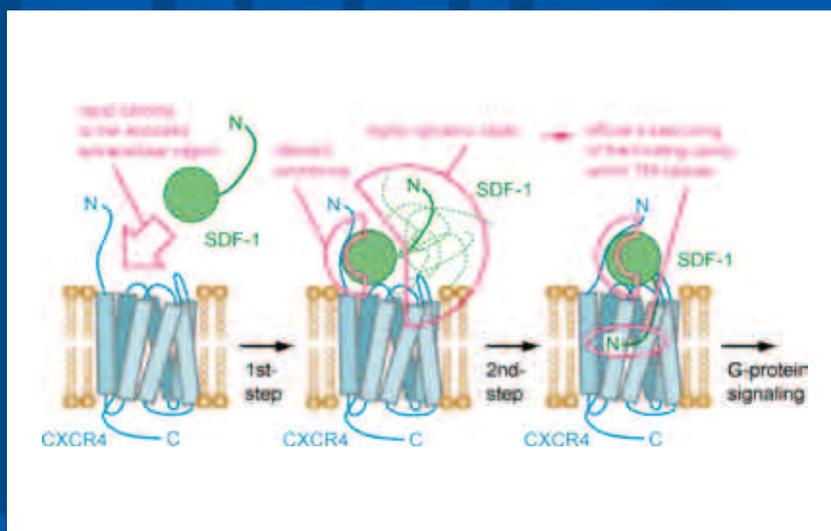


VAP-A に対する OSBP ペプチドの滴定実験



SDF-1 と CXCR4 の二段階結合の模式図

表紙の図

(上段)：NMR滴定実験と蛋白質の化学修飾 (Fig.2)

大阪大学蛋白質研究所 古板恭子、服部良一、児嶋長次郎

(下段)：膜タンパク質のNMR解析までの道 (Fig.4)

東京大学大学院薬学系研究科 上田卓見、幸福 裕、吉浦知絵、嶋田一夫

NMR

BULLETIN OF THE NUCLEAR
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN

Vol. **4**

October 2013

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

CONTENTS

会長メッセージ

1. NMR学会の試み 5
朝倉 哲郎

巻頭エッセイ

1. F_0F_1 ATP合成酵素はなぜ回る? 6
阿久津 秀雄
2. 追 想 8
平沖 敏文

解 説

1. 化学シフトデータの主成分解析による、蛋白質状態変化の洞察10
櫻井 一正
2. 蛋白質のNMR：緩和データ解析における誤差評価20
伊島 理枝子

トピックス

1. 多核固体NMRの方法—基礎から最新情報まで、四極子核を中心として—26
高橋 利和
2. 膜タンパク質のNMR解析までの道37
上田 卓見、幸福 裕、吉浦 知絵、嶋田 一夫

若手ポスター賞受賞講演

若手ポスター賞I受賞講演

1. 第51回NMR討論会若手ポスター賞について44
2. デュアルレシーバシステムを用いた同種核及び異種核間2次元相関 covariance NMR48
日下部 寧、野田 泰斗、福地 将志、武田 和行、竹腰 清乃理
3. β_2 -アドレナリン受容体の efficacy 決定機構の解明52
幸福 裕、上田 卓見、奥出 順也、白石 勇太郎、近藤 啓太、前田 正洋、辻下 英樹、嶋田 一夫
4. Large amplitude interface dynamics in FKBP-ligand complexes revealed by the aromatic ring flipping and hydroxyl proton exchange rates for the interfacial tyrosine residues56
Chun-Jiun Yang, Mitsuhiro Takeda, JunGoo Jee, Akira M. Ono, Tsutomu Terauchi, Masatsune Kainosho
5. ユビキチンの高エネルギー状態 N_2 の立体構造解明58
北沢 創一郎、亀田 倫史、矢木 真穂、菅瀬 謙治、Nicky Baxter、
加藤 晃一、Williamson Michael P、北原 亮
6. 生体分子の 1H 精密位置決定
~超高速MASIH固体NMRによる 1H DQMAS測定とGIPAW化学シフト計算~60
矢澤 宏次、鈴木 不律、西山 裕介、西村 勝之、梶 弘典、朝倉 哲郎
7. NMRを用いた定量的元素分析64
一条 直規、武田 和行、野田 泰斗、竹腰 清乃理

若手ポスター賞II受賞講演

8. 固体NMRによるセメント硬化体の化学構造および水和・硬化プロセスの解析68
高橋 貴文、古瀬 佑馬、大窪 貴洋、金橋 康二
9. 緩和分散差スペクトル法による混みあったNMRスペクトルの緩和分散データの解析72
小沼 剛、菅瀬 謙治
10. 半導体レジスト用モデルポリマーの脱保護による分子運動性変化74
相見 敬太郎、鈴木 真由美、西山 文之、西川 尚之
11. ポリ乳酸の物性を左右する立体規則性とそのNMRピークの起源76
菅沼 こと、堀内 健、松田 裕生、右手 浩一、朝倉 哲郎

NMR基礎講座

1. 交差相関緩和の基礎原理とTROSYなど生体高分子への応用80
池上 貴久
2. 固体NMRおよびGIPAW計算によるAlq₃結晶構造の解析87
鈴木 不律、梶 弘典
3. NMR滴定実験と蛋白質の化学修飾93
古板 恭子、服部 良一、児嶋 長次郎

NMR史点描

1. Gorterの失敗(中)99
寺尾 武彦

海外学会報告

1. 若手研究者渡航費助成金について 102
2. 若手研究者渡航費助成金 15th ICRP参加報告書 104
宮佐 亮太

技術レポート

1. 高速サンプリングの展開 106
芦田 淳、栗田 順一
2. 高磁場DNP装置の開発 113
藤原 敏道

NMR便利帳

1. 高分解能固体MAS NMRにおける効率的なシム調整法 117
西山 裕介
2. ビッグデータ時代の生体高分子NMRデータベース、BioMagResBank (BMRB)
その有効利用とわが国における現状 121
小林 直宏

NMR研究室便り

1. 京都大学理学部 分子構造化学研究室(竹腰研究室) 125
野田 泰斗
2. 味の素株式会社 イノベーション研究所 128
五十嵐 俊介

若手NMR研究会報告

1. 京都トラベラーズ・インで開催された第14回若手NMR研究会便り 131
神庭 圭佑

NMR学会よりのお知らせ

1. NMR学会の決定事項 136
2. 2013年度第52回NMR討論会 138
3. ニュースレターの記録 141
4. 日本核磁気共鳴学会規約 147
5. 日本核磁気共鳴学会機関誌「NMR」投稿規程 151
6. 賛助会員名簿 153
7. 学会機関誌編集委員名簿(2012、2013年度) 153
8. 編集後記 154

NMR学会の試み

日本核磁気共鳴学会会長

朝倉 哲郎

日本核磁気共鳴学会 (The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan) は、2001年11月15日に総会で議決・設立されてから、13年経とうとしております。そこで、これまで実施してきた事業に加え、今後、さらに、どのような事業を行っていったら良いのか、理事、評議員の方はもとより、会員の皆様と、あらためて考えていきたいと思っております。

学会の会則の第2条には、核磁気共鳴に関する基礎・応用研究、ならびに啓蒙・教育活動を推進し、我が国における核磁気共鳴研究の発展に寄与することを目的とすること、第3条には、学術集会の開催、会報の発行、その他前条の目的を達成するために必要な事業を行うと記載されています。

学会発足の母体となったNMR討論会は、今年で52回を数えます。今年は金沢大学の水野先生が世話人の労をとられますが、いつものように、NMRに関する基礎と応用の分野で多岐にわたる多くの発表がなされることと思っております。個人的には、若手ポスター賞Iに加えて昨年より発足した若手ポスター賞IIの応募者の発表やNMRの利点を生かした、なるほど、と唸るような発表に出会えることを楽しみにしています。

NMR討論会に初めて参加することになったころ、当時、味の素(株)におられた甲斐荘先生が、アオキの実を直接NMR管に入れて ^{13}C NMRを測定、驚くほど高分解能のスペクトルを発表されたり、北大の下川先生が、マウスを直接、35mm試料管に入れて、身づくろいをさせながら、 ^1H NMRを測定するなど、面白いNMR研究が次々と発表され、今後のNMR研究の広がりを感じながら、送付されてきた次のNMR討論会の要旨集を開けるのが大きな楽しみでした。

さて、NMR学会の国際的な貢献の観点から、日本が招致するNMR関連の大きな国際会議として、

第27回生体系磁気共鳴国際会議(ICMRBS2016)が2016年、京都国際会館で開催される予定です。是非、皆様と一緒に、盛り上げていきたいと思っております。また、会報の発行につきましては、ホームページ、NMRニューズレターが充実するとともに、機関誌NMRが発行され、今年で4年(4巻)を迎えました。横浜国大の内藤編集委員長の下、多くの編集委員が尽力され、執筆者各位のご協力によって充実した内容となっています。是非、読んでいただきたいと思っております。

ところで、会則に“啓蒙・教育活動を推進し”、とありますが、残念ながら、一般社会でのNMRの認知度は極めて低いと言わざるを得ません。むしろ、医療機器として知られているMRIの方が、圧倒的に認知度は高いでしょう。例えば、これからの世代を担う中学生、高校生に、なんとか、NMRを知ってもらい、興味を持ってもらう、すべはないでしょうか。会員諸氏のお知恵を拝借できればと思っております。

現在、教育活動の一環として、NMR学会主催の講座の開設を検討しています。学会は、これまでNMR討論会の前日に、チュートリアルコースを併設してきました。非常に好評で今年の討論会でも行われます。さらに、NMRの測定や研究を開始された方を対象とした基礎講座とNMR討論会参加者のフォローアップとしての応用講座を、討論会から半年後を目処に開設、特に、応用講座では、前年のNMR討論会で発表された最新の研究例の中で会員の要望の高い内容を盛り込む等、NMR討論会とリンクした企画を考えています。

皆様の忌憚のないご意見をお寄せいただければ幸いです。

2013年秋

F₀F₁ ATP合成酵素はなぜ回る？

大阪大学蛋白質研究所

阿久津 秀雄

H⁺-駆動F₀F₁ ATP合成酵素に取り組み始めて20年以上経つ。歩みは遅々たるものであるが、興味は尽きない。本酵素は生物界で最も広くエネルギー変換にかかわっており、水相に突き出しているF₁と生体膜に埋まっているF₀から構成される、分子量50万以上の比較的大きな膜タンパク質複合体である(図)。Walkerらが報告したF₁中の $\alpha_3\beta_3\gamma$ の結晶構造によると触媒サブユニットである β はAMPPNP/ADP結合型ではopen構造をとり非結合型ではclosed構造をとっていた。またATPの加水分解に伴って $\alpha_3\beta_3$ を貫く軸となっている γ が回転することを吉田、木下らが報告した。この回転のメカニズムはATP/ADP結合時におこる β サブユニットの構造変化が γ サブユニットとの相互作用を順次変化させるソフトな分子間相互作用によるものと考えられる。われわれはここにおけるエネルギー変換のメカニズムをNMRにより明らかにすべく、以下のように研究を進めてきた。

1. エネルギー変換システムの全容を明らかにするための研究戦略

われわれの興味は本酵素によるエネルギー変換メカニズムから始まった。しかし、本酵素の回転が明らかになった時点で、われわれの問いは「なぜ回る？」というものに集約された。問いは単純である

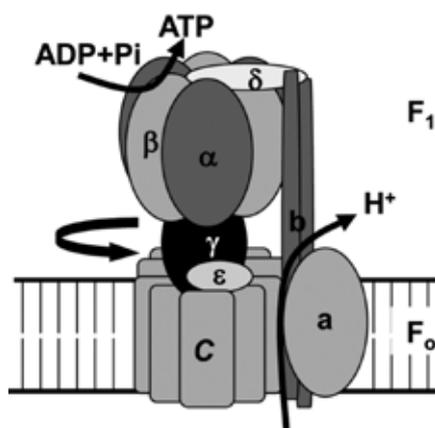


図 Bacterial F₀F₁ ATPsynthase

が、答えるのは簡単ではない。勿論、その答えはいろいろな方法の組み合わせによって明らかにされるものである。その中でNMRは何ができるか。NMRは構造と機能を結び付ける研究に特徴がある。しかし、本酵素はNMRにとっては巨大なタンパク質複合体である。基本戦略は「サブユニットから複合体へ」、「可溶性タンパク質は溶液NMRで、膜タンパク質は固体NMRで攻める」であった。吉田賢右研究室との密接な共同研究も重要な要素である。

2. β サブユニット触媒カルボン酸のpKaは？

スタート時は400 MHzのNMR装置を用いての挑戦であった。まず注目したのはATP合成触媒部位を持つ β サブユニットである。この単量体は水溶性であるが、分子量は52000である。 β にはCysがなかったので触媒部位と考えられていたGlu190をCysに置き換えて、カルボキシメチル化することにより選択的¹³C標識を達成した。そのシグナルのpH滴定によりpKaを6.8と決定した。

3. γ サブユニット回転の駆動力は何か？

β サブユニットの構造変化の研究はTyr環プロトンの選択的解析に始まる。800 MHz装置が使えるようになり、均一標識した β の骨格¹⁵Nの解析が可能になった。特に、山崎俊夫博士との共同研究でおこなわれたインテインによる区分標識は大きなタンパク質解析の強力な方法となった。当時、F₁の結晶構造で見出されたopen型とclosed型の間での構造変換を引き起こすメカニズムが問題になっていた。われわれは区分標識と残余双極子結合(RDC)を用いてATP/ADPの結合が β 単量体のopen型からclosed型への構造変化を引き起こすことを証明した。即ち、F₁で γ を回転させる β の構造変化が核酸の結合によって駆動されることが明らかになった。また、われわれはATPとADPで誘起されるclosed構造に違いがあることを見出し、ADP結合型が結晶中のclosed構造と一致することを示した。

ATP型は励起状態の構造に近いというのがわれわれの提案であった。

4. 溶液中の F_1 における β サブユニットの構造は？

単量体で見出された性質が本当に活性複合体である F_1 中で実現しているのかは回転を考える上で重要な問題である。しかし、 F_1 は 380 kDa あり、解析は容易ではない。そこで、区分標識した β を F_1 に再構成して解析を行った。その結果、結晶構造にあたるタイプの F_1 で、 β は単量体の open と ADP 結合型 closed の構造をとっていることが確認された。

5. どのようにして ϵ サブユニットは F_1 回転のブレーキとして働くか？

ϵ サブユニットは ATP の浪費を防ぐために ATP 濃度が下がるとブレーキとして働く。好熱菌 ϵ は特に ATP への親和性が高い。そこで ATP 存在下および非存在下での構造を調べると前者では折りたたまれた構造を、後者では伸びた構造をとることが明らかになり、ブレーキとして働く構造基盤が明らかになった。

6. F_0 における c サブユニットリング回転のメカニズムは？

回転のメカニズムを知るためには F_0 におけるプロトン移動と c -リングの関係を知る必要がある。親水的な F_1 の研究は非常に進んでいるが、疎水的な F_0 の研究は遅れている。そこでわれわれは基本戦略にしたがって、まず有機溶媒中での好熱菌 c -サブユニット単体の構造を決定した。これは既に決定されていた大腸菌の構造とそれに基づく c -リング回転のモデルと一致しなかった。そこで、固体 NMR を使って c -リング構造を調べる必要があると考えた。まず、大腸菌の c -サブユニットを合成し、リングを脂質膜中に再構成させた。この際、大腸菌中で均一 ^{13}C 標識したものと、化学合成により活性部位のみを選択標識した c -サブユニットを用いた。固体 NMR による解析の結果、上記のリングモデルと一致しないことが確認された。全面的な解析には安定性の高いものが適しているため、好熱菌の c -リングを使ってさらに研究を進めた。コムギ胚芽無細胞系による SAIL アミノ酸の導入は優れた分解能のスペクトルを実現し、リング活性部位の解析を可能にした。この結果、必須カルボン酸によるプロトンのリング内固定化法には 2 種類あることが示唆された。固体 NMR による全構造の決定を目指して、さまざまな部分標識体を合成し、 ^{13}C シグナルの帰属と構造情報の集積を進めて来た。そろそろまとめに入りたいと思っている。



阿久津秀雄 (あくつ・ひでお)

1967年 東京大学理学部卒業
 1972年 東京大学理学系研究科単位修得退学
 1972年 大阪大学蛋白質研究所助手
 1978～1980年 スイスバーゼル大学留学
 1985年 横浜国立大学工学部助教授
 1991年 横浜国立大学工学部教授
 2000年 大阪大学蛋白質研究所教授
 2002年 日本核磁気共鳴学会会員
 2007年 大阪大学名誉教授・客員教授
 2009～2013年 韓国ソウル大学 WCU 教授 (併任)
 現在に至る

追 想

北海道大学工学研究院

平沖 敏文

卒業研究でNMRに触れて以来今日までNMRとラセン高分子を中心に研究を行ってきました。電磁石から超伝導磁石へ、CW法からFT法へとハード・ソフト両面の過渡期とその後の急速な発展に立ち会えたことは真に幸運でした。この幸せをかみしめながら、筆者のささやかなNMR遍歴を紹介いたします。

思い起こせば大学2年生の時、たまたま生協書店の本棚でSlichterの「磁気共鳴の原理」(第1版)を手に入れました。もちろん理解できるわけではなく、扉に著者近影が大きく掲載されていたので記憶に残りました。後にこれを学ぶことになろうとは思いませんでした。

電磁石を共有したNMR/ESRハイブリッド装置で広幅 ^1H -NMR (CW, 12 MHz) をもちいた生体高分子の水和と分子運動との関係を調べることが、引地邦男・堤耀広両先生の指導のもと、卒業研究の課題でした。-100°Cでも高分子には局所運動が存在し、水化した水分子の一部も引きずられて動くという結果でした。大学院では高分解能NMR (CW) でコポリアミノ酸のヘリックス-コイル転移と側鎖間磁氣的相互作用を調べました。学内の共同利用装置 (60・100 MHz) を借り歩きましたが、測定時間の制限のためなかなか実験がすすみませんでした。この間にPople/Schneider/BernsteinとAbragamの本をセミナーで四苦八苦して読んだことが今も役立っています。博士課程の最後の年にやっとFT-NMR装置 (^1H , 60 MHz) が入り、 ^1H 、 ^{13}C 、 $^1\text{H}_2\text{O}$ の緩和時間をひたすら測定して、ポリグルタミン酸-常磁性金属イオン錯体に関する研究を学位論文として提出できました。この時、隣室の先生が、高価なおモチャで研究しているのだから良いデータを出しなさいと励ましてくれたことを思い出します。

この後、引地研究室の助手に採用され、高分子-常磁性金属イオン系の研究を継続しているときに、北大で開催された第19回NMR討論会 (1980)

に初参加し、ポリ-L-オルニチン-Cu (II) 常磁性錯体のダイナミクスを発表しました。緩和時間の常磁性の寄与を求め、錯体構造や運動性を評価したものです。ここではA先生から厳しい質問を受けました。すでに本討論会では多くの低分子常磁性系の発表がなされていたのです。

1985年秋に、研究室を立ち上げたばかりのカナダ・カルガリー大学のH. J. Vogel教授のもとに赴き、金属イオン結合蛋白質を中心に研究しました。最新鋭の400 MHz装置のFFTの速さに驚き、いろいろなパルス系列を試し、今では当たり前的高速ネットワークを用いて効率的にデータを出力することができました。電子回路のパーツには民生用と軍用用の2種類あり、特にFFTの高速演算に使うarray-processorは軍用が高い信頼性を持つことを知りました。Vogel教授の厚意により北米での幾つかの国際学会に参加する機会も得ました。なかでも1987年のENCに初参加したときにはNMRの巨人たちを目の前にして大きな刺激を受けました。Ernst・Wuethrich両先生が昼下がりのポスター会場で一つ一つポスターを眺められていたことが強く印象に残っています。

2年弱のカナダ滞後に北大工学部の堤研究室に移りました。幸い、共同利用施設に最新鋭の固体NMR装置が入ったので、固体NMRの研究も始めました。部位選択的に重水素化したポリアミノ酸を化学合成し、固体重水素NMRにより、スペクトルの線形・緩和時間・エコー強度等から主鎖の運動や側鎖のガラス様転移と分子運動の関係を求めました。この測定のために90度パルス巾が約1.5 μs のコイルを自作し、多くの試料の測定を行うことができました。

重水素の緩和時間が四極子相互作用に支配されるので、棒状高分子のゾルーゲル転移を重水素化溶媒から調べました。この系の高分子をメーカー提供の固体・液体プローブで高分解能測定することは、高分子の分子運動の速さを考慮すると困難

だったので、溶液用プローブを用いて溶媒の重水素緩和時間を調べました。架橋した高分子と溶媒からなるゲル状態と孤立高分子と溶媒からなるゾル状態において、高分子に溶媒和した溶媒とバルクな溶媒との遅い化学交換による項がゲル系では寄与するため、ゲルとゾル両状態で溶媒の T_2 が大きく異なります。溶媒の T_2 の温度依存性からゾル-ゲル転移の履歴現象、転移温度、熱力学量を得ることができ、ゲル化における速度論も調べることができました。

1989年に念願の固体NMR装置(7T)が研究室に入りました。ポリアミノ酸の研究以外に、選択的重水素化アミノ酸を組み込んだ蛋白質表面のダイナミクスを固体重水素NMRにより調べ、その運動モードと速さ、水和との関係を調べることができました。これらの量は重水素化残基すべての平均値であり、固体状態で残基ごとのダイナミクス情報を得ることが今後の課題です。この他、ポリアミノ酸が金属錯体を形成する時に生じる二次構造変化が金属種やそのイオン価数によって異なることを見出しました。もう一つは主鎖が共役しているポリアセチレン誘導体の構造も調べ始めました。側鎖エステル基の分岐の有無により主鎖構造が変化することが分かったのですが、その詳細は不明でした。

この数年は文科省ナノネット・ナノプラットの助成下にある分子科学研究所のECA 920MHz NMR装置を利用しています。超高磁場の利点を生かして様々ならせん高分子の動的構造を測定しました。

溶液状態でポリアセチレン誘導体主鎖には異なる構造が存在し、これらの中で遅いアコーディオン様の運動が存在し、さらに側鎖にも遅い内部回転が存在することが明らかになりました。これは高磁場のためシグナルが分離して観測できたためです。固体状態では、これらの異なる構造が共存するためシグナルがわずかに重なり、二次元に展開しても分離は困難でしたが、 ^1H - ^{13}C CPMAS HETCOR測定により主鎖から側鎖に沿ったスピン拡散を明らかにすることができました。又、MQMASプローブを用いて、ポリアミノ酸金属錯体の金属のMQMAS測定を行い、金属核のNMRパラメーターを得ることもできました。

最近、NMR装置の共用促進事業により最先端高磁場NMR装置を産学官の研究者が利用できるシステムができています。担当される皆さんはご苦労されるでしょうが、末端のユーザーにとっては真に喜ばしいことです。研究のレベルアップのみならず最先端の技術に触れることができ、新たな研究開発の芽となり得ます。単なる高磁場の分析装置にとどまらず、優れた解析機器として価値をもっと高める必要があるでしょう。

今改めて思うことは、一緒に仕事をしてきた学生や国内外の数多くの皆さんから有形無形の援助を受けて研究を続けることができました、ここに感謝申し上げます。さらに、超高磁場の測定に当たり分子科学研究所NMR委員会と技術職員の中野路子さんに深謝いたします。



平冲 敏文 (ひらおき・としふみ)

- 1973. 3 北海道大学理学部高分子学科卒業
- 1979. 3 北海道大学理学研究科修了、理学博士
- 1979. 7 北海道大学理学部助手
- 1985. 10 カルガリー大学 Research Associate
- 1987. 7 北海道大学工学部助教授
- 2002 日本核磁気共鳴学会会員
- 2013. 1 北海道大学工学研究院教授
- 2013. 4 北海道大学工学研究院特任教授

化学シフトデータの主成分解析による、 蛋白質状態変化の洞察

近畿大学先端技術総合研究所高圧力蛋白質研究センター

櫻井 一正

はじめに：

蛋白質研究における HSQC スペクトルの汎用性

^1H - ^{15}N HSQC スペクトルは蛋白質の NMR 測定に欠かせない測定法である。ご存知通り、このスペクトルは ^1H 核と ^{15}N 核の間の J 結合を介して磁化を移動させる測定であるため、 ^1H - ^{15}N 結合を持つペプチド結合は一つ当たり一つのシグナルを示す。これが蛋白質分子内に遍在する理想的なプローブとなる。

^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの優れたところは、直観的な分かりやすさである。各シグナルの位置の変化 (化学シフト摂動: $\Delta\delta$) や強度変化は対応する残基の周辺環境を敏感に反映するため、これらの変化を比較的簡便に解析するだけで、多くの情報を得ることができる。例えばリガンド滴定を行い大きな化学シフト摂動を示した残基を立体構造上にマッピングすればリガンドの結合位置を推定できるし、重水素交換実験でシグナル強度減衰が遅い残基をマッピングするとどの残基が埋もれていたり二次構造を形成していたりするかが直観的に理解できる。それに比べて線形解析や緩和解析は、定量的で詳細な情報を得ることはできるが^[1,2]、得られる知見を理解するにはその裏に存在する NMR 的に“高度な”数学を理解せねばならず、普段 NMR に携わっていない人には敷居が高い。つまり、HSQC スペクトルの分かりやすさは、多くの研究者への NMR の門戸を広げ、利用の幅を広げるためのカギになると思う。

我々も HSQC シグナルの強度変化や化学シフト摂動を基に蛋白質の状態変化の研究を行ってきたが、その中で化学シフトデータの主成分解析を行った結果をいくつか報告した。この解析では“化学シフト (Chemical Shift)”データを“主成分解析 (Principal Component Analysis)”しているのですが、筆者はこの一連の解析を CS-PCA と呼んでいる^[3,4]。本稿ではその解析を行うに至ったいきさつと概念について述べたいと思う。

CS-PCA の必要性を感じたいきさつ

蛋白質間相互作用、および蛋白質-リガンド相互作用の研究では、滴定実験の HSQC スペクトル測定から得られた化学シフト摂動データの解析がよく行われる。もし解離会合の速度が十分速ければ (fast exchange regime)、 $\Delta\delta$ の大きさの滴定リガンド濃度依存性から、解離定数を決定できる。しかし複数の蛋白質やリガンドの結合サイトを持つ系の場合、化学シフト変化は複雑になり、解析も単純でなくなる。

筆者はこれまで、 β ラクトグロブリン (β LG) のリガンド結合や pH 依存的な構造変化を調べてきた。これらの現象を調べるための一環として HSQC スペクトルによる滴定実験を行ったところ、残基によっては滴定に伴いシグナル位置が曲線的に変化するのを見た (図1)。これは、これらの残基が複数の状態変化を経由していると解釈される。そこでどの残基がどの構造転移に関与しているかを整理して理解するのに、主成分解析が利用できるのではないかと考えたのである。

主成分解析の利用されている場面

そもそも主成分解析とは、多くの数のデータを含むデータ群から重要な情報を抽出するために用いられる多変量解析と呼ばれる数学的手法のひとつである。主成分解析は、膨大なデータからそのデータの変化やばらつきを説明する比較的少数の因子を見つけ出し、人に理解できるようなストーリーを抽出するための手法だと言える^[5]。

主成分解析は実は社会のいたるところで利用されている。例えば、入試模試結果の解析では、全ての受験生の得点データから、各受験生の得意不得意項目を調べるのに用いられていたり、スーパーやコンビニでは各商品の売り上げと客層の関係を解析し、商品の仕入れや陳列レイアウトなどにフィードバックするというにも利用されていたりする。

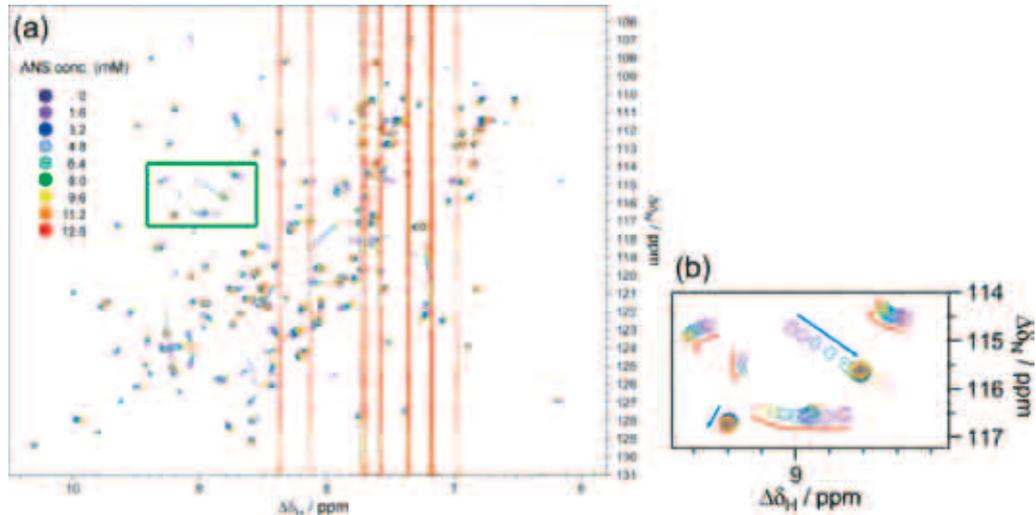


図1 蛋白質が複数の状態を経由する場合の滴定実験のHSQCスペクトル(参考文献[4]の図を元に改変)

(a) β LGのリガンド滴定で得られた一連のHSQCスペクトルの重ね合わせ。濃紫(0mM)から赤(12.8mM)までリガンドであるANS濃度を上げていき各点で得られたスペクトルを示す。(b) (a)の緑四角で囲んだ部分の拡大図。青矢印、橙矢印はそれぞれシグナルの移動が直線的、曲線的に起きている残基を示す。

もちろん、蛋白質研究の分野でも主成分解析は利用されている。例えば、シミュレーションで得られた構造群のクラスタリング^[6]、生体内に投与した物質のNMRスペクトルの経時変化データからその物質の代謝経路の同定^[7]、また、与えられたペプチドのアミノ酸配列からそのペプチドのアミロイド原性を予測するようなプログラムにも主成分解析は用いられている^[8]。

主成分解析の数学的な概念

主成分解析を使おうと考えた理由は、多くの残基の化学シフトデータから、そこに含まれる状態数を知ることができると考えたからである。ここでは主成分解析の数学的な概念を簡単に説明したいと思う。

まず、主成分解析の対象となるデータは、①一つのデータ点が複数の数値データを含み、②そのようなデータ点が複数あるものである。例えば、上で挙げた模試結果のデータは、①各受験者がそれぞれの教科の点数を持っており、②受験者数が大勢いるので解析の対象となる。NMRの滴定実験の場合も、①ひとつのスペクトルには各残基の化学シフト値があり、②滴定点の数だけスペクトルがあるので条件を満たす。ここで一つのデータ点はいわゆるベクトルと見なすことができる。もし一つのデータ点が10個の数値を持っているとすると、このベクトルは10次元のベクトルということになる。これを $\mathbf{I}(i)$ と表記する(i は各データ点の背番号)。元の

データに含まれる各データ点を表記するには、もとの次元数だけ(上の例では10個)数値を規定しなければならない(式1)。

$$\mathbf{I}(i) = \sum_X f_X(i) \times \mathbf{I}_X \quad (1)$$

ここで \mathbf{I}_X は各次元の単位ベクトル、 f_X はそれぞれの次元の係数である。しかし、初めのデータ群に含まれる各データ点は、細かい誤差を無視すれば少数の因子で表現できる場合がある。もし3つの因子で説明できる場合、元のデータの各点は以下の式で表記される。

$$\mathbf{I}(i) = f_A(i) \times \mathbf{I}_A + f_B(i) \times \mathbf{I}_B + f_C(i) \times \mathbf{I}_C \quad (2)$$

ここで \mathbf{I}_X は各因子を表す軸方向の単位ベクトル、 f_X はそれぞれの因子の係数と意味が変化する。それではその因子数はいくつか、またその因子とは何かを調べるのが主成分解析の目的である。

上の概念を100残基の蛋白質のHSQCスペクトルから得られる化学シフトデータに適用したときを想定し、図2に沿って説明する。各残基がH軸とN軸の化学シフト値を持つので、シグナル全ての記述には200個の数値が必要になる。これらの数値を一組のベクトルと考えるとこのベクトルは200次元空間の1点を指し示すことになる。蛋白質だけでスペクトルを取ったこの点を基準点(始状態)とし、これをA状態(A点)と呼び、この点の位置を示す位

置ベクトルを \mathbf{I}_A とする (図2a)。

さて、この蛋白質があるリガンドと1:1で結合する場合を考える。各滴定点でHSQCスペクトルを測定すると、滴定量の増加に伴い各残基の化学シフトが変化する (fast exchange regimeを想定している)。この変化は全ての蛋白質分子がリガンドと結合するまで続き、飽和点では100%結合型のスペクトルとなる。これをB状態 (B点、 \mathbf{I}_B) とする。先ほどの200次元空間で考えるとA点からはじまり、滴定に伴い移動しながら飽和点 (B点) に辿り着く。ここでポイントなのは、全てのスペクトルはA点とB点の線形結合で記述できるので、A点からB点までを直線的に移動しているという点である (図2a、黒点列)。式 (2) の形で説明すると必要な因子は2つとなる。

今度は蛋白質が2つの結合サイトを持っており、それぞれのアフィニティが異なるため順次結合が起こる場合を考えてみる。するとA点から始まり二つのサイトが両方とも飽和したらB点に辿り着くという点は先ほどと同じだが、滴定の前半は片方のサイトだけに結合したときのスペクトル (これをC点とする) に向かっていくため、曲線的な軌跡を描くことになる (図2a、赤点列)。先ほどとは対照的に、こちらの場合では必要な因子数は3であることが分かる。

ここでそれぞれのケースで、描いた軌跡を表現するのに何次元の空間が必要か考えてみる。ひとつめのケースでは軌跡は直線であるため、その軌跡を貫くように描く軸1本の計1次元ですべての点の位置を表すことができる。それに対しふたつめのケー

スの軌跡はA点、B点、C点を通る面上を動いているため、軌跡を表現するには計2次元が必要である。注目してほしいのは、蛋白質が取りうる状態数を n とすると、 $n-1$ 次元まで元のデータの次元を落とせることである。物質の状態変化の場合、係数 (f) の和が1という制約があるため、ひとつ少ない次元になる。つまり、元のデータの次元をどこまで落とせるかを調べることで、式 (2) の因子の数、つまり反応に含まれる状態の数を調べることができるのである (図2b)。データ表記に必要な次元数を決定した後、各軸がどのような因子に対応するかを考察し、これらのデータに解釈を与える (図2c)。これが主成分解析の大まかな流れである。

お気づきの方がいるかもしれないが、化学シフトの主成分解析は、これまでの分光スペクトルデータの解析で、測定対象の物質が何状態の構造変化を示すか調べるために行われてきたスペクトル解析 (こちらも特異値解析とかSVD解析という名で呼ばれている) という方法と本質的には同じである。いわゆるスペクトルは強度が測定波長点の順に並んで \mathbf{I} というデータ列 (縦ベクトル) になったものだが、これを化学シフトが残基順に並んだベクトル \mathbf{I} に置き換えたものがCS-PCAなのである。

CS-PCAの応用：複数のリガンド同時結合系

それでは、実際に我々が行ったりリガンド滴定の例を使って、CS-PCAの解析の手順を一つずつ説明したい。図3に沿って説明する。

まず解析対象としたのは β LGのアニリノナフタレンスルホン酸 (ANS) という基質の結合の解析で

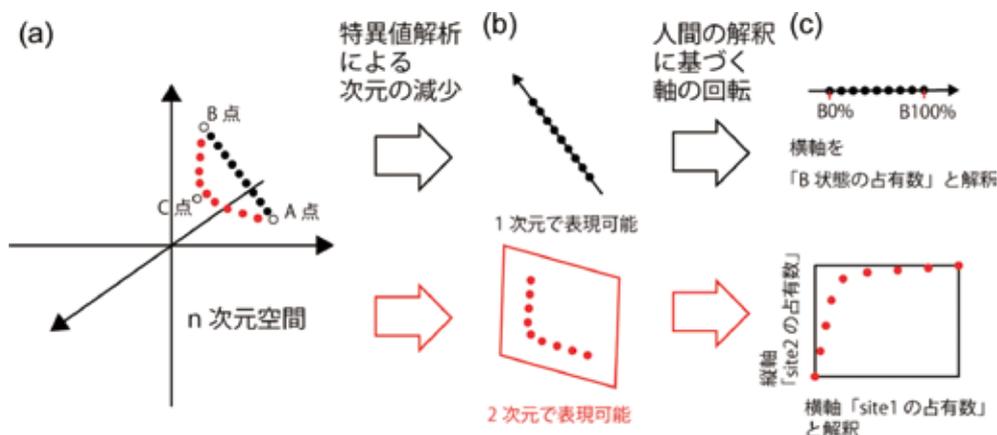


図2 主成分解析の概念

(a) データを元の n 次元のままプロットしたときのイメージ。 n 次元空間は正確に描画できないので、図ではやむなく3次元で表してある。(b) 特異値解析後、有意な次元のみ残してデータを表現した図。この時各主成分が各軸となり、各プロット点の座標は主成分スコアとなる。(c) 主成分スコアの座標から人の解釈に基づくように軸回転しそれぞれの軸の値に意味を持たせたものに変換した後のイメージ図。

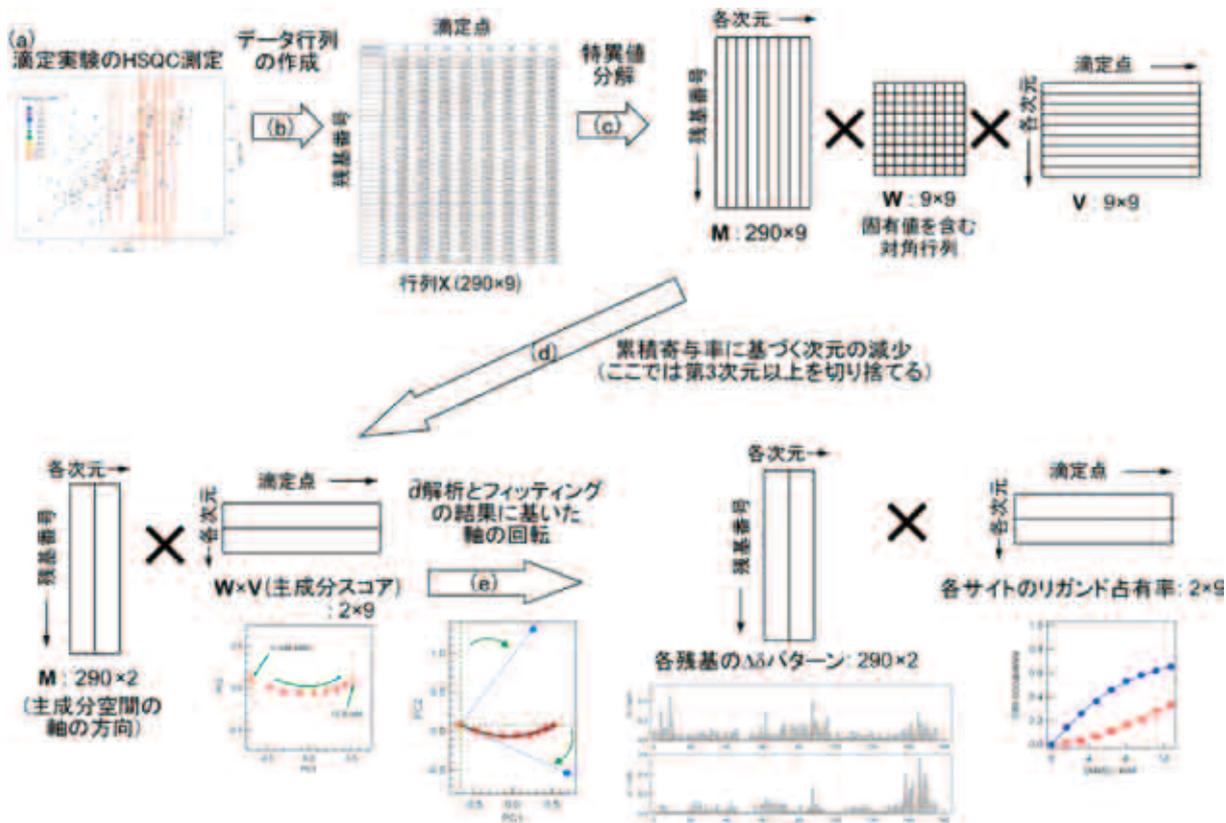


図3 リガンド滴定実験におけるCS-PCAのデータ解析の手順(参考文献[4]の図を元に改変)

(a) 滴定実験を行い、各滴定点でHSQCスペクトルを測定する。(b) 測定したHSQCスペクトルから各残基の化学シフト値を読み取り、縦方向に各残基の化学シフト値を、横方向に各滴定点のデータを配置し行列 X を作成する。(c) 行列 X の特異値分解を行う。(d) 累積寄与率を参考に、データの次元を落とす。図では最初の2次元まで採用している。この時点で得られた2次元プロットの横軸、縦軸は採用された第1成分、第2成分の主成分スコアである。(e) 加重平均距離解析やモデルフィッティングの結果を基に、2次元主成分スコアのプロットを軸回転し、サイト1、サイト2のリガンド占有率に変換する。また各結合サイトの由来の $\Delta\delta$ パターンも得られる。

ある。これまでの研究から、 β LGはANSの結合サイトを複数持つと考えられていたが、結合部位、会合定数、各部位の結合数などは明確に分かっていなかったため、これらのパラメータを決定することを目的とした。

(a) 滴定実験の観測と、

(b) 解析のための行列の作成

まず滴定実験を行い、各滴定点でHSQCスペクトルを測定する。この滴定実験結果を基に行列 X を作成する。この行列は一枚のスペクトルに含まれる各残基の化学シフト値 (δ_H と δ_N : ppm単位) を含む縦ベクトルを、横方向に滴定点の数だけ並べたものである。ただし、スペクトル幅を考慮して δ_N の値は1/8倍にしてある。この時の行列 X のサイズは290 (145個の追跡可能な残基の数 \times 2 (H軸、N軸)) \times 9 (滴定点の数) であった。この行列は n 次元空間中にスペクトルに相当する点の列が浮かんでいる状態に対応する(図2a参照)。この行列の各点から各残基の化学シフト値の平均値を差し引いて

おく。このようにして一群のデータ点を平行移動して、データ点の重心を n 次元空間の原点に合わせておく。

(c) 特異値分解

行列 X を特異値分解する。特異値分解とは、元の行列 X を $M \cdot W \cdot V^{-1} = X$ で表される3つの行列 M , W , V に分解する数学的操作である。 M , V はいずれも直交行列(行列に含まれる縦ベクトルが正規直交性を持つ)であり、 W は対角行列(対角成分のみ数値を持つ)である。今回の場合、 M , W , V^{-1} それぞれのサイズは290 \times 9, 9 \times 9, 9 \times 9となる。ちなみに、特異値分解を行うには一般的な表計算ソフトに組み込まれている機能を使えば可能である。例えば筆者が愛用しているIgorProというソフトウェアではMatrixSVDというコマンドを実行すれば元の行列 X から上で述べた3つの行列を算出してくれる。

(d) 次元の減少

行列 M に含まれる縦ベクトルはそれぞれ新たな

座標軸方向を示すものである。 \mathbf{W} の対角成分に入る数値は各成分(軸)の固有値であり、新しい軸方向に各データ点がどれだけ分散しているかを示す。分散の大きい方がデータ再現への寄与が大きい。この固有値から累積寄与率を計算すると、はじめの2軸で0.85となり、この2軸でデータの大部分を説明できるということが分かった。元々 β LGはANSを2か所で結合することが指摘されていたので、この結果は期待通りである。

次元を落とした結果、 \mathbf{M} , \mathbf{W} , \mathbf{V}^{-1} それぞれのサイズは 290×2 , 2×2 , 2×9 となった。ここで $\mathbf{V} \cdot \mathbf{W}$ の2つの縦ベクトルは、残った2軸上での座標を表す新しい変数であり主成分スコアと呼ぶ(図4)。式(2)で表すと \mathbf{I}_A と \mathbf{I}_B が \mathbf{M} の持つ2つの縦ベクトルとなり、 $f_A(i)$ と $f_B(i)$ が主成分スコア($\mathbf{V} \cdot \mathbf{W}$ の2つの縦ベクトルの各成分)となる。

(e) 軸の回転

特異値解析によってデータの次元数を減らし各次元の主成分スコアを得たが、主成分スコア自体は物理的な意味を持たず、軸回転(一次変換)によって物理的に意味のある数値に変換する必要がある。今回のケースでは、2つの軸をそれぞれの結合サイトへのリガンド結合に関連付けるのが適切である。つまり、式(2)の \mathbf{I}_A をリガンドフリーの状態、 \mathbf{I}_B と \mathbf{I}_C をそれぞれのサイトにリガンドが結合したときのスペクトル変化と定義し、 f_B と f_C をそれぞれのサイトにリガンドが結合した割合(リガンドのサイト占有率)とすればよいことになる。しかし、この軸変換にはサイト1、サイト2にそれぞれANSが100%結合した時、どのようなスペクトルになるか(つまり主成分スコア平面上で、 \mathbf{I}_B と \mathbf{I}_C がどの位置にくる

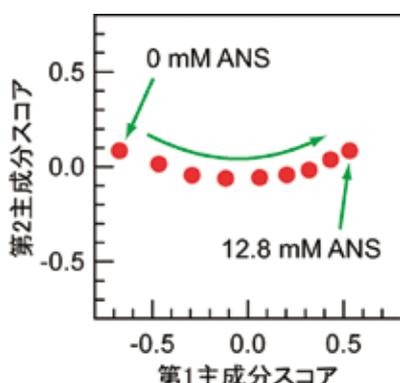


図4 ANS滴定データから得られた第1、第2主成分スコアのプロット(参考文献[4]の図を元に改変) ひとつの赤点はそれぞれのANS濃度で得られたHSQCスペクトルデータに相当する。ANS濃度の上昇に伴い、スペクトル点が左から右へ点が移動する。

か)を特定しなければならない。今後の解析の都合を考え、我々はこの点の座標の規定を一般的な直交座標系ではなく、極座標系($|\mathbf{I}| \cos \theta$, $|\mathbf{I}| \sin \theta$)ですることにした。極座標系では点の位置を、図5aのように、滴定のスタートのスペクトル(A点)からみて第1主成分軸から角度 θ だけ傾いた方向に $|\mathbf{I}|$ の距離だけ離れている点というように規定する。一つ述べておきたいのは、 $|\mathbf{I}|$ の変化も θ の変化もスペクトルの各残基の $\Delta\delta$ の変化を引き起こすが、 $|\mathbf{I}|$ の変化では各残基の $\Delta\delta$ の比が変わらず変化することに対し、 θ の変化では各残基の $\Delta\delta$ が独自に変化することである。

極座標系を採用した理由は、以下で述べる加重平均距離という考え方をを用いることで、極座標の片方のパラメータ、 θ 、を事前に決定し、フィッティングパラメータから除外することができるからである。これによりフィッティングパラメータの数を減らし、解析の精度を上げることができる。

加重平均距離(\bar{d})の導入

我々は各サイトの θ の決定のために加重平均距離(\bar{d})という量を導入した。 \bar{d} は、基本的にはPDBデータに基づいて計算される全ての主鎖窒素原子間の距離の平均である。しかし $\Delta\delta$ の大きな値を出す残基間の距離により大きな重みが付くようになっている。 \bar{d} は以下の式で計算した。

$$\bar{d}(\theta) = \frac{\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N d_{ij} \Delta\delta_i(\theta) \Delta\delta_j(\theta)}{\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \Delta\delta_i(\theta) \Delta\delta_j(\theta)} \quad (3)$$

ここで、 d_{ij} は結晶構造上*i*番目と*j*番目の残基の主鎖窒素原子間の距離であり、 $\Delta\delta_i$ は*i*番目の残基の $\Delta\delta$ の大きさを表している。 \bar{d} の値が小さい時は大きな $\Delta\delta$ を示す残基が一か所に集中して存在することを示し、 \bar{d} の値が大きくなるとは大きな $\Delta\delta$ を示す残基が3次元構造上に散らばっていることを示す。ひとつの結合サイトにリガンドが結合したとき、大きな $\Delta\delta$ を示す残基は集中しているのが自然なので、もし θ を -90° から $+90^\circ$ まで掃引すると、結合サイトに対応する点に向かう角度となった時、 \bar{d} が極小値を示すと考えられる。今回の場合は二つの結合サイトの存在を期待しているので、 $\bar{d}-\theta$ プロット中に二つの極小値が現れることが期待される。 β LGの結晶構造データと今回のCS-PCAの結果を基に $\bar{d}-\theta$ プロットを描いてみたところ、予想通り 52.6° と -24.4° で極小値が得られ、各サイトの θ を

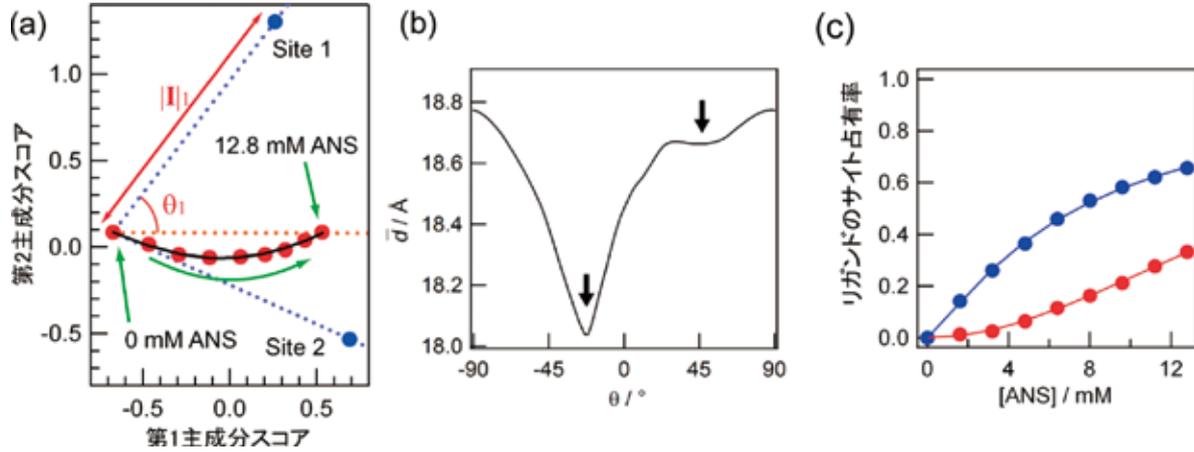


図5 主成分スコアの解析と軸回転に基づく解釈 (参考文献 [4] の図を元に改変)

(a) 主成分スコアのフィッティング。赤点は図4で示したものと同一。黒実線は式 (2)、(4)、(5) に基づく理論曲線で、青点はそれぞれのサイトにANSが結合したときのスペクトルに対応し、その位置は基準点 (フリー状態の β LGのスペクトル) から $|\mathbf{I}|$ と θ によって規定される。(b) 加重平均距離解析による、 θ の決定。黒線が実験結果から得られた加重平均距離 (\bar{d}) の θ 依存性で、これを二つのガウス関数でフィッティングしたところ、 52.6° ($\pm 0.6^\circ$) と -24.4° ($\pm 0.1^\circ$) で \bar{d} が極小値を示すことが分かった (黒矢印で示した点)。(c) 最終的に主成分軸の回転によって解釈されたそれぞれの結合サイトのリガンド占有率のリガンド濃度依存性。サイト1と2の占有率はそれぞれ赤、青で示してある。

決定することができた (図5bの矢印、図5aの青点線参照)。

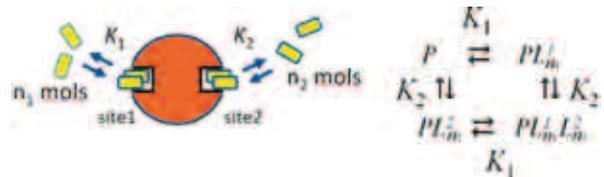
モデルフィッティング

各サイトの結合状態の θ が分かったところで、モデルフィッティングを行った。仮定したモデルは各サイトに n 個のリガンドが解離定数 K_d で結合するという一般的なものである (Scheme 1)。

$$f_1([L]) = \frac{[P]}{[P_{total}]} \left(\frac{[L]^{n_1}}{K_1} + \frac{[L]^{n_1}[L]^{n_2}}{K_1 K_2} \right) \quad (4)$$

$$f_2([L]) = \frac{[P]}{[P_{total}]} \left(\frac{[L]^{n_2}}{K_2} + \frac{[L]^{n_1}[L]^{n_2}}{K_1 K_2} \right) \quad (5)$$

式 (4) と (5) で定義される f_1 と f_2 を式 (2) に代入することで、理論曲線を描き、これを主成分スコアのデータをフィッティングした (図5a、実線)。フィッティングパラメータは各サイトで n 、 K_d と前項の極座標の未決定分 $|\mathbf{I}|$ の計6つである。フィッティングの結果、サイト1、2の解離定数はそれぞれ $3.42 \times 10^{-4} \text{ M}^2$ ($n_1 \approx 2$) と $2.51 \times 10^3 \text{ M}$ ($n_2 \approx 1$) という値を得た。またフィッティングの結果得られた $|\mathbf{I}|$ と θ の値を基に主成分スコアの軸回転を行い、各結合サイトの占有数 f_1 と f_2 でプロットしなおしたのが図5cである。さらに、得られた $|\mathbf{I}|$ と θ の値から、結合に伴いHSQCスペクトルがどのように変化するかも特定できる (図6)。サイト1では大きな $\Delta\delta$ を



Scheme 1 フィッティングで用いたモデルとその状態転移のスキーム

示す残基がEFループに集中していることが分かるが、これはcentral cavityと呼ばれる分子内の隙間の入口に相当する。サイト2の方は、 α ヘリックスとその周辺の β バレル残基が大きな $\Delta\delta$ を示している。

化学シフト摂動を考慮した ドッキングシミュレーション

滴定実験から得られた化学シフト摂動の結果を入力し、加えて蛋白質とリガンドの立体構造データを入力すると、化学シフト摂動の結果を満たすようなドッキングシミュレーションを行ってくれるHADDOCK^[9]というプログラムがある。先ほどのCS-PCAで分離したサイト1とサイト2の化学シフト摂動の寄与をそれぞれ使い、HADDOCKによってそれぞれのサイトにANS分子がどのように結合しているかシミュレーションを行った。

モデルフィッティングの結果に基づき、サイト1のドッキングシミュレーションを β LG 1分子とANS 2分子で行ったところ、ひとつのANS分子は上で述べた β LG分子内部のcentral cavityという

空間に結合していることが分かった(図7a)。一方サイト2は β LG 1分子とANS 1分子でシミュレーションを行い、 β パレルと α ヘリックスの隙間の cleft と呼ばれる位置に結合していることが分かった(図7b)。ここで非常に興味深いのは、他のグループが報告した β LGと他のリガンド分子(ここでは vitamin D^[10])の結晶構造を見ると、 β LG 1分子あたり二つの vitamin D が結合し、その結合位置が今回の我々のドッキングシミュレーションでANSの結合位置が収束した場所とまったく一致するのである。おそらく、ANSも vitamin D も芳香環をベースとした親水性基を持つ疎水性分子であり、 β LGとの結合部位も同じであるということが考えられる。

このように、滴定実験より得られた化学シフトデータを主成分解析することで、その中に含まれる複数の結合状態を分離することができた。

CS-PCA の応用 : pH 滴定

もう一つ我々がCS-PCAを適用したのは蛋白質のpH依存的な構造転移の解析である。以前の分光測定や密度測定から β LGはpH 2から8の間で4つの状態をとることが知られていた。これらの状態は低いpHから現れる順にM, Q, N, R状態と呼ばれ、各状態間の転移の pK_a は低い方から3.0, 5.0, 7.0であることが報告されている(Scheme 2)^[11, 12]。

これらは β LG分子の三次構造や密度の変化を伴うので分子全体の構造転移だと考えられているが、それぞれの転移にはそれぞれ重要な局所構造変化

が存在するはずである。そこで、どのような局所構造変化が分子全体の状態変化を引き起こすのかを調べることを目的とした。

先に述べたリガンド滴定実験と同様に、pH滴定を行い各pHでHSQCスペクトルを測定した。やはり曲線的に変化する残基がいくつか見られた(図8a, b)。ここで各残基の化学シフトの変化を色相環プロットというもので示したのが図8c, dである。この図ではもしHSQCスペクトル上でシグナル位置が左下へ(H核、N核ともに低磁場側へ)変化した場合、図8dのスケールに従って青色が表示される。Gln-5のように滴定pH領域でシグナルの移動の方向が異なる場合、プロット上でも異なる色で変化の方向が示される。

図8cを一見しただけでは、各残基の協同的な変化が存在するのかどうか判断しにくい。特異値解析を行ったところ、今回のデータは3次元で表記可能だという結果が得られた。つまり β LG分子は4状態を取るということになる。得られた主成分スコアから各状態転移の pK_a の決定を試みた。各転移の解離定数は以下の式で表される。

$$K_{ai} = \frac{[S_{i+1}][H^+]}{[S_i]} \quad (6)$$

今回は4状態存在するので、 i は1から3まで考慮した。この K_{ai} を用いて各状態の存在分率が計算できる。例えば第1状態のM状態の存在分率は以下

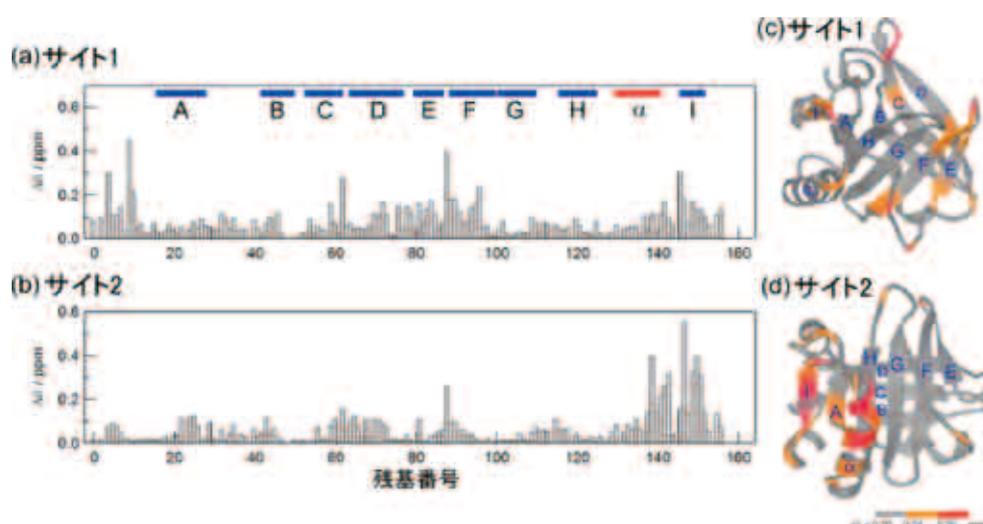


図6 加重平均距離解析による、結合サイトの同定(参考文献[4]の図を元に改変)
(a, b) フィッティングから得られたサイト1とサイト2の $\Delta\delta$ パターン。図の縦軸の $\Delta\delta$ は、 $\Delta\delta = \sqrt{\Delta\delta_H^2 + (\Delta\delta_N/8)^2}$ で与えられた値を示す。上部の青線と赤線は β LGの天然構造の β ストランド、 α ヘリックスの位置を示す。(c, d) サイト1とサイト2にANSが結合するときそれぞれ大きな $\Delta\delta$ を示すと考えられる残基を立体構造上にマッピングした。 $\Delta\delta$ が0.15 ppm, 0.25 ppmを超える残基はそれぞれ橙、赤色で示してある。

の式で表される。

$$f_1 = \frac{[H^+]^3}{[H^+]^3 + K_{a,1}[H^+]^2 + K_{a,1}K_{a,2}[H^+] + K_{a,1}K_{a,2}K_{a,3}} \quad (7)$$

各状態の存在分率を式(2)に代入し、主成分スコアに対しフィッティングしたところ、これら3つの転移の pK_a が2.9, 4.9, 6.8と同定された。これは、これまで密度測定や分光測定などの結果から報告されてきた値と一致する。つまり、個々の残基の挙動を見ても分子全体の構造転移との関係が理解できなかったのに対し、全ての残基の化学シフトの情報をまとめて主成分解析することで、分子全体のマクロな構造転移と関連付けることができたのである。

では、どのような局所構造変化が各状態間の構造転移を引き起こしているのだろうか？ CS-PCAから得られた、各状態転移に対応する $\Delta\delta$ を調べてみた。しかしはじめの2つの転移では、何か特定の残基の挙動にその状態間の転移が帰属できるわけではなく、各残基の挙動の動きが合わさり、分子全体の総体的な状態転移に見えていたことが分かった。このことは、図9a, bで、pH 3と5での転移はパターンが似ており、特異的な局所構造転移が見られないことに対応する。このpH領域では複数の酸

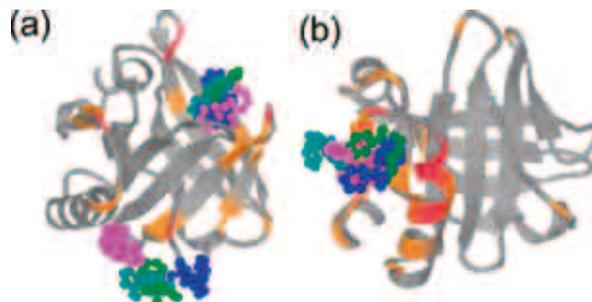
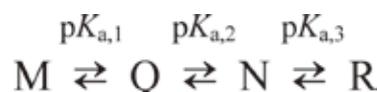


図7 HADDOCKによる複合体構造の解析(参考文献[4]の図を元に改変)

(a, b) $\Delta\delta$ の値を基に得られたサイト1(a)とサイト2(b)の結合構造。ANS分子はボール&スティックモデルで表示してある。緑、青、水色、紫色で示したANSはシミュレーションで提案された第一、第二、第三、第四候補の構造である。



Scheme 2 想定される β LGのpH依存的状態変化のスキーム

性側鎖のプロトン化が個々の pK_a で起きており、それらの重ね合わせの結果、見かけ pK_a 3と5の転移として検出されたものと考えられる。

対照的に、pH 7の転移は特徴的なパターンで協同的に起きていることが分かる。化学シフトの解析と同時にを行った塩酸グアニジン変性実験から、pH7

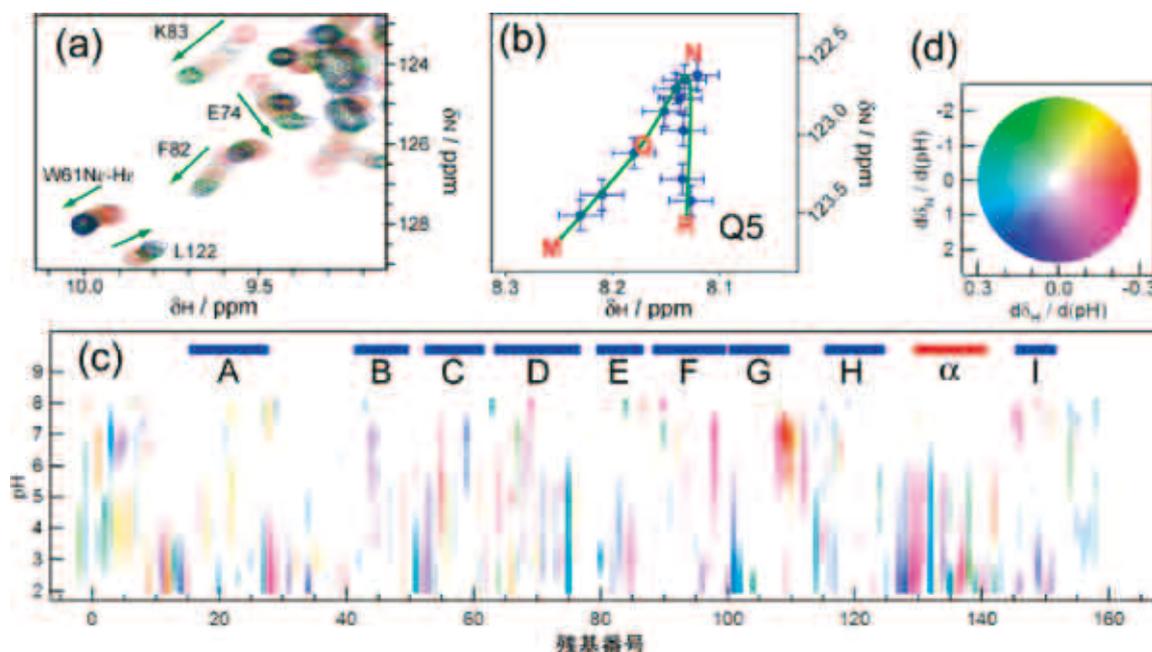


図8 pH滴定に伴う、各残基の化学シフト変化の様子(参考文献[3]の図を元に改変)

(a) pH 2.4 (赤)からpH 8.1 (青)までpHを変化させたときのHSQCスペクトルの変化の様子。シグナルの位置が変化を矢印で示してある。(b) 例としてGln-5の化学シフト変化を示した。 δ_H と δ_N のエラーバーはそれぞれ標準的な線幅である0.02ppmと0.1ppmとしてある。実線は式(2)、(6)、(7)に基づく理論曲線である。M, Q, N, Rの文字の位置はそれぞれの状態を取るときに予想されるシグナルの位置である。(c, d) 各残基の化学シフト変化を色相環プロットで示したもの(c)とそのスケールを示したもの(d)。

付近で β LG分子の一部が変性した中間体を形成することが分かった。この構造転移はある残基 (Glu-89) の側鎖の脱プロトン化によって協同的に引き起こされることが以前の研究からわかっていたが^[13]、この変化は図9cの残基番号110番周辺の大きな $\Delta\delta$ として検出できている。(Glu-89の側鎖はこれらの残基の主鎖と相互作用していることが結晶構造から分かっている。)つまりGlu-89のプロトン化が局所的な構造変化の引き金となっていることが確認できた。なお、この構造変化はEF-ループと呼ばれる領域の局所変性であるが、これはANS結合のところで述べたcentral cavityの入口の部位である。事実、 β LGはpH 7を境にリガンド結合能が上昇することが知られている。

このように、pH滴定の間連続的に起こる各残基の化学シフト摂動のデータを解析することで、分子全体で起きていると考えられていた状態変化と各残基の寄与を関連付けることができた。

まとめと今後の課題

CS-PCAがうまく適用できる条件は、状態間転移の速度が速いこと (fast exchange regimeであること) である。相互作用解析について言うと、一般的に弱い相互作用の時に解離会合のダイナミクスがfast exchangeになることが多い。しかしこれでは滴定実験で反応が飽和しにくいというジレンマが起こる。そこで加重平均距離を導入することでこの問

題を回避した。またpH依存的な構造転移の場合は有意な $\Delta\delta$ を示す残基が局所的に集まるという保証がないため加重平均距離は利用できない。しかしpHを幅広く変化させることで各状態転移が完結するので、解析は可能であった。このように解析の手順はどのような実験のデータを扱っているかによって異なってくるので、適切な手順を選ぶことが重要である。

今回我々はこのCS-PCA法を基質結合部位の同定やpH依存的な構造転移の解析に用いた。尿素変性や温度、圧力変化による蛋白質の構造変化も化学シフト摂動を伴うことが多く、このようなデータにも本解析法が適用でき、条件変化の途中に生じる変性中間体の構造やダイナミクス変化に関する情報が得られると期待される。今後本解析法を様々な蛋白質、そして様々な変性実験における構造変化や揺らぎの解析に応用し、本解析法を改良していきたい。もし読者の中に本解析に適すると思われるデータをお持ちの方は、是非ご紹介いただくと幸いです。

今回の解析を単純化するために、いくつか仮定を設けた。ひとつは解離会合の交換速度が速いということ (fast exchange regime)、もうひとつは二つのサイトでの結合反応が独立に起きていること、であった。このCS-PCAをより汎用性の高いものにするためには、様々な反応系でも解析可能にする必要がある。例えば、交換速度がより遅い場合 (slow

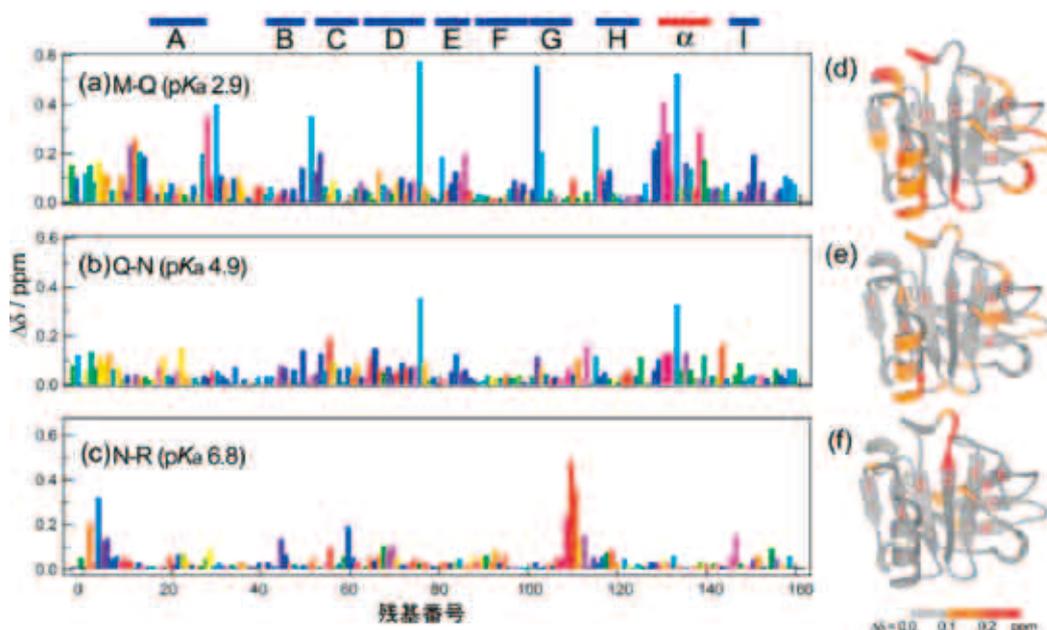


図9 CS-PCAによって同定された各マクロ構造転移に関する残基 (参考文献 [3] の図を元に改変) (a ~ c) pH 2.9 (a), 4.9 (b), and 6.8 (c) での構造転移に伴う $\Delta\delta$ をまとめたもの。バーの高さは $\Delta\delta$ の大きさを示し、色はHSQCスペクトル上のシグナルの動く方向を示し、図8dの色相環スケールに従う。(d ~ f) それぞれの転移で大きな $\Delta\delta$ を示す残基を立体構造上にマッピングしたもの。

もしくはintermediate exchange regime)、化学シフトだけでなくシグナル強度や線幅も変化する。これらの情報もインプットデータに含めて解析できる系を確立することができれば、より広いデータで本解析が利用可能になると思われる。しかし、数値データの線形結合性を基本にしている主成分解析と非線形的な変化をする線形解析をどのように結び付けるかはなかなか難しい問題である。これらの問題を解決することができれば、より汎用的なCS-PCA解析が可能になるのではないだろうか。その点についても、皆様から良いアイデアが頂けたらと思っている。

参考文献

- [1] Arai, M., Ferreón, J. C. & Wright, P. E. (2012). Quantitative analysis of multisite protein-ligand interactions by NMR: binding of intrinsically disordered p53 transactivation subdomains with the TAZ2 domain of CBP. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 3792-803.
- [2] Cogliati, C., Ragona, L., D'Onofrio, M., Gunther, U., Whittaker, S., Ludwig, C., Tomaselli, S., Assfalg, M. & Molinari, H. (2010). Site-specific investigation of the steady-state kinetics and dynamics of the multi-step binding of bile acid molecules to a lipid carrier protein. *Chemistry* **16**, 11300-10.
- [3] Sakurai, K. & Goto, Y. (2007). Principal component analysis of the pH-dependent conformational transitions of bovine β -lactoglobulin monitored by heteronuclear NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 15346-15351.
- [4] Konuma, T., Lee, Y. H., Goto, Y. & Sakurai, K. (2013). Principal component analysis of chemical shift perturbation data of a multiple-ligand-binding system for elucidation of respective binding mechanism. *Proteins* **81**, 107-18.
- [5] Jaumot, J., Vives, M. & Gargallo, R. (2004). Application of multivariate resolution methods to the study of biochemical and biophysical processes. *Anal. Biochem.* **327**, 1-13.
- [6] Zhou, Z., Madrid, M., Evanseck, J. D. & Madura, J. D. (2005). Effect of a bound non-nucleoside RT inhibitor on the dynamics of wild-type and mutant HIV-1 reverse transcriptase. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 17253-17260.
- [7] Jaumot, J., Marchan, V., Gargallo, R., Grandas, A. & Tauler, R. (2004). Multivariate curve resolution applied to the analysis and resolution of two-dimensional [^1H , ^{15}N] NMR reaction spectra. *Anal. Chem.* **76**, 7094-7101.
- [8] Rojas, F. A., Marchan, V., Gargallo, R., Grandas, A. & Goux, W. J. (2006). Prediction of nucleating sequences from amyloidogenic propensities of tau-related peptides. *Biochemistry* **45**, 4638-4652.
- [9] Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A. M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1731-7.
- [10] Yang, M. C., Guan, H. H., Liu, M. Y., Lin, Y. H., Yang, J. M., Chen, W. L., Chen, C. J. & Mao, S. J. (2008). Crystal structure of a secondary vitamin D₃ binding site of milk β -lactoglobulin. *Proteins* **71**, 1197-1210.
- [11] Sawyer, L. & Kontopidis, G. (2000). The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1482**, 136-148.
- [12] Taulier, N. & Chalikian, T. V. (2001). Characterization of pH-induced transitions of β -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.* **314**, 873-89.
- [13] Sakurai, K. & Goto, Y. (2006). Dynamics and mechanism of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin studied using heteronuclear NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **356**, 483-496.



