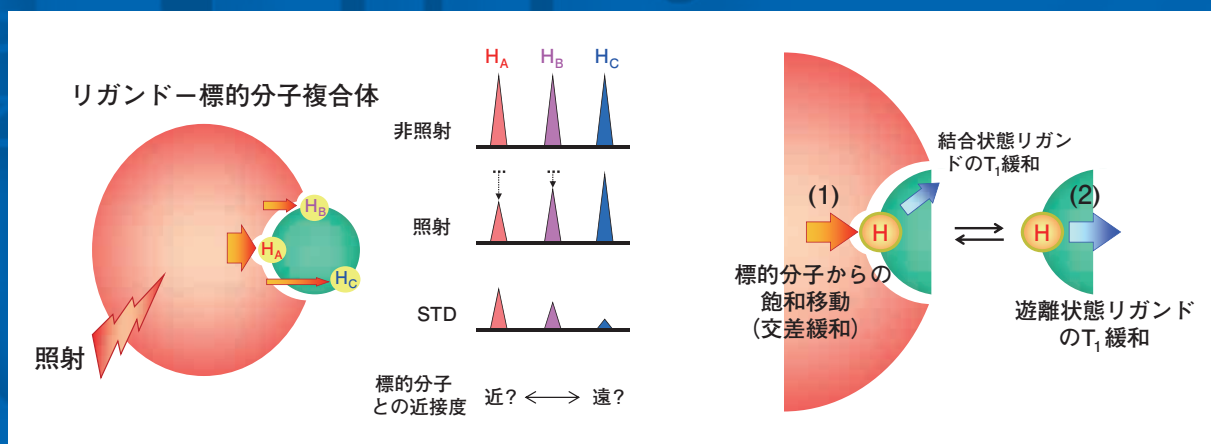


NMR 分光計を構成する回路基板



STD 法によるリガンドエピトープマッピング実験

表紙の図

(上段)：NMR分光計の開発 (図1)

京都大学大学院理学研究科 武田 和行

(下段)：創薬研究への応用を指向したNMR相互作用解析技術 (図1)

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科 高橋 栄夫

NMR

BULLETIN OF THE NUCLEAR
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN

Vol. **6**

October 2015

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

● 会長メッセージ	
NMR学会の活動と役割	4
内藤 晶	
● 巻頭エッセイ	
高分子のNMR構造解析そして絹人工血管の開発へ	5
朝倉 哲郎	
天然物化学とNMR	8
岩下 孝	
● 解 説	
磁場勾配NMR法の展開～電池材料中のイオン拡散挙動を評価する～	11
橋本 康博、森川 卓也、吉野 彰	
● トピックス	
創薬研究への応用を指向したNMR相互作用解析技術	23
高橋 栄夫	
溶液系DNP-NMRの実際と応用	31
津田 正史	
● 若手ポスター賞講演	
第53回NMR討論会(2014)若手ポスター賞について(報告)	36
若手ポスター賞I受賞講演	
ダイヤモンドスピンを用いた生体内ジャイロセンシング技術の開発	38
久美屋 雄太、五十嵐 龍治、杉 拓磨、外間 進悟、朽尾 豪人、吉成 洋祐、原田 慶恵、白川 昌宏	
ユビキチン化に伴うタンパク質構造不安定化	40
森本 大智、Erik Walinda、菅瀬 謙治、深田 はるみ、曾 友深、蔭山 俊 星野 大、藤井 高志、土屋 光、佐伯 泰、有田 恭平、有吉 真理子、朽尾 豪人 岩井 一宏、難波 啓一、小松 雅明、田中 啓二、白川 昌宏	
MAPキナーゼp38 α のストレスシグナル伝達機構の解明	42
徳永 裕二、竹内 恒、高橋 栄夫、嶋田 一夫	
天然存在比下での ³³ S STMASによるエトリンタイトの研究	46
佐々木 彬子、Stephen Wimperis	
<i>In situ</i> 光照射固体NMRによる光受容センサー膜タンパク質sensory rhodopsin Iの 波長依存的な光反応過程の解明	48
榎野 義輝、四方田 洋樹、友永 雄也、日高 徹朗、川村 出 沖津 貴志、和田 昭盛、須藤 雄気、内藤 晶	
固体NMRによるキンヒドロロン合成時の固相反応過程の研究	50
伊澤 研一郎、野田 泰斗、竹腰 清乃理	
Measurement of Proton Chemical Shift Anisotropy Tensors Using Symmetry-Based Radio-Frequency Pulse Sequences and Ultrafast MAS Solid-State NMR Spectroscopy	54
Manoj Kumar Pandey、Michal Malon、Yusuke Nishiyama	
● NMR基礎講座	
フーリエ変換に代わる共分散変換の特徴	56
長土居 有隆、池上 貴久	
固体NMRによる生体分子立体構造解析の最近の展開	65
川村 出	
● NMR史点描	
NMRの呼称について	69
寺尾 武彦	

●海外学会報告	
若手研究者渡航費助成金について	72
56 th ENC 参加報告書	74
水島 良太	
the 56 th ENC 参加報告書	75
松永 達弥	
ISMRM 23th annual meeting 参加報告書	76
津田 真人	
6th Asia-Pacific NMR Symposium 参加報告書	77
神庭 圭佑	
若手研究者渡航費助成による6 th Asia-Pacific NMR Symposium 参加報告書	79
重田 安里寿	
●技術レポート	
NMR分光計の開発	81
武田 和行	
●NMR便利帳	
循環型 極低温ヘリウムガス駆動DNP-MAS-NMR プローブの開発と応用	85
松木 陽	
●研究室便り	
長岡技術科学大学 グリーン資源科学研究室	89
河原 成元	
株式会社東レリサーチセンター	92
川口 謙、崎山 庸子、日下田 成	
NMR学会からのお知らせ	
1. 日本核磁気共鳴学会の決定事項	95
2. 第54回NMR討論会(2015)	97
3. ニュースレターの記録	99
4. 日本核磁気共鳴学会規約	101
5. 日本核磁気共鳴学会機関誌投稿規程	105
6. 賛助会員名簿	107
7. 日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員名簿(2015年度)	108
8. 編集後記	109

NMR学会の活動と役割

日本核磁気共鳴学会会長

内藤 晶

naito@ynu.ac.jp

日本核磁気共鳴学会第7期会長に就任して1年と4か月が過ぎました。任期满りまで会員の皆様とNMR学会発展に尽力を注ぎたいと思っています。どうぞよろしくお願いたします。

NMR学会は日本で開催される国際会議などを組織面、財政面で十分に支援する母体となる役割を持っています。その役割は2005年の第1回アジア太平洋NMRシンポジウム(The 1st AP NMR Symposium)を日本で開催することで一つ達成することができました。その会が原型となり、今年は6th AP NMR Symposiumが香港で開催されました。私も参加してまいりましたが、1st AP NMR Symposiumで苦勞して作り上げた会議様式が今も続いていることに感慨をもちました。これらの国際会議の開催を支援するため、特別会計(国際会議基金)を昨年設立いたしました。大きな国際会議を日本で開催するためには、財政面での支援が重要になってきます。NMR学会ではこの基金により国際会議の開催を支援する役割を果たす体制を整えました。これにより、2016年に京都で開催されるICMRBSを支援したいと考えております。2016年以降には日本でまだ開催されていないISMARや2度目の開催となるAP NMR Symposiumを日本で開催できるように支援活動を始めています。

NMR学会は、会員の皆様がNMRを用いた研究開発を発展するための情報を提供する活動を行っております。その一つは毎年秋に開催されるNMR討論会の主催者としての役割です。NMR討論会は伝統的に討論会世話人が主体となって会を組織運営していくことを原則としていますが、NMR学会は主催者として、討論会の運営を支援する活動をしています。また、産業界の研究者も含めた幅広い分野の研究者が参加できることに加えて、アジア各国からの参加者が増えるような討論会に発展することを視野に入れています。

NMR学会は若手研究者の育成も重要な役割であると考えています。特にNMR討論会での若手ポス

ター賞はNMR学会として選考を行い、表彰することで、若手研究者育成の役割を担っています。さらに、若手研究者の育成のための活動として、海外渡航支援を行っています。毎年5名程度の若手研究者の海外渡航費を支援しております。この制度を利用して、これまでに41名の若手研究者が国際会議で発表を行い、海外の研究者との交流を深めています。

NMR学会では、会員がNMRに関する情報の発信を行う活動も重要であると考えています。これにより、会員の研究の発展に貢献する役割を担えると考えています。この活動として、NMR学会員のニュースレターの発行はすでに定着しており、会員間の情報交換の場として、各種案内の発信の場として、多くの会員に利用されています。これらの会員および学会からの発信情報はNMR学会ホームページにまとめられており、会員が知りたい情報を的確に入手できるように引き続きホームページを改善する努力をしています。

NMR学会員の情報供給の場として、NMR学会誌の編集活動を行っています。鈴木前編集委員長によるNMR学会誌1巻、2巻の発行を経て、NMR学会誌3巻、4巻では、会員からの研究報告や技術レポートの内容を大幅に増やしました。NMR学会誌5巻および本6巻は筑波大の山本編集委員長により編集され、さらに充実した内容になっており、会員に必要な情報を供給する重要な媒体になっています。詳しく踏み込んだ内容や、装置や解析法の開発など、学会では発表できない内容もNMR学会誌には積極的に掲載しています。さらに、希望者には学会誌冊子体を配布するという、ユニークな方法で会員へのサービスの向上と費用の節約に努力してNMR学会誌が発行されています。

このような、会員の皆様の立場に立ったNMR学会活動のさらなる発展のため、微力ではありますが、頑張りしたいと思います。会員の皆様のご協力をよろしくお願いたします。

2015年秋

高分子のNMR構造解析 そして絹人工血管の開発へ

東京農工大学工学府・工学部

朝倉 哲郎

asakura@cc.tuat.ac.jp

高分子のNMR構造解析に関わって40年を経過した。多くのすばらしい学生や共同研究者に出会い、得られた研究成果を前に、幾度も大きな興奮を味わってきた。“NMRに関わって本当に良かった”というのが振り返ってみて素直な感想である。

東工大の学生時代

NMRの研究者としてスタートを切ったのは、私が東工大西岡研究室で安藤先生の熱心なご指導の下、“ポリプロピレン (PP) の¹H NMR立体規則性化学シフトをC-C結合の磁気異方性効果で計算する”研究を開始した1972年であった。“高分子鎖のフレキシブルなコンフォメーションを回転異性状態近似を用いて統計的に扱う”という手法に触れるとともに、本手法を用いたPPの両末端間距離の予測値と実験値との不一致に関する活発な論争があることを知り、化学シフトの研究結果に基づき、その論争に加わることによって、研究の面白さを段々と知るようになった。

その後、博士課程に進み、“生体高分子のヘリックス-コイル転移”の研究を、化学シフト計算の立場から行うことになった。ポリL-アラニン (PLA) を取り上げ、その¹H NMR化学シフトを、ペプチド結合の磁気異方性効果や電場効果に着目し、半経験的な式を用いて評価した。特に、評価式中のパラメーターの値を実験値から求めたかったが、当時は、タンパク質の精度の高い原子座標と該当するタンパク質のNMR化学シフトの報告例が十分に揃ってなく、いくつかの簡単なアミド化合物のみで、そのパラメーターを決定した。PLAの各官能基の¹H NMR化学シフトを、 α ヘリックス、ランダムコイル、 β シート構造について計算、化学シフトの起源とコンフォメーションについての研究を行った。

これらの¹H NMR化学シフト計算と、それを用いたタンパク質の構造決定が、その後、NMRの分野で活発になり、再度、参入することになるとは、当時、全く予想していなかった。

日本大学の理工学教室時代

1980年、日本大学の松戸歯学部理工学教室に助手として赴任し、歯科材料の開発を行うことになった。当時、就職難で、私もオーバー・Drを経験、かなり研究分野の異なる所での奉職となった。最終的に極めて短い期間であったが、その時の研究や知識、なにもまして、その時の人間関係が、今日、農工大で絹を用いて人工血管を開発する原動力となっている。

農工大の時代一渡米前

奉職して10か月程経った頃、農工大の助教授の話があり、そちらに移った。もともと、生きたカイコについて、直接NMR測定を行ってみたいという希望をずっと持ち続けていたので、早速、その研究から開始した。当時、農工大に導入されたばかりのJEOL FX200 NMR装置を用い、生きたカイコをNMR管に入れ、ノーロック・一晚の積算により¹³C溶液NMRを測定した。驚くほど磁場が安定しており、非常にきれいなスペクトルが得られ、生きたカイコで種の違いによる絹構造の違いを直接、検討できることが分かり、感激したことを覚えている。

さらに、絹の安定同位体ラベル化と溶液NMR構造解析を進めるとともに、当時、国立ガンセンターにおられた斉藤博士と固体絹構造に関して共同研究を行うようになった。共同研究とは言っても、いつも、斉藤博士のバイタリティに圧倒されていた。1984年から科研費一般研究Aの最大予算枠が広がり、申請した応募研究が採択され、自分の研究室でNMR装置、JEOL FX90Qを持つことができた。その後、NMR構造解析と合わせて、絹の特性を生かしたバイオセンサー、バイオリクターの応用研究も進めるようになった。

一方、農工大に赴任し1年程経ってから、絹研究に加えて、東工大の中條先生からの依頼でポリオレフィンの立体規則性解析を再度進めることとなった。東工大修士の時の研究の延長だった

が、 ^1H NMR のかわりに ^{13}C NMR を用いることにした。カップリングによる分裂がなく、官能基間の化学シフト差が大きい ^{13}C NMR が、本目的には ^1H NMR より断然有利である。 ^{13}C 化学シフトの γ-ゴースト効果とノーベル賞学者の Flory 教授らが発展させていた 5 行 5 列の回転異性状態マトリックスを用いて ^{13}C 立体規則性化学シフトを評価した。十分に満足できる結果が得られたので、この計算方法を用いて、その後数年間、さらに多くのポリオレフィンの ^{13}C NMR 立体規則性解析を行うこととなった。その結果、従来、実験のみからは解釈の難しいスペクトルについて、化学シフト計算を行うことによってはじめて解釈可能となること、高次の立体規則性ピークが、化学シフト計算によってはじめて帰属可能なこと、NMR 化学シフトが、回転異性状態マトリックスを用いた高分子鎖の統計的取り扱いに関する唯一の検証データとなることを明らかにすることができた。今でも、国内の石油化学系会社の研究者から、“朝倉の帰属結果を使っています”との声をかけられることも多く、うれしく思う。

