドナー原子、アクセプター原子対を同定する際には、X 線結晶構造解析等によって決定された原子座標をもとに、どの原子が水素結合をとり得る配置と距離に存在しているかを調べることで、判断している。従って、現在のように広く生体分子の構造解析技術が広まった状況においても、構造決定の際に水素結合ネットワークなどの同定が正確でない場合がある。

一方、水素結合は、わずかに共有結合性を併せもつことから、水素結合を介して、スカラースピン結合（*J* 結合）が存在する。これは、NMR によって直接的に水素結合の存在が示され、信号の帰属をもとに水素結合のドナーとアクセプターを直接同定し得るということでもある [1)2)3)]。

また、近年では、分解能が 1Å を超える超高分解能のタンパク質の X 線結晶解析や、中性子回折によって水素の座標も与えられるような解析例が増えつつあることから、これらから得られるジオメトリの情報と合わせて、水素結合経由の *J* 結合の性質を解析することで、精度の高い議論が期待できる。

我々は分裂酵母のタンパク質 Cpc2 について、その結晶構造解析と、異種核 NMR 解析を並行して進め、このタンパク質のループ部分に存在するタンパク質主鎖から隣接するヒスチジン側鎖への NH-N タイプの水素結合に関して（図１）、水素結合経由の *J* 結合の観測に成功したので報告する。

図 1. Cpc2 の X 線結晶構造
F65 の主鎖のアミドと、H64 の側鎖の Nδの原子間距離は 2.8 Å であり、水素結合の存在が推定される。

タンパク質、水素結合、スカラースピン結合
○たかだゆめと, あいずたかひろ, いとうゆたか, みしままさき

【方法】

Cpc2の主鎖の帰属は、^{2}H,^{13}C,^{15}Nラベル試料を用いてHNCACB-TROSY、HN(CO)CACB-TROSY、HN(CA)CO-TROSY、HNCO-TROSYより行った。^{2}H,^{15}Nラベル試料を用いてHNN-COSYの測定を行った。

【結果】

分裂酵母由来CpC2（314残基）の^{1}H-^{15}N TROSYスペクトルを図2に示す。F65の主鎖の信号は、プロトンの化学シフトが、11.4 ppmと極めて低磁場に存在していることから（図2）、水素結合のドナーになっていることが示唆された。^{15}N軸を高分解能で測定したTROSYスペクトルからは約7 Hzという非常に大きな分裂が観測された（図3）。結晶構造から、F65の主鎖アミドとH64側鎖の水素結合の存在が推定されたことから、次にこの水素結合経由の$^{h2}J_{NN}$を観測するために、HNN-COSYによる測定を行った（図4）。その結果、F65の主鎖のNHに関して、H64側鎖のNδの$^{h2}J_{NN}$由来と考えられるクロスピークを観測することに成功した。次いで1/2τ_{NN}を30 msから50 msに変えて測定をすると、H64側鎖のNδの$^{h2}J_{NN}$由来と考えられるクロスピークは、より強く観測された。現在、Spin-echo測定における$^{h2}J_{NN}$による強度変調から、$^{h2}J_{NN}$の大きさの詳細な解析を進めている。TROSYでの分裂幅から推定されたように実際に7 Hz程度の大きさのスピン結合であるとすれば、先行して報告されているヘリックスキャップ構造で観測された$^{h2}J_{NN}$の値~5 Hz[4)5)]よりも大きく、タンパク質内の水素結合における特徴的に大きな$^{h2}J_{NN}$の同定となる。これらの実験情報に基づいて、今後、水素結合のジオメトリと$^{h2}J_{NN}$ 値の関係についても考察を進めていく予定である。

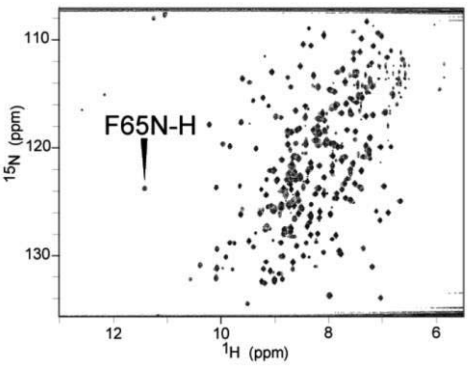


図 2. Cpc2 の ^{1}H-^{15}N TRSOY スペクトル
F65 のピークは非常に低磁場側に存在している。

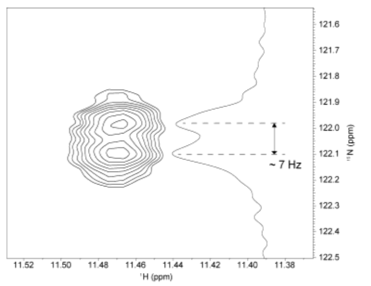


図 3. Cpc2 の ^{1}H-^{15}N TRSOY スペクトル
F65 の主鎖のアミド基の信号。^{15}N 軸に関して約 7 Hz の分裂が観測されている（他の主鎖アミド基は分裂しない）。

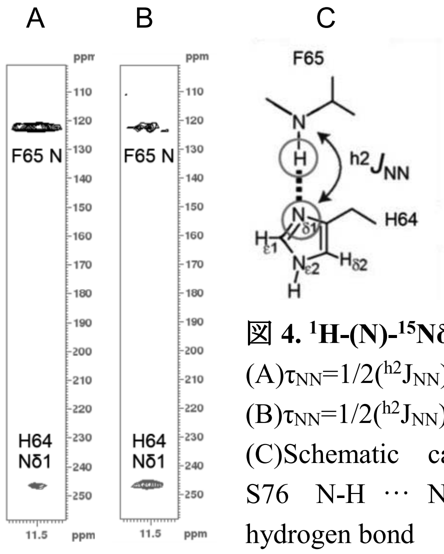


図 4. ^{1}H-(N)-^{15}Nδ1 COSY
(A)τ_{NN}=1/2(^{h2}J$_{NN}$) ~ 30 ms
(B)τ_{NN}=1/2(^{h2}J$_{NN}$) ~ 50 ms
(C)Schematic carton of S76 N-H ··· Nδ1 H64 hydrogen bond

References

1) Dingley, AJ. and Grzesiek, S. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 8293-8297

2) Cordier, F. *et al* (2008) *Nat. Protocol* 3,235-241

3) Mishima, M. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*122 5883-5884

4) Matthew R, *et al.* (2015) *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 1008−1011

5) Jenkins, T. C. *et al.*(2015) *Biochemistry*, 54, 6896−6908

P5

常磁性NMRを用いたYeast Ubiquitin hydrolase 1 (YUH1) の構造決定及びダイナミクス解析

○岡田 真由[1]，池谷 鉄兵[1]，Rajesh Sundaresan[1]，野尻 英里[1]，
美川 務[2]，八木 宏昌[2]，木川 隆則[2]，伊藤 隆[1]
[1]首都大学東京・大学院理工学研究科
[2]理化学研究所・生命機能科学センター

Structural and Dynamics Analysis of Yeast Ubiquitin Hydrolase 1 (YUH1) Using Paramagnetic NMR Spectroscopy

○Mayu Okada[1], Teppei Ikeya[1], Rajesh Sundaresan[1], Eri Nojiri[1], Tsutomu Mikawa[2], Hiromasa Yagi[2], Takanori Kigawa[2], Yutaka Ito[1]
[1] *Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University*
[2] *RIKEN, Center for Biosystems Dynamics Research*

Ubiquitination and deubiquitination of proteins are involved in numerous cellular processes such as proteolysis, signal transduction, DNA repair, and so on. Yeast Ubiquitin Hydrolase 1 (YUH1), which is composed of 236 residues (26.4kDa), is a deubiquitinating enzyme, capable of hydrolyzing ubiquitin adducts for homeostasis of free ubiquitin levels in the cell. However, the molecular mechanism of its specific substrate recognition and hydrolysis is not fully understood because the three-dimensional (3D) structure of monomeric YUH1 in solution has not been solved yet whilst the crystal structure of its complex with the tight-binding inhibitor ubiquitin aldehyde (Ubal) has been reported previously. Hence, we addressed the protein structure determination and dynamics analysis of monomeric YUH1 to elucidate the structural basis of this specificity with the ubiquitin and its dynamical processes.

【序論】

タンパク質のユビキチン化や脱ユビキチン化はタンパク質分解やシグナル伝達、DNA 修復など多くの重要な細胞プロセスに関わっている．Yeast Ubiquitin Hydrolase 1（YUH1）は 236 残基からなる脱ユビキチン化酵素であり，細胞内の遊離ユビキチン量を調節するためユビキチン付加物から加水分解によりユビキチンを切り離す役割を担っている．YUH1 と阻害剤であるユビキチンアルデヒド(Ubal)との複合体の結晶構造は既に報告されている一方で，溶液中での YUH1 単体の立体構造はいまだに明らかになっておらず，YUH1 の特異的な基質認識や加水分解の分子メカニズムは十分に解明されていない．そこで本研究では，NOE データに基づいた従来の NMR 立体構造解析に加えて，常磁性効果を利用した paramagnetic relaxation enhancement（PRE)や pseudo-contact shift（PCS)などの手法を用いて YUH1 の構造及びダイナミクスの解析を行い，YUH1 のユビキチン認識メカニズムを解明することを目的とした．

常磁性NMR, pseudo-contact shift, paramagnetic relaxation enhancement, 脱ユビキチン化酵素

○おかだ まゆ，いけや てっぺい，すんだれさん らじぇしゅ，のじり えり，みかわ つとむ，やぎ ひろまさ，きがわ たかのり，いとう ゆたか

【実験】

初めに，大腸菌発現系を用いて安定同位体標識をしたYUH1の発現，精製を行った．主鎖及び側鎖のNMRシグナルの帰属を行うために，各種3D 3重共鳴NMR測定を行った．次に，NOEによる距離情報を得るため，3D ^{15}N-separated NOESY，^{13}C-separated NOESY，メチル選択的安定同位体標識を用いた^{13}C/^{13}C-separated NOESYの測定を行なった．また，常磁性タグ結合部位を得るため，内在性のシステインをセリンに置き換え，１つのシステインを追加導入した４種類の変異体（C90S/N5C, C90S/S104C, C90S/N140C，C90S/N225C）を作製した． PREの測定は，これらの変異体にMTSLタグを導入して行った．また，現在それぞれの変異体に4PhSO$_2$-PyMTAタグとランタノイド金属を導入し, PCSの測定及び解析に取り組んでいる. NOEとPREより得られた距離情報と化学シフトから得られた二面角拘束情報を利用し，CYANAプログラムのNOE自動帰属を用いて構造計算を行った．加えて，T1T2緩和測定を行いYUH1のダイナミクス解析を行った.

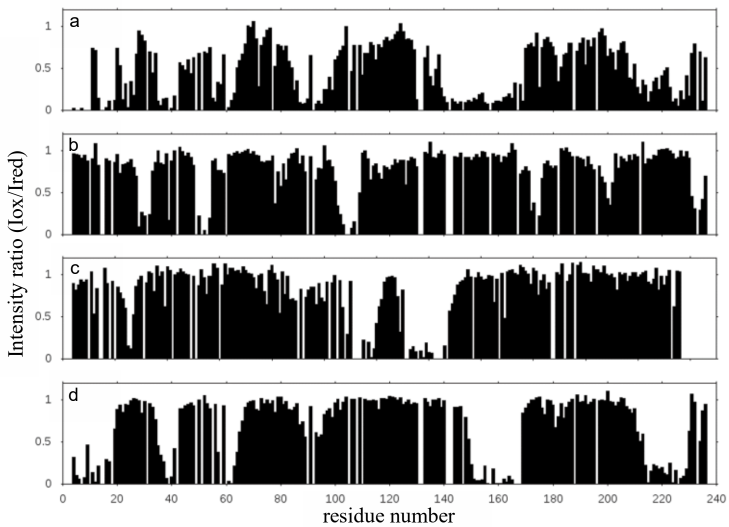


Fig. 1 Intensity ratios derived from PRE measurements of YUH1 C90S/N5C(**a**), and C90S/S104C(**b**), and C90S/N140C (**c**), and C90S/N225C(**d**)

【結果と考察】

YUH1の主鎖約98％と側鎖約75%のNMRシグナルの帰属に成功した．また，2322個のNOE由来の距離拘束と974 個のPRE由来の距離拘束を得ることが出来た．CYANAを用いてこれらの距離拘束から得られた構造をFig.3bに示す．T1T2緩和解析によって得られたS^{2}の値を構造にマッピングすると，構造が収束しない領域とダイナミクスが大きい領域が良く一致していた．構造解析の結果，活性中心を覆い被さるように存在するN末端と約20残基からなるループ領域は, YUH1-Ubal複合体の結晶構造(Fig.2a)では固く閉じた構造をとっているのに対し，今回得られた単体の溶液構造では，非常に柔軟な構造をとっていることが示唆された．先行研究により，活性中心を覆っているこの領域は脱ユビキチン化を行う際に，ユビキチンに結合した基質のサイズを制限し，触媒活性を調節していると考えられている．従って，複合体と単体での構造及びダイナミクスの大きな違いは，脱ユビキチン化の特異性及び効率に寄与していると考えられる．

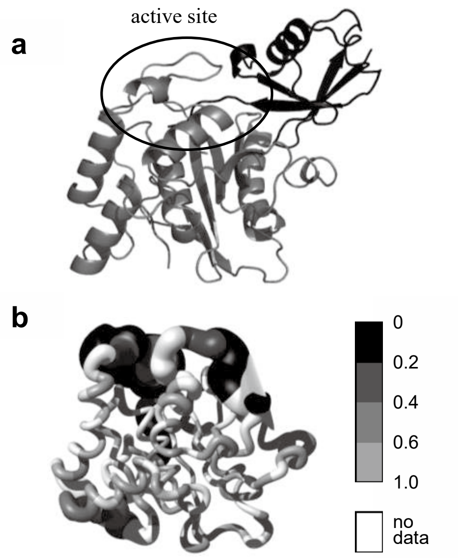


Fig. 2 (a) The crystal structure of YUH1 complex with ubiquitin aldehyde. YUH1 and ubiquitin aldehyde are represented as the gray and black ribbon models, respectively. (**b**) The solution structure of monomeric YUH1. S^2 values obtained from T1T2 relaxation analysis are mapped on the solution structure.

P6

qNMRによる薬剤の溶解度および劣化度の検定とその蛋白質薬剤相互作用解析への応用

○小篭蒼[1]、新家粧子[2]、小橋川敬博[3]、藤原敏道[2]、児嶋長次郎[1,2]
1 横浜国立大学・大学院理工学府
2 大阪大学・蛋白質研究所
3 熊本大学・大学院生命科学研究部

qNMR for solubility test and its application to protein-drug interaction analysis

○Aoi Kokago[1], Shoko Shinya[2], Yoshihiro Kobashigawa[3], Toshimichi Fujiwara[2], Chojiro Kojima[1,2]
1 Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University
2 Institute for Protein Research, Osaka University
3 Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

Quantitative NMR (qNMR) is a recently developed method to determine the absolute amount of analyte, comparing its NMR signal intensity to the reference. In this study, qNMR was used to test effective concentration of stock solution and applied to protein-drug interaction analysis. NMR titration experiments of protein kinase and its inhibitor were performed. Obtained stoichiometry was 6 times larger than reported value. Since the reported K_d value is ~ nM, the concentration was re-evaluated by qNMR. We found the effective solubility was ~ 80 μM and the concentration of 100 μM stock solution decreased to 17 μM. This value agrees with the reported stoichiometry, suggesting that qNMR is useful to determine the effective concentration of unstable drug.

[序論]

qNMR (Quantitative NMR：定量 NMR) は、NMR の信号面積が溶液濃度に比例するという原理を利用した手法であり、最近になって絶対定量法として確立された。qNMR の特徴としては、溶液条件下で実際に溶解した状態の分子をそのまま定量できることや試料が回収できることなどが挙げられる。すでに、薬品管理や食品分析などの分野で頻繁に利用されているが、生体系NMR研究ではほとんど使われていない。今回、抗がん剤研究のモデル系として、線維芽細胞増殖因子受容体 FGFR1 のキナーゼドメインと抗がん剤 Ponatinib との相互作用を NMR を用いて解析する過程で、qNMR が劣化試薬の定量に有用であることを見い出したので報告する。

[実験]

FGFR1 キナーゼドメインの Met-^{13}C 標識サンプルは、小橋川らが確立した大腸菌発現系で調製した。NMR 滴定実験には ^{1}H-^{13}C HMQC スペクトルを用いた。Ponatinib は 100% DMSO で 50 mM のストック溶液を作成し、それぞれの実験で用いた。Ponatinib のNMR溶解度は、粉末試薬の秤量によって 50、100、200 μM 溶液を作成し、qNMR で定量することで求めた。また、NMR 滴定実験で使用した薬剤のストック溶液のNMR濃度を qNMR で測定した。

qNMR、薬剤劣化、NMR滴定実験

○こかごあおい, しんやしょうこ, こばしがわよしひろ, ふじわらとしみち, こじまちょうじろう

[結果・考察]

メチオニン残基のメチル基を ^{13}C 標識した FGFR1 キナーゼドメインの^{1}H-^{13}C HMQC スペクトルを Fig. 1 に示す。薬剤 Ponatinib との NMR 滴定実験では、遅い交換が観測され、強く結合していることが推測された。Free form 由来のシグナルの強度変化から結合比を求めたところ、蛋白質 25 μM に対して約1:6で薬剤が結合するという結果が得られた(Fig. 2A)。他の手法で報告されている結合比が1:1、K_d 値が ～ nM であることから、実効薬剤濃度が薬剤調製時の濃度より低い可能性がある。そこで、qNMR による溶液中の薬剤の定量を行った。

Ponatinib の溶解度を検定するために、Ponatinib の粉末試薬を新調し、DMSO 溶液と 99% D_2O 1% DMSO 溶液を調製した。秤量によって 50, 100, 200 μM 溶液を作成し、これらの溶液濃度を qNMR 法で定量した(Fig. 3)。DMSO 溶液では、両者が直線関係($y = 1.01x + 1.29$)にあることから、Ponatinib のDMSOへの溶解度が高い(> 200 μM)ことが分かった。また、qNMR 法では高精度の定量(約 1 %)が可能であることも検証された。99% D_2O 1% DMSO 溶液では、約 80 μM に濃度上限があり、200 μM 溶液では明らかな沈殿が見られたことから、99% D_2O 1% DMSO への溶解度は約 80 μM であることが分かった。

NMR 滴定実験で実際に使用していた薬剤のストック溶液の濃度を qNMR で定量した。99% D_2O 1% DMSO 溶液には全く沈殿が出ていなかったが、100 μM で調製された溶液濃度が 17 μM まで低下していた(Fig. 3)。これは、滴定実験に用いていた薬剤の濃度が約 1/6 まで低下していたことを示している。実際、この実効濃度を用いて滴定実験の濃度を校正したところ、1:1の結合比を示した(Fig. 2B)。これらの結果は、qNMR では薬剤の実効濃度が定量可能であることを示唆している。

[まとめ]

本研究では、qNMR による定量分析を行うことで、水溶媒への溶解度が低いこと、薬剤が劣化していたこと、などを明らかにすることができた。また、qNMR で決定した薬剤濃度の値は、劣化薬剤での滴定実験において実効薬剤濃度と解釈でき、適切な結合比を与えることも分かった。不安定な薬剤や吸光度などで濃度を決定できない薬剤では、qNMR が実効薬剤濃度を決定するためのキーテクノロジーとなり得る。

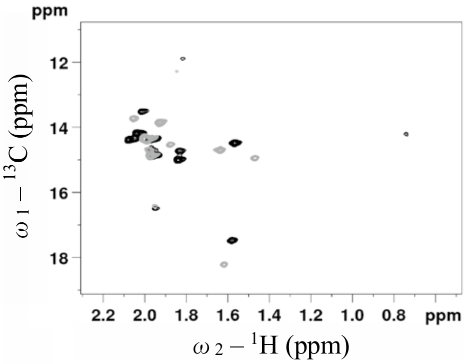


Fig. 1. ^{1}H-^{13}C HMQC spectrum
Black : Free state, Gray : Bound state

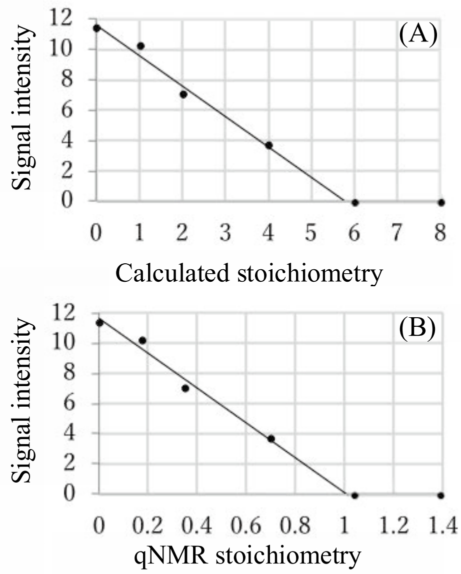


Fig. 2. NMR Titration analysis of protein-drug interaction

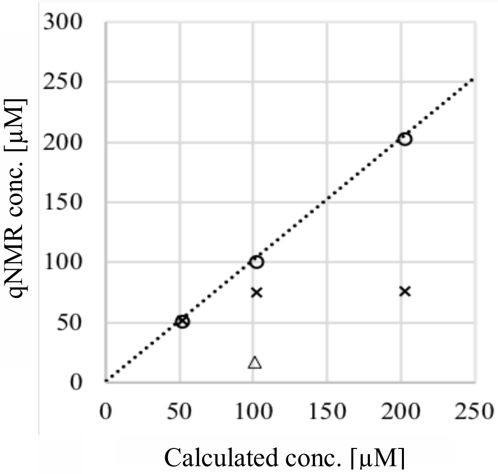


Fig. 3. qNMR concentration of drug in DMSO（○）, in D_2O（×）, stock solution in D_2O（△）

P7

山積されるNMR情報のデータクレンジング法検討およびツール開発

○山田隼嗣[1,2]，黒谷篤之[2]，近山英輔[2,3]，菊地淳[1,2,4]
[1]名大院・生命農，[2]理研・環境資源，[3]新潟国際大・情報文化，[4]横市院・生命医

Data cleansing investigation and development of web tool for the stacked NMR big-data

○Shunji Yamada[1,2], Atsushi Kurotani[2], Eisuke Chikayama[2,3], Jun Kikuchi[1,2,4]
[1] Grad.Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.,[2] RIKEN CSRS, [3] Niigata Univ. Int. Inform. Stud.,[4] Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ.

The application of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is expanding in data driven science. Effective utilization of stacked NMR big-data meaning accumulation for many years is an important issue for innovation of medical, food, materials, and the environmental issues. In the concept of "Data Lake" comparing database and lake, "Data Cleansing" is important to prevent muddy formation which obscures analysis results. Therefore, FID and related information should be organized, and a database that supports efficient retrieval and various analysis is proposed in this study.

データ駆動型科学において、核磁気共鳴（NMR）分光法の適用が拡大している[1,2]。長年の蓄積に由来する山積されるNMR情報（ビッグデータ）の活用は、医療、食品、材料、環境分野のイノベーションにとって重要な課題である。NMRのハードウェア開発も盛んであり、特に、低磁場の卓上NMRが将来的に現場での環境や健康の恒常性評価や農林水産業における品質管理で普及することにより、自由誘導減衰（FID）のビッグデータの蓄積が加速することが想定される。NMRによる知識発見や未来予測の戦略において、使用される生データ（FID）の質は、抽出される知識の価値に影響するため重要である。世界中からインターネットを介してデータが集積されるデータベースを湖に例えた「データレイク」は、FIDと関連情報（化学シフト、*J*値、サンプル名、状態、溶媒、温度、化学構造、日時、場所、生物種）の未整理による手間の増加や解析結果を不鮮明にする泥沼化を防ぐためにデータ整理が重要である（Fig.1）。また、ノイズの存在も問題である。したがって、データ整理及びノイズ除去を意味する「データクレンジング」は、山積され得るFIDビッグデータ時代の基盤技術として重要である。

最近、FIDと化学構造を関連付けるフォーマットが提案された[3]。そこで、FIDと関連情報を整理し、効率的な検索及び多様な解析に対応するデータベースを提案する（Fig.2）。また、FIDのノイズを除去し、信号対雑音比（S/N比）を改善する戦略は確立されていない[4]。

FIDビッグデータ、ノイズ除去、機械学習

○やまだしゅんじ、くろたにあつし、ちかやまえいすけ，きくちじゅん

本研究では、機械学習の１つである畳み込みニューラルネットワーク（CNN）[5]について、FIDノイズ除去のためのデジタルフィルターとしての適用を始動する。拡張性のある対話型FID処理ツールとして、機械学習の分野で主流なPythonパッケージが公開されている[6]。これらの技術に基づくウェブツールを開発し、簡便な手順でノイズを除去し、効率的に高品質なデータセットを得ることができるデータクレンジング環境整備を議論したい。

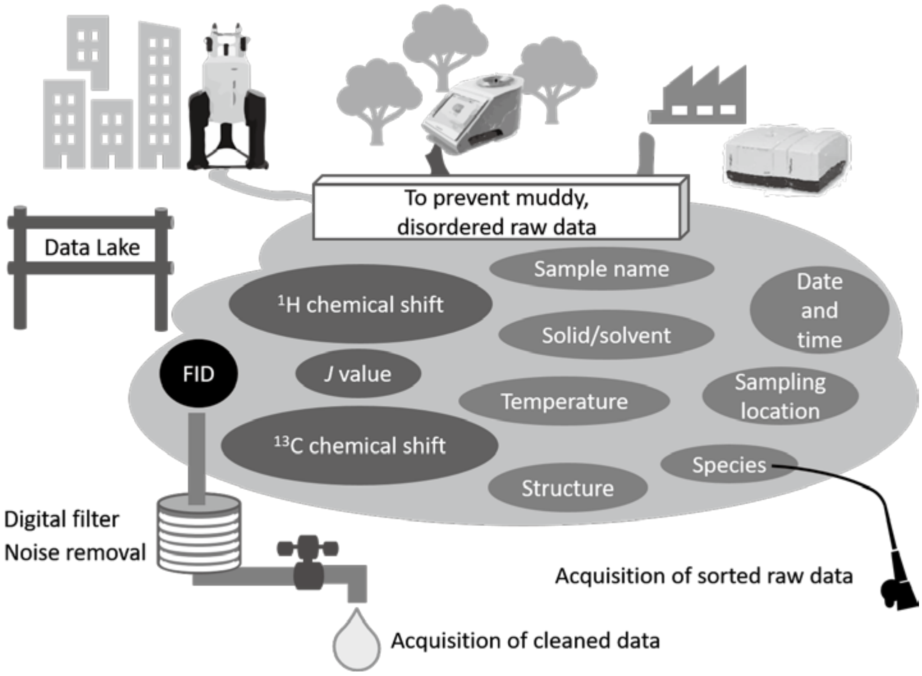


Fig. 1. Conceptual diagram of "Data Lake" and "Data Cleansing System" in FID big-data era.

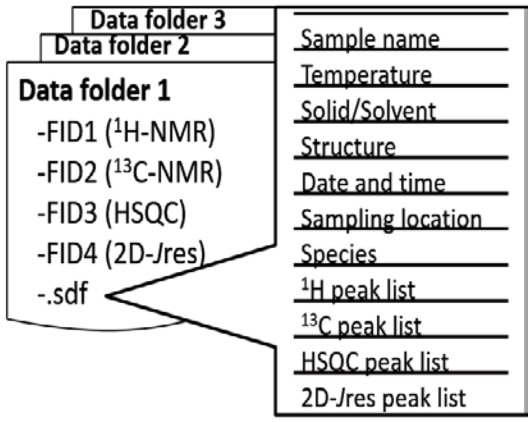


Fig. 2. A diagram showing the folder structure of data and the contents of .sdf

[References]

1. J. Kikuchi and S. Yamada, *Analyst*, 2017, **142**, 4161-4172.
2. J. Kikuchi, K. Ito and Y. Date, *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2018, **104**, 56-88.
3. M. Pupier, J. M. Nuzillard, J. Wist, N. E. Schlörer, S. Kuhn, M. Erdelyi, C. Steinbeck, A. J. Williams, C. Butts, T. D. W. Claridge, B. Mikhova, W. Robien, H. Dashti, H. R. Eghbalnia, C. Farès, C. Adam, P. Kessler, F. Moriaud, M. Elyashberg, D. Argyropoulos, M. Pérez, P. Giraudeau, R. R. Gil, P. Trevorrow and D. Jeannerat, *Magn Reson Chem*, 2018, **56**, 703-715.
4. W. J. Chen, H. Ma, D. Yu and H. Zhang, *Sensors*, 2016, **16**.
5. P. Klukowski, M. Augoff, M. Zieba, M. Drwal, A. Gonczarek and M. J. Walczak, *Bioinformatics*, 2018.
6. A. Mohamed, C. H. Nguyen and H. Mamitsuka, *Bioinformatics*, 2016, **32**, 2067-2068.

P8

抗プリオン活性を有する四重鎖RNAの構造決定と高い活性の発現機構の解明

○真嶋 司[1,2]、Lee Joon-Hwa[3]、鎌足 雄司[4]、林 智彦[1]、西川 富美子[5]、永田 崇[1,2]、西川 諭[5]、木下 正弘[1,2]、桑田 一夫[6]、片平 正人[1,2]
[1]京大・エネルギー理工学研究所、[2]京大・エネルギー科学研究科、[3]Department of Chemistry and RINS, Gyeongsang National University、[4]岐阜大・科学研究基盤センター、[5]産総研、[6]岐阜大・連合創薬医療情報研究科

Structure determination of quadruplex RNA having an anti-prion activity and elucidation of mechanism of high activity

○Tsukasa Mashima[1,2], Lee Joon-Hwa[3], Yuji O. Kamatari[4], Tomohiko Hayashi[1], Fumiko Nishikawa[2], Takashi Nagata[1,4], Satoshi Nishikawa[2], Masahiro Kinoshita[1,2], Kazuo Kuwata[5], and Masato Katahira[1,4]
[1]Inst. of Adv. Energy, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Energy Sci., Kyoto Univ., [3]Dept. of Chem. and RINS, Gyeongsang Natl. Univ., [4]Life Sci. Res. Center, Gifu Univ., [5]AIST, [6]Unit. Grad. Sch. of Drug Disc. and Med. Info. Sci., Gifu Univ.

The conformational conversion of prion proteins from normal cellular form (PrP^C) into abnormal form (PrP^{Sc}) is reportedly responsible for prion disease. Previously, we showed that RNA aptamer, R12, not only binds tightly to PrP^c but also reduces the production of PrP^{Sc} if administered to prion-infected cells. We then determined the solution structure of R12: R12 forms a homodimer, in which a single R12 folds into parallel quadruplex. In the present study, we designed a new prion aptamer, NPapt, based on the R12 structure. We determined the solution structure of NPapt using NMR. NPapt folds into intramolecular quadruplexes. The structure of NPapt mimicry resembled that of the dimeric R12. Remarkably, the anti-prion activity of NPapt turned out much higher than that of R12.

序論

プリオン蛋白質にはαヘリックスに富む正常型プリオン蛋白質(PrP^C)と、βシートに富む異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})が存在することが知られている。PrP^CからPrP^{Sc}へと構造が遷移し、その結果としてPrP^{Sc}の蓄積がプリオン病(ウシの狂牛病、羊のスクレイピー、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病等)の原因と考えられている。我々はPrP^Cを高い親和性で捕捉し、PrP^{Sc}への遷移を抑制するRNAアプタマー、R12 (r(GGAGGAGGAGGA))が2量化して四重鎖構造を形成し、各1分子がプリオン蛋白質の2箇所のリジンクラスターに同時に相互作用することをNMR法によって明らかにしてきた[1,2,3]。本研究では、我々の明らかにしてきたR12の立体構造とプリオン蛋白質への相互作用様式に基づき、より抗プリオン活性の高いRNA分子の創製と、その立体構造を明らかにして構造科学の観点から高い活性を発揮するメカニズムの理解を目指した。

四重鎖核酸、プリオン、アプタマー

○ましま　つかさ、りー　じゅんは、かまたり　ゆうじ、はやし　ともひこ、にしかわ　ふみこ、ながた　たかし、にしかわ　さとし、きのした　まさひろ、くわた　かずお、かたひら　まさと

方法

抗プリオン活性の高いRNA分子の創製にあたり、R12配列を骨格にして末端等への残基の付加を系統的に施すことで、20種類以上のRNAを設計した。設計したRNAは化学合成法によって調製し、^{1}H NMRスペクトルを測定した。最もNMRスペクトルの分離が良く、構造解析が可能と判断したものについて、濃度1 mMとなるように95/5% H_2O/D_2OあるいはD_2O中に溶解させ、これらのサンプルをAVANCE III HD 600 MHz (ブルカー・バイオスピン社)を用いて、^{1}H NMRスペクトル、^{1}H-^{1}H NOESYスペクトル、DQF-COSYスペクトル、TOCSYスペクトル、^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルおよび^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルの測定と解析を行った。

結果と考察

設計した20種類以上のRNAの中から、最も良好なスペクトルを示したRNA配列をNPapt (new prion aptamer)と命名した。NPaptの共鳴線の帰属を行った(Fig. 1)。次いでNOEの帰属を行い、残基間GNH-GH8, GNH_2-GH8およびGNH-GNHなどのテトラッド構造に特徴的なNOEのセットと、GNH2-AH8のsheared型G:A塩基対を形成した際に特徴的なNOEが観測されたことから、NPaptはG:G:G:Gテトラッド構造と、G(:A):G:G(:A):Gのヘキサッド構造を持つことが明らかになった。

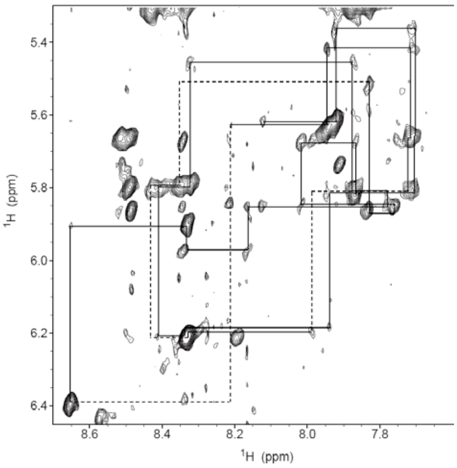


Fig. 1. Sequential assignment of NPapt

NOEに基づく原子間距離の拘束条件、カップリング定数に基づいた糖のパッカリング情報、テトラッド構造およびヘキサッド構造に関する平面性の拘束条件および水素結合の情報を用いて、Xplor-NIHによる構造計算を行った。100個の構造を計算したうち、エネルギーの低い10個の構造について、AMBERによる水分子を考慮した拘束条件つき分子動力学計算によって、NPaptの構造をリファインメントした(Fig. 2)。NPaptはテトラッド構造とヘキサッド構造から成る四重鎖構造を形成しており、1分子で2量体化したR12と近いトポロジーの立体構造を示した[4]。

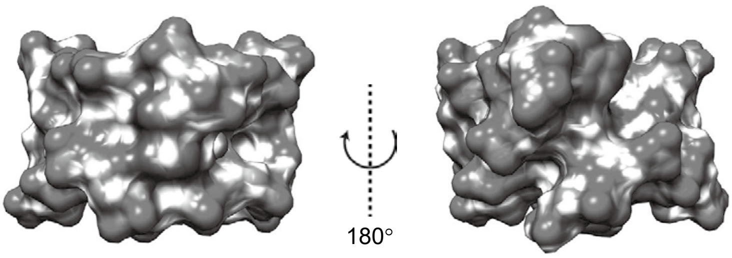


Fig. 2. Surface electrostatic potential presentations of NPapt

恒常的にPrP^{Sc}を産生する神経細胞を用いてNPaptの抗プリオン活性について調べたところ、R12よりも遥かに高い活性を示した。1分子で構造形成することによって獲得した溶液中での安定性が、高い抗プリオン活性に寄与したと考えられる。

References

(1) Mashima, et al., Nucleic Acids Research, 2009, 37, 6249-6258; (2) Mashima, et al., Nucleic Acids Research, 2013, 41, 1355-1362; (3) Hayashi, et al., Nucleic Acids Research, 2014, 42, 6861-6875; (4) Mashima, et al., submitted.

P9

ESIPT型蛍光色素BTImPとアニオンとの錯形成の直接観測 ^{15}N-NMRによる評価

土屋早紀[1]、坂井賢一[1]、○河野敬一[1]、中根由太[2]、菊地毅光[2]、芥川智行[2]
1千歳科学技術大学理工学部
2東北大学多元物質科学研究所

Directly Observed ^{15}N-NMR Spectra of ESIPT Fluorophore BTImP Complexed with Anion

Saki Tsuchiya[1], Ken-ichi Sakai [1], ○Keiichi Kawano [1], Yuta Nakane[2], Takemitsu Kikuchi[2], Tomoyuki Akutagawa[2]
1Chitose Institute of Science and Technology
2Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University

2-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-methoxy-6-(1,4,5-triphenyl-1H-imidazol-2-yl)phenol (BTImP) is an excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) fluorophore, containing an acid-stimuli-responsive intramolecular hydrogen bond (H-bond) that can switch from the central phenolic proton to the imidazole (Im) or benzothiazole (BT) nitrogen atoms. Here, we demonstrate that BTImP shows full-color (red, green, blue, and white) emission upon the addition of different concentrations of $HClO_4$ or, with time, after the addition of HBF_4. It also shows thermally dependent color changes from pink through white to blue in a narrow temperature range of 25–60℃. ^{1}H and ^{15}N NMR measurements suggest that, after the green fluorescent BTImP is protonated at its Im nitrogen atom, a conjugate base anion coordinates to the imidazolium (HIm^+) proton, forming two types of complexes with different coordination states.

【序論】

近年、圧力や摩擦、熱、ゲスト認識など、外部からの刺激に応答して蛍光特性が可逆的に変化する固体蛍光クロミズムが注目されている。我々は、励起状態分子内プロトン移動(ESIPT)型蛍光色素の優れた蛍光特性に注目して研究を進めてきた。最近、酸/塩基に応答して分子内水素結合部位が切替わることを想定した新規 ESIPT 型色素 BTImP を合成した（Fig.1）。BTImP は、THF 溶液

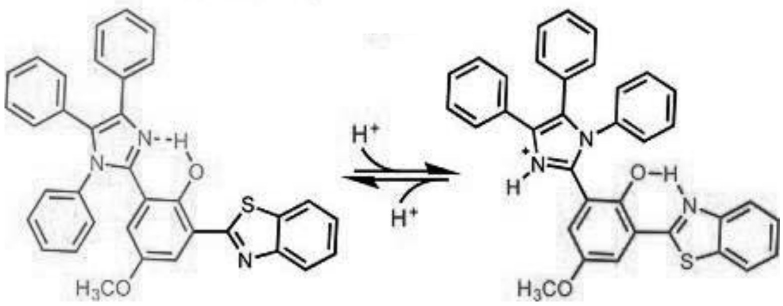


Fig. 1. Fluorescence color switching of BTImP, resulting from the switching between two ESIPT sites induced by protonation/deprotonation of the Im nitrogen atom.

直接観測^{15}N-NMR、蛍光色素、プロトン化

つちや さき、さかい けんいち、○かわの けいいち、なかね ゆうた、きくち たけみつ、あくたがわ ともゆき

中で、イミダゾール（Im）側に形成された水素結合での ESIPT による緑色蛍光を示すが、酸の添加により、Im 環がプロトン化されることで水素結合がベンゾチアゾール（BT）側に切替わり、橙色蛍光を示す。水素結合の切替は単結晶 X 線構造解析からも確認された。その希釈溶液中に $HClO_4$ や HBF_4 のような酸化合物を添加した場合にのみ、添加濃度に依存して赤、青、緑、白のフルカラー蛍光を示す。プロトン化した BTImP と ClO_4^- や BF_4^- イオンとの間で錯体を形成することが多色蛍光発現に重要であるという仮説を立てている。それを検証するため、重窒素化した BTImP を合成し、^{15}N-NMR 測定により BTImP とアニオンとの相互作用について評価した。

【結果と考察】

Fig. 2の下段にTHF-d_8 溶媒中での^{15}N-BTImPの^{15}N-NMRスペクトルを示す。重窒素を導入したイミダゾール環窒素からのシグナルが246 ppmに明瞭に観測された。そこに$HClO_4$（Fig. 2上段）やHBF_4（Fig. 2中段）を添加すると、シグナルは183 ppmへと高磁場側に大きく移動することが確認出来た。これはイミダゾール環窒素がプロトン化されたことを示している。酸化合物の添加で蛍光色は緑から赤($HClO_4$)や白(HBF_4)に変化しているが、その時のNMRスペクトルには、もう一つ別のシグナルが現れていることがわかる（163 ppm: $HClO_4$, 185 ppm: HBF_4）。これらのシグナルは、イミダゾール環のプロトンにClO_4^-やBF_4^-が配位していることを示唆している。シフト量の違いから、アニオンとの相互作用の強さも評価することが出来た。

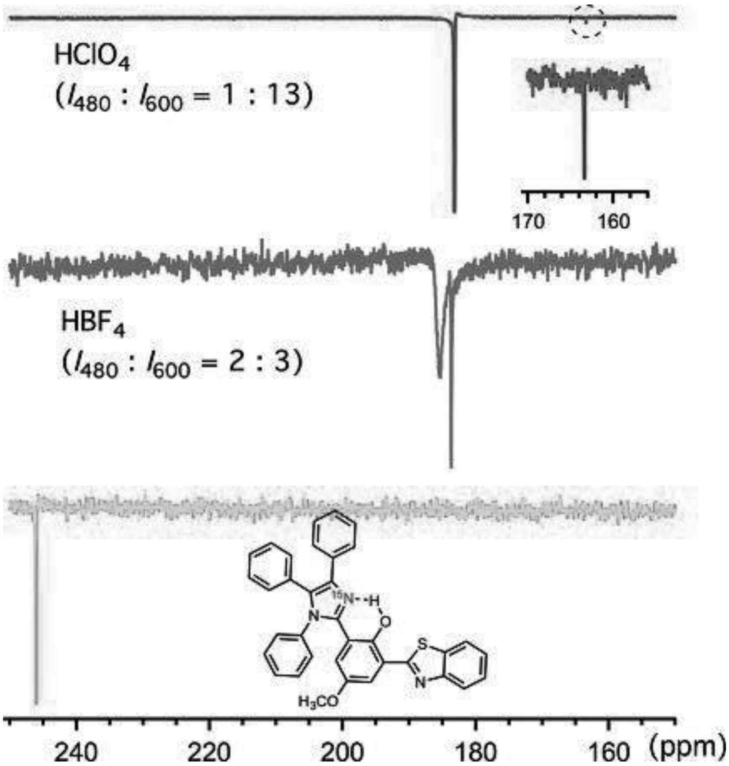


Fig. 2. Proton-decoupled ^{15}N NMR spectra of ^{15}N-labeled BTImP in [D$_8$]THF: (top) upon the addition of 1.7 equiv of $HClO_4$, (middle) upon the addition of 1.1 equiv of HBF_4, and (bottom) before adding acid.

【参考文献】

(1) An ESIPT Fluorophore with a Switchable Intramolecular Hydrogen Bond for Applications in Solid-state Fluorochromism and White Light Generation, K. Sakai, S. Tsuchiya, T. Kikuchi, T. Akutagawa, J. Mater. Chem. C 2016, 4, 2011–2016.

(2) Color Changes of a Full-Color Emissive ESIPT Fluorophore in Response to Recognition of Certain Acids and Their Conjugate Base Anions, S. Tsuchiya, K. Sakai, K. Kawano, Y. Nakane, T. Kikuchi, T. Akutagawa, Chem. Eur. J. 2018, 24, 5868 – 5875.

P10 Rheo-NMR法を用いたパーキンソン病原因タンパク質αシヌクレインの線維化機構の解明

○島田陽介[1]，岩川直都[1]，森本大智[1]，菅瀬謙治[1]，白川昌宏[1]
[1]京都大学大学院・工学研究科

Elucidation of fibrillization mechanism of α-synuclein by using Rheo-NMR spectroscopy

○Yosuke Shimada[1], Naoto Iwakawa[1], Daichi Morimoto[1], Kenji Sugase[1], and Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University.*

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease that leads to chronic and progressive movement disorders. Amyloid fibril formation of α-synuclein in neurons is suggested to be one of the triggers for PD. Therefore, elucidation of fibrillization mechanism of α-synuclein can contribute to the care of PD. To date, physical and chemical properties of α-synuclein have been well studied; however, how α-synuclein forms amyloid fibrils in detail remains unclear. In this study, we have established a high-sensitivity Rheo-NMR instrument; and by using the Rheo-NMR, we acquired atomic-level structural and kinetical information on fibril formation of α-synuclein.

【緒言】

パーキンソン病（PD）は運動障害を伴う神経変性疾患の一種である。加齢に伴い発症率は上がるため、高齢化が進む現代において早急な治療法が求められている。パーキンソン病患者の脳内にはレビー小体と呼ばれる封入体が確認されている。そして、その主要素がαシヌクレインと呼ばれるタンパク質であり、この線維または前駆体オリゴマーが疾患発症と深く関わっている。しかしながら、このαシヌクレインが線維化する機構が原子レベルで未解明なため、αシヌクレインを標的とした合理的なドラッグデザインが極めて困難であり、パーキンソン病の根治には至っていない。そこで、(1) αシヌクレインの線維化機構の解明、及び (2) 低分子化合物によるαシヌクレインの線維化阻害機構の解明を通して、この疾患の根治に向けた創薬基盤を築こうと試みた。

この解明に向けて、本研究では、当研究室が世界に先駆けて製作した撹拌しながらNMR測定を行える高分解能Rheo-NMR装置を用いた。撹拌はタンパク質の線維化を促すため、Rheo-NMRを用いると従来の線維研究では不可能だった線維化過程における各状態を原子分解能かつリアルタイムで解析でき、詳細な線維化機構ならびに阻害機能の解明が期待される。また、従来の線維研究では振盪やスターラーバーによる乱流撹拌によって線維化させるため均一性や再現性が乏しいが、Rheo-NMRではNMR管内に層流を発生させるため、線維化におけるタンパク質の構造変化をより均一かつ定量的に解析できると期待される。

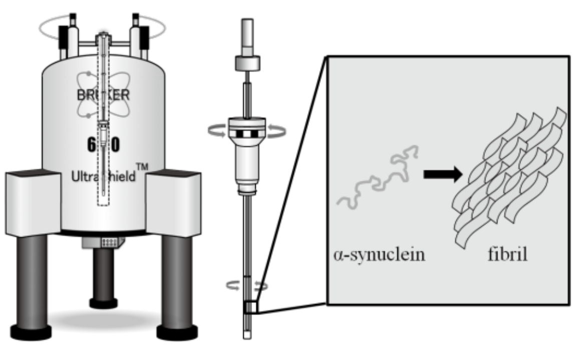


Fig. 1 Schematic diagram of Rheo-NMR spectroscopy.

Rheo-NMR、αシヌクレイン

○しまだようすけ、いわかわなおと、もりもとだいち、すがせけんじ、しらかわまさひろ

【結果・考察】

⑴　αシヌクレインの線維化過程における構造情報をアミノ酸レベルで取得

安定同位体標識したαシヌクレインを用いて、Rheo-NMRで測定したところ、先行研究よりαシヌクレインのアミロイド線維のクロスβ構造形成に深く関わっていると指摘されていたN末端領域と疎水性領域であるnon-amyloid-β component（NAC）領域において、線維化するにつれ、ピーク強度が顕著に減少することが確認された（Fig. 2）。また、αシヌクレインの線維化過程における各残基のピーク強度の経時変化に対してフィッティングを行い、線維化過程における初期核形成と二次核形成速度定数をそれぞれ求めた（Fig. 3）。その結果、初期核形成速度が、N末端領域とNAC領域の複数の残基で他の残基よりも著しく速いことが分かった。以上の結果から、線維化過程において特定したこれらの残基が初めに分子間相互作用することで核形成が促されることが示唆された。

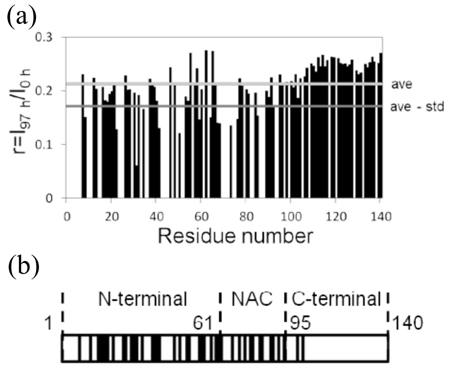


Fig. 2 Results of the Rheo-NMR experiments. (a)Decrease in peak intensity by fibril formation. (b)Mapping of the residues showing large intensity changes during fibril formation (black).

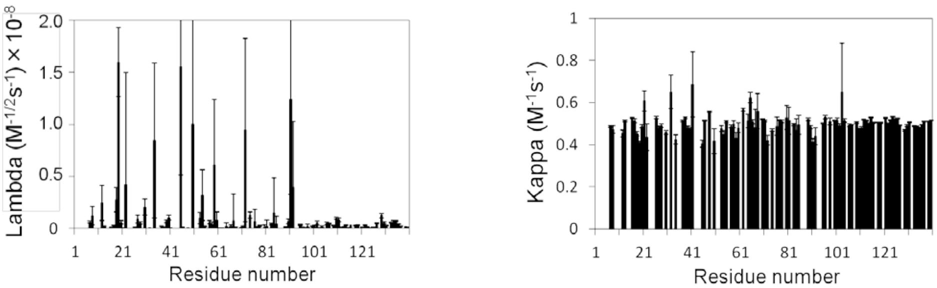


Fig. 3 The rates of primary nucleation (left) and secondary nucleation (right).

⑵　Epigallocatechin gallate（EGCG）によるαシヌクレイン線維化の阻害機構

先行研究により、Epigallocatechin gallate（EGCG）がαシヌクレインの細胞毒性の低い安定なオリゴマーを形成し、線維化を阻害することが報告されている。しかし、その詳細な阻害機構は未解明である。そこで、EGCGがどのようにαシヌクレインの線維化機構を阻害するのかを原子レベルで確認した。まず、EGCGと安定同位体標識したαシヌクレインの混合物をRheo-NMRで測定した。その結果、αシヌクレインは即座にオリゴマーを形成し、その後Rheo-NMRにより撹拌し続けてもオリゴマーの状態のまま線維化が進まなかった（Fig. 4a）。つまり、EGCGは線維形成より先んじて細胞毒性の低い安定なオリゴマーを形成させる機能があることが分かった。さらに、オリゴマーを形成前後のピーク強度を解析したところ、N末端領域において顕著なピーク強度低下が観察された。このことから、EGCG存在下において、αシヌクレインは主にN末端領域を介して毒性の低いオリゴマーを形成していることが示唆された（Fig. 4b）。

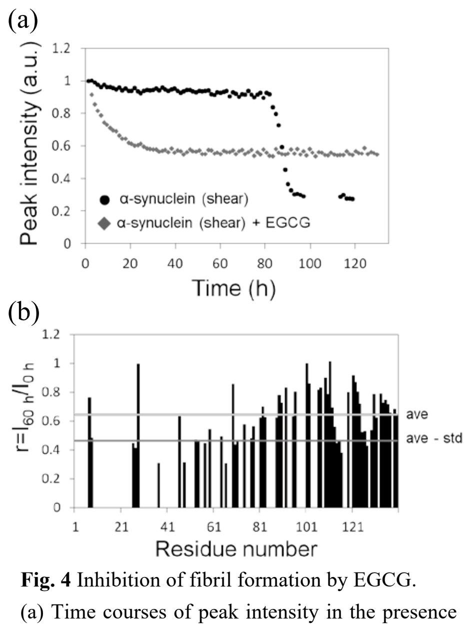


Fig. 4 Inhibition of fibril formation by EGCG.
(a) Time courses of peak intensity in the presence and absence of EGCG. (b) Decrease in peak intensity.

P11

物質を介した魚類と水の関係性情報抽出

○鈴木　漱星[1]，松本　朋子[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

Relational data mining between fish and water via substances

○Sosei Suzuki [1], Tomoko Matumoto[2], Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ.,[2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.

Japan has tremendous fish diversities due to warm and cold, as well as nutrient rich sea current. However, ecosystem collapses are frequently happened by natural/artificial eutrophication events such as red tide. It can be expected that environmental water and fish affect each other, but not known in detail. In this experiment, we establish the new water quality measurement of POM and attempt to figure out the important factors which indicate the relationship between fish and water. In order to find important factors of relationship between fish and water in POM, we may attention to the difference between of fish species, filter diameter, and environment by NMR analysis. We found that metabolic profiles between natural and aquarium water showed remarkable differences. Also, lactate and alanine may be important factor of differences of fish species by computing student t-test. This result would be expected the relationship between fish and water and the new factors of water quality measurement in POM.

［緒言］

世界第6位の排他的経済水域を有する日本近海は、暖流と寒流から流れ込む豊かな栄養塩に恵まれ世界有数の生物多様性を誇る。一方で自然および人為的要因による富栄養化、例えば赤潮の頻発化により生態系破壊も頻発している[1,2]。環境水中には、魚類の餌となるプランクトンが多く存在し、魚類はこれらのプランクトンを始めとした食物連鎖を形成している。魚類からは体表の分泌や鱗の剥がれ、糞便などの排泄物により、物質を介して環境水と相互に影響を及ぼすことが予想される[3,4]。これらの懸濁有機物(POM)は、海洋中にいる微生物が分解し、溶存有機物（DOM）へ変換している[5]。そのため、DOMに着目した水質評価が存在するが[6]、環境水や魚類がPOMを介して、どのようにして互いに影響を及ぼしているのか詳しく判明していない。また、POM組成をもとに魚類を対象とした水質評価はまだ確立されていない。そのため、水から魚へ、魚から水へと互いに影響を与える懸濁有機物を明らかにすることで、SDGsで求められる海洋環境持続性と食料供給の両立における、新たな水質評価法として利用可能であると考えた。こうした着眼点をふまえて、当研究室では魚類や海水を対象にNMR法を駆使した環境要因解析の手法構築を行っている[7-10]。

本実験では、魚種と環境を確立させた水槽水の水質測定及び、POMとして水槽水の濾過物のNMR計測を行い、魚類と水の関係性を示す要因有機物質を把握する初期的検討を遂行した。

［方法］

POMを用いた水質評価として、飼育水槽における異なる魚種及びフィルター径におけ

懸濁態有機物、プロファイリング、水棲環境
○すずきそうせい，　まつもとともこ，きくちじゅん

る水槽水POM、プロテインスキマーと魚類糞便、及び東京湾沿岸の自然環境水POMとの差に着目してNMRによる測定及び解析を試みた。

各水槽水の水温、溶存酸素量(DO)、電気伝導度(Cd)、塩濃度、pH、簡易クロロフィル計測した。各水槽の水を2Lずつ、8.0、1.0、0.2 µmのフィルター径にて濾過した。フィルター上POMをKPiによって抽出し、2D-*J*resによるNMR計測を行った。

［結果］

各種スペクトルデータ比較をした結果、自然水と水槽水において大きな違いが見られ、メジナ及びメバル飼育の異なる水槽間においても違いがみられた (Fig. 1)。有機溶媒でも多数のシグナルが確認できた。東京湾沿岸の自然海水と水槽水を比較し、2.5~4.0 ppmで自然水に強くシグナルが見られ、東京沿岸海水では、8.0 ppmに高磁場と比較して弱いピークが確認できた。8.0 ppm付近でメジナ水槽水に特徴的なピークが確認できた。魚種の比較で、メバルとメジナにおいて、スペクトルによるピーク差でStudentのt検定により、有意確率を差5%として、有意差がみられるものを調べた。その結果、Lactateに有意な差がみられた(Fig. 2)($p < 0.01$ *)。また、Alanineにも大きな差がみられた(Fig. 2)。これらは、餌の違い、もしくは魚種の違いに基づき、水槽環境の違いを示すと考えられた。

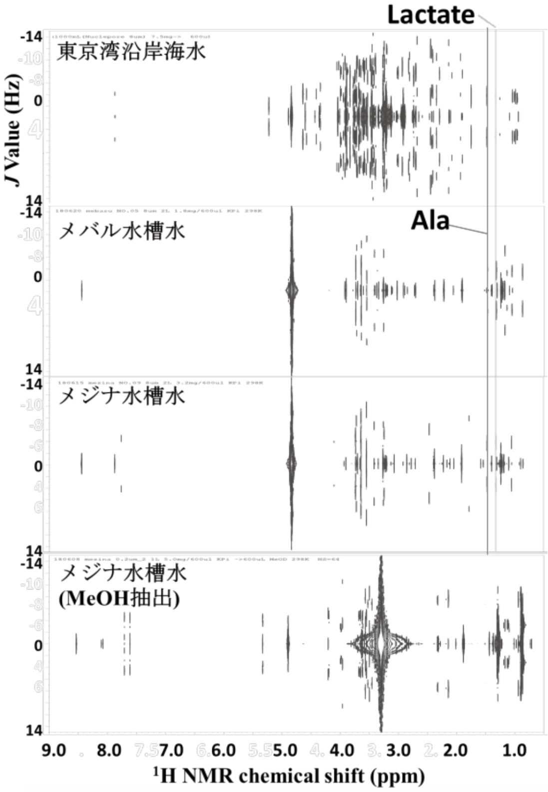


Fig. 1 Comparison of 2D-*J*res spectra of POM.

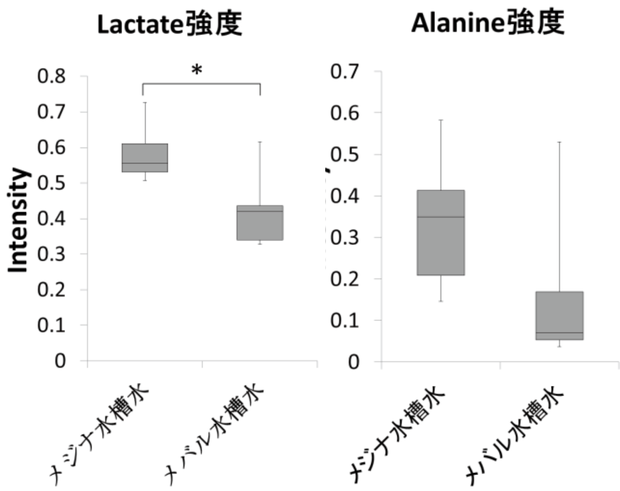


Fig. 2 Differences of lactate and alanine intensities between fish species.

[References]

[1] Kikuchi & Yamada, *Analyst* **142**, 4161-4172 (2017).

[2] Oita et al., *Sci. Total Environ.* **636**, 12-19 (2018).

[3] Asakura et al., *PeerJ* **2**, e550 (2014).

[4] Mekuchi et al., *PLoS One* **13**, e0197256 (2018).

[5] Asakura et al., *Anal. Chem.* **86**, 5425-5432 (2014).

[6] Uchimiya et al., *Metabolites* **7**, e52 (2017).

[7] Yoshida et al., *Sci. Rep.,* **4**, 7005 (2014).

[8] Asakura et al., *Anal. Methods* **10**, 2160-2168 (2018).

[9] Wei et al., *Sci. Rep.,* **8**, 3478 (2018).

[10] Date & Kikuchi, *Anal. Chem.* **90**, 1805-1810 (2018).

[11] Asakura et al., *Anal. Chim. Acta* (in press).

P12 フルオロキノロン誘導体とRNAとの相互作用解析

○長野来南[1]，上村孝[2]，中村慎吾[2]，河合剛太[1]
[1]千葉工業大学大学院　工学研究科
[2]株式会社 Veritas In Silico

Interaction analysis of Fluoroquinolone derivatives and RNA

○Nagano Konami[1], Kamimura Takashi[2], Nakamura Shingo[2], Kawai Gota[1]
[1]*Chiba Institute of Technology, Graduate School of Engineering*
[2]*Veritas In Silico Inc.*

This study aims to develop small molecule drugs targeted to RNA. Interaction analysis between small molecules and RNA as well as structure determination of RNA-small molecule complexes will be the clues to search for compounds that bind to specific mRNA in drug discovery.

In this study, a fluoroquinolone derivative designed to bind to RNA, KG022, and a hairpin RNA with a bulge out residue were used. NMR analysis indicated that KG022 actually interacts with the RNA in the vicinity of the bulge-out residue. The structure determination of the RNA-KG022 complex are in progress.

序論

本研究は，合成低分子化合物とRNAの相互作用を調べ，複合体の立体構造を決定することで化合物とRNAの結合様式を解明することをめざしているものである．これは，核酸を標的とした低分子創薬をするにあたり重要な基礎研究であり，将来的にはmRNAに結合する化合物を探索する手がかりのひとつになると考えられる．

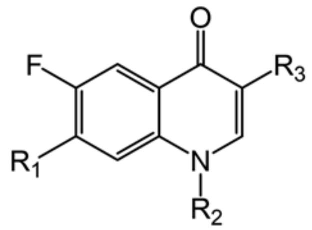


Fig. 1 fluoroquinolone derivatives

今回は，RNAに結合するようにデザインしたフルオロキノロン誘導体KG022を用い（Fig. 1），RNAは，バルジアウトを一つ含むヘアピン構造のモデルRNAを用いた．

フルオロキノロン誘導体とRNAとの相互作用はこれまでに報告されていない．

KG022についてはすでにRNAとの相互作用が確認されており，NMRスペクトルの解析により，RNAのバルジアウト付近のシグナルが変化することが分かっている（第19回日本RNA学会・富山，ConBio2017・神戸）．本研究では，複合体の立体構造決定をめざし，解析を進めた．

方法

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

RNA、Small molecule、Interaction

○ながのこなみ，かみむらたかし，なかむらしんご，かわいごうた

ン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）を用いた．RNAの濃度は，0.49 mMであった．相互作用解析ではRNA試料にKG022をRNA:KG022のモル比が1:0.5，1:1，1:2になるように加え，それぞれイミノプロトンスペクトルを測定した．その後，NOESYスペクトル等を測定した．

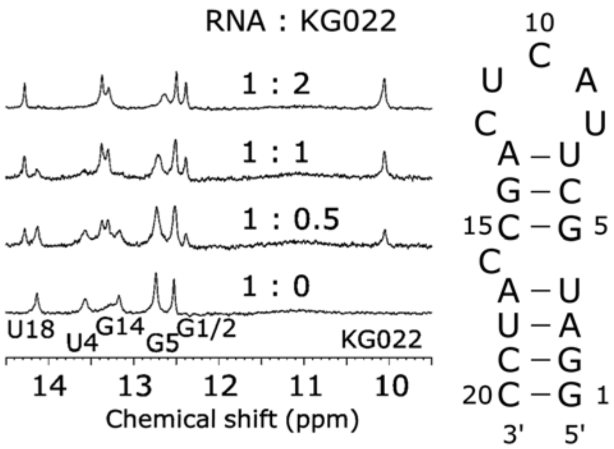


Fig. 2 Imino proton spectra and the secondary structure of the model RNA

結果

【相互作用解析】

イミノプロトンスペクトルを用いて相互作用解析を行ったところ，KG022を添加することで，新たなシグナルが出現し，RNAの構造が変化したことが分かった（Fig. 2）．また，RNAとKG022はモル比1:1で結合していることが示唆された．

【分子間NOE】

NOESYスペクトルをにおいて分子間NOEを調べたところ，U4，G5やC6などのバルジアウト残基の反対側の残基とKG022の間で58個が観測された（Fig. 3）．このことから，その付近にKG022が結合していることが推定された．

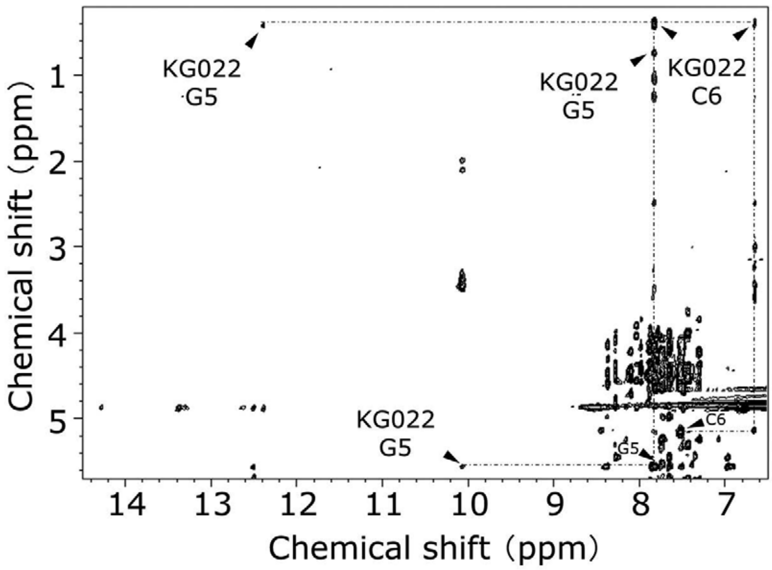


Fig. 3 Intermolecular NOEs between the RNA and KG022

【立体構造計算】

得られた情報をもとに立体構造計算を進めている．これまでに得られた立体構造では，KG022はバルジのCの部分において，そのC残基と塩基対を組むかのように結合していることが分かった（Fig. 4）．

考察

以上のことから，フルオロキノロン誘導体KG022は，RNAのバルジ部分に塩基対を組むかのように結合することが明らかとなった．このことは，フルオロキノロン誘導体がmRNAを標的とした薬物設計の出発物質として有望であることを示唆している．

今後は，さまざまな構造のRNAを用いて，KG022のRNA結合の特異性について系統的に解明したいと考えている．このような解析を通して，mRNAターゲット低分子創薬をめざし，さらなる知見を積み重ねていきたいと考えている．

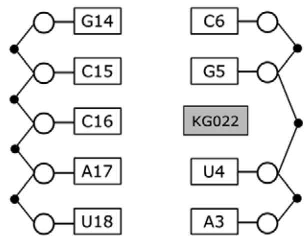


Fig. 4 Schematic drawing of the interaction between the RNA and KG022

P13 新規安定同位体標識技術を利用した高分子量蛋白質の動態構造解析法の開発

○宮ノ入 洋平[1,2]，武田 光広[2,3]，寺内 勉[4,5]，甲斐荘 正恒[2,4]
1:大阪大学 蛋白質研究所，2:名古屋大学大学院 理学研究科附属構造生物学研究センター，3:熊本大学大学院 生命科学研究部，4:首都大学東京大学院 理工学研究科，5:SAILテクノロジーズ株式会社

Transverse relaxation optimized isotope labeling for studying structural dynamics of larger proteins

○Yohei Miyanoiri[1,2], Mitsuhiro Takeda[2,3], Tsutomu Terauchi[4,5], Masatsune Kainosho[2,4]
1: Institute for Protein Research, Osaka University, 2: Structural Biology Research Center, 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.

We have improved the stereo-array isotope labeling (SAIL) method to observe the ^{13}C-^{1}H NMR signals of various amino acid residues in proteins larger than 80 kDa. By using the SAIL amino acids with transverse relaxation-optimized isotope labeling patterns, we have succeeded in observing extremely narrow aromatic ^{13}C-^{1}H signals in high-molecular-weight proteins up to 900 kDa. We have also developed cost-effective cellular protein expression systems using various amino acid auxotrophic *E. coli* strains, to prepare proteins residue-selectively labeled with new types of SAIL amino acids. We will illustrate the benefits of recent advances in the SAIL method for the 82 kDa single domain malate synthase G (MSG), by showing the structure refinements with the additional NOE constraints for aromatic ring and aliphatic methylene protons. We will briefly present the latest data on the structure and dynamics of aliphatic and aromatic side-chains in MSG obtained under various conditions, including high-pressure and low temperature.

[序論]

幅広い時間軸にわたる構造動態情報を原子分解能でもたらす溶液NMR法は、蛋白質の立体構造と生物機能の関連を解明するための基本的な手法として広く利用されてきた。しかしながら、分子量50kDaを超えるような高分子量蛋白質・蛋白質複合体に関しては、これまで主鎖アミド(^{15}NH)・側鎖メチル($^{13}CH_3$) NMRシグナルのみが観測可能と信じられてきたため、蛋白質の全領域を俯瞰する詳細な構造動態情報の取得は事実上不可能であった。我々は、高分子量蛋白質のNMR構造決定法として開発したSAIL（Stereo-Array Isotope Labeling; 立体整列同位体標識）法を基盤として、この課題の解決に取り組んでいる。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、分子量範囲 (80-900kDa)に及ぶ高分子量蛋白質に関しても、芳香環や脂肪族NMRシグナルの高感度観測が可能であることを立証した[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、アミノ酸要求性大腸菌株や大腸菌無細胞発現系を用いて、観測目的とするアミノ酸残基のみを選択的にSAILアミノ酸標識し､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。

SAIL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

このような技術基盤は、主としてリンゴ酸合成酵素(malate synthase G; MSG)をモデル蛋白質として整備されたが、その過程において従来は主鎖アミド(^{15}NH)・側鎖メチル($^{13}CH_3$) のみが観測可能と信じられてきたにもかかわらず、脂肪族・芳香族メチン、メチレン等、事実上MSGに含まれる全ての^{13}CHシグナルの高感度測定と配列帰属が可能であることが示された。本年会においては、このように新たな観測対象となるNMRシグナルを利用した蛋白質構造動態研究に関する最近の進展に関して報告する。

[方法]

従来のSAILアミノ酸の横緩和過程の更なる最適化は、基本的にはNMRシグナル観測のために導入した^{13}CH対を核スピンネットワークから孤立させることにより達成される。従って、従来のSAILアミノ酸とは異なり、直接に結合した^{13}C-^{13}Cは含まれず、位置・立体選択的に導入した^{13}CH対に隣接する炭素は全て重水素のみを持つ^{12}Cとなっている (Figure. 1 a, b)。このような横緩和最適型SAILアミノ酸を用いて、主として大腸菌発現系により目的とする蛋白質を標識した。Fig. 1に用いたγ_1-Val、δ_2-Leu以外は全て完全に重水素化したMSG試料は、Rutgers Univ. 井上研究室で作成されたLeu, Val要求性BL21 (DE3) 株を用い、重水素化M9最少培地中で調製した[2]。

[結果と考察]

横緩和過程を最適化した様々なSAILアミノ酸を用い､更にアミノ酸要求株や無細胞発現系を適宜組み合わせることにより､高分子量蛋白質の全てのアミノ酸残基の^{15}NH、^{13}CHシグナルを高感度に個別観測する技術が大きく進展する可能性が明らかとなった。特定のアミノ酸残基、或いはそれらを数種組み合わせたSAILアミノ酸標識蛋白質から得られるNMR情報は、高分子量蛋白質の構造研究に新たな展開をもたらすであろう[3]。これらの研究は緒に就いたばかりであるが、例えば立体特異的に$^{13}CH_3$標識したγ_1-Val、及びδ_2-Leuで標識したMSGを1,500 barの高圧下で測定すると常圧下では見られない新たなシグナル観測された (Figure 1)。このような新たに観測されたシグナルが、Leu, Val残基側鎖の回転異性体に由来する可能性があり､アミノ酸残基側鎖の配座返還運動は、SAIL-NMR法で明らかにされてきた芳香環反転運動や側鎖水酸基の水素交換運動[4]とも密接に関連していると思われる。このような大きな構造変化を伴う比較的遅い構造動態は蛋白質の生物機能の発現機構とも深く関わっていると思われる[4]。

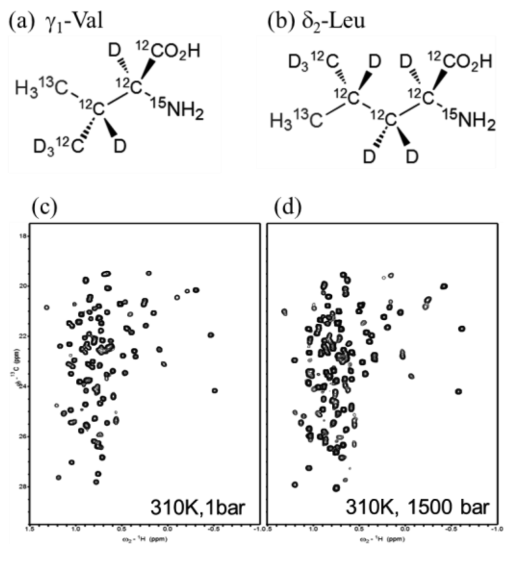


Figure 1. Variable pressure Leu, Val methyl HMQC signals of MSG:
Structure of γ_1-Val (a) and δ_2-Leu (b). γ_1-Val methyl and δ_2-Leu methyl signals at 900MHz, 310 K:1bar (c) and 1,500 bar (d).

[文献]

[1] M. Kainosho, *et al.* (2018), The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (Eds): Experimental Approaches of NMR Spectroscopy, pp 37-62; [2] Y. Miyanoiri, *et al.* (2016), *J. Biomol. NMR* **65**, 109-119; [3] M. Kainosho, *et al.* (2018), *J. Biomol. NMR, in press,* DOI 10.1007/s 10858-018-0198-x [4] C.-J. Yang *et al.* (2015), Biochemistry **54,** 6983-6995

[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。

P14 互いに識別し合う2種のLINEにおける相互作用の解析

○大津 舞菜，河合 剛太
千葉工業大学大学院 工学研究科

Interaction analysis on the two LINEs which identify each other

○Maina Otsu and Gota Kawai
Chiba Institute of Technology, Graduate School of Engineering

Recognition of the 3' stem-loop of LINE RNA by its reverse transcriptase (RT) is the important step of the retrotransposition. In order to elucidate the specific recognition mechanism of LINE RNA by RT, we are analyzing the tertiary structures and interaction of RT recognition sites of two related LINE RNAs from zebrafish, ZfL2-1 and ZfL2-2. Structures of the RT recognition sites of the two LINE RNAs, R-1 and R-2, respectively, are already determined by NMR and, furthermore, it was confirmed that mutations of A to G in R-1 and G to A in R-2 did not change the tertiary structures. In the present study, interactions between the RNAs and peptides derived from RTs were analyzed by using the wild type and mutant RNAs. The structural analysis for the RNA-peptide complexes are in progress.

序論

Long interspersed nuclear element（LINE）は転移因子の一種で散在性反復配列であり，様々な生物種が様々な種類のLINEを持っていることが知られているが，その役割や増幅機構の詳細などは解明されていない．LINEは生物種によって含まれている種類や数に特徴があるため，LINEを解析することによってLINEの役割の解明や生物の進化の解析につながることを期待している．

LINEは自身にコードされた逆転写酵素によりRNAを介して逆転写することで新たな位置に挿入されることが知られているが，逆転写酵素によるLINE RNAの認識機構の詳細は解明されていない．そこで本研究では，LINEの逆転写に重要だと考えられているRNAの領域および逆転写酵素の領域について立体構造解析および相互作用解析を行うことで，その認識機構を解明することを目的としている．

本研究では，ゼブラフィッシュ由来のLINEで，互いによく似ているが逆転写酵素の認識の特異性が異なるZfL2-1とZfL2-2の2つのLINEに着目している．これまでに，認識に重要なLINE RNAの一部の立体構造をNMR法によって決定した[1, 2]（Fig. 1）．その結果，ZfL2-2ではU残基となっている部分に，ZfL2-1ではステムループが挿入されていることがわかった．また，ZfL2-2において認識に重要とされているループ中のG残基が，ZfL2-1においてはA残基となっていた．

今回は，RNAの認識に必要な逆転写酵素の断片を用いて相互作用解析を進めることによって，近縁の2種のLINEの認識方法が異なることを明らかにした．

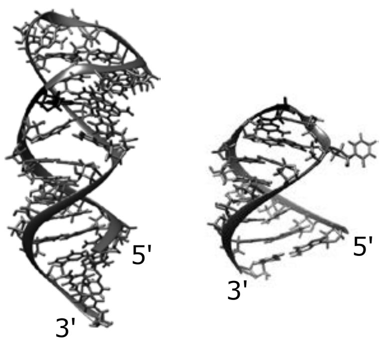


Fig. 1 Solution structures
Left: RNA from ZfL2-1
Right: RNA from ZfL2-2

RNA, Reverse transcriptase, Interaction

○おおつまいな，かわいごうた

方法

まず，4種類のRNAと2種類のペプチドを用いてゲルシフト法による相互作用解析を行った．

RNAについては，ZfL2-1とZfL2-2のそれぞれのLINE RNAの3'末端のステムループ部分の配列を用いた（R-1-45，R-2-41）．さらに，R-1-45およびR-2-41の1残基を置換した配列であるR-1-45-G（AをGに1残基置換した配列）およびR-2-41-A（GをAに1残基置換した配列）も用いた．置換した1残基は，それぞれを特異的に認識するために重要であると推測している残基である．この残基がR-1-45ではA残基でありR-2-41ではG残基であるため，この1残基のみを取り換えることで認識の特異性が変化するのではないかと考えた．

逆転写酵素については，ZfL2-1とZfL2-2のそれぞれのRNAを識別する最も短い領域に対応する配列であるRRD-1（67アミノ酸残基）およびRRD-2（48アミノ酸残基）を用いた[3]．

さらに，これらのRNAおよびペプチドを用いて，NMR法による相互作用解析を行っている．

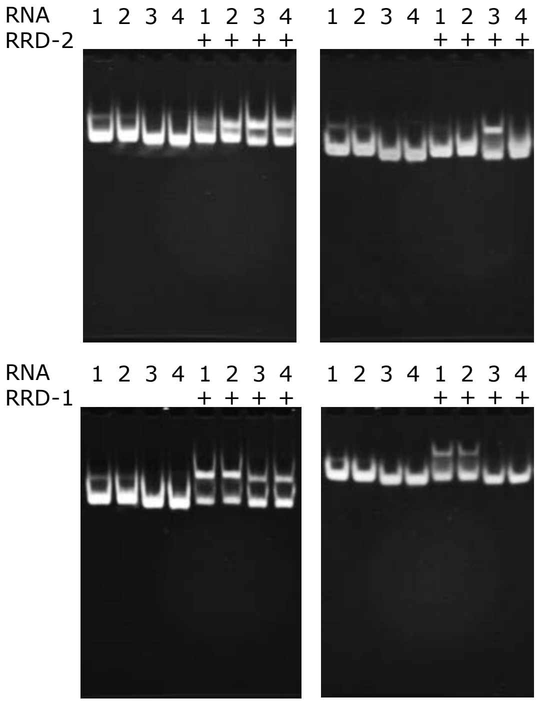


Fig. 2　Gel shift assay
1: R-1-45　　2: R-1-45-G
3: R-2-41　　4: R-2-41-A
Left gel: low NaCl concentration
Right gel: high NaCl concentration

結果および考察

まず，4種類のRNAとRRD-2を用いた相互作用解析を行った（Fig. 2，上段）．低塩濃度（0 mM NaCl，左のゲル）において，R-1-45とRRD-2はバンドのシフトがほとんどみられないが，R-1-45-Gではシフトしたバンドが観察された．一方，R-2-41とRRD-2においてはシフトしたバンドが強く観察されたが，R-2-41-Aでは，そのバンドが弱まった．すなわち，1残基置換したことで相互作用の強さが変化したことが分かった．なお，塩濃度を上げた場合（50 mM NaCl，右のゲル）では，本来の組み合わせであるR-2-41のみがシフトしたバンドを示した．このように，RRD-2との相互作用解析では，Gが認識に重要であるという既往研究を再現することができた．そこで，次にRRD-1を用いた相互作用解析を行った．

RRD-1においては1残基置換したことによる差はなく，R-1とR-2でバンドのシフトに違いがみられた（Fig. 2，下段，左のゲル: 0 mM NaCl，右のゲル: 100 mM NaCl）．予備的な実験において，RRD-1はR-1にのみ存在する14残基のステムループと結合することが示されており，2種類のLINEにおいてRNAを識別する方法が異なっていた．

すでに，2016年のNMR討論会において，RRD-2が1残基の違いを識別できることを，イミノプロトンシグナルを用いることによって示した結果を報告している．現在は，これまでのゲルシフト法による解析結果に基づき，RRD-1およびRRD-2について，溶液NMR法を用いたRNAとの相互作用解析を進めている．

【引用文献】

1. Otsu, M. et. al., *J. Biochem.* **162**, 279-285 (2017)
2. Baba, S. et al., *RNA* **10**, 1380-1387 (2004)
3. Hayashi, Y. et al., *Nucleic Acids Res.* **42**, 10605-10617 (2014)

P15

NMRによる蛋白質のミトコンドリア内動態の解析

○清水涼香[1], 美川　務[2], 福嶋瑞穂[1], 池谷鉄兵[1,2], 鴨志田一[1], 木川隆則[2],
三島正規[1], 伊藤　隆[1,2]
[1]首都大学東京・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

Investigating intramitochondrial behaviours of proteins by NMR spectroscopy

○Suzuka Shimizu[1], Tsutomu Mikawa[2], Mizuho Fukushima[1], Teppei Ikeya[1,2], Hajime Kamoshida[1], Takanori Kigawa[2], Masaki Mishima[1] and Yutaka Ito[1,2]
[1]Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Japan
[2]RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research, Japan

Protein behaviours in eukaryotic organelles were investigated by extending the in-cell NMR approaches to be available for the analysis of proteins localised in organelles, particularly mitochondria.

A model protein, *Streptococcus* protein G B1 domain, with a mitochondrial targeting signal was incorporated into cultured human HeLa.S3 cells by electroporation for in-cell NMR experiments. The observation of in-mitochondria NMR spectra by isolating the mitochondria faction is in progress in order to analyse the intramitochondrial crowding effects on the 3D structure, dynamics and folding stability of proteins.

【背景】

真核細胞は, 細胞膜, 核, 細胞質から成り立っており, 細胞質は様々な細胞小器官で満たされている. 細胞内は, 多種多様な分子が極度に密集した分子クラウディング環境であり, このような環境が蛋白質をはじめとする生体高分子の機能や構造などの動態に与える影響は充分には明らかになっていない. 細胞内分子クラウディング環境の解析には様々な手法が用いられているが, 生きた細胞の中(細胞質中)の生体高分子の立体構造やダイナミクスを原子分解能で明らかにすることができる解析手段としては, 唯一溶液NMR(in-cell NMR)があるのみである. 現在では真核細胞を用いたin-cell NMR解析を可能にする様々な要素技術が確立してきており, 多くの蛋白質, 核酸の細胞質での動態の解析が行われている.

細胞小器官内部の環境は細胞質とは異なり, 例えばミトコンドリアのマトリクス内は, 細胞質に比べて若干高いpHと, より混みあった分子クラウディング下にあると言われている. しかし, 各細胞内小器官内の物理化学的環境はまだ十分に解明されていないため, 細胞小器官内で機能する蛋白質の機能発現のメカニズムに対する当該小器官の分子クラウディング環境の影響を解析することには大きな意義がある. 2015年には細胞内で発現させた蛋白質をミトコンドリア内で観察(in-mitochondria NMR)した先駆的な研究が報告されたが[1], 立体構造やダイナミクスに対する影響はいまだに解析がなされていないのが現状である.

本研究では, in-mitochondria NMR解析によってミトコンドリア内環境が蛋白質の立体構造, ダイナミクス, フォールディング安定性, 相互作用などに与える影響の解析を試みた. 宿主細胞としてはヒト培養細胞HeLa.S3を用い, 標的蛋白質はミトコンドリア移行配列(MTS)を付加し, 安

---

in-cell NMR, in-mitochondria NMR, mitochondria-targeting sequence
○しみずすずか, いけやてっぺい, かもしだはじめ, みかわつとむ,
きがわたかのり, みしままさき, いとうゆたか

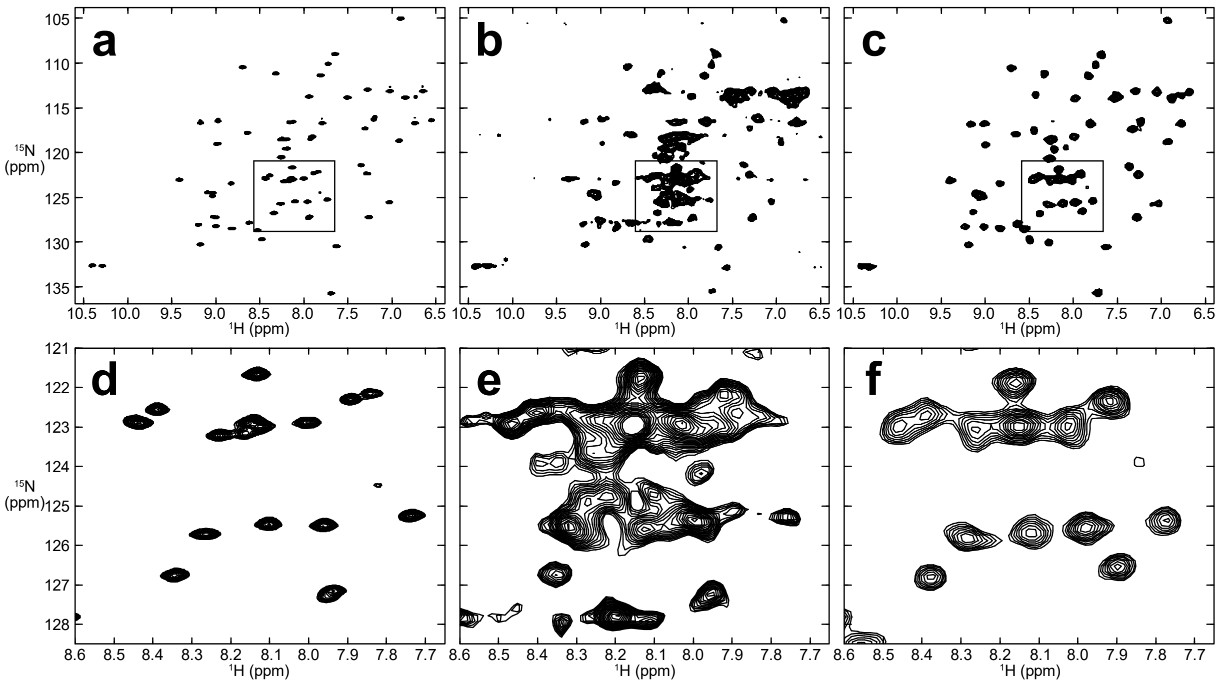


Figure 1. 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of MTS-GB1 in diluted solution (**a**) and 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC spectra of MTS-GB1 (**b**) and wild type GB1 (**c**) in HeLa.S3 cells. A region of the spectra shown in **a**, **b** and **c** is magnified in **d**, **e** and **f**, respectively.

定同位体標識したものを調製し，電気穿孔法で導入することにした.

【結果および考察】

標的蛋白質としては，HeLa.S3細胞を用いたin-cell NMR解析で実績がある[2]，連鎖球菌protein G B1ドメイン（GB1）を選択し，MTSを付加した発現系を作成後，大腸菌の系を用いて^{15}N標識試料の大量発現，精製を行った. さらにこれを電気穿孔法[3]によりHeLa.S3細胞に導入し，細胞試料の2D ^{1}H-^{15}N SOFAST HMQC測定を行った. **Figure 1**には，MTS-GB1のin-cell NMRスペクトルを希薄溶液中のもの，およびMTSを持たないGB1のin-cell NMRスペクトルと比較して示した. MTS-GB1のin-cell NMR測定では，立体構造を保持した状態と部分変性が推定される状態が混在したスペクトルが観測された. これは細胞質内に存在するMTS-GB1由来のシグナル，ミトコンドリア・マトリックス内に存在する（MTSが切断された）GB1由来のシグナル，ミトコンドリアへの移行過程にあるGB1のシグナルが混在して現れているものを推定される. 現在，MTS-GB1を導入したHeLa.S3細胞について，破砕後ミトコンドリア画分を調製し2D ^{1}H-^{15}N SOFAST HMQC測定を行う試みを進めており，良好なスペクトルが得られつつある.

今後は，in-cell NMRについては，MTS-GB1の導入後の経時変化の解析を試みる. In-mitochondria NMRについては測定条件を検討し，さらに良好なスペクトルの取得を目指す. また，MTS-GB1，ミトコンドリアをそれぞれ蛍光試薬によって染色し，共焦点顕微鏡を用いてMTS-GB1のミトコンドリアへの局在化の観察を行う予定である.

References: [1] Barbieri, L. et al. *Biochim. Biophys. Acta.* **1843**, 2492-2496 (2014); [2] Ikeya, T. et al. *Sci Rep.* **6**, 38312 (2016); [3] Danielsson, J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **112,** 12402-12407 (2015).

P16 リン酸化ユビキチンの２つのコンフォメーションの構造変化

○北沢　創一郎[1]，柳　恵一郎[1]，青島　佑[2]，北原　亮[1,3]
1 立命館大学　薬学部
2 立命館大学　生命科学研究科
3 大阪大学　蛋白質研究所

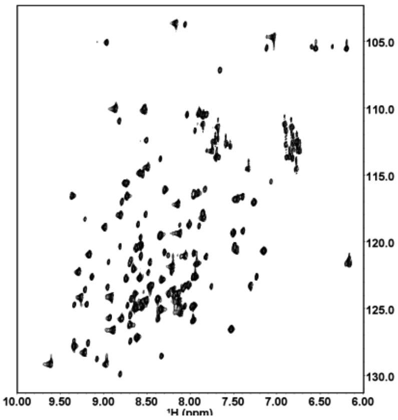
High-pressure NMR reveals conformational fluctuation of major and minor forms of phosphorylated ubiquitin.

○ Soichiro Kitazawa[1], Keiichiro Yanagi[1], Yu Aoshima[2], Ryo Kitahara[1,3]
[1] *College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University*
[2] *Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University*
[3] *Institute of Protein Research, Osaka University*

Ubiquitin phosphorylated at Ser65 (pUb) is Parkin activator[1]. Interestingly, two sets of NMR signals were observed in ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of pUb. The major form has a closely similar conformation to the non-phosphorylated ubiquitin. On the other hand, the minor form has entirely different hydrogen bonding patterns at β-sheet region, in which β_5-strand has retracted into the ubiquitin core region by two amino acid residues[2,3]. The retracted minor conformation provides different interaction surface on the ubiquitin hydrophobic patch from that of the major one. Here, we report the analysis of conformational fluctuation of pUb using high-pressure NMR spectroscopy. Our results indicate that the retracted conformation is not significantly stabilized in pUb and phospho-mimic mutants under high pressure. Pressure-induced chemical shifts were markedly different at the β-sheet and 3_{10}-helix regions between the major and minor ones, indicating that pressure-induced changes in hydrogen bond length and torsion angles are different at the β-sheet region.

【研究の背景と目的】

Ser65がリン酸化されたユビキチン(pUb)はParkinの活性化因子であり、Parkinを活性化させることでミトコンドリアの品質管理を行う[1]。pUbは水溶液中で2つのNMR的に遅い交換による二つの信号を与え、二つの状態の平衡状態にある(Figure 1)。pUbのMinor状態はpHの上昇に伴い存在比が増加することが知られており、中性pHで20%以上の分布率で存在する。pUbのMajor状態の立体構造は、非リン酸化ユビキチン(Ub)の立体構造と概ね一致している[2,3]。一方、pUbのMinor状態は、β_5–strandが二残基分スライドし、β_5-strandのN末端側に存在する3_{10}-helixが伸長する。それに伴いβ–sheet領域の構造が変化している[3]。また、リン酸化により一部のリガンドとの相互作用能が消失している[2]。pUbとParkinを含む様々なリガンドとの相互作用とMajor-Minor間の構造揺らぎの関係は興味深い。しかし、これまでにpUbの構造揺らぎについての十分な知見はない。



Figur e 1. ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of phosphorylated Ub at 298 K.

高圧力NMR、リン酸化ユビキチン

○きたざわ そういちろう，やなぎ　けいいちろう、あおしま ゆう，きたはら りょう

本研究では常磁性緩和促進法によるMajor-Minor間の構造研究及び構造変化に敏感な高圧力NMR法とpUbの構造揺らぎ研究について報告をする。

【方法】

^{15}N/^{13}C標識されたpUbを作成し、^{1}H 950 MHz-NMR装置（大阪大学蛋白質研究所）を用いた三重共鳴実験によりMajor状態, Minor状態の信号を帰属した。常磁性緩和促進(PRE)プローブとしてMTSLを導入したQ40C変異体によりMajor-Minor間の構造変化を測定した。さらに、pUbWTの^{1}H-^{15}N HSQC, ^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルを1気圧から2500気圧の範囲で測定し、リン酸化ユビキチンの安定性を計測した。

【結果と考察】

F4C, K6C, Q40C, S57C, T66C, L71C, L73C変異体を作成し、PINK1と反応をさせた。リン酸化反応が進行したQ40Cについて *S*-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonothioate (MTSL)を導入しPRE実験を行った。Major状態とMinor状態では、２残基分水素結合がスライドするβ_5-strand領域において、信号強度比(常磁性/反磁性)に違いが見られた。特にV70とL71はMajor状態とMinor状態では大きな違いが見られた。V70ではMajor状態では信号強度比が23 %程度であったが、Minor状態は87%であった。同様にL71ではMajor状態では2%程度であったが、Minor状態では67.0%程度であった。L73では、Major状態とMinor状態の信号強度比に明確な違いが見られないことから、おおよそ２残基程度β_5-strandがスライドしていると予測できる。この結果はMajor状態とMinor状態の立体構造の結果とおおよそ一致した。

pUbの^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを298 K, pH 7.2, 1 barで測定した。各残基のMajor状態とMinor状態の信号強度比からMinor状態の存在比を計算すると１気圧でおよそ20%であった。1気圧から2500気圧までの範囲で存在率に変化はほとんどなかった。この結果は、Major状態とMinor状態間の立体構造が大きく違うにも関わらず、二状態間の部分モル体積差(ΔV)は、非常に小さいことを示す。

次に各状態の圧力応答について着目する。Major状態の化学シフトの圧力応答は、Ubのそれと類似していた。化学シフトの圧力応答から天然状態(N_1)と準安定状態(N_2)間のギブス自由エネルギー差 (ΔG^0)とΔV^0は4.1 ± 0.1 kJ/mol, –23 ± 1 ml/molと見積もられ、同条件でのUbのΔG^0, ΔV^0は 3.4 kJ/mol ± 0.1 kJ/mol , –24.7 ± 0.8 ml/molに非常に近い。これらUbとMajor状態の結果の類似性からUbで観測されるN_1-N_2の状態転移がMajor状態でも存在することが示された。

一方、Minor状態とUbの化学シフトの圧力応答は相関がみられなかった。Minor状態で3_{10}-helixが伸長形成した62-65アミノ酸残基で大きな化学シフトの圧力応答と信号の減弱が観測された。これらのことからMinor状態ではUbにみられる状態転移は存在しないが、新たに形成された3_{10}-helixにおいて局所的な構造変化が生じていることが示唆される。

References
(1) Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon EA, Trempe JF, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature, 510*,162-166.
(2) Wauer T, Swatek KN, Wagstaff JL, Gladkova C, Pruneda JN, Michel MA, Gersch M, Johnson CM, Freund SM, Komander D. (2015) Ubiquitin Ser65 phosphorylation affects ubiquitin structure, chain assembly and hydrolysis. *EMBO J. 34,* 307-325
(3) Dong X, Gong Z, Lu YB, Liu K, Qin LY, Ran ML, Zhang CL, Liu Z, Zhang WP, Tang C. (2017) Ubiquitin S65 phosphorylation engenders a pH-sensitive conformational switch. *Proc Natl Acad Sci, 114,* 6770-6775

P17

拡散NMR法による高分子水溶液中の水分子の拡散現象観測

○川口翼[1]，喜多理王[1]，新屋敷直木[1]，八木原晋[1]，福崎稔[2]
1東海大学理学部物理学科
2東海大学九州教養教育センター

Diffusion Phenomena of Water in Polymer Solution by Means of NMR Diffusometry Observation

○Tsubasa Kawaguchi[1], Rio Kita[1], Naoki Shinyashiki[1], Shin Yagihara[1], Minoru Fukuzaki[2]
[1] *Department of Physics, School of Science, Tokai University*
[2] *Kyushu Liberal Arts Education Center, Tokai University*

Water translational dynamics in aqueous polymer solutions are observed by means of NMR Diffusometry. In addition of synthetic polymer, polysaccharides named Sacran is adopted as a solute. The sacran has an extremely large molecular weight over 2×10^7 g/mol and show specific behavior in water interaction such as absorption properties. Although the sacran aqueous solution shows high viscosity, the diffusion coefficient of water and its temperature dependences are close to those of pure water. It is indicated that even in the solution has high viscosity, water molecules diffuse quite freely. On the other hand, the diffusion coefficient shows diffusion time dependence which means the water molecules are interacted by sacran matrix. The characteristic length of the matrix is determined as 86 μm. Further consideration with another polymer aqueous solution will be discussed in the session.