櫻井 一正 (さくらい・かずまさ)

近畿大学先端技術総合研究所 高圧力蛋白質研究センター 講師

2000年大阪大学理学部化学科卒業。2005年大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻博士後期課程修了。同年大阪大学蛋白質研究所助手に就任。2013年に現職に就任。〔専門〕蛋白質物理化学。2004年 日本核磁気共鳴学会会員。

蛋白質のNMR： 緩和データ解析における誤差評価

University of Pittsburgh School of Medicine

伊島 理枝子

1. 序

私は、長年、蛋白質のNMR磁気スピン緩和からその内部運動を研究してきたが、近年は特に、そのデータから得られる内部運動パラメータの確からしさや誤差について研究している。近年、NMR緩和から得られたGeneralized order parameterを、熱測定から得られた構造エントロピーと比較したり^[1~3]、緩和分散法から得られた2状態の存在比率、つまり、ギブズ自由エネルギーを、他の方法から得られた結果と比較したりできるようになった^[4~8]。これらの比較を定量的に行うためには、NMR緩和測定またそのデータ解析の信頼性が非常に重要である。また、緩和の効果は静磁場依存であるため、近年の高磁場での測定は、過去の低磁場での実験では無視できたような誤差が大きくなる可能性がある。このような理由により、本稿においては、実験方法について述べるのではなく、得られたNMRスペクトルからどのようにして信頼出来る緩和時間や定常状態NOEの値が得られるか、そのときに注意する点は何かを、蛋白質主鎖の運動性解析に用いられる¹⁵N核スピンの緩和、特に、一般的に用いられる以下の3つの¹⁵N核スピンの緩和のデータ解析を例に述べる^[9~13]。

$R_1 (=1/T_1)$ ：縦緩和速度、または、スピン-格子緩和速度 (longitudinal relaxation rate or spin-lattice relaxation rate)

$R_2 (=1/T_2)$ ：横緩和速度、または、スピンスピン緩和速度 (transverse relaxation rate or spin-spin relaxation rate)

{¹H}-¹⁵N NOE：異種核間オーバーハウザー効果 (heteronuclear Overhauser effect)

ここで、説明を加えておくと、縦、横緩和とい

う言い方は、現象をマクロに定義したものであり、一方、スピン-格子緩和やスピンスピン緩和は、現象の原理に基づいた定義である。しかし、 R_1 には、必ずしもスピンと格子 (=熱溜) の相互作用のみでなく、交差緩和 (cross-relaxation) の影響も反映され、また、実際に観測される R_2 には、スピンドウシの相互作用だけでなく、化学交換 (蛋白質の内部運動による構造平衡を含む) も反映される。このため、本稿では、原理に基づいた名称よりも、マクロな現象の定義を用いる。また、{¹H}-¹⁵N NOEの場合、プロトンに{}を用いるのは、¹⁵Nに直接結合したプロトン (¹H-¹⁵Nアミド基) 以外のプロトンも、NOEに寄与しうるからである。

2. 測定から解析までの流れ

R_1 や R_2 については、信号強度 (後述) の減衰を検出するために、磁化減衰の時間 (t_{relax}) を変えた2次元スペクトルを N_{relax} 個測定する (図1A)。緩和が完全に単一指数関数で記述できると考えられる場合にのみ、初期点、 $t_{relax}=0$ 、と適当な時間 t_{relax} の2点 (つまり $N_{relax}=2$) のスペクトルだけを用いて緩和時間を決めることができる。しかし、理論上、単一指数関数で表されるはずであっても、現実には他の理想的ではない要素により単一指数関数からずれる可能性もあるので、特定の実験以外は^[14, 15]、 t_{relax} を段階的に増大した N_{relax} 個のデータを測定する。サンプリング最適化の理論上は、 $R_{1,2}t_{relax}=1$ となる t_{relax} が指数関数のカーブフィットにおいて、 $R_{1,2}$ の誤差を最小にするが^[16, 17]、 $R_{1,2}$ の誤差は、 N_{relax} 個の信号のsignal-to-noise (S/N) 比にも依存する。図1Bに示すように、 $R_{1,2}t_{relax}=0.5$ では、フィットの誤差の影響はS/Nの2.9倍、 $R_{1,2}t_{relax}=1$ ではS/Nの3.9倍と、その差はあまり大きくないので、現実的には、 $R_{1,2}t_{relax}$ が0.5から1あたりをカバーしたサンプリングが測定されることが多い^[13]。

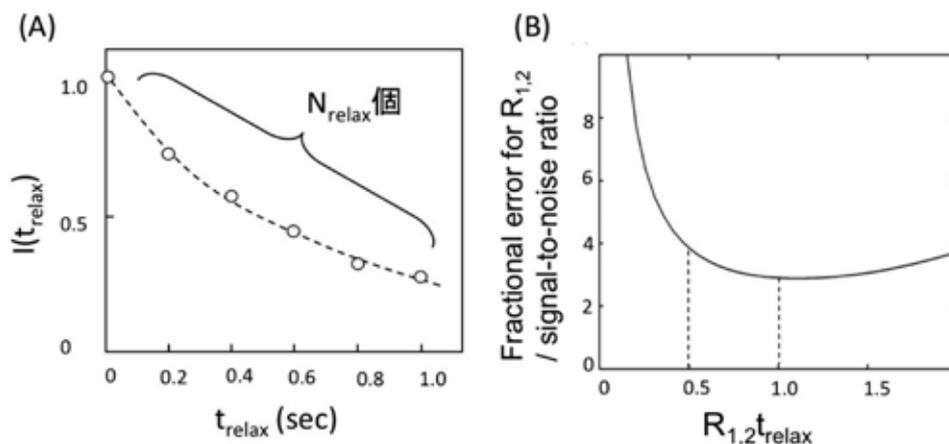


図1 (A) 緩和による磁化減衰。本稿では、 t_{relax} の値で計測した磁化強度を $I(t_{relax})$ とし、 N_{relax} 個の異なる t_{relax} での $I(t_{relax})$ を測定するとする。(B) 2点のデータだけで指数関数を決定した場合の t_{relax} 依存の相対誤差の見積もり^[12, 32]。

$\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOEの実験については、NOE効果のない ^{15}N 信号強度と、NOE効果を含む ^{15}N 信号強度の比を、定常状態でのNOEとして算出する。これにより、 ^{15}N R_1 (自己緩和) に対する交差緩和量の割合を評価することになる。かつては、3回以上繰り返して測定し、その強度比の平均値と標準偏差を求め、標準偏差をNOE値の誤差としたが、近年は、全体の測定時間を短縮するために、一回の測定をもとに、その信号のスペクトル上のS/Nから誤差を求める場合が多い(後述)。ただし、 $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOEの場合、積算の繰り返し時間を十分に待たないで測定すると、 ^1H 核の不十分な縦緩和に由来する誤差と、 ^{15}N 核の不十分な縦緩和に由来する誤差が生じるので^[18, 19]、磁化回復の時間(=積算のための繰り返し時間)を短くしてはいけない。さらに、高磁場の場合、 ^1H - ^{15}N 双極子相互作用と ^{15}N の化学シフトの異方性との交差相関があるゆえ、純粋な縦緩和、 R_1 で定義される以上に磁気緩和に時間がかかるので注意されたい^[11]。その交差相関の影響を押さえたパルスシーケンスも発表されている^[20]。

3. 信号のピーク値強度と積分強度

縦緩和、横緩和速度、またNOEの測定のいずれにおいても、実際のNMR実験の後は、得られたスペクトルから、各残基の信号強度を抽出することになる。信号強度の計測方法としては、ピーク値強度(height)または、積分強度(volume)がある。理論的には、NMR信号の自由誘導減衰(Free-induction decay, FID)が単一の指数関数で表せる場合、そのフーリエ変換は、ローレンツ型となるため、ピーク値でも積分値でも、どちらでも相対的に同じ信号の減衰カーブを示すことになる。しかし、

実際には、積分強度の場合、信号が少しでも重なり合うと誤差が大きくなるので、ピーク値強度を用い、積分強度は用いないことが多い。ソフトウェアによっては、ピーク値強度の検出の場合も、ピークを放物線型に補間した上でのピーク値を計算するものがあるので^[21]、ノイズを取り除いた強度をその後のデータ解析に扱うのか、ノイズを取り除く前の強度を扱うのか、利用者が注意すべきである(後述)。

また、 ^{15}N 横緩和の場合、ピークの線幅(半値幅 $=1/(\pi T_2) = R_2/\pi$)から定性的に R_2 を推測しようという考えもある^[22]。この場合、通常の蛋白質の緩和 ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルでは誤差を生じる。なぜなら、通常の ^1H - ^{15}N HSQC測定の場合、 ^{15}N の化学シフトを記録する t_1 の間、 ^{15}N 磁化は、 ^1H - ^{15}N のJ-カップリングの影響を受けるからである。J-カップリング自体は、 ^1H の180度パルス照射するので、スペクトルには現れないが、その線幅は ^{15}N R_2 のみならず、 $2N_{\text{XY}}H_Z$ 項による ^1H R_1 の影響も受ける。もし、定性的にピークの線幅から ^{15}N R_2 を推測する必要がある場合は、 ^{15}N の化学シフトを記録する t_1 の間、composite decouplingなどにより、完全にプロトン項をデカップリングする必要がある。

4. 緩和速度の決定

さて、ここまでで、各残基について、その信号強度が縦緩和または横緩和により減衰したデータが得られたとしよう。この1セットのデータを用いて、 R_1 または R_2 の値を決定する。それに用いる関数は、

$$I(t_{relax}) = I^0 \exp(-t_{relax} R_{1,2}) \quad (1)$$

であって、 N_{relax} 個の異なる t_{relax} 時間での $I(t_{\text{relax}})$ 値が実験から得られており、未知変数、 I^0 と $R_{1,2}$ を、なるべく実験値を再現するように決定する。これには、通常、 χ^2 二乗和(式2)の最小化を行う。

$$\chi^2 = \sum_{N_{\text{relax}}} \frac{\{I^{\text{exp}}(t_{\text{relax}}) - I^{\text{cal}}(t_{\text{relax}})\}^2}{\Delta I^2} \quad (2)$$

上記で、 $I^{\text{exp}}(t_{\text{relax}})$ はそれぞれの t_{relax} で得られた実験値の信号強度、 $I^{\text{cal}}(t_{\text{relax}})$ は、 I^0 と $R_{1,2}$ を仮定したときに式1で得られる計算値の信号強度、 ΔI は、実験値に含まれる誤差である。この実験値を用いて決定された I^0 と $R_{1,2}$ を後述の他の I^0 と $R_{1,2}$ から区別するため、本稿では、 I^{fit} と $R_{1,2}^{\text{fit}}$ として記述することにする。つまり、 N_{relax} 個の $I^{\text{cal}}(t_{\text{relax}})$ が、限りなく N_{relax} 個の $I^{\text{exp}}(t_{\text{relax}})$ に近づいた時の I^0 と $R_{1,2}$ が、 I^{fit} と $R_{1,2}^{\text{fit}}$ となる。

ΔI が、 N_{relax} 個のデータで一定である場合(たとえば、 ΔI が実験ノイズのみで与えられる場合)は、 ΔI は得られる χ^2 値の絶対値を変動させるが、関数の形は相対的には変えないことになる。このため、この I^0 と $R_{1,2}$ の決定においては、 ΔI は、得られる値そのものには、基本的には影響を与えない。しかし、その最適化の確からしさを推定するためには、 χ^2 値を決定する要因の1つである ΔI は重要である。通常、実験値が、正規分布する実験ノイズだけの誤差を持つ場合には、 $\chi^2/(N_{\text{relax}} - 2) \approx 1$ となる。 ΔI を過小評価すれば、 χ^2 値が大きくなり(つまり、 $\chi^2/(N_{\text{relax}} - 2) \gg 1$)、 I^0 と $R_{1,2}$ が決定できなくなる。逆に ΔI を過大評価すれば、 χ^2 値が小さくなり、 I^0 と $R_{1,2}$ は決まるが、その誤差が大きくなるので、決定した値の確からしさが下がる。

一方、式2の $\{I^{\text{exp}}(t_{\text{relax}}) - I^{\text{cal}}(t_{\text{relax}})\}$ 項も、大きく緩和時間の決定に影響する。 ΔI が妥当であり、式1を用いた場合の誤差が大きくなる場合($\chi^2/(N_{\text{relax}} - 2) \gg 1$)は、 $I^{\text{exp}}(t_{\text{relax}})$ を再現できる $I^{\text{cal}}(t_{\text{relax}})$ がないのであって、実験ノイズ以外の誤差があることになる。この場合は、該当するピークに対して、図1Aのような磁化の減衰のプロットを作り、特異な点がないかを検討することが必要であり、また、実験方法や実験条件を調べ直す必要がある。実験ノイズ以外の誤差が本当にあるかどうかを調べる方法としては、実際のスペクトルのノイズと指数関数フィットの誤差を比較する方法がある(後述)^[23]。

緩和速度の決定において、式1にさらにもう1項加わった式、

$$I(t) = I^0 \exp(-tR_{1,2}) + b \quad (3)$$

をオプションとして選択できるようなソフトウェアもあるかもしれないが、これを用いると誤差を過小評価することになるので用いるべきではない。特に、縦緩和速度を決める場合、『十分に磁化が戻っていない可能性』を考えて、式3を用いるかもしれない。しかし、蛋白質の¹⁵N緩和で多く用いられているFreeman-Hill法を用いた測定では、磁化が I^0 から I^0 へ戻る形でなく、 I^0 から0へ減衰するような結果を得るので、『十分に磁化が戻っていない可能性』を考える必要はない^[24]。

5. ノイズ誤差とフィット誤差

緩和速度が上記のように求まった後、次にその誤差を推定する。これには、モンテカルロ-シミュレーション法を用いることが多い^[25]。まず、上記、4節で得られた I^{fit} と $R_{1,2}^{\text{fit}}$ を用いて、各 t_{relax} での理想的な信号強度 $I^{\text{fit}}(t_{\text{relax}})$ を逆算する。その理想的な信号強度を平均値として、信号強度がその『誤差』すなわち ΔI を標準偏差とする正規分布で表されるような変位をもつと仮定した、100個程度の $I(t_{\text{relax}})$ のセット(各セットは、 t_{relax} の異なる総計 N_{relax} ポイントの信号強度で与えられる)を『合成』する。そして、この合成された(つまり、誤差を人工的に含む)データセットについて、それぞれ I^0 と $R_{1,2}$ を決定し、その平均値と標準偏差を求める。4節と区別するために、こうして得られた合成データの I^0 の平均値と標準偏差を、 $\langle I^{0\text{syn}} \rangle_{\text{ave}}$ と $\langle I^{0\text{syn}} \rangle_{\text{std}}$ とし、 $R_{1,2}$ の平均値と標準偏差を $\langle R_{1,2}^{\text{syn}} \rangle_{\text{ave}}$ と $\langle R_{1,2}^{\text{syn}} \rangle_{\text{std}}$ と表記することにする。各信号強度の誤差が本当に実験ノイズだけからなり、真の値に対して正規分布で表される場合には、得られた I^0 と $R_{1,2}$ の平均値は、実際の実験データから4節で得られた I^0 と $R_{1,2}$ にそれぞれ一致するはずである。つまり、

$$\begin{aligned} \langle I^{0\text{syn}} \rangle_{\text{ave}} &\approx I^{\text{fit}} \\ \langle R_{1,2}^{\text{syn}} \rangle_{\text{ave}} &\approx R_{1,2}^{\text{fit}} \end{aligned}$$

となるはずであり、 $R_{1,2}^{\text{fit}}$ の誤差を $\langle R_{1,2}^{\text{syn}} \rangle_{\text{std}}$ と推定する。

$$\Delta I^0 = \langle I^{0\text{syn}} \rangle_{\text{std}}$$

$$\Delta R_{1,2} = \langle R_{1,2}^{syn} \rangle_{std}$$

さて、この操作の中で、信号強度の『誤差』を仮定して、合成データを作る際、『誤差』(ΔI)の見積もり方法は二通りある^[23](図2)。

(A) ノイズ誤差：NMRスペクトルノイズの二乗平均平方根偏差 (Root-Mean-Square Deviation) を用いる^[25, 26]。

(B) フィット誤差： N_{relax} 個の、実験で観測された信号強度と $I^{fit}(t_{relax})$ の差の、平均値、 $\langle I^{exp}(t_{relax}) - I^{fit}(t_{relax}) \rangle_{ave}$ を用いる^[27]。

もし、実験値の誤差がスペクトルのノイズのみに依存する場合 (= 偶然誤差)、どちらの方法でも同じ ΔI 値を得る。一方、実験値の誤差が、スペクトルのノイズだけにとどまらない場合、たとえば、系統誤差や、フィットモデルの不適合性がある場合、(B) で得られる ΔI は、(A) で得られる ΔI より大きくなる。つまり、(A) は実験ノイズの寄与だけを含むが、(B) は、単一指数関数 (= モデル) からのずれをすべて含む。また、同じ t_{relax} でのデータを複数回は測定し、その平均誤差を評価する方法もあるが、その場合でも、 t_{relax} 依存の系統誤差は反映できないという点では、(A) に近い方法になる^[25, 28]。

この2種類の誤差が大きく異なる例として、高磁場での Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) R_2 を図3に示す。観測中心から離れるに従って、CPMGパルスの効果が不十分になるので、スペクトルのノイズによる誤差は変わらないが、off-resonance error と呼ばれる系統誤差が増大するため、フィット誤差が大きくなる^[12]。このように2種類の誤差を比較することによって、実験で予測していない誤差が含まれているかを検証することができる^[23]。

6. NOE の不確かさ

{¹H}-¹⁵N NOEの実験については、十分に実験の繰り返し時間を持って、また適宜なパルスシーケンスを用いて、測定したと仮定しよう^[20]。または、磁気回復の時間が不十分でも、それを補正したとしよう^[18, 19]。その{¹H}-¹⁵N NOEの値は、NOE効果のあるスペクトルとないスペクトルでの信号強度比、 $NOE = I_{NOE}/I_{NON}$ 、で得られ、スペクトルノイズだけを誤差の要因とすると、NOEの誤差、 ΔNOE は

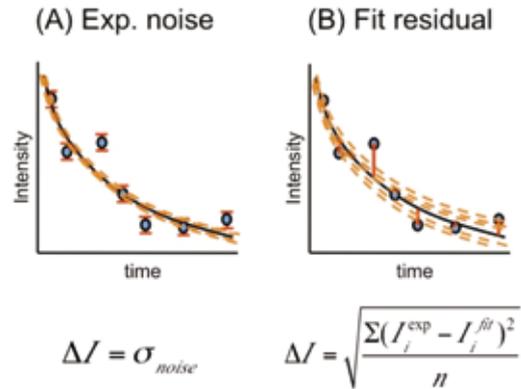


図2 (A) ノイズ誤差と (B) フィット誤差。誤差 (ΔI) として、二通りの見積もり方がある^[23]。

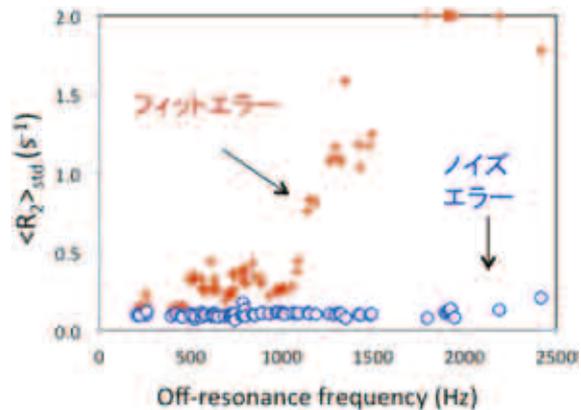


図3 ユビキチンの¹⁵N CPMG R_2 に対するノイズ誤差とフィット誤差。測定は900 MHzで行われ、観測中心からのずれ (off-resonance frequency) を強調するため、¹⁵N観測中心は130 ppmとした^[23]。

$$\Delta NOE = \frac{\Delta I}{I_{NON}} \sqrt{1 + \left(\frac{I_{NOE}}{I_{NON}} \right)^2} \quad (4)$$

となる^[29, 30]。ここでは、どちらのスペクトルのノイズも同じだと仮定した ($\Delta I = \Delta I_{NOE} = \Delta I_{NON}$)。また、2つのスペクトルの誤差に相関はないとした。こうしたスペクトルノイズからの誤差推定には、磁気回復の不十分さや、ピークどうしの多少のオーバーラップによる誤差、サンプルの不安定性などは反映されない。こうした誤差の過小評価のため、むしろ、スペクトルを検証して、一定の誤差を推定することもある^[31]。

3節で述べたように、ピーク値強度の検出には、ノイズを取り除いた強度 (ピークを放物線型に補間した上でのピーク値を計算するなど^[21]) を用いる場合と、ノイズを取り除く前の強度を扱う場合がある。{¹H}-¹⁵N NOEの場合は、この強度比をそのままNOEとするので、それ自体が正しくあるべき、つまり、補間したピーク値を用いるべきである。も

し、ノイズを取り除く前の強度を用いる場合には、ピーク値一点ではなく、2~3点の平均値を用いて、ずれの大きなNOE値にならないようにすべきである。一方、縦横緩和速度の決定の場合は逆になる。信号強度を用いて、緩和速度の決定とともにその誤差推定を行うので、もし、強度検出のソフトウェアを用いて、ノイズを取り除いた強度を計測し、それを緩和速度決定に用いると、(B)のフィット誤差を見積る場合、フィット誤差内にあるノイズ誤差が過小評価される。緩和速度の決定の場合には、ノイズを取り除く前の信号強度を用いたほうがよい。

7. まとめ

以上、簡単に、蛋白質主鎖の運動性を得るためにしばしば用いられる¹⁵N核の緩和(R_1 , R_2 , {¹H}-¹⁵N NOE)のデータ解析についてまとめた^[13]。既存のソフトウェアが用いられる昨今、そのデータ解析の詳細はユーザーにとっては、わかりにくくなってきているかもしれない。しかし、このように、一步一步、得られたスペクトルを解析していくことで、エラーバーに見えない最終誤差を減らすことができる。

8. 米国大学の研究環境

ピッツバーグ大学に移って、7年になる。本稿はじめに書いたように、これまで私は蛋白質のNMR緩和関係の研究に長らく携わり、微々たるものながらも、この分野に一定の貢献をしてきたと思っている。NMRがルーチン化されてきた現在、それ自体の研究が必要でなくなる一方、ルーチン化ゆえに見えない誤差が多くなった。私の研究室では、こうした緩和誤差の研究と、蛋白質の構造、内部運動、リガンド相互作用の研究をしている。

さて、こちらのシステムの場合、大学4年を卒業してすぐの学生もいる一方、かなりの研究経験をもって博士課程に入学する学生も多く、当然、博士号取得までにかかる年数も人それぞれになる。しかしながら、彼らを見て共通していることは、まず、与えられた課題や、今ある問題に真剣に取り組むことのできる学生が伸びる。じっくりと考えると、おのずから結果が出るものだと思う。それはハイインパクトのジャーナルに掲載される内容にはならないかもしれないが、自分でじっくりと考えて得た結果は、サイエンスにおいては同じく大事であるし、研

究者になるためのステップとしては必要不可欠である。米国に滞在してよかったことを1つ言えば、考えの違う人、教育背景の異なる人に、どう物事を説明するかを考える機会を多く得たことだろう。インターネットでやりとりできる現在、必ずしも、海外留学は必要ないかもしれないが、日常の時間の使い方、ノート付けから、デスクの片付け、議論になる前の議論など、人々と接することで得るものは多い。

参考文献

- [1] Akke, M. and Palmer, A.G., Monitoring Macromolecular Motions on Microsecond to Millisecond Time Scales by $R_1\rho$ - R_1 Constant Relaxation Time NMR Spectroscopy. *J Am Chem Soc.*, 1996. **118**, 911-912.
- [2] Li, Z., Raychaudhuri, S., and Wand, A.J., Insights into the local residual entropy of proteins provided by NMR relaxation. *Protein Sci.*, 1996. **5**, 2647-2650.
- [3] Yang, D.W. and Kay, L.E., Contributions to conformational entropy arising from bond vector fluctuations measured from NMR-derived order parameters: Application to protein folding. *J Mol Biol*, 1996. **263**, 369-382.
- [4] Carver, J.P. and Richards, R.E., General 2-Site Solution for Chemical Exchange Produced Dependence of T2 Upon Carr-Purcell Pulse Separation. *J Magn Reson*, 1972. **6**, 89-105.
- [5] Davis, D.G., Perlman, M.E., and London, R.E., Direct Measurements of the Dissociation-Rate Constant for Inhibitor-Enzyme Complexes Via the T-1-Rho and T-2 (Cpmg) Methods. *J Magn Reson, Ser B*, 1994. **104**, 266-275.
- [6] Orekhov, V.Y., Pervushin, K.V., and Arseniev, A.S., Backbone dynamics of (1-71) bacterioopsin studied by two-dimensional ¹H-¹⁵N NMR spectroscopy. *Eur J Biochem.*, 1994. **219**, 887-896.
- [7] Mulder, F.A., van Tilborg, P.J., Kaptein, R., and Boelens, R., Microsecond time scale dynamics in the RXR DNA-binding domain from a combination of spin-echo and off-resonance rotating frame relaxation measurements. *J Biomol NMR*, 1999. **13**, 275-288.
- [8] Loria, J.P., Rance, M., and Palmer, A.G., A relaxation-compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence for characterizing chemical exchange by NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 1999. **121**, 2331-2332.
- [9] Ishima, R. and Torchia, D.A., Protein dynamics from NMR. *Nat Struct Biol.*, 2000. **7**, 740-3.
- [10] Chang, S.L., Hinck, A.P., and Ishima, R., Model-free analysis for large proteins at high magnetic field strengths. *J Biomol NMR.*, 2007. **38**, 315-324.
- [11] Gong, Q. and Ishima, R., ¹⁵N-{¹H} NOE experiment at high magnetic field strengths. *J Biomol NMR*, 2007. **37**, 147-157.
- [12] Myint, W., Gong, Q., and Ishima, R., Practical aspects of ¹⁵N CPMG transverse relaxation experiments for proteins in solution. *Concepts Magn Reson*, 2009. **34A**, 63-75.
- [13] Ishima, R., Recent Developments in (¹⁵) N NMR

- Relaxation Studies that Probe Protein Backbone Dynamics. *Top Curr Chem*, 2011. **326**, 99-122.
- [14] Mulder, F.A., Skrynnikov, N.R., Hon, B., Dahlquist, F.W., and Kay, L.E., Measurement of slow (microseconds) time scale dynamics in protein side chains by ^{15}N relaxation dispersion NMR spectroscopy: application to Asn and Gln residues in a cavity mutant of T4 lysozyme. *J Am Chem Soc.*, 2001. **123**, 967-975.
- [15] Tollinger, M., Skrynnikov, N.R., Mulder, F.A., Forman-Kay, J.D., and Kay, L.E., Slow dynamics in folded and unfolded states of an SH3 domain. *J Am Chem Soc.*, 2001. **123**, 11341-52.
- [16] Jones, J.A., Hodgkinson, P., Barker, A.L., and Hore, P.J., Optimal sampling strategies for the measurement of spin-spin relaxation times. *J Magn Reson, Ser B*, 1996. **113**, 25-34.
- [17] Jones, J.A., Optimal sampling strategies for the measurement of relaxation times in proteins. *J Magn Reson*, 1997. **126**, 283-286.
- [18] Grzesiek, S. and Bax, A., The Importance of Not Saturating H_2O in Protein Nmr - Application to Sensitivity Enhancement and Noe Measurements. *J Am Chem Soc.*, 1993. **115**, 12593.
- [19] Freedberg, D.I., Ishima, R., Jacob, J., Wang, Y.X., Kustanovich, I., Louis, J.M., and Torchia, D.A., Rapid structural fluctuations of the free HIV protease flaps in solution. *Protein Sci.*, 2002. **11**, 221-32.
- [20] Ferrage, F., Cowburn, D., and Ghose, R., Accurate sampling of high-frequency motions in proteins by steady-state ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ nuclear Overhauser effect measurements in the presence of cross-correlated relaxation. *J Am Chem Soc.*, 2009. **131**, 6048-6049.
- [21] Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A., Nmrpipe - a Multidimensional Spectral Processing System Based on Unix Pipes. *J Biomol NMR*, 1995. **6**, 277-293.
- [22] Clore, G.M., Driscoll, P.C., Wingfield, P.T., and Gronenborn, A.M., Analysis of the backbone dynamics of interleukin-1 beta using two-dimensional inverse detected heteronuclear ^{15}N - ^1H NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 1990. **29**, 7387-7401.
- [23] Myint, W., Cai, Y., Schiffer, C.A., and Ishima, R., Quantitative comparison of errors in ^{15}N transverse relaxation rates measured using various CPMG phasing schemes. *J Biomol NMR*, 2012. **53**, 13-23.
- [24] Freeman, R. and Hill, H.D.W., Fourier Transform Study of NMR Spin-Lattice Relaxation by "Progressive Saturation". *J Chem Phys*, 1971. **54**, 3367-3377.
- [25] Palmer, A.G., Rance, M., and Wright, P.E., Intramolecular motions of a zinc finger DNA-binding domain from Xfin characterized by proton-detected natural abundance ^{13}C Heteronuclear NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991. **113**, 4371-4380.
- [26] Skelton, N.J., Palmer, A.G., Akke, M., Kordel, J., Rance, M., and Chazin, W.J., Practical Aspects of 2-Dimensional Proton-Detected N-15 Spin Relaxation Measurements. *J Magn Reson, Ser B*, 1993. **102**, 253-264.
- [27] Nicholson, L.K., Kay, L.E., Baldisseri, D.M., Arango, J., Young, P.R., Bax, A., and Torchia, D.A., Dynamics of methyl groups in proteins as studied by proton-detected ^{13}C NMR spectroscopy. Application to the leucine residues of Staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 1992. **31**, 5253-63.
- [28] Chazin, W.J., Akke, M., Kordel, J., Palmer, A.G., and Skelton, N.J., Backbone Dynamics of Calbindin-D9k in the Apo and Calcium-Bound States. *Faseb Journal*, 1992. **6**, A144-A144.
- [29] Bevington, P.R. and Robinson, D.K., Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences 1992, New York: McGraw-Hill
- [30] Fushman, D., Weisemann, R., Thuring, H., and Ruterjans, H., BACKBONE DYNAMICS OF RIBONUCLEASE-T1 AND ITS COMPLEX WITH 2'GMP STUDIED BY 2-DIMENSIONAL HETERONUCLEAR NMR-SPECTROSCOPY. *J. Biomol. NMR*, 1994. **4**, 61-78.
- [31] Tjandra, N., Wingfield, P., Stahl, S., and Bax, A., Anisotropic rotational diffusion of perdeuterated HIV protease from ^{15}N NMR relaxation measurements at two magnetic fields. *J Biomol NMR*, 1996. **8**, 273-84.
- [32] Ishima, R. and Torchia, D.A., Accuracy of optimized chemical-exchange parameters derived by fitting CPMG R2 dispersion profiles when $R2(0a) \neq R2(0b)$. *J. Biomol. NMR*, 2006. **34**, 209-219.



伊島 理枝子 (いしま・りえこ)

University of Pittsburgh School of Medicine

1987年 京都大学 理学部卒業

1992年 京都大学大学院理学研究科博士課程修了・博士号取得

1992年 日本電子株式会社

1993年 東京大学非常勤補助職員

1995年 Ontario Cancer Institute, Toronto, ON, Canada (Postdoctoral Fellow)

1997年 NIDCR, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA (客員研究員のち研究員)

2005年 Assistant Professor, Dept. of Structural Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

2012年 Associate Professor, 同上

多核固体NMRの方法

—基礎から最新情報まで、四極子核を中心として—

産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター

高橋 利和

多核固体NMRは種々の目的に用いることができる汎用性の高い測定法である。とりわけ産業界や日常生活で使われている大部分の固体材料を、そのまま測定対象としうるため、学問の世界のみならず産業界や日常生活にもインパクトのある結果を導きうる可能性が大いにある。アモルファスやコンポジット、ポリマーアロイなど複雑な組成をもつ材料を対象にして、その構造の把握や性能との関係について原子分子レベルの詳細な情報を取り出すことのできる数少ない手法のひとつである。

本稿では四極子を含む多核固体NMRの測定について、もっとも一般的かつ基本的に用いられている手法から順に紹介し、事例を紹介しつつ目的に向けてより合理的な手法にたどりつくためのヒントを提示していく。できるだけ初心者にもわかりやすい記述に配慮しつつ、最新手法の紹介まで行うことを目指す。

小文を書くために全般的に使った参考文献をまず最初にあげさせていただく。Abragham著「核の磁性」(吉岡書店 on Demand)はいまだにNMRのバイブルと言ってよい書籍である^[1]。Slichterら「磁気共鳴の原理」(Springer)には現代的な固体NMRで使われている技術の基礎がほぼ網羅されている^[2]。日本化学会編「実験化学講座」は現代的な装置による基本的NMR実験手法と留意すべき点がわかりやすくまとめられている^[3]。Mackenzie, Smithの“Multinuclear Solid-state NMR of Inorganic Materials” Pargamon Pressは無機材料に関する最近の成果が多数掲載されている^[4]。Wasylishchen, Ashbrook, Wimperisの“NMR of Quadrupolar Nuclei in Solid Materials” Wileyは四極子核NMRに関する最新情報の宝庫である^[5]。このほか日本語で書かれた多くのNMR関連の書籍からたくさんのことを学んだ。この場をお借りしてお礼申し上げる。

1. 多核固体 NMR 測定の目的

ひとことで言ってNMRは溶液、固体を問わず主としてケミカルシフト、緩和時間、カップリング情報をもとにサンプル中に含まれる観測目的核をスペクトル上のピークとして分離、検出する方法である。

そもそもNMR実験が与える大半は核種選択的な情報であることはもちろん、核がおかれている環境を反映するケミカルシフトによって分離された成分ごとに相対量、環境、運動性、相関等のさまざまな情報を引き出しうる大きな強みである。感度が低い場合比較的多量の試料と長時間の積算を必要とするなど、弱点もあるが、それを補って余りある特徴を持っている。

構造解析に用いられるのはケミカルシフトおよび四極子相互作用とその異方性、異種核および同種核相関、 T_1 、 $T_{1\rho}$ の測定などがある。化学結合やその性質に対しては J 結合を活用した測定法が、幾何的な距離を決定するためにはREDOR等の手法などがある。NMRは複雑な手法の導入によってより詳細な情報が得られるようになるという特徴を持ち、装置感度の上昇に伴って将来はさらなる詳細化、精密化が可能となることも期待される。

本稿ではとりわけCPMAS, HETCORタイプの実験手法を中心として、さらにその基礎となる手法や感度増大や分解能向上のために併用される様々な手法を合わせて最近の動向を交えながら紹介したい。特に筆者が現在取り組んでいる ^{27}Al ($I=5/2$)について事例をあげながら行う。このためにまず固体NMRにおける四極子核の特徴について述べる。

2. 四極子核の固体 NMR

原子の質量数と原子番号との偶数奇数の組み合わせによって四極子核には I が整数の核と半整数の核とができる(表1)。原子数、原子番号ともに偶数の場合は $I=0$ となりNMRの対象外となる。原

表1 Groups of spin quantum number I of an atom with its atomic number, Z and mass number, A .

Category of Nuclear Spin I		Atomic Number, Z	
		Odd	Even
Mass Number, A	Odd	Half Integer *	Half Integer *
	Even	Integer	0

* Including $I = 1/2$.

子数が奇数である場合、原子番号の偶数奇数にかかわらず半整数となる。ただし、NMRの世界では $I=1/2$ の核をあえて同じ名前と呼ぶことは稀であり、通常 $I=1/2$ の核と呼ぶ。半整数核 ($I \geq 3/2$) は全元素の70%以上にもおよび、測定手法を開発する意味が大きい。

NMRの相互作用を表す一個のスピンに関するハミルトニアンおよびそれが従うHeisenberg運動方程式は下記のように表される。

$$H = H_z + H_K + H_P + H_{CS} + H_D + H_J + H_Q + H_I \quad (1)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} \Phi = -i \hbar [H, \Phi] \quad (2)$$

H_z : Zeeman相互作用、 H_K : Knightシフト、 H_P : 不対電子に基づく常磁性相互作用、 H_{CS} : 化学シフト相互作用、 H_D : 双極子相互作用、 H_J : J-カップリング相互作用、 H_Q : 四極子相互作用、 H_I : 外部電磁場による相互作用。 \hbar : Planck定数、 Φ : スピン系の波動関数

一般のNMR実験においてはこれらのうち H_z (Zeeman相互作用) が最も大きな影響を持つ。 H_z , H_{CS} , H_D , H_K , H_P についてはその起源や大きさ、異方性とその時間的変動の振幅と頻度などが異なるだけで、各瞬間を見れば核から見た外部磁場の大きさと向きに若干の影響を与えているに過ぎない。 H_J については原子核の位置における電子の存在確率が影響するので外部磁場とは言い難いが、結果的には化学結合によって結ばれたスピンによる数Hzから数1000Hzのケミカルシフト分の磁場が外部的につけ加わったのと同じ効果を与える。ところが以下に述べるように H_Q だけは異なる。

スピン $I=0$ または $1/2$ の核種は球対称な電荷分布をもつため、四重極モーメントはゼロである。一方スピン $I > 1/2$ の核種は原子核の電荷分布が球対称から逸脱しているためその四重極モーメントはゼロではない有限な値を有し、四極子核と呼ばれる。

このため、二次の電場勾配との相互作用が各スピン状態にそれぞれ異なる影響を及ぼす(なお、原子核は常時一次の電場勾配=0となる位置に存在するため一次の電場勾配は影響しない)。四極子相互作用のハミルトニアンを具体的に式で表現すると下記のようになる。

$$H_Q = \frac{eQ}{2I(2I-1)} \mathbf{I} \cdot \mathbf{V} \cdot \mathbf{I} \quad (3)$$

\mathbf{V} : 電場勾配テンソル、 \mathbf{I} : スピン

静電場が磁化と直接作用する事実は不思議に思えるが、原子核の形状とそれが持つスピンの方向との間には決まった関係があると考えれば理解できる。この性質のために四極子核は磁場がないときでも、たとえば $I=3/2$ の場合 $I_z = \pm 1/2, \pm 3/2$ の2状態に分裂していて、電磁波を用いてこの2状態間の遷移を観測することが可能である。この手法は核四重極共鳴と呼ばれ、特に ^{14}N 等について有効な手法として用いられている。高分解能NMR装置中では核スピンと主磁場とのゼーマン相互作用はスピンが感じる磁気相互作用の中で最も強いので、各スピンは主磁場に沿って磁化されており、時々電磁波を吸収放出して向きを入れ替えるほかは、分子がどのように向きを変えようともジャイロのように磁場に追従して分子との相対方向を変えている。したがって自然に我々は分子がどれだけ自由に動き回ってもスピンは主磁場に対して上向きか下向きかのいずれかの状態で歳差運動しているイメージを思い描く。しかし四極子モーメントをもつ原子核のスピンは外部磁場がない場合は、周囲の電場勾配、すなわち分子構造に影響を受けて一定の力の下で配向している。核が高磁場中にある時はZeeman相互作用が勝ってこの影響は相対的に小さくはなるが、なお残っており、このことが四極子NMRを複雑にしている。

磁場の中におかれた $I = n/2$ の核はZeeman相互作用によって $\hbar\omega = \hbar\gamma B$ だけのエネルギーギャップ

によって隔てられた $n+1$ 個の状態に分裂する。各状態はスピン量子数の主磁場に平行な成分 I_z によって特徴づけられ、 $I_z = -n/2$ から $n/2$ までの値をとる (図1)。

実際にワンパルスNMRの例として $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ の例を図2に示す。中央の大きなピークがCT (Central Transition) ($-1/2 \rightarrow 1/2$) に対応し、それ以外の遷移はST (Satellite transition) と呼ばれ、周辺の多数のひげ状のピークを形成する。中央の遷移だけは一次の四極子結合の影響を受けないがSTはその影響を受けて広く分布する。ベースラインのうねりに

ついては後程説明する。

二次の電場勾配は二階のテンソル量であるが、主軸変換によって V_{xx} , V_{yy} , V_{zz} の対角成分にまとめられる。このときこの電場勾配のもつ主軸座標系はPAS (Principal Axes System) と呼ばれる。いくつかのコンベンションがあるが、通常 $V_{zz} \geq V_{xx} \geq V_{yy}$ ととる。核の位置にはほかの荷電粒子による電場は存在しないためLaplace方程式より $V_{xx} + V_{yy} + V_{zz} = 0$ が成立するので、これらのパラメータのうち2個だけが自由に決定される。通常は四極子相互作用 eq ならびにその異方性 η のふたつのパラメータが四

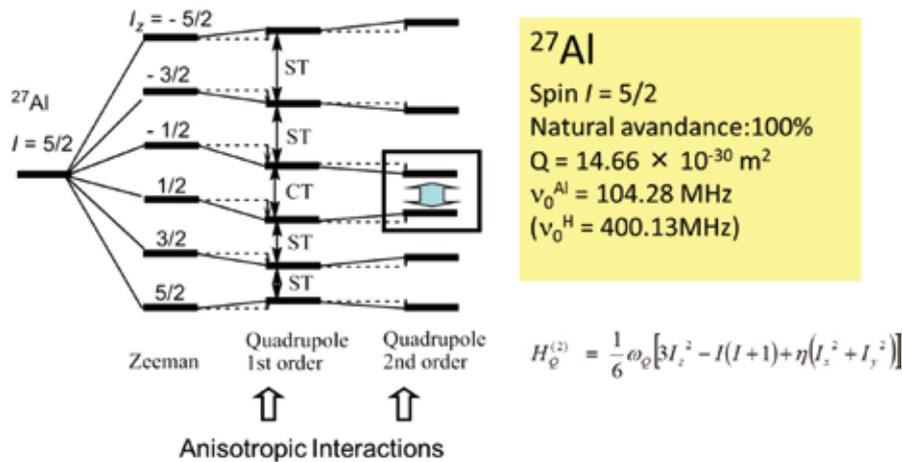


図1 Schematic diagram of quadrupolar interactions in each state of ^{27}Al . Note that the direction of anisotropic interaction brought by $H_Q^{(2)}$ is having the opposite signs, which can be used for refocusing quadrupolar anisotropy such as DAS and MQMAS. A simple reason that causes the easy magnetization leak is intersystem crossing during the rotation.

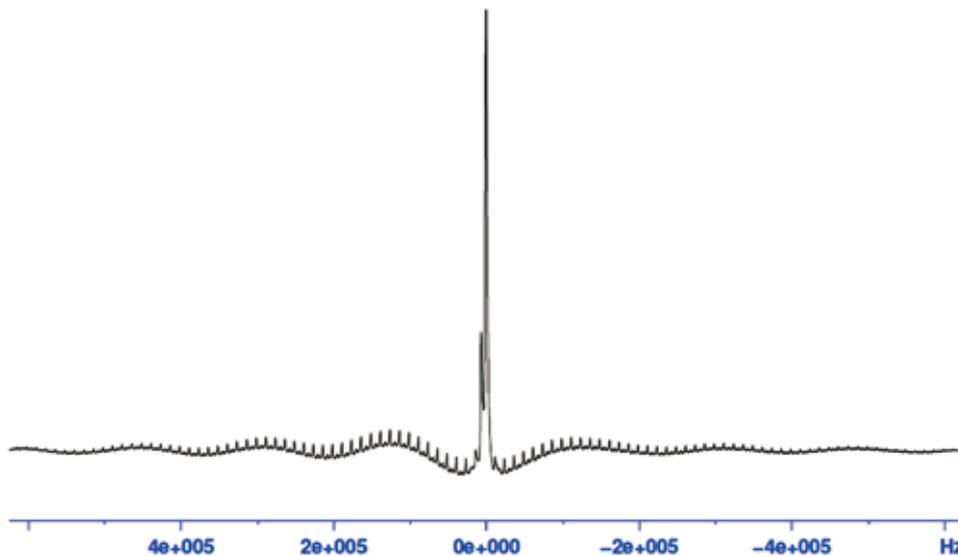


図2 ^{27}Al MAS NMR spectrum of Al_2O_3 using 12° flip angle. The curve of the baseline is in good coincidence to the SINC function, $y = -\text{Sin}(\omega/\Delta\omega) / (\omega/\Delta\omega)$, where $\Delta\omega = 2\pi \times 16.67$ kHz, which is just the same value to $1/(\text{dead time})$. The spectrum of 2 MHz width is taken by $0.2 \mu\text{s}$ of a rectangular pulse at the pulse power $\nu_1 = 167$ kHz, sample rotation $\nu_R = 12.5$ kHz. Much numbers of ST signals spread over a range of 2 MHz width can be seen.

極子場を特徴づけるために用いられる。

$$eq = V_{zz}, \eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}} \quad (4)$$

と表され、(3)、(4)より

$$H_Q = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} [3I_z^2 - I(I+1) + \frac{1}{2} \eta (I_+^2 + I_-^2)] \quad (5)$$

途中の計算は省くが結果的にCTの共鳴周波数として最終的に下式のようにまとめられる。

$$\begin{aligned} \nu &= \frac{\nu_Q^2}{\nu_L} \\ &= A_0 + A_2(\theta, \phi) P_2(\cos^2 \beta) + A_4(\theta, \phi) P_4(\cos^4 \beta) \end{aligned} \quad (6)$$

四極子核のピークは ν_Q^2/ν_L 真のケミカルシフトからずれて観測される。

(5)式で表される四極子結合の大きさを表現するパラメータとして四極子結合定数 Cq (Q_{cc})、四極子分裂 ν_Q 、四極子パラメータ P_Q などが用いられる。それぞれ下式で書かれる。

$$Cq = e^2 Q V_{zz} / h \quad (7)$$

$$\nu_Q = \frac{3e^2 Q_{cc}}{2I(I-1)h} \quad (8)$$

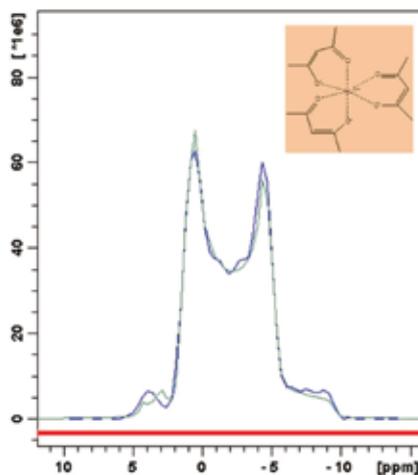
$$P_Q = Cq \sqrt{1 + \eta^2/3} \quad (9)$$

このうち実験的には P_Q が最もよく使われる。(6)式の角度依存性の複雑な計算は成書に委ね、結論だけを述べると、静磁場が主軸座標系に対して (θ, ϕ) の方向を向くとき、一次の四極子相互作用の方向依存性は双極子相互作用と同様に $Y_{2,0}[\theta, \omega]$ 型(d_z^2 軌道型)の依存性が得られるのに対し、二次の四極子相互作用による方向依存性は $Y_{4,0}[\theta, \omega]$ 型(g_z^4 型)の依存性が現れる。前者はMASで平均化することによって消去することが可能だが後者はMASで若干相互作用が縮小するものの完全に消去することができない。そこで結晶中の単一のサイトであっても複雑な形状を持ったピークとしてのみ観測される(図3)。

結晶については四極子相互作用としては上記の2つのパラメータの他に α, β, γ (PASに対するケミカルシフトの主軸を表すためのオイラー角)がある。

二次の四極子シフトの値は大きな磁場を用いるほど小さくなるのがわかる。 δ_{iso} と表現される等方性ケミカルシフトを得るためには四極子核の場合磁場強度を変えて複数回測定するか、線形を解析するか、次に述べるMQMAS、STMAS等を用いるかのいずれかによらなければならない。

二次の四極子相互作用を狭い線幅にまとめて観測するための手法が種々開発されている。歴史的にはDOR法(DOuble Rotaion Method)、DAS法(Dynamic Angle Switch Method)が開発された^[3,4]。これらの手法はそれぞれ特殊なプローブを必要とし、条件設定も必ずしも容易ではないという問題点があった。最近では通常のMASプローブでも実行可能なMQMAS、STMAS法が頻繁に使われるようになってきている。



NMR parameters obtained by a line-shape analysis

Simulated Data

$$\delta_{iso} = 3.1 \text{ ppm}$$

$$\delta_{CSA} = 14.68 \text{ ppm}$$

$$\eta_{CSA} = 0.3$$

$$C_Q = 2990 \text{ kHz}$$

$$\nu_Q = 450 \text{ kHz}$$

$$\eta_Q = 0.135$$

$$\text{exponential decay} = 29 \text{ ms}$$

図3 Experimental (thick line) and simulated data (pale line) CT (central transition) band of ^{27}Al MAS NMR of $\text{Al}(\text{acac})_3$. $\omega_R = 12.5 \text{ kHz}$, $\omega_1(\text{Al}) = 167 \text{ kHz}$, pulse width = $0.2 \mu\text{s}$

種々の手法、コンベンションが編み出されているが筆者の経験ではz-filterを用いるMQMAS、感度を高めるためにSPAM (Soft Pulse Added Mixing) を併用したMQMAS、STMASなどが比較的容易に実行でき、かつきれいなチャートが得やすいと感じている。これらの手法については高橋、金橋の総説に詳しい^[5]。STMASはMQMASに比べて感度が高いため、調整が容易な場合には有力な手法となりうる。ただしmagic angleの精度は 0.003° という地球から金星を望む角度よりも狭い範囲にMASの軸を合わせこまなければならない。STMASは概してST信号が出にくいサンプルでは難しく、分子運動によってかえってブロード化してしまう例も知られている。STMASはDQF (Double Quantum Filter) を組み合わせる方法が最も感度が高いとされ、 ^{27}Al 等 $I=5/2$ の核の場合、四極子パラメータの分解能については5QMQMASが最も優れた結果を出している^[6]。

四極子結合定数は電場の二次の勾配の最大のも

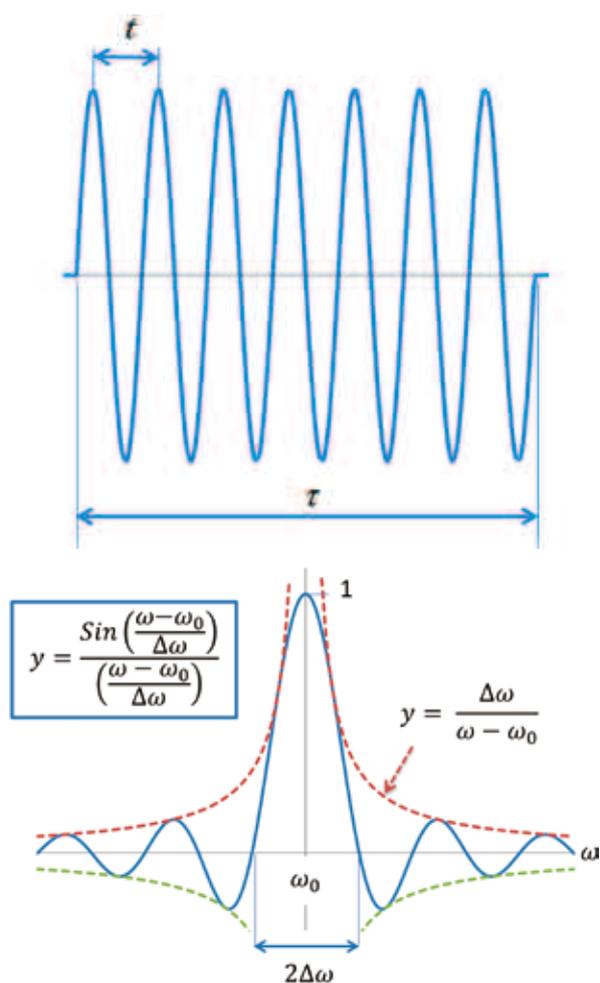


図4 Pulse shape having a rectangular envelope (upper) and the frequency profile of its Fourier transformation (lower), where $\omega_0 = 2\pi/t$ and $\Delta\omega = 2\pi/\tau$.

のを表現するのでサイトの電場歪の大きさを表現しているはずである。サイトの電場歪の原因としては配位子の電荷バランスと配位子場の歪のふたつの要因が主に影響していると考えられる。これらの要素を明らかにするために点電荷モデルなどによって四極子核の周囲に荷電粒子を設置したモデルを人工的につくり、四極子結合定数を計算して導き出すなどの工夫が行われている^[7]。

アモルファスにおいてはケミカルシフトのみならず四極子定数にも分布が発生する。この場合、四極子パラメータが正規分布をもって分布すると仮定したとき、スペクトル上のピークは見かけ上低振動数側に流れるような形になることが知られている。具体的な数式モデルがDominique Massiotらによって与えられている^[8]。

3. 多核固体 NMR の方法

(1) ワンパルス実験：NMRのもっとも基本的な方法
溶液、固体を通じてNMRの最も基本的な手法はワンパルス実験である。

NMRの矩形パルスに含まれる周波数成分を図4に示す。照射されている電磁波のFourier変換はその中心を搬送波の周波数とし、振幅の周波数依存性はエンベロープである矩形波のFourier変換に相当するSinc関数 (Sinx / x) の形に広がる。この関数が適度な広がりをもつことで、一定範囲のシグナルを一度に励起してスペクトルを取得することが可能となっている。この広がり程度は振幅0の線を切る点がちょうど矩形波の長さの逆数になっている。

パルスの非理想性の他に観測装置の非理想性も無視できない問題を与える。プローブやプリアンプ等の信号装置には必ずデッドタイムが設けられている。このデッドタイムはちょうどその負の矩形波近似のフーリエ変換である、 $-\text{Sinc}$ 関数の形にベースラインをひずませる。したがってNMRのどの実験においても得られる信号のベースラインは実はSinc関数型に波打ったものとして観測される。このような波うちはあとからスプライン曲線や多項式によるベースライン補正で取り除くのが一般的であるが、幅が限定されていれば、あるいはデッドタイムが十分に小さく、かつスペクトル幅が一定範囲内に限定されていれば一次までの位相補正で完璧に補正することが可能である。

四極子核の場合、スピン $1/2$ 核とは異なり、四極子相互作用の影響でNutationが複雑な挙動を示

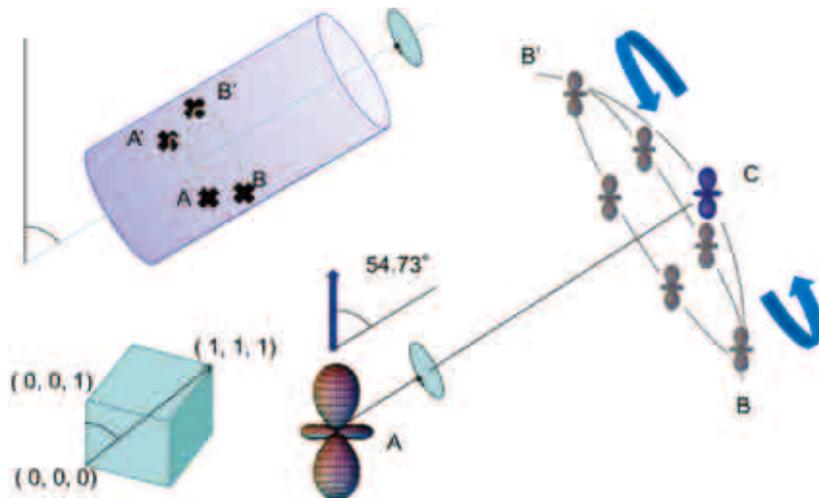


図5 What is MAS, “magic angle spinning”? The magic angle, 54.73° , is the angle between the two vectors, $(1, 1, 1)$ and $(0, 0, 1)$, in a 3 dimensional space. The angle is the same as the angle between the z-axis and the node plane of d_z^2 function (Spherical harmonic function, $Y_{2,0}[\theta, \phi]$). Here we consider the electromagnetic interaction between A and B. When the relative vector $A \rightarrow B$ rotates around the MAS axis, the average position of the B from the fixed view point on A will be the position C, just located on the A's magic angle axis on which the mutual dipole interaction between A and C becomes zero.

す。四極子核の ν_1 (Nutation Rate) については四極子の影響のない溶液サンプル等を用いて定義される。実際にワンパルス実験を行う際は 15° flip角やそれ以下の短いパルスを用いることによって、極力Nutationの違いによる影響が出ないように工夫されている。

ここまでワンパルス実験について長々述べたが、NMR実験では定量性を期待する場合、 T_1 (縦緩和時間) $\times 5$ 倍という十分な待ち時間をとったワンパルス実験のデータを用いるしかない。 T_1 はサンプルや不純物、温度などによって変化し、ものによっては数分から数時間に上る。混合物を純物質に分離したりアモルファスを複数成分に分離して観測したりする際にも量的な根拠については必ずワンパルス実験に立ち返ってそのシグナル分離に求めざるをえない。四極子核についてもワンパルス実験がすべてのNMR実験の基本であり、これを正しく取得することがまず第一歩となる。

(2) Echo(ベースラインの歪を回避)

Echoは $90^\circ - \tau - 180^\circ$ とパルスを与えて τ 後にリフォーカスされる。 τ は最低 $10 \tau_s$ 程度とればよい。 $90^\circ_x - \tau - 90^\circ_y$ のパルスシーケンスはsolid echoと呼ばれ、四極子核もしくは双極子結合した2個の $1/2$ スピンについてエコーを結ぶことが知られている。これらの実験はいずれもエコートップからデー

タ取得を開始することが重要である。

(3) MAS: 異方性相互作用の大幅な低減

前項、前前項の内容は静止サンプルについても回転サンプルについても用いるため、あえてMAS (Magic Angle Spinning) については書いていなかったが、MAS法は固体NMRの有用性を劇的に引き出したと言える。 54.732° というmagic angleは数式的には

$$3\cos^2\theta - 1 = 0 \quad (9)$$

の解として与えられるものであり、幾何学的には $l_x = l_y = l_z = 1$ の立方体の原点から $(1, 1, 1)$ に向かうベクトルのz軸、または $(0, 0, 1)$ ベクトル等との間になす角と等しい。あるいは2次の球面調和関数 $Y_{2,0}[\theta, \phi]$ の節面の方向とも一致している。この関数は化学者にとっては d_z^2 軌道としておなじみの方向依存性をもつ。

MASによる双極子相互作用の平均化の数式による説明は成書にお任せし、ここでは直観的な理解を助ける概念図を示す(図5)。

MAS環境下において、Aにある核もBにある核も最大の相互作用であるZeeman相互作用に基づいてz軸方向(またはその反対向き)に磁化している。したがって、AとBとが互いに異種核の場合、

歳差運動の周期が異なるため、z軸方向を向いた平均磁化ベクトル間の相互作用だけを問題にすればよい。ローター内のAの位置にある核にとってBの位置にある核の相対運動は常にAを中心として磁場に対してmagic angleだけ傾いた軸を中心にした回転運動となる。回転速度が十分に速い場合、Aの核にとってBの核の平均位置はC軸周りの位置が平均化されて軸上にある場合と同じ成分だけが残る結果、双極子モーメントが図のCの位置にある場合と同じ効果だけが残るだろう。このAとCの位置は互いを結ぶベクトルがちょうど双極子相互作用がゼロとなる面の方向に合致しているため、双極子双極子相互作用は消去されると考えることができる。

(4) CPMG法 (T_2 取得、感度増大法)

Carr-Parcel-Meiboom-Gillの開発者4名の頭文字をとって命名された方法である^[2]。まずEchoを取得する方法と同様に $\pi/2$ パルス照射後、時間 τ において π パルスを与え、Echoを取得し、Echo終了後ふたたび 180° パルスを与えて再度リフォーカスする。これを繰り返していくつものエコー・トレインを生成させ、目的のEchoのピークトップからFIDを取得してフーリエ変換する手法である(図6)。CPMG法によって得られる緩和時間はエコー・トレインの間隔を縮めていった極限では T_2 に一致するので、十分に τ を短くとした段階で十分な時間をかけて測定したシグナルの線幅を観測すれば T_2 の逆数が得られる。

この手法はしばしばシグナル感度増大のために

活用される。特に四極子核を対象として行われる場合QCPMG法と呼ばれる(図6)。感度増大のためにできるだけ行うべきことは 90° パルス照射直後に発生するFID減衰曲線の先端から信号を取り込み始めることである。これによって単位時間あたりに取得できるS/Nゲインは約2倍に向上するとされる。実際には π パルスを複数回にわたって繰り返し照射し続けることによるノイズの上乗せもあるため、S/Nの増大は目減りする。CPMG法によって得られるデータはこのためCPMAS実験などにおける条件設定の際、有利に用いられる。

QCPMG法で得られるピークは一見MASのパターンに近い櫛状のシグナルを与えるが、MASのそれとは異なり、 δ_{iso} を反映しない。照射位置を中心周波数として周辺のシグナルが $\pm\Delta\nu$ ($\Delta\nu=1/\tau$: τ は π パルス照射間隔)の位置に寄り集まって見出されているに過ぎない。したがって、すべてのシグナルは同一の櫛状のシグナルの列中に混入している。

分解能は限られているがSkyline projectionと呼ばれるCPMGの櫛状パターンのピークトップをなめらかにつないでシグナルを表現する方法は幅広いシグナル形状を感度高く取得するために用いられる。

(5) CPMAS(四極子核も含む)

通常のCPMAS実験は2つの理由によって測定感度の向上に寄与する。ひとつは ^1H の磁気回転比が大きく100%近い天然存在比でかつ多量に存在する

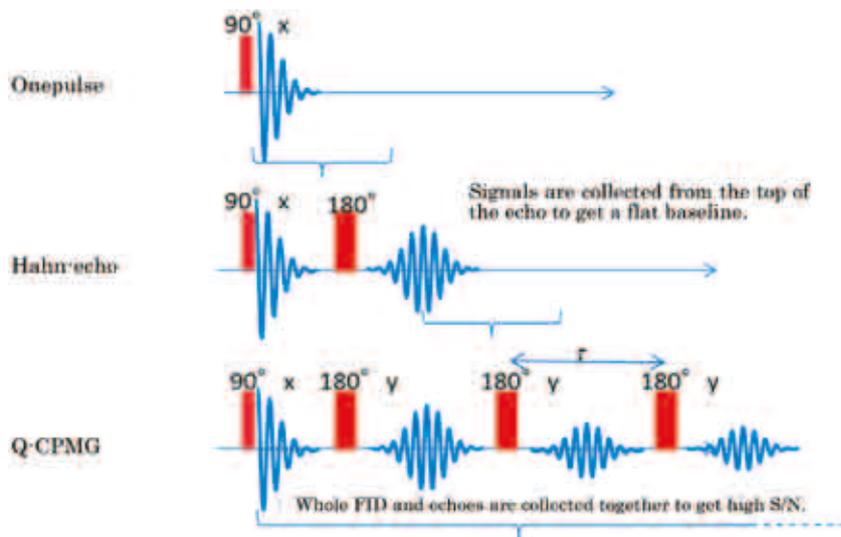
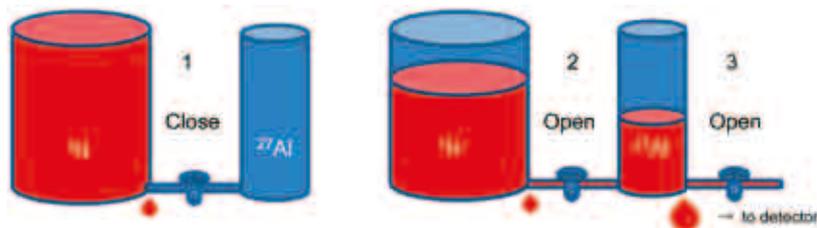


図6 The difference of Hahn echo and Q-CPMG. When FT has been done for the Q-CPMG data, the signal envelope will be the same shape as the FT of one pulse FID, having the line width and the spacing of comb pattern will be $1/T_2$ and $1/\tau$.



1. Initialize magnetization → 2. Hartman-Hahn matching → 3. Detection

図7 Model for CP (cross-polarization) magnetization transfer from ^1H to ^{27}Al . Red fluid represents transverse magnetization on each the nucleus. Inevitably, much a larger part of the magnetization flows out of ^{27}Al reservoir, because of its quadrupolar nature.

豊富な磁化を、より磁気回転比が小さく、数も少ない ^{13}C などに移動させることによって ^{13}C を直接励起する場合よりも大きく磁化させること。ふたつめは ^1H のより短い緩和時間を利用して単位時間当たりの繰り返し頻度を高め、S/N向上に役立てうるからである。 ^1H - ^{13}C CPMAS実験においては ^{13}C の緩和時間を気にする必要はなく、 ^1H の緩和だけを待てばよい。なぜなら Spinlock によってそれまでに持っていた磁化は完全にデフェーズされるからである。さらに付け加えるなら入口の ^1H は双極子相互作用によってブロードに広がった磁化であるのに対し、出口側の ^{13}C は T_2 が長いので、シャープなシグナルとして得られることもこの手法の有用性を高めている。

双極子-双極子相互作用によって磁化移動を引き起こすためには磁化の入口側、出口側の核種に対して、Hartmann-Hahn のマッチング条件を満たすように同時に Nutation を起こさせることで可能となる。図7はこのことを模式図で2種の磁化溜めの間のバルブの開閉に例えている。この際、Source 磁化側には 90°_x パルス → Spin Lock (y) を適用して作り出した横磁化を用いる。

ここでは特に四極子核を含む CPMAS について述べる。四極子とそうでない核種との磁化移動を実施する際、四極子側を初期磁化に使うことにメリットがある。四極子核は緩和時間が短く、次のパルスシーケンスを開始するまでの待ち時間を短くできることがその理由である。

四極子核の CP については CT 帯 (Central Transition) の磁化を $I=1/2$ 核の場合と近似して考えることができる。ただし四極子核の Nutation そのものが $I=1/2$ 核とは異なり限られた範囲でしか周期的な符号の交替を示さない。これはそもそも四極子核には磁場がかかる以前から四極子相互作用によるエネルギー準位の分裂が存在し、影響するからで

あると考えられる。

四極子核の Spinlock においては Adiabaticity と呼ばれる下記のパラメータが重要とされる^[9]。

$$\alpha = \frac{\nu_1^2}{\nu_R \nu_Q} \quad (10)$$

CPMAS を実現するためにはこの α が 1 より大きいかわ小さいかのいずれかがよい。十分に大きい場合は断熱的に ν_1 によって磁化が制御され、はるかに小さい場合は平均化によって磁化が維持される成分だけが選択される。 $\alpha = 1$ 付近の場合は回転と Nutation が四極子と干渉する可能性が高い。

四極子核を含む CP 実験を行う際は、まず四極子核の Spin Lock で磁化が長時間持続する条件を選び、その中で Hartmann-Hahn の条件に合致する相手核側の Spin Lock 条件を見出すことが重要になる。例えば ^{27}Al - ^{29}Si CPMAS の実験条件に関しては ^{27}Al 側の Spinlock を 1 kHz またはそれ以下という弱いパルスで行い、 ^{29}Si 側は ν_R ν_{Al} に設定する必要がある^[10]、これ以外の条件でうまくいくことは稀である。

^{27}Al 等四極子核を磁化源として用いる場合に用いることのできるシグナル増大法として四極子核のポピュレーション操作に基づく手法が複数選択できる。RAPT (Rotor-Assisted Population Transfer^[11])、DFS (Dual Frequency Sweep^[12])、FAM (Fast Amplitude Modulation^[13]) 等である。いずれも ST 帯に影響を及ぼしてポピュレーションを CT 帯に集めようとするもので、DFS が最も効果が高いとされる。しかしながら 50 ms に一回くらいの繰り返し頻度にふさわしい手法は RAPT のみであるため、CPMAS の初期磁化形成のためには専ら RAPT が用いられる。

CP は正方向だけでなく、逆方向にも起こすこと

ができる。 $^1\text{H} \rightarrow ^{27}\text{Al}$ と $^{27}\text{Al} \rightarrow ^1\text{H}$ のCPMASは同じ spinlock 条件にて双方とも観測することが可能である。 $^{27}\text{Al}-^1\text{H}$ STMAS \rightarrow CP \rightarrow DUMBOのような手法で ^{27}Al 側、 ^1H 側双方を高分解能化する実験が行われている。また $^{27}\text{Al}-^{11}\text{B}$ 、 $^{23}\text{Na}-^{17}\text{O}$ など四極子核間のCPMASも試みられつつある^[14]。

(6) HETCOR

Hetero-Correlation スペクトラム、略称HETCORはその名の通り2種の異なる核種間のシフト相関2Dスペクトラムを指す。HETCORは溶液でも用いられる場合があり、その場合、二つの核種間の相互作用としては J カップリングに基づくINEPTライクな磁化移動が用いられる。一方、固体の場合には一般的に双極子-双極子相互作用に基づくCPによ

る磁化移動が用いられる。F1軸側の展開は 90° パルス打ってからSpin lockするまでの待ち時間を用いる場合(HETCOR without decoupling)と ^1H の磁化にFSLG(Frequency Shifted Lee-Goldburg^[15])パルスシーケンスやDUMBO^[16]など $^1\text{H}-^1\text{H}$ 双極子相互作用を消去するパルスシーケンスを打って ^1H の磁化を分離しつつ ^{27}Al に移動させて観測する手法とがある。

コンタクト時間を長くするとせっかく切断した ^1H 間相互作用が復活してしまう場合があるので、 $200\ \mu\text{s}$ 以下の短い接触時間を設定することが好ましい。このためどうしても感度には一定の制限が付きまとう。

FSLGシーケンスを用いて2D測定を行う場合はLGシーケンス=照射中心をシフトさせたペアのパ

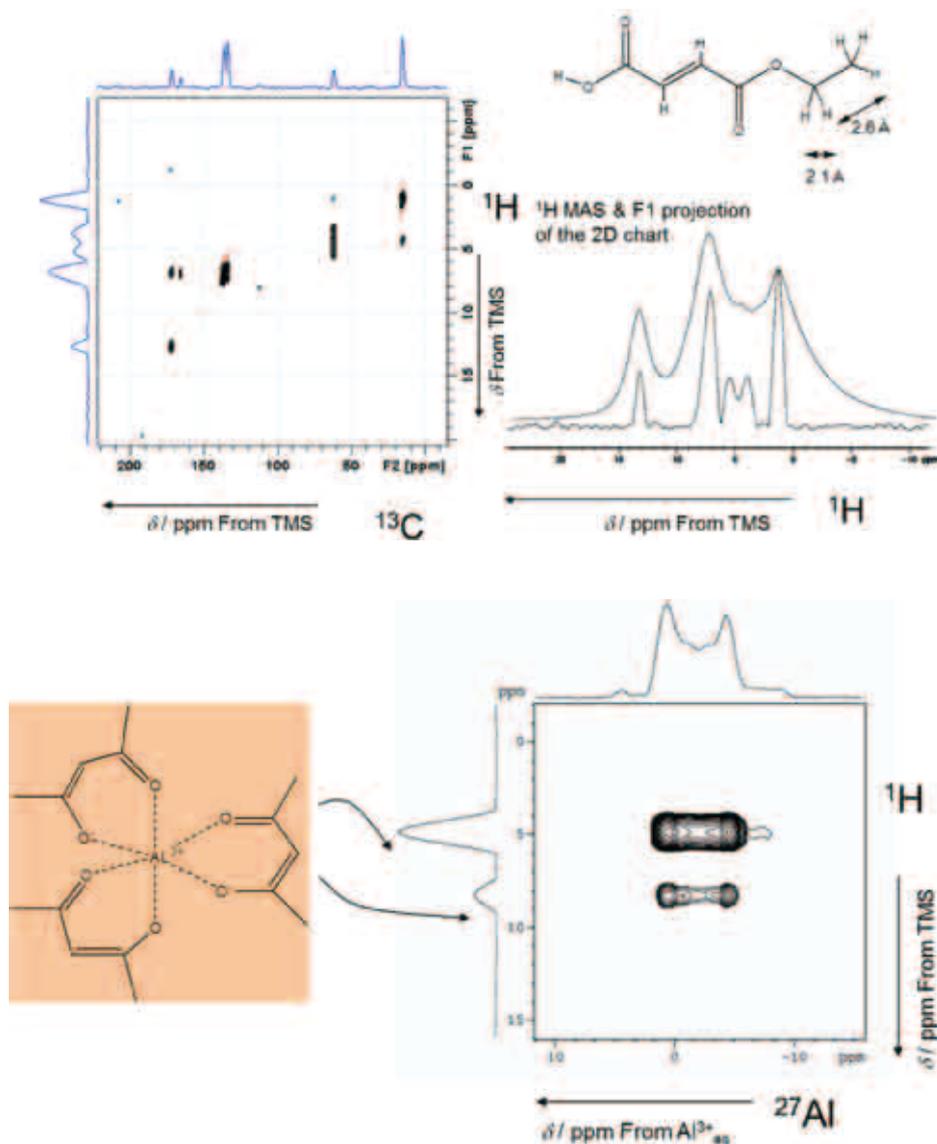


図8 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ FSLG HETCOR of mono-ethylfumarate and its F1 projection and ^1H MAS spectrum demonstrated in a same chart (upper). ^{27}Al FSLG HETCOR of $\text{Al}(\text{acac})_3$. The F1 axis was calibrated using mono-ethylfumarate. Sine-bell window function was applied before the Fourier transformation of F1 axis.