さて、1988 年、米国 Madison で ICMRBS の国際会議があり、大きな会場で、あふれんばかりの聴衆の前で、Sheffield Univ. の Williamson 教授が、生体高分子の NMR 化学シフトに関する講演を行っているのに遭遇した。その発表内容は、まさに、東工大の博士課程の時の研究と同様の考え方で進められた研究であったので、再度、タンパク質 ^1H NMR 化学シフトの半経験的計算を進めることとした。すなわち、タンパク質の精度の高い原子座標と該当するタンパク質の溶液 NMR 化学シフトが十分に揃ってきたことを知り、化学シフトの評価式中のパラメーターを精度高く決定できるようになってきたことを直感し、ただちに、この分野に再度参入することにしたわけである。帰国後、ただちに、コンピューター計算に堪能な学生を説得して、それまでの彼のテーマを変え、新たに化学シフト計算を行ってもらった。

渡米中

その後、東大の宮澤先生が大磯で主宰されたヒューマンフロンティアの国際会議に参加させていただいた折、Florida State Univ. の Cross 教授とお会いした。翌年の 1990 年、一年間、客員教授として Florida で研究を行うことになり、Cross 教授らが Opella 教授とともに開発されていた“ガラスを用いて配向させた脂質 2 重層膜中でタンパク質の原子

座標を決定する固体 NMR の手法を、家蚕絹の繊維化前の構造 (Silk I) 決定に用いる”との研究提案を行った。Cross 教授は、快く受け入れてくれ、しかも Cross 研究室の Post Dr 第一号の Nicholson 博士 (現 Cornell Univ. 教授) と一緒に、このテーマで共同研究を行うようにアレンジしてくれた。残念ながら、その目的を達することはできなかったが、同様の手法を家蚕絹の繊維化後の構造 (Silk II) 決定に生かすことができた。同時に、多くの海外の研究者と知り合いになった。例えば、当時の Florida State Univ. の助教授で、REDOR で有名な Gullion 博士 (現 West Virginia Univ. 教授) とは、帰国後、絹構造に関する共同研究を開始、約 10 報の共著論文を発表してきた。

また、渡米中の 1990 年、英国 Warwick で ICMRBS の会議があり、そこで満を持して生体高分子の化学シフト計算の発表を行った。そのとき以来、今日まで Williamson 教授との共同研究は続いており、共著の論文は 30 報を下らない。

農工大の時代—渡米後

帰国後、本格的に Silk I 構造の決定を行うこととした。その後、国際会議で何度か発表するにつれて、絹研究に興味を持っていたいただいた ETH の Meier 教授や Karlsruhe Inst. Tech. の Ulrich 教授らが加わり、共同研究を積極的に進めることとなった。1997 年には、生研機構の大型プロジェクト「絹タンパク質の構造—物性相関の徹底解明と新しい絹繊維等の開発」(1997–2002) に採用となり、新たに固体 NMR の装置も購入でき、絹研究が大きく進展することとなった。また、1998 年、2001 年の 2 回にわたり、農工大で“絹と NMR に関する国際シンポジウム”を開催、共同研究者を招聘して発表と討論を重ねた。2001 年、絹研究を開始して、20 年かかって、念願の Silk I 構造を決定することができた (図 1)。

決定してみると、単純ではあるが、実によくできた構造であった。半分以上を占める結晶部分は、アラニンとグリシンの交互共重合体と近似することができるが、それはタイプ II 型の β ターン構造の繰り返しであり、分子鎖に沿って分子内と分子間の水素結合が交互、かつ、直角に繰り返されていた。そしてカイコが糸を吐く時に、分子内水素結合が切れると同時に、切れた部分は改めて近隣の分子同士で分子間水素結合を形成、すべて分子間水素結合となり、強力な分子間水素結合のネットワーク

が瞬時に形成されることになる。すなわち、カイコが、わずかな力で鋼鉄線に匹敵するような繊維を簡単に創るための仕組みが、この絹の Silk I 構造に内包されていたわけである。

一方、繊維化後の構造である Silk II 構造は、基本的には β シート構造であり、NMR が不得意とする分子間構造の情報を系統的に得ることができる固体 NMR の手法が必要であった。幸いにも、当研究室助手の山内博士を代表者とする「超微量用固体 NMR プローブの開発」(2004-2007) の大型プロジェクトが (独) 科学技術振興機構の先端計測分析・機器開発事業に採用され、その後、引き続き、JEOL が代表者 (2008-2010) となって研究を継続、最終的に超高速固体 NMR プローブが開発され、市販されるに至った。それによって、分子間構造に敏感な高分解能の ^1H 固体 NMR 測定が可能となり、絹の Silk II 構造の解明が飛躍的に進んだ。その結果、従来から生化学の教科書に必ずと言って良いほど掲載されてきた Marsh、Pauling らの提案した逆平行の β シート構造は、分子間水素結合のペアが間違っていることを明らかにした。現在、最終構造の提案に向けて、鋭意、固体 NMR 研究を進めている。

さらに、並行して、生研センターの大型プロジェクトや農水省のアグリバイオやアグリヘルス大型プロジェクト、科研費基盤研究 S 等に毎年、継続的に採用され、絹の NMR 構造解析のみならず、応用研究を飛躍的に進めることができた。その結果、大腸菌やトランスジェニックカイコによる高機能性を有する新しい絹の生産が可能となり、また、臨床医の先生方と絹のさまざまな再生医療分野への応用研究を行うことができた。現在、到来しつつある高齢化社会や生活習慣病の増加を背景に極めて重要な高い小口径絹人工血管の開発に重点的に取り組んでいる。多くの国内外の研究者が、多額の研究

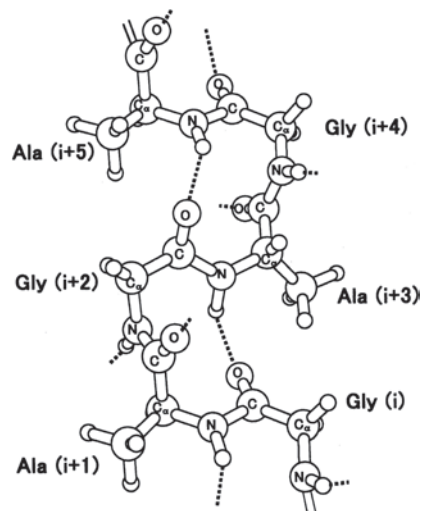


図1 家蚕絹の繊維化前の構造 (Silk I)

費と多くの歳月を有しても未だ成し得ていない開発研究であり、絹の優れた特性を生かしてブレークスルーを図りたいと考えている。詳細については、これまで、マスコミにも頻繁に取り上げられてきたので省略する。

これまで多くの大型プロジェクトに採用され、十分な研究費のサポートの下で、絹と NMR をキーワードとした研究を自由に行うことを許していただけてきたので、これまでの研究成果を、なんとか、眼に見える形で世に残したいと考え絹の応用研究を行っている。さらに、今年から、内閣府のインパクトプロジェクト「超高機能構造タンパク質による素材産業革命」(2014-2019; 分担) にも関わるようになった。これまで34年にわたって得られてきた絹研究の成果を最大限生かして、本プロジェクトを成功させたいと考えている。

これらの成果は、200名を超える当研究室の多くの学生と出村先生 (現北大教授) をはじめとする多くの内外の共同研究者と一緒に得られてきたものである。ここに深く感謝申し上げたい。



朝倉 哲郎 (あさくら・てつお)

1972年 東京理科大学理学部一部化学科卒業
1974年 東京工業大学大学院理工学研究科修士課程修了
1977年 東京工業大学大学院理工学研究科博士課程修了 (工学博士)
1980年 日本大学松戸歯学部理工学教室 助手
1981年 東京農工大学工学部 助教授
1990-1991年 フロリダ州立大学化学科 招聘教授
1993年 東京農工大学工学部 教授
2002年 日本核磁気共鳴学会会員 (2012-2013年 会長)
2015年 東京農工大学工学部・工学部 名誉教授・特任教授
現在に至る

天然物化学とNMR

公益財団法人サントリー生命科学財団

岩下 孝

iwashita@sunbor.or.jp

1. はじめに

学部生(東京教育大学・化学科)で研究室を選ぶとき、物理化学にするか天然物化学にするかだど迷った末、柿澤寛先生の主宰する天然物化学の研究室を選んだ。物理化学をやるには少し数学に自信がなかったのと天然有機化合物の美しい構造に惹かれたのが主な理由だった。大学院へ進み、研究室の筑波大学への移転と同時に博士課程後期に編入となり天然有機化合物の合成研究に没頭した。この頃はCW型 ^1H 共鳴周波数60MHzのNMR装置を使っていた。当時、筑波大学では博士課程の院生にリサーチ・プロポーザルというものを課していた。これは自分の専門分野以外のことを調べて、その分野でどのような研究をしたいかプロポーザルするというものだった。NMRスペクトルを自由に測定するようになっていて興味もあったのでJohn D. Roberts先生のJACSの論文を参考に ^{15}N -NMRでt-RNAの構造を研究するというプロポーザルを行った。柿澤先生はこのプロポーザルを憶えてくださり、コロンビア大学の中西香爾先生が所長を兼務していたサントリー生物有機科学研究所(生有研)に推薦してくださった。

2. 生有研とFT-NMR

生有研に入った前年(1979年)から中西香爾先生が所長になり機器分析による天然有機化合物の構造解析が重視され、FT-IRとともにFT-NMRが導入された。1980年にNicolet社のNT-360というFT型 ^1H 共鳴周波数360MHzの装置が設置されたが、この装置の特徴は8.457Tの高磁場を発生する超伝導磁石と2次元NMRの測定を可能にするソフトウェアだった。装置にはFTを行うためのデータプロセッサ(コンピュータ)が装備されていて、それまでやったことのないプログラミングの勉強をせざるを得なくなった。最初はJ分解スペクトルしか取れなかったが、すぐに絶対値表示のCOSYやNOESYが測定できるように

なった。しかし、この時の装置のデカップラーは ^{13}C -NMRで ^1H を全領域にわたってデカップルするためのノイズデカップリングというモードしかなくINEPTやDEPTのように ^1H 側からパルスを出すというアイデアには対応できなかった。そこでNicolet Japanのエンジニアに頼んでデカップラーのゲートの一つ外してパルスを出せるように工夫し、INEPT/DEPTやHetCorタイプの異種核間相関スペクトルが測定できるように改造した。このようにして一通りの実験ができるようになった1986年に「チャートで見る超電導FT-NMR」という本を講談社サイエンティフィックから上梓した。同種の本が全くなかったこともあり韓国語にまで翻訳され、その勢いを得て英文版まで出版した^[1]。今では一般的な「超伝導」とすべきところを工学系で一般的だった「超電導」としてしまったのがご愛嬌だった。この時期、静岡大学上村大輔教授とパリトキシンという巨大天然有機化合物の構造決定に取り組んだ。上村先生はパリトキシンをいくつかのパーツに化学分解し、それぞれについて最初はいわゆるホモデカップリングでスピン系を明らかにして構造解析を進めた。同時にCOSYの測定も行い、ホモデカップリングでは分かり難いところの解析を可能にした^[2]。

3. コロンビア大学医学部

1986年には生有研での次期大型NMR装置導入のため、半年間コロンビア大学医学部Dinshaw Patel教授の研究室にお世話になりながらアメリカ各地のNMRを見て回った。NIHではAd Bax先生にお会いしてTOCSY測定のための装置を見せてもらい、パルス・シーケンスについてもいろいろと教わった。装置は我々と同じNicolet社製であったがTOCSYのミキシング・パルスを出すために特別なパワーアンプが取り付けられているのが印象深かった。Patel研ではDNA 12merを相手に位相敏感型NOESYのパルス・シーケンスを改良するこ

とに取り組んだ。使用していた装置はBruker社のAM-500だったが、もともとBruker社がNicolet社のデータプロセッサを使用していたため、幸いなことにコマンドがほとんど同じですぐその意味するところが理解できた。この時、Mike Zagorskiさん(現・ケースウエスタンリザーブ大学教授)と知り合うことになる。後に彼はPatel研から生有研に移り、我々には初めてのディスタンス・ジオメトリーを使ってPardaxin P-2の3次元構造解析を行った^[3]。さらに当時まだあまり研究の進んでいなかったアミロイドβの構造研究を行い、Science誌に論文を掲載後ケースウエスタンリザーブ大学へと戻っていった。

4. GN-500の導入

生有研に戻ってから¹H共鳴周波数500 MHzのNMR装置としてGE社のGN-500が導入され水溶液サンプルの測定が本格化する。¹³C{¹H}-HetCorタイプの異種核間相関スペクトルも含めた様々な位相敏感型の2次元NMRが測定可能になった。しばらくしてインバース・タイプのプローブが導入され¹H{¹³C}-HMQCタイプの実験もできるようになる。1980年代後半、東北大学安元健教授らの進めるマイトトキシン構造解析の初期段階に参画することになった^[4]。マイトトキシンはパリトキシンよりさらに分子量が大きく、NMRの感度はだいぶ上がってきていたが¹³C-NMRを測定するにはサンプル量が必要だった。安元研では元生有研所員の村田さん(現・大阪大学教授)が渦鞭毛藻を培養してサンプルを得ていたので¹³CO₂を吹き込んでエンリッチすることを提案した。後に村田さんは¹³Cを4%に高めたサンプルのHMBCから¹³C-¹H間のスピン結合定数を求めて立体配座解析を行っている。

5. 固体NMRへの取り組み

1993年から2年間、コロンビア大学Ann McDermott教授のもとで研究する機会が得られた。このときの目的は固体NMRを有機化学研究にどのように生かせるかということであり¹⁹F間の距離測定を目指した。コロンビア大学で使った装置はChemagneticsのCMX-400(¹H共鳴周波数400 MHz)で、プローブはDOTYから手に入れ、いろいろなフィルターを組み合わせて¹Hと¹⁹Fの周波数分離を行った。当時中西研にいた門出さん(現・北海道大学教授)に¹⁹F間の距離の違う化合物をいくつか作ってもらい測定した^[5]。また、中西研では

フィラントトキシンというハチ毒のニコチン性アセチルコリン受容体への作用部位に関する研究が進んでおり、¹⁹Fでラベルしたフィラントトキシンと電気ウナギから採取したニコチン性アセチルコリン受容体の複合体の固体¹⁹F-NMRを測定した。クロロプロマジンと競合することまでは分かったが、再現性などの問題で残念ながら論文はされなかった。この時期、McDermott教授はSuraminというトリパノソーマ症の治療薬の作用機作に興味を持っており、TIMやPGKといった酵素存在下のSuraminの構造研究をStill教授のMacroModelを使って行った。このとき、化学教室には水溶液サンプルを測定できるようなNMRがなく、医学部まで行ってPatel教授の後を継いだArthur G. Palmer III教授のAM-500を借りて測定した。化学教室のあるメインキャンパスと医学部のあるアップタウンはかなり離れていたためデータを転送する必要があったが現在利用できるようなインターネットはなかった。大学のキャンパス間をつないでいるラインを使って2進数で構成されたFIDのファイルを一旦アスキー・コードに変換して伝送後に2進数に戻すという非常にややこしい操作が必要だった。このプロジェクトにはPalmer教授も参画してPGK(phosphoglycerate kinases)に結合した状態のSuraminのコンフォメーションを論ずることができた^[6]。