高分子水溶液は温度や濃度、ポリマーの組成を工夫することで様々な特異な性質や機能性を示すことが知られている。特に、多糖類高分子/水系はしばしば生体適合性を示すことから、食品・医療分野などにおいて増粘剤やゲルなどの形で利用されている。しかし、高分子水溶液を特徴づけるためには高分子の構造のみではなく、水と高分子が織りなす分子ダイナミクスをそれぞれ観測・解析する必要がある。構造が単純であり分子量もコントロールしやすいことから、誘電分光法などの手法によりPVP、PVA、PEG水溶液中での水分子ダイナミクスに関する研究が報告されている[1)]。過去の報告から、水分子の回転ダイナミクスに関する知見はある程度得られているが、分子の拡散現象といった視点での報告は十分ではない。また、比較的単純な構造を示す合成高分子のみならず、より実際的な材料として用いられている多糖類高分子の水分子ダイナミクス関する報告はほとんどなされていない。本研究では、拡散NMR法やNMR緩和時間測定により、高分子水溶液中の水分子ダイナミクスを特徴づけることを目的とする。

測定試料として、上述したPVPなどの合成高分子に加え、近年注目されている多糖類高分子Sacranを用いた[2)]。Sacranは2×10^7 g/molの分子量を持つ高分子であり、低濃度であってもゲル化を示すこと、液晶層へと転移することで特異な配向能を示すこと、ヒアルロン酸など既存の材料に比べて極めて高い吸水性を示すことなどその特異な機能が注目されている。さらに、Sacranは微生物由来の多糖類高分子であるため、食品や医療材料としての応用も期待できる。

本研究では400MHz(Avance 400WB, Bruker)-NMRと拡散測定用プローブ(Diff-50, Bruker)を用いて、プロトンの拡散係数・緩和時間測定を行った。必要に応じて、温度域は25℃から60℃の間で変化させて測定を行った。

拡散NMR法、高分子水溶液、水
○かわぐちつばさ，きたりお，しんやしきなおき，やぎはらしん，ふくざきみのる

拡散係数測定にはStimulated Echo法を用い、Stejskal-Tannerの式で解析を行った[3]。傾斜磁場パルス印加時間は1msに固定し、拡散時間は20msから2000msで変化させ、最大傾斜磁場強度は2300gauss/cmとした。

Fig.1に0.5wt% Sacran水溶液中の水分子の拡散係数の温度依存性を示す。これまでの報告から[2]、Sacran水溶液は低濃度であっても高い粘性を示し、ある濃度以上ではゲル状態になることがわかっている。また、ゲル状態のSacranは液晶構造をとり、ある温度で相転移を起こすことが知られている。しかし、Fig.1に示す濃度・温度域では相転移の様な挙動は観測されず、純水の拡散係数と同じ値・傾向を示した。高分子水溶液では、マクロな物性値としての粘性などのパラメータは急激な変化を示すが、溶液中の自由水の運動性にはほとんど影響を与えないことがわかる。

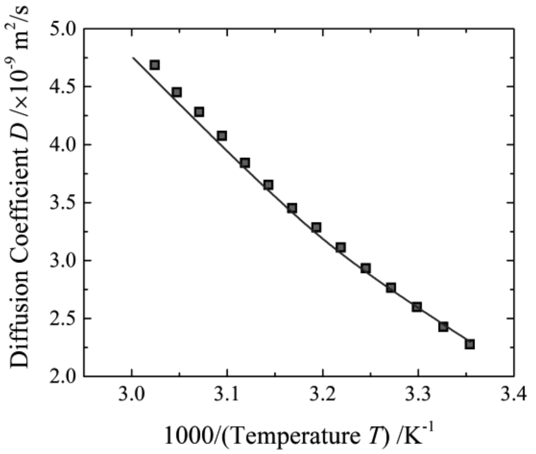


Fig. 1. Temperature dependences of water diffusion coefficient in 0.5wt% Sacran aqueous solution (red square) and pure water diffusion coefficient[5] (blue line).

Fig.2には25℃での1.0wt% Sacran水溶液中の水分子の拡散係数の拡散時間依存性を示す。一般に、分散系や細胞など界面で分子が隔離されている系では、拡散時間が長くなるにつれ系と拡散質の相互作用が増加するため、拡散係数が減少していことが知られている。ただし、高粘度或いはゲル化している高分子/水系であっても、その網目の相関長は水分子に比べて十分に大きいため、水の拡散係数は拡散時間に依存しない事が多い[4]。しかし、Fig.2では明らかに拡散時間の増大に伴って拡散係数が減少していることから、1.0wt%程度のSacranであっても特徴的な構造を形成し水分子の拡散を阻害していることがわかる。さらに、指数減衰を仮定して拡散係数の拡散時間依存性を解析することで、水分子の拡散を阻害している構造の空間スケールは86μm程度と見積もることができた。発表ではその他の合成高分子の結果も交え、高分子水溶液中での水の特異的な振る舞いについて議論する。

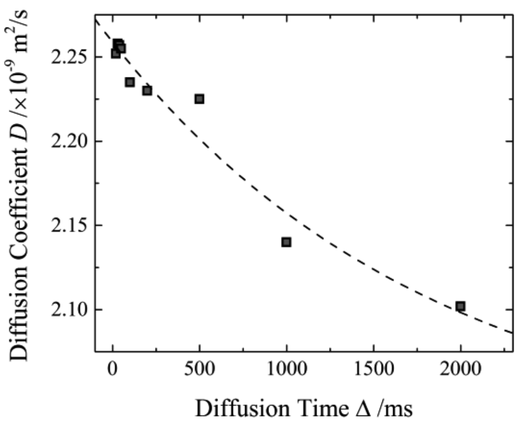


Fig. 2. The diffusion time dependence of water diffusion coefficient in 1.0 wt% Sacran aqueous solution (green square). The black dashed line represents best fitted line by exponential decay.

References

(1) Y. E. Ryabov, Y. Feldman, N. Shinyashiki, and S. Yagihara, *J. Chem. Phys.*, **116**(19), 8610-8615(2002)
(2) K. Okeyoshi, M. Okajima, and T. Kaneko, *Kobunshi Ronbunshu*, **75**(1), 1-8(2018)
(3) J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.*, **52**(5), 2523-2526(1970)
(4) S. Matsukawa, I. Ando, *Macromolecules*, **29**(2), 7136-7140(1996)
(5) M. Holz, S. Heil, A.. Sacco, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2**(20), 4740-4742(2002)

P18

核磁気共鳴法と中性子小角散乱法による Fc と Fcγ受容体の相互作用解析

○與語理那[1,2]、谷中冴子[1,2]、矢木宏和[1]、井上倫太郎[3]、杉山正明[3]、
加藤晃一[1,2]
1名古屋市立大学　大学院薬学研究科
2自然科学研究機構　生命創成探究センター/分子科学研究所
3京都大学　複合原子力科学実験所

The structural analysis of interaction between IgG-Fc and Fcγ receptor glycoproteins using NMR and small-angle neutron scattering

○Rina Yogo[1], Saeko Yanaka[1,2], Hirokazu Yagi[1], Rintaro Inoue[3], Masaaki Sugiyama[3], Koichi Kato[1,2]
1Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University
2Exploratory Research Center on Life and Living Systems/ Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences
3Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University

It remains challenging to characterize detailed structures of glycoproteins and their complexes in solution because of the flexible and heterogenious nature of their carbohydrate moieties. To address this issue, we have been developing methodology using NMR and small-angle neutron scattering (SANS) assisted by stable isotope labeling. Here we apply this approach to structural analyses of the interaction of the Fc region of immunoglobulin G with its conjugate receptor (FcγR). We performed SANS observation of the complex formed between human IgG1-Fc and 75% deuterated FcγR complex for selective observation of the scattering from non-deuterated Fc in approximately 100% D_2O solution. We also utilized stable-isotope-assisted NMR spectroscopy and identified the interaction site of FcγR to Fc despite the high molecular mass (77 kDa) of the Fc-FcγR complex. These techniques enabled us to characterize the interaction mode of Fc-FcγR complex in solution, which was consistent with the previously reported crystal structures.

生体内に細菌やウィルスなどの異物が侵入した際にはそれらを排除するように免疫グロブリン(IgG)を介した免疫システムが働く。IgGはFab領域において異物を認識し、Fc領域において免疫細胞上に存在するFcγ受容体(FcγR)と結合することで免疫機能を発動する。FcとFcγRの相互作用解析は、これまでX線結晶構造解析をはじめとし広く行われてきており、複合体形成に伴い、Fcと、FcγRともに構造変化が誘起されることが明らかとなっている[1]。しかしながら、IgGやFcγRが存在する溶液環境における実際の構造変化はこれまで明らかとされてこなかった。これは、溶液中で複合体中の成分を選択的に観測することが難しかったことによる。そこで、本研究では、溶液中での構造情報を得ることができる中性子溶液散乱法(SANS法)と核磁気共鳴法(NMR法)を用い、安定同位体標識を施すことで、複合体中における特定成分の観測および選択的構造情報の抽出を試みた。

免疫グロブリンG、Fcγ 受容体、中性子小角散乱

◯よごりな、やなかさえこ、やぎひろかず、いのうえりんたろう、すぎやままさあき、かとうこういち

SANS法では、分子の大きさや形状などのマクロな構造情報を得ることができる。中性子散乱は、原子ごとに固有の散乱長を有し、特に軽水素原子と重水素原子の散乱長は大きく異なることが知られている。この散乱長の違いを利用することで、溶液と溶質の散乱長の差をコントロールできる。これにより特定サブユニットと溶媒の散乱長密度を溶質と一致させ、そのサブユニットの散乱を見かけ上消すことで、観測したいサブユニットのみの情報を抽出することが可能となる[2]。本研究では、大腸菌発現系を用いて、可溶型Fcγ受容体Ⅲb（sFcγRⅢb）に75%重水素標識を施すことで、Fc-sFcγRⅢb複合体中のFcに由来する散乱情報を特異的に抽出することに成功した。さらに、FcとsFcγRⅢbは弱い相互作用で結合することから、溶液中での解離平衡を考慮することで、Fc-sFcγRⅢb複合体の散乱曲線が、結晶構造から算出される理論散乱曲線を用いてよく説明されることが明らかとなった。本研究の結果より、溶液中において、FcはFcγRと結合することで、Fig.1の結晶構造で示されるような四次構造変化をすることが示された[3]。

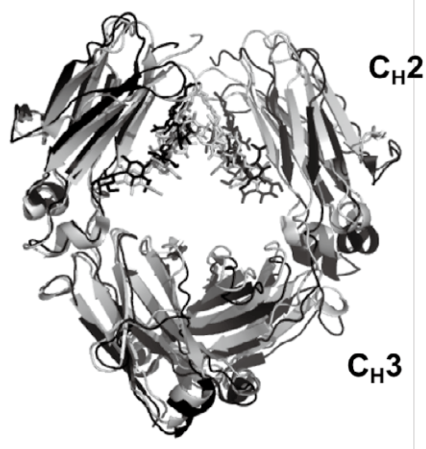


Fig.1 Conformational change of Fc upon binding to sFcγRⅢb

Crystal structure of free Fc (PDB code: 3AVE) and Fc-sFcγRⅢb complex (1T89)
stick : sugar chain

NMR法では、sFcγRⅢb上におけるFcとの結合部位を特定するため、sFcγRⅢbの主鎖のアミドプロトン、アミド窒素、CαおよびCβに由来する NMR シグナルの帰属を行った。[u-^{13}C,^{15}N]-sFcγRⅢbに重水素標識を施すことで、劇的にシグナルの感度が上昇し、主鎖に由来するシグナルの帰属を達成することができた[4]。さらに、交差飽和法を用いて、Fcとの相互作用界面でのsFcγRⅢbのシグナル減弱を観測した。

以上より、安定同位体標識を施すことで、SANS法、NMR法を用いて溶液中における、FcとFcγRの複合体形成に伴う構造変化を捉えることに成功した。

References:

[1] Mizushima, T., Yagi, H., Takemoto, E., Shibata-Koyama, M., Isoda, Y., Iida, S., Masuda, K., Satoh, M. and Kato, K., Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their glycans, Genes to Cells,16, 1071-1080 (2011)

[2] Sugiyama, M., Yagi, H., Ishii, K., Porcare, L., Martele, A., Oyama, K., Noda, M., Yunoki, Y., Murakami, R., Inoue, R., Sato, N., Oba, Y., Terauchi, K., Uchiyama, S. and Kato, K., Structural characterization of the circadian clock protein complex composed of KaiB and KaiC by inverse contrast-matching small-angle neutron scattering, Scientific Reports, 6, 35567 (2016)

[3] Yogo,R., Yanaka,S., Yagi,H., Anne Martel, Linoel Porcar, Yutaro Ueki, Rintaro Inoue, Nobuhiro Sato, Sugiyama,M., Kato,K., Characterization of conformational deformation- coupled interaction between immunoglobulin G1 Fc glycoprotein and a low-affinity Fcγ receptor by deuteration-assisted small-angle neutron scattering., Biochemical and Biophysical Reports,12,1–4 (2017)

[4] Yogo,R., Yanaka,S., Kato,K., Backbone ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N assignments of the extracellular region of human Fcγ receptor IIIb, Biomolecular NMR Assignment 12(1):201-204 (2018)

P19 ヤエヤマサソリ *Liocheles australasiae* 由来の抗菌活性を有するペプチド毒素 LaIT2 の多次元 NMR 分光法による構造機能相関解析

〇田村真生 [1]、十一浩典 [2],宮下正弘 [2]、宮川恒 [2]、森田勇人 [1]
1 城西大学・大学院理学研究科
2 京都大学・大学院農学研究科

Solution structural studies of insecticidal peptide LaIT2 from Japanese scorpion, *Liocheles australasiae*, with heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy

〇Maiki Tamura[1],Hironori Juichi[2],Masahiro Miyashita[2],Hisashi Miyagawa[2],Eugene Hayato Morita[1]
[1]Department of Chemistry, Graduate School of Science, Josai University
[2]Department of Agriculture, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Japanese scorpion, *Liocheles australasiae*, mainly inhabits in the Yaeyama islands, has the peptide like poison, LaIT2, (59AA), which is selectively acting to insects. LaIT2 also has the antibacterial activity. To clear the structural properties of LaIT2 inducing these two physiological characters, we have established the *E. coli* overexpression system for GST tagged LaIT2. Overexpressed GST-LaiT2 in M9 medium was purified with GST affinity column. GST tag was truncated with enterokinase treatment and isolated LaIT2 was purified with GST affinity and benzamidine-sepharose columns. With the use of ^{15}N-NH_4Cl, ^{15}N labeled LaIT2 was prepared and several ^{15}N-edited multidimensional NMR spectra were measured. With these spectra, structural analysis is in progress.

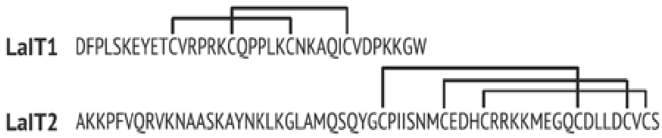


Fig.1 Amino acid sequence of LaIT1 and LaIT2

日本に生息する 2 種類のサソリのうちの 1 種ヤエヤマサソリから分泌される毒素には、昆虫に選択的に作用するだけでなく、抗菌作用をも合わせ持つペプチド毒素 LaIT2 ならびに、LaIT2 と類似構造を持つと予測される複数のペプチド毒素が含まれている。しかし、抗菌活性を示すものは限られており、昆虫選択的毒性と抗菌活性がどのような分子構造に由来するかは明らかになっていない。この点を明らかにするために、安定同位体標識法を併用した多次元 NMR 分光法により LaIT2 の溶液構造解析を行い、すでに溶液構造が明らかになっている LaIT1

LaIT2、昆虫選択的毒性、抗菌活性
〇たむらまいき、じゅういちひろのり、みやしたまさひろ、みやがわひさし、もりたはやと

と比較することで、２つの生理活性をもたらす構造要因を特定することを計画した。

本目的を達成するために、まず、LaIT2 の大腸菌における大量発現の構築を行った。LaIT2 をコードする cDNA 情報をもとに、大腸菌内での発現に適するようにコドンの最適化を行って人工合成した DNA 断片を、大腸菌大量発現用ベクターpET-32a の NcoI、XhoI の制限酵素サイトに挿入することで、GST-LaIT2 の大量発現用プラスミドを作製した。

作製したプラスミドを、大腸菌 Rosetta-Gami™ B (DE3)/pLysS、Rosetta 2 (DE3)/pLysS に形質転換することで、GST-LaIT2 の大量発現系を作成した。形質転換を行った大腸菌は各々M9 培地中、20℃で培養し OD_{600}=0.5 で 1.0mM、0.5mM IPTG の添加により GST-LaIT2 の発現誘導を行った。IPTG 添加 30 分後、Rifampicin (100μg/ml) を添加することで可溶化率の向上を試みた。IPTG 添加後さらに 4 時間培養を行うことで GST-LaIT2 の大量発現を行った。

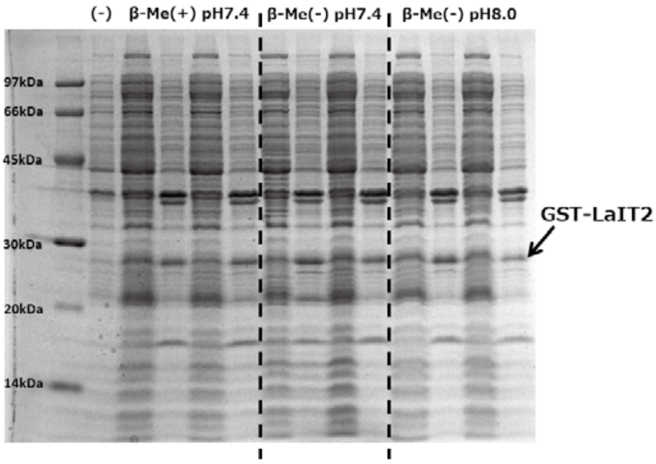


Fig.2. The SDS PAGE result of three Lysis buffer by sonication (-;Before Induction),IPTG 1.0mM β-Me(+) pH7.4 sup/ppt ,IPTG 0.5mM β-Me(+) pH7.4 sup/ppt , ITPG 1.0mM β-Me(-) pH7.4 sup/ppt , IPTG 0.5mM β-Me(-) pH7.4 sup/ppt , IPTG 1.0mM β-Me(-) pH8.0 sup/ppt ,IPTG 0.5mM pH8.0 sup/ppt

以前の培養条件(培養温度 20℃、IPTG 濃度 1.0mM、Rifampicin 濃度 100μg/ml)より、IPTG 濃度 0.5mM で発現誘導を行い、Lysis Buffer(50mM Tris-HCl,pH 8.0,300mM NaCl,10mM Imidazole)を用いて超音波破砕を行った方が、可溶率が向上したことが推測された。

最適な培養条件のもと、GST-LaIT2 は、回収した菌体を超音波処理による破砕により得られた可溶性画分に対し、ポリエチレンイミン（PEI）により除核酸処理を行い、GSTrap FF（GE Healthecare）を用いたケル濾過カラム法により、純度 95%以上の精製 GST-LaIT2 試料を得た。得られた、GST-LaIT2 は Enterokinase により室温で 4 時間処理することで、LaIT2 を単離することができた。

現在、測定した M9 培地に ^{15}N-NH_4Cl を用いることで、^{15}N 標識 LaIT2 の作出を進めている。本発表会では、^{15}N 標識 LaIT2 を用いた多次元 NMR スペクトル測定の結果について報告する予定である。

Reference

(1) サソリ毒は生理活性の宝庫　宮下正弘著　生物工学学会誌第 94 巻　pp.38-41

(2) Shoichiro Horita, Nobuto Matsushita, Tomoyuki Kawachi, Reed Ayabe, Masahiro Miyashita, Takuya Miyakawa, Yoshiaki Nakagawa, Koji Nagata, Hisashi Miyagawa, Masaru Tanokura,, Biochem. Biophys. Res. Comm. 411,(2011),738-744. “

P20 藍色細菌 *Anabaena variabilis* 由来低温耐性関連タンパク質 RbpD の多次元 NMR 分光法による二次構造解析

○田中邑樹[1], 佐藤直樹[2], 林秀則[3,4], 森田勇人[1]
1 城西大学大学院理学研究科
2 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻・生命環境科学系
3 愛媛大学プロテオサイエンスセンター
4 愛媛大学理学部化学科

Secondary structural analysis of the cyanobacterial RNA-binding protein RbpD from cyanobacterium *Anabaena variabilis* with heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy

○Yuuki Tanaka[1], Naoki Sato[2], Hidenori Hayashi[3],[4], Eugene Hayato Morita[1]
[1]*Graduate Scool of Science, Josai University (corresponding; Eugene Hayato Morita),*
[2]*Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo*
[3]*Proteo Science Center, Ehime University,*
[4]*Gradate School of Science and Engineering, Ehime Unviersity*

RbpD in *Anabaena variabilis* is a member of the small RNA-binding proteins containing a single RNA recognition motif (RRM). In *Anabaena variabilis,* low temperature induces the expression of rbp genes with the exception of rbpD gene. On the structural point of view Rbps other than RbpD consist of RRM and C-terminal glycine-rich domain, and RbpD only contains one RRM domain. To elucidate the functional differences of RRMs between RbpD and other Rbp proteins, especially RbpA, we tried to compare the solution structures of RRMs in RbpD and RbpA1, with heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy. With the *E. coli* overexpression system for RbpD, we have prepared the ^{15}N or ^{15}N/^{13}C labelled RbpD and measured HN(CO)/CA/HNCA, CBCA(CO)NH/ CBCANH, and ^{15}N-edited NOESY-HSQC. On the basis of these spectra, secondary structural analysis for RbpD is now in progress and secondary structural differences between RRMs in RbpD and RbpA will be shown.

藍色細菌*Anabaena variabilis*由来のRbpD は、保存性の高いRNA -recognition motif（RRM）のみから構成されており、他のRRMを含む小型RNA結合タンパク質と異なり、RRMのカルボキシ末端にグリシンリッチドメインを持たないという構造上の特徴がある。さらに、RbpDは、他のRRMを含む小型RNA結合タンパク質のような、低温ストレスによる発現誘導が見られないという機能上の特徴がある。このようなRbpDの機能上の特異性が、構造上の特性とどのように関係しているかについては、解明すべき点が多く存在している。

そこで本研究ではRbpDの大腸菌による大量発現系を構築するとともに、安定同位体標識法(^{15}N-　^{13}C-)を用いた多次元NMR分光法によりその溶液構造を解明することで、RbpDとRbpA1のRRMドメインの構造上の差異を明らかにすることを試みた。
これまでに作製したRbpDの大腸菌大量発現系を用いて、37℃ M9培地中で培養し、OD_{600}＝0.5で、0.25ｍM IPTGを添加しRbpDの発現誘導を行った。30分後 Rifampicin (100μg/ml) を添加することで可溶化率の向上を図った。^{15}N-NH_4Clならびに^{13}C-Glucoseを用いることで、

RRM　RNA結合タンパク質　藍色細菌

○たなかゆうき　さとうなおき　はやしひでのり　もりたはやと

^{15}N のみもしくは、^{15}N/^{13}C により安定同位体標識を行った。
RbpD の二次構造を決定するとともに、主鎖を構成する各原子の化学シフトを同定するために、^{15}N 標識 RbpD を用いて、^{1}H-^{15}N HSQC、^{1}H-^{15}N NOESY-HSQC、TOCSY-HSQC スペクトルを、^{15}N/^{13}C 二重標識 RbpD を用いて、HNCO、HN(CO)CA／HNCA ならびに CBCA(CO)NH／CBCANH スペクトルを城西大学機器分析センターに既設の Agilent 社製 700MHz FT-NMR を用いて測定した。試料温度 25℃、試料濃度 0.2mM~0.4mM で測定を行った。測定データのフーリエ変換には NMRPipe を、シグナルの連鎖帰属には、Sparky を用いた。

RbpD は、試料濃度を高めると凝集体を形成しやすくなること（25°Cの条件下で、0.4mM で約 48 時間、0.2mM で約 168 時間程度安定であった）、ならびに測定スペクトルの総合感度の計算から、CBCANH のみ 0.4mM で、そのほかのスペクトルは 0.2mM で測定を行った。NOESY のミキシングタイムは 50ms、100ms、150ms の３点で、TOCSY のミキシングタイムは 25ms、50ms の 2 点で行った。HNCA、CBCANH スペクトル計測は、^{13}C 上の磁荷の展開時間にコンスタントタイム法を採用し、感度の向上を図った。
現在これらのスペクトルの中から特に HN(CO)CA/HNCA、CBCA(CO)NH/CBCANH、^{1}H-^{15}N NOESY-HSQC を用いて、主鎖の連鎖帰属を進めており、本発表会ではその結果に基づく RbpD と RbpA1 の RRM の二次構造比較結果について報告する。

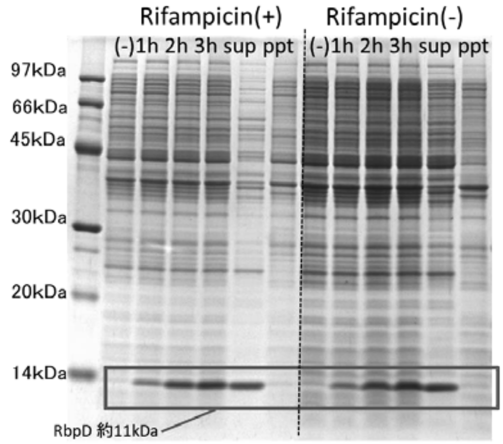


Fig.1 SDS-PAGE of overexpressed RbpD

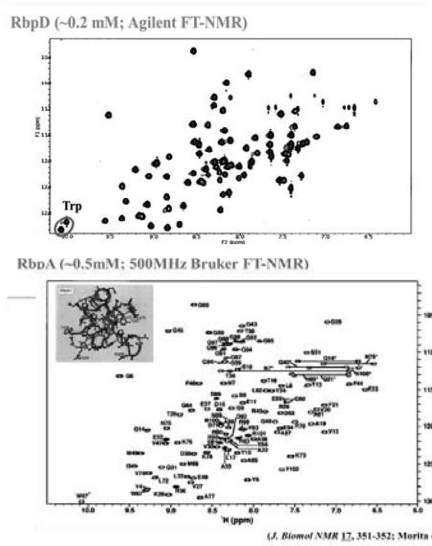


Fig.2 HSQC spectra of RbpD and RbpA

References
1. Kyonoshin Maruyama, Naoki Sato, Niji Ohta, Nuc. Acid. Res. 1999 **27(9)** 2029-2036
2. Eugene Hayato Morita, Toshihide Murakami, Koichi Uegaki, Toshio Yamazaki, Naoki Sato, Yoshimasa Kyogoku, Hidenori Hayashi J. Biomol. NMR, 2000 **17**: 351-352

P21

NMRによる花成制御化合物の探索

○新家粧子[1]，河原郁美[1]，中村歩美[2]，樋口佳恵[3]，木川隆則[3]，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、大学院工学府
3 理化学研究所、生命機能科学研究センター

Drug discovery by NMR to control flowering

○Shoko Shinya[1], Ikumi Kawahara[1], Ayumi Nakamura[2], Kae Higuchi[3], Takanori Kigawa[3], Toshimichi Fujiwara[1], Chojiro Kojima[1,2]
1 Institute for Protein Research, Osaka University
2 College of Engineering Science, Yokohama National University
3 Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN

Florigen is a flowering hormone in plants. A rice florigen, Hd3a, interacts with bZIP transcription factor, OsFD1, via a florigen receptor protein, GF14c [(1)]. Formation of this complex is essential for flowering function in rice. We aim to control the flowering by the inhibitor or activator, and NMR and TR-FRET screenings using chemical library were applied to GF14c-OsFD1 complex. The screening hits were validated by STD-NMR. To identify the binding site, the ^{13}C, ^{15}N-Ile selective labeled sample was prepared using cell-free system and used for the titration experiment.

【序論】

フロリゲンは花芽形成を誘導する植物ホルモンである。2011年に、イネフロリゲン受容体(GF14c)とイネフロリゲン(Hd3a)、転写因子ペプチド(FD1)の3者複合体結晶構造が報告された[(1)]。これにより、葉で産生されたフロリゲンが茎頂部へと移動してフロリゲン受容体と結合し、さらに複合体は核内へと移行して転写因子ペプチドとの3者複合体を形成することによって花芽形成遺伝子を活性化することが明らかになった。これらの複合体形成を阻害、あるいは促進する薬剤が創成されれば、花成のタイミングをコントロールすることが可能になると考えられる。

本研究では、人工的な花成の制御を目指して、イネフロリゲン受容体と転写因子ペプチドの複合体をターゲットとし、Time Resolved(TR)-FRETスクリーニングおよび^{19}FフラグメントNMRスクリーニングにより形成阻害剤および促進剤の探索を行った。得られたスクリーニングヒット化合物は、STD-NMR法および化学シフト摂動法により、蛋白質との結合を確認した。

【方法・結果】

ユーロピウム(Eu)標識抗体でラベルしたフロリゲン受容体と、シアニン色素Cy5でラ

フロリゲン、薬剤スクリーニング、阻害剤

○しんやしょうこ、かわはらいくみ、なかむらあゆみ、ひぐちかえ、きがわたかのり、ふじわらとしみち、こじまちょうじろう

ベルしたリン酸化転写因子ペプチドを用いて、大阪大学が保有する化合物ライブラリを使用し23,614個の化合物に対してTR-FRETスクリーニングを行った。TR-FRETスクリーニングの結果、フロリゲン受容体と転写因子ペプチドの複合体形成阻害効果を示す24種の化合物を得た。これらの化合物についてフロリゲン受容体とのSTD-NMR測定を行ったところ、幾つかの化合物でSTDシグナルが観測された(Fig.1)。これはフロリゲン受容体と転写因子ペプチドの複合体形成阻害効果を示すヒット化合物がフロリゲン受容体に直接結合していることを示している。

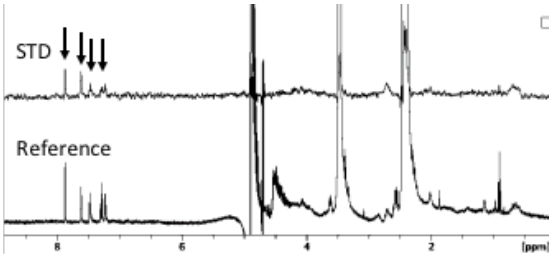


Fig. 1 STD-NMR spectrum of S-16 with GF14c.
Arrows indicate STD signals.

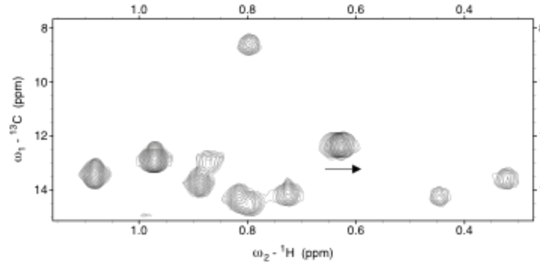


Fig. 2 Chemical shift change of Ile signal in ^{1}H-^{13}C HSQC induced by S-16 binding.

フロリゲン受容体は分子量2.5万の二量体であり、均一ラベル体を用いた二次元スペクトルの化学シフト変化の追跡は困難であった。そこで、ILE残基のみを選択的に^{1}H/^{13}C/^{15}N標識したフロリゲン受容体を無細胞系で調製した。主鎖シグナルの帰属情報に基づき、HCCH-TOCSYおよび^{13}C-NOESYスペクトルによりILEのメチル基シグナルの帰属を行った。フロリゲン受容体に対してS-16化合物を滴定した結果、^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルのILEシグナルに化学シフト変化が観測され、ヒット化合物の結合部位を同定することに成功した(Fig. 2)。一方、阪大蛋白研では、885化合物からなる^{19}Fフラグメントライブラリを整備している。フロリゲン受容体に対して^{19}F-NMRフラグメントスクリーニングを実施した結果、14個のヒット化合物が得られた(Fig. 3)。ヒット化合物についてSTD-NMR測定を行ったところ、10個の化合物において確かに受容体に結合することを示すSTDシグナルが観測され、フロリゲン受容体に結合する新規化合物が見出された。

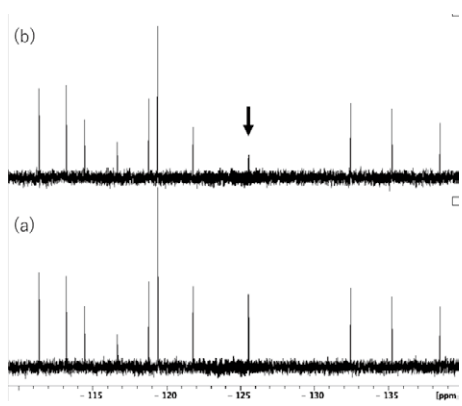


Fig. 3 ^{19}F spectra of a fragment mixture (a) in the absence of GF14c and (b) in the presence of GF14c. The signal of hit compound is shown by arrow.

【参考文献】

1. Taoka et. al., 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. Nature, 476, 332-335 (2011)

P22

黒酵母が作る新規β-グルカンの可逆的秩序ー無秩序転移の解明

○甲野裕之[1]，近藤修啓[2]，平林克樹[2]，尾形慎[3]
1 苫小牧工業高等専門学校
2 伊藤忠精糖株式会社
3 福島工業高等専門学校

The order-disorder transition of a novel β-(1→3, 1→6)-D-glucan from *Aureobasidium pullulans*

○Hiroyuki Kono[1], Nobuhiro Kondo[2], Katsuki Hirabayashi[2], Makoto Ogata[3]
1 National Institute of Technology, Tomakomai College
2 Itochu Sugar Co. Ltd.
3 National Institute of Technology, Fukushima College

Structural characterization of the water-soluble *Aureobasidium pullulans* β-(1→3, 1→6)-glucan (KBG) is yet to be achieved, although KBG is expected to exhibit excellent biofunctional properties. Thus, we herein report the elucidation of the primary structure of KBG using solution NMR, followed by comparison of the obtained structure with that of schizophyllan (SPG). Structural characterization of KBG revealed that the structural units are a β-(1→3)-ᴅ-glucan backbone with four β-(1→6)-ᴅ-glucosyl side branching units every six residues. In addition, solid-state NMR analysis revealed that KBG forms a triple-helical conformation in aqueous solution but exhibits a random coil structure in DMSO solution, which is similar to the behavior of SPG.

【目的】β-(1→3,1→6)-グルカンはグルコースがβ-(1,3)-グリコシド結合した主鎖にβ-(1,6)-分岐を持つ多糖であり、細菌、真菌、酵母、キノコなどの細胞壁を構成している。分岐様式が異なる様々なβ-グルカンが知られており、シイタケ子実体から抽出されるレンチナン、スエヒロタケ由来のシゾフィラン（SPG）などは抗腫瘍活性、免疫賦活活性を持つことから、医薬品として応用されている。β-グルカンは水溶液中で水素結合により三重螺旋構造を形成しているものが多く、分子構造と高次構造形成、生理活性と高次構造には何らかの関係性があると考えられている。

細胞壁成分以外に黒酵母を特殊な条件下で培養するとβ-グルカンを生成することが明らかになっている。しかし黒酵母β-グルカンは高い生理活性が示唆されているが、一般に不溶性のためその応用が困難であった。我々のグループでは黒酵母β-グルカンに水熱処理を行なうことで、水溶性β-グルカンを高収率で生産できることを明らかにした（クルルのβ-グルカン（KBG））[1,2]。本研究ではKBGの分子構造を詳細に明らかにし、水溶液中での高次構造形成に関する情報を得ることを目的とした。

【方法】水熱処理して得られたKBGをD_2OもしくはDMSO-d_6中で各種二次元NMR測定を行い、そのスペクトル解析から一次構造(分岐構造、結合位置)を決定した。KBGとポリ

固体NMR、β-グルカン、構造転移
○こうの ひろゆき、こんどう のぶひろ、ひらばやし かつき、おがた まこと

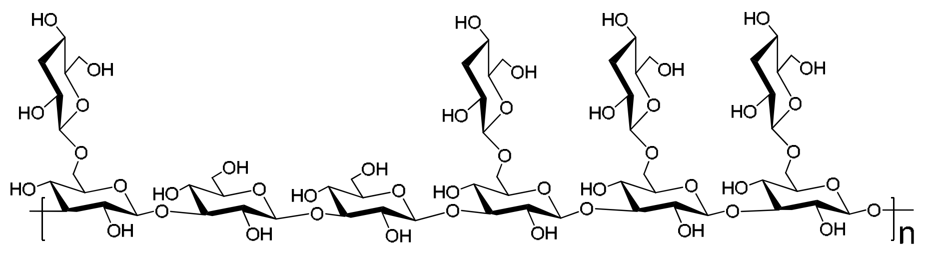


Fig. 1 Primary structure of the water-soluble β-(1→3, 1→6)-glucan (KBG) from Aureobasidium pullulans.

アデニル酸（PolyA）との分子間相互作用を円二色性（CD）スペクトルから評価し、各溶媒における高次構造に関する情報を得た。また水とDMSO中に溶解したKBGを凍結乾燥し、得られた試料について固体NMR（緩和）測定を行ない、分子運動性より溶液中での高次構造を推測した。

【結果】KBGの相関NMRスペクトル上に磁気的不等価な6種類のβ-グルコース残基が検出された。次に逆ゲート付き（定量）^{13}C NMRによる各残基の定量性評価、NOESYスペクトルによるシーケンス解析から、その一次構造はβ-(1→3)-主鎖6残基毎に4残基のβ-(1→6)-グルコース分岐を持つ分岐度66％の繰返し単位から成ることが明らかになった（Fig. 1）[3,4]。また、CDスペクトルにおける吸収強度変化に基づきKBGは水溶液中でPolyAと水素結合を介して複合体形成することが確認され、PolyA-KBGPolyA- SPG錯体の分子挙動との比較から、KBGは水溶液中において高次構造を形成していることが示唆された。

次に水およびDMSOに溶解したKBGを凍結乾燥し、固体高分解能NMRおよび広角X線回折から高次構造に関する情報を得た。DMSOから凍結乾燥したKBGの各共鳴線の縦緩和、交差緩和時間はいずれも水から凍結乾燥した場合よりも極端に短く、水中ではKGBの分子運動が抑制されていることが明らかになった。また水から凍結乾燥したKBGの固体NMRスペクトルには典型的な三重螺旋に帰属される主鎖C3共鳴線が観測され、DMSO中ではランダムコイルの共鳴線が確認された。さらにWAXS上には三重螺旋ピッチと思われる回折が5°付近に観測され、そのピッチ長は17.5nm程度であった。よって、類似構造を持つシゾフィランと比較すると、その螺旋ピッチ長が若干長く、側鎖の分岐度がコンフォメーションおよびピッチ長に影響を与えることが予想された。また水/DMSO混合溶媒中でのNMR測定より、構造変化はDMSOが80(v/v)%程度で生じていることが明らかになった。

謝辞

本研究は科研費JP16K05802の助成を受けて行なわれたものである。

参考文献

[1] K. Hirabayashi, N. Kondo, S. Hayashi, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **32,** 206-212 (2016).

[2] www.itochu-sugar.com/corporate/products/glucan.html

[2] H. Kono, N. Kondo, K. Hirabayashi, M. Ogata, et al., *Carbohydr. Polym.* **174,** 876-886 (2017).

[3] H. Kono, N. Kondo, K. Hirabayashi, M. Ogata, et al., *Data in Brief* **15,** 382-388 (2017).

P23

セルロース誘導体の置換基分布状態の解明

○甲野裕之，沼田純
苫小牧工業高等専門学校

Detailed substituent distribution of cellulose derivatives

○Hiroyuki Kono, Jun Numata
National Institute of Technology, Tomakomai College

Properties of cellulose derivatives strongly depend on the mole fraction of un- and substituted anhydroglucose units (AGUs) comprising the polymer chains as well as substituent degree (DS). Herein, mole fractions of the AGUs in partially substituted cellulose acetate (CA) were determined by NMR. CA samples with varying DS were prepared by the acid-hydrolysis of cellulose triacetate in acetic acid. Quantitative analysis of the ^{13}C NMR spectra facilitated the assignment of the carbonyl carbon shifts of the 2-mono-, 3-mono-, 6-mono-, 2,3-di-, 2,6-di-, 3,6-di-, and 2,3,6-tri-substituted AGUs, and the determination of the mole fraction of 7 AGUs and unsubstituted AGU in the CA chains. The comparison of the mole fractions of the 8 AGUs suggested that the acetone solubility of CA strongly related to the AGU composition

【目的】現在までにセルロースエステル[1,2]およびエーテル[3-5]の詳細な置換基分布状態を加水分解等の前処理をすることなく、ＮＭＲを用いて直接解明する方法について検討を行なってきた[1]。セルロース誘導体は一般に置換基分布が異なる8種類のグルコース残基を含む。そのＮＭＲスペクトルは置換基、グルコース環領域ともに複雑に重複しており、その解釈が容易ではない。そこで置換度(DS)の異なる複数の試料についてＮＭＲ解析を実施し、その共鳴線強度変化から各モノマーの共鳴線帰属が可能であることを明らかにした[1-4]。しかしセルロースエステルの場合、グルコース炭素共鳴線への置換基効果が低く、帰属した共鳴線が重複することで、定量的な評価が不可能である。そこで本研究では酢酸セルロースをターゲットとし、そのカルボニル炭素共鳴線を用いたモノマー組成決定とその定量評価を実施した。三酢酸セルロースの加水分解により複数の置換度を持つ二次アセテートを合成し、その置換状態とアセトン溶解性との相関性を評価した。

【方法】三酢酸セルロース(Aldrich)を酢酸に溶解し、硫酸と水を加え、80℃で加水分解反応により部分アセチル化セルロースを合成した。中和、精製後、得られた試料についてＮＭＲ測定を行ない、カルボニル炭素領域に対してSimplex法により波形分離を行なった。各波形の信号強度からDSに対する各グルコース残基のモル分率を算出した。またセルロースを1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリドに溶解し、均一系アセチル化反応によって部分アセチル化セルロースを合成し、同様の解析を行った[1]。

多糖類、高分子、セルロース
○こうの ひろゆき、ぬまた じゅん

【結果】三酢酸セルロースの加水分解により、DS=2.31、1.81、1.28の二次アセテートを合成した。各試料についてHSQC、HMBC、HSQC-TOCSY測定を行ない、グルコース残基炭素の帰属を行った。次に定量^{13}Cスペクトルに対して波形分離により各共鳴製強度を求め、グルコース炭素共鳴線積分値との比較に基づいて、カルボニル炭素共鳴線が帰属できた。さらに各カルボニル炭素共鳴線強度とDSから置換された7種類のモノマーモル分率を決定し、DSに対してプロットを行なった結果、次の点が明らかになった。

1）加水分解初期（DS= 3～2.4）ではアセチル基の加水分解が2, 3, 6位では差は見られず、二置換体の生成がほぼ同一のモル比で推移する。
2）アセチル置換基の不均一系加水分解に対する反応性はC2位 ＞C3位 >> C6位の順に進行する。
3）DSが2以下になると6位一置換体のモル分率が急激に生成し、置換基の分布状態に極端な不均一性が生じる。

これら試料においてDS=2.31の試料のみアセトン溶解性を示した。一方完全均一系の一段階で合成した試料についてはほぼ同一DSであっても全く溶解性を示さなかった。つまり、二段階合成法で合成された二酢酸セルロースは加水分解反応初期における2,3,6位での均一な分解が溶解性に強く影響を及ぼすことが確認された。

謝辞
本研究は科研費JP16K05802の助成を受けて行なわれたものである。

参考文献

[1] H. Kono, C. Oka, R. Kusumoto, S. Fujita, *Carbohydr. Polym.* **170,** 23-32 (2017).
[2] H. Kono, H. Hashimoto, Y. Shimizu, *Carbohydr. Polym.* **118,** 91-100 (2015).
[3] H. Kono., *Data in Brief* **18,** 1088-1098 (2018).
[4] H. Kono, *Carbohydr. Res.* **445,** 51-60 (2017).
[5] H. Kono, K. Oshima, H. Hashimoto, Y. Shimizu, K. Tajima, *Carbohydr. Polym.* **146,** 1-9 (2016).

P24 Concerted Action of Molecular Chaperones in Protein Unfolding

○Haojie Zhu[1], Tomohide Saio[1, 2], WalidA Houry[3], Koichiro Ishimori[1, 2]

1.Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University,

2.Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University,

3.Department of Biochemistry University of Toronto

A molecular chaperone Trigger Factor (TF) is known to play important roles in protein synthesis, but was recently found to interact with an ATP-dependent chaperone ClpX that unwinds the misfolded proteins for degradation. To unveil the mechanism of the protein unwinding mediated by TF and ClpX, we have exploited solution NMR and investigated the interaction between TF and ClpX. Our data indicated nucleotide-dependent interaction between the two proteins and possible overlap between the substrate binding sites and ClpX-binding sites on TF, which led us to establish a possible model of the cooperative work in protein unwinding.

[Background]

In *Escherichia coli* (*E.coli*), molecular chaperone Trigger Factor (TF), consisting of three domains, ribosome-binding domain (TF^{RBD}), proline peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase domain (TF^{PPD}), and substrate-binding domain (TF^{SBD}) (**Fig. 1a**), is a ribosome-associated chaperone and plays important roles in the protein synthesis, facilitating folding and translocation of proteins [1]. On the other hand, misfolded or denatured proteins are unfolded by an ATP-dependent chaperone ClpX then degraded by ClpP protease[2]. ClpX subunit consists of an ATPases associated with diverse cellular activities domain (ClpX^{AAA}) and a zinc binding domain (ClpX^{ZBD}), and six ClpX subunits forms a homohexamer[2] whose four subunits are in the nucleotide-bound form and the other two are in the nucleotide-free form (**Fig. 1b**). The conformational changes during the cycle of ATP binding, hydrolysis and nucleotide release are expected to unwinds the substrate protein[2]. Recently, the unfoldase activity of ClpX is found to be modified by the direct interaction with TF, whereas the mechanism of protein unfolding mediated by TF and ClpX remains unknown. Herein we focus on the interaction between TF and ClpX to unveil the mechanism of protein unwinding mediated by a concerted action of TF and ClpX.

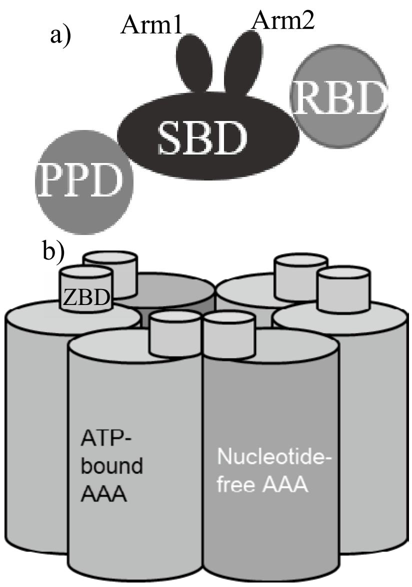


Fig. 1 a) The scheme of TF
b) The scheme of ClpX

[Experimental Procedures]

Molecular Chaperone, trigger factor, ClpX, interaction, NMR

しゅこうけつ　さいおともひで　WalidA Houry　いしもりこういちろ

We exploited solution NMR to investigate the interaction between TF and ClpX. Due to the large size of the system, we have exploited methyl-selective isotope-labeling in which the methyl groups of Ile, Leu, Val, Met, and Ala are specifically protonated and ^{13}C-labeled in the deuterated background[3]. To obtain insights into the interaction between TF and ClpX, a series of NMR titration experiments were performed, where ClpX or its domains, ClpX^{AAA} and ClpX^{ZBD}, were titrated into isotopically labeled TF domains, TF$^{PPD\text{-}SBD}$ and TF^{RBD}. The titrations were performed in the absence and presence of ADP or ATP analogue AMP-PNP.

[Results and Discussion]

Our NMR titration experiments clearly showed specific TF-ClpX interaction and the ClpX-interaction sites on TF were identified. The data showed that the TF and ClpX use multiple sites for the interaction. All of the three domains of TF, TF^{PPD}, TF^{SBD}, and TF^{RBD}, and both of the two domains of ClpX, ClpX^{ZBD} and ClpX^{AAA} are involved in the interaction. Interestingly, the interaction between TF and ClpX^{AAA} depends on the nucleotide binding to ClpX^{AAA} (**Fig. 2**), indicating nucleotide-dependent cycle of protein unwinding by TF-ClpX complex. The data also showed that the ClpX-binding sites on TF overlap with the substrate-binding sites[4], which suggests that TF releases the substrate upon binding to ClpX (**Fig. 3**). Combined with the nucleotide-dependent interaction between TF and ClpX, the data led us to establish a possible scheme of protein unwinding by concerted action of TF-ClpX complex (**Fig. 3**), which will be discussed in detail in the presentation.

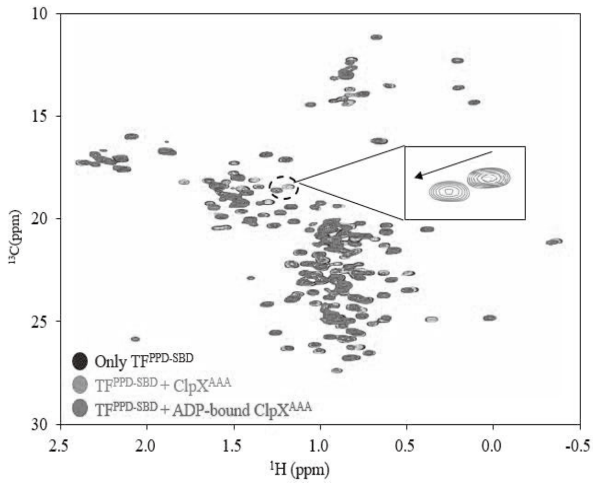


Fig. 2 The overlaid spectra of TF$^{PPD\text{-}SBD}$ in the absence and the presence of ClpX^{AAA} or the presence of ADP-bound ClpX^{AAA}

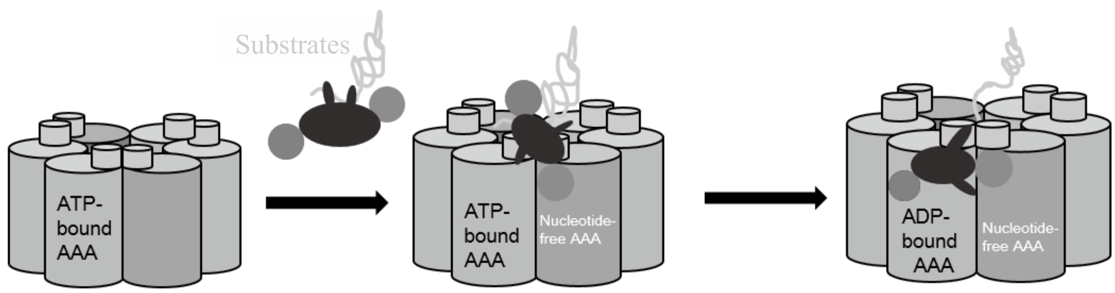


Fig. 3 The possible mechanism of the concerted action of TF and ClpX in protein unfolding.

References

[1] Hoffmann, et al., Molecular Cell Research, 1803.6, 650-661 (2010), [2] Glynn, et al., Cell, 139.4, 744-756 (2009), [3] Tugarinov, et al., Nature protocols, 1.2, 749 (2006), [4] Saio, Tomohide, et al., Science 344, 1250494 (2014)

P25

魚醤のNMRメタボロミクス

○小椋賢治，林　万里，太田龍一，松本祐奈，小柳　喬
石川県立大学 生物資源環境学部 食品科学科

Chemical properties and characterization of fermented fish sauce: ^{1}H-NMR metabolomics approach

○Kenji Ogura, Mari Hayashi, Ryuichi Oota, Yuna Matsumoto and Takashi Koyanagi
Department of Food Science, Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa Prefectural University

We evaluated the chemical properties of commercially available fermented fish sauces in Japan and Southeast Asia using ^{1}H-NMR metabolomics approach and quantitative analysis. The multivariate analysis resulted in fish sauces were classified into three groups by the materials and the countries of origin. Moreover, as the chemical contents affecting the PCA score plot, betaine, glycine, lactic acid, acetic acid, and trimethylamine were identified. The concentrations of these components, glycerol and histamine were quantified using the ^{1}H-NMR or ^{1}H-^{13}C HSQC spectra. In conclusion, NMR-based metabolomics and quantitative analysis of fish sauces could represent information to identify chemical contents involved in fish sauce quality.

魚醤とは，魚を塩とともに樽に漬け込み，発酵によって生じる褐色の液体を成分とする伝統的な調味料であり，主に日本，中国，東南アジアで生産されている．日本国内においては秋田県の「しょっつる」や石川県の「いしる」[1] がよく知られている．近年，国際食品規格を制定するコーデックス委員会において，魚醤のヒスタミン濃度基準値が 400 ppm 未満に制定され（CODEX STAN 302-2011），魚醤の品質改善およびブランド力向上のための評価技術の開発が求められている．本研究の目的は，メタボロミクスの手法を用いて，市販されている魚醤製品の ^{1}H-NMR 測定，統計処理，成分同定および定量分析を通じて，魚醤の品質評価，産地判別，真正評価のための指標を提案することである．

魚醤試料として日本製品 29 検体（石川県産 26 検体および他県産 3 検体）および東南アジア製品 9 検体を，販売店から購入または生産者から提供のいずれかの方法により，入手した．魚醤 150 µL と D_2O 600 µL を混合し，13000 rpm，5 min，室温にて遠心したのち，上清 600 µL を NMR 測定試料とした．化学シフトおよび定量分析の内部標準物質として DSS-d_6 を NMR 測定試料に添加した．NMR 測定は，ECX400P NMR 分光計（^{1}H 共鳴周波数 400 MHz，日本電子）および TH5 プローブを使用して，27°C でおこなった．^{1}H 一次元スペクトルは 512 回積算し，^{1}H-^{13}C HSQC スペクトルは 16 回積算し，いずれも繰り返し時間 8 sec にて測定した．魚醤に含まれる化合物は，メタボロームデータベース（http://www.hmdb.ca）または純品の試薬を用いて同定した．^{1}H 一次元スペクトルの多変量解析は，ALICE2 for Metabolome ソフトウェア（日本電子）を使用した．魚醤の ^{1}H-NMR スペクトルのうち，5.1～4.4 ppm を除く 10.0～0.3 ppm の領域を 0.04 ppm 幅のバケットに

食品、メタボロミクス

○おぐらけんじ，はやしまり，おおたりゅういち，まつもとゆうな，こやなぎたかし

分割し,それぞれのバケットにおける信号強度を用いて多変量解析をおこなった.第1主成分(PC1)および第2主成分（PC2）からPCAスコアプロットおよびローディングプロットを得た.

魚醤の^{1}H-NMRスペクトルから得られた多変量解析の結果（PCAスコアプロット）をFig.1に示す．PC1およびPC2の寄与率は，それぞれ41.9%および23.0%であった．Fig. 1より，魚醤製品を，原料にイカを使用した日本製品，原料にイカ以外の魚を使用した日本製品，および，東南アジア製品，の3グループに分類することができた．ローディングプロットを用いて，PCAスコアプロットに影響を及ぼしている因子を調べた．その結果，ベタイン，グリシン，乳酸，酢酸，トリメチルアミン（TMA）を同定することができ，魚醤中におけるそれらの化合物の濃度を^{1}H一次元または^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルの積分強度から定量した．ベタインは，イカを原料とする魚醤に多く（10～80 mM）含まれる一方，イカ以外の魚を原料とする魚醤および東南アジア製品にはほとんど含まれていなかった．これは，ベタインは甲殻類に多く含まれる化合物であり，原料の含有成分が製品に反映したものと考えられる．酢酸は，東南アジア製品に多く（50～80 mM）含まれる一方，日本製品にはまったく含まれていなかった．これは，東南アジアの魚醤は砂糖を添加して熟成させるため，熟成タンクに混入した酵母がエタノールを産生し，酢酸菌がエタノールを代謝して酢酸を産生したものと考えられる．グリシン，乳酸，TMAの濃度は製品ごとの差異が大きく，それらの濃度と原料・製法のあいだに相関は認められなかった．

魚醤製品中のグリセロールと乳酸の濃度には負の相関が見られた．原料に含まれる油脂は熟成中に脂肪酸とグリセロールに分解されるが，乳酸濃度が高い魚醤では，乳酸菌がグリセロールを資化することで増殖したと考えられる．

魚醤製品中のヒスタミン濃度は全38検体中の4検体において，コーデックス基準値の400 ppm（モル濃度換算3.6 mM）を超える製品があった．ヒスタミンはヒスタミン産生菌においてヒスチジン脱炭酸酵素の作用によって産生される．熟成タンクに好塩性のヒスタミン産生菌が混入した場合，製品中のヒスタミン濃度が上昇する可能性がある．また，ヒスタミン濃度と乳酸濃度には相関は見られなかった．発酵食品の製造工程では，乳酸菌（乳酸産生によって環境のpHを低下させる）による有害細菌の増殖抑制効果を利用することが多いが,ヒスタミン濃度が高い製品においては,乳酸菌がヒスタミン産生菌を抑制できていないと考えられる.

NMRを用いたメタボロミクスおよび定量分析により，魚醤製品の原料，製法上の特徴，品質を示す化合物成分を同定・定量することができた．今後は，より詳細な成分分析および菌叢解析に基づいて，魚醤のブランド力向上および品質改善のための指標を提案したい.

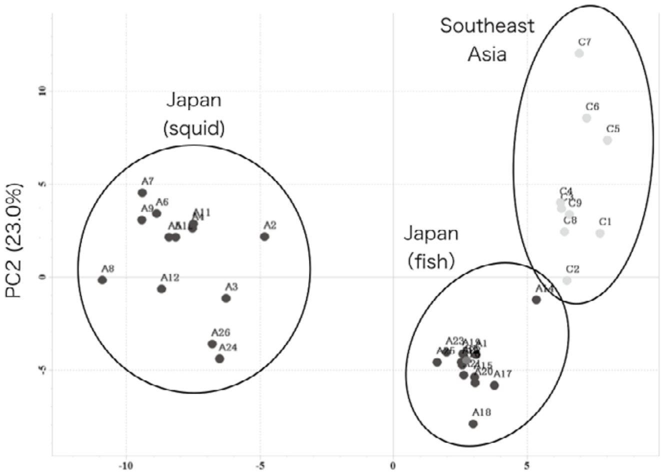


Fig.1 PCA score plot of commercially available fish sauces.

(1) 森真由美，小柳　喬，石川県能登の魚醤油「いしる」．日本海水学会誌 70，295–302 (2016).

P26

複雑系代謝物群の構造・運動性相関スペクトルの俯瞰的解析技術の開発

○伊藤研悟[1,2], 坪井裕理[1], 伊達康博[1,2], 菊地淳[1,2,3]
[1]理研・環境資源、[2]横市院・生命医、[3]名大院・生命農

Development of a Comprehensive Analytical Method for Structure and Mobility Correlation Spectra of Complex Metabolites

○Kengo Ito[1,2], Yuuri Tsuboi[1], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]RIKEN CSRS, [2]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.

Comprehensive detection and identification of metabolites with evaluation of chemical structure and physical properties are important for effective utilization of biological resources. Although NMR can detect metabolites comprehensively, signal separations and identification of saccharide or lipid which has a similar chemical structure is difficult. In addition, the physical property evaluation method of metabolite in mixture using NMR has not been established yet. Here we developed an analytical protocol which enables noninvasive signal separation, identification, and physical property evaluation by deductive approach and diffusion- and relaxation-NMR. This approach was capable of evaluation of chemical structure and dynamic phenomena such as binding state and mobility of metabolites for not only standard substance mixture but also a biological sample.

【背景・目的】
生物由来の成分を有効活用する上で、代謝物群の包括的な検出と同定、化学構造及び物性評価の俯瞰的な解析は極めて重要である。NMRは代謝混合物の包括的な検出が可能であり[1,2]、得られた化学シフトおよびスピン結合定数の実測値をデータベースとの照合、あるいは量子化学に基づき算出された理論化学シフトおよび理論スピン結合定数と比較することにより、既知・未知代謝物群の正確な同定および化学構造評価が可能となってきている[3,4]。一方で、糖類や脂質など、類似の化学構造を有する成分は化学シフトが近似しており、他成分とシグナルが重複してしまうため、混合物のシグナルを化学シフトやスピン結合定数のみで完全にシグナル分離および同定することは困難である。しかし、類似の化学構造を有する化合物群でも物性の違いがあるため、動的な現象に着目することが重要であると考えられる。そこで本研究では、非侵襲的なシグナル分離や同定、物性評価に有用な拡散および緩和NMR実験を代謝物群の解析に適用した。さらに、古典力学および量子化学といった演繹的手法により、代謝混合物の*in silico*同定および物性評価を行った。これらの総合的な解析により、複雑系代謝物群の結合状態や運動性などの動的な現象と化学構造の俯瞰的評価が可能な手法の確立を目的とした（**Fig.1**）。

【実験方法】

<u>1. 混合物サンプルの調製</u>　本研究では、生体試料におけるNMR実験でシグナル帰属が困難とされている糖類および脂質を対象に、それぞれ標準物質の混合物を方法論構築用のサンプルとして作成した。糖類混合物では、単糖としてGlucose、Fructose、Galactose、二糖としてSucrose、Maltose、Cellobioseの6化合物をKPi/D_2O溶媒中で終濃度2-5mMとなるように調製した。脂質混合物では、

DOSY、ROSY、*in silico*

○いとうけんご、つぼいゆうり、だてやすひろ、きくちじゅん

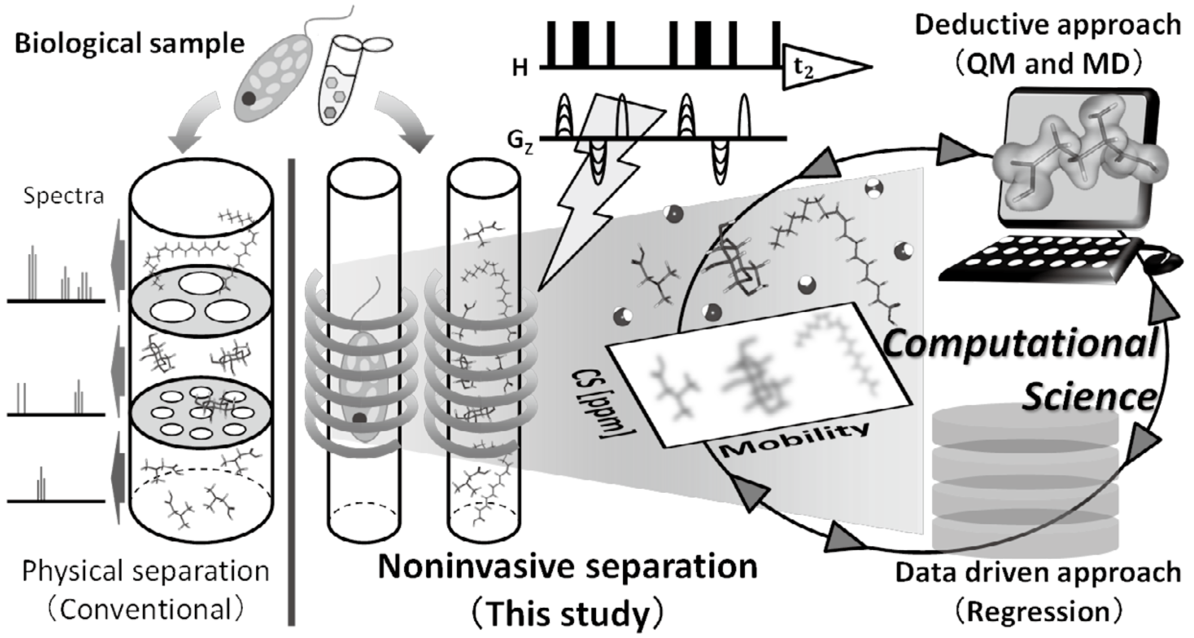


Fig.1 Concept of comprehensive analytical method combining noninvasive experiment and computational science in this study.

Palmitic acid、Linolenic acid、Linoleic acid、Oleic acid、Phytol、Eicosapentaenoic acid、Docosahexaenoic acidの7化合物をMeOD溶媒中で終濃度100mMとなるように調製した。また、生体試料のテストサンプルとして、ブリ（*S. quinqueradiata*）の筋肉組織を凍結乾燥後に粉末化し、MeOD溶媒に溶け込ませた。これらの3つのサンプルをNMR計測に供試した。

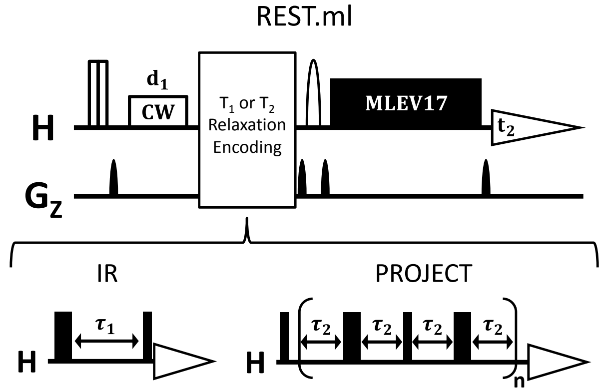


Fig.2 Pulse sequence for ROSY experiment using IR for T_1 relaxation encoding or PROJECT for T_2 relaxation encoding.

2. 拡散係数および緩和時間測定　全てのNMR計測は、Bruker社の700MHz（Cryoプローブ）NMR装置を用いて、298Kで行った。代謝物群のアノテーションおよび部分構造帰属のため、^{1}H-^{13}C HSQCの計測を行った。ブリの筋肉組織の代謝物シグナルのアノテーションについては、当研究室で開発されたSpinAssign（http://dmar.riken.jp/spinassign/）を用いた。また、混合物のカップリングシグナルのオーバーラップを抑制しつつ、代謝物群の拡散現象を観測するため、PSYCHE-iDOSY[5]の計測を行った。計測パラメータの検討から、Δは40ms、δは3msとした。代謝物群の磁気緩和現象はROSY[6]の計測により観測した（**Fig.2**）。これは、Band-selective-TOCSYのシーケンスの前に緩和時間計測シーケンスであるIRおよびPROJECTを印加させており、選択された個々のスピンの緩和時間でスピン系全体を標識することが可能となる。事前にシーケンスのパラメータを検討し、帯域励起パルスはReburp、スピンロックパルスはMLEV-17に変更した。また、混合時間は80msとした。糖類混合物の励起箇所はアノマー部位(5.5-4.5ppm)とし、脂質混合物の励起箇所はメチル部位(1.1-0.7ppm)とした。また、ブリのサンプルについては6.1-4.9ppmの領域を励起した。スペクトル処理については、TopSpin3.5を用いて直接次元のFIDのフーリエ変換を行った。間接次元の拡散、T1、T2曲線はカーブフィッテング、ピーク分離法[7]、逆ラプラス変換[8]を用いて処理した。

3. 拡散係数および緩和時間の理論値計算　シグナル帰属の妥当性および物性を評価するため、拡

散係数および緩和時間の実測値と理論値を比較した。拡散係数の理論値については、Stokes–Einstein Gierer-Wirtz推定法[9]を用いて、帰属代謝物の分子量および溶媒、温度条件から算出した。また、緩和時間の理論値については、Spinachソフトウェア[10]を用いて、Bloch-Redfield-Wangsness理論から算出した。構造の入力値は、Gaussian16プログラムにて、計算レベルSCRF/B3LYP/6-311++G**で算出した理論的な最適化構造を用いた。回転相関時間の入力値は、Gromacs5を用いた分子動力学計算からシミュレートした値を用いた。これらの計算には、理研のスーパーコンピュータHOKUSAIを使用した。

【結果・考察】

1. 標品混合物の拡散・緩和実験　糖類混合物および脂質混合物を用いて方法論の検討を行った。まず、糖類混合物の^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルを確認したところ、Glucose、Galactose、Maltose、Cellobioseのアノマー部位が同一の化学シフトで重複し、また、2位から6位の箇所で幾つかの糖類のシグナル重複が見られた。脂質混合物においても、Phytolを除く6脂質で全体的なシグナルの重複が見られた。これは、糖類群および脂質群が類似の立体的な部分構造を持つためであり、化学シフトのみで完全なシグナル分離と同定が困難であることが示された。

次に拡散NMR実験としてPSYCHE-iDOSYの計測を行った。糖類混合物のDOSYスペクトルを確認したところ、単糖と二糖でシグナルが分離された。これらの化合物の分子量は異なるため、運動性の違いにより糖鎖の判別が可能になることが示された。しかし、単糖群および二糖群内でのシグナルは顕著に分離されなかった。分子量が同じ化合物は拡散係数がほぼ同一であり、このような化合物は、DOSY法でのシグナル分離が困難であると考えられた。また、拡散係数の実測値と理論値を比較したところ、理論値と実測値がほぼ一致した。このことから、理論値と実測値との比較により、同定と運動性評価が可能であることが示唆された。脂質混合物のDOSYスペクトルを確認したところ、拡散曲線のフィッティングのスペクトル処理ではシグナル分離が不十分であった。そのため、ピーク分離法であるNNSC法と逆ラプラス変換法の一種であるNNLS法を組み合わせてスペクトル処理を行ったところ、脂質混合物の分離が可能であった。これらのことから、DOSY法により分子量の異なる代謝物群のシグナル分離は可能であったが、分子量が同一の代謝物群の分離は困難であることが示唆された。そのため、さらなるシグナル分離には、物性の違いを特徴付ける別の計測法が必要であると考えられた。

そこで、緩和NMR実験に着目し、REST.mlの計測を行った。糖類混合物のREST$_1$.mlスペクトルを確認したところ、単糖群内、二糖群内、α体とβ体での分離が可能であった。アノマー部位からの相関シグナルを検出しているため、2-3位までの帰属が可能であった。また、緩和時間の実測値と理論値を比較したところ、α-Galactoseでは、3.51 [s]（実測値）、3.45 [s]（理論値）となり、β-Galactoseでは、2.65 [s]（実測値）、2.85 [s]（理論値）となった。分子量が同じでも回転運動が異なるため、α体とβ体の判別が可能であることが示唆された。脂質混合物においても、相互作用の違いによりシグナル分離が可能であり、理論値により部分的な同定が可能であることが示された。

2. 生体試料の拡散・緩和実験　ブリの筋肉組織のMeOD抽出物を用いて、同様に拡散・緩和NMR実験を行った（**Fig.3**）。PSYCHE-iDOSYの計測で得られた拡散係数の実測値と理論値を比較したところ、理論値よりも実測値の拡散係数が低いことから、粘度の影響により運動性が下がっていると考えられた。さらに、分離能と同定能を上げるため、REST$_1$.mlの計測を行った。2つの主要な脂質骨格が、オレフィンからの相関シグナルで確認され、HistidineやInosinic acidなどの成分の骨格も同一T_1軸で確認された。これらの結果から、拡散・緩和NMR実験を生体試料に適用することで、代謝物群の非侵襲的なシグナル分離、同定、物性評価が可能となることが示唆された。インタクトな試料を用いることで、より詳細に代謝物の輸送や反応、結合状態などの動的な現象と化学構造の俯瞰的評価が可能となると考えられた。

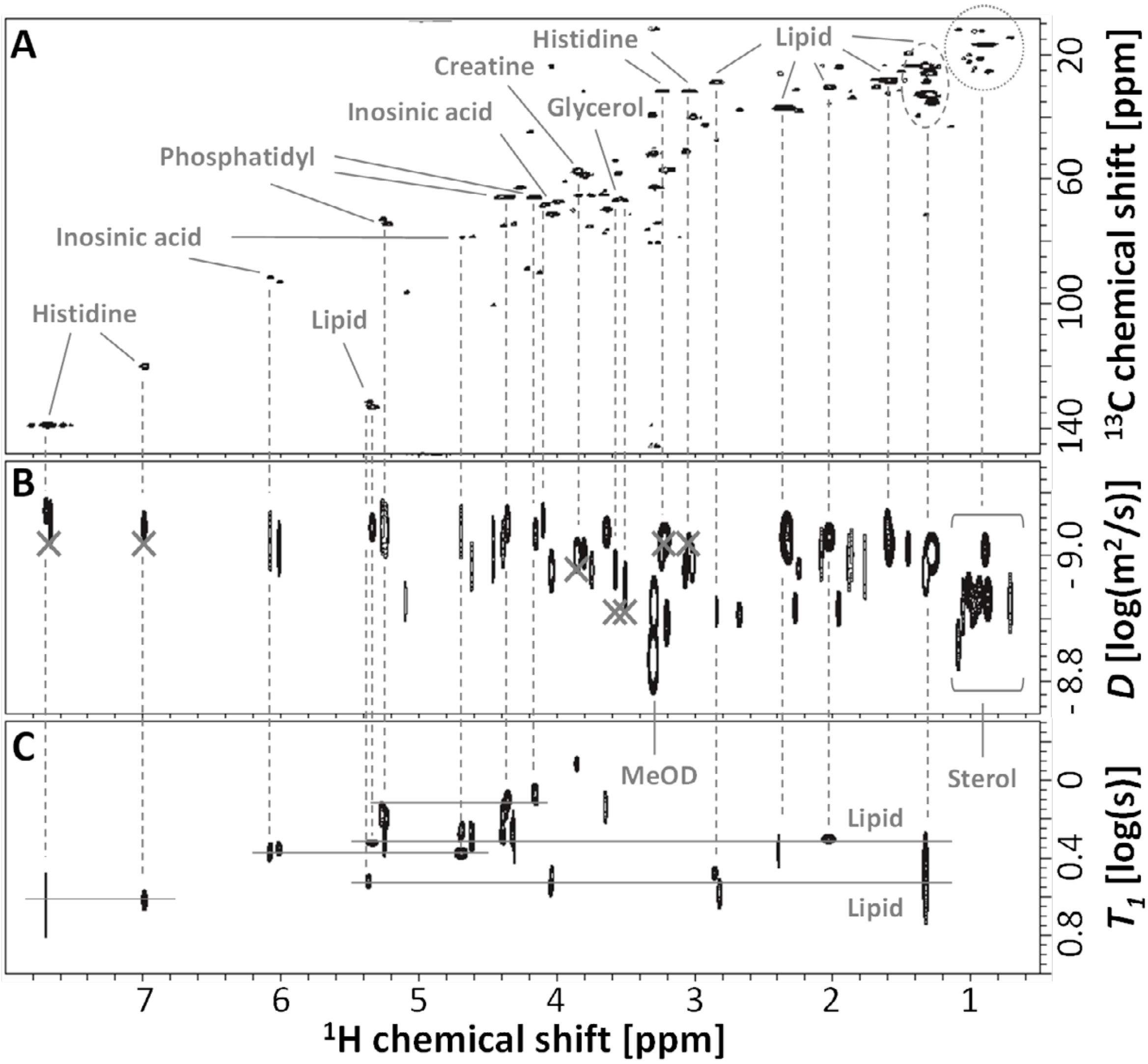


Fig.3 NMR spectra of A) ^{1}H-^{13}C HSQC, B) PSYCHE-iDOSY, and C) REST$_1$.ml experiments using MeOD extract in *S. quinqueradiata*. (×; Theoretical diffusion coefficient + scaling factor)

【参考文献】

[1] Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, J., *Anal. Chem.* **86**, 1098–1105 (2014).

[2] Kikuchi, J., Ito, K. and Date, Y., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **104**, 56–88 (2018).

[3] Ito, K., Tsutsumi, Y., Date, Y. and Kikuchi, J., *ACS Chem. Biol.* **11**, 1030–1038 (2016).

[4] Ito, K., Obuchi, Y., Chikayama, E., Date, Y. and Kikuchi, J., *Chem. Sci.* (revised).

[5] Foroozandeh, M., Castañar, L., Martins, L.G., Sinnaeve, D., Poggetto, G.D., Tormena, C.F., Adams, R.W., Morris, G.A. and Nilsson, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 15579–15582 (2016).

[6] Dal Poggetto, G., Castañar, L., Adams, R. W., Morris, G. A. and Nilsson, M., *Chem. Commun.* **53**, 7461–7464, (2017).

[7] Wei, F., Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, J., *Anal. Chem.* **87**, 2819–2826 (2015).

[8] Xu, K. and Zhang, S., *Anal. Chem.* **86** 592−599 (2014).

[9] Evans, R., Dal Poggetto, G., Nilsson, M. and Morris, G.A., *Anal. Chem.* **90**, 3987–3994 (2018).

[10] Hogben, H.J., Krzystyniak, M., Charnock, G.T.P., Hore, P.J. and Kuprov, I., *J. Magn. Reson.* **208**, 179–194 (2011).

P27 ATPによるタンパク質の線維化阻害機構の解明

○西澤茉由[1]，ヴァリンダエリック[2]，森本大智[1]，菅瀬謙治[1]，白川昌宏[1]
[1]京都大学大学院・工学研究科
[2]京都大学大学院・医学研究科

Elucidation of inhibitory mechanism of ATP for protein fibril formation

○Mayu Nishizawa[1], Erik Walinda[2], Daichi Morimoto[1], Kenji Sugase[1], and Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University*
[2]*Graduate School of Medicine, Kyoto University*

Neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease are thought to be caused by abnormal accumulation of amyloid fibrils in neurons. Recently, high concentration of adenosine triphosphate (ATP) is found to inhibit protein fibril formation although ATP generally mediates storage, supply, and transport of energy in cells. Furthermore, the decrease in the intracellular ATP level can lead to neurodegenerative diseases. To date, how ATP inhibits protein fibril formation remains unclear; therefore, it is important to analyze the inhibitory mechanism at the molecular level. In this study, we focus on the intermolecular interactions between ATP and proteins. By using solution NMR techniques, we quantified the concentration-dependent binding of ATP to proteins and found that ATP affects protein-protein interactions.

■研究背景・目的

アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患は、タンパク質の異常アミロイド線維が神経細胞に蓄積することによって惹起されると考えられている。近年、生体内のエネルギーの貯蔵や供給、運搬を仲介するアデノシン三リン酸(ATP)がタンパク質の線維化を阻害することが明らかにされた[1]。また、ATP 濃度の低下と神経変性疾患に関連性があることが報告されたことから[2]、ATP の線維化阻害能の分子基盤の解明は、神経変性疾患の治療法開発に重要な知見となることが期待される。さらに、ATP の線維化の阻害能は 1 mM 以上の高濃度で発揮されており、ATP は細胞内に 1-10 mM と高濃度に存在する。したがって、細胞内において ATP はあらゆるタンパク質の線維化を阻害する可能性がある。標的タンパク質との非共有結合性の相互作用により、ATP は線維化の阻害能を持つと考えられるが、なぜ阻害能を持つのか、相互作用に選択性や特異性があるのかは不明である。また、1 mM 以上で ATP と標的タンパク質が相互作用することから、弱い分子間相互作用が予想される。

そこで本研究では、弱い分子間相互作用を定量化できる溶液 NMR を用いて ATP と標的タンパク質との相互作用を原子レベルで解析し、線維化の阻害機構を解明する。

ATP、アミロイド

○にしざわまゆ，ゔぁりんだえりっく，もりもとだいち，すがせけんじ，しらかわまさひろ

■研究方法

(1)ATP-タンパク質間相互作用の定量化

あらゆる細胞内に比較的高濃度（数十μM程度）に存在するユビキチンを研究対象とした。^{15}N標識ユビキチン50 μMに対して0 mMから11 mMまで段階的に濃度を変化させたATPを共存させ、溶液NMRでATP濃度に依存するATP-タンパク質間相互作用を解析した。また、測定は298Kで行った。

(2)ATPのタンパク質間相互作用への影響

溶液中で単量体と二量体の2つの状態の平衡状態にあるp62 UBAドメインを用いた。^{15}N標識p62 UBA 50 μMに対してATP 10 mM存在下でNMR測定を行い、ATPとp62 UBAとの相互作用およびp62 UBA同士のタンパク質間相互作用を解析した。

■研究結果および展望

(1) ATP-タンパク質間相互作用の定量化

ATP添加により、ユビキチンの主鎖の化学シフトが部位特異的に変化した(Fig.1a)。
詳細な解析から、ATPがユビキチンの疎水面と構造的に柔軟なC末端領域に選択的に結合することが分かった。さらに、ATP濃度を上げるにつれて化学シフトの変化量がシグモイド関数様に増加した(Fig.1b)。この結果より、ATP濃度とATP-タンパク質間相互作用に正の協同性があることが示唆された。

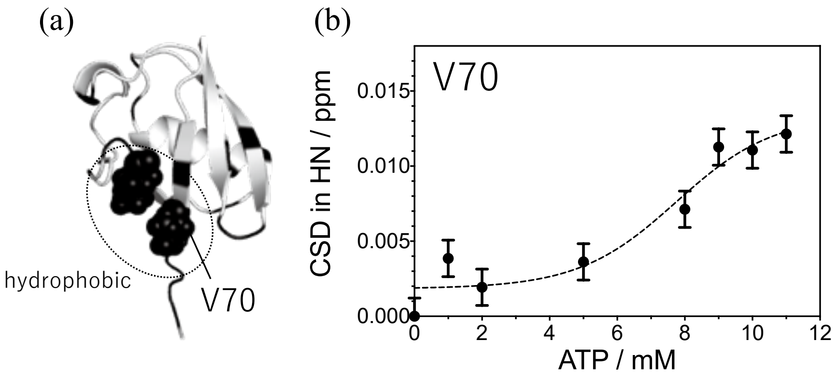


Fig. 1. ATP-protein interaction

a, Black: residues showing chemical shift differences (CSD); **b**, ATP concentration-dependent CSD.

(2)ATPのタンパク質間相互作用への影響

単量体と二量体の平衡状態にある p62 UBA に 10 mM ATP を添加すると、両状態ともに化学シフトが変化した。ユビキチンと同様に、p62 UBA についても、疎水面および C 末端領域に ATP が選択的に結合した。上記(1)(2)の結果から、タンパク質の種類に関係なく、ATP は疎水性分子表面に結合し、疎水性面を保護することで、線維化しないタンパク質の分子間相互作用を阻害することが示唆された。今後は、NMR 緩和分散法である R_2 dispersion 法を用いて数百マイクロ秒〜数秒の時間範囲における ATP のタンパク質間相互作用への影響を観測する。

References

[1] Patel, A., et al., ATP as a biological hydrotrope. *Science*, **356**, 753-756 (2017)

[2] Pathak, D., et al., The role of mitochondrially derived ATP in synaptic vesicle recycling. *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 22325-22336 (2015)

P28

NMR を用いた自然免疫受容体 Mincle による糖脂質認識機構の解析

○古川敦[1]、須知祐介[1]、久米田博之[2]、松丸尊紀[3]、齊藤貴士[4]、前仲勝実[1]
1北海道大学大学院　薬学研究院
2北海道大学大学院　先端生命科学院
3慶應大学　理工学部化学科
4北海道薬科大学　薬学部薬学科

NMR analysis revealed the detail glycolipid binding mechanism of innate immune receptor Mincle

○Atsushi Furukawa[1]、Yusuke Shuchi[1]、Hiroyuki Kumeta[2]、Takanori Matsumaru[3]、Takashi Saitoh[4]、Katsumi Maenaka[1]
1 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
2 Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University
3 Department of Chemistry, Faculty of Science and technology, Keio University
4 Department of pharmacy, Faculty of pharmacy, Hokkaido Pharmaceutical University

Mincle (Macrophage inducible C-type lectin,) is known to be the receptor of trehalose dimycolate (TDM) and expressed on the cell surface of mycobacterium tuberculosis. Previously, we successfully crystalized and solved the crystal structure of human Mincle (Macrophage inducible C-type lectin, CLEC4E). However, the glycolipid mechanisms is still unclear due to the difficulty of crystallization of Mincle-glycolipid complex. Here, we used NMR spectroscopy to reveal the glycolipid binding mechanism of Mincle. As the result of NMR analysis of Mincle indicated that Mincle has high flexible part. Furthermore, the titration of glycolipid, trehalose-C10, to Mincle drastically decreased NMR signals. DLS analysis indicated that this is due to the multimerization of Mincle though glycolipid. Addition of NDSB-195, which is known as an inhibitor of protein aggregation, to Mincle could inhibit the multimerization and enabled chemical shift perturbation by glycolipid binding.

自然免疫受容体の１つである Macrophage Inducible C-type Lectin (Mincle) は C-type Lectin Receptor (CLR)ファミリーに属するタンパク質で結核菌の細胞壁に存在する Trehalose 6,6’-dimycolate (TDM) などの糖脂質を認識する受容体である[1]。Mincle は樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞に発現し、リガンドを認識することにより、細胞膜領域で会合している Fc 受容体 γ 鎖を介して炎症促進性サイトカイン等の分泌を促進し、Th1 及び Th17 型の免疫応答を活性化する。これまでに Mincle の糖脂質の認識はトレハロースの糖鎖部分とミコール酸の脂質部分が必要であることが示唆されていたが詳細な分子認識機構は不明であった。そのため、我々は Mincle の糖脂質認識機構の解明を目的に研究を進め、これまでにヒト Mincle 結晶構造を明らかにし、Mincle は CLR に広く保存されている Ca イオン周辺に、他の CLR では見られない疎水性アミノ酸が多くあることを明らかにしている[2]。さらに、Mincle が TDM と結合するこ

免疫受容体、糖脂質、相互作用解析
○ふるかわあつし[1]、しゅうちゆうすけ[1]、くめたひろゆき[2]、まつまるたかのり[3]、さいとうたかし[4]、まえなかかつみ[1]

とにより、GFP 蛍光強度が上昇するレポーター細胞を用いた変異実験によってそれらの疎水性残基の重要が示唆された。しかしながら、Mincle と糖脂質との共結晶は相互作用の弱さなど推定される理由からこれまで得られていない。そのため、Mincle の詳細な糖脂質認識機構を明らかにするために NMR 法を用いて研究を行った。

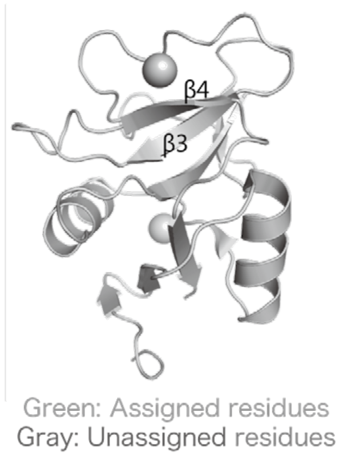


図　1 Mincle(3WH3)への帰属・未帰属残基のマッピング

Mincle の NMR 測定の結果、約 20%の残基で NMR シグナルが観察されないことが分かり、特に推定されるリガンド認識部位の多くの残基由来のシグナルが観測されないことが分かった。（図 1）。さらに、NMR シグナルが観測された残基であってもシグナルの分裂が観測された。このことは、Mincle は非常に糖脂質認識部位に運動性に富んだ部位を含むことを示唆する。さらに、Mincle の糖脂質認識機構を明らかにするために、TDM アナログの脂質鎖の炭素数 10 の Trehalose-C10 の滴下実験を行ったが、糖脂質滴下に伴って NMR シグナルの大きな減弱が見られ、相互作用に必要な残基を見出すことが困難であった。Dynamic Light Scattering (DLS)を用いた解析により糖脂質の増加によって粒子径の増大が見られたことから、NMR シグナルの減弱の原因は分子量の増大に伴うためと考えられた。 そのため、タンパク質凝集抑制効果が知られている non-detergent sulfobetaine-195 (NDSB-195)を糖脂質滴下時に加えることにより、DLS により糖脂質滴下に伴う凝集を抑制することが示唆された。その NDSB-195 の存在下で Trehalose-C10 を滴下した結果、滴下に伴う化学シフトの変化を観測することに成功した。その結果、これまでに Mincle の糖脂質の相互作用が示唆されている L199 や Y201 で大きく化学シフトが変化していることが分かった（図２）。さらに、それらの化学シフトの変化量を濃度でプロットし、解離乗数 K_d を決定し、L199 や Y201 がこれまでの Surface Plasmon resonance (SPR)と同様の K_d を持つことが分かった(図 2)。現在、これらに変異を持つ Fc 融合 Mincle タンパク質を調製し、ELISA による TDM 結合能の評価を進めており、当日はそれを含めて議論したい。

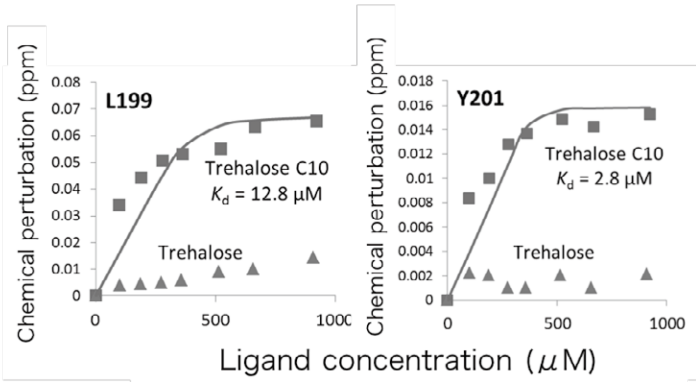


図 1 L199 と Y201 の化学シフトの濃度依存性とそのフィッティング解析

1. Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y. S., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O., Kinoshita, T., Akira, S., Yoshikai, Y., and Yamasaki, S. (2009) Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med* **206**, 2879-2888.

2. Furukawa A, Kamishikiryo J, Mori D, Toyonaga K, Okabe Y, Toji A, Kanda R, Miyake Y, Ose T, Yamasaki S, and Maenaka K (2013). Structural analysis for glycolipid recognition by the C-type lectins Mincle and MCL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 43, 17438-17443.

P29

炭疽病菌から分泌される細胞死誘導タンパク質の立体構造解析の検討

○山口真紀[1]，梅本史絵[1]，高塚梨沙[1]，高原浩之[1]，久米田博之[2]，小椋賢治[1]
1 石川県立大学 生物資源環境学部
2 北海道大学 大学院先端生命科学院

Structural analysis of virulence effector protein derived from *Colletotrichum higginsianum*

○Maki Yamaguchi [1], Fumie Umemoto [1], Risa Takatsuka [1], Hiroyuki Takahara [1], Hiroyuki Kumeta [2] and Kenji Ogura [1]
1 Department of Food Science, Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa Prefectural University
2 Graduate School of Life Science, Hokkaido University

FgEC91 is a secretion protein produced by *Colletotrichum higginsianum*. FgEC91 acts as a virulence effector at infection in plants. We purified both of ChEC91 and the homologue FgEC91 proteins. Infiltration of ChEC91 solution into *Nicotiana benthamiana* induced the hypersensitive response within two days. The solution structure of FgEC91 formed a β-sandwich fold.

植物炭疽病菌は，植物に感染する際に自身の構成成分や分泌タンパク質を周囲に放出する．一方，植物は炭疽病菌が放出した物質（糖鎖やタンパク質など）を認識し，局所的な細胞死を誘導することで，病原菌の感染が植物全体に及ぶことを回避している．このような，細胞死による植物の防御応答を誘導する物質をエリシターという．植物炭疽病菌の一種（*Colletotrichum higginsianum*）の遺伝子解析から，炭疽病菌が植物に感染する際に分泌するエリシタータンパク質として ChEC91 が同定されている[(1)]．エリシタータンパク質は，植物が本来もっている抵抗力を高める機能があるため，次世代農薬として期待されている．本研究の目的は，植物炭疽病菌が分泌するエリシタータンパク質 ChEC91 およびそのホモログでムギ類赤カビ病菌が分泌する非エリシタータンパク質 FgEC91 の立体構造を解析し，両者の立体構造を比較することにより，植物のエリシター認識機構に関する知見を得ることである．

<u>発現系の構築</u>

ChEC91（144 アミノ酸残基）と FgEC91（146 アミノ酸残基）のうち，N 末端の細胞外分泌シグナルを除去した領域に相当する遺伝子を pET22b に組み込み，C 末端に Histag を融合したタンパク質発現プラスミドを設計した．これらのプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)に形質転換し，ChEC91 および FgEC91 の大腸菌発現系を構築した．

細胞死、タンパク質、立体構造解析

○やまぐちまき，うめもとふみえ，たかつかりさ，たかはらひろゆき，くめたひろゆき，
おぐらけんじ

培養と精製

大腸菌を LB 培地で 37°C にて培養し，IPTG で発現誘導し，3 時間後，集菌した．ChEC91 と FgEC91 は不溶性画分に発現したため，8 M 尿素を含む緩衝液で封入体を可溶化したのち，菌体破砕，遠心，Ni-NTA カラムによって変性状態の目的タンパク質を粗精製した．ChEC91 と FgEC91 はいずれも分子内ジスルフィド結合を 2 本含むため，DTT を添加し，すべてのシステインをいったん還元状態にした．その後，透析リフォールディング法により段階的に尿素濃度をゼロにした．尿素濃度が 1 M から 0.5 M のときには，タンパク質の凝集を抑制するために 400 mM アルギニン塩酸塩を，正しいジスルフィド結合形成を促進するために 250 μM 酸化型グルタチオンおよび 2.25 mM 還元型グルタチオンを，透析外液にそれぞれ添加した．ゲル濾過クロマトグラフィーにより, モノマー分子量に相当する保持体積で溶出した ChEC91 および FgEC91 を分取した．

細胞死の観察

精製した ChEC91 および FgEC91 を濃度 1～10 μM に調整し，タバコ葉の裏側に約 0.1 mL 接種し，葉の様子を観察した．

NMR 測定および立体構造解析

INOVA 600（^{1}H 共鳴周波数 600 MHz，バリアン）を使用して，^{1}H/^{13}C/^{15}N 三重共鳴多次元 NMR スペクトルを測定した．ソフトウェア SPARKY を使用して信号を帰属し，ソフトウェア CYANA を使用して立体構造を決定した．

可溶化およびリフォールディングを経て精製した ChEC91 および FgEC91 をタバコ葉に接種したところ，2 日後に ChEC91 では細胞死が観察でき，FgEC91 では細胞死が見られなかった．これらの結果より，大腸菌で生産した ChEC91 がエリシター活性を持つことが確認された．

ChEC91 および FgEC91 の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルはいずれもクロスピークの良好な分散を示した．FgEC91 の立体構造を決定した．2 カ所の分子内ジスルフィド結合の位置は NOE 情報に基づいて決定した．FgEC91 は β-サンドイッチ構造を形成しており，DALI によるサーチでは，いくつかの類似構造が見つかった．発表では，立体構造の詳細について議論する予定である．

(1) Kleemann J et al., Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog.* **8**, e1002643 (2012).