ルスをひとつの単位として ^1H をmagic angleにスピ
ンロックし続けるパルスの個数を増大させつつその
時間をF1軸として取り込み、実験を行う。この手
法は筆者の経験の範囲では最もアーティファクトが
少ない。States-TPPI法を用いた2D実験には一般
に言えることだが、シグナルが存在する場所にお
ける少量のAxial NoiseのほかはF1軸の上下端にのみ
アーティファクトが現れる。よく調整すれば互いに
geminal位にある CH_2H_b 型の磁気的非等価なメチレ
ン水素核間の双極子相互作用も分離観測可能であ
る(図8)。

(7) そのほかの方法

ここで述べることができなかつたが有用ないくつ
かの手法について述べる。

同種核間双極子相互作用検出のためのSQ-DQ
2D NMR^[17]測定等双極子相互作用のリカップリン
グを用いる手法がある。

REDOR^[18]系の手法も有用であり、活用されて
いる。四極子核を含むREDOR実験用に種々の
手法が開発されている。SEDOR^[19]、TEDOR^[20]、
REAPDOR^[21]、TRAPDOR^[22]等である。これらはい
ずれも四極子核へのパルス照射によって主とし
て ^1H の磁化の減衰分のシグナルだけを抽出するこ
とによって行われる。この際、mixing時間にあ
たるパラメータを変化させながら逐次測定すること
によって距離の評価に用いることができる。

D-HMQC法はJean-Paul Amoureuxらが開発し
たREDORを応用した手法であり、高磁場高速回転
にも適応したHETCOR実験を可能とする^[23]。 ^{27}Al -
 ^1H 、 ^{27}Al - ^{31}P などが報告されている。双極子相互作
用をリカップルしつつ ^1H 側シグナルのデフェーズ分
のみを抽出する方法である。感度はさほど高くない
が、CPに比べて調整の手間が少ないという特徴を
もつとされる。さらにこの方法を発展させ、四極子
核間のHETCORも実現されている^[24]。

Nutation NMRもこの中で取り上げることがで
きなかつた ^{14}N 、 ^2H 等整数核のNMRについても
最近の実例を紹介したかった。Xe、アルカリ金属、
ハロゲン等のNMRについてもほかの著者による解
説に待ちたい。

4. おわりに

本稿では最新の手法をと依頼を受けたにも関わ
らず、全体的には私がこれまでに実践してきた手法
のご紹介になってしまった。しかしいずれも基本的

な手法であるうえ、今後高磁場、高速回転が利用
可能になるとますます重要になる手法であると考え
ている。忍耐強く読んでくださった方々に小文がな
んらかのよいきっかけになれば幸いである。

参考文献

- [1] Abragham, A., (1961) The principles of nuclear magnetism, Oxford University Press.
- [2] Slichter, C. P., (1989) Principles of Magnetic Resonance, 3rd Enlarged Edition, Springer Series in Solid-State Sciences 1, Springer, New York.
- [3] 日本化学会編「実験化学講座8 NMR・ESR」第5版(2006), 丸善出版株式会社.
- [4] Mackenzie K. J. D. and Smith, M. E., (2002) Multinuclear Solid-state NMR of Inorganic Materials, Pergamon Material Series, Volume 6, Pergamon Press, Oxford.
- [5] Editors: Wasylishen, R. E., Ashbrook, S. E., and Wimperis, S., (2009) NMR of Quadrupolar Nuclei in Solid Materials, Wiley.
- [6] 高橋貴文、金橋康二, (2010) 技術論文「四極子核に対する固体NMRの高分解能化および高感度化」, 新日鉄技報, **390**, 60-66.
- [7] Widdield, C. M., and Bryce, D. L., (2010) Solid-State $^{79/81}\text{Br}$ NMR and Gauge-Including Projector-Augmented Wave Study of Structure, Symmetry, and Hydration State in Alkaline Earth Metal Bromides, *J. Phys. Chem. A*, **114**, 2102-2116.
- [8] de Lacaillerie, J.-B. d' E., Fretigny, C. and Massiot, D., (2008) MAS NMR spectra of quadrupolar nuclei in disordered solids: The Czjzek model, *J. Magn. Reson.*, **192**, 244-251.
- [9] Amoureux, J.-P., and Pruski, M., (2002) Theoretical and experimental assessment of single- and multiple-quantum cross-polarization in solid state NMR, *Molecular Physics*, **100**, 1595-1613.
- [10] Kennedy, G. L., Wiench, J. W., and Pruski, M., (2008) Determination of ^{27}Al - ^{29}Si connectivities in zeolites with 2D ^{27}Al \rightarrow ^{29}Si RAPT-CPMG-HETCOR NMR, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **33**, 76-81.
- [11] Yao, Z., Kwak, H.-T., Sakellariou, D., Emsley, L., and Grandinetti, P. J., (2000) Sensitivity enhancement of the central transition NMR signal of quadrupolar nuclei under magic-angle spinning, *Chem. Phys. Lett.* **327**, 85-90.
- [12] Kentgens, A. P. M., (1991), Quantitative excitation of half-integer quadrupolar nuclei by a frequency-stepped adiabatic half-passage, *J. Magn. Reson.* **95**, 619-625.
- [13] Madhu, P. K., Goldbourt, A., Frydman, L. and Vega, S. (1999) Sensitivity enhancement of the MQMAS NMR experiment by fast amplitude modulation of the pulses, *Chem. Phys. Lett.* **307**, 41-47.
- [14] Lu, X., Tankamony, A. S. L., Trébosc, J., Lafon, O., and Amoureux, J.-P., (2013) Probing proximities between different quadrupolar isotopes using multi-pulse cross-polarization, *J. Mag. Res.* **228**, 148-158.
- [15] van Rossum, B.-J., Förster, H., and de Groot, H. J. M., (1997) High-field and high-speed CP-MAS ^{13}C NMR heteronuclear dipolar-correlation spectroscopy of solids with frequency-switched Lee-Goldburg homonuclear decoupling, *J. Magn. Reson.* **124**, 516-519.
- [16] Halse, M. E., and Emsley, L., (2012) A common the-

- ory for phase-modulated homonuclear decoupling in solid-state NMR, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 9121-9130.
- [17] Yu, Z., Zheng, A., Wang, Q., Chen, L., Xu, J., Amoureux, J.-P., and Deng, F., (2010) Insights into the Dealumination of Zeolite HY Revealed by Sensitivity-Enhanced ^{27}Al DQ-MAS NMR Spectroscopy at High Field, *Angew. Chem. Int. Ed.* **122**, 8839-8843.
- [18] Fyfe, C. A., Mueller, K. T., Grondy, H., and Wong-Moon, K. C., (1992) Dipolar dephasing between quadrupolar and spin-1/2 nuclei. REDOR and TEDOR NMR experiments on VPI-5, *Chem. Phys. Lett.* **199**, 198-204.
- [19] Herzog, B., and Hahn, E. L., (1956) Transient nuclear induction and double nuclear resonance in solids, *Phys. Rev.* **103**, 148-166.
- [20] Hing, A. W., Vega, S., and Schaefer, J., (1992) Transfer-echo double-resonance NMR, *J. Magn. Reson.* **96**, 205-209.
- [21] Gullion, T., (1995) Detecting ^{13}C - ^{17}O dipolar interactions by rotational-echo adiabatic-passage, double-resonance NMR, *J. Magn. Reson. A* **117**, 326-329.
- [22] Zhang, L., de-Araujo, C. C., and Eckert, H., (2007) Structural role of fluoride in aluminophosphate sol-gel glasses: High-resolution double-resonance NMR studies, *J. Phys. Chem. B* **111**, 10402-10412.
- [23] Lafon, O., Wang, Q., Hu, B., Vasconcelos, F., Tre' bosc, J., Cristol, S., Deng, F., and Amoureux, J.-P., (2009) Indirect Detection via Spin-1/2 Nuclei in Solid State NMR Spectroscopy: Application to the Observation of Proximities between Protons and Quadrupolar Nuclei, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 12864-12878.
- [24] <http://pascal-man.com>に掲載されている情報を多数活用させていただいた。



高橋 利和 (たかはし・としかず)

産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター 主任研究員 博士(薬学)

1984年3月 東京大学大学院工学系研究科合成化学専門課程 修士課程修了

1987年3月 同上 博士課程 単位取得退学

1987年4月 広島大学医学部総合薬学科 教務職員

1989年10月 科学技術庁科学技術特別研究員

1993年4月 工業技術院物質工学工業技術研究所 研究員

2000年1月 産業技術総合研究所(改組による)主任研究員

2008年 日本核磁気共鳴学会会員

膜タンパク質のNMR解析までの道

東京大学大学院薬学系研究科

上田 卓見、幸福 裕、吉浦 知絵、嶋田 一夫

1. ケモカイン受容体の生理的な役割

膜タンパク質は、シグナル伝達、膜輸送、エネルギーの合成や代謝等の重要な役割を担っており、市販されている医薬品の約半数は、膜タンパク質を標的とする。特に、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、シナプスの神経伝達物質や血中のホルモンやサイトカイン、および体外の光や感覚刺激物質の受容体であり、多くの重要な生理機能を制御する。

CXCR4, CCR5をはじめとするケモカイン受容体は、GPCRの一種である。単球、マクロファージなどの白血球細胞に発現し、免疫・炎症反応に関与する。ケモカイン受容体は、リガンドとして、低分子量タンパク質であるケモカインを認識する。CXCR4とCCR5は、それぞれSDF-1、MIP-1 α というケモカインを認識する。ケモカインとの結合により活性化を受けると、ケモカイン受容体は、Giタンパク質へのシグナル伝達を介して、白血球の遊走反応を誘起する。

ケモカインおよびケモカイン受容体は、自己免疫疾患、がんなどの疾病に関与することが報告されている。加えて、ケモカイン受容体の一種であるCXCR4およびCCR5は、HIV感染時の共受容体となることが報告されている。したがって、CXCR4およびCCR5のケモカイン認識機構を解明することにより、これらに関与する疾病に対する薬剤設計において有用な知見を得ることが期待できる。

しかし、GPCRには、発現量が低い上に、生体膜から可溶化した状態での安定性が非常に低いという問題があるため、CXCR4およびCCR5の構造生物学的解析は行われていなかった。そこで本研究では、CXCR4およびCCR5の構造生物学的解析を可能とする実験手法を確立した上で、ケモカイン結合様式を解明することを目的とした。

2. CXCR4のSDF-1認識機構の解明^[1]

CXCR4は、SDF-1の結合する細胞外側に、N末端に加えて、3本の細胞外ループを持つ、352アミノ酸残基の膜タンパク質である。一方、SDF-1は、運動性に富むN末端と、コア領域で構成される、68アミノ酸残基のタンパク質である。先行研究におけるSDF-1の変異体解析からは、SDF-1のN末端がシグナル伝達活性に必須である一方、受容体の親和性にはコア領域が重要であることがわかってきた。また、CXCR4については、細胞外領域がリガンドとの親和性に重要である一方、膜貫通(TM)領域がシグナル伝達に関与すると考えられていた。このことから、CXCR4とSDF-1の間には、結合のみを担う相互作用(SDF-1コア領域-CXCR4細胞外領域)と、シグナル伝達を担う相互作用(SDF-1N末端-CXCR4TM領域)の、2つの独立した相互作用が存在するという、2段階仮説が提唱されていた。しかし、この2種類の結合状態を示した知見はなく、これらの相互作用に関する原子レベルでの情報も得られていなかった。そこで本研究では、SDF-1上のCXCR4相互作用部位の同定を行い、さらに、SDF-1とCXCR4との間に2つの独立した相互作用が存在するかを、構造生物学的に解明することとした。

2-1. CXCR4の調製および性状解析

CXCR4を昆虫細胞に発現させ、ドデシルマルトシド(DDM)による可溶化後、C末端に付加した1D4エピトープタグを利用した抗体アフィニティークラムにより精製した。SDS-PAGE解析から、得られたCXCR4の純度は80%以上と見積もった。得られたCXCR4について、N末端から2番目の細胞外ループが正しくフォールドしたCXCR4を認識する構造認識抗体である12G5、およびFLAGエピトープタグに対する抗体との結合を、表面プラズモン共鳴(SPR)法により調べた。その結果、12G5抗体の

結合量は、FLAG抗体のおよそ半分であったことから、得られたCXCR4の約50%が正しくフォールドしていることが明らかとなった。また、この12G5の結合量から、正しくフォールドしたCXCR4の収量は、1.5L培養あたり約100 μ gであることが示された。さらに、得られたCXCR4がSDF-1結合活性を有していることを、プルダウンアッセイにより確認した(図1A)。

しかし、CXCR4を27 $^{\circ}$ Cにて48時間インキュベーションした結果、大半が変性・凝集・沈殿し、上清中にCXCR4は確認されなかった。そこで、CXCR4の安定性が向上する条件を探索した。その結果、低温・グリセロール存在下であれば、48時間後も12G5結合活性が保持されることが判明した(図1B)。

2-2. TCS法による、SDF-1上のCXCR4結合界面の同定

上記の収量では、通常のNMR解析に必要な試料濃度を達成するのは難しい。加えて、低温、グリセロール存在下では、ブラウン運動の速度低下によりシグナルが広幅化するため、NMR解析はより困難になる。そこで、高感度検出に適したイソロイシン・ロイシン・バリンのメチル基を選択的に 1 H, 13 C標識してプローブとした上で、当研究室で開発した転移差飽和法(transferred cross-saturation, TCS)を適用した^[2,3]。TCS法では、CXCR4の磁化を選択的に飽和させた上で、非結合状態のSDF-1に転移した飽和をNMRシグナルの強度減少として観測することにより、SDF-1上のCXCR4結合界面を同定することが可能である。さらに、変性した

CXCR4やDDMミセル、不純物との非特異的相互作用の影響を取り除くために、コントロール実験として、均一 2 H標識した、TCS実験で用いたSDF-1変異体より親和性の高い野生型SDF-1を、活性のあるCXCR4とほぼ等量加え、特異的な相互作用のみを阻害した条件でTCS実験を行い、両者を差し引いた。

TCS実験の結果、非特異的相互作用の影響を除いたシグナル強度減少幅が大きかった残基は、SDF-1のN末端(V3, L5)に加えて、コア領域の半周にもおよぶ帯状の広い範囲(V18, V23, L26, I28, L29, V39, V49, L55)に分布していた(図2)。したがって、この領域がSDF-1のCXCR4相互作用部位であると結論した。

2-3. アンタゴニストAMD3100がCXCR4とSDF-1の相互作用に与える影響

さらに、SDF-1とCXCR4との相互作用様式を明らかにするため、CXCR4の特異的なアンタゴニストであるAMD3100を用いた解析を行った。AMD3100はCXCR4のTM領域に結合することが示されており、そのSDF-1-CXCR4相互作用に与える影響を解析することで、TM領域をブロックした状態でもSDF-1が結合しうるか、などの知見を得ることを目指した。まず、AMD3100存在下にて上述と同様のTCS解析をおこなった。その結果、N末端(L3, V5)のシグナル強度減少はほとんど観測されなくなり、CXCR4と相互作用しなくなったことが示された(図3)。一方、SDF-1のコア領域では、AMD3100添加前と同等のシグナル強度減少が観測され、AMD3100存在下でも、CXCR4結合様式に

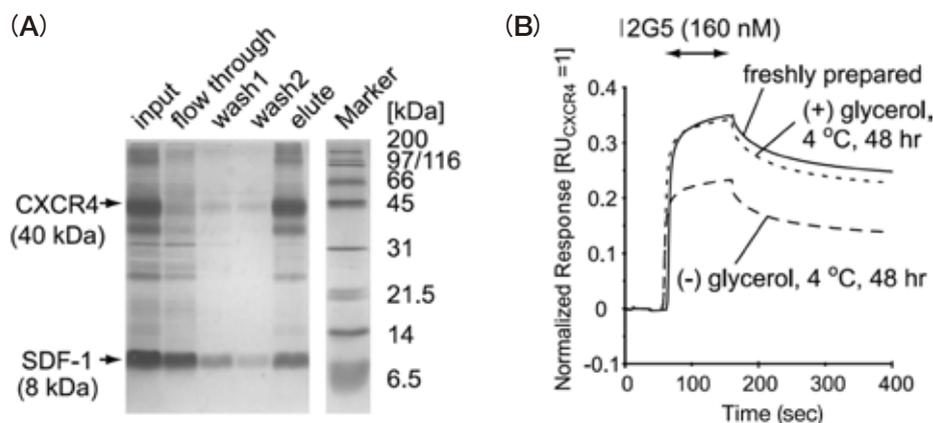


図1 CXCR4の性状解析

(A) CXCR4とSDF-1のプルダウンアッセイの結果。CXCR4を溶出させた画分にSDF-1が共溶出したことから、両者の結合が示された。

(B) 精製直後および48時間インキュベートした後のCXCR4と、12G5抗体の結合のSPRレスポンス。

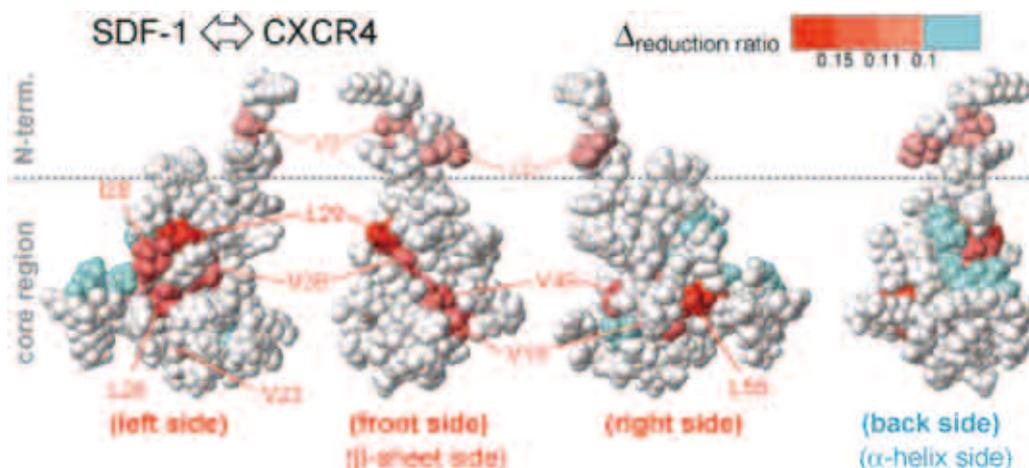


図2 SDF-1とCXCR4のTCS実験の結果

非特異的相互作用の影響を除いた強度減少 ($\Delta_{\text{reduction ratio}}$) が大きい残基を、SDF-1の立体構造上に濃い赤～薄い赤でマッピングした。N末端領域とコア領域の境界を点線で示した。

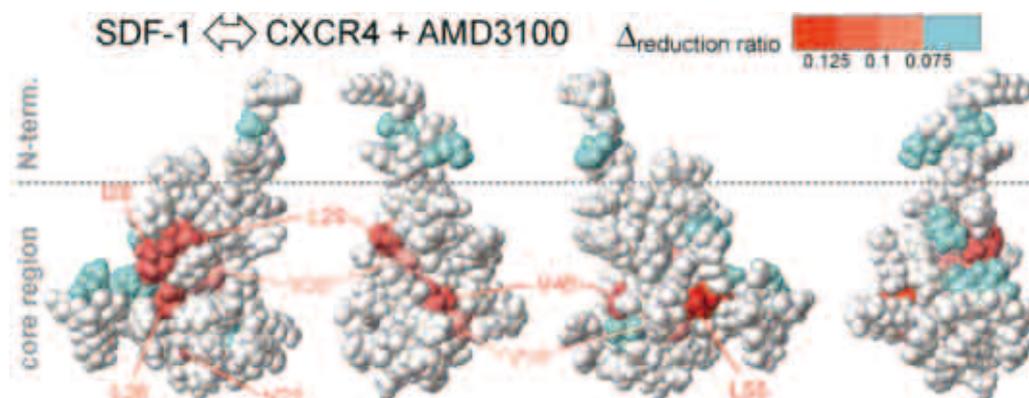


図3 AMD3100存在下における、SDF-1とCXCR4のTCS実験の結果

AMD3100非存在下 (図2) と比べると、N末端領域では強度減少が観測されなくなった。一方、コア領域では同等のシグナル強度減少が観測された。

大きな変化がないことが示された。

以上の結果と、AMD3100がCXCR4のTM領域に結合することを考慮すると、SDF-1のコア領域はCXCR4の細胞外領域と、SDF-1のN末端はCXCR4のTM領域と、それぞれ独立に相互作用すると考えるのが妥当である。したがって、本研究では、2段階仮説を支持する実験的な証拠が初めて得られたといえる。また、AMD3100存在下におけるCXCR4とSDF-1の結合は、観測が困難な一段階目の結合様式を模したものであるといえる。

2-4. CXCR4とSDF-1の2段階結合様式の意義

近年、CXCR4およびいくつかのGPCRについて、低分子アンタゴニスト結合状態のX線結晶構造が報告されており、低分子アンタゴニストは、GPCRの膜貫通領域に存在する、比較的空間的に狭いcavityに結合することが示された。しかし、このような構造はケモカインのような比較的分子量の大き

いリガンドの結合には不利である。上述の2段階の相互作用は、このような性質をもつケモカイン-ケモカイン受容体の相互作用に適しているといえる (図3)。SDF-1コア領域のみの独立した相互作用は、CXCR4細胞外領域への迅速な結合とともに、効率よくSDF-1をCXCR4上につなぎとめておくことを可能とする。SDF-1のN末端は、この状態においても運動性が高く、効率よく結合空間を探索し、比較的空間的に狭いTM領域のcavityへの結合を促進する。

3. CCR5のMIP-1 α 結合様式の解明^[4]

もう一方のケモカイン受容体CCR5の生理的リガンドであるMIP-1 α には、HIV感染抵抗性を示す一塩基遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) であるE57Dが知られている。しかし、E57近傍の領域が、CCR5との結合および活性化においてどのような役割を果たしているかは不明であっ

た。そこで、MIP-1 α 上のCCR5結合部位の同定も行うこととした。

3-1. CCR5の試料調製および性状解析

可溶化状態のCCR5は、CXCR4よりも安定性が低く、低温・グリセロール条件下においても、急速に失活した。そこで、CCR5を再構成高密度リポタンパク質 (reconstituted high density lipoprotein, rHDL) 中の脂質二重膜に組み込む方法を開発した。rHDLは、脂質二重膜が、membrane scaffolding protein (MSP) の両親媒性ヘリックス二本に囲まれた構造を持つ、直径約10nmの構造体であり、中に膜タンパク質を再構成することが可能である。本研究で開発したrHDL再構成法を図5に示す。この方法では、CCR5を発現させた昆虫細胞から膜面分を調製して、界面活性剤で可溶化した後、すぐにMSPの一種であるMSPE3と脂質を加え、界面活性剤を除去して、HDLを再構成する。その後、MSPに付加したHisタグとCCR5のC末端に付

加した1D4抗体を用いて、rHDL再構成後のCCR5 (CCR5-rHDL) を精製する。この方法では、CCR5が可溶化状態にある時間を最小限に抑えることにより、可溶化状態の膜タンパク質の変性および凝集を最小限にすることが可能である。

調製したCCR5-rHDLをNative PAGEで解析した。その結果、膜タンパク質を入れていない、空のrHDLと同じ位置にバンドが確認できたことから、CCR5-rHDLは、空のrHDLと同程度の大きさであり、同様に脂質二重膜を形成していると判断した。また、SDS-PAGE解析により、得られたCCR5-rHDLの純度は約80%以上であること、rHDLに含まれるCCR5の収量は、昆虫細胞培養液1Lあたり約10 μ gであること、rHDL1粒子中には1分子のCCR5が含まれることが明らかとなった。さらに、構造認識抗体2D7結合活性、およびその経時変化を、2D7をアナライトとしたSPR解析により調べた。その結果、観測されたレスポンス上昇の大きさから、少なくとも50%のCCR5が正しく折り畳まれ

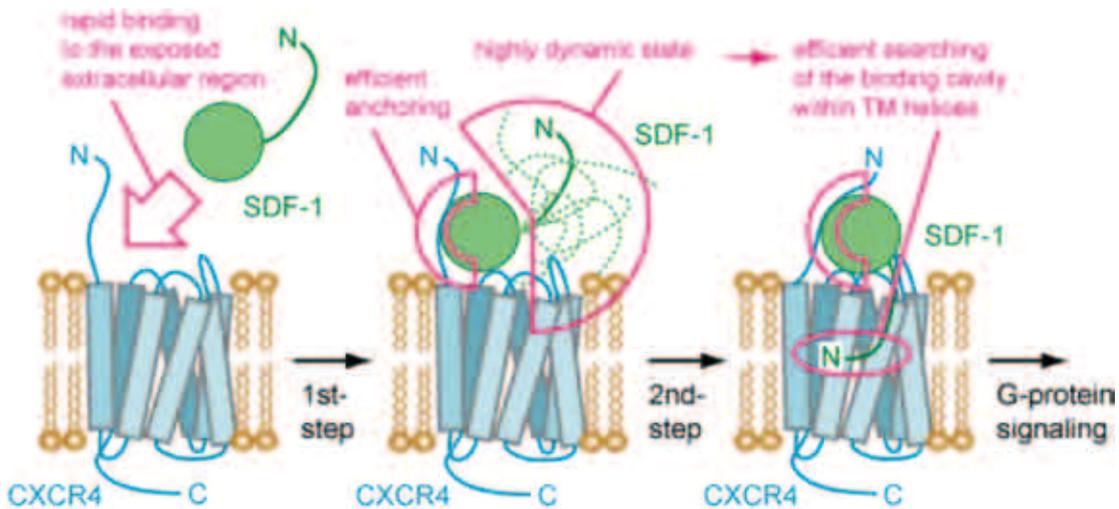


図4 SDF-1とCXCR4の二段階結合の模式図

SDF-1のコア領域とCXCR4の細胞外領域が迅速に結合して、両者が繋ぎ止められた一段階目の結合状態となる。この時、SDF-1のN末端は、高い運動性を持っていて、CXCR4の膜貫通領域のcavityを効率良く探索する。その結果、CXCR4の膜貫通領域と二段階目の相互作用を形成して、CXCR4を活性化させる。

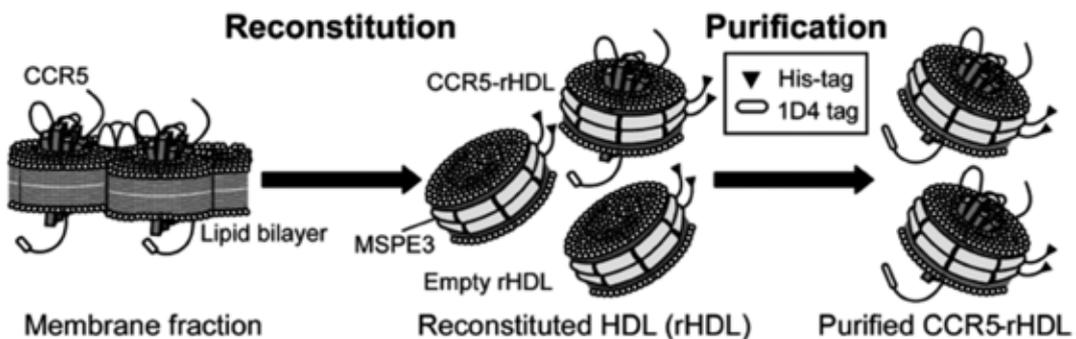


図5 本研究で開発したrHDL再構成法の模式図

ていることが示唆された。また、可溶化状態では、4°Cで24時間インキュベートした後の2D7結合量は10%未満に低下したのに対し、CCR5-rHDLは、約85%の2D7結合量を保持しており、安定性が顕著に向上していることが示された(図6)。

さらに、CCR5-rHDLが、リガンド刺激依存的にシグナル伝達活性を保持しているかを、蛍光標識GTPを用いたGDP-GTP交換アッセイにより調べた(図7A)。その結果、CCR5-rHDL存在下における、Gタンパク質の α サブユニットに結合した蛍光標識GTPの量が、CCR5のリガンドであるMIP-1 β の濃度依存的に増大した(図7B)。一方、CCR5のリガンドではないSDF-1では、この蛍光増大は観測されなかった。したがって、CCR5-rHDLが、リガンド結合に伴って、Gタンパク質のGDP-GTP交換を促進することが示された。

次に、CXCR4の時と同様に、メチル基をプローブとしたTCS法により、MIP-1 α 上のCCR5-rHDL結合界面を同定した。rHDLへの非特異的結合の影響を見積もるコントロール実験として、CCR5を含まないrHDLを用いたTCS実験も行い、両者を差し引いた。その結果、MIP-1 α のV59、V63に、シグナル強度減少が観測された(図8)。

HIV抵抗性のSNPが報告されている、MIP-1 α のE57は、本研究でCCR5との結合界面であることが示された、V59およびV63の近傍に位置する。したがって、このSNPがHIV抵抗性となるのは、CCR5との結合様式が変化することが原因である可能性があると考えた。また、V63自身にも、SNPがあることも報告されている。このV63のSNPの解析は進んでいないが、HIV感染に影響があるかもしれないと考えた。

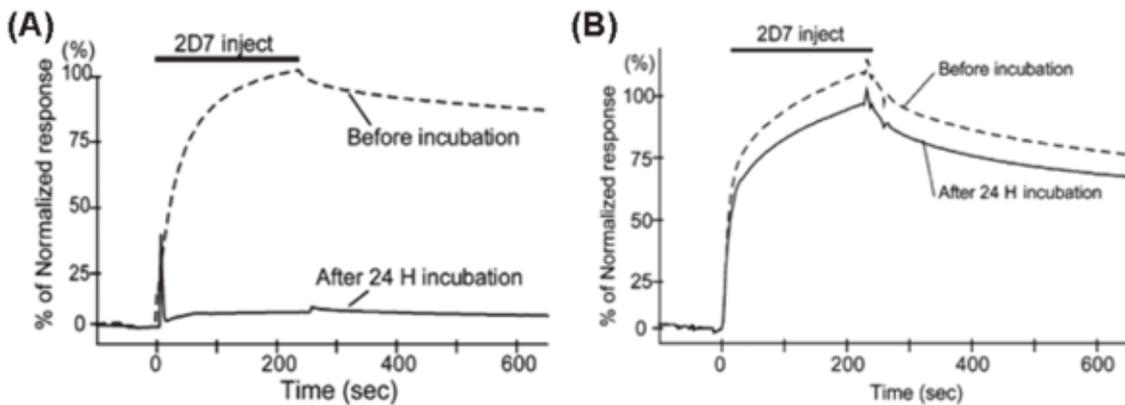


図6 可溶化状態のCCR5とCCR5-rHDLの安定性の比較

(A) 可溶化状態のCCR5、(B) CCR5-rHDLそれぞれについて、センサーチップ上に固定し、直後および4°Cで24時間インキュベートした後に、2D7抗体をアナライトとして流した際のレスポンスを示した。

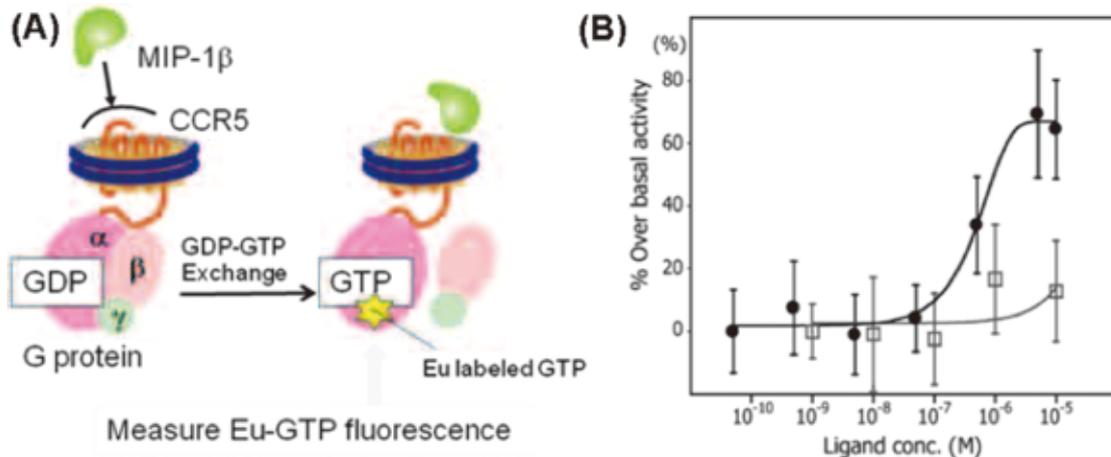


図7 CCR5-rHDLのシグナル伝達活性

(A) GDP-GTP交換アッセイの模式図。MIP-1 β によりrHDL中のCCR5が活性化されると、Gタンパク質の α サブユニットからGDPが解離して、Eu標識GTPが結合する。この α サブユニットをHisタグによりビーズに吸着させて、蛍光強度を測定する。

(B) 観測された蛍光強度の、MIP-1 β (黒丸) およびSDF-1 (白四角) 濃度依存性。

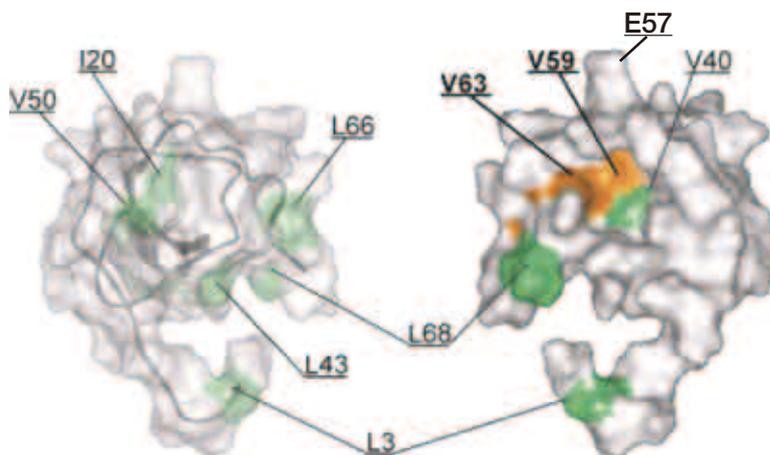


図8 TCS実験により同定された、MIP-1 α 上のCCR5結合部位
MIP-1 α とCCR5-rHDLのTCS実験において、非特異的相互作用の影響を除いた強度減少が大きい残基をオレンジ色で、有意な強度減少が観測されなかった残基を緑色で、MIP-1 α の立体構造上にマッピングした。

4. 展 望

最近、我々は、GPCRに属する、 β_2 アドレナリン受容体が、各種リガンド結合状態において、活性型と不活性型の平衡状態にあり、活性型の量比が細胞内に誘起するシグナルの強度を決定することを明らかにした^[5]。このことは、GPCRの活性発現が、動的構造平衡により行われていることを示している。また、カリウムチャネルKcsAの機能発現に関わる動的構造平衡の量比が、rHDLの脂質二重膜中に再構成した状態と可溶性ミセル状態では異なること、および脂質二重膜の中にトリフルオロエタノールを分配させると、その量比がさらに変化することを明らかにした^[6]。このことは、膜タンパク質の動的構造平衡は、脂質二重膜の有無や脂質組成といった膜環境の影響を受けることを示している。したがって膜タンパク質の機能を解明するためには、NMRにより生理的な膜環境下における膜タンパク質の動的構造平衡を解明することが必要である。今後、安定同位体標識法、試料調製法、NMR測定手法、および動的構造平衡を可視化する手法をさらに発展させた上で、生理的に重要な膜タンパク質の、生理的な膜環境の中における膜タンパク質の動的構造平衡を解明して、その機能を明らかにできることが期待される。

参考文献

- [1] Kofuku Y., Yoshiura C., Ueda T., Terasawa H., Hirai T., Tominaga S., Hirose M., Maeda Y., Takahashi H., Terashima Y., Matsushima K., and Shimada I. (2009) Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and G-protein-coupled receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* **284**, 35240-35250.
- [2] Takahashi H., Miyazawa M., Ina Y., Fukunishi Y., Mizukoshi Y., Nakamura H., and Shimada I. (2006) Utilization of methyl proton resonances in cross-saturation measurements. *J. Biomol. NMR* **34**, 167-177.
- [3] Shimada I., Ueda T., Matsumoto M., Sakakura M., Osawa M., Takeuchi K., Nishida N., and Takahashi H. (2009) Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments. *Prog. Nuc. Magn. Reson. Spect.* **54**, 123-140.
- [4] Yoshiura C., Kofuku Y., Ueda T., Mase Y., Yokogawa M., Osawa M., Terashima Y., Matsushima K., and Shimada I. (2010) NMR analyses of the interaction between CCR5 and its ligand using functional reconstitution of CCR5 in lipid bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6768-6777.
- [5] Kofuku Y., Ueda T., Okude J., Shiraishi Y., Kondo K., Maeda M., Tsujishita H., and Shimada I. (2012) Efficacy of the β_2 -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nature Commun.* **3**, 1045.
- [6] Imai S., Osawa M., Mita K., Toyonaga S., Machiyama A., Ueda T., Takeuchi K., Oiki S., and Shimada I. (2012) Functional equilibrium of the KcsA structure revealed by NMR. *J. Biol. Chem.* **287**, 39634-39641.



上田 卓見 (うえだ・たくみ)

東京大学大学院薬学系研究科・助教

2005年東京大学大学院薬学系研究科機能薬学専攻博士課程修了。2005年バイオ産業情報化コンソーシアム特別研究員。2007年より東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室助教。〔専門〕構造生物学。2002年 日本核磁気共鳴学会会員。



幸福 裕 (こうふく・ゆたか)

東京大学大学院薬学系研究科・特別研究員

2009年東京大学大学院薬学系研究科機能薬学専攻博士課程修了。2009年産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター特別研究員。2011年より東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室特別研究員。〔専門〕構造生物学。2012年 日本核磁気共鳴学会会員。



嶋田 一夫 (しまだ・いちお)

東京大学大学院薬学系研究科・教授

1980年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻修士課程修了。1980年(株)東レリサーチセンター・構造化学研究部入社。1987年(財)東京都臨床医学総合研究所・生理活性物質研究部入所。1989年東京大学薬学部薬品物理化学講座助手。1994年より同大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室教授。2001年産業技術総合研究所生物情報解析研究センター分子認識解析チームチームリーダー併任。2008年産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センターセンター長併任。2013年産業技術総合研究所研究顧問併任。〔専門〕構造生物学。2002年 日本核磁気共鳴学会会員。

第51回NMR討論会若手ポスター賞について

今回は、従来のポスター賞をポスター賞Ⅰとし、それに加えて、産業応用をポスター賞Ⅱとして募集致しました。尚、今回からのもう一つの特徴として、それぞれの区分の中で最優秀ポスターには、JEOL RESONANCE社の御厚意により、「JEOL RESONANCE賞」が贈られることになりました。

次に募集要項をニュースレターから転載します：

日本核磁気共鳴学会『若手ポスター賞』の拡大と副賞『JEOL RESONANCE賞』について

今年度から、『若手ポスター賞Ⅰ』と『若手ポスター賞Ⅱ』を設け、『若手ポスター賞』受賞者を倍増させるとともに、ⅠとⅡの最優秀若手ポスター賞受賞者には、副賞『JEOL RESONANCE賞』として、各々、10万円が授与されます。

主 旨

これまで、日本核磁気共鳴学会の若手研究者支援活動の一環として、次代を担う若手研究者をエンカレッジするために、NMR討論会のポスター発表の中から、優れた若手研究者（会員）の発表に『若手ポスター賞』を学会から贈呈してきました。しかしながら、最近の『若手ポスター賞』を受賞された若手研究者は、主に大学や公的機関の若手に偏ってきております。今後のNMRの発展を担う有力な若手集団は、大学や研究所の若手に加えて、企業でNMRを使用する若手ではないかと思えます。そのような若手NMR研究者にも、もっと積極的に応募していただき、『若手ポスター賞』を受賞して欲しいと思えます。

そこで、NMR学会では、企業でNMRを使用する若手の『若手ポスター賞』受賞者を増やすために、従来の大学や公的機関の若手、企業でNMRを開発する若手を対象とした『若手ポスター賞Ⅰ』と、企業でNMRを使用する若手を対象とした『若手ポスター賞Ⅱ』を設け、審査基準を若干変えて選考し、『若手ポスター賞』を拡大することを企画しました。

さらに、“若手のNMR研究者をエンカレッジしたい”と（株）JEOL RESONANCE から申し出があり、『若手ポスター賞Ⅰ』と『若手ポスター賞Ⅱ』の各最優秀若手ポスター賞受賞者には、副賞『JEOL RESONANCE賞』として、各々、10万円が授与されることになりました。それ以外の『若手ポスター賞』受賞者には、従来通り、学会規定に従い、賞金が贈呈されます。また、受賞者は、すべて、NMR討論会の懇親会場で表彰されます。討論会での発表要旨は、ニュースレターおよび学会機関誌「NMR」に掲載されるとともに、NMR討論会の最終日に受賞内容の口頭発表を行うことによって、研究内容を広く会員に知っていただきます。

選考方針

『若手ポスター賞Ⅰ』は、従来の大学や公的機関の若手研究者や企業でNMRを開発する若手研究者を対象とし、従来通りの下記の選考方針とします。

- (1) 高いオリジナリティーを有する優れた学術的研究である。
- (2) ポスターや要旨が論理的に明解に作成されており、分かり易い内容である。
- (3) 分かり易い優れた発表を行うとともに、質問に対して答えが的確である。

一方『若手ポスター賞Ⅱ』は、企業でNMRを使用する若手研究者を対象とし、上記の(1),(2),(3)の観点からの評価に加えて、以下の2点を重視して選考します。

- (4) 企業で行った研究が主体となっている。
- (5) 研究成果が広く会員に有益であり、評価される内容である。

受賞者の決定は、従来通り、NMR学会の評議員の投票によって行われます。

『若手ポスター賞Ⅰ』の応募資格

1. 日本核磁気共鳴学会の会員であること。
2. 2012年11月8日の時点で、35歳未満の学生または研究員であること。
3. 過去の『若手ポスター賞』受賞者は対象外とする。
4. 原則として、応募者は1研究グループあたり2名以内とする。

『若手ポスター賞Ⅱ』の応募資格

1. 日本核磁気共鳴学会の会員であること。
2. 2012年11月8日の時点で、40歳未満であること。
3. 過去の『若手ポスター賞』および『若手ポスター賞Ⅰ』受賞者は応募できるが、過去の『若手ポスター賞Ⅱ』受賞者は対象外とする。
4. 原則として、応募者は1研究グループあたり2名以内とする。

若手ポスター賞応募者は、申し込みの際に、『若手ポスター賞Ⅰ』か『若手ポスター賞Ⅱ』に申し込むかを、明確にして応募ください。尚、企業以外の若手研究者で、大学や公的機関の共通研究施設や分析センター等の職員が、『若手ポスター賞Ⅱ』の応募を希望する場合は、庶務担当理事の池上 (tiik@protein.osaka-u.ac.jp) に、お問い合わせください。

日本核磁気共鳴学会 若手ポスター賞 担当理事
鈴木榮一郎 朝倉哲郎

以上のような募集の結果、

ポスター賞Ⅰ：31名

ポスター賞Ⅱ：12名

の応募がありました。

また、受賞者が倍増することに伴い、西村善文理事、藤原敏道理事も加わり、若手ポスター賞担当理事を4名体制とすることが理事会で決まりました。

以下、従来の選考方法に基づき、今回見直しの上制定した厳密、かつ、公正な選考基準を報告致します。尚、実際に下記の全ての規定が必要になったかどうかについては、今後とも、公表しないこととさせていただきます。

1. 各応募者の評点を母数で割った5点満点で、小数点以下も含めて算出する。
(評議員の付ける点が小数点以下の数を含むときは、その小数点を含む実数を評点とする。採点欄が空白の場合は、その空白採点欄を母数に入れないで平均を取る。また、1から5までの範囲外の点数を付けた投票は、無効とする)

2. ポスターⅠの3つのグループについて、評点の平均点を算出する。

もしグループ間に平均点で0.5以上の違いがあれば、平均点差が0.5になるように高平均点グループのすべての応募者から一定の点数を引く。

3グループについて平均値が $c \leq b \leq a$ であるとします。

その場合、cグループのものはそのままの点を、得点とする。

aグループのものは、もし $(a - c) \leq 0.5$ なら、そのままの点を得点とする。

それ以外の時には、aに $(c - a + 0.5)$ を加え、aとc間の平均点差が0.5になるようにする。

bグループのものは、もし $(a - c) \leq 0.5$ なら、そのままの点を得点とする。

それ以外の時には、bに $(c - b) + 0.5x(b - c)/(a - c)$ を加える。

例えば、 $a = 3.5, b = 3.1, c = 2.5$ なら、補正後は $a = 3.0, b = 2.8, c = 2.5$ が平均点です。

$a = 3.2, b = 2.8, c = 2.5$ なら、補正後は $a = 3.0, b = 2.71, c = 2.5$ が平均点です。

最優秀者が同点の時について

締め切り以降に応募した者がいるなら最優秀者にしない。

違うグループで同点である場合には、上記2の均等化操作をしているなら、均等化操作を行わない素点で比べる。

さらに同点なら、グループ間の平均点差が0になるように、高平均点グループの応募者から一定の点数を引いた点数で評価する。

同一グループで2名最高点で同点なら、その2名について「オリンピック方式」で採点して、高得点者を上位順位者とする。オリンピック方式とは、最高と最低評点を除いて平均を取る方式です。

それでも同じなら、さらに最高と最低評点を除き平均値を求めていく。差が出るまで、繰り返します。

それでも、最高位に同点者がいるときには、上位リストを提出し評議会で審議し決定する。

例えば、利害関係者を除いて、両名が属する領域以外のグループIの審査を担当する評議委員に2名について、二者択一の投票をしてもらうなどかと思えます。投票できる委員はおよそ6名か、12名です。

上の案では、グループ間の差を0.5点まで許しています。これは、グループによっては優秀者が多いグループがあることも考慮しているからです。

採点では、評点平均が5段階で3になるようにと採点要項で書いているので、四捨五入して1になる0.5以上の平均点差は生じないようにしています。

また、平均点数差を抑制することで、特定のグループ・分野から多くの上位順位者が出ることも少なくしています。

なお、同点者がいた場合に再採点すると、短時間で最大20名の採点者が、2つのポスターに集中することにもなり、十分な評価が難しいと考え上記のような平均値操作で評価の観点を変えて、一人が最優秀者になるようにしています。

最高得点者 JEOL RESONANCE 賞を含む、上位6名を選ぶ方法

各グループから最高得点者を一人ずつ選ぶ。これで3名が決まります。

上記で平均値を補正した得点を、全応募者に付ける。上位得点者から選んで、グループトップと合わせて6名を選ぶ。

可能性としては、グループから3名から1名が上位6以内に選ばれます。

もし最下位者が同点で上位者6名を選べないときなどは、オリンピック方式で決める。

それでも上位者6名を選べないときには、上位リストを提出し評議会で審議し決定する。

以上のような公平・厳正な審査基準のもと、下記の通りの計10名が選ばれ、懇親会の時に、賞状と副賞として1万円が学会長から手渡されました。また、JEOL RESONANCE賞の副賞は10万円です。

(若手ポスター賞 I)

幸福 裕 (東京大学) β_2 アドレナリン受容体の efficacy 決定機構の解明

北沢 創一郎 (立命館大学) ユビキチンの高エネルギー状態 N_2 の立体構造解明

Chun-Jiun Yang (首都大学東京)

Large amplitude interface dynamics in FKBP-ligand complexes revealed by the aromatic ring flipping and hydroxyl proton exchange rates for the interfacial tyrosine residues

日下部 寧* (京都大学)

デュアルレシーバーシステムを用いた同種核及び異種核間2次元相関 covariance NMR

矢澤 宏次 (東京農工大学)

生体分子の¹H精密位置決定

～超高速 MAS¹H 固体NMRによる¹H DQMAS測定と GIPAW 化学シフト計算～

一条 直規 (京都大学) NMRを用いた定量的元素分析

(若手ポスター賞Ⅱ)

小沼 剛 (サントリー生命科学財団)

緩和分散差スペクトル法による混みあったNMRスペクトルの緩和分散データの解析

菅沼 こと (帝人株式会社) ポリ乳酸の物性を左右する立体規則性とそのNMRピークの起源

高橋 貴文* (新日鐵住金株式会社)

固体NMRによるセメント硬化体の化学構造および水和・硬化プロセスの解析

相見 敬太郎 (富士フイルム株式会社) 半導体レジスト用モデルポリマーの脱保護による分子運動性変化

* JEOL RESONANCE 賞受賞

これらの若手がこれからもNMR関係の仕事について活躍を期待しながら、受賞講演並びに懇親会時の挨拶を聞くことが出来ました。また、今回受賞者を倍増したこと、及び、JEOL RESONANCE 賞が創設されたことにより、討論会は一層の盛り上がりを感じさせました。

若手ポスター賞担当理事

朝倉哲郎 西村善文 藤原敏道 鈴木榮一郎

P66**デュアルレシーバシステムを用いた同種核及び異種核間
2次元相関 covariance NMR**○日下部寧¹, 野田泰斗¹, 福地将志², 武田和行¹, 竹腰清乃理¹¹京都大学大学院理学研究科²京都大学化学研究所**Homo- and Heteronuclear two-dimensional covariance solid-state NMR spectroscopy with a dual-receiver system**○Yasushi Kusakabe¹, Yasuto Noda¹, Masashi Fukuchi², Kazuyuki Takeda¹, and K. Takegoshi¹¹*Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University.*²*Institute for Chemical Research, Kyoto University.*

Two-dimensional (2D) covariance NMR spectroscopy, which has originally been developed for homonuclear correlation (HOMCOR) type experiments, is extended to include heteronuclear correlations (HETCOR). In a $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ chemical shift correlation experiment, ^{13}C and ^{15}N signals are acquired simultaneously with a dual-receiver NMR system. The data sets are arranged for the covariance data processing, and ^{13}C - ^{15}N HETCOR is obtained together with ^{13}C - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ - ^{15}N HOMCOR. As in the case of the original covariance HOMCOR, much fewer amounts of data suffice to obtain a well-resolved 2D-spectrum compared to the conventional 2D-Fourier transformation scheme, saving the experimental time.

1. 序論

2次元相関 NMR 法は核間の距離情報をもたらす有用な構造解析法である。しかし間接次元において磁化が十分に減衰するまで発展時間を増やしつつ測定を繰り返す必要があるため、一般に長い実験時間を要する。最近、相関実験において測定時間を短縮するために、2次元 covariance (共分散) NMR 法が確立された[1,2]。covariance NMR 法の実験手順は従来の2次元相関 NMR 法のそれと同一である。ただし、covariance を用いた統計的なデータ処理により、従来法に比べてずっと少ない間接次元のデータポイント数 (N_1) で距離情報を判定するのに足る2次元スペクトルを得ることができる。

2次元 covariance の分解能は、その数学的性質上、 N_1 には依らず、間接・直接次元ともに直接次元のデータ長 (N_2) で与えられ、データ配列は $N_2 \times N_2$ の対称な行列となる。そして、従来 covariance NMR は、スペクトルが対称であると期待される同種核相関 (HOMCOR) 実験にのみ適用されてきた。しかし、実験時間の短縮は異種核相関 (HETCOR) にとっても重要である。ここで我々は、covariance NMR 法を Fig. 1 に示す ^1H - ^1H 双極子相互作用媒介 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 化学シフト相関実験 (通称 CHHC, NHHN, CHHN, NHHC 相関実験[3]) に適用し、 ^{13}C - ^{15}N 間の HETCOR が取得できることを示す[4]。なおこの手法では covariance ^{13}C - ^{13}C 、及び ^{15}N - ^{15}N HOMCOR も同時に得られる。また covariance NMR, dual receiver, HETCOR

○くさかべやすし, のだやすと, ふくちまさし, たけだかずゆき, たけごしきよりの

covariance データ処理には ^{13}C , ^{15}N 両者の信号が必要となる。測定時間短縮の観点から、デュアルレシーバ NMR システムを用いて ^{13}C , ^{15}N の信号を同時に取得することで、covariance 実験の本領が発揮される。

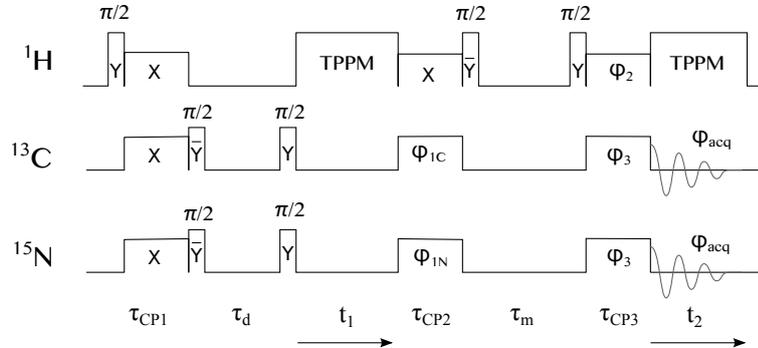


Fig. 1 A pulse sequence for ^1H - ^1H dipolar-coupling mediated $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ chemical shift correlation experiments.

2. 原理

2組の複素変数 $X = \{x_1, \dots, x_N\}$, $Y = \{y_1, \dots, y_N\}$ についてのcovariance (共分散) $C(X, Y)$ は、

$$C(X, Y) = \langle (X - \langle X \rangle)(Y - \langle Y \rangle)^* \rangle \quad (1)$$

$$= \langle XY^* \rangle - \langle X \rangle \langle Y^* \rangle$$

と定義される。ただし、 $\langle \rangle$ と*はそれぞれ標本平均と複素共役を表す。

2次元実験において、スピン I (^{13}C) とスピン S (^{15}N) の信号はそれぞれ $s^I(t_1, t_2)$, $s^S(t_1, t_2)$ と表される。まず、それぞれ t_2 についてのフーリエ変換を行い、 N_1 個の1次元スペクトルを得る：

$$S^I(t_1, \omega_{21}) = \int s^I(t_1, t_2) \exp(-i\omega_{21}t) dt_2 \quad (2)$$

$$S^S(t_1, \omega_{2S}) = \int s^S(t_1, t_2) \exp(-i\omega_{2S}t) dt_2$$

従来の2D-FT法では、式(2)の $S^I(t_1, \omega_{21})$, $S^S(t_1, \omega_{2S})$ を t_1 についてフーリエ変換し、2次元スペクトル $S^I(\omega_1, \omega_{21})$, $S^S(\omega_1, \omega_{2S})$ を得る。一方、covariance 法では式(2)の S^I と S^S から covariance C^{II} , C^{IS} , C^{SI} , C^{SS} を以下のように計算する：

$$C^{II}(\omega_{21}, \omega_{21}') = \langle S^I(t_1, \omega_{21}) S^I(t_1, \omega_{21}')^* \rangle - \langle S^I(t_1, \omega_{21}) \rangle \langle S^I(t_1, \omega_{21}')^* \rangle$$

$$C^{IS}(\omega_{21}, \omega_{2S}') = \langle S^I(t_1, \omega_{21}) S^S(t_1, \omega_{2S}')^* \rangle - \langle S^I(t_1, \omega_{21}) \rangle \langle S^S(t_1, \omega_{2S}')^* \rangle$$

$$C^{SI}(\omega_{2S}, \omega_{21}') = \langle S^S(t_1, \omega_{2S}) S^I(t_1, \omega_{21}')^* \rangle - \langle S^S(t_1, \omega_{2S}) \rangle \langle S^I(t_1, \omega_{21}')^* \rangle$$

$$C^{SS}(\omega_{2S}, \omega_{2S}') = \langle S^S(t_1, \omega_{2S}) S^S(t_1, \omega_{2S}')^* \rangle - \langle S^S(t_1, \omega_{2S}) \rangle \langle S^S(t_1, \omega_{2S}')^* \rangle \quad (3)$$

これらのcovariance のセットはFig. 2のように正方対称行列 \mathbf{C} を形成し、4つの領域にそれぞれ II, SS, IS, SI 間の相関が現れる。

なお、ここで式(3)の $\langle \rangle$ は『 t_1 についての』時間平均を示す。

ここで、Parsevalの定理 ($F(\omega), G(\omega)$ はそれぞれ $f(t), g(t)$ のフーリエ変換)

$$\int_{-\infty}^{\infty} dt f(t) g^*(t) \propto \int_{-\infty}^{\infty} d\omega F(\omega) G^*(\omega) \quad (4)$$

から、covariance行列 \mathbf{C} は s', s'' を 2D-FT して得られるスペクトル \mathbf{F} の 2 乗に対応する：

$$\mathbf{C} = \mathbf{F}^T \mathbf{F} \quad (5)$$

よって、 \mathbf{C} の根行列 $\mathbf{C}^{1/2}$ を計算すれば、2D-FT 法に相当するスペクトルを得ることができる。

従来の 2D-FT 法では、間接次元の分解能は N_1 で与えられる。一方、covariance スペクトルでは直接次元の測定ポイント数 N_2 で与えられる。

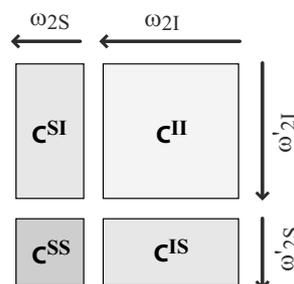


Fig. 2 A covariance matrix. The four regions carries $I-I$, $I-S$, $S-I$, and $S-S$ correlations.

3. 実験と結果

本実験は、磁場 9.4 T で 3.2 mm MAS プロブを用いて行った。また、自作分光計を 2 台同期操作することによりデュアルレーザーシステムを構築した。サンプルには、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ についてフルラベルされたヒスチジンをを用いた。Fig.3 にヒスチジンの構造式と、CPMAS 法で測定した $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ の 1 次元スペクトルを示す。

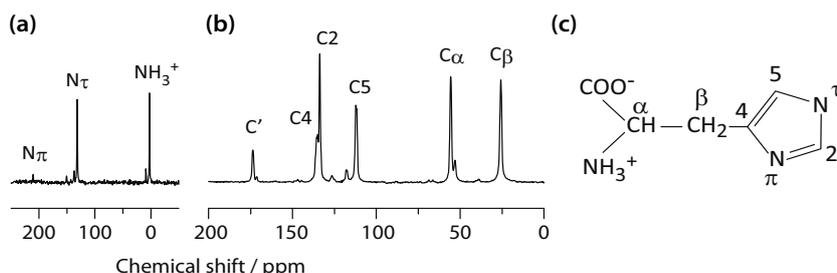


Fig. 3 (a),(b) ^{15}N , ^{13}C CPMAS spectra of uniformly ^{13}C - ^{15}N labeled histidine. The contact time was 200 μs , and the signals were accumulated over 40 times under MAS at 23 kHz. (c) The structure of histidine. The carbon and the nitrogen sites are labeled according to IUPAC nomenclature.

Fig. 4 (a) には、Fig.1 のパルスシーケンスによって得られた ^{13}C と ^{15}N の FID から式 (3) を用いて計算した covariance 行列 \mathbf{C} を示す。また、 \mathbf{C} の根行列 $\mathbf{C}^{1/2}$ を (b) に示す。ここで、間接次元の時間増分 Δt_1 は 33 μs 、ポイント数 N_1 は 32 とした。

(a),(b) では間接測定時間 t_1 を $\Delta t_1 \times N_1 = 1.024$ ms までしか取っていないにも関わらず、良いスペクトルが得られた。一方、同じデータを従来の 2D-FT 法で処理した (c) には間接次元に沿って多くのリップルが発生した。これは、1.024 ms の間に磁化が減衰していないためである。そこで、 N_1 を 8 倍の 256 とし、正味の実験時間を固定するために積算回数を 1/8 にして再測定を行い、2D-FT 法で処理したスペクトルを Fig. 4 (d) に示す。 ^{15}N 領域にはなおリップルが残っており、積算回数の減少による S/N 比の低下が見られた。一方 covariance スペクトルにリップルは見られず、 ^{13}C - ^{13}C , ^{15}N - ^{15}N HOMCOR と共に ^{13}C - ^{15}N HETCOR も明瞭に観測できた。また、ピーク強度比に着目すると 2D-FT 法のスペクトル (d) を良く再現しているのは根行列 (b) である。これから、共分散行列の根行列が従来の 2D-FT 法によるスペクトルに相当することが裏付けられる。

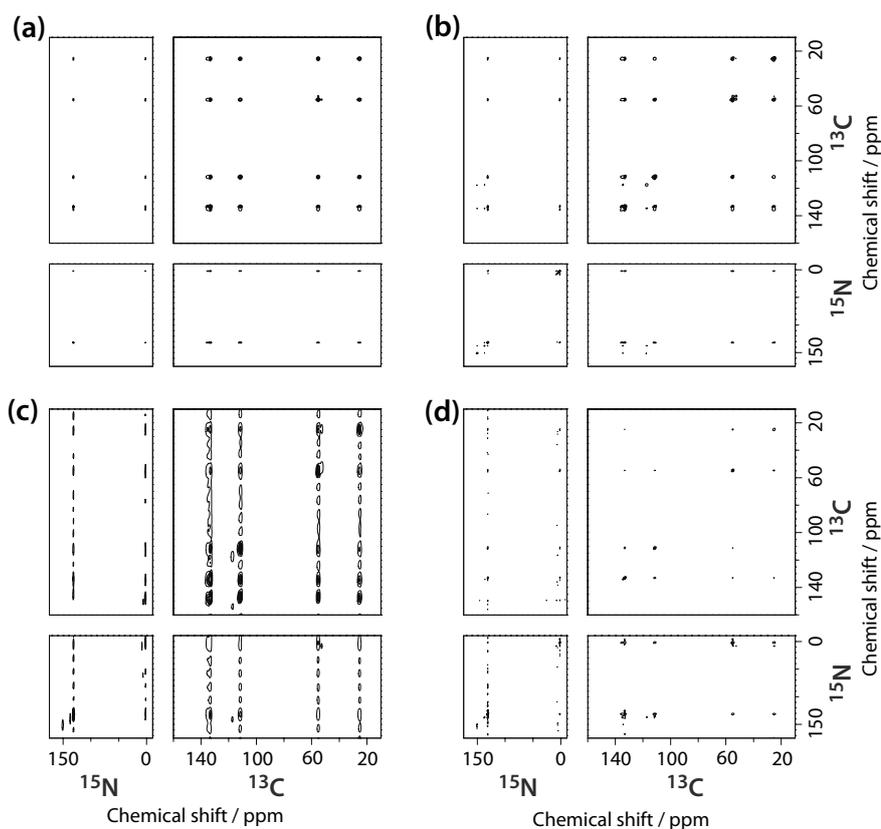


Fig. 4 2D spectra of ^{13}C , ^{15}N -labeled histidine with a pulse sequence described in Fig. 1. (a) and (b) are a covariance spectrum and its square root. (c) and (d) are conventional 2D-FT spectra. Experiment parameters for (a) ~ (c) were as follows : $\tau_{\text{CP1}} = \tau_{\text{CP2}} = \tau_{\text{CP3}} = 200 \mu\text{s}$, $t_d = 3 \text{ ms}$, $\tau_m = 200 \mu\text{s}$, $\Delta t_1 = 33 \mu\text{s}$, $N_1 = 32$, and $N_A = 320$. For (d), N_1 was 256, and N_A was 40. The other parameters were identical with those in (a) ~ (c). The experiments were carried out in a magnetic field of 9.4 T and under MAS at 23 kHz.

4. まとめ

- ここで提案したアプローチにより、covariance HOMCOR だけでなく HETCOR も取得することができる。
- 従来の covariance HOMCOR の利点はそのまま引き継がれており、実験時間を大幅に短縮できる。あるいは同じ時間でより多く積算して大幅に感度を向上できる
- 異種核の信号を同時に取得するために、デュアルレシーバが必要である。

[引用文献]

- [1] R. Brüschweiler and F. Zhang, *J.Chem.Phys.*, 2004, **120**, 5253-5260.
- [2] R. Brüschweiler, *J.Chem.Phys.*, 2004, **121**, 409-414.
- [3] C. Herbst, K. Riedel, Y. Ihle, J. Leppert, O. Ohlenschläger, M. Görlach and R. Ramachandran, *J. Biomol. NMR*, 2008, **41**, 121-125.
- [4] K. Takeda, Y. Kusakabe, Y. Noda, M. Fukuchi, K. Takegoshi, *Phys.Chem.Chem.Phys.* 2012, **14**, 9715-0721.

P12

 β_2 -アドレナリン受容体のefficacy決定機構の解明

○幸福裕^{1,2}, 上田卓見¹, 奥出順也¹, 白石勇太郎¹, 近藤啓太¹, 前田正洋³, 辻下英樹³, 嶋田一夫^{1,4}

¹東大・院薬系

²日本バイオ産業情報化コンソーシアム

³塩野義製薬・創薬研究所

⁴産総研・バイオメディシナル情報研究センター

Efficacy of the β_2 -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region

○Yutaka Kofuku^{1,2}, Takumi Ueda¹, Junya Okude¹, Yutaro Shiraishi¹, Keita Kondo¹, Masahiro Maeda³, Hideki Tsujishita³, and Ichio Shimada^{1,4}

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Tokyo, Japan.

²Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), Tokyo, Japan.

³Shionogi Co., Ltd., Discovery Research Laboratory, Osaka, Japan.

⁴Biomodeicinal Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tokyo, Japan.

Many drugs that target G-protein-coupled receptors (GPCRs) induce or inhibit their signal transduction with different strengths, which affect their therapeutic properties. However, the mechanism underlying the differences in the signalling levels is still not clear, although several structures of GPCRs complexed with ligands determined by X-ray crystallography are available. Here we utilized NMR to monitor the signals from the methionine residue at position 82 in neutral antagonist- and partial agonist-bound states of β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR), which are correlated with the conformational changes of the transmembrane regions upon activation. We show that this residue exists in a conformational equilibrium between the inverse agonist bound states and the full agonist-bound state, and the population of the latter reflects the signal transduction level in each ligand-bound state. These findings provide insights into the multi-level signalling of β_2 AR and other GPCRs, including the basal activity, and the mechanism of signal transduction mediated by GPCRs.

【序】Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は、共通の7回膜貫通構造をもつ、膜タンパク質ファミリーの1つであり、創薬のターゲットとして注目されている。GPCRに結合するリガンドは、Gタンパク質などのエフェクターを介したシグナル伝達を活性化または不活性化するが、その程度はリガンドによって異なる。これをefficacyと呼び、リガンドはefficacyによって、full agonist、partial agonist、neutral antagonist、inverse agonistに分類される。このようなefficacyの違いは薬効に影響することが知られており、例えば、 β_2 -アドレナリン受容体 (β_2 AR) の場合には、full agonistはpartial agonistよりも急性の喘息に対してより有効である。

Gタンパク質共役型受容体、構造平衡、昆虫細胞発現系

○こうふくゆたか, うえだたくみ, おくでじゅんや, しらいしゆうたろう, こんどうけいた, まえだまさひろ, つじしたひでき, しまだいちお

これまでに様々なリガンドに結合したGPCRの結晶構造が明らかになっているにもかかわらず、リガンドごとにefficacyが異なる機構は明らかではない。そこで、我々は、 β_2 ARを解析対象とし、シグナル伝達に直接関与する膜貫通領域の構造を、様々なリガンド存在下で解析することで、efficacyの違いが生じる機構を明らかにすることを目的として、研究をおこなった。

【方法】 β_2 ARは、バキュロウイルス発現系を用い、昆虫細胞expresSF+ により発現した。メチオニンmethyl選択的 ^{13}C 標識は、バキュロウイルス感染直前にメチオニン不含培地に交換し、感染後16時間で200 mg/Lの[methyl- ^{13}C]メチオニンを添加することによりおこなった。膜画分を調製した後、ドデシルマルトシドに可溶化し、コバルトアフィニティーカラムおよびリガンドアフィニティーカラムにより精製した。このようにして調製した[methyl- ^{13}C -Met] β_2 ARを用いて、inverse agonist (carazolol)、neutral antagonist (alprenolol)、partial agonist (tulobuterol、clenbuterol)、full agonist (formoterol) 存在下で、 ^1H - ^{13}C SOFAST-HMQCスペクトルを測定した。

【結果】 1. β_2 ARの調製

上述のように調製した β_2 ARを、SDS-PAGEにより解析したところ、精製度は95 %以上、RIリガンド結合アッセイにより解析したところ、活性割合は80 %以上であった。 β_2 ARには、9残基のメチオニンが広く分布しており、そのうち、M82、M215、M279は活性化にともない大きく構造変化することから (Fig. 1)、メチオニンmethyl基をプローブとしてNMR解析をおこなうこととした。昆虫細胞発現系において、90 %程度の標識率でメチオニンのmethyl基を選択的に ^{13}C 標識する方法を確立した。

2. inverse agonistおよびfull agonist結合状態の β_2 ARのスペクトル

carazolol (inverse agonist) 結合状態のスペクトルでは、概ねメチオニン9残基に対応する数のシグナルが観測された (Fig. 2)。このことは、 β_2 ARのメチオニンが、膜貫通領域を含めて観測可能であることを示している。一方、formoterol (full agonist) 結合状態のスペクトルでは、carazolol結合状態と比較して、いくつかのシグナルの化学シフト変化および消失が観測された (Fig. 2)。

著しいシグナルの重なりを解消するため、溶媒または膜に面した4残基のメチオニンを同時に変異した、4Met変異体を作成した。この4Met変異体では、強度の大きい4個のシグナルが消失し、スペクトルが大きく簡略化された (Fig. 2)。シグナルの帰属は、4Met変異体をベースに、さらにメチオニンを変異することによりおこなった。

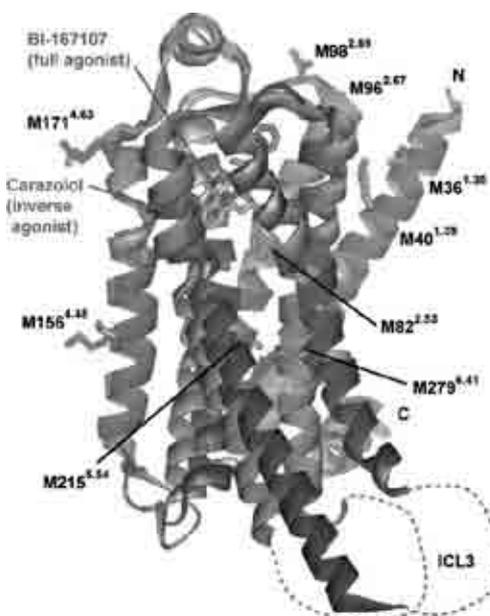


Fig. 1 Distribution of the methionine residues in the overlaid crystal structures of β_2 AR bound with an inverse agonist (PDB code: 2RH1) and bound with a full agonist and a G-protein (PDB code: 3SN6).

帰属の結果、M82、M215、M279でリガンド依存的に大きな化学シフト変化、またはシグナルの広幅化が観測されることがわかった。このことは、活性化にともなう β_2 ARの構造変化を観測できたことを示している。このうち、M82はformoterol結合状態でも、高感度でシグナルが観測されたことから、これ以降、特にM82に注目することとした。M82はcarazolol結合状態で、2個のシグナルを与えており、これらをM82^UおよびM82^Dと呼ぶ。一方、formoterol結合状態では、carazolol結合状態とは異なる化学シフトに、1個のシグナルが観測されており、これをM82^Aと呼ぶ。

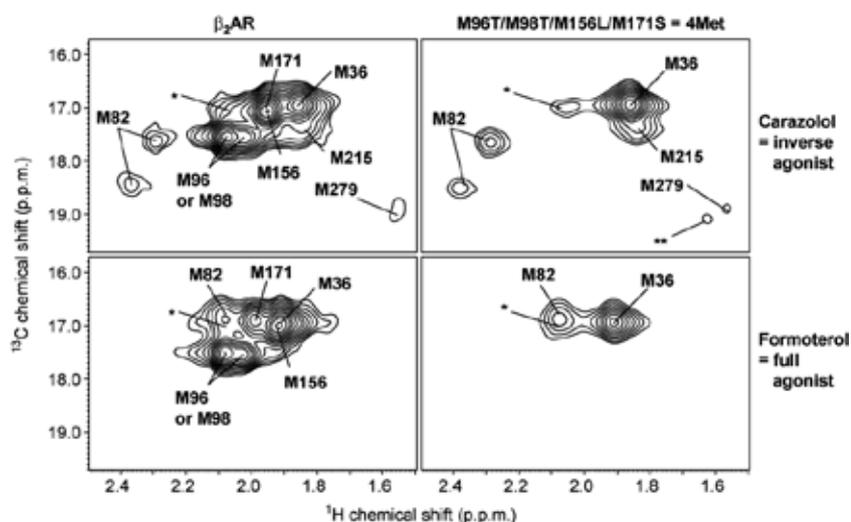
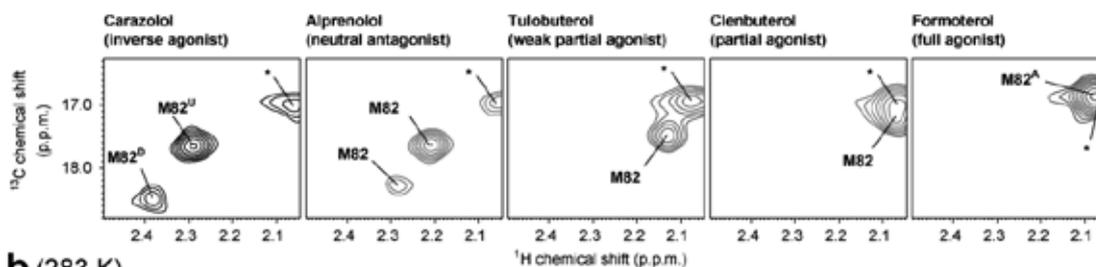


Fig. 2 ^1H - ^{13}C SOFAST-HMQC spectra of [methyl- ^{13}C -Met] β_2 AR and their assignments.

から、これ以降、特にM82に注目することとした。M82はcarazolol結合状態で、2個のシグナルを与えており、これらをM82^UおよびM82^Dと呼ぶ。一方、formoterol結合状態では、carazolol結合状態とは異なる化学シフトに、1個のシグナルが観測されており、これをM82^Aと呼ぶ。

a (298 K)



b (283 K)

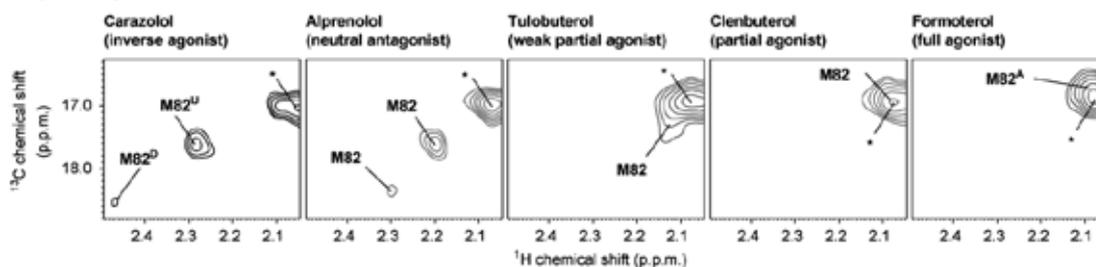


Fig. 3 The regions of M82 resonances in the ^1H - ^{13}C SOFAST-HMQC spectra of [α,β - $^2\text{H}_3$ -, methyl- ^{13}C -Met] β_2 AR/4Met at 298 K (a) and at 283 K (b) in the states with various efficacies.

3. neutral antagonistおよびpartial agonist結合状態のM82由来シグナルの変化

リガンドによりefficacyが異なる機構を明らかにするため、さらにalprenolol (neutral antagonist)、tulobuterol、clenbuterol (いずれもpartial agonist)

結合状態について、M82のシグナルの変化を解析した (Fig. 3)。その結果、これらの状態では、carazolol結合状態とformoterol結合状態の中間的な化学シフトに、シグナルが観測された。

さらに、これらのシグナルが、異なる状態の間を交換しているかを明らかにするため、測定温度を298 Kから283 Kに下げて、測定をおこなった。その結果、partial agonist結合状態について、温度依存的なM82の化学シフト変化が有意に観測された (Fig. 3)。

【考察】メチオニンmethylの ^1H と ^{13}C の化学シフトは、それぞれ、環電流効果を含む周囲の環境と、 χ^3 -二面角に強く依存することが知られている。今回、観測されたM82の化学シフトの特徴を、既知の結晶構造と比較すると、M82^DおよびM82^Uがinverse agonist結合状態の結晶構造に、M82^Aがfull agonistおよびGタンパク質結合状態の結晶構造に対応することがわかった。このことから、M82^DおよびM82^UはGタンパク質を活性化できない不活性化状態に、M82^AはGタンパク質を活性化できる活性化状態に対応すると結論した。

今回、解析したefficacyの異なる5種類のリガンドについて、M82のmethylシグナルの化学シフトは、efficacy依存的に連続的に変化した (Fig. 3)。また、partial agonist結合状態について、温度依存的な化学シフト変化が観測された。このことを考え合わせると、M82^D、M82^U、およびM82^Aに対応する3つのconformationの間を交換しているといえる。

以上のことから、各リガンド結合状態において、 $\beta_2\text{AR}$ は、M82^D、M82^Uに対応する不活性化状態と、M82^Aに対応する活性化状態の間の平衡にあり、inverse agonist、neutral antagonist、partial agonist、full agonistの違いは、活性化状態の割合の違いに起因することが示された (Fig. 4)。GPCRにおいて、シグナル伝達に関わる、膜貫通領域の構造変化様式は共通しており、本研究の解析結果は、 $\beta_2\text{AR}$ を含む多くのGPCRのシグナル制御機構を解明する上で、普遍的な知見を与える。

【参考文献】

Kofuku Y. *et al.*, *Nat. Commun.* 3:1045 doi: 10.1038/ncomms2046 (2012)

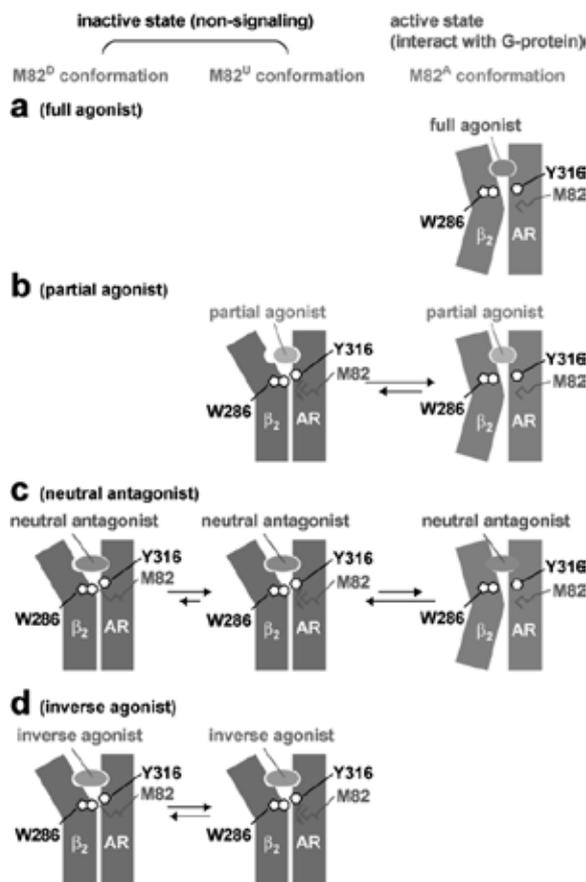


Fig. 4 A proposed mechanism for the differences in the efficacy of $\beta_2\text{AR}$ for full agonists (a), partial agonists (b), neutral antagonists (c), and inverse agonists (d).