6. AVANCE-750とCMX Infinity-300の導入

生有研に戻ってから固体NMR測定用にCMX Infinity-300(¹H共鳴周波数300 MHz)を導入した。この時の研究所長は中嶋暉躬先生で、新しく所員となった野村さんが蜘蛛や蜂の毒成分で膜に穴をあけるタイプのペプチドの構造解析を行うことになる。溶液NMRはAVANCE-750(¹H共鳴周波数750 MHz)が導入され、菅さんを中心にパリトキシンの全帰属を行った。パリトキシンは分子式C₁₂₉H₂₂₃N₃O₅₄で帰属すべき炭素数だけでも129もあり、シグナルの混み合ったところは3D HSQC-TOCSYを用いる必要があった^[7]。また、Scripps研究所から帰ってきた菅瀬君がR2 Dispersionなどの手法を駆使したタンパクの動的な構造研究を始めた。

1990年代からNMR装置にはMRIで発展したグラジエントが組み込まれ、多次元NMR測定が一変した。グラジエントのもう一つの効用はDOSYなどにより拡散係数を測ることが可能となったことであ

る。その実験を通して熱対流の問題に取り組んだ。一般的なStimulated Echoタイプのパルス・シーケンスではNMRサンプルチューブ内に熱対流が存在すると正確な拡散係数を求めることができなくなる。熱対流の影響をキャンセルするようなパルス・シーケンスもあるが、存在する熱対流の効果を完全に払拭できたか見極めるのが難しい。細いNMRチューブでは熱対流が起こりにくいことに着目して、合成化学などでよく使われる細いキャピラリー(外径で0.8mm)を普通の5mm管に18本突っ込んで熱対流を抑制することを思いついた^[8]。

7. AVANCE III HD-800 と未来

2011年に研究所は公益財団法人に移行し、今年(2015年)、関西文化学術研究都市(愛称:けいはんな学研都市)に移転した。主要な溶液用NMR装置はAVANCE-750からAVANCE III HD-800 (¹H共鳴周波数800MHz)に更新された。この35年間あまり、ひたすら最新の手法に取り組み、どのように工夫したら天然物化学に上手くNMRが使えるかということを考えてきた。その時々で懸命に様々なことに取り組んだが、どちらかというとなMR現象とそれを観測する装置に興味があって過ごした研究人生だったと思う。しかし、それもある種の過渡期を体験したからのように思える。NMR、特に溶液NMR、は研究手段としては円熟期を迎えているように見える。これからはますます、何を研究していくかということが重要になるだろう。

ここでは取り上げられなかったが非常にたくさんの先生方と共同研究する機会があり多くの夢ももらった。感謝しても感謝しきれない思いである。

参考文献

- [1] Nakanishi K.(ed.), Kusumi T., Iwashita T., Naoki H. (1990) One-dimensional and Two-dimensional NMR Spectra by Modern Pulse Techniques, Kodansha (Tokyo)-University Science Books(California)
- [2] Uemura D., Hirata Y., Iwashita T. and Naoki H. (1985) Studies on Palytoxins, *Tetrahedron*, **41**, 1007-1017
- [3] Zagorski M. G., Norman D. G., Barrow C. J., Iwashita T., Tachibana K., Patel D. J. (1991) Solution structure of pardaxin P-2, *Biochemistry*, **30**, 8009-8017
- [4] Murata M., Naoki H., Iwashita T., Matsunaga S., Sasaki M., Yokoyama A., and Yasumoto T. (1993) Structure of maitotoxin, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 2060-2062
- [5] Gilchrist, Jr., M. L., Monde, K., Tomita, Y., Iwashita, T., Nakanishi, K., and McDermott, A. E. (2001) Measurement of Interfluorine Distances in Solids, *J. Magn. Reson.*, **152**, 1-6
- [6] Polenova T., Iwashita T., Palmer III A. G., and McDermott A. E. (1997) Conformation of the Trypanocidal Pharmaceutical Suramin in Its Free and Bound Forms: Transferred Nuclear Overhauser Studies, *Biochemistry*, **36**, 14202-14217
- [7] Kan, Y., Uemura, D., Hirata, Y., Ishiguro, M., and Iwashita, T. (2001) Complete NMR signal assignment of palytoxin and N-acetylpalytoxin, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 3197-3202
- [8] Iwashita T., Konuma T., Harada E., Mori S., and Sugase K. (2015) Use of glass capillaries to suppress thermal convection in NMR tubes in DOSY experiments, *Magn. Reson. Chem.* Submitted.



岩下 孝 (いわした・たかし)

1975年 東京教育大学理学部化学科 卒業
 1977年 東京教育大学大学院理学研究科化学専攻 修士課程修了
 1980年 筑波大学大学院化学研究科 博士後期課程修了 理学博士
 1980～2003年 財団法人サントリー生物有機科学研究所 研究員
 (この間、1986年2月～7月 米国コロンビア大学医学部D. Patel教授研究室、1992年4月～1994年3月 米国コロンビア大学化学科A. McDermott教授研究室留学)
 2003年 財団法人サントリー生物有機科学研究所 分析室長
 2005～2008年 同 主幹研究員・第一研究部長
 2008～2010年 同 主幹研究員
 2010年～現在 同 特任研究員
 (2011年 公益財団法人 サントリー生命科学財団 に名称変更)

磁場勾配NMR法の展開 ～電池材料中のイオン拡散挙動を評価する～

¹旭化成株式会社 基盤技術研究所、²旭化成ケミカルズ株式会社 交換膜事業部、³旭化成株式会社

橋本 康博¹、森川 卓也²、吉野 彰³

hashimoto.yv@om.asahi-kasei.co.jp

1. はじめに

磁場強度に勾配をかけることにより得られる位置情報を利用して、自己拡散係数を評価することができる。拡散係数は分子が動く速さに関する情報であり、電池材料におけるイオン伝導度に直接関係するパラメータである。さらには、サイズの情報に変換することができたり、イオンが拡散する場の構造についても知ることができる。本報告では、磁場勾配NMR法を利用した材料評価の魅力と、その応用例として、電気分解や電池の隔膜（セパレータ、電解質膜）の孔中のイオン拡散の評価事例を紹介する。

2. 拡散係数の測定

NMRマグネットのなかでは、試料溶液の分子はどれも同じ静磁場を感じているが、磁場勾配をかけると、分子の存在する位置によって異なる強さの磁場を感じるようになる。たとえば、同じ化合物のある核の共鳴周波数が、溶液の上部に存在する分子の場合には大きく、下部に存在する分子の場合には小さくなる。つまり、共鳴周波数から位置情報を得ることができるようになるのである。

このことを使って、拡散測定では、ある一定の時間 (Δ) 前後で移動しなかった成分、すなわち共鳴周波数が変化しなかった成分をエコー法で観測する。図1Aに代表的な拡散測定法である pulsed field

gradient spin echo (pfgse) 法を示す。第1の磁場勾配パルスの $\Delta/2$ 時間後に、180度パルスで磁化の xy 平面の成分を反転させ、その $\Delta/2$ 時間の後、第2の磁場勾配パルスを印加する。この間に移動した分子の磁化は、第1の磁場勾配パルスと第2の磁場勾配パルスで異なる磁場強度を受けるためリフォーカスされない。一方で、 Δ の間、同じ位置にあった分子の磁化は第2の磁場勾配パルスでリフォーカスされ、エコーを形成する。したがって、エコーの形成によるシグナル強度は、次式に示す通り、分子の拡散係数 (D) などに依存する^[1]。ここで、 E はシグナル強度、 γ は磁気回転比、 g は磁場勾配強度、 δ は磁場勾配印加時間、 E_0 は磁場勾配強度 $g=0$ におけるシグナル強度である。

$$E(\delta, g, \Delta) = \ln \frac{E}{E_0} = -\gamma^2 g^2 \delta^2 D (\Delta - \frac{\delta}{3})$$

x 軸を $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3})$ として、 y 軸に $\ln \frac{E}{E_0}$ をプロットすると直線となり、この拡散プロットの傾きから拡散係数を求めることができる(図1B)。直感的には、 Δ を長くしていきピークの減衰を観測するのが理解しやすいが、 Δ を変化させて測定すると、分子拡散とは関係ない緩和によるピーク減衰も起きてしまうため、実際には Δ を一定にして g を増加させて測定する。

磁場勾配強度 g の最大値で検出できる位置情報

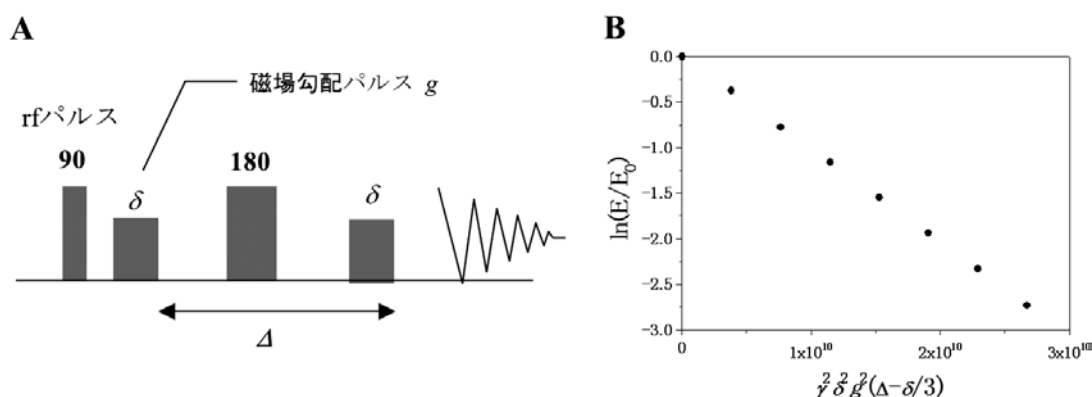


図1 自己拡散係数の測定

A: pulsed field gradient spin echo (pfgse) 法パルスシーケンス。B: 拡散プロット

の分解能が決まる。たとえば、磁場勾配が小さいと、一定時間にわずかな距離しか移動しない成分は、共鳴周波数があまり変化せず、ピークが減衰しない。磁場勾配が大きければ、少しの位置変化でもピーク強度が減少し、拡散係数を算出することができる。

多孔質セパレータのなかでは、イオンの移動は膜の孔の構造によって制限をうける。このため、拡散係数はバルクの電解液中のイオンより小さいことが多く、NMRによる拡散係数の測定には大きな磁場勾配 (1000 G/cm以上) をかける必要がある。

3. 材料評価における

磁場勾配 NMR 法のメリット

拡散係数の値を評価するにあたって、磁場勾配 NMR 法には下記に述べるさまざまな特徴がある^[2];

- ① 個々の NMR シグナルの拡散プロットを得ることができるために、シグナル (成分) ごとの拡散係数を得ることができる、
- ② 自己拡散係数に分布がある場合は、拡散プロットが下に凸のカーブになり、そこから拡散係数の分布評価が可能である (図2)、
- ③ 拡散係数から分子サイズや分子量への変換が可能である、
- ④ Δ 値により、観測するタイムスケール (= 拡散距離スケール) を選択・可変することができる。これらの特長を生かして、我々は以下のような材料評価を行っている。

3.1 混合物の化学構造と組成の解析

混合物試料で x 軸が NMR スペクトル、 y 軸が拡散係数である二次元 DOSY スペクトル^[3] を測定すると、いくつかの成分があるかを推定したり、成分ごとにシグナルを帰属したりすることが可能である。

煩雑な分離操作を必要とせず簡便であり、また、実際の状況に近い混合物のまま評価できる。

3.2 合成高分子の分子量と組成の解析

合成高分子は通常重合度の異なる分子の混合物であり、分子量には分布がある。分子量とその分布の幅は材料物性に大きく影響を与える。拡散係数は流体力学半径に反比例し、また流体力学半径は分子量の 0.5 乗～0.6 乗に比例する。そして、分子量の分布は拡散係数の分布として反映される。著しく狭い分子量分布の高分子として、単分散分子量ポリスチレンなどが知られているが、そのクロロホルム溶液中のポリスチレンの拡散プロットは直線になり、単一の拡散係数が得られていることがわかる (図2A)。一方、分子量分布の幅が広い多分散分子量のポリスチレンの拡散プロットは、その分布を反映して下に凸の曲線となる (図2B)。すなわち、拡散係数とその分布から、合成高分子の分子量分布解析が可能である。なお、拡散係数と分子量の関係は、溶液濃度などの測定条件によっても影響を受けるため、分子量分布の解析には、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) で行われているように単分散分子量ポリマーで作製した検量線を用いる。

複数のモノマーから構成される共重合高分子の物性は、モノマーの組成比や、その重合度依存性によって大きく影響をうける。これらの解析には、従来は GPC で分取した各分子量成分を NMR で組成分析するという煩雑な作業が必要であったが、磁場勾配 NMR 法では、前処理の必要なしに、成分ごとの拡散係数を直接求めることにより、同様の情報を取得することができる^[2,4]。

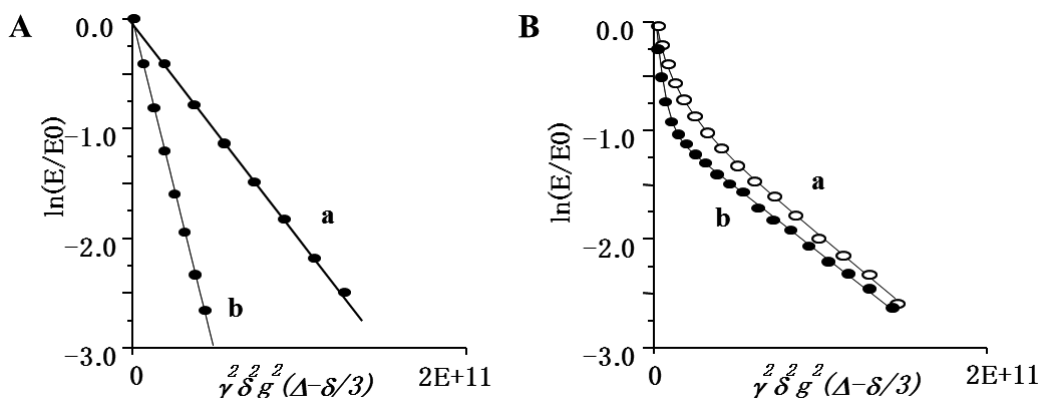


図2 ポリスチレン溶液の拡散プロット (CDCl₃中1 wt% 溶液、室温)