P30 ワカサギ不凍タンパク質の立体構造解析の検討

○竹本茉由[1]，廣瀬　光[1]，中野明日香[1]，新井達也[2,3]，津田　栄[2,3]，
小椋賢治[1]
1 石川県立大学 生物資源環境学部 食品科学科
2 北海道大学 大学院先端生命科学院
3 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

Structural analysis of antifreeze protein derived from Japanese smelt

○Mayu Takemoto[1], Hikaru Hirose[1], Asuka Nakano[1], Tatsuya Arai[2,3], Sakae Tsuda[2,3]
and Kenji Ogura[1]
1 Department of Food Science, Faculty of Bioresources and Environmental Sciences,
Ishikawa Prefectural University
2 Graduate School of Life Science, Hokkaido University
3 Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Antifreeze proteins (AFPs) are produced by fish, insects, plants and bacteria that protect their living tissue in subzero environment. AFPs can bind surfaces of ice-crystals, and inhibit growth of them. AFPs are classified into several subclass, type-I, type-II, and so on. The calcium-dependent type-II Japanese smelt AFP (jsAFP) was isolated by Yamashita et al. (1). In this study, we investigated the methods of expression and purification of jsAFP using *E. coli* host cells. Moreover, we measured the antifreeze activity of the purified jsAFP. ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of jsAFP suggested that jsAFP changes the local structure by calcium binding.

寒冷な環境に棲息する生物（魚類，昆虫類，植物，菌類）は，凍結によるダメージから生体組織を保護するために，不凍タンパク質（antifreeze protein; AFP）を生産する．体液が 0°C 以下に冷却されると微小な氷結晶が生成するが，AFP は氷結晶の表面に結合することにより氷結晶の成長を抑制し，その結果，体液の凝固点を降下させる機能を持つ．AFP はアミノ酸配列の違いにより, AFGP, I 型, II 型, III 型, insect AFP の 5 種類に分類される. ワカサギ由来 AFP (jsAFP) は 128 アミノ酸残基からなる II 型 AFP であり，カルシウムイオンを結合している状態においてのみ不凍活性を示すことから, カルシウム依存 II 型 AFP とよばれる(1). カルシウム依存 II 型 AFP に属するニシン AFP の結晶構造は C 型レクチンの糖鎖結合ドメインとよく似ていることがわかっているが(2)，カルシウム結合にともなう立体構造変化および不凍活性制御の分子機構はあきらかになっていない．また，II 型 AFP は 5 本の分子内ジスルフィド結合を含むため，大腸菌発現系では可溶性画分に発現させることができず，ピキア酵母（*Pichia pastoris*）発現系を用いることが一般的である．本研究の目的は，NMR 法を用いて jsAFP の立体構造と分子機構を解析するための第一段階として，大腸菌発現系による生産・精製方法を検討することである．

<u>ピキア酵母発現系</u>

jsAFP 遺伝子（N 末端に Histag を付加）を組み込んだピキア酵母はジャーファーメンターま

不凍タンパク質、リフォールディング、立体構造解析

○たけもとまゆ，ひろせひかる，なかのあすか，あらいたつや，つださかえ，おぐらけんじ

たはカルチャーバッグを用いて，BMMY 培地で 15°C にて培養し，24 時間ごとにメタノールを添加し，発現誘導した．120 時間後，培地を回収し，Ni–NTA およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した．^{15}N ラベル体の調製は，^{15}N-アンモニアを含む BSM 培地を用いて同様に培養，発現誘導，精製をおこなった．

<u>大腸菌発現系</u>

jsAFP 遺伝子（C 末端に Histag を付加）を組み込んだプラスミドで形質転換した大腸菌を LB 培地で 37°C にて培養し，IPTG で発現誘導した．3 時間後，菌を回収し，8 M 尿素を含む緩衝液で封入体を可溶化したのち，菌体破砕，遠心，Ni-NTA カラムによって変性状態の jsAFP を粗精製した．透析リフォールディング法により段階的に尿素濃度をゼロにしたのち，ゲル濾過クロマトグラフィーにより，正しいフォールディングを形成した jsAFP を分取した．透析中におけるグルタチオン（酸化型・還元型の混合物），アルギニン塩酸塩，$CaCl_2$ の添加の有無による最終精製物の収量への影響を比較した．

<u>不凍活性測定</u>

精密な温度制御が可能な冷却ステージを装備した顕微鏡を使用して，試料中の氷結晶の形状を観察した．また，試料溶液の凝固点および融点を測定した．

<u>NMR 測定</u>

AVANCE III 800（^{1}H 共鳴周波数 800 MHz，ブルカー）およびクライオプローブを使用して，^{15}N ラベル jsAFP の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを測定した．

ピキア酵母および大腸菌で生産された jsAFP の水溶液を試料として，温度を変えながら氷結晶の形状を観察した．また，陽性対照実験として，冬期に捕獲したワカサギの抽出液についても同様の観察をおこなった．いずれの試料においても，氷結晶のバイピラミッド型への変形，および，融点と凝固点の違い（サーマルヒステリシス）が見られた．これらの現象は AFP の不凍活性指標とされており，両発現系で同程度の不凍活性をもつ jsAFP を精製できることがわかった．ピキア酵母発現系における jsAFP の最終精製物の収量は，ノンラベル体が 4.8 mg，^{15}N ラベル体が 1.2 mg であった（いずれも培地 1 L あたり）．カルシウムイオン存在下および非存在下での jsAFP の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを比較したところ，独立した 120 個のピークのうち，約 20 個のピークに化学シフト変化が見られた．このことは，jsAFP の立体構造はカルシウム結合にともない，部分的変化を生じることを示唆している．大腸菌発現系における jsAFP の最終精製物の収量は，透析中における添加物の有無で影響されたが，グルタチオン，アルギニン塩酸塩，$CaCl_2$ のいずれも添加しない条件がもっとも高収量であった．培地 1 L あたりの収量は LB 培地で 2.8 mg，MP 培地（最少培地）で 2.1 mg であった．これまで，II 型 AFP の遺伝子組換え体を生産・精製するための発現系はピキア酵母に限られており，そのことが他のタイプの AFP に比べて立体構造に関する研究報告の少ない理由のひとつであった．今回，大腸菌発現系と透析リフォールディング法により jsAFP の大量精製に成功したことで，NMR 法による立体構造解析およびダイナミクス解析が可能となり，今後，II 型 AFP の分子機能解明に向けて研究の進展が期待される．

(1) Yamashita Y, Miura R, Takemoto Y, Tsuda S, Kawahara H, Obata H. Type II antifreeze protein from a mid-latitude freshwater fish, Japanese smelt (*Hypomesus nipponensis*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 461–466 (2003).

(2) Liu Y, Li Z, Lin Q, Kosinski J, Seetharaman J, Bujnicki JM, Sivaraman J, Hew CL. Structure and evolutionary origin of Ca^{2+}-dependent herring type II antifreeze protein. *PLoS One* **2**, e548 (2007).

P31

NMRを用いたシアノバクテリア由来GAFドメインの構造解析

○会津貴大[1]，広瀬侑[2]，伊藤隆[1]，三島正規[1]
1首都大学東京大学院 理学研究科
2豊橋技術科学大学　大学院工学研究科

Structural study of a GAF domain from Cyanobacteria by solution NMR

○Takahiro Aizu [1], Yuu Hirose [2], Yutaka Ito[1], Masaki Mishima[1]
1Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University
2Department 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”, regulated by RcaE protein, a photosensor protein, phosphorylating transcription regulatory proteins in a wavelength dependent manner. To reveal the molecular mechanism, such as light absorption and the following structure changes related to kinase activity, we are working on NMR structure analysis of intact RcaE with red-light absorption form and green-light absorption form. We have succeeded in obtaining well dispersed HSQC spectra of the GAF-domain for both red light absorption and green light absorption form. We will report the NMR signal assignments of green light absorption form obtained by a series of 3D-4D NMR experiments.

〈序論〉

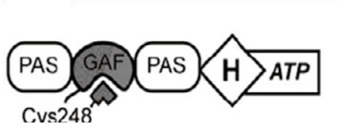


Fig.1 Domain organization of RcaE (adopted from Ref. 1)

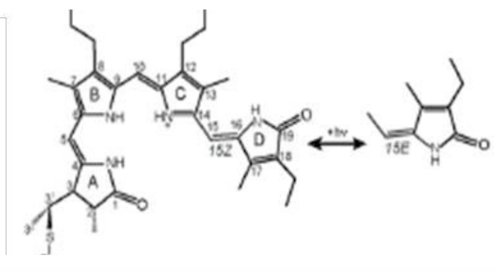


Fig.2 Structure of PCB

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、赤色光を吸収する光合成色素を合成し、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を介して相互作用しており、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-trnas*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)]。我々は、RcaE全長における光吸収からそれに伴う構造変化、キナーゼ活性調節までの分子機構を解明するため、RcaEの赤色光吸収型(^{15E}Pr)と緑色光吸収型(^{15Z}Pg)のNMR構造解析に取り組んでいる。本発表では、まずRcaEのGAFドメインの、^{15E}Prと^{15Z}Pgの構造解析について報告する。

溶液NMR、RcaE、光受容タンパク質

○あいづ たかひろ，ひろせ ゆう，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それぞれ、2D-^{1}H-^{15}N HSQCを行った。また、赤色光照射下においては3D-HNCACB、3D-CBCA(CO)NH、3D-HN(CA)CO、3D-HNCO、3D-C(CO)NH、3D-H(CCO)NH、4D-HC(CO)NHの測定を行った。

<結果>

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-^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを得ることに成功した(Fig.2、Fig.3)。また、赤色光照射下、緑色光照射下においてのタンパク質の色の変化を確認し、実際に2D-^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルのピークの化学シフト変化も確認することができた。また、緑色光吸収型においては3D-HNCACB、3D-CBCA(CO)NH、3D-HN(CA)CO、3D-HNCOを基に主鎖の帰属を行い、約90%のアミノ酸残基の帰属に成功した。また、現在3D-CCONH、3D-HCCONH、4D-HC(CO)NHを基に側鎖のメチル、メチレンの帰属を行っている。

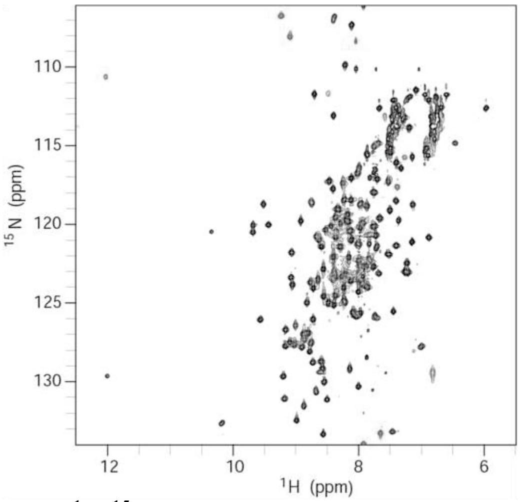


Fig.2 ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of RcaE GAF (^{15E}Pr)　Buffer:50 mM K-phodphate (pH 6.9), 50 mM KCl

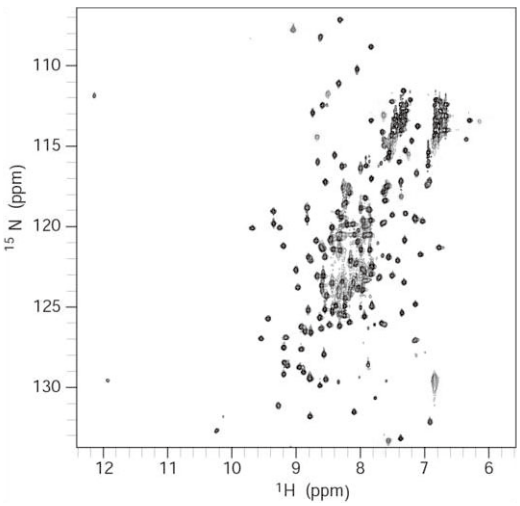


Fig.3 ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of RcaE GAF (^{15Z}Pg)　Buffer:50 mM K-phodphate (pH 6.9), 50 mM KCl

<展望>

赤色光吸収型、緑色光吸収型においては現在までに行った測定に加えて、NOESY-HSQC等の測定も行い構造の距離情報や、角度情報の取得を行い、まず、RcaE GAFドメインの構造を明らかにし、赤色光吸収型と緑色光吸収型の構造の違いを明らかにする。またRcaEにおける光吸収の特徴としてPCBの環上のNHにおいて、光吸収にともないプロトン化、脱プロトン化か起こると考えられており[1)]、NMRによりこれを追跡する。

さらに、RcaE全長の発現系の構築、タンパク質の精製、NMR測定を行う。全長に関しては、705アミノ酸残基からなり、巨大であるため、我々が開発を行っているsortase Aによるドメインライゲーションの技術を活用することでRcaE全長の構造を明らかにしたい。そこから得られた構造の情報から、RcaEの光吸収からキナーゼ活性調節までの分子機構を解明したい。

<参考文献>

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

<謝辞>

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。

P32

山廃酒母の熟成過程における成分変化の解析

○高松美里，上井史絵里，鶴貝采映，小柳　喬，小椋賢治
石川県立大学 生物資源環境学部 食品科学科

^{1}H-NMR study of compositional changes during fermentation process of *yamahai-moto*, Japanese *sake* starter

○Misato Takamatsu, Shieri Uwai, Kotoe Tsurugai, Takashi Koyanagi and Kenji Ogura
Department of Food Science, Faculty of Bioresources and Environmental Science, Ishikawa Prefectural University

Japanese rice wine, *sake* is Japanese alcoholic beverage made from rice and water. The fermentation of Japanese sake starts from mixture of steamed rice, malted rice and water. Since lactic acid comes from bacteria in natural environment, this traditional method of producing Japanese sake is called *yamahai-moto*. In this study, we investigated the compositional changes during the fermentation process of yamahai-moto using ^{1}H-NMR spectroscopy.

日本酒は米を原料とする醸造酒である．ブドウを原料とするワインでは，酵母がブドウに豊富に含まれるグルコースを利用することによりアルコール発酵が起こる．一方，日本酒醸造では，酵母は米の主成分であるデンプンを発酵に利用することができないため，麹菌がデンプンを糖化するプロセスが必要である．日本酒のスターターは，蒸し米，米麹，水を混合したものであり，これを醸造タンクに移すと，麹菌による糖化が最初に起こり，その後，乳酸菌による乳酸の生成，酵母によるアルコール発酵が続く．現代の日本酒製造工程では，雑菌の繁殖を抑制するために乳酸を人為的に添加することが多く，これを速醸酛（もと）または速醸酒母という．一方，伝統的な製法では，醸造タンク中で乳酸菌が自然に増殖するのを待つ．これを山廃酛または山廃酒母という．山廃酒母の熟成過程では，仕込み後の日数によって菌叢が刻々と変化することが報告されており[(1)]，それらの菌が生成する多種多様な有機化合物が，日本酒に複雑かつ芳醇な味や香りを付与していると考えられている．また，蔵元，麹菌，製法などの違いによって日本酒には数多くの銘柄が存在するが，山廃酒母の熟成過程におけるわずかな成分変化の差異が，日本酒文化の醸成に貢献してきたとも言える．本研究の目的は，^{1}H-NMR を用いて山廃酒母の熟成過程で生成する成分を同定および定量し，麹菌の種類による成分変化の違いを解析することである．

滅菌したガラス瓶に，市販の米麹 15 g，滅菌水 30 mL，蒸し米 45 g を入れてよく混合したのち，10°C でインキュベートした．仕込み開始後，0 日目から 33 日目まで，滅菌済みの薬匙を使用して少量の試料を採取し，-20°C で保存した．

室温にて自然解凍した試料 0.5 g に脱イオン水 1 mL を加え，氷水で冷却しながら超音波をアプライし，試料をホモジナイズした．この試料 200 μL と D_2O 800 μL を混合し，13000 rpm で 5 分間遠心した上清 600 μL を NMR 測定試料とした．

山廃酒母、メタボロミクス

○たかまつみさと，うわいしえり，つるがいことえ，こやなぎたかし，おぐらけんじ

化学シフトおよび定量分析の内部標準物質として DSS-d_6 を NMR 測定試料に添加した．^{1}H-NMR 測定は，ECX400P NMR 分光計（^{1}H 共鳴周波数 400 MHz，日本電子）および TH5 プローブを使用して，27°C でおこなった．

仕込み後，0 日および 8 日における山廃酒母の ^{1}H-NMR スペクトルを図 1 に示す．デンプンに含まれるアミロース由来の α–1, 4 結合に相当する信号の積分強度は，0 日目が最大で日数が経過するにつれて減少していった．また，グルコースの H–1 位の還元末端（ α および β アノマー）に相当する信号の積分強度は日数が経過するにつれて増加していった．これらの結果は，麹菌のアミラーゼがアミロースを分解する過程をトレースできていることを示している．一方，アミロペクチン由来の α–1, 6 結合に相当する信号の積分強度は，日数が経過しても変化が小さかった．この結果は，アミラーゼはα–1, 6 結合を分解する活性が低いことを意味している．また，日数が経過するにつれて，0 日目では存在していなかった乳酸およびエタノールの濃度が増加していった．本実験は滅菌した材料を使用して，クリーンベンチで操作したため，コンタミネーションは考えにくい．したがって，乳酸菌および酵母は米麹にはじめから付着していたものと考えられる．

現在，市販の米麹 20 種類を用いて同様の解析をおこなっており，アミロースの分解およびグルコース，乳酸，エタノールの生成速度が，米麹の種類によって大きく異なるという結果が得られている．また，1〜2 ppm 付近に生じる微量成分の同定および定量を進めている．発表では，これらの成分変化の詳細な解析結果を報告するとともに，米麹の種類の差異が日本酒の味わいに与える影響についても議論したい．

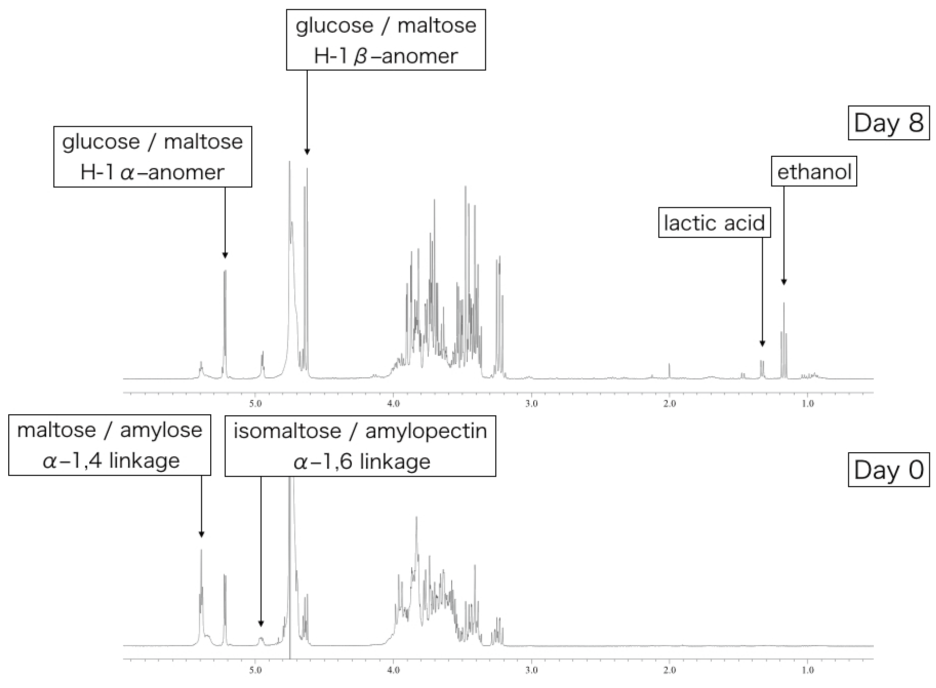


Fig.1 ^{1}H-NMR spectra of yamahai-moto. (lower) day 0, (upper) day 8.

(1) Koyanagi T, Nakagawa A, Kiyohara M, Matsui H, Tsuji A, Barla F, Take H, Katsuyama Y, Tokuda K, Nakamura S, Minami H, Enomoto T, Katayama T, Kumagai H. Tracing microbiota changes in yamahai-moto, the traditional Japanese sake starter. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 399–406 (2016).

P33 水溶液中の重原子イオンとキレート化合物のスピン分極シフトの研究

○桑原大介[1]、横山拓海[1]、佐藤立樹[1]、田崎健太[1]、中川直哉[1]
[1]電気通信大学・大学院・情報理工学研究科

Spin polarization NMR chemical shifts of heavy atoms in aqueous solutions and in chelate compound solutions

○Daisuke Kuwahara[1], Takumi Yokoyama[1], Tatsuki Sato[1], Kenta Tasaki[1], Naoya Nakagawa[1]
[1]*Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications*

In 1967, Nakagawa et al. [1] presented the article on the NMR chemical shifts for heavy atoms. This was the first study for the NMR chemical shifts generated by spin polarization due to heavy atoms. In addition, the NMR chemical shifts were the first relativistic effects found in chemistry. Following this pioneer work, there have been considerable researches on the calculations for the relativistic effects on the NMR chemical shifts. However, the relativistic effects have not been thoroughly investigated experimentally. In this work, we present the experimental observations for the chemical shifts of lead, iodine, potassium, lithium, cesium, sodium, bromine, and rubidium covalently bonded to water molecules.

１．序論

1967 年に中川等は、重原子によるスピン分極シフトについての学会発表をはじめて行った。のちに Pekka Pyykko[2]が 2000 年代にまとめたように、その発表は化学の分野における相対論的効果の初めての研究として有名になった。本研究では、様々な重金属のスピン分極化学シフトの NMR 測定を行った。スピン分極シフトとは重原子および、重原子と共有結合している原子に現れる非常に大きな化学シフトである。外部磁場による 2 次常磁性電流は重原子の場合非常に大きいので、結合軌道中の電子にスピン分極が生じる。またスピン分極シフトの大きさは原子番号とともに大きくなることが理論的に明らかにされている。本研究ではさまざまな重金属イオンについて、水溶液の濃度変化と温度変化による化学シフトの変化を実験的に検証した。また新たな化合物としてキレート化合物についても、重金属のスピン分極シフトが観測されることを発表する。

２．方法

最初に濃度約 15％の重水を作成した。この重水に様々な重金属化合物を溶かして試料溶液を作成し NMR 測定を行った。試料の濃度は 5.0mol/kg から 0.001mol/kg のあいだであった。NMR スペクトルはすべて single pulse あるいは Hahn echo を用いて測定した。積算に関しては、濃度の薄い試料は濃度の濃い試料と同等の感度が得られるまで積算を行った。試料の温度変化では、20℃から 70℃の間で温度を変化させて測定した。キレート化合物については、エチレンジアミン四酢酸鉛(II)ナトリウム（EDTAPb）とエチレンジアミン四酢酸ビスマス(III)ナトリウム（EDTABi）を用いて、1.0mol/kg から 0.01mol/kg 濃度の重金属水溶液試料を作成した。

スピン分極、重原子、化学シフト

○くわはらだいすけ，よこやまたくみ，さとうたつき，たさきけんた、なかがわなおや

３. 結果および考察

Table 1 に各種重金属水溶液の NMR 化学シフトの濃度変化を示す。最も右側の列（ppm）は、試料濃度を変化させた時の化学シフト変化の最大値を示す。これらの数値を見ると、原子番号とともに化学シフトが大きく濃度変化していることがわかる。一般にスピン分極はスピン軌道相互作用（SOC）に比例し、SOC は原子番号 Z の 4 乗に比例する。よってこれらの実験結果は、水溶液中で重原子周りにスピン分極が起こり、スピン分極が重原子の大きな化学シフト変化を引き起こしていることを示している。またほとんどの化合物で化学シフト変化の方向は低磁場側（高周波数側）であり、この変化の方向はスピン分極シフトの量子化学理論計算の結果と一致している。

唯一の例外は硝酸鉛 $Pb(NO_3)_2$ であり、硝酸鉛のみは高磁場側への化学シフト変化を示す。
同じ鉛化合物の過塩素酸鉛とはシフトの方向が逆で大きさはほぼ同じである。この硝酸鉛の結果は、これまでに行われたスピン分極シフトの理論研究（量子化学計算）では予想できなかった結果である。本研究では硝酸鉛と過塩素酸鉛のシフト方向の違いの原因をつきとめるために、Gaussian で鉛イオンと水分子との結合エネルギー計算を行った。会場では鉛イオンと水分子の結合クラスターモデルとともにシフト方向の違いについての考察を報告する。

さらに本研究では、あらたにキレート化合物中に取り込まれた金属イオンついても、スピン分極シフトが起こりうると考え､2 種類のキレート化合物、EDTAPb、EDTABi について重金属の NMR 測定を行った。Fig. 1 は EDTAPb の Pb についての測定結果で､わずかではあるが水溶液濃度の変化に伴った化学シフトの変化が観測された。一方、EDTABi については化学シフトの濃度変化が見られなかった。詳細については会場で報告する。

Table 1. Concentration changes in NMR chemical shift for nuclear species contained in the water solutions of various compounds.

核種	原子番号	試料	化学シフトの濃度変化(ppm)
Li	3	ヨウ化リチウム LiI	0.28
Na	11	臭化ナトリウム NaBr	1.02
K	15	ヨウ化カリウム KI	10.11
Br	35	臭化ナトリウム NaBr	9.89
Rb	37	塩化ルビジウム RbCl	14.98
I	53	ヨウ化リチウム LiI	44.84
		ヨウ化カリウム KI	44.79
		ヨウ化セシウム CsI	31.35
Cs	55	塩化セシウム CsCl	36.15
		硫酸セシウム Cs2SO4	23.34
		ヨウ化セシウム CsI	34.82
Pb	83	硝酸鉛(Ⅱ) Pb(NO3)2	-71.68
		過塩素酸鉛(Ⅱ)三水和物	71.90
		Pb(ClO4)2	

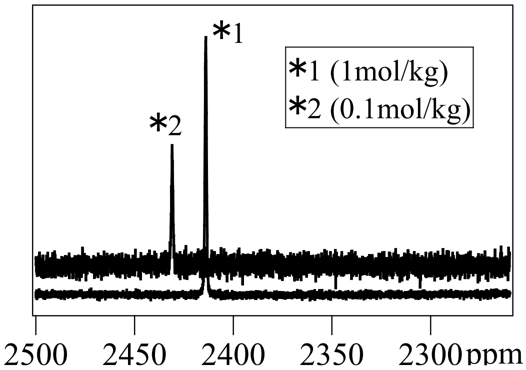


Fig 1. NMR chemical shifts of lead in water solutions for ethylenediaminetetraacetic acid lead(II) disodium salt hydrate.

References

[1]Nakagawa, N.; Sinada, M. Proceedings of The 6th Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan, 1967.

[2]Pekka Pyykko. Annu. Rev. Phys. Chem. 2012, 63, 45-64.

P34 疎な多変量解析を用いたスペクトル–機能相関解析法の開発

○栗田順一，　平尾優佳，　西村善文
横浜市立大学生命医科学研究科

Development of spectrum-function correlation analysis method using sparse multivariate analysis

○Jun-ichi Kurita, Yuuka Hirao, Yoshifumi Nishimura
Graduate school of medical life science, Yokohama City University

Multivariate analysis is currently applied in various fields. In biomolecule NMR field, applications to metabolome and protein HSQC ligand titration experiments etc. have been reported. In general, however, the results obtained by multivariate analysis are expressed as the sum of many variables with small contribution, and it is difficult to understand. In recent years, attempts have been made to intuitively understand by applying sparse methods to various multivariate analyzes. In this study, we developed a method to analyze correlation between NMR spectrum and protein function by applying sparse PCA and sparse PLS-DA method in HSQC ligand titration experiment.

【はじめに】

現在,多変量解析は,さまざまな分野で適用されており,NMRの分野では,メタボロームやタンパク質HSQCリガンド滴定実験などへの応用が多数報告されている. しかし,一般に多変量解析で得られた結果は,寄与の少ない多くの変数の和として表現されており理解することは難しい. 近年,多様な多変量解析に疎な方法を適用して直感的に理解しようとする試みがなされている. 本研究では,HSQCリガンド滴定実験において,sparse PCAとsparse PLS-DA法を適用することにより,NMRスペクトルとタンパク質機能との相関を解析し直観的に解釈が得られる方法を開発した.

【試料】

ターゲットタンパク質として,NRSF/RESTのコリプレッサーであるmSin3BのPAH1ドメインを選び,大腸菌大量発現系にて^{15}N安定同位体標識し,NMRサンプルとした.また,滴定するリガンドはすでに構造が決定されている2CZY[1]の構造を元に産業総合研究所の福西快文博士らがLigandBox及びKEGG Drugデータベースからインシリコスクリーニングを行った結果,結合する可能性が高い化合物として考えられた52種類の低分子化合物を選んだ.目的の機能は,東京工業大学 中野洋文博士らによるDAOY株三次元培養試験により得られた成長阻害能を指標にした.

【実験】

^{15}N安定同位体標識mSin3B PAH1ドメイン100μMに等モルになるよう52種類の化合物を滴定し,CSP(Chemical Shift perturbation)を55残基それぞれに対し観測した.得られたCSPに対しR言語のライブラリであるMixOmicsによりノーマライズ後sparse PCA法およびsparse PLS-DA法の解析を行った.また,sparse PLS-DA法に対しては7-foldのcross validationも行った.

スパース，多変量解析，相互作用

○くりた　じゅんいち, ひらお　ゆうか, にしむら　よしふみ

【結果】

DAOY の成長阻害活性で IC50 が 30μM 以上を”ineffective”,IC50 が 30μM 以下を”effective”と群を分け,sparse PCA を行ったところ,群をわける成分を見出すことはできなかった(Fig 1). しかしながら,PC1 は ligand のタンパク質に結合する成分であることが直観的に理解できる残基を示した.単純な PCA で活性を記述できなかったことが意味するのは,他の要素を解析に含めなければならないことを意味する.そこで我々は,教師つき多変量解析である PLS-DA 法に sparse 推定を適応した sparse PLS-DA 法を行うこととした.

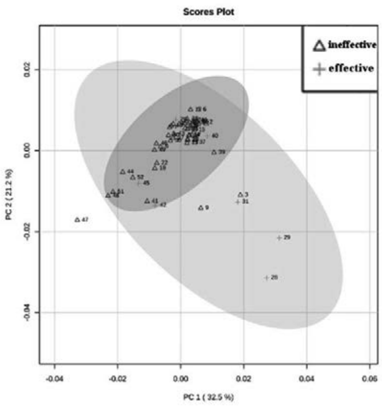


Fig 1 sparse PCA score plot

Sparse PLS-DA 法の 3 次元スコアプロットを Fig 2 に示す.Sparse PLS-DA 法では明確に“effective”と”ineffective”な群に分けることができた.また 5-fold の cross validation を行ったところ,3 次元で解析を行えば,8%程度のエラー率で予測できることを示唆する結果を得ることができた(Fig3).さらに,3 次元の軸の成分を 2CZY のタンパク質構造にマッピングしたところ,第一成分の残基は主にポケットを形成する残基であるので PCA の解析と同様に ligand との結合に関与する残基であることを意味していた.第二成分は,それと異なりテイルやヘリックスが接する部位の残基が主に関与する.第三成分は,ヘリックス間のリンカーに位置する残基の関与が大きい(Fig4).これらの構造生物学的な解釈を ligand とタンパク質のドッキング構造を用いて,当日報告する予定である.

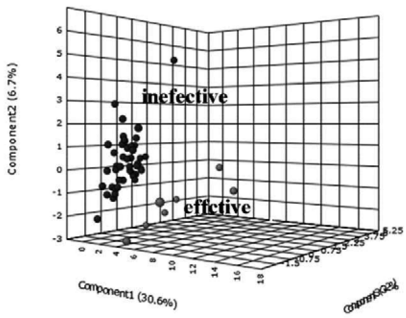


Fig 2 sparse PLS-DA 3D score plot

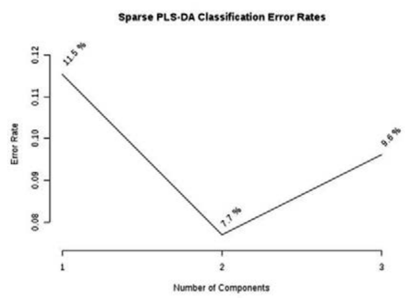


Fig3 5-fold cross validation

【参考文献】

1. Nomura, M., Uda-Tochio, H., Murai, K., Mori, N. & Nishimura, Y. The neural repressor NRSF/REST binds the PAH1 domain of the Sin3 corepressor by using its distinct short hydrophobic helix. *J. Mol. Biol.* **354,** 903–15 (2005).

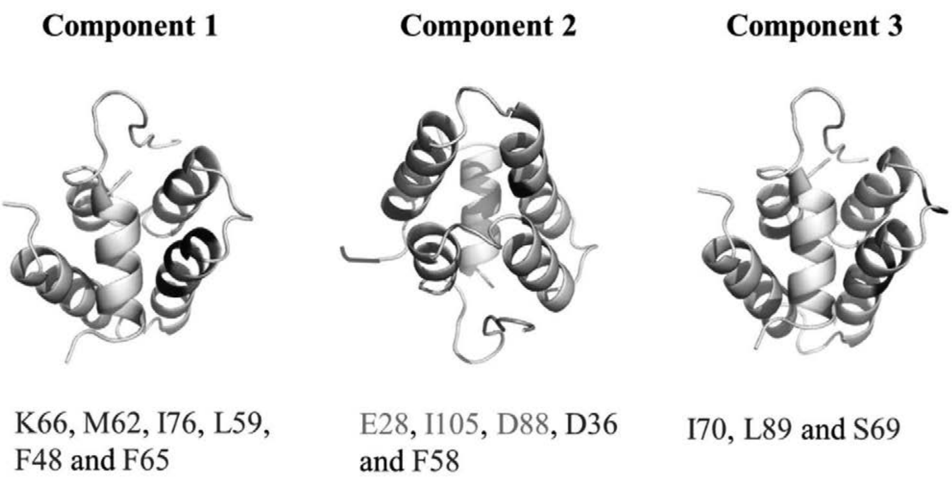


Fig4 structural mapping of sparse loading vector

P35

NMR法を用いたエピガロカテキンガレートの相互作用解析

○金場　哲平 [1]，高橋　知也[2,3]，黒田　大祐[4]，長門石　曉[3,5,6]，
津本　浩平[3,4,5,6]
1 ブルカージャパン株式会社バイオスピン事業部アプリケーション部
2 花王株式会社　ヘルスケア食品研究所
3 東京大学大学院　工学系研究科　バイオエンジニアリング専攻
4 東京大学大学院　工学系研究科　医工学RSセンター
5 東京大学大学院　工学系研究科　化学生命工学専攻
6 東京大学　医科学研究所

NMR analysis of interaction of epigallocatechin gallate

○Teppei Kanaba [1], Tomoya Takahashi[2,3], Daisuke Kuroda[4], Satoru Nagatoishi[3,5,6], Kouhei Tsumoto[3,4,5,6]
1 Application Department, BioSpin Division, Bruker Japan K.K.
2 Global R & D – Health Care Food, Kao Corporation
3 Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo
4 Biomedical Engineering RS Center, School of Engineering, The University of Tokyo
5 Department of Chemistry & Biotechnology, School of Engineering, The University of Tokyo
6 Institute of Medical Science, The University of Tokyo

(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCg), a natural polyphenol found in plant-based foods and beverages such as green tea, possesses high antioxidant and antiviral activity. EGCg interacts with many proteins and other biomolecules, such as phospholipids and polysaccharides, and it is known that the interactions play important roll in EGCg activities. One of the interacting molecules is human serum albumin (HSA). Some reports suggested that the EGCg-HSA interaction contributes to the stabilization of EGCg. In this study, we focused the interaction between EGCg and target molecules, and investigated this interaction using saturation transferred difference (STD) NMR, INPHARMA-NMR, isothermal titration calorimetry (ITC) and docking simulation.

[序論]

エピガロカテキンガレート(EGCg)は茶などに多く含まれているカテキン類であり、抗酸化作用や殺菌作用などの様々な生理活性を持つ。EGCgはタンパク質などの様々な生体分子と結合することが知られており、その相互作用はEGCgの活性において重要となる。EGCgと結合する生体分子の一つがhuman serum albumin (HSA)であり、EGCgの血中における安定性においてはHSAとの相互作用が関係していると報告されている(1)(2)。またEGCgの生理活性の一つに糖代謝への寄与があるが、EGCgはアミラーゼなどの糖分解酵素の活性に作用する他、多糖に直接結合することでも糖代謝に関わっているとされている(3)。本研究ではEGCgとターゲット分子との相互作用に着目し、STD法やINPHARMA法などのNMRを用いての手法に加え、ITC、ドッキングシミュレーションを併せた相互作用解析を行った。

STD, INPHARMA, EGCg

○かなば　てっぺい、たかはし　ともや、くろだ　だいすけ、ながといし　さとる、つもと　こうへい

[実験]

EGCgは水溶液中において6、8位の水素原子が溶媒と交換してしまうため重水中で長時間のNMR測定を行うと6、8位のシグナルが観測できなくなるという問題があった。そのためNMR測定の溶媒には重水ではなく90% H2O/ 10% D2Oの緩衝液を用いた。それに伴いSTD測定やINPHARMA-NMRのための2D NOESYには溶媒消去のパルス系列 (excitation sculpting) を使用したパルスプログラムを用いた。STD測定での飽和パルスの照射中心は-40ppm (off resonance) と 0ppm (on resonance) に設定し、パルスの照射時間は1秒で行った。INPHARMA-NMRのサンプルにはEGCg、warfarin、HSAをモル比 50 :50 : 1 で混合したサンプルを用いた。

[結果と考察]

STD法の結果をFig.1に示す。STDによる解析ではEGCgのA環、B環、ガロイル基 (B'環) のそれぞれの^{1}Hについて大きなSTDが観測された。飽和パルスの照射時間を変化させても同じ傾向を示しており、これはEGCgが分子全体でHSAと相互作用していることを示唆している。

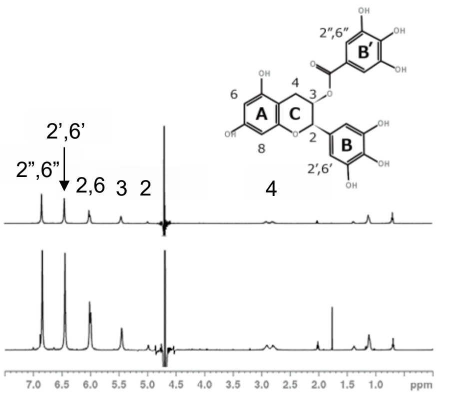


Fig. 1. STD spectra of the EGCg-HSA complex
(lower) off-resonance reference spectrum
(upper) STD spectrum

HSAはリガンドと結合する部位を複数持つが、その中のsite 1に結合する化合物、warfarinを用いてINPHARMA-NMRによる相互作用解析を行った。Fig.2に示すように、EGCgとwarfarinの間にHSAを介したリガンド間のNOEが観測された。これはEGCgはwarfarinと競合的にHSAのsite 1に結合していることを示している。ITCを用いたEGCgとwarfarinの競合実験も行っており、その結果からもEGCgとwarfarinの競合を確認している。

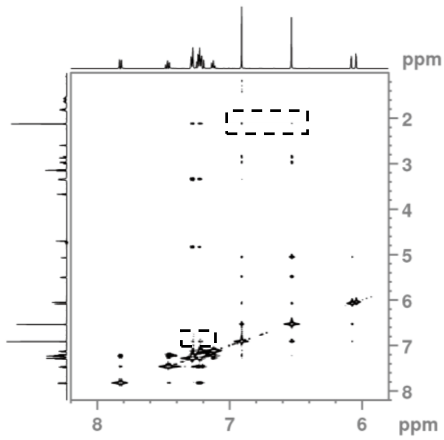
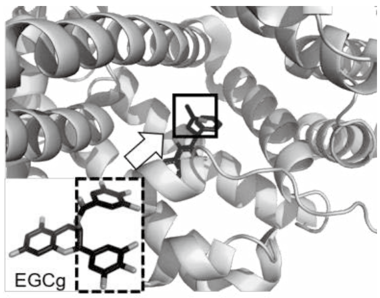


Fig. 2. NOESY spectra of a mixture of HSA, EGCg and warfarin
Interligand NOEs via HSA are observed.

INPHARMAの結果ではwarfarinの芳香族^{1}HとEGCgの芳香族^{1}Hの間にNOEグナルが観測された他に、warfarinのメチル基とEGCgのB環、ガロイル基の^{1}Hとの間にもシグナルが確認された。報告されているwarfarinとHSAの複合体の結晶構造 (PDB code : 2BXD) をFig.3に示す。INPHARMAの結果より、Fig.3の四角で示した場所にB環、ガロイル基が位置する配向でEGCgはHASと複合体を形成していると予想される。ドッキングシミュレーションを用いたHSAとEGCgの結合の予測を行ったところ、INPHARMAからの予測と似ている結合様式が得られた。これらは二つの結果が妥当であることを示している。

このように構造生物学的な手法から、HSAとの複合体中におけるEGCgの配置に関する知見を得ることに成功した。また現在はSTD-NMRによる、EGCgの結合のターゲットの一つである多糖との相互作用解析を行っており、年会ではその結果も併せて報告する予定である。



[References]
1. Ishii T., *et al*., Biosci. Biotechnol. Biochem., 75, 100-106, 2011
2. Vesic J., *et al*., Food Chem., 185, 309-317, 2015
3. Chai Y., *et al*., J. Agric. Food Chem., 61, 8608-8615, 2013

Fig. 3. Relative orientation of EGCg predicted from INPHARMA
Methyl group of warfarin, EGCg B ring and galloyl group are indicated by boxes

P36 NMRによるヒストンシャペロンNAP1とヒストンH2A-H2Bの相互作用解析

○大友秀明[1]，森脇義仁[1]，栗田順一[1]，西村善文[1]
1横浜市立大学生命医科学研究科

The interaction analysis between the histone chaperone NAP1 and the histone H2A-H2B by using NMR

○Hideaki Ohtomo[1], Yoshihito Moriwaki[1], Jun-ichi Kurita[1], Yoshifumi Nishimura[1]
1Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

Nucleosome assembly protein 1 (NAP1) is a histone chaperone protein, which supports the nucleosome assembly and disassembly. NAP1 contains an N-terminal acidic domain (NTAD), a core domain, and a C-terminal acidic domain (CTAD). NTAD and CTAD of human NAP1 (hNAP1) contribute to the histone chaperone activity. Here, we show that an NTAD and a CTAD of hNAP1 interact with H2A-H2B. The interaction analyses of labeled NTAD and CTAD with non-labeled H2A-H2B revealed that there were two binding sites in CTAD and one binding site in NTAD, and H2A-H2B binding sequence contained many acidic residues with a few hydrophobic residues. Additionally, the interaction analyses of labeled H2A-H2B with non-labeled NTAD and CTAD revealed that there were two binding sites in H2A-H2B, hydrophobic patch (HP) and basic patch (BP). The CTAD interacted with both HP and BP while the NTAD interacted with BP alone.

クロマチンの最小構造単位であるヌクレオソームは約146bpのDNAにヒストンH3-H4テトラマーが結合した後、ヒストンH2A-H2Bダイマーが2分子結合することで構築される。Nucleosome assembly protein 1(NAP1)はヌクレオソームの構築を助けるヒストンシャペロンと呼ばれるタンパク質の一つである。NAP1はコアドメインとN末端、C末端の長い天然変性領域からなる。これらの天然変性領域は酸性アミノ酸を多く含むためN-terminal acidic domain (NTAD)とC-terminal acidic domain(CTAD)と呼ぶことにする。ヒトNAP1(hNAP1)において、コアドメインとCTADはそれぞれが単独でH2A-H2Bと相互作用し、CTADはヌクレオソーム形成を促進するために必須であることが明らかになっている[1]。また、NTADとCTADはヒストンバリアントH2A.Bbdを含むヌクレオソームからH2A.Bbd-H2Bダイマーを排除するために重要であることも報告されている[2]。本研究で、我々はまず、13C, 15Nラベルした全長のhNAP1(hNAP1^{FL})の^{1}H-^{15}N TOROSY-HSQCスペクトルで観測されるシグナルの帰属を行い、観測されたシグナルはN末端(M1-A35)とC末端(G358-Q391)の天然変性領域であることが分かった。続いてH2A-H2Bの滴定実験を行ったところ、hNAP1^{FL}ダイマー:H2A-H2B=1:1までに、D13-A35のシグナル強度が減少し、G358-N384でシグナル強度の減少とシグナルの消失が見られた。この結果はNTADとCTADがそれぞれH2A-H2Bと相互作用することを示す。次にNTADまたはCTADとH2A-H2Bの相互作用を詳しく調べるために、hNAP1^{FL}と同様にNTADペプチドまたはCTADペプチドと

NAP1、H2A-H2B、ヒストンシャペロン

○おおともひであき，もりわきよしひと，くりたじゅんいち，にしむらよしふみ

H2A-H2Bの相互作用解析を行った。ラベルしたNTAD、CTADペプチドにH2A-H2Bを滴定したとき、NTADではV19とV22を含むD17-T27の化学シフトが変化した(Fig.1)。また、CTADではY354を含むD353-E359とY377を含むN373-K381の二つの領域に化学シフト変化またはシグナルの消失が起きた(Fig.1)。さらに、CTADの二つの結合領域を一つずつに分けたCTAD-NとCTAD-Cはそれぞれ単独でH2A-H2Bと相互作用した。H2A-H2Bに結合する配列はいずれも連続した酸性アミノ酸と少数の疎水性アミノ酸を含んでいた(Fig.1B)。一方、H2A-H2Bをラベルした場合、Fig.2に示したように二つの領域の化学シフトが変化した。一つは塩基性アミノ酸を多く含み(Basic patch, BP)、もう一つは疎水性アミノ酸も含まれていた(Hydrophobic patch, HP)。NTADはBPに特異的に結合し、CTAD-CはHPに特異的に結合した。一方、CTAD-NはHPとBPの両方に結合したことは興味深い。これらの知見はNAP1の機能メカニズムを明らかにするために重要である。

参考文献

1. Ohtomo *et al. Genes Cells* (2016)

2. Okuwaki *et al. Genes Cells* (2010)

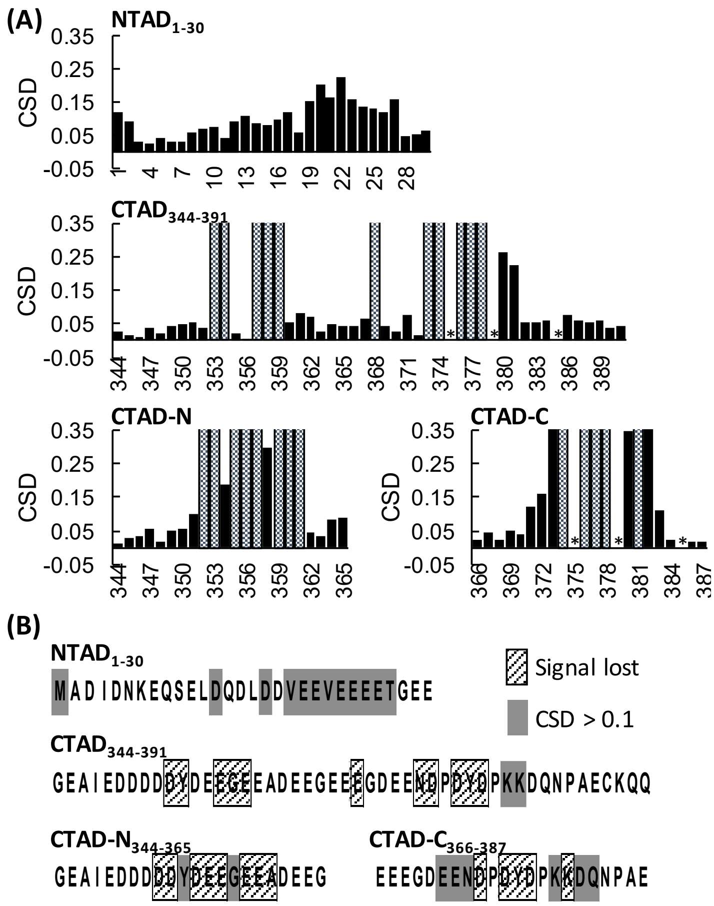


Fig.1 **(A)** Chemical shift changes of labeled NTAD, CTAD, CTAD-N, CTAD-C upon binding to H2A-H2B. Shaded bars are residues whose signal disappeared by addition of H2A-H2B. * is a proline residues. **(B)** The amino acid sequences of NTAD, CTAD, CTAD-N, CTAD-C. Residues in which the signals disappeared by binding to H2A-H2B were shaded and the residues with CSD> 0.1 were highlighted in gray.

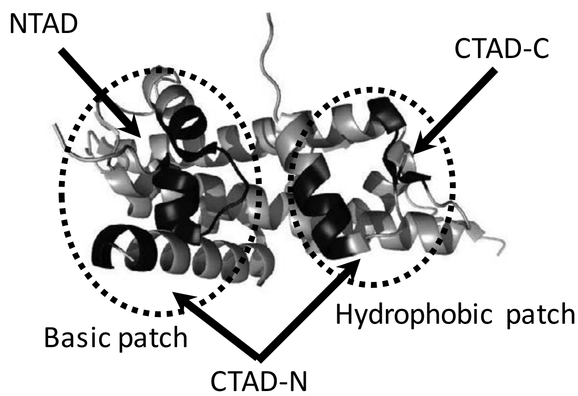


Fig.2 NTAD and CTAD binding regions in H2A-H2B. Residues whose chemical shifts were significantly changed by binding to NTAD or CTAD were shown in black.

P37

HP1αのN末端天然変性領域のリン酸化による ヘテロクロマチン形成機構の解明

○古川亜矢子[1]，米澤健人[2]、安達成彦[2]、清水伸隆[2]、千田俊哉[2]、志村諒[3]、寺田透[3]、清水謙多郎[3]、中山潤一[4]、西村善文[1]
1横浜市立大学・生命医科学研究科
2高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所
3東京大学大学院・農学生命科学研究科
4基礎生物学研究所

Heterochromatin formation by the phosphorylated HP1α N-terminal disordered region

○Ayako Furukawa[1], Kento Yonezawa[2], Naruhiko Adachi[2], Nobutaka Shimizu[2]. Toshiya Senda[2], Ryo Shimura[3], Tohru Terada[3], Kentaro Shimizu[3], Jun-ichi Nakayama[4], and Yoshifumi Nishimura[1]
1. Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University
2. Structural Biology Research Center, High Energy Accelerator Research Organization (KEK)
3. Graduate School of Agricultural and Life Science, Tokyo University
4. National Institute for Basic Biology

The formation of transcriptionally silent chromatin, so called heterochromatin, is critical for genomic stability and cell differentiation. The heterochromatin structure is maintained by a heterochromatin protein 1 (HP1). HP1α, one of the isoforms, is composed of two structured chromodomain (CD) and chromo-shadow domain (CSD), and three disordered N-terminal, linker, and C-terminal regions. CD directly binds to lysine 9 methylated histone H3 (H3K9me3) and CSD can homodimerize. The N-terminal disorderd region has four succesive serin residues, whose phosphoriration enhances the binding to H3K9me3 and induces phase separation. To reveal the molecular mechanism, we have examined the structural dynamics of HP1α with and without the phosphorylation. We have examined structural changes of HP1α between the phosphorylated and unphosphorylated forms. Interestingly, we have identified the chemical shift changes of the CD moiety and the linker reagion at low NaCl concentration. This suggests that the interaction between the linker region and the N-terminal-CD region is different between the phosphorylated and unphosphorylated HP1α.

クロマチンの基本構造単位はヌクレオソームである。クロマチンには、ヌクレオソーム間のDNAが緩んでいるユークロマチン構造とヌクレオソーム同士が凝集したヘテロクロマチン構造が存在する。この2種類のクロマチン構造によって、遺伝子発現の制御が行われている。ヘテロクロマチン形成に関与するヘテロクロマチンタンパク質（HP1)は、N末端テイル(NT)-クロモドメイン(CD)-リンカー(Ln)-クロモシャドードメイン(CSD)-C末端テイル(CT)から成る。NT+CD領域が9番目のリシンがメチル化されたヒストンH3(H3K9me3)に結合、CSDが2量化し、ヘテロクロマチン構造を形成する。HP1のホモログであるHP1αのNTには4個の連続するセリンが存在しセリンのリン酸化によってNTが伸びた紐様構造を取りH3K9meと強く結合する[1]。またNTのセリンのリン酸化により可逆的な液滴を形成し相分離(phase separation)を起こすことが報告されている[2]。

ヘテロクロマチン、リン酸化、動的構造変化
○ふるかわあやこ， よねざわけんと， あだちなるひこ， しみずのぶたか， せんだとしや， しむらりょう， てらだとおる， しみずけんたろう， なかやまじゅんいち， にしむらよしふみ

そこで、HP1αのリン酸化から相分離までの構造変化を解析し、HP1αのヘテロクロマチン形成の分子機構を明らかにすることを目的とした。HP1αは、酸性残基や塩基性残基が固まって存在しているため分子内で動的に弱く相互作用していると考えられる。そこで、NTのリン酸化の有無による各残基の化学シフト差を50 mM NaClと500 mM NaClで比較した(Fig.1)。その結果、500 mM NaCl条件下では、N末領域以外は化学シフト差が見られなかったが、50 mM NaCl条件下では、CD領域の40番付近の残基及びLn領域の100番付近の残基に化学シフト差が見られた。このことからN末のリン酸化により、Ln領域とNT+CD領域との相互作用が変化していることが示唆された。そこで、アミドプロトンと水との交換速度を決められるCLEANEX-PMの測定を行った。しかしながら、リン酸化の有無で交換速度の差は見られなかった。このことから、msオーダーよりも速いタイムスケールにおいて、動的な構造に違いがあると考えられる。現在、常磁性緩和(PRE)法に加えてX線小角散乱(SAXS)法やMD計算も併せて解析を進めている。

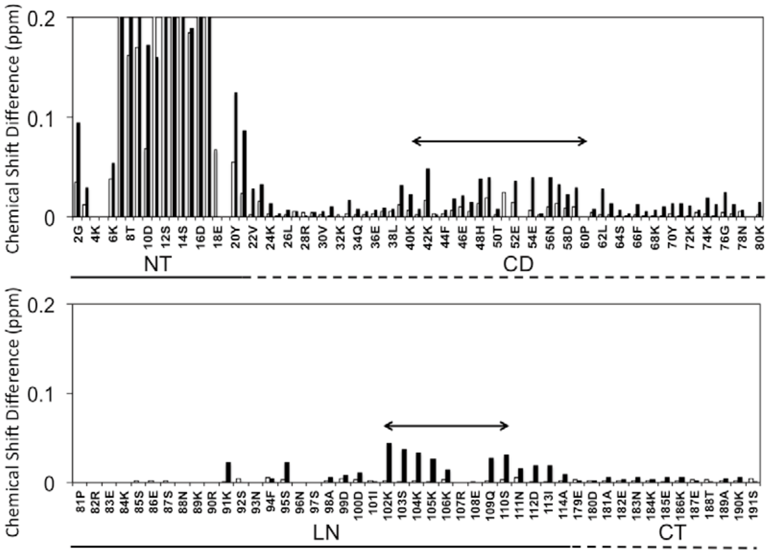


Fig. 1. Comparison of chemical shift differences between the unmodified HP1α and the phosphorylated HP1α at 500 mM NaCl (open bar) at 50 mM NaCl (filled bar).

また、リン酸化によるHP1αのphase separationの解析も進めている。各濃度のリン酸化HP1αの拡散係数をNMRを用いて算出した。タンパク質濃度1 mMの時に、phase separationを確認出来た(Fig.2)。Phase separationを目視出来なかった濃度300 μMの拡散係数は、リン酸化及び非リン酸化体で同じであったが、1 mMの時はリン酸化体で更に遅い成分が現れ2種類の拡散係数が得られた。リン酸化によりHP1αが形成する多量体の相互作用についても解析を進める。

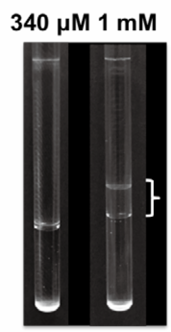


Fig. 2. Phase separation of phosphorylated HP1α at 4 ^{o}C.

Reference

(1) Shimojo H., Kawaguchi A., Oda T., Hashiguchi N., Omori S., Moritsugu K., Kidera A., Hiragami-Hamada K., Nakayama J., Sato M., and Nishimura Y. (2016) Extended string-like binding of the phosphorylated HP1α N-terminal tail to the lysine 9-methylated histone H3 tail. *Scientific Reports* 6, 3;6:22527.

(2) Larson A. G., Elnatan D., Keenen M. M., Trnka M. J., Jonathan J. B., Burlingame A. L., Agard D. A., Redding S., and Narlikar G. J. (2017) Liquid droplet formation by HP1α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* 547, 236-240

P38

ヒト単純ヘルペスウイルス由来糖ペプチドと免疫受容体PILRα相互作用解析

○野村尚生[1]、柿田浩輔[2]、古川敦[3]、穴田仁洋[2]、橋下俊一[2]、松永茂樹[2]、齊藤貴士[4]、前仲勝実[1, 3]
1北海道大学大学院薬学研究院 創薬科学研究教育センター
2北海道大学大学院薬学研究院 薬品製造化学研究室
3北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室
4北海道薬科大 薬学科

Effect of sugar chain on interaction of HSV-1 Glycoprotein with immune receptor PILRα

○Takao Nomura[1], Kosuke Kakita[2], Atsushi Furukawa[3], Masahiro Anada[2], Shunichi Hashimoto[2], Shigeki Matshunaga[2], Takashi Saitoh[4], Katsumi Maenaka[1,3]
1Center for Research and Education on Drug Discovery, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
2Laboratory of Synthetic and Industrial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
3Laboratory of Biomolecular Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
4School of Pharmacy, Hokkaido Pharmaceutical University

Paired Ig-like type 2 receptor α (PILRα) recognizes a wide range of O-glycosylated mucin and related proteins to regulate broad immune responses. Here we show that sialylated O-linked sugar T antigen (sTn) and its modified peptide region are both required for ligand recognition by PILRα. GalNAc would play an important role for immobilizing the sialic acid vertically to the peptide chain. These findings provide significant insight into the binding motif and molecular mechanism for the development of HSV1 infection inhibitors.

単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）は、日本脳炎、各種ヘルペス、皮膚病などの様々な疾病に関与する病原性ウィルスの一種である。また、ヒト免疫受容体であるPaired immunoglobin like type 2 receptor alpha （PILRα）は広範な免疫細胞に発現しており、このHSV-1の感染時にそのエントリーレセプターとして働いていることが知られる[1]。PILRαは免疫抑制性のシグナルを伝達するのに対し、ファミリータンパク質であるPILRαは免疫活性化シグナルを伝達する。これらの細胞外ドメインは非常に高いホモロジーを有するが、PILRαとHSV-1は相互作用しないことが知られている。近年までPILRαとHSV-1の結合様式ははっきりと解明されていなかったが、黒木らによりHSV-1のglycoproteiB（gB）の糖鎖修飾ペプチド部分とPILRαの細胞外ドメインの共結晶構造解析が解かれ、糖鎖とペプチド領域の両方がPILRα認識に重要であることが判明した[2]。
今回、HSV-1の感染阻害を目指し、gBのシアリルT抗原（sTn）糖鎖のGalNAcを置換し

ウイルス感染、免疫受容体、糖ペプチド

○のむらたかお、かきたこうすけ、ふるかわあつし、あなだまさひろ、はしもとしゅんいち、まつながしげき、さいとうたかし、まえなかかつみ

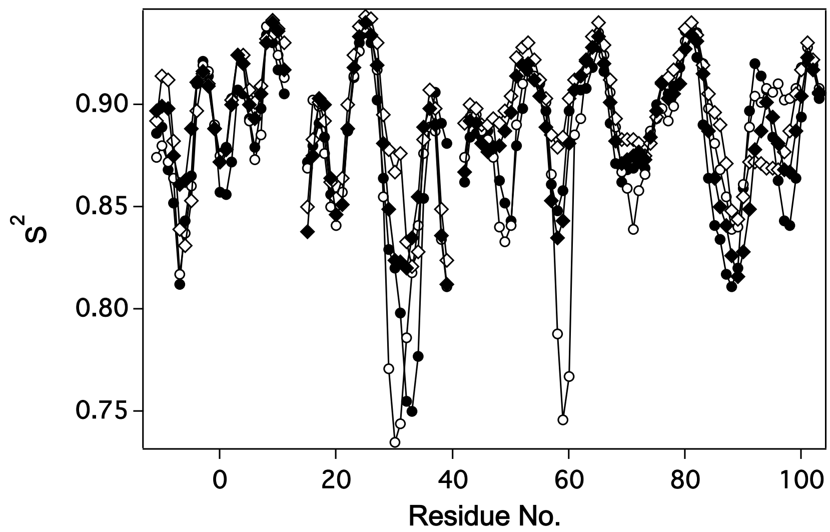


Fig. 1. ***TALOS-N analysis from chemical shift change of the PILRa with or whithout sTn peptide***

Filled circle: S^2 value of PILRα in the absence of sTn peptide, Open circle: in the presence of 5 eq. GalNAc peptide, Open diamond: in the presence of 5 eq. GlcNAc peptide, Filled diamond: in the presence of 5 eq. Deoxy-GalNAc peptide.

た糖ペプチドアナログ２種類（GlcNAc体、Deoxy-GalNAc体）を化学合成した。これらの糖アナログペプチドはどれも共結晶構造解析では、野生型とほぼ同じ結晶構造を示していたが、定温滴定型熱量測定により溶液中におけるPILRαの構造変化に違いがあることが判明した[3]。そこで、この結合状態変化について解析するため、NMRによる三次元解析を用いてPILRαと糖ペプチドアナログの相互作用を詳細に解析した。糖ペプチドアナログはどれもPILRαと相互作用を示す結果を得たが、各ペプチドアナログの結合によるPILRαの構造変化はそれぞれ違い、結晶構造と同様の結果を得ることはできなかった。野生型のGalNAc体では、ケミカルシフトの見られた残基が結晶構造解析で構造変化があった残基と完全に一致したが、GlcNAc体では構造変化に関与する残基において、ケミカルシフトの変化が見られないものが多数存在した。さらにDeoxy-GalNAc体においても同様に、GlcNAc体と比較しケミカルシフトの変化量に違いが見られたことから、熱量測定の結果から示唆されたように。sTnペプチド結合による構造変化が溶液中と結晶構造で異なることが示された。また、二面角情報からTALOS解析により、gB由来のGalNAc型糖ペプチドのみがPILRαのC末端領域を安定化させる結果を得ており、GalNAcによってペプチドの配向を制御し、安定な構造を誘起することが示唆された（Fig.1）。

References

1. Tabata, S., Kuroki, K., Wang, J., Kajikawa, M., Shiratori, I., Kohda, D., Arase, H., and Maenaka, K., (2008) *J. Biol. Chem.,* **283**, 8893-8901.
2. Kuroki, K., Wang, J., Ose, T., Yamaguchi, M., Tabata, S., Maita, N., Nakamura, S., Kajikawa, M., Kogure, A., Satoh, T., Arase, H., and Maenaka, K., (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **111**, 8877-8882.
3. Furukawa, A., Kakita, K., Yamada, T., Ishizuka, M., Sakamoto, J., Hatori, N., Maeda, N., Ohsaka, F., Saitoh, T., Nomura, T., Kuroki, K., Nambu, H., Arase, H., Matsunaga, S., Anada, M., Ose, T., Hashimoto, S., and Maenaka, K., (2017) *J. Biol. Chem.,* **292**, 21128-21136.

P39

NMR分光法によるロスマリン酸誘導体ーアミロイドβ42の結合解析

○上井幸司[1]，久米田博之[2,3]，坂本和[4]，杉浦亜美[1]，関千草[1]，中野博人[1]，
徳樂清孝[1]，馬渡康輝[1]
1 室蘭工業大学大学院工学研究科
2 北海道大学　先端生命科学学院
3 北海道大学　国際連携研究教育局　ソフトマターグローバルステーション
4 室蘭工業大学応用理化学系学科

Analysis of amyloid ß42 – rosmarinic acid derivatives interaction by NMR spectroscopy

○Koji Uwai[1], Hiroyuki Kumeta[2,3], Nodoka Sakamoto[4], Ami Sugiura[1], Chigusa Seki[1], Hiroto Nakano[1], Kiyotaka Tokuraku[1], Yasuteru Mawatari[1]
1 Graduate School of Engineering, Muroran Institute of Technology
2 Faculty of Advanced Life Science. Hokkaido University
3 Global Station for Soft Matter, GI-CoRE, Hokkaido University
4 Department of Applied Sciences, Muroran Institute of Technology

It is expected that the inhibition of the aggregation of amyloid ß (Aß), which is considered one of the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), is a promising preventive strategy for AD[1]. Rosmarinic acid (RA), which contains abundantly in *Lamiaceae* family, is known to exhibit potent Aß aggregation inhibitory activity[2]. Recently, we studied the structure-activity relationships of RA derivatives, and showed a possibility that they have different mechanism of inhibition based on the chemical structure[3]. Thus, in this study, to clarify the differences of the mode of action of RA derivatives in Aß aggregation inhibitory activity, interactions between Aß42 and RA derivatives were analyzed by STD-NMR, ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC, PIUP assay, and ThT-assay. The results suggested that RA and caffeic acid pentyl ester were both interacted with Aß42-monomer, and prevent the aggregation mainly by binding with non-NMR detectable early phase of oligomers.

【背景】アルツハイマー病 (AD) の原因物質と考えられているアミロイドβ (Aβ) はオリゴマー化により神経細胞毒性を示し, AD 発症へと導く [1]. そのため, 毒性の極めて高い Aβ オリゴマー形成阻害機構の解明が AD 予防または治療薬開発に繋がると期待される. Aβ の凝集阻害物質としてポリフェノールが知られており，そのなかでもロスマリン酸はシソ科ハーブに含まれる代表的な物質である [2]. これまでに我々はロスマリン酸およびその誘導体であるカフェイン酸エステルを用いた Aβ 凝集阻害機構の解析 [3] により, 各物質の凝集阻害段階は異なり, それぞれ複数存在する可能性が示唆されている. そこで本研究では, ロスマリン酸誘導体の Aβ 凝集阻害機構をより詳細に解析し，誘導体間の活性の違いを明らかにするために，核磁気共鳴 (NMR) 法およ

アルツハイマー病，アミロイドβ，ロスマリン酸
○うわい　こうじ，くめた　ひろゆき，さかもと　のどか，すぎうら　あみ，せき　ちぐさ，なかの　ひろと，とくらく　きよたか，まわたり　やすてる

び生化学的手法によりロスマリン酸およびカフェイン酸ペンチルエステルの Aβ との相互作用について検討した.

【方法】ロスマリン酸およびカフェイン酸ペンチルエステルと Aβ$_{42}$ 凝集阻害段階をチオフラビン T (ThT) 法および PICUP 法により検討し，同条件下での Aβ と阻害剤との相互作用を STD および ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC の両 NMR 法により検討した.

【結果および考察】ThT 法により，ロスマリン酸は β-シート形成を完全には阻害できなかった. また，PICUP 法では数種のオリゴマーの生成がみられた. 従って，凝集体形成の中途段階を阻害していると考えられた. また，カフェイン酸ペンチルエステルは ThT 法では β-シート形成を完全に阻害し， PICUP 法ではオリゴマーの減少が見られた. 従って, Aβ モノマーとの相互作用が観測できると期待された.

ロスマリン酸と Aβ の共存溶液の STD-NMR スペクトルを測定した (Fig.1). 飽和パルス照射位置を-0.2, 0.05, 0.3, 0.55, 0.8 ppm としたSTD-NMR スペクトルを測定したところ，いずれの照射位置でもシグナルの強度が減衰したため，ロスマリン酸は Aβに結合していることが明らかとなった. また, 相対的相互作用強度を計算した結果, 主に芳香族部位で結合することが示唆された.

一方, カフェイン酸ペンチルエステルと Aβ の共存溶液の STD-NMR スペクトルはいずれの照射位置でもシグナルの強度が減衰したため，カフェイン酸 C5 エステルは Aβに結合していることが明らかとなった. そのシグナル強度はオフレゾナンンススペクトルの 40 パーセント程度であり，ロスマリン酸は Aβモノマーあるいは可溶性オリゴマーと結合することが，また，相対的相互作用強度をから, 主にアルキル側鎖で結合することが示唆された.

現在, ^{15}N 標識 Aβ を用いた ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC 法スペクトル測定により Aβ 上の相互作用部位を検討中である.

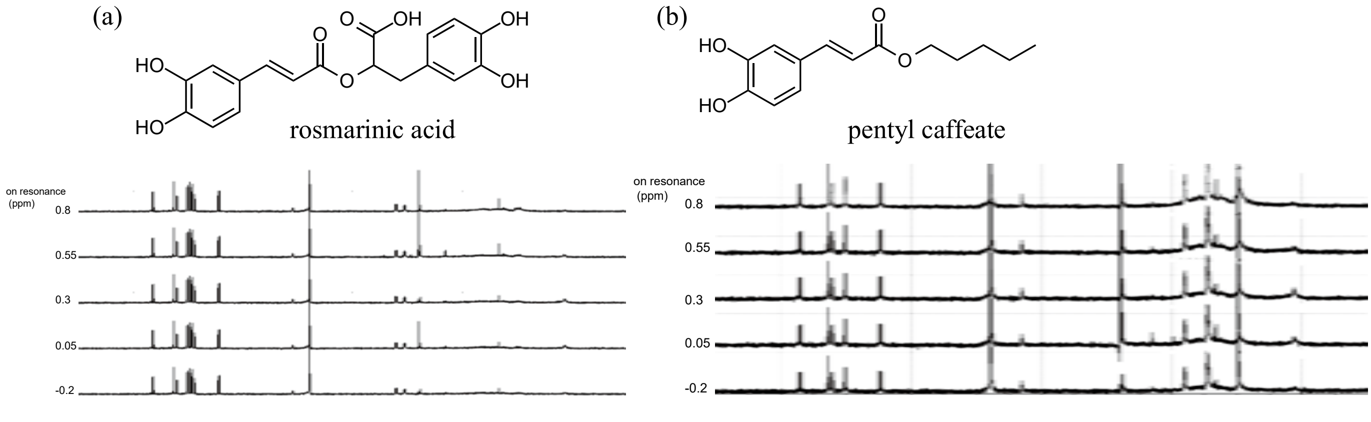


Fig.1 STD-NMR spectra of the mixture containing Aβ and rosmarinic acid (a) or pentyl caffeate (b)

References:

1) C. R. Jack Jr *et al.*, *Lancet Neurol*, **9**, 119-128, (2010).
2) K. Ono *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **287**, 14631-14643 (2012).
3) R. Taguchi *et al., Eur. J. Med. Chem.,* **138**, 1066-1075 (2017).

P40

^{13}C NMR化学シフト予測・部分構造検索機能を有するCAST/CNMRシステムの公開

○越野広雪[1]，朝倉克夫[2]，栗本智充[3]，小市俊悟[4]，佐藤寛子[5,6]
[1]理化学研究所　環境資源科学研究センター
[2]日本電子株式会社
[3]株式会社JEOL RESONANCE
[4]南山大学 システム数理学科
[5]情報・システム研究機構
[6]チューリッヒ大学 化学科

Development of Graphical User Interface in Delta NMR Software to CAST/CNMR System

○Hiroyuki Koshino [1], Katsuo Asakura[2],Tomomitsu Kurimoto[3], Shungo Koichi[4], Hiroko Satoh[5,6]
[1]*RIKEN Center for Sustainable Resource Science*
[2]*JEOL Ltd.*
[3]*JEOL RESONANCE Inc.*
[4]*Department of Systems and Mathematical Science, Nanzan University*
[5]*Research Organization of Information and Systems*
[6]*Department of Chemistry, University of Zurich, Switzerland*

We have developed a graphical user interface for using the CAST/CNMR system from the NMR data processing system of JEOL, Delta NMR software, before the release of CAST/CNMR as freeware. The Delta users can prepare the query directly from their processed NMR spectral data and run the CAST/CNMR Structure Elucidator via the interface. The users can also visually compare the output of predicted chemical shifts from the CAST/CNMR Chemical Shift Predictor with their NMR spectral data to confirm the structure. The CAST/CNMR system will be available via the JEOL website, which will be announced in the near future.

CAST/CNMRシステムは、分子構造を入力すると^{13}C NMR化学シフト予測(CAST/CNMR Chemical Shift Predictor)[1,2]と^{13}C NMR化学シフト値を入力すると部分構造検索および分子構造推定(CAST/CNMR Structure Elucidator)[3]が出来る２つの機能を持つNMRによる分子構造解析のためのソフトウェアである(図1の右側)。Shift Predictor、Structure Elucidator共に、二面角を利用した立体分子構造コード、CASTコード[4-8]を用いて記述した分子構造-^{13}C NMR化学シフトデータベースを用いる。CAST/CNMRシステムは近くフリーソフトウェアとして公開予定である。これに先立ち、NMRデータ処理システムとして普及しているDelta NMRソフトウェア(日本電子株式会社)にCAST/CNMRシステムとのインターフェース機能を新たに開発した。

実測の^{13}C NMRスペクトルからDeltaによってStructure Elucidatorのクエリーである^{13}C NMR化学シフト値のリストを容易に作成できるようになった。その際、炭素種を炭素に結合する水素の数によって区別することができる。さらに同じ画面で Structure

データベース、構造解析、GUI

○こしのひろゆき、あさくらかつお、くりもとともみつ、こいちしゅんご、さとうひろこ

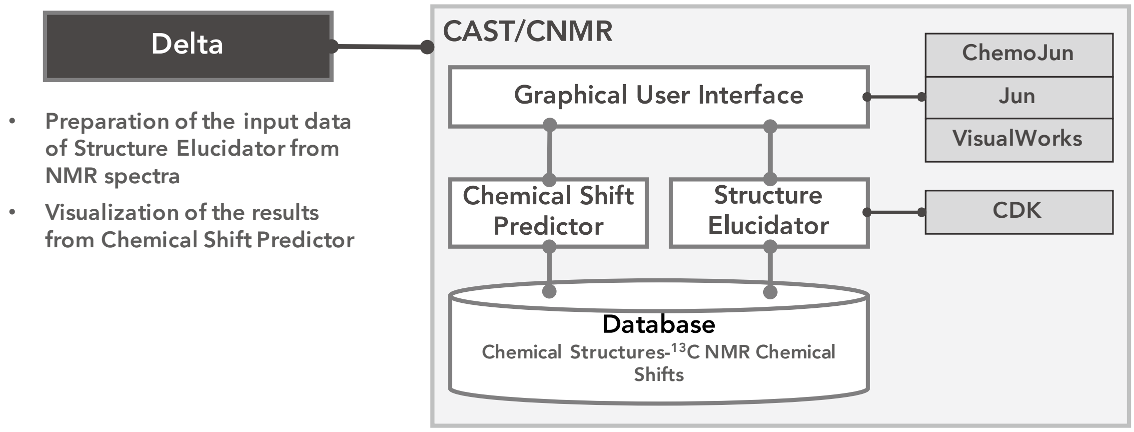


図 1. CAST/CNMR システム(右)と Delta NMR ソフトウェア(左)との連携の概念図

Elucidatorの実行条件の設定と実行が可能になった。出力結果はCAST/CNMRシステムのGUIで表示できるが、DeltaからはCAST/CNMRシステムのアイコンをクリックするだけで起動できる。また化学構造をクエリーとして化学シフト値を予測するChemical Shift Predictorの出力結果をスペクトルとし表示し、実測データとの比較が容易になった。さらにシフト値の予測に利用された個々のデータのシフト値をスペクトルと同様に視覚的に表示できるようになり、予測に利用されたデータの分布を容易に確認することが可能である。帰属や構造に間違いがある場合における構造訂正研究[9-13]では、予測値と大きく異なるデータが存在するため、利用されたデータの分布を解析する上で便利な機能になっている。

今回CAST/CNMRシステムの最初の公開には天然有機化合物などの文献値を中心に約4千件のデータを含むデータベースを提供予定であるが、データベースの更新は随時行う予定である。また公開は日本電子株式会社のホームページからユーザー登録後にダウンロードできる形式を予定している。

参考文献

1. H. Satoh, H. Koshino, J. Uzawa, and T. Nakata, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 4539-4547.
2. H. Satoh, H. Koshino, T. Uno, S. Koichi, S. Iwata, and T. Nakata, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 7431-7437.
3. S. Koichi, M. Arisaka, H. Koshino, A. Aoki, S. Iwata, T, Uno, and H. Satoh, *J. Chem. Inf. Model.,* **2014**, *54*, 1027-1035.
4. H. Satoh, H. Koshino, K. Funatsu, and T. Nakata, *J. Chem. Inf. Comput. Sci*., **2000**, *40*, 622-630.
5. H. Satoh, H. Koshino, K. Funatsu, and T. Nakata, *J. Chem. Inf. Comput. Sci*., **2001**, *41*, 1106-1112.
6. H. Satoh, H. Koshino, and T. Nakata, *J. Comput. Aided Chem.*, **2002**, *3*, 48-55.
7. S. Koichi, S. Iwata, T. Uno, H. Koshino, and H. Satoh, *J. Chem. Inf. Model.,* **2007**, *47*, 1734-1746.
8. S. Koichi, H. Koshino, and H. Satoh, *J. Comput. Chem. Jpn*., **2015**, *14*, 193-195.
9. H. Koshino, H. Satoh, T. Yamada, and Y. Esumi, *Tetrahedron Lett*., **2006**, *47*, 4623-4626.
10. S. Takahashi, H. Satoh, Y. Hongo, and H. Koshino, *J. Org. Chem*., **2007**, *72*, 4578-4581.
11. Y. Q. Ye, H. Koshino, J. Onose, C. Negishi, K. Yoshikawa, N. Abe, and S. Takahashi, *J. Org. Chem*., **2009**, *74*, 4642-4645.
12. S. Takahashi, M. Yasuda, T. Nakamura, K. Hatano, K. Matsuoka, and H. Koshino, *J. Org. Chem*., **2014**, *79*, 9373-9380.
13. S. Takahashi, D. Satoh, M. Hayashi, K. Takahashi, K. Yamaguchi, T. Nakamura, and H. Koshino, *J. Org. Chem*., **2016**, *81,* 11222-11234.

P41

生きた真核細胞中での蛋白質立体構造決定

○池谷鉄兵[1]，田中孝[1]，鴨志田一[1]，三島正規[1]，白川昌宏[2]，Peter Güntert[1, 3, 4]，伊藤隆[1]
1 首都大学東京 大学院理学研究科
2 京都大学 大学院工学研究科
3 Goethe University Frankfurt, Institute of Biophysical Chemistry and Center for Biomolecular Magnetic Resonance
4 ETH Zürich, Laboratory of Physical Chemistry

High resolution protein 3D structure determination in living eukaryotic cells

○Teppei Ikeya [1], Takashi Tanaka[1], Hajime Kamoshida[1], Masaki Mishima[1], Masahiro Shirakawa[2], Peter Güntert[1,3,4], Yutaka Ito[1]
1 Graduate school of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University
2 Graduate School of Engineering, Kyoto University
3 Goethe University Frankfurt, Institute of Biophysical Chemistry and Center for Biomolecular Magnetic Resonance
4 ETH Zürich, Laboratory of Physical Chemistry

To understand the behavior of proteins under intracellular crowding conditions, it is indispensable to observe their three-dimensional (3D) structures at atomic level in a physiologically natural environment. Here we show the first *de novo* protein structure determinations in eukaryotes with the sf9 cell/baculovirus system that are based exclusively on NMR data from living cells. The method was applied to five proteins. In all cases, we could obtain structural information from well-resolved in-cell 3D NOESY data, suggesting that our method can be a standard tool for protein structure determinations in living eukaryotic cells. For three proteins, we achieved well-converged 3D structures. Among these, the in-cell structure of GB1 was most accurately determined, demonstrating that a helix-loop region is tilted in a direction away from a β-sheet compared to the conformation in diluted solution.

The interior of eukaryotic cells is different from that of prokaryote, which is comparted by a nucleus and other organelles as well as the meshwork of the cytoskeleton. Although in-cell NMR studies in eukaryotic cells have become possible by either expressing target proteins inside cells or by introducing stable isotope-enriched proteins from outside, high-resolution protein structures have been determined only in *E. coli* cells. Recently, structural information of proteins in cells were obtained by exploiting paramagnetic NMR effects induced by intracellularly stable lanthanoid-binding tags and NMR chemical shifts, which were utilized in the protein structure prediction software Rosetta. However, the structures predicted by the approach did not yield sufficiently detailed side-chain conformations, which are expected to be predominantly affected by the intracellular environment.

In-cell NMR、Sf9、protein structure determination

○いけやてっぺい，たなかたかし，かもしだはじめ，みしままさき，しらかわまさひろ，ぎゅんたーとぺーたー，いとうゆたか

In order to elucidate the subtle difference between *in vitro* and in-cell structures, it remains necessary to achieve the *de novo* 3D protein structure determination from a sufficient number of NOE-derived distance restraints between side-chains. Here we show the first *de novo* protein structure determinations with high accuracy and precision in living eukaryotic cells provided by the sf9 cell/baculovirus system, exclusively based on information from NMR spectra.

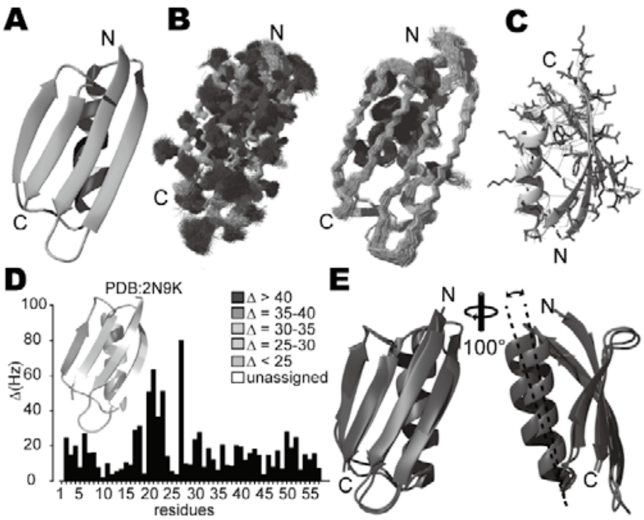


Figure 1. (**A**) The structure of GB1 in living sf9 cells with the highest posterior. (**B**) Backbone heavy atoms of the structure ensemble of GB1 in sf9 cells superimposed onto the 20 structures in diluted solution. Side-chain (left) and aromatic residues (right) are highlighted. (**C**) Distance restraints shown with side-chains. (**D**) Chemical shift differences for GB1 in sf9 cells and diluted solution. (**E**) Superposition of the structures in diluted solution (lowest energy) and the sf9 (highest posterior).

As model systems, three small- and two medium-sized proteins were selected; Streptococcus protein G B1 domain (57 a.a., 7 kDa; GB1), the *T. thermophilus* HB8 TTHA1718 (66 a.a., 7 kDa), human ubiquitin with three alanine mutations, L8A, I44A and V70A, (74a.a., 8 kDa; Ub3A), rat calmodulin (148 a.a., 17 kDa; CaM), and C-terminally truncated human HRas (residues 1–171, 19kDa; HRas). For GB1 in sf9 cells, we could obtain high quality 3D triple-resonance NMR spectra even for side-chain resonance assignments. As a result, we could assign approximately 98% of the backbone $^{1}H^{N}$, ^{15}N, $^{13}C^{\alpha}$ and $^{13}C'$ resonances, as well as for 76% of H^{α}, 42% of H^{β}, and 75% of $^{13}C^{\beta}$ resonances of GB1 in sf9 cells unambiguously. Structures were first calculated with the program CYANA. The resulting structures were further refined with the assistance of Bayesian inference using the CYBAY module in CYANA, which performs replica-exchange Monte Carlo for a wide search of the conformation space. 1900 conformers collected from the trajectory of GB1 are well defined (Fig. 1B) with an average backbone RMSD of 0.51 Å to the mean coordinates. The backbone RMSD between the mean structure in sf9 and that in diluted solution is 1.61 Å. RMSDs of the main-chain atoms were small for most residues, except for the residues 22–26 and 28 in the loop and the α-helix, which coincides well with a region exhibiting chemical shift differences between the in-cell and diluted solution samples (Fig. 1D). In sf9 cells, the relative position of the α-helix is tilted significantly in a direction away from the β-sheet (Fig. 1E).

The structure determinations of Ub3A and TTHA1718 were also performed from 3D NOESY spectra in sf9 cells. The resulting structure ensemble of Ub3A with 4400 conformers is well-defined with an average backbone RMSD of 0.39 Å to the mean coordinates. The backbone RMSD between its mean structure and the structure in diluted solution is 1.31 Å. Backbone RMSDs of TTH1718 (residues 1-8,19-66) with 1000 conformers to the mean coordinate and the structure in diluted solution are 0.88 and 1.27 Å, respectively.

For CaM and HRas, we prepared samples with methyl- and aromatic-selective $^{1}H/^{13}C$- labeling in sf9 cells, since these proteins exhibited heavily overlapped NMR spectra when labeled uniformly. In both cases, well resolved 3D ^{13}C-separated NOESY spectra were acquired. Comparison of in-cell NMR spectra of CaM with corresponding spectra in diluted solution suggested that CaM in sf9 cells exists in a conformational state similar to Mg^{2+}-bound CaM. HRas in sf9 cells is suggested to be in the 'inactive' GDP-bound state, which is reasonable considering that the C-terminal truncation disables the GDP to GTP exchange at the cell membrane, while the bound GTP is hydrolyzed by its intrinsic GTPase activity during the sample preparation.

P42 免疫応答に関与するHOIL-1Lによる直鎖型ダイユビキチンの認識機構

○石井公貴[1]，ヴァリンダエリック[2]，岩川直都[1]， 森本大智[1]，菅瀬謙治[1]，
白川昌宏[1]
1京都大学大学院 工学研究科
2京都大学大学院 医学研究科

Recognition mechanism of linear di-ubiquitin by HOIL-1L in immune responses

○Naoki Ishii[1], Erik Walinda[2], Naoto Iwakawa[1], Daichi Morimoto[1], Kenji Sugase[1],
and Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University.*
[2]*Graduate School of Medicine, Kyoto University.*

Nuclear factor-κB (NF-κB) activation is crucial for immunity and inflammation. In the activation pathway, linear polyubiquitin chains conjugated by the linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) are specifically recognized by Npl4 zinc finger (NZF) domain of HOIL-1L and the specific recognition is critical for the NF-κB activation. Recently, the crystal structure of the NZF domain/linear di-ubiquitin (M1-Ub_2) complex has been reported; however, to understand the recognition mechanism in detail, it is necessary to obtain structural properties of the NZF domain in solution. In this study, we determined the solution structure of the free NZF domain by using NOE and RDC restrains. Also, our NMR titration experiments showed that the NZF domain recognizes M1-Ub_2 in a site-specific manner.

【緒言】

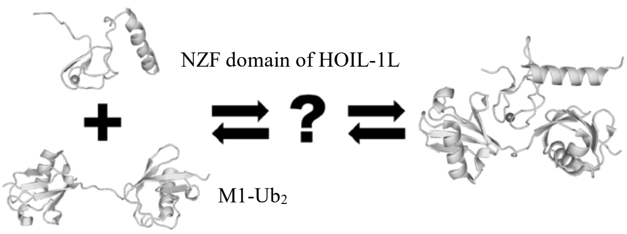


Fig.1 Specific recognition mechanism between the NZF domain and M1-Ub_2.

NF-κBは免疫応答やアポトーシスなどの多様な生命現象に関与している転写因子である。しかし、その活性の異常が生じると、自己免疫疾患や癌をはじめとする様々な疾患が起こることが知られている。NF-κBはその活性化経路において複数の過程を経て活性化されるが、その１つにE3酵素(LUBAC)のサブユニットであるHOIL-1LのNZFドメインによる直鎖型ユビキチン鎖の特異的な認識があげられる。これまでにX線結晶構造解析によってNZFドメインによる直鎖型ダイユビキチン(以後、M1-Ub_2と略す)による複合体の結晶構造が報告され、またその特異的な認識がNF-κBの活性化に重要であることが示唆された(Sato et al, 2011)。しかし、その分子認識の詳細な過程は明らかになっていない。そこで本研究では溶液中でNZFドメインによるM1-Ub_2の認識機構を原子レベルで解明することを目指す(Fig.1)。溶液NMR法を用いて遊離型NZFドメインのNMRシグナルの帰属を行い、核オーバーハウザー効果(NOE)ならびに残余双極子相互作用カップリング(RDC)データにより溶液構造を決定した。また、NMR滴定実験から、溶液中でのNZFドメインとM1-Ub_2との相互作用を確認し、各アミノ酸残基で結合様式が異なることが示唆された。

NF-κB、HOIL-1L、直鎖型ユビキチン鎖

○いしいなおき、ゔぁりんだえりっく、いわかわなおと、もりもとだいち、すがせけんじ、しらかわまさひろ

【結果・考察】

遊離型 NZF ドメインの溶液構造決定を行った。はじめに、連鎖帰属法により遊離型 NZF ドメインの NMR シグナルを帰属したところ、主鎖、側鎖についてそれぞれ 100%、約 98%の帰属に成功した(Fig.2)。この帰属結果から遊離型 NZF ドメインの二次構造を予測したところ、すでに報告されている結合型 NZF のものと類似していることが示唆された。また、$^{15}N\{^1H\}$ hNOE 測定により、遊離型 NZF ドメインのαヘリックス領域はナノ秒のタイムスケールで揺らいでいることが示唆された。得られた帰属結果と NOE 及び RDC から得られた距離・角度制限情報を元に、CYANA を用いて、遊離型 NZF ドメインの構造決定を行った (Fig.3)。

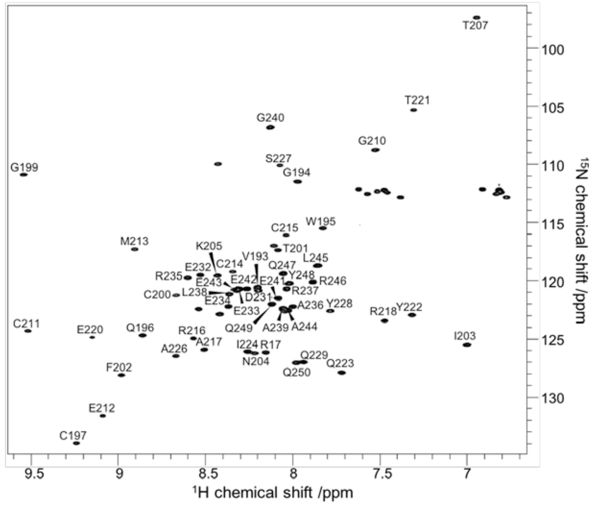


Fig.2. ^1H-^{15}N HSQC spectrum of free NZF domain.

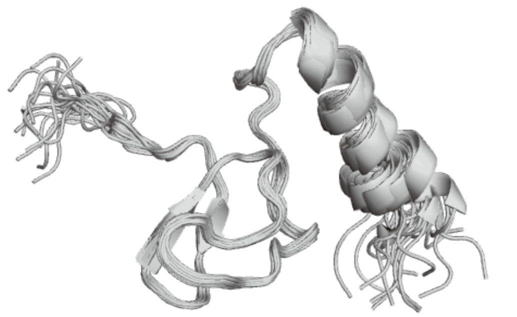


Fig.3 Solution structure of free NZF domain.

次に、溶液中での NZF ドメインと M1-Ub$_2$ との相互作用を確認するため、M1-Ub$_2$ を NZF ドメインに滴下し、^1H-^{15}N HSQC 測定を行った(Fig.4)。その結果、ほとんどのクロスピークで変化が確認され、そのシグナル変化には Fast exchange と Slow exchange を示すものが見られた。興味深いことに、結晶構造で報告された M1-Ub$_2$ と相互作用する Zn^{2+}結合部位(NZF-core)だけではなく、結合にあまり関与しないとみられるαヘリックス領域にも Slow exchange とみられるシグナル変化が確認された。このことからαヘリックス領域は M1-Ub$_2$ 認識に伴って構造変化を起こすことが示唆される。

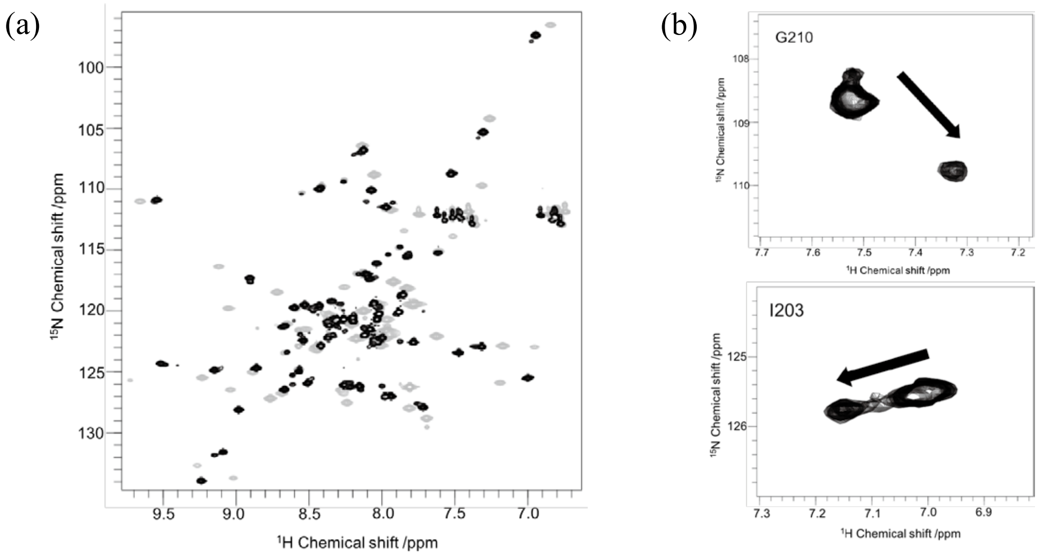


Fig.4 (a)^1H-^{15}N HSQC spectra of the NZF domain in the absence (black) and presence of 4 e.q. of M1-Ub$_2$ (gray). (b)Enlarged views of the peaks showing slow exchanges (G210) and fast exchanges (I203) in the ^1H-^{15}N HSQC spectra.

Reference

Sato, Y. *et al.* Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex. PNAS. (2011)

P43

免疫抑制剤結合タンパク質FKBP12の薬剤認識における動的構造解析

○平河卓也[1]，岩川直都[1]，森本大智[1]，菅瀬謙治[1]，白川昌宏[1]
[1]京都大学大学院・工学研究科

Structural dynamic analysis of FKBP12 in the recognition of immunosuppressive drug

○Takuya Hirakawa[1], Naoto Iwakawa[1], Daichi Morimoto[1], Kenji Sugase[1], and Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University*

In the drug recognition, proteins are in the equilibrium between the free and bound states. Relaxation dispersion NMR spectroscopy is the method of choice to detect and quantify such conformational exchange dynamics on a timescale from microseconds to milliseconds in which proteins bind to drugs. To date, the drug recognition has been well-studied in the dilute conditions. By contrast, the intracellular environment where drugs are expected to function is highly crowded with macromolecules and the crowded environment can affect physical and chemical properties of the drug binding. In this study, we quantitatively analyzed the effects of crowded environment on the interaction between the immunosuppressant pimecrolimus and its target protein FKBP12 by using relaxation dispersion NMR. Our results showed that the exchange rates and population ratios in the drug recognition are not affected by the crowded environment.