P28

Large amplitude interface dynamics in FKBP-ligand complexes revealed by the aromatic ring flipping and hydroxyl proton exchange rates for the interfacial tyrosine residuesChun-Jiun Yang¹, Mitsuhiro Takeda², JunGoo Jee³, Akira M. Ono⁴, Tsutomu Terauchi⁴, and Masatsune Kainosho^{1, 2, 5}¹Graduate School of Science and Engineering & Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan; ²Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya, Japan; ³College of Pharmacy, Kyungpook National University, Daegu, Korea; ⁴SAIL Technologies Inc., Yokohama, Japan; ⁵Protein Research Institute, Osaka University, Osaka, Japan**Abstract**

FKBP-ligand systems have often been used as models for developing structure-based drug design methodologies. The interface structures between the FKBP's and each of their ligands are well-defined and almost identical in the crystalline states. However, in contrast to these static structures, we actually found that large amplitude motions occur in the FKBP-ligand interfaces in solution, with different interface dynamics for the distinct pairs of complexes. In this study, such motions were manifested by quantitative measurements of the aromatic ring flipping and hydroxyl proton exchange rates for the tyrosine residues (Tyr26 and Tyr82) in the FKBP-ligand interfaces, by using the stereo-array isotope labeling (SAIL) method. The variations of the rate parameters between the different FKBP-ligand complexes revealed that the interface dynamics will provide novel clues about the protein-ligand interactions.

The side-chain moieties on protein surfaces often play pivotal roles in their specific interactions with ligands. Although such moieties are inherently flexible in the *free* state, their conformations and dynamics become drastically altered upon ligand binding. Among the various types of amino acids, aromatic residues are frequently locating at the binding interfaces of proteins, and play important and versatile roles in interactions with biomolecules and small chemical compounds. Therefore, aromatic rings would serve as useful probes and indicators to correlate the side-chain dynamics and ligand binding interactions. The FK506 binding proteins 12 (FKBP12) and 12.6 (FKBP12.6) are highly homologous, and form tight complexes with the immunosuppressive drugs FK506 and rapamycin (Rap) (Figure 1), mainly through the hydrophobic interaction between aromatic residues and ligand molecules. With the aid of

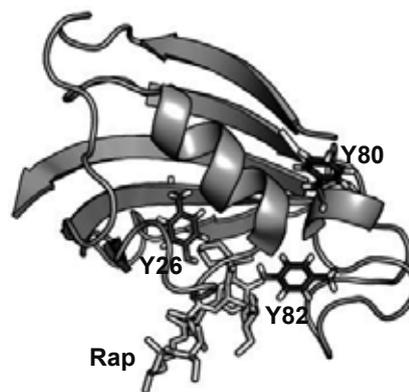


Figure. 1 (A) Crystal structure of FKBP12-Rap complex. Tyr residues and Rap were showed as stick mode.

Key Words: SAIL Method, Binding Interface Dynamics, Large-amplitude Motion

SAIL amino acids (Figure 2), dynamic process of ring-flipping motion and hydroxyl proton (OH) exchange for FKBP-ligand interfacial tyrosine (Tyr) residues can be successfully captured, which is quite difficult to be obtained by traditional NMR method due to the relatively complex spin system of aromatic rings.

By using FKBP12 or 12.6 labeled with various type of SAIL Tyr in the *free* and ligands bound forms, considerable reductions of the ring-flipping rate (k_{flip}) and the OH exchange rate (k_{ex}) constants were observed in the binding interface upon ligands association, either FK506 or rapamycin, due to the restrictions originating from the ligand molecules, as compared to the *free*, solvent-exposed state. We also noticed that the k_{flip} and k_{ex} with slow dynamic processes determined here is much faster than the dissociation constant (k_{off}), indicating large-amplitude motion takes place in the FKBP-ligand interface to permit the aromatic ring rotation and probably the entrance of water molecules in the complex state.

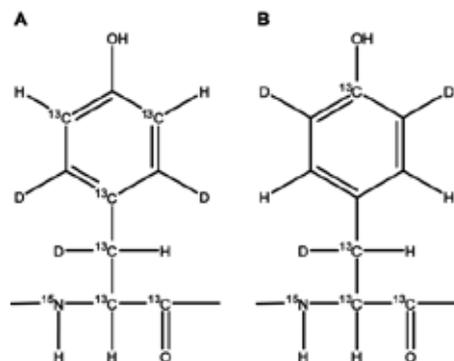


Figure 2. Chemical structures of ϵ -SAIL Tyr (A) and ζ -SAIL Tyr (B). ^{12}C atoms are not shown in the figure.

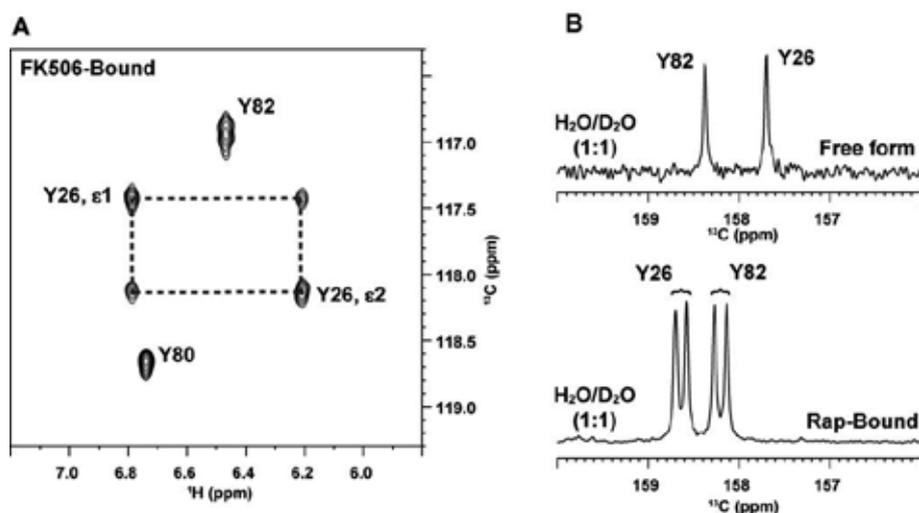


Figure 3. (A) ^1H - ^{13}C C_α longitudinal exchange experiment with ϵ -SAIL Tyr selectively labeled FKBP in the complex with FK506. Two signals for Tyr26 are due to slow flipping motion and link with exchange peaks (without assignment) by dashed line. (B) 1D ^{13}C spectra for C_α resonances are acquired on FKBP labeled with ζ -SAIL Tyr in the free (upper) and rapamycin bound (lower) states, in the $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 1:1 mixture solution.

REFERENCES

1. Kainosho, M. et al. (2006) *Nature*, 440, 52-57.
2. Takeda, M., Ono, A. M., Terauchi, T. & Kainosho, M. (2009) *J Biomol NMR*, 46, 45-49.
3. Takeda, M., Jee, J., Ono, A. M., Terauchi, T. & Kainosho, M. (2009) *J Am Chem Soc*, 131, 18556-18562.

P20

ユビキチンの高エネルギー状態 N_2 の立体構造解明

○北沢 創一郎¹, 亀田 倫史², 矢木 真穂^{3,4}, 菅瀬 謙治⁵, Nicky Baxter⁶, 加藤 晃一^{3,4}, Williamson Michael P.⁶, 北原 亮¹

¹立命館大学薬学部, ²産総研・生命情報工学研究センター, ³岡崎統合バイオサイエンスセンター, ⁴名古屋市立大学院薬学研究科, ⁵サントリー生命科学財団, ⁶シェフィールド大学・分子生物バイオテクノロジー学科

Solution structure of the alternatively folded state of ubiquitin

○Soichiro Kitazawa¹, Tomoshi Kameda², Maho Yagi^{3,4}, Sugase Kenji⁵, Nicky Baxter⁶, Koichi Kato^{3,4}, Williamson Michael P.⁶ Ryo Kitahara¹

¹College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, ²Computational Biology Research Center, Advanced Industrial Science and Technology, ³Okazaki Institute for Integrative Bioscience and Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences, ⁴Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, ⁵eNMR Group, Division of Organic Chemistry, Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences, ⁶Department of Molecular Biology and Biotechnology, The University of Sheffield

We have previously shown that ubiquitin populates a high-energy conformer N_2 at high pressure. Here, we show that the mutation Q41N favors N_2 : high-pressure NMR shows that N_2 is ~70% populated in Q41N but only ~20% in the wild type at ambient pressure. This allows us to characterize the structure of N_2 , in which the α_1 -helix, the following loop, β_3 and β_5 change their orientations relative to the remaining regions. The N_2 conformers produced by high pressure and by the Q41N mutation are closely similar in both structure and dynamics. The conformational change to produce N_2 is orthogonal to that seen when proteins containing a ubiquitin interacting motif (UIM) bind at the hydrophobic patch of ubiquitin, but matches changes seen on binding to the E2 conjugating enzyme. We propose that Q41N is a model for structural changes required for ubiquitin conjugation.

【研究の背景と目的】

水溶液中で蛋白質は、天然状態から変性状態までの広い構造空間を構造変化し、熱力学的平衡状態にある。特に天然状態よりわずかにギブスエネルギーが高い状態(高エネルギー状態)との構造揺らぎは、分子認識など蛋白質の機能発現に関わっているといわれている。高圧力NMR法は、存在比が低く観測するのが困難な高エネルギー状態の分布率を、加圧により分布率を増加することで解析する方法である。

高圧力NMR法により、ユビキチンは2つの中間状態(準安定構造 N_2 , 局所変性構造 I)の存在が明らかになった。 N_2 状態は、ユビキチンの α_1 -helixと β_3 -strand, β_5 -strandの配向が変化し、関連酵素群(E1,E2)との相互作用部位が開いた構造をしていることが、高エネルギー状態, 立体構造解析

○きたざわ そういちろう, かめだ ともし, やぎ まほ, すがせ けんじ, につきー ばくすたー, かとう こういち, ういりあむ まいける, きたはら りょう

3000気圧下における立体構造解析により分かっている。面白いことに高ギブスエネルギー状態はE1-E2-E3カスケードを有するホモログ群で進化的に保存されていることがわかっており、ユビキチンの機能発現における重要性が示唆されている。本研究では高エネルギー状態の構造転移に関わる相互作用を特定し、高エネルギー状態を模倣した変異体の作成とその立体構造解析・ダイナミクス・安定性の解明に成功した。

【方法】

最安定なN₁構造 (1 bar) と準安定なN₂構造 (3000 bar) の構造比較により構造転移に関わる相互作用を特定し、これら相互作用を減弱した変異体 (K11A,E34A,Q41A,Q41N)を作成した。最もN₂状態へ平衡が傾いたQ41N変異体について距離情報 (NOE)と角度情報 (RDC, TALOS+) を基に立体構造解析を行い、高圧力NMR法により、N₂状態の分布率を求めた。各種緩和解析(R₁,R₂,hnNOE)により構造転移を明らかにし、水和NMR法 (CLEANEX-PM NMR) により構造安定性について明らかにした。

【結果と考察】

変異体の¹⁵N/¹H HSQCスペクトルを測定し、アミノ酸変異による化学シフトの変化と圧力(3000–30 bar)による化学シフトの変化の間に相関があることから、アミノ酸変異によってN₂状態の安定化が示唆された。高圧力NMR法により、最も化学シフト変化量の大きいQ41NのN₂状態の分布率は約70%であることが示された。また、変異による化学シフト変化は、ほとんどの残基でK11≈E34A<<Q41A<Q41Nであり、Q41とI36COの水素結合がN₁構造の安定化に大きな寄与があることが分かった。Q41Nについて、距離情報(NOE)と角度情報(RDC, TALOS+)を基に精密な立体構造解析を行った。Q41Nは、3000気圧下で決定されたWTのN₂構造と同様に、α₁-helix, following loop, β₃-strand, β₅-strandの配向が変化していることが分かった。また主成分解析から、N₂構造は、これまでに報告されているユビキチンのnative state ensemble構造(DER, EROS, ERNST)を逸脱した新しいコンフォメーションであることが分かった。このQ41Nの立体構造において、Ubiquitin Interacting Motif (UIM)を含む多くのubiquitinリガンドの共通の相互作用部位である疎水性パッチ(L8-I44-V70)の構造変化は見られなかった。

さらにQ41Nの緩和解析からα₁-helix, following loop, β₃-strand,β₅-strand 領域でR₂値に増加が観測された。このus-ms域の構造揺らぎは、高圧力下でも観測されており、緩和解析からもN₁-N₂間の構造転移が増幅されたことが分かった。構造変化が大きいI36周辺部分はE2との相互作用面であることから、N₁-N₂構造揺らぎはE2との相互作用に必要な相互作用の可能性はある。



Fig.1. Solution structure of Q41N

P74

生体分子の ^1H 精密位置決定～超高速MAS ^1H 固体NMRによる ^1H DQMAS測定とGIPAW化学シフト計算～

○矢澤宏次¹, 鈴木不律², 西山裕介³, 西村勝之⁴, 梶弘典², 朝倉哲郎^{1,4}
¹農工大・工, ²京大・化研 ³JEOL RESONANCE, ⁴分子研

Determination of precise ^1H geometry in Biomolecules.**- ^1H solid state NMR analysis by ^1H DQMAS under ultra high speed MAS and GIPAW chemical shift calculations.-**

○Koji Yazawa¹, Furitsu Suzuki², Yusuke Nishiyama³, Katsuyuki Nishimura⁴, Hironori Kaji² and Tetsuo Asakura^{1,4}

¹Department of Biotechnology, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.

²Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Japan.

³JEOL RESONANCE, Akishima, Japan.

⁴Institute for Material Science, Okazaki, Japan.

The well-resolved ^1H solid state NMR spectra of alanine tripeptide (Ala_3) with anti-parallel and parallel β sheet structures are assigned by using double-quantum magic-angle-spinning (DQMAS) measurements under ultra high field with ultra fast MAS NMR. The observed ^1H chemical shifts are in excellent agreement with the ^1H chemical shifts calculated by first principles gauge-including projector augmented wave (GIPAW) method for ^1H geometry optimized structures, indicating that the accurate ^1H positions of the structure was obtained by ^1H DQMAS and GIPAW calculation. The chemical shifts of the amide protons are described by the inverse third power of inter-molecular $\text{NH}\dots\text{OC}$ direct hydrogen bond distance. This relationship can be used to evaluate inter-molecular $\text{NH}\dots\text{OC}$ direct hydrogen bond distance of peptides and proteins in the solid state from the amide proton chemical shifts.

【緒言】 ^1H 核は天然存在比ほぼ100%で感度が非常に高く、また分子表面に存在するため、分子間近接に敏感である。ペプチドやタンパク質の溶液NMR構造解析において、アミドプロトン化学シフトの値は、アミド基が直接関わる水素結合間距離と密接に関わることから、その化学シフトと水素結合距離との相関式が提案され、構造研究に利用されてきた。一方、固体中では ^1H - ^1H 核間の強い双極子相互作用によってスペクトルが広幅化するため、化学シフトを得ることが難しく、これまで構造解析にはほとんど利用されてこなかった。

本研究の流れをFig.1にまとめた。本研究では、ペプチド、タンパク質等生体分子の新規固体構造解析法として、これまでスペクトルの広幅化のために同定できなかった ^1H 固体NMR化学シフトを用いた、 ^1H 精密位置決定法を開発することを目的とした。そこで、まず単結晶X線回折によって構造が既知であるアラニン3量体(Ala)₃について、超高磁場と超高速試料回転の組み合わせによって先鋭化した ^1H 固体NMRスペクトル

Biomolecules, ultra high speed MAS, ^1H solid state NMR

○やざわこうじ, すずきふりつ, にしやまゆうすけ, にしむらかつゆき,
 かじひろのり, あさくらてつお

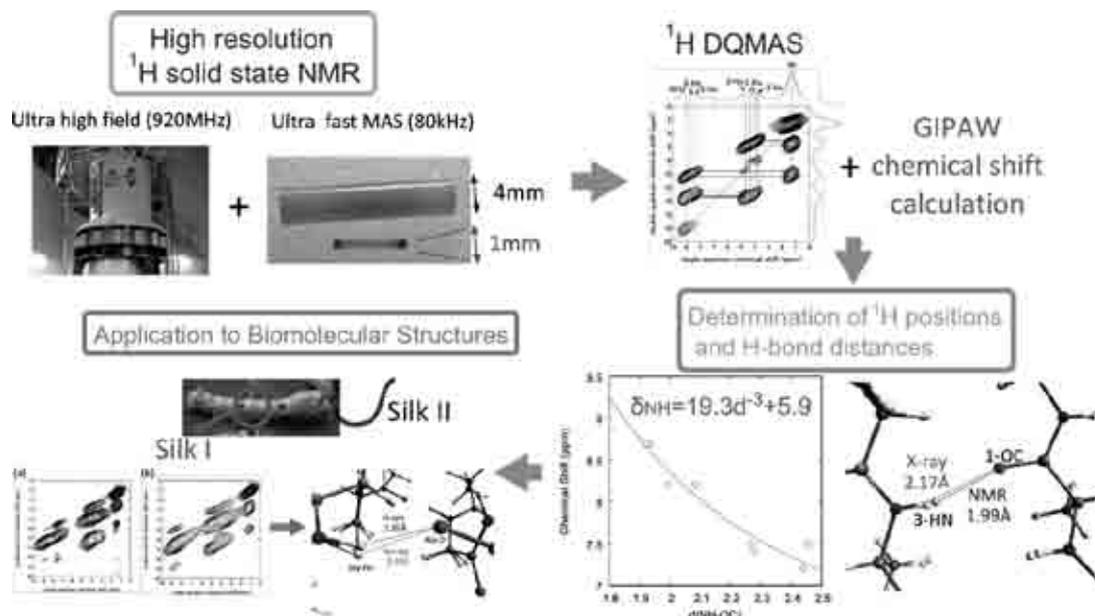


Fig.1 Concept and strategy of this research. High resolution ^1H solid state NMR spectra obtained by ultra fast MAS under ultra high field magnet probes precise ^1H geometry, which is inaccessible by x-ray diffraction, by combination with GIPAW chemical shift calculations. Relationship between chemical shift and intermolecular H-bond distance is available for analyses of biomacromolecular structures, such as crystalline fractions with Silk I and Silk II structures.

から化学シフト値を決定した。さらに精密化学シフト計算を組み合わせることで、 $(\text{Ala})_3$ についてX線解析ではアクセスできない正確な ^1H の位置を決定し、化学シフトと水素結合距離との相関式を決定した。次に、この方法を生体高分子の分子間構造解析に応用し、絹タンパク質の繊維化前後の結晶部の構造解析を行った。

【実験】 試料はX線構造既知の逆平行 β シート構造の $(\text{Ala})_3$ および、DMFで処理して平行 β シート構造に変換したものをを用いた。また、キモトリプシンで家蚕(*Bombyx mori*)絹水溶液のTyr残基C端を切断、得られた沈殿を繊維化前のSilk I型結晶部として回収した。また、それをギ酸に溶解させ、乾燥させたものを繊維化後のSilk II型結晶部とした。また比較対象として、絹結晶部モデルペプチド $(\text{AG})_{15}$ を合成し、同様に溶媒処理を行いSilk IおよびSilk II構造を得た。

超高磁場NMR装置は分子科学研究所のJEOL JNM-ECA920(JEOL RESONANCE)を用い、超高速試料回転は1mm試料管プローブセットを用いて主に回転速度70kHzで行った。 ^1H - ^1H 近接の観測にはDipolar Homonuclear Homogeneous Hamiltonian double-quantum/single-quantum (DQ-SQ) correlation法[1]を用いた。90°pulse=12.9 μs 、繰り返し時間2s、2tdelayはS/N比が最大となる0.3msで行った。 ^1H 化学シフトの外部基準には、シリコンゴム(0.12ppm from TMS)を用いた。

化学シフト計算は、Geometry optimization and the gauge-including projector augmented wave (GIPAW)法を用い、CASTEPプログラムにより周期境界条件下で行った。

【結果・考察】 まず ^1H 固体NMR法により、 ^1H の正確な位置と水素結合距離を決定できるかを検証するため、X線構造が報告されている $(\text{Ala})_3$ の平行および逆平行型 β シートの ^1H DQMAS測定を行い、各ピークを帰属し、その化学シフトを決定した。Fig.1に示すように、実測の化学シフトはX線構造から直接GIPAW法により計算した化学シフト (No-opt.) の場合、一致は十分でなかったが、重原子を固定し ^1H の位置を最適化した構造から計算した場合 (H-opt.)には、よく一致した。(Fig.2a) このことから ^1H DQMASと化学シフト計算と併用することにより、より正確な ^1H の位置情報が得られることがわかった。また、 β シート構造の分子間水素結合に直接関わるアミドプロトンの化学シフト δ_{NH} は、水素結合距離 d と $\delta_{\text{NH}}=19.3d^3+5.9$ (RMSD 0.07Å) の関係で表されることがわかった。ここで得られた係数19.3ppm・Åは溶液NMRによって得られたタンパク質 (basic pancreatic trypsin inhibitor)の β シートにおける係数19.2ppm・Å[2]と非常によく一致した。これは固体状態でのペプチドの化学シフトと水素結合距離の関係を表した初めての例である。化学シフトは水素結合距離だけでなく、磁気異方性等、N-H-Oの角度にも影響されるが、 β シートにおいてはその影響が少なく、化学シフトを求めることで距離情報を0.1Å以下の精度で抽出できることは非常に興味深い。

次に ^1H 固体NMRを用いたタンパク質の分子間構造解析への応用として、絹タンパク結晶部の繊維化前後 (Silk I および Silk II) の構造解析を行った。これらの構造モデルは既に報告されているが、 ^1H の位置情報の詳細は分かっていない。また、Silk II型構造に関しては、1955年にMarshらによって報告された逆平行 β シート構造[3]が知られているが、実測のX線回折強度と構造モデルに基づく強度との一致はあまりよくなく (Rfactor=37%)、精密な構造決定が求められている。

試料には主に $(\text{AGSGAG})_n$ 配列を有する絹タンパク結晶部、およびそのモデルペプチド $(\text{AG})_{15}$ を用いた。Fig. 2に絹結晶部と $(\text{AG})_{15}$ のSilk I、Silk II型の ^1H 固体NMRスペクトル、Fig.3にSilk IおよびSilk II型絹結晶部の ^1H -DQMASスペクトルを示す。最も高磁場側に表れる CH_3 基のピークはAla残基にしか存在しないため、 ^1H -DQMASスペクトルをこのピークから解析し、全 ^1H の化学シフトを同定した。両試料ともにSilk IではAla残基とGly残基のNH基の化学シフトはそれぞれ7.6、8.9ppmと大きく異なるのに対し、Silk IIでは8.7ppm付近で重なって観測された。これは β シートを形成することで分子

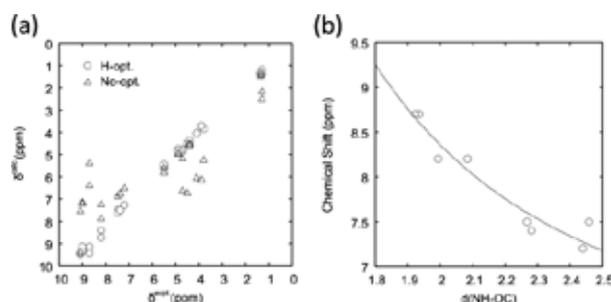


Fig.2 (a) Comparison of the observed ($\delta^{\text{expt.}}$) and calculated ($\delta^{\text{calc.}}$) ^1H chemical shifts of Ala_3 . For NH_3 and CH_3 , three calculated ^1H chemical shifts are averaged. (b) The plot of the experimentally determined ^1H chemical shifts for the hydrogen-bonded amide protons in AP and P β sheet structures of Ala_3 vs. the distance between these protons and the nearest oxygen atoms. The solid line represents the best fit curve, $\delta_{\text{NH}}=19.3d^3+5.9$.

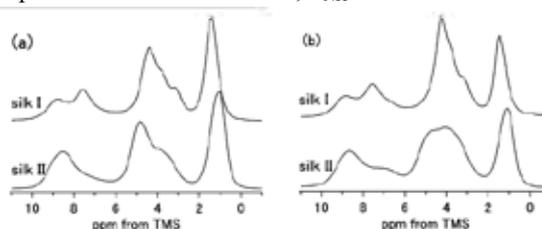


Fig.3 ^1H Solid state NMR spectra of (a) AG_{15} and (b) *B.mori* silk crystalline fraction with Silk I and Silk II structures.

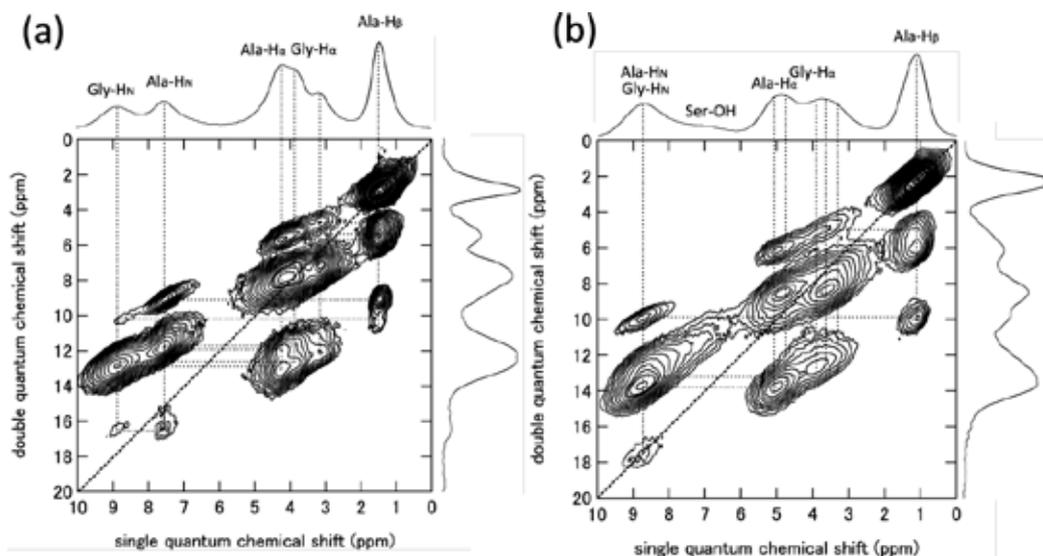


Fig. 4 ^1H -DQMAS spectra of *B.mori* silk crystalline fraction with (a) Silk I and (b) Silk II structures.

間水素結合距離の残基による違いが表われなくなっていることを示唆している。また結晶部と $(\text{AG})_{15}$ のDQMASスペクトルを比較するとSilk I、Silk IIともに、水素結合距離を強く反映するNH基の化学シフトは両試料間でほとんど変わらず、Ser残基のピークもAla残基とは区別できなかったことから、両結晶構造中でSer基の主鎖部はAla基と同様のコンフォメーションで存在していると考えられる。次に $(\text{Ala})_3$ で求めた化学シフトと水素結合距離との関係(Fig.2b)から、Silk IおよびSilk IIの水素結合距離を算出したところ、Silk Iでは $\text{H}^{\text{N}}(\text{Ala})\text{-O}(\text{Gly})=2.13\text{\AA}$ 、 $\text{H}^{\text{N}}(\text{Gly})\text{-O}(\text{Ala})1.84\text{\AA}$ となり、文献値の2.01、 1.85\AA [4]とよく一致した。一方、Silk IIでは、 $\text{H}^{\text{N}}(\text{Ala})\text{-O}(\text{Gly})$ 、 $\text{H}^{\text{N}}(\text{Gly})\text{-O}(\text{Ala})$ 共に 1.91\AA となり、文献値の 1.77 、 1.76\AA [3]と比べると 0.15\AA ほど長く、X線から得られた構造モデルを修正できた。今後はさらにシート間距離の解析を行う。

以上により、これまで構造解析にほとんど用いられてこなかった ^1H 固体NMRを超高磁場+超高速回転により高分解能化することによって、低分子だけでなく、タンパク質の分子間構造の解析に応用できることが分かった。今後は今回得られた ^1H シグナル情報を活かすため、試料を部分的に ^{13}C や ^{15}N ラベルすることにより、それらと結合した ^1H 間の近接情報を ^1H 観測により得る。これにより、これまで重原子のNMRでは明らかにされていない β シート間距離など、より詳細なSilk IIの構造解析を行う。

【謝辞】 本研究は一部、農林水産省アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクトならびに平成23年度科学研究費補助金基盤研究A(課題番号23245045)により実施された。

【参考文献】

- [1] M. Deschamps, et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011, **13**, 8024
- [2] G. Wagner, A. Pardi, and K. Wuethrich. *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 5948.
- [3] R. E. Marsh, R. B. Corey, L. Pauling, *Biochem. Biophys. Acta*, 1955, **16**, 1
- [4] Asakura et al., *J. Mol. Biol.* **306**, 291 (2001). Asakura et al., *Macromolecules* **38**, 7397 (2005).

P130**NMRを用いた定量的元素分析**

○一条直規、武田和行、野田泰斗、竹腰清乃理
京都大学大学院 理学研究科 化学専攻

Quantitative elemental analysis by NMR

○Naoki Ichijo, Kazuyuki Takeda, Yasuto Noda, and K. Takegoshi

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

We explore the possibility for identifying the composition of atomic elements in materials of chemical interest by NMR. To keep the efficiency of signal acquisition common for all spin species, we propose to fix the frequency and vary the magnetic field to cover the resonance conditions of the isotopes involved in a sample. For this purpose, we developed an experimental setup using a cryogen-free, field-variable superconducting magnet. Quantitative elemental analysis is demonstrated not only in solution as well as in the solid-state under magic-angle spinning.

1. Introduction

未知試料の元素組成を決定するための手法として、燃焼法、原子吸光分析法(AAS)、電子線マイクロアナライザ法(EPMA)、X線光電子分光法(ESCA、XPS)、誘導結合プラズマ法(ICP)、二次イオン質量分析法(SIMS)等の様々な元素分析法が確立されているが、その多くは測定の際に試料を破壊してしまうという難点がある。上記のうちEPMA、ESCAは非破壊的だが表面の分析しかできない。つまり、現在のところ物質内部の組成を知るには試料を分解するしかなく、常温常圧下におけるバルク試料の非破壊的要素分析は実現されていない。NMRはエネルギーの低いラジオ波を用いた分光法のため、原理的に非破壊で物質内部の情報を得られるという利点がある。本研究で我々は、従来法の弱点を補完するべく、NMRを用いた元素分析の実現可能性を探求した[1]。

ArとCeを除く全ての安定元素には固有の磁気回転比の核スピンを持つ同位体があり、原理的には共鳴条件の掃引により試料中の各元素の有無が判別できると期待される。しかし、固定磁場を用いる一般的なシステムでは、複数の核種にアクセスするために周波数を切り替える必要があり、煩雑なプローブチューニング作業を要する。さらに検出効率が周波数に依存するため、信号強度から核種の存在比を決定する定量的分析は困難である。そこで我々は、周波数を固定して磁場強度を広範囲に変えることで、同一の回路構成と周波数の下に異なる核種の共鳴条件をカバーし、定量的な測定を実現した。

元素分析、磁場可変、異種核間定量

○いちじょうなおき, たけだかずゆき, のだやすと, たけごしきよのり

2. Principle

磁気回転比 γ のスピンは磁場 B_0 において、ラーモア周波数

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \quad (1)$$

で歳差運動する。よって磁気回転比 γ の核スピンの集合に対し周波数 $|\omega_0|$ のラジオ波を照射することで共鳴が起こり、コイルに生じる誘導起電力 V_{emf} としてNMR信号が観測される。 V_{emf} は鎖交磁束の時間変化に等しい（ファラデーの電磁誘導の法則）から、熱平衡磁化 M を用いて

$$V_{\text{emf}} \propto \omega_0 M \quad (2)$$

と書ける。温度 T における熱平衡磁化は、核スピンの数を N 、スピン量子数を I として

$$M = \frac{N\gamma^2 \hbar^2 I(I+1)B_0}{3k_B T} \quad (3)$$

と表される（キュリーの法則）。

NMR信号の強度 S は誘導起電力に比例するので

$$S = \eta V_{\text{emf}} \quad (4)$$

（ η は検出効率）と表すと、式 (3)、(4) より、一定温度の下

$$S \propto \eta N \gamma^2 \omega_0 I(I+1) B_0 \quad (5)$$

となる。これより、通常の測定のように磁場強度が一定の場合、磁気回転比 γ_i ($i = 1, 2, \dots$) の核種の存在比は得られた信号強度を用いて

$$N_1 : N_2 : \dots = \frac{S_1}{\eta_1 |\gamma_1|^3 I_1(I_1+1)} : \frac{S_2}{\eta_2 |\gamma_2|^3 I_2(I_2+1)} : \dots \quad (6)$$

を計算すれば求められる。ただし、核種によって決まっている γ_i や I_i と違い、 η_i は測定時の回路構成や周波数に依存するため、これを逐一実験的に求める必要がある。

一方、周波数を固定し磁場を変えることで異なる核種にアクセスすれば、全ての測定において検出効率を同一にすることが可能となる。したがってこの場合は、核種の存在比は

$$N_1 : N_2 : \dots = \frac{S_1}{|\gamma_1| I_1(I_1+1)} : \frac{S_2}{|\gamma_2| I_2(I_2+1)} : \dots \quad (7)$$

で直ちに求めることができる。

ただし上記の議論が成り立つには、ラジオ波パルス照射する前に核スピンの熱平衡に達している、かつ核スピンのフリップ角が等しい必要があるため、測定の際には注意を要する。後者に関しては、各核種に対し、共鳴磁場強度に比例した強度のパルスを照射することで実現される。

3. Experimental setup

広範囲に磁場強度を変えるという目的のため、我々は磁場可変型の無冷媒超伝導マグネット(Cryogenic Ltd.)を導入した。このマグネットは卓上サイズで、ボアは直径50.8 mmで大気に開放されている。超伝導コイルは外部の冷却機によって4 K以下に保たれている。コイルの一部を温め局所的に超伝導を破り、電流を制御することで、磁場を0から7 Tまで数分のうちに変えることができる。自作NMR分光計[2-4]にマグネット操作機能を追加することでNMR測定および磁場掃引を行うことができるようにした。

プローブはマグネットのボアサイズに合わせて自作した。マジック角試料回転(MAS)による測定が行えるよう3.2 mmスピニングモジュール(Agilent)を備え付け、共振回路を設計・製作した。周波数は実験に応じて容易に変更できるようになっている。

4. Results and discussion

(i) Liquid: 5.00 M NaH_2PO_4 aq. (30, 75 MHz)

我々はまず溶液試料に対するNMR元素分析のデモンストレーションとして、5.00 Mリン酸二水素ナトリウム(NaH_2PO_4)水溶液の測定を行った。試料は3 mmのガラス管に封入し、共振周波数は30.03 MHzとした。

磁場を0から上昇させると、最初の信号は0.7054 Tで観測された (Fig.1 (a))。これは ^1H の共鳴条件に対応する。スペクトルの線幅の主な原因は静磁場の不均一性によるものである。磁場を大きくしていくと1.742 T、2.665 Tで信号が観測され (Fig.1 (b),(e))、これらをそれぞれ ^{31}P 、 ^{23}Na と帰属したが、2.477 T、2.653 Tにも信号が現れた (Fig.1 (c),(d))。これらの信号はそれぞれ ^{65}Cu 、 ^{63}Cu の共鳴条件に現れ、試料管を抜いても観測されたため、サンプルコイルの銅線によるものと推測した。コイルの銅線を銀線に換えると信号が観測されなくなったことから、これらをコイル内の ^{65}Cu 、 ^{63}Cu と帰属した。なお、上記の5つ以外に信号は観測されなかった。

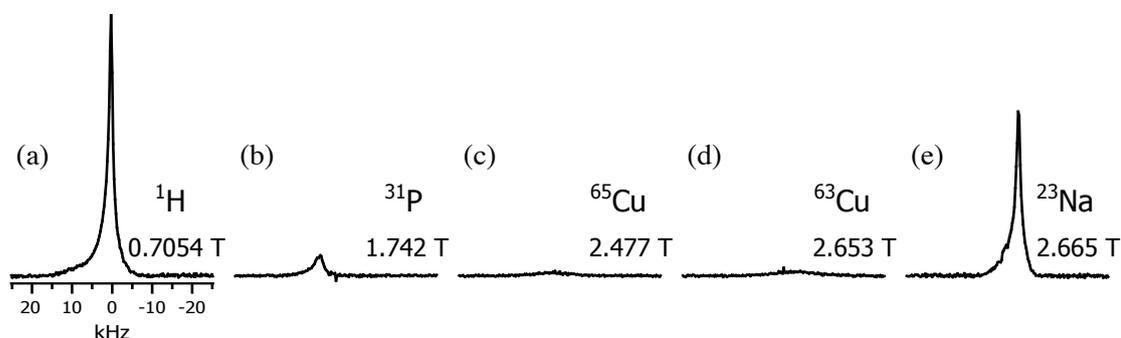


Fig. 1 Spectra obtained in aqueous solution of NaH_2PO_4 in magnetic field of (a) 0.7054 T, (b) 1.742 T, (c) 2.477 T, (d) 2.653 T, and (e) 2.665 T. The carrier frequency was fixed at 30.03 MHz. The signals were assigned to be ^1H , ^{31}P , ^{65}Cu , ^{63}Cu , and ^{23}Na , respectively.

次に定量的なNMR元素分析を行うために、共鳴周波数を75.00 MHzに固定し、磁場値1.761 T、4.349 T、6.656 Tにて ^1H 、 ^{31}P 、 ^{23}Na のNMR測定を行った。その際スピン系が確実に熱平衡に達してから測定を行うために、飽和回復法により各核種のスピン-格子緩和時間を求め、その7倍以上の繰り返し時間を用いた。また、プローブ部品由来の ^1H バックグラウンド信号強度も予め測定し、差分を取った。結果、それぞれのスペクトルの面積強度の比は $^1\text{H} : ^{31}\text{P} : ^{23}\text{Na} = 59.4 : 1.00 : 3.24$ となった。測定データのSN比から、誤差は4.1%と見積もった。これより、式(7)を用いて各スピンの数の比を計算すると $^1\text{H} : ^{31}\text{P} : ^{23}\text{Na} = 24.0 : 1.00 : 0.991$ となり、秤量値から求めた比(24.1 : 1.00 : 1.00)と誤差の範囲内で一致した。

(ii) Solid: Sn_4P_3 powder (106 MHz)

固体試料に対するデモンストレーションとして、回転速度10 kHzのMASの下、リン化スズ(Sn_4P_3)粉末を測定した。 ^{31}P 、 ^{119}Sn および ^{117}Sn を観測するため共鳴周波数を106.0 MHzとし、それぞれ磁場6.141 T、6.621 T、6.929 Tで測定を行った。信号強度からスピンの数の比は $^{31}\text{P} : ^{119}\text{Sn} : ^{117}\text{Sn} = 10.1 : 1.10 : 1.00$ となり、誤差は5.3%と求められ、理論値 $^{31}\text{P} : ^{119}\text{Sn} : ^{117}\text{Sn} = 9.77 : 1.12 : 1.00$ と一致した。

5. Summary and prospects

本研究で我々は、NMRを用いた新たな元素分析法の可能性を示した。各同位体の存在比の定量を信号強度の直截的な比較によって達成するために、磁場強度を変えることで共鳴条件を掃引する必要があったが、それを磁場可変超伝導マグネットの導入により実現した。溶液および粉末試料に対して定量的NMR元素分析のデモンストレーションを行った。この研究で測定したリン化スズはリチウムイオンを吸収・放出する機能を有しており、定量的NMR元素分析による非破壊的な化学量論的分析は電池開発にも資すると期待できる。

今後は静磁場の不均一性による広幅化を改善するためにシム調整機構の開発を行う予定である。これにより化学シフトなどの情報が解析できるようになれば、元素分析と同時に化学種の同定が可能になると期待される。

References

- [1] K. Takeda, N. Ichijo, Y. Noda, and K. Takegoshi, *J. Magn. Reson.*, accepted.
- [2] K. Takeda, *Rev. Sci. Instrum.*, **78**, 033103 (2007).
- [3] K. Takeda, *J. Magn. Reson.*, **192**, 218 (2008).
- [4] K. Takeda, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.*, **74**, 355 (2011)

P84

固体NMRによるセメント硬化体の化学構造および水和・硬化プロセスの解析

○高橋貴文¹、古瀬佑馬²、大窪貴洋²、金橋康二¹¹新日鐵住金(株) 先端技術研究所²千葉大学大学院 工学研究科

Analysis of Chemical Structure, and Hydrating and Hardening Process of Cement Paste Using Solid State NMR

○Takafumi Takahashi¹, Yuma Kose², Takahiro Ohkubo², Koji Kanehashi¹¹Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation²Graduate School of Engineering, Chiba University

Cement-based cold bond pellet produced by coagulating dusts will be ready for a raw material in blast furnace. Since chemical structure and pore structure drastically change depending on curing time, mechanism of hydration process remains unclear despite of long-term research. In this study, we have applied two approaches to investigate time-dependent changes in chemical structure and pore structure. As a result of ²⁷Al MAS/3QMAS and ²⁹Si MAS NMR, it is found that compression stress is dominated by Al-bearing hydrates (e.g. ettringite) in the early stage of curing (~ 6h), followed by Si-bearing hydrates such as CSH (calcium silicate hydrate) in the longer term. Furthermore, *in situ* ¹H NMR relaxation time analysis shows that pore diameter gradually decreases as curing time, and consequently *gel* pore with diameter smaller than 40 nm is formed when CSH-like hydrates are observed in ²⁹Si MAS NMR.

1. 緒言

近年の原料価格高騰を背景に、劣質原料を有効活用する製鉄プロセスが重要となっている。その中で、水和反応を利用した固める技術がキーテクノロジーとなりつつある。その1例として、水和セメントをバインダーとする炭材内装型ペレットがある。これは、ダストや微粉鉄鉱石等の鉄源とコークス粉を近接配置し反応率を高めることによって、高炉の還元材比を低減するもので、大きなコストメリットが期待されている。ペレットの強度発現には、バインダーであるセメントの水和・硬化プロセスが重要な役割を果たす。水和反応の進行とともに内部の空隙構造および化学構造が変化する。強度発現に関わる化学構造や空隙種類を明らかにすることによって、最適な養生条件を見出すことができ、最終的にはセメント使用量削減などの効果も期待できることから、コスト削減に直結する重要な課題である。

ただし、セメントは、エーライト $3\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2(\text{C}_3\text{S})$ 、ビーライト $2\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2(\text{C}_2\text{S})$ 、アルミネート $3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3(\text{C}_3\text{A})$ 、フェライト $4\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3(\text{C}_4\text{AF})$ など複数のクリンカー鉱物から構成され、さらに、水和反応によって幾つかの水和物が加わるため、化学構造を理解することは容易ではない。これまでにもXRD等によりセメント中の化学構造を解析し、硬化プロセスを解析する研究が行われてきた。しかしながら、非晶質な水和物なども存在することから、水和・硬化プロセスには不明な点も多い。そこで、我々は、核種毎の構造情報が得られ、非晶質材料にも有効な固体NMRを用いて、強度発現に寄与する化学構造や空隙構造を明確にし、これらを指標として養生条件の最適化、セメント使用量の削減を目指している。本研究では、²⁹Si, ²⁷Al, ¹H多核固体NMRにより化学構造を解析するとともに、*In-situ* ¹H NMRの緩和時間分布より空隙構造の発達過程を解析した。更に、構造と圧潰強度との関係を検討し、強度発現メカニズムについて考察した。

固体NMR、セメント、水和・硬化

○たかはしたかふみ、こせゆうま、おおくぼたかひろ、かねはしこうじ

2. 実験

純水と普通ポルトランドセメント(Table 1)を重量比0.4の割合で混合し、1分間混練した後、密閉容器に入れて25°Cで養生した。所定時間(注水後6h, 12h, 24h, 42h, 72h)養生後、セメント硬化体を脱型し、これを減圧下で繰り返しアセトン浸漬した後、40°Cで24h乾燥した。成型体の圧潰強度試験を行った後、破片試料を乳鉢で粉末になるまで粉砕し、NMR測定に供した。

Table 1 Chemical composition of portland cement used in this study.

SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	P ₂ O ₅	MnO	SrO
20.8	5.48	3.07	66.5	1.04	0.21	0.24	0.30	0.26	0.1	0.038

²⁷Al MAS/MQMAS測定には、JEOL ECA700分光計(静磁場16.4T)を用いた。また、²⁷Al MQMAS測定には、Fig. 1に示すSoft pulse added mixing (SPAM) 3QMASシーケンス^[1]を用いた。²⁹Si MASおよび¹H MAS測定には、Agilent Inova 500分光計(静磁場11.7T)を用いた。Table 2に、MASスペクトルの測定条件をまとめて示す。

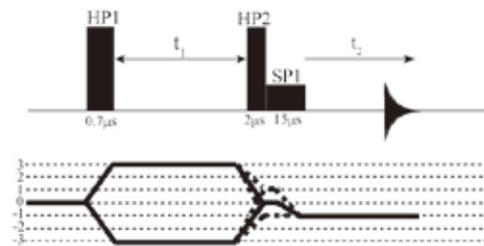


Figure 1. SPAM 3QMAS pulse sequence. The soft pulse of SP1 was applied with 2.8% of the r.f. field strength for hard pulses.

Table 2 Experimental condition in MAS measurements.

	²⁷ Al	²⁹ Si	¹ H
Larmor frequency [MHz]	182.3	99.29	499.86
Rotor diameter [mm] ^{†1}	4	3.2	1.2
Spinning rate [kHz]	18	20	58
Pulse width [s]	0.83(π/5)	1.3(π/2)	0.9(π/2)
Recycle delay [s] ^{†2}	3	1	5

^{†1} Zirconia (ZrO₂) rotor

^{†2} Recycle delay were selected to satisfy full relaxation.

一方、¹H NMR 緩和時間測定は、反応を凍結することなく *in situ* で行った。混練後の懸濁試料をNMR試料管に封入し、20分間隔で最長72h後まで観測を行った。測定には、JEOL ECA 600 (14.0T)を用いた。緩和時間(T₁)測定法としてInversion Recovery法を用いた。観測された¹H NMR信号について、逆ラプラス変換を用いたCONTIN法^[2]により解析し、緩和時間分布を導出した。

3. 結果および考察

3-1. Alの構造変化

水和前および養生時間を変えた際の²⁷Al MASスペクトルをFig. 2に示す。水和前のセメントには、主に4配位Alが含まれる。これらは、C₃A、C₄AFさらにC₃Sに微量に含まれるAlに由来すると考えられる。

水和反応後、養生初期から6配位領域に新たなピークが観測されている。²⁷Alは核スピンI=5/2の四極子核であることから、MAS法では二次の核四極子相互作用を平均化できていない。そこで、3QMAS法を用いて高分解能スペクトルを測定し、帰属を行った。その一例として、24h養生

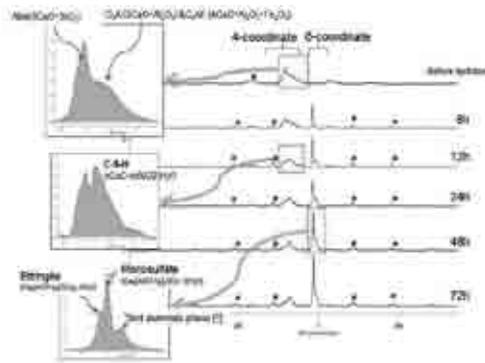


Figure 2 ²⁷Al MAS spectra of cement paste acquired at the spinning frequency of 18kHz.

後の3QMASスペクトルをFig. 3示す。Fig.3(a)より、6配位の領域には、2つのサイトが観測されている。これをMASスペクトルと比較すると、1つのサイトが欠落している。これは、欠落したサイトの四極子相互作用が極めて小さいことに原因があると考えられる。標準試料（エトリンガイト $\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{12}(\text{SO}_4)_3 \cdot 26\text{H}_2\text{O}$ 、モノサルフェート $\text{Ca}_4[\text{Al}(\text{OH})_6]_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、ハイドロガーネット $3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ）のスペクトルと比較した結果、この欠落したサイトはエトリンガイトに帰属された。一方、残りの2つのピークは、6配位領域に観測されるピークのうち、低磁場からモノサルフェート、未同定のThird 6 coordinate Al phase (TAP) に帰属された (Fig. 2a)。

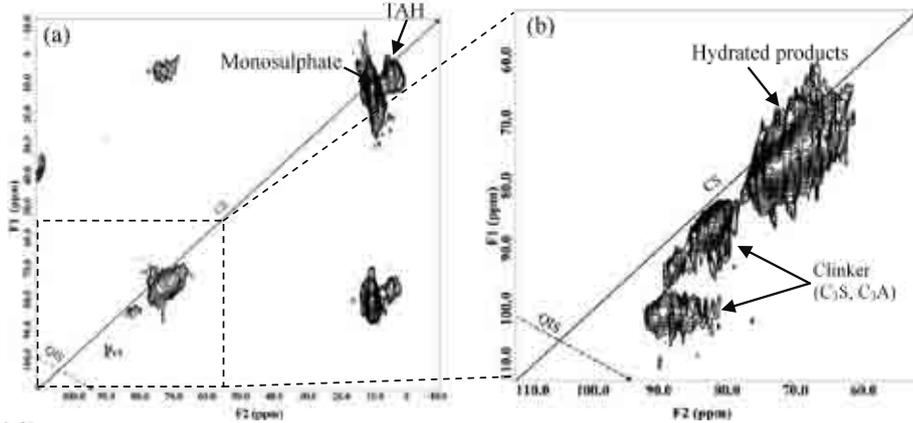


Figure 3 ^{27}Al 3QMAS NMR spectra of cement paste cured for 24 hours at 25°C . (a) whole region spectrum, (b) spectrum focused on the 4-coordinate region. Spectrum (b) was acquired using the rotor synchronized F_1 sweep frequency.

一方、4配位領域には、Fig. 3(b)に示すように、クリンカー由来のサイトがMAS軸上で78~90ppmに観測され、これとは異なる広幅なサイトが60~75ppmに掛けて観測された。後者のサイトは、MASスペクトル上で養生時間とともに増加する傾向を示していることから、水和反応生成物に由来すると考えられる。また、4配位構造を有することから、CSH (calcium silicate hydrate) ゲル生成との関連が強く示唆される。CSHの構造は、 Q^1 (架橋酸素が1個) および Q^2 (架橋酸素が2個) の SiO_4 四面体ネットワークを用いて近似的に表現される。ただし、粘土鉱物に見られるように、四面体SiはAlにより置換される傾向がある。これらを踏まえると、反応に伴い増加する4配位Alは、CSHのネットワーク構造中の四面体Alに相当するのではないかと考えられる。尚、CSHは、非晶質でありXRDでは観測出来ないことから、この結果は固体NMRによってのみ得られる構造情報であると言える。

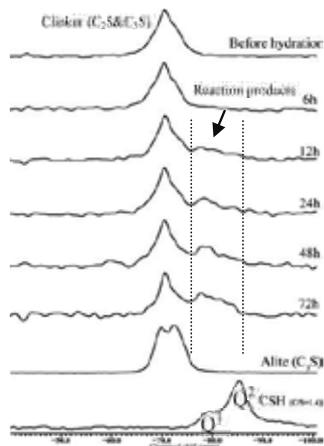


Figure 4 ^{29}Si MAS NMR spectra of cement paste acquired at the spinning frequency of 20 kHz.

3-2. Siの化学構造変化

Fig. 4に養生に伴う ^{29}Si MASスペクトルの変化を示す。水和前には約-71ppmを中心としてピークが観測されている。これは、 C_3S および C_2S 中のSiに由来する。水和反応後は、-76~-85ppmにかけて広く分布するピークが観測され、これらは時間とともに増加した。その構造は、化学シフトから考えると Q^2 または Q^1 のネットワーク構造を有すると考えられ、Fig.4からも明らかなように、合成CSHの化学シフト範囲とも概ね一致している。この結果は、Alの構造解析結果とも調和的である。また、セメント硬化

体中では、合成CSHに比べ Q^2 の割合が低いことから理想的なCSHに比べ、ネットワークの発達が弱いと考えられる。

いずれにしても、クリンカー由来のSiと反応生成物由来のSiを凡そ区別して観測できたことは、固体NMRならではの成果である。

3-3. 空隙構造の変化

セメントの水和・硬化過程においては、内部の化学構造の変化に伴い、セメント粒子間の空隙構造が変化し、硬化体に特有の硬化組織を形成すると考えられる。そこで、 ^1H NMRの T_1 緩和時間の分布を用いて、微細空隙構造の解析を試みた。Fig. 5に T_1 分布の時間変化を示す。混練直後から緩和時間分布が 10^{-1} オーダーとなっており、自由水の緩和時間(1s)に比べて大幅に短縮されているように見えるが、これは、セメント中の常磁性イオン (Fe^{3+})

の効果であり、混練直後には自由水に近い運動状態であると考えられる。12h以降では、緩和時間が主に2つのグループに分かれることがわかる。 N_2 吸着実験の結果も踏まえると、12時間以降観測される $10^{-2} \sim 10^{-3}$ の緩和時間成分は、40nm領域の所謂ゲルポアと考えられ、この相対的な比率は、時間とともに増加する。以上のことより、セメント粒子間の空隙は、0~12hに掛けて μm オーダーの毛細管空隙へと変化し、12h~72hにかけて更に微細なゲル空隙が発達すると考えられる。

3-4. 圧潰強度発現と化学構造、空隙構造との関係

^{29}Si MAS, ^{27}Al MASスペクトルより、水和物中のAlおよびSiを定量し圧潰強度との関係を検討した。さらに、 ^1H NMRの T_1 分布解析から得られた40nm以下のゲルポア比と圧潰強度との関係も検討した(Fig. 6)。その結果、養生6h程度ではゲル空隙は発達していないにも関わらず、強度が発現しており、これはエトリンガイト等のAl水和物の寄与が大きいことを示唆している。その後48hまでは、Al水和物、CSHが増加し、これと平行してゲルポア比も増加している。よって、AlとSi水和物双方が強度発現に関与している。48h以降は、ゲル空隙と水和物中のSiが増加する一方で、水和物中のAl量はほぼ一定となる。よって、長期の強度発現には、ゲルポアを作り出すCSH状のSi水和物が寄与していると推定される。

【結言】

多核固体NMR法を駆使することによって、セメント硬化体中の化学構造、空隙構造を解析し、水和・硬化プロセスに関する以下の知見を得た。

✓空隙構造に顕著に見られるのは6h以降であり、CSH系水和物の生成に伴い40nm以下の微細ポアが発達すると考えられる。

✓初期（養生6h程度）の圧潰強度発現には、エトリンガイトをはじめAl系水和物の寄与が大きいと考えられる。より長期の強度発現には、CSHをはじめとするSi系水和物の寄与が大きいと考えられる。

これらの知見は、セメントをバインダーとするペレット製造時の強度発現の促進、養生条件の最適化等、プロセス設計の指針となることが期待される。

【References】

[1] Gan, Z. and Kwak, H. T. *J. Magn. Reson.* **168**, 346-351. [2] Provencher, S. W. *Comput. Phys. Commun.*, **27**, 213-221.

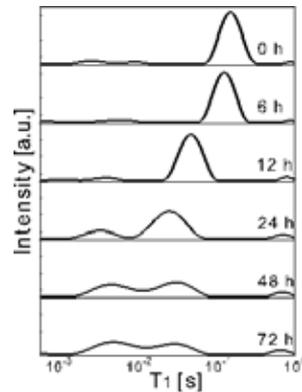


Figure 5 Distribution of ^1H spin-lattice relaxation time (T_1) measured by high magnetic field NMR. (Curing time = 0 to 72 hours).

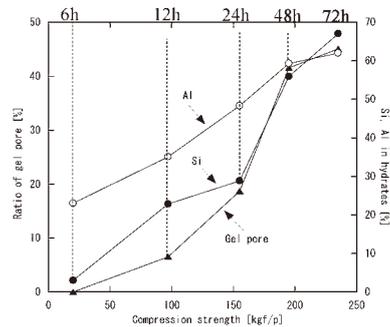


Figure 6 Relationship between compression strength and Si and Al in hydrates, and ratio of gel pore.

P50

緩和分散差スペクトル法による混みあったNMRスペクトルの緩和分散データの解析

○小沼剛, 菅瀬謙二

(公財) サントリー生科財団・生有研

Extracting information on protein dynamics from crowded NMR spectra using relaxation dispersion difference

○Tsuyoshi Konuma, and Kenji Sugase

Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences

Relaxation dispersion spectroscopy is one of the most powerful tools to elucidate protein dynamics. The method can produce many unprecedented results regarding protein dynamics, but it is difficult to apply it to large proteins or intrinsically disordered proteins because many NMR signals of these proteins are often highly overlapped due to the existence of a large number of signals or less signal dispersion. Signal overlap precludes an accurate quantification of signal intensities, which are converted to effective R_2 relaxation rates. In this study, we have developed a new method called relaxation dispersion difference (RDD) that can leave the signals showing relaxation dispersions from crowded NMR spectra. The RDD method was validated by comprehensive simulation and actual NMR experiments with a sample that is known to show relaxation dispersions.

緩和分散法は、タンパク質のダイナミクスを解明するための最も強力な NMR 測定法の一つである。この方法から、ミリ秒からマイクロ秒のタイムスケールにおけるアミノ酸残基特有の熱力学、動力学的パラメータ、およびタンパク質の状態間の化学シフト差を定量することができる。また、ほとんどの生物物理学的方法では観測できない低存在比状態まで調べることが可能である。しかし、分子量の大きなタンパク質や天然変性タンパク質に対しての緩和分散法の適用は困難となる。なぜなら、その様なタンパク質の NMR シグナルは重なることが多く、横緩和速度定数 (R_2) を得るためのシグナル強度を正確に測定することができないからである。この問題を改善する方法の一つは選択的に同位体標識したサンプルを用いることである。しかし、限定された標識のために NMR によって得られる情報が減少し、さらに、均一標識よりも高価な同位体標識化合物が必要となるデメリットがある。そこで本研究では、均一標識サンプルの混みあった NMR スペクトルにおいて、緩和分散を示すシグナルのみを残す緩和分散差スペクトル (Relaxation dispersion difference; RDD) 法と呼ぶ新しい解析法を開発した。

RDD 法の原理は非常に単純である。緩和分散測定したスペクトルにおいて、全く緩和分散を与えないアミノ酸残基のシグナル強度は全ての τ_{CP} で一定である。一方で、緩和分散を与えるアミノ酸残基のシグナル強度は τ_{CP} に応じて異なる。そこで、最も

緩和分散法, ダイナミクス

○こぬまつよし, すがせけんじ

大きな $1/\tau_{CP}$ の緩和分散スペクトルから各スペクトルを減算することで、緩和分散を与えるアミノ酸残基のシグナルのみが残る (Fig. 1)。

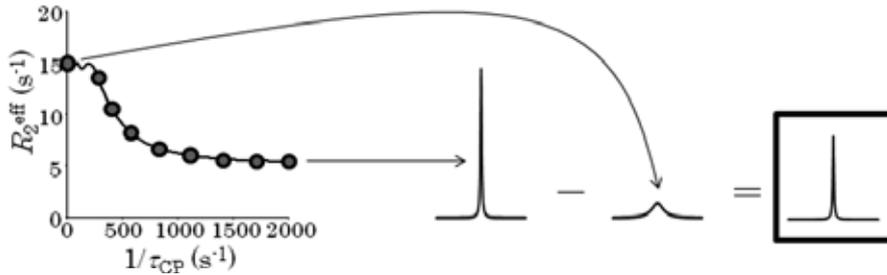


Fig. 1 The principle of RDD. Subtraction of each relaxation dispersion spectrum from the one with the largest $1/\tau_{CP}$ leaves a peak with the relaxation information.

まず我々は本研究で開発した RDD 法の有効性を検証するため、包括的なシミュレーションを行った。RDD 法において変数となるパラメータ ($\Delta\omega$, k_{ex} , ρ_b) を系統的に変化させ、 τ_{CP} に応じて強度データを生成した。さらにその強度データに対して 1%~2% のエラーを加えた (Fig. 2)。それらのデータに対してフィッティングを行い、データ生成に用いたパラメータと比較することで、RDD 法によって解析可能なパラメータの範囲を確認した (Fig. 3)。

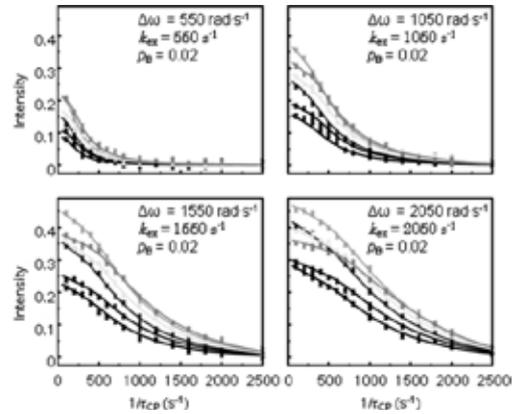


Fig. 2 Fitting Simulation of RDD at magnetic field of 600 and 750 MHz.

さらに我々は、いくつかのシグナルが重なった高分子量タンパク質を実際に測定し、RDD 法を用いて解析を行った。そして、今までは重なりにより解析不可能であったシグナルから構造情報を抽出することに成功した。

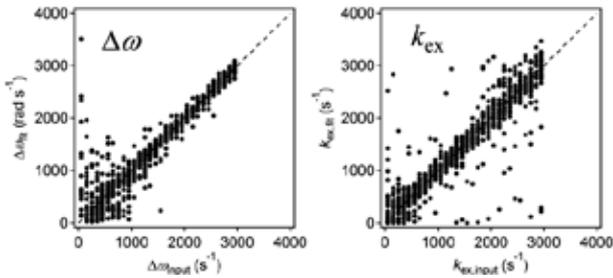


Fig. 3 Comparative of input and fitting parameters in $\Delta\omega$ and k_{ex} .

RDD 法は、特に選択標識サンプルやパルスプログラムのさらなる変更を必要としないため簡単に適用可能であり、分子量の大きなタンパク質や天然変性タンパク質など、より多くのタンパク質の構造情報が得られることが期待できる。

P128

半導体レジスト用モデルポリマーの脱保護による分子運動性変化

○相見 敬太郎¹, 鈴木 真由美¹, 西山 文之², 西川 尚之³
 富士フイルム株式会社 R&D統括本部 ¹解析技術センター、
²エレクトロマテリアルズ研究所、³有機合成化学研究所

Changes in the molecular mobility of model polymers for chemically amplified resist during de-protection reaction

○Keitaro Aimi¹, Mayumi Suzuki¹, Fumiyuki Nishiyama², Naoyuki Nishikawa³

¹Analysis Technology Center, ²Electronic Materials Research Laboratories,

³Synthetic Organic Chemistry Laboratories,

R&D management headquarter, FUJIFILM Corporation, Kanagawa, Japan.

Molecular mobility of the resist polymers during the post exposure bake (PEB) process is considered to control the acid diffusion that determines the lithographic performances of the chemically amplified resist. Therefore, changes in the molecular mobility of resist polymers were analyzed using variable temperature solid state ¹H MAS and ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy. With increasing the ratio of the carboxylic acid unit, $T_{1\rho}^H$ minimum was shifted to higher temperature. At higher temperatures above the $T_{1\rho}^H$ minimum, the molecular mobility of the acid labile blocking unit (ABU) became vigorous. Those indicate that the molecular mobility of the ABU becomes slow-down as the de-protection reaction progresses.

【緒言】半導体レジストを用いた光リソグラフィプロセスは、シリコン基板上に形成した感光性レジスト膜を露光・パターンニングすることにより半導体デバイスの回路パターンを形成する工程である。レジストパターンは、露光により発生した酸が露光後ベーク時に保護基を分解してカルボン酸を生成し(図 1)、アルカリ可溶となることで形成される。パターンの線幅は脱保護反応時の酸の拡散性によって決まり、これはポリマーの分子運動性と関係していると考えられている¹⁾。そこで、脱保護反応の進行に伴うポリマーの分子運動性の変化を調べ、レジスト性能との関係を考察した。

【実験】試料には、脱保護のモデル試料として保護基とカルボン酸の比率を変えたポリマーを合成し、固体 NMR 測定に用いた。

固体 ¹H MAS 及び ¹³C CP/MAS NMR 測定には、ブルカー・バイオスピン社製 AVANCE DSX-300 分光器と 4 mmφ HFX CP/MAS probe を用いた。緩和時間 T_1^H , $T_{1\rho}^H$ 及び ¹³C CP/MAS スペクトルは、液体窒素を気化させた窒素ガスを用いて 14 kHz MAS 下で、-20~140°C の範囲で昇温しながら測定を行なった。

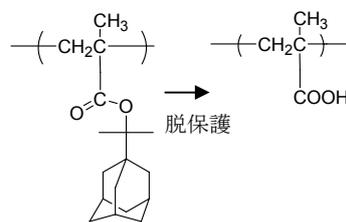


Fig.1 De-protection reaction of ABU.

chemically amplified resist, molecular mobility, solid state NMR

○あいみ けいたろう、すずき まゆみ、にしやま ふみゆき、にしかわ なおゆき

[結果と考察]

カルボン酸比率に対する分子運動性の変化

保護基ユニット (acid labile blocking unit, ABU) や主鎖のコンホメーション変化など、脱保護反応に伴うセグメンタルな分子運動の変化を、緩和時間 $T_{1\rho}^H$ の温度変化により調べた。図2にカルボン酸(carboxylic acid unit, CAU)比率を変えた試料の $T_{1\rho}^H$ の温度変化を示す。

いずれの試料についても $T_{1\rho}^H$ の極小が観測され、極小値の前後で傾きが変化していることから、この温度において運動モードが変化していると考えられる。そこでカルボン酸比率 25%試料の温度可変固体 ^{13}C CP/MAS 測定を行った結果、保護基由来のピークの先鋭化が 80°C 以上で見られ、保護基の分子運動が 80°C 以上で活発化することがわかった。従って、 $T_{1\rho}^H$ で観測される運動モードの変化が保護基の分子運動によって誘起されると推定した。そこで、簡易的に極小前後での接線の交点を読み取り、保護基の分子運動活発化温度とした。

図3にカルボン酸比率に対する保護基の分子運動活発化温度の変化を示す。カルボン酸比率の増加(脱保護反応の進行に対応)に伴って、分子運動活発化温度が上昇することから、脱保護によりポリマーの分子運動性が低下することがわかった。

保護基の分子運動性と露光ラチチュードの関係

次に、保護基の構造を変えたポリマーについて、 $T_{1\rho}^H$ 測定からカルボン酸比率に対する保護基の分子運動活発化温度調べた(図4)。保護基の構造の違いにより、カルボン酸比率に対する活発化温度の変化幅が異なることがわかった。この温度変化幅が大きいほど、露光ラチチュード(EL)が良化しており、脱保護反応前後での分子運動性変化を大きくする分子設計により、ELを良化できると考えられる。

[参考文献]

1) A. Shibuya, S. Yamaguchi, Y. Yoshida, M. Shirakawa, Proc. of SPIE, 7273, Advances in Resist Materials and Processing Technology XXVI, Clifford L. Henderson, Editors, 72730H.

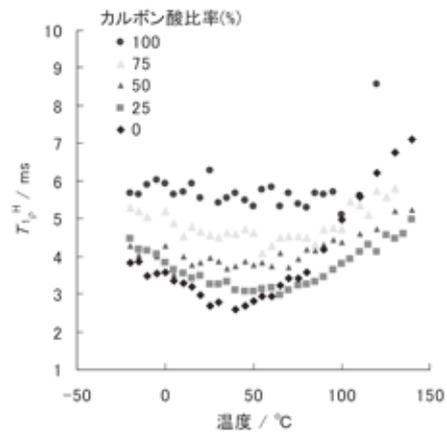


Fig.2 Temperature dependence of $T_{1\rho}^H$.

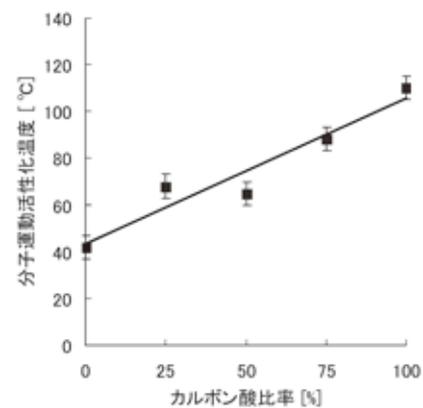


Fig.3 The relationship between the activation temperature of ABU and the ratio of CAU.

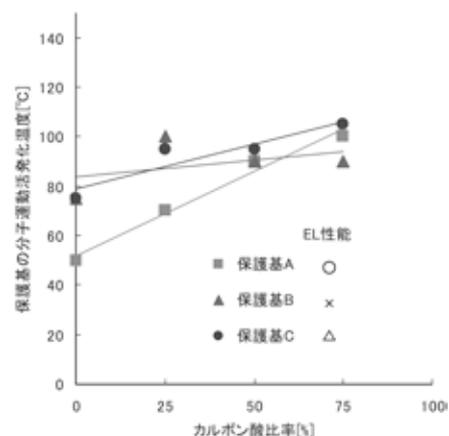


Fig.4 The relationship between the activation temperature of ABU and the ratio of CAU for different ABUs.

P52

ポリ乳酸の物性を左右する立体規則性とそのNMRピークの起源

○菅沼こと^{1,2}, 堀内健², 松田裕生², 右手浩一³, 朝倉哲郎¹¹農工大院・工²帝人・構造解析研究所³徳島大院・STS**The Chemical Shift Origin of Stereoregularity of Poly Lactic Acid controlling the Physical Properties.**○Koto Suganuma^{1,2}, Ken Horiuchi², Hironori Matsuda², Koichi Ute³, and Tetsuo Asakura¹¹Department of Biotechnology, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.²Material Analysis Research Laboratories, Teijin Ltd., Tokyo, Japan.³Chemical Science and Technology, Univ. of Tokushima, Tokushima, Japan

In order to clarify the origin of NMR peak splitting due to the stereoregularities of poly lactic acid (PLA), the model compounds (dimer and trimer) with different tacticities were synthesized. The ¹H and ¹³C chemical shifts of the model compounds were calculated quantum-chemically on the basis of both the fraction of the time-averaged conformations in solution and the chemical shift of each conformation. The tacticity splitting of the dimers showed no significant difference among the solvents used here, which means that the splitting is due to difference in the inherent electric states of the molecules. The good agreement was obtained for all the calculated and observed ¹H and ¹³C chemical shifts of dimer model compounds with different tacticities. This approach was extended to trimer model compounds to reproduce the tacticity splitting of the trimers and also PLA polymer.

< 諸言 >

ポリ乳酸 (PLA) は、近年、環境を重視したポリマーとして、特に着目されるようになった。しかしながら、その欠点は耐熱性が低い点である。それを向上させる有力な方法として、立体規則性を制御したPLAの合成と、そのステレオコンプレックス (sc) 結晶を生成させる方法がある[1]。従って、PLAについて立体規則性やその連鎖分布を把握することは大変重要である。溶液NMRは、ポリマー中の微細構造を理解する上で極めて有効な方法である。これまでに、PLAの構造解析にも溶液NMRが適用され、CH水素、及びCH炭素ピークは、PLA中の4連子を反映すること、さらに、カルボニル炭素ピークは、6連子を反映して分裂することが報告されてきた[2,3]。本研究では、この立体規則性によるピーク分裂の起源を明らかにするため、まず、立体規則性の異なるPLAのモデル化合物を合成してNMR測定を行い、立体規則性が化学シフトに及ぼす影響を明らかにした。また、量子化学的計算の手法を用いて、内部回転角の関数としてコンフォメーションエネルギーとNMR化学シフトを計算し、立体規則性毎に平均化することによって、実測の立体規則性ピークとの比較を行った。

Poly lactic acid, Stereoregularity

○すがぬまこと, ほりうちけん, まつだひろのり, うてこういち, あさくらてつお

<実験・計算>

PLAの1量体，ならびに立体規則性の異なる2量体および3量体モデル化合物を合成し、NMR測定を行った。NMR装置はJEOL製 ECA600を用い、溶媒を変えて、室温で ^1H 及び ^{13}C NMRスペクトルを測定した。また、Gaussian09を用いてコンフォメーションエネルギーと化学シフトの計算を行った。

<結果・考察>

(1) ポリ乳酸2量体モデル化合物の合成とNMR測定

ポリ乳酸の2量体モデル化合物 (Fig.1) について立体規則性の異なる化合物 (アイソタクチックとシンジオタクチック) を合成して ^1H 及び ^{13}C NMR測定を行った。さらに、HMBC測定によって全てのピークの帰属を行い、化学シフトの実測値を得た。NMR測定は3種の溶媒 ($\text{CDCl}_3/\text{CCl}_4$ (20/80 v/v), CDCl_3 , DMSO-d_6) 用いて行った。測定溶媒の違いによる化学シフトの比較をFig.2 (^1H NMR) とFig.3 (^{13}C NMR) に示す。今回測定溶媒に用いた溶媒は、 $\text{CDCl}_3/\text{CCl}_4$ (20/80 v/v) < CDCl_3 < DMSO-d_6 の順に溶媒効果が大きいと考えられるが、Fig.2,3でアイソタクチック(i)とシンジオタクチック(s)の序列を比較すると、全ての原子で測定溶媒に関わらず同じ序列であることがわかる。つまり、これらの溶媒を用いた場合、立体規則性ピークの序列を議論する上で溶媒効果は極僅かであることがわかった。

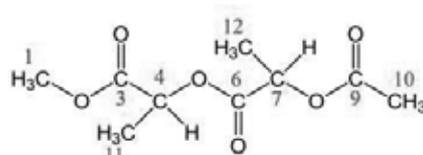


Fig.1 dimer model compound (1) of poly lactic acid

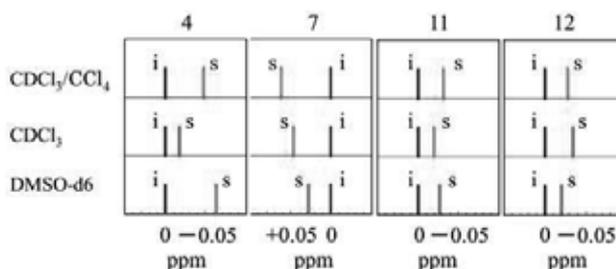


Fig.2 Comparison of the observed ^1H chemical shifts (in ppm) of PLA dimer model compound (1) shown as stick spectra.

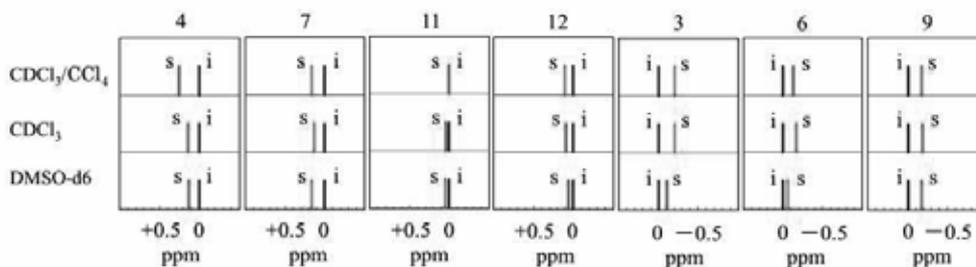


Fig.3 Comparison of the observed ^{13}C chemical shifts (in ppm) of PLA dimer model compound (1) shown as stick spectra.

(2) ポリ乳酸2量体モデル化合物の化学シフト計算と実測値の比較

ポリ乳酸1量体モデル化合物のラマチャンドランマップで得られた2つの安定なコンフォメーション[4]の組み合わせによって得られた4つの2量体モデル化合物のコンフォメーションについて量子化学計算による構造最適化を行い、さらに、エネルギー計算に基づく存在確率を算出した。さらに、各コンフォメーションについて全ての原子の化学シフトを計算し、各コンフォメーションの存在確率を基に平均化して化学シ

フトの計算値を得た。構造最適化と化学シフト計算には、2つの計算手法 (HFとB3LYP) を使い、また、基底関数には3つの関数 (6311+G*, TZVP, cc-pVTZ) を用いて計算結果を検討した[5]。その結果、基底関数に関わらず、構造最適化にB3LYP、化学シフト計算にHFを用いた時、アインタクチックとシンジオタクチックの序列において、 ^1H 及び ^{13}C の全ての原子にて、化学シフトの計算値が実測値を再現することがわかった (Fig.4,5)。以上より、計算結果が妥当であることが確認できた。

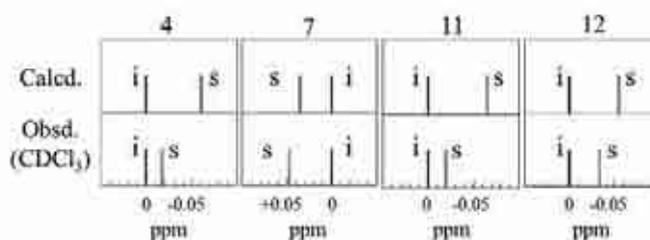


Fig.4 Comparison of the observed ^1H chemical shifts (in ppm) of PLA dimer model compound (1) shown as stick spectra.