A: 単分散分子量ポリスチレン試料。aは分子量189,000、bは分子量37,200。B: 分子量の異なるポリスチレンを混合して多分散系とした試料。aは分子量2,740、37,200、189,000、707,000を1:1 (w/w) で混合、bは分子量2,740、707,000を1:1 (w/w) で混合。

3.3 分子会合の評価

複数の分子による会合体形成の評価は、創薬、診断薬、あるいはバイオセンサー開発に重要である。NMRでは、分子会合による見かけの分子サイズの変化を拡散係数の変化として観測する。会合しているか、していないかだけでなく、会合⇌非会合のダイナミクスに関する情報も得ることができる。会合の平衡反応において、交換速度が遅く、 Δ 時間の間会合体のまま、あるいは非会合の状態のまま変化しなければ、会合体と非会合の成分の拡散係数が別々に観測される。交換が Δ のタイムスケールより十分速ければ、平均化された値が得られる。このように Δ の設定を変えることで交換速度に関する情報も得ることができる^[5]。

3.4 分離膜中の物質移動

合成高分子や無機材料からなる分離膜は、医療分野では人工透析などに、また石油化学分野ではガス分離膜など、様々に利用されている。これら分離膜、たとえばガス分離膜などは目的のガス分子のみを選択的に透過させ、他のガス分子を遮断するように設計される。分離膜のなかのこれらの物質の拡散係数評価に加え、NMR緩和時間、¹²⁹Xe-NMR評価を組み合わせることで、選択透過性と、それらが拡散する場である分離膜の構造を解析することができる^[6]。

3.5 電池の電解液の評価

電解液のイオン伝導度は、イオンの解離特性や拡散係数に影響される。これら諸特性は溶媒の誘電率やイオンとの溶媒和特性に大きく左右される。磁場勾配NMR法では、電解液中のアニオン、カチオン、溶媒について、それぞれの拡散係数を得ることができ、電池の性能に関与するイオン種の拡散評価が可能である。例として、リチウムイオン二次電池の電解液の拡散プロットを図3に示す。カチオンやアニオンのそれぞれの拡散係数、そして、イオンごとに溶媒和したサイズを知ることができる。また、得られた拡散係数とイオン伝導度測定の結果を用いて、Nernst-Einstein式から解離定数を得ることができるなど、電解液の重要な基本特性を得ることができる^[7]。

4. 電池隔壁中のイオンの拡散係数測定と材料評価への応用

隔壁は電気分解システムや電池における、陽極

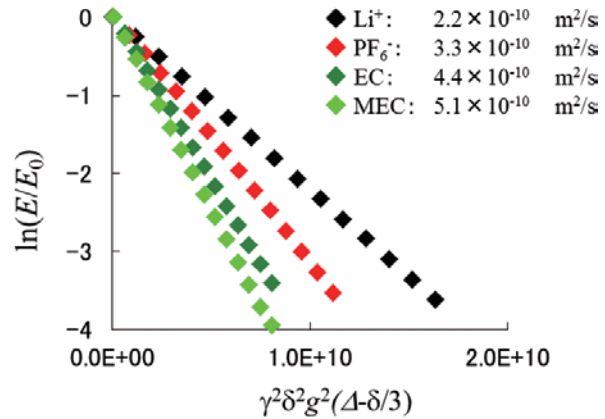


図3 リチウムイオン二次電池電解液の拡散プロット(室温)
電解質としてLiPF₆をエチレンカーボネート(EC)ーメチルエチルカーボネート(MEC)の混合溶媒に溶解した。

と陰極のあいだの隔膜であり、両極の絶縁を保ちながら、イオンを透過させる役割を担っている。用途に応じて微多孔膜や電解質膜が用いられる。食塩電解では電解質膜の中をナトリウムカチオン(Na⁺)が、固体高分子燃料電池では電解質膜の中をプロトン(H⁺)が、リチウムイオン二次電池では微多孔セパレータの中をリチウムカチオン(Li⁺)が透過する。また、食塩電解ではアニオンを遮断する必要もある。望みのイオン透過性・選択性を発現する隔膜を実現するには、イオンの通り道である孔の構造制御が重要である。

4.1 拡散係数の解析によるセパレータの構造評価

バルクの電解液中のイオンは、何にも制限されず均一に拡散し、拡散係数に分布はなく、拡散プロットは直線となる。一方、拡散する場の構造に制限される場合は、その拡散プロットの種々のパターン・挙動として反映される^[8]。隔壁は多孔質膜であり、その孔の中に電解液が満たされており、イオン拡散は孔構造の影響を大きく受ける。単純に孔径にだけでなく、孔の空間的な配置の不均一性(孔の分布の疎密)や、孔(形状、配置)の異方性などに大きく影響を受ける。イオンの拡散を磁場勾配NMR法でイオン拡散挙動を解析することで、このような孔の構造についての情報も得ることができる。

4.1.1 孔の疎密と拡散係数

さまざまな孔径の孔が連なって、ところどころボトルネックとなって孔と孔の間の移動が制限されているモデル構造(図4A)を考えてみる。このとき重要なのは、拡散係数測定の際の Δ の設定によ

り、観測できる拡散のタイムスケールが変わることである。イオンがひとつの孔内だけを移動し、ボトルネックに到達しない程度の短いタイムスケールでは、拡散係数値に分布が生じ、拡散プロットが下に凸の曲線となる。一方、イオンがボトルネックを1、2個通過する程度の少し長いタイムスケールでは、ボトルネック通過時の減速により、拡散係数は小さくなる。さらに長いタイムスケールで観測すると、イオンが数多くのボトルネックを通過することで拡散係数はいっそう小さくなり、やがて平均化されて収束するため、拡散プロットが直線になる。

このモデルを広いスケールに拡大したのが**図4B**である。多くの孔が互いに連結して密に存在する部分と、孔の連結度が低く疎になっている部分がある。このような孔の疎密に偏りがある場合、短い Δ では、密な部分に存在している拡散係数の大きなイオンと、疎な部分に存在している拡散係数の小さいイオンの両方が観測され、拡散プロットは下に凸の

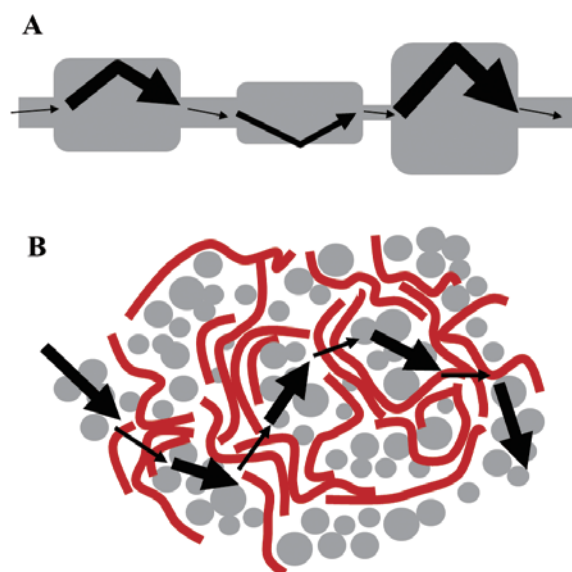


図4 微多孔中のイオン拡散挙動の模式図
A: さまざまな径の孔をイオンが通過するモデル。B: 孔の疎密がある材料中でのイオン拡散。

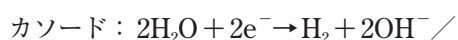
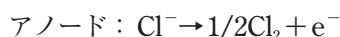
曲線となる。一方、長い Δ では、イオンが疎密の部分を行き来して、拡散係数が平均化される。このように Δ を変えて測定することで、孔の疎密分布に関する情報を得ることができる。

4.1.2 膜の異方性の評価

多孔膜中の孔の形や疎密分布は、等方的ではなく異方性をもつことがあり、出力特性に影響を与える。したがって、膜中のイオンの拡散係数の異方性を評価することが必要である。そのためには、評価対象の膜を、目的の方向にそろえてNMR試料管へ挿入する(**図5A**)。このような試料で、静磁場方向に磁場勾配を印加すれば、静磁場方向の拡散係数を測定していることになり、膜厚方向(z)、膜面の x 、 y 方向の拡散係数を独立に得ることができる(**図5C**)。

4.2 食塩電解

食塩電解は、以下の式のように電気分解により食塩水から塩素と苛性ソーダを製造するプロセスである。



隔壁は、フッ素系電解質ポリマーの多層膜で、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) を基本骨格にもち、イオン交換を担う交換基としてスルホ基およびカルボキシ基を有する(**図6A**)。膜は抵抗が低く、電流効率が高いほど性能が良いとされ、そのために Na^+ イオンの透過性と、アニオンの遮断性が求められる。

ポリマーは両親媒性であるため、**図6B**のように複数の交換基が集まって、含水された直径数nmのミセル(クラスター)を形成する。このイオンの通り道となるクラスター構造を制御することで Na^+ イ

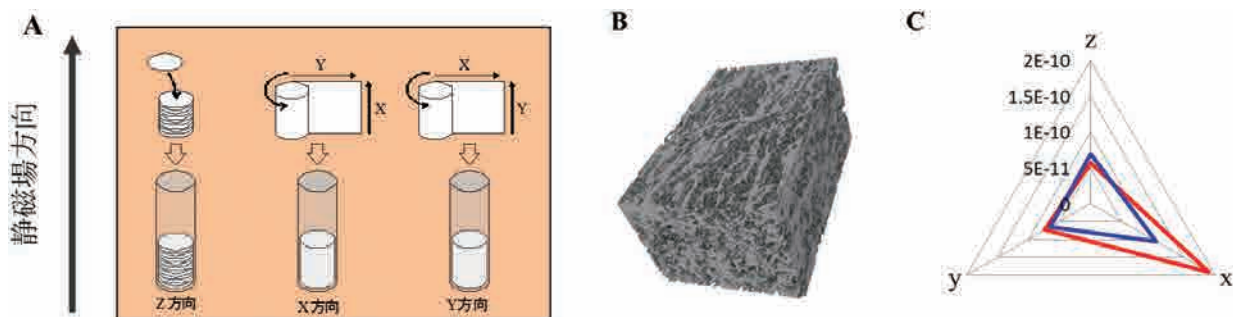


図5 膜の異方性の評価

A: 異方性のある膜をNMR試料管に挿入する際の方向。B: リチウムイオン二次電池セパレータのFIB-SEM画像の例。C: 2種類の膜について、各方向の拡散係数をプロットした例。

オンだけを選択的に通し、所望の性能を発現させることが求められる。そこで我々は、交換基の種類や量、および製膜条件が、クラスター構造やイオン拡散にあたる影響を明確にすることを目的に、小角X線散乱法 (SAXS)、および磁場勾配NMR法による解析を行った。

4.2.1 交換基の種類

まず、交換基が SO_3Na であるS膜と、 COONa であるC膜を水に含浸させ、 Na^+ イオンの拡散係数を測定した(図7A)。図中のEW (equivalent weight, 等価質量) は、イオン交換容量の逆数で、イオン交換基の量の指標となる。この膜の ^{23}Na -NMRシグナルの T_1 、 T_2 はともに短いため(～10ms)、拡散測定の際に Δ を長く設定することができず、また、 ^{23}Na 核は磁気回転比が小さいため、良好な減衰を得るには、1000 G/cm以上の磁場勾配が必要であった。図7AのグラフからS膜中の Na^+ の拡散係数(D_{Na})は $1.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ 、C膜中の D_{Na} は $4.7 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ と求められ、 Na^+ イオンはC膜中ではS膜中よりもはるかに遅く拡散することがわかった。これは、カルボキシ基はスルホ基よりも水の配位能が低いため、ポリマーの含水率が低くなり、径が小さいクラスターを形成することが主な原因と考えられる。

4.2.2 Na^+ イオンの透過性とクラスター径

次に、製膜条件やEWを変化させてクラスター径の異なる膜を作製し、クラスター径と Na^+ イオンの拡散係数の関係を調べた。SAXSで求めたクラスター径と磁場勾配NMR法で求めた Na^+ イオン拡散係数を比較したところ(図7B)、予想どおり、 Na^+ イオンの通り道であるクラスター径が大きいほど、 Na^+ イオンの拡散係数が大きいことがわかった。図7Bのプロットが直線ではないのは、クラスター径が大きくなるにしたがってイオンの通り道が増大することに加えて、個々のクラスターの連結による効

果が加わるためであると考えられる。クラスターの連結については、直接の評価が困難であるが、クラスター径と同等に、拡散係数に影響を及ぼす重要な因子であると考えている。

図7には示していないが、これら種々の膜の中で Na^+ イオンの拡散係数とイオン伝導度には比例関係が成立し、イオンの拡散がイオン伝導を発現する直接の因子であることを示している。また、 Na^+ イオンと溶媒である水の拡散係数の比はどの試料においても約3で一定の値であった。これは後述する固体高分子形燃料電池 (PEFC) のセパレータにおいて、水の拡散係数とイオン伝導度に比例関係が見られないことや、プロトンへの水の配位状態が湿度によって変化することと対照的である。

4.2.3 イオンの選択透過性

これまでの測定は膜を水に浸して行ったが、イオンの選択透過性の評価は膜を電解液に浸して行う。ただし、膜の外のイオンを除外して、膜の中のイオンの拡散係数のみを測定する必要がある。NMRで膜の内外のイオンを区別できるかを確認するため、S膜を3.5 N NaCl水溶液に浸漬し、 ^{23}Na -NMRと ^{35}Cl -NMRを測定したところ、膜内と膜外のイオンで化学シフトが異なることがわかった(図7C)。そこで、膜内イオンの拡散係数を求め、 Na^+ イオンの拡散係数、 Na^+/Cl^- の拡散係数の比、 H_2O の拡散係数を求めた。それぞれ、電解性能における、抵抗、カチオン選択透過性、透水量に関するパラメータである。このような解析は、例えばイオン伝導度測定では行えないことであり、NMRの優位性を示すものである。なお、残念ながらC膜については、イオンの拡散係数が小さく、またS膜中に比べて T_1 、 T_2 ともに極端に短いため同様の評価ができなかった。このような拡散係数が小さく、緩和時間の短い試料の評価が、今後の課題である。