【緒言】

タンパク質と薬剤の結合は一般的に可逆的であり、タンパク質は薬剤結合型と遊離型の平衡状態となる。NMR緩和分散法を用いると、このような二分子間の相互作用に伴う構造変化を定量的に解析できる。本研究で用いた緩和分散法の一つであるR_2 relaxation dispersion法は、リガンド結合による構造変化の速度領域であるマイクロ秒―ミリ秒オーダーの構造変化を検出する測定法であり、存在比がわずか１％の状態でも構造情報を得ることができる。

このようなタンパク質の動的構造解析の研究の多くは希薄条件下である試験管内で行われている。しかし、実際にタンパク質が存在する生細胞内は数百g/Lもの生体高分子が存在しており、試験管内と比べ非常に混雑している。このような混雑環境が細胞内の物理化学現象へ影響を与えるのではないかと指摘されているが、定量的な知見は乏しい。本研究では、タンパク質クラウダーを用いることで細胞内混雑環境を模倣し、混雑環境が免疫抑制剤であるピメクロリムスとその標的タンパク質であるFKBP12の相互作用に与える影響を定量的に解析した。

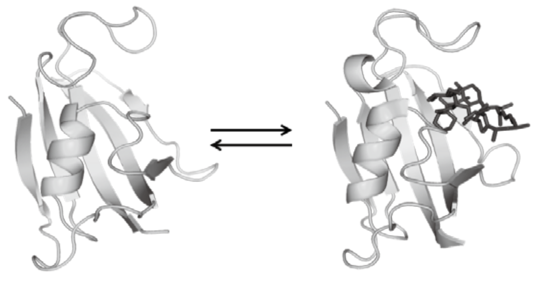


Fig. 1. Schematic diagram of the equilibrium between free and bound states of FKBP12.

FKBP12, drug-protein binding, relaxation dispersion NMR spectroscopy

○ひらかわたくや、いわかわなおと、もりもとだいち、すがせけんじ、しらかわまさひろ

【結果・考察】

まず、^{15}N標識したFKBP12にピメクロリムスを滴下し、^{1}H-^{15}N HSQCの測定を行なった。ピメクロリムスを加えることにより、多くの残基において、Slow-exchange regimeで新たなピークが出現することが分かった (Fig. 2)。さらに、これらのピメクロリムス結合型由来のピークを連鎖帰属法によりピーク帰属を行なった。

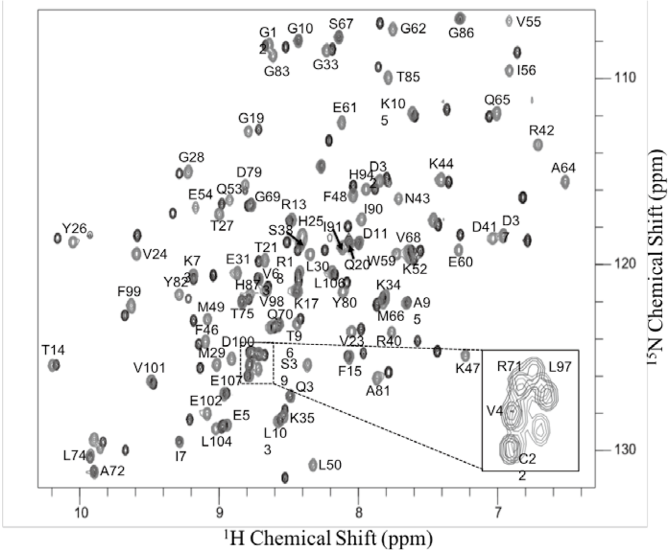


Fig. 2. ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of FKBP12 in the free (black) and the pimecrolimus-bound (grey) states at pH 8.0 and 298K

次に、R_2 relaxation dispersionの測定を行い、二状態平衡モデルのCarver and Richards equationに従いフィッティングを行なった (Fig. 3a)。ピメクロリムスを加えることで緩和分散を示す残基が見られ、これはFKBP12がピメクロリムスと結合することにより結合型と遊離型の平衡状態にあることを示す。また、解析により結合型と遊離型の交換速度k_{ex}は324±14 s^{-1}、遊離型の存在比p_{free}は2.40±0.04%であった。

さらに、混雑環境による薬剤とタンパク質との結合における影響を解析するため、ピメクロリムスを1当量加えたFKBP12にタンパク質クラウダーとしてウシ血清アルブミン(BSA)を200 g/Lの濃度で加えた条件においてもR_2 relaxation dispersionの測定およびフィッティングを行なった (Fig. 3b)。解析により、k_{ex}は346±31 s^{-1}、p_{free}は2.42±0.08%であった。これらの値はBSAを加えていない条件における値とほとんど変わらないことから、BSAをクラウダーとして用いた場合、混雑環境による結合型と遊離型の平衡状態への影響はほとんどないことが示唆された。

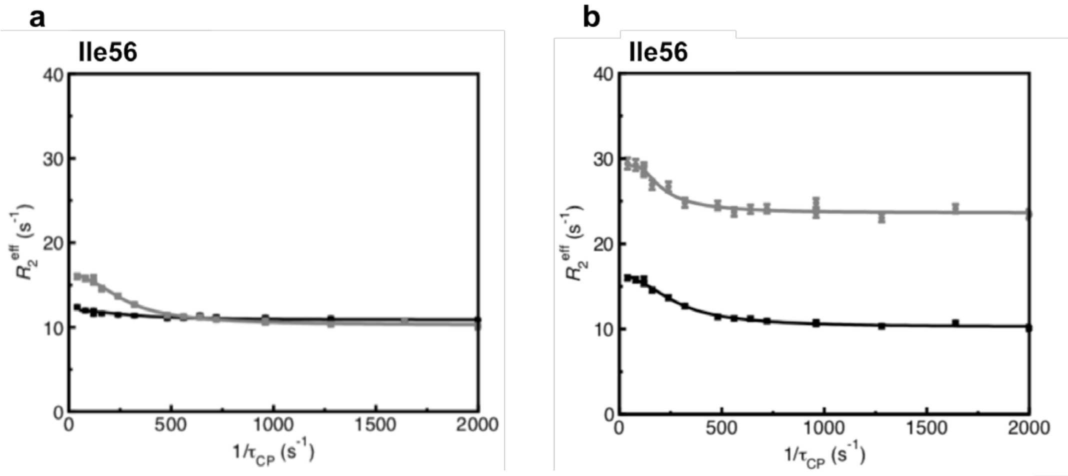


Fig. 3. ^{15}N R_2 relaxation dispersion profiles for Ile56 (a) without (black) and with (grey) pimecrolimus (b) without (black) and with (grey) BSA at pH 8.0 and 298K.

P44 アルキル側鎖を有する液晶ポリエステルのアルカンガスの透過性の NMR 法による評価

○庄司大槻・吉水広明
名古屋工業大学・大学院工学研究科

A liquid crystalline polyester having alkyl side chains Evaluation of permeability of alkane gas by NMR method

○Daiki Shoji, Hiroaki Yoshimizu
[1] Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

Since membrane separation is energy-saving and easy to operate, it is attracting attention as one of gas separation. I focused on the liquid crystalline polymer B - Cn as a material for the separation membrane. It is known that B - Cn has a layered structure, and this layer interval can be controlled by changing the length of the side chain. Also, from previous studies, it is known that B - Cn sorbs and diffuses gas only in the side chain region which can be regarded as rubber state. Therefore, in this study, Sorption measurement was performed on various alkane gases using B - C14, and the difference in permeability depending on molecular size was evaluated. Then, the difference in permeability could be confirmed by the molecular size.

＜緒言＞

気体分離の手法として膜分離は省エネルギーかつ操作の簡便さなどの観点から分離技術の一つとして注目されている。高機能な分離膜は分離性・透過性が高い必要がある。しかし、この二つの性質はトレードオフの関係にある。従来の分離膜には無定形高分子が用いられており、これらの性質が低いという問題があった。そこで私は、秩序構造を有する液晶性高分子 B-Cn に着目した。B-Cn は層構造を形成し、その層間隔を側鎖の長さによって制御することが可能であり、また気体分子は、ゴム状態とみなせる側鎖領域でのみ収着・拡散する性質や高い磁気異方性から磁場配向が可能であるという性質がある。これらの性質を用いて、B-Cn の層間隔を制御し、磁場配向させることで気体分子の透過性を維持したまま、分離性を向上させることが可能であると考えられる。そこで今回はまず、配向試料と無配向試料にアルカンガスを用いて重量法を行い、拡散係数を算出した。

液晶性高分子、アルカンガス、PFG NMR 測定

○しょうじだいき・よしみずひろあき

＜実験＞

試料調製

B-C14 を磁場中と磁場外で液晶転移温度である 150℃付近まで昇温し、常温まで冷却することで試料を調製した。

これらの試料に対して、メタンガス、ブタンガス、キセノンガスを用いて重量法(Fig. 1)を行い、平均自己拡散係数を算出した。

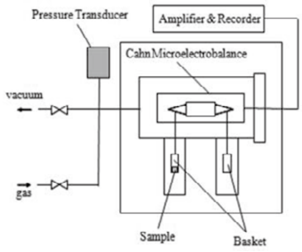


Fig.1 Schematic illustration of apparatus for sorption measurement.

＜結果及び考察＞

表 1～表 3 はそれぞれ、ランダム配向試料と配向試料 R（Fig.2 の層構造が膜面に対して垂直に並んでおり a 方向への気体分子の拡散がないもの）に対する、メタンガス、ブタンガス、キセノンガスの平均拡散係数と溶解度係数をまとめたものである。まず、気体分子の大きさはブタン＞キセノン＞メタンの順であり、平均拡散係数はランダム配向試料、配向試料ともに分子の大きさを反映した結果となった。次に分子鎖の配向の影響を見ていくと、溶解度係数においては有意な差は見られなかった。このことから配向前後で構造に大きな変化は起きていないことがわかる。

一方、平均拡散係数は配向によってより大きな値を示した。これは、ランダム配向試料では気体分子が拡散する側鎖領域が様々な方向を向いているのに対し配向試料では一定方向にそろうため拡散経路が短くなった他ためであると考えられる。以上のことから、高分子鎖の配向による気体分子の拡散への影響が示された。

しかし、重量法により算出された平均拡散係数には膜に対して垂直な方向からの気体分子の拡散だけでなく、少なからず膜の側面からの気体分子の拡散も起こってしまうため正確な値ではない。そこで今後 PFG NMR 測定による気体分子の拡散係数の評価を行いたいと考えている。PFG NMR 測定では磁場方向のみの気体の動きを観測することが可能であり、より正確な拡散係数を算出することができると考えられる。また、他のアルカンガスを用いて拡散性の違いを確認していく。

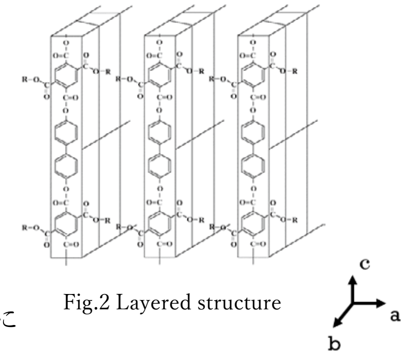


Fig.2 Layered structure

Table 1　Diffusion and solubility coefficients of CH_4 in not oriented and oriented samples at 25 ℃ and 76 cmHg

sample	D × 10^8 (cm²/sec.)	S × 10^3 (cm³STP/cm³$_{polym.}$cmHg)
random	3.00	0.895
R	4.06	0.719

Table 2　Diffusion and solubility coefficients of Xe in not oriented and oriented samples at 25 ℃ and 76 cmHg

sample	D × 10^8 (cm²/sec.)	S × 10^3 (cm³STP/cm³$_{polym.}$cmHg)
random	0.586	12.0
R	2.13	10.4

Table 3　Diffusion and solubility coefficients of iso-C_4H_{10} in not oriented and oriented samples at 25 ℃ and 76 cmHg

sample	D × 10^8 (cm²/sec.)	S × 10^3 (cm³STP/cm³$_{polym.}$cmHg)
random	0.15	102
R	0.92	98.7

P45

ヒト糞便試料の保存条件がメタボロームに与える影響の検討

○包　克非[1]，北田　直也[1]，稲村　優雅[1]，山野　めぐみ[1]，久米田　博之[2,3]，熊木　康裕[2]，大西　裕季[2]，塚本　卓[1,2,3]，菊川　峰志[1,2,3]，　出村　誠[1,2,3]，中村　公則[2]，綾部　時芳[2]，山村　凌大[4]，中村　幸志[5]，玉腰　暁子[5]，　相沢　智康[1,2,3]

1 北海道大学・大学院生命科学院，2 北海道大学・大学院先端生命科学研究院，3 北海道大学・国際連携研究教育局，4 北海道大学・大学院医学院，5 北海道大学・大学院医学研究院

Studies on sample storage conditions for human fecal metabolomics

○ Kefei Bao[1], Naoya Kitada[1], Yuga Inamura[1], Megumi Yamano[1], Kumeta Hiroyuki[2,3] Yasuhiro Kumaki[3], Yuki Ohnishi[3], Takashi Tsukamoto[1,2,3], Takashi Kikukawa[1,2,3], Makoto Demura[1,2,3], Kiminori Nakamura[2], Tokiyoshi Ayabe[2], Ryota Yamamura[4], Koshi Nakamura[5], Akiko Tamakoshi[5], Tomoyasu Aizawa[1,2,3].

1 Graduate School of Life Science, Hokkaido University.

2 Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University.

3 Soft-Mater Global Station, GI-CoRE, Hokkaido University.

4 Graduate school of Medicine, Hokkaido University.

5 Faculty of Medicine, Hokkaido University.

Global metabolic profiling, known by the terms metabolomics, is being employed to determine metabolic phenotype and provide novel bio-markers. Fecal metabolomics studies are gaining increased attention on to unravel the host-gut microbial metabolic interactions. ^{1}H NMR spectroscopy has been one of the major tools for metabolites analysis. Our studies have investigated the influence of the various sample storage conditions on the finally obtained metabolic profile. We evaluated metabolic stability of fecal samples by ^{1}H NMR spectroscopy and principal component analysis.

【背景】　近年、ヒト糞便代謝産物群（メタボローム）を対象とした疾病バイオマーカーの探索や宿主-微生物相互作用に関する研究に注目が集まり、多くの研究が進められている [1]。ヒト糞便試料には、宿主であるヒト、共生微生物、さらには食物残留物に由来する多数の化合物が含まれるが、代謝産物の変動の原因となる酵素等も含まれるため、安定してメタボロームの測定可能な試料処理のプロトコールの確立は、信頼性の高い分析結果を得るための重要な課題である。しかしながら、医療機関等以外で採集したヒト糞便試料の取り扱いに必要な、保存状態によるメタボロームの安定性に関する検討は必ずしも十分とは言えない。そこで本研究では、^{1}H NMR メタボロミクスにより、試料保存条件がメタボロームの変化に与える影響の基礎的な検討を行った。

NMR、メタボローム、ヒト糞便

○ばおかあふぇい、きただなおや、いなむらゆうが、やまのめぐみ、くめたひろゆき、くまきやすひろ、おおにしゆうき、つかもとたかし、きくかわたかし、でむらまこと、なかむらきみのり、あやべときよし、やまむらりょうた、なかむらこうし、たまこしあきこ、あいざわともやす

【方法】 健常ボランティアから提供を受けた新鮮糞便を迅速に分注し、温度（室温、冷蔵、冷凍）、時間、再凍結の有無等が異なる計 8 条件での保存を経た後、試料重量の 10 倍量の 50 mM PBS (pH 7.4), 0.5 mM TSP, 1 mM formate, 0.004% NaN_3, 10% D_2O を加えて攪拌、抽出を行い、遠心後の上清を回収し ^1H NMR 測定を行った。測定には Bruker Avance III HD, 600 MHz を用い、noesypr1D パルスを使用した。また、得られた NMR スペクトルに対してソフトウェア Chenomx 7.5 を用いてスペクトルのバケット積分及び代謝物の同定と定量を行い、SIMCA 14 を用いて主成分分析(PCA)を行った。

【結果】 バケット積分値を用いた PCAのスコアプロットから、保存条件による化合物の変化の程度は個人によって大きく異なること、また、保存条件によっては個人間の特徴よりも大きな影響が生じる場合があることが明らかになった(Fig. 1)。また、PCA分離に寄与したバケット積分値をローディングプロットにより確認したところ、第一主成分には酢酸、第二主成分ではプロピオン酸、酪酸の寄与が大きいことが明らかになった。これらの代謝産物では、特に室温で保存することによる濃度の増加が著しかったことから、糞便含有微生物による代謝の影響が考えられる。

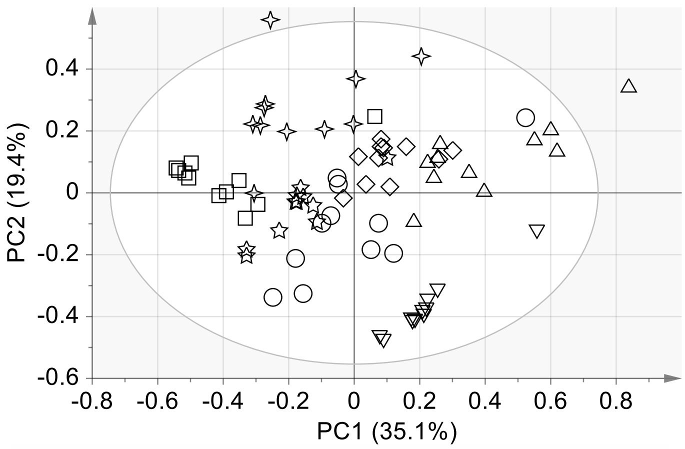


Figure 1 PCA score plots of samples on 8 storage conditions. Shapes are set to represent data acquired from samples of 7 individuals.

これに対して、溶媒に抽出後の状態で冷蔵保存した試料では、いずれの試料においても、保存時間（5h, 24h, 72h）の経過による代謝物濃度の変動と比較して、試料間の個人間の差が十分に大きかった（Fig. 2）。

これらの結果から、試料採取後に溶媒抽出を迅速に行うことが、試料中のメタボロームの変化の抑制に効果的であることが確認された。

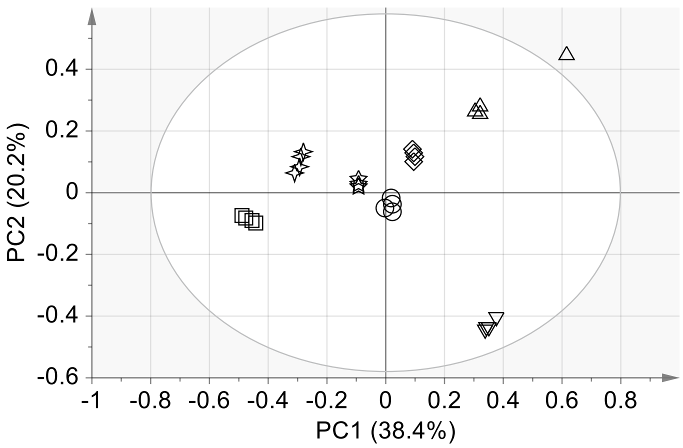


Figure 2 PCA score plots of samples stored after extraction. Data from 7 individuals were acquired from samples stored at 4 ℃ at a series of time.

【参考文献】 [1] Smirnov, Kirill S., et al. "Challenges of metabolomics in human gut microbiota research." International Journal of Medical Microbiology 306.5 (2016): 266-279.

P46

NMR メタボロームを用いた昆虫食に関する研究

○池田華子[1], 稲村勇雅[1], 久米田博之[2,3], 熊木康裕[2], 大西裕季[2], 塚本卓[1,2,3], 菊川峰志[1,2,3], 出村誠[1,2,3], 岡松滋美[4], 仲宗根豊一[4], 伊東昌章[5], 相沢智康[1,2,3]
1 北海道大学大学院生命科学院
2 北海道大学大学院先端生命科学研究院
3 北海道大学 GI-CoRE ソフトマターGS
4 沖縄 UKAMI 養蚕
5 沖縄工業高等専門学校

Research on entomophagy by NMR metabolomics

○Hanako Ikeda[1], Yuga Inamura[1],, Hiroyuki Kumeta[2,3], Yasuhiro Kumaki[2], Yuki Onishi[2], Takashi Tsukamoto[1,2,3], Takashi Kikukawa[1,2,3], Makoto Demura[1,2,3], Shegemi Okamatsu[4], Toyokazu Nakasone[4], Masaaki Ito[5], Tomoyasu Aizawa[1,2,3]
[1]*Graduate School of Life Science, Hokkaido University*
[2]*Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University*
[3]*Soft Matter Global Station, GI-CoRE, Hokkaido University*
[4]*OKINAWA UKAMI Co., Ltd.*
[5]*National Institute of Technology, Okinawa college*

Global population is steadily increasing and is estimated to reach 9 billion by 2050. Along with that, serious food shortage is concerned, and edible insect is in a trend as a new protein sourse. However, research on improving their taste, which emphasizes the use as a food material, has not progressed yet. In this study, in order to study the taste of silkworm (*Samia cynthia ricini*), the NMR measurement was performed on samples grilled in an oven and the difference of components depending on the growth days was examined.

【背景・目的】

世界人口は増加の一途を辿っており、2050 年には 90 億人に達すると予想され、それに伴い深刻な食糧不足が懸念され、新たなタンパク源として昆虫食が大きな注目を集めている[1]。しかし、食材としての利用を重視した、食味の向上についての研究はまだ進んでいないのが現状である。本研究ではエリ蚕 *Samia cynthia ricini* の食味に関して研究を目的として、加熱調理したサンプルに関して NMR 測定を行い、発育経過日数による成分の差について検討した。

メタボローム、昆虫、食品

○いけだはなこ、いなむらゆうが、くめたひろゆき、くまきやすひろ、おおにしゆうき、つかもとたけし、きくかわたかし、でむらまこと、おかまつしげみ、なかそねとよかず、いとうまさあき

【方法】

蛹化前、蛹化後 1 日目から 3 日目の発育経過日数の異なる 4 種のエリ蚕を 200℃の乾熱オーブンで 20 分加熱した後粉砕し、標準物質としてトリメチルシリルプロパン酸-d4(TSP)を含むリン酸緩衝液で抽出・遠心した後の上清に対して NMR 測定を行った。それぞれの ^1H NMR スペクトルはプレサチュレーションを用いた 1D NOESY で測定し、積算回数は 128 回、ミキシングタイムは 100ms とした。代謝物の同定と定量は Chenomx 社製のソフトウェアである Chenomx NMR suite を用いて行った。

【結果】

^1H NMR スペクトルから 46 種の代謝物の同定と定量を行うことができた(Fig.1)。その結果、発育経過日数によってアミノ酸をはじめとする諸成分の含有量に大きな差が出ることが明らかになった。蛹化後 3 日目と 2 日目ではマレイン酸、コハク酸といった有機酸やホスホリルコリンを、蛹化後 1 日目は分岐鎖アミノ酸、トレハロースを、蛹化前はその他のアミノ酸などを複数種、それぞれ豊富に含むことが確認できた。今後は試料を増やして多変量解析を行うとともに、調理方法による成分差の検討を行う予定である。

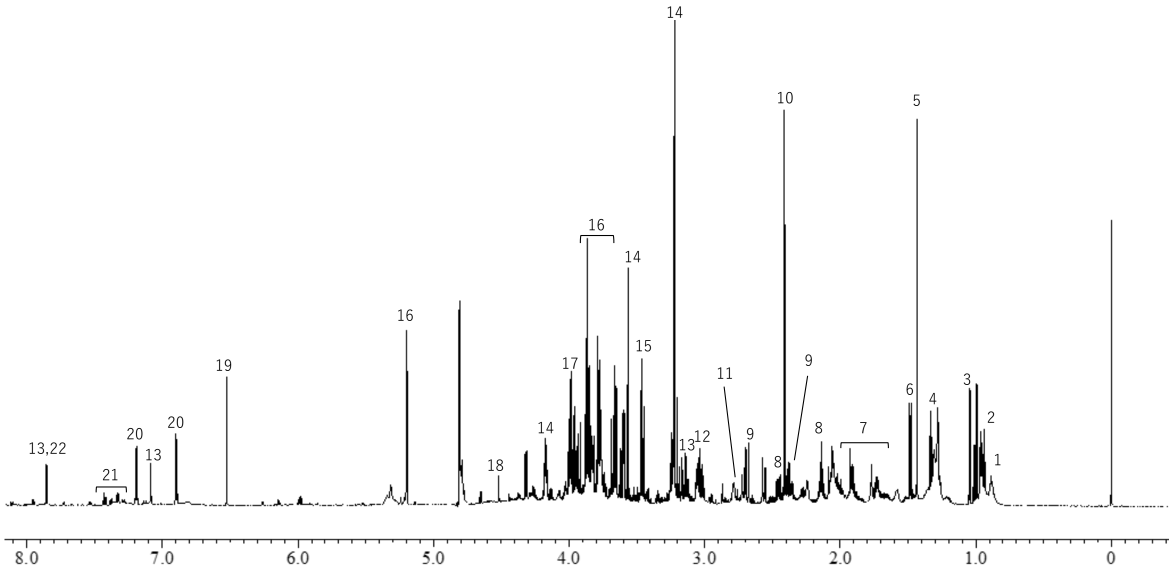


Fig.1 ^1H NMR spectral of silkwarm 1day later after pupated.

1, 2-Isopropylmalic acid; 2, Leucine; 3,Valine; 4, Threonine; 5, Dimethylmalonic acid; 6, Alanine; 7, Arginine; 8, Glutamine; 9, Malate; 10, Succinate; 11, Aspartate; 12, Lysine; 13, Histidine; 14, Phosphorylcholine; 15, Glycine; 16, Trehalose; 17, Serine; 18, Ascorbate; 19, Fumarate; 20, Tyrosine; 21, Phenylalanine; 22, Xanthine

【参考文献】

[1] Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) "Edible insects: future prospects for food and feed security" FAO Forestry Paper vol.171

P47

Deep-MagRO：深層学習を応用した高速かつ高精度な統合的NMR解析システム

○小林直宏[1]、杉木俊彦[1]、永田崇[2]、Peter Güntert[3,4,5], 児嶋長次郎[6]、藤原敏道[1]
1大阪大学蛋白質研究所
2京都大学エネルギー理工学研究所
3 Laboratory of Physical Chemistry, ETH Zürich, 8093 Zürich, Switzerland
4 Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, 192-0397, Japan
5 Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University, 60438 Frankfurt am Main, Germany
6横浜国立大学、大学院理工学府

Deep-MagRO: new integrated system for automated NMR analysis assisted by deep neural networks

○Naohiro Kobayashi[1], Toshihiko Sugiki[1], Takashi Nagata[2], Peter Güntert[3,4,5], Chojiro Kojima[6], Toshimichi Fujiwara[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University*
[2]*Institute of Advanced Energy, Kyoto University*
[3]*Laboratory of Physical Chemistry, ETH Zürich, 8093 Zürich, Switzerland*
[4]*Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, 192-0397, Japan*
[5]*Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University, 60438 Frankfurt am Main, Germany*
[6]*College of Engineering Science, Yokohama National University*

The image recognition technology using deep neural networks [1] has been implemented in the new system called Deep-MagRO to eliminate noise peaks as well as to predict shoulder peak positions; Deep-MagRO may improve automated NMR signal analysis and structure calculation performed by FLYA[2]. Deep-MagRO also has a function to check consistency of NMR signal assignments with modeled structures for given NMR spectrum types, which can assist manual and automated improvements of assigned chemical shifts and NOE peaks. Using residual dipolar couplings (RDCs) derived from sample in weakly aligned media can support the quality assessment of calculated NMR structures. In the presentation we will illustrate feasibility of our approach by demonstrating fully automated structure determination at high accuracy using limited NMR data sets of medium-sized proteins (100~150aa) as examples.

安定同位体ラベルされた小型タンパク質を対象とする溶液NMRによる多核、多次元スペクトルを用いる解析方法は既に完成の域に達している。しかしながら解析者の経験やデータのクオリティなど求められる基準は依然として高く、測定時間の制約あるいはサンプルの事情により限られたスペクトルデータセットで解析を実行する場合、信頼性の高いシグナル帰属や構造解析を行うことは現在でも困難である。我々は小林らによって開発されたKujira[3]の後継プログラムであるMagROに深層学習によるノイズ判定機能を搭載し、自動的少ないデータセットでもサンプルの性質がよければわずか半日程度で

自動解析、深層学習、データ評価

○こばやしなおひろ、すぎきとしひこ、ながたたかし、ぎゅんたーとぺーたー、こじまちょうじろう、ふじわらとしみち

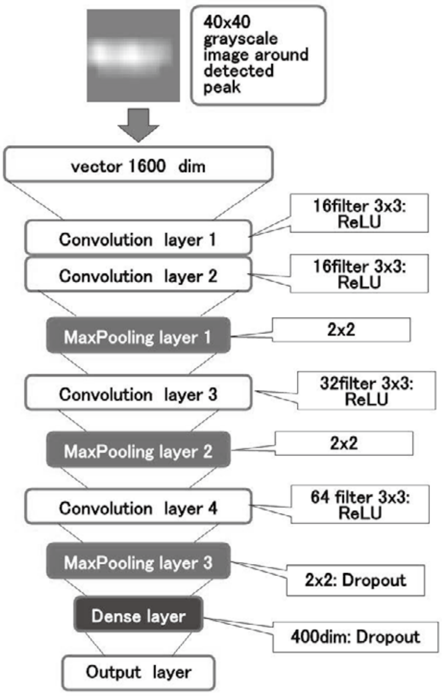


Fig. 1. Network structure of shoulder peak recognition.

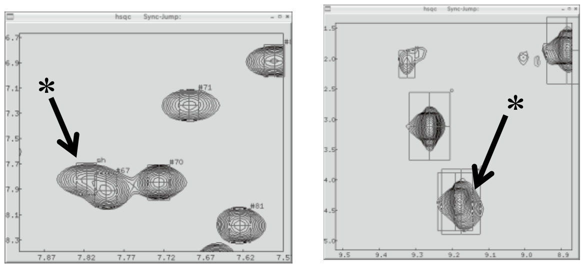


Fig. 2. Predicted shoulder peaks (*) on 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectra.

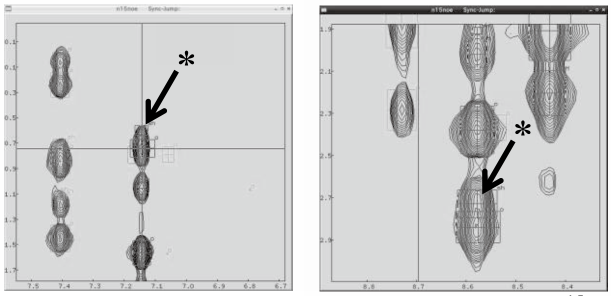


Fig. 3. Predicted shoulder peaks (*) on 3D ^{15}N edited NOESY spectra.

極めて信頼性の高い結果が得られることを示した[1,4]。Fig.1に示すような合成訓練データにより開発された深層学習検出器を用いる事で近接したシグナル個数(2-3個)と相対位置を推定可能になった(Fig.2,3)。NOEシグナルの位置補正、追加可能なシグナルを再検出させる機能を追加し、信号帰属とピークリストのrefinementを強化し、これら新機能を搭載したDeep-MagROによって従来解析が困難であったデータに対しても充分な性能を発揮できるようになった。Fig. 4,5 に新規フォールド人工タンパク質の自動解析による構造とRDCによる再現性 (相関係数)を示す(設計構造との主鎖RMSDはそれぞれ1.2Å、1.3 Åであった)。

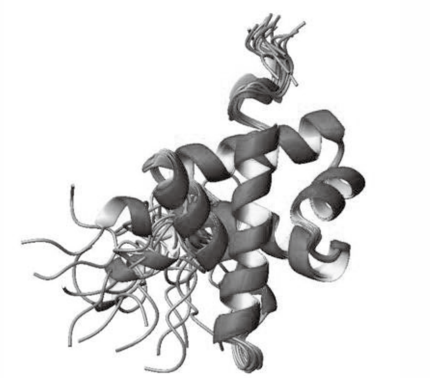


Fig. 4. Final structure of all α-protein (99a.a.) Koga et al., unpublished data. RDC correlation between simulated and experimental data = 0.93

Fig. 5. Final structure of αβ-protein (110a.a.) Koga et al., unpublished data. RDC averaged correlation between simulated and experimental data = 0.90

References

(1) Kobayashi et al., *Bioinformatics* in print (2018).
(2) Schmidt, E. and Güntert, P. (2012) *J. Am. Chem. Soc.* 134, 12817–12829.
(3) Kobayashi N. et al., *J. Biomol. NMR* (2007) 39, 31-52.
(4) Kobayashi N. et al., 第56回NMR討論会 (2017).

P48 calmodulin 融合発現系を用いた抗菌ペプチド大量発現の NMR 解析への応用

○加藤貴純[1]、大沼幸暉[1]、石田博昭[2]、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：Department of Biological Science, University of Calgary
3：北海道大学 GI-CORE ソフトマターGS

Development of the calmodulin-antimicrobial peptides fusion expression system for the NMR

○Takasumi Kato[1], Koki Onuma[1], Hiroaki Ishida[2], Takashi Tsukamoto[1,3], Takashi Kikukawa[1,3], Makoto Demura, Hans J. Vogel[2], Tomoyasu Aizawa[1,3]
1 : Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Hokkaido, Japan
2 : Department of Biological Science, University of Calgary, Canada
3 : Soft-matter GS, GI-CORE, Hokkaido University, Hokkaido, Japan

Cecropin P1 (CP1), a 31-residue antimicrobial peptide isolated from *Ascaris suum,* the nematode parasite of pigs, indicates antimicrobial activity to Gram-positive and negative bacteria. Antimicrobial peptides are regarded as candidate of a new medicine for antibiotic resistant bacteria but the mechanisms of antimicrobial activity are not recovered well.

In this study, we developed more efficient method for mass-production of CP1 to investigate the structure by NMR to understand mechanism of antimicrobial activity of CP1 and antimicrobial peptides.

【序論】

豚の腸に寄生する線虫*Ascaris suum*由来のcecropin P1（CP1）はグラム陰性菌・陽性菌に対して幅広い抗菌活性を持つ抗菌ペプチドであり、31残基でαヘリックス構造、カチオン性の表面を持つ。

CP1を含む抗菌ペプチドは抗生物質に対して耐性を持つ細菌に対する新たな医薬品への応用などが期待されている一方、抗菌作用機序には未解明な点が多く残る。そこで本研究では、代表的な抗菌ペプチドとして研究例が多いCP1を対象として、遺伝子組換え技術を用いた大量生産とNMR法による解析を行うことで、抗菌ペプチドの作用機序の解明を行うことを目的としている。

大腸菌を用いた遺伝子組換え発現によるCP1の大量生産では、発現したCP1が宿主に対して抗菌活性を示すことや大腸菌内在性のプロテアーゼによる分解などの問題によって、最終生産量が減少するということが報告されている[*1]。本研究ではこの問題を解決するために、抗菌ペプチドへの融合発現での多くの成功例が報告される、カルシウム結合タンパク質calmodulin（CaM)を融合パートナーとした融合発現系[*2]のCP1の大量生産への応用の検討を行った。

---

calmodulin、cecropin P1（CP1)、fusion expression

○かとうたかすみ、おおぬまこうき、いしだひろあき、つかもとたかし、きくかわたかし、でむらまこと、ふぉーげるはんす、あいざわともやす

【実験】

CP1のCaM融合タンパク質の大腸菌用発現用ベクターを構築し、大腸菌BL21（DE3）株による大量発現を行った。得られた融合タンパク質をNi^{2+}－NTAカラムクロマトグラフィーにより粗精製し、entero kinase（EK）による融合CaMの切断を行った後、RP-HPLCによりCP1の最終精製を行った。得られたCP1は、MALDI-TOF MSにより質量分析を行った。現在はCP1の安定同位体標識試料を同様の方法で調製し、NMRによる解析を検討している。

【結果・考察】

融合パートナーとして抗菌ペプチドの大量発現報告例の最も多いthioredoxin（Trx）を利用した場合では、発現誘導後に明確な宿主大腸菌の溶菌、生育阻害が確認されたのに対して、CaMを利用した場合は順調な生育が確認された（Fig. 1）。またSDS-PAGEの結果より、CaM融合発現ではTrx融合発現と比較してタンパク質の発現量の顕著な増加が確認された（Fig. 2)。このことからCaMとの融合発現によってCP1の抗菌活性が抑制される可能性が示唆された。幅広い抗菌ペプチドに対する高い親和性が報告されているCaMが融合発現時にCP1と相互作用することによって、宿主細胞膜等の損傷による抗菌活性の発現が阻害されたと考えられる。

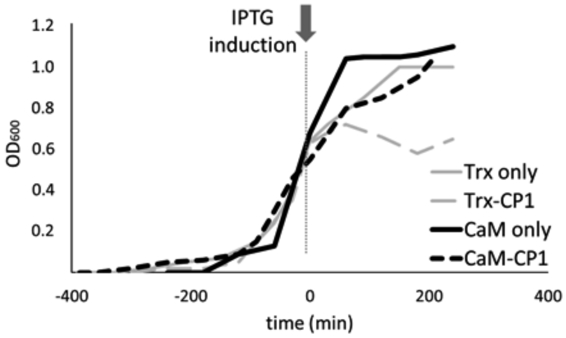
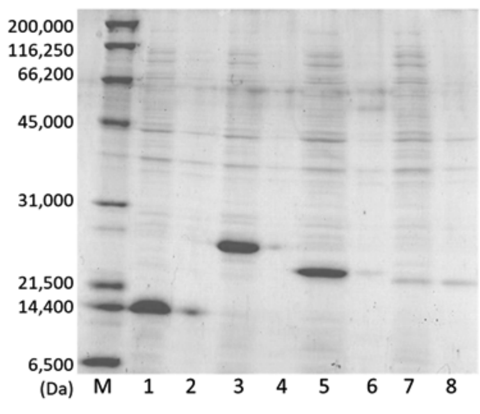


Fig. 1 Effect of the expression on the growth of *E. coli* BL21 (DE3) host cells, CaM, Trx, CaM-CP1 fusion protein and Trx-CP1 fusion protein. Cells were grown in 5 mL of LB medium at 37℃ and induced with 1 mM IPTG at OD600~0.7.

精製後の質量分析を用いた解析により、完全な目的配列のCP1の生産に成功したことを確認し、その収量はLB培地1 Lあたり1.7 mgであった。同様の条件でのTrxを利用した生産では、CP1の最終収量は0.1 mg程度であり、本研究では従来の手法を用いた場合と比較し、大量のCP1を安定に生産することに成功した。

Fig. 2 SDS-PAGE showing the expression after IPTG induction. Lane M shows the molecule mass marker. Lanes 1 and 2 represent the supernatant and pellet of lysate of *E. coli* expressed CaM, lanes 3 and 4 represent CaM-CP1, lanes 5 and 6 represent Trx, lanes 7 and 8 represent Trx-CP1 fusion protein.



*1: Baek MH et al, 2016, *J. pept. Sci.* Apr;22(4):214-21

*2: Ishida H et al, 2016, *J. Am. Chem. Soc.* 138, 11318-11326

P49 NMR 解析に向けた凝集性を抑制した一本鎖抗体(scFv)の作製

○小橋川 敬博[1], 翁力 棟[2], 福田 夏希[2], 豊田 湧也[2],
久米田 博之[3], 佐藤 卓史[1], 山内 聡一郎[2], 新家 粧子[4],
児嶋 長次郎[4,5], 森岡 弘志[1]
[1]熊大・院・生命科学、[2]熊大・院・薬、[3]北大・院・先端生命、
[4]阪大・蛋白研、[5]横国・院・工

Production of single-chain Fv antibody (scFv) clones with reduced oligomer formation for NMR analysis

○Yoshihiro Kobashigawa[1], Lidong Weng[1], Natsuki Fukuda[1], Yuya Toyota[1], Hiroyuki Kumeta[2], Takashi Sato[1], Shoko Shinya[3], Chojiro Kojima[3,4], Hiroshi Morioka[1]
[1]Kumamoto University, Kumamoto, Japan. [2]Hokkaido University, Sapporo, Japan. [3]Osaka University, Osaka, Japan. [3]Yokohama National University, Yokohama, Japan.

To date, NMR analysis of single chain Fv fragment (scFv) proteins has been limited due to NMR line broadening and precipitation caused by the formation of domain-swapped dimer, trimer and larger oligomers even at relatively low concentrations. The scFv protein is in equilibrium between the closed and the open states formed by assembly or disassembly of the V_H and V_L domains. Suppression of the open-close dynamics is, therefore, assumed to be critical for overcoming formation of multimers. Here, we obtained stable scFv clones against GA-pyridine, an advanced glycation end-product, by using the combination of a phage display system and random mutagenesis. We selected compact clones by small angle X-ray scattering (SAXS) and high-speed atomic force microscopy (HS-AFM), and revealed that the thus-obtained clone was stable over two weeks of NMR measurements at 37ºC. Our results indicated that phage display technology, SAXS and HS-AFM analyses are useful for obtaining stable scFv clones for NMR analysis.

抗体の抗原認識に関わるドメインである重鎖可変領域 (V_H) および軽鎖可変領域 (V_L)をペプチドリンカーで連結した一本鎖抗体 (scFv) は全長抗体に比べて低分子であり、(1) 大腸菌発現系による生産が可能である、(2) 抗原結合が 1 価であるために相互作用解析が容易である、(3) 高機能化を目指した部位特異的変異導入や他のタンパク質との融合抗体の作製が容易であるという点において全長抗体よりも優れてい

---

scFv, HS-AFM, SAXS

○こばしがわ よしひろ，おう りきとう、ふくだ なつき、とよた ゆうや、くめた ひろゆき、さとう たかし、やまうち そういちろう、しんや しょうこ、こじま ちょうじろう、もりおか ひろし

る。一方、鎖間の V_H-V_L 間の相互作用により、種々の会合体を形成しやすいという欠点を有する。このことに起因する分子の均一性の低下が scFv の産業応用や NMR 解析を困難にしている。本研究では、抗原-抗体反応の NMR による解析へ向けて、凝集を抑制した scFv クローンを作製した。

Fig. 1 は scFv の凝集体系性プロセスを示す。scFv は V_H と V_L が相互作用したコンパクトな状態 (Closed state)と開いた状態 (Open state)の平衡状態にある。そのため、この平衡状態を Closed state に偏らせることができれば、scFv の凝集体系性を抑えることが可能である。

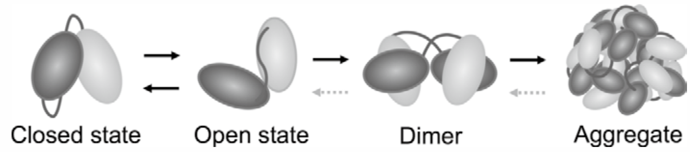


Fig. 1. scFvの凝集体形成プロセスの模式図

そこで、本研究では、ファージディスプレイ法とランダム変異を用いてコンパクトなクローンの作製を試みた。

タンパク質週末糖化産物 (AGE)の一種である GA-pyridine を認識する scFv クローン (L-V94AscFv)を対象として、最初に、Error-Prone PCR により V_H もしくは V_L 領域にランダム変異を導入したライブラリーを作製した。M13 ファージ上に提示し、37℃で 4 ラウンドのバイオパニングを行い、安定性が向上したクローンを濃縮した。得られた V_H 領域変異体クローンおよび V_L 領域変異体クローンのそれぞれのうち、最も収量が高いクローンを選別し、これらについて示差走査熱量測定を行った。その結果、いずれのクローンにおいても熱安定性が 3℃程度向上していた。次に、高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM)および X 線小角散乱 (SAXS)により、これらのクローンについて分子サイズおよび Open-Close Dynamics について評価を行った。その結果、V_H 領域に変異を導入したクローン(MuH19-scFv)において最も分子サイズが小さく、かつ、Open-Close Dynamics が最も抑制されていることが明らかとなった。このクローンについて、抗原である GA-pyridine を添加した状態で NMR 測定を行い、相補性決定領域 3 (CDR3)以外のほぼ全領域について主鎖原子の NMR シグナルの帰属を完了した。以上の結果より、ランダム変異とファージディスプレイ法を用いて 37℃で高い結合性を有するクローンをスクリーニングすることで、NMR 測定に適した凝集性が改善した scFv クローンが得られることが明らかとなった。

References

(1) Fukuda, Kobashigawa *et al.*, . (2017) *Molecules*. E1695

(2) Fukuda, Kobashigawa *et al*, . (2017) *J Biochem*. **161**:37-43.

P50

NMR メタボロミクスによるブタ生育状態の解析

○北田直也[1]，山野めぐみ[1]，稲村勇雅[1]，久米田博之[2,3]，熊木康裕[2]，大西裕季[2]，塚本卓[1,2,3]，菊川峰志[1,2,3]，出村誠[1,2,3]，相沢智康[1,2,3]
1北海道大学大学院生命科学院
2北海道大学大学院先端生命科学研究院
3北海道大学GI-CoRE ソフトマターGS

Appilication of NMR metabolomics profiling to porcine serum

○Naoya Kitada[1], Megumi Yamano[1], Yuga Inamura[1], Hiroyuki Kumeta[2,3], Yasuhiro Kumaki[2], Yuki Onishi[2], Takashi Tsukamoto[1,2,3], Takashi Kikukawa[1,2,3], Makoto Demura[1,2,3], Tomoyasu Aizawa[1,2,3]
1Graduate School of Life Science, Hokkaido University
2Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University
3Soft-Matter Global Station, GI-CoRE Hokkaido University

Metabolomics, which is the comprehensive analysis of metabolites, can be extensively applicable to medical diagnosis technology. Chromatography and NMR mainly apply to measure biological samples in metabolomics, and in this study, we choose NMR because of its non-destructive and highly repeatable nature, simple sample preparation, and brief measuring time.

Recently, it is said that improving production capacity in the field of domestic pig farming is necessary. It is a huge problem that many piglets will die by the stress and infections due to breeding environment. Therefore, we investigated metabolic changes in porcine serum with NMR-based metabolomics to evaluate health state of pig.

【背景】

近年、医療診断技術の分野で注目を集めている手法として、メタボロミクスが挙げられる。メタボロミクスとは、生体試料中に含まれる代謝物を網羅的に定量・解析する手法であり、様々な疾病に対するバイオマーカー探索や生活習慣・健康に関する研究などに応用されている。測定機器としては主にクロマトグラフィーと NMR が用いられるが、NMR は1. 非破壊的で再現性が高い，2. サンプル調製方法が簡便である，3. 測定時間が短い，等の利点があり、最近では農林水産業や食品産業に対する解析の応用展開の報告も増加している。

本研究では、養豚業で重要となるブタの健康状態の解析に対して、NMR メタボロミクスを応用することを検討した。日本の養豚業における問題点として、飼育環境による様々なストレスや感染症などにより子ブタが死亡するケースが多いことが挙げられており、生産能力の低下を招いている[1]。よって、ブタの生理や習性を加味した飼育管理を行い、その健康を維持することにより、国産ブタの生産能力の向上を目指すことが重要な課題といえる。そこでブタの血清を試料として、NMR を用いたメタボロミクスによって、その健康状態評価への応用を検討することを目的とした。

メタボロミクス，ブタ血清，多変量解析

○きただなおや，やまのめぐみ，いなむらゆうが，くめたひろゆき，くまきやすひろ，おおにしゆうき，つかもとたかし，きくかわたかし，でむらまこと

【方法】

異なる3つの農場で飼育された、日齢の異なる45頭のブタから血清を採取した。それぞれのサンプルに対して標準物質であるギ酸を含むリン酸 buffer を加えて遠心後、上清を回収し、NMR 測定を行った。測定にはBruker 800MHz (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) を使用し、presaturation を行う CPMG を用いた。また、Chenomx NMR Suite 7.5 software (Chenomx Inc., Edmonton, Canada) を用いることで、代謝物の同定と定量を行った。(Fig. (A))

【結果】

17種類の代謝物の同定と定量に成功した。また、ノンターゲットでの多変量解析を行ったところ、日齢毎にクラスターの形成が確認された。 (Fig. (B), Fig. (C)) 特に乳酸に注目すると、30日齢または60日齢の子ブタの血清中では乳酸の含有濃度が150日齢のものよりも顕著に高いことが分かった。本研究から、ブタ血清試料のNMR メタボロミクスは、ブタの生育状態の評価に有用である可能性が示唆された。

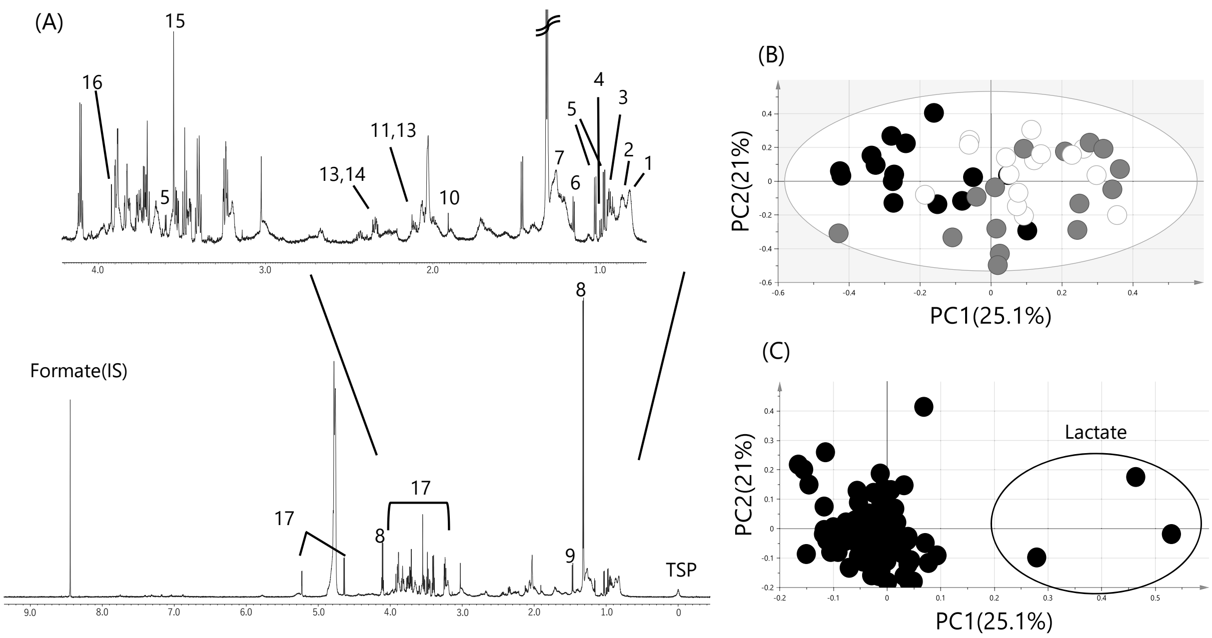


Figure
(A)800 MHz H-NMR 1 D spectra and assignments of porcine serum
1:HDL 2:VLDL 3: leucine 4: Isoleucine 5: valine 6: Isopropanol
7: Lipids(triglycerides and fatty acids) 8: Lactate 9:Alanine 10:Acetate 11: Methionine 12: Glutamate
13:Glutamine 14: pyruvate 15: Glycine 16: Creatine 17: Glucose
(B)PCA score plots Black circle ; 150-day-old, White circle; 60-day-old, Grey circle; 30-day-old
(C)PCA loading plots

【参考文献】

[1] Ryo Abe, 2016, Kachiku shiiku no kiso (The foundation of livestock breeding), Tokyo, Nousangyoson Bunkakyoukai, pp. 72-107

P51

分子運動を利用した固体^{2}H NMRスペクトルの分離

○飯島隆広[1]，清水　禎[2]
[1]山形大学学術研究院
[2]物質・材料研究機構

Separation of ^{2}H NMR spectra assisted by molecular dynamics in solid materials

○Takahiro Iijima[1], Tadashi Shimizu[2]
[1]*Institute of Arts and Sciences, Yamagata University*
[2]*National Institute for Materials Sciences*

The relaxation-assisted separation method was applied to overlapping ^{2}H nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of diamagnetic and paramagnetic solids to separate them based on the different relaxation behaviors caused by molecular motion. Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequences for ^{2}H NMR were adopted to build two-dimensional data sets from one-dimensional NMR experiments. For diamagnetic α-glycine, the ^{2}H NMR spectrum collected at 198 K was separated into two components from static $-CD_2-$ and dynamic $-ND_3$. In addition, for the paramagnetic $Sm(NO_3)_3 \cdot 6D_2O$, the asymmetric ^{2}H NMR spectra obtained at 213 K due to the hyperfine coupling was also separated into two components, which corresponded to coordinated and crystal water molecules undergoing a 180° flip motion with different correlation times.

固体^{2}H NMRは物質の静的局所構造のみならず分子運動を解析できる極めて有力な分光法であり，これまで反磁性，常磁性を問わず，様々な物質の構造解析に適用されている．サンプル中に化学的に異なる複数の^{2}Hサイトが存在する場合，各サイトの等方シフトはMASにより分解される．また2次元NMRにより等方性-異方性の相関スペクトルを得ることも可能である．しかしながら，^{2}H NMRで分子運動の解析を行う際は幅広い温度領域でNMR測定を行うことが多く，この点においてMASよりもstaticの測定が有利と言える．本研究ではstatic条件のもと，分子運動を活用して^{2}H NMRスペクトルを分離する方法を検討した．

パルスシーケンスとしては，反磁性[1]および常磁性体[2]に対する^{2}H NMR用CPMGを採用し，CPMG の1サイクル目からwhole echoで信号を取り込む．この1次元の時間領域信号を2次元のデータセット$S(\tau, t)$に再編する．ここでtは各CPMGサイクルにおける信号取得時間, τは最初の90° パルスから取り込みのCPMGのエコートップまでの時間を表す．Relaxation assisted separation (RAS) [3]と同様に，$S(\tau, t)$をt領域でFourier変換し，その後τ領域で逆Laplace変換（ILT）を施すことにより2次元スペクトル$I(R_2, \nu)$を得る．ここでR_2は分子運動の効果を含む緩和速度である．異なる^{2}H サイトで分子の運動性に違いがあれば，それによってスペクトルの分離が可能となり得る[4].

反磁性体のサンプルとして重水素化グリシン（glycine-d_5, $D_3N^+CD_2COO^-$）を用いた．^{2}H NMRの測定は11.7 Tの静磁場のもとでJEOL ECA 500分光器を用い共鳴周波数76.78 MHzで行った．CPMG測定では，CPMGの繰り返し32回，積算384回で信号を取り込んだ．スペクトルのシミュレーションにはラジオ波パルスや位相回しの効果を取り入れた自作のソフトウェアを用いた．ILTにはNNLSアルゴリズムを適用した.

重水素，分子運動，CPMG

○いいじまたかひろ，しみずただし

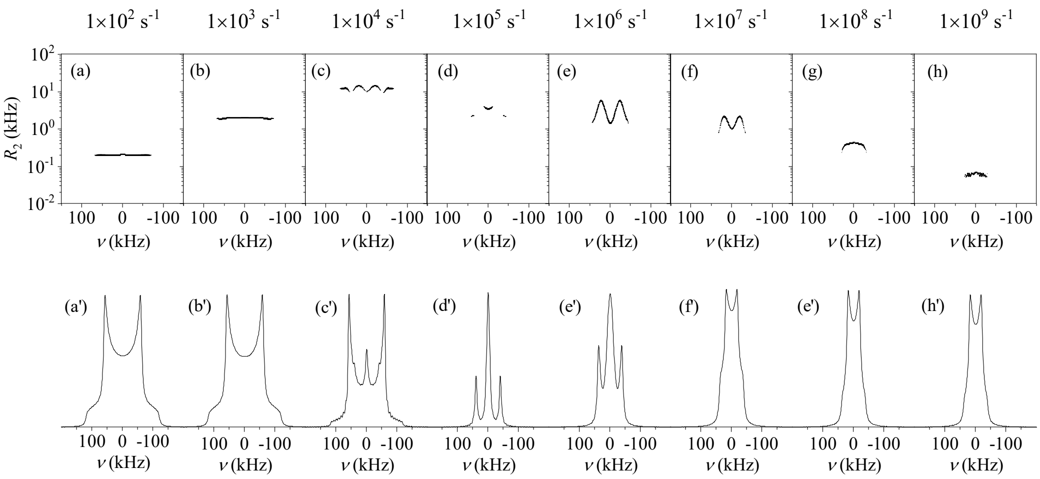


Fig. 1: Simulation of the dependences of (bottom) the ^{2}H NMR 1D spectra and (top) the corresponding RAS spectra on k for the three-site jump of diamagnetic solids. (a, a')-(h, h') show the spectra at $k = 1\times10^{2} - 1\times10^{9}$ s^{-1}, respectively. The magnification factors for these spectra are 2.1, 3.3, 100, 40, 12, 2.3, 1.1, and 1.0, from left to right. The quadrupole parameters used are (C_Q, η_Q) = (160 kHz, 0.00).

Fig. 1(a'-h') に，^{2}H NMRシミュレーション・スペクトルにおける-ND_3の3サイトジャンプの速度定数（k）依存性を示す．ほぼrigidである$k = 1\times10^{2}$ s^{-1}の時，スペクトルは幅$3C_Q/2 = 240$ kHzの粉末パターンを示した．速い分子運動によりEFGテンソルは平均化され，異方性は$(3\cos^{2}\beta - 1)/2 = -1/3$にスケールされる．$k = 1\times10^{9}$ s^{-1}のスペクトルの幅は$C_Q/2 = 80$ kHzとなった．中間の速度領域において，kの増大に伴い信号強度が減少しその後増加するのはexchange broadening (k～10^{3}–10^{4} s^{-1}) 及びmotional narrowing (k～10^{5}–10^{8} s^{-1}) で説明される．Fig. 1(a-h)の^{2}H RASスペクトルは分子運動に基づく磁化減衰の振る舞いをシミュレートしており，R_2に違いがあればスペクトルが分離され得ることが分かる．

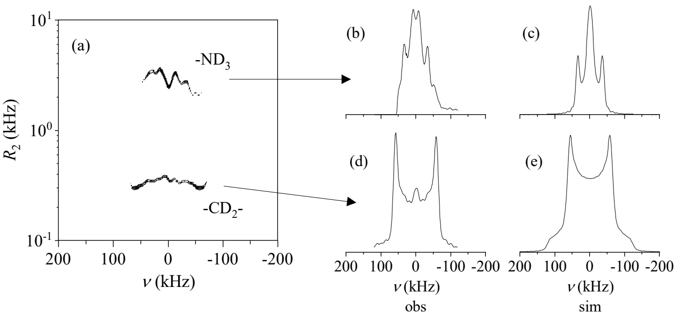


Fig. 2: (a) ^{2}H NMR RAS spectrum of glycine-d_5 under 11.7 T at 198 K. (b, d) The two spectral components in it. (c, e) Simulated spectra for (b) and (d), respectively.

Fig. 2(a)に重水素化グリシンの198 Kでの ^{2}H RASスペクトルを示す．スペクトルは2つの^{2}H成分（-CD_2-と-ND_3）に分離された．各成分を取り出したのがFigs. 2(b, d)である．Figs. 2(c, e)はそれらに対するシミュレーションである．Fig. 2(c)では-ND_3の3サイトジャンプ（$k = 6\times10^{5}$ s^{-1}）を考慮した．2次元RASスペクトルの周波数依存性（Fig. 1(e)）はグリシンの-ND_3のスペクトル（Fig. 2(a)）でも観測された．

当日の発表では本法を常磁性体に適用した例も報告する．

References

[1] F.H. Larsen, H.J. Jakobsen, P.D. Ellis, N.C. Nielsen, Chem. Phys. Lett. 292 (1998) 467.
[2] T. Iijima, K. Nishimura, Chem. Phys. Lett. 514 (2011) 181.
[3] A. Lupulescu, M. Kotecha, L. Frydman, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 3376.
[4] T. Iijima, T. Shimizu, Solid State Nucl. Magn. Reson. 91 (2018) 1.

P52 固体NMRによるポリヒドロキシ酪酸／ポリカプロラクトンブレンドの解析評価

○西田雅一[1]，早川由夫[1]、安田洸平[2]、西田政弘[2]
[1] 産業技術総合研究所、[2] 名古屋工業大学大学院

Solid-state NMR analysis of polyhydroxybutylate/polycaprolactone blends

○Masakazu Nishida [1], Yoshio Hayakawa [1], Kohei Yasuda [2], Masahiro Nishida [2]
1 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan
2 Nagoya Institute of Technology, Japan

Morphological change of poly(hydroxybutylate) (PHB) / poly(caprolactone) (PCL) blend due to cross-linking agent (PERHEXA) was studied by solid-state NMR analyses. SEM observation of fractural surface of the PHB/PCL blend showed sea-island or bicontinuous structure. The addition of 1% PERHEXA made these inhomogeneous structures disappear. By the PERHEXA addition, intensity of ^{1}H MAS signals of the PHB/PCL blends was increased, while intensity of ^{13}C PST-MAS signals of the PHB/PCL blends was decreased, especially for the 50% PCL blend. The T_1H values of PHB unit in all PHB/PCL blends were shortened by the cross-link with PERHEXA. These NMR spectral and relaxation time changes could be explained by the decrease of inhomogeneity in microscale which could be observed by SEM.

序論

ポリヒドロキシアルカン酸(Polyhydroxy-alkanoate, PHA)は、非可食性原料から微生物が産生するバイオマスポリマーであり、次世代の生分解性プラスチックとして用途の拡大が期待されている。このPHAはポリブチレンサクシネート(Polybutylene succinate, PBS)やポリ乳酸(Polylactic acid, PLA)との共重合により可塑性が向上し、特に、PHA/PBS共重合体とポリカプロラクトン(Polycapro-lactone, PCL)からなるポリマーブレンドが大きな破断ひずみを示すことが知られている[1]。今回、PHAの主たる構成成分であるポリヒドロキシ酪酸(polyhydroxybutyrate, PHB)に対して、PCLとのポリマーブレンドを作製し、架橋剤であるPERHEXAによるモルフォロジーの変化が固体NMRスペクトルや緩和時間に与える影響を調べた。

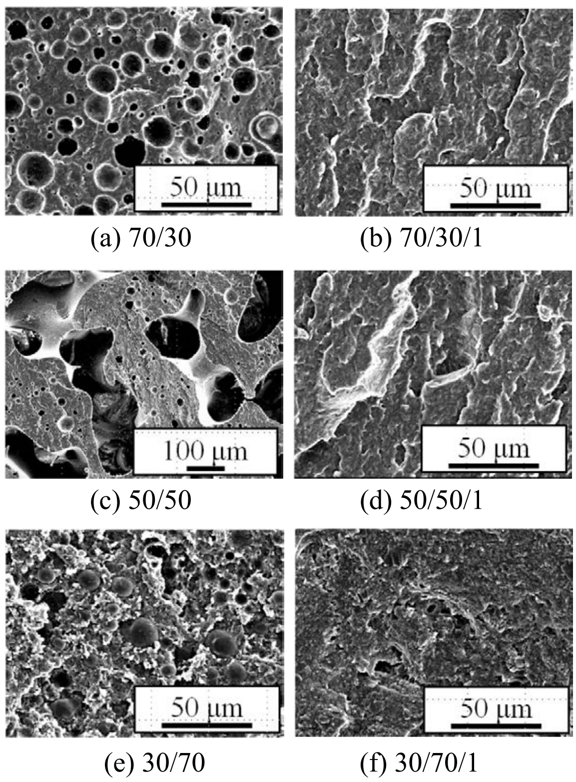


Fig. 1. Fracture surface of PHB/PCL blends

ポリマーブレンド、架橋剤、相溶化

○にしだまさかず、はやかわよしお、やすだこうへい、にしだまさひろ

材料とモルフォロジー

PHBペレットとしてBiomer社製のP338を、PCLペレットとしてPerstop社製のCapa6800を用い、架橋剤を加える場合は日油製PERHEXA-25Bを総質量の1%の割合で添加し、PHB/PCL = 70/30, 50/50, 30/70の割合で、井元製作所製簡易混練機を用いて175～185℃の温度範囲で混練を行った。混練終了後、175℃に保たれた高温プレス機を用いて、板材を作製した。試料を凍結破断し、破断後にアセトン漬を行うことでPCL相を除去し、PHB相のみを観察した。その結果を図１に示す。PHB/PCLについては相溶性が低いため海島構造や共連続構造をとるが、PERHEXAの添加により相溶性が向上することで、それらの構造が消失することを確認した。

固体NMRスペクトルと緩和時間

PHB/PCLブレンドの^{1}H MAS NMRスペクトルを図２に示す。PHBのシグナル強度はPCLと比較して、ごく小さく、PCL30%でもほとんどがPCL由来のシグナルとなった。一方、PCL添加量が30%と50%の場合、PERHEXAによる架橋で全体のシグナル強度が増大したが、これは架橋によって系全体の運動性が増加することで、T_2が長くなったためであると考えられた。さらに、^{13}C CP-MAS NMRではPERHEXAによる架橋の影響はほとんど見られないのに対して、図３に示したように^{13}C PST-MAS NMRでは、PHBのCH_3シグナルがPERHEXAの添加により減少し、特にPCL50%添加の場合に、PCLと架橋することでPHBのCH_3基のNOE効果が減少することが確認された。

PHB/PCLブレンドに対するPERHEXAによる架橋の影響は、特に緩和時間に大きく現れていた。PHBユニットのT_1Hは、PCL無添加の場合は2.0 sec程度であったが、50%のPCLの添加により2.3 secまで増加し、さらに70%のPCLを添加することで逆に1.9 secまで減少した。一方、PERHEXAを添加することで、PHB/PCLブレンドのT_1HはPCL組成とは関係なく、いずれも1.5 sec程度まで短縮していた。

PHA/PBS共重合体では、PHA, PBSユニットともに^{1}H MASシグナルが大きく増大するとともに、PHA, PBSユニットのT_1Hが平均化されることから[2)]、今回のPHB/PCLブレンドでは架橋での均質化はSEM観察可能なスケール以下では不十分であるため、^{1}H MAS NMRの増大やT_1Hの平均化の度合いが共重合体と比較して小さくなったと考えられた。

1) M. Nishida, *et.al. J Mol Struct*, **1124**, 92 (2016).
2) M. Nishida, *et.al. Polymers*, **10**, 506 (2018).

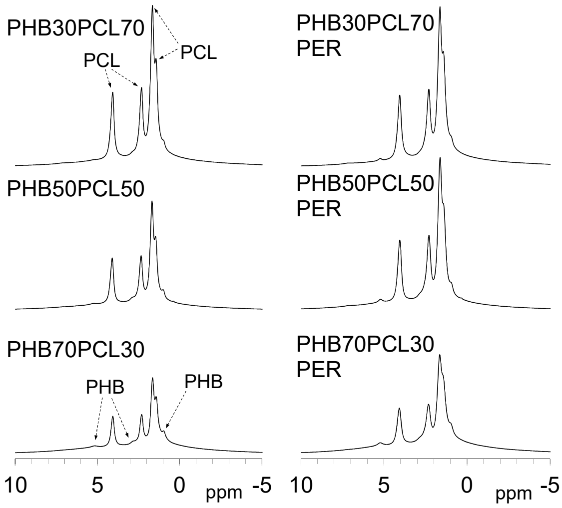


Fig. 2. ^{1}H MAS NMR spectra of PHB/PCL blends

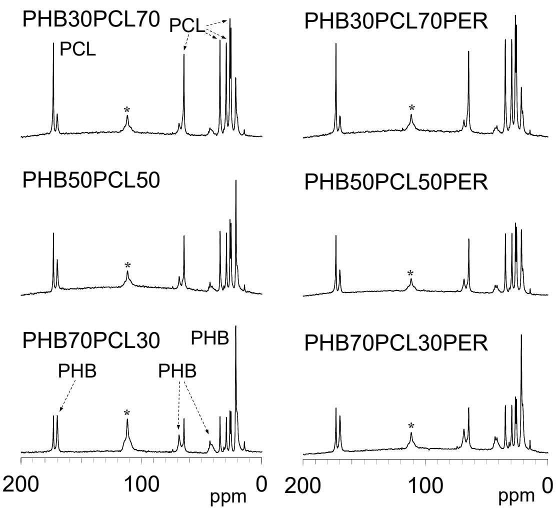


Fig. 3. ^{13}C PST-MAS NMR spectra of PHB/PCL blends

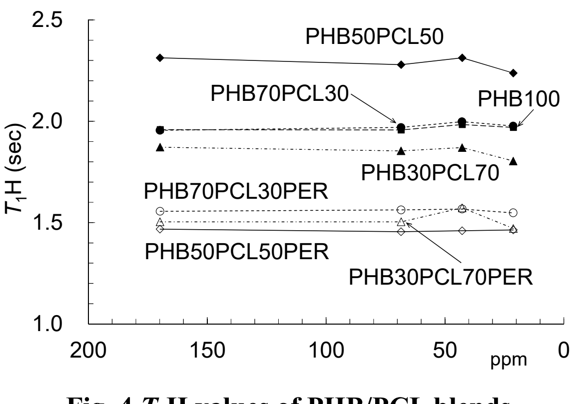


Fig. 4 T_1H values of PHB/PCL blends

P53

層状複水酸化物の固体NMR解析

○宮本　佳子, 日野上　麗子
パナソニック株式会社

Solid NMR analysis of Layered Double Hydroxide

○Yoshiko Miyamoto, Reiko Hinogami
Panasonic Corporation

We are developing electrochemical devices using anion exchange membrane (AEM). From the viewpoints of heat resistance and ionic conductivity, we are focusing on layered double hydroxide (LDH) among inorganic materials expected to have higher heat resistance than polymer materials, research on ion conductivity improvement were reported. Three types of LDH powder with different conductivities were prepared, solid state NMR measurement was performed by measuring the relaxation time (T1) by checking the difference in the OH site by ^{1}H NMR at a MAS rotation speed of 70 kHz. In addition, the state of carbonate ion was also analyzed by ^{13}C CPMAS.

1. 緒言　我々はアニオン交換膜(AEM: Anion Exchange Membrane)を利用した電気化学デバイスの開発を行っている。AEMを透過する水酸化物イオン(OH^-)により、アルカリ性雰囲気となり，安価な非貴金属触媒が利用できる利点があるものの，高分子材料を用いた電解質膜は耐熱性とイオン伝導性の観点から，実用に耐えないという課題があった。そこで，高分子材料よりも耐熱性が高いと期待される無機材料のうち，層状複水酸化物(LDH: Layered Double Hydroxide)に着目し，イオン伝導性向上の研究開発を，固体NMRを用いて行った。

2. 実験方法　実験に用いたLDH材料は、圧粉体状態のイオン伝導度が異なるもの3種類(sample 1 10^{-3}S/cm, sample 2 10^{-3}S/cm, sample 3 10^{-1}S/cm)に対し、dryとwetの状態のものを用意した。固体NMR測定は、JNM-ECZ600R(JEOL)を用い、MAS回転速度70kHzで、^{1}H MAS NMR測定を行い、OHサイトの違いを確認し、続いて緩和時間(T1)測定を行った。また、3.2mm試料管を用いて、^{13}C CPMAS測定から、炭酸イオンの状態を解析した。

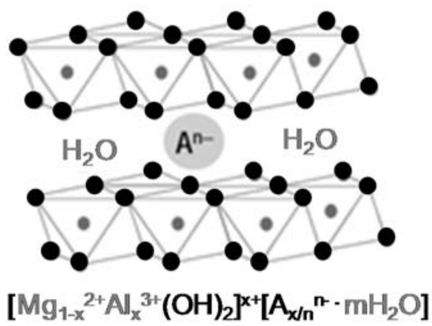


Fig. 1: Crystal structure of LDH

3. 結果・考察　dry状態の試料に対して測定した^{1}H MAS NMRスペクトルをFig.2に示す。LDH層のサイトについて、sample3ではMg_2AlOHサイト(2.8～3.5ppm)とMg_3OHイト(1.2～1.6ppm)に

層状複水酸化物, ^{1}H 固体NMR

○みやもとよしこ, ひのがみれいこ

帰属されるピークが確認され、sample 1とsample 2では、それらに加え、$MgAl_2OH$サイト(6.0ppm)に帰属されるピークが観測された[1]。緩和時間測定からは、dry状態に比べて、wet状態での緩和時間が小さくなる傾向が見られたことから、水分の影響でLDHのプロトン核の束縛力が弱まっている可能性が示された。

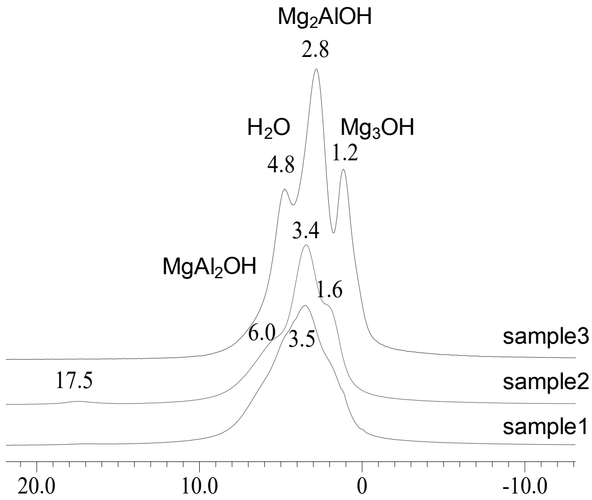


Fig. 2. ^{1}H MAS NMR of LDH

次に、^{13}C MAS NMRを測定した(Fig.3)。sample 2においては、状態がdryもしくはwetに関わらず2つのピークが観測された。170ppm付近のピークはCO_3^{2-}種であり、166ppm付近のピークはHCO_3^-、もしくは違う形でホスト層と相互作用しているCO_3^{2-}種と考えられる[2]。LDHのゼータ電位は一般にpH=10程度であるが、pH=10の水溶液中での炭酸イオンの電離状態はCO_3^{2-}とHCO_3^-の濃度はほぼ同程度であることから、この濃度平衡がLDH層間中でも成立するのであれば、HCO_3^-の存在の可能性が示唆され、HCO_3^-イオンが存在すれば、電荷中性の観点からも同濃度のOH^-の存在を示す結果となった。

一方、sample 3については強度の弱いCO_3^{2-}由来のピークのみが観測された。強度が低い理由としては、含有されるCO_3^{2-}濃度がsample 2の40%程度と低い点、またsample 3にはNO_3^-が含有されていることから、層間のpHが低い可能性などが考えられる。しかしながら、pHが低いと、一般的な水溶液中ではCO_3^{2-} 濃度比は減少しHCO_3^-やH_2CO_3濃度が増加するが、NO_3^-が含有されたLDHの層間は^{13}C NMRで観測できなかった感度の低いHCO_3^-が主成分であると考えられる。以上のことから、今回、観測された170ppm付近のピークは、LDH粒子表面に吸着したCO_3^{2-}と推察され、層間の炭酸イオン種は観測が難しかったと考えている。

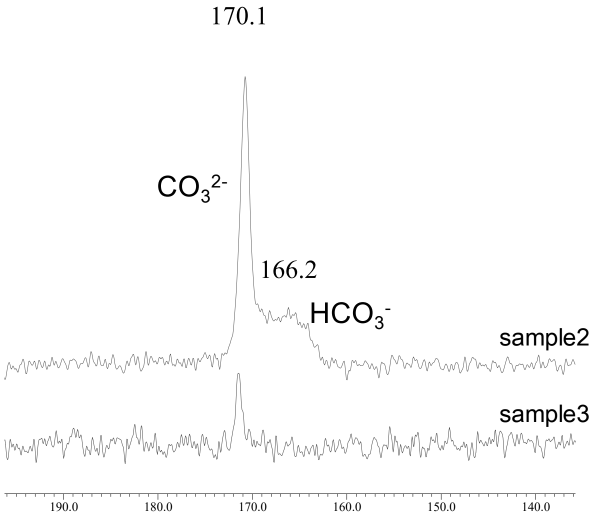


Fig. 3. ^{13}C CPMAS NMR of LDH

^{1}H 固体NMRを用いることで、LDHホスト層や水に由来するプロトン核種を同定することが可能で、さらに、^{13}C 固体NMRにより、炭酸イオンの状態を確認でき、LDHにおけるイオン種の働きを示唆する結果が得られたと考えている。

[1] S. Cadars, et al., Chem. Mat., 23 (2011) 2821-2831.
[2] P. Sahoo, et al., ACS Appl. Mater. Interfaces, 6 (2014) 18352-18359.

P54 チオリシコンガラスの構造および結晶生成メカニズムの解析

○浜辺 啓汰[1]，宇都野 太[2]，山口 展史[2]，岩舘 泰彦[1]，大窪 貴洋[1]
[1]千葉大学大学院 融合理工学府
[2]出光興産 先進技術研究所

Analysis of thioLISICON glass structure and crystallization mechanism

○Keita Hamabe[1], Futoshi Utsuno[2], Hiroshi Yamaguchi[2], Yasuhiko Iwadate[1], Takahiro Ohkubo[1]
[1]Graduate School of Engineering, Chiba University
[2]Advanced Technology Research Laboratories, Idemitsu Kosan Co. Ltd

We present a comprehensive study of alkaline earth metal sulfide additive in Li_2S-P_2S_5 glass system. Structural investigations of Li_2S-P_2S_5-MS(M = Ca, Sr, Ba) glass and glass-ceramics were performed by ^{31}P Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance (MAS NMR) spectroscopy. Chemical shifts and population of chemical species such as PS_4^{3-} and $P_2S_7^{4-}$ units were quantitatively estimated from ^{31}P MAS NMR spectra. A characteristic change among different MS addition was PS_4^{3-} chemical shift for Li_2S-P_2S_5-CaS, which was shifted to higher field compared with Li_2S-P_2S_5-SrS and Li_2S-P_2S_5-BaS systems. This effect indicates that PS_4^{3-} in Li_2S-P_2S_5-CaS glass lead a higher electron density than other Li_2S-P_2S_5 glass systems. A possible explanation of this phenomenon is that Ca^{2+} can play a role of a bridging atom between PS_4^{3-} anions.

１．緒言

チオリシコンガラスおよび結晶は全固体リチウムイオン二次電池に用いられる固体電解質として有望視されているため、盛んに研究が行われている。一般に固体電解質に用いられるチオリシコン結晶はチオリシコンガラスの熱処理により合成される。中でも$70Li_2S$-$30P_2S_5$ガラスの熱処理により得られる$Li_7P_3S_{11}$は室温で高い導電率10^{-3} S/cmを示す[1)]ため、特に注目を集めている。$70Li_2S$-$30P_2S_5$ガラスはPS_4^{3-}、$P_2S_7^{4-}$および$P_2S_6^{4-}$の三種類の骨格構造ユニットを有する[2)]ことが知られている。しかしLi_2S-P_2S_5系にアルカリ土類金属を加えた三成分系のチオリシコンガラスでは骨格構造ユニットについての知見が少なく、2価のカチオンが骨格構造ユニットへ与える影響を明らかにする必要がある。本研究ではLi_2S-P_2S_5-MS(M = Ca, Sr, Ba)ガラスおよび結晶化ガラスを合成し、^{31}P MAS NMR測定により2価のカチオンが共存する組成でのガラスや結晶化ガラスの構造解析を実施した。

２．実験

出発原料としてLi_2S、P_2S_5、CaS、SrSおよびBaSを用いた。これらをAr雰囲気のグローブボックス内で乳鉢にて混合した後、ペレット化して石英管に真空封管した。その後、850℃で3時間溶融し、氷水で急冷してガラスを合成した。得られたガラスを熱処理して結晶化ガラスを合成した。得られたガラスおよび結晶化ガラスは^{31}P MAS NMR測定により構造解析を行った。^{31}P MAS NMR測定はJEOL-ECX400(静磁場9.4 T)およびJEOL-ECA

固体電解質、ガラス、ガラスセラミックス

○はまべ けいた，うつの ふとし，やまぐち ひろし，いわだて やすひこ，おおくぼ たかひろ

500(静磁場11.7 T)により行い、4φ試料管を用いて回転速度を16 kHzとした。90°パルス幅は3.25 μs、繰り返し時間は試料の緩和時間に応じて定量性が得られるように設定した。得られた^{31}P MAS NMRスペクトルはフォークト関数を用いて、最小二乗法によるフィッティングを行い、ピークの分離を行った。

３．結果と考察

Figure 1は合成した$60Li_2S$-$30P_2S_5$-10MS(M = Ca, Sr, Ba)および$70Li_2S$-$30P_2S_5$ガラスの^{31}P MAS NMRスペクトルを示す。得られた^{31}P MAS NMRスペクトルから$60Li_2S$-$30P_2S_5$-10MSガラスは$70Li_2S$-$30P_2S_5$ガラスと同様の骨格構造ユニットを有するガラスであるとわかった。Table 1は合成したガラスの^{31}P MAS NMRスペクトルのピーク分離から得た骨格構造ユニットの化学シフト値および存在比を示す。Table 1より$60Li_2S$-$30P_2S_5$-10CaSガラスは$60Li_2S$-$30P_2S_5$-10SrS、$60Li_2S$-$30P_2S_5$-10BaSおよび$70Li_2S$-$30P_2S_5$ガラスと比較して、PS_4^{3-}ユニットの化学シフト値が高磁場に2 ppm程度シフトするとともに、その存在比が増加した。チオリン酸ガラスでは骨格構造ユニットの周囲に存在しているカチオンの価数が大きいほど、化学シフト値が高磁場にシフトすることが知られている。例えばNa_2O-P_2O_5-CaOガラスにおいて、周囲にCa^{2+}が存在している骨格構造ユニットは、Na^+が存在している骨格構造ユニットと比較して化学シフト値が高磁場にシフトする[3)]。したがって$60Li_2S$-$30P_2S_5$-10CaSガラスに含まれるPS_4^{3-}ユニットの周囲にはCa^{2+}が存在していると考えられる。またLi_2S-P_2S_5-MSガラスにおいてPS_4^{3-}ユニットはMのイオン半径が小さくなるにつれて化学シフト値が高磁場にシフトしたことに対し、$P_2S_7^{4-}$および$P_2S_6^{4-}$ユニットはMのイオン半径が大きくなるにつれて化学シフト値が高磁場へシフトした。

発表ではガラスを熱処理して得られた結晶化ガラスの^{31}P MAS NMRの測定結果と合わせて、結晶生成メカニズムについて議論する。

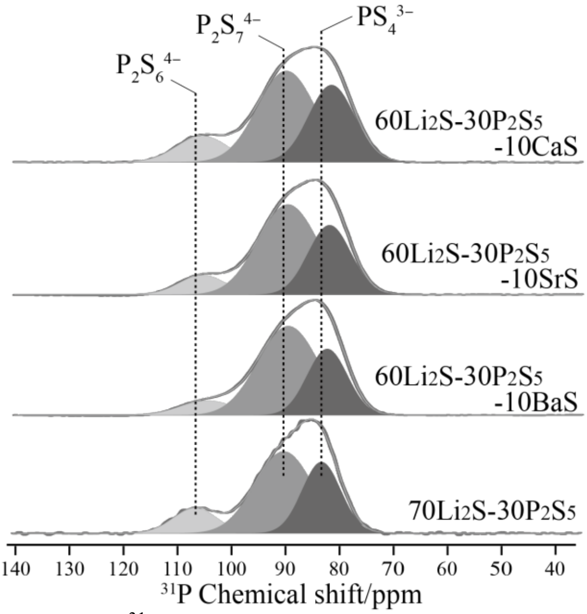


Figure 1 ^{31}P NMR spectra of the $60Li_2S$-$30P_2S_5$-10MS(M = Ca, Sr, Ba) and $70Li_2S$-$30P_2S_5$ glass.

Table 1 ^{31}P chemical shift and population obtained from peak deconvolution of ^{31}P MAS NMR spectra of the $60Li_2S$-$30P_2S_5$-10MS(M = Ca, Sr, Ba) and $70Li_2S$-$30P_2S_5$ glass.

		M			
		Ca	Sr	Ba	$70Li_2S$-$30P_2S_5$
PS_4^{3-}	CS / ppm	81.3	81.7	82.1	82.9
	area / %	34.8	32.0	30.1	32.2
$P_2S_7^{4-}$	CS / ppm	89.7	89.4	89.3	89.9
	area / %	52.1	58.2	61.0	55.0
$P_2S_6^{4-}$	CS / ppm	105.2	105.2	104.3	106.2
	area / %	13.1	9.76	8.83	12.8

References

[1] F. Mizuno *et al.*, *Solid State Ionics*, **177**, 2721-2725 (2006)

[2] C. Dietrich *et al.*, *J. Mater. Chem. A*, **5**, 18111-18119 (2017)

[3] D. Carta *et al.*, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **353**, 1141-1149 (2007)

P55

固体NMRによる酸素欠陥発光ガラスの構造解析

○小島充[1]，岩舘泰彦[1]，大窪貴洋[1]
1千葉大学大学院・融合理工学府

Structure Analysis of glasses emitted by oxygen vacancies from Solid-State NMR

○Mitsuru Kojima[1], Yasuhiko Iwadate[1], Takahiro Ohkubo[1]
1Chiba University Graduate School of Science and Engineering

Silicate glasses containing oxygen vacancies have much interest in new photo materials. It has well known that alkali silicate glasses prepared under reducing atmosphere exhibit strong photoluminescence (PL). However, the relationship among the glasses composition, the prepared conditions and PL properties has not been clarified in detail. In this study, we aimed to investigate the relationship between PL properties and glass local structure. Silicate glasses with different nominal alkali (Na_2O) contents (30, 35, 40, 45, and 50 mol%) were prepared by the melt-quenching method using a graphite crucible for different melting time (10 min, 2, 4, 8 h) at 1300℃. Silicate bridging and Na dispersion structure in sodium silicate glasses were investigated by ^{29}Si and ^{23}Na solid-state NMR.

緒言

シリカガラス中の酸素欠陥は還元雰囲気下での溶融急冷により導入されること知られており、紫外光を吸収して可視光を放射する。酸素欠陥を利用した発光材料の材料研究が行われる一方、酸素欠陥の生成メカニズムやホストとなるガラス構造との関係は不明な点が多い。そこで本研究では、アルカリ成分を含むシリカガラスを種々の条件で処理することにより酸素欠陥を導入し、発光特性とガラスの架橋構造との関係を^{29}Si固体NMRにより調べた。またガラスに添加したNaの分散構造を解明するため、^{23}Naスピンエコー実験を行い同核種間の双極子-双極子相互作用を評価した。

実験

アルカリシリカガラスは、Na_2CO_3およびSiO_2を原料として作製した。ガラスのモル比が、$x Na_2O$-(100-x)SiO_2(x=30、35、40、45および50)となるようにNa_2CO_3およびSiO_2を秤量し混合した。原料粉末を黒鉛るつぼに入れて、窒素雰囲気にて10 ℃/minで1300℃まで昇温後、保持することにより溶融ガラスとした。溶融状態での保持時間は10 min、2、4および8 hとし、その後雰囲気を保ったまま常温まで自然放冷してバルクガラスを得た。得られたバルクガラスの発光特性は、絶対量子収率測定により評価した。^{29}Si NMRスペクトルはMagic angles spinning下(10 kHz)でCPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill)法により得た。^{29}Si CPMG NMR測定はπ/2パルス=2.8 μsで緩和の待ち時間は30 minとして16回積算を行った。得られた30個のエコー信号を時間ドメインで足し合わせてフーリェ変換することで^{29}Si NMRスペクトルを得た。^{23}Na NMRのスピンエコー実験は、-100℃でstaticにより行った。^{23}Naの中央遷移のみを選択励起するためにπ/2パルスは20 μs以上とした。エコー時間

ガラス、発光、構造解析
○こじまみつる、いわだてやすひこ、おおくぼたかひろ

を変えて得られた信号強度の減衰を理論式にフィッテングすることにより^{23}Na同核の双極子-双極子相互作用の二次モーメントを評価した。すべてのNMR測定は11.7 Tの磁石とJEOL Deltaにより行った。

結果および考察

絶対量子収率測定より、作製したガラスは溶融時間が長くなるほど高い量子収率を示すことが確認できた。溶融時間の変化による量子収率の変化について調査するために、実際の組成でNa_2O濃度が2%以内に収まっている溶融時間の異なる4つのガラスについて構造解析を行った。

ガラスを構成するSiO_4四面体の架橋酸素数nはQ^nと表され、NMRスペクトル上で特有のピークを生じる。Figure 1は、4つのガラスの^{29}Si NMRスペクトルとガウス関数によるピーク分離により求めたQ^nの存在割合を示す。Figure 1より、溶融時間が長いガラスほどQ^3が増加し、Q^2が減少することが確認できた。これは、溶融時間が長くなるほどNa_2O濃度が減少することに起因すると考えられるが、非架橋酸素によるNa$^+$の電荷補償モデルでQ^n構造の分布を説明することができない。1つの非架橋酸素当たりのNa数を考慮すると、10 min、2、4および8 h溶融ガラスではそれぞれ0.538、0.545、0.551および0.577個であり、溶融時間が長くなるほど値が大きくなった。溶融時間が長いほどガラスの量子収率が大きくなる結果を踏まえ、この結果は生成した酸素欠陥に伴うSi-O-Siの重合度の増加、あるいはNaの凝集に起因すると考えた。

Figure 2はNaの凝集を評価するための^{23}Naスピンエコー実験より求めたエコー時間(2τ)と信号強度の関係を示す。信号強度の減衰は次式でフィッティングして同核種の二次モーメントM_2を得た。

$$I(2\tau) = I_0\exp(-M_2((2\tau)^2)/2)$$

ここでM_2はNa-Na間の距離r_jと関係付けられる。

Figure 2より溶融時間が長いガラスほどM_2の値は減少した。M_2とNa-Na間の距離rの関係から溶融時間が長いガラスほどNa-Naの間距離が離れていることになり、溶融時間が長くなってもNaは凝集することなく均一に分散していることを示している。よって溶融時間の増加による1つの非架橋酸素当たりのNa数の増加は、Naの凝集ではなく、生成した酸素欠陥に伴うSi-O-Siの重合度の増加に起因すると考えられる。

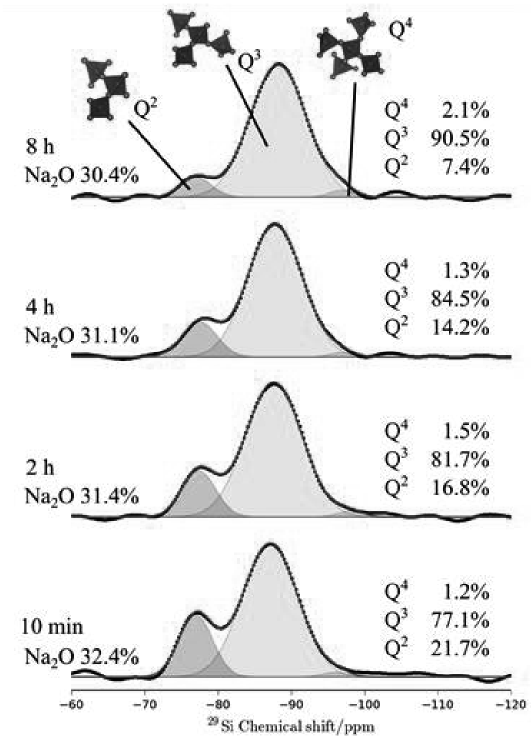


Figure 2 ^{29}Si NMR spectra of sodium silicate glasses prepared for different melting times.

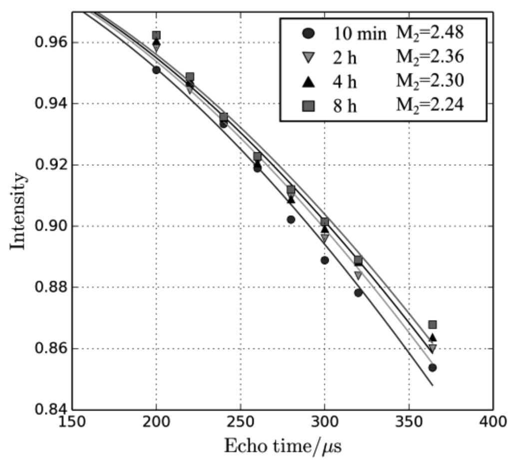


Figure 3 ^{23}Na spin-echo NMR data as a function of echo times of sodium silicate glasses prepared for different melting time.

P56

^{15}N標識化人工石炭の局所構造 :超高速MAS下での^{1}H-^{15}N doubleCP法による解析

○奥下慶子[1]，畑友輝[1]，杉本　義一[2]，高橋貴文[1]，金橋康二[1]
[1]新日鐵住金株式会社　技術開発本部
[2]産業技術総合研究所

Local structure of ^{15}N-labeled Coals
: ^{1}H-^{15}N double CP Analysis at Ultra-fast MAS condition

○Kieko Okushita [1], Yuki Hata[1], Yoshikazu Sugimoto[2], Takafumi Takahashi[1], Koji Kanehashi[1]
[1]Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation
[2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Nitrogen in coals has been focused as a key element to reduce NO_x. N-containing structure in coals is expected to have main relation with the coals' reactivity to NO_x. Our goal is to understand the structural details on N-containing sites in coals both qualitatively and quantitatively, and then get structural insight to reduce NO_x in combustion processes. In this study, we acquired quantitative ^{15}N MAS NMR spectra of ^{15}N-labeled synthesized coals which are originated from different three kinds of ^{15}N-reagents, and compared their ^{15}N- component percentages. Then, we tried to elucidate chemical environment around ^{15}N nuclei in the synthesized ^{15}N-labeled coal by using ^{1}H-^{15}N double CP techniques at ultra-fast MAS condition.