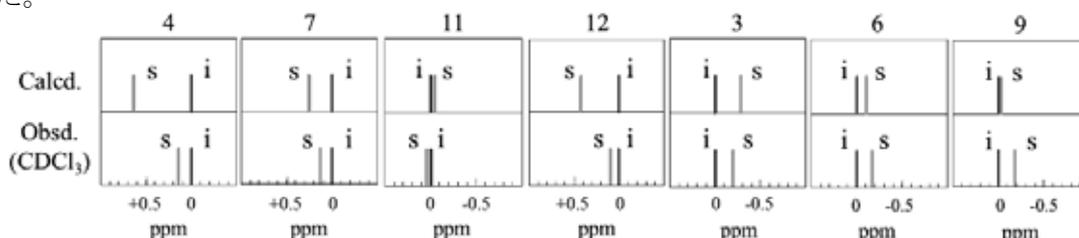


Fig.5 Comparison of the observed ^{13}C chemical shifts (in ppm) of PLA dimer model compound (1) shown as stick spectra.

(3) ポリ乳酸3量体モデル化合物の合成とNMR測定

立体規則性の異なるポリ乳酸の3量体モデル化合物 (ii, is, si, ss) を合成した。合成方法をFig.6に示す。合成した3量体モデル化合物4種それぞれについて ^1H 及び ^{13}C NMR測定を行った。さらに、HMBC測定によって全てのピークの帰属を行い、化学シフトの実測値を得た。

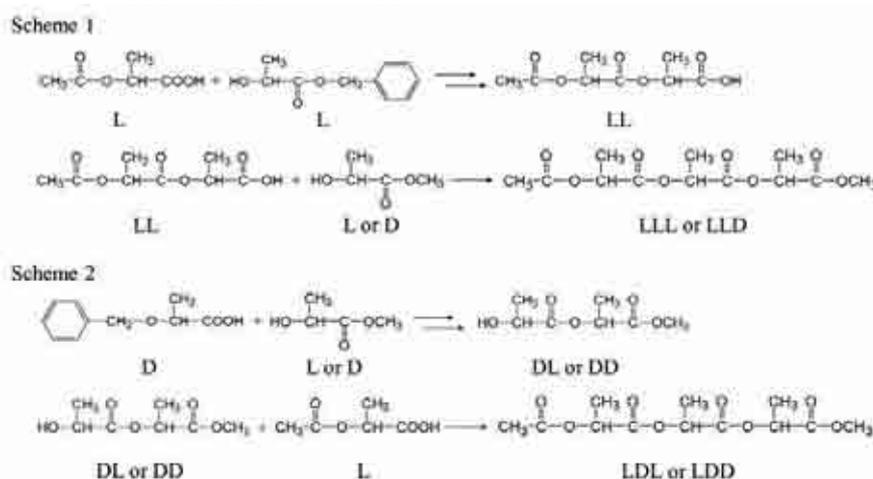


Fig.6 Experimental scheme of trimer model compounds (2) synthesis. Scheme 1 is synthesis of LLL (ii) and LLD (is), and scheme 2 is synthesis of LDL (ss) and LDD (si).

(4) ポリ乳酸3量体モデル化合物とポリマーの化学シフト実測値の比較

ポリマー (PLA) のNMRスペクトルにおいて、CH水素とCH炭素は4連子を反映し

てピーク分離をし、全てについて帰属されており、カルボニル炭素は6連子を反映してピーク分離をし、一部について帰属されている

(Fig.7)。このうち、全てのピークが帰属されているCH水素とCH炭素について、ポリマーと3量体モデル化合物の化学シフト実測値の比較を行った。尚、ポリマーにおいてCH水素とCH炭素は、4連子を反映してピーク分離しており、3量体モデル化合物と比較するため、tetradピークをtriadに変換して比較した (Fig.8)。

Fig.8より、立体規則性ピークの序列を比較すると、CH炭素とCH水素共に、ポリマーにおける各々の観測中心を考慮することで、3量体モデル化合物とポリマーで良好な相関が得られた。今後、3量体モデル化合物の化学シフト計算を行い、各コンフォメーションとの関係を明確にすることによって、立体規則性ピークの起源を明らかにする。

<謝辞>

ポリ乳酸2量体モデル化合物を合成いただいた帝人ファーマ 生物医学総合研究所 研究員 小宮山真人氏に感謝いたします。

<参考文献>

- [1] Fukushima, K. *et al. J. Polym. Sci. Chem..Ed.*, **2008**, 46, 3714.
- [2] Bero, M.*et al. Makromol. Chem.* **1990**, 191, 2287.
- [3] Zell, M. T. *et al. Macromolecules* **2002**, 35, 7700.
- [4] Suganuma, K. *et al. Macromolecules*, **2011**, 44, 9247.
- [5] Suganuma, K. *et al. Polymer J.*, **2012**, 44, 838.

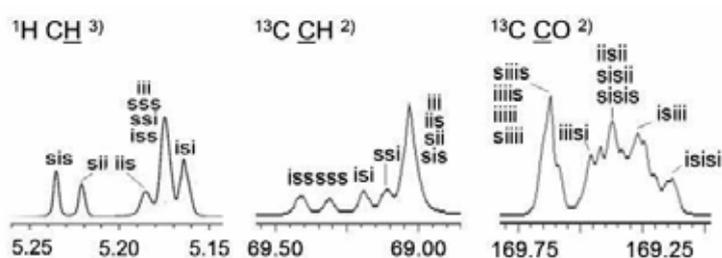


Fig.7 ^1H and ^{13}C NMR spectrum of PLA.

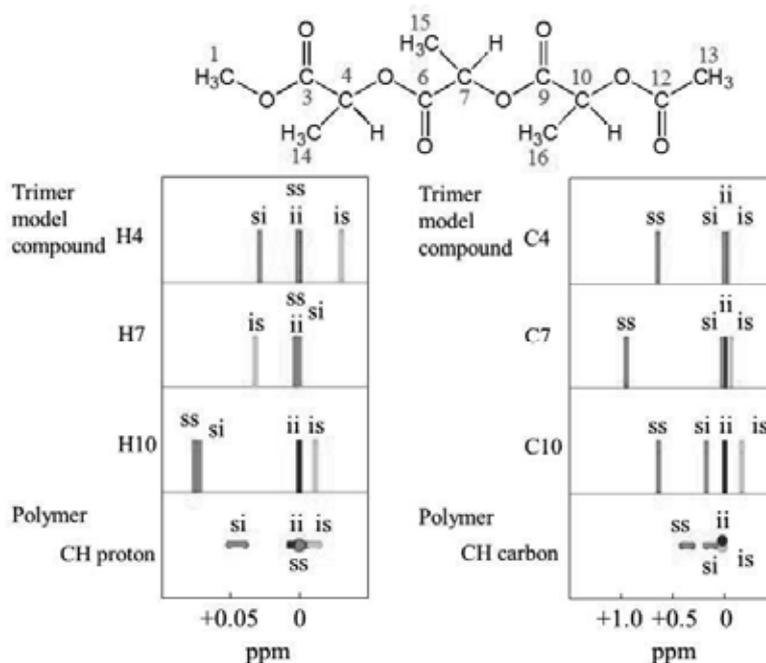


Fig.8 Comparison of the observed ^1H and ^{13}C chemical shifts (in ppm) of PLA dimer model compound (2) and PLA shown as stick spectra.

交差相関緩和の基礎原理とTROSYなど 生体高分子への応用

大阪大学・蛋白質研究所

池上 貴久

はじめに

蛋白質の軽水素核 ^1H を重水素核 ^2H に置き換えることによって、より大きな対象を解析することに世界中が燃えていた1997年、この年は1年間に3度も驚くような論文が蛋白NMRの分野で飛び出した。まず*Science*の5月号にあるアミノ酸の ^1H - ^{15}N ベクトルと一個前のアミノ酸の $^1\text{H}\alpha$ - $^{13}\text{C}\alpha$ ベクトルとの間の二面角が、交差相関緩和 (cross-correlated relaxation, CCR) と呼ばれる現象を使って決めることができるという論文が出た^[1]。それまでは 3J -coupling定数をもとにしてKarplusの式で二面角を決めるのが主流であったので、このような私にとっては聞いたこともないような名前の方で二面角を決められるというのは大変驚きであった(しかも、緩和?で)。そして、まだその理解もままならない11月、今度はこの交差相関緩和をうまく使うと今までの分子量の限界をさらに超えることができるというTROSY法の論文が*PNAS*に出た^[2]。その時、同じ研究室内のX-線結晶構造解析の仲間から「これでやっとNMRと競争できるね」と言われたことを覚えている。そのほとんど前後*Science*の11月号に、今度は液晶を溶液に入れると蛋白質が静磁場中で配向するので残余双子曲相互作用 (residual dipolar coupling, RDC) という値を得ることができ、そこから ^1H - ^{15}N ベクトルの分子に対する方向が分かるという論文が出た^[3]。NMRを始めて3年目の時にこのような驚くべき方法が年内に立て続けに現れ、これらがNMRに対する情熱を一気に押し上げてくれる機会になったことは大変幸せであった。しかし、これらの物理現象を理解するのがとにかく難しかった。「固体NMRの用語だから関係ないよ」とそれまで避けていたdipolar-coupling、CSAのような言葉や式が頻出するのである。それまで溶液NMRでdipolar-couplingと言えば、「磁化が緩和する原因らしい」と「NOEも何だかそれで起こるらしい」程度しか知らなかった。それでも最先端のことを勉強しているのだという嬉しさに加

え、RRR-workshopなどを企画されていた先生方にGriesinger先生やBax先生を呼んで頂き、飛び上がるほど感激したことは今では良い思い出となっている。このように「交差相関」という言葉は私にとっては今でも特別な響きをもっている。そこで1997-1998年当時のノートを引っ張り出してきてそれを練りながら、そして当時を懐かしがりながら以下を書いていくこととした。

決して簡単な論文とは思えないが、交差相関緩和の参考文献として必ずといってよいほど挙げられる論文がGoldman (1984) である^[4]。たまたま1997年頃に研究室で輪読していた本がGoldman著であったので^[5]、数式のフォーマットなどには馴染みがあり、何気無く親しみを覚えた。今この論文の導入部分を改めて読み返してみると面白いことが書かれているので、とんでもない意識ではあるが、それを少し下を書いてみる。

「 ^{15}N で標識したtRNAの ^1H スペクトルを観てみると、アミノ基の ^1H の二重分裂線の線幅がお互いに違っていた」との報告がある(1982)。これは、 ^1H - ^{15}N dipolar couplingと ^1H chemical shift anisotropyとの間の干渉 (interference) が横緩和に影響を与えたとすることで説明できる。このように同じ分子座標系に二つの異なる相互作用が載っていると、それらの間に干渉が起きることは30年も前からすでに分かっており、繰り返し再発見されてきた。戻ること1950年代、さまざまな常磁性中心のESRスペクトルで、核スピンからのhyperfine超微細相互作用で分かれた多重分裂線の線幅がお互いに異なっていることが報告されている。この現象はMcConnellによって電子-核couplingと電子g因子の異方性との間の干渉から来ていることが突き止められた(1956)。似たような現象が10年後に核スピンの緩和でも見つかった(1966)。 CH_2Cl_2 の ^1H とのJ-couplingで割れた ^{19}F の二重分裂線において、それぞれの T_1 緩和時間が異なった。そして、これは ^1H - ^{19}F 双極子双極子相互作用と ^{19}F の化学シフト

異方性との間の干渉の結果であることが実験的にも理論的にも示された。これまで理論面での研究では、次の二つの方法がしばしば採られてきた。それらは、Fermi黄金律を使って異なるエネルギー準位の間の遷移確率を計算する方法と、Redfieldの緩和超演算子を使って密度行列の全要素がどのように展開するかを計算する方法である。しかし、この論文 (Goldman, 1984) の目的は、演算子の展開を記すためのマスター方程式がどのように交差相関の説明に使えるかを示すことである。もちろん、結果は上に挙げた二つの方法とかなり重複している。しかし、違った理論を使うことで、もっと簡単に考えたり、一般論にまで持って行けるような利点も出てくるかもしれない。ここでは、もっとも単純な系を採り上げた。つまり、 J -couplingしたスピン量子数 $1/2$ の二つの異種核で、双極子双極子相互作用と化学シフト異方性で緩和しているような系である。この例は、より高い静磁場のNMRが出てくるにつれてますます重要となってくるであろう。

この最後の文章は、13年後の1997年にTROSYが出現することを予言しているかのようにも読み取れ面白い (1,000 MHz付近になると、蛋白質の ^1H 、 ^{15}N のCSAの大きさが ^1H - ^{15}N のdipolar-couplingの大きさに近づくため、干渉効果が最大になる)。

^1H - ^{15}N TROSY

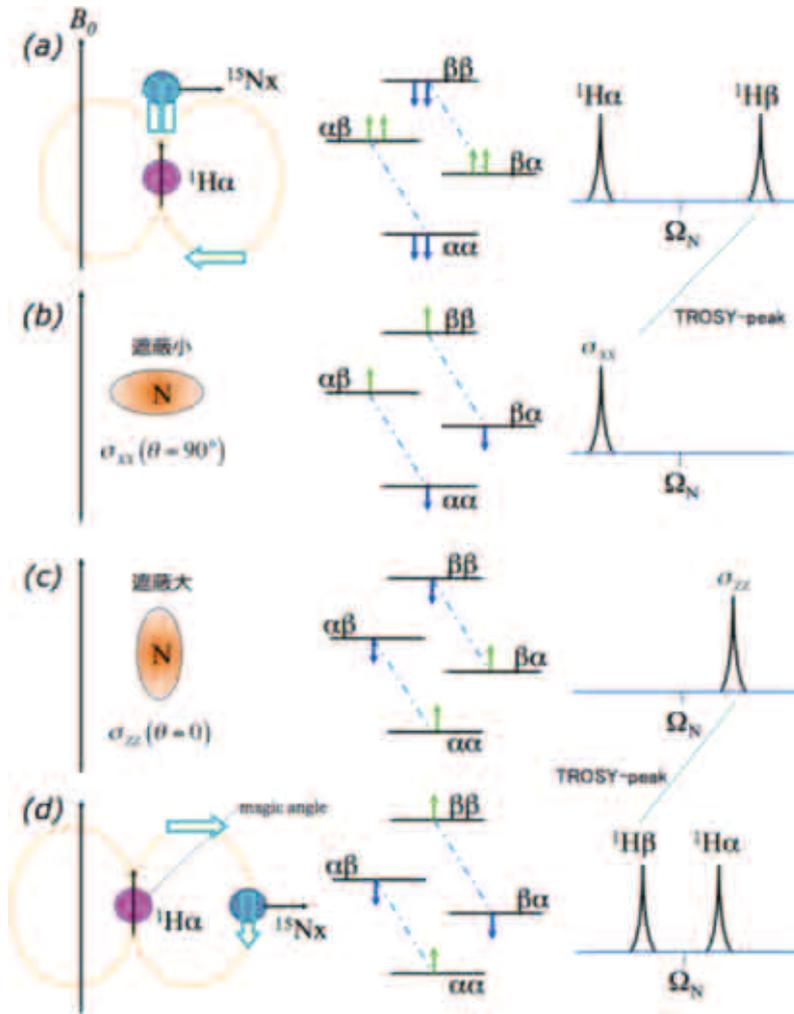
二次元 ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを二次元のデカップリング無しで測定した場合、各アミド基 ^1H - ^{15}N からのピークは4つに分裂する (二重分裂 \times 二重分裂)。このうち右下 (^1H の高磁場側、 ^{15}N の低磁場側)のピークの強度がもっとも強くなる。このように分裂したピークのそれぞれの T_2 横緩和速度が異なる原因が、交差相関緩和と呼ばれる物理現象にある。4つのピークが依然見えていると複雑であるので、位相回しやgradient-echoなどを駆使してその右下のピークだけを選ぶように工夫したパルス系列が2D ^1H - ^{15}N TROSY-HSQCである (厳密には、 ^{15}N で緩和が遅い方のコヒーレンスがそのまま ^1H で緩和が遅い方のコヒーレンスに移るように作られている。つまり、途中で緩和が速い方のコヒーレンスを通して損をしてしまうようなことを避けている。これをスピン状態選択的spin-state selectiveなコヒーレンス移動と呼んでいる)^[2]。もし、測定している対象が超高分子であれば、残りの3つのピークは横緩和が速過ぎて自然に消えてしまうので、このような位相回しなどの工夫を必ずしも施さなくてもよい

場合もある。このような現象はすでに1950-60年代に観られていた。しかし、重水素化蛋白質を使うとこのTROSY効果が高くなり、かなり大きな蛋白質分子の主鎖帰属用の3次元測定にまで応用できることが発表されたのは1997年であった (重水素化率を上げると ^1H 間のspin-diffusionの機会が減り、 $^1\text{H}^{\text{N}}$ の α 、 β -スピン状態の間の入れ替えの頻度が下がる)。

この交差相関緩和の現象をきっちりと理解するには、揺動散逸定理に基づきマスター方程式と呼ばれる式の解き方などを理解する必要がある。しかし、これがなかなか難しい。ここでは紙面が限られているので、もう少し描像として捕らえてみたいと思う。 ^1H - ^{15}N 双極子双極子相互作用 (そのハミルトニアンを ^1H - ^{15}N -DDと表すことにする) が作る局所磁場と ^{15}N の化学シフト異方性 (そのハミルトニアンを ^{15}N -CSAと表すことにする) が作る局所磁場との間の相関が交差相関緩和を生み出す。一方、普通の ^{15}N 核スピンの T_1 、 T_2 緩和などは自己相関緩和と呼ばれる。これは、例えば ^1H - ^{15}N 双極子双極子相互作用が作る局所磁場と、ある時間 τ 後に再び同じ ^1H - ^{15}N 双極子双極子相互作用が作る局所磁場との間の相関が生み出す緩和現象である。全く同じ ^1H - ^{15}N 双極子双極子相互作用どうしの相関であるので、 τ が0の時、スピンのどのような状態にあっても相関は当然のように100%であり、局所磁場は同じ向きに強め合う関係にある。これは交換演算子を使って表すと、 $[^1\text{H}$ - ^{15}N -DD, $[^1\text{H}$ - ^{15}N -DD, σ]] などと表される。この自己相関の程度はもちろん τ が長くなるにつれて減ってくる (まるでFIDが時間とともに減衰するかのように)。それは τ 時間の間に蛋白質全体が回転したり対象とするアミド基が局所的に揺れて、 ^1H - ^{15}N ベクトルの向きが変わるためである。そのため、緩和速度の解析から、前者の蛋白質の回転相関時間 τ_c が分かれば、後者のアミド基のオーダーパラメータの自乗 (S^2) が分かることになる。一方、交差相関のように異なる相互作用どうしが絡んでくると、先ほどの自己相関 $[^1\text{H}$ - ^{15}N -DD, $[^1\text{H}$ - ^{15}N -DD, σ]] が作る局所磁場とは逆向きの局所磁場も (たとえ τ が0の場合でも) 含まれてくる場合がある。例えば、 $[^{15}\text{N}$ -CSA, $[^1\text{H}$ - ^{15}N -DD, σ]] を考えてみると、 ^1H スピンの α -スピン状態にあるか、それとも β -スピン状態にあるかによって、 ^1H スピンが作る局所磁場の ^{15}N の位置での向きが逆転する (図)。交換演算子を使うと、 $[^{15}\text{N}$ -CSA, $[^1\text{H}(\alpha, \beta)$ - ^{15}N -DD, σ]] において、 ^1H が α -あるいは β -スピン

状態にあるかによって符号も逆転する（以下このように書いた場合、 $[^1\text{H}(\alpha, \beta) - ^{15}\text{N-DD}, [^{15}\text{N-CSA}, \sigma]]$ も同時に含めることとする）。もし、ここから生じた交差相関 $[^{15}\text{N-CSA}, [^1\text{H}(\beta) - ^{15}\text{N-DD}, \sigma]]$ が

自己相関 $[^1\text{H}(\beta) - ^{15}\text{N-DD}, [^1\text{H}(\beta) - ^{15}\text{N-DD}, \sigma]]$ や $[^{15}\text{N-CSA}, [^{15}\text{N-CSA}, \sigma]]$ と逆の符号をもち、その結果、全ての合計が0に近付くと TROSY効果が生じる。ちょうど $(csa \pm dd)^2$ のような数式を考えた場



図

- (a) ^1H 核が α -スピン状態にある時、 ^{15}N 核は B_0 と同じ向きの局所磁場を感じるため、ピークは低磁場側（高周波数側）に双極子双極子相互作用によりシフトする。図には示してはいないが、逆に ^1H 核が β -スピン状態にあれば、 B_0 とは逆向きの局所磁場を感じるため ^{15}N ピークは高磁場側にシフトする。
- (b) 分子が(a)と同じ方向にある時、 ^{15}N 核の化学シフト異方性による遮蔽が小さいので、 ^1H 核が α 、 β -どちらのスピン状態にあるかに関わらず ^{15}N ピークは低磁場側にシフトする。その結果、 ^1H 核が β -スピン状態の時に、双極子双極子相互作用によるシフトと化学シフト異方性によるシフトがお互いに打ち消し合う。
- (c) 分子が溶媒中で 90° 回転した場合、 ^{15}N 核の化学シフト異方性による遮蔽が大きくなる。したがって、 ^1H 核のスピン状態に関わらず ^{15}N ピークは高磁場側にシフトする。
- (d) 分子がこの 90° 回転した向きにある時、今度は α -スピン状態にある ^1H 核が B_0 とは逆向きの局所磁場を ^{15}N 核の位置に作る。

一方、図には示してはいないが、 ^1H 核が β -スピン状態にあれば、 ^{15}N ピークは低磁場側にシフトする。結局のところ、分子の向きに関わらず ^1H 核が β -スピン状態にある時に、双極子双極子相互作用によるシフトと化学シフト異方性によるシフトはお互いに打ち消し合うことになり、これが先鋭化したTROSYピークを生む。なお、図示されたピークのシフトは J -couplingによるものではない点に注意。しかし、 J -couplingによる分裂と同じように、交差相関が相手側の核の α 、 β -スピン状態と連動しているため、多重分裂線の線幅が異なるという形で現れる。蛋白質が(RDCを測定する時のように)静磁場に対して配向していない時は、双極子双極子相互作用によるシフトも化学シフト異方性によるシフトも分子の回転拡散に伴い平均化され、その結果それぞれの中で打ち消しあって0となる。したがって、DDやCSAによる分裂が図のように見えるわけではない(配向させると観える)。しかし、緩和の過程ではこれらは常に働いている。また、実際にはこのスペクトル密度 $J(0)$ 成分以外に、分子の回転拡散の周波数が ^{15}N スピンのラーモア歳差運動の周波数と一致した時に生じる $J(\omega_N)$ 成分も在る。しかし、高分子になるほど、前者の $J(0)$ 成分が大きくなるので、 $J(\omega_N)$ 成分についてはここでは触れていない。

合、 ^1H が β -スピン状態の時、 $(csa - dd)^2$ に、逆に α -スピン状態の時 $(csa + dd)^2$ になる $((csa \pm dd)^2 = csa * csa + dd * dd \pm dd * csa \pm csa * dd)$ 。そして、 csa と dd が近い大きさになれば、 $(csa - dd)^2 \rightarrow 0$ に近づく(ここで、 $csa * csa$ と $dd * dd$ の項が自己相関であり必ず+になる。一方、 $dd * csa$ と $csa * dd$ の項が交差相関であり、 ^1H のスピン状態によって符号が逆転する)。実は csa は静磁場の大きさに比例し、1GHz付近ではかなり dd に似た値となるらしい。このような好都合なスピン状態にあるピークが、 $J_{\text{HN-coupling}}$ による分裂と呼応して ^1H - ^{15}N HSQCの右下に出て来る。このピークでは、 ^1H スピンが β -スピン状態にあるとすると、逆に ^1H スピンが α -スピン状態にあるピークは、右上のピークに相当する。この場合、交差相関はむしろ自己相関に余計に加わり、 ^{15}N 緩和がさらに速くなる。これと同じような議論を $[^1\text{H-CSA}, [^1\text{H}-^{15}\text{N-DD}, \sigma]]$ についても考えることができ、この場合は ^{15}N スピンが α -スピン状態にあるか、それとも β -スピン状態にあるかによって交差相関の符号が逆転し、その結果 ^1H 次元(横軸)での二重分裂線が高磁場側の方が緩和が遅い理由に繋がる。

メチル TROSY

メチル基は他の基に比べて感度が高いことは昔からよく知られていた。3つの ^1H が3重回転対称の位置関係にあり、さらにその軸の周りに速く回転している。そのため、この3つの ^1H は磁氣的に等価となり、化学シフト値が同じとなる。また、 ^1H どうしの見かけの J -couplingも無しとなる。しかし、非常に興味深いことに、あるスピン状態の時には、 ^{13}C 、 $^1\text{H}_3$ の中の二つの核の組み合わせからなる双極子双極子相互作用が作る局所磁場がお互いに打ち消し合う。このことにより、理想的な形をとりメチル基の軸周りに高速で回転し、さらに孤立したメチル基では、双極子双極子相互作用による自己相関と交差相関の合計が0となるような遷移が生まれる。この遷移を検出する方法がmethyl-TROSYである^[6]。

なお、蛋白質の側鎖のメチレン基においても若干のTROSY効果が生じる。しかし、メチル基ほど完璧にはいかない。その理由の一つは、メチレン基はメチル基のように回転していない、そのため、二つの ^{13}C - ^1H ベクトルがなす角が 109.5° 付近と固定してしまうためである。交差相関緩和では、緩和の原因となる二つの作用(双極子双極子相互作用や化学シ

フトの異方性など)がなす角を θ とすると、その効果が $(3\cos^2\theta - 1)/2$ 倍になる。したがって、メチレン基においては $-1/3$ 倍に目減りしてしまう。一方、メチル基においては、3つの ^1H の位置が高速に入れ替わるので、 ^{13}C - ^1H ベクトルどうしがなす角は0とみなせる。同様に ^1H - ^1H ベクトルどうしの角度も0とみなせる(ただし、ゆっくり回転してしまうと、この仮定は崩れる)。したがって、 $(3\cos^2\theta - 1)/2 = 1$ が成り立つのである。また、この部分の符号の違いにより、メチレン基のTROSYピークは、二次元 ^1H - ^{13}C スペクトルで分裂したピークのうち右下側にあたり、メチル基のTROSYピークは、分裂した(と仮定した)ピークのうちの真ん中にあたるのである。

メチル基のダイナミクス

巨大な蛋白質でも、メチル基ならばTROSYを使うことによってその信号を観ることができる。そこで、このメチル基のダイナミクスも調べることができる。もちろん、メチレン基や芳香環のダイナミクスを調べる手法も今後さらに精度が増すと期待されるので、それらを組み合わせると主鎖だけでなく側鎖全体のダイナミクスもNMRにより解析することができるようになるであろう。

メチル基のダイナミクスを調べる方法の一つとして、 ^1H - ^1H の双極子双極子相互作用どうしの交差相関緩和を使う手法が発表されている^[6]。今、メチル基の3つの ^1H をそれぞれ $^1\text{H}_{\text{obs}}$ 、 $^1\text{H}_1$ 、 $^1\text{H}_2$ とし、 $^1\text{H}_{\text{obs}}$ スピンを励起(横磁化に)したとする。すると、 $^1\text{H}_1$ と $^1\text{H}_2$ がそれぞれ α -スピン状態、あるいは β -スピン状態にあるかに依って、 $^1\text{H}_{\text{obs}}(\alpha\alpha)$ 、 $^1\text{H}_{\text{obs}}(\alpha\beta)$ 、 $^1\text{H}_{\text{obs}}(\beta\alpha)$ 、 $^1\text{H}_{\text{obs}}(\beta\beta)$ の4つの状態が $^1\text{H}_{\text{obs}}$ スピンには在ることになる。もし、 $^1\text{H}_{\text{obs}}$ のピークがこのように4つに分裂していると仮定すると(実際には ^1H どうしが等価なので分裂はしないが) $^1\text{H}_{\text{obs}}(\alpha\alpha)$ と $^1\text{H}_{\text{obs}}(\beta\beta)$ のピークは両端に存在し、間に挟まれた残り二つの $^1\text{H}_{\text{obs}}(\alpha\beta)$ 、 $^1\text{H}_{\text{obs}}(\beta\alpha)$ のピークよりも緩和が速い。このように $^1\text{H}_{\text{obs}}(\alpha\alpha)$ と $^1\text{H}_{\text{obs}}(\beta\beta)$ の緩和が速くなってしまふ理由は、 $^1\text{H}_1$ 、 $^1\text{H}_2$ がどちらも同じ α -あるいは β -スピン状態にあるために、双極子双極子相互作用の結果生じる局所磁場が両方で強め合ってしまうためである($^1\text{H}_{\text{obs}}$ - $^1\text{H}_1$ ベクトルと $^1\text{H}_{\text{obs}}$ - $^1\text{H}_2$ ベクトルの間の角度は 60° のはずであるが、メチル基が高速回転しているために交差相関の時間スケールでは0になることに注意)。逆に、 $^1\text{H}_{\text{obs}}(\alpha\beta)$ 、 $^1\text{H}_{\text{obs}}(\beta\alpha)$ では、 $^1\text{H}_{\text{obs}}$ - $^1\text{H}_1$ の作る局所

磁場と ${}^1\text{H}_{\text{obs}}\text{-}^1\text{H}_2$ の作る局所磁場が逆方向になってお互いに打ち消し合うことになり、蛋白質分子が回転しても ${}^1\text{H}_{\text{obs}}$ が感じる局所磁場の揺動は小さい。その結果として緩和が遅くなる。

このように分裂した多重線ピークの間で緩和の速さに差があると、結果としてコヒーレンス移動が起こる。この原理はちょうど、 ${}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ のTROSY効果を利用して磁化を移すCRIPTの場合と同じである。さて、このメチル基の場合は、交差相関緩和の結果として ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}$ から $4{}^1\text{H}_{\text{obs,x}}\text{-}^1\text{H}_{1,z}\text{-}^1\text{H}_{2,z}$ へとコヒーレンス移動が起こることになる。ここで ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}$ は四重線(分裂していると仮定)に渡って同位相であるのに対して、 $4{}^1\text{H}_{\text{obs,x}}\text{-}^1\text{H}_{1,z}\text{-}^1\text{H}_{2,z}$ は両端2本と真ん中2本がお互いに反位相である。そして、両者の足し算が ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}(\alpha\alpha)$ 、 ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}(\beta\beta)$ に、引き算が ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}(\alpha\beta)$ 、 ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}(\beta\alpha)$ に対応する。この ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}(\alpha\alpha)$ 、 ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}(\beta\beta)$ の緩和が速く、逆に ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}(\alpha\beta)$ 、 ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}(\beta\alpha)$ の緩和が遅いということは、つまり ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}$ と $4{}^1\text{H}_{\text{obs,x}}\text{-}^1\text{H}_{1,z}\text{-}^1\text{H}_{2,z}$ の量比が時間とともに変わることを意味する。これを ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}$ と $4{}^1\text{H}_{\text{obs,x}}\text{-}^1\text{H}_{1,z}\text{-}^1\text{H}_{2,z}$ の間で交差緩和が起こったと表す(交差「相関」緩和ではない点に注意。交差緩和という言葉がもっともよく出て来るのは、IzとSzの間のNOE現象であるが、ここでは交差相関緩和の結果、同位相と反位相コヒーレンスの間に交差緩和が起こったと考えることができる)。コヒーレンス移動の増減は交差相関緩和速度 η の関数、 $\sinh(-\eta T)$ 、に従うが、この η はメチル基の三回回転対称軸のオーダーパラメータの自乗、 S_{axis}^2 、に比例する。つまり、メチル基の回転軸が蛋白質の上で固定されていれば、相関を失わせる要因は蛋白質全体の回転だけとなりコヒーレンス移動の効率が最大となる。逆に蛋白質を土台として3回回転軸そのものが揺れれば、その揺動で相関の程度が落ちてしまい、コヒーレンス移動の効率が落ちる。そこで、どれだけコヒーレンス移動が起こったかを $4{}^1\text{H}_{\text{obs,x}}\text{-}^1\text{H}_{1,z}\text{-}^1\text{H}_{2,z}$ 由来のピーク強度から見積もり、そこから S_{axis}^2 を得ることができる。

上で ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}$ から $4{}^1\text{H}_{\text{obs,x}}\text{-}^1\text{H}_{1,z}\text{-}^1\text{H}_{2,z}$ が交差緩和で生じることを描像的に書いてみたが、もちろん少し単純化した数式で見ることでもできる。それには、先ほどの交換演算子を使い $[{}^1\text{H}_{\text{obs}}\text{-}^1\text{H}_1\text{-DD}, [{}^1\text{H}_{\text{obs}}\text{-}^1\text{H}_2\text{-DD}, {}^1\text{H}_{\text{obs,x}}]]$ を計算してみるとよい。 ${}^1\text{H}_{\text{obs}}\text{-}^1\text{H}_{1,z}\text{-DD}$ は双極子双極子相互作用のハミルトニアンを表すが、本来は多数の項から成る。しかし、高分子であればあるほど、その中でも $2\text{H}_{\text{obs,z}}\text{-H}_{1,z}$ 演算子が横緩和にもっとも大きく貢献するので、これだけを考える

ことにする。ここで $[I_z, I_x] = i * I_y$, $[I_z, I_y] = -i * I_x$ などの法則を利用する。

$$[2\text{H}_{\text{obs,z}}\text{-H}_{1,z}, [2\text{H}_{\text{obs,z}}\text{-H}_{2,z}, {}^1\text{H}_{\text{obs,x}}]] \\ = i * [2\text{H}_{\text{obs,z}}\text{-H}_{1,z}, 2\text{H}_{\text{obs,y}}\text{-H}_{2,z}] = 4\text{H}_{\text{obs,x}}\text{-H}_{1,z}\text{-H}_{2,z}$$

このように最初 ${}^1\text{H}_{\text{obs,x}}$ と同位相であったコヒーレンスが、交換演算子を二度潜り抜ける間に $4{}^1\text{H}_{\text{obs,x}}\text{-}^1\text{H}_{1,z}\text{-}^1\text{H}_{2,z}$ と反位相のコヒーレンスへ移ったことが分かる。

先ほどの $[{}^{15}\text{N}\text{-CSA}, [{}^{15}\text{N}\text{-H-DD}, \sigma]]$ の例に戻してみる。 ${}^{15}\text{N}\text{-CSA}$ ハミルトニアンの中から N_z 演算子を、同様に ${}^{15}\text{N}\text{-H-DD}$ ハミルトニアンの中から $2N_z\text{-H}_z$ 演算子を選ぶこととする。どちらも高分子になるほど効いてくる項である。

$$[N_z, [2N_z\text{-H}_z, N_x]] = i * [N_z, 2N_y\text{-H}_z] = 2N_x\text{-H}_z$$

$[2N_z\text{-H}_z, [N_z, N_x]]$ も同じ結果となる。このように最初 ${}^{15}\text{N}_x$ と同位相であったコヒーレンスが、交換演算子を二度潜り抜ける間に $2{}^{15}\text{N}_x\text{-}^1\text{H}_z$ と反位相のコヒーレンスへ移ったことが分かる。この同位相と反位相の間の交差緩和は分子量が大きい程よく働くので、高分子では J -couplingによる磁化移動よりも、この交差相関緩和による磁化移動の方が効率が高い場合もある。これを ${}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ HSQCで利用したのがCRIPTである^[7]。 J と交差相関緩和の両方を活かした方法がCRINEPTと呼ばれる。この方法を360 kDaもの大きさのプロテアソーム複合体に応用した例もある。

ちなみに、INEPTを利用した ${}^1J_{\text{HN}}\text{-coupling}$ による磁化移動を交換演算子で表すとどのようになるだろうか? ${}^1J_{\text{HN}}\text{-coupling}$ を駆動させるハミルトニアンの演算子は $2N_z\text{-H}_z$ である。この場合、この磁化移動は緩和現象ではないので、交換演算子は一重となる。

$$[2N_z\text{-H}_z, N_x] = i * 2N_y\text{-H}_z$$

すると、 ${}^{15}\text{N}$ スピンのxではなくyと 90° ずれる。また、新たに虚数*i*も生じている。この虚数は共鳴位置がずれることを意味し、この場合は ${}^{15}\text{N}$ のピークが二本に分かれて、それぞれ $\pm J/2$ ずつ ω_N の位置からずれることを意味する。下記の直積演算子の右辺第二項目に相当する。

$$N_x \rightarrow N_x \cos(\pi Jt) + 2N_y H_z \sin(\pi Jt)$$

実は、交差相関の計算でも緩和に繋がる実数項以外に虚数項が生じてしまう。この虚数項は二重分裂線をそれぞれ異なる値でほんの少しだけシフトさせてしまう。したがって、二重分裂線がそれぞれ異なる速度で緩和するだけでなく、その間の間隔ももはや真の J -coupling 値とは異なっているのである。これを dynamic frequency shift (DFS) と呼んでいる。

回転相関時間 τ_c を見積もる

横緩和速度 R_2 を測定する時、その値には交換速度 R_{ex} も含まれていることに注意しないとイケない。つまり、見かけの R_2^{app} は双極子双極子相互作用や化学シフトの異方性などから来る真の R_2 と交換速度 R_{ex} の足し算となる ($R_2^{app} = R_2 + R_{ex}$)。ところが面白いことに、交差相関横緩和速度 η_{xy} は、その中に R_{ex} を含んでいない。蛋白質の回転相関時間 τ_c を決める場合、しばしば R_2^{app}/R_1 の値を使っていた。しかし、もし R_2^{app} に大量の R_{ex} が含まれていると、この τ_c が実際よりも大きく見積もられてしまう。一方、 η_{xy} をある程度正確に測ることができれば、その値には R_{ex} が含まれていないので、 τ_c をもう少し正確に見積もることができる(ただし、 η_z との比を取らない場合には、 ^{15}N - ^1H のオーダーパラメータ、 S^2 、を一律であると仮定する。 R_2^{app}/R_1 の場合においても比をとるのは、 S^2 を割り算で打ち消すためである)。

横緩和速度 R_2 を測るとということは、すなわちピークの半値幅を測ることに相当する(半値幅 $\times \pi = R_2^{app}$)。したがって、もし R_{ex} が多量にあると、どんどん半値幅(線幅)が増えてしまう。この R_{ex} による広幅化は分裂した多重線に等しく起こる。したがって、例えば、二重分裂線のそれぞれの半値幅の差をとれば、 R_{ex} の部分は打ち消し合うことになる。実は、この半値幅 $\times \pi$ の差が $2\eta_{xy}$ である。このような方法を利用した τ_c の決め方は TRACT という名前で紹介されている^[8]。

金属蛋白質での交差相関緩和

ヘム蛋白質など常磁性金属を含む蛋白質では、交差相関緩和から興味深い構造情報がとれる場合がある。もし、この常磁性金属の電子の緩和がピコ秒程度と非常に速い場合、平衡状態での電子の磁気モーメント(キュリースピン)と ^1H スピンとの間に双極子双極子相互作用(ハミルトニアン

を ^1H -curie-DD とする)が生じる。そして、この ^1H -curie-DD と ^1H - ^{15}N の双極子双極子相互作用(ハミルトニアンを ^1H - ^{15}N -DD とする)との間に交差相関が起こる。この電子スピン(キュリースピン)の磁気モーメントは非常に大きいため、 15\AA ほど離れていても交差相関緩和の現象を観ることが出来る。また、キュリースピンの磁気モーメントは z 成分だけの値を持ち、 x 、 y 成分は 0 となる。したがって、 ^1H -curie-DD のハミルトニアンはまるで ^1H -CSA ハミルトニアンのような式となる。その結果、 $[^1\text{H}$ -curie-DD, $[^1\text{H}$ - ^{15}N -DD, $^1\text{H}_x]$] の交差相関の式は $[^1\text{H}$ -CSA, $[^1\text{H}$ - ^{15}N -DD, $^1\text{H}_x]$] と似た形となり、スペクトル上では ^1H の二重分裂線の強度が異なるという結果を生む^[9]。もちろん、 $[^1\text{H}$ -CSA, $[^1\text{H}$ - ^{15}N -DD, $^1\text{H}_x]$] では、TROSY 効果により高磁場側の ^1H ピークの強度が強くなるのであるが、これに $[^1\text{H}$ -curie-DD, $[^1\text{H}$ - ^{15}N -DD, $^1\text{H}_x]$] の効果が加わるため、逆に低磁場側の ^1H ピークの強度が強くなる場合もある。この実験の惜しい点は、両者の寄与を分けるために反磁性状態の蛋白質のスペクトルも同じように測定し、そこから得られる $[^1\text{H}$ -CSA, $[^1\text{H}$ - ^{15}N -DD, $^1\text{H}_x]$] の寄与を引かないとイケない点である。また、 $[^1\text{H}$ -curie-DD, $[^1\text{H}$ - ^{15}N -DD, $^1\text{H}_x]$] から得られた交差相関緩和速度(二重分裂線の半値幅 $\times \pi$ の差 $2\eta_{xy}$ から得られる)には、 ^1H -curie ベクトルと ^1H - ^{15}N ベクトルの間の角度 θ の情報だけでなく、 ^1H とキュリースピンの間の距離 $r_{\text{H-curie}}$ の情報も同時に混じってしまう。これらは $(3\cos^2\theta - 1)/r_{\text{H-curie}}^3$ という形にまとまってしまうため、せっかく遠距離に相当する構造情報でありながら、両者がこのように絡んだ状態で構造解析に使わなくてはイケない。

さいごに

しばしば双極子双極子相互作用が関連し「緩和」という名前が付いているように、交差相関は空間を経て作用する物理現象である。そして、NOE 現象が 5\AA 程度までの距離しか効かず、蛋白質の立体構造決定では依然主力の情報でありながら、その有効範囲の短さに嘆かざるを得ないのと同様、交差相関緩和も同様に局所的である。もちろん直前の段落の話のように常磁性の電子スピンを巻き込めば、かなり遠くまで有効範囲が伸びることは、paramagnetic relaxation enhancement (PRE) と同じである。交差相関が予想していたほどには構造解析に日常的に使われない理由の一つに次のような事情が挙げられる。例えば、A-B-DD と B-CSA との間の交差相

関の場合、スピンBが共有されている。A-B-DDとB-C-DDの場合も同様である。ところが、A-B-DDとC-D-DDの間の交差相関を観たい場合、例えば、B-Dの多量子コヒーレンスを作らないといけないのである。これを作るにはBとDの間でJ-couplingなどを通して磁化を移動させなければいけない。この事情がせつかく大きな潜在力をもつ交差相関が局所的な有効範囲に留まってしまっている残念さの原因のようにも思われる。

実はこの続きで「CCRで ϕ , ψ を見積もる」「Transferred CCRでGPCRに結合したリガンドの構造を解く」「相関して動く(将棋倒しの)ダイナミクスを観る」「 ^2H 四極子相互作用とDDとの間のCCRで水素結合を見つける」…などが続く予定であったが、すでに字数制限に近づいてしまっていた。また、文章から書いてしまったために図がほとんど無いような状態となってしまったが、それらの図はまた別の講義・講演・ウェブなどで示すということでどうかお許し頂きたい。

参考文献

- [1] Reif, B., Hennig, M., and Griesinger, C. (1997) Direct measurement of angles between bond vectors in high-resolution NMR. *Science* **276**, 1230-1233.
- [2] Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and Wüthrich, K. (1997) Attenuated T_2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12366-12371.
- [3] Tjandra, N., and Bax, A. (1997) Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science* **278**, 1111-1114.
- [4] Goldman, M. (1984) Interference effects in the relaxation of a pair of unlike spin-1/2 nuclei. *J. Magn. Reson.* **60**, 437-452.

Reson. **60**, 437-452.

- [5] Goldman, M. (1988) Quantum Description of High-Resolution NMR in Liquids. Clarendon Press, Oxford.
- [6] Tugarinov, V., Sprangers, R., and Kay, L.E. (2007) Probing side-chain dynamics in the proteasome by relaxation violated coherence transfer NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1743-1750.
- [7] Riek, R., Pervushin, K., and Wüthrich, K. (2000) TROSY and CRINEPT: NMR with large molecular and supramolecular structures in solution. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 462-468.
- [8] Lee, D., Hilty, C., Wider, G., and Wüthrich, K. (2006) Effective rotational correlation times of proteins from NMR relaxation interference. *J. Magn. Reson.* **178**, 72-76.
- [9] Ohmura, T., Harada, E., Fujiwara, T., Kawai, G., Watanabe, K., and Akutsu, H. (1998) Paramagnetic inversion of the sign of the interference contribution to the transverse relaxation of the imido protons of the coordinated imidazoles in the uniformly ^{15}N -labeled cytochrome c_3 . *J. Magn. Reson.* **131**, 367-372.

略語

- cross-correlated relaxation (CCR)
- cross relaxation-enhanced polarization transfer (CRINEPT)
- cross relaxation-induced polarization transfer (CRIPT)
- chemical shift anisotropy (CSA)
- dynamic frequency shift (DFS)
- heteronuclear single-quantum correlation (HSQC)
- insensitive nuclei enhanced by polarization transfer (INEPT)
- nuclear Overhauser effect (NOE)
- paramagnetic relaxation enhancement (PRE)
- residual dipolar coupling (RDC)
- transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY)
- TROSY for rotational correlation times (TRACT)
- A-B核間の双極子双極子相互作用のハミルトニアン演算子 (A-B-DD)
- A核の化学シフト異方性のハミルトニアン演算子 (A-CSA)
- 交換演算子 $[A, B] = AB-BA$



池上 貴久 (いけがみ・たかひさ)

1991年3月 大阪大学・理学部・生物学科 卒業
 1991年4月 株式会社日立製作所・計測器事業部 入社
 1994年4月 大阪大学・大学院理学研究科・生物化学・修士課程 入学
 1996年4月 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 教務職員
 1997年4月 同上 助手
 1999年3月 博士号取得(理学生物化学、大阪大学)
 2000年11月 フランクフルト大学(Prof. Griesinger) JSPS海外特別研究員
 2001年10月 ゲッティンゲン・マックスプランク研究所 同上
 2002年3月 大阪大学・蛋白質研究所 助教授
 2003年 日本核磁気共鳴学会会員
 2003年10月 大阪大学・生命機能研究科(兼任) 助教授
 2007年4月 蛋白質研究所 および 生命機能研究科(兼任) 准教授(現職)
 2012年4月 京都大学・エネルギー理工学研究所 客員准教授

固体NMRおよびGIPAW計算による Alq₃結晶構造の解析

京都大学化学研究所

鈴木 不律、梶 弘典

はじめに

固体NMR法は、固体材料の構造を調べる有力な手段として広く用いられている。中でも、精密な構造情報を得るために、日々、先進的な固体NMR法が開発されてきた。我々も、同位体ラベル試料を準備し、複雑なパルス系列からなる固体NMR法を用いて、X線回折測定では解析困難な構造を調べてきた^[1]。このような固体NMR解析法が展開される一方で、NMRの専門家以外の人でも用いることができる、簡便かつ汎用性の高い手法があれば、固体NMRは、基礎的な面でも応用面でも、より便利な構造解析手段となり得るであろう。

例えば、¹³C核に対するCP/MAS法は、今ではNMRの専門家でなくても容易に用いることができる、汎用性の高い手法となっている。同位体ラベル試料や複雑なパルス系列を用いることなく、すべての炭素種に対する化学シフト情報を簡便に得ることができる。しかし、現在のところ、粉末X線解析から(モデルは必要であろうが)結晶構造が得られるようには、CP/MASスペクトルの解析から結晶構造を得ることはできていない。

CP/MASスペクトルから構造情報を得る一つの方法は、量子化学計算を併用することである。実際、gauge-including atomic orbitals(GIAO)法による化学シフト計算が広く用いられ、それにより様々な情報が得られている。しかし、そのほとんどは孤立分子に対する計算であり、固体試料における分

子間相互作用を考慮することは難しい。我々も分子間相互作用を組み入れるため、複数の分子からなるクラスターに対する計算を何度も試みたことがあるが、なかなかうまくいかなかった経験をもつ。このような状況のもと、PickardとMauriは、gauge-including projector-augmented wave (GIPAW)法を開発した^[2]。このGIPAW法では、平面波近似により周期境界条件下での化学シフト計算を可能としている。すなわち、この手法により、分子間相互作用を含めた形での結晶試料に対する計算が可能となる。本NMR基礎講座では、**図1**に示した有機分子tris(8-hydroxyquinoline)aluminum(III)(Alq₃)の結晶構造解析を例にとり、GIPAW法とCP/MAS¹³C NMR法を併用した構造解析の有用性を示す。

Alq₃は、発光特性および電子輸送特性という興味深い特性を併せ持つ有機材料であり、有機エレクトロルミネッセンス(有機EL)デバイスに広く用いられている。Alq₃には、*facial*(**図1a**)、および、*meridional*(**図1b**)と呼ばれる2種の幾何異性体がある。*facial*体は3重回転軸を有し、3つの配位子は等価である。一方、*meridional*体は配位子のひとつが反転した構造となっており、3つの配位子は非等価である。従来、Alq₃は緑色に発光することが知られていたが、近年、青色に発光するAlq₃が報告された^[3]。この青色発光Alq₃は従来に比べ2倍以上の発光量子収率を示す(すなわち、よく光る)といった、さらなる特性を有するが、青色発光の起源については、分子内構造、すなわち、上記の幾何異性体に起因するという報告と、分子間相互作用に由来するという報告があり、現段階では確定していない。本講座では、この最近見出された青色発光をするAlq₃結晶、すなわち、 γ 型^[4]および δ 型^[5,6] Alq₃結晶に焦点を絞り、CP/MAS¹³C NMR測定とGIPAW計算により構造精密化を試みた結果^[7]について紹介する。

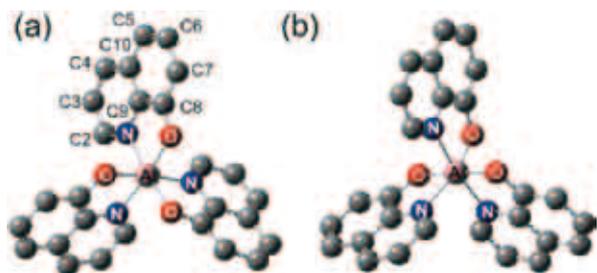


図1 Molecular structures of Alq₃ in (a) *facial* and (b) *meridional* isomeric states. Hydrogen atoms are omitted for clarity.

CP/MAS ^{13}C NMR 測定と GIPAW 計算

図2aに、 $\gamma\text{-Alq}_3$ 結晶の実測CP/MAS ^{13}C NMRスペクトルを示す。シャープな共鳴線が、すべての炭素種に対して一本ずつ観測される。このことは、 $\gamma\text{-Alq}_3$ が*facial*体の分子からなることを明確に示している。図2bには、従来のGIAO法による、*facial*- Alq_3 一分子に対する等方化学シフト計算の結果を示す。現状では、実測化学シフト値と計算値のズレは、 ^{13}C 核に対しては2-3ppm以内であれば十分一致していると判断して良い^[8]が、その判断基準からすると、図2bは、実測の等方化学

シフトを再現していない。図2c、dには、Mucciniら^[4]によって報告されたX線解析により決定された構造(M-orig)、および、その構造から水素原子の座標のみを最適化した構造(M-Hopt)に対する、GIPAW法による等方化学シフト計算の結果をそれぞれ示す。図2eには、さらに全原子の座標を最適化した構造(M-FULLopt)に対する結果を示す。図2c、dはいずれも実測を再現していない一方、図2eでは、実測値とのズレは最大で1.6ppmとなり、実測を非常によく再現する結果となった。

図3aには、 $\delta\text{-Alq}_3$ 結晶に対する実測CP/MAS

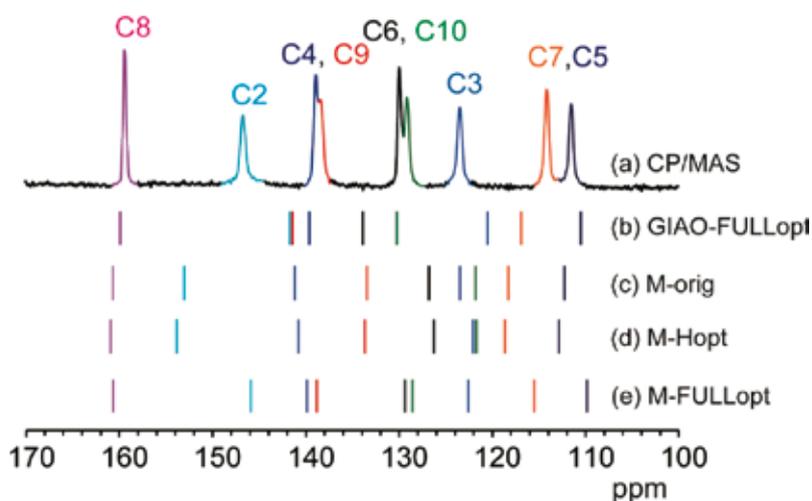


図2 (a) Experimental CP/MAS ^{13}C NMR spectrum of $\gamma\text{-Alq}_3$. (b) Isotropic resonance lines of a *facial* Alq_3 single molecule calculated using the GIAO method. (c)-(e) Isotropic resonance lines of $\gamma\text{-Alq}_3$ crystals calculated using the GIPAW method.

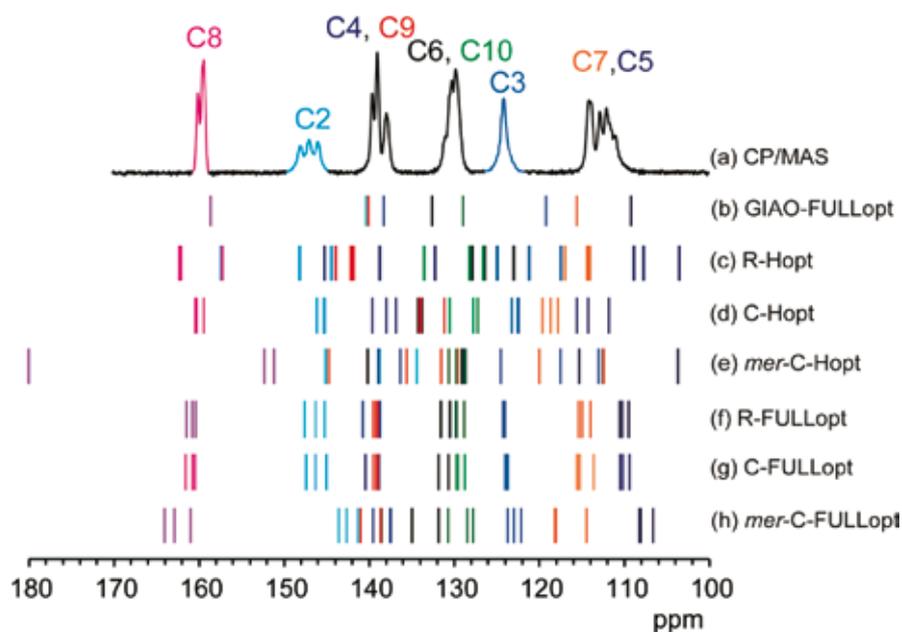


図3 (a) Experimental CP/MAS spectrum of $\delta\text{-Alq}_3$. (b) Isotropic resonance lines of a *facial* Alq_3 single molecule calculated using the GIAO method. (c)-(h) Isotropic resonance lines of $\delta\text{-Alq}_3$ crystals calculated using the GIPAW method.

^{13}C NMRスペクトルを示す。図2aと異なり、図3aでは各炭素種に対する共鳴線に分裂が見られる。例えば、C2炭素(図1参照)の共鳴線は3本に明瞭に分裂している。この結果からは、次の2つの可能性が考えられる。1) Alq_3 分子が*facial*体ではなく*meridional*体からなるため、3つの配位子が化学シフトの異なる共鳴線を与える。2) Alq_3 分子は*facial*体であるが、分子間の相互作用が共鳴線の分裂をもたらす。

まず、正しい結晶構造を得るべく検討を行った。 δ - Alq_3 の結晶構造としては、Rajeswaranら^[5]によって報告されたものとCölleら^[6]によって報告されたものがある。Cölleらの構造にはH原子の座標が示されていないので、H原子を付けその座標を最適化したもので比較を行った。RajeswaranらのH座標最適化構造(R-Hopt)、CölleらのH座標最適化構造(C-Hopt)に対するGIPAW計算結果をそれぞれ図3c、dに示す。さらに、これらR-Hopt、C-Hoptをもとに、全原子座標の最適化を行った構造(それぞれR-FULLoptとC-FULLoptと呼ぶ)に対するGIPAW計算結果を図3f、gに示す。図3c、dは、いずれも実測を再現していない。また、図3c、dは異なる結果を与えている。一方、図3f、gは、ほぼ同じ結果となり、また、実測を良く再現している。この結果は、RajeswaranとCölleのもともとの構造では、原子座標は互いに異なっていたが、全原子に対する構造最適化により、ほぼ等価な構造が得られたことを示している。(ちなみに、Rajeswaranら^[5]は、 δ - Alq_3 の単結晶を得ることに成功しており、図3cで用いた構造は単結晶X線構造解析により得られたものである。図3c、dを比較すると、Cölleらによる粉末試料のRietveld解析の結果得られた構造の方が、実測CP/MASスペクトルにより近い結果を与えている。)

以上の図3c、d、f、gの結晶はいずれも*facial*体からなっている。一方、*meridional*体からなる結晶構造に対しては、H原子を最適化した構造(*mer*-C-Hopt、図3e)、全原子を最適化した構造(*mer*-C-FULLopt、図3h)いずれにおいても、実測を再現

する結果は得られなかった。以上の結果から、 δ - Alq_3 は*facial*体 Alq_3 のみから形成された結晶であり、共鳴線の分裂は分子間相互作用によると結論付けてよいであろう。

一分子の構造

図4a、bには、全原子座標を最適化した γ - Alq_3 および δ - Alq_3 結晶(M-FULLoptとC-FULLopt)から一分子を取り出し(それぞれ、M-FULLopt-IMとC-FULLopt-IMと呼ぶ)、分子間相互作用がない孤立分子の状態での化学シフト計算を行った結果を示す。これらは図2e、3gと明確に異なっていることから、分子間相互作用が等方化学シフトに大きく影響すること、すなわち、等方化学シフトから分子間の凝集状態を調べることが可能であることを示している。C-FULLopt-IMでは、3つの配位子からの共鳴線が、完全にではないがほぼ一致している。すなわち、図3gで見られる共鳴線の分裂は分子間相互作用の影響である、という上記の結論が、この結果からも確証される。また、 γ - Alq_3 および δ - Alq_3 結晶中の一分子の構造はほぼ同じであることがこの結果から明らかとなった。

粉末X線解析との比較

次に、粉末X線解析との比較について述べる。図5には、実測、および、図2に示した各種 γ - Alq_3 モデル結晶に対する計算粉末X線プロファイルを示す。M-orig、M-Hopt、M-FULLoptいずれのプロファイルも実測に類似しており、明確な違いは見られない。一方、図2では明確な違いが見られていることから、粉末X線回折測定では区別困難な構造が、本手法では明確に区別できる、すなわち、本手法により、粉末X線解析よりも精密な結晶構造解析が可能であることがわかる。

図6には、実測、および、図3に示した各種 δ - Alq_3 モデル結晶に対する計算粉末X線プロファイルを示す。図6hの*mer*-C-FULLoptを除いて、すべて実測を再現する、ほぼ同じプロファイルとなった。すなわち、 δ - Alq_3 に対しても、 γ - Alq_3 の場合と同様に、

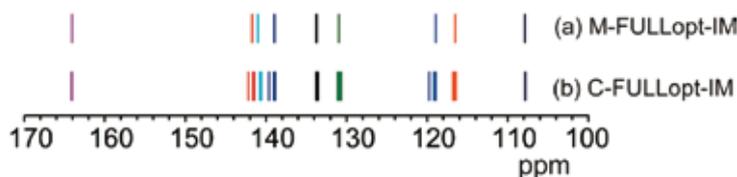


図4 Calculated isotropic resonance lines for the structures, (a) M-FULLopt-IM and (b) C-FULLopt-IM.

NMRスペクトルでは区別できる構造が、X線回折プロファイルでは区別困難であることがわかる。全原子座標を最適化した*meridional*体からなる結晶(図6h)は他とは異なる(そして実測とも異なる)プロファイルを与えるが、H原子のみを最適化した*meridional*体からなる結晶(図6e)は、*facial*体からなるプロファイル(図6b~d, f, g)とほぼ一致している。すなわち、*meridional*体からなる結晶であっても、原子座標を少し動かすことにより*facial*体からなる結晶と同じプロファイルを与えることが可能である。このことは、粉末X線回折測定のみから、これらの異性体を区別することが困難であることを意味している。また、Rajeswaranらの構造とCölleらの構造の区別が困難であることも、図6からわかる。

有機ELデバイスへの展開

はじめに述べた通り、Alq₃の構造と発光色は深く関係している。本講座では深くは述べないが、本解析は、緑色発光をするAlq₃と青色発光をするAlq₃の違いが、分子間相互作用ではなく、異性体状態、すなわち、*facial*体か*meridional*体か、によって決まることを支持している。したがって、従来のAlq₃からなる有機ELに加え、*facial*体のAlq₃からなる有機ELができれば、三原色のうちの二つの色をもつ有機ELデバイスをこのAlq₃のみから作製できることになる。また、上述の通り、*facial*体Alq₃からなる有機ELは、*meridional*体Alq₃からなる有機ELの倍以上よく光るのであろう。しかし、*facial*体のAlq₃は気相および液相状態では不安定であるため^[9,10]、有機ELデバイスの作製過程で、*facial*体のAlq₃は*meridional*体になってしまう。これらの結果をうけ、現在、我々は、*facial*体が安定なAlq₃誘

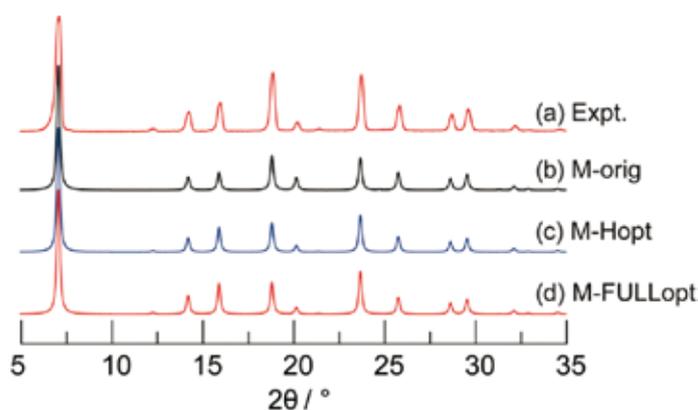


図5 Experimental and calculated powder X-ray diffraction profiles for γ -Alq₃. Gaussian broadenings with full widths at half-maximum of 0.2° were applied for all the calculated profiles.

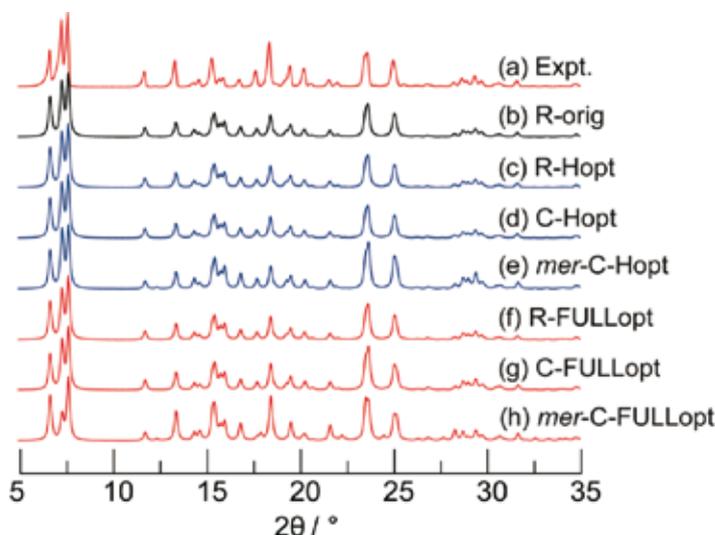


図6 Experimental and calculated powder X-ray diffraction profiles for δ -Alq₃. Gaussian broadenings with full widths at half-maximum of 0.2° were applied for all the calculated profiles.

導体の合成に取り組んでいる。

また、 γ -Alq₃、 δ -Alq₃いずれに対しても、全原子座標最適化前後での炭素原子の座標変位は、最大で0.2Åであった。はじめに述べた通り、Alq₃は、発光特性に加え、電荷輸送特性をも兼ね備えている。有機材料における電荷輸送は、分子間での電荷のホッピング伝導によって起こる。そのため、分子間の波動関数の重なり(電荷移動積分)が電荷輸送特性を決める重要な因子の一つとなる。我々はすでに、Alq₃を含めた種々の有機材料に対して、分子間距離が0.1-0.2Å変化するだけでも電荷移動積分が大きく変わることを明らかにしている。

そのため、有機材料の電荷輸送特性を分子レベルで明らかにするという我々の目的に対しては、粉末X線回折法で得られる精度では十分でなく、本研究で得られる精度で構造を決める必要がある。

まとめ

本講座では、GIPAW法とCP/MAS ¹³C NMR法を併用した解析手法の有用性を示した。CP/MAS測定により得られる等方化学シフトから、0.1-0.2Å程度の原子座標の違いを判別することができ、粉末X線解析よりも十分精密な解析を行えることが示された。ただし、今回の系に対するGIPAW計算には数時間以上を要しており、反復的な計算を行うことは現状では不可能である。そのため、今回はX線解析により得られた構造をもとに構造精密化を行った。しかし、将来、計算速度が飛躍的に向上すれば、固体NMRデータとGIPAW計算の組み合わせのみから(等方化学シフト以外の固体NMR測定による拘束条件が必要となるかもしれないが)、結晶構造を明らかにできる可能性があると期待している。

我々は現在、本手法を非晶系に展開しつつある。解決しなければいけない問題が山積しているが、この取り組みにより、非晶系有機デバイスの中で有機材料はどのような構造をとっているのか、さらに、そのデバイス中で実際にどのような現象が起こっているのかを、分子・電子のレベルから明らかにできればと考えている。

本手法は対象を選ばないことから、種々の有機および無機化合物、天然物等への適用が可能である。現在、農工大、朝倉教授らのグループと共同で、GIPAW法の適用をペプチド等の系に展開している。必ずしもCP/MAS測定のみでなく、種々の固体NMR測定と組み合わせている。詳細に関して

は、文献11,12を参照されたい。

謝辞

本研究は、京都大学スーパーコンピュータ共同研究制度(若手奨励枠)による。また、総合科学技術会議により制度設計された最先端研究開発支援プログラムにより、日本学術振興会を通して助成された。計算時間の一部は、京都大学化学研究所スーパーコンピュータシステムより提供され、NMR測定には京都大学化学研究所共同研究・共同利用拠点の機器であるNMR装置を利用した。ここに感謝の意を記す。

参考文献

- [1] 例えば、Kaji, H., Klaus Schmidt-Rohr, K. (2001) Conformation and dynamics of atactic poly (acrylonitrile). 2. Torsion angle distributions in meso dyads from two-dimensional solid-state double-quantum ¹³C NMR. *Macromolecules* **34**, 7368-7381.
- [2] Kaji, H., Klaus Schmidt-Rohr, K. (2002) Selective observation and quantification of amorphous trans conformers in doubly ¹³C-labeled poly(ethylene terephthalate), PET, by zero-quantum magic-angle-spinning solid-state NMR. *Macromolecules* **35**, 7993-8004. など。
- [3] Pickard, C. J., Mauri, F. (2001) All-electron magnetic response with pseudopotentials: NMR chemical shifts. *Phys. Rev. B* **63**, 245101.
- [4] Braun, M., Gmeiner, J., Tzolov, M., Cölle, M., Meyer, F. D., Milius, W., Hillebrecht, H., Wendland, O., von Schütz, J. U., Brütting, W. (2001) A new crystalline phase of the electroluminescent material tris(8-hydroxyquinoline) aluminum exhibiting blueshifted fluorescence. *J. Chem. Phys.* **114**, 9625-9632.
- [5] Muccini, M., Loi, M. A., Kenevey, K., Zamboni, R., Masciocchi, N., Sironi, A. (2004) Blue luminescence of facial Tris(quinolin-8-olato)aluminum(III) in solution, crystals, and thin films. *Adv. Mater.* **16**, 861-864.
- [6] Rajeswaran, M., Blanton, T. N., Klubek, K. P. (2003) Refinement of the crystal structure of the δ -modification of tris (8-hydroxyquinoline) aluminum(III), δ -Al(C₉H₆NO)₃, the blue luminescent Alq₃. *Z. Kristallogr. - New Cryst. Struct.* **218**, 439-440.
- [7] Cölle, M., Dinnebier, R. E., Brütting, W. (2002) The structure of the blue luminescent δ -phase of tris(8-hydroxyquinoline)aluminum(III) (Alq₃). *Chem. Commun.* **23**, 2908-2909.
- [8] Suzuki, F., Fukushima, T., Fukuchi, M., Kaji, H., (2013) Refined structure determination of blue-emitting tris(8-hydroxyquinoline) aluminum(III) (Alq₃) by the combined use of CP/MAS ¹³C solid-state NMR and first-principles calculation. *J. Chem. Phys. C*. accepted.
- [9] Harris, R. K., Wasylishen, R. E., Duer, M. (2009) *NMR Crystallography*. pp. 81-98, Wiley, Chichester.
- [10] Kaji, H., Kusaka, Y., Onoyama, G., Horii, F. (2006) CP/MAS ¹³C NMR characterization of the isomeric states and intermolecular packing in tris(8-hydroxyquinoline) aluminum(III) (Alq₃). *J. Am. Chem. Soc.*

- 128, 4292-4297.
- [10] Fukushima, T., Kaji, H. (2012) Green- and blue-emitting tris(8-hydroxyquinoline) aluminum(III) (Alq₃) crystalline polymorphs: preparation and application to organic light emitting diodes. *Org. Electron.* **13**, 2985–2990.
- [11] Yazawa, K., Suzuki, F., Nishiyama, Y., Ohata, T., Aoki, A., Nishimura, K., Kaji, H., Shimizu, T., Asakura, T. (2012) Determination of accurate ¹H positions of an alanine tripeptide with anti-parallel and parallel β -sheet structures by high resolution ¹H solid state NMR and GIPAW chemical shift calculation. *Chem. Commun.* **48**, 11199-11201.
- [12] Asakura, T., Yazawa, K., Horiguchi, K., Suzuki, F., Nishiyama, Y., Nishimura, K., Kaji, H. (2013) Difference in the structures of alanine tri- and tetrapeptides with antiparallel β -sheet assessed by X-ray diffraction, solid-state NMR and chemical shift calculations by GIPAW. *Biopolymer* accepted.