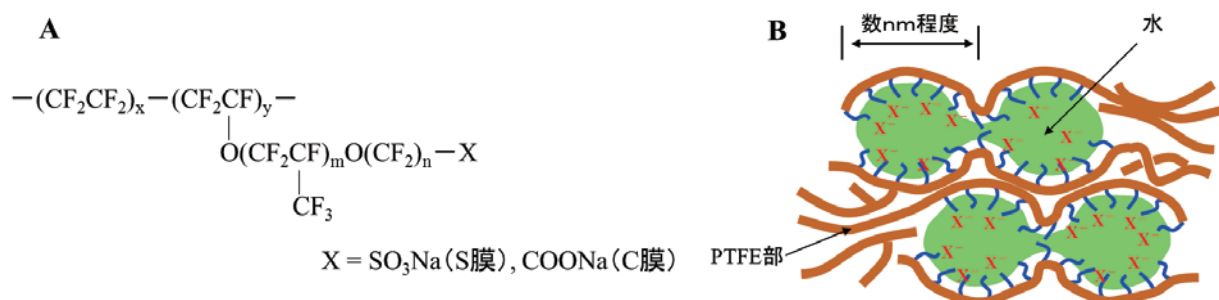


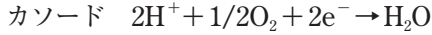
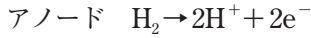
図6 フッ素系電解質ポリマー

A: 1次構造。B: 複数の交換基で形成されたクラスター。

4.3 固体高分子形燃料電池 (PEFC) の

セパレータの解析例^[9]

PEFCは、次世代水素エネルギー社会に向けた家庭用、自動車用発電システムとして大きく期待されている。



セパレータとして広く用いられているのは、スルホン酸型のフッ素系電解質ポリマーで、食塩電解用とは異なり、交換基はプロトン型になっている(図6A, X=SO₃H)。プロトンがアノードからカソードに移動するが、相対湿度の低い条件でプロトン伝導度が急激に低下することが問題となっている。膜のプロトン伝導度が湿度に依存して変化する機構の解明をめざして、各種の湿度条件で、水の拡散係数の測定、SAXSによるクラスター構造解析、および赤外分光法(IR)による水の状態分析を行った。

なお、このフッ素系電解質ポリマーは、含水平衡に至る時間が非常に短く、事前に湿度調整を行っても、測定中にその雰囲気相対湿度にしたがって含水率が変化してしまう。そのため各種の測定は、密閉した測定試料管内に、飽和蒸気圧が異なる下記の飽和塩水溶液を静置して調湿しながら行った。LiC-H₂O (11% RH)、CaCl₂·6H₂O (32% RH)、KNCS (47% RH)、NaNO₂ (66% RH)、NaCl (76% RH)、KCl (86% RH)、K₂SO₄ (96% RH)。NMR測定では、飽和塩水溶液を入れた3mmφNMR試料管を、5mmφNMR試料管の上部の検出コイルのない位置に吊るした。

4.3.1 イオン伝導度と含水率の湿度依存性

まず、PFEC膜の含水率とイオン伝導度の湿度依存性を調べたところ、両方のプロットとも直線にならなかった(図8A)。相対湿度が0から30% RHの条件では、相対湿度の上昇に伴って含水率が増加

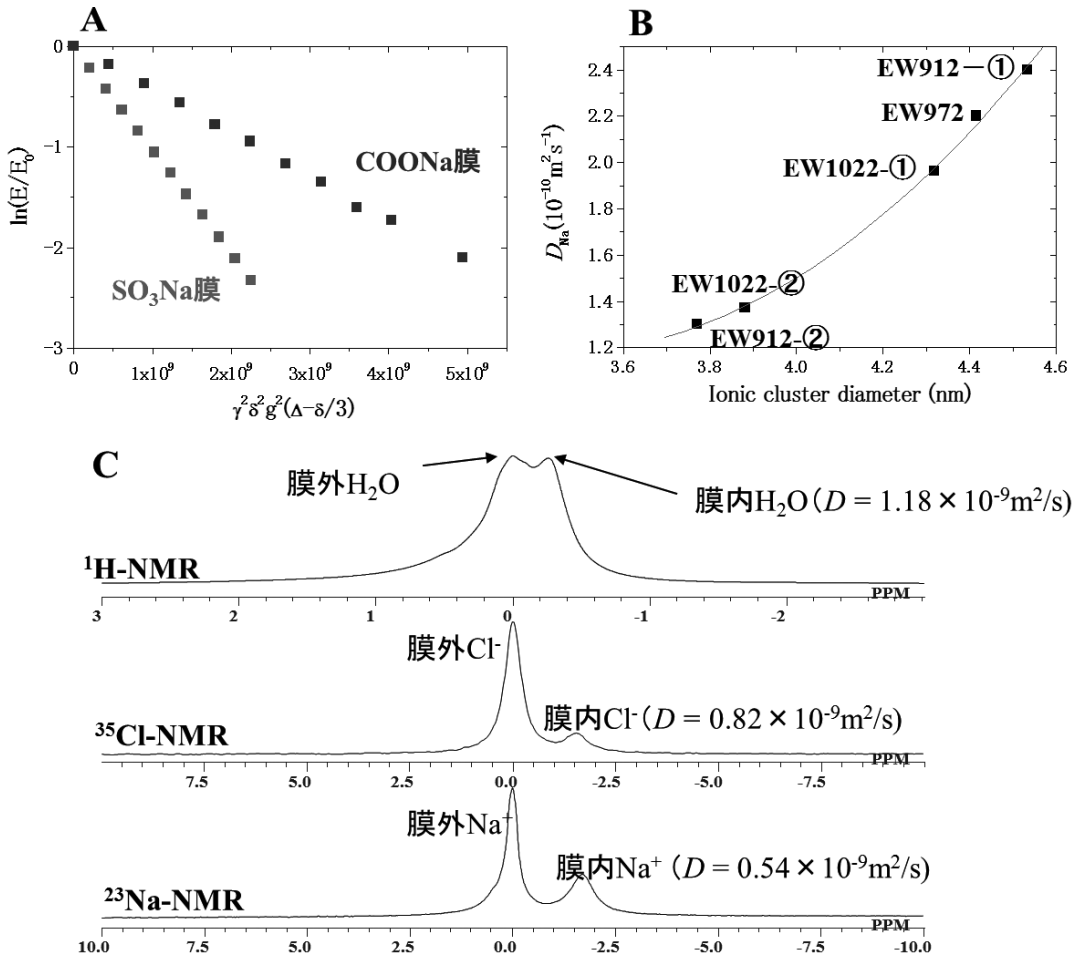


図7 食塩電解用隔壁のイオン拡散評価

A: SO₃Na膜 (S膜) (EW=950) と COONa膜 (C膜) (EW=1150) の²³Na拡散プロット (90°C)。B: EWが異なるS膜についてSAXSで求めたクラスター径と、磁場勾配NMR法で求めたNa⁺イオンの自己拡散係数の関係 (室温)。①と②は同じEWのポリマーについて製膜条件を変えてクラスター径を制御したもの。C: 3.5 N NaCl水溶液に浸漬したS膜の²³Na、³⁵Cl、¹H-NMRスペクトル (80°C)。磁場勾配法で求めた拡散係数をスペクトル上に示した。

したが、イオン伝導度の上昇は緩やかであった。一方で、70%RH以上の条件では、相対湿度上昇に伴って、含水率とイオン伝導度の両者が、急激に増加した。この系で移動しているイオンは H^+ だけであり、イオン伝導度の測定では H^+ の伝導を見ていることになる。そのため、この結果は、高湿度下と低湿度下で H^+ 伝導機構が異なることを示唆している。

4.3.2 $H^+(H_2O)_n$ の拡散係数の湿度依存性

次に、磁場勾配法NMR (1H)で膜中の $H^+(H_2O)_n$ の拡散係数の湿度依存性を調べた(図8B)。相対湿度の低下に伴い拡散係数が減少しており、 $H^+(H_2O)_n$ が拡散しなくなることがイオン伝導度低下の直接の原因となっていることがわかった。 $H^+(H_2O)_n$ の拡散係数に対してイオン伝導度をプロッ

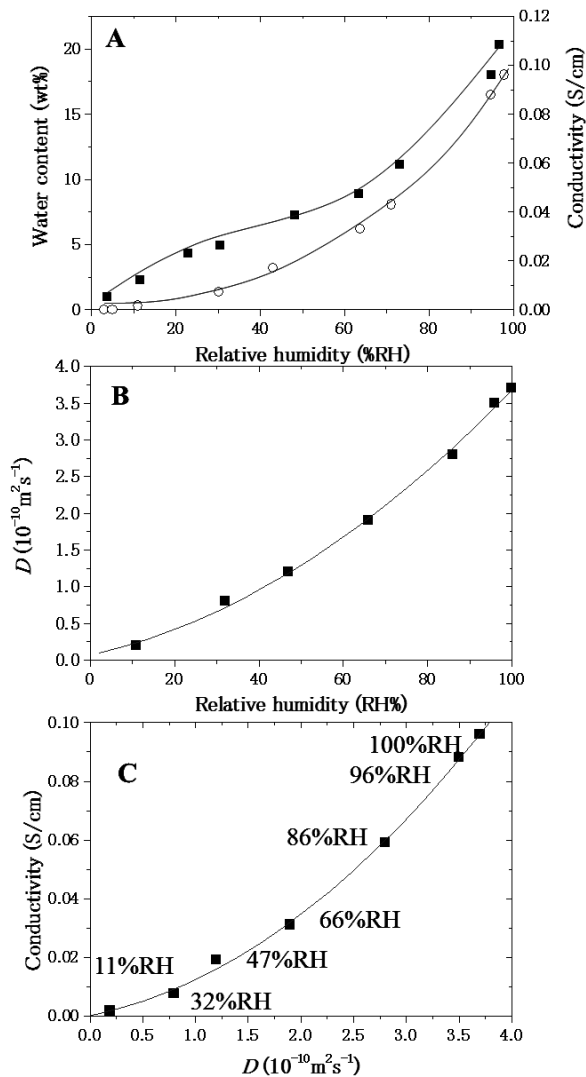


図8 PEFCセパレータ (EW = 950) の含水性と拡散挙動の相対湿度依存性 (室温)
A: 含水率 (■) とイオン伝導度 (○) の相対湿度依存性。B: $H^+(H_2O)_n$ の拡散係数の相対湿度依存性。C: $H^+(H_2O)_n$ の拡散係数とイオン伝導度の関係。

トするとグラフは曲線となり(図8C)、4.2の食塩電解セパレータ中の Na^+ イオン拡散係数とイオン伝導度が比例関係にあったのとは異なる結果となった。 $H^+(H_2O)_n$ の拡散係数の増加がもたらすイオン伝導度の上昇の度合いが、低湿度と高湿度で異なることを示しており、前述の、湿度によるプロトン伝導機構の変化を支持するものである。

4.3.3 束縛水と自由水

次にプロトンが拡散する媒体である水についてIRで分析を行った。IRでは電解質膜中の水の状態、特に束縛水と自由水の挙動を明確に追跡することが可能である(図9A)。IRスペクトルのOH変角振動の領域に2種類のピークが観測され、 $1710 cm^{-1}$ のピークがスルホ基の酸素と直接水素結合している束縛水、 $1640 cm^{-1}$ のピークがその外側に存在しバルク水と同じような挙動を示す自由水と帰属される。2つのピークの面積を湿度に対してプロットすると(図9B)、0から30% RHまでの低湿条件では、相対湿度の上昇にしたがって束縛水のピークが急激に増大するが、30% RH以上では束縛水の量に変

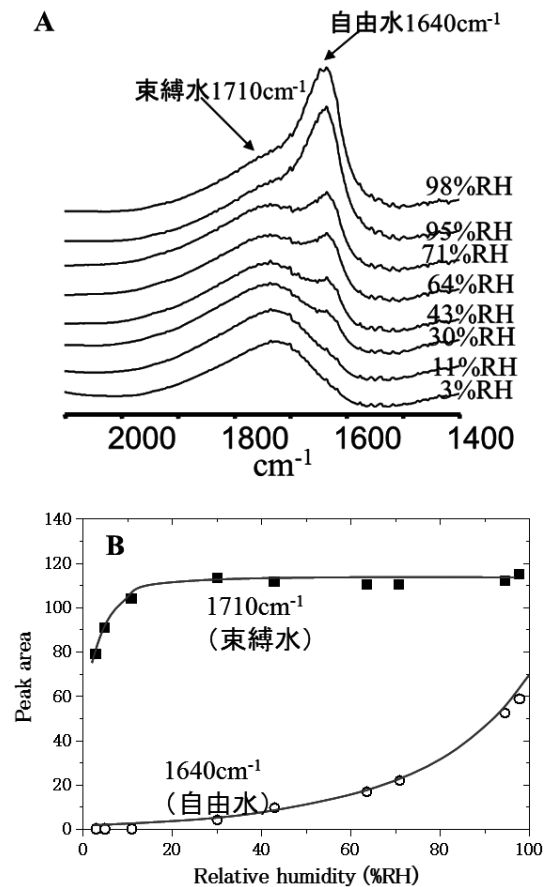


図9 PEFCセパレータ (EW = 950) 中の水の状態評価
A: IRスペクトル (透過法、室温) の相対湿度依存性。B: $1640 cm^{-1}$ と $1710 cm^{-1}$ のピーク面積の相対湿度依存性。

化は見られなかった。一方、自由水は0から30% RHではほとんど増加しないが、30%RHから徐々に増え、70%RH以上では急激な増加が見られた。

0～30% RHの低湿条件においては、相対湿度上昇に伴い含水率が増加するにも関わらずイオン伝導度が向上しなかった。これは、この湿度領域での含水率の上昇が束縛水の増加によるものであり、そのイオン伝導度への寄与は、高湿度下で急増する自由水よりも非常に低いことを示している。

4.3.4 SAXSによるクラスター構造の解析

PEFCセパレータのイオンの通り道は、食塩電解の隔膜と同様に、交換基が形成するクラスターである。その構造の湿度による変化をSAXSで解析した(図10A)。 $2\theta = 2.5^\circ$ 付近にクラスターの干渉によるピークが観測され、そのピーク強度が相対湿度上昇にしたがって増加した。このことから含水率の増加に伴って、クラスター形成が進行していることが