１．背景・目的

石炭有機質部分はC、H、Oだけで95～98%を占めるが、燃焼プロセスで生じるNO_xやSO_xといった微量元素由来生成物の低減に関する研究は環境保全・処理装置のコスト面から産業上重要である。特に、石炭燃焼時のNO_x化反応性に窒素含有官能基構造が関わるとされ、複雑な石炭のNMRによる窒素核化学構造研究は機構解明の手段として注目されている。

一方、^{15}N核は天然存在比0.37%、共鳴周波数についても^{13}C核の2/5程度、^{1}H核の1/10程度であるため非常に感度の低い核であり、通常、試料の^{15}N標識化を要する。特に、一般的な石炭中では窒素含有量が数%程度のためさらに観測の難易度が上がる。窒素同位体核の^{14}N核は天然に99.63%存在し同核の利用が考えられるが、単純な化合物についても四極子相互作用により線形が複雑化する。したがって、元より複雑な化学的環境を有する石炭試料中の、特に官能基比率の定量解析により量的推移を議論する場合には線形が単純な^{15}N核を選択する必要があり、同スペクトルも詳細に帰属されている必要がある。

本発表ではまず、文献[1)]を参考とし、^{15}N標識化原料としてウラシル、グリシン、硫酸アンモニウムを用いて合成された人工石炭について、固体^{15}N MAS NMR測定による定量的な官能基比を反映するスペクトルの取得・比較を行い、詳細な構造解析のためのモデル試料を選定した結果について報告する。さらに、超高速MAS下での測定・解析法を組み合わせて進めている構造帰属研究についても報告する。

固体^{15}N核、人工石炭
○おくした　けいこ、はた　ゆうき、すぎもと　よしかず、たかはし　たかふみ、かねはし　こうじ

２．実験

【測定試料】

測定に用いた^{15}N同位体標識の人工石炭は、セルロースに[1-$^{15}N_1$]Glycine、^{15}N-Uracil、$(^{15}NH_4)_2SO_4$それぞれを窒素源として加え、ステンレス球を撹拌子として、オートクレーブ中300℃で三日間加熱して合成された[1)]。合成された人工石炭G300、U300、A300の元素分析値（d. a. f. %）をもとに作成されたVan Krevelen図より、各人工石炭は亜瀝青炭と同程度の石炭化度を有する。また、モデル化合物として[1-^{15}N]及び[Pyridine-^{15}N] 7-Azaindoleを用いた。

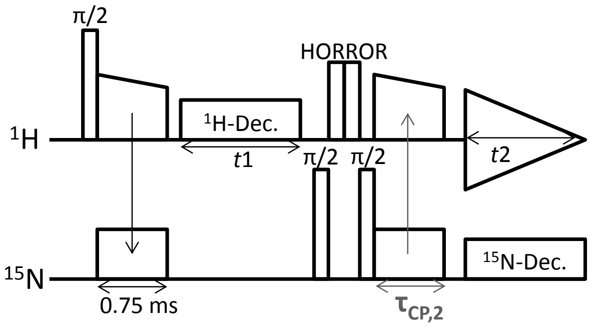


Fig. 1 ^{1}H-^{15}N double CP のパルスシークエンス。

【NMR測定条件】

・分光器：Bruker Ascend 800 Avance NEO

・共鳴周波数：{^{1}H}800.19 MHz, {^{15}N}81.08 MHz

・プローブ：PH MASDVT800S4 BL3.2 N-C/F-H FIX、 PH MASDVT800S4 BL0.7 N-C/H FIX

・マジック角回転（MAS）：23 kHz（3.2 mmϕ）、110 kHz（0.7 mmϕ）

・測定法：1）Hahn-echo法（待ち時間150秒）、2）^{1}H-^{15}N CP/MAS（Contact time 0.1～8.0 ms）、3）2D ^{1}H-^{15}N double-CP/MAS （0.7 mmϕ）

３．結果と考察

窒素源違いの人工石炭^{15}N NMRスペクトルの特徴

Fig. 2に、定量的な官能基比率を反映した^{15}N標識化人工石炭の^{15}N Hahn-echo MAS NMRスペクトルを示した。既報[1)-4)]の帰属に従うと下記及びFig.3aのようになる。

・-50～-90 ppm（ピリジン窒素）

・-150 ppm付近（ピロールアニオン、イミダゾール-N）

・-190 ppm付近（ピリジニウムイオン、*N*-置換ピロール、ピロールカチオン、イミダゾール-NH）

・-245 ppm付近（アミド、非置換ピロール）

・-330 ppm付近（アミン）

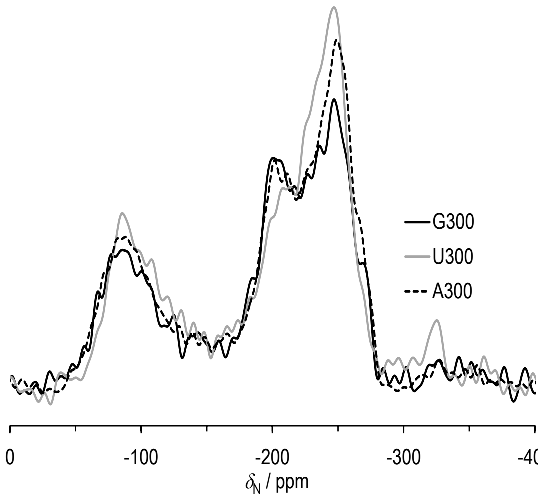


Fig. 2 異なる^{15}N標識化合物から合成された人工石炭の^{15}N Hahn-echo MAS NMR スペクトル（面積でスペクトルを規格化済）。

特にG300とU300の間で、ピリジンの低磁場側と高磁場側の比率、-200 ppm付近の４級窒素と-245 ppm付近のピロール/アミドピークの量比に違いがみられた。また、U300ではアミン官能基比率が高い傾向があった。一般に、窒素を含む芳香環の構成環数が増加するとピリジン及びピロール型窒素ともに高磁場シフトする傾向がある。したがって、本観測でみられたU300ピリジン領域内の高磁場傾向から、ウラシルは比較的大きなクラスターを形成してピリジン化する可能性があることが分かった。また、非置換ピロール型窒素/アミドピークに対応する-245 ppm付近では、U300以外の試料に-270 ppm付近のアミド由来と考えられる肩ピークがみられた。

人工石炭 ^{15}N NMRスペクトルの2D化による分離

そこで次に、感度が良く、中間的な^{15}N NMRスペクトル形状を示すA300を用いて、超高速MAS条件下での^{1}H–^{15}N double-CP実験により非置換ピロール型窒素/アミドピーク領域の成分分離を試みた。中程度のMAS回転数の23 kHzにおいて、A300はFig.3aのような^{1}H–^{15}N CP/MASスペクトルとなり、CPを利用した測定によるスペクトルの議論は、主に同領域についてとなる。同領域-270 ppm付近観測される肩ピークはこれまでに明確な帰属がなされていないが、^{1}H核との相関を取ることで官能基の帰属につながる情報が得られると考えられる。

Fig.3bにMAS 110 kHz下、$^{15}N \rightarrow {}^{1}H$-contact time 0.1 msにおいて測定した^{1}H観測による^{1}H–^{15}N double-CPスペクトルを示した。同条件で測定された^{1}H–^{15}N相関は[U-^{13}C,^{15}N] L-Alanine及びFig.4に示した[1-^{15}N] 7-Azaindoleの実験より、直接結合した^{1}H–^{15}N相関のみ観測されることが分かっている。予想通り、^{15}N軸側では-280～-220 ppmの領域のみにスペクトルが観測され、主に2本の相関として観測された。しかし、^{1}H軸側では各々の相関について4本程度のピークが分離して観測され（Fig.5a）、各^{15}N領域の局所^{1}H環境は複数存在することが分かった。

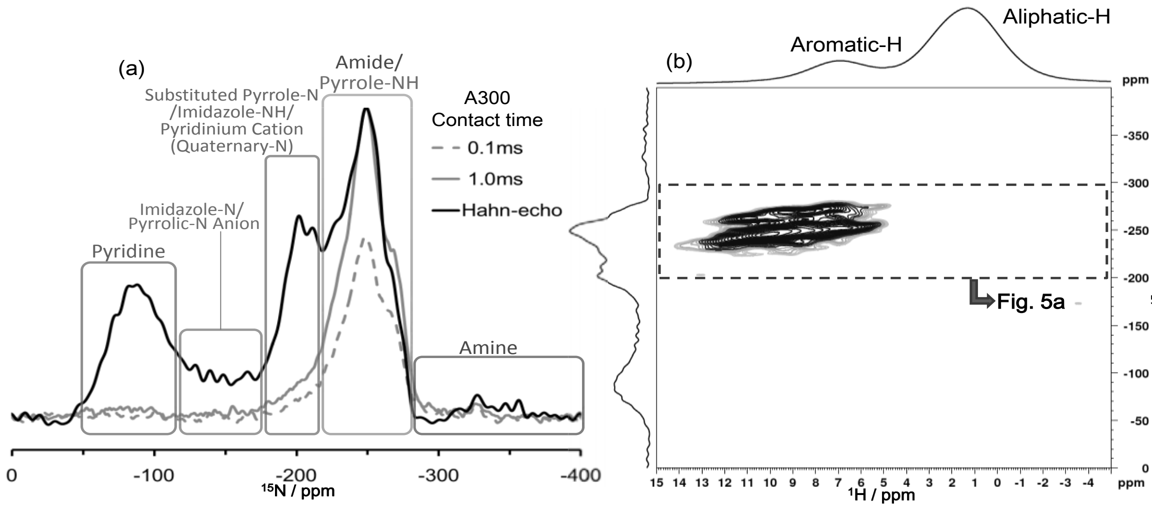


Fig. 3 ^{15}N 標識人工石炭 A300 の(a) MAS 23 kHz における 1 次元 ^{1}H-^{15}N CP/MAS 及び ^{15}N Hahn-echo MAS NMR スペクトル、(b)MAS 110 kHz 下での ^{1}H-^{15}N double CP スペクトル（Contact time: $^{1}H \rightarrow {}^{15}N$ 0.75 ms、$^{15}N \rightarrow {}^{1}H$ 0.1 ms）。縦及び横軸には MAS 23 kHz 下での Hahn-echo 及び MAS 100 kHz での ^{1}H-depth スペクトルを挿入した。

観測^{1}H–^{15}N相関成分の局所環境

Double CP実験では核間距離に依存してスペクトル強度が変化する。そのため、測定パラメーターであるContact timeを変化させることにより、核間距離に依存した相関スペクトルを観測できる。そこでまず、構造既知のモデル化合物である7-Azaindoleを用いて、$^{15}N \rightarrow {}^{1}H$-Contact timeに依存したC-Hピークの強度変化を観測し、測定パラメーターに依存して観測される核間距離を大まかに見積もった（Fig.4）。結果、$^{15}N \rightarrow {}^{1}H$-Contact time 0.5 msとすることで、N核周辺の4.5Å程度の範囲内に限定した相関を得られることが分かった。

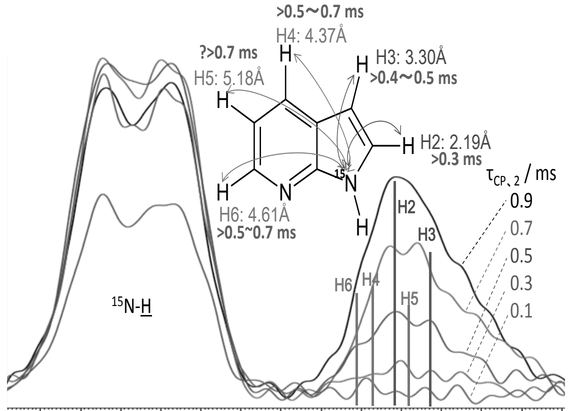


Fig. 4 [1-^{15}N] 7-Azaindole の $^{15}N \rightarrow {}^{1}H$-contact time を変化させた double CP 実験。MAS 110 kHz、の $^{1}H \rightarrow {}^{15}N$-contact time は 0.75 ms。

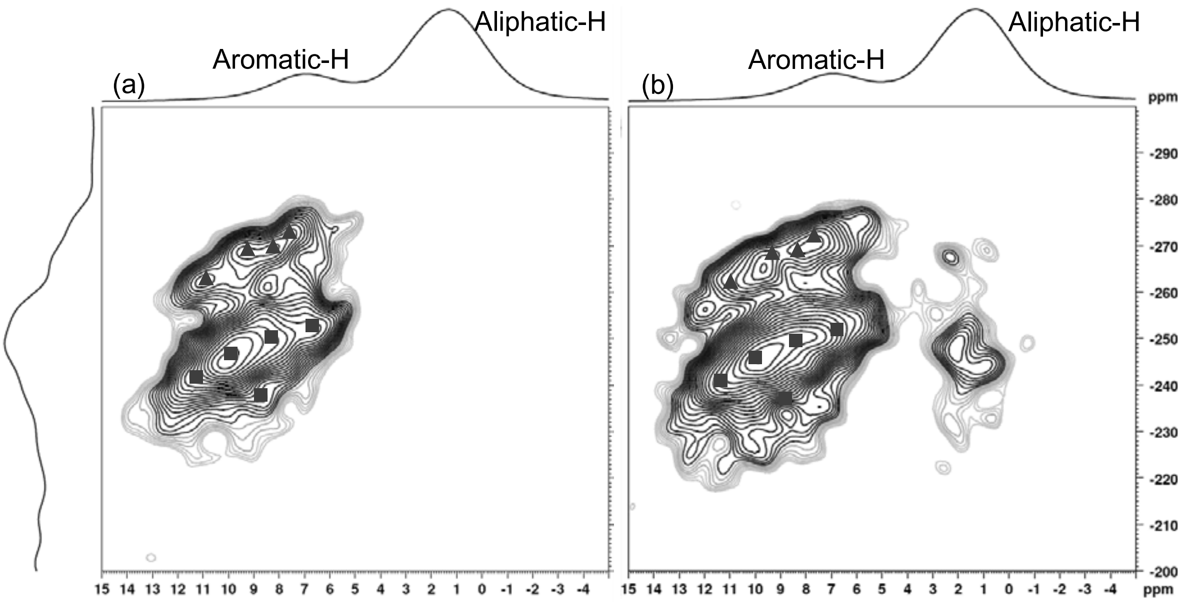


Fig. 5 ^{15}N 標識人工石炭 A300 の MAS 110 kHz 下での ^{1}H-^{15}N double CP スペクトルの拡大。(a) Contact time: ^{1}H→^{15}N 0.75 ms、^{15}N→^{1}H 0.1 ms、(b) ^{15}N→^{1}H 0.5 ms。濃淡はピーク強度を反映。

次に、^{15}N→^{1}H-Contact time 0.5 msとして^{15}N標識化人工石炭A300のdouble CPスペクトルを測定し（Fig. 5b）、^{15}N→^{1}H-Contact time 0.1 msの場合（Fig. 5a）と比較した。Fig. 5bでは、^{15}N→^{1}H-Contact time 0.1 msの窒素核の化学シフトとの相関として、1〜2.5 ppmのAliphatic-C<u>H</u>ピークとの相関が観測され、同領域のN-H官能基の周辺アルキル側鎖が存在することがわかった。また、Fig.5bでは^{15}N→^{1}H-Contact time 0.1 msでは観測されなかった、量の少ないまたは双極子相互作用の弱いN-H、あるいはプロトンと直接結合していないN-CHピークも観測されている可能性がある。本会では、超高速MAS下でのCPVC測定による定量的N-H間双極子相互作用解析等の手法が、人工石炭中のNに結合したH数解析・官能基の区別等へ適用可能かどうかについても議論する予定である。

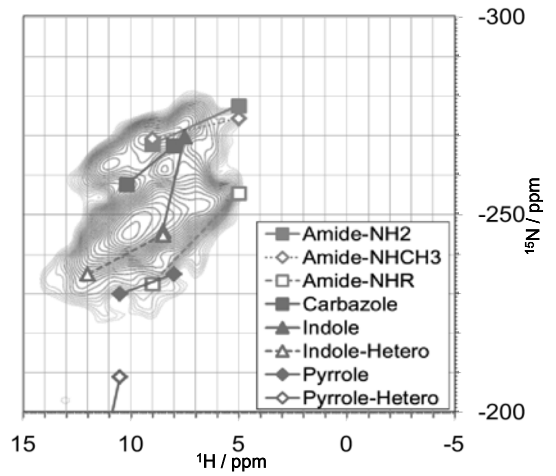


Fig. 6 既知の溶液 NMR データベースより得た NH_x 官能基と ^{1}H-^{15}N 化学シフトの関係。$CDCl_3$ を中心に記載。

また、化学シフトから局所構造を考察するため、Fig.6のように、既存の溶液NMRデータから候補となる官能基に関する^{1}H-^{15}Nの化学シフト範囲を見積もった。局所構造としてFig.5■印の相関はピロール型NHの可能性が高いが、▲印の相関は大きな環構造に存在するピロール型NHとアミドNH両方の可能性がある。特に^{15}N核化学シフトは溶媒や水素結合の影響を大きく受けるので、本会では新規に取得する固体NMRデータ群で検証した結果について報告する。

【参考文献】

1) 川島、呉、杉本、*日本エネルギー学会誌* **2002**, *81*, 49-56.

2) Knicker, H., Hatcher, P.G., Scaroni, A.W., *Int. J. Coal Geol.* **1996**, *32*, 255.

3) Solum, S.M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9804-9809.

4) Solum, S.M. *et al.*, *Energy & Fuels* **1997**, *11*, 491-494.

P57 固体NMR法を用いたガングリオシド膜上におけるアミロイドβの構造解析

○矢木真穂[1,2,3]，加藤晃一[1,2,3]，西村勝之[2]
1自然科学研究機構　生命創成探究センター、
2自然科学研究機構　分子科学研究所
3名古屋市立大学　大学院薬学研究科

Solid-state NMR Characterization of Conformation of Amyloid-β on Ganglioside Membrane

○Maho Yagi-Utsumi[1,2], Koichi Kato[1,2], Katsuyuki Nishimura[2]
1Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural Sciences
2 Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences
3Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

Lipid membranes provide active platforms for dynamic interactions of a variety of biomolecules on cell surfaces, where glycolipids are involved in physiological and pathological molecular recognition events. Growing evidence has recently demonstrated that gangliosides on neuronal cell membranes can be targets for various amyloidogenic proteins that are associated with neurodegenerative disorders exemplified by amyloid β (Aβ) in Alzheimer's disease. Here we apply soli-state NMR technique to characterize the interactions of Aβ with GM1 gangliosides. Our solid-state NMR data of Aβ employing GM1 ganglioside-containing DMPC vesicles as model membrane system have elucidated the membrane-induced conformation of Aβ, giving insights into the mechanisms underlying the α-to-β conformational transition of Aβ on ganglioside clusters, which promote nucleation processes in Aβ aggregation in the membrane environments.

アルツハイマー病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患の発症には、アミロイドβ (Aβ) やαシヌクレインといったタンパク質の神経組織における異常な凝集・蓄積がそれぞれ関与している。このようなタンパク質の凝集の本質は、本来一定の立体構造をもたないタンパク質が、アミロイド線維やオリゴマーなどの毒性を発揮する重合体へと変換される過程である。神経変性疾患関連タンパク質は、分子間の相互作用を契機として重合の核となる特異構造へと変換した後、それを鋳型として自己組織的にアミロイド線維を形成すると考えられる。さらに、そのようなタンパク質の構造変換は、神経細胞膜上に存在する糖脂質クラスターという特異な相互作用場において誘起され、しかもそうした分子過程は、膜の組成や構成要素によって様々に影響され得ることが明らかとなってきた。

私たちはこれまで、NMR分光法を基軸とした分子科学的アプローチにより、タンパク質と糖脂質からなる超分子複合体を対象に、細胞表層における分子間相互作用を原子レベルの分解能で解明することを目指し、それらが関与する疾患の発症メカニズムを分子構造論的に理解することを

アミロイドβ、ガングリオシド

○やぎまほ、かとうこういち、にしむらかつゆき

目的とした研究を展開してきた。

Aβの異常会合は、神経系に豊富に存在する糖脂質であるGM1ガングリオシドとAβの複合体形成を契機として促進されることが知られている。これまでに溶液NMR解析を通じて、ガングリオシドクラスターは親水性/疎水性境界面において、本来特定の2次構造を持たないAβ分子のαヘリックス構造への転移を誘起するとともに、その空間配置を規定していることを明らかとしてきた。また、Aβが高密度に存在する条件下では特異的な分子間相互作用が促され、AβのC末端領域においてβストランド様構造が形成していることを示してきた。そこで本研究では、その先にある構造変化、すなわち、GM1膜上においてAβがαヘリックス構造の膜結合状態からβシート状のアミロイド線維へと至る構造転移のメカニズムを解明することを目的とし、固体NMR法による構造解析を試みた。U-[^{13}C, ^{15}N]Aβ(1-40)を調製し、GM1を組み込んだ1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine（DMPC）ベシクルと混合した後、超遠心分離により沈殿画分を回収し、NMR計測に供した。CC-COSY、NCO、NCA、DARR計測を実施し、帰属を行った。発表では、GM1-DMPC膜上で見られたAβの中間体構造をもとに、膜上におけるAβの構造転移および分子間相互作用の実体について議論したい。

参考文献

[1] M. Utsumi, Y. Yamaguchi, H. Sasakawa, N. Yamamoto, K. Yanagisawa, K. Kato, *Glycoconj. J*. **26**, 999-1006 (2009).

[2] M. Yagi-Utsumi, T. Kameda, Y. Yamaguchi, K. Kato, *FEBS Lett.* **584**, 831-836 (2010).

[3] M. Yagi-Utsumi, K. Matsuo, K. Yanagisawa, K. Gekko, K. Kato, Int. *J. Alzheimers Dis.* **2011**, 925073 (2010).

[4] M. Yagi-Utsumi, C. M. Dobson, *Biol Pharm Bull.* **38**, 1668-1672 (2015).

[5] M. Yagi-Utsumi, K. Nishimura, K. Kato, *PLoS One* **11**, e0146405 (2016).

P58

^{13}C 固体NMRによる新規選択的スペクトル抽出法の開発及び定量測定への適用

○朝田　麻実子[1]
1 アステラス製薬株式会社 製薬技術本部 物性研究所

Development of Qualitative and Quantitative Analysis of New Relaxation Filter-Selective Signal Excitation Methods for ^{13}C Solid-State Nuclear Magnetic Resonance

○Mamiko Asada[1]
1 Analytical Research Labs, Pharmaceutical Technology, Astellas Pharma Inc.

We have developed four types of new relaxation filter-selective signal excitation (RFS) methods for ^{13}C solid-state NMR using proton spin-lattice relaxation time in the rotating frame (^{1}H T_{1rho}) or proton spin-lattice relaxation time (^{1}H T_{1}) which enable extraction of the spectrum of a target component from a mixture of several components. These methods are based on the equalization of proton relaxation time in a single domain via rapid intra proton spin diffusion and the difference in proton relaxation times of individual components in the mixture. Introduction of simple pulse sequences to one-dimensional experiments reduced data acquisition time and increased flexibility. These methods are also appreciable to the quantitative analysis. Further, the practicality and versatility are increased by combining two or more of them. These RFS methods are suitable for use in a broad range of fields.

【序論】

複数成分の固体混合物から特定成分の評価を簡便に行い、その物理化学的存在状態を把握することは、高分子、低分子を問わず品質を管理する上で重要である。多成分から成る混合物中の特定成分の評価に対しては、これまで知られている分析手法 (固体NMR、粉末X線回折、DSC、マイクロカロリメトリー、ラマン分光法、赤外分光法、近赤外分光法等) では、他成分のシグナルの影響から、データ解析が煩雑となる場合や正確な評価が困難となる場合が多い。そこで、本研究では、固体 ^{13}C NMR を用いて測定前の物理的分離等の前処理なしに、混合物中の特定成分のシグナルのみを選択的に直接検出可能な四種類の新規な測定手法 {選択的スペクトル抽出法 (Relaxation Filter-Selective Signal Excitation Methods: RFS 法)} を開発し、この問題を克服した (Figure 1)。

【理論】

本法は、プロトンスピン拡散による単一ドメイン中のプロトン緩和時間の均一化、並びに、各成分固有のプロトンの緩和時間 (^{1}H T_{1}、^{1}H T_{1rho}) の違いを利用することにより、他成分の影響を消去して目的成分のみの単一スペクトルを選択的に抽出することができる。

固体NMR、パルスプログラム、緩和時間

○朝田　麻実子（あさだ　まみこ）

また、一次元NMR法であることから、これまでに固体NMRを用いた定量手法として報告のある波形分離や多変量解析を用いた手法、TOSY、ROSYなどの二次元NMRの手法や、DECRAなどの数学的アルゴリズムを組み合わせる従来の手法に比べ、測定時間の短縮や煩雑な計算処理を回避できる利点を有する。

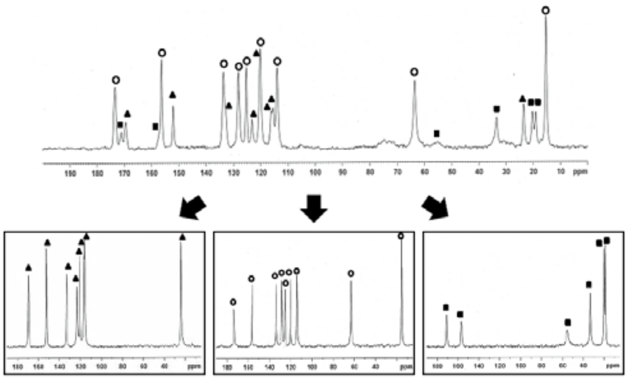


Figure 1. Image of RFS methods for ^{13}C solid-state NMR

【実験】

数種類の有効成分を含有する市販薬の他、汎用固体NMR測定法 (CP-MASやDD-MAS等) ではシグナルの重なりが生じるような結晶成分を含む難溶性薬物の固体分散体、二種類の結晶多形の混合物、二種類の糖類の混合物及び結晶と非晶質の混合物に対して、この新規測定手法 (RFS 法) を適用し、目的成分の選択的なスペクトル抽出を行った。さらに、本法を難溶性薬物の固体分散体における原薬の結晶化度測定及び結晶多形の含有率定量に適用し、実用性を確認した。

【結果及び考察】

成分固有の緩和時間の違いを利用することにより混合物中の目的成分の直接的なシグナル観測が可能となった。一種類のRFS法のみでは、製剤のように複数の成分を含む混合物中の目的成分のみを選択的に検出することが難しいケースが生じたものの、本法の利点として、この四種類のRFS法を二種類以上自由に組み合わせることにより、不要な成分のシグナルを同時に消去して、多成分の固体混合物から目的成分のスペクトルのみを選択的に抽出することが可能である点が明らかとなった。また、$^{1}H\ T_{1rho}$ を利用したRFS法では、長時間のスピンロッキングは、プローブやプリアンプのダメージへの影響が考えられたが、低出力でのスピンロッキングの採用により、装置へのダメージを軽減することができた。さらに、目的成分に対する直接的なシグナルの観測が可能となったことから、本法を用いた結晶化度測定や結晶多形の含有率定量において、幅広い範囲 (5 ~ 100%) で非常に高い感度と精度及び良好な直線性を確認できた (Figure 2)。

本法を様々な分野における混合物中の特定成分の評価に適用することで、その実用性と多用途性の増大が期待される。

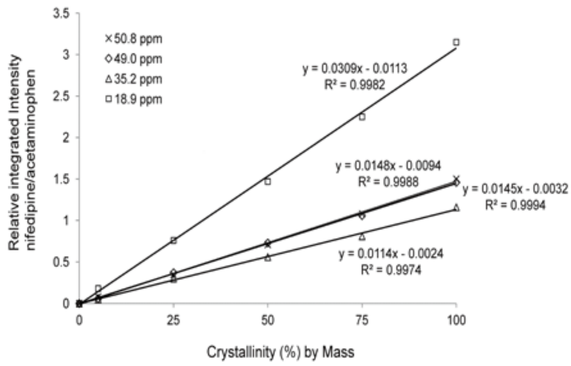


Figure 2. Relative integrated intensity vs. crystallinity of nifedipine using a physical mixture of crystalline nefidipine and acetaminophen

【Reference】

[1] Nasu, M., Nemoto, T., Mimura, H., Sako K. (2013) *J. Pharm. Sci.*, 102(1), 154-161.
[2] Asada, M., Nemoto, T., Mimura, H., Sako K (2014) *Anal. Chem.*, 86(20), 10091-10098.

P59

CdSeマジックサイズクラスターの固体NMRによる構造解析

○栗原 拓也、野田 泰斗、竹腰 清乃理
京都大学大学院理学研究科

Structural analysis of CdSe magic-sized clusters by solid-state NMR

○Takuya Kurihara, Yasuto Noda, and K. Takegoshi
Division of chemistry, Graduate school of science, Kyoto University

This work examines structure of CdSe magic-sized clusters (MSC) capped with L-cysteine by solid-state NMR. In ^{113}Cd measurements, small difference between ^{113}Cd 1-pulse and –{^{1}H} CP/MAS spectra was observed. The CP method with ^{1}H of cysteine capping on the CdSe surface allows measuring only the surface ^{113}Cd. Hence the small difference indicates that the large part of the Cd atoms exists at the surface sites. Comparison of ^{77}Se 1-pulse and –{^{1}H} CP/MAS showed that CdSe MSCs have three Se layers. To examine surface geometry of the surface Se atoms and nitrogen of the ligand-cysteine bonding to the surface Cd, ^{15}N–{^{77}Se} rotational-echo double-resonance (REDOR) method was employed. REDOR fractions obtained showed behavior of multi-spin system, and analysis of the fraction by using an approximated REDOR curve suggests that, in the surface layer, Cd atoms are located on more outside than Se.

1. 背景

ナノ粒子よりも小さな、数～数百個の原子から成る物質の状態はクラスターと呼ばれる。クラスターはバルクやナノ粒子とは異なる、独特の構造や電子状態を取ることが知られている。近年では、有機分子をリガンドとして用いることで、液相中において構造を精密に揃えたクラスターを合成することが可能となり、その構造や物性の研究や、機能性材料としての応用研究が盛んに行われている。

化合物半導体であるCdSeのクラスターは、溶媒中で原料を混合するだけで特定の原子数を持った構造を形成し安定化するマジックサイズクラスター(MSC)であることが報告されている[1]。また質量分析および第一原理計算から、CdSe MSCには$(CdSe)_{13}$や$(CdSe)_{34}$が存在し、それらは籠状構造を有するとされている。しかしこの構造はリガンドが欠損した真空中の状態のものであり、溶媒中におけるリガンドが存在した状態の構造はこれまで明らかとなっていない。クラスターの構造の安定性や電子状態にはリガンドが大きく関わることが知られており、したがってCdSe MSCについてもリガンドに保護された状態の構造を実験的に解明することが重要である。

我々はこれまでに、システインをリガンドとしたCdSe MSC (CdSe-Cys)のNMR活性な同位体を用いた合成法、および非破壊的な固体化法を確立し、固体NMRを用いてシステインがどのような構造でCdSe MSCを安定に保護しているのか解析を行った。その結果、リガンド全体のうち約6割のシステインはチオール基のSがMSC表面のCdと結合し、更に残りの約4割はSに加えアミノ基のNがCdに配位することで、CdSe MSCを安定化していることを明らかにした[2,3]。本研究では、システインに保護されているCdSe MSCがど

CdSeマジックサイズクラスター、固体NMR

○くりはら たくや、のだ やすと、たけごし きよのり

のような構造を持っているのかについて、^{113}Cdおよび^{77}Se NMRによる解析を行った。また、システインのアミノ基がMSC表面のCdに配位していることを利用し、^{15}N–^{77}Se相関NMRによる表面構造の解析を行った。

2. 実験方法

CdSe-Cysの合成および固体化は、金属^{113}Cd、^{77}Se粉末、^{15}NラベルL-cysteineを原料に用いて、我々が確立した方法により行った。固体NMR測定はすべて9.4 Tマグネット(^{1}H 400.2 MHz、^{113}Cd 88.8 MHz、^{77}Se 76.3 MHz、^{15}N 40.6 MHz)において、3.2 mm T3プローブを用いて行った。MAS速度は、^{113}Cdおよび^{77}Se測定では20 kHz、^{15}N–{^{77}Se} rotational-echo double-resonance (REDOR)測定では10 kHzとした。

3. 実験結果・考察

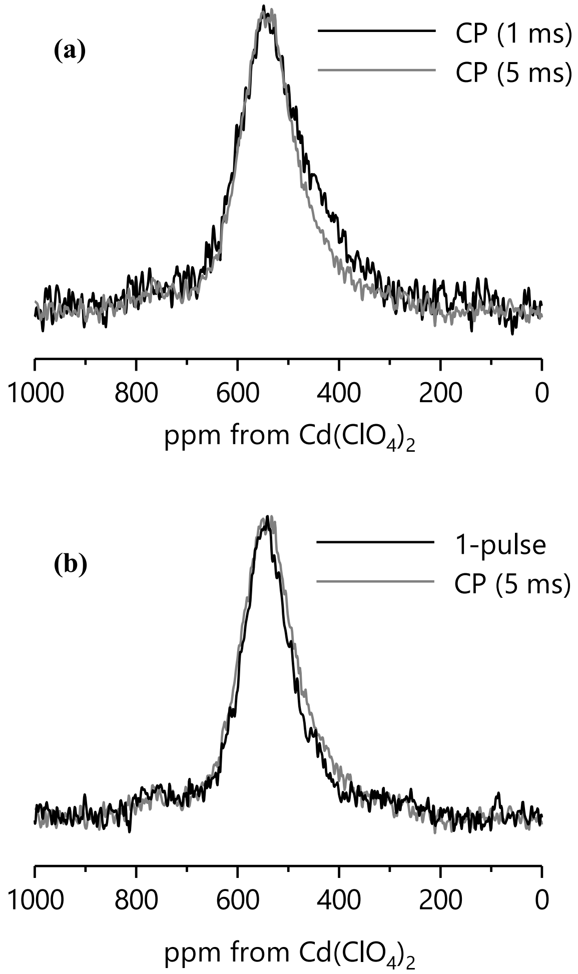


Fig. 1. ^{113}Cd CP/MAS and 1-pulse normalized spectra of CdSe-Cys.

Figure 1にCdSe-Cysの^{113}Cd–{^{1}H} CP/MASおよび^{113}Cd 1-pulseスペクトルを示す。ピーク強度は規格化されている。CP/MAS測定では、CdSe MSCの表面に結合しているシステインの^{1}Hから磁化を移すため、MSC表面の^{113}Cdのみを選択的に観測することができる。Fig. 1(a)ではコンタクトタイム(CT) 1および5 msで測定されたスペクトルの300–500 ppmに差が見られる。これは、MSC表面のCdには^{1}Hとの双極子結合が強い環境と弱い環境の2種類が存在しており、CT 1 msのスペクトルでは主に前者が、CT 5 msでは加えて後者も観測されているためと考えられる。表面Cdにはアミノ基(−NH_2)のNと結合しているものとしていないものがあるため[2]、これが^{1}H–^{113}Cdの双極子結合の差を生んでいると予想される。Fig. 1(b)では、1-pulseスペクトルの350–550 ppmにCT 5 msで測定されたCP/MASスペクトルの線形との差が見られ、このことから、^{1}HからのCPが届きにくい内部のサイトも存在していると考えられる。また、その差が小さいことから、MSCを構成するCd原子の多くが表面に存在することが予想される。しかし、現時点では^{113}CdのT_1は不明であるため、1-pulse測定時の待ち時間(200 s)が不十分でありスペクトルは定量性の欠けたものである可能性が高い。そのため、今後T_1を測定して十分な待ち時間での1-pulse測定を行い、得られたスペクトルについて改めて解析を行う予定である。

次に、Figure 2にCdSe-Cysの^{77}Se–{^{1}H} CP/MASおよび^{77}Se 1-pulseスペクトルを示す。ピーク強度は規格化されている。Fig. 2(a)に示すように、^{77}SeではCT 10 msまでの範囲でCP/MASスペクトルに明確な差が観測されなかった。^{113}Cdとは異なり、表面層の^{77}Seは

ある程度同じ強さの双極子結合を^{1}Hと形成していると考えられる。これは、Seはシステインのアミノ基のNと結合を形成していないため[3]、CdほどHとの距離に差が出にくいことが理由と予想される。1-pulseスペクトルでは、−550–−350 ppmの線形にCP/MASスペクトルとの差が見られ、更に−350–−150 ppmに新たなピークが観測された(Fig. 2(b))。この結果は、MSC内部のSeが2種類の化学環境にあることを示している。なお、この1-pulseスペクトルは待ち時間1000 sで測定されたものだが、^{77}SeのT_1は~300 sであることが実験から明らかになっている。したがって^{77}Seに関しても、待ち時間を$5T_1$~1500 sとして再測定を行い、定量的な解析を行う予定である。

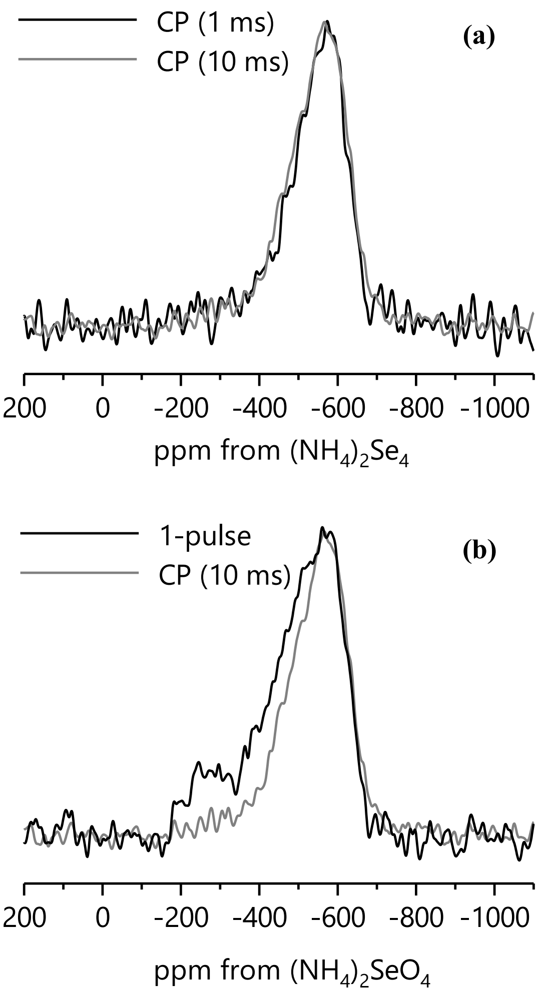


Fig. 2. ^{77}Se CP/MAS and 1-pulse normalized spectra of CdSe-Cys.

表面の原子配置を解析するために、システインのアミノ基の^{15}Nを観測核として^{15}N−{^{77}Se} REDOR測定を行った。この実験では、表面Cdに配位した^{15}Nと、そのCdと結合している^{77}Seとの距離相関が観測されることが期待される。結果はFigure 3に示すとおりであり、実験データは2スピン系のREDOR理論曲線には合わなかった。Cdは通常4つの共有結合を持ち、Nと結合する表面Cdは残りの結合を3つのSe、もしくは2つのSeおよびシステインのSと形成することが予想される。したがって実験結果の解析においては、3もしくは4スピン系のREDOR曲線を用いる必要があると考えられる。しかし多スピン系のREDORの挙動は核間距離に加え3核の成す角度も影響を及ぼすため、解析は非常に複雑である。そこで今回は、Eckertらによる近似式を用いた解析を行った[4]。この式は

$$\frac{\Delta S}{S_0}=\frac{1}{I(I+1)\pi^2}\tau_{\mathrm{d}}^2\left[\frac{4}{15}\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2\gamma_{\mathrm{I}}^2\gamma_{\mathrm{S}}^2 I(I+1)\sum\langle r_{\mathrm{IS}}^{-6}\rangle\right]\qquad\left(0\le\frac{\Delta S}{S_0}\le 0.3\right)$$

と表され(Iは非観測核のスピン量子数、γ_{I}およびγ_{S}は非観測核および観測核の磁気回転比、r_{IS}はI−Sスピン間距離)、式の有効範囲内においてSe−N−Seのなす角度を無視した解析を行うことができる。^{15}N−^{77}Se間の距離をすべて同じとして解析を行ったところ、3スピン系を仮定した場合はその平均距離を3.8 Å、4スピン系の場合は4.1 Åと得た。以前の研究より、^{15}N−^{113}Cdの結合距離はREDORにより~2.4 Åと測定されており[2]、またバルク状態でのCd–Se間結合距離である2.64 Åを用いてSe−N−Seのなす角度を計算すると、3スピン系では99°、4スピン系では109°と得られた。この結果を図示したものをFigure 4に示す。MSCにおけるCd−Se間距離はバルクの状態と多少異なる可能性があるため、正確な角度を算出することはできないものの、得られた結果はMSC表面ではSeよりCdが外側に位置する可能性を示唆している。

以上の結果から、CdSe MSCは表面と内部の大きく2種類の層から構成されており、MSC表面ではシステインのアミノ基のNが配位したCdに対し、そのCdと結合しているSeは表面層のより内側に位置する可能性が示唆された。一方、MSC内部ではSeに大きく2種類の化学環境が存在することが明らかとなった。CdSe-CysはLDI-MSによって$(CdSe)_{34}$の組成を持っているとされているが[5]、この$(CdSe)_{34}$は第一原理計算より、4員環–6員環ネットワークから成る$(CdSe)_{28}$の中に2つの6員環同士が結合した$(CdSe)_6$が存在する、籠状構造であるとされている[1]。この計算された構造では、表面の$(CdSe)_{28}$ではほとんどのSeがCdより外側に位置しており、本研究で得たSeよりCdの方が外側に位置するという結果と異なる。また内部の$(CdSe)_6$を構成する原子はどれもほぼ同じ化学環境にあると言え、本研究の^{77}Seスペクトルに観測されたように化学シフトが大きく異なる2種類のサイトを持つとは考えにくい。したがって、本研究で得られた結果は、CdSe MSCが計算で予測されている$(CdSe)_{34}$の構造とは異なる構造を有する可能性を示している。今後は、より詳細な構造情報を得るために、^{113}Cd–^{77}Se相関NMRを行う予定であり、学会発表当日にはより具体的な構造モデルを提案し議論したいと考える。

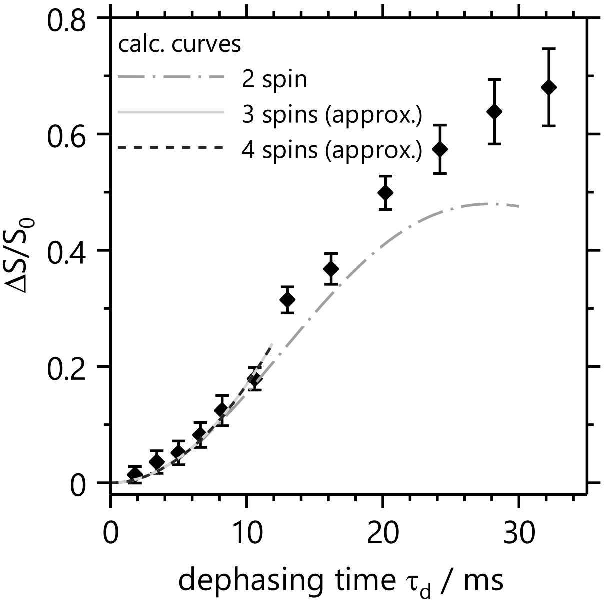


Fig. 3. ^{15}N–{^{77}Se} REDOR experimental fraction of CdSe-Cys and calculated REDOR curves.

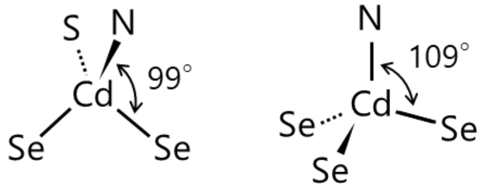


Fig. 4. Structural model of NSe_2 3 spin and NSe_3 4 spin systems suggested by REDOR.

4. 参考文献

[1] A. Kasuya et al., Nat. Mater. 3 (2004) 99.
[2] T. Kurihara et al., J. Phys. Chem. Lett. 8 (2017) 2555.
[3] 栗原ら，第56回NMR討論会，P72.
[4] M. Bertmer et al., J. Phys. Chem. B 104 (2000) 6541.
[5] Y.-S. Park et al., J. Phys. Chem. C 114 (2010) 18834.

P60

CdSeクラスターを保護するシステインの特異な運動の解析

○俣野晃広[1]，栗原拓也[1]，野田泰斗[1]，竹腰清乃理[1]
[1]京都大学大学院　理学研究科

Analysis for unique motion of cysteine capping CdSe cluster

○Akihiro Matano[1], Takuya Kurihara[1], Yasuto Noda[1], and K. Takegoshi[1]
[1]*Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University*

Variable-temperature ^{2}H solid-state NMR was performed to elucidate the mobility of cysteine capping the surface of a CdSe magic-sized cluster. At lower temperature, sharp center peaks and sharp side peaks were observed in the QCPMG spectra. At higher temperature, however, broad center peaks and sharp side peaks were observed. This result suggests that the spectra consist of two or more components with different mobility. To selectively analyze the mobile component, we observed the change of the center peak by measuring in a short pulse delay. By simulating the spectra based on an isotropic 4-site jump model, we obtained the jump rate at each temperature and the activation energy.

<はじめに>

有機分子を保護基として液相合成されるナノ粒子やクラスターは近年機能性材料としての応用研究が行われている。保護基はナノ粒子やクラスターの表面において分子単体では見られなかった運動性を発現することがあり、それが例えば金のナノ粒子では触媒の機能と相関することが報告されている。[1]このように、ナノ粒子やクラスターの物性や機能は表面に結合する有機分子の運動性と密接な関係を持っている場合があり、保護基がどのような運動をしているのかを調べることは重要な意味を持つ。

Ⅱ–Ⅵ族化合物半導体であるCdSeも保護基を用いることで液相中に大きさの揃ったクラスターを大量に合成することができる。これまで我々は、システインを保護基として用いて422 nmに鋭い吸光ピークを示すCdSeクラスター（以下、CdSe-Cys）を合成・固体化し、NMRを用いてシステインが構造安定化に果たす役割を研究してきた。[2,3] CdSe-Cysの^{1}H MAS NMRを測定すると、システインのCH_2のピークの線幅がシステイン単体のものよりも細く、更に{^{1}H}-^{13}C CP MASにおいて最大強度となるコンタクトタイムがシステイン単体よりも長くなることを見出した。これらのことは、保護基としてCdSe表面に配位しているシステインが結晶状態では見られない運動性を有していることを示唆している。本研究ではこの運動性を解析するためにCH_2基をD化したシステインでCdSe-Cysを合成し、その温度可変^{2}H NMRを行い得られた線形をシミュレーションと照らし合わせて運動を考察した。

CdSeクラスター、システイン、重水素NMR

○またのあきひろ，くりはらたくや，のだやすと，たけごしきよのり

<実験>

CdSe-Cysの合成は[3,3]-d_2-システイン(98%)粉末を用いて、以前我々が確立した方法を用いて行った。[2,3]

温度可変^{2}H NMRの測定には7 Tのマグネットを使用した。共鳴周波数46.126 MHzであった。温度較正にはd_4メタノールを用い、ODのピークとCD_3のピークの位置の差をΔδ ppmとして以下の式で較正した。[4]

$$T_{\mathrm{CD_3OD}} = -14.68 \times (\Delta\delta)^2 - 65.06 \times \Delta\delta + 159.48 + 3.8 \times 10^{-15} \times \mathrm{e}^{-13.2\Delta\delta}$$

測定ではラジオ波パルス強度を125 kHzに設定しsolid-echo法とQCPMG法(エコー間隔100 μs)を用い、温度を−75℃から40℃までの間で変化させた。また、スペクトルシミュレーションにはEXPRESS[5]を使用した。

<結果>

Fig. 1は(a) −50℃および(b) 40℃においてり測定されたCdSe-Cysの^{2}H QCPMGスペクトルである。40℃では後で述べるように、測定の繰り返し時間(Pulse Delay; PD) を変えて測定した。(a) −50℃では信号はすべてシャープである一方、(b1) 40℃では両肩の信号はシャープであるが、中心付近の信号は少しブロードになっている。このことより温度変化に対して運動性が変わる成分と変わらない成分が存在することがわかる。CdSe-CysのシステインにはSとNの両方がCdSeに結合しているものとSのみがCdSeに結合しているものの二種類が存在する。[2]その結合様式から後者が運動性を持ち、前者が持たないと考えられるので、二成分が存在するのは妥当であるといえる。

運動の遅い分子ほど縦緩和時間T_1は長くなる。この性質を利用して、測定の繰り返し時間(Pulse Delay ;PD)を短くしてNMRを測定することにより運動している成分を強調したスペクトルを選択的に観測することを試みた。実際に40℃においてPDを10 msと短く設定して測定したCdSe-Cysの^{2}H QCPMG NMRスペクトルをFig.1 (b2)に示す。PDを短くすることで両肩の信号に比べて中心が強調されたスペクトルが得られた。

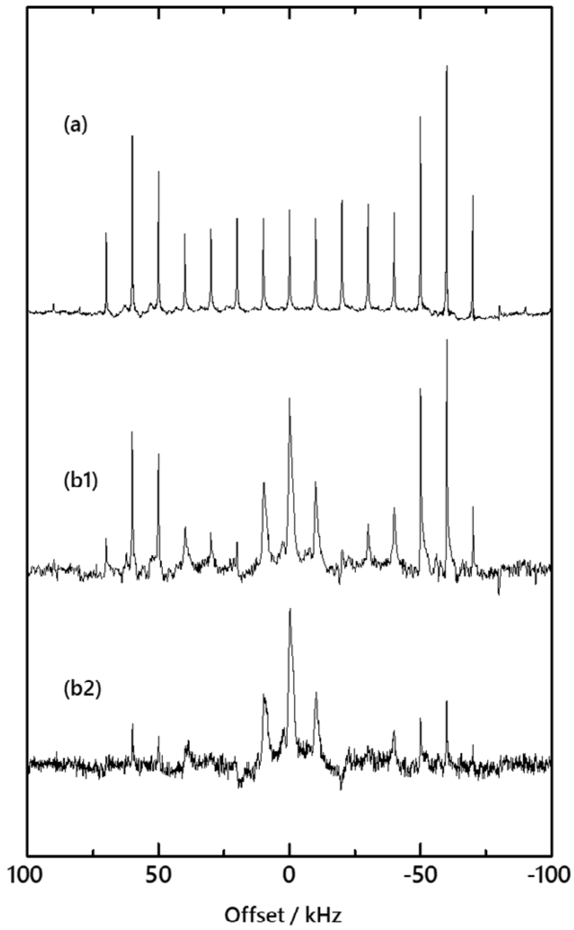


Fig. 1. VT ^{2}H QCPMG NMR spectra onbtained in the following conditions: (a) T = −50℃, PD = 8 s, NA = 800, (b1) T = 40℃, PD = 1 s, NA = 8000, and (b2) T = 40℃, PD = 10 ms, NA = 60000.

上記の議論に基づき、−10から40℃において10 msと短いPDで取得した^{2}H solid-echoスペクトルをFig. 2に黒線で示す。この線形の変化では、中心のピークが1本に細くなっていくので、この変化は等方回転運動によるものであると考えられる。[6]また、両肩のピークが残っているのは運動していない成分を完全には取り除けていないためであると考えられる。運動性を持つと思われるシステインはSのみがCdSe表面のCdと結合しているものである。しかしCd-Sの一軸回転だけでは等方的な回転運動にならない。したがってFig. 3のようにCd-S軸回転とS-C軸回転が合わさって等方回転のような挙動を示している可能性が考えられる。今回は単純化のため正四面体頂点間の4サイトをジャンプするモデルによって等方回転運動をシミュレートしている。このモデルでは4サイトの相対配向は4つのEuler角(α, β, γ) = (0°, 0°, 0°), (0°, β’, 0°), (0°, β’, 120°), (0°, β’, 240°)で定義される(Fig. 4)。この4サイト間を動く速度をジャンプレートkとしてシミュレーションを行った。β’が109.4°の時、このモデルは完全な等方回転を模すが、次式で示すようにβ’に依存するパラメーターAを変化させることで異方性の効果を取り込むことができる。[6]

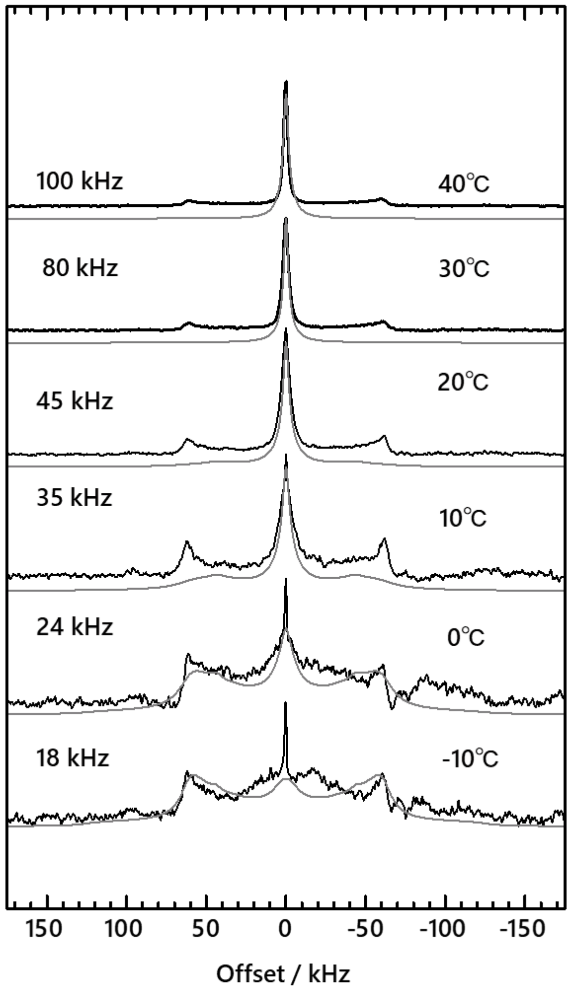


Fig. 2. ^{2}H solid-echo spectra obtained by experiments (black) and simulation (gray).

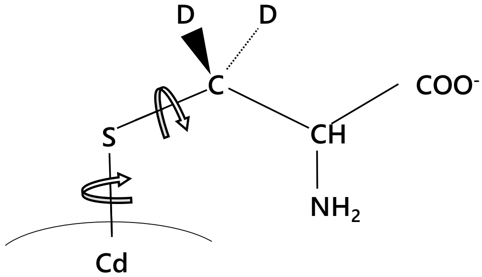


Fig. 3. A schematically represented model for combination of two rotations.

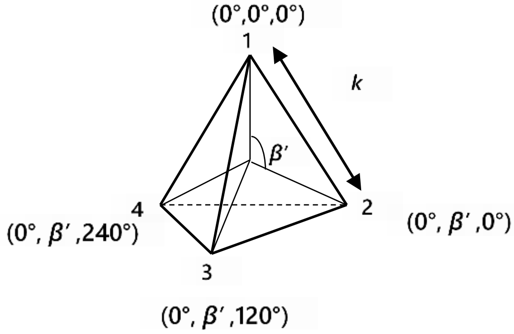


Fig. 4. A tetrahedral four site model.

Fig. 2中の灰色で示したスペクトルがシミュレーションの結果である。計測したスペクトルでは運動していない成分が完全には取り除けていないので両肩のピークが残っており、今回は運動している成分と思われる中心のピークに対してフィッティングした。このシミュレーションでは0℃から30℃の範囲でよく一致している。A = 0.05ではkを80 kHzよりも大きくしても線形が細くならなかったので40℃の線形に合うものは見つけられなかった。また、-10℃の線形に対してはシミュレーションの線幅を広げようとすると両肩のピークも大きくなるので、合うものを見つけられなかった。これらのことは回転の対称性が温度で変化しうることを示唆している。

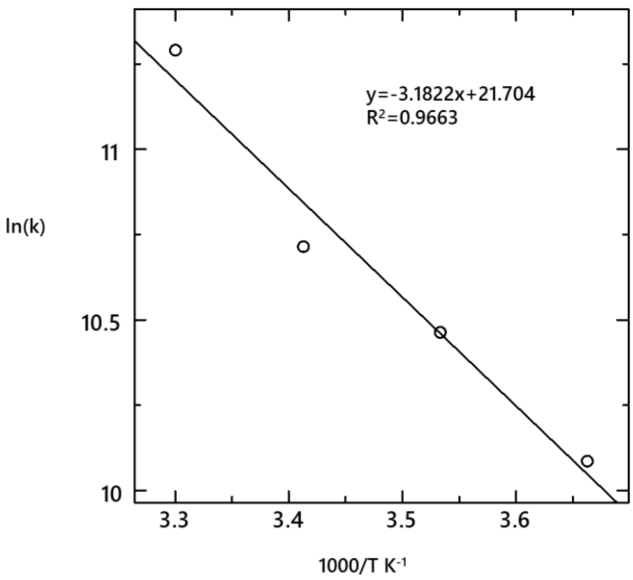


Fig. 5. Arrhenius plot for jump rate, k.

ジャンプレートkを温度の逆数に対してアレニウスプロットすることにより活性化エネルギーを求めることができる。Fig. 5に示したプロットでは上のシミュレーションがよく一致した0℃から30℃の値を用いた。このプロットから求めた活性化エネルギーは26.4 kJ/molであった。

これまでの研究により、保護基としてCdSe表面に配位しているシステインが結晶状態では見られない運動性を有しており、その運動の速度のオーダーを見積もることができた。このことはナノ粒子の固体では分子が運動できる空間が存在していることを示しており、新たな機能の発現や反応場として活用できることが期待される。

<謝辞>
本研究はJSPS科研費 新学術領域研究「複合アニオン化合物の創製と機能」(JP16H06440)の助成を受けて実施された。

<References>

[1] Ramesh Sharma *et al., J. Phys. Chem. C* **119**, 20100 (2015).
[2] 栗原ら、第54回NMR討論会 (2015)、P70.
[3] T. Kurihara *et al*., *J. Phys. Chem. Lett.* **8**, 2555 (2017).
[4] R.E. Hoffman, *Magn. Reson. in Chem.* **44**, 606 (2006).
[5] R.L. Vold *et al., J. Magn. Reson.* **198**, 57 (2009).
[6] M. Mizuno *et al., Macromol.* **47**, 7469 (2014).

P61 光照射固体NMRによるレチナール蛋白質の光中間体の定常捕捉とレチナール配座の解析

○内藤　晶[1], 槇野義輝[1], 川村　出[1], 藤原敏道[2], 松木　陽[2], 加茂直樹[3], 須藤雄気[4], 上田一義[1]
1 横浜国立大学　大学院　工学研究院
2 大阪大学、蛋白質研究所
3 北海道大学　大学院　先端生命科学院
4. 岡山大学　大学院　医歯薬学総合研究科

Retinal Configuration of *Pharaonis* Phoborhodopsin Photo-Intermediate of Retinal Proteins as Revealed by Photoirradiation Solid-State NMR

○Akira Naito [1], Yoshiteru Makino[1], Izuru Kawamura[1], Toshimichi Fujiwara[2], Yoh Matsuki[2], Naoki Kamo[3], Yuki Sudo[4], Kazuyoshi Ueda[1]
1 Graduate School of Engineering, Yokohama National University
2 Protein Institute, Osaka University
3 Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University
4. Graduate School of Medicine, Density and Pharmaceutical Science, Okayama University

Pharaonis phoborhodopsin (*p*pR) from *Natronomonas pharaonis* is a transmembrane photoreceptor protein involved negative phototaxis. Structural changes in *p*pR triggered by the photoisomerization of retinal chromophore are transmitted to its cognate transducer protein (*p*HtrII) during a cyclic photo-reaction pathway through several photo-intermediates. We observed the ^{13}C CP MAS NMR signals of late photo-intermediates such as M-, O- and N'-intermediates by illuminating with green light (520 nm). The N'-intermediate was newly observed in this experiment. Under UV light irradiation of the M-intermediate, the O-intermediate was appeared with the 13-trans, 15-syn configuration. Thus, photo-irradiation NMR studies revealed the photoreaction pathways from the M- to O- intermediates and the equilibrium state between the N'- and O-intermediate. In contrast to the case of bR, N'-intermediate was transformed from the O-intermediate rather than the M-intermediate.

【序論】

高度好塩好アルカリ細菌である*Natronomonas pharaonis*に存在するレチナールタンパク質フォボロドプシン*p*pR(あるいはセンサリーロドプシンII，SRII)はその固有のtransducerタンパク質*p*HtrIIと2:2の複合体を形成して負の光走性の信号を伝達する光受容膜タンパク質である。この*p*pR/*p*HtrII複合体は光照射によってK,L,M,O−中間体を経て元に戻る光反応サイクルをもっている。この光反応サイクルの中でM−中間体は負の光走性を示す信号を下流のリン酸化酵素に伝え、鞭毛モーターを制御して負の光走性を示す光信号伝達系をもつことが知られている。

光照射固体NMR分光法は光受容レチナール結合膜蛋白質の光反応サイクルで生成する光反応中

レチナールタンパク質、光中間体、光照射固体ＮＭＲ

○ないとう　あきら、まきの　よしてる、かわむら　いずる、ふじわら　としみち、まつき　よう、かも　なおき、すどう　ゆうき、かずよし　うえだ

間体の観測に有効である。この測定には光照射下でNMR信号を観測することが重要であるが、固体NMR装置ではMASプローブを用いているため、光照射を行うのは容易ではない。このため、本研究ではin situ光照射固体NMR装置の開発を行った[1-8]。

本研究では*in-situ*光照射固体NMR分光法を使用して、光照射によって光中間体を捕捉し、中間体を経て、*p*pRから*p*HtrIIに信号が伝わる過程を明らかにすることを目的として測定を行った[1,8]。

【実験】

１．光照射固体ＮＭＲ分光器の開発

Fig. 1に光照射固体NMR分光器の概略を示す。光はLED光源から発生させ、光ファイバーを通して超電導磁石の外側から、プローブ内を通って、プローブヘッドまで伝送した[1,2]。固体MAS－NMRで使用する試料管はジルコニア製であり、透明な材質ではない。そこで、試料管の蓋には透明なガラスを使用し、このガラスの蓋の上に光ファイバーの先端を非接触な状態で固定した。したがって、光はガラスの蓋を通って、試料管内部に到達する。カラスの蓋の先端はスリガラス状にしてあるため、光は先端で散乱して試料管の内壁にフィルム状に広がった光受容膜タンパク質試料に垂直な方向からの光照射が可能となる。フィルムに平行に光照射した場合は全反射を起こし、試料内部に光照射することができない。したがって、この方式により、格段に効率のよい光照射が可能になった。

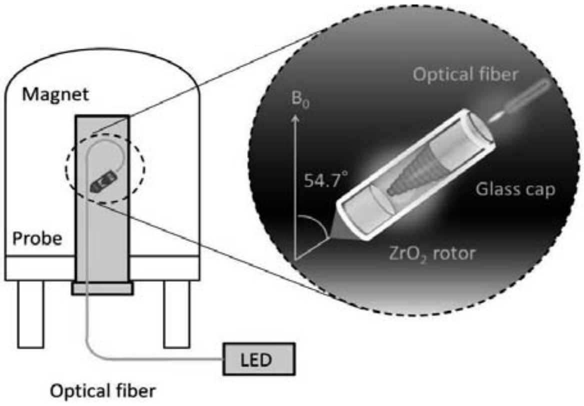


Fig. 1 Schematic illustration of *in situ* photo-irradiation solid-state NMR spectrometer [5].

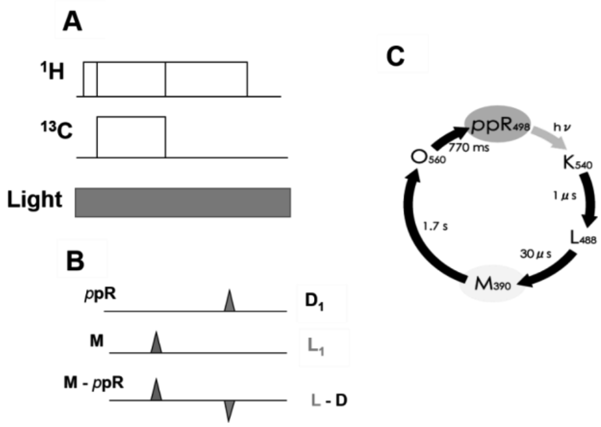


Fig. 2 (A) CP MAS pulse sequence under green light irradiation. (B) The schematic experimental protocol. First, the G state was observed in the dark state (D). Second. The M-intermediate was observed under green light irradiation (L). We analyzed the photoreaction pathway by obtaining difference spectrum (L – D), in which negative peak indicates reactant and positive peak indicates product.

２．光受容膜タンパク質の光反応中間体の定常捕捉とNMR観測

細菌類の光受容膜タンパク質は発色団としてレチナールを含んでいる。例えばホボロドプシン(ppR)(またはセンサリーロドプシンII,SRII)の場合、光反応サイクルはFig. 2Cのように光照射によりppR（G状態）からK－中間体が生成し、次にL-，M-，O-中間体を経てG状態に戻る光反応サイクルを取る[1]。Fig. 2Cに示すようにM-中間体の半減期が他の中間体に比べて1.7 sと各段に長いことが分かる。この場合、連続

光照射を行うと、光反応サイクルは回転しつづけるが、寿命の長いM-中間体の占有数が増加していく。すなわち、定常的にM-中間体が捕捉される。このような捕捉の仕方を定常捕捉（Stationary Trapping）と名付けた。

NMR信号を観測するにはFig. 2AのCP-MASパルス系列を用いてまず暗状態（D1）でNMR信号を観測する(Fig. 2B,D1)。このときG状態の信号が観測される。次に緑色光照射を行いながら信号を観測する（Fig. 2B、L1）。このときM-中間体の信号が観測される。これらの信号の差スペクトルをとると（Fig. 2B、L-D）反応物の信号（G状態）は負のピークになり、生成物の信号（M-中間体）は正のピークになる。この結果、光反応経路を特定することが可能になった。

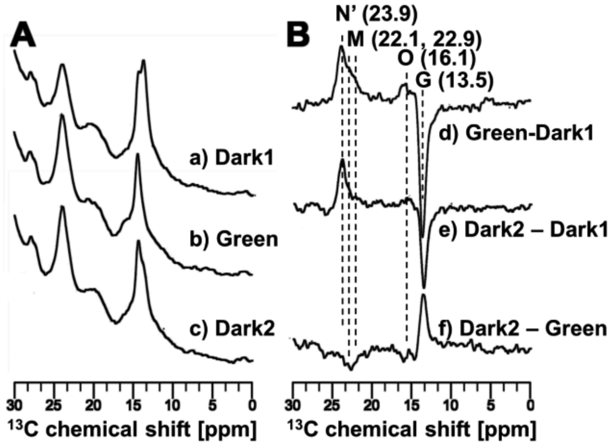


Fig.3 ^{13}C CP-MAS NMR spectra of [20-^{13}C]retinal-*p*pR/*p*HtrII complex at -40 ºC using a 4 kHz MAS frequency. (A)(a) Acquired under dark condition (Dark 1), (b) acquired under green light condition (Green), (c) obtained one day after turning off irradiation (Dark 2). (B) The difference spectra (d) Green – Dark1, (e) Dark2 – Dark1, and (f) Dark2 – Green) [8].

【結果と考察】

1. 光照射固体NMRによる光受容膜タンパク質 *p*pR(SRII)/*p*HtrII 複合体の光反応サイクルの解明

本研究では *p*HtrII の構造変化を調べるため[20-^{13}C]Ret-*p*pR/*p*HtrII複合体における^{13}C CP-MAS NMR信号を観測した。まず暗状態で^{13}C NMRスペクトルを観測し(Fig. 3Aa)、次に520 nm LED照射状態で^{13}C NMRスペクトルを観測した(Fig. 3Ab)。その後、緑色光照射状態から暗状態を差し引いたスペクトルを求めた(Fig.3Bd)。このスペクトルの解析から、レチナールのG-状態が減り、M-中間体の信号が増加したことが判明した。加えて、N'-中間体(13-*cis*)およびO-中間体(13-*trans*)も捕捉された（Fig. 3Bd)。N'-中間体は*p*pRではこれまで観測されていない中間体である。

次に、M-中間体が補足された状態で、365 nm LEDを照射したところ、M-中間体の一部が減少し、一部は残留することが判明した(Fig. 4Ab)。この残留成分はN'-中間体であると帰属した。さらにG-状態の低磁場側に新たな信号が増えたことから、O-中間体の生成が示唆された(Fig. 4Ac)。この結果はM-中間体が緑色光照射により

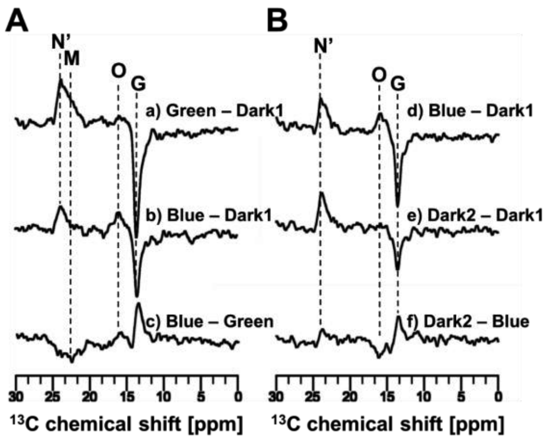


Fig. 4 ^{13}C CP-MAS NMR difference spectra of the [20 ^{13}C] retinal labeled *p*pR/pHtrII complex measured at -40 ºC. A(a) Green – Dark1, (b)Blu – Dark1, (c) Blue – Green. B(d) Blue – Dark1, (e) Dark2 – Dark1, (f) Dark2 – Blue [8].

O-中間体に変化する光反応過程が存在することを示している。さらに、このN' - およびO-中間体は平衡状態になっていることが示唆された (Fig. 4Ab)。この結果、*p*pR/*p*HtrII 複合体に紫外線照射した場合、O-中間体生成する波長依存的光反応過程の存在が明らかになった(Fig. 5)。

【結論】

本研究では光照射固体NMR装置を用いて、光照射下でNMR測定を行い、タンパク質内の発色団レチナールの光中間体を定常捕捉することが可能になった。－40℃、暗状態で緑色光(520 nm)照射を行ったところ、G-状態から光異性化を起こして、M- 状態 O- 状態 N'-状態の光中間体が定常的に捕捉された。また、M-中間体に紫外光(365 nm)照射を行ったところ、O-中間体に変換され、さらにO-中間体はN'-中間体と平衡反応を示す光反応経路(Fig. 5)が本実験で明らかになった。

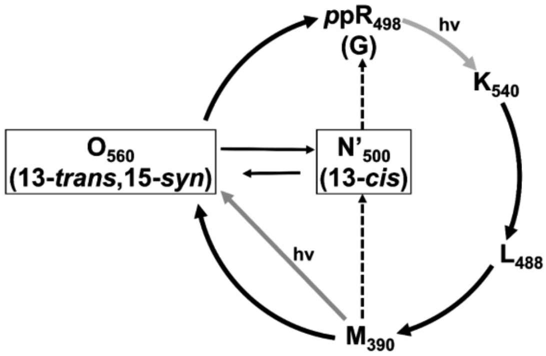


Fig. 5 The photoirradiation pathways of *p*pR indicating the N'-intermediate, as revealed by in situ photoirradiation solid-state NMR measurements [8].

【文献】

[1]. Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Nishio, K. Ohsawa, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, A. Ramamoorthy, A. Naito. An active photoreceptor intermediate revealed by in situ photoirradiated solid-state NMR spectroscopy. Biophys. J. 101, L50-L52 (2011).

[2]. H. Yomoda, Y. Makino, Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, A. Naito, Color- discriminating retinal configurations of sensory rhodopsin I by photo-irradiations olid-state NMR spectroscopy. Angew. Chem. Int. Ed. 53, 6960-6964 (2014).

[3] A. Naito, I. Kawamura, Advances in Biological Solid-State NMR-Proteins and Membrane Active Peptides. Ch. 20 Photoactive structural changes in photoreceptor membrane proteins as revealed by in situ photoirradiation solid-state NMR spectroscopy. Eds. F. Separovic, A. Naito. Royal Society of Chemistry (2014).

[4]. K. Oshima, A. Shigeta, Y. Makino, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, S. Tuzi, T. Iwasa, A. Naito. Characterization of photo-intermediates in the photo-reaction pathways of a bacteriorhodopsin Y185F mutant using in situ photo-irradiation solid-state NMR spectroscopy. Photochem. Photobiol. Sci., 14, 1694-1702 (2015).

[5] A. Naito, I. Kawamura, N. Javkhlantugs, Recent solid-state NMR studies of membrane-bound peptides and proteins Annu. Rep. NMR Spectrosc., 86, 333-411 (2015)

[6] A. Naito, Y. Makino, I. Kawamura. In-situ photo irradiation solid-state NMR spectroscopy applied to retinal binding protein. Modern Magn. Reson. In press (2017).

[7] A. Naito, Y. Makino, Y. Tasei, I. Kawamura. Photoirradiation and microwave irradiation NMR spectroscopy. Experimental approaches of NMR spectroscopy. Methodology and application of life science and materials science. The NMR Society of Japan. Ed. Springer (2018).

[8] Y. Makino, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, N. Kamo, Y. Sudo. Retinal configuration of ppR intermediates revealed by photoirrdiation solid-state NMR. Biophys. J. 115, 72-83 (2018).

P62

^1H NMR 緩和時間法によるセメント間隙中水移動過程の解明

○坂田渚彩[1]，舘幸男[2]，岩舘泰彦[1]，大窪貴洋[1]
1 千葉大学大学院 工学研究院
2 日本原子力研究開発機構 核燃料サイクル工学研究所

Study of water transfer in cement interstices by ^1H NMR relaxation time method

○Nagisa Sakata [1], Yukio Tachi [2], Yasuhiko Iwdate[1], Takahiro Ohkubo[1]
1 Graduate School of Engineering, Chiba University
2 Japan Atomic Energy Agency

Cement-based materials will be used as a component for radioactive waste disposal facility. Understanding water paths in cement-based materials is a key to evaluate their long-term performance. It is well known that ^1H transverse relaxation (T_2) of water filled pores is related to their porous structure. In this study, ^1H T_2 distribution analyses were applied to hydration process of cement-based materials, and the relationship between porous structure and mass transport was discussed. Experimental results showed that the main path of water is the grain boundary between cement and silica sand contained in mortar. In addition, C-S-H gel layers in cement and C-S-H gel pore cannot contribute as a path of water.

【緒言】
放射性廃棄物の処分において，セメント系材料は廃棄物容器の充填材や処分施設の構造材料として用いられ，放射性核種の移行抑制効果などが期待されている。また，福島第一原子力発電所の事故に伴い発生するコンクリート廃棄物の評価においても，セメント系材料中への核種の移行評価が重要となる。そのため放射性核種のセメント材料中での移行挙動を解明する必要がある。放射性核種の多くは水を媒介としてセメント材料中を移行することから，水和反応によって形成する「水の通り道」を定量的に評価することが望まれている。

多孔質材料の間隙を充填する水の横緩和時間(T_2)は水の存在する間隙構造を反映する。そのためT_2測定からセメントの固化反応で経時変化する間隙構造の変遷を非破壊でモニターすることが可能である。本研究では，種々の条件で調製したセメントペーストを対象に間隙構造の経時変化をT_2により評価した。さらに，固化したセメント材料をD_2Oと接触させることで，水の通り道となる間隙構造を抽出することを試みた。NMR実験により得られた結果は，放射性核種の拡散実験の結果と比較することで水の通り道と物質移動の関係を検討した。

【実験】
試料はNMR測定用のPTFE製円筒状容器 ($\phi = 10$, $h = 28$ mm)中にホワイトセメントとイオン交換水を水セメント比45,50(WC45,WC50)で混合し調製した。1日ごとに^1H NMRのスピンエコー信号を取得し，セメントペースト調製3時間後から20日後までの経時変化を測定した。また，セメントペースト調製20日後より試料を重水で満たしたタンクと接触させ，セメント固化体中のH_2O

セメント，水，NMR緩和時間法

○さかたなぎさ，たちゆきお，いわだてやすひこ，おおくぼたかひろ

を D_2O で交換する実験を行った。核磁気共鳴装置は Maran Ultra(Oxford 社製，静磁場強度: 0.54 T)を用いた。スピンエコー測定は 100 μs オーダーから 1s までの広い範囲の T_2 を観測するため，120 μs から 160 μs までエコー時間を $\log_{10}$ スペースで 160 ポイント変化させながら測定した。S/N 比が 1500:1 程度になるよう積算回数は 5120 回とした。得られたスピンエコー信号の逆ラプラス処理により T_2 分布を得た[1]。逆ラプラス処理の条件は，100 μs から 1 s の範囲を $\log_{10}$ スペースで 10000 ポイントに離散化した T_2 とし評価関数χを最小化するよう係数ベクトル F を最適化して得た。

$$\min|\chi| = |M - K \cdot F| - \alpha|F|$$

ここで M は実測したスピンエコーのベクトルデータ，K は離散化した T_2 と測定したエコー時間の指数関数からなるカーネル行列，αはスムージングパラメータである。既報よりセメント中の水は 4 成分に分類できることが知られているため，4 つのピークが得られるようαを調整し解析を行った。

【結果と考察】

図1にWC45のエコー信号の一例を，図2に図1のエコー信号のラプラス逆変換を行って求めたT_2分布を示す。先行研究よりピークは緩和時間の短い方から C-S-H ゲル層間水，C-S-Hゲル間隙水，キャピラリー水(ペースト調製直後は水和物中)と帰属した[2]。セメントペースト調製3時間後の信号強度が最大となり，その後は時間の経過に伴い信号強度は減少し調製16日後からほぼ一定の値をとった。また，時間の経過とともにC-S-H ゲル層間水，C-S-Hゲルポア水のピーク面積は増大，キャピラリー水のピーク面積は減少しそれぞれ調製16日後からほぼ一定の面積をとった。これはセメントの水和反応が15日程度でほぼ完了し，スピンエコーで観測される液体水の量と間隙構造がほとんど変わらなくなったためと考えられる。またD_2Oとの接触によるT_2分布の経時変化は確認できなかった。なお，重水導入開始直後の信号強度およびキャピラリー水のピーク面積が増大は，重水の導入に伴い自由水全体の量が増加したためと考えられる。以上の傾向はWC50で調整したセメント試料についても同様にみられた。

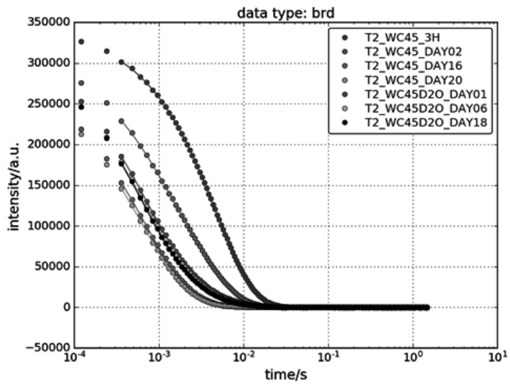


Fig. 1 White cement (WC45) echo signal

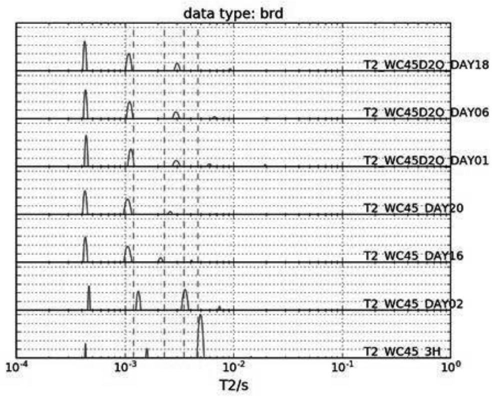


Fig. 2 White cement (WC45) T_2 distribution

既報によるモルタル中でのトリチウム拡散試験[3]より10日間の拡散距離を計算すると，およそ1 cmであることからD_2Oとの接触により水の交換が起こりT_2分布の変化が予測される。しかしいずれのT_2ピークも変化が観測されなかった理由は，セメント中のC-S-H ゲル層間，C-S-Hゲル間隙は水の通り道として機能せず，モルタルに含まれる珪砂との粒界が通り道となっている可能性があると考察した。発表では同様の試験をホワイトセメントモルタル，普通ポルトランドセメント，普通ポルトランドセメントモルタル，1年以上の長期に渡って養生を行ったモルタル試料について行った結果と併せてセメント中の水移動挙動と間隙構造の関係について考察する。

参考文献

[1] J.P. Butler et al., SIAM. J. Number Anal., 18, 381-397 (1981)
[2] A.C.A. Muller t al., J. Phys. Chem., 117, 430-412 (2013)
[3] 稲垣八穂広　プラズマ・核融合学会誌 第76巻第10号, 1044-1050(2000)

P63 固体NMRによるβ_2-microglobulinアミロイド線維の立体構造解析

○田巻初[1]，宗正智[1]，後藤祐児[1]，藤原敏道[1]，松木陽[1]
1大阪大学 蛋白質研究所

Structural analysis of β_2-microglobulin amyloid fibril by solid-state NMR

○Hajime Tamaki [1], Masatomo So [1], Yuji Goto [1], Toshimichi Fujiwara [1], and Yoh Matsuki [1]
1*Institute for Protein Research, Osaka University*

Amyloid fibril of β_2-microgloblin (b_2m) causes dialysis-related amyloidosis (DRA). However, the fibril forming mechanism, including the tertial structure, is still unclear. We successfully prepared isotope labeled b_2m amyloid fibril by seeding of a clinical sample removed from a DRA patient. 80% of the backbone chemical shifts of the fibril core region have been assigned using signals from standard 3D spectrum series, and the backbone dihedral angles were predicted from the chemical shifts. Most of dihedral angles agree with those from fibrils fully formed *in vitro*, reported by Radford, Griffin and co-workers. Surprisingly, some turn positions are not consistent, suggesting the fibril structure formed *in vivo* is different from those formed *in vitro*. Our study shows importance of structural analysis of amyloid fibrils grown from *in vivo* seeds for revealing clinically relevant amyloid forming mechanism.

アミロイド線維はタンパク質の凝集体であり、神経変性疾患などの疾病やペプチドホルモンの貯蔵等に関与する。β_2-microglobulin（b_2m）は、長期間の人工透析によってアミロイド線維を形成し、手根管症候群などの透析アミロイドーシス（DRA）を引き起こす。しかしb_2mのアミロイド形成機構の詳細は、線維状態の立体構造も含め未だ明らかになっておらず、DRAの根本的な治療法は確立されていない。アミロイド形成機構には共通のルールが存在すると考えられていることからも、その立体構造解析は重要である。本研究の目的はb_2mアミロイド線維の立体構造を固体NMR法を用いて決定することである。

アミロイド線維は線維化条件によって様々な形態をとることが知られている。近年、アルツハイマー病と関連があるAβについて、その症状と線維形態に相関が見られることが明らかとなった[1]。つまり、疾病と関連するアミロイド線維は、病理組織から得られた線維の構造を解析することが望まれる。アミロイド線維には伝搬性をもつものがあり、線維断片をタンパク質溶液に加えることで同じ構造をもつ線維を増幅できる（シーディング）。我々はDRA患者から摘出されたb_2mアミロイド線維をシーディングし、同位体標識された線維を得ることに成功した。さらに線維コア部分の主鎖の約80%を帰属することに成功した。本討論会では、その詳細とRadford・Griffinらから報告されている*in vitro*で形成された線維の研究結果[2]との違いを議論する。

アミロイド線維、β_2-microglobulin

○たまきはじめ、そうまさとも、ごとうゆうじ、ふじわらとしみち、まつきよう

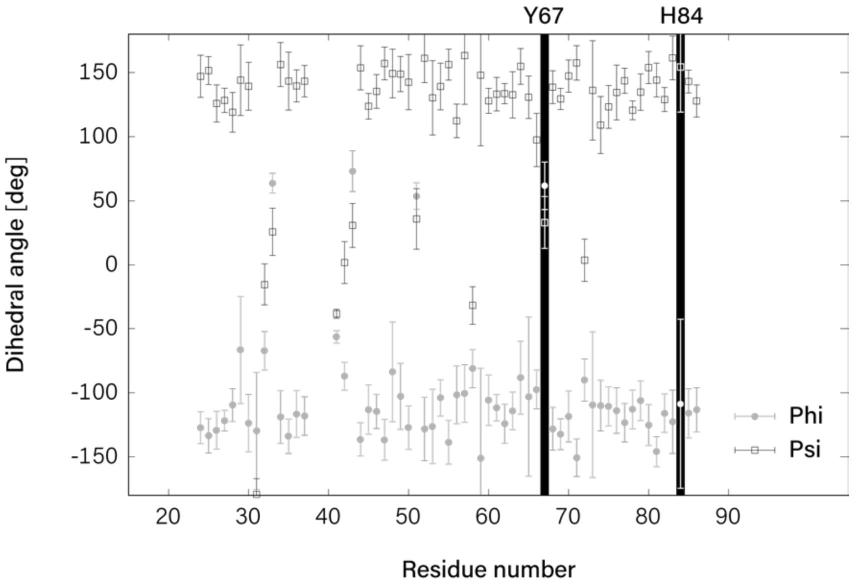


Fig.1
TALOS+ predicted backbone dihedral angles of b$_2$m amyloid fibril grown from *in vivo* seeds (phi, filled circles, psi, open squares). The black bars indicate positions of Y67 and H84 residues.

■実験方法

DRA患者組織から精製したb$_2$mアミロイド線維をシードとし、これを大腸菌発現系で調製した同位体標識b$_2$mに加えることで固体NMR試料を得た。同位体標識b2m線維の増幅は酸性条件下で行なった。同位体標識は、^{13}C, ^{15}N均一標識体に加え、[1,3-^{13}C]-および[2-^{13}C]-グリセロールを炭素源に用いたスパース標識体を調製した。測定はJEOL RESONANCE ECA-II 600 MHzを用い、MAS 12.5 kHz、プローブ温度-10 ℃の条件下で行なった。

■結果

アミロイド線維形成がシーディングによって加速されたことから、*in vivo*で形成されたアミロイド線維を増幅できたことが確認された。^{13}C, ^{15}N均一標識体の各種三次元スペクトルを用いて、線維コア部分の約80%の残基の主鎖^{13}C, ^{15}N化学シフトを帰属した。さらにスパース標識体を用いて残基間の^{13}C-^{13}C相関を測定した。スパース標識により双極子トランケーションの影響が低減され、隣接残基間の明瞭な相関が得られたことで、連鎖帰属の結果のバリデーションが可能となった。

帰属した主鎖化学シフトについて、TALOS+を用いて主鎖二面角を予測した。Radford・Griffinらのグループが報告した、*in vitro*で線維化した試料での解析結果[2]と同様に、ほとんどの残基がβ-ストランド構造をもつことが確認されたが、ターンの位置が異なる可能性があることが明らかとなった。例えば、我々の解析結果はY67で主鎖がターンしていることを示唆しているが、*in vitro*の線維ではβ-ストランド構造であると予測されている。一方、*in vitro*線維ではH84でターンしていると予測されているが、我々の結果はβ-ストランド構造であることを示唆している。このように、*in vivo*線維でシーディングし構造解析することが重要であることがわかる。

現在、より詳細な解析のために、側鎖^{13}Cの帰属、および^{13}C-^{13}C/^{13}C-^{15}N間距離測定を行なっている。討論会では、それらの結果も含めて発表する予定である。

■参考文献

[1]Qiang et al., *Nature* 541, 217-221 (2017)
[2]Su et al., *J. Am. Chem. Soc.* 136, 6317-6325 (2014)

P64

Xe-129 NMR を用いた低温における PPO への Xe 収着による可塑化現象の観察

名工大院・工　○石谷創・吉水広明
名古屋工業大学・大学院工学研究科

Observation of Plasticization Phenomenon by Xe Sorption to PPOat Low Temperature by Xe-129 NMR

In this study, in order to investigate the plasticization phenomenon due to gas sorption to PPO which is a glassy polymer, QCM method was used to measure Xe sorption characteristics at low temperature, the mobility of polymer chains were examined by H-1 pulse NMR, sorbed Xe motility was evaluated by Xe-129 NMR. From the analysis of sorption isotherms obtained here, it is apparent that they are plasticized despite at low temperature. From the H-1 pulse NMR and Xe-129 NMR spectra, it was confirmed that both the mobility of polymer chains and sorbed Xe increased at low temperature and high pressure.

＜緒言＞

これまで二酸化炭素のような凝集力の大きいガスはポリマーを可塑化させることが知られていたが、当研究室の先行研究により不活性ガスである Xe もポリマーを可塑化させることがわかった。このことから、より低い温度かつ高い圧力において実験を行うことにより、可塑化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。このため、本実験では高い圧力下では高い圧力まで Xe を収着させ可塑化現象を観察した。しかし、高い圧力下での実験は爆発の危険性があり非常に危険である。したがって、高い圧力下においても安全に実験を行える水晶振動子マイクロバランス法(Fig.1)を用いて実験を行った。

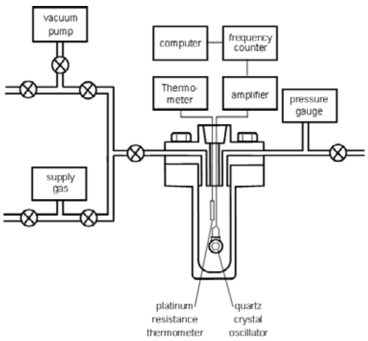


Figure1 Schematic illustration of quartz crystal microbalance.

＜実験方法＞

サンプル調製は以下のように行った。PPO 5 mg をクロロホルム 10 mL 中で 24 h 攪拌した。その後、水晶振動子上に滴下し 1750 回転 / min で 80 秒間、2500 回転 / min で 80 秒間スピンキャストした。そして、真空下で 230 ℃ で 3 h アニーリングした。ザウエルブレイの式を用いて水晶振動子に塗布した PPO の重量を求め、そこから体積を算出した。また、-50、-30、25 ℃ における Xe 収着特性を水晶振動子マイクロバランス法(QCM 法)により測定した。

ガラス状高分子、可塑化、Xe- 129 NMR

○いしたにはじめ・よしみずひろあき

また、H-1 パルス NMR 測定には BLUKER minispec mq20 をもちいて Solid Echo 法により、-50、

-25 ℃において測定を行った。Xe-129 NMR 測定に関しては Agilent Technology 400 plus NMR を用いて-50、25 ℃において圧力を変化させながら測定を行った。

＜結果及び考察＞

25 ℃では二元収着型の収着等温線を示したが、-30 ℃、-50 ℃では二元収着型に従わなかった。(Fig.2)このことから、低温かつ高圧においてはガラス状高分子である PPO が不活性ガスである Xe により可塑化されたことが確認できた。また、二元収着モデルパラメーターを算出したところ、ミクロボイドの総数を示す C_H'が温度を低くするに従って、増加していることが確認できた。

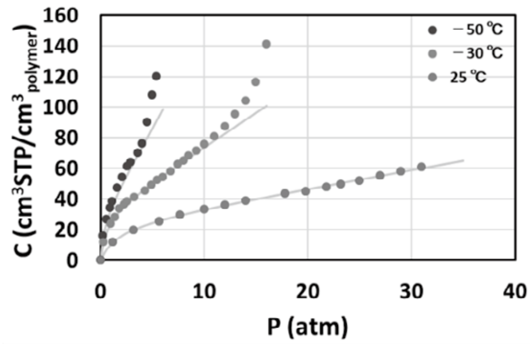


Figure2 Xe sorption isotherms of PPO at various temperatures.

高分子鎖の運動性を評価するために 1H パルス NMR 測定を行った。(Fig.3)緩和時間 T_2 の結果により、25 ℃においては 0 atm、9 atm ともに変化は見られなかったのに対し、-50 ℃では 0 atm と 9atm を比較したところ 8 μs 遅れた。このことから、低温にすることで高分子鎖の運動性が上昇したことがわかった。また、収着した気体の運動性を評価するために Xe-129 NMR 測定を行った。この結果、25 ℃では圧力変化によるピークの半値幅の変化は見られなかった。しかし、-50 ℃では圧力増加に従い、半値幅が小さくなった。このことから、収着した Xe の運動性についても低温の方が高いことが示唆された。

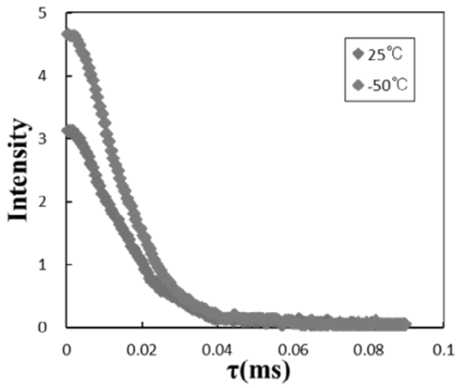


Figure3 T_2 relaxation curves of PPO at 0atm.

P65

ポリ（γ - グルタミン酸）とその複合体の固体NMRを用いた構造解析

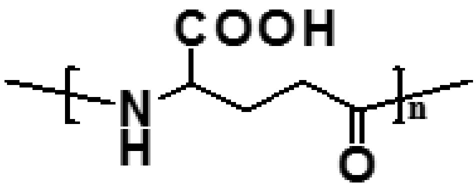
○藤井美暉子，斎藤京子，前田史郎
福井大院工

Characterization of Poly(γ-glutamic acid) and its polymer complex by Solid NMR

○Mikiko Fujii, Kyoko Saito, and Shiro Maeda
Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, 910-8507, Fukui, Japan.

Molecular structure analysis of microbial poly(γ-glutamic acid) (γ-PGA) with different D/L ratio and its polymer complex was done by IR and solid NMR. Free form (acid form) of DL-γ-PGA shows a characteristic peak at 171ppm in ^{13}C solid NMR spectrum and a strong absorption band at 1735 cm^{-1} in IR spectrum which are not observed in its sodium salt, γ-PGANa and L-γ-PGA. Carbonyl carbon peak of DL-γ-PGA was curve fitted to three peaks: A in the lowest field side was assigned to main chain amide carbon. Two peaks in the higher field side were assigned to two different kinds of side-chain carboxyl groups, one for the carboxyl group which forms the strong hydrogen bonds among carboxyl groups (dimeric form) and the other for free carboxyl group.

【はじめに】



Scheme1. Repeating units of poly(γ-glutamic acid) (γ-PGA).

ポリ(γ-グルタミン酸)(γ-PGA)(Scheme1)は、グルタミン酸のα-アミノ基とα-カルボキシル基がアミド結合により結合した通常のポリ(α-グルタミン酸)とは異なり、α-アミノ基とγ-カルボキシル基が結合したポリアミノ酸であり、水溶性および生分解性を有する陰イオン性のポリマーである。産生菌によって、D体、あるいは、L体のみで構成されるD-γ-PGA、L-γ-PGA、D体とL体が様々な比率で混じっているDL-γ-PGAが産生される。ナトリウム塩型γ-PGANaについては、D/L比にかかわらず、水に可溶である。一方で、DL-γ-PGAは水に不溶だが、L-γ-PGAは水に溶解する。本研究では、D/L比が異なるγ-PGAを用いてIR、固体NMRスペクトルを測定し、DL-γ-PGAに特徴的な171ppmのピーク[1]について検討した。また、γ-PGAを用いて複合体を作成し、その構造にD/L比が及ぼす影響についても検討する。

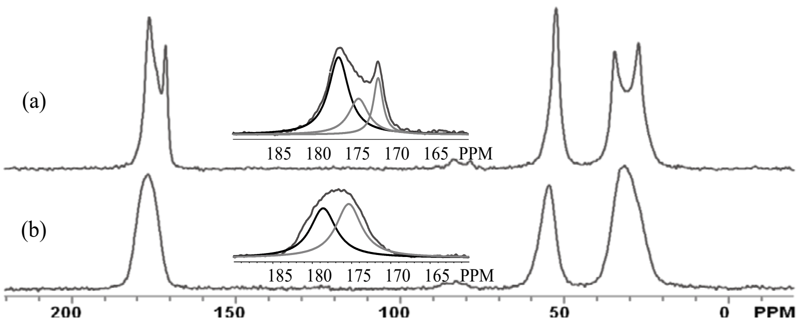


Figure 1. ^{13}C solid NMR spectra of (a)DL- γ-PGA powder and (b) DL-γ-PGANa powder (D/L=7/3).