鈴木 不律 (すずき・ふりつ)

2004年3月 京都大学工学部工業化学科卒業
 2006年3月 京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 修士課程修了
 2006年4月 花王株式会社 入社
 2008年10月 京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 博士後期課程入学
 2010年 日本核磁気共鳴学会会員



梶 弘典 (かじ・ひろのり)

1994年4月 京都大学化学研究所 助手
 1998年4月～1999年3月
 文部省在外研究員 (米国Massachusetts大学客員研究員)
 2002年11月～2006年3月
 科学技術振興事業団 さきがけ研究 (秩序と物性領域) 研究員兼任
 2002年 日本核磁気共鳴学会会員
 2003年10月 京都大学化学研究所 助教授 (2007年4月より准教授)
 2009年7月 京都大学化学研究所 教授

NMR 滴定実験と蛋白質の化学修飾

大阪大学蛋白質研究所

古板 恭子、服部 良一、児嶋 長次郎

はじめに

本稿では、主に蛋白質や核酸を対象とする溶液 NMR 法の中で、基礎的でありながら近年進展が著しい二つの実験技術を取り上げる。ひとつは NMR 滴定実験であり、もう一つは化学修飾による NMR プローブの導入技術である。NMR 滴定実験では、滴定実験におけるスペクトル線形変化を容易にシミュレートできるプログラムが開発されており、専門家でなくても 2 次元スペクトルのシミュレーションが可能となりつつある。今回は、NMR 滴定実験におけるスペクトル変化の見方を線形シミュレーションに基づき基礎から概説するとともに、その応用例を示す。化学修飾法は、古典的な化学修飾による安定同位体の導入のほか、常磁性緩和 (PRE) 法や偽コンタクトシフト (PCS) 法で必須となるスピラベルやキレート剤の導入などに用いられており、その利用範囲は年々拡大を続けている。特に、ケミカルバイオロジーの分野において、細胞内のターゲットと任意のリガンドを特異的に化学反応させることが可能になりつつあることから、今後の NMR への発展が期待される。今回は、リジン側鎖に付加した ^{13}C メチル基を用いた NMR 解析法の応用例を示すとともに、NMR における化学修飾の利用例を幾つか紹介する。

1. NMR 滴定実験

生体系における NMR 滴定実験として最も典型的な例は、レセプターにリガンドを段階的に加えていったときの、レセプターの NMR スペクトルの変化を追う実験である。この実験からは、レセプター上のリガンド結合部位やリガンドとの親和性といった結合に関する情報を得ることが出来る。NMR 滴定実験は、他にも、結合中間体の解析^[1,2]や、複数部位へのリガンド結合の解析^[3,4]、結合したリガンドの配向決定^[5,6]、レセプターとリガンドのドッキング^[7,8]などに利用されている。本項では、滴定実験で生じうる様々なスペクトル変化のパターンにつ

いてシミュレーションスペクトルと実例を用いて紹介する。

NMR 滴定実験におけるレセプターのスペクトル変化のパターンは、フリーと複合体の交換レート (k_{ex}) に依存している。ここでは、レセプター (R) とリガンド (L) が、フリーと複合体 (RL) の 2 状態を行き来する場合を考える ($\text{R} + \text{L} \rightleftharpoons \text{RL}$)。結合解離は、固有の結合速度定数 (k_{on}) 及び解離速度定数 (k_{off}) によって特徴づけられている。レセプター、リガンド及び複合体の濃度をそれぞれ $[\text{R}]$ 、 $[\text{L}]$ 及び $[\text{RL}]$ とすると、結合のレートは、 k_{on} を用いて、 $k_{\text{on}}[\text{R}][\text{L}]$ 、解離のレートは、 k_{off} を用いて、 $k_{\text{off}}[\text{RL}]$ で表される。滴定実験の NMR スペクトルの変化に影響を与える k_{ex} は、 $k_{\text{ex}} = k_{\text{on}}[\text{L}] + k_{\text{off}}$ で表される^[9]。

滴定実験における NMR スペクトル変化のパターンは、 k_{ex} と、レセプターのフリーと複合体での周波数差 ($\Delta\omega$) によって大きく 3 つに分けられる。① $k_{\text{off}} \ll \Delta\omega$ の場合 (slow-exchange) ② $k_{\text{off}} \gg \Delta\omega$ の場合 (fast-exchange) ③ $k_{\text{off}} \approx \Delta\omega$ の場合 (intermediate exchange) である。

Slow-exchange の場合、リガンドが滴定されるに従って、フリーの位置の信号が徐々に減少していき、代わりに複合体の位置に信号が現れ、強度を増していく (図 1A)。fast-exchange の場合、リガンドが滴定されるに従って、信号がフリーの位置から複合体の位置に向かって直線的に移動していく (図 1B)。Intermediate-exchange では、fast-exchange と slow-exchange が入り交じったような複雑な信号の変化が見られる (図 1C)。Intermediate-exchange では、滴定の半ばで、信号の線幅が広がり、ほとんど観測できないこともある。このほかに、滴定実験の始めは slow-exchange のピーク変化を示し、終盤でピークのシフトが見られることがある^[10]。これは、 $k_{\text{ex}} = k_{\text{on}}[\text{L}] + k_{\text{off}}$ であるため、実験の終盤では $[\text{L}]$ の増加により交換レートが増加するためである。

タンパク質の信号を追う滴定実験は、信号の重なりを防ぐため、2 次元スペクトルを用いて行われ

ることが多い。2次元スペクトルによる滴定実験でピークの変化を見る際、注意しなければならないのは、x軸とy軸で、フリーと複合体形成時の周波数差が異なるということである。このため、x軸ではfast-exchange、y軸ではintermediate-exchangeという風に、異なるパターンになることがあり、一見すると奇妙なスペクトル変化を示すことがある(図1D、図2)。

図2は、小胞体膜貫通タンパク質VAMP-associated protein-A (VAP-A)に、そのリガンドであるOxysterol binding protein (OSBP)由来のペプチドフラグメントを滴定したときの ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルである。

多くの残基は典型的なslow-exchangeあるいはfast-exchangeのピーク変化を示したが、いくつかの残基において、特殊なピークの変化がみられた。これらのうちいくつかは、上述の2状態平衡におけるintermediate-exchangeの様々なピークシフトのパターン及び、 ^1H 軸と ^{15}N 軸のフリーと複合体の周波数差の違いで説明できた。しかし、4つの残基は、それらを考慮しても、2状態平衡では説明がつかなかった。このことと、OSBPペプチド変異体を用いた実験などから、筆者らはVAP-AはOSBPペプチドとの結合において、何らかの結合中間体を形成すると結論づけた^[11]。

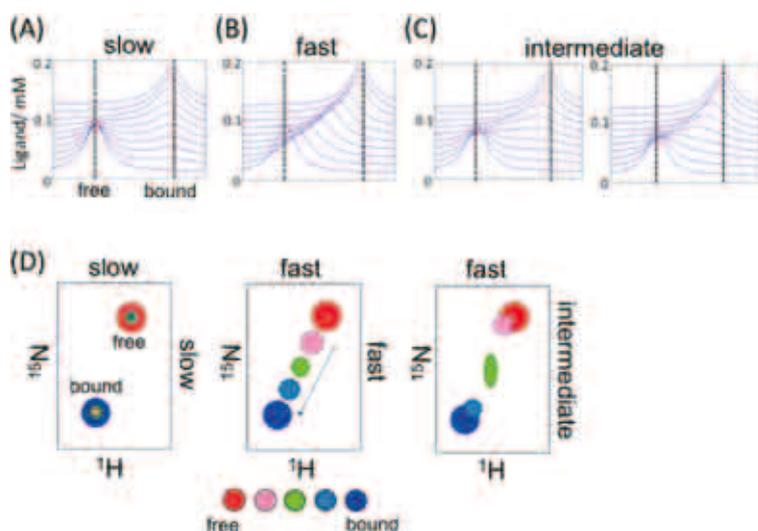


図1 (A～C) 滴定実験におけるスペクトルの変化

スペクトルシミュレーションは、LineShapeKin Simulationソフトウェア^[10]を用い、 $\Delta\omega = 76\text{ Hz}$ 、 $K_a = 2.8e5$ 、 $k_{\text{off}} = 5$ (A)、200(B)、15(C左)、30(C右)として行った。intermediate状態ではピーク位置の変化を伴うslow exchange様のピークや、シグモイダル様のピーク位置変化を伴うfast exchange様のピークが観測される。(D) 2次元スペクトルを用いた滴定実験で現れうるピーク変化の模式図。

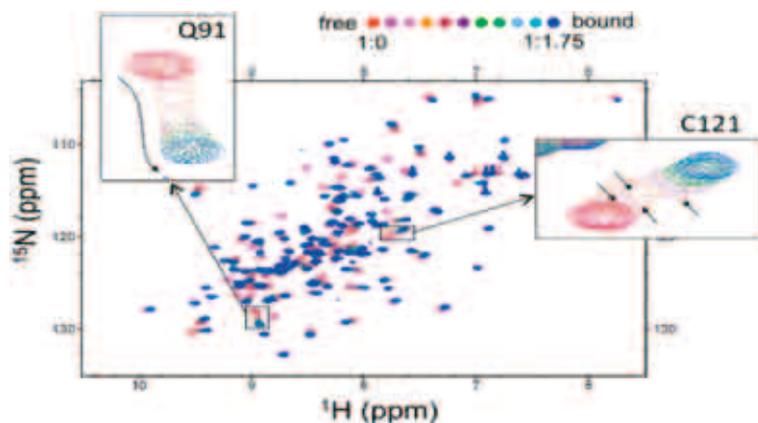


図2 VAP-Aに対するOSBPペプチドの滴定実験

ピーク変化の例を拡大して示してある。Q91は非線形なピークシフトを、C121はある滴定ポイントにおいて観測される4つのピークを示した。Q91は2状態モデルで説明できるが、C121の4つのピークは2状態モデルで説明できない。

本項で見てきたように、単純な2状態平衡の結合でもNMR滴定実験におけるピークの変化は多様である。それを考慮してもなお説明のつかないピーク変化が見られた場合、その結合は、結合中間体の形成や、フリーのリガンドやレセプタータンパク質の構造変化などの複雑な過程を含んでいると考えられる。そうした複雑な結合における滴定実験のピーク変化に関しては、文献[10]に詳しく記されているので参照されたい。

2. リジン側鎖に付加した¹³Cメチル基を用いたNMR解析法

タンパク質のNMR解析においては、シグナルの重なりを解消するための異種核多次元NMR測定を高感度に行う上で、安定同位体標識が必須のものとなっている。その手法として、均一²H/¹³C/¹⁵N標識法のほか、様々なアミノ酸部位選択的標識法が開発され、高分子量タンパク質を高分解能かつ高感度に解析することが可能になってきた^[12]。しかしながら、その標識法のほとんどは、大腸菌発現系を用いることを前提とするものである。糖鎖付加などの翻訳後修飾やジスルフィド結合の形成に有効な酵母発現系、あるいは昆虫細胞や哺乳細胞発現系での標識法も開発されているが、コストや発現量の問題があり、今なお改良が進められている^[13]。組換え発現系において標識体を調製することが現実的ではないタンパク質のNMR解析を行うには、タンパク質を発現・精製後に化学修飾によって同位体標識することが必要となる。筆者らは、そのような化学修飾法の1つであるリジンの還元的メチル化によって¹³Cメチル標識されたタンパク質を用いて、タンパク質間相互作用解析への応用を行った^[14]。本項では、その概要に加えて、その他の化学修飾法を用いた同位体標識例について紹介する。

化学修飾を行うには、タンパク質が安定な条件下で部位選択的な反応を起こす必要があるが、内在性のアミノ酸残基でその対象となりうるのは、主にシステインとリジンである。システインへの標識においては、その側鎖チオール基(-SH)に、トリフルオロメチル基(-CF₃)を有する誘導体を修飾し、

¹⁹F標識する方法が用いられてきた^[15]。また最近では、S-¹³Cメチル基(-S¹³CH₃)の修飾によって、メチオニンと良く似た化学構造の標識体に変換し、高分子量タンパク質複合体のNMR解析に用いられた例がある^[16]。リジンへの標識においては、還元的メチル化による¹³Cメチル標識法(図3)が用いられている^[17]。メチル化はリジン側鎖アミノ基の静電的性質に大きな影響を与えないため、アミノ基の静電的環境の変化を間接的に検出するプローブとして用いることができる。これを利用し、7回膜貫通型Gタンパク質受容体のリガンド結合状態が、結合ポケット近辺に存在する塩橋形成の変化として解析された^[18]。システインとリジン以外をターゲットとする方法としては、マンニッヒ反応を利用したチロシンおよびトリプトファン側鎖の¹³C標識法^[19]や、酵素トランスグルタミナーゼを用いた部位特異的なグルタミン側鎖の¹⁵N標識法^[20]が挙げられる。これらのうち、どのような化学修飾法を用いるかは、対象とするタンパク質のアミノ酸組成やNMR検出したい部位、そして反応中および修飾後のタンパク質の安定性による。我々は、タンパク質の構造や機能に与える影響が小さく、かつタンパク質表面を比較的万遍なく標識することができるリジンの還元的メチル化による¹³Cメチル標識法に着目し、他のタンパク質との相互作用をNMR解析する上での有用性を検証した^[14]。

手法の適用先として、ユビキチン-YUH1の系を選んだ。¹³Cメチル標識ユビキチンへのYUH1の滴定を、化学シフト摂動法により解析し、複合体結晶構造と合致する相互作用部位の同定(図4)や、等温滴定型熱量測定の結果と合致する解離定数の算出に成功した。別種のタンパク質を滴定した場合においても、妥当な相互作用部位および解離定数が決定可能であった。また、これらの解析を通して、相互作用面に近いリジン側鎖の末端に付加したメチル基のNMRシグナルは、タンパク質側鎖間の相互作用を鋭敏に反映することが示された。さらに、0.2-2 μMの¹³Cメチル標識ユビキチンに対するYUH1の相互作用が検出できたことから(図5)、リジン側鎖に導入したメチル基が非常に高い感度を

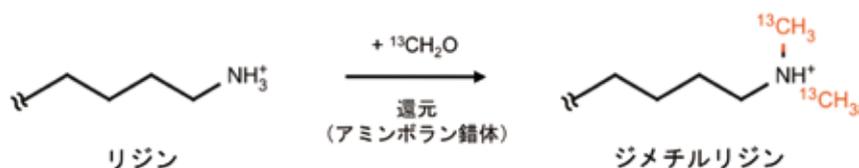


図3 リジン側鎖アミノ基の還元的メチル化による¹³Cメチル標識

有ることが示された。1つのリジンに対して2つ導入される ^{13}C メチル基は、リジン側鎖の高い運動性によって化学シフトが平均化されると、合計6つのプロトンのシグナルが1つのピークとして検出されるため、極めて強いシグナル強度を与える。一方で、2つのメチル基の化学交換がピークのプロードニングや分裂をもたらすこともあり、これはリジン側鎖の運動性の解析には有効であるが、分解能向上のためには、還元的メチル化の反応率を抑えた場合に得られるモノメチル標識体の検出が有効であるとの報告がある^[21]。

本項で紹介したような化学修飾法は、同位体標識が困難であった対象の解析を可能にするだけでなく、常磁性プローブ等の導入にも広く用いられている。また、近年開発が進んでいる細胞内タンパク質の高分解能NMR測定 (in-cell NMR) 法への応用においては、細胞膜透過性ペプチドの融合に

よってヒト細胞内へ導入したタンパク質のNMR測定法^[22]や、リガンド指向型トシル化学による内在性タンパク質の選択的 ^{19}F 標識法^[23]が報告されている。今後も、さまざまな化学修飾法の開発および応用が進むことによって、NMR解析に適した機能性タンパク質の創製、そして生細胞内でのタンパク質挙動の解析など、新たなNMR法の発展が期待される。

謝 辞

本稿では、古い歴史を持つ伝統的な技法でありながら、構造生命科学分野において新たな技術的発展を見せつつあるNMR法を幾つか紹介したが、この中で、NMR滴定実験とリジン残基 ^{13}C メチル化実験の実施例は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科および大阪大学蛋白質研究所において得られた研究成果に基づいている。

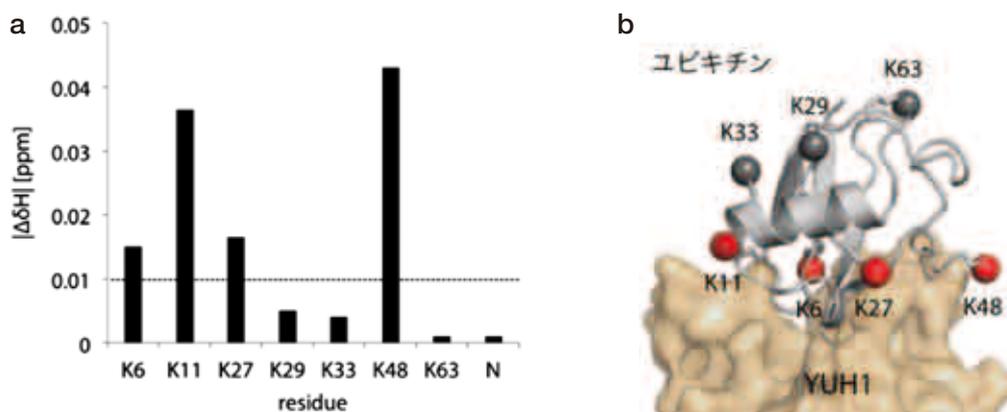


図4 (a) YUH1結合前後における ^{13}C メチル標識ユビキチンのメチル基 ^1H 化学シフト変化の絶対値。(b) ユビキチン-YUH1複合体結晶構造 (PDB ID: 1CMX) におけるユビキチンのリジン残基の位置を、 ^1H 化学シフト変化0.01 ppm以上 (red) とそれ未満 (gray) に分けて示したものの。 ^{13}C メチル標識法を用いることで、結合部位が容易に分かる。

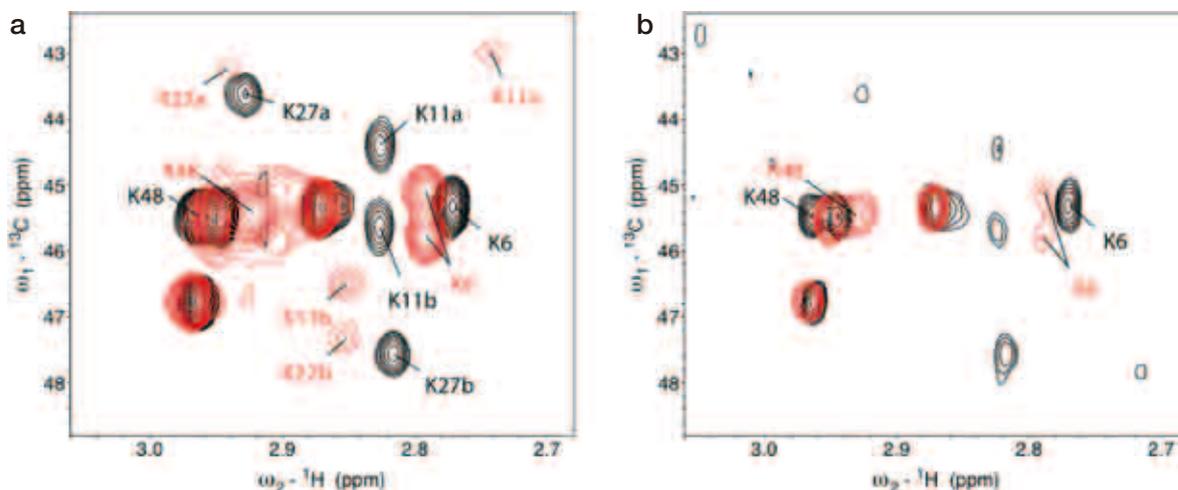


図5 (a) $2\ \mu\text{M}$ ^{13}C メチル標識ユビキチンのYUH1結合前 (black) と結合後 (red) の ^{13}C -HSQCの重ね合わせ。(b) $0.2\ \mu\text{M}$ ^{13}C メチル標識ユビキチンについての同様の重ね合わせ。 ^{13}C メチル標識法を用いることで、極めて低濃度 (μM 以下) での解析が可能になっている。

これらの成果は、共同研究者の方々をはじめ、学会等で議論していただいた皆さん、奈良先端大および蛋白研でご協力いただいた皆さんなど、数多くの方々のご助力によって得られた。心より感謝する。

参考文献

- [1] Mittag, T., Schaffhausen, B., and Günther, U.L. (2004). Tracing kinetic intermediates during ligand binding. *J Am Chem Soc* **126**, 9017-9023.
- [2] Sugase, K., Dyson, H., and Wright, P. (2007). Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature* **447**, 1021-1025.
- [3] Arai, M., Ferreon, J.C., and Wright, P.E. (2012). Quantitative analysis of multisite protein-ligand interactions by NMR: binding of intrinsically disordered p53 transactivation subdomains with the TAZ2 domain of CBP. *J Am Chem Soc* **134**, 3792-3803.
- [4] Konuma, T., Lee, Y.H., Goto, Y., and Sakurai, K. (2013). Principal component analysis of chemical shift perturbation data of a multiple-ligand-binding system for elucidation of respective binding mechanism. *Proteins* **81**, 107-118.
- [5] Medek, A., Hajduk, P., Mack, J., and Fesik, S. (2000). The use of differential chemical shifts for determining the binding site location and orientation of protein-bound ligands. *J Am Chem Soc* **122**, 1241-1242.
- [6] McCoy, M., and Wyss, D. (2000). Alignment of weakly interacting molecules to protein surfaces using simulations of chemical shift perturbations. *J Biomol NMR* **18**, 189-198.
- [7] McCoy, M., and Wyss, D. (2002). Structures of protein-protein complexes are docked using only NMR restraints from residual dipolar coupling and chemical shift perturbations. *J Am Chem Soc* **124**, 2104-2105.
- [8] Stratmann, D., Boelens, R., and Bonvin, A. (2011). Quantitative use of chemical shifts for the modeling of protein complexes. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **79**, 2662-2670.
- [9] Cavanaugh J, Fairbrother WJ, Palmer III AG, Skelton NJ (2006) Protein NMR spectroscopy: principles and practice. Academic Press, USA.
- [10] Kovrigin, E. (2012). NMR line shapes and multi-state binding equilibria. *J Biomol NMR* **53**, 257-270.
- [11] Furuita, K., Jee, J., Fukada, H., Mishima, M., and Kojima, C. (2010). Electrostatic interaction between oxysterol-binding protein and VAMP-associated protein A revealed by NMR and mutagenesis studies. *J Biol Chem* **285**, 12961-12970.
- [12] Ohki, S. Y., and Kainosho, M. (2008). Stable isotope labeling methods for protein NMR spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson.* **53**, 208-226.
- [13] Takahashi, H., and Shimada, I. (2010). Production of isotopically labeled heterologous proteins in non-*E. coli* prokaryotic and eukaryotic cells. *J. Biomol. NMR* **46**, 3-10.
- [14] Hattori, Y., Furuita, K., Ohki, I., Ikegami, T., Fukada, H., Shirakawa, M., Fujiwara, T., and Kojima, C. (2013). Utilization of lysine C-13-methylation NMR for protein-protein interaction studies. *J. Biomol. NMR* **55**, 19-31.
- [15] Gerig, J. T. (1994). Fluorine NMR of proteins. *Prog. Nucl. Magn. Reson.* **26**, 293-370.
- [16] Religa, T. L., Ruschak, A. M., Rosenzweig, R., and Kay, L. E. (2011). Site-Directed Methyl Group Labeling as an NMR Probe of Structure and Dynamics in Supramolecular Protein Systems: Applications to the Proteasome and to the ClpP Protease. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9063-9068.
- [17] Jentoft, N., and Dearborn, D. G. (1983). Protein labeling by reductive alkylation. *Methods Enzymol.* **91**, 570-579.
- [18] Bokoch, M. P., Zou, Y. Z., Rasmussen, S. G. F., Liu, C. W., Nygaard, R., Rosenbaum, D. M., Fung, J. J., Choi, H. J., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Puglisi, J. D., Weis, W. I., Pardo, L., Prosser, R. S., Mueller, L., and Kobilka, B. K. (2010). Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **463**, 108-112.
- [19] McFarland, J. M., Joshi, N. S., and Francis, M. B. (2008). Characterization of a three-component coupling reaction on proteins by isotopic labeling and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7639-7644.
- [20] Shimba, N., Yamada, N., Yokoyama, K., and Suzuki, E. (2002). Enzymatic Labeling of arbitrary proteins. *Anal. Biochem.* **301**, 123-127.
- [21] Larda, S. T., Bokoch, M. P., Evanics, F., and Prosser, R. S. (2012). Lysine methylation strategies for characterizing protein conformations by NMR. *J. Biomol. NMR* **54**, 199-209.
- [22] Inomata, K., Ohno, A., Tochio, H., Isogai, S., Tenno, T., Nakase, I., Takeuchi, T., Futaki, S., Ito, Y., Hiroaki, H., and Shirakawa, M. (2009). High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature* **458**, 106-109.
- [23] Tsukiji, S., Miyagawa, M., Takaoka, Y., Tamura, T., and Hamachi, I. (2009). Ligand-directed tosyl chemistry for protein labeling in vivo. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 341-343.



古板 恭子 (ふるいた・きょうこ)

- 2005年 筑波大学第二学群生物学類卒業
 2007年 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士前期課程修了
 2010年 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士後期課程修了
 博士(バイオサイエンス)(奈良先端科学技術大学院大学)取得
 2010年 大阪大学蛋白質研究所 特任研究員
 2013年 日本学術振興会 特別研究員 現在に至る



服部 良一 (はっとり・よしかず)

- 2009年 京都大学工学部工業化学科卒業
 2011年 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科分子生物学専攻博士前期課程修了
 2011年 大阪大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程入学 現在に至る



児嶋 長次郎 (こじま・ちようじろう)

- 1990年 大阪大学理学部化学科卒業
 1995年 大阪大学大学院理学研究科無機物理化学専攻博士前期課程修了
 1995年 大阪大学大学院理学研究科無機物理化学専攻博士後期課程修了
 博士(理学)(大阪大学)取得
 1995年 カリフォルニア大学サンフランシスコ校薬化学科 訪問博士研究員
 1998年 東京都立大学理学部化学科 CREST研究員
 2001年 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 助教授
 2002年 日本核磁気共鳴学会会員
 2010年 大阪大学蛋白質研究所 准教授 現在に至る

Gorterの失敗(中)

京都大学

寺尾 武彦

Gorterは、1940年にアムステルダム大学の物理学教授およびゼーマン研究所所長となった。32歳の若さで、P. Zeeman^[1]の後任として抜擢されたのだった。

この新しい環境で、Gorterは、常磁性緩和の研究を引き続き行う一方、NMRの検出に再挑戦する計画を立てる。1942年に、学生のL. J. F. Broerとともに、de Haasの再度の厚意で常磁性緩和の実験に使っていた装置をライデンに移送し、今回は電磁的検出を試みることにした。Gorterは、LC発振器の共振回路のコイルを静磁場中に置きその中に試料を入れておくと、磁場が共鳴点から離れていれば発振周波数は試料の影響を受けないが、共鳴点近傍では試料のラジオ波帯磁率の分散成分がコイルのインダクタンス L を変化させ、したがって発振周波数がシフトすることに気がついた。そこで、磁場を非常にゆっくり変化させて、この周波数変化 $\Delta\nu$ を検出することにした^[2]。

実験は、LiCl粉末中の ${}^7\text{Li}$ とKF粉末中の ${}^{19}\text{F}$ に対して3.7MHzの共鳴周波数で行なわれた。測定温度は、LiClに対して20K(液体水素温度)と4.2K(液体ヘリウム温度)、KFに対して20Kであった。 $\Delta\nu$ は、両者に対して4.2Kで80Hz、20Kで16Hzと見積もった。しかし、2、3日実験したが、約1Hzの測定精度を超える周波数変化は検出されず、NMRの電磁的検出の試みもまたもや失敗に終わった。Gorterは、 T_1 が長すぎて磁化が低温での平衡値よりずっと小さかったのではないかと考えた。この考えのもとで、 T_1 は1000秒以上あるだろうと推測している^[2]。

しかし、Gorterが言うように、本当に実験時間以内に磁化が平衡値に達しないほど T_1 は長かったのだろうか。それとも別に失敗の原因があったのだろうか。以下に、この実験の詳細を分析し、成否を分ける鍵は何だったのかを考察してみたい。

まず最初に、試みられた方法が適切であったかどうか検討してみよう。吸収信号は T_1 が長いと相

当弱い H_1 で飽和してしまうため、未知の信号を探すのに適した分散信号を観測することにしたのは正解だった。しかし、それを発振周波数の変化で検出するというのはあまり良い方法とは言えない。信号対雑音比の雑音に当たるのは、この場合発振周波数の揺動であるが、LC発振器の周波数は、一般に上記の $\Delta\nu$ を検出できるほどには安定していないからである。しかし、Gorterは、非常に安定な発振器を用い、測定精度は約1Hzだった、と述べている。この意外に優れた安定度のもう一つの要因は、共振回路のコイル、コンデンサ、および試料を入れた銅製の箱を液化ガス温度に冷却しているので、LCの温度変化が小さいためであろう。しかし、それでもこのような低磁場の実験で $\Delta\nu$ を検出可能になるほど大きくするには、できるだけ低温で実験しなければならない。上記の低温での $\Delta\nu$ の予測値は、1Hzの測定精度のもとでは確かに検出の可能性を感じさせるが、検討してみると飽和を省略して計算されていることが分かった。共鳴現象の理解が未熟な時代のことで仕方がないが、発振強度は特に抑制した様子もなく、 T_1 も長いので十分飽和していたものと考えられる。この場合はごく緩い条件で断熱通過が起こるので、それによる発振周波数のずれを求めるのが正しい取り扱いであろう。ただし、この場合 $\Delta\nu$ は H_1 に依存し、その計算には H_1 の値が必要となる。 H_1 の値は論文に書かれていないが、小さいが非常に安定な発振器を使用した、と書かれており、出力の大きさよりも安定性を重視したようである。1936年の論文[3]では高出力の発信器を用いて約1mTの H_1 を与えた、と書かれている。両者を考え合わせると、 H_1 の大きさは前回の1mTよりもかなり小さかったと考えられる。断熱通過による $\Delta\nu$ を計算してみると、 H_1 が1mTのときGorterの見積り約0.5倍、0.4mTでほぼ同じ、0.1mTで約2倍であった^[4]。結局、Gorterの見積りも、取り扱いは正しくなかったものの、結果的には用いた H_1 の辺りでほぼ正しい値を与えて

いたことになる。したがって、この検出法は、最大数十の信号対雑音比を与える可能性があり、凝縮系のNMRを初めて検出するという目的の達成には、他に特に大きな問題がなければ使えそうに思える。

次に検討しなければならない重要な問題は、 T_1 がNMRの検出に支障を来すほど長かったかどうかである。確かに、低温では T_1 は非常に長くなる可能性は大いにある。実は、1949年にNicolaas Bloembergenが、上記の実験で使われたLiClの試料を用いて ${}^7\text{Li}$ の T_1 の測定を行っている^[5]。Bloembergenは、Purcellの研究室でいわゆるBPP理論を構築した後、出身校であるライデン大学に戻り、1946年に同大学に異動して来ていたGorterの研究室で博士研究員となった。そこで、Gorterに頼まれて T_1 を測定したのだった。9.5MHzの静磁場で測定した結果は2.1Kで600sであった。別のLiClの試料では14Kで7s、2.1Kで90sであった。両者の T_1 の違いは試料に含まれる常磁性不純物の量によっている。使われた試料はたまたま純度が高かったのだった。しかし、Gorterが用いたLiClの ${}^7\text{Li}$ も常磁性不純物で T_1 が決まっているとし、両者の実験の温度と磁場の違いを考慮すると、Gorterの試料の T_1 は3.7MHzの磁場において、4.2Kで600sより一桁短く、20Kでは二桁短いと推定される。したがって、磁化は、Gorterの推論に反して実験時間以内に十分平衡値に達していたはずである。それでも、磁場が合っていない状態から見たことのない信号を少しずつ磁場を動かして探すには T_1 はまだ長いように思えるが、実はこの実験では T_1 はあまり短すぎてもいけない。この方法では、周波数カウンタの量子化誤差 ϵ が信号対雑音比を下げないように注意しなければならないが、 $\epsilon = \pm 1\text{Hz}$ とすると1点の測定に対して1sを要するので共鳴線を数秒かけて掃引する必要があり、最大信号を検出するにはこの掃

引時間より T_1 、 $T_1\rho$ がずっと長い必要があるからである。このことを考慮すると、上記の推定された T_1 の値はまずまず適当な値と言える。

以上の検討から、この検出法と T_1 の組み合わせで少なくとも原理的には共鳴の検出は可能と思われる。2、3日の実験中には共鳴点をときどきヒットしただろうし、そのときに何らかの小さな効果くらいは見えていても良さそうに思える。実は、論文[2]には、“測定精度を超えるジャンプは観測されなかった”、としか書かれていないが、文献[6]には、“結果は再びネガティブだった”と記した後に、“ときどき発振周波数に再現しそうな不規則な変化が見られたけれども”と付け加えられている。

この“再現しそうな不規則な変化”とは一体なんだろうか。まずは発振器の不安定性によるものと疑うべきであろう。しかし、もしそうなら共鳴点近傍でなくても見られるはずである。Gorterがそういうチェックをしていないとは考えにくく、わざわざ書いているところを見ると共鳴点近傍で見たのであろう。はたして、Gorterの見たものは信号だったのであろうか。信号だったとすれば、それは、なぜ再現性に乏しい不規則性を示したのだろうか。これらの疑問に対する著者の見解を以下に示したい。

先ず、Gorterの実験において、様々なパラメータ(T_1 、 $T_1\rho$ 、線幅、 H_1)と磁場掃引速度の組み合わせによって様々なことが起こり得ることを指摘しておきたい。例えば、非共鳴点でスピン系が熱平衡状態にあったとして磁場を共鳴点まで掃引するときには断熱通過の条件が満たされていれば、最大の信号が観測される。条件によっては信号は小さかったり、ゼロであったり、負であったりする。信号が見えたと思って磁場を戻してみると、消失している場合もあり得る。上記のパラメータを固定しても、磁場の掃引速度次第でこれらの様々なことが起こりうる。

では、実際には何が起きていたのだろうか。キーワードは手動による磁場掃引である。磁場掃引を回路的に行っても掃引速度がいくらかとも書かれていないので、共鳴を探すために電磁石の電源の電流値を設定するダイヤルを手で回すことによって掃引したものと判断できる。手動で磁場を掃引すると掃引速度にムラが生じる(特にダイヤルを持ち替えるとき)ので、掃引ごとに信号の大きさは異なるであろうし、消失することもある。さらに、ダイヤルを回しても磁場は直ちに追従せず数秒以上の長い時定数でジワーッと変化すること、およびUターンし



てダイヤルを元の位置に戻しても電磁石の鉄心のヒステリシスのため元の磁場とは異なることのために頭の中で想定している磁場と実際に加わっている磁場との間にはかなりのギャップがその時々で生じる。このことと信号の大きさが手動による掃引のために様々なることを組み合わせると、きわめて複雑な現象が観測されることになる。実験者から見れば、共鳴磁場付近で信号かどうか分からないものが、感覚的にはいろんな磁場値で大きさもランダムに現れたり、あるいは現れなかったり、負になったり、現れたと思って戻ってみれば再現しなかったり、つかみ所がない。これが“再現しそうな不規則な変化”の正体ではないだろうか。

もし上記の推論が正しいとすれば、実際にはGorterはNMR信号を見ていたと言えるが、これでは本人も信号をとらえたという確信はもてないだろうし、思いを残しながらも、論文では、信号は観測されなかった、と結論せざるを得なかったのだろう。

では、Gorterが見たものが信号だったとして、NMR検出に成功した、と科学的に明確に結論するには何が必要だったのであろうか。容易には説明し難い見かけ上奇妙な観測結果に導いた原因は、手動による磁場掃引が実験条件に不明瞭さを持ち込んでしまったことにあるのは確かであろう。リニアに磁場を掃引させる回路を作成し、掃引速度を変えては実験していれば成功していた可能性があったのではないか。あるいは、今回の実験は約0.22 Tの

低磁場で行われたが、磁場を上げてみるのも有効だっただろう。Gorterも導いているように $\Delta\omega$ は磁場の強さの2乗に比例しているから、数倍に上げれば^[7] $\Delta\omega$ は飛躍的に大きくなり、さすがにGorterも信号であることを確信し、一見不規則に見える $\Delta\omega$ の振る舞いの中から規則性を見出す努力をしていたのではないだろうか。

とにかく、もう少し粘れなかったのだろうか。もうあと一歩のところまで詰め寄ったのにあまりにも惜しい。しかし、当時は戦争中で、しかもオランダはドイツに占領されていて、きわめて厳しい状況下にあった。次第にライデンとの間を行き来するのも儘ならなくなった上に、ライデンにスペースも無くなり、GorterはNMRの実験の続行を断念した^[6]。

(次号へ続く)

文献および注釈

- [1] オランダの物理学者。1902年に、ゼーマン効果の発見によりノーベル物理学賞を受賞した。
- [2] Gorter, C. J., and Broer L. J. F. (1942) *Physica*, 9, 591.
- [3] Gorter, C. J. (1936) *Physica*, 3, 995.
- [4] 試料の量などが不明であるため $\Delta\omega$ を数値的に求めることができず、両者の比を求めた。
- [5] Bloembergen, N. (1941) *Physica*, 15, 405.
- [6] Gorter, C. J. (1967) "Bad luck in attempts to make scientific discoveries", *Phys. Today*, 20, 76.
- [7] 磁場の最高強度は、論文に書かれていないが、前回の実験で使われた電磁石と同じものを使ったとすれば、1.4 Tである。今回1 Tで、ある試みを行っているので、最高強度は1 T以上であることは確かである。



寺尾 武彦 (てらお・たけひこ)

1966年、京都大学理学部物理学科卒業。1971年、京都大学大学院理学研究科物理学第一専攻博士課程単位取得退学。同年、京都産業大学理学部講師。1973年、京都大学理学博士。1975年、京都大学理学部(化学科)講師。1983年、同助教授。1989年、同教授。1987年、カリフォルニア大学バークレー校招聘教授。1995年、京都大学大学院理学研究科教授。2005年、定年退職、京都大学名誉教授。2002年、日本核磁気共鳴学会会員(2002-2008 同学会理事、2007-2008 同学会副会長)。2008年、ISMAR Fellow。2011年、日本核磁気共鳴学会名誉会員。

若手研究者渡航費助成金について

NMR学会では、NMR研究を行う若手研究者が海外で行われる国際会議（学会・シンポジウム等）で自分の研究成果を発表する場合、あるいはNMR Practical course等の測定・解析技術の実践を学ぶ学術集会へ出席する場合の渡航費を補助します。NMR関連会議等の他、生物・化学・物理系、材料・高分子系など基礎科学から応用科学の海外国際会議等のNMR関連研究発表への渡航助成についても広く募集します。

◆ 応募資格

- ・ 応募時に会費納入済みの日本核磁気共鳴学会会員であり、35歳以下であること。
- ・ 大学院生、博士研究員、およびそれに準ずる者。
- ・ 他の旅費補助金を受けていないこと（本助成金で足りない部分を研究室等で補填するものは可とする）。
- ・ 所属する研究室において選考を経た後、同じ国際会議に対して1名のみ応募すること。

◆ 応募方法（詳細は学会ホームページ（<http://www.nmrj.jp/index.php>）をご覧ください。）

1. 応募書類

- ・ 若手研究者渡航費助成金応募申請書（様式指定、推薦理由、応募理由を記入のこと）
- ・ 略歴（様式自由）
- ・ 学会発表、論文リスト（様式自由）
- ・ 参加予定の国際会議の発表要旨
- ・ 以上の書類を電子メールに添付（PDF形式あるいはWord形式）して送付すること。

2. 応募期間

国際会議の開催時期に応じて、年に3回募集を行う。

- (A) 7－10月開催の学会は4月10日－5月31日を募集期間とする。
- (B) 11－2月開催の学会は8月1日－9月15日を募集期間とする。
- (C) 3－6月開催の学会は前年の12月1日－1月15日を募集期間とする。

3. 応募書類送付先

若手研究者渡航費助成金選考委員長 高橋栄夫 (hid@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp)

◆ 選考方法

若手研究者渡航費助成金選考委員会において、応募締切日までに受け付けた応募者からA、B、C各期に若干名の援助金受領者を選考し、各応募締切日から1カ月以内に、その結果を会長名で本人宛て通知します。また受領者はNMR討論会において賞状をもって顕彰します。採択件数は年間5名程度とします。

◆ 助成額

助成額：1件あたり10万円 助成金の贈呈は参加報告書（下記参照）提出後となります。

◆ 報告の義務

援助金受領者は参加した国際会議等の参加報告書（書式はNMRニュースレターの投稿規定に従うこと）を帰国後1ヶ月以内に選考委員長宛てに提出してください。NMRニュースレター、機関誌および学会ホームページで参加報告書を公開します。

◆ 過去の本助成金採択者

平成24年3月－6月開催の学会に参加した助成金採択者

玉田大輝 筑波大学大学院数理物質科学研究科 博士後期課程1年 ISMRM2012に参加

平成24年7月－10月開催の学会に参加した助成金採択者

小松功典 横浜市立大学大学院 博士前期課程2年 EUROMAR2012に参加

植草義徳 自然科学研究機構 博士研究員 ICS2012に参加

小笠広起 東京大学大学院薬学系研究科 博士後期課程2年 ICMRBS2012に参加

小沼 剛 サントリー生物有機化学研究所 博士研究員 ICMRBS2012に参加

北沢創一郎 立命館大学大学院理工学研究科 博士後期課程2年 ICMRBS2012に参加

宮佐亮太 横浜国立大学大学院 博士前期課程2年 ICRP2012に参加

平成25年7月－10月開催の学会に参加した助成金採択者

田中 孝 首都大学東京大学院 博士前期課程2年 5th APNMR Symposiumに参加

小倉立己 横浜市立大学大学院 博士後期課程2年 5th APNMR Symposiumに参加

採択者の海外学会参加報告書：昨年度前期開催学会分は機関誌Vol.3に掲載、昨年度後期開催学会分は次ページより掲載されています。今年度採択者の報告書は日程の関係上、機関誌Vol.5に掲載いたします。

若手研究者渡航費助成金選考委員 高橋栄夫、内藤 晶

若手研究者渡航費助成金 15th ICRP 参加報告書

横浜国立大学大学院工学府 機能発現工学専攻
構造生命科学研究室 博士課程前期2年

宮佐 亮太

この度、平成24年度第1回若手研究者渡航費助成の支援を受け、9月30日～10月5日にかけてアスコナ(スイス)で開催された15th International Conference on Retinal Proteins (15th ICRP)に参加しました。15th ICRPではレチナルタンパク質に関する口頭発表60題、ポスター発表62題が行われ、NMRを用いた研究の発表も数多く行われました。アスコナはスイス国内のイタリア語圏に属し、マジョーレ湖畔にある自然豊かなリゾート地でした。学会会場はアスコナにあるモンテ・ヴェリタと

いう丘にあり、会場からの眺望は大変美しいものでした。学会が行われた期間は少し肌寒い気温でしたが、快晴の日が多く、熱気に包まれたポスター会場では丁度よい気候でした。

この国際会議の研究対象は7本膜貫通型-光受容膜タンパク質のレチナルタンパク質です。このタンパク質は様々な手法を用いて研究されており、溶液NMRおよび固体NMRを利用した研究も注目され、興味深いデータも多く発表されて活発な議論が成されました。具体的には、Steven Smith先生 (Stony Brook University, New York) の ^{13}C 安定同位体標識したロドプシンの光中間体をDARR法によって ^{13}C - ^{13}C の距離測定を行い、光活性状態の構造変化を巧みに示されていました。またAntoine Gautier先生 (Paul Scherre Institute, Switzerland) の可溶化した膜タンパク質について溶液NMRを用いて立体構造を決定されていました。Leonid Brown先生 (University of Guelph, Canada) は主に固体NMRを用いてアナベナ由来センサーロドプシンを構造解析し、結晶構造との違いをはっきりと示されました。さらに常磁性緩和の手法を利用



写真1 ポスター発表の様子



写真2 15th ICRP会場にて記念撮影

し、このタンパク質が細胞膜中で三量体を形成していることも明らかにされてきました。最後に内藤晶先生（横浜国立大学）がIn-situ 光照射固体NMRを用いたフォボロドプシンの光活性状態の特徴について、レチナル異性化やそれに関わるタンパク質のNMR信号を詳細に解析することで示されていました。

私は“Conformational change in M-intermediate of D96N-bR as studied by in-situ photo-irradiated solid-state NMR”というタイトルでポスター発表を行いました。この発表では、固体NMRに連続光照射システムを組み込み、光駆動型プロトンポンプ活性を持つ膜タンパク質であるバクテリオロドプシン

(bR) の変異体における光中間体を ^{15}N CP-MAS法を用いて捕捉し、その補足した光中間体の吸収する波長の励起光を用いて光中間体から基底状態へと遷移させた結果を発表しました。この発表を通して、NMRを用いた研究者の方や異なる分野の方、そして海外の先生方にも発表を聞いて頂き、様々な視点からの御意見を頂くことができ、研究結果に対するより広い視点からの考察が得られ、今後の研究にも新たな課題が発見でき、充実した発表とすることが出来ました。

最後になりますが、本学会への参加をご支援頂きました日本核磁気共鳴学会関係者の皆様に深く感謝致します。

高速サンプリングの展開

アジレント・テクノロジー株式会社

芦田 淳、栗田 順一

1. 初めに

現在あまたある分析法の中でも、高分解能NMRは特に有用な手法として広く用いられている。これは、高分解能NMRでは全体構造だけではなく局所構造の詳細な情報も得られるということに起因しているからであると思われる。たとえばかつては分解能が溶液NMRに比べて格段に落ちると言われていた固体NMRでも、近年では数十kDaの蛋白質の多次元NMRスペクトルが非常に分解能良く得られ、個々の残基の情報がより精度よく取得できるようになってきている。

しかし、NMRの最大の欠点は、感度が他の分析手法と比較して桁外れに低い点である。たとえば測定に必要な最小量は、ESRでは 10^{16} mol、MSでは 10^{19} mol.程度なのに対して、NMRでは 10^9 mol.程度と言われている^[1]。このことは、他の分析手法と比較してより大量の試料を必要とするか、あるいは試料量が限られている場合には測定が長時間にわたるということを意味する。特に多次元NMR測定では、通常の測定法では t_1 次元や t_2 次元の展開時間でのFIDを得るために数十～数百のサンプリングポイント数が必要であり、そのためさらに積算時間がかさんでしまう。

そのためNMRの発展においては、感度の向上、測定時間の短縮化が何よりも重要視されてき

た。ハードウェアにおける超高磁場磁石や極低温プローブの開発はその最たる例であろう。また、分光計の高性能化によって、様々な強度・位相・周波数変調パルスを照射できるようになり、Single Scan法^[2]やHadamard法^[3-6]などの従来の多次元NMR法とはコンセプトの異なる測定方法も発表されている。さらに最近ではDNP (Dynamic Nuclear Polarization) など電子スピンの磁化を核スピンの移動できるように試料系に手を加えて感度を数百～数万倍に向上させる手法も開発が進み、対象となる試料はまだ限られるもののがかなり多くの応用例が発表されるようになってきている。

一方ソフトウェア側では、コンピュータの飛躍的な発展によりデータ処理の高速化は日進月歩であり、それに伴って特に多次元NMR測定において、従来のデータ処理法とは異なった手法を用いてより高速な時系列データから周波数系列データへの変換が行われるようになってきた。ここではそれらの手法の中でここ数年広く用いられるようになってきているNUS (Non-Uniform Sampling: 非線形サンプリング) と呼ばれる手法について紹介する。

2. 多次元データ処理

話を簡略化するため、ここでは基本的に二次元NMR法を例にとり説明するが、三次元以上の多

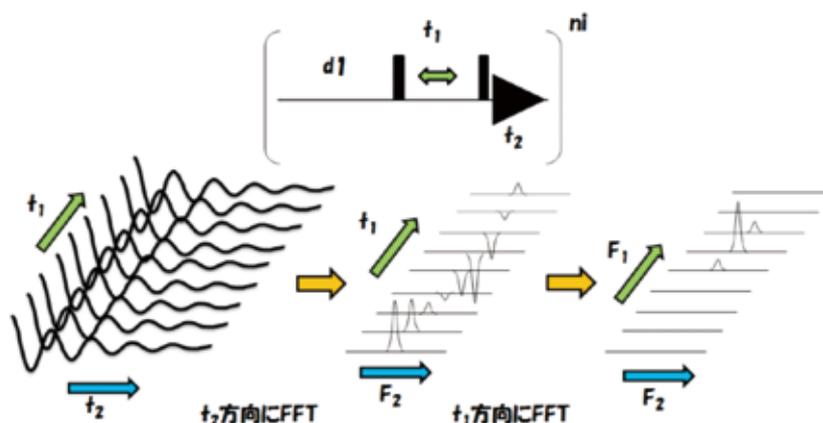


図1 通常の二次元NMRの測定および処理法

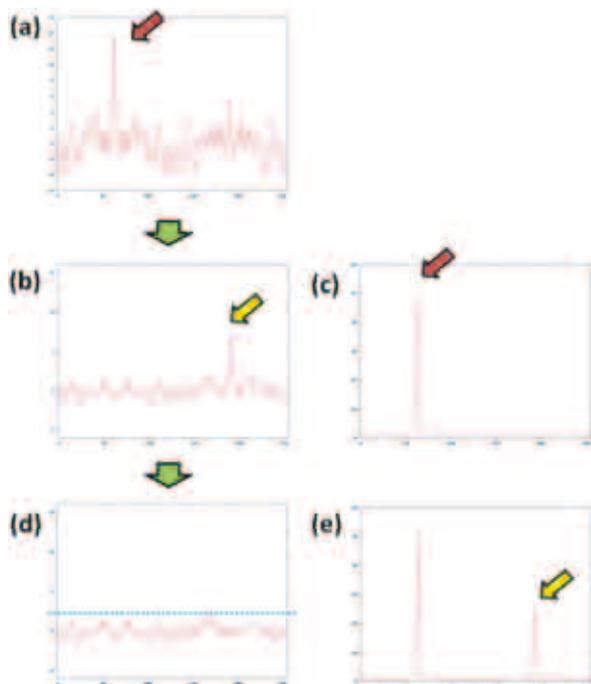


図2 CLEAN処理の概略図

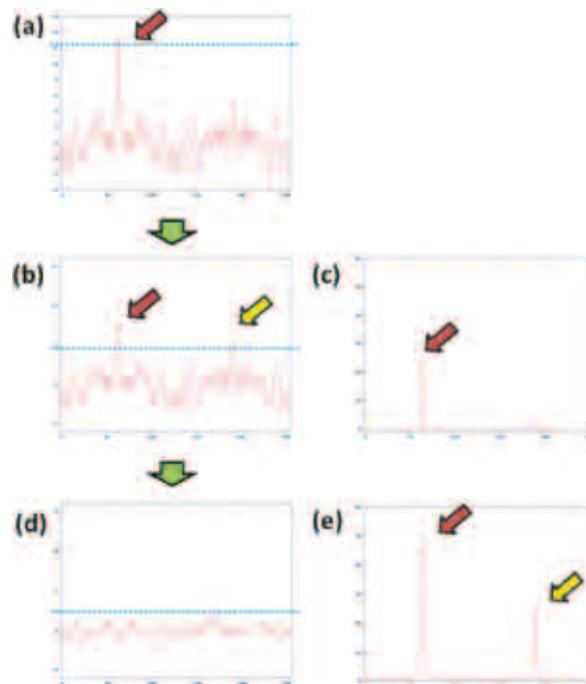


図3 IST処理の概略図

次元NMRにおいても同様の考え方で理解できる。従来の二次元NMRの測定および処理は図1の手順で行われる。まず t_2 軸方向に高速フーリエ変換 (FFT: Fast Fourier Transform) を行い、続いて t_1 軸方向にFFTを行う。この際に t_1 軸方向にFFTアルゴリズムを使うには、ナイキスト周波数のサンプリング間隔で t_1 を増加させたFIDを N 個 (位相検波の場合は実数部・虚数部が必要なのでさらにその2倍) 測定しなければならない。このときのサンプリングポイント数 N は、展開時間におけるFIDの持続時間を考慮して決定する必要がある。すなわち $t_1 \times N \ll$ (展開時間におけるFIDの持続時間) だと F_1 軸方向のフーリエ変換を行った際にrippleやwiggleと呼ばれる小振動の波がピークの裾野に生じることになる。従って、より高分解能のスペクトルを綺麗に得るためには、より多くの N が必要となり、それだけ測定に要する時間も増大することになる。これが三次元以上のより多次元NMRになると、必要なFIDの個数は $N \times M \dots$ となるので、測定にかかる時間が指数関数的に増えていくことは容易に予想がつくであろう。

3. Non-Uniform Sampling (NUS)

前章で述べたように、従来の二次元NMR法では、間接観測軸の観測幅を決定するとサンプリング間隔は自動的にその逆数で設定され、必要とされる展開時間からサンプリングポイント数も自動的に決定される。そこでこの t_1 次元でのサンプリング

ポイント数 N を間引いて測定し、より短時間で二次元スペクトルを取得するための方法が考案された。ただし間引き方に周期性があるとそれに同期したartifactを生じるので、サンプリングポイントの選び方はランダムでなければならない。これが“Non-Uniform”の名前の由来である。ところがここで時系列データを周波数系列データに変換するためにFFTアルゴリズムを用いるには等間隔 (uniform) でのデータポイントが必要なので、生データのままでFFTアルゴリズムを使用することができない。そこでNUSでは、まず間引いたところをゼロで補完して等間隔FIDデータを作成してFFTを行う。次に得られた周波数系列データの解析処理を行い、本来あるべきスペクトルとFIDを構築する。この周波数解析処理には様々な処理法 (NUFT、MFT、MEM、QME、MDD、CLEAN、IST、IRLSなど) が提案されているが、ここではこの中から筆者の使用しているソフトウェアに搭載されているCLEANとISTについて述べる。

CLEANアルゴリズムは、1974年にHogbomによって開発されたdeconvolutionの手法である^[7-9]。そもそもは電波天文学で、サンプリングが不完全な場合に畳み込みから真の信号を推定するために開発された方法であるが、現在では様々な分野で広く用いられている。NMRでは、FIDで間引いた部分にゼロフィリングした時系列データをFFTして得られた周波数系列データから、仮定シグナル (CLEAN components) の減算を実行し、残余スペ

クトルがなくなるように間引いたFIDから補完したFIDを得るというアルゴリズムが組み込まれている。

図2にCLEAN処理の概略を示す。まず元スペクトル(a)の一番高いピーク(赤矢印)に注目する。そこにシグナルがあると仮定し(CLEAN Component)、元スペクトルからサンプリングの周波数特性とCLEAN component(c)を乗算したものを引いて差スペクトル(b)を得る。次にこの差スペクトルの一番高いピーク(黄矢印)に注目して、先ほどと同じ操作を行う(dとe)。この操作を残渣スペクトルの最大ピークが最初に定めた閾値((d)の青点線)を下回るまで繰り返すことで、最終的に補完を完了する。実際のイタレーション回数はシグナルの個数に応じて数十~百回程度になる。

IST (Iterative Soft Threshold)^[10,11]は、CLEANと同様に得た周波数系列データに対して、閾値を徐々に下げていって仮定シグナルを選択して減算していく手法である。図3にIST処理の概略を示す。まず元スペクトル(a)に対して閾値(青点線)を定め、その閾値よりも高いピークを仮定シグナルとして次の閾値との差成分をシグナル成分とする(c)。次に閾値を少し下げ同様の操作を行う。閾値を超えるピークが複数あれば(b)、その全てのピークに対して操作を行う(e)。この操作を閾値が最初に定めた下限を下回る(d)まで繰り返すことで、最終的に補完を完了する。

この2つの手法はアルゴリズムが単純なため、MEM

(Maximum Entropy Method)よりもコンピュータ上で速く実行できる点が長所である。CLEANとISTを比較すると、処理時間はCLEANの方が一般的には短い、感度が低い場合に閾値をあまり低くすると間違った成分を取り出しやすいという欠点がある。

4. 応用例

図4に、[U-¹⁵N]Ubiquitinの¹⁵N-HSQCスペクトルを示す。右が従来法で測定したもので、左がNUSでサンプリングポイント数を約1/3に減じて測定したものである。だいたい1/3~1/5程度までポイント数を減らしても問題ないスペクトルが得られるようなので、二次元測定だとおよそ5倍の、三次元測定では25倍の高速化が図られることになる。つまり通常測定では1日かかる三次元測定を、NUSを適用するとわずか1時間でを行うことができることになる。

本来、展開時間のサンプリングポイント数Nは、間接次元軸でのデジタル分解能を決定するパラメータである。これを1/3にしても同じ分解能が得られるということは、逆に展開時間を3倍に設定してサンプリングポイントを間引いてN個だけ測定すれば3倍のデジタル分解能を得ることができることを意味する。図5にDNAオリゴマーの³¹P-Band Selective HSQCスペクトルを示す。

右が従来法で測定したもので、左がNUSで展開

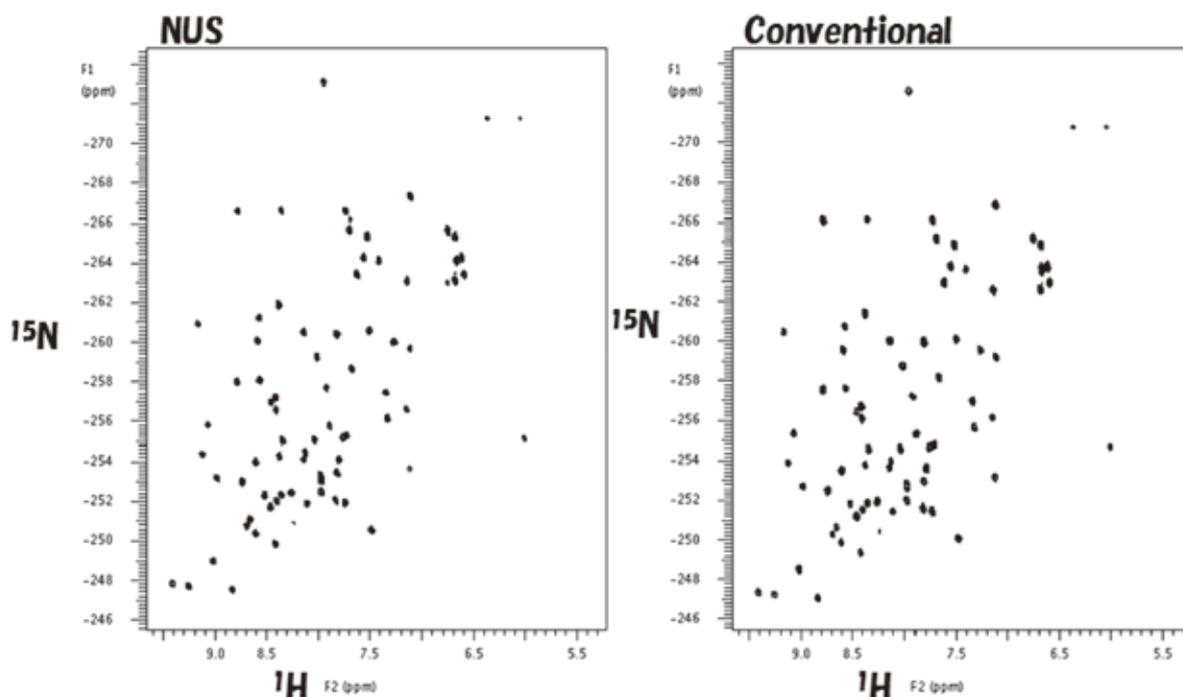


図4 [U-¹⁵N] Ubiquitinの¹⁵N-HSQCスペクトル
(左)NUS。N = 48。(右)通常測定。N = 128。

時間を従来法の3倍長くとったもののサンプリングポイント数を従来法と同一にして(つまり約1/3に間引いて)測定したものである。 ^{31}P 軸の分解能がNUSだと従来法と比較して向上していることが、**図5**の左上部を拡大した**図6**から読み取れる。このようにNUSは、高速化のみならず高分解能化にも非常に強力な手段であることがわかる。

以上溶液試料における応用例を2つ示したが、本

手法の適用対象は溶液・固体を問わない。現在のところ、固体試料に適用された文献はまだ少ない^[12, 13]が、これは固体NMRでは t_2 が短いことが多くて元々展開時間がそれほど長くする必要がないため、二次元NMRであればそれほどのメリットがないからではないかと思われる。しかし、今後試料回転速度の高速化に伴って、溶液NMRと同様に ^1H 観測の多次元NMRの適用範囲が広がってくると、より

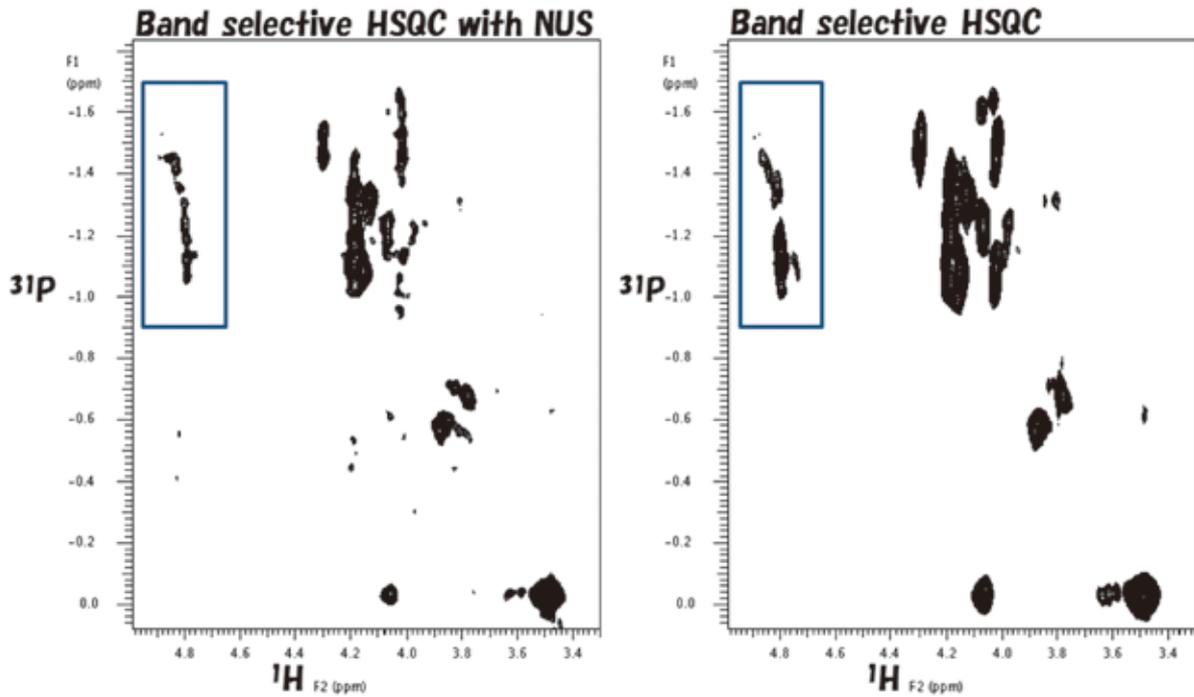


図5 DNAオリゴマーの ^{31}P -Band Selective HSQCスペクトル
(左)NUS。N = 128(384ポイントから間引き)。 (右) 通常測定。N = 128。

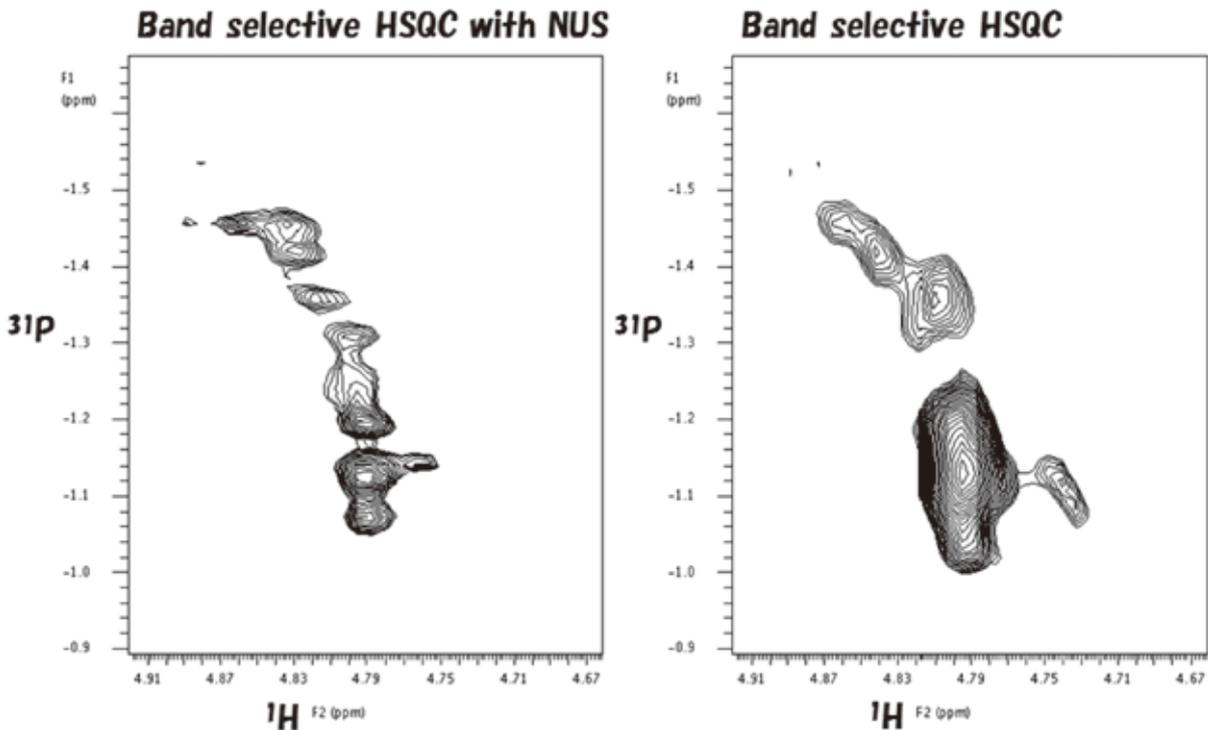


図6 図5の左上部分を拡大

長い展開時間が必要であったり、間接次元でのサンプリング間隔が短くなったりして必要なサンプリングポイント数が増えたりすることにより、固体試料においてもNUSの適用範囲が広がってくるものと期待される。

図7に固体インドメタシンのIndirect観測 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HETCOR二次元スペクトルを示す^[14]。右が通常のサンプリングポイントが128個の測定によるもので、左がNUSで1/4の32個のサンプリングポイントによるものである。通常測定では32時間かかっていた積算時間を1/4の8時間まで短縮することができた。

図8に固体 $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ フェニルアラニンの ^{13}C -INADEQUATEスペクトルを示す。 ^{13}C -INADEQUATEは、最も感度の低い二次元測定法の一つであるが、NUSを活用することで現実的な測定時間でデータを得ることが可能であることが示された。

5. 終わりに

高速サンプリングの手法は、次元数が増えるほ

ど指数関数的に効力が上がるが、二次元測定でもここで示したように数倍の時間短縮効果や分解能向上効果がある。データ処理にCLEANやISTなどのアルゴリズムを内包したソフトウェアが必要であるが、Single Scan NMRのような特殊な測定法とは異なり、かなり多くの種類の多次元NMRパルス系列に適用できる。現に筆者の使用している弊社の最新のNMR制御用ソフトウェアでは、ほぼ全ての多次元NMRパルス系列は高速サンプリング対応になっており、ボタンをクリックするだけでNUS測定を選択することができる仕様になっている(図9)。

多次元NMRはNUSで測定するのが標準仕様になるのもそう遠くはなく、逆にナイキスト周波数でサンプリングを行うことがオプションになるような時代が来るかもしれない。

【参考文献】

- [1] Webb, A. G. (1967) Radiofrequency microcoils in magnetic resonance. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **31**, 1-42.

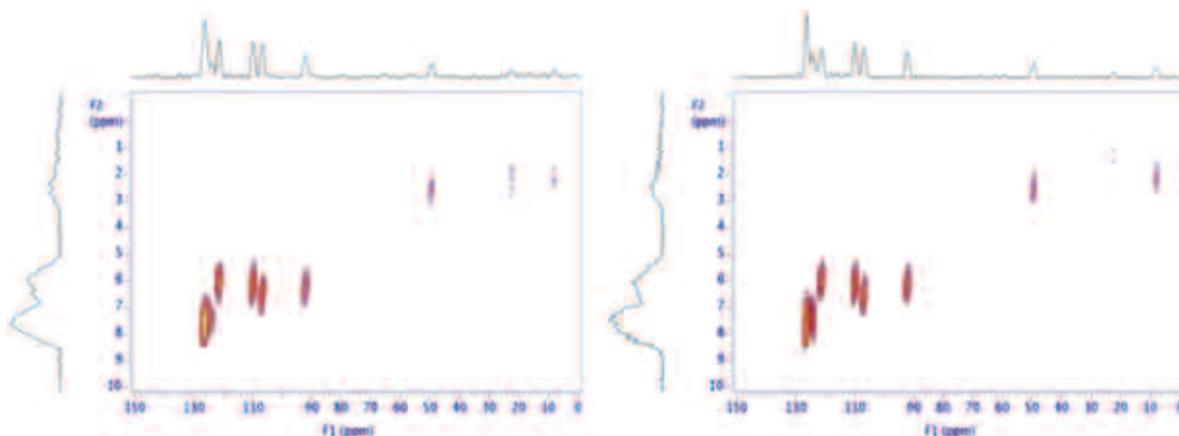


図7 インドメタシンのIndirect $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HETCOR スペクトル
試料量は1mg。試料回転速度は60kHz。(左)NUS。N = 32。(右) 通常測定。N = 128

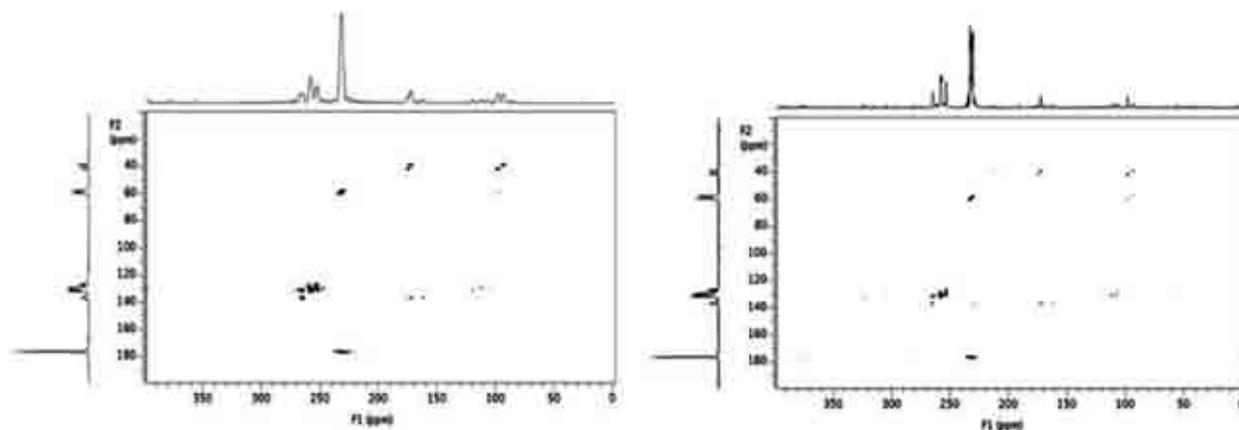


図8 $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ フェニルアラニンの ^{13}C -INADEQUATE スペクトル
(左)NUS。N = 16で測定時間は11時間。(右) 通常測定。N = 128で測定時間は88時間

- [2] Frydman, L., Scherf, T. and Lupulescu, A. (2002) The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15858-15862.
- [3] Ashida, J., Nakai, T., and Terao, T. (1990) 1D NMR separation of overlapping powder patterns by selective rf irradiation and switching-angle-spinning. *Chem. Phys. Lett.*, **168**, 523-528.
- [4] Kupče, Ě. and Freeman, R. (2003) Fast multi-dimensional NMR of proteins. *J. Biomol. NMR*, **25**, 349-354.
- [5] Ashida, J., Amoureux, J. P. and Kupče, Ě. (2006) Hadamard NMR spectroscopy in solids., *J. Magn. Reson.*, **179**, 129-135.
- [6] 芦田 淳 (2011) 広がるNMRの世界. pp154-157, コロナ社.
- [7] Högbom, J. A. (1974) Aperture synthesis with a non-regular distribution of interferometer baselines. *Astron Astrophys. Suppl.*, **15**, 417-426.
- [8] Roberts, D. H., Lehar, J. and Dreher, J. W. (1987) Time series analysis with CLEAN: I. Derivation of a spectrum. *Astron. J.*, **93**, 968-989.
- [9] Baisch, S. and Bokelmann, G. H. R. (1999) Spectral analysis with incomplete time series: an example from seismology. *Computers & Geosci.*, **25**, 739-750.
- [10] Hyberts, S., Milbradt, A., Wagner, A., Arthanari, H. and Wagner, G. (2012) Application of iterative soft thresholding for fast reconstruction of NMR data non-uniformly sampled with multidimensional poisson gap scheduling. *J. Biomol. NMR*, **52**, 315-27.
- [11] I. Dori, Eurasip (2007) Fast I1 minimization by iterative thresholding for multidimensional NMR spectroscopy. *J. Adv. SignalProcess*, 1-10.
- [12] Paramasivam, S., Suiter, C. L., Hou, G., Sun, S., Palmer, M., C. Hoch, J. C., Rovnyak, D. and Polenova T. (2012) Enhanced sensitivity by nonuniform sampling enables multidimensional MAS NMR spectroscopy of protein assemblies. *J. Phys. Chem. B*, **116**, 7416-7427.
- [13] Sun, S., Yan, S., Guo, C., Li, M., Hoch, J. C., Williams, J. C. and Polenova T. (2012) A timesaving strategy for MAS NMR spectroscopy by combining non-uniform sampling and paramagnetic relaxation assisted condensed data collection. *J. Phys. Chem. B*, **116**, 13585-13596.
- [14] Ashida, J., Kurita, J. and Kupče, Ě. (2011) 第50回 NMR 討論会要旨集 pp.448-449, 横浜.; (2012) The 51st ENC, Miami, FL.