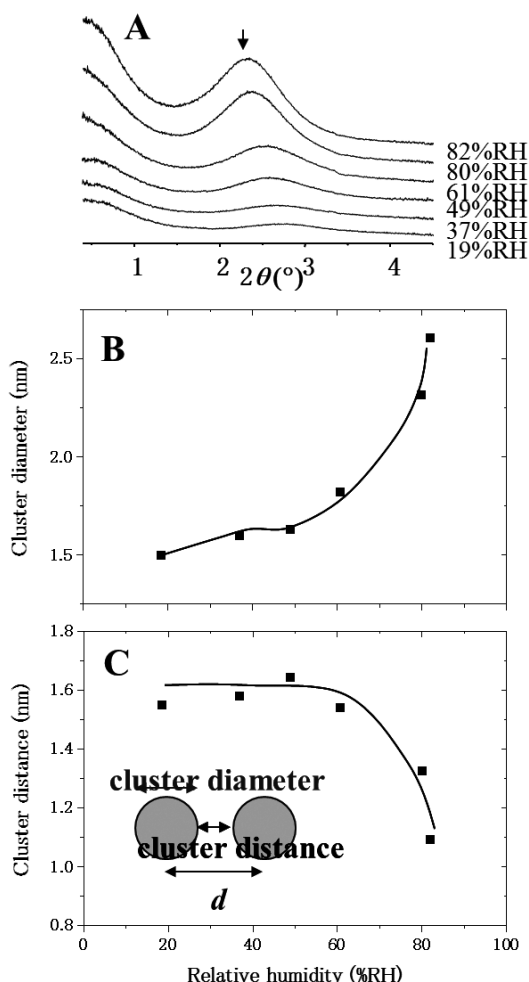


図10 PEFCセパレータ (EW=950) のクラスター評価
A: SAXSプロファイルの相対湿度依存性 (室温)。B: SAXSプロファイルからフィッティングで求めたクラスター径の相対湿度依存性。C: クラスター間距離 (d 値) の相対湿度依存性。

わかる。また、ピークが徐々に低角側へシフトしており、隣接するクラスターの中心間の距離 (d 値) が大きくなっていることがわかった。SAXSプロファイルからフィッティングによって求めたクラスター径を相対湿度に対してプロットすると、IRで自由水の急増が観測された70%RH付近で、クラスター径が急に大きくなることがわかった(図10B)。 d 値からクラスター径を差し引いた値は隣接するクラスターとの間隔の指標となり、この値が相対湿度の上昇とともに小さくなったことから(図10C)、クラスター同士が近接し、連結が進んでいると考えられた。なお、高湿度下ではSAXSフィッティング時に仮定している剛体球モデルが適用できないとも考えられるため、値そのものの議論はできず、あくまでも傾向の議論にとどめるべきである。

4.3.5 PEFCのセパレータの

プロトン伝導メカニズム

上述の通り、自己拡散係数の測定結果を、IRやSAXSなどと合わせて総合的に解析することで、湿度に依存したプロトン伝導メカニズムの変化を以下のように推定した。

0～30% RHの低湿条件では、水はスルホ基に配位した束縛水として存在する。束縛水は運動性が低くイオン伝導性への寄与は小さい。30% RH～70% RHでは、相対湿度を増加させても、束縛水は増加せず自由水が微増する。自由水は本来イオン伝導性への寄与が大きいものの、この増加量ではイオン伝導度は大きく上昇しない。相対湿度70%RHから100%RHまで増加させると、自由水が急激に増え、クラスター径が大きくなり連結も進むことで拡散係数が増大する。この条件で拡散係数の増加以上にイオン伝導度の上昇が見られるのは、低湿度下ではプロトンが束縛水を随伴しながら伝導していたのに対して、高湿度条件ではプロトンがホッピングしながら移動することでイオンが伝導するGrotthuss機構がはたらくためと考えられる^[10]。

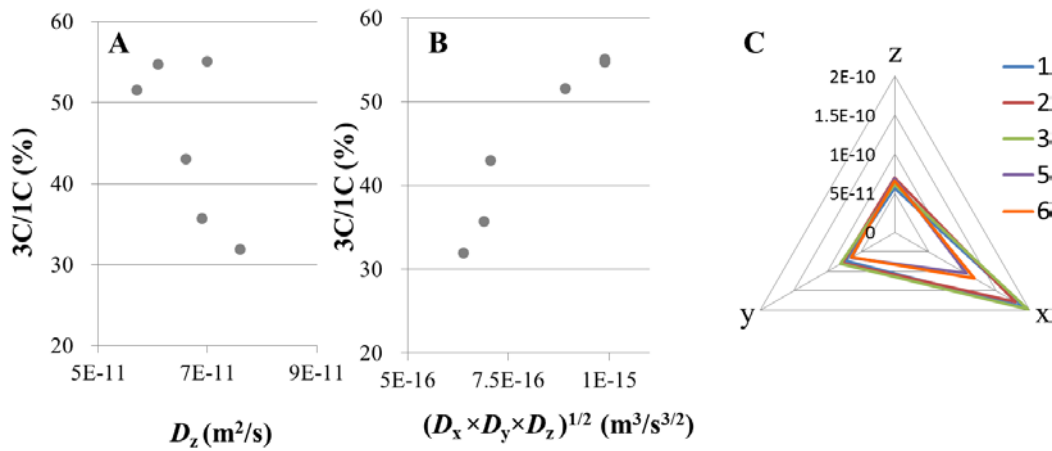
4.4 リチウムイオン二次電池の

セパレータの解析例

リチウムイオン二次電池は、スマートフォン、パソコン、ハイブリッド車、電気自動車など高いエネルギー容量密度が必要とされる分野で広く使われており、現在のモバイル社会に貢献している。セパレータは湿式相分離法、あるいは乾式開孔法で製造されたポリオレフィン系の微多孔膜である。孔

表1 評価に用いたリチウムイオン二次電池セパレータの放電レート特性

	Separator 1	Separator 2	Separator 3	Separator 4	Separator 5	Separator 6
放電容量維持率 3C/1C	55.1%	54.7%	51.6%	43.0%	35.7%	31.9%

図11 リチウムイオン二次電池セパレータ中のイオン拡散評価 ($\Delta = 50$ ms)

A: D_z と 3C/1C の相関。B: D_x 、 D_y 、 D_z の積の平方根と 3C/1C の相関。C: 各セパレータ中の Li^+ イオン拡散係数の異方性。

の中には電解液が満たされており、充放電の際には Li^+ イオンがその中を移動する。孔のサイズは膜の種類によって異なるがサブ μm オーダーである。 Li^+ イオンのサイズに比べてはるかに大きい、その拡散は孔の構造に大きく影響される。そのため、膜の電池出力特性を制御するために“孔構造”の設計が重要である。そこで我々は、孔構造の3次元観察(集束イオンビーム走査電子顕微鏡:FIB-SEM)、3次元像から得られた構造のなかでのイオン拡散シミュレーション、および磁場勾配NMR法による微多孔中の Li イオン拡散の実測により、孔構造が拡散挙動や電池出力特性に及ぼす影響を明らかにすることを試みている。拡散性に影響する因子として、孔の大きさに加えて、孔の連結性、異方性、疎密分布が鍵となる。本報では、磁場勾配NMR法を中心に紹介する。

4.4.1 孔の異方性と出力特性

まず、セパレータの孔の異方性を拡散係数測定で評価し、電池特性との関連を調べた。電池の正極には $LiCoO_2$ を、負極にはグラファイトを、電解液は $1 M LiPF_6$ のエチレンカーボネート(EC)/メチルエチルカーボネート(MEC)(1:2v/v) 溶液を用いた。電池特性の指標のひとつに放電レート特性がある。一定電流で放電を行ったときに1時間で放電終了となる電流値が1Cと定義される。3Cは1/3時間で放電終了となる電流値である。たとえば

3Cと1Cでの放電容量の比(3C/1C放電容量維持率)は、より大きな電流で放電したときの出力低下を示す指標となり、数値が大きいほど出力低下が少なく、特性が良いことを示す。この放電レート特性の異なる6種類の電池のセパレータ(表1)について、異方性を調べた。

電池の充放電においては、 Li^+ イオンは、膜の片側から反対側へ膜厚方向に移動する。したがって、当初我々は、出力特性には膜厚の z 軸方向の拡散性(D_z)のみが影響するものと予想していた。しかし、これら膜中の Li^+ イオンの拡散係数を測定したところ、 D_z と放電容量維持率(3C/1C)の間には相関が得られなかった(図11A)。一方、 D_z 、 D_x 、 D_y の積の平方根($(D_x \times D_y \times D_z)^{1/2}$)と放電容量維持率(3C/1C)との間には正の相関があり(図11B)、トータルの拡散係数が高いものが、出力特性が良いという結果が得られた。 $(D_x \times D_y \times D_z)^{1/2}$ は、一定時間内にイオンが動くことができる自由空間の体積の指標である。また、セパレータごとに D_z 、 D_x 、 D_y の値をプロットすると(図11C)、いずれの膜も、3方向の拡散係数のうち x 方向が最も大きく、3C/1Cが50%台である1, 2, 3のセパレータの D_x は、3C/1Cが30%台である5, 6のセパレータの D_x より明らかに大きいことがわかった。

この実験では、拡散係数は約 $1 \mu m$ オーダーでの評価であるが、実際の膜厚は約 $20 \mu m$ であり、もし、 $20 \mu m$ スケールでの D_z 評価ができるならば、

その値は3C/1Cの放電容量維持率と相関すると予想される。しかし、そのようなスケールではなく、短距離での拡散異方性データを取得する意義は、小さなスケールで見るときにセパレータの各方向にイオン拡散させる能力を評価することにある。今回の種々セパレータでは、出力特性の良いセパレータは、小さなスケールでは膜面方向 (x) にもイオンを拡散させる能力が高かった。このことからイオンの動きを推定すると、イオンが孔の中を膜厚方向 (z 軸) に動いているとき、孔構造の行き止まりや、孔が疎な部分、あるいは孔のボトルネックなどの障壁に出会うと、さらに z 軸方向に進むためには、これらを迂回する必要がある。そのときに膜面方向 (x , または y) への拡散性が重要となると考えられる。セパレータでは孔構造はきれいに整列しておらず、むしろランダムであるため、分布 (大きさ、場所) が生じることはやむを得ない。むしろその拡散障壁をいかに迂回させることができるか、ということが出力特性に大きく効くことを示している。

4.4.2 孔の疎密分布

次に低温での使用や急速放電といった、よりきびしい条件での出力特性に差のある膜を解析した例について述べる。表2、および図12に、気孔率の異なる3種のセパレータについての諸特性を示

表2 低温条件およびハイレート放電での放電特性評価に用いたセパレータ

サンプル	膜1	膜2	膜3
厚み (μm)	20	20	20
気功率 (vol%)	44	40	38
透気度 (sec/100cc)	220	270	360
孔径 (μm)	0.070	0.070	0.072

す。電解液は1 M LiPF_6 のEC/MEC (3 : 7 v/v) 溶液を用いた。15Cは一定電流で放電を行ったときに1/15時間 (4分) で放電が終了する電流値であり、15C/1Cは3C/1Cよりも大電流で急速に放電する際の出力特性を表している。3種の膜のなかで、気孔率38%セパレータ (膜3) のみ、 -30°C での抵抗値、および放電容量維持率 (15C/1C) の傾向が他のセパレータ (膜2、3) と異なり、出力特性の急激な低下がみられる (図12)。なお、図には示していないが、室温での抵抗値、および3C/1C放電容量維持率は、この3種類のセパレータ間の差異は小さい。

それぞれの膜の x , y , z 方向についての Li^+ イオンの拡散係数を測定すると、 D_z 、および $(D_x \times D_y \times D_z)^{1/2}$ は気孔率と良い相関が得られた (図13)。つまり、出力特性の傾向とは一致しておらず、低温条件 (-30°C) や放電容量維持率 (15C/1C) などの出力特性を Li^+ イオンの拡散係数で説明することはできなかった。

そこで、それぞれのセパレータについて拡散時間 Δ を20から800msまで可変させながら拡散測定を行った (図14)。 $\Delta = 20\text{ms}$ の拡散プロットは、直線

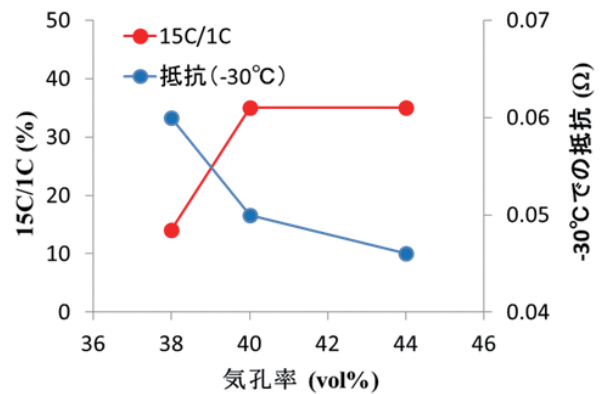


図12 リチウムイオン二次電池セパレータの出力特性と気孔率の相関

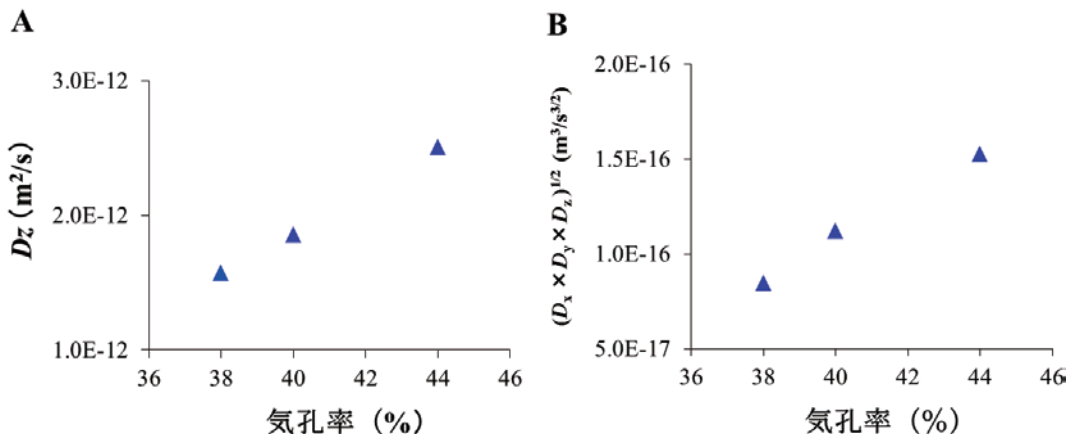


図13 リチウムイオン二次電池セパレータ中のイオンの拡散係数 ($\Delta = 50\text{ms}$)

A : 気孔率と D_z の相関。B : 気孔率と D_x , D_y , D_z の積の平方根との相関。測定は -30°C で行った。

ではなく下に凸の曲線であったが、 Δ を長くすると、拡散プロットは曲線から徐々に直線へと変化した。この結果は、4.1.1で示した孔の疎密分布を示しており、短い Δ での拡散係数はローカルな孔構造の不均一性を反映しているのに対して、長い Δ では、イオンが疎密の偏りを超えて長距離を移動して平均化されたため(図4)、と説明できる。