ポリ(γ-グルタミン酸)，固体NMR，微生物産生高分子

○ふじいみきこ，さいとうきょうこ，まえだしろう

【実験】

D/L=8/2（味の素）、5/5（ヤクルト薬品工業）、0/10（東洋紡）のγ-PGANaは各社から提供されたものを、D/L=7/3（和光純薬）のγ-PGANaは購入したものをそのまま用いた。各γ－PGANa水溶液にHCl、NaOHを加え、pHを調整した。pHがpKa以下で沈殿を生じるD/L=8/2、7/3、5/5のDL-γ-PGAについては沈殿を蒸留水で洗浄したのちに､沈殿が生じないpH領域およびD/L=0/10のL-γ-PGAはそのままテフロンシャーレ上にキャストし、数日間減圧乾燥しフィルム状の試料を作成した。

【結果と議論】

Figure 1に、D/L=7/3のDL-γ-PGAとナトリウム塩型DL-γ-PGANaのパウダーの^{13}C固体NMRスペクトルを示す。カルボニル炭素領域において、(a)のDL-γ-PGAのみに171ppmに鋭いピークが現れている。(a)のDL-γ-PGAのカルボニル炭素のピークは3つに波形分離でき、最も低磁場側のピークは主鎖のアミド炭素のピーク、他2つのピークは側鎖のカルボニル炭素のピーク、そのうち低磁場側のピークはフリーのCOOH、高磁場側は、2量体を形成しているCOOHのピークと考えている。また、(b)のDL-γ-PGANaでは、低磁場側のピークは主鎖のアミド炭素、高磁場側は、側鎖のCOO$^-$と帰属した。DL-γ-PGANaのpHをγ-PGAのpKa(=2.23)よりも低くすると，スペクトルの形はγ-PGAに酷似し、171ppmに鋭いピークが現れるとともに、IRスペクトルの1735cm^{-1}に大きな吸収が現れる。

Figure 2と Figure 3に、それぞれDL-γ-PGANaとL-γ-PGANaの異なるpHにおける^{13}C固体NMRスペクトルを示す。L-γ-PGAではpHがpKa以下においても二量体と考えられる171ppmにピークを示さなかった。しかし、DL-γ-PGAと同様に、カルボニル炭素のピークはpHが下がるにつれて高磁場にシフトすることから、二次構造の変化が起きていることが考えられる。

また、DL-γ-PGANa、L-γ-PGANaから形成されるイオン複合体の構造についても検討を行った。

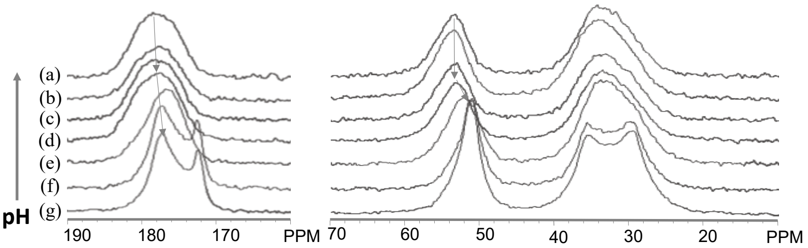


Figure 2. ^{13}C solid NMR spectra of DL- γ-PGANa(D/L=7/3) film cast from aqueous solution at (a)pH11.37 (b)pH9.30 (c)pH7.14 (d)pH4.87 (e)pH3.32 (f)pH2.27 (g)pH1.51

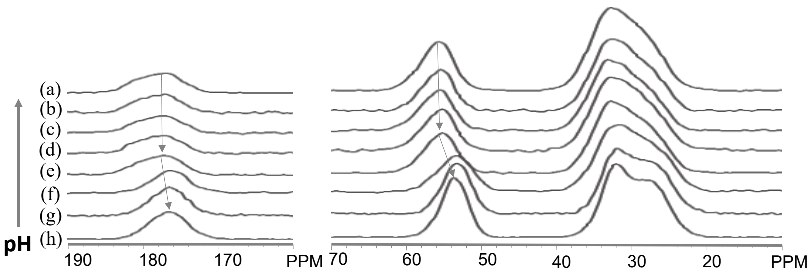


Figure 3. ^{13}C solid NMR spectra of L-γ-PGANa(D/L=0/10) film cast from aqueous solution at (a)pH=12.68 (b)pH=11.71 (c)pH=9.67 (d)pH=7.14 (e)pH=5.06 (f)pH=2.97 (g)pH=2.08 (h)pH=1.00

【引用文献】

[1]S. Maeda and Y. Shimizu, *Polym. Preprints, Jpn.* **57**, 3300(2008), **58**, 1162(2009), **59**, 1060(2010)

P66 アルギン酸—イミダゾール複合体における分子運動とプロトン伝導性

○梶本　翔[1]、近井　琢磨[2]、雨森　翔梧[3]、井田　朋智[2]、水野　元博[23]
金沢大学　物質化学類化学コース　理論化学研究室
[1]金沢大学理工学域物質化学類
[2]金沢大学自然科学研究科
[3]金沢大学新学術創成研究機構

Molecular Motion and Proton Conductivity in Alginic Acid-Imidazole Composite

○Sho Kajimoto[1], Chikai Takuma[2], Amemori Shogo[3],Tomonori Ida[2],Motohiro Mizuno[23]
[1]School of Chemistry, College of Science and Engineering, Kanazawa University
[2]Department of Chemistry, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University
[3]Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University

It has been reported that a complex membrane of alginic acid and imidazole shows high proton conductivity. In this study, the relationship between the proportion of imidazole in the complex and the proton conductivity was investigated. In the solid proton conductive material using imidazole as a proton conducting medium, the movement of the imidazole molecule is thought to play an important role. Therefore, the mobility of lm in AA-Im was analyzed in detail by solid-state NMR.）

[序論]　高分子とイミダゾールの複合体で、高いプロトン伝導性を持つ膜が報告されている。その1つである生体高分子のアルギン酸（AA）とイミダゾール（Im）分子から成る複合体は無水の高プロトン伝導性膜になると期待されている。アルギン酸は生物分解性と生体親和性を示すことから非毒性で且つ安価なポリマーである（Fig.1）。

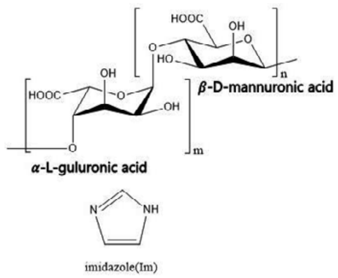


Fig.1 Molecular structure of alginic acid and imidazole

AA-Im複合体（AA-*x*Im）は373K以上の高温で熱安定性を示し、そのうち、アルギン酸が有する1つのカルボキシ基とイミダゾールのモル比が1:2となる複合体（AA-2Im）では、400K付近で～10^{-3} S/cmの高いプロトン伝導性を示すことが報告されている[1]。

AA-Im複合体のプロトン伝導は、水素結合を通して分子から隣接する分子にプロトンが移っていくGrotthuss機構で支配されており、イミダゾールの運動が重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、プロトン移動に関するAA-Im複合体の分子運動の詳細な情報は得られていない。そこで、本研究ではAA-2Imと同様にAA-Imについても固体^{2}H NMRを用いて、AA-Im複合体におけるイミダゾールの運動性を調べ、イミダゾールの分子運動とプロトン伝導との関係を明らかにすることを目的とした。

[実験]　AA-xImにおいてx = 1となるようにAAとImを混合し乾燥後、フィルム状の薄膜が得られた。AA-Imにおける電気伝導度の測定は、交流インピーダンス法を用いて行

重水素NMR、プロトン伝導体
○かじもとしょう、ちかいたくま、あめもりしょうご、いだとものり、みずのもとひろ

い、20 Hz～1 MHzの周波数範囲で測定した。また、AA-2Imd$_3$ について^{2}H NMR測定（共鳴周波数45.282 Hz）で行い、スペクトルは四極子エコー（QE）法で測定した。

[結果・考察]　AA-2Imにおける電気伝導率の温度変化をFig.2に示す。温度上昇に伴い、電気伝導度は増大し、およそ410 Kで1.6×10^{-3} Scm^{-1}の高プロトン伝導性を示した。また、310 K付近で電気伝導度の温度変化の傾きが変化した。電気伝導度の温度変化から活性化エネルギーを計算すると、310 Kより低温側と高温側で、それぞれ79 kJ/molと50 kJ/molであった。

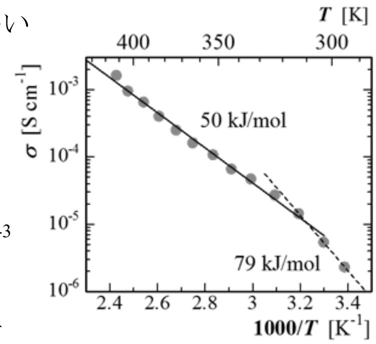


Fig.2 Temperature change of electrical conductivity in AA-2Im

AA-2Imd$_3$におけるQE ^{2}H NMRスペクトルの温度変化の実測とシミュレーションをFig.3に示す。Fig.3の破線はシミュレーションの結果である。AA-2Imd$_3$において観測された^{2}H NMRスペクトルから、252 K以上で0 kHz付近にシャープな成分が観測され、そのシャープな成分の強度は温度上昇に伴い増大した。このような変化は、イミダゾール分子の等方回転運動によるものと考えられる。252～271 Kのスペクトルに対して、等方回転の成分に加え運動性の低い成分があることが分かった。その成分は温度上昇に伴い減少し、276 K以上では等方回転が支配的となった。276 K以上のスペクトルでは、温度上昇に伴いその線幅が減少した。この線形の先鋭化は温度の上昇に伴う、分子運動の向上に起因するものである。

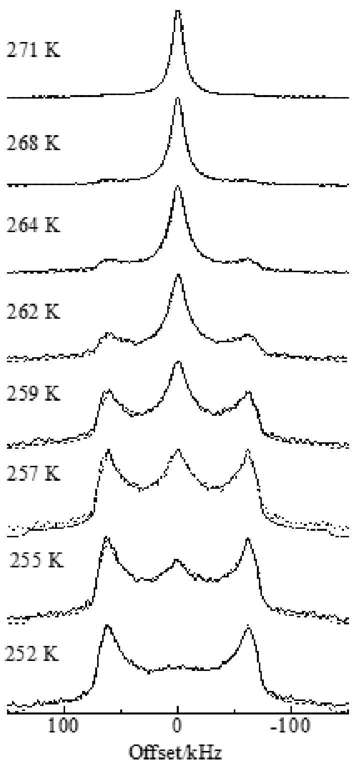


Fig.3 Temperature change of QE ^{2}H NMR spectrum in AA-2Imd$_3$.Measurement (-) and simulation (dashed line).

さらに、252～271 Kの線形変化は、イミダゾールの小角振動運動による成分と等方回転運動による成分の足し合わせで説明できる。

スペクトルの線幅から、見かけのスピン-スピン緩和時間（T_2*）を算出した。T_2*の温度変化をFig.4に示す。310 K付近でT_2*の温度変化の傾きが変化した。見積もった活性化エネルギーは、310 Kより低温側と高温側でそれぞれ31 kJ/molと6.4 kJ/molとなった。310 K前後で活性化エネルギーが減少したので、310 Kより高温ではイミダゾール分子の運動が起こりやすくなっていることが分かる。このときT_2*の温度変化の傾きが変化する温度（310 K）は、電気　伝導度の結果と一致しており、Im分子の運動がプロトン伝導に大きく関係していることが予想される。

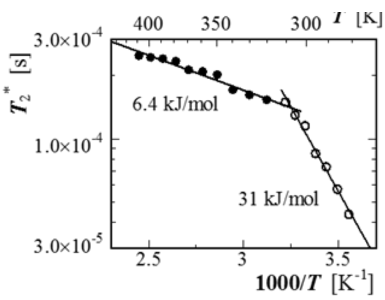


Fig.4　Temperature change of T_2* in AA-2Imd$_3$

また、T_2*より見積もられた活性化エネルギーが電気伝導度による活性化エネルギーより低い値を示しているのは、電気伝導測定では広範囲の運動を測定しているのに対し、NMRはイミダゾールの局所的な運動を観測しているためと考えられる。

[参考文献]

[1] M.Yamada, I. Honma, *Polymer,* 45, 8349 (2004).

P67

ポリブタジエン/5CB複合体の内部構造と液晶の配向挙動

○安念雅史[1]，雨森翔悟[2], 井田朋智[3], 水野元博[2, 3]
1金沢大学理工学域物質化学類
2金沢大学新学術創成研究機構
3金沢大学大学院自然科学研究科

Internal structure and orientation behavior of liquid crystal in polybutadiene/5CB

○Masashi Annen[1], Shogo Amemori[2], Tomonori Ida[3], Motohiro Mizuno[2,3]
1 School of Chemistry, College of Science and Engineering, Kanazawa University
2 Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University
3 Graduate School of Nature Science and Technology, Kanazawa University

Polymer dispersion type liquid crystal (PDLC) captured in a state that low molecular liquid crystal is separated in the polymer matrix. The polymer dispersed liquid crystal (PDLC) can exert the liquid crystal function in a flexible film. Therefore, it is a hybrid type material which can expect a new function such as a display which does not require a polarizing plate. For the development of these materials, detailed analysis of the internal structure of the polymer matrix and the alignment state of low molecular liquid crystals is indispensable. In this study, the internal structure and orientation of low molecular liquid crystals of PDLC films of low molecular liquid crystals such as polybutadiene and 4 - cyano - 4 '- pentylbiphenyl (5 CB) were analyzed using solid state NMR. From the results, the relation with external stimulus responsiveness was discussed.

[序論]

高分子マトリクス内に低分子液晶が分離した状態で取り込まれた高分子分散型液晶(PDLC)は、液晶機能を柔軟なフィルム内で発揮させることができ、特異な分子配向性や外部刺激応答性による新しい機能が期待できるハイブリッド型材料である。これらの材料の開発には高分子マトリクスの内部構造や低分子液晶の配向状態の詳細な解析が不可欠である。本研究では、ポリブタジエン(PBD)と4-シアノ-4’-ペンチルビフェニル(5CB)などの低分子液晶のPDLC膜について、相転移挙動を示差走査熱量計(DSC)を用いて調べ、内部構造及び低分子液晶の配向性を固体NMRを用いて解析した。

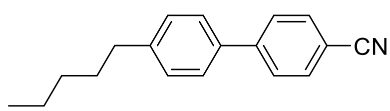


Fig.1 Structure of 4-cyano-4'-pentylbiphenyl (5CB)

[実験]

PBDと5CBを質量比1：1でクロロホルム溶媒に溶かして混合し、シャーレに移した後クロロホルムを蒸発させることで複合体膜(PBD/5CB)を得た。試料はPBD/5CB、PBD/5CBを100℃で２日間加熱したもの(PBD/5CB$_{\mathrm{heat}}$)、紫外線を長時間照射したもの(PBD/5CB$_{\mathrm{UV}}$)を用いた。固体NMRの測定はJEOL ECA-300分光器を用い、^{13}Cの共鳴周波数74.175 MHzで行った。^{13}C NMRスペクトルは、^{13}C{^{1}H}CP/MAS法と^{13}C{^{1}H}DD/MAS法を用いて測定した。CPの接触時間は2 ms、^{13}C{^{1}H}DD/MAS法における繰返し時間は30 sとした。

液晶、高分子、固体NMR

○あんねんまさし、あめもりしょうご、いだとものり、みずのもとひろ

[結果および考察]

PBD/5CBとPBD/5CB$_{UV}$におけるDSCの昇温時の測定結果をFig.2に示す。どちらの試料も290 Kと296 Kに吸熱ピークが観測された。バルクの5CBの固相-液晶相転移温度は296 Kである。290 K のピークはPBD内でミクロ相分離した5CBの相転移に対応し、ミクロ相分離のドメインサイズが小さいため、転移温度がバルクよりも低温にシフトしたと考えられる。また、紫外線を照射することで 296 Kのピークが小さくなった。同様の結果はPBD/5CB$_{heat}$にも見られ、試料の紫外線照射や加熱によってPBD内に架橋構造が形成され、バルクに近い5CBが減少することが分かる。

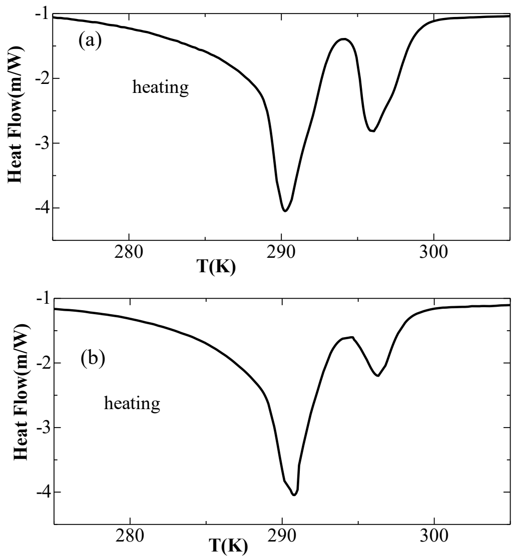


Fig.2 DSC curves for PBD/5CB(a) and PBD/5CB$_{UV}$(b)

Fig. 3 に PBD/5CB$_{UV}$ の 273 K と 296 K での ^{13}C CP/MAS と DD/MAS のスペクトルを示す。30 ppm と 130 ppm のピークは PBD によるもので､他のピークは 5CB に対応する。273 K の CP/MAS スペクトルでは 5CB の強いピークが観測されたが、DD/MAS のスペクトルではほとんど観測できず､5CB の運動性が非常に低いことが分かる。これに対し、296 K では 5CB のピークは DD/MAS スペクトルのみで観測された。296 K では PBD/5CB$_{UV}$ 中の 5CB の運動性が極めて高くなっていることが分かる。Fig. 4 に PBD/5CB の 296 K での ^{13}C CP/MAS と DD/MAS のスペクトルを示す。PBD/5CB では ^{13}C CP/MAS と DD/MAS の ^{13}C CP/MAS と DD/MAS のどちらのスペクトルにも 5CB が観測された。DD/MAS スペクトルでは主にミクロ相分離した 5CB のピークが現れ、CP/MAS スペクトルにはバルクに近い 5CB のピークが現れていると考えられる。これらの結果は、PBD 内でミクロ相分離した 5CB のドメインサイズが小さいため、5CB 分子が容易に動くことができることを示しており、固相-液晶相転移温度の低温シフトと対応している。

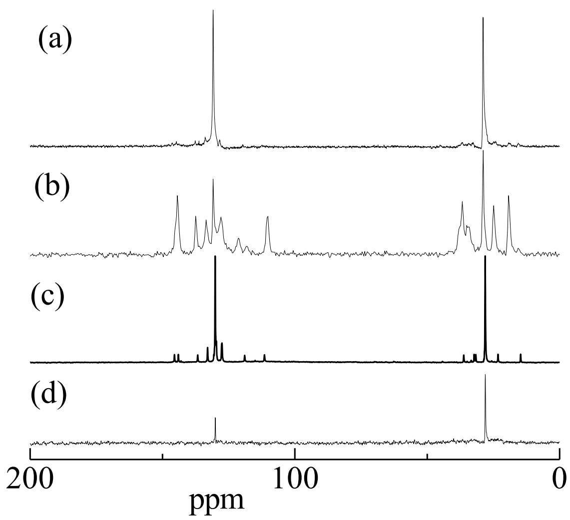


Fig.3 ^{13}C NMR spectra of PBD/5CB$_{UV}$.
(a) DD/MAS at 273 K, (b) CP/MAS at 273 K, (c) DD/MAS at 293 K, (d) CP/MAS at 293 K.

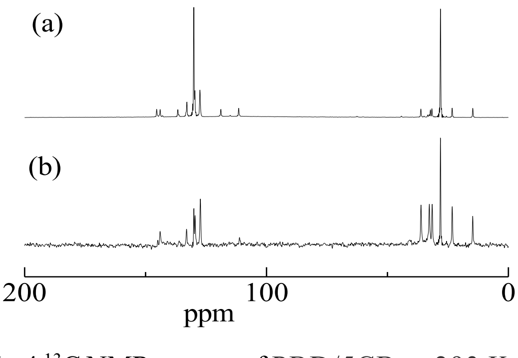


Fig.4 ^{13}C NMR spectra of PBD/5CB at 293 K.
(a) CP/MAS, (b) DD/MAS.

P68 ポリ-4-メチルペンテン 1 の結晶相における気体拡散の異方性評価

○野村 優友，吉水 広明
名古屋工業大学大学院　工学研究科

Evaluation of anisotropy of gas diffusion in crystal phase of poly-4-methylpentene 1

○Yusuke Nomura, Hiroaki Yoshimizu
Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

Since the conventional polymer gas separation membrane is a separation in an amorphous phase having no regular structure, there is a problem that it is a low efficiency gas separation. Therefore, we focused on poly-4-methylpentene 1 (PMP) with low density crystals in order to achieve gas separation in ordered crystalline phase. From the previous study, it has been confirmed that the crystal phase of PMP has cylinder-like pores and can sorb the gas. If the anisotropy of the gas diffusion in this crystal phase can be confirmed, it is possible to realize a gas separation membrane with higher efficiency by orienting the cylindrical pores of the crystal phase. Therefore, in this study, the anisotropy of gas diffusion in the crystal phase of PMP was evaluated. As a result, it was confirmed that the anisotropy was confirmed and it is reported.

【緒言】現在、産業社会では廃棄物から資源回収や有害物質の除去のため，物質分離技術の必要性が高まっている。その中でも，省エネルギーかつクリーンなプロセスを提供するという観点から高分子膜材料が注目されている。しかし，現状の高分子膜による分離は無定形高分子膜が用いられ，微細孔径分布に由来する拡散性の差異によって律せられるため，分離効率が不十分である。これを打破するために，秩序構造を形成する高分子を応用した分離膜が検討されている。高効率かつ高度な分離機能を兼ね備える究極の分離膜（スマートメンブレン； Fig. 1）を創成する挑戦は常用で必要不可欠なことである。そこで私は、結晶相に低密度なシリンダー状の空孔を有するイソタクチックポリ−4−メチルペンテン１（PMP）に着目した。この PMP のシリンダー状の空孔を配向させることでより高効率な気体分離膜（スマートメンブレン）の実現が可能であると考えられる。本研究では、延伸処理することで一軸方向に配向させた PMP 膜内の気体拡散性の異方性の有無を確認する。

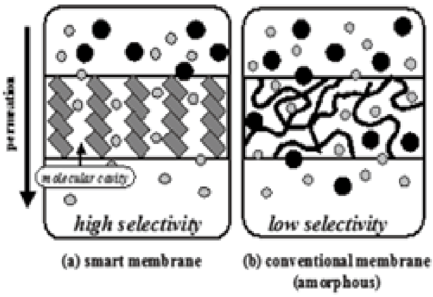


Figure1 Schematic representation of smart membrane.

【実験方法】

三菱化学株式会社より提供されたPMP膜をそのまま使用した。PMP54は同社から提供されたPMPペレットを膜厚が100 μmになるように270 ℃で溶融プレスした後，氷水で急冷した。PMP69は同様に溶融プレスした後，室温まで徐冷した。PMP81はPMP69を真空下で200 ℃, 24 h熱処理した。サンプル名の数字はDSC測定から決定された結晶化度を示している。X線回折測定により結晶形態が全て同じであることを確認した。これらの25，0, −10 ℃におけるXe収着特性を定容法で測定した。25 ℃における収着挙動の詳細な情報を得るために^{129}Xe NMRを行った。さらに、上記のPMP81に対して延伸処理を行い、配向試料を作製した。この配向試料を用いて、透過測定、PFG ^{1}HNMR測定を行うことで配向試料の膜内の気体拡散性を評価した。

PMP　気体分離膜　Xe

○のむらゆうすけ　よしみずひろあき

【結果及び考察】

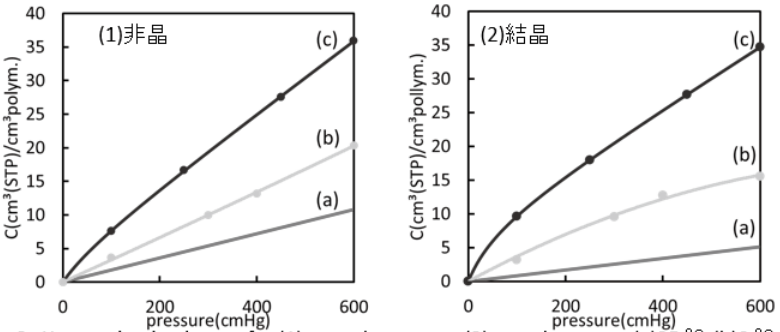


Figure 2 Xe sorption isotherms for (1)amorphous parts (2)crystal parts at (a)25 ℃ (b)0 ℃ (c)-10 ℃.

定容法を用いて得られた収着等温線から非晶、結晶における収着等温線を推定した。(Figure 2) Figure 2 から分かるように、25 ℃では収着等温線はHenry型を示し，非晶相がゴム状態であることが確認できた。0, −10 ℃ではガラス状高分子の収着挙動である二元収着型の収着等温線を示した。これらの収着挙動変化は，先行研究でガラス転移温度が約 13 ℃と見積もられた事実を踏まえると，非晶相に関してはガラス転移に基づく結果と考察できる。Xe 収着量は低密度である結晶相の方が少ないという結果が得られ、密度とは逆の関係が得られた。そこで、より詳細な情報を得るために 25 ℃における [129]Xe NMR 測定を行った。各結晶化度のサンプルの化学シフト値の圧力依存を示すグラフからそれぞれ圧力 0 に外挿する値から Xe 分子 1 個(圧力がゼロ)のときの化学シフト値の結晶化度依存を推定した。(Figure 3) Figure 3 から結晶化度の増加に伴って低磁場シフトしていることがわかる。このことから、結晶の方が Xe 分子の入り込める空間が小さいことが確認できた。さらに、Figure 3 から 0 に外挿する点を非晶の、100 に外挿する点を結晶の化学シフト値であると推定し、それぞれの化学シフト値から非晶と結晶の空孔の大きさを推定した。(Table 1) Table 1 の結果からも同様に結晶の方が Xe 分子の入り込んでいる空孔のサイズが小さいことが確認できた。ピークの線幅の結果からも結晶の気体拡散性の方が低いことが確認でき、密度とは逆の関係になった。主な要因としては非晶部では高分子鎖が柔らかいため、Xe 分子が高分子鎖を押しのけて入り込むことができ、多量の Xe 分子が収着し、膜内での気体拡散性が高くなったと考えられる。

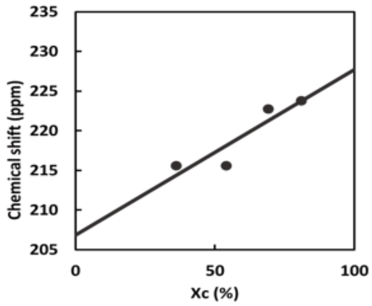


Figure 3Dependence of degree of crystallinity on [129]Xe NMR chemical shifts.

Table 1 [129]Xe NMR chemical shifts and size of microvoids .

	ピーク位置(ppm)	空孔サイズ(Å)
非晶	207	5.1
結晶	228	4.7

次に、PMP の結晶相の気体拡散異方性を確認するため、結晶相を膜面に平行方向に配向させたサンプルに対する透過測定を行った。そこから算出した平均拡散係数を Table 2 に示す。なお本研究室で用いる透過装置の特性上，この実験ではペネトラント分子が膜面に対して垂直方向に透過・拡散するため，本研究で算出した平均拡散係数は PMP 結晶相の螺旋軸(延伸方向)に対して垂直方向のものである。今回用いた 3 種類全ての配向 PMP サンプルの平均拡散係数を各配向度の試料で比較すると C_3H_8, iC_4H_{10} の 2 種類のペネトラント分子においてはどの試料も同程度の値が確認された。これは、この 2 種類のペネトラント分子は PMP の持つシリンダー状の空孔よりも大きな分子サイズを持つためだと考えられる。シリンダー状の空孔を拡散できないため、配向度によらず結晶相を迂回する拡散経路で拡散するため、拡散経路に大差はなく、平均拡散係数にも差が確認できなかったと考えられる。

CO_2, O_2, N_2, CH_4 の 4 種類のペネトラント分子において平均拡散係数は配向度が増すにつれて減少した。これは、配向度が増すことでシリンダー状の空孔に対して垂直方向の拡散性が減少しているため、PMP のシリンダー状の空孔に拡散異方性があることの裏付けになると考えられる。

Table 2 Diffusion coefficients of various gases in the direction perpendicular to the cylinder axis for drawn PMP membranes

Sample	$\bar{D} \times 10^8$ (cm²/sec.)					
	CO_2	O_2	N_2	CH_4	C_3H_8	iC_4H_{10}
PMP 2ratio	66.5	59.8	33.3	17.3	0.89	0.28
PMP 4ratio	52.4	39.2	24.3	9.54	0.80	0.17
PMP 5ratio	36.6	37.6	20.8	8.93	0.68	0.12

P69 ポリ（アクリル酸）複合体の固体NMRによる構造解析

○杉森諭，川畑優璃，前田史郎
福井大院工

Characterization of Polymer Complex of Poly(acrylic acid) by Solid NMR

○Satoshi Sugimori, Yuri Kawabata, and Shiro maeda
Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Fukui, 910-8507 Japan.

Characterization of ionic complex of poly(acrylic acid) (PAA) with poly(allyl amine) and hexadecylpyridinium chloride was done by solid NMR and IR. Primary amines are known to react with CO_2 to form alkylammonium alkylcarbamates. Carbamated PAAm (PAAm･CO_2) is formed by bubbling CO_2 through aqueous solution of PAAm. Upfield shift of 1~2 ppm for COO^- peak of PAA was observed in the ^{13}C solid NMR spectra of ionic complex of PAA. The origin of the upfield shift is discussed.

【はじめに】

ポリ(アリルアミン)(PAAm)水溶液にCO_2でバブリングすると、初期段階ではNH_2がNH_3^+とカルバメート($NHCOO^-$)になり、PAAmどうしでイオンコンプレックスを形成し、白濁する。さらにCO_2をバブリングすると、HCO_3^-が形成され、NH_3^+と対イオンとなりイオンコンプレックスが解消され、無色透明になる。その後、さらに室温でN_2をバブリングすると、HCO_3^-が除去される。[1,2]

本研究では、ポリイオンコンプレックスを形成した際のポリ（アクリル酸）(PAA)のCOO^-の化学シフト変化を観測するために、PAAとCO_2バブリングをしたPAAmの複合体(PAA/PAAm･CO_2）、PAAとCO_2バブリングの後N_2バブリングをしたPAAmの複合体(PAA/PAAm･(CO_2+N_2))、PAAとヘキサデシルピリジニウムクロリド(HDP)の複合体(PAA/HDP)について固体NMR測定を行い、構造解析を行った。

【実験】

PAANa(透明液体、重合度=2700～7500) およびHDP(白色粉末)は購入したものを、PAAm（Mn=5000,　濃度20％水溶液)はニットーボーメディカルより提供されたものをそのまま用いた。PAANa水溶液と、①PAAm･CO_2、②PAAm･(CO_2+N_2)、③HDPを種々の比率で混合し、シャーレにキャストした後に減圧乾燥し複合体を調製した。固体NMRは、3.2mm CPMASプローブを用い、試料回転数10kHzでJEOL-ECA600Ⅱを用いて測定した。

固体NMR, ポリ(アクリル酸), ポリイオン複合体

○すぎもりさとし, かわばたゆり, まえだしろう

【結果と議論】

Figure1,2,3に、それぞれPAA/PAAm・CO_2、PAA/PAAm・(CO_2+N_2)、PAA/HDP複合体の^{13}C固体NMRスペクトルを示す。186ppm付近のCOO^{-}ピークに高磁場シフトが観測された。これは、強い静電相互作用によるイオンコンプレックスの形成を示唆している。また、165ppmのピークはカルバメート基(-$NHCOO^{-}$)のカルボニル炭素である。

Figure4にカルボニル炭素領域を拡大した^{13}C NMR スペクトルを示す。PAA/PAAm・CO_2のCOO^{-}ピークに0～1.1ppmの高磁場シフトが観測された。一方、PAA/PAAm・(CO_2+N_2)においては、0.3～1.2ppmの高磁場シフトが観測された。これらから、N_2バブリングによるHCO_3^{-}の除去により、イオンコンプレックス形成時のCOO^{-}とNH_3^{+}の距離が近くなったためであると考えた。

PAA/HDPにおいては、2.0～2.9ppmのより大きな高磁場シフトが観測された。これらから、対カチオンが低分子化合物であるために、イオンコンプレックス形成時に、立体障害が少なくなり、COO^{-}とNH_3^{+}の距離がより接近したためであると考えた。また、PAA/PAAm・CO_2、PAA/PAAm・(CO_2+N_2)、PAA/HDP複合体のモノマーユニット比によるシフト変化量の違いについては現在検討中である。

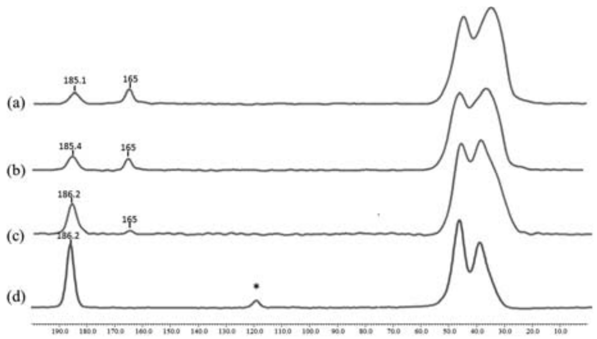


Figure 1 PAA/PAAm・CO_2複合体の ^{13}C NMR スペクトル
(a) PAA：PAAm・CO_2=1:3, (b) PAA：PAAm・CO_2=1:1, (c) PAA：PAAm・CO_2=3：1, (d)PAANa

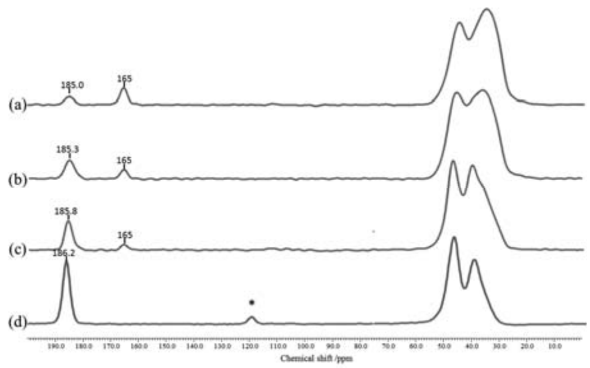


Figure 2 PAA/PAAm・(CO_2+N_2)複合体の ^{13}C NMR スペクトル
(a) PAA:PAAm・(CO_2+N_2) =1:3, (b)) PAA:PAAm・(CO_2+N_2) =1:1, (c) PAA:PAAm・(CO_2+N_2) =3:1 , (d)PAANa

Figure 4 PAA/HDP 複合体の ^{13}C NMR スペクトル
(a) PAA:HDP=1:3, (b) PAA:HDP=1:1, (c) PAA:HDP=3:1 , (d)PAANa

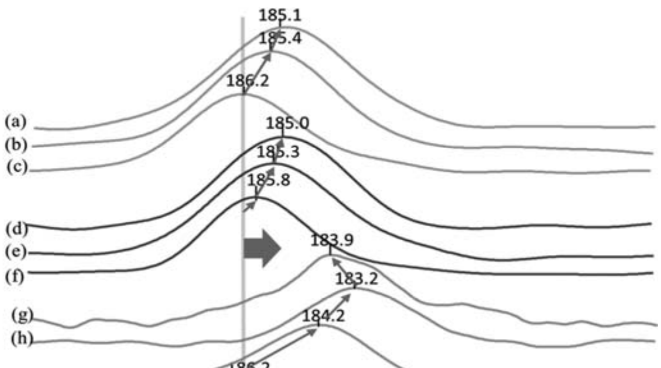


Figure 3 複合体のカルボニル炭素領域を拡大した ^{13}C NMR スペクトル
(a) PAA：PAAm・CO_2=1:3, (b) PAA：PAAm・CO_2=1:1, (c) PAA：PAAm・CO_2=3：1, (d) PAA:PAAm・(CO_2+N_2) =1:3, (e) PAA:PAAm・(CO_2+N_2) =1:1,
(f) PAA:PAAm・(CO_2+N_2) =3:1, (g) PAA:HDP=1:3, (h) PAA:HDP=1:1, (i) PAA:HDP=3:1 , (j)PAANa

References

[1] S. Maeda, S. Oumae, S. Kaneko, K.-K. Kunimoto, *Polym. Bull.*, **68**, 745-754 (2012)

[2] K. Takagi, S. Maeda, K.-K. Kunimoto, *Polym. Preprint, Jpn*, **62**(1),1015 (2013).

P70

シクロヘキサンの液体-液体転移の解析

○須藤　亜紀乃[1]，辰巳　創一[2]，水口　朋子[2]，藤原　進[2]，
武田　和行[1]，野田　泰斗[1]
[1]京都大学大学院　理学研究科
[2]京都工芸繊維大学　材料化学系

Analysis of liquid-liquid transition of cyclohexane

○Akino Sudo[1], Soichi Tatsumi[2], Tomoko Mizuguchi[2], Susumu Fujiwara[2], Kazuyuki Takeda[1] and Yasuto Noda[1]
[1]*Graduate School of Science, Kyoto University*
[2]*Material Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology*

To elucidate the mechanism of discovered liquid-liquid transition in pore-confined cyclohexane at 154 K, longitudinal and transverse relaxation of the ^{1}H spins were studied both experimentally by variable-temperature NMR measurements and theoretically by Molecular Dynamics (MD) in combination with the theory of relaxation. The anomaly in the longitudinal relaxation curve was observed experimentally at 154 K, in agreement with previous adiabatic calorimetric studies. This transition temperature was found to be higher than the glass-transition temperature determined from the transverse relaxation curve. Our theoretical calculations also successfully reproduced the anomaly. Moreover, we found that the intramolecular dipole fluctuation significantly contributes to the observed relaxation behavior compared to the intermolecular dipole fluctuation. Hence, molecular rotation and/or segment motion are responsible for the liquid-liquid transition.

1. 序論

結晶のような秩序構造に見られる多型が，分子が無秩序に凝集して運動している状態である液体に対して存在するという指摘が，近年、水やリン，高分子融液などにおいて、内部構造やX線透過率，中距離秩序を調べることでなされている[1,2] このことは密度以外に液体の性質を決める物理量があることを示唆しており、その正体について探索がなされている．これまで液体－液体転移の見つかった系には構成要素間に水素結合などの比較的強い相互作用が存在していたが、つい最近、分子間相互作用の弱いシクロヘキサ

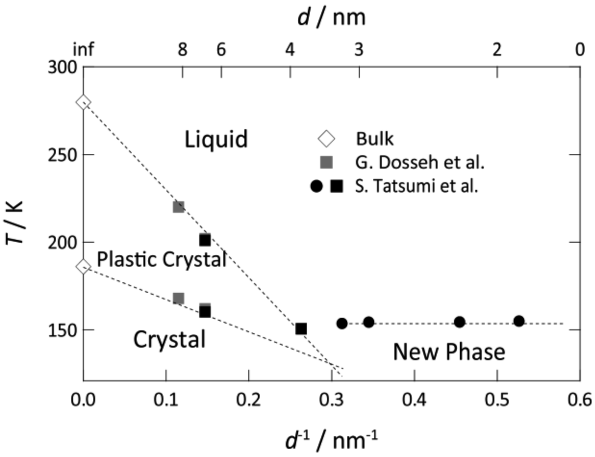


Fig.1. Pore diameter dependence of the phase transition temperature of confined cyclohexane
Data reported by Dosseh *et al.*[7]and S.Tatsumi *et al.*[3] were used.

液体-液体転移、可変NMR、ダイナミクス解析

○すどうあきの，たつみそういち，みずぐちともこ，ふじわらすすむ，たけだかずゆき，のだやすと

ンでも液体－液体転移が発見された。[3]

シクロヘキサンは285 Kに液相-プラスチック相、186 Kにプラスチック相-結晶相の転移点を持つ。シクロヘキサンを細孔に閉じ込め結晶化を妨げると、このふたつの転移温度は細孔径が小さくなる程徐々に降下していき、細孔径が3.2 nmより小さくなると細孔径の大きさに関わらず154 Kにひとつの転移点を持つようになる。Fig.1は断熱型熱容量測定によって得られた細孔内シクロヘキサンの相転移温度の細孔径依存性を示した図である。細孔径が小さくなる程ふたつの転移温度は近くなり、細孔径3~4 nmでふたつの転移温度は等しくなり、以降は154 Kにひとつだけ転移点を持つことがわかる。80 K~110 Kにガラス転移が確認されたことから、この転移は液体-液体転移であると考えられる[3]。

我々はこの転移のメカニズムを解明するために、まず分子の運動性の変化に着目した。シクロヘキサンについて考えられる運動としては、並進、二種類の回転、立体構造の変化、振動等が挙げられる。異なるオーダーの相関時間を持つ運動を観測するため、NMR、中性子準弾性散乱、MD(molecular dynamics)法を組み合わせて転移前後の運動性変化を考察した。

2. 実験および解析

NMR緩和時間測定

温度可変NMRシステムを用いて多孔質シリカ(MCM-41)に充填したシクロヘキサン(細孔径2.9 nm)におけるプロトンの緩和時間を測定した。測定には2.35 Tのマグネットを用い、室温から90 Kまで温度を変化させて実験を行った(^{1}H共鳴周波数：110 MHz)。緩和時間測定に影響を及ぼす溶存酸素を取り除くため、シリカは真空乾燥させ、シクロヘキサンは凍結乾燥を数回繰り返してからシリカに充填した。また、試料への熱伝導を良くするため、シリカはガラス製試料管に200 torrのHeと共に封管した。

MDシミュレーション

MD計算は分子数1331、圧力一定(1 atm)の系で行い、まず系を320 Kから60 Kまで10^{11} K/sの速度で冷却してガラス状態にした。その後速度10^{11} K/sで昇温していく中で、各温度で温度を一定にし、分子の運動を1 fsごとに計算、10 psごとに全部で10 ns分の^{1}Hの座標データを記録した。

^{1}H縦緩和時間T_1の数値計算

得られた各温度での分子座標データを用いて相関関数$G_{\mathrm{R,T}}(t)$を

$$G_{\mathrm{R,T}}(t) = \frac{3}{16}\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \hbar^2 \gamma^4 \times \frac{1}{N_{\mathrm{R,T}}} \sum_{i \neq j}^{N_{\mathrm{R,T}}} \left\langle \frac{\left(3\cos^2\theta_{ij}(t) - 1\right)}{r_{ij}^3(t)} \frac{\left(3\cos^2\theta_{ij}(0) - 1\right)}{r_{ij}^3(0)} \right\rangle_{p.a.} \qquad (1)$$

R,T : Rは分子内、Tは分子間を表す，μ_0:真空の透磁率，$\hbar$: $h/2\pi$，γ :磁気回転比，
$N_{\mathrm{R,T}}$:スピン数，θ :静磁場とスピンペアの成す角，r :スピンペア間距離
〈　〉$_{\mathrm{p.a.}}$: 粉末積分を表す

より算出した。$G_{\mathrm{R,T}}(t)$のスペクトル密度関数$J(\omega)$から縦緩和時間T_1を

$$\frac{1}{T_1} = J(\omega_0) + 4J(2\omega_0). \tag{2}$$

ω_0:照射周波数(2π×100 MHz, NMRは110 MHzで測定を行ったが、MDのサンプリング間隔が10 psであるため100 MHzで計算した)

により求めた。

3. 結果・考察

Fig.2は2.9 nmの細孔に閉じ込めたシクロヘキサンにおける^{1}Hの緩和時間のT_1およびT_2の温度依存性を示している。先行研究[5,6]によって示されたシクロヘキサンの縦緩和時間の190 Kにおける値は約400 msであり、実験結果と矛盾しない。

Fig.2(a)に示した縦緩和時間は、低温になるにつれ二段階で減少していることがわかる。この緩和曲線の異常は断熱型熱容量測定の結果と同様に、154 K付近に観測されている。Fig.2(b)の横緩和時間は低温になるにつれ滑らかに減少し、100 K付近以下で一定となっている。このことから100 K付近でガラス転移が生じていると判断でき、T_1に見られる154 Kの転移は液体から液体への転移であると考えられる。

変異点はT_1にのみ確認されT_2にはないため、T_1についてより詳しく解析することにした。

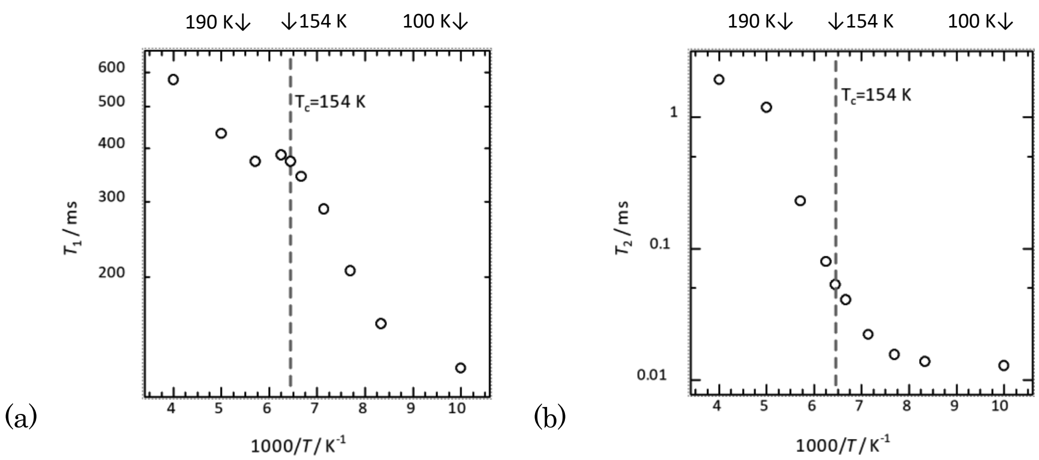


Fig.2. Experimental temperature dependence of (a) the longitudinal relaxation time (T_1) and (b) the transverse relaxation time (T_2) of the ^{1}H spins of cyclohexane confined in pores silica with a pore diameter of 2.9 nm.

The vertical broken line indicates the transition temperature T_c of 154 K obtained from adiabatic calorimetry.

NMR のデータだけではこの転移付近の緩和が分子内運動と分子間運動どちらによるものなのか判断できない。そこで MD 法を用いて、分子間と分子内の相互作用を分けて解析することで転移前後の分子の運動性変化を考察した。

Fig.3はMDシミュレーションを解析することによって得られた温度に対する^{1}Hの縦緩和時間のグラフである。分子内相互作用のみを考慮して求めたこの緩和曲線にはNMRより得られた緩和曲線と同じく154 K付近に変異点を持つ挙動が見られ､154 Kの転移に分子内の^{1}Hスピン間の双極子相互作用の揺動が影響することが分かった。すなわち本研究によって細孔内に閉じ込められたシクロヘキサンの液体―液体転移には分子の回転あるいはセグメント運動あるいは両者が寄与していることが示唆された。

このようにNMR実験、MD計算両者で、液体-液体転移と見られる転移点が確認された。NMR実験とMD計算を組み合わせることにより､NMRで得られる緩和時間を分子内・分子間の相互作用に分けて解析することが可能になった。

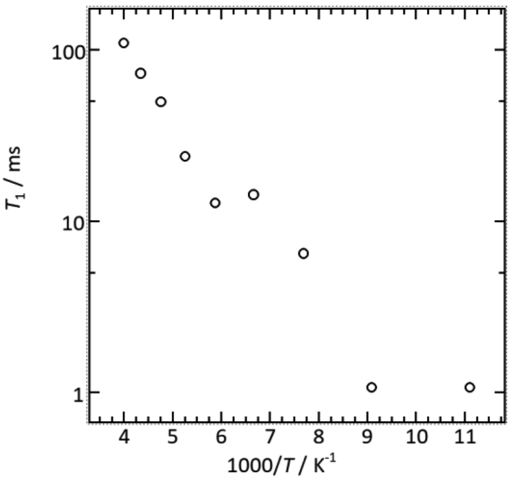


Fig.3. Calculated temperature dependence of the ^{1}H longitudinal relaxation time (T_1) from the MD simulation and Eqs.(1)-(2).

References
[1] O. Mishima, L. D. Calvert, and E. Whalley, *Nature* **314**, 76(1985).
[2] Y. Katayama, T. Mizutani, W. Utsumi, O. Shimomura, M. Yamakata, and K. Funakoshi, *Nature* **403**, 170 (2000).
[3] S. Tatsumi, T. Uehara, and M. Oguni, *Netsu Sokutei* **42** (4), 142-147 (2015).

[4] P. M. Singer, D. Asthagiri, W. G. Chapman, G. J. Hirasaki, *Journal of Magnetic Resonance* **277** (2017) 15–24.
[5] D.W. Aksnes, K. Forland, M. Stocker, *Microporous and Mesoporous Materials* **77** (2005) 79-87.
[6] L. Gjerdaker, D.W. Aksnes, G. H. Sorland, M. Stocker, *Microporous and Mesoporous Materials* **42** (2001) 89-96.
[7] G. Dosseh, Y. Xia, and C. Alba-Simionesco, *Journal. Physical. Chemistry. B.* **107**, 6445 (2003).

P71 分極剤濃度が高磁場DNP効率に与える影響の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 concentration of biradical dopant in sample on high-field solid-state DNP efficiency as analyzed by a fast and quantitative spin dynamics calculation

○Jun Fukazawa[1], Toshimichi Fujiwara[1], and Yoh Matsuki[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.*

Although NMR signal enhancement by Dynamic Nuclear Polarization (DNP) is theoretically expected to exceed six hundred times, the ratio of the electron gyromagnetic ratio to the proton gyromagnetic ratio, actual DNP experiments show less effectiveness. We studied possible causes by using the simulation program we have developed, in which we calculate DNP enhancement by computing only the critical spin dynamics exactly and leaving others approximately, under the electron spin relaxation and magic angle spinning. We considered the effects of intermolecular electron spin couplings, $T_{1\mathrm{e}}$ depending on sample temperature, etc. by the numerical simulation, to explain why both too high and too low concentration of biradical is bad for 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^{1}H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，特に数十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前回開発した。

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。

前回までのシミュレーションは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ていたが，その際は分子間の相互作用は電子スピン間双極子相互作用による

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

スピン交換のみ考慮し，複数分子に跨がる交差効果は無視していた。今回は複数分子に跨がる交差効果についても考慮し、より現実に近しいシミュレーションを行うことによって濃度の影響について考察した。

【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る。5スピン系ならば32×32行列となり、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くなる。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および電子間双極子相互作用によるスピン交換も同様に近似可能である。

【結果・考察】

これを用いて計算した2つのAMUPOL分子から成る系におけるDNP効率をプロットした図をFig.1に示す。この図はサブミリ波強度700kHz照射を0.71s間行ったときのDNP効率である。図の凡例にあるrは2つのAMUPOL分子の中心間距離を表す。ここで中心とは2つの分子内不対電子の中点を意味する。DNP実験でよく用いられるラジカル分子濃度である20mMの際の最近接分子間距離として最も頻度が高い距離は24Åであり、26Åはそれより僅かに長い距離である。この図を見ると、T_{1e}が長い、つまりより低温の条件下において、分子間距離が短い場合にDNP効率が顕著に低下することがわかる。バイラジカルが高濃度すぎる際にDNP効率が低下する理由はこれまではラジカルの遮蔽効果により観測可能な核が少なくなるためとされていたが、このシミュレーションにより近傍バイラジカル分子が交差効果を阻害するという新たな機構が示唆された。

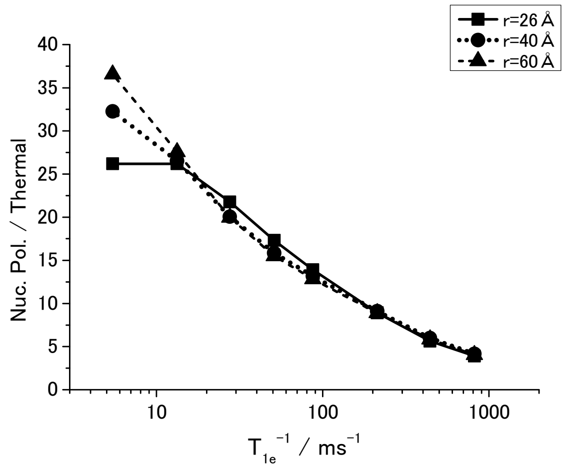


Fig.1. Simulated DNP enhancement as a function of the longitudinal electron relaxation rate T_{1e}^{-1} for a two AMUPOL molecule system, after a build-up time of 0.71 s almost at a steady state. r is the distance between two biradical molecules. In this calculation, T_{1H} =4 s, $\omega_{MAS}/2\pi$=7 kHz.

この現象に関する考察を濃度に換算し考察する他，サブミリ波非照射でのMAS下で核磁化が減少するThurber効果[3]へのバイラジカル濃度の影響に関しても考察する。

References
[1] K. R. Thurber, R. Tycko, *J. Chem. Phys.*, **137**, 084508 (2012)
[2] T. Mary, et. al., *J. Chem. Phys.* **128**, 052211 (2008)
[3] K. Thurber and R. Tycko. (2014) J. Chem. Phys., 140, 18420.

P72

１スピンラベル試料を用いたDARR交換１次元NMRによる炭素間距離解析

○大橋 竜太郎[1]，大木 忍[2]，出口 健三[2]，最上 祐貴[2]，丹所 正孝[2]，清水 禎[2]，水野 元博[1]
1. 金沢大学大学院自然科学研究科
2. 物質・材料研究機構

^{13}C-^{13}C distance analysis by one-dimensional exchange NMR with dipolar-assisted rotational resonance using one-spin labeled samples

○Ryutaro Ohashi[1], Shinobu Ohki[2], Kenzo Deguchi[2], Yuuki Mogami[2], Masataka Tansho2, Tadashi Shimizu[2], Motohiro Mizuno[1]
1. Natural Science & Technology, Kanazawa University
2. National Institute for Material Science

A method of distance determination between carbons is developed in this research. In distance analysis of carbons, effects of multiple spins significantly reduce accuracy of the distances, because only short-distance correlations are dominant in multiply-labeled spin systems. In this study, one-spin labeled sample ([1-^{13}C]-L-Valine and [1-13C]-L-Leucine) were measured by one-dimensional exchange NMR with dipolar assisted rotational resonance (DARR). In such samples, it is expected that precise distances between carbons are obtained because the effects of multiple spins are removed in the one-spin labeled samples.

【序】固体NMRは、X線回折や溶液NMRでは解析困難な試料にも適用できる測定法として期待されており、^{1}H の高分解能測定が困難なことから炭素間距離解析法が盛んに研究されてきた。Dipolar Assisted Zrotational Resonance (DARR)法による交換NMRは、^{1}Hへの弱いラジオ波のみで13C間の相関を得られるため、主に生体分子などで広く使われている。しかし、DARR法には、炭素間距離の精度が低いという問題があった（元の距離の25%程度の誤差）。本研究では、多スピンによる影響を除けば精度が上がると考え、L-Valine, L-Leucineのカルボキシ基の炭素のみラベルし、他の天然存在比の炭素との距離を解析した。

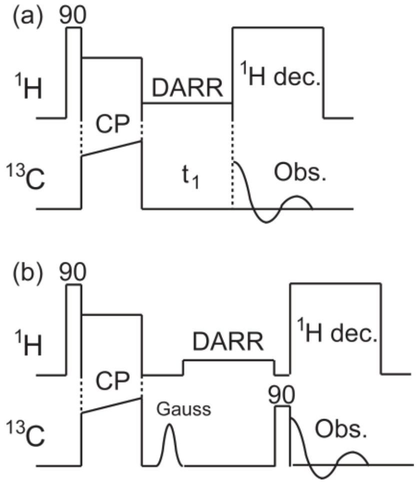


Fig. 1 Pulse sequences of 2D NMR to analyze line shapes under DARR recoupling (a) and 1D DARR exchange NMR (b)

【試料】１次元NMR測定、^{13}CのT_1測定、線形解析による^{1}H-^{13}Cの双極子相互作用の測定には天然存在比のL-Valine, L-Leucineを、DARR法による１次元交換NMR測定にはカルボキシ基を^{13}Cラベルした[1-13C]-L-Valine, [1-13C]-L-Leucineを用いた。L-Valine, [1-13C]-L-Valineは市販品の粉末X線回折スペクトルが水から再結晶化した構造による計算スペクトルと良い一致を示したため、市販品をそのまま測定した。L-Leucine, [1-13C]-L-Leucineは水-アセトンの混合溶媒から蒸気拡散法で再結晶化した。また、フルラベルした$^{13}C_5$-L-Valineを用いて^{13}C-^{13}C間の

Distance, Structure, Exchange NMR, DARR, Solid-state NMR
○おおはし　りゅうたろう、おおき　しのぶ、でぐち　けんぞう、もがみ　ゆうき、たんしょ　まさたか、しみず　ただし、みずの　もとひろ

２次元交換NMR測定を行った。本要旨では、L-Valineの解析結果について示す。

【NMR測定】NMR測定は11.4 T(1H 500 MHz, 13C 125 MHz) の磁場で12.5 kHz のMAS下で行った。１次元のCP-MAS測定、Torchia法による13CのT1測定、DARR法によるRecoupling下での線形測定[Fig. 1(a)]を天然存在比の試料で、DARR法による１次元交換NMR測定[Fig. 1(b)]をカルボキシ基のみ13Cラベルした試料で行った。

【結果と考察】

水溶液から再結晶化したL-Valineは Fig. 2 に示したTrans, Gauche 1、２つの構造を持つことが報告されている。^{13}Cの１次元スペクトルを測定すると、Fig. 3のようにC3, C4, C5の^{13}Cのピークが２つに分裂した。８本のピークを化学シフトの大きい順に S1 (176 ppm), S2 (61.6 ppm), S3 (30.9 ppm), S4 (31.5 ppm), S5 (22.3 ppm), S6 (21.7 ppm), S7 (19.6 ppm) S8 (19.4 ppm) とする。$^{13}C_5$-L-Valineの^{13}C-^{13}C DARR exchange NMRを行うと、Fig. 4のように分裂したピーク同士の相関が得られ、S3, S5, S8 と S4, S6, S7 が同じ分子内のピークであることが示された。２次元NMRによる^{13}C-^{13}C間の距離の解析も試みたが、近距離の炭素同士の相関が支配的となり、遠距離のカルボキシ基とメチル基の距離を解析することは出来なかった。そこで、１つの炭素原子のみを^{13}Cラベルした試料を用いた解析を試みた。^{13}Cの天然存在比は約 １% であるため、本研究で用いた[1-^{13}C]-L-Valineの場合、Fig. 5のようにカルボキシ基のみがラベルされた分子以外は、２スピンずつラベルされた分子が試料中に約 １% ずつ存在することになる。この試料を解析する場合、カルボキシ基からの距離しか得られないが、近距離の炭素同士の相関が支配的となる、という問題を回避し、得られる距離の精度が上がることが期待できる。そこでまず、S3, S5, S8 を Trans型の分子のピーク、S4, S6, S7をGauche 1型とした場合について炭素間の距離の解析を行った。炭素間距離の解析には。天然存在比試料の^{13}CのT_1とFig. 1(a)のパルス系列で天然存在比試料を測定して得られた ^{1}H-^{13}C間の双極子相互作用を用いる。構造上の変数はカルボキシ基－メチル基間の二面角のみとし、炭素間結合の距離、CH結合の結合角など他の変数は固定し、カルボキシ基－メチル基間の二面角のみを変数として解析した。その結果、Table 1のように S1とS2, S3, S4, S5, S8との距離は大きくともX線から得られた距離に対して 7 % 程度の誤差であったが、S1-S6, S7の距離の誤差が12から15 %と大きくなった。この原因については現在検討中である。また、帰属を入れ替えた場合や、X線構造から得られた炭素間の結合距離などの構造情報を用いない場合、どの程度の精度になるのかを発表当日までに検証する。また、L-Leucineについても同様の解析を行う。

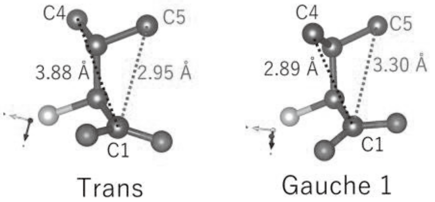


Fig. 2 Structures of L-Valine in a crystal from aqueous solution.

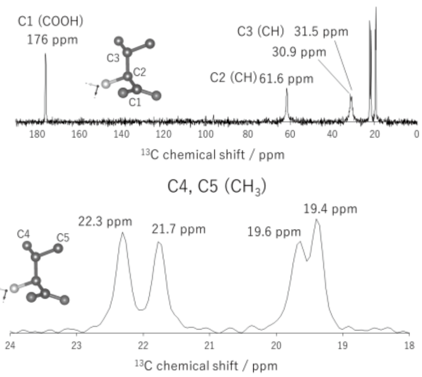


Fig. 3 Whole (top) and extended (bottom) ^{13}C NMR spectrum of L-Valine.

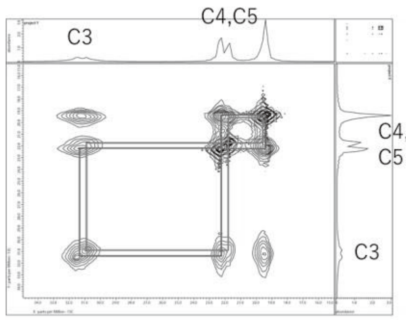


Fig. 4 2D DARR exchange NMR spectrum of $^{13}C_5$-L-Valine.

NMR信号の番号	化学シフト / ppm	^{13}C信号の帰属	本研究で求めた距離 / Å	X線の距離 / Å	X線との差 / %
S2	61.65	C2	1.63	1.53	6.5
S3	31.45	Trans, C3	2.45	2.49	1.6
S4	30.9	Gauche 1, C3	2.62	2.57	1.9
S5	22.29	Trans, C4	3.87	3.88	0.3
S6	21.73	Gauche 1, C4	3.7	3.3	12.1
S7	19.63	Gauche 1, C5	3.34	2.89	15.6
S8	19.36	Trans, C5	3.16	2.95	7.1

Table 1 Assignments and C-C distances of L-Valine

P73

固体NMRを用いたAlite(3CaO・SiO_2)の水和硬化過程の解析

○髙橋貴文[1]，金橋康二[1]
[1]新日鐵住金株式会社　先端技術研究所

Solid State NMR analysis on hydrating and hardening process of 3CaO･SiO_2

○Takafumi Takahashi [1] and Koji Kanehashi[1]
[1]*Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation*

Since alite (3CaO･SiO_2) is a most abundant mineral component in Portland cement, it has been used as a model substance to study hydration and consolidation process of Portland cement. Although the addition of gypsum ($CaSO_4$･$2H_2O$) is considered to accelerate hydration of alite, this phenomenon has not been systematically confirmed in terms of chemical structure analysis. In this study, we have studied changes of chemical structure during hydration of alite and investigated influences of addition of gypsum on its hydration using solid state NMR.

【諸言】

Alite(3CaO・SiO_2)は、ポルトランドセメントを構成する鉱物（クリンカー）の中で最も存在比率が高い。また、Fig.1に示すように、aliteを構成するSiO_4四面体は非架橋酸素から構成され、SiO_4が孤立したQ^0構造のため、セメントへの注水後、早期に水和反応を開始すると考えられている。

こうした特徴から、セメントの初期水和反応をシミュレートするための重要なモデル物質と見なされ、その水和硬化過程が研究されてきた。一方、近年、alite単体とセメントでは、初期強度や硬化組織に大きな乖離があることも指摘されている。例えば、Motaら[1]は、aliteへのgypsum（$CaSO_4$・$2H_2O$）添加によって、硬化組織に大きな違いが現れることを報告している。また、著者らも、大気圧走査電子顕微鏡を用いた追跡観察によって、gypsum添加により、水酸化カルシウム($Ca(OH)_2$)の晶出挙動や一定時間経過後の硬化組織に顕著な変化が生じることを見出した[2]。

こうした硬化組織の違いが報告される一方で、calcium silicate hydrate (CSH)等主要水和物の化学構造に対するgypsum添加の影響に関しては、知見が少ない。CSHの構造は非晶質に近く、X線回折では明確な回折線を与えないため、分子レベルの構造情報を取得可能な分光法が必要である。そこで、本研究では、固体NMRを用いて、水和前後のalite試料の解析を行い、水和硬化過程での化学構造変化およびgypsum添加の影響について検証した。

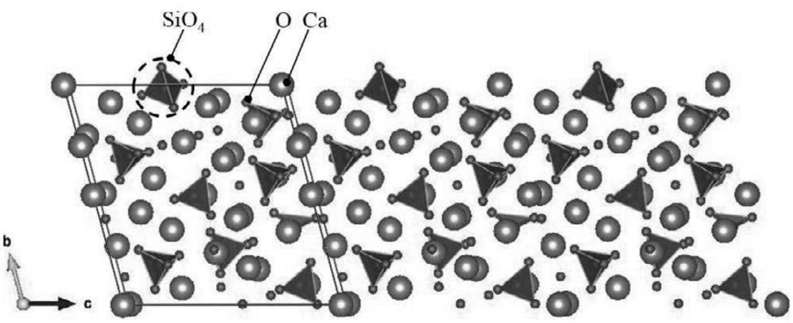


Fig. 1. Crystal structure image of alite[3] visualized by VESTA[4].

Keywords: 3CaO・SiO_2, ^{29}Si同位体標識, DQMAS

○たかはし　たかふみ、かねはし　こうじ

【実験方法】

Aliteは、^{29}Si同位体標識されたSiO_2に化学量論比を考慮した$CaCO_3$を添加して出発原料とし、脱炭酸後、焼成することで合成した。尚、実際のポルトランドセメント中のaliteを想定し、Caサイトの固溶元素として、数%のFe_2O_3, Al_2O_3を添加し、その分、$CaCO_3$混合量を微調整した。

上記のように合成したalite試料に、①水のみ、②$CaSO_4・2H_2O$および水を添加した各ケースについて、60s混合した後、25℃に設定された恒温槽内で養生した。所定の養生時間経過後、硬化体を取り出し、減圧下でアセトンに繰り返し浸漬させ、水和反応停止処理を施した。この処理後、硬化体試料を粉砕し、以下の固体NMR測定に供した。

^{29}Si MAS, ^{29}Si {^{1}H} CPMAS および ^{29}Si DQMAS NMR測定は、静磁場9.4T（ω_{si}=79.459 MHz, ω_H=400 MHz）、7mmϕ ZrO_2製試料管およびMAS回転周波数7kHzにて行った。^{29}Si MAS NMR測定は、 定量性を確保するため、π/6パルス（1.96μs）、繰り返し時間3s、積算4800回にて行った。

【結果および考察】

水和反応前後の^{29}Si MASスペクトルをFig.2に示す。この図より、gypsum 添加の有無に関わらず、24h水和後には79 ppm, 84 ppm付近に新たなピークが観測された。CPMASスペクトルでは、この新たなピークに加えて、72 ppm付近にもわずかなピークが観測されている。CPMAS測定では、H原子とSi原子の原子間距離が非常に近い構造のみが検出されるため、これらのピークは、C-S-Hあるいはその前駆体由来のピークと考えられる。化学シフト値より、72ppm付近のピークは全て非架橋酸素のQ^0構造、79ppm付近のピークは、Si四面体あたり架橋酸素1つから成るQ^1ネットワーク構造、84ppm付近のピークは、Si四面体あたり架橋酸素2つから成るQ^2ネットワーク構造に帰属される。

一方、^{29}Si-MASスペクトルでは、gypsum添加により、養生後、未水和aliteのピーク強度がやや低下し、79ppm, 84ppm付近のピーク強度がやや上昇した。よって、若干ではあるが、gypsum添加による水和反応の促進が示唆された。

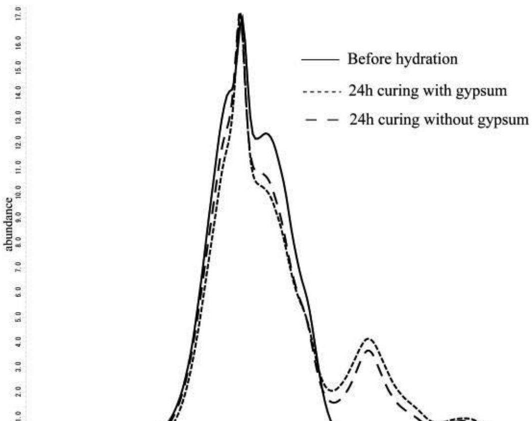


Fig. 2. ^{29}Si MAS NMR spectra of alite before and after hydration.

また、CPMASスペクトルでは、gypsumの添加有の場合において、全体として、シグナル強度が強く観測された。この原因として、単に水和物の生成量が多いということの他に、gypsum添加系では、水和物の運動性がより低いということも考えられる。

一方、^{29}Si DQMAS NMR測定より、水和物の前駆体と考えられる、殆ど縮合が進んでいないQ^1構造の他に、Q^1-Q^2間で僅かな相関を示すような、縮合した構造の存在も示唆された。この縮合した構造とは、Q^2サイトが内部、Q^1サイトが端面となり、微細な紐または糸のような存在であると推定される。

【References】

[1] B. Mota, T. Matschei, K.L. Scrivener, *Cem. Concr. Res.* (2015) 75, 53. [2] T. Takahashi, T. Jinnnai, M. Kimura, *proceedings of the 34th Anu. Cem. & Conc. Conf.* (2014) 277. [3] A. G. De la Torre, R. N. De Vera, A. J. M. Cuberos, M. A. G. Aranda, *Cem. Concr. Res.* (2008) 38, 1261. [4] K. Monnna, and F. Izumi, *J. Appl. Crsytallogr.* (2011) 44, 1272.

P74 固体NMRによるポリビニルピロリドン中に存在する水の状態分析

○石田宏之[1], 中田克[1], 古島圭智[1], 松田景子[1]
1 株式会社東レリサーチセンター

Structural analysis of water in polyvinylpyrrolidone by solid-state NMR

○Hiroyuki Ishida[1], Masaru Nakada[1], Yoshitomo Furushima[1], Keiko Matsuda[1]
[1] *Toray Research Center, Inc.*

The states of water in polyvinylpyrrolidone (PVP) were studied by using solid-state ^{2}H-NMR. In order to investigate the behavior of water in PVP, the temperature dependence from −90°C to 40°C of ^{2}H-NMR spectra and spin-lattice relaxation times T_1 were observed for PVP with various contents of water (D_2O). The water contents of PVP samples were adjusted to 18, 35, 57, 108, 145, 435 wt%. From the results of line-width of the D_2O peak and T_1 of D_2O in PVP samples, the mobility of water molecule in PVP is high as well as poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA) and hardly influenced by the water content over the melting point.

【緒言】

人工腎臓などの医療機器の多くにはポリマー材料が用いられているが、ポリマーの生体適合性の発現メカニズムは未だ解明されておらず、医療分野における重要な課題となっている。ポリマー材料表面の近傍では、ポリマーと相互作用した吸着水層が形成されている。吸着水はポリマーからの相互作用距離によって近傍水（不凍水）と中間水に分類される。また、ポリマー表面から離れたポリマーと相互作用していない水は自由水として存在し、通常のバルク水と同様の挙動を取っている。この中でポリマー材料表面における吸着水、特に中間水の存在が生体適合性の発現に大きく寄与していると着目されている[1)]。そこで本研究では、生体適合性ポリマーとして医療機器材料に広く用いられているポリビニルピロリドン（PVP）について、ポリマー中の水（重水）の状態・運動性の評価を固体^{2}H-NMRにより行った。

【実験】

乾燥重量当たりの水分率の異なるPVP（18, 35, 57, 108, 145, 435 wt%）試料を調製し、Bruker社製AVANCE III HD 400（9.4T）分光計を用いて^{2}H-NMRスペクトル測定と反転回復法による緩和時間T_1測定を行った。測定は、40°Cから−90°Cまでの冷却過程と、更に−90°Cで12時間以上保持した後の−90°Cから40°C までの昇温過程で行った。なお、各温度点では約15分保持した後に測定を実施した。

【結果と考察】

水分率108wt%に調製したPVPの昇温過程でのスペクトルをFig.1に示した。PVP中の重水のピークは−20°Cよりも高温の領域で、非常にシャープであり、温度依存性も小さい。従って、PVP中に存在する水（重水）はポリマーとの相互作用により、自由水が凍結する0°C以下の温度域でも凍らずに等方的な分子運動をしていることが推定される。しかしながら、−20°C以下の領域ではピーク幅は急激に増大し、−70°C

固体NMR、ポリビニルピロリドン、中間水

○いしだひろゆき，なかだまさる，ふるしまよしとも，まつだけいこ

以下ではピークは観測できなくなる。これはPVPの分子運動が凍結し、その中に存在する水の分子運動も凍結したためと考えられる。この挙動は、同様に血液適合性のあるポリ(2-メトキシエチルアクリレート)(PMEA)と類似している[2)]。

水分率57～435wt%のPVP試料のスピン-格子緩和時間T_1の温度可変測定結果をFig.2に示した。T_1値は4試料ともに−20°C近傍で極小を示し、それよりも高温側では溶液状態の水と同様にT_1値が大きい程分子運動性が高い領域にあり、低温側では逆にT_1値が大きい程分子運動性が低い固体領域にあると考えられる。−15°C以下では水分率が異なってもT_1値に大きな差は認められないが、それ以上では水分率による差が現れ始め、重水の融点を超えた5°C以上では水分率の高いものほどT_1値が大きくなっており、分子運動性の違いが明確になっている。

PVPとの相互作用が強いため比較的分子運動性の遅い中間水(DSCにおける不凍水)のみの水分率である57wt%に比べて、PVPとの相互作用が弱く比較的分子運動性の速い中間水(DSCにおける融点低下水)も存在する108wt%以上の試料では、中間水の融解が始まることにより−15°C以上でT_1値が大きくなっていると考えられる。

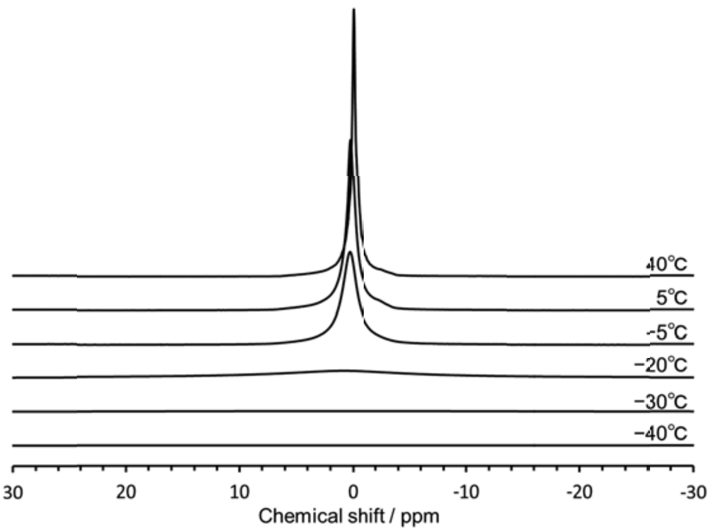


Fig. 1. ^{2}H-NMR spectra of D_2O (108 wt%) in PVP at various temperatures.

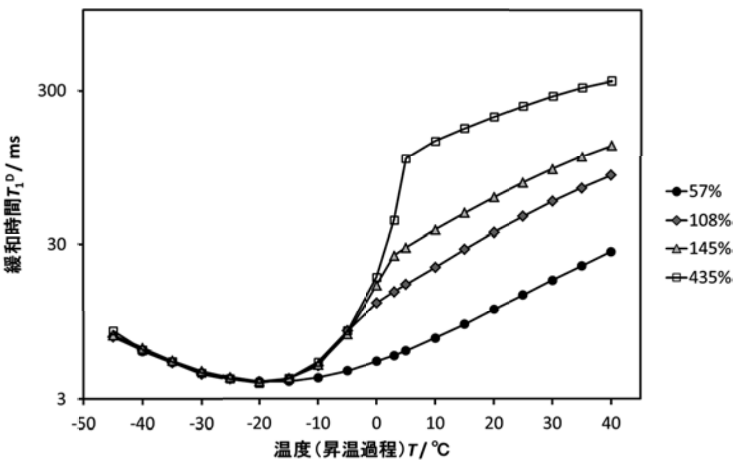


Fig. 2. Spin-lattice relaxation time (T_1) of D_2O in PVP at various temperatures.

≪参考文献≫
1) 田中賢: 化学と教育, **60(6)**, 250 (2012).
2) 三輪優子, 田中賢, 押山広明, 望月明: バイオマテリアル-生体材料, **21(2)**, 143 (2003)

P75 超偏極MAS-DNP固体NMRによる絶対偏極率測定法の開発と偏極の不均一性評価

○杉下友晃[1]，深澤隼[1]，松木陽[1]，藤原敏道[1]
[1]大阪大学・蛋白質研究所

Measurement of absolute polarization and analysis of heterogeneity in local polarization by hyperpolarized MAS-DNP solid-state NMR

○Tomoaki Sugishita [1], Jun Fukazawa[1], Yoh Matsuki[1], and Toshimichi Fujiwara[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan*

High-field dynamic nuclear polarization (DNP) becomes commonly used in solid-state NMR these days. In order to evaluate various conditions in DNP experiments, absolute amplitude of nuclear polarization has generally measured based on an enhancement factor by taking a ratio of peak intensity with or without submillimeter wave (SMMW) irradiation. However this conventional method has the serious problem that it doesn't provide actual equilibrium peak intensity without SMMW with magic angle spinning under ultralow temperature. The new method in this study, which uses a spin correlated component of Zeeman polarization, does not suffer from this problem. The experimental results showed the new method provided larger polarization than that by the conventional method. The result suggested this method give the polarization reflecting heterogeneity of local polarization derived from DNP. Thus we can probably obtain not only absolute polarization but also distance information with this method.

近年の固体NMR測定において、高磁場動的核分極（DNP）法を用いることはより標準的な選択肢になりつつある。NMR測定では観測核の偏極が大きければ大きいほど得られるシグナルの強度も大きくなるため、極低温下のDNP法によって電子から核への偏極移動が行われれば、理論的には与えられるシグナルの強度は室温下の最大1,000倍以上にもなる。当研究室においては、この高磁場DNPと極低温ヘリウムガスによるマジック角試料回転(MAS)を組み合わせて、感度と分解能を両立した固体NMR測定を行うことに成功している。

一方で、高磁場DNP法を用いた固体NMRは未だ最適化されていない部分も多く、新規ラジカル分極剤の評価やサブミリ波照射系の開発においてスピン偏極率の正確な評価は必須の課題である。一般にDNP測定においては、サブミリ波照射のON/OFF時のピーク強度を比較することによって信号の増強率であるenhancement factorを計測し、間接的に偏極率を評価している。一方で、極低温条件のMAS下におけるサブミリ波OFF時のピーク強度は実際の強度よりも小さくなってしまい（Thurber effect）、偏極率が過大評価されてしまうという問題が報告されている[1]。この問題を解決するために、新しい偏極率測定法を開発することが求められている。

この新しい偏極率測定のカギとなるのがスピン相関高次成分である。通常、NMR測定においては、単純化のために平衡状態の密度演算子（式(1)）として線形項のみを残す高温近似がなされる。しかし、超偏極を達成した系では高温近似が成り立たず、ゼーマン分極の高次項が無視できなくなる。例えば、2スピン系*IS*の平衡状態の密度演算子は、通常ならば観測核の線形項を考えるだけで十分であるが、スピン温度が1 K以下であるような超偏極下では*IS*スピン相関項の寄与

固体NMR，動的核分極（DNP），偏極率

○すぎしたともあき，ふかざわじゅん，まつきよう，ふじわらとしみち

実際にシグナルに影響を与えるようになる。

$$\rho_{\mathrm{eq}}^{IS} = \mathrm{Tr}\{I_{\mathrm{z}}\rho\}I_{\mathrm{z}} + \mathrm{Tr}\{S_{\mathrm{z}}\rho\}S_{\mathrm{z}} + \mathrm{Tr}\{2I_{\mathrm{z}}S_{\mathrm{z}}\rho\}2I_{\mathrm{z}}S_{\mathrm{Z}} + \mathrm{Tr}\left\{\frac{1}{2}E\rho\right\}\frac{1}{2}E \qquad (1)$$

ただし、$\rho = (1/Z)\exp(-\hat{H}_0^I/kT_I - \hat{H}_0^S/kT_S)$である。ここで、スピン相関成分$\mathrm{Tr}\{2I_{\mathrm{z}}S_{\mathrm{z}}\rho\}$と$S$スピン線形成分$\mathrm{Tr}\{S_{\mathrm{z}}\rho\}$の比は$I$スピンの偏極率$2\mathrm{Tr}\{I_{\mathrm{z}}\rho\}$になっていることが理論的に証明できる。以上から、超偏極下のスピン相関成分を利用することによってサブミリ波ON状態のシグナルのみを用いて偏極率を測定することが可能になり、従来の問題は解決される。

式(1)からも分かるように、超偏極下のS核のNMR測定では線形項S_{z}とスピン相関項$2I_{\mathrm{z}}S_{\mathrm{z}}$由来のシグナルが混在した状態で得られる。特に1 pulse測定では線形項はin-phaseピーク、スピン相関項はanti-phaseピークを与えるため、溶液NMRにおいてJ分裂したピークではdoubletの非対称性として偏極率を計算することができる[2]。しかし、固体NMRでは相互作用の異方性成分によって線幅が広がってしまうために、溶液NMRと同様の方法で偏極率を測定することは不可能である。

そこで、線形成分とスピン相関成分を別々に測定するためのパルスシークエンスを作成した。また、in-phase項およびanti-phase項を、MASを考慮したCSAや異種核双極子相互作用のハミルトニアン下で発展させるようなスピン動力学シミュレーションプログラムを作成し、超偏極NMR実験によって得られるスペクトル線形を予測した。測定試料として^{13}C-^{1}H系をもつ^{13}C$^{\alpha}$標識L-アラニンを用いた。シミュレーション結果と実験から得られた結果を比較したところ、スペクトル線形はよく一致した（Fig. 1）。

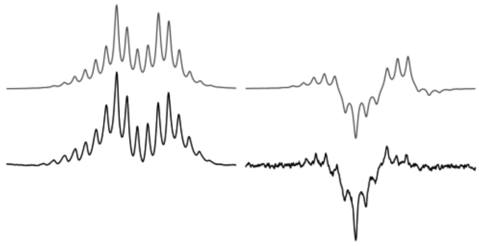


Fig. 1. In-phase signals (left) and anti-phase signals (right) in simulated (top) and experimental (bottom) spectra. The vertical scales for the two spectra are different.

得られたピークから偏極率を計算したところ、7.42 %と得られた。一方で、従来のサブミリ波ON/OFF時のピーク強度比から得られた偏極率は5.55 %であった。すなわち、本研究によって得られた偏極率は従来法によって得られた偏極率よりも大きかった。これは、従来法では本来の偏極率よりも過大評価された値が得られるという事前の予測とは異なっている。

この結果は、DNPによって引き起こされた偏極率の空間的な不均一性を反映するという本手法の性質に基づいて解釈できる。偏極はDNPによってバイラジカル分極剤の電子から核へ、また核間をスピン拡散によって移動していくため、DNP法を用いた試料では分極剤を中心とした偏極率の空間位置依存性が生じる。同時にバイラジカルの不対電子を中心とした常磁性緩和によって、バイラジカルに近い核は優先的に緩和してシグナルを与える。つまり、核スピンを飽和してからの回復時間が短ければ、偏極の増大したバイラジカル近傍の偏極が観測され、回復時間を十分とれば試料全体の平均の偏極率が与えられることとなる。極低温下では^{13}C$^{\alpha}$の緩和時間は非常に長くなり、この測定では十分な回復時間をとることができなかったため、平均値を測定する従来法よりも局所的な高偏極を反映した本手法の偏極率の方が大きく得られたものと考えられる。

上述の考察から、回復時間を十分待つことで、従来法の問題を回避した試料全体の本来の偏極率が得られると予想される。また、DNPによる偏極の不均一性が今回の結果に反映されているならば、偏極率は回復時間依存性をもつはずである。不均一性の評価は、距離や構造の情報を与える局所偏極率測定への応用にも繋がりうる。本発表では、これらの検証結果を報告する。

Reference

[1] K. Thurber and R. Tycko. (2014) *J. Chem. Phys.*, **140**, 18420.

[2] B. Vuichoud *et al*. (2015) *J. Magn. Reson.*, **260**, 127-135.

P76 NMRを用いた代謝・運動性プロファイルから見る魚類多様性

○魏菲菲[1]，伊藤研悟[1]，坂田研二[1]，清水智子[1]，伊達康博[1,2]，菊地淳[1,2,3]
[1]理研CSRS　[2]横市大院・生命医　[3]名大院・生命農

Physical and chemical characterization of fish muscle diversity by NMR

○Feifei Wei[1], Kengo Ito[1], Kenji Sakata[1], Tomoko Shimizu[1], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]RIKEN CSRS, Yokohama, Japan; [2] Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., Yokohama, Japan;
[3] Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., Nagoya, Japan.

NMR experiments with 1D spatial encoding are not so common even though they provide data that are spatially resolved along the sample depth-profile, which could provide detail information on the microstructure of organism samples. In the present study, the NMR relaxation times, diffusion coefficients and chemical shifts of fish muscle samples were analyzed along its 1D-concentration profile to obtain spatially resolved information on the physical and chemical characterization. Significant differences of T_2 and chemical shift profiles were observed between the red and white muscle tissues, which indicated the 1D MRI may be a powerful tool to evaluate the fish muscle based on its species diversity.

NMR イメージング（MRI）法は核磁気共鳴の現象を利用し，試料中の原子核の密度や運動性の空間特徴を習得する手法であり，形態学と生化学的情報を同時に収集することができる。パルス磁場勾配NMRを用いて観測原子核のZ軸方向沿いの空間分布や運動性特徴を取得する手法は一次元（1D）MRIとも呼ばれる。1D MRI手法を利用した研究例とし、水が多孔質体材料への浸潤過程の追跡(1)や、エマルションの粒子サイズ評価(2)、^{7}Li電池中の電荷キャリアの空間分布(3)などが挙げられ、生体試料への応用例はまだ少ない。

筋肉組織などの生体試料は様々な生理機能を発揮するために複雑な化学組成と微細構造を示す。一方、食品の視点からその化学的な組成および物理的な微細構造が食品、特に肉類の呈味や食感などのファクターと繋がると考えられる。国連食糧農業機関（UNFAO）によると、魚類は世界中約10億人が主なタンパク源としている。日本では魚肉の肉質特徴から使途（刺身、練り物など）が決められるが、評価・利用されている魚種は僅かの一部とのことが現状である。NMRを用いた魚類筋肉に関する研究は主に二つの方法に分けられ：魚肉の抽出物で代謝物プロファイルを取得する(4)；あるいはインタクトで観測コイル範囲内の組織の平均化した結果で組成や運動性を評価する。数センチ範囲内でも不均一性を有する魚類筋肉試料に対して、さらに微細構造な物理化学特性を評価する必要があるものの、このようなNMR研究例は未だ報告されていない。

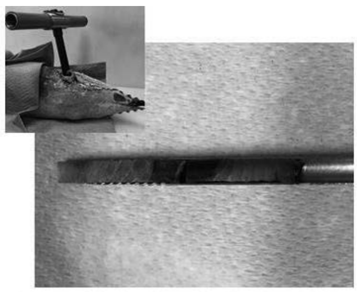


Figure 1. Fish muscle samples used in the 1D MRI

魚類多様性、運動性、バイオインフォマティクス
○うぇいふぇいふぇい，いとうけんご，さかたけんじ，しみずともこ，だてやすひろ，きくちじゅん

本研究の目的は1D MRIの手法を開発し、様々な魚類筋肉組織の微細構造や化学組成の空間特徴を示し、従来の抽出溶液データと比較することで、新たな魚肉の評価法創成を狙うこととした。

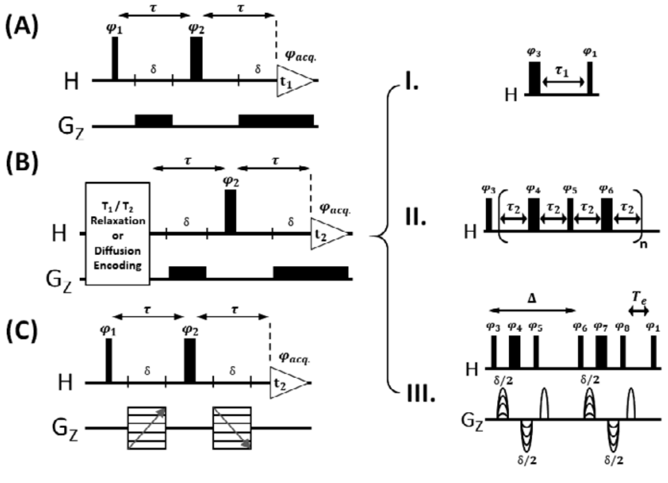


Figure 2. 1D MRI Pulse sequence of (A) proton density weighted imaging (PDWI); (B)I. T1 weighted imaging (T1WI), II. T2 weighted imaging (T2WI) and diffusion weighted imaging (DWI); (C) chemical shift imaging (CSI).

本研究では日本全国の近海沿岸河口域などでサンプリングした多種多様な天然魚、もしくは養殖魚を対象とした。図1で示されたようなコアサンプラーで冷凍状態の魚肉組織を採集し、そのまま100µlのKPi(1mM, D_2O)を入れたNMR試料管に挿入し、NMR観測に用いた。Bruker Avance III 700 MHzのNMR装置では5つのイメージングパルスシーケンス（図2：プロトン密度強調像（PDWI）、縦緩和強調像（T_1WI）、横緩和強調像（T_2WI）、拡散強調像（DWI）およびケミカルシフト画像（CSI））を開発・整備し、魚肉の1D MRIに応用した。

spin-echoの180°パルスの前後および取り込み中にZ方向磁場勾配を入れること（図2A）で、Z方向に位置ごとの^{1}H密度画像を得られることができ、魚肉（ソウダガツオ）のPDWI（図3）を確認したところ、筋肉組織の種類（赤筋・白筋）に関わらず均一的な信号が見られた。T_1/T_2/diffusion coefficients計測のためのInversion Recovery/Periodic Refocussing of J Evolution by Coherence Transfer/DOSYシーケンスに図2Aのイメージングブロックを付けることで、それぞれZ軸方向の空間位置によるイメージング信号を観測され、魚肉に応用してみた結果（図3）、T_2WIのほうではカツオの赤筋と白筋の間に差が見られた。魚の血合い部分には酸素を貯蔵するミオグロビンというタンパク質が多く含有し、その中心にはヘム鉄という形の鉄が存在する。赤筋がより短いT_2を示す理由は、ヘム鉄の常磁性効果によるものと考えられる。一般的なMRI装置と違い、NMRイメージングの大きいなメリットはパルスシーケンスを自由に組み合わせることである。魚肉（カタクチイワシ）のケミカルシフトのイメージングは図2Cで示されたパルスで実現でき（図3.CSI）、赤筋と白筋の空間分布による化学組成の差が観測された。以上の結果から、1D MRIは魚類筋肉特徴評価の新しい手法として期待でき、本大会では多種多様な魚類筋肉サンプルに展開し、抽出溶液と比較した結果について議論したい。

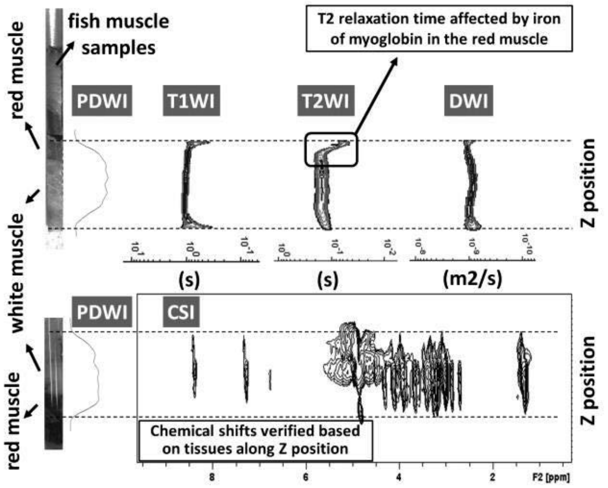


Figure 3. PDWI, T1WI, T2WI, DWI and CSI of fish muscle samples. Both T2 relaxation time and the chemical shifts were observed verifying between red and white fish muscle tissues.

【参考文献】

(1) Feunteuna, S. L., *et al.*, **Magn Reson Imag**, 2011, 29, 443.

(2) McDonald, P. J., *et al.*, **Phys Rev E**, 1999, 59, 874.

(3) Klamor, S., *et al.*, **Phys Chem Chem Phys**,2015, 17, 4458.

(4) Wei, F., *et al.*, **Sci. Rep.**, 2018, 8:3478.

P77 タンパク質の固体NMR分解能向上のための側鎖選択的重水素標識法の開発

○宮崎勇輝[1]，高橋涼[1]，松田勇[1]，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

New method for selective deuteration of side chains for high-resolution protein SSNMR

○Yuki Miyazaki[1], Ryo Takahashi[1], Isamu Matsuda[1], Toshio Yamazaki[2], and Yoshitaka Ishii[1,2]
[1]*School of Life Science and Technology, Tokyo institute of Technology,*
[2]*NMR Division, RIKEN SPring-8 Center, RIKEN*

Solid-state NMR (SSNMR) measurement using ^{1}H detection is attracting attention as a powerful method of protein structure determination. However, the ^{1}H line broadening due to ^{1}H-^{1}H dipolar interactions can-not be completely eliminated even with the 100 kHz ultra-fast MAS, which is an obstacle to signal assignment and structure determination. In this study, we developed a method to selectively deuterate side chains at a high deuteration level with *E. coli* BL21 (DE3) expression system while maintaining the protons at the α-position, which are useful for determining the backbone structure. ^{1}H-detected 2D ^{1}H-^{13}C SSNMR data showed a drastically simplified spectrum and improved resolution for a microcrystalline sample of uniformly ^{13}C-and ^{15}N-labeled GB1 protein that was deuterated by this method.

序論

^{1}H観測を用いた固体NMR法はタンパク質構造決定の有力手法として注目を集めている。しかし、^{1}H-^{1}H双極子相互作用による^{1}H線幅増大は100kHzの超高速MASを用いても完全には除去できず、信号帰属と構造決定上の障害となる。側鎖スペクトルの単純化と^{1}H信号分解能の向上がタンパク質の主鎖構造解析の容易化に貢献できると考え、本研究では、大腸菌BL21(DE3)発現系を用いてα位の水素を^{1}Hに保ったまま、簡便に側鎖を選択的に重水素標識する方法を開発した。

原理

側鎖の大部分を重水素標識する一方でα位を^{1}Hに維持する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を原理としている。アミノ基転移反応によってα-ケト酸はアミノ酸からアミノ基を受け取りアミノ酸へと変換される。この過程でα-ケト酸のα位にはアミノ基と同時に溶媒由来の水素が導入される。この反応を利用して、私は大腸菌を用いた発現系において均一^{2}H, ^{13}C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^{1}Hを導入し、側鎖のみを選択的に重水素標識する手法を開発した。

選択的重水素標識、固体NMR、分解能

○みやざきゆうき、たかはしりょう、まつだいさむ、やまざきとしお、いしいよしたか

結果・考察

図１は、(a)^{1}H標識GB1試料と(b)選択的重水素標識GB1試料に対し600MHz溶液NMRで得られた^{1}H-^{13}C HSQC側鎖スペクトルを示す。^{1}H標識試料では全ての水素原子のピークが確認できるが、本技術を用いた試料では約5割の信号に対してピークの消失もしくは強度の大幅な抑制が観測された。またこれらの帰属によって、重水素標識が高効率で行われるアミノ酸種がある一方でそうでないアミノ酸種も存在することが分かった。この重水素標識効率のアミノ酸依存性について考察したところ、クエン酸回路下流アミノ酸に共通して低効率であることが示唆された。これを解決するためにクエン酸回路阻害剤を用いた条件についても検討している。

また、固体NMR分解能の向上に関しては、2D (H)CHのdouble-CP測定を行った。この結果から、α領域の独立した全てのピークにおいて線幅の向上が確認できた。試料作製の詳細と固体NMRのデータについてはポスターにて発表を行う。

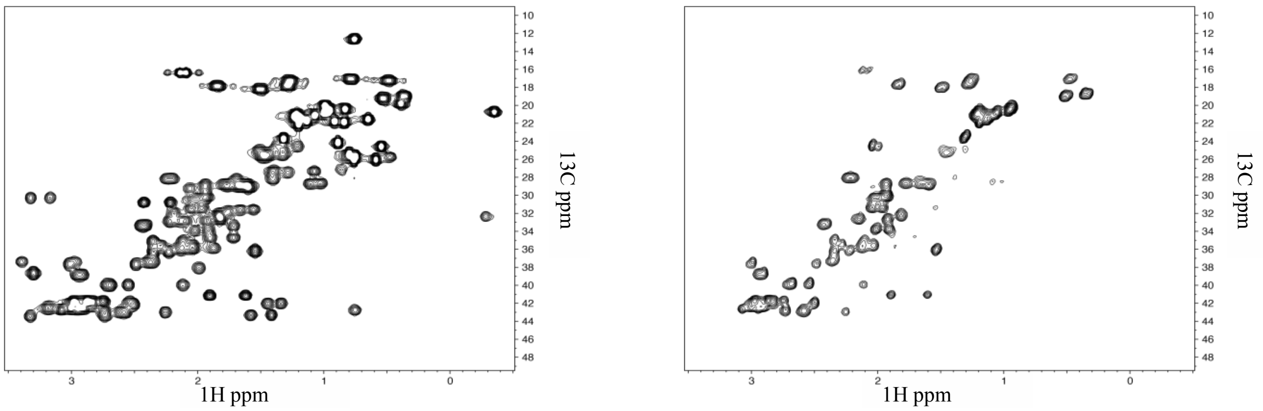


Fig. 1. ^{1}H-^{13}C HSQC side chain spectra of (a) fully protonated GB1, and (b) selectively deuterated GB1. Both the buffers are 50mM Na-PO$_4$ (pH 6.9) diluted with D$_2$O

P78

体毛からの有用情報抽出のための試料調製と NMR 解析条件検討

○塚本　楓[1]，坂田　研二[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

Investigation of sample preparation and analytical method for useful information mining from hairs

○Kaede Tsukamoto[1], Kenji Sakata[2], Jun Kikuchi[1, 2, 3]
[1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ.,[2]RIKEN CSRS,　[3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.