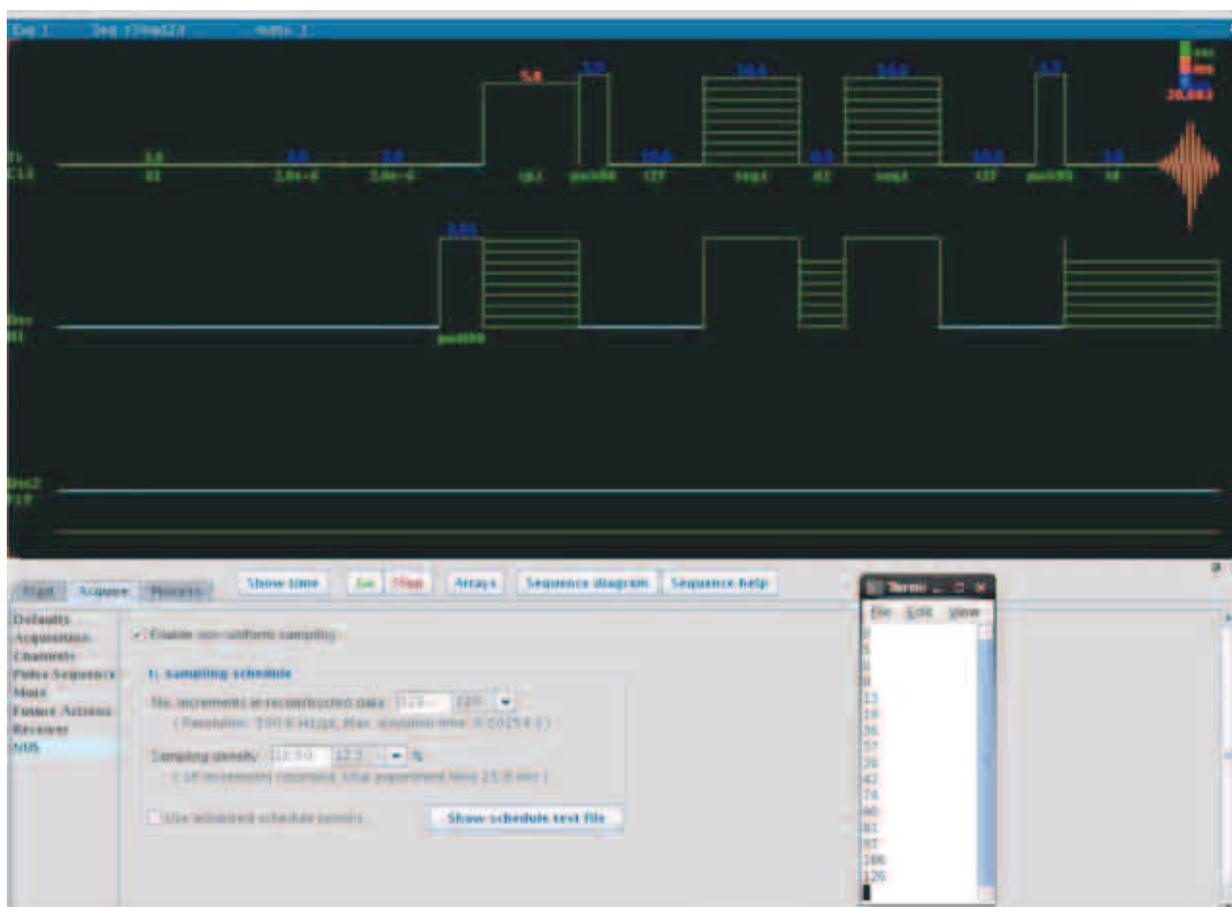


図9 弊社ソフトウェアにおける固体INADEQUATE測定時のパルス系列のグラフィック表示とNUSパラメータ設定パネル

パネルの左上の“Enable non-uniform sampling”に✓を入れるだけで、NUS測定を行うことができる。



芦田 淳 (あしだ・じゅん)

1992年3月 京都大学大学院理学研究科博士課程 単位取得認定退学
 1994年4月 バリアンジャパンリミテッド入社
 2002年 日本核磁気共鳴学会会員
 2003年3月 東京農工大学大学院工学研究科博士後期課程修了 博士(工学)取得
 2010年11月 会社統合によりアジレント・テクノロジー株式会社転籍(現職)
 2012年4月 高分子学会NMR研究会運営委員長(2014年3月まで)



栗田 順一 (くりた・じゅんいち)

2003年3月 北陸先端科学技術大学院大学材料科学専攻博士課程 単位取得認定退学
 2003年4月 バリアンジャパンリミテッド入社
 2003年6月 博士(材料)取得
 2010年11月 会社統合によりアジレント・テクノロジー株式会社転籍(現職)

高磁場 DNP 装置の開発

大阪大学蛋白質研究所

藤原 敏道

1. 高磁場 DNP とは

NMRが高い分解能と感度を発揮するのは高磁場においてである。この高磁場において、主に極低温固体状態であるが、実用性の高い多次元高分解能固体NMR法と両立して汎用的に ^1H や ^{13}C 等のNMR感度を100倍以上向上させる方法として、高磁場DNP (Dynamic Nuclear Polarization、動的核分極) は注目されている^[1]。低温による効果も考慮すると、室温の固体NMRに比べて1000倍以上の分極増大をこの方法で行える。これまでも、光ポンピングやパラ水素などによる超偏極法や、MRFM (Magnetic resonance force microscopy) など高感度な検出法が知られているが、汎用的に高分解能NMRの感度を向上させる方法にはなっていない。また、磁石磁場を強くすることは高感度化の常道であるが、10年以内に高分解能NMR磁石の磁場を2倍にすることは困難である。

DNPとは、電子スピンの非平衡な分極状態を核スピンの分極の変化として検出する方法である。この電子スピンの緩和と核スピンの緩和で生じる現象は、1953年にオーバーハウザーにより金属の自由電子スピンの緩和と核スピンの緩和について理論的に予測され、ほどなく実験的にも実証された。この現象は、オーバーハウザー効果として知られており、DNPの一種である。核スピンの緩和と核スピンの緩和の間でも同様な現象が生じて、これは核オーバーハウザー増大 (NOE: Nuclear Overhauser Enhancement) と呼ばれ、NMR研究者にはなじみがある。

DNPやNOEの効果の大きさは、相互作用する両スピンの共鳴周波数の比で決まってくる。 ^{13}C と ^1H のNOEでは、 ^{13}C に比べて4倍大きい共鳴周波数を持つ ^1H の遷移に関する分布を飽和することで、 ^{13}C の熱平衡分極を数倍大きくすることができる。この異種核間の効果は、 ^{13}C -NMRを高感度に測定することに利用されている。同様に電子スピンの緩和と ^1H のDNPについては、 ^1H に比べて約660倍大きな共鳴周波数を持つ電子スピン遷移を飽和させることで、

^1H の熱平衡分極を数百倍大きくすることができる。この分極増大によるNMR感度増大が、NMRにとっては有益なDNPの応用である。

DNPの原理が60年ほど前に提唱されているにもかかわらず、ようやく最近、高磁場DNPの実験ができるようになってきた。これは、高磁場DNPを行う上での実験技術上の難しさが克服されつつあること、また、高磁場において100倍以上の高感度化を実現できることが実験的に実証されたことによる。理論的には、高磁場になると、電子スピンと核スピンの相互作用である超微細結合は相対的に弱くなるので、顕著なDNP効果は固体状態で生じないと考えられていたが、これは回避できることも明らかになった。この技術レポートでは、これら高磁場DNPを可能にした実験技術について述べる。

2. 高磁場 DNP の要素技術

高磁場DNP法を行うためには、いくつかの新しい実験技術を取り込む必要がある。それは、(1) 高磁場で電子スピンを共鳴させる遠赤外領域の電磁波を作り出し試料に照射する技術、(2) 電子スピンの緩和を抑えて核スピン分極を効率的に増大させるために、極低温で高分解能固体NMRを行う技術、(3) 高磁場で核ゼーマン分裂が大きくなり、DNP効率が低下することを回避するラジカル試料技術などである。以下では、これらについて述べる。

2.1. テラヘルツ波、光源、伝送系

2.1.1. 光源

くり返し測定や積算を行う多次元NMRなどの初期磁化を効率的にDNP法で作りに出すために、高磁場で電子スピンを電磁波で共鳴させる。 ^1H の共鳴周波数が600 MHzの14.1 Tでは、電子スピンの共鳴周波数は約400 GHzである。400 GHzの遠赤外領域の電磁波は、波長が0.75 mmでありサブミリ波やテラヘルツ波と呼ばれる。

市販されているBWO（逆進行波管）やガンダイオードなどを用いてサブミリ波を発生でき、高磁場ESRには応用することができる。しかし、DNPでは電子スピンに関する遷移を飽和させる必要があるためワット級のサブミリ波を必要としており、市販の光源で適切なものはない。現在は、比較的小型の光源としてジャイロトロンが高磁場DNP用に利用されている^[2,3]。図1に示すようにジャイロトロン管は超伝導マグネットに挿入されている。下部にある電子銃から電子が放出され、超伝導磁石の中心にあるキャビティで電子のサイクロトロン運動によりサブミリ波が共鳴して発振する。このためジャイロトロンは、サイクロトロン共鳴メーザーとも呼ばれる。

同じ静磁場強度下では、DNPを行う電子スピンの共鳴周波数とジャイロトロンが発振する電磁波の周波数はほぼ同じである。このためDNPを行うNMRマグネットとジャイロトロン・マグネットの磁場強度は同じである。あるいは、ジャイロトロンが発振する2次高調波を用いる場合には、ジャイロトロンのマグネット磁場強度はNMRマグネットの約1/2である。

2.1.2. 周波数可変性

ジャイロトロンは、一般的にはその発振周波数がキャビティーサイズによって決まる、周波数固定の光源である。しかし、多様なラジカルについて、最大のDNP効果を得るためには、電子スピンへの

照射条件を最適化する必要がある。周波数固定のジャイロトロンを用いる時には、静磁場を変えて最適な条件を探す。このためには超伝導補助磁場コイルを持つマグネットか、通常の高分解能NMRマグネットの主電流値を変更する。磁場に比例して可変幅を大きくする必要があり、前者では、特別な機構を要して極めて高い磁場発生では製作も困難になる。後者では、電流リードを挿入して電流値を変え多量の液体ヘリウムを要する。両者とも、磁場変更は均一性とドリフトなど安定性を損ない、高分解能NMR測定には安定化のため時間を要する。さらに、核スピンの共鳴周波数も変わるので、プローブチューニング条件を磁場変更のたびに最適化する必要がある。このような難点のため、発振器であるジャイロトロン側に周波数可変性を持たせようという開発も進んでいる^[3]。

2.1.3. テラヘルツ波伝送系

DNP実験でサブミリ波を利用する上で重要なことは、ジャイロトロン・キャビティで発振したサブミリ波を効率よく電子スピン励起に適した形で、試料まで伝えることである。サブミリ波はマイクロ波の一種でもあり、XバンドESR実験で回転磁場ベクトルの空間分布を考慮するのと同様に、電磁波のモードつまり分布に注意する必要がある。よく使われるのは、ジャイロトロンで発生したサブミリ波をブラソフ・コンバーターでガウス波に変換し、オーバーサイズ円形コルゲート導波管のモードHE₁₁で

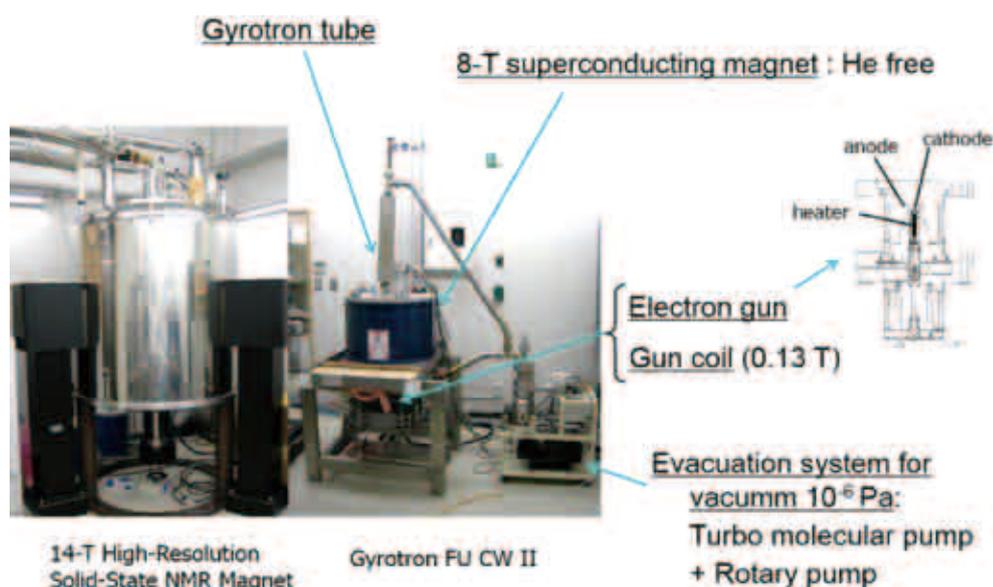


図1 NMR用マグネットとジャイロトロンFUCWII。左側の写真が600 MHzのNMR用マグネット、中央がジャイロトロン管と無冷媒8Tマグネット。右に示す電子銃が8Tマグネット下部から電子ビームを供給する。ジャイロトロン管の最上部からコヒーレントなサブミリ波が出力される。

長距離を高効率に伝送することである。コルゲート管は内側に1mm以下の周期で縞模様を刻んだ導波管である。他に、サブミリ波が光線に近い性質を持つことを利用して整形したミラー間で空間を通じて準光学的に伝送させることもできる。さらに、マーチンパペット干渉計を使って共鳴に有効な円偏光磁場成分を選んで照射することもできる。プローブ内部でのサブミリ波の試料への照射についても気を配る必要がある。サンプル周囲には、マジック角回転用のローターのスリーブやキャップ、タービン、さらにラジオ波共鳴用コイルがあり、これら部品とサブミリ波の干渉を考慮して高い透過性を維持した照射法を考える必要がある。そのために照射方向、ローターの材質や壁の厚さ、コイルの形状などに工夫を要する^[4]。

2.2. 極低温試料回転

DNP実験では、温度が上昇し電子スピン分極の緩和がミリ秒程度より速くなると核スピン増大は低下する。これは、双極子スピン間結合以外の機構で核スピンが緩和するとNOE効果が減じること、また緩和によりスピン結合が見かけ上小さくなることに似ている。このため、固体でのDNP実験は液体窒素を用いて、100K程度の温度で行うことが多い。絶対温度に逆比例して電子および核スピンの分極は増大するので、また温度低下とともに熱ノイズが低下するので、低温実験はシグナルのS/N比の向上に寄与する。この低温マジック角試料高速回転実験のために、毎分100L程度の極低温ガスを供給するシステムと、そのガスを利用して試料を冷却するために断熱性の高いDNP-NMRプローブが必要になる。

2.2.1. 極低温ガス供給

窒素ガスを冷媒とする実験では、冷却と試料回転をすべて液体窒素で行うことは可能である。しかし、この方式では大量の液体窒素を消費し効率的ではない。そのため、チラーによる電氣的な冷却法や、PSD (Pressure Swing Adsorption) や中空糸膜フィルターなどで空気から高純度窒素を精製する方法を併用することが効率的である^[5-7]。また、80K以下の実験では、ヘリウムガスを冷媒にして液体ヘリウムで冷却する方式が容易である。これまでは、この方式をとっていた。しかし、利用したヘリウムを大気放出すると冷媒代が高価になるので、要するガス量の大きい長時間実験ではヘリウムガスの回

収と再冷却を行うのが実用的である。さらに、回転と冷却に利用した直後のヘリウムは40K程度と低温なので、これと熱交換することで効率的に供給ヘリウムガスを冷却する等の工夫を行う。今後の応用実験では、このようなヘリウムの回収と効率的な再冷却化を行う局所的なヘリウム再利用システムが必要になると考えている。

2.2.2. 低温試料回転プローブ

プローブでは、断熱性を保つために真空ジャケットを持ち耐低温性であること、また室温空気と比べて80Kや20KなどDNP実験を行う温度の冷媒ガスは、動粘性係数が異なる。このためハウジングを含むスピナーシステムは、室温用のシステムを流用することが難しく、再設計する必要がある。また、絶縁性の低いヘリウムガス下での放電防止も重要である。

2.3. ラジカル増感剤

高磁場DNPでは、最適なスピン系を作るためにラジカル化合物を選ぶことが重要である。高磁場での¹Hのゼーマン分裂はDNPの駆動力である電子スピン-核スピン相互作用に比べて大きいので、それによりDNP効果は小さくする。高磁場で有効なDNPの機構としてクロス効果がある^[1]。これは、電子スピン1、電子スピン2、核スピンの3スピンを考えると、電子スピン1と電子スピン2の共鳴周波数差が、核スピンのゼーマン分裂を相殺して、電子スピンと核スピンのDNPが効率よく働くとする機構である。これに適した電子スピン・ハミルトニアンを持つのがバイラジカルであり、よく使われるのは化合物トタポールである。この化合物は同様なNOラジカルのgテンソルを2つ持つが、2つのテンソルで静磁場に対する向きが異なるので、g値異方性により共鳴周波数が異なる。この違いを利用してDNPを高い静磁場中でも実現する。これまでも、2つのgテンソルの向きを制御してDNP効率を向上させる試みも行われている。

3. 今後の技術

上記のように高磁場DNP法は、高磁場、DNP、極低温という3つの要素で、高分解固体NMR感度を室温状態に比べて1000倍以上、向上させられる革新的な方法である。今後も、上記のテラヘルツ波技術、極低温技術、ラジカル増感剤は、大きく進歩する余地があり、装置は使いやすくなることが

期待できる^[6,7]。最近、DNP装置が市販され欧米を初めとして普及し、生体物質、材料分子構造解析などへの応用法も開発されている。これらの進歩とともに、固体NMRの一般的な超高感度化法として広く利用されるようになって考えられる。

文 献

- [1] Maly, T., Debelouchina, G.T., Bajaj, V.S., Hu, K.N., Joo, C.G., Mak-Jurkauskas, M.L., Sirigiri, J.R., van der Wel, P.C.A., Herzfeld, J., Temkin, R.J., and Griffin, R.G., (2008) Dynamic nuclear polarization at high magnetic fields. *J. Chem. Phys.* **128**, 052211.
- [2] Agusu, La, Idehara, T., Ogawa, I., Saito, T., Kanamaki, T., Takahashi, H., and Fujiwara, T., (2007) Detailed consideration of experimental results of gyrotron FUCWII developed as a radiation source for DNP-NMR spectroscopy. *Int. J. Infrared Millim. Waves* **28**, 499-511.
- [3] Matsuki, Y., Ueda, K., Idehara, T., Ikeda, R., Kosuga, K., Ogawa, I., Nakamura, S., Toda, M., Anai, T., and Fujiwara, T., (2012) Application of continuously frequency-tunable 0.4 THz gyrotron to dynamic nuclear polarization for 600 MHz Solid-State NMR. *J. Infrared Millim. Terahz. Waves* **33** 745-755.
- [4] Nanni, E.A., Barnes, A.B., Matsuki, Y., Woskov, P.P., Corzilius, B., Griffin, R.G., and Temkin, R.J., (2011) Microwave field distribution in a magic angle spinning dynamic nuclear polarization NMR probe. *J. Magn. Reson.* **210** 16-23.
- [5] Matsuki, Y., Takahashi, H., Ueda, K., Idehara, T., Ogawa, I., Toda, M., Akutsu, H., and Fujiwara, T., (2010) Dynamic Nuclear Polarization Experiments at 14.1 T for Solid-State NMR. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 5799-5803.
- [6] Matsuki, Y., Ueda, K., Idehara, T., Ikeda, R., Ogawa, I., Nakamura, S., Toda, M., Anai, T., and Fujiwara, T., (2012) Helium-cooling and -spinning dynamic nuclear polarization for sensitivity-enhanced solid-state NMR at 14 T and 30 K. *J. Magn. Reson.* **225**, 1-9.
- [7] Barnes, A.B., Markhasin, E., Daviso, E., Michaelis, V.K., Nanni, E.A., Jawla, S.K., Mena, E.L., DeRocher, R., Thakkar, A., Woskov, P.P., Herzfeld, J., Temkin, R.J., and Griffin, R.G., (2012) Dynamic nuclear polarization at 700 MHz/460 GHz. *J. Magn. Reson.* **224**, 1-7.



藤原 敏道 (ふじわら・としみち)

1980年3月 大阪大学 理学部 化学科 卒業
 1985年3月 大阪大学大学院 理学研究科 無機及び物理化学専攻 博士後期課程 修了
 1985年4月 日本電子株式会社に入社 生体計測学研究室に配属
 1992年4月 横浜国立大学 工学部 物質工学科 講師のち助教授
 2000年12月 大阪大学 蛋白質研究所 助教授のち准教授
 2002年 日本核磁気共鳴学会会員
 2008年4月 大阪大学 蛋白質研究所 教授(現職)

高分解能固体MAS NMRにおける 効率的なシム調整法

株式会社JEOL RESONANCE

西山 裕介

0. 概 略

MAS NMRにおけるシム調整は、MAS軸がシムのy軸を向いているとき y_1 (or z_1)、 x_2 (or zy)、 z_3 (yz_2 or x_2z or y_3)の3つの項のみを調整することにより効率よく3次の補正が可能となる。Gradient shimmingに用いる z_n 項を上記の3つの項におきかえるだけで、MASのもとでのGradient shimmingによる自動シミングが実現する(MAGIC SHIMMING)。

本稿は、シミングの背景および基礎的理論を含めて紹介しているが、手動でのシム合わせは3章を自動シム合わせは5章のみ参照してもらえば、実務的に要求される情報が含まれている。また参考文献^[17~18]には、MAS NMRにおける手動シム調整法が、参考文献^[19]には自動調整法が詳しく説明されているので合わせて参照いただきたい。

1. はじめに

固体NMRにおいて、シム調整はほとんど無視されていた。これは固体NMRスペクトルの線幅が広く、シムの与える影響が少なかったことが背景にある。固体NMRスペクトルの線幅を決める要素にはさまざまなものがある。広く測定されている¹³C CPMASなどの $I=1/2$ 核の測定では、構造の分布や、不十分な¹Hデカップリング、隣接する¹⁴N核、異方的なバルク磁化率テンソル、マジックアングルのわずかなずれなどが広幅化に寄与する。またスピン $I>1/2$ の核ではさらに四極子相互作用によるブロードニングが寄与する。高分解能NMRを実現するために、¹H異種核および同種核デカップリング法の改良^[1~3]、高速の試料回転^[4~6]、エコーをベースとしたブロードニングのリフォーカス法^[7~9]などさまざまな努力が行われている。新しい測定法の導入だけでなく、近年のNMRスペクトロメーターの進化もあり、これらのブロードニングを飛躍的に低減することが可能になった。また、完全な固体試料のみならず、ゲルや生体組織といった半固体試料にもMAS NMRが幅広く用いられるようになった

た^[10~12]。結果として非常に先鋭化したスペクトルが日常的に測定されるようになり、相対的にシム調整の重要性が高くなってきた。

一方で溶液NMRでは B_0 の均一度がNMRスペクトルの線幅を大きく左右するため、gradient shimming^[13~15]をはじめ、さまざまな自動調整法が開発され日常的に用いられている。また、シムのハードウェアも溶液NMRに最適になるよう開発されてきた^[16]。たとえば、超電導マグネットの中では溶液サンプルはz軸方向(B_0 に平行方向)に長いサンプル形状を持っているため、z軸方向の磁場分布をより広く調整できるように高次のz項がシムにより調整できるようになっている。

本稿では、MAS NMRに適したシムの実践的な調整法および^[17, 18]、MAS NMRにおける自動シム調整法MAGIC SHIMMINGに関して紹介する^[19]。

なお、シム項の表記はNMRメーカーによって多少異なる。ここではJEOL RESONANCEの用いている表記法で記述するが、メーカーによっては x_2 の代わりに x_2-y_2 、 y_2 のかわりに xy 、 zx_2 のかわりに $z(x_2-y_2)$ 、 zy_2 のかわりに xyz を用いている。記述法に合わせて適当に読みかえるとよい。

2. MAS NMRにおけるシム項

試料がz軸に長い形状を持つ溶液NMRでは、分解能を向上させるためにはz軸の B_0 均一度が最も重要である。x軸y軸方向の B_0 の均一度は、試料をz軸周りに回転させるために時間的に平均化される。z方向の広い範囲に均一な B_0 磁場を作るために、z軸方向の傾斜磁場を作りだす z_n ($n=1, 2, 3, \dots$)のシム項は高次の n まで用意され利用されている。

一方でMAS NMRでは、試料の長軸および回転軸が溶液NMRとは異なる。MAS NMRにおいては、試料はz軸からmagic angle $\theta_m=54.7^\circ$ 傾いた軸(z^{int} 軸)周りに高速回転する。そのため、分解能を向上させるためにはz軸のかわりに z^{int} 軸の B_0 均一度が重要になる。そのため、理想的には z^{int} のシ

ム項があればMAS NMRのシム合わせに有用である。

ここで我々は、 z^{int} 項は x_n, y_n, z_n 項の線形和で表記できることを示す。幸いシムコイルの作る磁場は球面調和関数で表記されるので、 z 座標系から z^{int} 座標系への変換は容易である。

$$\begin{aligned}
 B_{z0}^{\text{int}} &= B_0 \\
 B_{z1}^{\text{int}} &= B_{z1} \cos \beta + B_{x1} \sin \beta \cos \alpha + B_{y1} \sin \beta \sin \alpha \\
 B_{z2}^{\text{int}} &= B_{z2} P_2(\cos \beta) \\
 &\quad + (B_{x2} \cos 2\alpha + 2B_{y2} \sin 2\alpha) \frac{3}{2} \sin^2 \beta \\
 &\quad + (B_{zx} \cos \alpha + B_{zy} \sin \alpha) 6 \sin \beta \cos \beta \\
 B_{z3}^{\text{int}} &= B_{z3} \frac{1}{2} \cos \beta (5 \cos^2 \beta - 3) \\
 &\quad + (B_{z2x} \cos \alpha + B_{z2y} \sin \alpha) 3 \sin \beta (1 - \frac{5}{4} \sin^2 \beta) \\
 &\quad + (B_{zx2} \cos 2\alpha + B_{zy2} \sin 2\alpha) \frac{15}{2} \sin^2 \beta \cos \beta \\
 &\quad + (B_{x3} \cos 3\alpha + B_{y3} \sin 3\alpha) \frac{5}{4} \sin^3 \beta
 \end{aligned} \tag{1}$$

ここで β は z 軸と z^{int} 軸のなす角、 α は z^{int} 軸の実験室系の xy 平面への射影と実験室系の x 軸のなす角である。MASかつ、試料回転軸が y 軸を向いているとき $(\alpha, \beta) = (\pi/2, -\theta_m)$ となり、

$$\begin{aligned}
 B_{z0}^{\text{int}} &= B_0 \\
 B_{z1}^{\text{int}} &= B_{z1} \frac{1}{\sqrt{3}} - B_{y1} \sqrt{\frac{2}{3}} \\
 B_{z2}^{\text{int}} &= -B_{x2} - 2\sqrt{2} B_{zy} \\
 B_{z3}^{\text{int}} &= B_{z3} \frac{2}{3\sqrt{3}} - \frac{1}{\sqrt{6}} B_{z2y} - \frac{5}{\sqrt{3}} B_{zx2} + \frac{5}{3\sqrt{6}} B_{y3}
 \end{aligned} \tag{2}$$

となる。shimをあわせるには1次は $y1$ (or $z1$)、2次は $x2$ (or zy)、3次は $z3$, ($yz2, y3$ or $x2z$) の3つの項のみを動かすのがよい。 $z2$ は全く効かないことに注意。試料回転軸が x 軸を向いているときの展開は^[17]にすでに示されており、1次は $x1$ (or $z1$)、2次は $x2$ (or zx)、3次は $z3$, ($z2x, zx2$, or $x3$) の3つの項だけでシムを合わせることができる。

3. マニュアルシミングの実際

シム調整は、シリコンゴムの ^1H 信号が便利であ

る。シリコンゴムは回転しにくい時が多いが、隙間に NaCl などの細かい粉末を詰めるとよい。数kHzの試料回転で十分な分解能が得られる。緩和時間も短く、 ^1H の強い信号強度で容易に短時間で分解能調整ができる。ただし、もともとの線幅が多少太いため、0.01 ppmといった分解能を求めるときには適していない。

究極の分解能が必要な場合には、アダマンタンの ^{13}C 信号が使いやすい。分解能調整には長時間のFID取り込みが必要になるため、ハイパワーデカップリングを行うとプローブを焼損する。これを避けるためにローパワーデカップリングを行う。通常のローパワーデカップリングは40 kHz以上の高速回転を用いるが^[20~22]、双極子相互作用の弱いアダマンタンの場合は15~20 kHzで十分である。デカップリング強度(数kHz程度)および ^1H オフセットを慎重に調整する。

試料回転軸の向きを調べるには、 $y1$ および $x1$ を変化させ分解能の変化を観察するとよい。 $y1$ が分解能を大きく変化させる場合は、試料回転軸は y 軸方向、 $x1$ の場合は x 軸方向と判断できる。いずれの配向であっても $z2$ は分解能調整に使えないことを注意する必要がある。

シム項の調整は、1次をあわせ2次、さらに1次に戻って、1次、2次、3次といった順に循環的に行うとよい。図1に実際にアダマンタンで調整した結果を示す。上側のスペクトルはすべてのシム項を0にして測定した結果、下のスペクトルは $y1, x2, z3$ の3つのシム項のみを調整した結果である。調整に要した時間は8分であった。 ^{13}C の線幅は1.8 Hz (= 0.012 ppm) となった。

4. MAGIC SHIMMING

溶液NMRで日常的に使われている自動シミング法、gradient shimmingをMAS NMRのもとで実現する。ここでは動作原理の概略を示すにとどめるが、溶液のgradient shimmingは^[13~15]に詳しい。 z 方向のpulsed field gradient (PFG)を用いて、 z 軸方向の B_0 の分布を可視化する。同様にして $z1, z2, z3$ …のシムが z 軸方向に作り出す B_0 傾斜磁場の分布を可視化する。この二つの情報から、 z 軸方向の B_0 の分布を補正する $z1, z2, z3$ …のシム値を割り出す。非常に高速かつ信頼性の高い自動シム合わせ法として、このgradient shimmingは幅広く用いられている。

MAS NMRにおいては、gradient shimming法は

そのままでは動作しない。これは、回転軸がz軸ではなくz^{int}軸であるためである。Gradient shimmingを実装するには、z^{int}方向の磁場勾配を作り出す特殊なPFGおよび、z^{int}方向の補正磁場を作り出す、z₁^{int}, z₂^{int}, z₃^{int}…のシム項を持つ特殊なシムコイルが必要になる。特殊なハードウェアを用いずにMAS NMRでのgradient shimmingを行うMAGIC SHIMMING法が開発された^[19]。本手法では、式(1、2)に基づき、MAS NMRに要求される特殊なPFGとシム項を実現する。Z₁^{int}方向のPFGは式(2)に明らかに記述されているようにz1およびy1の線形和で表記できる。すなわち通常のz軸方向のPFG(z1)により、幾分小さくスケールされてしまうもののZ₁^{int}方向のPFGとしても使えることがわかる。また、z₁^{int}, z₂^{int}, z₃^{int}の代わりにそれぞれy1 (or z1)、x2 (or zy)、z3、(yz2, y3 or x2z) が使えることが分かる。すなわち、gradient shimmingのソフトウェアのz1, z2, z3…をy1, x2, z3…に書き換えるだけでMAS NMRのもとでの自動シミングMAGIC SHIMMINGが実現する。Z1の電流を変化させることによりPFGを実現するhomospoil gradientを用いることにより^[15]、プローブにPFGコイルがなくともgradient shimmingが実行できる。MAGIC SHIMMINGは、一切ハードウェアを追加することなく、一般的なMAS NMRプローブ、一般的な室温シムコイルのみを用いて実行できる。

5. MAGIC SHIMMING の実際

Gradient shimmingを行うためには、十分な感度と、途切れのない連続したサンプル形状、1本もしくは複数本から1本だけ選択的に励起できるある程度細い線幅のピークをもつ試料が要求される。溶液NMRでは、重水溶媒の²H NMR信号が広く用いられている。MAGIC SHIMMINGでは、棒状のシリコンゴムの¹H NMR信号が便利である。細かく砕いたシリコンゴムの方が回転させやすいことが多いが、サンプル形状の点からお勧めできない。すべてのシム項が0の状態からスタートする場合、1次の項のみでMAGIC SHIMMINGを行いy1の値を調整し、次に1次と2次の項を入れて行うといった具合に徐々に高次の項を加えるほうが発散しにくい。もちろんあらかじめある程度シムが調整できている日常での調整ではこのような手順は不要である。特に2次の項に見られる現象であるが振り切れてしまう場合がある。その場合にはあらかじめzyに大きな値を入れておいて2次の項を調整するとよい。多

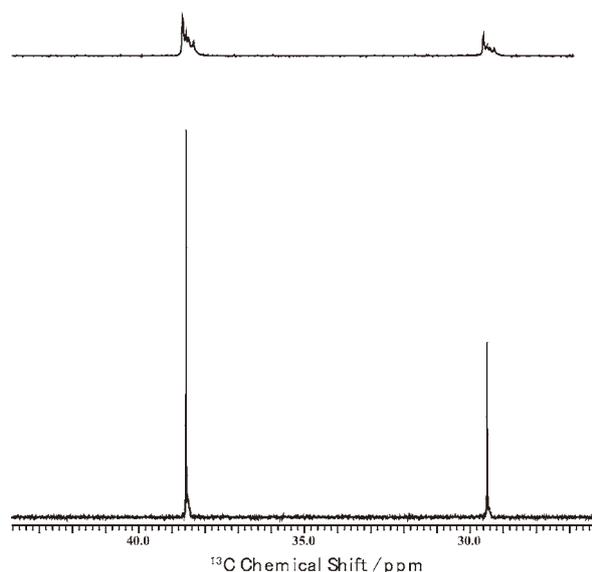


図1 ¹³C NMR spectra of adamantane before (upper) and after (bottom) shimming. Only y, x2, and z3 shim currents are adjusted.

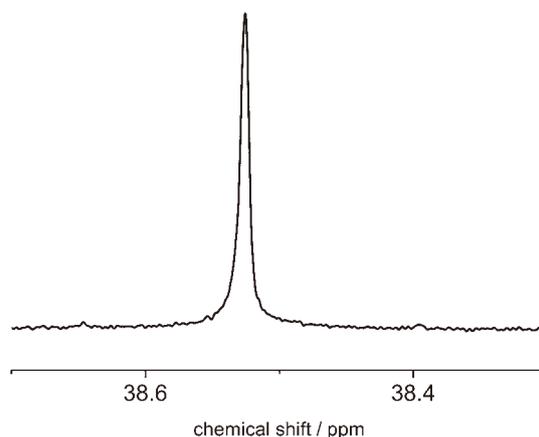


図2 ¹³C NMR spectra of adamantane after MAGIC SHIMMING on y, x2, and z3 shim

くの場合は2次までで十分な分解能が得られることが多い。

実際にシリコンゴムを用いてMAGIC SHIMMINGを行い、そのあとアダマンタンの¹³C NMR信号を測定した例を図2に示す。すべてのシム項が0の状態から調整に要した時間はマップの測定もすべて含めて2分程度。アダマンタンの¹³C NMRの半値全幅は0.97 Hz (0.0077 ppm) と非常に高い分解能が実現した。

参考文献

- [1] Hodgkinson, P., (2005) Heteronuclear decoupling in the NMR of solids. *Prog. Magn. Reson. Spec.* **46**, 197-222.
- [2] Nishiyama, Y., Lu, X., Trébosc, J., Lafon, O., Gan, Z., Madhu, P.K., Amoureux, J.-P., (2012) Practical choice of ¹H-¹H decoupling schemes in through-bond ¹H-(X) HMQC experiments at ultra-fast MAS.

- J. Magn. Reson.* **214**, 151-158.
- [3] Lu, X., Lafon, O., Trébosc, J., Thankamony, A.S.L., Nishiyama, Y., Gan, Z., Madhu, P.K., Amoureux, J.-P., (2012) Detailed analysis of the TIMES and TIMES₀ high-resolution MAS methods for high-resolution proton NMR. *J. Magn. Reson.* **223**, 219-227.
- [4] Nishiyama, Y., Endo, Y., Nemoto, T., Utsumi, H., Yamauchi, K., Hioka, K., Asakura, T., (2011) Very fast magic angle spinning ¹H-¹⁴N 2D solid-state NMR: Sub-micro-liter sample data collection in a few minutes. *J. Magn. Reson.* **208**, 44-48.
- [5] Nishiyama, Y., Malon, M., Gan, Z., Endo, Y., Nemoto, T., (2013) Proton-nitrogen-14 overtone two-dimensional correlation NMR spectroscopy of solid-sample at very fast magic angle sample spinning. *J. Magn. Reson.* **230**, 160-164.
- [6] Parthasarathy, S., Nishiyama, Y., and Ishii, Y., (2013) Sensitivity and Resolution Enhanced Solid-State NMR for Paramagnetic Systems and Biomolecules under Very Fast Magic Angle Spinning. *Acc. Chem. Res.* in press.
- [7] Medek, A., Harwood, J.S., and Frydman, L., (1995) Multiple-Quantum Magic-Angle Spinning NMR: A New Method for the Study of Quadrupolar Nuclei in Solids. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12779-12787.
- [8] Sakellariou, D., Brown, S.P., Lesage, A., Hediger, S., Bardet, M., Meriles, C.A., Pines, A., Emsley, L., (2003) High-Resolution NMR Correlation Spectra of Disordered Solid. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4376-4380.
- [9] Kobayashi, T., Mao, K., Paluch, P., Nowak-Krol, A., Sniechowska, J., Nishiyama, Y., Gryko, D.T., Potzebowski, M.J., Pruski, M., (2013) Study of Intermolecular Interactions in the Corrole Matrix by Solid-State NMR under 100 kHz MAS and Theoretical Calculations. *submitted*.
- [10] Maas, W.E., Laukien, F.H., and Cory, D.G., (1996) Gradient, High Resolution, Magic Angle Sample Spinning NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 13085-13086.
- [11] Beckonert, O., Coen, M., Keun, H.C., Wang, Y., Ebbels, T.M.D., Holmes, E., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., (2010) High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature Protocols* **5**, 1019-1032.
- [12] Wong, A., Li, X., Sakellariou, D., (2013) Refined Magic-Angle Coil Spinning Resonator for Nanoliter NMR Spectroscopy: Enhanced Spectral Resolution. *Anal. Chem.* **85**, 2021-2026.
- [13] Prammer, M.G., Haselgrove, J.C., Shinnar, M., Leigh, J.S., (1988) A new approach to automatic shimming. *J. Magn. Reson.* **77**, 40-52.
- [14] Vanzijl, P.C.M., Sukumar, S., Johnson, M.O., Webb, P., Hurd, R.E., (1994) Optimized Shimming for High-Resolution NMR Using Three-Dimensional Image-Based Field Mapping. *J. Magn. Reson. A* **111**, 203-207.
- [15] Barjat, H., Chilvers, P.B., Fetler, B.K., Horne, T.J., Morris, G.A., (1997) A Practical Method for Automated Shimming with Normal Spectrometer Hardware. *J. Magn. Reson.* **125**, 197-201.
- [16] Roméo, F., and Hoult, D.I., (1984) Magnetic field profiling: Analysis and correcting coil design. *Magn. Reson. Med.* **1**, 44-65.
- [17] Sodickson, A., and Cory, D.G., (1997) Shimming a High-Resolution MAS Probe. *J. Magn. Reson.* **128**, 87-91.
- [18] Piotto, M., Elbayed, K., Wieruszkeski, J.-M., Lippens, G., (2005) Practical aspects of shimming a high resolution magic angle spinning probe. *J. Magn. Reson.* **173**, 84-89.
- [19] Nishiyama, Y., Tsutsumi, Y., and Utsumi, H., (2012) MAGIC SHIMMING: Gradient shimming with magic angle sample spinning. *J. Magn. Reson.* **216**, 197-200.
- [20] Ernst, M., Samoson, A., and Meier, B.H., (2001) Low-power decoupling in fast magic-angle spinning NMR. *Chem. Phys. Lett.* **348**, 293-302.
- [21] Ernst, M., Samoson, A., and Meier, B.H., (2003) Low-power XiX decoupling in MAS NMR experiments. *J. Magn. Reson.* **163**, 332-339.
- [22] Kotecha, M., Wickramasinghe, N.P., and Ishii, Y., (2007) Efficient low-power heteronuclear decoupling in ¹³C high-resolution solid-state NMR under fast magic angle spinning. *Magn. Reson. Chem.* **45**, 221-230.



西山 裕介 (にしやま・ゆうすけ)

2002年3月 京都大学大学院理学研究科博士課程 単位取得の上退学
 2002年4月 理化学研究所ゲノムサイエンスセンター 研究員
 2002年5月 博士(理学)取得
 2005年4月 日本核磁気共鳴学会会員
 2007年9月 日本電子株式会社入社
 2009年4月 京都大学化学研究所非常勤講師(兼任・現職)
 2010年4月 分社化により株式会社JEOL RESONANCE 転籍(現職)

ビッグデータ時代の生体高分子NMRデータベース、 BioMagResBank (BMRB) その有効利用とわが国における現状

大阪大学蛋白質研究所

小林 直宏

BioMagResBank (BMRB) は生体高分子のNMR実験データを電子化し、データベースとして広く有効利用することを目的としている。大阪大学のPDBj-BMRBグループは米国BMRBおよびwwPDBと連携して、BMRBに関する開発、データ登録と公開拠点としてのサイトの構築運営を行っている。図1に示したとおりBMRBにおける総エントリー数は2013年7月において9,000件以上に達している。その一方でNMR立体構造のPDB登録件数は2013年6月に10,000件を超えた。BMRB登録データのうち約50%はPDBに立体構造座標が存在し、配列/構造/化学シフトの相関を得ることが出来る。

生体高分子を扱うNMR研究にとって化学シフトはパラメータとして最も重要な要素であるのは周知の事実である。対象サンプルで観測しうるシグナルの化学シフト値を得る一般的な手法としては、第一に核スピンの磁化移動を利用して化学構造や立体構造を参照しながら分離可能なシグナルを一つ一つ帰属していき、化学構造における官能基によりお

およその出現位置を予測してから化学構造上で矛盾の無い磁化移動経路を慎重に追跡しながら帰属していく。*J*-スピン結合による磁化移動が得られない芳香族系側鎖のシグナルの帰属などはNOEによる空間的な距離を慎重に考慮しながら帰属を行うため、ある程度信用できる立体構造情報が必要となる。 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ の同位体でラベルされたサンプルを対象とする場合、100～150残基程度のタンパク質では ^1H 核で1,000～2,000個、 ^{13}C 核で300～400個、 ^{15}N 核で100～200個ほどのシグナル全てを完全に分離し化学シフトを決定することが出来る。理化学研究所在籍中に著者が開発したKujiraはGüntertらによって開発された外部プログラムであるCyanaとの連携により、効率的にシグナル帰属、立体構造解析を行うことができ、現在までに実に1,200以上ものタンパク質立体構造決定に貢献した^[1]。またBMRBの化学シフトエントリーとしてもKujiraの機能を利用して600件以上のデータが登録された^[2]。

さて、これまでに蓄積されたデータベースを有効に利用した例としてBaxらが開発したTALOS^[3]、

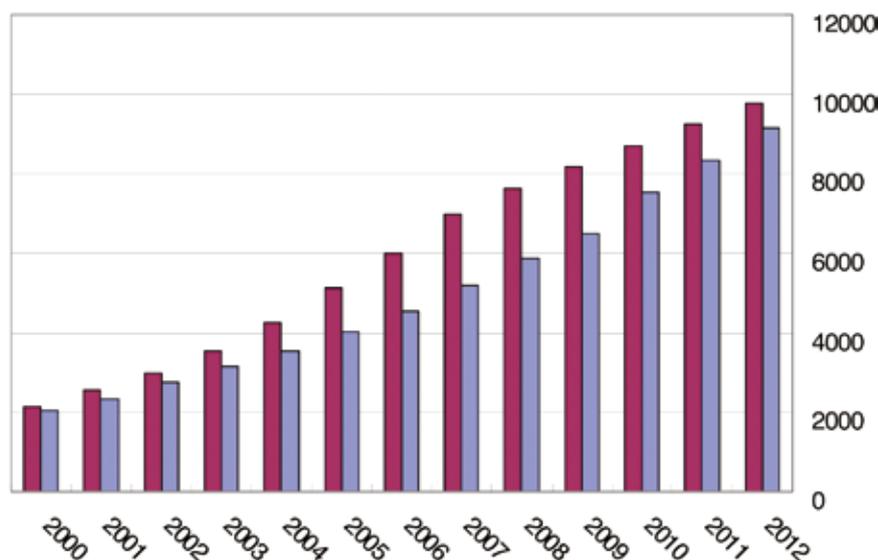


図1 NMR構造のPDBへの登録件数、BMRBへのNMR実験データの登録件数の推移

SPARTA^[4]が特に有名であり、近年の構造解析において実用的な成果を挙げている。詳細は原著を参照していただくとして、以下簡単にその原理を説明する。TALOSは注目する残基*i*の*i*-1、*i*+1残基、合計3残基分の化学シフトの実験値と統計平均からのずれ(2次シフト)を指標に化学シフト類似性と配列類似性からスコアリングされたデータベース中のトリペプチドフラグメントを検索する。集められたトリペプチド集合の残基*i*における ϕ 、 ψ 二面角の統計的な分散が、あるしきい値以下の集合を解として出力するものである。SPARTAはその逆を実行し、与えられた立体構造から2次構造、水素結合、環電流効果を考慮し、残基*i*の ϕ 、 ψ 角および χ^1 角の類似性からスコアリングされたデータベース中のトリペプチドフラグメントを検索し、集められた集合における残基*i*の2次シフトを予測するものである。発表当時はTALOSは20件、SPARTAは200件の立体構造/化学シフトの内部データベースを利用していた。現在、両プログラムの後継であるTALOS+では200件、SPARTA+では580件に増やしその予測精度を向上させている(SPART+^[5]、TALOS+^[6])。またSPARTAの機能はフラグメントアセンブリ法によるモデリング予測法と併用することで高精度な立体構造モデリングを実現するに至っている(CS-ROSETTA^[7])。これらのツールを用いる解析はあくまでも予測であって実験的な距離情報に基づいた構造解析ではないことには注意が必要である。実際に筆者がCS-ROSETTAによる構造解析を実行したところ、ループ構造などを多く含む2次構造含有率の低いタンパク質の構造予測には適していないことを示唆する結果を得ている。これはSPARTA自身が化学シフト予測のほとんどを2次構造に依存している点、フラグメントアセンブリ法が自由度の高いループ構造に弱い点が反映されているためである。一方、過去の化学シフトの統計的な利用は¹³C核シグナル、¹³C α 、¹³C β 、¹³COにおいて2次構造を議論する範囲で有効な精度を発揮しているが、実験的に最も容易に得られる¹⁵N α 、¹HNシグナルの予測精度については実用レベルに達しているとは言い難い。Wishertらにより開発されたShiftX2^[8]は与えられた立体構造座標データをもとに¹⁵N α 、¹HNシグナルの2次シフトを更に高精度で予測することに成功している。ただし、ShiftX2は過去に登録されている化学シフト情報を積極的に利用しているため、1残基置換されたホモログなどの解析に適しているといえる。

Vendruscoloらは座標データから2次シフトの予測させるプログラムCamShiftを開発した。このプログラムはSPARTA+、ShiftXと同程度の予測精度を持ちながら、線形関数で近似された評価関数として定義されている。この関数を組み込んだ分子動力学計算により、R₂緩和分散法により得られたフォールディング中間体など過渡の状態にある小型タンパク質の化学シフトや残余双極子を用いてそれらの立体構造の解析に成功している^[9]。

また¹⁵N α 、¹HNシグナルの化学シフト変化はリガンド結合実験などに有効であり、HADDOCKなどのドッキングプログラムと共に用いることで大規模な複合体解析への応用が多数試みられている。ドッキングプログラムを利用した解析ではX線小角散乱(SAXS)、cryo-電顕などの低分解能構造情報、HSQC-perturbation、FRETあるいはYeast-two-hybrid法などによる相互作用情報との組み合わせは特に重要であり、他のデータベース情報とのパイプラインが必要不可欠といえる。この方法論のごく最近の興味深い応用例ではHIVカプシドの全構造モデリングが挙げられる^[10]。このような超大規模構造解析においては高精度でかつ高信頼性の結果を得るよりも複数の構造データ、相互作用データをいかに“うまくまとめるか”というセンスが問われる。

ところで、情報分野における計算機技術および情報通信技術の発展は様々な分野におけるデータの登録、サイトの公開と運営を支える技術と共に全世界規模で爆発的な成長をつづけており、21世紀はまさにビッグデータの時代と呼ばれるにいたっている。ビッグデータのごく身近な例としてはgoogleによる検索、Wikiによる情報のカタログ化、ブログ、質問サイトなどが挙げられる。生命科学の分野においてもバイオインフォマティクスを始めとして多くのデータベースがセマンティック技術により情報的に統合されつつある。より具体的にはショッピングサイトなどで過去の購入履歴から購入者の好む商品を自動推定して表示するなどの技術に応用されている。生体高分子の立体構造座標データベースであるPDBは既にXML表現(タグと呼ばれる文字列を使って情報を埋め込んでいく言語の一つ)によるPDBMLをResource Description Framework(RDF、ウェブ上にあるリソースを記述するための統一された枠組み)化することに成功し、それらを一般公開している。我々のグループPDBj-BMRBでもごく最近、BMRBのほぼ全エント



図2 BMRBエントリーのフォーマットであるNMR-STAR ver.3からXMLフォーマットへの変換

表1 地域別BMRB登録件数の推移

BMRB 地域別登録件数	2009年	2010年	2011年	2012年
日本	57	336*	52	70
EU	197	195	230	241
アジア (日本を除く)	62	100	104	118
北米	295	357	390	326
その他	13	40	40	42
合計	624	1018	816	797

*理化学研究所と阪大蛋白研との共同作業により約280件が登録された

リーをXML化、RDF化し、公開を開始している(図2)。

これによりBMRBのNMR実験データは構造情報ばかりではなく立体構造座標に関してPDB、遺伝子配列情報についてGenBank、Uniprotをはじめ、NCBI-NIH、EMBL、ChemCompなどの外部データベースにリンクすることでリソースの交換を実現し、あたかも大規模なデータベースの一部として組み入れられることが可能になる。これにより高度な検索を複合的に実行するツールの開発が将来的に期待でき、上記の配列/構造/化学シフトの相関を利用した検索、対象とする生体高分子の機能推定、巨大複合体解析などの研究への応用が期待できる。いずれにせよNMR構造は年間約500件、NMR実験データは年間約800件のペースで登録数が増え続けており、今後のこれらの応用に大きな期待が寄せられている。表1に示すように2010年を除き、BMRBへの年間登録件数は堅調であり、アジア、EUからの登録の伸びが分かる。その一方、わが国における登録数は昨年における統計では50~70件であり、近年のNMR研究の多くが構造解析に至るデータ解析への要請が少なくなった事情を考慮しても先進国としてはやや少ないことが気になる。

NMRによる立体構造解析は核磁気共鳴法の習得のみならず、有機化学、タンパク質化学、計算機

科学、分子生物学といった幅広い分野における基礎知識を短期間に経験できる他の分野では見られない特性を持っている。若手育成の機会が失われている可能性に危機感を感じざるを得ない。

さて、データベース登録された実験データのクオリティはどのように維持されているかが気になることである。2011年以降、PDBへのNMR構造登録時にBMRBへの化学シフト登録が必須になった。このことからNMR構造と化学シフト情報はペアとなって増え続けるのは間違いないようである。今後は自分が解析したいタンパク質に関するデータが既知である、あるいは類縁体である可能性がますます高くなっていくであろう。したがって登録された立体構造の正確さや、化学シフトの正確さが問われることはますます避けられないと思われる。個人的にはシグナルの帰属とは人間による解釈の一形態であり、その決定に至る根拠と共に示されないと情報として再利用するには不安感が付きまとうと思われる。幸い、NMR構造の登録には距離制限情報の登録が必須になっており、これを基に登録されているNMR構造の妥当性を評価する方針についてwwPDBで議論されている。また化学シフトと立体構造との整合性を前述した予測プログラムと組み合わせる方法についても議論されている。近い将来、登録時あるいは登録されているデータに対して自動的に化学シフトデータあるいはNMR構造

の信頼性について評価されたデータが付されることになるだろう。

最後に、データベースとして蓄積されていくNMRデータには、過去に論文発表された解析データの参照と統計的な2次的利用に価値が見出されている。実測により確実に帰属するか、データベースあるいは経験則に基づく予測法に頼るかは研究の目的に応じて戦略を立てるべきであろう。しかしながら注意して欲しいのは統計的な例外には新しい発見が隠されている可能性がある。だからそれを見逃さないように利用すべきであることを強調したい。

参考文献

- [1] Kobayashi, N., Iwahara, J., Koshihara, S., Tomizawa, T., Tochio, N., Guntert, P., Kigawa, T., Yokoyama, S. (2007) KUJIRA, a package of integrated modules for systematic and interactive analysis of NMR data directed to high-throughput NMR structure studies. *J. Biomol NMR* **39**, 1, 31-52.
- [2] Kobayashi, N., Harano, Y., Tochio, N., Nakatani, E., Kigawa, T., Yokoyama, S., Mading, S., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Akutsu, H; Fujiwara, T. (2012) An automated system designed for large scale NMR data deposition and annotation: application to over 600 assigned chemical shift data entries to the BioMagResBank from the Riken Structural Genomics/Proteomics Initiative internal database. *J. Biomol NMR* **53**, 4, 311-320.
- [3] Cornilescu, G., Delaglio, F. and Bax, A. (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol NMR* **13**, 4, 289-302.
- [4] Shen, Y. and Bax, A. (2007) Protein backbone chemical shifts predicted from searching a database for torsion angle and sequence homology. *J. Biomol NMR* **38**, 4, 289-302.
- [5] Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu G. and Bax, A. (2009) TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol NMR* **44**, 4, 213-223.
- [6] Shen, Y. and Bax, A. (2010) SPARTA+: a modest improvement in empirical NMR chemical shift prediction by means of an artificial neural network. *J. Biomol NMR* **48**, 4, 13-22.
- [7] Shen, Y., Vernon, R., Baker, D. Bax, A. (2009) De novo protein structure generation from incomplete chemical shift assignments. *J. Biomol NMR* **43**, 2: 63-78.
- [8] Han, B., Liu, Y. F., Ginzinger, S. W., Wishart, D. S. (2011) SHIFTX2: significantly improved protein chemical shift prediction. *J. Biomol NMR* **50**, 1, 43-57.
- [9] Neudecker, P., Robustelli, P., Cavalli A., Walsh, P., Lundström, P., Zarrine-Afsar, A., Sharpe, S., Vendruscolo, M. and Kay L. E. (2012) Structure of an Intermediate State in Protein Folding and Aggregation *Science*, **336**, 362-366.
- [10] Zhao G., Perilla, J. R., Yufenyuy E. L., Meng, X., Chen, B., Ning J., Ahn J., Gronenborn A. M., Schulten K., Aiken C., and Zhang, P. (2013) Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. *Nature* **497**, 643-646.



小林 直宏 (こばやし・なおひろ)

1996年筑波大学大学院応用生物化学系 博士号取得

1998年学術振興会海外特別研究員 Cambridge大学 Fershtグループ

2001年理化学研究所研究員

2009年大阪大学蛋白質研究所 特任研究員 現職

京都大学理学部 分子構造化学研究室 (竹腰研究室)

京都大学大学院 理学研究科 化学専攻 分子構造化学研究室

野田 泰斗

はじめに

分子構造化学研究室は科学の飛躍的な発展を促すことを目指して、新規なNMRの手法の開発とその物質への応用を研究しています。2013年8月現在、京都大学北部キャンパスの理学部6号館に位置し、教員4名(竹腰清乃理教授、武田和行講師、久保厚助教、野田泰斗助教)、秘書さんと派遣研究員、研修生1名ずつ、博士課程5名、修士課程8名、学部生4名の総勢24名で構成されています。各自が独立した研究テーマを持ち、自由な雰囲気の中で、自分のスタイルで研究に取り組んでいます。

研究

本研究室では、従来では得ることが困難または不可能であった情報を得られるようにする固体NMRの新しい測定装置と測定・解析手法の開発を行っており、開発した手法を興味ある物質に応用して、構造と性質の解析をとおして物性・機能の発現機構を解明することを指向しています。ここでは近年に開発した装置と解析方法を主に紹介します。

安価に素早く改造でき、しかもA4サイズと小さ

い分光計(OPENCORE NMR分光計)を開発しました(図1左)。プログラムによりデジタル回路を構築できるFPGAとよばれるデバイスを用いることで、物理的な配線や電子部品をいじることなくFPGAにプログラムするだけでデジタル部分の変更ができます。そのプログラムや設計をオープンにしているためOPENCORE NMRと名付けられました。本研究室の測定のひとつがOPENCORE NMR上で実行されています。現在残っている市販の分光計は早晩OPENCORE NMRに置き換わる予定です。

このOPENCORE NMR分光計を用いて、FID取得中にレシーバーゲインを動的に大きくすることで量子化ノイズが低減できることを示しました。アナログ信号であるFIDを分光計に取り込むにはデジタル化する必要がありますが、大きな信号と小さな信号が混在しているFIDをデジタル変換すると、小さな信号に量子化ノイズがより大きく乗ります。FIDを取り込みながらFIDの減少に伴いレシーバーゲインを大きくし、デジタル化した後に元の大きさに数値的に戻してFTすれば量子化ノイズは小さく

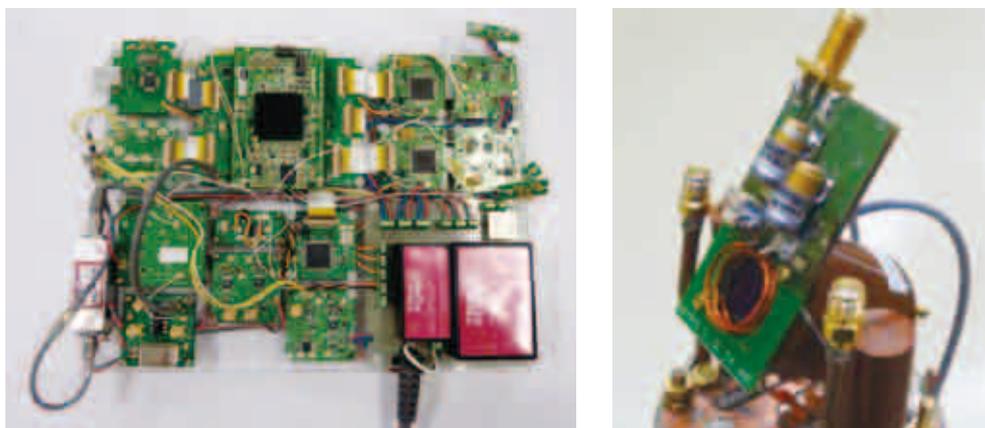


図1

(左) OPENCORE NMR分光計。A4サイズの亚克力ボード上にFPGAを核として電源やクロック、DDS、レシーバーなどがコンパクトに収められています。

(右) Disk MASプローブを装着した自作4mmプローブ。4mmプローブそのものをマジック角調整用に使い、ステーターに取り付けられた基板に組まれたDisk MASプローブにより薄膜試料からのNMR信号を取得します。

なります。このような一連の処理がOPENCORE NMR分光計によって実現されました。

量子化ノイズもただでさえ悪いNMRの感度を低くしていますが、通常は熱雑音によるノイズが感度を左右しています。コイルやデュプレクサ、プリアンプといった検出系を極低温に冷却することで感度を向上させるクライオプローブは溶液NMRではすでに実用化され、3～4倍程度の感度の向上が得られています。本研究室では、試料に手を加えることなく検出系だけを冷却し、固体の高分解能測定に必須なMASもできる固体NMR用のクライオプローブ (Cryocoil MAS) を開発しています。現在のところ感度が3～4倍向上した結果が得られており、通常では1週間かかる2次元測定を1日で測定することができました。

測定時間を短縮する方法として、近年、統計学の概念である共分散が同核種二次元NMRに応用されました。本研究室では、この共分散異核種・同核種共分散NMRへ拡張しました。間接次元の測定点数が十分ではないFIDをフーリエ変換すると分解能が落ち、さらに信号に測定打ち切りによるノイズがのります。共分散を用いると間接次元の測定点数は直接次元のそれと同じになり、分解能が向上します。間接次元の共分散処理はフーリエ変換ではないため打ち切りによるノイズも発生しません。共分散NMRはフーリエ変換NMRと全く同じスペクトルにはなりませんが、混合時間の依存性を調べることで距離情報を得ることができます。

解析手法としては、スピン同士が双極子相互作用で結合しているスピクラスタが空間的にどのような次元で分布しているのかが分かる解析手法を開発しました。多量子コヒーレンスを生成させ、展

開時間ごとに生成した多量子コヒーレンスの分布を記録します。多量子コヒーレンスが展開時間に応じて変化する様子をパーコレーション理論を応用した解析を行うことにより、メゾスコピック領域の大きさで分布しているスピクラスタの次元性の情報を引き出します。現在、セラミクス中の水素がどのように配置しているのかについて応用研究を行っています。

研究紹介の最後に、NMRのもつ非破壊・非侵襲性に着目して開発したDisk MASと可変磁場を用いた元素分析について述べます。

薄膜試料を破壊したり加工したりせずにそのままMAS NMRを測定できる手法 (Disk MASと呼んでいます) を開発しました。薄膜試料の重心が回転軸上にくるように薄膜試料をローター上部にとりつけ、ローターを従来のMAS機構で高速回転させることで薄膜試料のMASを実現させています。ステータには共振回路が組まれた基板を取り付けて、ラジオ波の送受信を行っています (図1右)。Disk MASには薄膜試料が非破壊に高速回転できる他にも、試料管で覆われていないという特徴があります。光や気体、熱線を試料に照射できるため他の分光法と組み合わせたりすることが期待できます。

可変磁場を用いることにより異核種間で定量的に元素分析を行いました。磁場強度が一定である通常のNMRではプローブを交換して異なる核種を測定します。異核種間で定量的に比較するには、プローブ毎に信号取得効率が違うためにそれぞれの核種で検量線を引くなど煩雑な手順が必要です。一方、磁場を掃引すると観測周波数を一定にできます。つまり、異なる核種でも信号検出効率を一定にすることができます。この原理に基づいてスピ



図2 NMR実験室の写真

7T磁場が3台 (左から1番目と右から1番目と2番目)、9.4Tと14Tが1台ずつ (左から2番目と真ん中) 写っています。

ン1/2の核種において溶液と固体の両方で実験を行い、異核種間で定量的に元素分析を非破壊にできることを実証しました。

研究装置

本研究室が専用に使用している磁場は、永久電流モードの超伝導磁石が7Tが3台、9.4Tと14Tが1台ずつの計5台（いずれもワイドボア）、0Tから7Tまで磁場強度を変えられる超伝導磁石（ナローボア）が1台の合計6台あります（図2）。また、すぐに修理や装置の改良・開発ができるように、各種卓上工作機械（ミニボール盤、フライス盤付き旋盤、電動糸鋸）が備えられ、他にも電子・電気回路工作用にハンダゴテは勿論のこと、小型スポット溶接機やレーザー基盤加工機を所有しています。

研究生活

当研究室は各自の裁量で自由に研究を進めています。拘束時間は特に設けていませんが、月曜日に進捗報告と、輪読または雑誌会を連続して行っています。その他に水曜日に学生有志が自主ゼミを開いています。装置以外にもコーヒーマル、ホームベーカリー、炊飯器といった調理器具もそろえています。朝は焼きたてのパンとコーヒーの香りが漂い、夜は炊きたてのご飯の匂いが充満し、このようなところでも自給自足の精神が発揮されているようです(?)。

NMRに関係するテーマで研究を行っていますが、それぞれが独立のテーマをもって研究しています。基本的に研究は各自の裁量に任せられています。また本研究室では「先生」と呼ぶことは禁じられています。スタッフも学生も学問上では対等な立場で研究に取り組んでいくという姿勢がそこかしこに現れており、独自性をもち自由にのびのびと研究ができる研究室だと思います。

味の素株式会社 イノベーション研究所

基盤技術研究所 分析応用研究グループ

五十嵐 俊介

私が味の素(株)に入社したのは今から約5年前のことです。当時は味の素(株)でどのような仕事が行われているのかほとんど想像がついておりませんでした。当社はアミノ酸や食品をはじめとして医薬品、化粧品、電子材料といった種々のアイテムを製造しているため、様々な体験をすることができ、私自身製薬メーカーや化学メーカーでのNMRや仕事についても幾分か想像がつくと思っております。そこで、当社におけるNMRや分析に関連する仕事を通じて企業研究の一例を紹介させていただき、進路を考えている学生の皆様の一助にもなればと思ひ、投稿させていただきました。

今から100年以上前、物理化学者・池田菊苗博士がおいしい調味料で日本人の栄養を改善したいという願いを込めて、昆布だしの研究を行いました。その結果、昆布だし特有の呈味が、古来知られていた甘・酸・塩・苦の四基本味にはない全く新しい第五の基本味であり、それを「うま味」と呼ぶことにしました。また、その本体成分がグルタミン酸塩であることを発見し、更にその製法を確立したことに基づき、当社の創業者・鈴木三郎助は博士とともに事業化して「うま味調味料」を世の中に広めてきました。それ以降、当社ではアミノ酸を軸に様々な事業を展開しております。

当社の研究所は、研究所の基盤となる技術を作り、未来の事業の種を創出するイノベーション研究所をはじめ、アミノ酸の生産プロセス開発と新素材の探索から工業化に取り組んでいるバイオ・ファイン研究所、科学にもとづいたおいしさや健康を追求する食品研究所、消化器疾患等に特化した創薬を行う創薬研究所(味の素製薬(株))により構成されております。各研究所および工場の品質管理部門にも分析部門が存在しており、それぞれの研究開発分野に適した分析を行っております。その中でイノベーション研究所の分析部門では構造解析、アミノ酸分析を中心とする分離分析に特化して技術を磨

き、新技術の開発を行いながら、研究開発の種の創出やお客様の安全安心につながる研究をしております。

私が所属している構造解析のグループでは、NMR(図1)、X線結晶構造解析(図2)、および計算科学を用い、産業用酵素や創薬ターゲット等のタンパク質について構造解析やリガンドとの相互作用解析を行っております。産業用酵素を対象とした研究では、立体構造に基づいてタンパク質にアミノ酸変異を導入することで、例えば酵素の活性や耐熱性の向上、基質認識の選択性の変化を通じて収率を向上させることができます。創薬研究では、立体構造に基づいてタンパク質とリガンドとの相互作用を解析することで、薬分子の設計を目指しております。グループの各自が遺伝子操作、タンパク質の発現と精製から、構造解析やアッセイまでを行っているため、企業にしては軽いフットワークを生かして構造解析テーマを推進しているのではないかと思います。

ここで当社のNMRについて少し紹介いたします。当グループは主に2台の600 MHz (14.1T) と1台の400 MHz (9.4T) のマグネットを使用しております。1台には、クライオプローブやサンプルチェンジャー(16サンプル用)を装着し、タンパク質の測定や多検体の測定を効率よく行っております。サンプルチェンジャーを装着することで効率的な測定が可能となるだけでなく、フラグメント化合物などのスクリーニングも可能となりましたので、表面プラズモン共鳴法(SPR)、計算科学やX線結晶構造解析を活用したFragment-based Drug Design(FBDD)も行い始めました。また、固体NMR測定用のプローブとNMRイメージング測定用のプローブも保有しており、これらも活用しております。

合成の部門は独自にNMRを保有していますので、彼らの化合物サンプルを測定することはほとんど



図1 NMR装置の写真



図2 X線回折装置の写真



図3 質量分析装置の写真

どありませんが、私たちは当社の中で一番高いスペックのNMRを使用しておりますので、微量サンプルや構造解析が難しい化合物について測定、解析を行うこともあります。また、他の研究者から依頼される分析にも日々対応しております。例えばアミノ酸発酵を阻害する原因物質を突き止めたい、新たな酵素を発見したため作用メカニズムを解明したい、などと様々なニーズがありますので、それに合わせて随時必要なNMR手法を立ち上げております。

一方で、当社のNMRでは難しい測定の場合、当社から近い理化学研究所や横浜市立大学、大阪大学蛋白質研究所の超高磁場NMRや特殊な装置が装着されているNMRを利用させていただいております。

また、当社はメーカーでありますので、安全安心な製品をお客様にお届けする責任があります。現場の分析部門で対応できない緊急案件では、現場の社員と共に、NMRでどのような測定を行うか、NMR以外にも有効な分析法は無いかなどを相談し、質量分析(図3)や無機分析をはじめとした各種分析法の専門家も交えて総合的に答えを導き出していきます。

分析アイテムは溶液だけでなく、アミノ酸や医薬品などの多くの固体サンプルも分析対象となります。例えば、グルタミン酸ナトリウムや核酸であるイノシン酸、グアニル酸により構成されている当社のうま味調味料は、単に高純度であれば良いというわけではありません。製品では、扱いやすさ、溶けやすさや保存安定性を決定づける結晶型も適切である必要がありますので、粉末や結晶のまま、固体

NMRや粉末X線回折による分析も行っております。学生時代はタンパク質の ^1H , ^{13}C , ^{15}N 核を主な観測対象として溶液NMR測定を行っていた私にとっては、入社してすぐに分析依頼を受けたフィルムの固体NMR測定が印象的でした。薄っぺらのフィルムをどのようにサンプル管に詰めるか、炭素原子がほとんど存在しないフィルムをどうやって測定するかなどに苦勞した末に、フィルム由来のNMRシグナルが観測出来るところまではたどり着きましたが、残念ながら依頼者の研究課題の解決に結びつく回答を提示するには至りませんでした。依頼された案件に対して必ずしも満足のいく答えをすることができない場合もあり、その時は大変心苦しく悔しく感じますが、NMR分析により依頼者の研究が推進したと感謝されたときにはとても嬉しいひと時であ

り、彼らの役に立つような分析法を作りたいというモチベーションに繋がります。

以上紹介させていただきましたように、企業においてもNMRの活用の方は色々と考えられると思いますが、ともすると漫然と業務をこなしがちになってしまいます。せっかく企業の中でNMRを活用できる立場ですので、企業という視点に立った上で、前回の研究室便りにて新日鐵住金株式会社の金橋先生が書かれたように、「NMRでしか測れない」情報をどうやって引き出すか、ということに日々頭を捻りつつも、それが企業研究の醍醐味と考えながら仕事しております。以上、簡単ではございますが当社の紹介を通じて企業研究のイメージをつかんでいただけますと幸いです。

京都トラベラーズ・インで開催された 第14回若手NMR研究会便り

京都大学大学院エネルギー科学研究科博士後期課程2年

神庭 圭佑

はじめに

2013年6月28日～30日に第14回若手NMR研究会が京都トラベラーズ・イン(京都市)で開催されました。若手NMR研究会は、NMRの勉強や若手研究者間の交流を目的とした合宿形式の研究会です。企画・運営についても若手研究者が行っております。ここでは実行委員を代表し、開催までの道のりや、会期中の様子についてご報告したいと思っております。

開催までの道のり

若手NMR研究会の運営は例年、NMRを用いて研究を行っている研究室が持ち回りで担当しています。私は昨年7月に北海道で開催された第13回研究会に参加しました。若手NMR研究会への参加はその時が初めてで、片平研として参加したのは私一人だったのですが、懇親会にて、「代表!? やっても大丈夫ですよ」と軽い気持ちで返事をした結果、「次回は京大、片平研主催でよろしくお願ひします」とご指名を受け、開催代表を担当することになりました。片平先生に経緯を報告して腹をくくった後、片平研究室の大学院生とそれぞれの知り合いを交えて話し合いを行いました。その結果、代表を神庭 圭佑(京大・片平研・D2)、副代表を山置 佑大(京大・片平研・D2)が担当し、初めに二人で会としての大まかな方向を決定しました。さらに近藤 敬子(京大・片平研・PD)、真嶋 司(京大・片平研・PD)、岩岡 諒(京大・片平研・D3)、北沢 創一郎(立命館大・北原研・D3)、大西 健人(立命館大・北原研・B4)、水野 正之(立命館大・北原研・B4)、若本 拓朗(立命館大・北原研・B4)、稲葉 理美(京府大・織田研・D1)、元木 祥子(京府大・織田研・M2)を加え、計11名が実行委員として準備を行いました。実際の運営は分業体制で行い、主に片平研メンバーが全体の運営と講演を担当し、企画は片平研以外の研究室のメンバーが中心に担当しました。

実行委員のメンバーはNMRを用いて生体分子の構造・相互作用・物性を研究しております。そこで、会の内容としては片平研のメンバーが得意としているタンパク質、核酸などの「生体高分子」に重点を置いた内容とすることにしました。NMRの測定・解析は初学者には敷居が高く、更に技術革新と研究の発展がそのことに拍車をかけていると感じます。さらに、近年の測定対象の高難度化に伴い、新たな見地を得るためにはますます幅広い知識が要求されるようになってきていると思います。しかしながら、この問題点に対してどう対処するのか、つまりは様々な対象に目を向ける等の「広く浅く」か、原理や特定の技術に特化する等の「深く狭く」のどちらの方針でアプローチするのかで会としての方向性が大きく変わってしまいます。副代表と相談した結果、今年は「広く浅く」の方針で企画することとしました。この点については後述いたします。

私は生化学若い研究者の会、生物物理若手の会など、他の若手の会の運営にも参加した経験があるので、様々な趣旨、分野の「若手の会」が乱立する中で若手会としての「若手NMR研究会」の存在意義を明確にし、NMR討論会等の学会や他のNMRの研究会との差別化を図ることが必要だと考えました。学会や研究会との違いは「基礎から話していただける」こと、「参加者の交流」だと思います。一方で若手の会をはじめ、合宿形式の勉強会はいずれも「交流」を売りにしているので、当会が「NMR」の「若手研究者主体」の研究会であることを考えて、「NMRの基礎から応用、実用への橋渡し」と「参加者による議論の機会の提供」に重点を置くこととしました。

ご講演していただく具体的な講師については、上記方針を踏まえた上で、実行委員が相談し、研究者が興味をもってもらえそうな先生を検討いたしました。また第12、13回では「学生セッション」として、参加者による口頭発表を行っていましたが、研究発表には自己紹介や交流としての意味合いが

あることを考慮し、なるべく多くの人に発表の機会を設けられるよう、今年はポスター発表と、そのフラッシュトーク(ランチョン形式)を行うことにしました。上記内容を踏まえて、最終的なプログラムは以下ようになりました。

6月28日(金)

講演1. 児嶋 長次郎 先生(大阪大学)

「パルスシークエンスを読むためのNMR入門」

講演2. 廣明 秀一 先生(名古屋大学)

「NMRによるタンパク質の立体構造決定
～CYANAとCNSを中心に～」

企画1. 研究室紹介プレゼンテーション

6月29日(土)

講演3. 坂本 泰一 先生(千葉工業大学)

「RNA研究とNMR」

講演4. 片平 正人 先生(京都大学)

「ライフイノベーションとグリーンイノベーション
におけるNMRの活躍

—抗プリオン核酸と木質バイオマスの研究実例—

企画2. ポスター発表フラッシュトーク

講演5. 新井 宗仁 先生(東京大学)

「NMRによるタンパク質

—リガンド相互作用の定量解析法」

講演6. 朝倉 哲郎 先生(東京農工大学)

「絹のNMR構造解析と再生医療材料への応用」

講演7. 西田 紀貴 先生(東京大学)

「in-cell NMRの現状と未来」

企画3. ポスター発表(15演題)

6月30日(日)

講演8. 佐藤 一 先生

(ブルカー・バイオスピン株式会社)

「NMRのハードウェア」

講演9. 菅瀬 謙治 先生

(公益財団法人サントリー生命科学財団)

「揺らぎが制御するヘム分解酵素反応の遠位効果」

会場については京都駅からのアクセスが良く、京都の繁華街の四条河原町の近くで、平安神宮のほぼ目の前に位置する京都トラベラーズ・インに決まりました。1年前に片平研による主催が決定した後から、プログラム、会場、協賛交渉、ホームページ、広報活動など実行委員が分担して準備してきました。予算については、多くの企業にご協賛していただくことができ、参加費を値下げできた点等、運営面で大きな助けとなりました。正直、主催者側

の立場としては数が集まるかどうかを最も危惧しておりましたが、多くの方々のご協力のおかげで、総数51名(講師9名、学生29名、企業3名、研究機関等10名)の参加をいただき、例年と同程度の規模で開催することができました。

会期中の様子

2泊3日の会期中は爽やかな天候に恵まれ、大きな問題なく、順調に運営できたと考えています。

今年の研究会は児嶋先生のご講演から始まりました。児嶋先生には、研究会全体を通して基礎となるNMRの基本原理についてご紹介していただき、ベクトルモデルと直積演算子を対比させながら、パルスプログラムの読み方についてご講演していただきました。続いて、廣明先生に、NMRによるタンパク質の立体構造決定について、及び関連ソフトCYANA、CNSを用いた具体的な構造決定の流れについてご講演していただきました。

2日目では、初めに、坂本先生にRNA研究におけるNMR法の活躍、特に抗体を認識するRNAアダプターや転写因子に結合するRNAアダプターの構造解析についてご講演していただきました。続いて、片平先生にはリボスイッチ及び抗プリオン活性を示すRNAアダプターの動作メカニズム解明、バイオリファイナー研究に向けたNMR法の応用例についてご講演していただきました。

昼食を挟んで、午後からは新井先生に特異値分解とグローバル解析を組み合わせた化学シフト摂動データ解析法についてご講演していただきました。朝倉先生には固体NMRを用いた絹の構造解析についての研究の軌跡、及びそこから得られた見地に基づいた人工血管を初めとした再生医療材料開発への取り組みについてご講演していただきました。2日目最後の演者の西田先生にはこれまでのin-cell NMR法の歴史、新規タンパク質導入方法の開発、及び長時間のin-cell NMR測定に向けた取り組みについてご講演していただきました。

3日目では、佐藤先生にNMRを開発する企業の立場から最新のNMR装置や測定技術についてご講演をしていただきました。最後に菅瀬先生に緩和分散法の基礎、及び具体的な応用例についてご講演していただきました。特に、ヘム分解酵素反応の揺らぎとその機能相関について、揺らぎの解析を行い、活性中心から離れた領域の重要性を見出した研究結果についてご講演していただきました。いずれのご講演も興味深い内容で、多くの質問・コメン

トがあり、白熱した議論となりました(写真1)。

合宿形式の研究会の醍醐味は、何と言っても参加者同士の交流に尽きると思います。研究の話から下らない話までをお酒の肴に、夜遅くまで盛り上がるといった機会は、学会などではなかなか得られない貴重な経験だと思います。

参加者の交流と参加者による研究発表については、1日目には夕食後、お酒を片手に参加研究室の紹介を行っていただきました(写真3)。参加者の所属する研究室がどのようなところなのか、どのような研究をしているのかなど「ユーモア」を交えつつ発表していただきました。2日目の片平先生のご講演の後には京都トラベラーズ・イン前で記念写真を撮りました(写真2)。その後、昼食をいただきながら参加者によるポスター発表のショートトークを行いました。さらに西田先生のご講演後にポスター発表(15演題)を行い、参加者、講師の先生方を交えて活発な議論が行われました(写真4、5)。今回は優秀ポスター賞を設けて、講師の先生方及び参加者による審査の結果、宗正智さん(大阪大学)と安西高廣さん(名古屋大学)の2名が受賞されました。2日目の懇親会では、すき焼きの鍋を囲いながら、参加者の交流が行われました。



写真1 講演中の様子。多くの質問・コメントがありました。

第14回研究会の反省と今後の発展

準備・運営に関しては、多くの方々のご協力のおかげで、盛会のうちに終えることができました。私個人としては、話すほうまで手が回ってなかった点が反省点ですが、全体としては大きなトラブルなく運営を行えたと考えております。重視していた「交流」、「NMRの基礎から応用、実用への橋渡し」と「参加者による議論の機会の提供」について、一定の成果が得られたと考えております。特に学生セッションを口頭からポスター形式に変えたことにより、上記目標の達成に貢献したと考えています。先生方のご講演が非常に好評であったのも運営を行った立場として嬉しく思います。一方で運営を行って感じたことを2点述べさせていただきます。



写真2 集合写真。参加者の皆様、講師の先生方、多くの方々のおかげで盛会ののちに終えることができました。

今回の会の話というよりは、この先の代の人たちのために運営を行って感じたことをこの場を借りて伝えさせていただきます。

① 会としての方向性をどうする？

生体高分子に焦点を合わせたこともあり、参加者層の分野の偏りを感じました。ここ数年、溶液、生体分子（特にタンパク質）中心の内容であったこともあり、固体、材料系との距離ができてしまっているように感じます。同じような分野だけに焦点をすれば、数年単位で見れば似たような内容にならざるを得ず、飽きられてしまうかもしれません。一方で、広い領域をカバーすれば深い議論は難しく、たとえば単にテーマをNMR一般にしてしまうと、深



写真3 懇親会の様子(1日目研究室紹介前)