拡散プロットの曲線は気孔率が低いほどより深い凸で、より長い Δ で直線になる傾向を示した。そこで、拡散係数が平均化されて拡散プロットが直線になるために必要な拡散距離を算出してみると、膜3は突出して長いことがわかった(図15)。この距離は、孔が密な部分と、疎な部分の偏りを表す指標であり、膜3では、粗密の偏りが大きいため、拡散係数が平均化するのに長い距離の移動が必要になっていると考えられた。このような膜では、低温や高速放電の際に Li^+ イオンが孔の密な部分に滞留したままになりやすく、放電特性が低下する考えられた。

D_z が気孔率と相関し、出力特性と関係がなかったのは(図13)、拡散プロットから拡散の遅い成分

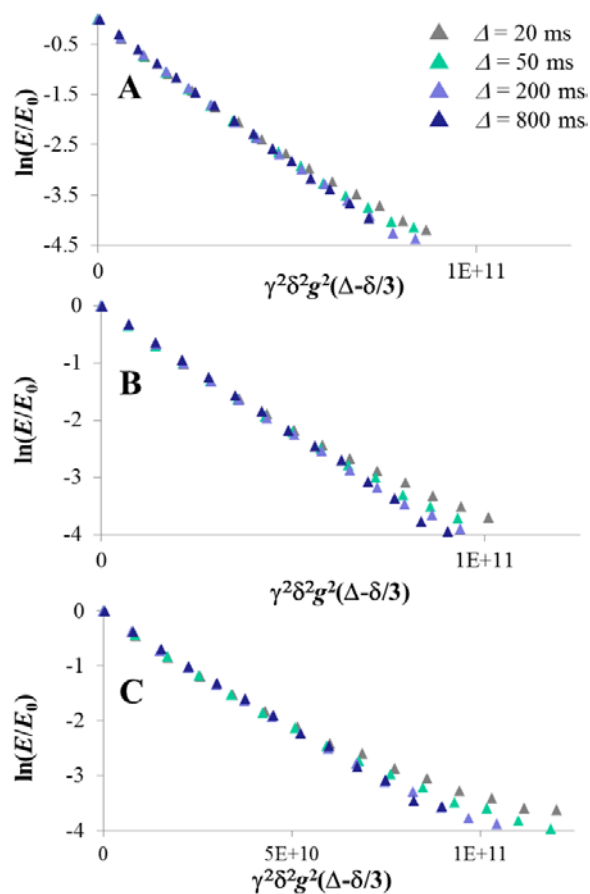


図14 リチウムイオン二次電池セパレータ中のイオン拡散係数 (30 °C)

A : 膜1 (気孔率44%膜)。B : 膜2 (気孔率40%膜)。
C : 膜3 (気孔率38%膜)。

を除いて拡散係数を求めたため、得られた D_z に滞留する成分の寄与がないからである。また、図13の測定条件($\Delta=50$ ms)は μm オーダーの拡散を観測しているのに対し、図15で求めた疎密分布のオーダーは10 μm である。したがって、図13Bの $(D_z \times D_x \times D_y)^{1/2}$ はおもに、セパレータの孔内だけの拡散を大きく反映することになり、気孔率と相関が得られた一方で、図14の Δ が長い条件では、 Li^+ イオンが長距離を移動し、孔の疎密が平均化された拡散係数が得られたと思われる。

5. おわりに

種々隔膜中のイオンの拡散挙動から、膜の孔構造を評価し、膜の特性とともに解析した事例を紹介した。多孔質膜中のイオン拡散測定の目的は、単にイオンの拡散係数を得ることではなく、イオンが拡散する場である孔の構造も知ることにある。得られた拡散係数を、NMR以外の計測技術と組み合わせで解析することで、孔構造の評価を行い、その結果を孔の設計や制御に役立てることができる。近年では有機系合成高分子膜に加えて、無機固体電解質膜も注目を浴びており、今後はこれら新規材料への磁場勾配NMR法の適用も期待される^[11]。

謝辞

磁場勾配NMR法に関してご助言、ご指導をいただいた、筑波大学 早水紀久子博士、(株)JEOL RESONANCE 櫻井智司様に感謝申し上げます。食塩電解セパレータの評価は旭化成ケミカルズ(株) 後藤寿久様、角佳典博士との、燃料電池膜評価は旭化成イーマテリアルズ(株) 三宅直人様、および旭化成(株) 飯嶋秀樹博士、坂本直紀博士との、リチウムイオン電池セパレータ評価は旭化成イーマテリアルズ(株) 河添慎也様、畑中博司様、大海一洋様、および旭化成(株) 野崎貴司様との共同で実施しました。リチウムイオン二次電池膜の拡散評価、

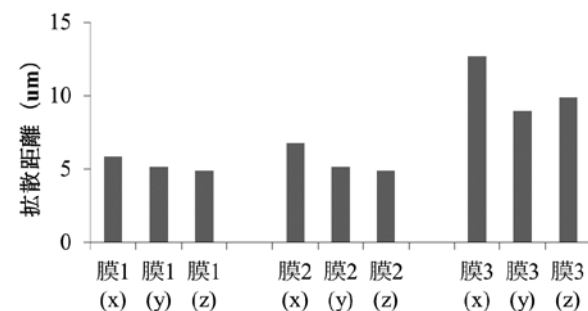


図15 リチウムイオン二次電池セパレータ中のイオンの拡散プロットが直線性を示すために必要な拡散距離

FIB-SEM観測は旭化成(株)乙部博英様、山本挙博士と共同で実施しました。拡散評価全般にあたっては旭化成(株)堀池則子様、名雪三依様、および内智景様と一緒に行ったものです。最後に、本論文の執筆全般においてアドバイスをいただきました、北海道大学福士江里博士に感謝いたします。

参考文献

- [1] Stejskal, E. O., and Tanner, J. E. (1965) Spin diffusion measurements: Spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *J. Chem. Phys.* **42**, 288-282.
- [2] 橋本康博、名雪三依、堀池則子、吉野彰(2008) PFG-NMR法から得られる情報～イオン拡散挙動、分子会合状態、合成高分子の分子量/組成相関～. 日本電子News **40**, 14-21.
- [3] Johnson Jr, C. S. (1999) Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **34**, 203-256.
- [4] 右手浩一(2007) 合成高分子の化学構造分布を測定するNMR. 生産と技術 **59**, 26-31.
- [5] 橋本康博、堀池則子(2009) DOSY NMR法の展開 包接現象を評価する. 化学と生物 **47**, 8, 578-583.
- [6] 吉水広明、岡澤誠裕、神野哲史、浅野朋子、鈴木智幸(2012) 種々のガラス状態にあるポリフェニレンオキサイドにおける気体の拡散特性のNMR法による評価. 高分子論文集 **69**, 7, 424-434.
- [7] Hayamizu, K., Aihara, Y., Arai, S., and Martinez, C. G. (1999) Pulse-Gradient Spin-Echo ^1H , ^7Li , and ^{19}F NMR Diffusion and Ionic Conductivity Measurements of 14 Organic Electrolytes Containing $\text{Li}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$. *J. Phys. Chem. B.* **103**, 519-524.
- [8] 早水紀久子(2006) 多核種NMR法によるポリエチレンオキサイド(PEO)系電解質中のイオン拡散と高分子鎖運動の研究. 高分子論文集 **63**, 1, 19-30.
- [9] 橋本康博、坂本直紀、飯嶋秀樹(2006) フッ素系燃料電池電解質膜の水の状態とクラスター構造がイオン伝導性に与える影響. 高分子論文集 **63**, 3, 166-173.
- [10] Zawodzinski, Jr., T. A., Derouin, C., Radzinski, S., Sherman, R. J., Smith, V. T., Springer, T. E., and Gottesfeld, S. (1993) Water uptake by and transport through Nafion[®] 117 Membranes. *J. Electrochem. Soc.* **140**, 4, 1041-1047.
- [11] Hayamizu, K., Matsuda, Y., Matsui, M., and Imanishi, N. (2015) Lithium ion diffusion measurements on a garnet-type solid conductor $\text{Li}_{6.6}\text{La}_3\text{Zr}_{1.6}\text{Ta}_{0.4}\text{O}_{12}$ by using a pulsed-gradient spin-echo NMR method. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, in press.



橋本 康博 (はしもと・やすひろ)

1993年 北海道大学大学院農学研究科林産学専攻修士課程修了
 1993年 旭化成株式会社 基盤技術研究所
 1996年 ペンシルバニア大学 派遣研究員
 1998年 オックスフォード大学 派遣研究員
 2000年 旭化成株式会社 基盤技術研究所 現在に至る
 2001年 博士(薬学)取得



森川 卓也 (もりかわ・たくや)

2000年 京都大学大学院工学研究科材料科学専攻修士課程修了
 2000年 旭化成株式会社 基盤技術研究所
 2014年 旭化成ケミカルズ株式会社 交換膜事業部 現在に至る



吉野 彰 (よしの・あきら)

1972年 京都大学工学研究科石油化学専攻修士課程修了
 1972年 旭化成株式会社
 1994年 (株)エイ・ティーバッテリー 出向
 1997年 旭化成株式会社 現在に至る
 2005年 博士(工学)取得
 2010年 技術研究組合リチウムイオン電池材料評価研究センター(LIBTEC) 理事長

創薬研究への応用を指向した NMR相互作用解析技術

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科

高橋 栄夫

hid@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

今世紀に入ってから構造ゲノム科学プロジェクトの進展に伴い、創薬標的タンパク質の立体構造を活用した薬剤設計 (Structure-Based Drug Design: SBDD) が謳われているが、膜タンパク質をはじめとする、あらゆる創薬標的分子に対し適用していくことは、容易ではないのが現状であろう。製薬会社における創薬プロセスでは、創薬標的分子 (タンパク質) が同定された後、ドラッグライクな化合物ライブラリーから、ハイスループットなスクリーニング技術により、薬剤候補化合物を見出そうとするアプローチが、相変わらず主流であるといえる。この創薬プロセスで重要な位置を占める化合物スクリーニングにおいて、NMRの特長を活かした多様なアプローチがこれまでに提案されてきている。なかでも、低分子化合物 (薬剤候補化合物) のプロトンシグナル観測をベースにする (リガンド観測) タイプの分子間相互作用検出法は、標的分子に対する結合が弱く、速い交換系であることが想定される、初期のヒット化合物のスクリーニングにおいて有効な方法である。

リガンド観測NMRスクリーニング法としては、低分子リガンドの標的分子結合に伴う、分子量の増大を検出する方法 (並進拡散速度の低下、横緩和速度の増大、交差緩和速度の符号変化 (Transferred NOE (TrNOE) の検出)、および分子間交差緩和を検出する方法 (Saturation Transfer Difference (STD)、WaterLOGSY) などが開発されてきているが^[1]、これらリガンド観測NMRによるスクリーニング法は、

- (1) 標的分子の固相化やリガンドの蛍光修飾などが不要であり、リガンド分子のNMRパラメーター変化を直接検出する方法であるため、他の手法に比べ、比較的アーティファクトが少ないと期待されること、
- (2) 標的分子の安定同位体標識が必要なく、標的分子の分子量の上限にも大きな制限はないことから、多様な相互作用系に適応可能であること、

- (3) 試料が化合物混合物であってもスペクトル上で分離観測できるため、混合物から結合化合物の選別が可能になること、

といった特長がある。そのような長所があるにも関わらず、表面プラズモン共鳴法など、近年の他の分析機器の著しい高感度化により、そのスループットの観点から、現状で、リガンドスクリーニングの第一選択肢としてNMRが用いられることは少なく、二次スクリーニングあるいはバリデーションのステップで用いられることが多い^[2,3]。これらのリガンド観測NMR手法は、交換系を活用した、NMRならではの美しいアプローチ (と個人的には思う) ではあるが、如何せん相互作用の有無を調べるだけであり、原子分解能の構造情報が得られるという、本来のNMR法のポテンシャルを引き出している方法であるとは言い難い。

一方、通常、スクリーニングにより得られた初期ヒット化合物は親和性が低いため、さらなる合成展開により、高活性化・高機能化していく必要がある。そこで、初期ヒット化合物と標的分子の相互作用に関する原子レベルの構造・相互作用情報が得られれば、次のステップの合成指針に大いに役立つが、これらの情報が創薬プロセスに真に役立つか否かは、構造情報の得られてくる時間軸が重要であると言われている^[2]。たとえ、得られてくる構造・相互作用情報が、必ずしも高精度なものでなかったとしても、迅速に (1~2週間程度で)、実験データに基づいた構造情報を取得することが重要視される。

このような背景のもと、また、様々なプロジェクトで共同研究を行ってきた企業研究者とのディスカッションを通して、筆者らは創薬プロセスに寄与できるような、迅速なリガンド観測NMRアプローチの開拓・活用に取り組んできた。本稿では、そのなかの2つの例についてお示ししたい。

1. リガンドエピトープマッピング技術開発と分子デザインへの応用

化合物ライブラリーから標的分子と相互作用する化合物を選別するNMRスクリーニング手法のなかでも、もっとも汎用的に用いられているアプローチの一つが、STD (飽和移動差スペクトル) 法である^[4]。STD法は、標的分子からリガンド分子への飽和移動を活用した方法であり、その基盤となるのは、リガンド-標的分子複合体における分子間交差緩和現象である。交差緩和項の大きさは、対象となる水素原子対の距離の6乗に反比例するため、リガンド分子内の特定のリガンドプロトンに着目した場合、第一義的には、そのプロトンがどれだけ密に標的分子 (のプロトン) と近接しているかが、STDの大きさに反映されると考えることができる (図1 (a))。すなわち、STD実験結果の差スペクトルにおいて、各リガンドプロトンのSTDシグナルの相対強度を比べれば、標的分子と密に相互作用しているリガンド部位 (リガンドエピトープ) を明らかにすることが可能と考えられ、実際に、レクチンに結合する糖リガンドを題材とした実証実験によりその有用性が示された^[5]。この報告を端緒として、STD法は、単なるスクリーニング法としてのみならず、リガンドコンタクト部位を明らかにする、原子レベルでの相互作用情報を簡便に得ることができる手法としても用いられるようになり、様々なリガンド-標的分子相互作用系のエピトープ同定への適用例も報告されてきている。