Analytical approach to evaluate healthcare status of animals including human is generally measured biofluids and excretions, such as blood, saliva, urine, feces, amniotic fluid etc., expect for the case of MRI diagnosis. However, those samples are physically unstable and easily perturbed by circadian rhythm. On the other hand, body hair is stable for time degradation and easily sampling by non-invasively. In addition, if we get effective biological information from body hair by simplified analytical instruments, it is expected to extract novel quality evaluation of food metabolism and early detection of disease status. Therefore, we have started to use body hair as getting biological information because of their useful features as mentioned above. In this study, we report investigations of appropriate sampling and analytical approaches from solid/liquid /benchtop NMR instruments due to extracting effective information of body hair.

【背景・目的】 MRI 装置を活用する場合を除いて、ヒトを含む動物の健康状態を解析し得る生体試料には血液[1]、唾液[2]、尿[3]、糞便[4-7]、羊水等がある。しかしながら、これらの生体試料は概日リズムの影響を大きく受け[8]、また採取後においても酸化等への劣化防止が必要とされる。一方、このような代謝変動等の理由で管理や保管に留意すべき生体試料に比べ、体毛は簡便にサンプリングが可能で、劣化しにくい特徴を有する。この体毛から簡易装置等により有用な生体情報を抽出する事が出来れば、食の品質評価・疾患の早期発見等への展開が期待出来る（図１）。そこで、本研究では、溶液 NMR(700 MHz)、固体 NMR(500 MHz)、卓上 NMR(60 MHz)を用いて体毛中における有用な情報を抽出するために、試料の抽出や分析条件検討を行った。

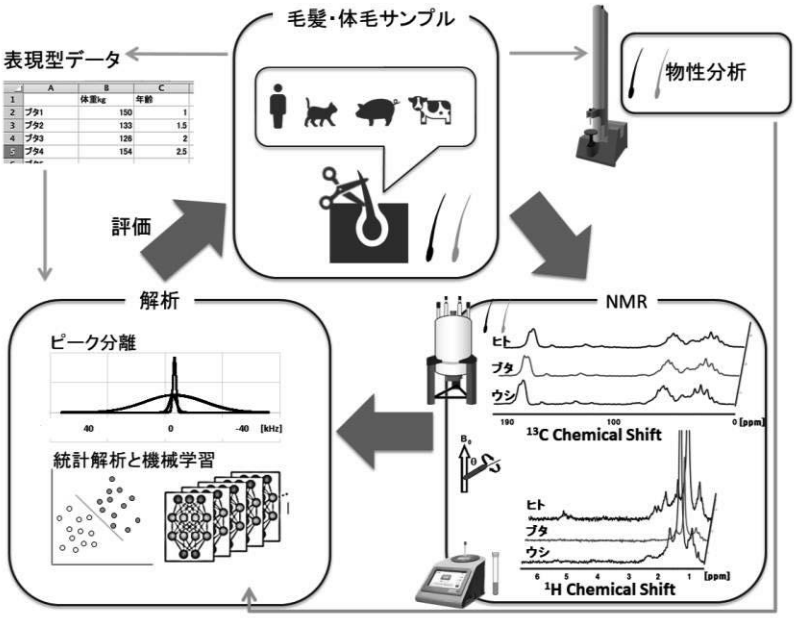


Fig. 1. Conceptual scheme

【方法】ヒト、ブタ、ウシ、ネコの毛髪、体毛を用いて固体 NMR による ^{13}C-CP/MAS、等方および異方性^{1}H、卓上NMRによる溶液^{1}H-NMR測定を行った。^{13}C-CP/MASスペクトルに対してはNMF

固体試料、ピーク分離、プロファイリング

○つかもとかえで，さかたけんじ，きくちじゅん

(non-negative matrix factorization, 非負値行列因子分解)法を用い[9]、毛髪、体毛中の主成分であるケラチン中の α ヘリックス、β シート・ランダムコイル構造に由来するピークの分離を行った。また異方性 ^{1}H スペクトルはフリーソフトウェア fityk によりピーク分離を行い、各種体毛中における水の運動性を評価した。ここでは同じヒトの毛髪サンプルを用いて保存条件、採取日、破砕条件によるスペクトル相違の評価も行った。また毛髪、体毛を租粉砕した後、卓上 NMR により脂溶性画分の評価を行った。

【結果･考察】オートグラフ装置により剛直な物性を確認していたブタ体毛に関しては、^{13}C-CP/MAS スペクトルのピーク分離結果から α ヘリックス構造が多い傾向が得られた。僅差ではあるが同じ試料の微粉砕処理では、α ヘリックス構造の割合が低下していた。一方で異方性 ^{1}H スペクトルを用いて各種毛髪、体毛中における水の運動性の異なる 3 成分(自由水、中間水、結合水)を分離し比較した結果、保存条件(-30℃、常温、デシケーター、40℃)が異なる毛髪サンプルのばらつきが小さいことから、毛髪および体毛は安定した生体試料であることが示唆された。また、ブタやウシなどの家畜動物は均一な環境で育てられていることからばらつきが小さい傾向にあり、一方、ヒト毛髪では、個人差や時系列での差が大きい傾向にあった(図２)。これは個々で食事や生活様式が異なるヒトの毛髪成分および組成が変化することが示唆され、毛髪、体毛などの生体試料は恒常性評価等に役立つ情報が蓄積されている可能性が考えられる。特にブタ体毛に関しては α ヘリックス構造の超分子集積化した、ミクロフィブリル繊維の外側に由来すると考えられる自由水、中間水の割合が最も低く、水の存在状態と α ヘリックス組成の両方が剛直な物性に関与していると示唆された。本発表ではこれらの結果に加え超高速MASによる固体 ^{1}H 検出型実験や､hr-MAS および卓上NMR 装置を駆使した組成解析についても報告したい。

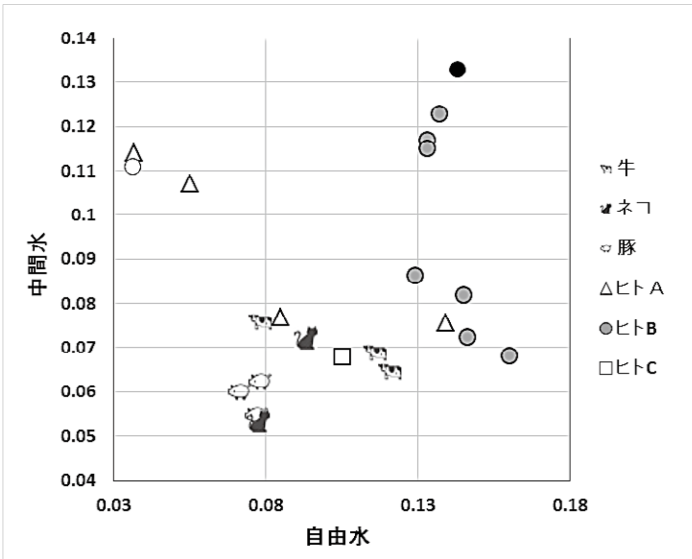


Fig. 2. Profile of aquatic mobility between free and interface water in hairs

References

1 Motegi, H. *et al. Sci Rep* **5**, 15710, (2015).

2 Misawa, T., Date, Y. & Kikuchi, J. *J Proteome Res* **14**, 1526-1534, (2015).

3 Shiokawa, Y., Misawa, T., Date, Y. & Kikuchi, J. *Anal Chem* **88**, 2714-2719, (2016).

4 Fukuda, S. *et al. Nature* **469**, 543-547, (2011).

5 Furusawa, Y. *et al. Nature* **504**, 446-450, (2013).

6 Misawa, T., Komatsu, T., Date, Y. & Kikuchi, J. *Chem Commun* **52**, 2964-2967, (2016).

7 Shima, H. *et al. Nutrients* **9**, e1307 (2017).

8 Mekuchi, M., Sakata, K., Yamaguchi, T., Koiso, M. & Kikuchi, J. *Sci Rep* **7**, 9372, (2017).

9 Wei, F., Ito, K., Sakata, K., Date, Y. & Kikuchi, J. *Anal Chem* **87**, 2819-2826, (2015).

P79 MATPASS法を用いた蓄電池正極のLi脱離･挿入挙動解析

○下田景士[1], 矢澤宏次[2], 村上美和[1], 松原英一郎[3]
1 京都大 産官学連携本部
2 (株)JEOL RESONANCE
3 京都大院 工学研究科

Li Extraction/Insertion Process of a LIB Positive Electrode Material Studied by MATPASS Technique

○ Keiji Shimoda[1], Koji Yazawa[2], Miwa Murakami[1], Eiichiro Matsubara[3]
1 Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University
2 JEOL RESONANCE Inc.
3 Graduate School of Engineering, Kyoto University

Rechargeable lithium-ion battery (LIB) is currently accepted to be one of the most suitable energy storage resources for portable electronic devices. We here investigate the Li extraction/insertion process of a LIB positive electrode material, $Li_{1.25}Ni_{0.20}Mn_{0.55}O_2$, during charge–discharge cycles by using ^{7}Li MATPASS NMR technique. The MATPASS spectrum of the pristine material shows that $Li_{1.25}Ni_{0.20}Mn_{0.55}O_2$ has a composite layered structure of $Li[Li_{1/3}Mn_{2/3}]O_2$, $Li[Li_{3/9}Ni_{1/9}Mn_{5/9}]O_2$ and $Li[Ni_xMn_{1-x}]O_2$ nanoscale domains. The Li ions are extracted from both the Li and transition-metal (TM) layers in the $Li[Li_{1/3}Mn_{2/3}]O_2$ and $Li[Li_{3/9}Ni_{1/9}Mn_{5/9}]O_2$ domains, but the Li ions remain in the $Li[Ni_xMn_{1-x}]O_2$ domain at 4.8 V. During the Li intercalation process, the TM ion migration and mixing leads to a domainless structure, becoming a homogeneous layered structure of $Li[Ni_{0.27}Mn_{0.73}]O_2$. After the irreversible structural modification in the 1st cycle, the bulk structure shows a reversible structural change during the charge–discharge cycles.

リチウムイオン二次電池は、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。一般的に$Li[Li_xM_{1-x}]O_2$あるいはLi_2MnO_3-LiMO_2で表記されるLi過剰系正極は200 mAh/gを越える高容量化が期待される正極材料として注目されているが、Li脱離・挿入メカニズムとそれに伴う構造変化の詳細はよく解っていない。今回、近年開発されたMagic-angle turning phase-adjusted sideband separation (MATPASS)法[1]を用いて$Li_{1.25}Ni_{0.20}Mn_{0.55}O_2$正極の充放電に伴う構造変化について解析を試みた。

$Li_{1.25}Ni_{0.20}Mn_{0.55}O_2$は$LiOH·H_2O$, $MnCO_3$及び$NiCO_3$試薬の混合粉末を900 °Cで12時間焼成することで作製した。活物質:アセチレンブラック:PVDFを8:1:1構成とした合剤電極、Li対極、1M $LiPF_6$電解液(EC:EMC = 3:7)を使用したセルを作製した。充放電評価はカットオフ電位を4.8 – 2.0 V vs. Li/Li$^+$として、50 °Cにて定電流モード(0.05Cレート)で実施した。目的とする容量または電位で電気化学測定を中断し、Ar雰囲気のグローブボックス内で電極を解体した。同様に、容量・電位

MATPASS、Li過剰系正極、リチウムイオン二次電池

○しもだ けいじ，やざわ こうじ，むらかみ みわ，まつばら えいいちろう

低下が確認できる20サイクル後の充放電試料も作製した。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た。^{7}Li MATPASS測定はECA-600 @14.1 Tで行った。MAS速度は30 kHzとした。繰り返し時間は0.1 sで実施した。

図1,左パネルは様々な測定条件での$Li_{1.25}Ni_{0.20}Mn_{0.55}O_2$のNMRスペクトルを示している。上3本はHahn echo法によって得られたスペクトルである(^{6}Liスペクトルは同位体濃集試料で測定)。^{6}Liスペクトル@100 kHzで辛うじてスピニングサイドバンド(ssb)の重なりがないスペクトルが得られる。一方で、^{7}Li MATPASSスペクトル@30 kHzではssbのない等方シフトのみが確認できる。MATPASSスペクトルのピーク分離によって、$Li_{1.25}Ni_{0.20}Mn_{0.55}O_2$の構造が$Li[Li_{1/3}Mn_{2/3}]O_2$, $Li[Li_{3/9}Ni_{1/9}Mn_{5/9}]O_2$及び$Li[Ni_xMn_{1-x}]O_2$ドメインの複合層状構造であることが理解できる(図1,右パネル)。

充放電解体試料のMATPASSスペクトルから、初期充電過程では、Li層と遷移金属(TM)層の両方からLiが脱離し、満充電状態(4.8 V)では$Li[Ni_xMn_{1-x}]O_2$ドメインのLiが残っていることが示唆された。以上の結果は、報告されている初期充電の電荷補償メカニズム[2]から考えられるLi脱離プロセス((i)充電スロープ領域での$Li[Ni_xMn_{1-x}]O_2$ドメインからのLi脱離と(ii)充電プラトー領域での$Li[Li_{1/3}Mn_{2/3}]O_2$ドメインからのLi脱離)とは整合しない。また、充放電サイクルによるTMイオンの移動及びミキシングが進むことでドメイン構造が消失し、TM層にはLiがほとんど入らない$Li[Ni_{0.27}Mn_{0.73}]O_2$ライクな均一な層状構造に変化することが明らかになった。

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] Hung *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1898 (2012).
[2] Shimoda *et al.*, *J. Mater. Chem. A* **4**, 5909 (2016).

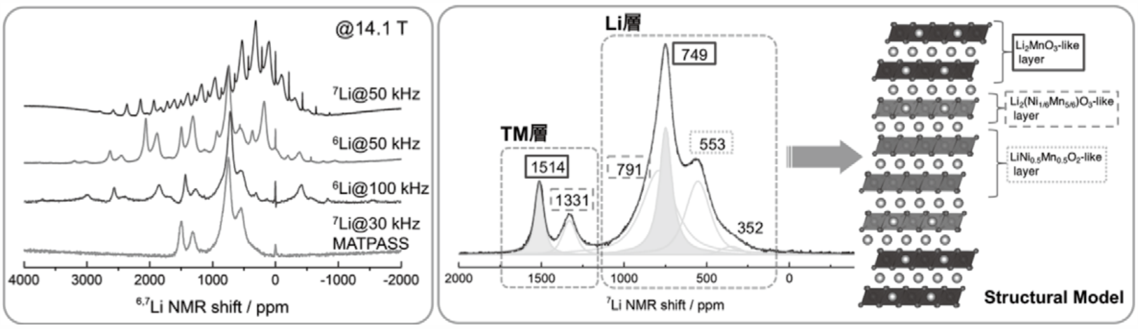


Fig.1 A comparison of NMR spectra of $Li_{1.25}Ni_{0.20}Mn_{0.55}O_2$ acquired with different experimental conditions (left panel), and a peak separation and a structural model of $Li_{1.25}Ni_{0.20}Mn_{0.55}O_2$ (right panel).

P80

褐炭の酸及び熱処理による改質における構造変化の固体NMRによる検討

○出田圭子[1], 下原孝章[1], 上田守男[2], 宮脇仁[1], 尹聖昊[1], 齋藤公児[3], 持田勲[2]
1 九州大学先導物質化学研究所
2 九州環境管理協会
3 新日鐵住金（株）技術開発本部

Investigation of structural change caused by acid and heat treatment of brown coal by solid-state NMR

○Keiko Ideta [1], Takaaki Shimohara[1], Morio Ueda[2], Jin Miyawaki[1], Seong Ho Yoon[1], Koji Saito[3], Isao Mochida[2]
1Kyushu University,
2Kyushu Environmental Evaluation Association
3 Nippon Steel & Sumitomo Metal

Victorian Brown coal of huge reserve is a promising resource as a future energy source. High moisture content and huge spontaneous heating are issues at its utilization.
Two lots of Loy Yang coal are studied – on present study to find large difference in their spontaneous heating when carbonized at 400ºC.
Solid state ^{13}C NMR was applied to differential the reactant of thin alkyl and oxygen functional groups when heated. Behavior of aluminum in their minerals were also studied by ^{27}Al NMR.

【背景】

低品位炭である褐炭は埋蔵量も多く、今後の有望な資源の可能性を秘めている。しかし多量の水分を含んでおり、乾燥すると自然発熱・発火を起こすことから貯蔵や輸送が困難であり現在のところ産炭地の燃料以外の有効利用は進んでいない。我々は褐炭の特長のいくつかにはナトリウムが関係していると考え、^{23}Na固体NMRを用いて検討を行ってきた。

一方、 同じビクトリア州ラトローブバリー産であっても自然発熱の挙動に差があり、同時に成分や形態が異なる。本発表では、褐炭の骨格及び灰分の構造の差異や、乾燥及び乾留による変化を代表的な褐炭、Loy Yang炭を用いて検討した。

【実験】

Lotの異なるLoy Yang炭を２種用意し、LY1、LY2とした。これらの乾燥炭及び窒素ガス雰囲気下で300,400℃で乾留した試料を作成した。各試料炭を断熱下,酸素を20mL/minで流し昇温を追跡した。40℃から150℃に達するまでの時間を発熱性の指標とした。

固体NMR測定は^{13}CについてはECA400 3.2mm CPMAS probe（日本電子（株））を用いて行った。

---

^{23}Na固体NMR、褐炭

○いでた けいこ、しもはら たかあき、うえだ もりお、みやわき じん、ゆん そんほ、さいとう こうじ、もちだ いさお

【結果と考察】

LY1とLY2は同一の産地であるが灰分の含有量やその構成は大きく異なっていた。乾燥炭に対する灰分全体の含有量はLY1が多かったが、LY2においてFe_2O_3, CaO, SO_3が多く検出された。

これらの乾燥炭と各温度で処理した乾留炭について断熱発熱実験を行った。

その結果（Table 1）を見てみると、LY1では400℃熱処理を行った場合に発熱性が極めて大きくなるが、LY2では400℃処理で発熱性はほとんど増大しない。

Table 1 adiabatic heating of Loy Yang coals and their heat treated ones. Spontaneous heating hours from 40 to 150℃

Sample	dried	300°C	400°C
LY1	25.75	21.57	3.03
LY2	21.08	ー	30.18

このことは熱処理後の^{13}C-NMR測定の結果を示す(Fig.1)。LY1では乾燥炭と比較すると、300℃乾留炭では170ppm付近のカルボキシル基を示すピークが減少し、さらに400℃乾留炭では170ppmのピークだけでなく、100、140－150ppm付近の酸素種に基づくピークや脂肪族ピークもほとんど消失した。

一方、LY2では乾燥炭において、酸素種のピークが多く検出されており、300℃乾留炭ではほとんど変化が無かった。400℃乾留でも300℃乾留炭より減っているものの、酸素種が残っていた。また脂肪族炭素も多く残存していることも認められた。

これまで、400℃付近で乾留した褐炭の自然発熱昇温性が高くなることが、利用上課題であった。今回2種のLY炭の400℃乾留炭の発熱性が大きく異なり、その理由として現時点では含酸素基の分解や脱アルキルの程度が異なることが要因と示唆された。炭素の骨格構造や鉱物の影響もあり得るのか、さらに研究が必要である。

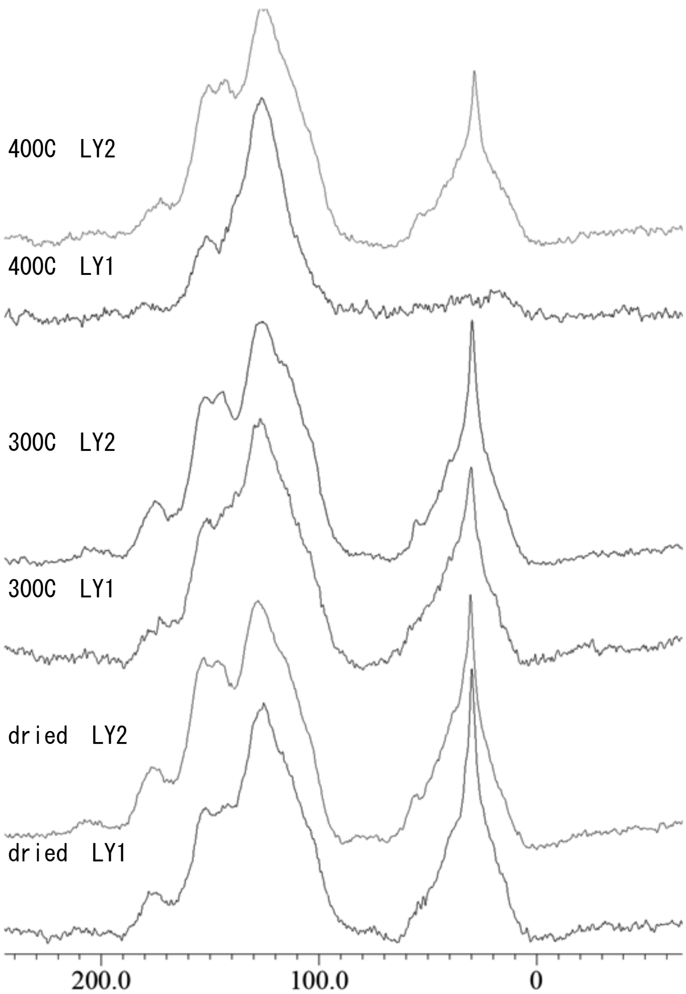


Fig. 1. ^{13}C spectra of LY coals and that of carbonized at 300℃ and 400℃,

【参考文献】

出田圭子ら、日本鉄鋼協会第174回秋季講演大会要旨集　p.663

P81

高次元固体NMR測定の高速化

○高橋涼[1], Ayesha Wickramasinghe[1,2], 松田勇[1], 松永達弥[2], 神原孝之[1], 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

Multi-dimensional Solid-State NMR measurement in short time

○Ryo Takahashi[1], Ayesha Wickramasinghe[1,2], Isamu Matsuda[1], Tatsuya Matsunaga[2], Takayuki Kamihara[1], Toshio Yamazaki[2], Yoshitaka Ishii[1,2]
[1]School of Life Science and Technology, Tokyo institute of Technology
[2] NMR Division, RIKEN SPring-8 Center, RIKEN

Protein structure determination using high-dimensional solid-state NMR (SSNMR) requires long experimental time. In general, experimental time gets longer exponentially as number of dimensions increases. We discuss a realistic approach to shorten experimental time of high-dimensional SSNMR of proteins with ^{1}H detection and paramagnetic relaxation enhancement. We examine experimental time and spectral quality for 3D–4D SSNMR of a fully labelled GB1 protein sample doped with 20 mM Cu-EDTA using ^{1}H detection with and without non-uniform sampling.

Introduction

構造生物学の進歩は目覚ましいが、アミロイドタンパク質のような難容性のタンパク質は多くの系がその複雑さによって構造が同定されていない。複雑なタンパク質の構造決定を固体NMRを用いて行うためには、既存の測定法ではしばしば分解能が不足する。原理的には、測定をさらに高次元化することにより分解能を向上させることができる。しかし、測定時間の増大のため、高次元のタンパク質固体NMRは現実的ではなかった。なぜなら、測定次元Nが増加すれば測定時間がおおよそNの指数で増大してしまう為である。この問題を緩和するため、間接観測次元において、NUS(Non Uniform Sampling)と呼ばれる手法を用いることが出来る。これは、測定の際の取得データポイント数を減らし、データ処理の際に特定のアルゴリズムで補う手法である。本研究では高速MAS下の^{1}H観測や常磁性緩和試薬の利用等の感度増加法[1)]を用いて、タンパク質の高次元固体NMRの測定をより高速に行う可能性を議論した。4次元の測定において要した時間とNUSの精度から、5次元測定の可能性についても述べる。

Experiments

全ての実験は600MHz SSNMR, 1mm probe, 60kHz MASで行った。サンプルは^{13}C, ^{15}N fully labelled GB1蛋白質を用い、常磁性緩和試薬として20mM CuEDTA溶液を加えた。

固体NMR、多次元測定、NUS
○たかはしりょう、まつだいさむ、まつながたつや、かみはらたかゆき、やまざきとしお、いしいよしたか

本文続き

行った測定は水素核観測を用いた3D-(^{1}H)^{13}CA^{15}N^{1}H、4D-^{1}H^{13}CA^{15}N^{1}Hで、NUSの評価は、炭素次元に関してはNUSを用いた2D-(^{1}H)^{13}CA^{1}Hと用いない同様の実験データを比較し､分解能を比較した。窒素次元に関しても同様に2Dの実験データを比較した。また、3DのNUSの評価は3D-(^{1}H)^{13}CA^{15}N^{1}Hを用いて同様の比較実験を行った。

Results and Arguments

まずはNUSの精度について、50%まで取得データポイント数を減らしても炭素と窒素それぞれの2D実験において機能することを確認出来た。次に3D以上のNUSに関しては、間接観測次元が複数になるが、全体のデータ取得率を指定するようになっている。そこで3D-(^{1}H)^{13}CA^{15}N^{1}Hの実験では、2つの間接観測次元が50%程度の取得率となるように、全体のデータ取得率を25%に設定した。結果として、今回の実験においてはNUSを用いたデータが、用いないものと同程度の分解能を持つことが確認できた。これらの実験から、多次元測定において各次元の取得率が50%程度で機能すると考えられる。この考察を4Dの実験に用いると、3つの間接次元に50%程度ずつかかる様に設定することになるので、全体の取得率は12.5%でよいことが分かる。今回、4D-^{1}H^{13}CA^{15} N^{1}Hの実験をNUSを用いずに行い、NMRPipeでデータを解析することが出来た。この実験は42時間を要したので、NUSを用いていれば5時間程度でデータを取得できた計算になる。5Dの実験の可能性については発表で議論する。

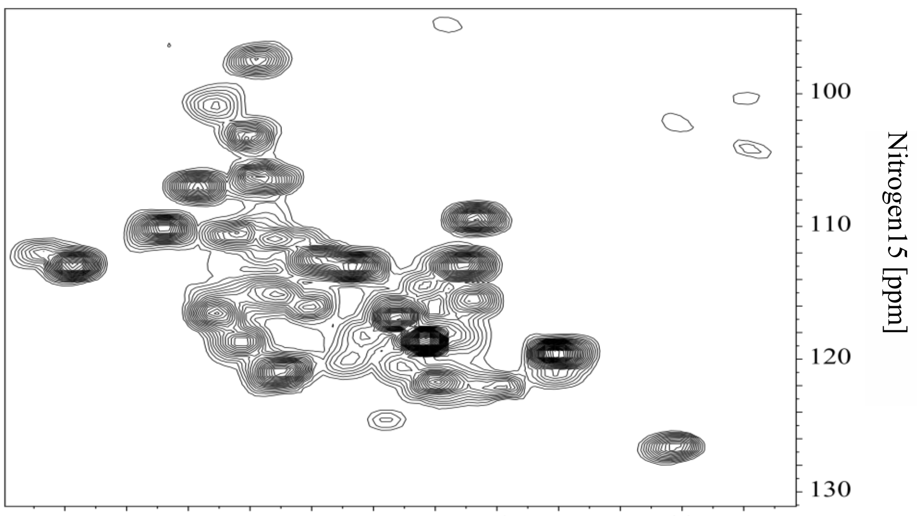


Fig. 1, 2D-projection from 4D-^{1}H^{13}CA^{15}N^{1}H processed by NMRPipe.

Reference

1) Nalinda P Wickramasinghe, et al., *Nature Methods* **6**, 215–218 (2009)

P82 NMR 測定を用いたゴム状高分子に収着した気体の拡散性評価

○松下晴香[1]、吉水広明[1]
[1]名古屋工業大学・大学院工学研究科

Determining gas diffusion characteristics of rubber materials by NMR method

○Haruka Matsushita[1], Yoshimizu Hiroaki[1]
[1] Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

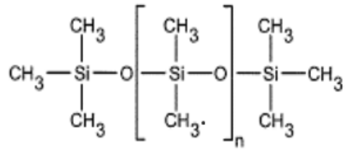
In this study, as a study of a gas separation membrane, experiments were conducted focusing on gas movement and gas diffusion characteristics in the membrane. Silicon rubber which is a rubbery polymer was used. Xe gas had no interaction with the material, so Xe gas was used. The peaks of sorbed Xe and free Xe were clearly observed. To characterize the diffusivity, selective irradiation experiment and PFG-NMR measurement were carried out. The NMR data were compared with results obtained by the conventional method. As a result, since the respective gas diffusion coefficients became equivalent values, it was possible to measure the gas diffusion coefficient using NMR measurement.

【緒言】

近年，高分子膜を用いた気体分離に注目が集まっている。膜分離の利点として，分離操作に必要な駆動エネルギーが基本的に気体の圧力差のみなので低エネルギー・低コストであることなどが挙げられる。より良い気体分離膜の開発には，膜物質の性質について詳細かつ精密に測定する技術が必要である。一方，核磁気共鳴(NMR)法は，原子・分子レベルで静・動的構造の詳細を検討するのに優れた手法である。本研究では，NMR 法を用いて気体分離膜材料の気体拡散特性の研究を行うことができるか検討するため，従来の実験方法で得た結果と新たに NMR 測定で得た結果を比べた。試料にはゴム状高分子であるシリコンゴム(PDMS)を用いた。一般に，ゴム状態の高分子鎖セグメントは活発にミクロブラウン運動をしているため，気体拡散性が高い。これは，試料中に存在している気体分子の運動性が高いことと同義で，NMR 信号の検出が比較的容易といえる。また，ゴム状試料で得られるデータは古典的拡散方程式で解析可能である。収着気体には材料との相互作用がなく，収着気体と遊離気体が明白に別々の NMR ピークとして観測される Xe ガスを用いた。

【実験】

試料には一般的なゴム材料としてシリコンゴム(PDMS)を用いた。まず従来の方法として重量法、透過法での実験を行った。試料の入った容器にガスを導入していき、この時の重量の変化から気体拡散係数を算出した。その後 NMR 法を用いての実験を試みた。耐圧 NMR 管に試料を詰め十分に真空引きした後、Xe ガスを 7atm 導入し収着平衡に達した後実験を行った。行った実験は選択照射実験と PFG-NMR 測定である。



PDMS

PDMS、Xe、高分子膜

○まつしたはるか、よしみずひろあき

選択照射実験では遊離気体に対応するピークに選択的に照射することでピーク信号を消すことができる。その後収着気体に対応するピークも気体の交換により減衰する。この照射時間を変えることによる減衰の仕方から気体拡散係数を算出した。PFG-NMR 測定では diffusion time 20ms、δ0.5ms として磁場勾配をかけていきそのピークの減衰から気体拡散係数を算出した。Figure 1 に ^{129}Xe NMR スペクトルの一例を示す。0 ppm 付近に観測されているピークは試料片外に存在する気相キセノンのもので，190 ppm 付近のピークが試料中に存在している収着キセノンのものである。

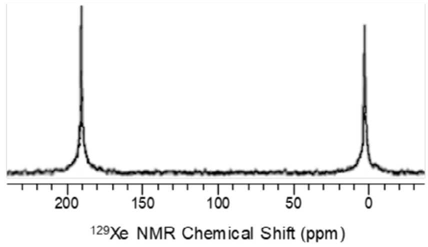


Figure 1 ^{129}Xe NMR spectrum of silicon rubber.

【結果・考察】

重量法での実験では任意の圧力に対し収着測定を行いその平衡収着量に対する各時間の収着量をプロットした。Figure 2 に PDMS 中の Xe の相対ピークの高さを時間に対してプロットした。圧力に依存せずに同一の曲線を描くことを確認でき理論式を用いることで気体拡散係数 6.3×10^{-6}(cm^2/sec)を得た。選択照射実験では照射時間を 0.5 s から 5.0 s まで変えて行った。若干だがピークの減衰が得られたためこれより気体拡散係数を算出した。PFG-NMR 測定では磁場勾配を強すするほどピークの減衰が見られた。その結果から気体拡散係数を算出した。Table 1 では様々な方法で求めた拡散係数、拡散の観測時間、平均行程距離をまとめた。下記の結果より、2 種類の NMR 法より測定した気体拡散係数の値がほぼ同等の値を示すことが分かった。以上より NMR 法を用いての気体拡散係数測定が可能になったといえる。また、拡散時間と平均行程距離を変えての観測が可能なことから複合材料などの気体輸送特性評価に有用であることが考えられる。

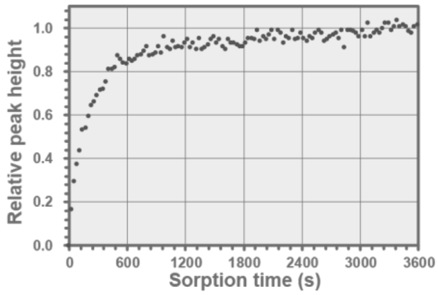


Figure 2 Time dependence of relative peak height of the Xe in PDMS

Table1 The values of diffusion coefficient, observation time and diffusion stroke distance at various methods

method	Diffusion coefficient [cm^2/s]	observation time[s]	diffusion stroke distance [m]
NMR peak height	**4.7×10^{-6}**	500	1.2×10^{-3}
sorption	**6.3×10^{-6}**	750	1.7×10^{-3}
permeation	**6.1×10^{-6}**	200	8.6×10^{-4}
Selective irradiation	**6.4×10^{-6}**	3	1.1×10^{-4}
Chemical shift	**1.9×10^{-6}**	0.002	4.8×10^{-6}
PFG	**7.2×10^{-6}**	0.004	1.3×10^{-5}

P83

^{1}H検出とHadamard法を使った高速固体二次元相関測定

○堤　遊[1]、Jean-Paul Amoureux[2]
1 ブルカージャパン株式会社　　2 リール第1大学

Fast acquisition of solid state 2D NMR spectrum using ^{1}H detection and Hadamard spectroscopy

○Yu Tsutsumi [1], Jean-Paul Amoureux [2]
1 Bruker Japan KK.　 2 Université Lille I

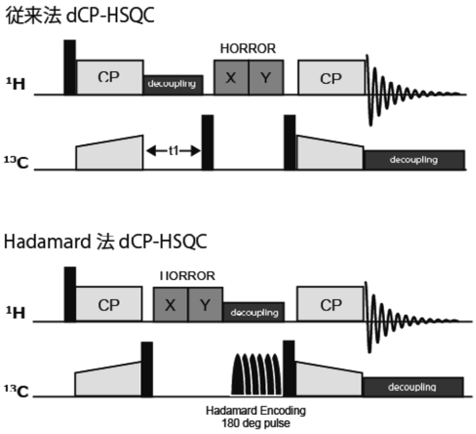
Recent development in solid state NMR probes allow the use of ^{1}H detection, and utilizing ^{1}H detection in 2D NMR has made it possible to perform ^{1}H-^{13}C and ^{1}H-^{15}N correlation experiments with a moderately short experiment time. Another benefit of using indirect detection of ^{13}C and ^{15}N chemical shifts is that their spectrum are highly resolved, and thus can be subject to Hadamard spectroscopy using selective pulses. In this presentation, we will show that by combining ^{1}H detection and Hadamard spectroscopy, ^{1}H-^{13}C and ^{1}H-^{15}N correlation experiments can be performed in the order of minutes even for non-labeled compounds.

^{1}HはNMR測定において非常に感度の良好な核種であり、このため溶液/液体のNMRでは^{1}H観測スペクトルを中心として構造解析を行うのが一般的である。一方で固体のNMRでの^{1}H観測の利用は、^{1}H間での強い同核種双極子カップリングによる信号の広幅化が障害となり、一般的には困難とされてきた。しかし近年、固体NMRのプローブの技術の進歩により、60 kHzを超えるような超高速MASも容易で行えるようになり、双極子相互作用を大きく低減させることで^{1}H観測スペクトルを固体NMRで利用することも可能となってきた。この恩恵はとくに測定時間のかかる^{1}H-^{13}Cや^{1}H-^{15}Nなどの二次元相関測定で顕著に見られ、従来のX核を観測する測定法にくらべ格段の測定時間の短縮が見られるようになってきた[1]。一方でHadamard法による多次元測定の高速化についても以前よりよく知られており、研究されてきた[2]。Hadamard法は、従来の多次元NMR測定と異なり、間接観測軸の信号を選択励起パルスを使い『符号化』することで、間接観測軸をフーリエ変換することなく多次元スペクトルを取得する手法である。この『符号化』はHadamard行列という正負の2値から成る$2^n \times 2^n$（n:自然数）直交行列に従って行われ、行列の行数が信号の数より多ければ十分な符号化が行える。このため一般的には同じ分解能を得るために必要な間接観測軸のポイント数はフーリエ変換を行う場合より少なくてすむ。Hadamard法も従来は溶液のNMRでの研究が進んでいたが、固体NMRでの応用もみられている [3]。

従来のX核観測のX-^{1}H相関の2次元測定では、間接観測軸にスペクトルの分離の悪い^{1}Hが使われているため、選択励起パルスを使いHadamard行列に従ってスペクトルを符号化することは出来なかった。しかし、高速MASにより、^{1}Hを直接観測核として使い、間接観測軸にX核を使うことが出来るようになったため、これらの測定にはHadamard法を適用し、さらなる高速化を図ることが出来る。今回は、^{1}H-^{13}C double CP based HSQC（dCP-HSQC）[4]を使うことで^{1}H観測とHadamard法の組み合わせの有効性を示すこととした。

超高速MAS、Hadamard法

○つつみ　ゆう、じゃんぽーる　あむーる



	1	2	3	4	5	6	7	8
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	−	+	−	+	−	+	−
3	+	+	−	−	+	+	−	−
4	+	−	−	+	+	−	−	+
5	+	+	+	+	−	−	−	−
6	+	−	+	−	−	+	−	+
7	+	+	−	−	−	−	+	+
8	+	−	−	+	−	+	+	−

Figure 1　dCP-HSQC のパルスシーケンス。上）従来法、下）Hadamard 法。右はエンコーディングに使われる 8×8 の Hadamard 行列。

dCP-HSQCの従来法とHadamard法それぞれのパルスシーケンスをFigure 1に示す。Hadamard法では従来法とは異なり、t_1展開時間を持たない代わりに間接観測軸の信号の位置に応じて位相を正負に符号化するための選択励起パルスが挿入される。このパルスシーケンスを使い、天然同位体比のヒスチジン塩酸塩を測定した結果をFigure 2に示す。測定はBruker社製Avance III HD 600 (14.1 T; ^{1}H: 600 MHz, ^{13}C: 150 MHz)と1.3 mm CPMASプローブを使って行った。また従来法、Hadamard法、いずれの測定もマジック角回転速度65 kHzで測定を行った。従来法では間接観測軸に128ポイントをとり、デジタル分解能はこのとき250 Hzとなった。Hadamard法では、ヒスチジンには6本の^{13}Cの信号が観測されるため、8×8のHadamard行列を適用し、選択励起パルスには励起幅200 Hzのtruncated gaussパルス（パルス幅4.5 ms）を用いた。積算回数を32回おこない、測定時間は従来法が3時間、Hadamard法が11分であった。

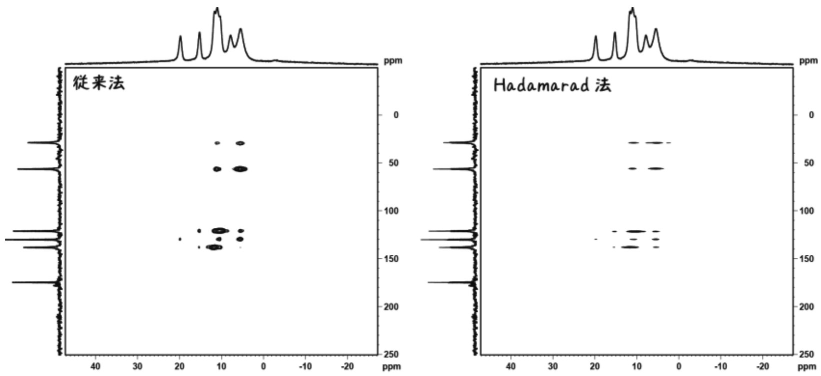


Figure 2　天然同位体存在比のヒスチジン塩酸塩の ^{1}H-^{13}C　^{1}H dCP-HSQC スペクトル。左）従来法 512×128 ポイント、右）Hadamard 法 512×8 ポイント（8×8 マトリックスで符号化）。

Figure 2からみられるようにHadamard法の測定時間は1/16になっているにもかかわらず、得られている分解能もS/Nも遜色がないものとなっている。Hadamard法は選択励起パルスを使わなければいけない関係上、あらかじめ信号を位置を知らなければならない、分解能に限界があるなどの欠点があることは考慮しなければいけない。しかし、構造解析に用いる多くの測定ではこれらの点は実用的にはあまり問題にならないことも多く、今後他の測定への応用も進めていきたい。

References

[1] Y. Ishii, R. Tycko, *J. Magn. Reson.* **142** (2000) 144-149
[2] Ē. Kupče, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **162** (2003) 158-165
[3] J. Ashida, Ē. Kupče, J.-P. Amoureux, *J. Magn. Reson.* **178** (2006) 129-135
[4] J.W. Wiench, C.E. Bronnimann, V.S.Y. Lin, M. Purski, *J. Am.Chem.Soc.* **129** (2007) 12076-12077

P84 固体MAS NMRによる光駆動型ナトリウムイオンポンプロドプシンKR2のアルカリ金属イオン依存的な構造変化の解析

○金子莉奈[1]，重田安里寿[2]，長島敏雄[3]，山崎俊夫[3]，井上圭一[4,5,6]，神取秀樹[5]，川村出[1,2]
1. 横浜国立大学 理工学府, 2. 横浜国立大学 工学府, 3. 理研RSC NMR,
4. 東京大学, 5. 名古屋工業大学, 6. JST・さきがけ

Alkali metal ion-dependent structural change of light-driven Na^+ pump rhodopsin KR2 by solid-state MAS NMR

○Rina Kaneko [1], Arisu Shigeta[2], Toshio Nagashima[3], Toshio Yamazaki[3], Keiichi Inoue[4,5,6], Hideki Kandori[5], Izuru Kawamura[1,2]
1. Graduate School of Science and Engineering, Yokohama National University
2. Graduate School of Engineering, Yokohama National University
3. RIKEN RSC NMR, 4. University of Tokyo, 5. Nagoya Institute of Technology, 6. JST PRESTO

Krokinobacter rhodopsin 2 (KR2), a light-driven Na^+ pump, has characteristic non-transported Na^+ at the Extracellular side. Herein, we investigated the effects of different alkali metal ions on the [Uniform-^{13}C, ^{15}N], [14, 20-^{13}C] retinal labeled KR2 in POPE/POPG membrane by multi-dimensional solid-state magic angle spinning NMR. We observed sufficient peak shifts of protonated Schiff base and several residues depending on the alkali metal ions in the buffer solution. Especially, the shifted cross peak of Arg109, which plays a crucial role on the Na^+ pump process, suggests that it alters the structure of hydrogen bonding network in the vicinity of Schiff base. Therefore, we have demonstrated the presence of the mutual interaction between the retinal-binding pocket and extracellular Na^+ binding site.

【序論】クロキノバクターロドプシン2 (*Krokinobacter* rhodopsin 2; KR2)は、海洋性真正細菌*Krokinobacter eikastus*由来の7本膜貫通型光受容膜タンパク質である[1]。KR2が保持する発色団レチナールの光異性化により、Na^+を細胞内から細胞外へ輸送する光駆動型Na^+ポンプ機能を持つ。結晶構造やAFMからKR2は細胞膜中で五量体を形成し、その細胞外側の分子界面にNa^+を結合しており、このNa^+結合サイトはB-helixやBC-loop上に存在するいくつかのアミノ酸残基から構成されることがわかっている[2,3]。また我々の研究において、野生型KR2及びH30A変異体KR2のレチナールシッフ塩基の^{15}N NMR信号が溶液に含まれるアルカリ金属イオンの種類に応じて大きく変化することを報告した[4]。

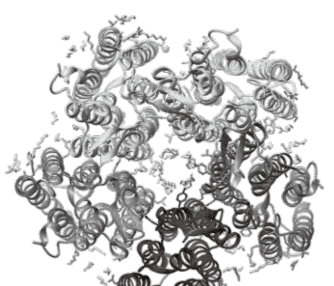


Fig. 1 KR2の五量体構造 (細胞外側からの視点)

本研究では野生型KR2のNa^+結合サイトの役割を調べるために、細胞膜に再構成したKR2についてナトリウムイオン及び他のアルカリ金属イオン条件下での多次元固体NMRスペクトルを記録し、異なるアルカリ金属イオンに対するNMR信号変化を詳細に観測した。Na^+結合サイトからレチナール結合ポケットへの構造変化の伝搬を示した。

固体NMR、膜タンパク質、*Krokinobacter* rhodopsin 2

○かねこりな、しげたありす、ながしまとしお、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】KR2のプラスミドDNAを導入した大腸菌C41(DE3)株を用いて、U-^{13}C標識グルコース, $^{15}NH_4Cl$および[14, 20-^{13}C]レチナールを含むM9最少培地で培養し、発現させたタンパク質を精製することで目的の試料を得た。このタンパク質をPOPE:POPG=3:1の脂質膜に、KR2:脂質=1:20(モル比)の割合で再構成した。この試料を100 mM NaCl (またはLiCl, CsCl)(pH=8.0)で十分に懸濁したものを用いた。NMR測定は、Bruker 600 MHzおよび700 MHzの固体NMR分光計を使用し、温度は278K、MASの回転速度はそれぞれ10 kHz, 15.75 kHzで測定を行った。多次元NMRでは2次元^{13}C-^{13}C 相関のDARRとDREAM、および3次元CANCO, NCOCX, NCACXなどの測定によりタンパク質主鎖の化学シフト値からアミノ酸残基の連鎖帰属情報を得た。また、^{13}C-^{15}N 相関のNCO、NCAから[Uniform-^{13}C, ^{15}N], [14, 20-^{13}C] retinal標識WT-KR2のアルカリ金属イオン依存的な信号のシフトを観測した。

【結果・考察】測定した2D NMRスペクトルからいくつかのアミノ酸残基の信号がアルカリ金属イオン依存的にシフトしていることを観測した。特に2D NCOスペクトルで観測されたArg領域での信号のシフトに注目した。アルカリ金属イオン依存的な信号のシフトが見られるピークは、Fig. 1のR109K変異体のスペクトルよりArg109と帰属した。Arg109はレチナール近傍に位置し、Na^+輸送に関与すると示唆されている。Fig. 2より、Arg109NεとCεの信号が顕著にシフトしていることが観測された。結晶構造情報からArg109NεはGln78(B-helix)と水素結合しており、NMRのデータから結合サイトからB-helixへと構造変化が伝わり、Arg109の変化を誘起することが示唆される。一方で、Arg109の2つのNηのピークは10 ppmほど分離した"wing peak"として観測された。Arg109 Nη部位はAsp251などの周辺のアミノ酸残基と強力な相互作用を形成し、この影響からピークの分離が起きていると考えられ、また、Nηのピークにはアルカリ金属イオン依存的な大きなシフトは見られなかった。このことからCsClおよびLiCl条件下では、100 mMのイオン濃度であっても結合サイトにCs^+やLi^+イオンが安定に保持することができず、結合サイトの構造がイオン非結合型に変化し、それがレチナールやArg109周辺の水素結合ネットワークの一部を乱していることが考えられる。別の言い方をすると、結合サイトはNa^+のイオンサイズにフィットする構造であることが示唆された。討論会では他の帰属情報も含めて、発表する予定である。

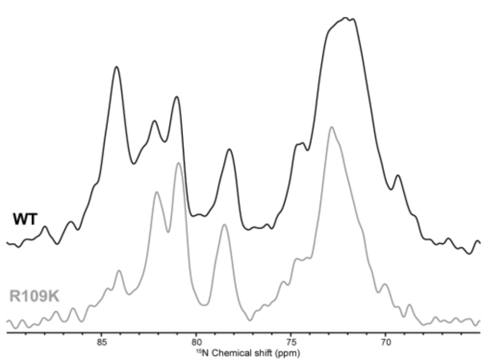


Fig. 2 ^{15}N CP-MAS spectra of WT-KR2 and R109K-KR2

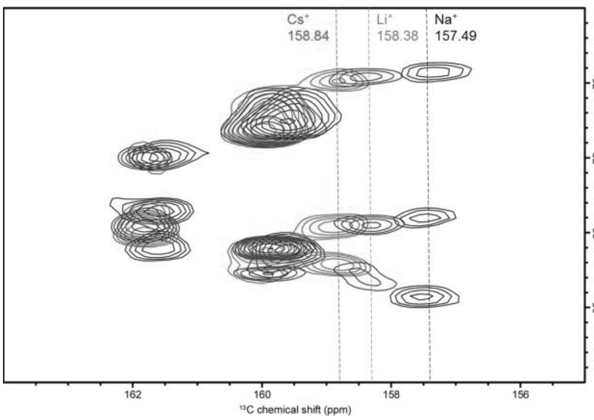


Fig.3 Arginine field of 2D NCO spectra in NaCl, LiCl and CsCl

【参考文献】

[1] K. Inoue et al. (2013) *Nat. Commun.*, 4, 1678.
[2] I. Gushchin et al. (2015) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 22, 390-395.
[3] M. Shibata et al. (2018) *Sci. Rep.,* 8, 8262.
[4] A. Shigeta et al. (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 8450-8455.

P85

固体NMRによる自己組織化ペプチドの構造解析

○川村 出[1,2]，白方宏樹[2]，尾澤 夢実[1]，Batsaikhan Mijiddorj[1]，上田一義[1]，内藤 晶[1]
1 横浜国立大学 大学院工学府
2 横浜国立大学 大学院理工学府

Solid-state NMR study of the structure of self-assembly formed by peptides

○Izuru Kawamura[1,2], Hiroki Shirakata[2], Yumi Ozawa[1], Batsaikhan Mijiddorj[1], Kazuyoshi Ueda[1], Akira Naito [1]
1. Graduate School of Engineering, Yokohama National University,
2 Graduate School of Engineering and Science, Yokohama National University,

Solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy provides significant structural information regarding the conformation and dynamics of a variety of solid samples. Self-assembly into nanostructure has attracted an enormous interest due to the potential applications in nanotechnology. Specially, the nanostructure of self-assembled short-peptide is attracted as a biomaterial in the medical field since discovery that phenylalanine dipeptide (Phe-Phe-OH, FF) self-assembles into fibers. In this work, we have focused on the phenylalanine tripeptide (Phe-Phe-Phe-OH, FFF) which is known to self-assemble into microplate and investigated the way of controlling self-assembly by using d-amino acid. The structural difference between L-Phe-L-Phe-L-Phe-OH (FFF) and L-Phe-D-Phe-L-Phe-OH (FfF) was thoroughly revealed by solid-state NMR. We also investigated the structure of short peptide containing fluorescent L-pyrenyl and D-pyrenyl-alanine. We showed not only the difference of the molecular structure into self-assembly but also the property of fluorescence.

[はじめに]

高濃度に溶解させた短いペプチド(残基数が少ない)は溶媒もしくは温度変化などをきっかけにして、水素結合などの弱い分子間相互作用を利用して自己会合することで、超分子構造を迅速に構築する。その代表的なものとして、フェニルアラニン2残基で構成されるジペプチド(Phe-Phe)があげられる。このペプチドをヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)に溶解し、貧溶媒として適量の水を加えることによって、ナノ構造体を形成することが知られている。現在では、溶媒や温度、別な官能基の導入などによって自己組織化をコントロールし、新しいペプチド材料が生み出されてきた[1]。最近ではミトコンドリアにリクルートできるタグを結合させ、ミトコンドリア内でペプチドを高濃度に濃縮することで自己組織化させ、アポトーシスを誘発させる研究も報告されている[2]。

本研究ではPhe-Pheペプチドを基盤としながら、新しい超分子構造を形成させるために、D体アミノ酸や蛍光側鎖などを導入したペプチドの自己組織化とその構造解析のた

固体NMR、ジペプチド、自己組織化

○かわむら　いずる、しらかた　ひろき、おざわ ゆみ、ばとさいくはん みじどるじ、うえだかずよし、ないとう　あきら

めに固体NMRを用いた。一部は結晶構造の化学シフト計算と比較を行い、自己組織化構造の評価に利用した[3]。

[方法]

L-Phe-L-Phe-L-Phe (**FFF**)と L-Phe-D-Phe-L-Phe (**FfF**)、ピレンアラニン(Pyn)を含むL-Pyn-L-Phe (**L-Py**)と D-Pyn-L-Phe (**D-Py**)などの数種類の疎水性ペプチドをFmoc固相合成法で合成した。精製にはODSカラムを装備したRP-HPLCを用いた。ペプチドの自己組織化の方法は、基本的に、ペプチドを100 mg/mLの濃度でHFIPに溶解させ、貧溶媒となる水を加えることで行った。自己組織化後の試料の形態を走査型電子顕微鏡によって観察した。固体NMRはBruker Avance III 600 MHz分光計と4.0 mmのE-freeプローブを用い、サンプル量は乾燥重量でおよそ10-20 mgの自己組織化試料を用いた。測定はMAS回転数10 kHz, ^{13}Cおよび^{15}N CP-MAS法で行った。

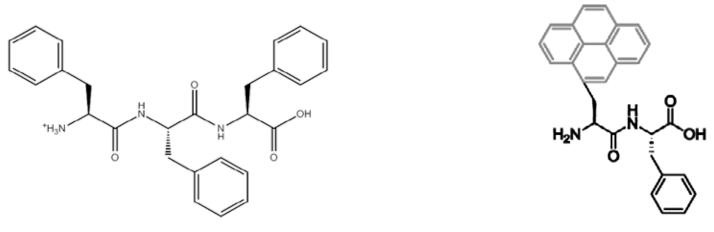


図1. L-Phe-L-Phe-L-Phe (FFF) (左)とL-Pyn-L-Phe (右)ペプチドの化学構造

[結果]

FFFと**FfF**は電子顕微鏡観察において、それぞれプレート状およびファイバー状の構造を観察し、分子の集積の違いが示唆された。NMRでは、**FFF**と**FfF**の間で^{15}Nアミド窒素の信号に10 ppm近くの差が生じており、主鎖のねじれや水素結合に違いがあることが示唆された。また、芳香環領域のスペクトルパターンも異なるため、芳香環同士の相互作用にも違いが生じていることも示唆された。発表では、この化学シフトの違いについて化学シフト計算や他の手法も組み合わせて詳細に説明する予定である。

L-Pyと**D-Py**はそれぞれが形成するファイバーの幅に違いがあるとともに、ピレン環同士の相互作用によって生じるエキシマ発光の強度が大きく異なっていた。これはピレン側鎖をもつアミノ酸のL体とD体の違いによって、発光特性の異なる材料を作り分けたことを意味している。NMRでは、主鎖の化学シフト値の違いとともに、^{13}Cの芳香環由来の信号に違いが生じていたため、ピレン環同士のスタッキングに違いが生じていることを裏付けた。

[まとめ]

固体NMRを用いて自己組織化ペプチドの分子構造を解析し、自己組織化後の形態や蛍光強度などの特徴との関連を示すことができた。今後は安定同位体標識部位の導入箇所を工夫して、より空間的な相互作用について解析を進めていく。

参考文献

[1] G. Wei, E. Gazit, R. Mezzenga (2017) ***Chem. Soc. Rev.*** 46, 4661-4708.
[2] M. T. Jeena, et al. (2017) ***Nat. Comm.*** 8, 26.
[3] I. Kawamura et al. (2018) ***Magnetochemistry,*** 4, 30.

P86 アルツハイマー病βアミロイド40と42によるクロスシーディング

○石黒貴也[1], Brian K. Yoo[2], 松田勇[1,2], 石井佳誉[1,2,3]
[1]東京工業大学　生命理工学院
[2]Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago
[3]理化学研究所　放射光科学研究センター

Cross-seeding of 40- and 42-residue Alzheimer's β-Amyloids

○Takaya Ishiguro[1], Brian K. Yoo[2], Isamu Matsuda[1,2], Yoshitaka Ishii[1,2,3]
[1]*Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology*
[2]*Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago,* [3]*RIKEN SPring-8 Center*

Misfolded β-amyloid (Aβ) is associated with Alzheimer's disease (AD). As both 40-residue Aβ40 and 42-residue Aβ42 coexist in AD, it is important to understand interactions between different species of Aβs. Our kinetic and SSNMR data show dose-dependent promotion of Aβ42 fibrillation by Aβ40 fibrils. However, the interaction was asymmetrical. We discuss possible cause of this asymmetry.

Introduction

β-amyloid (Aβ) peptides are 40–43 amino acid long peptides with varying C-terminus, and the most abundant species (isoforms) are Aβ40 and Aβ42. As those Aβs have different properties despite similarities in their primary structures, aggregation kinetics and structures of both Aβ40[1] and Aβ42[2] fibrils has been studied separately to investigate the mechanism of AD. However, since both Aβ40 and Aβ42 coexist in a brain of AD, it is important to understand how a fibril of one Aβ isoform affect the aggregation kinetics of another Aβ isoform (i.e., cross-seeding) and the resultant fibril structures. It has been recently shown that E22G Aβ40 misfolding followed structure-specific template nucleation with both Aβ40 and Aβ42 seed fibrils.[3]

In this study, cross-seeding of Aβ42 monomer seeded with Aβ40 fibrils (fAβ40) and that of Aβ40 monomer seeded with Aβ42 fibrils (fAβ42) were investigated. Our kinetic data show a dose-dependent cross-seeding effect of Aβ40 fibrils in misfolding of Aβ42 monomers, and solid-state NMR (SSNMR) data show shifts in chemical shifts of the resultant Aβ42 fibrils, suggesting a shift in the fibril structure towards Aβ40-like fibrils. However, misfolding of Aβ40 monomer with seed Aβ42 fibril suggests only limited modulation in kinetics. We discuss a possible mode of interaction between Aβ40 and seed Aβ42 fibrils.

Experiment

Monomers of chemically synthesized Aβ40 and Aβ42 (~40 μM, pH 7.4) were prepared in sodium phosphate buffer, separately. These monomer solutions were incubated under slow rotation at ambient temperature to form mature fibrils of Aβ40 and Aβ42, respectively. Matured fibrils of each peptides were fragmented by sonication and introduced as seeds for the corresponding monomer solutions to prepare structurally homogenous fibrils of Aβ40 and Aβ42 (i.e., self-seeding). Those homogeneous fibrils were used as seeds for cross-seeding.

ベータアミロイド、クロスシーディング

○いしぐろたかや、まつだいさむ、ぶらいあんゆー、いしいよしたか

For cross-seeding of Aβ42 with fAβ40, fragmented Aβ40 fibrils were introduced into a monomer solution of Aβ42 at 5 and 10% (w/w) and incubated the same way as self-seeding. Fibrillation was monitored by thioflavin T fluorescence. The resultant fibrils were harvested by centrifugation, packed into 2.5-mm rotors, and analyzed by SSNMR. Cross-seeding of Aβ40 with fAβ42 was performed in the same manner using Aβ40 monomer and Aβ42 fibrils.

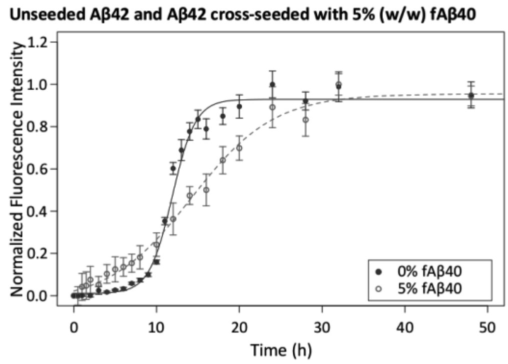


Fig. 1. Fibrillation kinetics of Aβ42 cross-seeded with fAβ40 at 5% (w/w).

Results and Discussions

Figure 1 shows fibrillation kinetics of cross-seeded Aβ42. Unseeded Aβ42 (Closed circles) showed a typical sigmoidal curve, suggesting nucleation-dependent polymerization from monomers. On the other hand, Aβ42 with fAβ40 showed a modulation from a sigmoidal line shape (Open circles). Non-linear regression of the data set showed better fit to the first-order kinetics than the sigmoidal curve, suggesting occurrence of cross-seeding with fAβ40. However, this phenomenon did not occur with Aβ40 cross-seeded with fAβ42. In this case, the kinetics was unaffected despite of the presence of Aβ42 seed fibrils.

To study cross-seeding at atomic level, ^{13}C-^{13}C SSNMR fingerprint was used. Figure 2 shows spectra of (a) Aβ42, (b) cross-seeded Aβ42 with 5% (w/w) fAβ40, and (c) Aβ40, all uniformly ^{13}C, ^{15}N-labeled at V18, F19, A21, G33, and L34. Chemical shift of A21 in cross-seeded Aβ42 overlaps with that in Aβ40 (Open arrow). The result suggests a structural change of Aβ42 fibril to Aβ40-like fibril by cross-seeding. Structural effects of Aβ42 seed fibril for Aβ40 fibrillation would also be discussed.

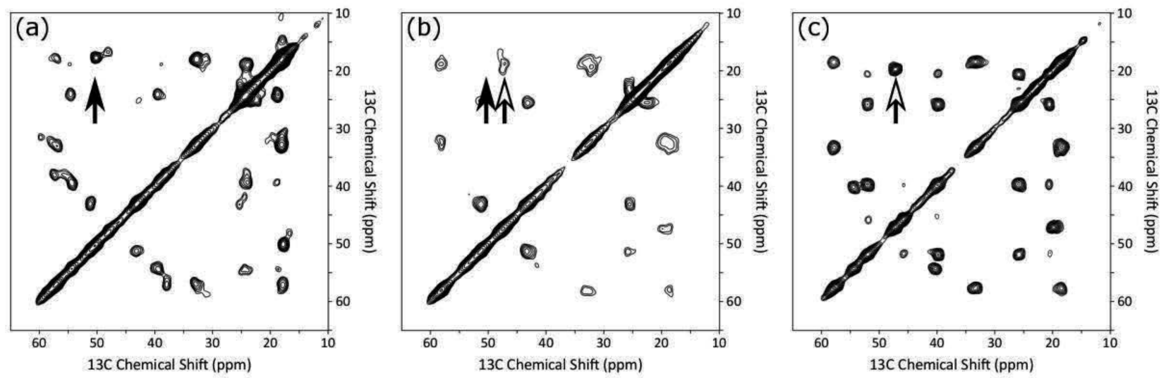


Fig. 2. SSNMR fingerprint of (a) Aβ42, (b) cross-seeded Aβ42 with 5% (w/w) fAβ40, and (c) Aβ40. All peptides were uniformly ^{13}C, ^{15}N-labeled at V18, F19, A21, G33, and L34. Closed and open arrows indicate chemical shifts of A21 in Aβ42 and Aβ40, respectively.

References

[1] Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **2002**, 99, 16742.

[2] Xiao, Y.; Ma, B.; McElheny, D.; Parthasarathy, S.; Long, F.; Hoshi, M.; Nussinov, R.; Ishii, Y. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, 22, 499.

[3] Yoo, B. K.; Xiao, Y.; McElheny, D.; Ishii, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 2781.

P87

PHIP-SAH 法を用いた ^{13}C 標識ピルビン酸の励起技術の開発

○加瀬優希[1]，蛸島健介[2]，内尾佳貴[2]，Neil J Stewart[2]，松元慎吾[2]
1北海道大学 工学部 情報エレクトロニクス学科 生体情報コース
2北海道大学大学院　情報科学研究科　生命人間情報科学専攻

Development of excitation technique of ^{13}C-labeled pyruvic acid by PHIP-SAH method **point**

○Yuki Kase[1], Kensuke Takoshima[2], Yoshiki Uchio[2], Neil J Stewart[2], Shingo Matsumoto[2]
1 Bioengineering and Bioinformatics Course Department of Electronics and Information Engineering School of Engineering, Hokkaido University
2 Division of Bioengineering and Bioinformatics Graduate Scool of Information Science and Technology, Hokkaido University,

Hyperpolarized ^{13}C MRI metabolic imaging of [1-^{13}C] pyruvate has been clinically applied in cancer diagnosis and cardiac function evaluation. As a low-cost ^{13}C excitation method to replace the current disolution dynamic nuclear polarization (DNP) method, we developed the excitation technique of ^{13}C pyruvate by parahydrogen induced polarization (PHIP) method. Parahydrogen is added to the propargyl ester of pyruvate to induce nuclear polarization in ^{1}H. Immediately after polarization transfer to ^{13}C by the magnetic field cycle method, alcohol side chain is cleaved by alkaline hydrolysis, and hyperpolarized ^{13}C pyruvate was obtained. We amplified ^{13}C NMR signal approximately 10,000 times at 1.5T and the set up of metabolic MRI measurement in tumor-bearing mouse is on going.

^{13}C MRI は ^{13}C 標識した化合物の代謝反応を追跡することにより、癌診断および心機能評価を可能にする。しかし、^{13}C の NMR 信号は微弱であるため、in vivo 計測には超偏極による信号増幅が不可欠である。 ^{13}C に超偏極を誘導する方法として、現在最も盛んに研究が行われているのは動的核偏極法（DNP）であるが、この方法では、初期費用およびランニングコストが高額であるため、臨床への普及を妨げる主因となっている。また、低コストな励起方法であるパラ水素誘起分極（PHIP）法では、代謝プローブの前駆体にパラ水素を付加する必要があり、ピルビン酸のような炭素多重結合を有する前駆体の用意が不可能な化合物は励起することができない。したがって、本研究では、 PHIP サイドアーム（Side Arm Hydrogenation）法[6]に着目し、^{13}C ピルビン酸の励起技術の開発を行った。

PHIP-SAH 法では、ピルビン酸のプロパギルエステルにパラ水素を付加することによって付加した ^{1}H に超偏極を誘導し、この ^{1}H から ^{13}C へ超偏極を転移させた後、急速なアルカリ加水分解によってアルコール側鎖を切断し、超偏極 ^{13}C ピルビン酸を得る。本研究では、この方法によって超偏極 ^{13}C ピルビン酸を作製することに成功した。また、加水分解工程を自動化するための構造の提案および装置の作製を行った。さらに、マウスの後肢に移植した癌細胞を測定するための$^{1}H/^{13}C$ RFコイルの作製を行った。

超偏極、13C MRI、PHIP-SAH 法

○かせゆうき[1]，たこしまけんすけ[2]，うちおよしき[2]，Neil J Stewart[2]，まつもとしんご[2]

加水分解装置では、高圧の窒素によって射出された HEPES が受け皿の水酸化ナトリウム水溶液と混合されることによって HEPES の射出後自動で pH が生体内の値に近い約 7.4 付近に中和され、その後２つのシリンジによって有機層と水層をそれぞれ計り取る構造となっている。 $^{1}H/^{13}C$ RF コイルについては、銅板によってシールドした箱の中に 13C 用のソレノイドコイル、その外側に 1H 用のサドルコイル重ねて配置することにより、^{1}H と ^{13}C の両方を測定可能な共振器を作製した。

今後は加水分解工程で使用する水酸化ナトリウム水溶液濃度の最適化を行い、担癌モデルマウスにおける代謝 MRI 測定へと展開する。

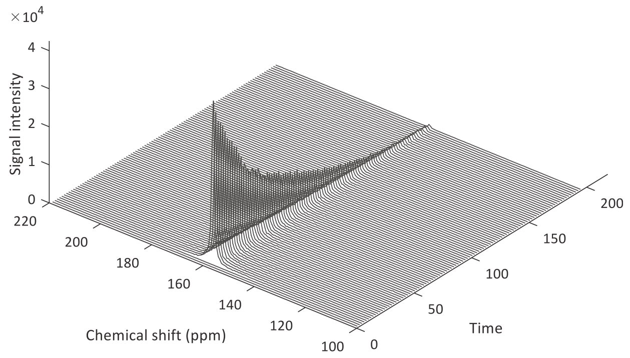


Fig. 1 ^{13}C NMR spectrum of hyperpolarized ^{13}C allyl pyruvate excited by PHIP method

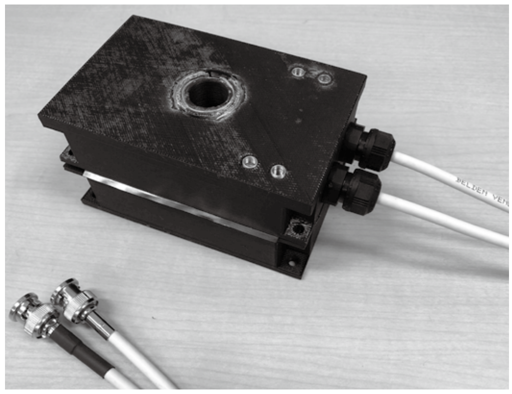


Fig. 2 ^{1}H / ^{13}C dual RF coil for measurement of tumor-bearing model

参考文献
[1] 安藤勲, 内藤昌, NMRNMR分光学: 基礎と応用. 東京化学同人, 2008
[2] Sarah J Nelson *et al*., *Sci. Trans. Med*., 2013, 5, 198
[3] P.P.Hsu and D.M.Sabatini *et al., Cell*., 2008, 134, 703-707.
[4] K.Golman, *et al., Cancer. Res*., 2006, 66, 10855-60.
[5] C.Bowers and D. Weitekamp, *Phys. Rev. Lett.*, 1984, 57, 2645-48.
[6] F. Renieri *et al*., *Nat. Commun.*, 2015, 6, 6858.
[7] E. Cavallari *et al*., *Chem. Eur. J*., 2017, 23, 1200-1204.
[8] M. G. Pravica *et al*., Chem. *Phys. Rev. Lett.*, 1998, 145, 255-258.
[9] E. Cavallari *et al*.,*J. Phys. Chem. B*.. 2015, 119, 10035-100441.
[10] J.-B Hövener, *et al., Magn, Reson. Mater. Physics. Biol. Med.*, 2009, 22, 123-121.
[11] J.-B Hövener, *et al., Magn, Reson. Mater. Phys.,* 2009, 22, 123-134.
[12] スリクター C.P. 磁気共鳴の原理. シュプリンガーフェアラーク東京, 1998.

P88 パラ水素誘起偏極法による磁場サイクル型^{13}C励起装置の開発

○福江優香[1]，内尾佳貴[2]、Neil J Stewart[2]、平田拓[2]、松元慎吾[2]
1北海道大学工学部　情報エレクトロニクス学科　生体情報コース
2北海道大学大学院　情報科学研究科　生命人間科学専攻

Development of 13C Excitation Device of Magnetic Field Cycling by PHIP method

○Yuka Fukue[1]，Yoshiki Uchio[2]、Neil J Stewart[2]、Hiroshi Hirata[2]、Shingo Matsumoto[2]
1 Bioengineering and Bioinformatics Course, Department of Electronics and Information Engineering School of Engineering, Hokkaido University
2 Division of Bioengineering and Bioinformatics, Graduate School of Information Science and Technology, Hokkaido University

Aiming at application to metabolic imaging by Hyperpolarized ^{13}C MRI, we developed a ^{13}C hyperpolarization based on parahydrogen induced polarization (PHIP) method using parahydrogen, a nuclear spin isomer of hydrogen molecule. For the polarization transition from ^{1}H to ^{13}C, magnetic field cycle (MFC) method capable of polarization transfer to nuclei separated by 3 or more covalent bonds was used. All J values in the ^{13}C-labeled metabolic probe including long-distance J value were measured by sel-HSQMBC-Tocsy and the optimal solution of the variable magnetic field pattern which can obtain the maximum polarization transfer efficiency by quantum statistical mechanics calculation was obtained. A fully automated system for accurately controlling this MFC was constructed using the LabVIEW / PXIe system.

^{1}H核磁気共鳴画像（MRI）が解剖学的な画像診断法の一つとして広く用いられている一方で多くの生体内分子に共通して含まれる炭素の安定同位体^{13}Cを対象各種とするMRIは、生体内の代謝計測を可能にする有用な手段である。^{13}CはMRI画像の基となるNMR信号が極めて弱く、そのままではMRIによる生体イメージングは不可能であるが、『超偏極』というNMR信号を一時的に数万倍に増幅させる技術を用いることで可能になる。超偏極を誘導する方法はいくつかあり、中でも現在は動的核偏極（DNP）法がよく用いられているが、臨床初期費用は数億円に上り、実際の医療現場への普及の見込みは薄い。一方で、水素分子の核スピン異性体であるパラ水素を用いた偏極法であるパラ水素誘起分極（PHIP）法は安価ではあるが、臨床応用をする上で解決されていない技術的課題が多く、未だ臨床には至っていない。

本研究の目標は、臨床応用可能なPHIP法による^{13}C核励起装置の開発である。パラ水素付加により誘導される超偏極の^{1}Hから^{13}Cへの分極転移には、共有結合で３つ以上離れた核への分極移動が可能であるMagnetic Field Cycle（MFC）法を採用した。

PHIP法は、目的の代謝プローブの水素化前駆体にパラ水素を付加することで水素の超偏極を起こし、その水素の超偏極状態を^{13}Cへ移すという方法である。そのため、まずパラ水素化によって超偏極^{1}Hを誘導する必要がある。そのため、まず、高圧のパラ水素によって水素化を起こすこと

超偏極、PHIP、MFC

○ふくえゆうか[1]，うちおよしき[2]、Neil J Stewart[2]、ひらたひろし[2]、まつもとしんご[2]

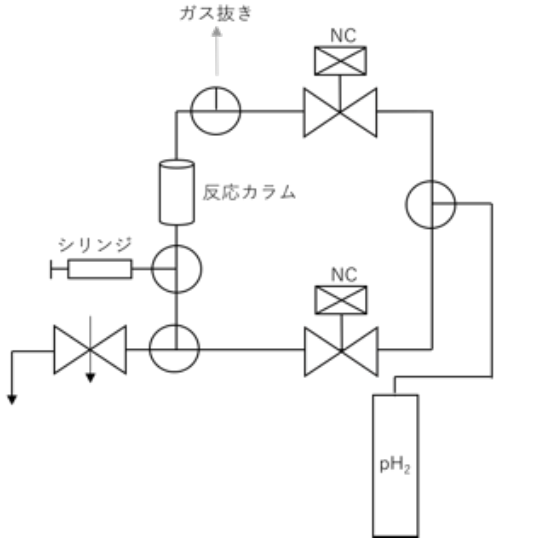


Fig.1 Scheme of the parahydrogen equipment

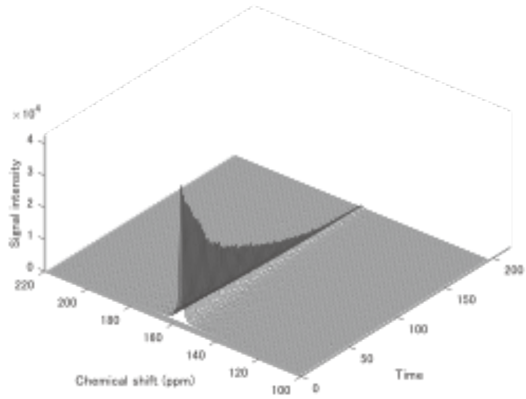


Fig.2 Hyperpolarized ^{13}C NMR spectrum of ^{13}C allyl pyruvate.

ができる水素化装置を作成した（Fig.1）。
この高圧水素化装置を使い、水素化前駆体（クロロホルム溶媒、触媒としてRh[(dppb)(COD)]BF_4を使用）をパラ水素化したところ、生成された水素化物の^{1}Hに超偏極信号を確認することができた（Fig.2）。

次に、^{1}Hから^{13}Cへ分極転移するための磁場変化の形状を求めた。物質それぞれに対して最適な磁場変化の形状を求めることで、効率よく分極転移を起こすができる。本研究では、sel-HSQMBC-Tocsyパルスシークエンスで計測した、長距離J値を含む^{13}C標識代謝プローブ内のすべてのJ値を用いた量子統計力学計算によって分極シミュレーションを行うことで最適な磁場変動パターンを求めた。量子統計力学計算は、先行研究[1]を参考にしてMATLABを用いて行った。スピンの状態を密度行列によって表現し、その時間発展をフォン・ノイマン方程式によって記述することにより、分極移動の計算を行った。磁場の変化タイミング・強さなどを変化させ、分極率の最も高くなる最適解を導出した。シミュレーションによって導出した最適なMFC磁場を正確に制御するため、全自動化装置をLabVIEW/PXIeシステムによって構築した。

References（参考文献）

[1] E. Cavallari, C. Carrera, T. Boi, S. Aime, and F. Reineri, “Effects of Magnetic Field Cycle on the Polarization Transfer from Parahydrogen to Heteronuclei through Long-Range J-Couplings,” J. Phys. Chem. B, vol. 119, no. 31, pp. 10035–10041, Aug. 2015.

P89

超偏極キセノンガス生成供給装置普及版の製作と応用

○藤原英明[1、2]、今井宏彦[3]、木村敦臣[1]
[1]大阪大学大学院医学系研究科
[2] MRメドケム研究所合同会社
[3] 京都大学大学院情報学研究科

Development of Hyperpolarized ^{129}Xe Gas Production System for Widespread Use and Application

○Hideaki Fujiwara[1,2], Hirohiko Imai[3], Atsuomi Kimura[1]
1 Graduate School of Medicine, Osaka University
2 MR MedChem Research, LLC
3 Graduate School of Informatics, Kyoto University

Recently hyperpolarized ^{129}Xe NMR and MRI have grown as advanced analytical and diagnostic tools in chemistry and medicine. However, the techniques have not yet reached at widespread adoptions, and barriers to dissemination remain to be overcome. In the present study, a recycling Xe gas supply scheme is adopted after making some improvements for a long-run stable operation of the hyperpolarizing system. Our resulting system enables us to perform long-time averaging of ^{129}Xe signal from samples including very weak signals of adsorption. Thus, further wide applications to surface analysis are encouraged with such new materials as nanomaterials , high polymers and films that attract academic and/or industrial interests.

【序】　超偏極^{129}Xe NMR/MRIは医学や化学の分野で強力な診断および分析ツールとして興味が広がっている。[1,2]　しかし、幅広く利用が進むには装置へのアクセシビリティーの改善が必須な状況にある。本発表では、広く利用し易い超偏極キセノンガス生成供給装置の開発を行うと共に、その応用例として高分子やナノ素材の表面分析への適用を行った。

【装置の改良】　当該装置の幅広い活用のためには、基本性能として感度に直結する^{129}Xe偏極率の向上が第一であるが、最近は、この問題は基本的には殆ど解決された状態にあると言える。次の問題として、性能の安定した効率的な超偏極キセノンガスの供給システムの開発がある。そこでは、循環型の採用によりキセノンガスの消費を大幅に削減できること、その際、出来るだけ長時間に亘り超偏極性能の安定性が確保できること、その上で、装置の維持管理が容易であること、などが要点となる。

サンプル上を一度通過した超偏極ガスを、連続した経路を通して再度超偏極セルに導入する循環型超偏極方式では、サンプル上の通過時に混入するサンプル由来の不純物ガス、及び、その前後の配管経路で混入してくる不純物ガスが大きな問題となる。サンプル由来の水分や酸素等の不純物ガスは、かなり乾燥・精製したサンプルからも微量に漏れてくるので、偏極セル中のRbの劣化を引き起こす。この影響を最小限に抑

超偏極^{129}Xeガス、循環型装置、hyper-CEST

○ふじわら　ひであき、　いまい　ひろひこ、　きむら　あつおみ

えるため、循環ガスはアルカリ金属合金（KとNaの容積比１：１での混合物）で乾燥と脱酸素を十分に行い、その上で、Rb予備室を設けてセル中のRb濃度の安定化を計った。結果として、循環型での連続運転時間を100時間程度まで延長することが可能となった。Fig.1に装置の概要を示す（詳しい説明は当日発表）。

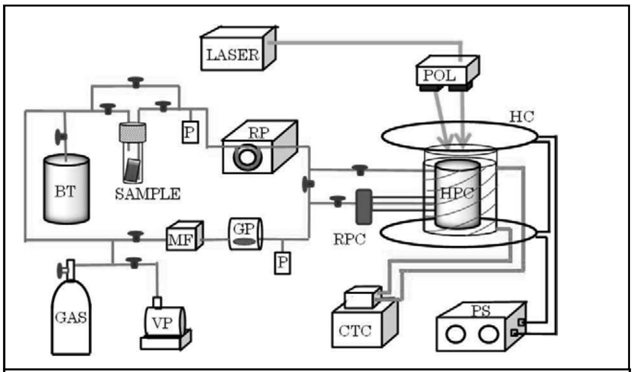


Fig.1 Schematic drawing of the home-built ^{129}Xe hyperpolarizing system operational under gas recycling mode.

【長時間積算時のSN改善に関する考察】

超偏極キセノンガスを用いて、さらなるSN改善のために積算を行う場合、信号が非常に弱く積算が長時間に及ぶ場合、超偏極セルの性能劣化の影響にも考慮が必要となる。例えば、セル性能の低下が次式のように指数減衰的に進むとする：

$$SN(n) = SN^0 \times e^{-an} \tag{1}$$

ここで、nは積算回数、SN^0は積算開始時のスペクトルのSN, aは減衰定数である。$SN(n)$はn番目の1回測定におけるSNであるので、n回の測定を全て加算した後のSNを$SN^{(n)}$とすると、

$$SN^{(n)} = \frac{\sum_{j=1}^{n} SN^0 e^{-aj}}{\sqrt{n}} = \frac{SN^0}{\sqrt{n}}\left(e^{-a} + e^{-2a} + e^{-3a} --- + e^{-na}\right) = \frac{SN^0}{\sqrt{n}} e^{-a} \frac{1-e^{-na}}{1-e^{-a}} \tag{2}$$

となる。2式のSNが最大となる条件を求めると、na=1.2565を得る。そこで、セルの減衰定数が、a= 0.165×10^{-4}の場合、SNが最大となる積算回数は、n= 76,000となる。この実験条件では76000回の積算時間は5.3時間に相当したので、約5時間の積算が効率的な積算の上限となる。このように、セルの性能低下の時定数を極力下げることが、長時間積算の効率化に欠かせないことが分かる。Fig.2に3.3時間の積算例を示す。Fig.3はhyper-CESTの一例で、30ppmに幅広いピークが見える。200ppm付近にも弱いピークの存在が窺がわれるが、確認にはさらなる積算によるノイズ減少が必要である。

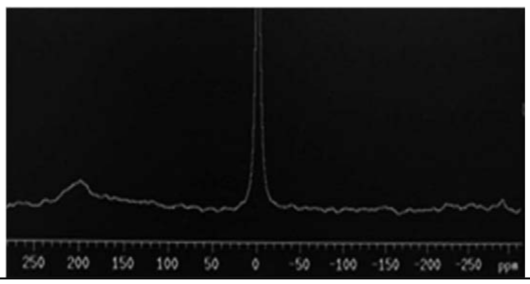


Fig. 2 binom Spectrum for Cellulose White Capsule obtained after 3.3 hrs accumulation.

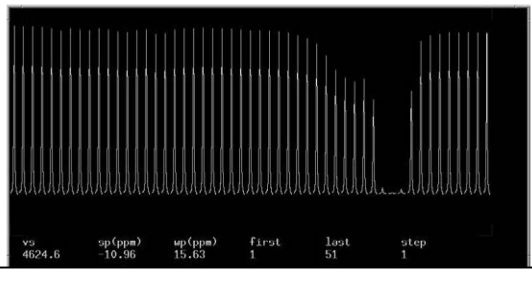


Fig. 3 hyper-CEST Z Spectra for Buffalin Tablet crushed.

【実験】NMR は Agilent INOVA400WA NMR 装置により測定(^{129}Xe の共鳴周波数は 110.5 MHz).

1. A. Kimura, H. Imai, and H. Fujiwara, *in:* T. Meersmann and E. Brunner, eds., *Hyperpolarized Xenon-129 Magnetic Resonance*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, Chap.17, pp.301-316 (2015).
2. H. Imai, A. Kimura, and H. Fujiwara, *in:* M. Albert and F. Hane, eds., *Hyperpolarized and Inert Gas MRI in* Research and Medicine, Elsevier, San Diego, CA, Chap. 8, pp. 115-129 (2017).

P90

遺伝子コード可能なHyperCEST MRI造影剤の開発

○水島良太[1,2,3]，井上加奈子[4]，岩根　敦子[1]，渡邊　朋信[1]，木村敦臣[2]
1 理化学研究所生体機能科学研究センター
2 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻医用物理工学講座
3 東京医科大学ナノ粒子先端医学応用講座
4 大阪大学超高圧電子顕微鏡センター

Multiplexed HyperCEST detection of genetically-reconstituted gas vesicle nanoparticles in human cancer cells in vitro.

○Ryota Mizushima [1,2,3], Kanako Inoue [4], Atsuko H. Iwane[1], Tomonobu M. Watanabe[1], Atsuomi Kimura[2]
1 RIKEN BDR
2 Department of Medical Physics and Engineering, Division of Health Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka University
3 Department of nanoparticle translational research, Tokyo Medical University
4 Research Center for Ultra-High Voltage Electron Microscopy, Osaka University

Gas vesicle nanoparticles (GVs) are gas-containing protein assemblies expressed in bacteria and archaea. Recently, GVs have gained considerable attention for biotechnological applications as genetically-encodable contrast agents for MRI and ultrasonography. However, at present, the practical use of GVs is hampered by a lack of suitable methodology to induce GVs into mammalian cells. Here, we demonstrate the genetic reconstitution of GVs in a human breast cancer cell line KPL-4, and genetic control of their size and shape through the co-transfection of various combinations of humanized gas vesicle genes cloned into Tol2 transposon vectors, referencing the natural gas vesicle gene clusters of the cyanobacteria *planktothrix rubescens / agardhii.* We also report the utility of these GVs as multiplexed, sensitive and genetically-encoded chemical exchange saturation transfer contrast agents for hyper-polarized xenon MRI (HyperCEST).

ガスベシクル(GV)は、一部の微生物で発現する、ウイルスキャプシド様の蛋白質ナノ粒子であり、気体を選択的に透過する性質がある。近年、GVのMRI[1]や超音波エコーにおける、遺伝的にコード可能な造影剤への応用が提唱されているが、ほ乳類細胞での発現方法が確立されていなかった。本研究において、申請者は*P. rubescens*という光合成細菌のガスベシクル遺伝子gvpAとgvpC16/20/28の組み合わせによって、GVの大きさや形が制御されている[2]ことに着目した。この性質を利用して、これらの遺伝子を人工合成して、ほ乳類細胞に導入し、ほ乳類細胞でのGV発現法を確立し、その性質の遺伝的な制御を試みた。光合成細菌*P. rubescenes/agardhii* のGV遺伝子群は、菌株によって、含まれるGV遺伝子が異なり、分子量の大きいGvpCを含むほど、大きく、壊れやすいGVを形成する。申請者は、この性質を利用して、導入する遺伝子群の組み合わせを変えることで、ほ乳類細胞中で発現するGVの性質を操作できるという仮説を立てた。この仮説に基づいて、以下のような実験を行った。*P. rubescens/agardhii* 由来のgvpAとgvpC16/20/28のコドン配列をほ乳類細胞での発現用に最適化して人工合成し、Tet-Onシステムの入ったTol2ベクター

HyperCEST MRI、ガスベシクルナノ粒子、バイオテクノロジー

○みずしま　りょうた、いのうえ　かなこ、いわね　あつこ、わたなべ　とものぶ、きむら　あつおみ

にクローニングした。その際、T2A配列を介して、蛍光蛋白質の遺伝子もクローニングしGV遺伝子の発現量を蛍光で確認できるようにした(Fig. 1)。抗生物質とFACSを用いて、複数の導入したGV遺伝子をドキシサイクリンで安定に発現誘導できる細胞株を確立した。こうして得られた細胞株について、GV発現を検証した。まず、ほ乳類細胞からのGV精製法を開発した。この精製GV溶液に対して、動的光散乱 (DLS) 測定を行ったところ、100nm以上のナノ粒子を確認できた。そこで、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、そのナノ粒子の構造を観察した(Fig. 2)。こうして、KPL-4細胞においてGVの発現が確認された。また、導入するGV遺伝子の組み合わせによって、GVの大きさや形の制御に成功した。次にKPL-4細胞内で発現したGVがHyperCEST MRI造影剤として機能するか検証した。そのため、GV発現細胞の試験管内サンプルに対して、飽和パルスの周波数を変化させたときの、溶解相の^{129}Xeの信号強度変化を計測した(Z-spectrum)。その結果、GV_AC28とGV_AC16C20において、溶解相の^{129}Xeとガスベシクルと結合した^{129}Xeの化学交換が観測された。また、飽和時間を変化させたときの、HyperCESTコントラストを計測した。その結果、GV_AC28は、生体への応用を考えた時に実用的な飽和時間である２秒で、有用なHyperCESTコントラスを得ることができた。

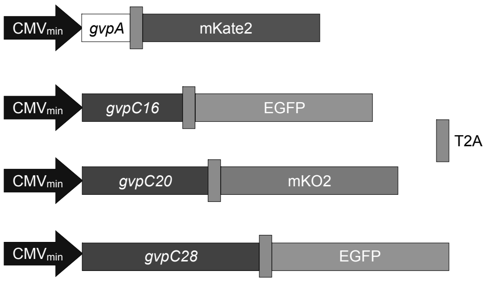


Fig.1 Composition of the insert of Tol2 vectors for transfection of humanized GV genes *gvpA*, *gvpC16*, *gvpC20* and *gvpC28*

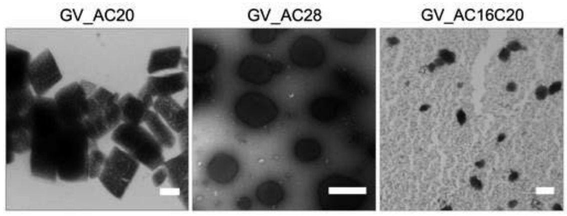


Fig. 2 TEM images of purified GVs from the monoclonal cells: GV_AC20 (left), GV_AC28 (middle) and GV_AC16C20 (right). Scale bars indicate 100 nm (left), 500 nm (middle) and 100 nm (right).

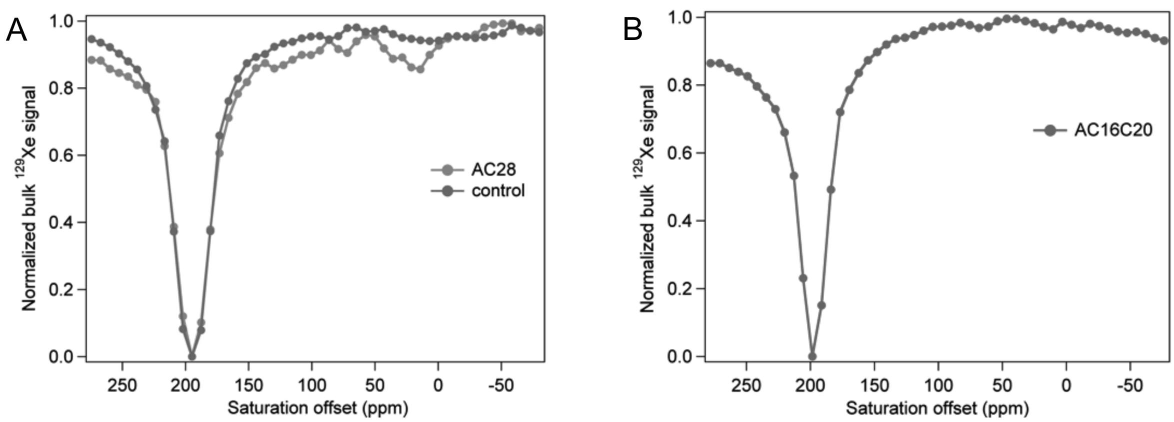


Fig. 3 Z-spectrum of GV_AC28 cell and control KPL-4 cell samples with 8.0 x 10^7 cells / ml (A) and GV_AC16C20 cell with 2.0 x 10^7 cells /ml (B).

References

1. M. G. Shapiro *et al.*, Genetically encoded reporters for hyperpolarized xenon magnetic resonance imaging. *Nature Chemistry*. **6**, 629–634 (2014).

2. S. J. Beard, P. A. Davis, D. Iglesias-Rodríguez, O. M. Skulberg, A. E. Walsby, Gas vesicle genes in Planktothrix spp. from Nordic lakes: strains with weak gas vesicles possess a longer variant of gvpC. *Microbiology*. **146**, 2009–2018 (2000).

P91 パラ水素誘起偏極法によるINEPT型^{13}C励起装置の開発

○友広潤志[1], Neil J Stewart[1], 平田拓[1], 松元慎吾[1]
1北海道大学大学院 情報科学研究科　生命人間情報科学専攻

Development of INEPT-type parahydrogen induced ^{13}C hyperpolarizer

○Mitsushi Tomohiro[1], Neil J Stewart,[1] Hiroshi Hirata[1], Shingo Matsumoto[1]
1 Division of Bioengineering and Bioinformatics, Graduate School of Information Science and Technology, Hokkaido University

^{13}C NMR/MRI is a promising tool for the noninvasive detection of metabolic processes *in vivo*, but clinical applications are typically limited by low sensitivity. In the current study, hyperpolarization technology was applied to amplify the ^{13}C NMR signal intensity, by using parahydrogen induced polarization (PHIP) method and an INEPT-based polarization transfer pulse sequence. A 2 mT external magnetic field (B_0) coil and ^{1}H/^{13}C RF coils were constructed in house, and the INEPT pulse sequence was implemented using the LabVIEW/PXIe system. Polarization transfer from ^{1}H to ^{13}C was confirmed by measuring the signal intensity changes of ^{1}H and ^{13}C NMR signal. By tailoring the pulse interval in INEPT, generation of ^{13}C hyperpolarization in several important metabolic probes is possible.