写真4、5 学生セッション(ポスター発表)の様子。白熱した議論となりました。

い議論をすることが難しくなってしまいます。現実的な意味では、持ち回りで運営を行っているため、運営の中心が大学院生を中心とした若手研究者である以上、どうしても自分たちの行っている研究に偏った内容になります。もちろん次に参加される方もそのテーマに近い方が中心になるので、その次も似たようなテーマとなる可能性が大きいです。一方で、テーマの流れを大きく変えるには、分野の壁を超えた取り組みが必要ですが、そんなに簡単なことではないと思います。そこで例えば、NMR討論会常連ではないけれど、NMRを用いて面白い研究を行っている先生やNMRが主力ではないけれどNMRも活用している先生にも講演を行っていただくなど、運営に携わる人の特色を生かし、その代の運営メンバーだからこそできる内容にする工夫を行えばいいのではないかと思います。また、過去何代か遡って共通するテーマを見つけ、協力することも有効ではないかと思います。

② 持ち回りについてと開催時期についての検討

現状として、会を続けるにあたって「担い手」が必要ですが、運営が持ち回りのため、引き受けたときに初めての運営となる場合が多く、戸惑いや、負担となることもあるかと思います。また研究室が主催する形式なので、研究室の主催者の名前を借りる必要があります、主催する研究室への負担が大きくなってしまっているのが現状です。私は他の若手会(生物物理若手の会、生命科学若手の会)の運営にも参加した経験があるので、他の会と比較すると、前者は地方支部の持ち回りの運営、後者は毎年運営の統括専門の部署を設けており、現状の当会の運営との大きな違いは「2回目、3回目、それ以上の運営経験のある人も運営を行っていること」です。実際にやってみて、1回目ではわからないこと、できないことは多くあります。私自身、かなり他の若手の会で培った経験と、知り合いに協力していただいたことが運営を行うにあたって大いに助けになりました。一方で、未経験で勝手がわからないことも多く、世話役の経験があるかないではできることが違うと痛感しました。その点について話し合ったところ、年1回の運営とは別に本部(過去の代表などの運営経験者が必要に応じてアドバイザーになる等)を置き、運営の補助をするなどの案がありました。そうすれば、先生方への打診の幅が広がるなど、より幅広い分野のNMR研究をテーマとして視野に入れることができるかもしれません。また、本部を設

立しておけば、例えばX線や計算機の研究者と「構造」を共通のテーマとしてみるなど、他の分野の人を巻き込む選択肢もあるのではないかと案もありました。一方で、当会が「NMR」の「若手研究会」であるという点は、数ある若手会との差別化のために必要なことだと考えております（いくら他の分野と協力しても、他の会の1セッションになるようなことをするべきではない）。何年かに1回くらいの周期で、例年と違うことをしてもよいかもしれません。

また、開催時期についてはNMR討論会のある週で、その付近の会場で開催するという案も上がりました。その場合、過去の研究や発表するまでの内容でない結果、これからの研究に関する決意表明とかでもよいので交流を行う、あるいは相談コーナーを設け、現在の研究（精製がうまくいかない等）や進路の話をしてみるといった案もありました。NMR討論会に参加された方を主な対象とすれば、参加者も増えるのではないかと声がある一方で、そうすると回ごとの特色が薄れてしまう恐れがあるという意見もありました。いずれにせよ、次の世代に、こんな案もあったと託すことにします。

第15回若手NMR研究会は2014年、6月前後に千葉工大・坂本研究室主催で開催される予定です。近年は主にタンパク質研究を行っている研究室が中心となって運営を行っていましたが、坂本研究室では核酸のNMR研究を得意とされていることもあり、例年とは一味違った会を催していただけないかと思えます。この記事を読み、研究会に興味を持たれた方々が、参加、ご講演、告知等、それぞれの立場で当研究会にお力を貸していただくと幸いです。

末筆となりますが、このような会の運営に携われたおかげで、多くの方々と関わりをもつことができ、いろいろな意味で世界が広がり、大いに成長する機会をいただきました。ご参加いただいた皆様、講師の諸先生、会場の京都トラベラーズ・インの皆様、協賛企業・学会の関係者、スタッフの皆様、そしてアドバイザーの方々に、この場をお借りして心より御礼申し上げます。

参考サイト：

第14回若手NMR研究会ホームページ

<http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/bio/wakatenmr.html>

日本核磁気共鳴学会の決定事項

日本核磁気共鳴学会
2012年度 通常総会 議事次第

日時：2012年11月8日(木)12時05分～12時35分

場所：ウインクあいち大ホール

総会次第

1. 開会の辞
2. 会長挨拶
3. 2012年NMR討論会世話人挨拶
4. 事業報告
5. 2011年度収支決算の承認
6. 2012年度中間報告の承認
7. 2013年度収支予算案の承認
8. 2013年度役員を選任
9. ICMRBS-2016(京都)の決定
10. 2013年NMR討論会世話人挨拶
11. 閉会の辞

会員数

会員種別	2010年 9月30日	2011年 9月30日	2012年 9月30日
正会員	394	395	421
学生会員	113	128	140
名誉会員	9	10	12
賛助会員	7	8	8
合計	523	541	581

H24年度現役役員名簿

■ 会長 (H24-H25)

朝倉 哲郎 東京農工大学

■ 理事 (H24-H25)

池上 貴久 大阪大学

嶋田 一夫 東京大学

鈴木榮一郎 味の素

西村 善文 横浜市立大学

藤原 敏道 大阪大学

■ 理事 (H23-H24) 会長(*) 副会長(**)

朝倉 哲郎(*) 東京農工大学

内藤 晶(**) 横浜国立大学

阿久津秀雄 大阪大学

伊藤 隆 首都大学東京

河合 剛太 千葉工業大学

■ 会計監査 (H24-H25)

相沢 智康 北海道大学

山崎 俊正 農業生物資源研究所

■ 評議員 (H24-H25)

伊倉 光彦 Ontario Cancer Institute

池上 貴久 大阪大学

梶 弘典 京都大学

木川 隆則 理化学研究所

菊地 淳 理化学研究所

北原 亮 立命館大学

児嶋長次郎 大阪大学

嶋田 一夫 東京大学

鈴木榮一郎 味の素

高橋 栄夫 横浜市立大学

出村 誠 北海道大学

西村 善文 横浜市立大学

平沖 敏文 北海道大学

廣明 秀一 名古屋大学

藤原 敏道 大阪大学

■ 評議員 (H23-H24)

阿久津秀雄 大阪大学

朝倉 哲郎 東京農工大学

伊藤 隆 首都大学東京

稲垣 冬彦 北海道大学

大木 進野 北陸先端科学技術大学院大学

河合 剛太 千葉工業大学

河野 敬一 北海道大学

神田 大輔 九州大学

菅瀬 謙治 サントリー生命科学財団

内藤 晶 横浜国立大学

林 繁信 産業技術総合研究所

水野 元博 金沢大学

三森 文行 国立環境研究所

村田 道雄 大阪大学

飯塚 舜介 鳥取大学

山本 泰彦 筑波大学

事業報告

I. 現時点での会員数

II. 活動報告と方針の提案

●2011年度

1. 第50回NMR討論会
2. 「日本核磁気共鳴学会 若手研究者渡航費助成金」の募集と選定
3. 会員サービスの推進
4. その他

●2012年度

1. 第51回NMR討論会
2. 「日本核磁気共鳴学会 若手研究者渡航費助成金」の募集と選定
3. 会員サービスの推進
4. 学会機関誌 Vol.3特別号の発行
5. その他

●2013年度(方針)

第52回NMR討論会

1. 「日本核磁気共鳴学会 若手研究者渡航費助成金」の募集と選定
2. 会員サービスの推進
3. 学会機関誌 Vol.4の発行
4. その他

内藤 晶	横浜国立大学
西村 勝之	自然科学研究機構
三島 正規	首都大学東京
水野 元博	金沢大学
武藤 裕	武蔵野大学
山本 泰彦	筑波大学
若松 馨	群馬大学

平成25年度選出の評議員から理事(追加分)が選出された結果、平成25年度理事、会計監査、幹事は以下のように決定した。会長(*) H25副会長(**)

■理事

朝倉 哲郎(*)	東京農工大学	H23-H25
内藤 晶(**)	横浜国立大学	H25-H26
池上 貴久	大阪大学	H24-H25
嶋田 一夫	東京大学	H24-H25
鈴木榮一郎	味の素	H24-H25
西村 善文	横浜市立大学	H24-H25
藤原 敏道	大阪大学	H24-H25
阿久津秀雄	大阪大学	H25-H26
伊藤 隆	首都大学東京	H25-H26
河合 剛太	千葉工業大学	H25-H26
山本 泰彦	筑波大学	H25-H26

■会計監査(H24-H25)

相沢 智康	北海道大学
山崎 俊正	農業生物資源研究所

■幹事

出村 誠	北海道大学
加藤 晃一	自然科学研究機構
水野 元博	金沢大学
高橋 栄夫	横浜市立大学

日本核磁気共鳴学会 2012年度 通常総会 議事録

出席：出席88名+委任状56名

* 定足数[一般会員421名(2012年9月30日現在)]
/5=84名

* 配布資料と投影資料に基づき全て承認された。

* 2011年度収支決算について監査報告がなされた。

日本核磁気共鳴学会役員(第六期)(H24~H25)

平成25年度の評議員が選出された。

■評議員(H25-H26)

阿久津秀雄	大阪大学
浅川 直紀	群馬大学
浅野 敦志	防衛大学校
伊藤 隆	首都大学東京
稲垣 冬彦	北海道大学
金橋 康二	新日鐵住金
河合 剛太	千葉工業大学
白川 昌宏	京都大学
菅瀬 謙治	サントリー生命科学研究財団
武田 和行	京都大学
枋尾 豪人	京都大学

2013年度第52回NMR討論会

第52回NMR討論会は石川県金沢市で開催いたします。講演会場の石川県立音楽堂邦楽ホールは歌舞伎をはじめ様々な演劇、舞踊等の上演が行われる会場で、独特の和の雰囲気を持っています。国内外のNMR研究者が、金沢の歴史・伝統に触れながら有意義な討論を展開できる場になりたいと考えております。今回の討論会では、1日目(11月12日(火))の午後に国内招待講演を企画し、国内の大学・公的機関で行われている発展的なNMR研究や企業での材料開発へのNMRの応用の現況を伺います。また、2日目(11月13日(水))には特別講演2件と海外招待講演6件を予定しております。

若手ポスター賞は、第51回討論会と同様に、従来の大学や公的機関の若手、企業でNMRを開発する若手を対象とした『若手ポスター賞I』と、企業でNMRを使用する若手を対象とした『若手ポスター賞II』を設けます。

また、好評を得ているNMR初心者の方へのチュートリアルコースを、今年も討論会に先立ち開催いたします。

第52回NMR討論会 世話人 水野 元博(金沢大学)

会期：2013年11月12日(火)～14日(木)

チュートリアルコース 2013年11月11日(月)

会場：石川県立音楽堂(石川県金沢市昭和町20-1)

招待講演・特別講演のプログラム

国内招待講演 第1日目(11月12日(火))

15:30～16:05

招待講演1 座長 鈴木 榮一郎

縮合系合成高分子の溶液NMR構造解析

松田 裕生(帝人株式会社)

16:05～16:40

招待講演2 座長 浅野 敦志

鉄鋼業における固体NMRの活用

金橋 康二(新日鐵住金株式会社)

16:55～17:30

招待講演3 座長 水野 元博

多孔性ソフト結晶材料の化学と応用

北川 進(京都大学)

17:30～18:05

招待講演4 座長 大木 進野

質量選別した気相イオンのNMR分光法の開発

富宅 喜代一(神戸大学)

18:05～18:40

招待講演5 座長 池上 貴久

糖鎖の機能解明を目指したNMRアプローチ

加藤 晃一(自然科学研究機構)

海外招待講演・特別講演 第2日目(11月13日(水))

11:20 ~ 12:00

招待講演6 座長 竹腰 清乃理

Native Membrane Protein Structure in Lipid Bilayers Requires Solid State NMR

Timothy A. Cross (Florida State University)

13:20 ~ 14:00

招待講演7 座長 嶋田 一夫

Environmentally-controlled protein/protein interactions:

Insights provided by NMR into nature's switches

Kevin H. Gardner (University of Texas)

14:00 ~ 14:40

招待講演8 座長 楯 真一

Folding dynamics of topologically knotted proteins

S-T Danny Hsu (Academia Sinica)

14:55 ~ 15:35

招待講演9 座長 藤原 敏道

Solid -state NMR spectroscopy of membrane proteins

Stanley J. Opella (University of California, San Diego)

15:35 ~ 16:15

招待講演10 座長 甲斐荘 正恒

Enhancing Signal and Contrast in MRI with Long-Lived Hyperpolarization or Intermolecular Coherences

Warren S. Warren (Duke University)

16:30 ~ 17:10

特別講演1 座長 山本 泰彦

Personal Reminiscences on Helical Polymers by NMR

平沖 敏文(北海道大学教授)

17:10 ~ 17:50

特別講演2 座長 内藤 晶

Why can F_0F_1 ATPsynthase rotate?(F₀F₁ ATP合成酵素はなぜ回る?)

阿久津 秀雄(大阪大学名誉教授)

17:50 ~ 18:30

招待講演11 座長 朝倉 哲郎

Nuclear Magnetic Resonance:

A Powerful Tool for Elucidating the Interplay between Structure and Dynamics of Soft Matter

Hans W. Spiess (Max Planck Institute)

チュートリアルコース

日時：11月11日(月)

会場：石川県立音楽堂(邦楽ホール)

13:00～14:30

「メチル基を通して巨大な分子を観る」

池上 貴久 先生(大阪大学蛋白質研究所 准教授)

たとえTROSY-CRIPTなどの測定法を使っても、蛋白質主鎖のアミド基ではもはや観測できないような大きな分子量を対象とすることに挑戦がなされている。その鍵はメチル基を観ることである。一般的にメチル基は、その軸で速く回転し、さらに3つの ^1H スピンの化学シフト値が重なることのために感度が他の基よりも高くなることはよく知られていた。近年、それに加えて交差相関の働きにより、さらに横緩和が遅くなっていることも実証され、Methyl-TROSYの名で知られるようになった。この現象を利用すると、巨大分子どうしの相互作用だけでなく、その側鎖のダイナミクスも分かり、また、必ずしも帰属をしなくても、巨大な蛋白質のアロステリック効果に伴う構造変化なども追うことができるようになった。ここでは、それらの実験例とその原理について紹介したい。

14:45～16:15

「NMRおよびGIPAW計算を用いた有機EL、有機太陽電池の解析」

梶 弘典 先生(京都大学化学研究所 教授)

NMRが、他の解析手法では得ることが困難なユニークかつ重要な情報を与えてくれることは、本学会の皆様はよくご存知のことと思う。本チュートリアルでは、NMRを有機エレクトロルミネッセンス(有機EL)、有機太陽電池といった有機デバイスの解析に応用した例を紹介する。また、最近、分子間相互作用を考慮した化学シフトの計算が可能となってきた。GIPAWと呼ばれるこの手法の応用例に関しても紹介したい。

16:30～18:00

「NMRはいかに創られたか：7. フーリエ変換NMR」

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る。しかし、その行間には先人たちの汗と涙がにじみ、フィクションを超えるドラマが潜んでいる。本講演では時代を画したNMRの方法論の研究にスポットを当て、どのような時代背景の下でどういう人物が何をきっかけに歴史的な発想を得たのか、またどんな困難に出くわしてそれをどう解決して研究を完成させたかを人間的なエピソードを交えて話す。若い方々が話を通じて優れた科学者の研究に取り組む姿勢や学問に対する情熱を学んで頂ければ幸いである。今回はフーリエ変換NMRについて話す予定である。

ニュースレターの記録

NMRニュースレターは核磁気共鳴学会会員相互のNMRに関する情報交換の場を提供するものです。会員サービスの一環として、会員からご投稿いただいたニュースレターを会員メーリングリストで配信するとともに、学会ホームページでもバックナンバーを公開いたします。配信内容は6ジャンルに分類しております。

1. 学会からのお知らせ・学会誌新着情報
2. 若手研究者渡航費助成
3. NMR討論会・チュートリアルコース (参加方法、若手ポスター賞応募方法など)
4. 共催事業・学会・会議等開催案内
5. 求人 (企業・研究機関など)
6. 研究支援情報 (施設利用、教科書、機器提供、実験アイデア・ティップス、ソフトウェアの公開等)

◎ ニュースレターの受信設定 (会員個人登録情報の更新)

ニュースレターのメール配信をご希望の場合、会員専用ページからログインしていただき、個人登録メールアドレスの設定をお願いいたします。

学会ホームページ <http://www.nmrj.jp> から「入会・会員ページ」→「会員専用ページ」を選択してください。

◎ バックナンバーの閲覧方法

学会ホームページ <http://www.nmrj.jp> から「NMRニュースレター」→「バックナンバー」を選択してください。キーワード、発行日検索もできます。

◎ 記事の投稿方法について

会員からのニュースレターの投稿は随時受け付けております。原稿作成・投稿方法は、下記掲載の「ニュースレター投稿規定」に従ってください。

ニュースレター No.370-447 (2012年4月～2013年3月)

各号のニュース記事本文については、学会ホームページ <http://www.nmrj.jp> 「NMRニュースレター」→「バックナンバー」からご覧いただけます。

1. 学会からのお知らせ・学会誌新着情報

- | | |
|---|---|
| 374号 (12年5月7日) | http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120507_374_1.pdf |
| NMRニュースレターのリニューアルご意見募集 | |
| 389号 (12年7月10日) | http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120710_389_1.pdf |
| Ivano Bertini 教授ご逝去のお知らせ | |
| 390号 (12年7月13日) | http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120713_390_1.pdf |
| NMR討論会要旨集事前配布、役員選挙にあたって会費納入および身分、連絡先等更新のお願い | |
| 400号 (12年8月20日) | http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120820_400_1.pdf |
| NMRニュースレター配信アドレス変更のお知らせ | |
| 402号 (12年8月27日) | http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120827_402_1.pdf |
| 日本核磁気共鳴学会機関誌NMRのプレリリース版について | |
| 403号 (12年8月27日) | http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120827_403_1.pdf |
| 日本核磁気共鳴学会機関誌NMRプレリリース版掲載のお知らせ | |
| 405号 (12年8月31日) | http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120831_405_1.pdf |
| 日本核磁気共鳴学会機関誌NMRプレリリース版掲載のお知らせ | |

- 409号 (12年9月4日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120904_409_1.pdf
日本核磁気共鳴学会機関誌NMRプレリリース版掲載のお知らせ
- 414号 (12年9月11日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120911_414_1.pdf
日本核磁気共鳴学会機関誌NMRプレリリース版掲載のお知らせ
- 415号 (12年9月12日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120912_415_1.pdf
日本核磁気共鳴学会機関誌NMRプレリリース版掲載のお知らせ
- 417号 (12年9月20日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120920_417_1.pdf
日本核磁気共鳴学会機関誌NMRプレリリース版掲載のお知らせ
- 418号 (12年9月25日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120925_418_1.pdf
年会費の納入および連絡先などの更新のお願い
- 421号 (12年9月27日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120927_421_1.pdf
日本核磁気共鳴学会機関誌NMRプレリリース版掲載のお知らせ
- 424号 (12年10月13日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121013_424_1.pdf
2012年度通常総会および新評議員会の開催のお知らせ
- 430号 (12年11月1日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121101_430_1.pdf
日本核磁気共鳴学会機関誌NMR Vol.3掲載のお知らせ
- 432号 (12年11月2日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121102_432_1.pdf
2012年度通常総会の委任状ご提出のお願い
- 434号 (12年11月20日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121120_434_1.pdf
NMR学会機関誌についてのアンケート調査のお願い
- 441号 (13年1月1日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20130101_441_1.pdf
新年ごあいさつ

2. 若手研究者渡航費助成

- 370号 (12年4月6日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120406_370_1.pdf
平成24年度第1回若手研究者渡航助成の募集について
- 373号 (12年4月28日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120428_373_1.pdf
日本核磁気共鳴学会『若手ポスター賞』の拡大について
- 379号 (12年5月26日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120526_379_1.pdf
平成23年度第3回若手研究者渡航費助成金 (ISMRM) 参加報告
- 380号 (12年5月26日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120526_380_1.pdf
平成24年度第1回若手研究者渡航助成の締め切り (5月31日) 迫る
- 391号 (12年7月17日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120717_391_1.pdf
平成24年度第1回若手研究者渡航費助成金 (EUROMAR2012) 参加報告
- 393号 (12年7月31日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120731_393_1.pdf
平成24年第2回若手研究者渡航費助成金の募集について
- 397号 (12年8月9日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120809_397_1.pdf
平成24年度第1回若手研究者渡航費助成金 (ICS2012) 参加報告
- 404号 (12年8月29日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120829_404_1.pdf
若手研究者渡航費助成金によるXXVth ICMRBS参加報告書 (1)
- 407号 (12年8月31日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120831_407_1.pdf
若手研究者渡航費助成金によるXXVth ICMRBS参加報告書 (2)
- 408号 (12年8月31日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120831_408_1.pdf
若手研究者渡航費助成金によるXXVth ICMRBS参加報告書 (3)
- 413号 (12年9月9日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120909_413_1.pdf
第2回若手研究者渡航助成の締め切り (9月15日) 迫る

- 433号 (12年11月1日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121101_433_1.pdf
平成24年度第1回若手研究者渡航費助成金(15th ICRP)参加報告
- 435号 (12年11月26日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121126_435_1.pdf
平成24年第3回若手研究者渡航費助成金募集
- 443号 (13年1月17日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20130117_443_1.pdf
若手研究者渡航助成金応募の締切延長(平成25年1月25日まで)

3. NMR 討論会・チュートリアルコース(参加方法、若手ポスター賞応募方法など)

- 372号 (12年4月26日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120426_372_1.pdf
第51回NMR討論会ホームページ開設のお知らせ
- 388号 (12年6月28日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120628_388_1.pdf
『若手ポスター賞』の拡大と副賞『JEOL RESONANCE賞』について
- 392号 (12年7月18日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120718_392_1.pdf
『第51回NMR討論会』発表申込開始
- 396号 (12年8月6日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120806_396_1.pdf
第51回NMR討論会発表申込締切のお知らせ
- 398号 (12年8月10日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120810_398_1.pdf
第51回NMR討論会発表申込締切延長のお知らせ
- 399号 (12年8月20日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120820_399_1.pdf
第51回NMR討論会若手ポスター賞IIを除く発表演題登録を締め切りました
- 423号 (12年10月3日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121003_423_1.pdf
第51回NMR討論会プログラム公開と事前参加登録締切のお知らせ
- 436号 (12年11月27日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121127_436_1.pdf
第51回NMR討論会 写真アルバム公開のお知らせ

4. 共催事業・学会・会議等開催案内

- 375号 (12年5月8日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120508_375_1.pdf
第15回 固体NMR技術交流会のご案内
- 376号 (12年5月9日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120509_376_1.pdf
高分子学会NMR研究会のお知らせ
- 377号 (12年5月18日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120518_377_1.pdf
よこはまNMR構造生物学研究会 第45回ワークショップ「イメージングと創薬」
- 381号 (12年5月29日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120529_381_1.pdf
理研NMRセミナー 2012のご案内
- 381号 (12年5月30日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120530_381_2.pdf
NMR学会学会誌「NMR」への投稿をお願いいたします。
- 384号 (12年6月4日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120604_384_1.pdf
第13回若手NMR研究会参加登録受付開始のお知らせ
- 387号 (12年6月15日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120604_387_1.pdf
第13回若手NMR研究会参加登録受付開始のお知らせ
- 395号 (12年8月3日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120803_395_1.pdf
第3回国際シンポジウム「Drug Discovery and Design by NMR」開催のお知らせ
- 401号 (12年8月25日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120825_401_1.pdf
平成24年度日本分光学会NMR分光部会 集中講義「産業利用を目指す最新NMR手法の実践的講義」のご案内

- 416号 (12年9月19日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120919_416_1.pdf
第3回国際シンポジウム「Drug Discovery and Design by NMR」出欠締切9月26日
- 419号 (12年9月25日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120925_419_1.pdf
5th Asia-Pacific NMR Symposium (APNMR5) 開催のお知らせ
- 420号 (12年9月25日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120925_420_1.pdf
ACS National Meeting の案内およびポスター募集
- 426号 (12年10月22日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121022_426_1.pdf
Pharmaceutical NMR Lecture Series in Osaka
- 427号 (12年10月22日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121022_427_1.pdf
蛋白研セミナー開催のお知らせ
- 428号 (12年10月22日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121022_428_1.pdf
Lecture Series for NMR Structure Determination
- 429号 (12年10月30日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121030_429_1.pdf
高分子学会NMR研究会・高分子と水・分離に関する研究会 合同研究会
- 437号 (12年11月27日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121127_437_1.pdf
第4回圧縮センシングとその周辺研究会
- 438号 (12年12月4日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121204_438_1.pdf
RRR ワークショップご案内
- 442号 (13年1月15日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20130115_442_1.pdf
固体NMR・材料フォーラム (5/16) のご案内
- 445号 (13年2月8日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20130208_445_1.pdf
よこはまNMR構造生物学研究会 第46回ワークショップ
- 446号 (13年2月26日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20130226_446_1.pdf
平成24年度 先端研究施設共用促進事業報告会
- 447号 (13年3月11日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20130311_447_1.pdf
岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム

5. 求人 (企業・研究機関など)

- 378号 (12年5月21日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120521_378_1.pdf
京都大学化学研究所 研究員 (FIRST 最先端研究開発支援プログラム) 募集
- 411号 (12年9月7日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120907_411_1.pdf
京都大学大学院理学研究科化学教室教員公募
- 422号 (12年9月28日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120928_422_1.pdf
特任研究員募集
- 431号 (12年11月1日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121101_431_1.pdf
NMR測定についての特任研究員募集
- 439号 (12年12月22日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121222_439_1.pdf
研究員募集
- 444号 (13年2月5日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20130205_444_1.pdf
研究系、技術系職員募集

6. 研究支援情報 (施設利用、教科書、機器提供、実験アイデア・ティップス、ソフトウェアの公開等)

- 371号 (12年4月14日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120414_371_1.pdf
「創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業」公募 (第2期)
- 383号 (12年6月1日) http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120601_383_1.pdf
理研NMR施設外部利用課題の平成24年度募集 (第2回)

385号(12年6月5日)	http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120605_385_1.pdf
平成24年度「先端核磁気共鳴装置群の産業利用支援プログラム」利用課題募集について(第2回)	
386号(12年6月6日)	http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120606_386_1.pdf
平成24年度第2回NMR施設外部利用課題募集のお知らせ	
394号(12年8月1日)	http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120801_394_1.pdf
故前川先生遺児育英基金募金のお知らせ	
406号(12年9月3日)	http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120903_406_1.pdf
先端核磁気共鳴装置群の産業利用支援プログラム利用課題募集	
410号(12年9月5日)	http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120905_410_1.pdf
理研NMR施設外部利用課題の募集(第3回)	
412号(12年9月6日)	http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20120906_412_1.pdf
NMR施設外部利用課題募集のお知らせ	
425号(12年10月17日)	http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121017_425_1.pdf
定量NMRクラブ第1回会合のご案内	
440号(12年12月28日)	http://www.nmrj.jp/pdf/nl/20121228_440_1.pdf
井上春成賞募集案内	

ニュースレター投稿規定

本ニュースレターは日本核磁気共鳴学会会員相互のNMRに関する情報交換の場を提供するものです。会員からの情報提供(投稿)を随時受け付けます。お送りいただいた原稿は、原則として無審査で掲載しますが、NMRに無関係のものや公序良俗に反するなど本レターに不適切と理事会で判断したものは掲載不可とします。なお文責は投稿者にあり、本学会はレターの内容に起因するトラブルには一切責任を負わないものとします。

投稿ご希望の方は投稿規定をご覧ください、原稿(PDF)を指定送付先(※)までお送りください。

[1] ニュースレターの内容について

▶ 学会からのお知らせ・学会誌新着情報

学会・学会事務局から会員への連絡事項。日本核磁気共鳴学会機関誌の新着情報。

▶ 若手研究者渡航費助成

若手研究者渡航費助成金(旧:京極記念基金)により参加された方の報告書。

▶ NMR討論会・チュートリアルコース

NMR討論会の発表・参加案内。チュートリアルコースの参加案内。若手ポスター賞応募方法など。

▶ 共催事業・学会・会議等開催案内

講演会・研究会のお知らせ。国際会議の開催案内、参加報告(内容・感想等)。研究室の訪問者による小規模セミナー等で部外者参加を歓迎される場合など。

▶ 求人

企業、研究機関等からの求人情報。博士研究員・教官等の公募案内。

▶ 研究支援情報

施設利用、教科書(※1)、機器提供(※2)、その他NMRに関する研究支援情報(※3)。

※1:新刊書の書評、最近読んだ興味深い論文の紹介。

※2:新製品情報(新製品の紹介は賛助会員に限らせて頂きます)。不用物品情報(譲り受け等の交渉に関しては直接本人同士でお願いします)。

※3:実験上のちょっとしたアイデア・工夫・ティップス、ソフトウェアの公開、出版はしないが報告しておきたい興味深い実験結果・スペクトル、研究に関する報告等。ただし、本レターはプライオリティーを保証するものではありません。自己の責任においてご投稿ください。引用はニュースレター

内では自由ですが、他所で引用されたい場合はご本人の了解を得て私信として引用してください。

[2] 原稿の書式について

- ▶ 原稿 (PDF) の長さは原則としてA4半ページ程度までとします。ただし、研究に関する報告、国際学会参加報告については2ページまでとします。
- ▶ 書式：1行目左端に日付 (2009年4月1日なら2009/04/01と書いて下さい)。2行目にタイトルを書いて下さい。3行目に所属・名前を書いて下さい。一行あけ、5行目から本文を書き始めてください。フォントは角ゴシック体、サイズはタイトル16ポイント、他はすべて12ポイントとしてください。原稿 (PDF) はそのまま本学会ホームページに掲載します。
- ▶ 送付：原稿 (PDF) はメール添付ファイルで指定送付先 (※) へお送りください。メールのタイトルは“ニュースレター”としてください。
※指定送付先 kyoumei_postman@sci.hokudai.ac.jp
- ▶ メールには原稿 (PDF) を添付する以外に、メール本文には原稿の日付、タイトル、所属・名前をコピーし、一行あけて要約を記載してください。要約は会員メール案内用に使います (若干編集する場合があります)。

日本核磁気共鳴学会規約

日本核磁気共鳴学会会則

第1条 本会は、日本核磁気共鳴学会 (The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan) という。

第2条 本会は、核磁気共鳴に関する基礎・応用研究、並びに啓蒙・教育活動を推進し、我が国における核磁気共鳴研究の発展に寄与することを目的とする。

第3条 本会は、学術集会の開催、会報の発行、その他前条の目的を達成するために必要な事業を行う。

第4条 本会は、必要な地に支部を置くことができる。

第5条 本会の会員は一般会員、学生会員、賛助会員および名誉会員とする。

1. 一般会員および学生会員は核磁気共鳴に関する研究に従事、またはこれに関心を持つ個人であって、本会の目的に賛同し、定められた会費を納める者をいう。
2. 賛助会員は本会の目的に賛同し、定められた賛助会費1口以上を納める個人または団体をいう。
3. 名誉会員は、我が国の磁気共鳴研究に特に功労のあった者から、理事会の推薦を経て総会の議決により決定する。

第6条 会員は本会の行う諸事業に参加し、本会が出版物を発行する際は配布を受けることができる。

第7条 会員として入会しようとする個人または団体は、細則に定められた手続きに従って申込み、会長の承認を得なければならない。

第8条 会員は下記の会費を納めるものとする。ただし名誉会員はこれを要しない。原則として、毎年3月31日までに次年度の会費を納入するものとする。

一般会員 年額 7,000円

学生会員 年額 3,000円

賛助会員 年間 一口以上 (一口50,000円)

第9条 会員は会長に届け出て退会することができる。会費を滞納した会員、または理事会で理由をあげて本会の会員として適当でないと決議された会員に関して、会長はそれらの者の会員資格

を停止、あるいは除籍に処することができる。

第10条 本会には、次の役員 (理事、評議員) および会計監査をおく。

1. 理事 10名以内 (会長、副会長各1名を含む)
ただし、会長の理事任期が3年目になる場合は11名以内。
2. 評議員 35名以内 (理事を含む)
3. 会計監査 2名

第11条 役員は一般会員の中から一般会員の投票により選出され、総会で承認を得るものとする。理事は役員の内選により決定する。会長、副会長は理事の内選による。会計監査は理事以外の一般会員の中から一般会員の投票により選出される。役員の内選による。会長の任期は選出されてから2年とし、役員任期が3年となることを妨げない。会長は連続して再選されないものとする。ただし、非連続の再選はこれを妨げない。

第12条 会長は本会を代表して会務を総括する。

第13条 会長は理事会の承認を得て諸業務担当の幹事若干名をおくことができる。業務担当幹事は会長を助け、本会の運営にあたる。

第14条 副会長は会長を補佐し、会長が欠けたとき、または会長に事故があるときは会長の職務を代行する。

第15条 理事は理事会の審議に加わるほか、会長を助けて会務を執行する。

第16条 評議員は評議員会の審議に加わり、会の運営について評議する。また、理事会の諮問があった事項、その他必要と認める事項について助言する。

第17条 会議を分けて、総会、評議員会、理事会の3つとする。

第18条 総会を分けて、通常総会と臨時総会とし、会長がこれを召集してその議長となる。通常総会は毎年1回開催する。臨時総会は次の場合にこれを開く。

- (1) 理事会が必要と認めた場合
- (2) 一般会員の3分の1以上から議案を添えて請求があった場合

第19条 総会は一般会員の5分の1の出席により成立し、議事は出席者の過半数の同意を持って

決する。ただし、可否同数のときは議長がこれを決する。一般会員は総会における議決権の行使を他の出席者に書面をもって委任することができる。

第20条 評議員会は会長がこれを招集して議長となる。評議員会は年1回以上これを開く。ただし、理事会が必要と認めた場合はこれを開かなければならない。

第21条 評議員会は2分の1以上の出席がなければ開くことができない。ただし、出席者に書面をもって委任することができる。評議員会の議事は出席者の過半数の同意をもって決し、可否同数の場合は議長がこれを決する。

第22条 理事会は会長がこれを招集して議長となる。理事会は会則に定めてある事項ならびに総会および評議員会の執行について議決する。

第23条 理事会は3分の2以上の出席がなければ開くことができない。理事会の議事は出席者の過半数の同意をもって決し、可否同数の場合は議長がこれを決する。ただし、理事会に出席できない理事はあらかじめ通知された事項について書面をもって議決に加わることができる。理事会があらかじめ通知していない事項について可決した場合は、これを欠席理事に通知しその賛否を求め、理事会の決議とすることができる。

第24条 理事会は年1回以上開催するものとする。

第25条 本会の会計年度は4月1日に始まり、翌年3月31日に終わる。

第26条 本会則の施行についての細則は別に定め、その変更は理事会の議決を経る。

第27条 本会則の変更ならびに本会の解散は総会の議決を経る必要がある。

第28条 本会則は、2001年11月15日より施行する。

第29条 付則

2004年4月から3年間は経過措置として、役員半数の任期を3年とすることができる。

2001年11月15日

日本核磁気共鳴学会総会議決

2002年4月1日

制定

2002年11月7日

改定

2003年11月26日

改定

2008年11月12日

第10条 評議員数、および**第11条** 会長の非連続選出について

改定

2009年11月11日

第10条、第11条、第12条

改定

細 則

第1章 会員

第1条 本会に入会を希望する者は、所定の入会申込書に必要事項を記入し、会長に提出するものとする。

第2章 総会

第2条 総会の議案は会長が作成し、理事会の議を経た後提出する。議案には前年度の事業内容および収支決算、新年度の事業計画、および収支予算を含むものとする。なお、一般会員の3分の1以上の賛成を得て、理事会に提案があった場合には、これを最も近い総会の議題としなければならない。

第3条 総会を開くときは、会長は予定された審議事項の内容を一般会員にあらかじめ通告しなければならない。

第3章 役員を選出

第4条 毎年役員半数を改選する。役員および会計監査の候補者は次のものの中から一般会員の投票によって選ぶ。

1. 立候補した一般会員
2. 一般会員が推薦した一般会員（以下会員推薦候補者）
3. 理事会が推薦した一般会員（以下理事会推薦候補者）
4. 会計監査と役員を兼ねることはできない。

第5条 役員および会計監査の投票は次のように行う。

1. 理事会は役員および会計監査の立候補者、および会員推薦候補者をつのり、理事会推薦候補者ととも一般会員に公示し、一般会員の投票により役員および会計監査候補者を選ぶ。
2. 会長は一般会員の中から2名を選んで選挙管理委員を委嘱する。選挙管理委員会は選挙事務を行い、一部を選挙管理委員会管理の下に業者に委託することができる。選挙管理委員は被選挙権を有する。
3. 役員は連続して3回まで、会計監査は連続して

2回まで選出されることができる。それぞれ退任後2年間は同じ役職に就任することはできない。すでに、上記の選出回数に達した者の氏名は選挙要項に公告される。

4. 役員は得票者中の上位の者より順に改選定員数以内を選出、会計監査は得票者中の上位の者より順に2名を選出する。同数得票者については選挙要項に従って順位を定める。

第4章 幹事

第6条 会長は理事会の承認を得て、会員の中から、必要に応じて諸業務担当幹事を委嘱する。幹事の任期は1年とする。ただし、会長の任期内で延長を妨げない。

第5章 学会機関誌編集委員会

第7条 本学会に学会機関誌編集委員会をおく。

第8条 学会機関誌編集委員長は会長が理事の中から指名し、理事会の承認をもって決定する。

第9条 学会機関誌編集委員会は定期的に学会機関誌を発行し、会員に情報を発信する。

第10条 学会機関誌編集委員は編集委員長が会員の中から指名し、理事会の承認をもって決定する。

第6章 事務所

第11条 本会の事務所は次のところにおく。

日本核磁気共鳴学会事務局〒650-0033 神戸市中央区江戸町85-1 ベイ・ウィング神戸ビル10階 (株)プロアクティブ内

第12条 年会費は(株)プロアクティブが指定する方法により納入するものとする。

第7章 細則の変更

第13条 本細則の変更は理事会の議決による。

第14条 本細則は、2001年11月15日よりこれを実施する。ただし、本会発足時、第1回の役員を選出および幹事の承認は総会で行うものとし、それらの任期は2004年3月31日までとする。

2001年11月15日

日本核磁気共鳴学会総会議決

2002年4月1日

制定

2002年11月6日

改定

2003年6月21日

改定

2003年11月25日

改定

2005年6月25日

改定

2007年5月12日

改定

2008年4月29日

第5条-3 非選出期間の設定ならびに文言の修正。

第11条 プロアクティブの移転に伴う住所の変更。

改定

2008年11月11日

第6条 幹事の選出、任期について

改定

2009年3月21日

第4条、第5条

改定

2012年11月7日

第5章 第7、8、9条 学会機関誌編集委員会の定義について追加

改定

2013年3月17日

第5章 第10条 学会機関誌編集委員の定義について追加

改定

選挙要項

第1条 日本核磁気共鳴学会細則第3章に定める役員および会計監査の選出が、円滑に行われるようこの要項を定める。

第2条 選挙管理委員会は役員および会計監査の選挙を行うたびごとに設け、当選人を理事会へ報告した時点で解散する。

第3条 選挙管理委員会は委員の互選により委員長を定める。

第4条 選挙管理委員会は一般会員に対して役員および会計監査選挙の告示を行う。

第5条 選挙管理委員会は役員および会計監査の立候補者、および会員推薦候補者の受付を一般会員に公示しなければならない。

第6条 役員および会計監査の候補者を推薦する場合は、一般会員1名につき役員候補者は3名以内、会計監査は1名を推薦することができる。役員候補者は3名以上推薦のあった会員を会員推薦役員候補者とする。

第7条 選挙管理委員会は、候補者の氏名、その他必要な事項を掲載した候補者名簿を作成し、

これを選挙用ウェブサイトに掲載しなければなら
ない。

第8条 投票は選挙用ウェブサイトで行う。投票用
候補者リストより、役員は10名以内、会計監査
は2名以内を選ぶ。

第9条 開票は、選挙管理委員会がこれを行う。

第10条

1. 評議員および会計監査は、得票数のもっとも
多い候補者から、順次、会則第10条および細
則第5条によって定められた定数までの候補者
を当選とする。評議員、会計監査ともに当選
圏内にある者は前者の当選者とする。

2. 末位に得票数の等しい候補者が2名以上あっ
たときは、選挙管理委員会はこれらを併記して
理事会に報告する。これらの候補者の当落は
理事会が決定する。

第11条 評議員会における理事の選挙は選挙担当
理事が管理する。新理事の被選挙権は次年度役
員に選ばれた評議員にのみある。選挙権は次年
度の全評議員にある。選挙は5名連記の無記名
投票によって行い、定数および次点を決定する。
開票に当たっては被選挙権を有しない評議員が
立ち会う。

第12条 理事会における次期会長および次期副会
長の選挙は選挙担当理事が管理する。まず、次

期会長の選挙を行い、その結果を踏まえて次期
副会長選挙を行う。次期会長、次期副会長の被
選挙権、選挙権は次年度の全理事にある。ただ
し、現会長は会則第11条に基づき次期会長の被
選挙権を持たない。副会長の任期は役員任期内
とする。その後任の副会長の任期は会長の任期
終了までとする。選挙は無記名投票によって行
う。開票は選挙担当以外の理事の立会いの下に
行う。

第13条 評議員および会計監査の選挙に関して疑
義を生じたときは、選挙管理委員会の合議によっ
て決定し、理事会に報告するものとする。

2003年6月21日

制定

2009年3月21日

第6条、第10条

改定

第11条、第12条

追加

2009年7月11日

第13条

改定

2012年7月14日

第7、8条

改定

日本核磁気共鳴学会 機関誌「NMR」投稿規程

日本核磁気共鳴学会 機関誌「NMR」は主にNMRに関する情報を公開し、会員の皆様の学術交流を目的とした会員サービスを提供します。本学会の会員の皆様から原稿の種別で記した欄に奮ってご寄稿いただくようお願いいたします。ただし、会員からの投稿原稿の採択の可否は編集委員の査読結果をもとに編集委員会で決定します。なお掲載された著作物の著作権は本学会に帰属するものとします。依頼原稿に関しては編集委員会での承認を経て会員以外の方に依頼することもあります。

執筆原稿は以下の原稿のフォーマットを参照してワープロで作成し、本文・図・表を含むファイルを下記編集委員長までメールで投稿してください。図や表を他の文献から引用して使用する場合には投稿前に著作権所有者から許可を得てください。図も含めた依頼原稿については担当編集委員にメール添付にて提出してください。

学会機関誌編集委員長 内藤 晶
naito@ynu.ac.jp

原稿の種別と字数

● 会長メッセージ

NMR学会会長からのメッセージ。2000字以内、1頁。

● 巻頭エッセイ

主にNMR討論会特別講演者の講演要旨。NMR討論会やNMR学会との関わりなどについて自由に書いてもらう。NMR討論会の要旨と共通であってもよいとする。2000字～4000字 1～2頁(図表を含む)。簡単な履歴と顔写真を提出してください。

● 解説

あるテーマについて著者の成果を中心にそのテーマの分野の現状を専門外の読者にも分かりやすく解説する。8000字～16000字 4～8頁(図、表を含む)。簡単な履歴と顔写真を提出してください。

● トピックス

2年以内に発展した新しいNMRの展開について解説したミニレビュー。4000～8000字 2～4頁(図、表を含む)。簡単な履歴と顔写真を提出してください。

● 研究報告

投稿者(会員)が単著あるいは共著(非会員でも

可)で行ったNMRに関するオリジナル研究報告。6000～12000字 3～6頁(図、表を含む)。簡単な履歴と顔写真を提出してください。

● NMR基礎講座

主にNMR討論会のチュートリアル講演者等によるNMRの基礎についての解説。4000～10000字 2～5頁(図、表を含む)。簡単な履歴と顔写真を提出してください。

● 技術レポート

NMRの装置や測定方法の開発を解説したレポート。4000～8000字 2～4頁(図、表を含む)。簡単な履歴と顔写真を提出してください。

● NMR便利帳

会員がNMR実験に関して便利と思われる装置(ハード)や実験方法・解析(ソフト)の工夫、その他、最近とくに取り組みがさかんになりつつある研究上の安全衛生(磁場、高気圧、高電圧、酸欠、毒物劇物)などについて便利な点を分かりやすく解説する。4000～6000字 2～3頁(図、表を含む)。簡単な履歴と顔写真を提出してください。

● 海外学会参加報告

若手研究者渡航費助成金受領者は必ず寄稿してください。受領者はニューズレターに報告することが義務付けられているので、この原稿が学会誌にも掲載されます。さらに、会員が参加した海外学会報告の寄稿を歓迎します。2000～4000字 1～2頁(図、表を含む)。

● NMR研究室便り

主にNMRを使って研究を行っている大学や公的機関、企業の開発室が構成員、研究テーマ、特徴など、研究室の内容を紹介する。2000～6000字 1～3頁(図、表を含む)。

● 若手NMR研究会だより

若手NMR研究会の主催者による研究会報告、参加者の報告、講演者の要旨の寄稿を歓迎いたします。4000～8000字 2～4頁(図、表を含む)。

原稿のフォーマット

◇ 表題は14ポイント、テキストは12ポイントで日本語は明朝体、英語はTimesのフォントで書いて、doc、あるいはdocxファイルで提出してください。

- ◇ テキストは表題、所属、本文、文献、表、図の順番にして提出してください。
 - ◇ 巻頭エッセイ、解説、トピックス、研究報告、NMR基礎講座、技術レポート、NMR便利帳の著者は略歴と顔写真のファイルを提出してください。
 - ◇ 図はTIF, JPG, PDFファイルで600 dpi以上の解像度で作成し、提出してください。
 - ◇ 図と表には番号を付けて説明を記入してください。
 - ◇ 文献は
- 1) Javkhlantugs, N., Naito, A., and Ueda, K., (2011) Molecular dynamics simulation of bonbolitin II in the dipalmitoylphosphatidylcholine membrane bilayer. *Biophys. J.* **101**, 1212-1220.
 - 2) 内藤 晶 (2011) 光センサータンパク質の情報伝達機能. 化学 **66**, 68-69.
 - 3) Saito, H., Ando, I, and Naito, A. (2006) Solid State NMR Spectroscopy for Biopolymers. Principles and Applications. pp. 1-464, Springer, Dordrecht.
- を参考にして記入してください。

賛助会員名簿

味の素株式会社イノベーション研究所
 アジレント・テクノロジー株式会社
 SIサイエンス株式会社
 株式会社JEOL RESONANCE
 株式会社シゲミ
 ジャパン スーパーコンダクタ テクノロジー株式会社
 大陽日酸株式会社
 ブルカー・バイオスピン株式会社

平成25年9月4日現在の本学賛助会員は上記の通りです。
 本学会の事業に対してご賛助いただきましたこと、厚く御礼申し上げます。

学会機関誌編集委員名簿 (2012, 2013年度)

編集委員長	内藤 晶	横浜国大院工
副編集委員長	池上 貴久	阪大蛋白研
	河合 剛太	千葉工大
編集委員	鈴木榮一郎	味の素
	出村 誠	北大院先端生命科学研
	浅野 敦志	防衛大応用化学
	松森 信明	阪大院理
	鳥澤 拓也	中外製薬
	川村 出	横浜国大院工
	中澤 靖元	東京農工大科学博物館
	上田 卓見	東大院薬
	五十嵐俊介	味の素
	菅瀬 謙治	サントリー生有研

編集後記

日本核磁気共鳴学会機関誌「NMR」は昨年発行したVol.3 特別号において内容の刷新を図りました。特に、学会連絡事項に比べて、研究報告の割合を大幅に増やしました。また、会員の皆様に学会誌の存在を知っていただくため、電子版に加えて冊子体の発行を行いました。もう一点、寄稿された原稿は実際の発行までの期間、プレリリース版として、会員にはいち早く閲覧ができるようにしました。これに加えて機関誌のホームページの充実を図りました。Vol.3発行後に会員アンケートを回収させていただきましたが、回答では機関誌の発行時期(10月末)、発行回数(年1回)、プレリリース版の会員限定閲覧サービスを支援する意見が多く寄せられました。

本年度は、会員の皆様に引き続き有用な情報を提供することを基本方針として、Vol.4を編集いたしました。分野のバランスについても昨年とほぼ同様にしております。Vol.4においても、多くの著者の先生が依頼原稿執筆を快く承諾していただき、お忙しい中、期日までに脱稿をしていただきました。この報告の中には、NMR測定に関する詳細な技術レポートなど、NMR学会機関誌ならではの内容も含まれています。また、編集委員は担当原稿の編集を迅速に行ってくださいました。この努力の結果、Vol.4をNMR討論会前に、会員の皆様にお届けすることが可能となりました。著者および編集委員の皆様へ感謝いたします。

最後になりましたが、NMR学会役員、および会員の皆様、並びにクバプロNMR学会機関誌編集室の、松田國博様、阿部美由紀様には学会機関誌Vol.4発行に向けて、多大なご尽力をいただきましたことに感謝申し上げます。今後とも学会機関誌の発展にさらなるご協力をお願い申し上げます。

2013年10月 日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員長 内藤 晶

NMR

BULLETIN OF THE NUCLEAR
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN

Vol.4

2013年10月31日発行

発行：日本核磁気共鳴学会

編集：NMR学会機関誌編集室 株式会社クバプロ
〒102-0072 東京都千代田区飯田橋3-11-15
TEL：03-3238-1689 FAX：03-3238-1837

広告掲載一覧

(順不同)

アジレント・テクノロジー株式会社
株式会社エム・アール・テクノロジー
SIサイエンス株式会社
大阪大学蛋白質研究所
株式会社ジオル・レゾナンス
太陽日酸株式会社
ブルカー・バイオスピン株式会社
株式会社フレックス
独立行政法人理化学研究所

アジレント・テクノロジー VnmrJ4.0 ソフトウェア

Nuclear Magnetic Resonance

低分子から生体高分子までの幅広いアプリケーションを
提供するNMRコントロールソフトウェア

Persona Manager

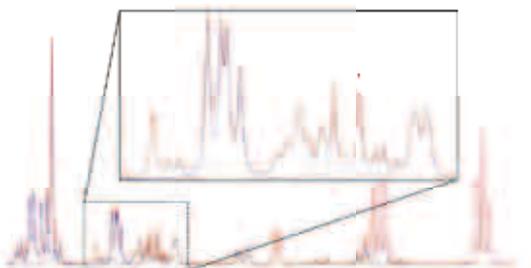
- 使用者の習熟度に合わせて制限&インターフェース

Non Uniform Sampling (NUS)

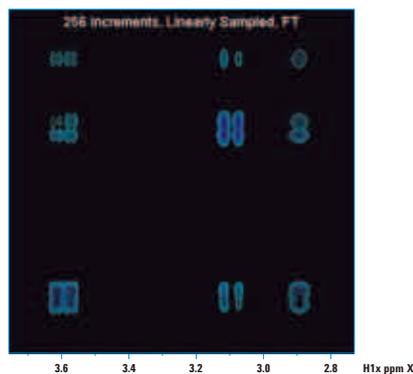
- 溶液・固体ともに高速多次元測定法に標準対応

CRAFT

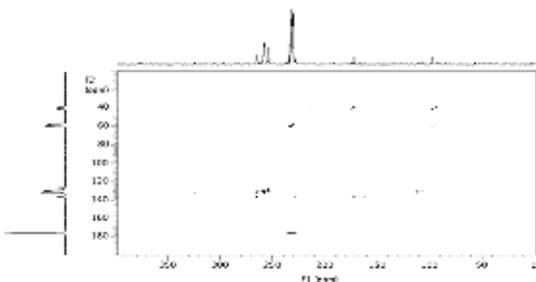
- 多検体定量処理を自動的に



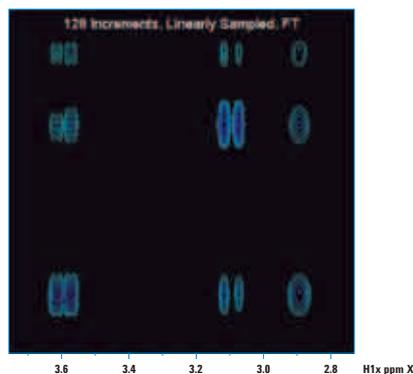
CRAFT法による波形分離



zTOCSY Nyquist サンプリング FFT処理



固体INADEQUATE 12.5% NUS CLEAN処理



zTOCSY t1展開時間2倍 50% NUS IST処理





株式会社エム・アール・テクノロジー(つくば)

[核磁気共鳴画像装置]

実験室内の保有資産(超伝導磁石、永久磁石他)を活用した
先鋭的MRI/NMRのトータルインデグレーション、アップグレードを提供します。
御希望の任意ボード組み込み、ソフトウェア追加等の特殊仕様も自由自在です。

MRMICS®

MR Microscope with an Independent Console System



ナローボア NMR で
麻酔下マウス頭部
の MRI が出来る!
既設メーカー装置
には干渉しません!

Windows7
Digital-RF

取得画像提供
筑波大学巨瀬勝美研究室

既設 NMR 磁石、
永久磁石 MRI を
“Win7 化”
“Digital-RF 化”
でアップグレード

既設
マグネット

MRTe
イメージング
プローブ



下記、お問い合わせください

- ・デジタル MRI コンソール(Win7)
 - ☑ オブリーク、同期撮像対応等
 - ☑ 5MHz から 930MHz まで対応 (H)
- ・生体マウス用 RF&G コイル
- ・気化麻酔システム
- ・心拍呼吸同期検出器(PLL 機能付)
- ・永久磁石対応アップグレード
 - ☑ WindowsXP から Windows 7 へ!
 - ☑ デジタル化
 - ☑ オブリーク、同期撮像対応等

* JST 先端計測の成果を活用しています

適宜、秀逸な輸入製品を活用します



・SMARtracer
・Spinmaster



・LapNMR ・Redstone
・APOLLO ・Scout



・Terranova-MRI
・Aurora



・ProbeTuningDevices



株式会社エム・アール・テクノロジー® 代表取締役 拝師智之

〒305-0047 茨城県つくば市千現 2-1-6 つくば研究支援センター-B5

TEL : 029-859-5075

Email : info@mrtechnology.co.jp

FAX : 03-6203-8222

URL : http://www.mrtechnology.co.jp/

「主要製品; Fast Field Cycling NMR Relaxometry」

• **SPINMASTER FFC2000 – High performance 0~1T system:** Multi-nuclear operations (including ^2D , ^{13}C , ^{19}F and ^7Li); T_1 measurements from earth field to 1 tesla (42MHz, ^1H Larmor frequency) and T_2 (depending on conditions); Measurements of relaxation times from a fraction of a millisecond to several seconds; Fully automated acquisition of NMRD profiles; PCNMR console supports Field Cycling Spin Echo Experiments; Efficient and accurate temperature control (range from -140 to +140 °C with a 0.1 °C; resolution); Integrated NMR Windows software; Minimum operating costs (no cryogenic gases necessary).



• **SMARtracer™ – Innovative compact bench-top 0~0.25T system:** Measurement of T_1 and T_2 (depending on conditions); Measurement of NMRD profiles from a few KHz to 10MHz (^1H proton Larmor frequency); Variable temperature measurement (-140 to +140 °C with 0.1 °C precision and stability); Multi-nuclear operation; Fully automated acquisition of NMRD profiles; PCNMR console supports Field Cycling Spin Echo Experiments; Integrated NMR Windows software; Minimum operating costs (no cryogenic gases necessary).



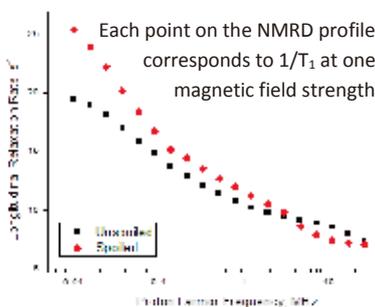
* **3T 高温超電導磁石オプション – High- T_c cryogen-free superconducting magnets for high field relaxometry:** Manufactured by HTS-110; Extends the NMR field range up to 3 tesla either in combination with Spinmaster or SMARTracer™.



「FFC-NMR Relaxometry が拓くアプリケーションの代表例のご紹介」

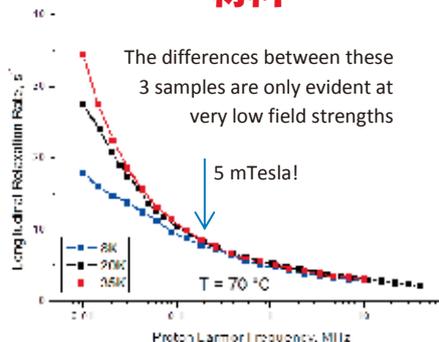
Field of application	Examples of applications for Field Cycling NMR Relaxometry
Pharmaceutical	<ul style="list-style-type: none"> ✓ R&D of MRI contrast agents ✓ R&D for formulations (e.g. properties of solutions; liposome drug carriers) ✓ Quality control of products in manufacturing ✓ R&D: studies of proteins
Polymer	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Quality control of products in manufacturing ✓ Control of levels of polymer additives ✓ R&D for new polymer materials
Oil/petroleum	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Oil surveying – rock pore size
High-technology /Electronics	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Liquid crystal R&D for electronic devices ✓ R&D for lithium materials for batteries
Food	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Quality control of foodstuff ✓ Counterfeit products (e.g. DOC/DOCG or DOP denoted products)

食品



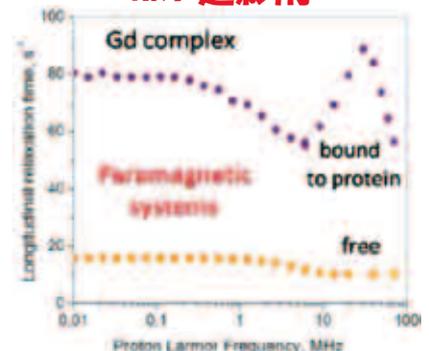
NMRD of food before and after expiry - Data from study by Stelar

材料



NMRD of Polyethylene glycol with 3 different molecular weights - collaboration with IFPEN

MRI 造影剤



NMRD of Gadolinium contrast agents - collaboration with Invento

静磁場を固定した従来型 NMR 装置では引き出せていなかった試料情報を NMRD-profile によって表現出来ます！

安定同位体 標識試薬(^{13}C ^{15}N D $^{17-18}\text{O}$)



当社は国内唯一の重窒素メーカーで、 ^{13}C 、D、 $^{17-18}\text{O}$ 及びメタル、希ガスなど、安定同位体標識化合物を各種取扱っています。



- トレーサー試験用同位体標識化合物
硫酸 硝酸塩 尿素 被覆肥料 $^{13}\text{CO}_2$ NaHCO_3 他
- メタルアイソトープ各種 (ロシアIsoflex社)
Fe Cu Cr Cd Ca Na K 他
- 希ガス (ロシアIsoflex社)
He Ne Ar Kr Xe
- NMR用 同位体標識化合物 (アメリカCIL社他)
アミノ酸 糖 塩安 CHL培地 NMR溶媒 ユビキチン

SI分析センター 安定同位体受託分析

サーモフィッシャーサイエンティフィック社の安定同位体比質量分析計を導入し、安定同位体(^{13}C ^{15}N D ^{18}O ^{34}S)の受託分析を行っています。

- 測定項目
 ^{13}C ^{15}N D ^{18}O ^{34}S の Natural 及び Tracer
- 測定機器
サーモエレクトロン社
DELTA plus XL DELTA plus Advantage
DELTA V Plus 他



<お問い合わせ>

SIサイエンス 株式会社

TEL:0480(37)1556

E-MAIL:isotope@si-science.co.jp

大阪大学 蛋白質研究所 NMR装置群 産業利用のご案内

大阪大学蛋白質研究所では、研究所の保有する 400 MHz～950 MHz までの溶液 NMR、固体 NMR 装置を産業界に開放しております。

(学術的利用にも開放しています。詳細は、以下 URL の応募方法をご覧ください。)

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/jpn/applications/applications/>

利用形態

- ◆ トライアルユース (無償)
- ◆ トライアルユース講習会・性能試験 (無償)
- ◆ 成果占有 (有償)

トライアルユース (無償) の次回公募は 11 月 1 日～22 日までを予定しております。公募期間外であっても利用枠に空きがある場合には、利用が可能です。お気軽にお問い合わせください。

トライアルユース講習会・性能試験利用と成果占有利用には、特に公募期間は設けておりませんので、ご希望の場合にはメールにてお問い合わせください。



溶液 950 MHz および 800 MHz NMR 装置

利用可能装置

◆ 溶液 NMR 装置

950 MHz (極低温プローブ付)、800 MHz (極低温プローブ付)
600 MHz、500 MHz、400 MHz

◆ 固体 NMR 装置

700 MHz、600 MHz (超高感度 DNP 装置)、500 MHz

溶液・固体 NMR 装置共に空きがございます。お問い合わせください。

お問い合わせ先

大阪大学蛋白質研究所 機能構造計測学研究室 (担当 片平)

電話 06-6879-8598

メールアドレス nmrkaihou@protein.osaka-u.ac.jp

ホームページ

http://www.protein.osaka-u.ac.jp/biophys/sentan_kyoyo/index_new.html



固体 700 MHz NMR 装置

本事業は、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」の補助事業「先端核磁気共鳴装置群の産業利用支援プログラム」によって、運営されています。

世界最高クラス**感度**を実現！



NEW 超高感度溶液プローブ - 高温測定対応 -

UltraCOOL probe

UltraCOOLプローブは、オートチューンやFGコイル搭載などにより、通常のプローブと同様の操作性を維持したまま、検出コイルとプリアンプを極低温に保つことで熱雑音を低減し、NMR信号を非常に高感度に検出することができます。超高感度検出により、従来非常に長時間を要した測定を、数十分の1の圧倒的な短時間で実現することが可能となります。また150℃までの温度可変測定が可能であり、高温測定が必要とされるポリマーの立体規則性の解析などに極めて有効です。

世界最速 世界最高速回転を誇る固体高速MASプローブ

0.75mm CPMAS probe



0.75 mm試料管 (容量 0.29 μ l) で世界最高回転速度110 kHz以上を (2013年9月現在) 実現した0.75 mm CPMASプローブは、マイクロコイルによる微量試料に対する高感度測定その他、強いRF磁場強度と超高速試料回転の効果により、様々な新しい固体NMRの世界を可能にしました。



安定同位体標識化合物

Stable Isotope for Structural Biology

大陽日酸は多次元NMRでの構造解析に必須な安定同位体標識化合物を高い品質・お求め易い価格で販売しております。

安定同位体標識無細胞タンパク質合成キット

独立行政法人理化学研究所の無細胞タンパク質合成技術をキット化したしました。

New!

無細胞くん[®] SI SS



安定同位体標識タンパク質合成キット

無細胞[®]くん SI SS

SS結合を持つ抗体やサイトカインなどの分泌タンパク質合成専用キットです。安定同位体標識タンパク質の合成に最適です。

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	-80℃	65,000

無細胞くん[®] SI



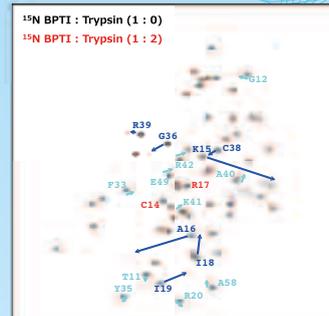
安定同位体標識タンパク質合成キット

無細胞[®]くん SI

安定同位体標識タンパク質合成専用キットです。迅速・簡単に大量合成できます(CATタンパク質最大合成量 5mg/mL)。発現確認用「無細胞くんQuick」と併せてお使い下さい。

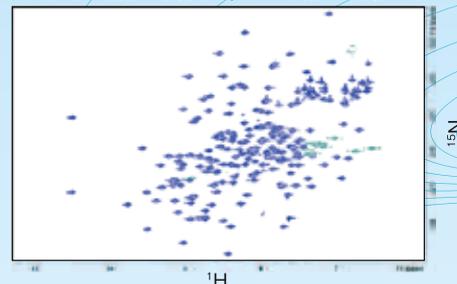
製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格(円)
A29-0059	無細胞くんSI	1キット	-80℃	55,000

BPTI プロテアーゼインヒター-¹H-¹⁵N HSQCスペクトル



Biological Magnetic Resonance Data Bank 5358, 5359 were used for assignments.

Ras (Y32W) タンパク質の¹H, ¹⁵N-HSQCスペクトル



ご提供: 独立行政法人理化学研究所生命分子システム基盤研究領域 NMRハイブライン高度化研究チーム殿

無細胞くん用 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)	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	ご相談	A42-0075	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹³ C, ¹⁵ N,d	1mL	35,000
A39-0072	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹⁵ N	1mL	15,000	A91-0128	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Arg-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	20,000
A41-0074	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹⁵ N,d	1mL	18,000	A92-0129	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Leu-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	20,000
A40-0073	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	30,000	A108-0145	アミノ酸混合物水溶液-SeMet	1mL	ご相談

培地

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

核酸

- NTPs / NMPs (¹³C, ¹⁵N, d)
- Phosphoramidites (¹³C, ¹⁵N, d)
- RNA・DNAオリゴマ合成

アミノ酸・ケト酸

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

その他

- Pf1 NMR Cosolvent
- Tris-d₁₁, MES-d₁₃, HEPES-d₁₉
- Water-¹⁷O (10-90atom%)

※ 各種製品を取り揃えておりますのでお気軽にお問い合わせください。

製造・総販売元

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 <http://stableisotope.tn-sanso.co.jp>



大陽日酸
The Gas Professionals

世界最高峰の性能と品質のNMRシステム



— ● 革新を続けるブルカー・バイオスピンのNMR製品

ブルカー・バイオスピンは常にお客様の声に耳を傾けながら製品の開発をしてきました。私たちのNMR製品はお客様の満足のため、さらなる性能と品質を追求して今も革新を続けています。

安定性を追求した高精度温度制御システム、高コストパフォーマンスを誇る高感度プローブCryoProbe Prodigy、世界初のヘリウム再液化冷凍機付Ascend Aeon超伝導磁石などNMRシステムの測定機器としての性能だけでなくコスト、安定性、管理のしやすさも含んだトータルの品質を提供し、様々な側面からお客様の研究活動を支援します。

- 世界初の冷凍機統合型NMR用磁石Ascend Aeon
液体He再液化用冷凍機を統合した世界初の高分解能NMR用超伝導磁石であるAscend Aeonは冷媒充填の手間を省きます。
✓400, 500 MHz用：液体N₂充填不要、液体He 540日ホールド
✓600, 700 MHz用：液体N₂充填不要、液体He充填不要
- 冷却機能付きオートサンプルチェンジャSampleCase Cooled
SampleCaseに冷却機能（4～6℃）が備わり、Cooledとして新しくなりました。室温で不安定なサンプルも安心して取り扱えます。
- 高感度プローブCryoProbe Prodigy
液体N₂を用いた冷却機構を使うことでコストパフォーマンスの高い高感度プローブを実現しました。汎用のBBOと新登場の¹H高感度のTCIの2タイプからお選びいただけます。
- 高精度温度制御システムNMR Thermometer
独自のデジタルロック機構を利用した温度制御技術によりサンプル自体の温度を測定して高精度に制御することで、様々な要因による温度変化を補償します。

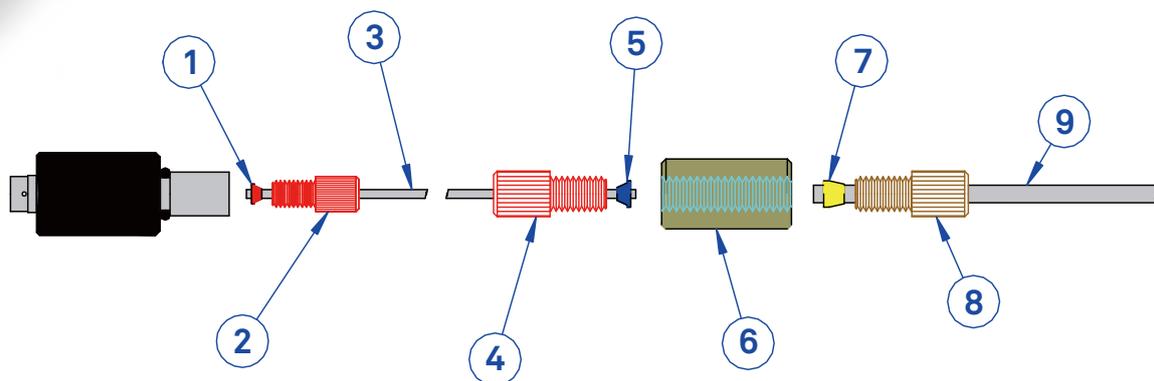
〒221-0022
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9
ブルカー・バイオスピン株式会社
本社
Tel: 045-444-1390
Fax: 045-453-2457

〒532-0004
大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29
ブルカー・バイオスピン株式会社
大阪営業所
Tel: 06-6394-8989
Fax: 06-6394-9559

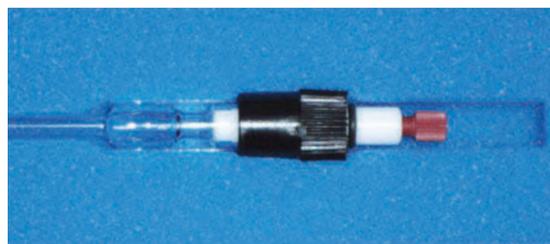
詳しい製品情報は<http://www.bruker.co.jp/>

新製品

Optional Tubing Connections



- | | |
|----------------|---|
| 1. QPV-F | Ferrule for 10-32 nut / 1/16" O.D. Tubing (Supplied with QPV-V Valve) |
| 2. QPV-N | Nut, 10-32 for 1/16" O.D. Tubing (Supplied with QPV-V Valve) |
| 3. QPV-T16 | Tubing, 1/16" O.D. PTFE |
| 4. QPV-N14 | Nut, ¼-28 for 1/16" Tubing |
| 5. QPV-F14 | Ferrule for ¼-28 nut / 1/16" Tubing |
| 6. QPV-U14 | Union, ¼-28 |
| 7. BP-1822-018 | Ferrule for ¼-28 Nut / 1/8" Tubing |
| 8. BP-1821-018 | Nut, ¼-28 for 1/8" O.D. Tubing |
| 9. BP-1823-014 | Tubing, 1/8" O.D. PTFE |



Wilmad LabGlass 社製 NMR用 Quick Pressure Valve Tube

• 特徴

バルブの開閉が非常に簡単
開口部分が大きくサンプルの注入が容易
溶媒・溶液サンプルなどの追加注入が簡便
軽量型試料管

• 応用

触媒の分子構造解析
ガス / 液相反応試料の測定
沸点の低い温度上昇サンプルの測定
嫌気性サンプルの測定等に最適



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
【NMR共用プラットフォーム】



NMR 共用プラットフォーム

◎代表機関、○実施機関

神奈川県



◎理化学研究所
ライフサイエンス技術基盤研究センター
NMR立体構造解析パイプライン・NMR施設



○横浜市立大学
大学院生命医科学研究科生命医科学専攻
NMR装置群

大阪府

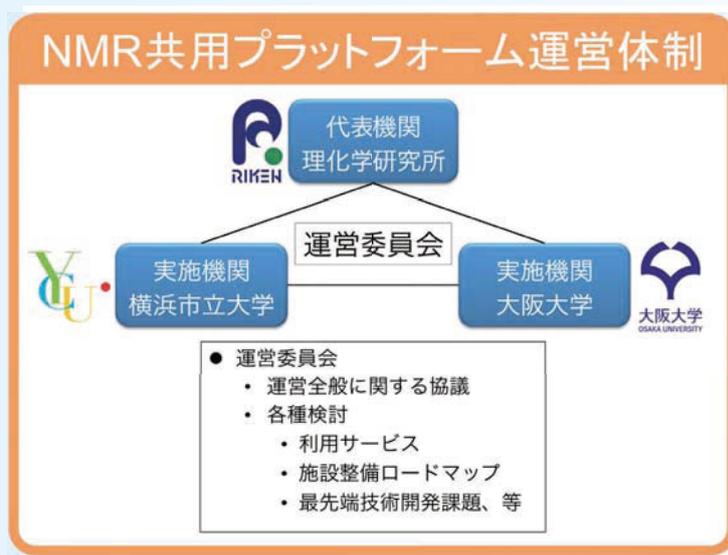


○大阪大学
蛋白質研究所
NMR装置群

プラットフォームの概要、目標・目的、連携体制

核磁気共鳴（NMR）法は、化学、材料・素材、食品・環境、生命科学等の広範な分野で必須の計測法です。近年は創薬、薬物代謝物動態、新世代電池の解析など、ライフィノベーションやグリーンイノベーションに直接つながる分野への利用も広がり、先端的な施設・設備や技術に対する利用ニーズが高まっています。更に、高磁場化や高感度化などの技術的発展、機器開発とそれに基づくユーザーニーズの拡大の余地は依然大きく、今後の発展が更に期待される技術領域です。

先端的な NMR 施設と技術を有する、理化学研究所、横浜市立大学、大阪大学は、平成25年4月より強固に連携した「NMR 共用プラットフォーム」を構築し、最先端技術開発の動向を踏まえた研究開発と人材育成を支える取組を、他の施設との連携協力関係を築きながら全国的な取り組みへと発展させNMR 技術領域の利用と発展を先導するとともに、最先端技術開発の基盤を作り、ユーザーニーズを的確に反映させた技術開発に資する存在となることを目指します。



今後の活動内容

3機関による運営委員会を設置してワンストップサービス等の NMR 利用サービスの検討を行うほか、利用者と技術開発者の意見を反映した最先端技術開発課題の検討・抽出、最先端技術開発の促進、産学連携利用の拡大、および機関間連携を推進するための「特定課題利用」枠の設定、NMR 技術領域における産学官連携研究を推進する人材の育成などに取り組みます。

連絡先 NMR 共用プラットフォーム（3 機関共通）

E-mail : nmrpfkaihou@riken.jp

URL : <http://www.ynmr.riken.jp/platform.html>

参画機関

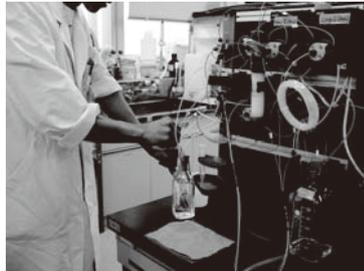
- ◎代表機関 独立行政法人 理化学研究所（ライフサイエンス技術基盤研究センター）
- 実施機関 公立大学法人 横浜市立大学（大学院生命医科学研究科生命医科学専攻）
国立大学法人 大阪大学（蛋白質研究所）

外部利用受付中

NMR施設・NMR立体構造解析パイプラインを
使ってみませんか？

NMR立体構造解析 パイプライン

タンパク質試料の
「発現確認から構造解析」
まで行います



NMR施設

700MHz多核固体NMR
(1mmφプローブ予定)

600~900MHz溶液NMR
(極低温プローブ)

が利用できます

タンパク質調製

固体・溶液 NMR測定



機能・物性解析

活用事例

有機化合物・天然物の構造解析

材料食品等の組成分析

高分子ポリマー・高機能性材料・電池材料



利用方法等の詳細は

Webサイトをご覧ください

ynmr

検索

文部科学省が実施する「先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業[※]」の補助を受けています。

※大学・独立行政法人等の保有する先端研究施設の供用を促進することにより、
基礎研究からイノベーション創出に至るまでの科学技術活動全般の高度化を図るとともに
国の研究開発投資の効率化を図ることを目的とします。

詳細については「共用ナビ」(<http://kyoyonavi.mext.go.jp/>)をご覧ください。

独立行政法人 **理化学研究所** 横浜キャンパス
ライフサイエンス技術基盤研究センター

お問合せ先
横浜事業所
NMR施設開放担当

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
TEL 045-503-7091 FAX 045-503-9113
[ホームページ] <http://www.ynmr.riken.jp>
[メールアドレス] nmrkaihou@yokohama.riken.jp