非侵襲的に生体の解剖像を取得できる核磁気共鳴画像（MRI）は、通常^{1}H核を観測対象としている。観測対象を^{13}C核とした^{13}C MRIは、原理的には生体内の代謝反応の可視化が可能であるが、^{1}Hと比べて低い磁気回転比と生体内濃度を有するために信号の検出感度が低く、医療応用上の障壁となっている。この問題の解決策として、核スピンの分極を熱平衡時と比較して増大させることで一時的にMRI信号を増幅する超偏極技術が利用されている。本研究は、^{13}C核に超偏極を誘導する方法としてParahydrogen and Synthesis Allow Dramatically Enhanced Nuclear Alignment（PASADENA）型のパラ水素誘起分極（PHIP）法を採用した。本研究では、現在主流の動的核偏極（DNP）法と比べ励起時間の短さとランニングコストの低さで優れるPHIP法による超偏極MRIの実験系の構築を目指し、主磁場強度2 mTの低磁場NMR装置の開発と、Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer（INEPT）型パルスシーケンスの照射装置の開発を行った。

INEPT型のパルスシーケンスはLabVIEW/PXIeシステムで作成し、任意のパルス振幅・照射時間・周波数、パルス間待ち時間を設定したシーケンスが生成できていることをオシロスコープで確認した（Fig.1）。パルスがPASADENA条件下での^{13}Cと^{1}Hそれぞれのラーモア周波数を持ったコンポジットパルスとして出力され、これにより単一チャンネルからのパルス照射で異種核を同時に励起することが可能となった。

^{13}C NMR観測する化合物の炭素多重結合前駆体として、ピルビン酸プロパルギル、酢酸アリル、アセチレンジカルボン酸を用意し、それらにパラ水素付加反応を起こし、生成した二つの超偏極^{1}Hの分極を^{13}Cへ、INEPT型のパルスシーケンスの照射によって転

PHIP、Hyperpolarization、INEPT

○ともひろみつし、Neil J Stewart、ひらたひろし、まつもとしんご

移させる。分極の転移はパルスのフリップ角が正確にキャリブレーションされておりかつパルス間待ち時間がパラ水素のプロトンと炭素C核とのカップリング定数（J値）によって定められた値に正確に設定されている場合に起こるため、分極転移装置のフリップアングルのキャリブレーションとJ値の測定を試みた。フリップアングルのキャリブレーションは、予めキャリブレートされたNMR装置の90°パルスを用いて、作成した分極転移装置のパルスが正確に90°となるようキャリブレーションを行なった。酢酸プロパルギルの水素化反応生成物である酢酸アリルのJ値、また、酢酸アリルの水素化反応により生成される酢酸エチルのJ値は、400MHz NMRによる一次元^{1}H NMRスペクトルと二次元J分解HMBCスペクトルの分裂幅より算出した（Fig.2）。

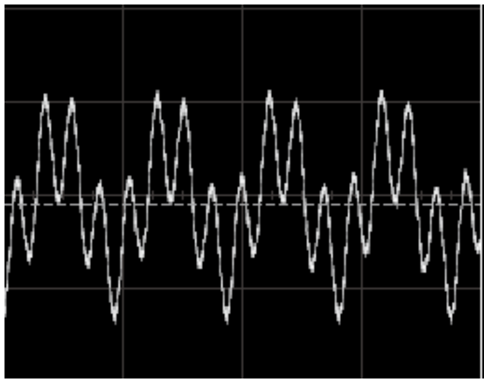


Fig. 1 13C/1H composite pulse by LabVIEW/PXIe system.

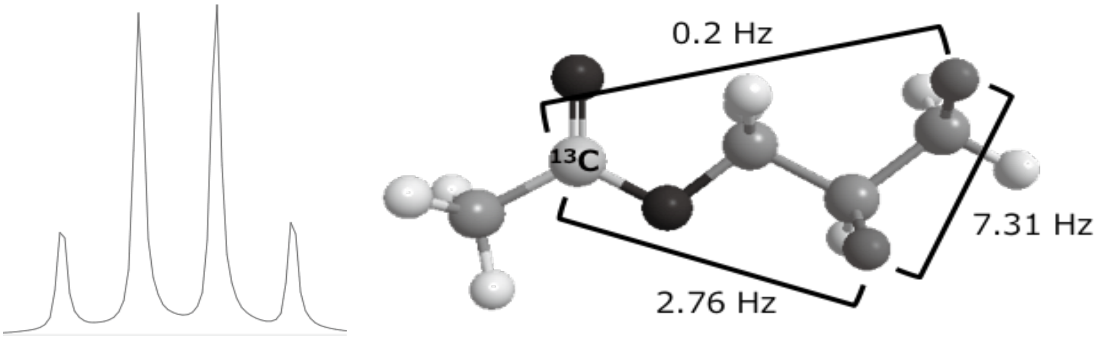


Fig. 2 1H NMR spectrum of ethyl acetate(left). Split width of the spectrum depends on spin-spin coupling values indicated on the right.

算出したJ値を、パルスシーケンスの待ち時間に組み込んだ。待ち時間は以下のように与えられる[1]，[2]

$$\tau_1 = \frac{2}{2|J_{HH'}| + |J_{CH}| + |J_{CH'}|} \quad \tau_2 = \frac{1}{2(|J_{CH}| + |J_{CH'}|)}$$

また、作成したパルスシーケンスで、Nuclear Overhauser Effect (NOE) による^{13}C NMR信号増強が起こったことを、1.5T NMRを用いた周波数掃引測定により確認した（Fig.3）。

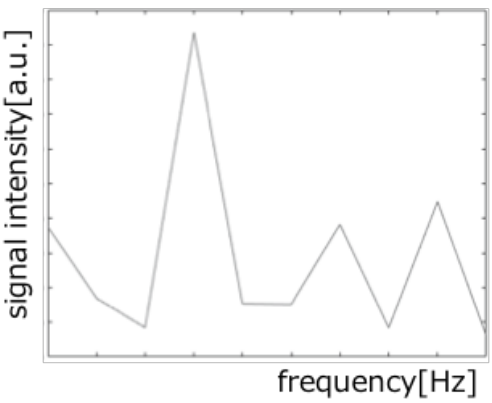


Fig. 3 13C NMR signal intensity by the irradiation of INEPT-based pulse.

Reference
[1] S. Bär, T. Lange, D. Leibfritz, J. Hennig, D. Von Elverfeldt, and J. B. Hövener, *J. Magn. Reson.*, vol. 225, pp. 25-35, 2012.
[2] A. B. Schmidt *et al.*, *Nat. Commun.*, vol. 8, 2017.

P92 時間領域におけるスパース性仮定に基づくベースライン補正法の提案

○中尾朋喜[1]，泉顕也[1]，内海博明[1]
[1]株式会社JEOL RESONANCE

Baseline Correction Method based on Sparsity Assumption in Time Domain

○Tomoki Nakao [1], Kenya Izumi[1], Utsumi Hiroaki[1]
[1]*JEOL RESONANCE Inc.*

A new method for correcting baseline distortion in NMR spectrum is proposed. This is based on the sparsity assumption of the baseline distortion in the time-domain. Proposed method can be applied to signal with a few setting parameters. This paper presents L_1 norm minimization algorithm using IST as practical approach. This solve minimization problem of evaluation that consist to residual L_2 norm of the observed and baseline distortion vector on the baseline sampling points and L_1 norm of baseline distortion vector. The numerical experiment shows that proposed method is effective to remove the baseline distortion.

【緒言】

NMRでは，測定や解析環境によってベースライン歪みと呼ばれる現象が起き，しばしばこれを取り除く必要性が生じる．ベースライン歪みとしては，FID信号の序盤点におけるデータ欠損やリンギングノイズ付加によるものが広く認知されている[1]．これは，FID信号の序盤の欠損や増加値が，周波数領域においてブロードな信号成分となることによって生じる．極低温プローブで測定されたNMR信号に生じるベースライン歪みは，この現象によるものである．Fig.1に，極低温プローブによって測定された^{13}CNMRスペクトルの例をプロットする．一方，メタボローム解析などでは解析対象外の非常にブロードな信号成分を便宜上ベースライン歪みとして扱うような記述が見受けられる[2]．本稿では，発生原因に依らず所望信号でない周波数領域上で広帯域かつ平たんな信号をベースライン信号と呼び，観測信号からベースライン信号を補償または除去する方法をベースライン補正法と呼ぶこととする．

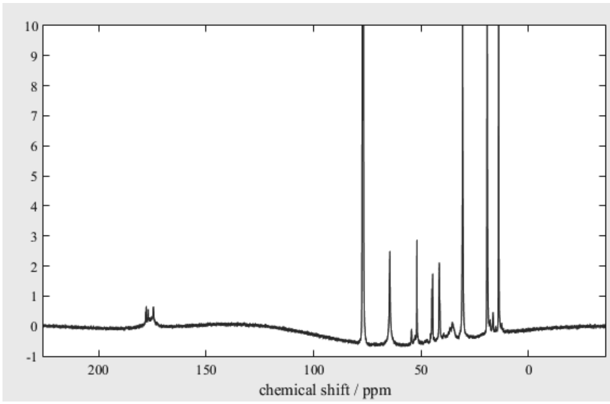


Fig. 1. Example of baseline distortion by missing first few data point of FID signal.

ベースライン補正，スパース最適化

○なかおともき，いずみけんや，うつみひろあき

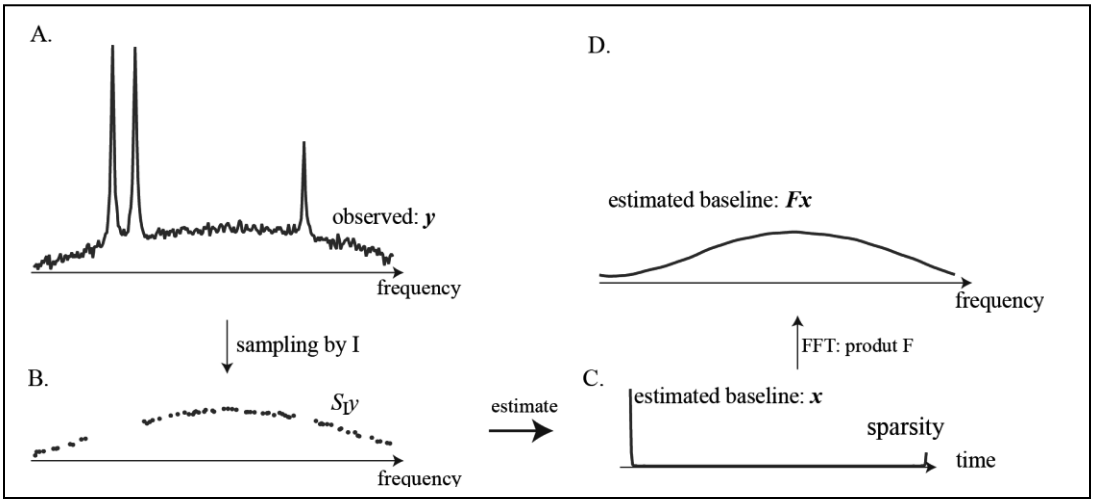


Fig. 2. Outline of proposed algorithm.
(A) observed spectrum; (B) sampled observed spectrum by I; (C) estimated baseline signal in the time domain; (D) estimated signal in the frequency domain.

ベースライン補正法は，これまでに大きく分けて，1)区分直線補間やスプライン補間などの補間法[3]，2)smoothingやAIMAなどの移動平均法[4]，3)多項式フィッティングなどの最小二乗法[5]による方法が提案されている．第二手法は，設定パラメータが少ないため，自動解析に向いている．これに対して，第一と第三手法は設定パラメータが非常に多いため自動解析に向かないものの，適切なパラメータ設定によって非常に優れた結果を得ることが可能である．特に，周波数領域においてベースライン信号が支配的な領域が多く確保できる場合に有効である．

【提案法】

既存法は手法ごとにアプローチが異なるものの，ベースライン信号を周波数領域で広帯域かつ平たんな信号と想定していることは共通している．このような信号は，フーリエ変換の性質から時間領域においてt=0近傍に大きな値を持つ信号となる．特に，データ欠損やリンギングノイズはFID信号の序盤数点に集中するため，データポイント数に比べて非常に少ない要素数に大きな値が集中することが予想される．

ベクトルが非常に多くの0値を持つ場合，スパースなベクトルと呼ばれる．また，このようなベクトルの性質を利用した最適化，すなわちスパース最適化は様々な分野で用いられている．上記のベースライン信号の時間領域における性質は，十分にスパース性を仮定することが可能といえる．この点を鑑み，我々はスパース最適化アプローチによるベースライン信号推定が可能と考えた．

提案法は，周波数領域における観測信号のベクトル表現を$\mathbf{y} \in \mathrm{R}^{N\times 1}$，標本点集合を$I$として，評価量

$$J = \frac{1}{2}\left\| S_I(\mathbf{y} - F\mathbf{x}) \right\|_2^2 + \lambda \left\| \mathbf{x} \right\|_1 \qquad (1)$$

を最小とする$\mathbf{x} \in \mathrm{R}^{N\times 1}$を求める．ただし，$S_I \in \mathrm{R}^{M\times N}$は標本点集合Iで指定された要素番号の要素をベクトルから取り出して再構成する行列，$F \in \mathrm{R}^{N\times N}$はN要素ベクトルに対してIFFT変換を

行う行列，$\|\cdot\|_2^2$はL2ノルム，$\|\cdot\|_1$はL1ノルムとする．また，λは調整パラメータである．式（1）の第一項が観測値と推定値の2乗誤差，第二項がベースライン信号のスパース性の評価項に相当する．Fig. 2.に提案法の概略図を示す． Fig. 2. A.が観測信号，B.が観測信号を標本点集合Iした結果，C.が提案法によって推定される時間領域のベースライン信号，D.が推定されたベースライン信号をFFTした結果である．提案法は，Fig. 2. C.のようにベースライン信号がスパースになることを想定している．

Algorithm 1 Proposal Algorirhm

Input $\boldsymbol{y}$ and $\boldsymbol{I}$ and λ.
$L_{\mathrm{f}} = \max(\mathrm{eig}(S_I F F^H S_I^H)$
Initialization
$k = 0$ and $\boldsymbol{x}_0 = \mathbf{0}$.
while $k <= k_{\max}$ **do**
  $\boldsymbol{h}_{k+1} = \boldsymbol{x}_k + \frac{1}{L_{\mathrm{f}}} F^H S_I^H (S_I(\boldsymbol{y} - F\boldsymbol{x}_k))$
  $\boldsymbol{x}_{k+1} = \mathrm{soft}\left(\boldsymbol{h}_{k+1}, \frac{\lambda}{L_{\mathrm{f}}}\right)$
  $k = k + 1$
end while

Table 1. Proposed algorithm

提案法は，L1ノルム最適化アルゴリズムの一手法であるIterative Soft Thresholding(IST)[1]を用いて式（1）を解くこととする．提案法のアルゴリズムをTable 1.に示す．L_{f}はリプシッツ係数，$k_{\max}$は最大試行回数，eig()とmax ()はそれぞれベクトルの固有値と最大値を得る関数，Hは行列の共役転置とする．soft()はソフト閾値関数と呼ばれ，$\boldsymbol{y} = \mathrm{soft}(\boldsymbol{x}, \mathrm{T})$はベクトル$\mathbf{x}$の各要素$x_{\mathrm{n}}$に対して

$$y_n = \begin{cases} (x_n - T)\, e^{j\phi_n} & |x_n| - T > 0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \tag{2}$$

を行う関数とする．ただし，ϕ_{n}はn番要素の位相，$\|\cdot\|$は絶対値計算を意味し，Tは実数とする．

提案法は，第一，三手法よりも必要とするパラメータが少なく，第二手法よりも高精度なベースライン信号の推定が可能である．また，調整パラメータλの上限値は，標本点集合と行列F，観測ベクトルから決まるため調整パラメータλによる依存性は大きくない．

【数値実験】

計算機上で生成した疑似NMRスペクトルに対して提案法を適用して，その有効性を確認する．

データポイント数Nを2^{10}，サンプリング周波数を1Hzとして，所望信号の振幅，半値幅，周波数をTable2.とする．信号耐雑音比を100，ベースライン信号を以下の3パターン，

1） $\cos(2\pi x)$, $x = 0,1,\ldots,N-1$

2） $1 - 3\cos(4\pi x)$, $x = 0,1,\ldots,N-1$

3） $\mathrm{gauss}(0.05, 0.25, x)$, $x = -1/2, .., 1/2$

で作成した．ただし，$\mathrm{gauss}(f, d, x)$は，中心周波数f[Hz]，半値半幅d[Hz]のガウス波形である．また，本稿ではベースライン信号と所望信号のエネルギー比が5[dB]となるように，ベースライン信号のスケールを調整している．

group	amplitude	HWHM /Hz	frequency /Hz
1	2	5e-4	-0.375
2	2		-0.125-6/N
	4	5e-4	-0.125
	2		-0.125-6/N
3	1		0.25-12/N
	3	5e-4	0.25-4/N
	3		0.25+4/N
	1		0.25+12/N

Table 2. Parameters of desired signal.
HWHM is half width at half maximum, group 1 is singlet peak on -0.375Hz, 2 is triplet peaks on -0.125Hz, 3 is quartet peaks on 0.25Hz.

パターンA-Cのベースライン信号を含む観測信号に対して，標本点数Mを2^6として提案法を適用し

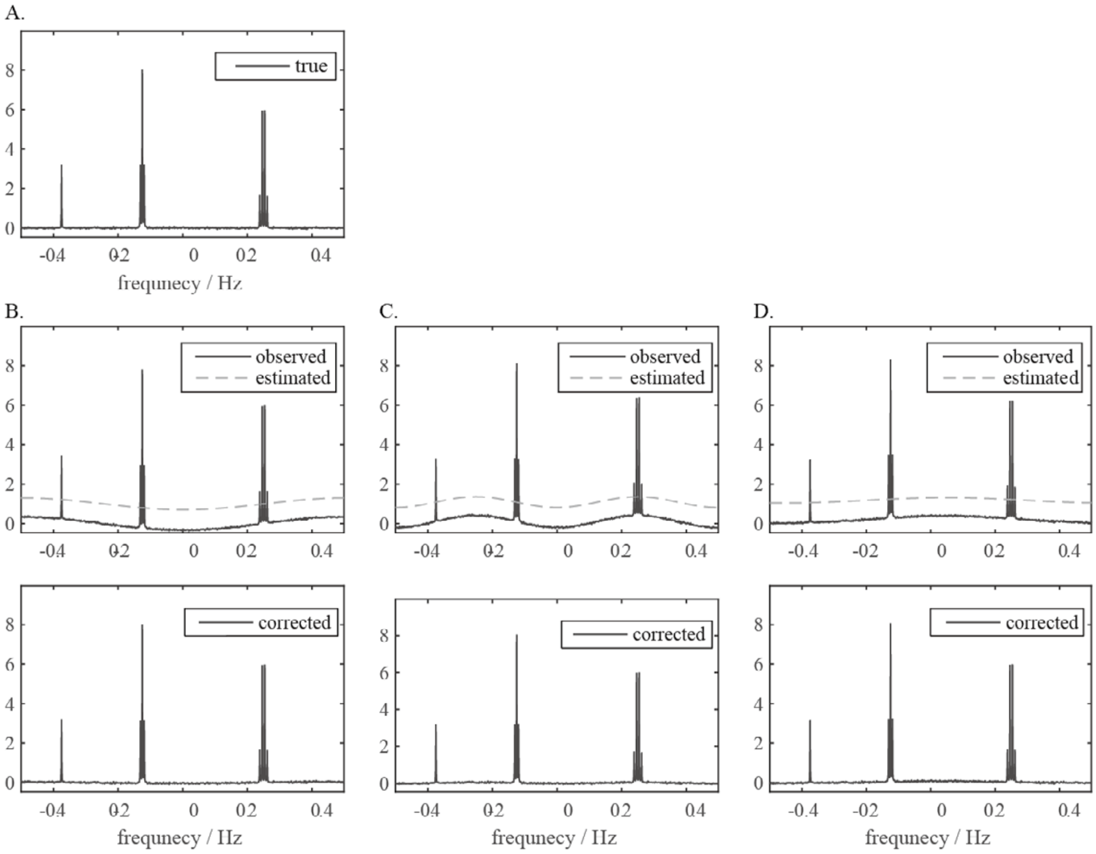


Fig. 3. Results of proposed method.
(A) observed signal(not including baseline distortion); (B), (C), and (D) observed, estimated baseline signal, and corrected signal correspond to the baseline pattern 1, 2, and 3. In (B)-(D), the top is plotted the observed and estimated baseline signal. Bottom is plotted corrected signal.

た結果をFig.3.に示す．ここではアルゴリズムの検証のため，標本点はベースライン信号付加前の信号から強度のヒストグラム計算を用いて決定した．A)に補正信号の真値に相当する信号を，B-D)にベースライン信号のパターン1-3)に対応する観測信号，推定ベースライン信号，補正信号をプロットする．なお，紙面の都合上，ベースライン信号は推定結果にバイアスを加えてプロットしている．

B-D)から，提案法によって十分な精度でベースライン補正が出来ることが確認できる．特に，cos形状で与えられるパターン1，2では非常に良い補正結果が得られている．一方，ガウス形状で与えられる場合に対しては，ある程度補正が成されているものの十分とは言い難い．

Reference

1) Heuar. A. and Haeberlen U., *J. Magn. Reson.*, **85**, 79-97 (1989).
2) Yuanxin Xi and David M. Rocke, *BMC Bioinfornatics*, **9**:324 (2008)
3) Zsolt Z., Slobodan M., and John L Markley, *J. Magen. Reson.*, **82**, 496-504 (1989)
4) Bhaskaran D. P. and Yap. C. W., *Analyst*, **136**, 3130-3135 (2011)
5) Zhi-Min Z., Shan c., and Yi-Zeng L., *Analyst*, **135**, 1138-1146 (2010)
6) Amir B. and Marc T., *SIAM Journal. on Imaging Sciences*, **2**, 183-202 (2009)

P93 TD-NMRによるゴムの架橋状態の評価

○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 crosslinked degree of rubbers by TD-NMR

○Hideyuki HARA
Application Division, Bruker BioSpin K.K.

TD-NMR (time domain nuclear magnetic resonator) is the analytical method which estimates the motility from relaxation time of the proton. In generally low motility materials indicate short relaxation time and high motility materials indicate long relaxation time. It's possible to observe the difference in the motility by crosslinking of rubber by using this method.

【序論】

TD-NMR (時間領域核磁気共鳴) 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ある。一般に運動性の低いもの（硬いもの）は緩和時間が短く観測され、運動性の高いもの（柔らかいもの）は緩和時間が長く観測される。この手法をゴムに用いることで架橋による運動性の違いを観測することが可能である。

【装置および測定法】

装置は TDNMR 装置 minispec mq20（Bruker BioSpin）を用いた。測定は 60 度で行い、運動性の評価には CPMG 法を、また架橋による残余双極子相互作用の観測に Multi Quantum 法を用いた。パルスシーケンスを図 1 に示す。解析は緩和時間解析ソフトウェア TDNMR-A（ブルカージャパン）を用いて行った。試料は、EPDM の未架橋および 4 種類の架橋密度の異なる試料を用意した。Multi Quantum 法は式(1)にフィッティングすることで残余双極子相互作用(D)を求めた。

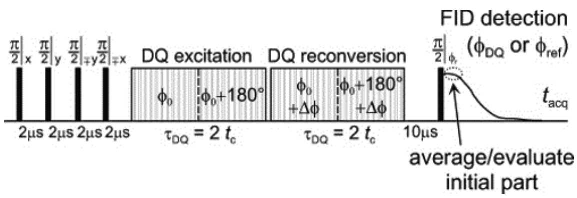


Fig.1 Pulse sequence of MQ

$$I_{nDQ}(\tau_{DQ}, \overline{D}_G, \sigma_G) = \frac{1}{2}\left(1 - \frac{\exp\left\{-\frac{\frac{2}{5}\overline{D}_G^2\tau_{DQ}^2}{1+\frac{4}{5}\sigma_G^2\tau_{DQ}^2}\right\}}{\sqrt{1+\frac{4}{5}\sigma_G^2\tau_{DQ}^2}}\right)$$

Eq.1 Gaussian distributed fitting function)

TD-NMR, 緩和時間, ゴム

○はら　ひでゆき

【結果および考察】

図 2（左）に CPMG 法で測定した架橋，未架橋の緩和曲線を示す。架橋した試料では架橋によって硬化したと思われる緩和時間の短い成分が観測された。架橋による硬化はネットワークの形成による運動性の低下によるものと考えられるため、ネットワーク形成による残余双極子相互作用を直接モニターできる Multi Quantum 法を用いて評価も行った図 2（右）。Multi Quantum 法ではすべての相互作用を含んだ信号(Iref)と Double Quantum 相互作用を含んだ信号(IDQ)を観測することで残余双極子相互作用の成分を取り出すことができる図 3。発表では架橋密度の異なる合計 5 種類の試料についてこれらの測定を行った結果から架橋密度と緩和時間、残余双極子相互作用の関係性について議論する。

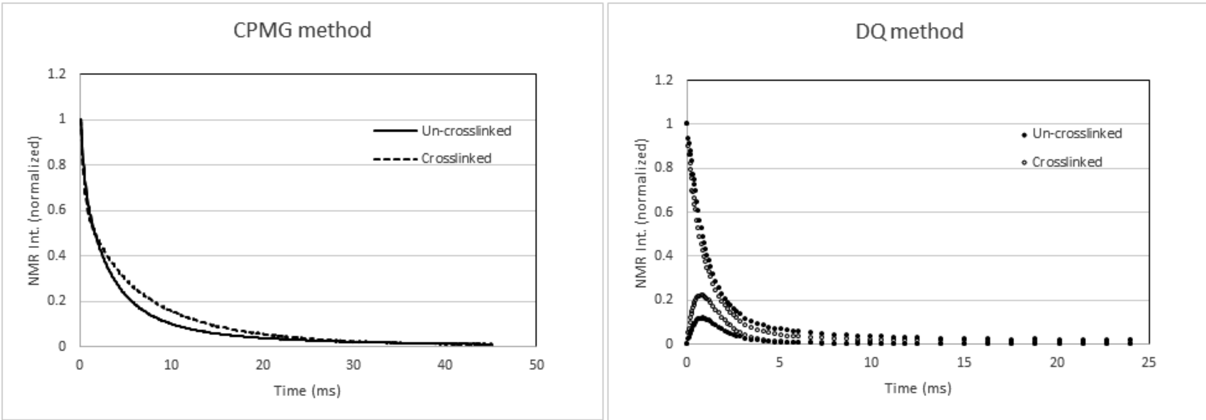


Fig.2 Pulse sequence of stimulated pulse field gradient (PFG)

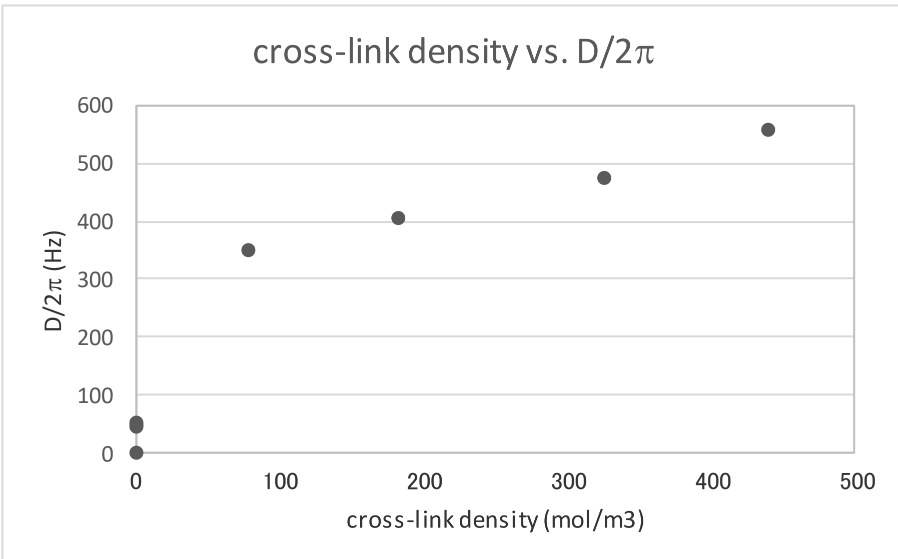


Fig.3 Difference of diffusion behavior of restricted and free diffusion (left) and these

【参考文献】

Macromolecules 2007, 40, 1555-1561 Kay Saalwacher et.al.

P94

内積NMR：共分散NMRの改良版
○小林洋太[1]，竹腰清乃理[1]，野田泰斗[1]，武田和行[1]
[1]京都大学大学院 理学研究科 化学専攻

Inner-Product NMR spectroscopy: a variant of covariance NMR spectroscopy

○Youta Kobayashi, K. Takegoshi, Yasuto Noda, and Kazuyuki Takeda
Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

We examine a variant of covariance NMR spectroscopy, namely, inner-product NMR, suggested in Ref. [2]. The operation of inner product is the same as that of covariance except that subtraction of the average value of the variable is intentionally omitted, so that the correspondence of the spectrum with that of the conventional two-dimensional Fourier Transform (2D-FT) approach is established without having to request the average value of the variable to vanish. In covariance, the mixing-time dependence of the peak intensity can be influenced merely by the choice of the center of the spectrum, whereas the inner-product approach is free from such an undesirable effect, while keeping the merit of covariance NMR. We demonstrate inner-product NMR in a polycrystalline sample of fully ^{13}C-labeled L-alanine.

【背景・目的】

二次元フーリエ変換(2D-FT)NMRは分子の構造や運動を解析する上で非常に有力な手法であるが、長い実験時間を必要とすることも多い。2変数の相関の統計的指標である共分散を二次元NMR実験のデータ処理に用いる共分散NMR法[1]により、2D-FT NMRよりはるかに少ないデータ数で二次元相関情報が得られる。共分散によるデータ処理で得られるスペクトルとフーリエ変換で得られるスペクトルの類似性は、ある2つの関数の積の積分がそのフーリエ変換後の2つの関数の積の積分と等しいというパーシバルの定理に基づいている。ただし、後述するように変数の平均がゼロになるという条件を要する。

一方、共分散の代わりに、変数をベクトルとみなして内積を計算することで、変数の平均がゼロになるという条件を課さずに相関情報が得られる可能性が示唆されていた[2]。本研究では、内積処理による相関情報の取得の実証と共分散法との比較を行った。以下で我々は、内積NMR法が共分散NMR法と同様、2D-FT法に比べてより少ないデータポイントから十分な水準のスペクトルを構成できることを示す。さらに、スペクトルの中心を決める参照周波数の選択がデータへ及ぼす影響が少ない点において内積NMRが共分散NMRよりも優れていることを示す。

共分散、内積、相関NMR

○こばやしようた，たけごしきよのり，のだやすと，たけだかずゆき

【共分散NMRと内積NMR】
交換NMRあるいは相関NMR実験によりN_1個のスペクトル$s_{k,m} = s(k\Delta t_1, m\Delta\omega_2)$を得たとする。2D-FT法では間接時間$t_1$に関してフーリエ変換

$$S_{p,q} = \sum_{p=0}^{N_1-1} s(p\Delta t_1, q\Delta\omega_2)\exp(-i\omega_1 p\Delta t_1) \tag{1}$$

を行って二次元スペクトル$\mathbb{S}$のp,q成分$S_{p,q}$を得る。共分散法では二次元スペクトル$\mathbb{C}$のp,q成分を

$$C_{p,q} = \frac{1}{N_1}\sum_{k=1}^{N_1}\left(s_{k,p} - \langle s_p\rangle\right)\left(s_{k,q} - \langle s_q\rangle\right)^* \tag{2}$$

$$\langle s_\xi\rangle = \frac{1}{N_1}\sum_{k=1}^{N_1} s_{k,\xi} \quad (\xi = p, q) \tag{3}$$

によって求める。パーシバルの定理によると、2つの時間の変数$f(t)$と$g(t)$、およびそれぞれのフーリエ変換関数$F(\omega)$と$G(\omega)$には

$$\int_{-\infty}^{\infty} dt f(t) g^*(t) \propto \int_{-\infty}^{\infty} d\omega F(\omega) G^*(\omega) \tag{4}$$

の関係がある。よって間接次元方向の平均$\langle s_\xi\rangle$がゼロならば、$f(t)$と$g(t)$を$s(t, p\Delta\omega_2)$と$s(t, q\Delta\omega_2)$に、また$F(\omega)$と$G(\omega)$を$S(\omega, p\Delta\omega_2)$と$S(\omega, q\Delta\omega_2)$に対応させることができ、共分散行列$\mathbb{C}$は、2D-FT行列$\mathbb{S}$の二乗になる。よって$\mathbb{C}$の平方根$\sqrt{\mathbb{C}}$を求めることにより、2D-FT法に対応した共分散スペクトルが得られる。

一方、新しいアプローチでは式(2)における平均値$\langle s_\xi\rangle$の減算をあえて省略して、

$$C'_{p,q} = \frac{1}{N_1}\sum_{k=1}^{N_1} s_{k,p} s_{k,q}^* \tag{5}$$

により、二次元行列$\mathbb{C}'$を求めて$\sqrt{\mathbb{C}'} \sim \mathbb{S}$を得る。よって、平均$\langle s_\xi\rangle$がゼロに収束するかどうかに関わらず、パーシバルの式による2D-FTスペクトルとの対応が保証されている。

ここで、変数$\{s_{1,p}, s_{2,p}, \dots, s_{N_1,p}\}$および$\{s_{1,q}, s_{2,q}, \dots, s_{N_1,q}\}$をそれぞれ$N_1$次元のベクトル$\mathbb{s}_p, \mathbb{s}_q^*$とみなすと、式(4)は内積$\mathbb{s}_p \cdot \mathbb{s}_q$に対応していることがわかる。共分散が2つの変数の相関の程度を表すのに対して、内積$\mathbb{s}_p \cdot \mathbb{s}_q$は2つのベクトルの相対的角度$\theta$を用いて、

$$\mathbb{s}_p \cdot \mathbb{s}_q = |\mathbb{s}_p||\mathbb{s}_q|\cos\theta \tag{6}$$

とも表されるため、内積NMRにはベクトルの類似性という幾何学的な解釈を与えることができる。

【実験・結果】

[13]Cフルラベルアラニンの粉末試料を用いて、DARR法[3]を用いた二次元相関実験を行なった。混合時間を 10.0 ms に、またMAS速度を 11 kHz に設定した。$N_1 = 256$ 点の間接次元のデータを取得して2D-FT処理を行った。また、共分散NMR・内積NMRでは先頭の16点のデータのみを用いてデータ処理を行った。共分散・内積の計算には行列の複素特異値分解を利用してデータ処理に要する時間を大幅に減らした[4]。

Fig. 1(a)に示す2D-FTスペクトルではウイグルがみられた。したがって、間接次元のデータ長N_1は256でもまだ不足している。一方共分散スペクトル(Fig. 1(b))および内積スペクトル(Fig. 1(c))では、N_1を16にまで減らしてもスペクトルのパターンに問題はみられなかった。したがって、共分散法と内積法のどちらも、2D-FT法に比べて、取得する間接次元のデータ長を大幅に減らして実験時間を短縮することができるといえる。

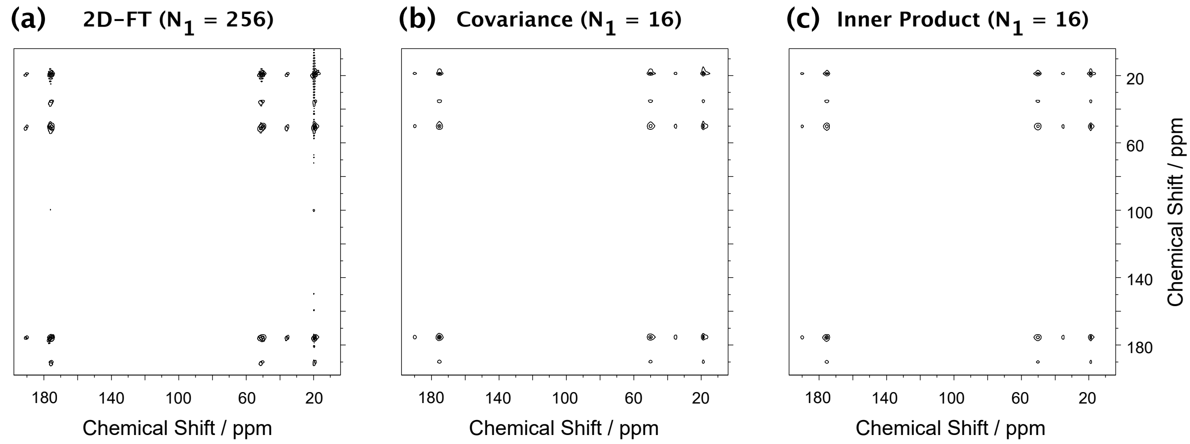


Fig. 1 DARR ^{13}C correlation spectra obtained in a polycrystalline sample of fully ^{13}C-labeled L-alanine with (a) 2D-FT (N_1 = 256), (b) covariance (N_1 = 16), and (c) inner product (N_1 = 16). Here, N_1 indicates the length of the data set along the indirect dimension. Experiments were performed in a magnetic field of 7 T using a 5 mm CPMAS probe. The spinning speed was 11 kHz.

構造解析のためには、クロスピークの有無だけではなく、クロスピーク強度の混合時間依存性を取得することが重要である。共分散法では、一次元スペクトル配列の、間接次元方向の平均$\langle s_\xi \rangle$(式(3))がゼロに収束する必要があるが、この条件はデータ長N_1が小さくなるほど厳しくなる。さらに、NMR測定の参照周波数で決まるスペクトルの中心においては回転座標系での歳差運動が起こらず、間接時間における振動がないため、そもそも$\langle s_\xi \rangle$が消失することが期待できない。そのため、クロスピークの混合時間依存性の定量性に疑問が残る。

Fig. 2は、アラニンのCH-CH_3 間の交差ピーク強度を、混合時間依存性を4つの参照周波数でプロットしたものである。ただし、強度はCH_3の対角ピーク強度で規格化されている。共分散法では、参照周波数が規格化に用いたCH_3のピークの位置と一致する場合に混合時間依存性が大きく異なって見られた(Fig. 2(b))。

一方、内積法では、参照周波数がCH_3のピークの位置と一致するかどうかに関わらず、Fig. 2(a)のフーリエ変換のものと同様に混合時間依存性にほとんど変化がなかった(Fig. 2(c))。このことから、内積処理を行うことによって、共分散の利 点である大幅な時間短縮を達成しつつ、2D-FT法と同様に定量性を持ったスペクトルを得ることができると考えられる。例えば、広幅の共鳴線が現れる試料など、参照周波数をどうしてもピークに重なる位置に設定せざるを得ない場合に、共

分散のように参照周波数付近のピーク強度が変化することなく二次元スペクトルが得られると期待できる。

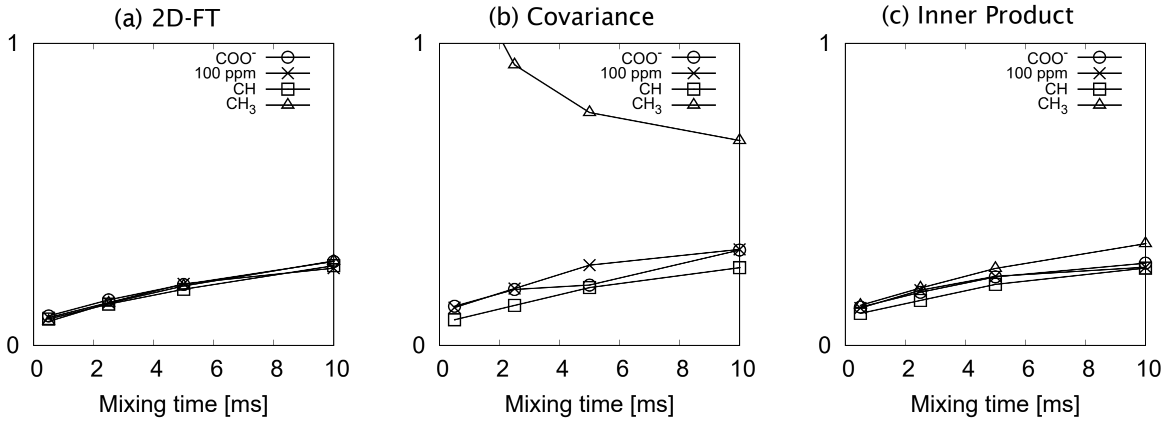


Fig. 2 Mixing-time dependence of the ^{13}CH-^{13}CH$_3$ cross-peak intensity in ^{13}C DARR correlation experiments in a polycrystalline sample of L-alanine for spectral centers set at the carboxyl peak (circles), 100 ppm (diagonal crosses), methine peak (squares), and methyl peak (triangles). (a), (b), and (c) represent the data obtained using the FT, covariance, and inner-product schemes. Data were normalized with respect to the intensity of the diagonal peak.

【まとめ】

共分散スペクトルの計算(式(2))において、平均の減算は省略すべきである。この時のデータ処理(式(5))は多次元ベクトルの内積に対応する。パーシバルの定理にもとづく2D-FTスペクトルとの対応関係は、共分散スペクトルよりも内積スペクトルのほうがより直接的であり、後者においてはピーク強度が参照周波数の選択に大きく影響されることはない。

References

[1] R. Brüschweiler and F. Zhang: J. Chem. Phys. **120** (2004) 5253-5260.

[2] K. Takeda, Annual reports on NMR spectroscopy **84** (2015) 77-113.

[3] K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Terao, Chem. Phys. Lett. **344** (2001) 631-637.

[4] N. Trbovic, S. Smirnov, F. Zhang, R. Brüschweiler, J. Mag. Reson. **171** (2004) 277-283

P95

クライオコイルMASプローブにおけるリンギング対策

○最上祐貴[1], 清水禎[1], 水野敬[2], 戸田充[2], 根本貴宏[2], 竹腰清乃理[3]

1 物質・材料研究機構

2 (株)JEOL RESONANCE

3 京都大学理学研究科

The technique against the ringing for the cryo-coil MAS probe

○Yuuki Mogami[1], Tadashi Shimizu[1],Takashi Mizuno[2], Mituru Toda[2], Takahiro Nemoto[2], K. Takegoshi[3]

[1] *National Institute for Materials Science*

[2] *JEOL RESONANCE*

[3]*Department of science, University of Kyoto*

A cryocoil MAS-NMR probe is compatibly consisted both of a sample spinning system around room-temperature and a cryogenically refrigerating system for signal detector under low temperature (< 20 K), which results in higher S/N gain on high-resolution solid-state NMR spectrum by attenuating thermal noise in the detector and being increased its coil-Q[1-3]. The cryocoil MAS-NMR probe is expected to be applied to the low-γ nucleus. However, because of the high Q and the low frequency, the ringing time is longer than the standard probe. The long ringing time increase the dead time, and the long dead time lowers S/N and make it difficult to observe broad spectrum. AS the technique against the ringing, some pulse sequences are proposed called EASY, RIDE and so on. These pulse sequences are used for only the spin-1/2 nucleus. Therefore, we propose the improved EASY which can also be used for quadrupole nucleus.

JEOL RESONANCE 水野らによって開発されたクライオコイル MAS プローブはコイルなど検出系を極低温まで冷却することで固体高分解能 NMR の感度を従来機より～4 倍向上する装置である[1-3]。これらは冷媒循環系およびプローブから成り、冷却に液体ヘリウムなどを必要とせず気体ヘリウムを循環することでプローブ内のコイル温度 14K を実現している。そのため液体ヘリウムを用いて冷却した時のようなヘリウムの損失は全くなくランニングコストも抑えられるものとなっている。

クライオコイル MAS プローブは低γ核を測定対象核としていることやコイルを冷却しプローブの Q 値が高くなるという特性上、一般的な市販プローブに比べてリンギングによるデッドタイムが長くなってしまう。たとえば Single pulse 法で出力 200 W 程度での測定でのデッドタイム長は観測周波数 100 MHz で 100 us、80 MHz で 300 us、40 MHz で 700 us 程度となっている(@ 9.8T)。リンギングの存在下ではスペクトルがリンギングに埋まってしまうため影響がある程度なくなるまでデッドタイムをとらないといけない。しかしデッドタイムを長くするとシグナル強度が弱くなってしまい､S/N の向上というクライオコイル MAS プローブの利点が失われてしまう。クライオコイル MAS プローブの利点を十分に生かすためにもリンギング対策が必要である。

リンギング対策用のパルスシークエンスの一つとしてEASY法と呼ばれる方法がある[4]。EASY法のパルスシークエンスをFig.1に示す。これは緩和時間T_1がT_2に比べて十分に長い系に使

クライオコイルMASプローブ, リンギング, 43Ca

○もがみゆうき、しみずただし、みずのたかし、とだみつる、ねもとたかひろ、たけごしきよのり

える方法である。まず、90°パルスを照射し、*acq*1でリンギングとサンプル由来が重なったFIDが観測される。次にT_2の数倍程度の待ち時間（τ）で90°パルスを照射する。その後の観測（*acq*2）ではT_1がτに比べて十分に長い場合、リンギング信号のみが得られる。*acq*1と*acq*2で得られたスペクトルについて差スペクトルを取ることでリンギング成分は相殺されサンプル由来の成分のみが得られる。しかし、EASY法は90°パルス幅に誤差がある場合*acq*2に信号が含まれてS/Nが低下してしまうことや*acq*2でサンプル由来の信号以外のノイズ及びリンギング成分を取り込むためS/Nが$1/\sqrt{2}$倍になってしまうことなどという欠点がある。そのため90°パルス幅にサンプル依存性がある四極子核($I > 1/2$)ではS/Nが低下してしまう。本研究ではこの二点についてEASYの改良を行った。

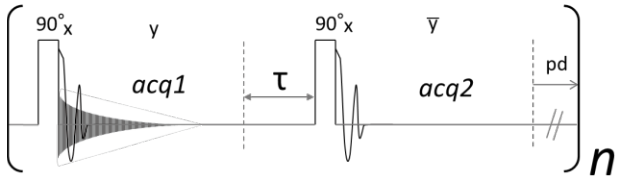


Fig.1 EASY のパルスシークエンス

四極子核についても利用可能な改良版EASYのパルスシークエンス($EASY^R$)をFig.2に示す。これはEASY法で行った*acq*1と*acq*2のみをそれぞれ別の積算で取り込みその後、差スペクトルを取るというものである。これによって*acq*2での縦磁化がサチュレーションされパルス幅に誤差があったとしても*acq*2で信号が含まれてしまうことはない。

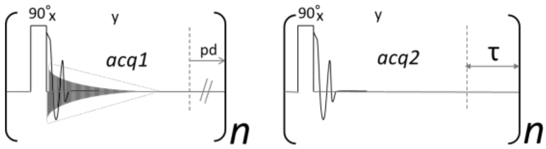


Fig.2 $EASY^R$ のパルスシークエンス

リンギングはサンプル由来の信号に比べて緩和が早いものもある。その場合、EASYにおいては*acq1*と*acq2*を同一測定で行っていたためこれらは同じ長さ取り込む必要があった。しかし$EASY^R$では*acq1*と*acq2*を別々の測定として取り込んでいるため測定後取り込み時間を*acq*1ではサンプル由来のスペクトルに、*acq2*ではリンギングに最適化しゼロフルをして2つの取り込み時間を同じにし、差スペクトルを取ることでEASYと比較して取り込むノイズを落としS/Nをあげる方法を考えた（$EASY^{R0}$）。

Single Pulse法、$EASY^R$法、$EASY^{R0}$法を用いてカルサイトを測定した^{43}Ca NMRスペクトルをFig. 3に示す。$EASY^R$を用いることでカルサイト($CaCO_3$)のスペクトルが得られた。S/Nは理論値通り$1/\sqrt{2}$倍程度になったもののリンギングは軽減されていることがわかる。さらに$EASY^{R0}$を用いることでS/NがSingle Pulseと同程度でリンギングを軽減させることができていることがわかる。

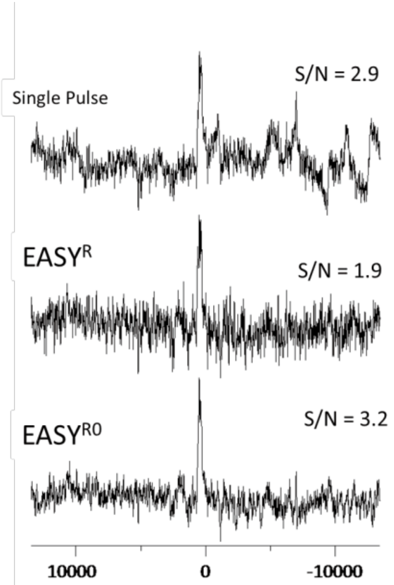


Fig.3 上から Single Pulse, $EASY^R$ $EASY^{R0}$ を用いて測定をしたカルサイトの ^{43}CaNMR スペクトル(26.9MHz@9.4T, dead time: 320us)

1. T. Mizuno, K. Hioka, K. Fujioka and K. Takegoshi, *Rev. Sci. Instrum.* 79 (2008) 044706
2. T. Mizuno and K. Takegoshi, *Rev. Sci. Instrum.* 80 (2009) 124702
3. T.Nakai, M. Toda, J. Ashida, F. Hobo, Y. Endo, H. Utsumi, T. Nemoto and T. Mizuno, *Chem. Phys. Lett.* 678 (2017) 265.
4. C. Jaeger, F. Hemmann, Solid State Nucl. Magn. Reson 57 (2014) 22

P96

パラ水素誘起分極法による^{13}C標識ピルビン酸代謝の*in vivo*超偏極^{13}C NMR計測手法の開発

○本間 章太郎[1]，Neil J Stewart[1]，内尾佳貴[1]，松元慎吾[1]
1北海道大学大学院 情報科学研究科 生命人間情報科学専攻

Development of *in vivo* ^{13}C NMR measurement for hyperpolarized ^{13}C pyruvate using PHIP technique

○Shotaro Homma[1], Neil J Stewart[1], Yoshiki Uchio[1], Shingo Matsumoto[1]
[1]*Graduate School of Information Science and Technology*

Parahydrogen Induced Polarization (PHIP) is a hyperpolarization technique which uses parahydrogen as a source of hyperpolarization, and by transferring the polarization from ^{1}H, NMR signals of hetero nucleus such as ^{13}C may be greatly enhanced. Using the NMR signals of hyperpolarized ^{13}C labeled compounds enables analysis of metabolism in one's body. Pyruvate is a key intermediate in glucose metabolism, and its metabolic pathway is known to alter in normal and tumor tissues: In normal tissues, pyruvate enters the TCA cycle via mitochondrial oxidization, but in tumor tissues, pyruvate is mainly converted into lactate through glycolysis. Here, we developed *in vivo* ^{13}C NMR measurement technique for hyperpolarized ^{13}C pyruvate using PHIP.

核磁気共鳴画像(MRI)は^{1}HのNMR信号を用いることで生体内の形態像を取得することが可能であるが、^{1}H NMRから取得できる代謝情報は限られている。それに対し、^{13}C NMRでは^{13}C標識された化合物を生体に投与しNMR信号を取得することで生体内の代謝反応をリアルタイムに観測することが可能である。しかし^{13}Cの信号は微弱であるため、NMR計測の前段階に偏極率を増幅させる必要がある。パラ水素誘起偏極(PHIP)は水素付加反応を用いて^{1}Hに核偏極を誘導する手法であり、続く分極移動により^{13}Cなどの異核のNMR信号を数万倍に増幅することが可能である。

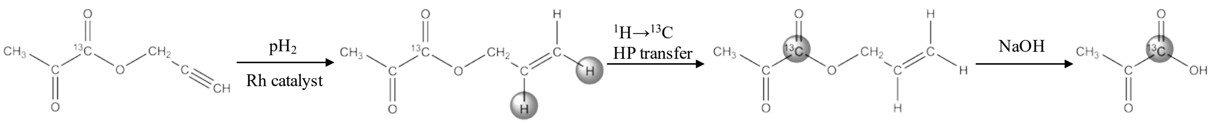


Fig.1. PHIP hyperpolarization of [1-^{13}C]pyruvate

ピルビン酸はグルコース代謝の主要中間体であり、癌組織ではミトコンドリアの酸化的リン酸化から解糖系への代謝シフトが知られている。そのため^{13}C NMRでピルビン酸代謝の計測を行うことによる癌診断への応用が期待される。

超偏極、代謝計測

○ほんましょうたろう，Neil J Stewart，うちおよしき，まつもとしんご

本研究では、パラ水素誘起偏極法を用いて超偏極^{13}C標識ピルビン酸を調整し、1.5T MRIの自作機を用いて、マウスにおけるピルビン酸代謝の*in vivo*超偏極^{13}C NMR計測手法の開発を行った。磁場強度を変化させるMagnetic Field Cycling(MFC)法を用いて^{1}Hから^{13}Cへの分極移動を行い、NMR計測においては自作した^{1}H用ソレノイド型ボディコイルと^{13}C用サーフェスコイルの二重共振器を用い、マウスの肝臓における^{13}Cピルビン酸代謝スペクトルの取得を行った。今後は担癌モデルによる癌診断研究へと展開していく。

Fig.2a. C3H mouse with ^{13}C surface coil resonator

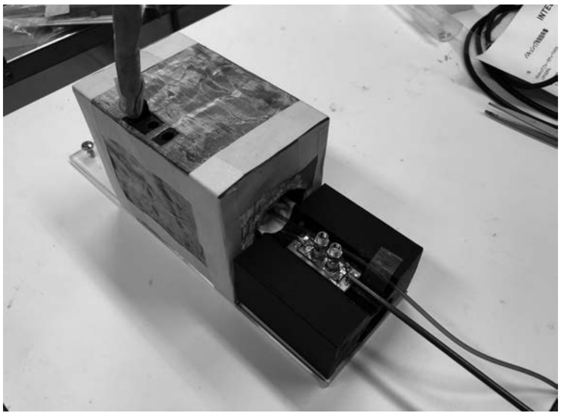


Fig.2b. ^{1}H solenoid coil and ^{13}C surface coil resonator

Reference

(1) Golman, K., Zandt, R. I. T., Lerche, M. H., Pehrson, R. & Ardenkjaer-Larsen, J. H. Metabolic imaging by hyperpolarized 13C magnetic resonance imaging for in vivo tumor diagnosis. *Cancer Res.* **66**, 10855–60 (2006).

(2) Hsu, P. P. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**, 703–707 (2008).

(3) Natterer, J. & Bargon, J. Parahydrogen induced polarization. *Prog.Nucl.Magn.Reson. Spectrosc.* **31**, 293-315(1997)

P97 周期的匂い刺激と独立成分解析を利用したマウス全脳の嗅覚応答の検出

○武田　光広[1]，林　芙優[1]，杠　直哉[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

Detection of odor responses in mouse whole brain using periodic stimulations and independent component analysis

○Mitsuhiro Takeda [1], Fuyu Hayashi [1], Naoya Yuzuriha [1], Sosuke Yoshinaga [1], Hiroaki Terasawa[1]
[1]*Faculty of Life Sciences, Kumamoto University*

Olfactory perception is an important sense in animals. Mice serve as a useful model for the olfactory responses, as they have a well-developed olfactory system. The olfactory perception starts from the binding of odorants to olfactory receptors, which transduce signals to the olfactory bulb, and then to higher-order brain regions. While numerous reports have monitored the odor-evoked responses in the olfactory bulb, our understanding of the olfactory responses in the higher-order brain regions is still limited. We monitored the odor-evoked olfactory responses in the higher-order brain regions in mice, using periodic odor stimulations and independent component analysis.　In this study, we compared the responses evoked by two different odorants, isoamyl acetate and muscone.　In addition, we explored the influences of two types of anesthesia, urethane and medetomidine.

【背景・目的】嗅覚は動物の重要な感覚の一つであり、匂い物質の認知と識別を担う神経回路が動物の脳内に構築されている［1］。約 1000 種類の嗅覚受容体遺伝子を持つマウス等の齧歯類は、高度な嗅覚系を形成しており、嗅覚研究における有用なモデルとなる。嗅覚系においては、まず、匂い物質が嗅上皮の嗅覚受容体で受容され、その入力信号が一次中枢である嗅球と伝えられる。続いて、嗅球から高次の脳領域へとシグナルが伝達され、最終的にマウスの行動・情動・生理的変化を引き起こす。これまで、匂い特有の嗅球の活性化パターンは、MRI 法のひとつである BOLD 法を用いて解析がなされている［2, 3］。高次脳領域における匂い特有の活性化パターンも、BOLD 法を用いてリアルタイムで検出できると考えられるが、活性化に伴う血流動態応答関数 (HRF: Hemodynamic Response Function)が一般的な形を示すかなどの不明な点がある。我々は、周期的な匂い刺激と独立成分解析（ICA: Independent component analysis）を組み合わせた、BOLD 信号の高感度検出法の開発を進めている［4］。ICA は周期的に活性化する脳領域を同定する方法である［5］。刺激と同周期で応答する成分を抽出することで活性化部位を同定する［4］。本発表は、Isoamyl acetate (IAA)、およびジャコウジカ由来のムスク化合物 muscone の２種類の匂い刺激をマウスに与え、高次脳領域における活性化の類似点と相違点を調べることを目的とした。また、最近従来の urethane などにかわり、鎮静剤のひとつである medetodimine 麻酔がBOLD 実験に利用されている。そのため、urethane とmedetomidine の麻酔下での比較も行った。

BOLD、匂い刺激、機能的MRI

○たけだみつひろ、はやしふゆ、ゆずりはなおや、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、ブルカー社製７テスラ小動物用 MRI 装置を用いた。C57BL/6 雄マウスを、urethane あるいは medetomidine により麻酔して撮像に用いた。匂い刺激の時間および濃度を制御するため、吸気ラインに三方活栓を付け、匂い物質で飽和させたシリンジポンプを接続した。グラジエントエコー型 EPI 法による連続撮像を行いつつ、匂い物質を５秒間吸引させ５５秒間止めることを交互に繰り返した。画像解析は、SPM8 による動き補正および平滑化処理を行った後、ICA 解析を行った。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び、マウス脳アトラスと比較して活性化部位を同定した。

【結果】urethane 麻酔下では、IAA および muscone の匂い刺激時のいずれにおいても、梨状皮質 (Pir; Piriform cortex) に活性化が検出された。また、IAA 刺激時にのみ外側視床下部 (PLH; Posterior Lateral Hypothalamus) 、muscone 刺激時にのみ扁桃体に、それぞれ活性化が検出された。検出部位における信号強度の時間変化を調べると、匂い刺激開始後約８秒の時点で信号強度が増加しはじめた。medetomidine 麻酔したマウスにおいては、urethane 麻酔時と同じ部位に活性化が検出された。刺激後の強度変化のタイミングも同じであったが、urethane 麻酔下に比べて、信号強度の増加の程度は有意に大きかった。

【考察】周期的な匂い刺激と ICA 解析を組み合わせることで、IAA および muscone 匂い刺激によるマウス高次脳領域の活性化を検出できた。従来の線形モデル解析は、BOLD信号が一般的な HRF の形に従わないと検出できないが、ICA 解析は信号の周期性に基づいて検出するため、BOLD 信号の形に影響されずに活性化を検出できる。今回、得た撮像データを線形モデルにより解析しても、同脳領域における活性化を検出できなかった。信号強度の増加が刺激後約８秒で生じ、一般的な HRF の形と異なるため検出が出来なかったと考えられる。IAA と muscone 匂い刺激の両者で活性化が検出された Pir は嗅覚伝導路の一部であり、幅広い種類の匂い物質により活性化されると考えられる。IAA 刺激特異的に活性化が検出された PLH は、摂食中枢を含む。IAA はバナナ臭を持つため、PLH が特異的に応答した可能性がある。また、muscone 刺激特異的に活性化された扁桃体は情動に関与している [6]。muscone による扁桃体の活性化は免疫染色法を用いた解析からも報告されている[7]。また、当初期待したように、urethane 麻酔下に比べて medetomidine 麻酔下において強い BOLD 信号が検出された。medetomidine は鎮静剤であり意識レベルの低下が比較的弱く、urethane に比べてmedetomidine 麻酔下において強い応答が得られたと考えられる。

【結語】周期的刺激と ICA 法を組み合わせ、IAA および muscone 匂い刺激によるマウス高次脳領域の活性化部位を同定した。また、urethane 麻酔に比べ medetomidine 麻酔下でより強い BOLD 信号が検出された。

【参考文献】[1] Touhara, K. and Vosshall, L.B., *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 307–332 (2009), [2] Pain, F. *et al., Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2689–2709 (2011), [3] Xu, F. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 11029–11034 (2003), [4] Yuzuriha, N. et al., Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 24, 1722 (2016), [5] McKeown, M.J. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95,** 803-810 (1998). [6] Venkatraman, A. et al., Front Neuroanat. **11**, 15 (2017), [7] Shirasu, M. et al., Neuron **81**, 165-178 (2014).

P98

磁場配向微結晶懸濁体の *in situ* 固体 NMR 測定
- 磁場配向プローブの開発 -

○門間 啓[1]，久住 亮介[1]，和田 昌久[1]，木村 恒久[1]，武田 和行[2]
1 京都大学大学院　農学研究科
2 京都大学大学院　理学研究科

In situ **solid-state NMR measurement of magnetically oriented microcrystal suspension – development of magnetic orientation probe –**

○Hiroshi Kadoma [1], Ryosuke Kusumi [1], Tsunehisa Kimura [1], Kazuyuki Takeda [2]
1 Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan
2 Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan

A probe for measuring solid-state NMR of Magnetically Oriented Microcrystal Suspension (MOMS) was developed. In this probe, the sample is rotated slowly (≤ 100 rpm) around an axis perpendicular to the static magnetic field (B_0). Under such a rotating magnetic field, the microcrystals in the liquid medium are *aligned* by a torque arising from the anisotropic bulk magnetic susceptibility of the crystal. When the rotation speed is switched for every 90° sample rotation, three-dimensional orientation is expected. Here, we demonstrate formation of MOMS with L-alanine microcrystals under a constant-speed rotation, followed by ^{13}C CP measurements, confirming uniaxial alignment of the microcrystals along the hard magnetization axis (χ_3) perpendicular to the B_0. The obtained spectrum agreed well with simulation, indicating that the chemical shift anisotropy can be directly evaluated from the MOMS using the developed probe.

1. 緒言

固体NMRでは，一般に粉末試料についてMAS下で測定する．しかしながら，MAS下では化学シフトの異方性(CSA)が平均化されるため，CSA情報(化学シフトテンソル)を完全な形で抽出し精密なレベルでの局所構造解析に応用することは困難である. 数mmサイズの単結晶があれば単結晶NMR法[1–3)]を用いて化学シフトテンソルを決定することができるが，そのような巨大なサイズの単結晶を準備できるケースは稀である．一方，当研究グループではこれまでに，微結晶の三次元磁場配向体(擬単結晶，Magnetically Oriented Microcrystal Array (MOMA))[4)]に単結晶NMR法を適用し, 微結晶粉末から化学シフトテンソルを決定する手法を提案してきた[5)]. しかしながら，この擬単結晶法では測定試料を配向固定用の媒体(紫外線硬化モノマーなど)に均一に分散させるプロセスが不可欠であるため，損傷しやすいタンパク質やナノオーダーの微小な結晶といった物質への応用が困難であった．また，測定用のNMR装置に加え，擬単結晶作製用の強磁場(超伝導磁石など)と配向装置を準備する必要もある.

上記の課題を解決するため，本研究では，固体NMRの強磁場を活用して微結晶懸濁体の磁場配向を達成しつつ，媒体を固化させることなくそのままの状態での固体NMR測定が可能な磁場配向プローブを設計・作製した.

磁場配向、プローブ設計・開発、*in situ*固体NMR測定

○かどま ひろし[1]，くすみ りょうすけ[1]，わだ まさひさ[1]，きむら つねひさ[1]，たけだ かずゆき[2]

2. 実験

磁場配向プローブは，JEOL CMX300 Infinityに備え付けられていた7.5 mmϕHX-MASプローブを改良して作製した．微結晶の三次元磁場配向を達成するためには，懸濁体の入った試料管を静磁場と直交させた状態で変調回転させる必要がある．そこで，まずプローブ内のMAS用のスピナーを取り外し，磁場配向プローブ用のRFコイルを新たに準備した．次に，コイルおよび試料管の支えとなる樹脂製の支持体を，CADソフトウェアを用いて設計し, 3Dプリントして作製した．試料管の変調回転は厳密に制御する必要があるため，駆動はステッピングモーターにより行なうこととした．試料管はPCTFE製とし，懸濁体を封入できる仕様とした．Fig. 1に，作製した磁場配向プローブを示す. 超電導磁石(300 MHz, 7.05 T)およびRFパルス照射のためのパワーアンプにはJEOL CMX300 Infinityのものを使用し，測定はFPGA集約型OPENCORE NMR分光計[6)]を用いて行った.

作製した磁場配向プローブを用いて, まずは定速回転(ω = 20 rpm)下においてL-アラニン微結晶懸濁液の固体^{13}C CP測定を行った. 測定は90°パルス幅3 μs，CPコンタクトタイム3 ms, 繰り返し待ち時間2 s, 積算回数40000回の条件で行なった.

3. 結果・考察

Fig. 2(a)に，通常のL-アラニンの粉末スペクトルを, またFig. 2(b)には回転磁場による一軸配向下で得られたL-アラニン微結晶懸濁液の^{13}C CPスペクトルを示す. Fig. 2(c)は単結晶データ[3)]を用いた一軸配向粉末試料のシミュレーションの結果を示している. 今回の実験条件では，懸濁媒体中の微結晶は回転磁場下で磁気トルクを受け, 結晶の磁化困難軸(χ_3軸)が試料回転軸と平行, すなわち静磁場方向と垂直に配向する. 測定結果はシミュレーションとおおむね一致しており, NMRの強磁場を利用した動的磁場配向下での微結晶懸濁体のNMR測定に成功したと言える. 試料管の変調回転によって三次元磁場配向も達成できることが期待できる.

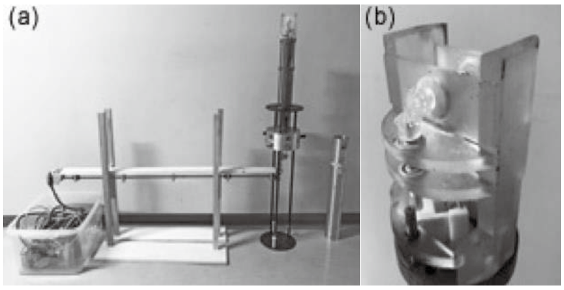


Fig. 1　Solid-state NMR probe developed for *in situ* measurements of magnetically oriented microcrystal suspensions: (a) overview and (b) close-up of the sample-rotating unit.

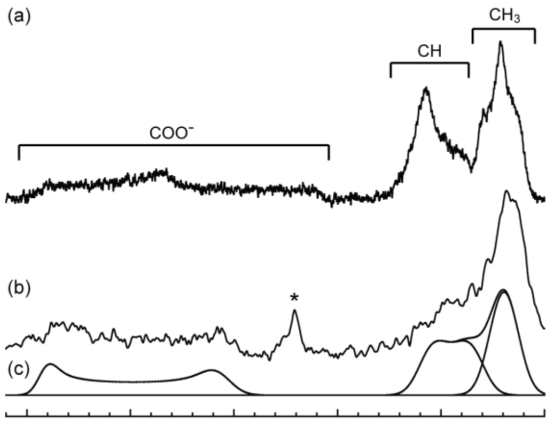


Fig. 2　^{13}C CP spectra of L-alanine microcrystals (a) without MAS (powder spectrum), (b) obtained in a suspension under the rotating magnetic field (20 rpm), and (c) simulated from the single-crystal data[3)]. The resonance peak from the sample tube is marked with an asterisk.

参考文献

1) C. A. Fyfe, *Solid State NMR for Chemists*, 1983.
2) D.L. Sastry et al., *Carbohydr. Res.* **165**, 161 (1987).
3) A. Naito et al., *J. Chem. Phys.* **74**, 3190 (1981).
4) T. Kimura et al., *Langmuir* **22**, 3464 (2006).
5) R. Kusumi et al, *J. Magn. Reson.* **223**, 68 (2012).
6) K. Takeda, *J. Magn. Reson.* **192**, 218 (2008).

P99

高温超電導RFコイルによる四極子核NMRプローブの開発(1)
－RFコイルのQ値向上と測定試料の大容量化－

○高橋雅人[1]，加藤翔太[2]，トリトラカーンテシット[2]，岡村哲至[2]，入江晃太朗[3]，星晴貴[3]，齊藤敦[3]，山田和彦[4]
1 理化学研究所・放射光科学研究センター
2 東京工業大学大学院・工学院
3 山形大学大学院・理工学研究科
4 高知大学・教育研究部

NMR Probe for Quadrupolar Nuclei Using High-Temperature Superconducting RF Coils (1): High Quality-factor RF Coils with Large Volume Sample

○Masato Takahashi[1], Shota Kato [2], Techit Tritrakarn[2], Tetsuji Okamura[2], Kotaro Irie[3], Haruki Hoshi[3], Atsushi Saito[3], Kazuhiko Yamada[4]
1 SPring-8 Center, RIKEN
2 School of Engineering, Tokyo Institute of Technology
3 Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University
4 Research and Education Faculty, Kochi University

A next-generation NMR probe using High Temperature Superconducting (HTS) RF coils has been developed in JST-SENTAN program. The quality factor of the tank circuit using the HTS coils was found to be as high as 16,125 at 9 K. We intend to apply the new probe to NMR of quadrupolar nuclei in amorphous solids, which sometimes play important roles in materials science. In general, it is difficult to acquire NMR spectra of quadrupolar nuclei with high sensitivity. In particular, when the quadrupolar interaction is very large, it is impossible even to detect the NMR signals using the conventional approaches. To overcome this problem, we propose to apply our next-generation probe using the HTS coils to field-swept NMR using a cryogen-free superconducting magnet.

［序論］

より高機能・高性能な材料開発に貢献するために、JST先端計測分析技術・機器開発プログラム「全原子を測定対象とする次世代型NMR装置の開発」（チームリーダー：高知大学　山田和彦）を行っている。実用材料中四極子核の結合状態や動的挙動を測定するNMR装置を開発し、現在でも未解明なタイヤなどゴム中の硫黄（^{33}S）による架橋構造を解明することを目標としている(Fig. 1)。固体NMRの特徴の一つであるアモルファス状態でも着目原子核から情報を得ることが可能である点を利用して材料開発やライフサイエンスに貢献したいと考えている。しかし、四極子核の場合NMRスペクトルは非常に幅広になることが多く、既存のNMR装置では測定できない。従来とは全く異なる超高感度な高温超電導（HTS）受信アンテナ（コイル）と磁場掃引型超電導磁石を備えたNMR装置を開発中である。

上記先端計測プロジェクトは3つの要素から成る。HTS受信コイル（LC共振回路のLを高

RFコイル、四極子核、高温超電導

○たかはしまさと、かとうしょうた、とりとらかーんてしっと、おかむらてつじ、いりえこうたろう、ほしはるき、さいとうあつし、やまだかずひこ

性能化）、オプトメカニクス（Cを高性能化）、磁場掃引NMRの手法開発である。オプトメカニクスでは、共振回路のコンデンサの電極を振動膜にして充放電をレーザーで読み取るNMR信号測定法を京都大学の武田を中心に開発中である[1]。磁場掃引NMRは高知大学の山田が実材料に適した測定法を開発中である[2]。

実用材料、たとえば共有結合性を有する有機硫黄化合物やゴムを含む高分子試料の場合、^{33}Sの四極子モーメントによってNMRスペクトルの線幅が数十MHzになる。これは、四極子相互作用の強さ（上記数十MHz）とゼーマン相互作用の強さ（^{33}SのNMR共鳴周波数、たとえば500 MHz(11.74 T)のNMR装置で38.4 MHz）がほぼ同じということになる。この場合、両者が混合して複雑な数十MHzに及ぶ広幅のNMRスペクトルが維持されるため広幅すぎて通常は測定できない（横の問題）。さらに、NMR信号を出す^{33}Sの天然存在比が0.75%であるためより困難な測定となる（縦の問題）。つまりNMR測定の難易度は、線幅（横）と信号強度（縦）の問題で決まる。

［実験装置］

HTS受信コイルによる超高感度化で縦の問題を解決し、磁場掃引型超電導磁石を用いた新規測定手法により横の問題を解決する。HTS受信コイルは、超高感度を実現できるものの周波数の調整が不可能であるため、磁場掃引型超電導磁石と組み合わせることがその性能を有効活用できる唯一の方法である。用いたHTS受信コイルはREBCO薄膜を用いた25 mm角の基板型であり山形大学の齊藤が製作した[3]。磁場掃引型超電導磁石は、仁木工芸株式会社の8 T 伝導冷却型高均一度マグネット（室温ボア径54 mm）を用いた。この磁石は、セルフシム機能により、磁場掃引中でもシム調整することなく高い磁場均一度（10 ppm@10 mm球）を維持できるため、本手法に最適である(Fig. 2)。

［実験結果］

HTS RFコイルを組み込んだプローブを開発し、冷却試験を行った。9 Kまで冷却した時Q値は16,125となった。これは同形状の室温銅コイルの約36倍に相当する（感度では約6倍相当）。

Reference

[1] Takeda et al, Optica 5 (2018)152.

[2] K. Yamada, et al.: Chem. Phys. Lett., 618 (2015) 20

[3] Saito, et al.: 13th European Conference on Applied Superconductivity (2017), 3EP1 20

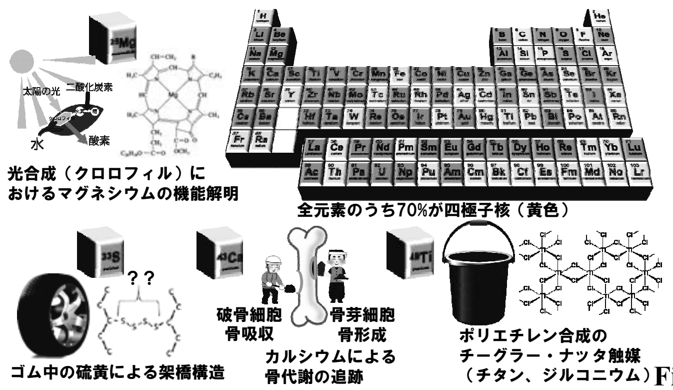


Fig. 1. Target materials of our development

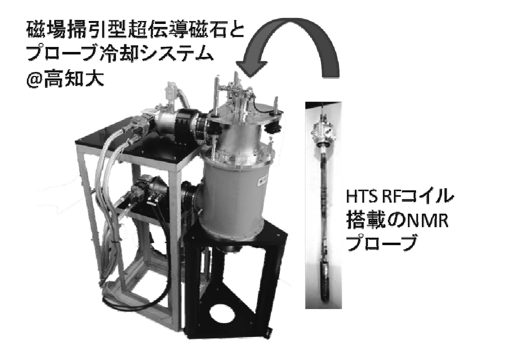


Fig. 2. Developed NMR probe and field-swept cryogen-free superconducting magnet

P100 高温超電導RFコイルによる四極子核NMRプローブの開発(2) ーRFコイルのQ値向上と測定試料の大容量化ー

○加藤翔太[1]，トリトラカーンテシット[1]，岡村哲至[1]，高橋雅人[2]，入江晃太朗[3]，星晴貴[3]，齊藤敦[3]，山田和彦[4]
1 東京工業大学・工学院
2 理化学研究所・放射光科学研究センター
3 山形大学大学院・理工学研究科
4 高知大学・教育研究部

NMR Probe for Quadrupolar Nuclei Using High-Temperature Superconducting RF Coils (2): High Quality-factor RF Coils with Large Volume Sample

○Shota Kato [1], Techit Tritrakarn[1], Tetsuji Okamura[1], Masato Takahashi[2], Kotaro Irie[3], Haruki Hoshi[3], Atsushi Saito[3], Kazuhiko Yamada[4]
1 School of Engineering, Tokyo Institute of Technology
2 SPring-8 Center, RIKEN
3 Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University
4 Research and Education Faculty, Kochi University

We have developed a totally different NMR measurement method and a NMR probe to promote materials science. The probe with High-Temperature Superconductor (HTS) RF coils has been developed. HTS RF coils are expected to have higher Quality Factor (Q), which leads higher sensitivity due to HTS's much less surface resistance. The factors that decrease Q such as eddy current loss and dielectric loss should be avoided in the probe, because Q is defined as a value that total stored magnetic energy of RF coils divided by total energy loss. The materials and shape of HTS support structure were carefully considered and designed using electromagnetic field simulators. The sensitivity of HTS RF coils have been 6.6 times larger than copper RF coils of the same shape, at the same temperature, 9 K (^{79}Br in KBr powder).

［序論］

本研究ではこれまでとは全く異なるNMR装置・方法で、四極子核を含む構造の解明を通じて材料開発に貢献することを目的としている（概要は同題目（１）を参照）。装置に関しては、高温超電導アンテナ（HTS RFコイル）を始めとした超高感度な信号検出部を有するプローブを開発中である。

HTS RFコイルは高周波における電気抵抗（表面抵抗）が銅と比較してかなり小さいためQ値が向上する［1］。Q値はRFコイルに蓄積される磁場エネルギーを損失エネルギーで割った値であり、この値が高いほど高性能なプローブといえる。ただし損失エネルギーには、渦

RFコイル、四極子核、高温超電導

○かとうしょうた、とりとらかーんてしっと、おかむらてつじ、たかはしまさと、いりえこうたろう、ほしはるき、さいとうあつし、やまだかずひこ

電流損失や誘電損失などの周囲の影響も含むため、HTS RFコイルの支持構造はこれらの影響が小さい材料や形状にする必要がある。HTS RFコイルの高い感度の実証のため、電磁界シミュレーションによる検討を行った後、支持構造を作成した（Fig.1）。

今回のような場合、溶液NMRやMAS NMRのような試料管サイズの制約がない。よって基板型のHTS RFコイルに合わせて試料管の形状・大きさを変更し、フィリングファクター・試料容積の向上も図っている（Fig.2）。

［実験結果］

KBr粉末中の^{79}Brについて固体NMRを行った結果、9 Kの時のHTS RFコイルは同形状・同温度のCu RFコイルの約6.6倍の感度となった（Fig.3）。よってRFコイルの高性能化により感度が向上することが示された。また、この結果は室温のCu RFコイルからすると11.3倍の感度向上に相当するものであり、プロジェクト目標を達成した。

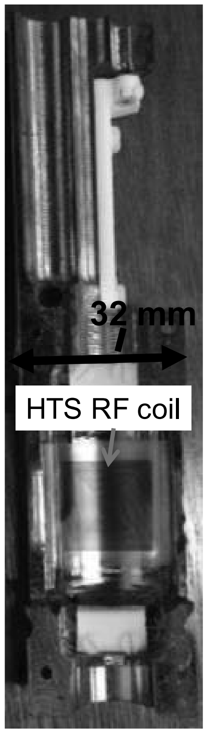


Fig. 1: HTS support structure

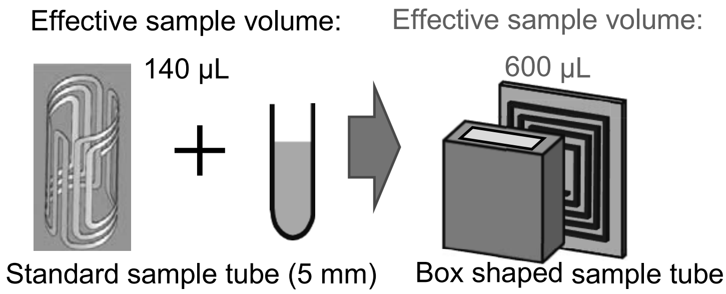


Fig.2: Optimizing sample tube's size and shape

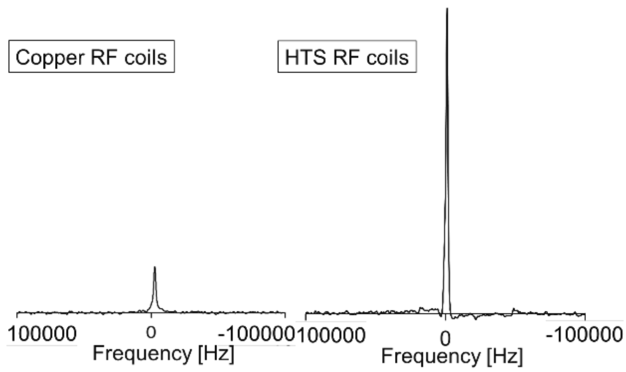


Fig.3: ^{79}Br NMR spectra of KBr powder

Reference

[1] K. Koshita, K. Kitajima, T. Yamada, M. Takahashi, H. Maeda, A. Saito, and S. Ohshima, Development of HTS Pickup Coils for 700-MHz NMR: Resonance Frequency Tuning Using a Sapphire Plate, IEEE Trans. Appl. Supercond., Vol. 26, No. 3, pp. 1500104, (2016)

キーワード検索
著者検索

Keyword Index
Author Index

キーワード索引

数字

アルファベット

A

B

C

D

E

F

G

H

I

K

L

M

N

P

著者検索
アルファベット

A

B

C

D

E

F

G

H

O

R

S

Z

五十音順

あ

い

う

え

お

か

2018年9月3日発行
Published on 3rd September 2018

第57回 NMR 討論会（2018）

会　　期：2018年9月18日（火）～ 20日（木）
18-20 September 2018
会　　場：札幌コンベンションセンター
Sapporo Convention Center
〒060-0006　札幌市白石区東札幌6条1丁目
編集･発行：第57回NMR討論会事務局
〒060-0003　札幌市中央区北3条西2丁目 日通札幌ビル6F
㈱近畿日本ツーリスト北海道北海道DM支店 MICEセンター
Tel：011-280-8855　Fax：011-221-5491
E-mail：s-convention-1@or.knt-h.co.jp

協賛企業･団体

NMR共用プラットフォーム

株式会社アフィニティサイエンス

ウェイブファンクション･インク日本支店

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

株式会社システムプラス

昭光サイエンス株式会社

大陽日酸株式会社

日本カンタム･デザイン株式会社

日本電子株式会社

株式会社ビジコムジャパン

ブルカージャパン株式会社

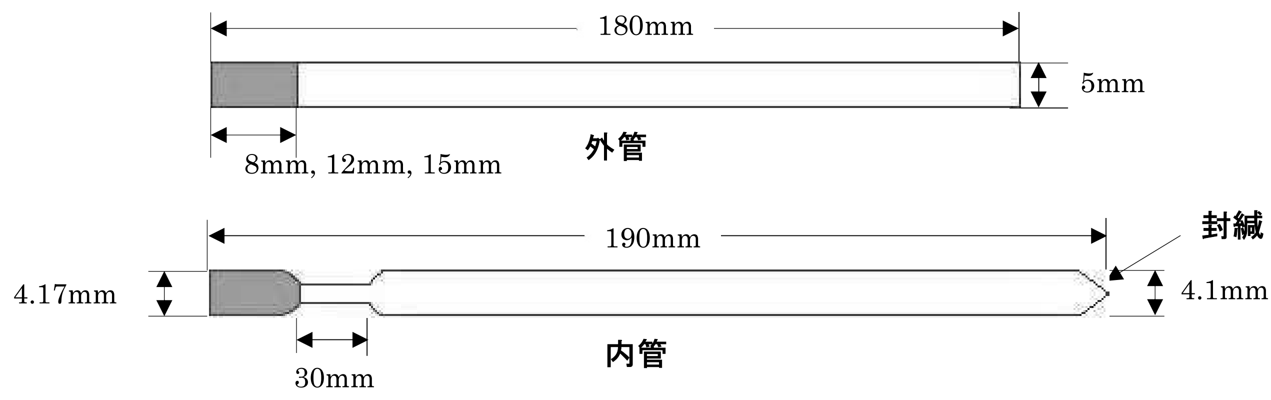
株式会社フレックス

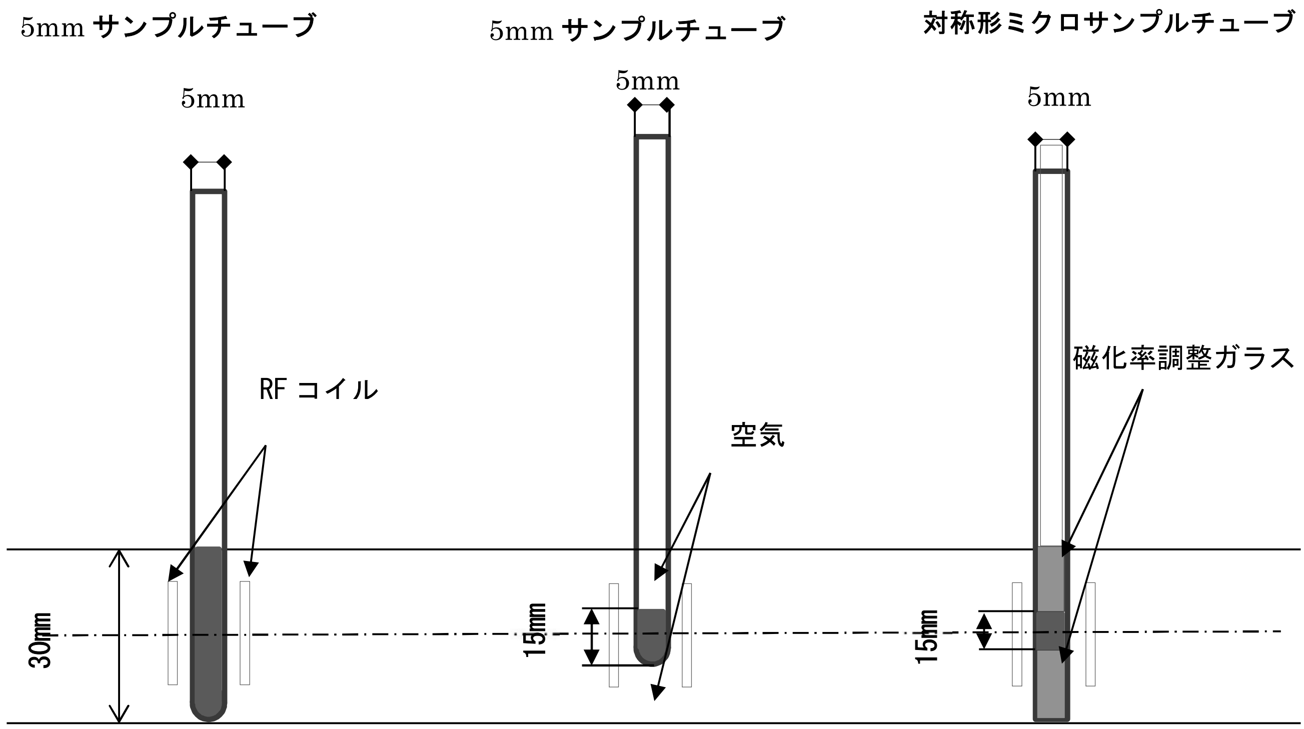
北海道和光純薬株式会社

北海道大学･先端NMRファシリティ

（敬称略、五十音順、8月24日現在）

Aceton-d_6用対称形ミクロサンプルチューブ





5mmφ用プローブでの測定例

5mmφサンプルチューブにシムが十分調整可能な液高に注入。	5mmφサンプルチューブに濃度を上げるために溶媒を減らしたが、液高が低いためシム調整できない。	5mmφ対称ミクロ形サンプルチューブに5mmφサンプルチューブの半分の量注入。シム調整問題なし。
液高：30mm	液高：15mm	液高：15mm
量：410μL	量：210μL	量：210μL

2.5mm・3mm・5mm・8mm・10mm のラインアップがあります。

平成２１年度「日本化学会科学有効賞」受賞製品

電話　042-624-2207
FAX　042-622-0937

株式会社　シゲミ

http://www.shigemi.co.jp
mail:shigemi-corp@nifty.com

無細胞タンパク質合成キット
Cell-Free Protein Expression Kit

理化学研究所の高度な無細胞タンパク質合成技術をキット化いたしました。
大腸菌抽出液を用いており、抗体や膜タンパク質などをはじめ各種タンパク質を迅速・簡便に大量合成し、高効率に安定同位体標識できます。

無細胞くん® Start

Coming Soon !

タンパク質合成キット
無細胞くん® Start

■ 無細胞くんStart 特徴

発現量や可溶性の確認および条件検討用に小スケール反応を複数回行うための試薬、小型透析カップを含んでおります。無細胞くんSIキットをご使用される前に、無細胞タンパク質合成反応をお手軽にお試しいただけます。各種安定同位体標識アミノ酸（別売）と組み合わせてご使用いただくことで安定同位体標識タンパク質を合成できます。

ご興味のある方は、お気軽にお問合せください。

製品名	数量	希望納入価格（円）
無細胞くんStart	1キット	28,000

無細胞くん®

■ 無細胞くんSI SS 特徴

SS結合を持つ抗体やサイトカインなどの分泌系タンパク質合成専用キットです。任意の酸化条件を選択可能で、ジスルフィドイソメラーゼを含みます。

■ 無細胞くんSI 特徴

大量合成用のキットです。16時間でCATタンパク質を1キットにつき、約5mg合成できます。

製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格（円）
A89-0126	無細胞くんSI SS	1キット（1mL反応×1回分）	−80℃	65,000
A29-0059	無細胞くんSI	1キット（1mL反応×1回分）	−80℃	55,000

■ ご使用方法：テンプレートDNAとしては、T7プロモーターとリボソーム結合部位を含む市販のベクターに目的タンパク質の遺伝子をクローニングしたものを用います。
また、PCRで調製した直鎖状DNAもご使用いただけます。詳しくは弊社までお問合せください。

国立研究開発法人 科学技術振興機構「産学共同シーズイノベーション化事業」の支援を受け、開発された製品です。

無細胞くん用 安定同位体標識アミノ酸

■SAIL メチル・芳香族選択標識

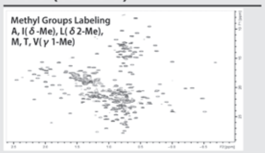
製品番号	製品名	数量	希望納入価格（円）
SAT2001	SAIL アミノ酸混合物水溶液	1mL	220,000
G07-0226	[δ2-^{13}CH$_3$;^{2}H]Leu+[γ1-^{13}CH$_3$;^{2}H]Val＋18種重水素標識アミノ酸	1mL	120,000

■各種安定同位体標識アミノ酸

製品番号	製品名	数量	希望納入価格（円）
A107-0144	アミノ酸混合物水溶液-UL-d	1mL	25,000
A39-0072	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{15}N	1mL	15,000
A41-0074	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{15}N,d	1mL	18,000
A40-0073	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{13}C,^{15}N	1mL	30,000
A42-0075	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{13}C,^{15}N,d	1mL	35,000
A91-0128	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Arg-UL-^{13}C,^{15}N	1mL	20,000
A92-0129	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Leu-UL-^{13}C,^{15}N	1mL	20,000
A108-0145	アミノ酸混合物水溶液-SeMet	1mL	12,000
20種類のアミノ酸を含有しております。			

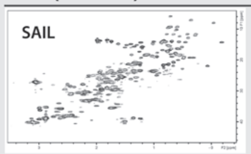
NMRスペクトル

MSG (82 kDa)



^{1}H-^{13}C HMQC spectrum (900 MHz)

RAS (22 kDa)

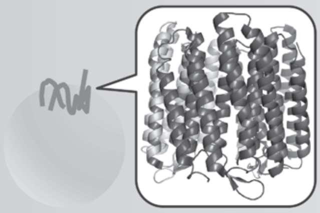


^{1}H-^{13}C ct-HSQC spectrum (400 MHz)

Sample Prepared by 1 Cell-Free kit

ご提供：国立大学法人 名古屋大学殿

New! 無細胞くん用 膜タンパク質合成用試薬



■ 特徴

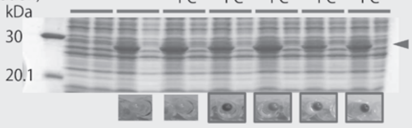
膜タンパク質を発現しプロテオリポソームを形成するための界面活性剤・脂質サプリメントです。

製品名	数量	希望納入価格（円）
膜タンパク質合成用脂質溶液	1キット	30,000

発現例

Bacteriorhodopsin

Template DNA	No DNA		Bacteriorhodopsin				
Detergent (Internal solution)	−	−	−	Cho	CHA	Dig	Dch
Lipid (Internal solution)	−	−	PC	PC	PC	PC	PC



Purplish brown color represents proper folding of Bacteriorhodopsin.
PC,L-α-Phosphatidylcholine; Cho, Cholate; CHA, CHAPS; Dig, Digitonin; Dch, Deoxycholate; Left lanes, total; Right lanes, supernatant

大陽日酸
The Gas Professionals

大陽日酸株式会社 SI事業部
〒142-8558 東京都品川区小山1-3-26 東洋Bldg.
Tel.03-5788-8550（代表） Fax.03-5788-8710
●資料のご請求は、大陽日酸までお気軽にご用命ください。
メールアドレス Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
ホームページアドレス https://stableisotope.tn-sanso.co.jp

ISOTEC™
A MEMBER OF THE SIGMA-ALDRICH FAMILY
SAIL TECHNOLOGIES

北海道大学・先端NMRファシリティは、先端生命科学研究院・次世代物質生命科学研究センターに設置された800MHzの溶液NMR装置を中心とする生体高分子・材料等の高度な解析技術を特徴とする研究施設と、理学研究院・高分解能NMR研究室に設置され600MHzの溶液、固体NMR装置による材料・食料・地域資源・環境など幅広い分野の測定に対応する研究施設から構成されています。

北海道大学 先端NMR ファシリティ

-NMR装置群-

800MHz溶液NMR装置　2台
600MHz溶液NMR装置　3台
600MHz固体NMR装置　1台
500MHz溶液NMR装置　2台

-利用形態-

◆NMR-PF最先端利用開発利用
◆北大オリジナル課題型共用事業
・トライアル(無償・成果公開)
・成果非占有(有償・成果公開)
・占有利用(有償・成果非公開)
◆北大オープンファシリティ利用
(受託測定あり)

■利用に関するご相談は・・・

北大先端NMRファシリティ
nmrfacility@mail.sci.hokudai.ac.jp
http://altair.sci.hokudai.ac.jp/facility/nmr/index
https://aces.gfc.hokudai.ac.jp/future/sky/smou/

謝　辞

若手ポスター賞に関しまして、今年度も、株式会社JEOL RESONANCEよりJEOL RESONANCE賞と大陽日酸株式会社より大陽日酸賞を設けていただきました。

ご支援賜りましたこと、心より御礼申し上げます。

文部科学省
先端研究基盤共用促進事業（共用プラットフォーム形成支援プログラム）

NMR共用プラットフォーム ご利用案内

**NMR共用プラットフォームでは、参画機関が保有する
NMR装置を産業界・アカデミアに開放しています。**

シンポジウムを開催します

「NMR共用プラットフォームシンポジウム2018」
日時：２０１８年１０月１６日（火）午前１０～１２時
場所：日本橋ライフサイエンスハブ

最先端のNMR装置を利用した測定技術や利用の
成功事例を紹介いたします。

詳細はWebサイトをご覧ください
URL： http://nmrpf.jp/

◆ご利用前の相談も随時、承ります。

NMR共用プラットフォーム　検索

"最先端"装置・技術を核として、"開発"と"利用"を橋渡しし、"知"を蓄え"人"を育てます

日本のNMR研究開発の持続的な維持・発展を先導する技術プラットフォームとなることを目指します。
理化学研究所、横浜市立大学、大阪大学、北海道大学の４機関がプラットフォームを構築し、先端的なNMR設備を産官学の皆様に広くご利用いただくことを目的としています。

**NMRのプロフェッショナルが
豊富な経験に基づいて、皆様の研究をサポートいたします。**

◇NMR施設紹介（装置一例） この他にも多種多様なNMR装置、NMRプローブを取り揃えております。

理化学研究所

世界最大規模のNMR装置集積台数を誇り、溶液・固体NMRにおけるアクセサリーの充実とNMR立体構造解析パイプラインで多様な試料測定に対応可能。


600MHz溶液NMR
DCH ^{13}C高感度測定


900MHz固体NMR
高速MAS


NMR立体構造解析
パイプライン

横浜市立大学

世界最高レベルの共用装置：通常の溶液NMRに加えてLC-NMR、固体NMR、オートサンプラー測定により多くの企業の成果に活用された豊富な実績。


950MHz溶液NMR、
LC-NMR、固体NMR


800MHz溶液NMR
最大480本オートサンプラー


700MHz溶液LC-NMR
最大60本オートサンプラー

大阪大学

950MHz溶液NMRや700MHz固体DNP-NMRなど世界最大級・世界最高性能の装置群で、装置開発から創薬まで幅広くサポート。


700MHzDNP固体NMR
高速MAS


950MHz溶液NMR


400MHz溶液NMR
^{19}Fスクリーニング

北海道大学

北日本最大のNMR施設として研究・産業分野の幅広いNMR測定のニーズに答えます。


800MHz溶液NMR
ランタニドプローブ


600MHz固体NMR
高速MAS、FG-MAS


装置実習、
教育プログラム

参画機関
◎代表機関　国立研究開発法人理化学研究所
○実施機関　公立大学法人横浜市立大学
　　　　　　国立大学法人大阪大学
　　　　　　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

NMR共用プラットフォームポータルサイト
URL： http://nmrpf.jp/