そのようななかで、核酸合成に関わるジヒドロ葉酸還元酵素の阻害剤であるトリメトプリムのSTDエピトープマッピング実験結果は、X線結晶構造解析をベースにしたモデル解析結果と相反する、と報告された^[6]。この矛盾の原因は、STD実験における飽和移動の効果には、交差緩和項だけでなく、個々のリガンドプロトンの T_1 緩和速度 (縦緩和時間 T_1 の逆数) の相違が大きく影響していたためであった (図1 (b))。例えば、トリメトプリムの場合には、7位のメチレンプロトンの T_1 は0.39秒であるのに対し、6位芳香環プロトンは1.64秒と、実に4倍以上の差が見られている^[6]。このような低分子化合物の部位による大きな T_1 の差は、分子間距離に依存する飽和移動の効果をも曖昧にする、つまり、STD法を活用したリガンドエピトープマッピング実験は、 T_1 緩和の影響を考慮しないと、正確なエピトープ同定が行えない可能性が高いことが明らかとなった。

このような状況のもと、我々は、簡便かつ精度の高いリガンドエピトープマッピングを行うために、個々のリガンドプロトンの T_1 緩和速度に標的分子の選択的照射が与える影響を調べる、という逆の発想でのアプローチを試みた。具体的には、リガンド-標的分子混合溶液を試料とし、標的分子選択的なラジオ波を照射した条件、および非照射条件で、反転回復 (inversion recovery) 法により各リガンドプロトンの T_1 緩和速度をそれぞれ求め、その差を取ることで (T_1 緩和の影響を抑えた) リガンド-標的タンパク質間の飽和移動効果を見積もること

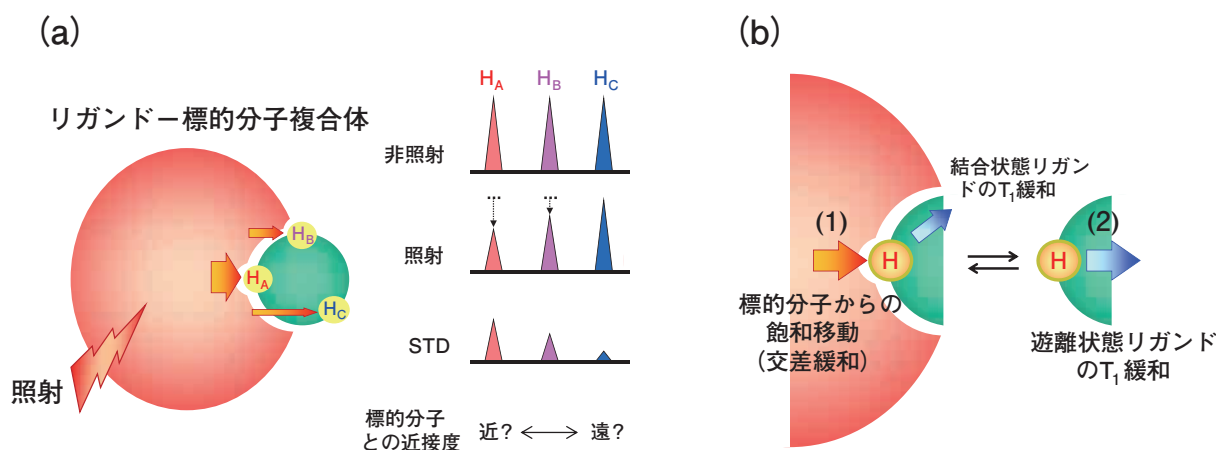


図1

(a) [左] STD法を用いたエピトープマッピング実験の考え方。リガンド-標的分子複合体において、標的分子により密にコンタクトしているリガンドプロトン部位には飽和移動の効果が大きく現れる (図の場合、 $H_A > H_B > H_C$ の順に、標的分子により近接して相互作用するとしている)。[右] 左の状況におけるNMRスペクトルのイメージ。飽和移動の効果は、標的分子に対するラジオ波非照射、照射の差スペクトルであるSTDスペクトル中の各シグナル強度に反映され、それが、標的分子との近接度合いに依存すると考える。

(b) STD実験における飽和移動効果を決定する要因。STD強度は、標的分子からの直接の飽和移動の効果 (1) のみならず、 T_1 緩和 (特に遊離状態リガンド) により飽和効果が失われる効果 (2)、のバランスにより決定される。

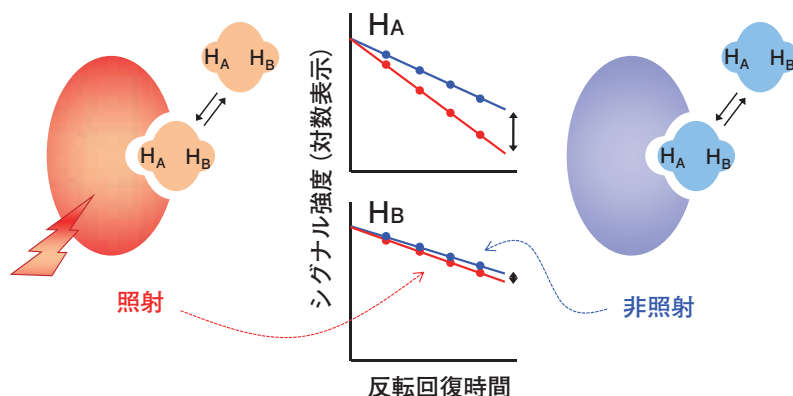


図2

DIRECTION法によるエピトープマッピング法。中央の図は、反転回復 (Inversion Recovery) 実験から得られる T_1 緩和プロファイル。赤が標的分子を照射した実験、青が非照射における実験のプロット。標的分子により近接しているリガンドプロトン H_A では、照射-非照射のプロットの傾きの差が大きく現れるのに対し、標的分子に距離的に遠い H_B では、その差が小さくなる。照射-非照射における緩和速度の差が、標的分子とのコンタクト度合に対応してくる。

を行った(図2)。このアプローチを、DIRECTION (Difference of Inversion REcovery rates with and without Target Irradiation) と名付け、実際のリガンドエピトープマッピング実験に用いることとした^[7]。

実証実験の題材として、MAPキナーゼ $p38\alpha$ と阻害剤SB203580(図3(a))の相互作用系を用いた。DIRECTIONエピトープマッピングの結果を図3(c)に示す。この結果から、ラジオ波照射と非照射における緩和速度の差が大きいH1、H4/5、H6の部位、すなわち、ピリジン環とフルオロフェニル環部分が、標的分子である $p38\alpha$ とより密にコンタクトしている部位であると推察された。すでに構造決定がなされていた $p38\alpha$ と本阻害剤の複合体の立体構造を参照すると、阻害剤のピリジン環とフルオロフェニル環部位が、標的分子 $p38\alpha$ のクレフト部分に、深く入り込み、密に標的分子 $p38\alpha$ とコンタクトしていることがわかる(図3(b))。より定量的な評価を行う目的で、プロトンを発生させた複合体座標を用い、分子間交差緩和の効果を計算により見積もったところ(図3(d))、実験結果(図3(c))と概ね合致することが確かめられたことから、開発したDIRECTION法により、精度の良いリガンドエピトープマッピング実験が行えることが示された^[7]。

このようなりガンドエピトープマッピングから得られた情報は、リガンド高機能化に向けた合成指針の決定に活用できる。我々は、DFG out型と呼ばれる $p38\alpha$ 阻害剤である、BMU (1-(5-tert-butyl-2-methyl-2H-pyrazol-3-yl)-3-(4-chlorophenyl)-urea :

図4(a)についても、DIRECTION法によるエピトープマッピング実験を行った^[7]。その結果(図4(b))、BMUのN-メチル基(H4)は、他の部位(H1/2、H3、H5)に比べ、 T_1 緩和速度の差が小さいことから、その周囲を標的分子の水素原子で密に囲まれていないと推察された。逆にいえば、この部位により大きい官能基を導入することで、標的分子とのより良いコンタクトを形成できる可能性があると考えられる。実際に、このメチル基をよりかさ高いフェニル基で置き換えた化合物は、その標的分子に対する親和性が40倍上昇することが確かめられている。

2. INPHARMA法を活用した 高機能リガンドデザイン

近年、創薬アプローチのひとつとして実施されているFBDD (Fragment-Based Drug Discovery) と呼ばれる、分子量300以下の比較的単純な構造をもつ小分子(フラグメント)を出発化合物とするアプローチ^[8]では、初期に選択されるフラグメントの標的分子への親和性は、通常のハイスループットスクリーニングで選択される化合物よりも、低いことが想定され、その後の化学的な修飾により、親和性・特異性を向上して薬剤候補化合物としていかななくてはならない。その親和性向上プロセスにおいて、有意義な構造的指針があれば、合理的に初期ヒットフラグメントを高機能化していくことが可能になると考えられる。

一方、創薬標的分子の中には、ホルモン受容体など、生理活性ペプチドをリガンドとしているもの

も多く存在するうえに、近年は、任意の標的分子に結合するペプチドリガンドを取得するための技術が確立してきている^[9-11]。また、標的分子に結合したペプチドリガンドの立体構造に関する情報については、古くからリガンド観測NMRアプローチであるTrNOEを用いた研究例が知られており^[12]、標的分子との相互作用に関する情報についても、アラニ

ン変異実験や前項のエピトープマッピング技術などにより得ることが期待できる。十数残基程度のペプチドリガンドが標的分子と相互作用する場合、その相互作用面では、複数の鍵となる相互作用が存在し、トータルとしての相互作用面積は、低分子化合物と標的分子の相互作用面積より一般に大きくなり、標的分子に対する高い親和性や特異性を獲

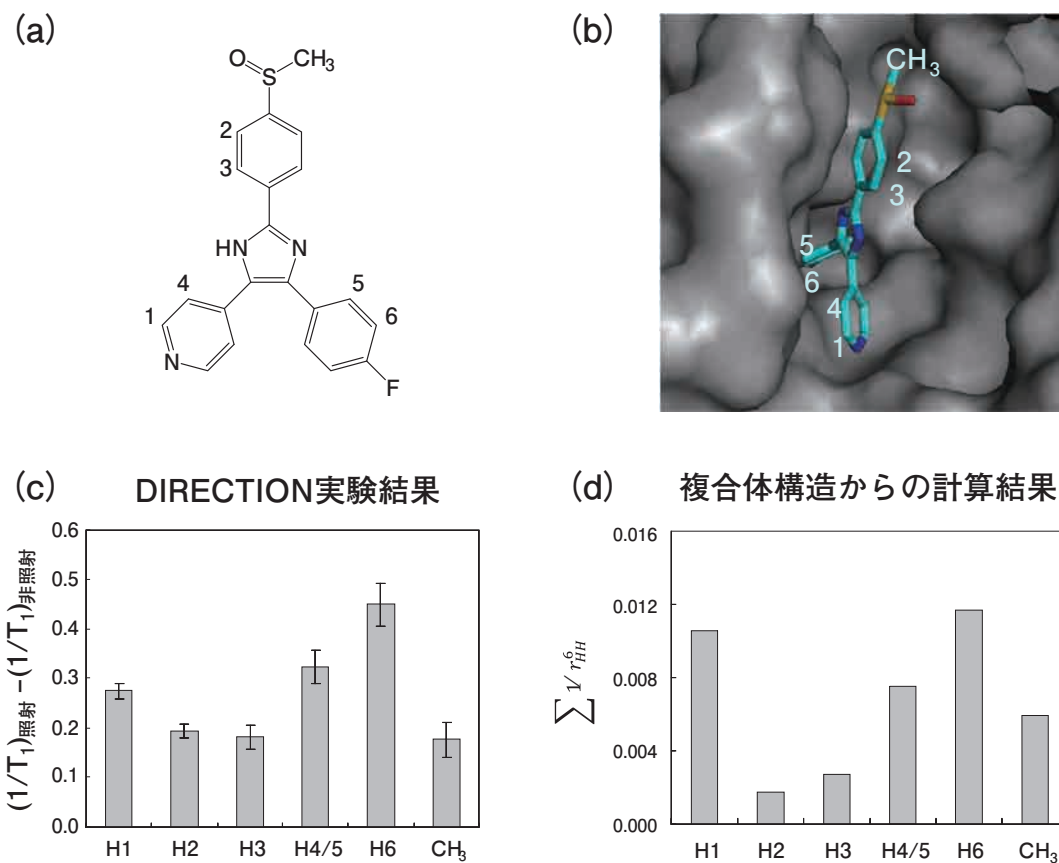


図3

- (a) SB203580の化学構造。
 (b) MAPキナーゼp38 α に結合する阻害剤SB203580のDIRECTIONエピトープマッピング結果。
 (c) 複合体構造 (PDB code: 1A9U) を用いて計算した、各リガンドプロトンが受ける分子間交差緩和効果のプロット。
 (d) p38 α /SB203580 複合体の阻害剤結合部位周辺構造。

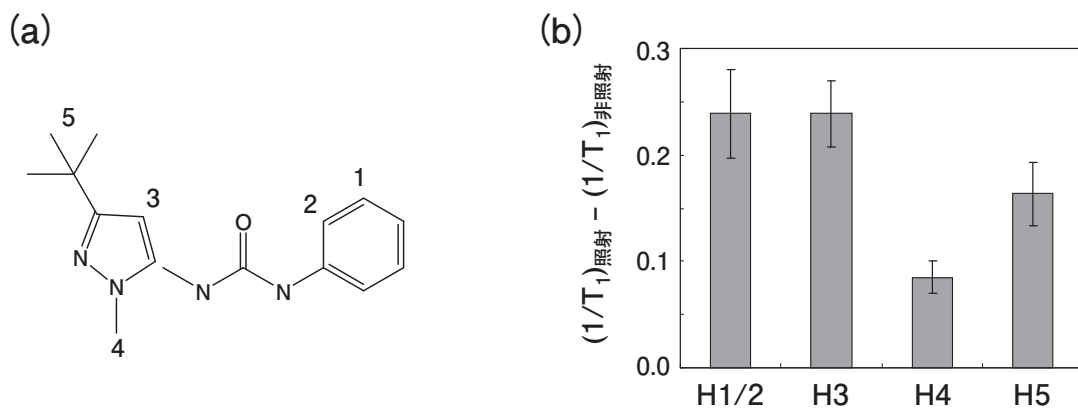


図4

- (a) BMUの化学構造。
 (b) 標的分子MAPキナーゼp38 α に対する、阻害剤BMUのDIRECTIONエピトープマッピング結果。

得できると考えられる。しかしながら、現状では、ペプチドリガンド自身を直接薬剤として用いることは、その吸収性、安定性、体内動態特性などの観点から、限定的であるといえる。

我々は、このような背景のもと、比較的容易に得ることが可能なペプチドリガンドと標的分子の相互作用情報を活用した、低親和性化合物の親和性向上ストラテジーの開発に取り組んだ。本ストラテジーの基本的なイメージを図5に示す。親和性を向上したい低分子化合物(フラグメント化合物等)があり、その分子と活性部位を競合する親和性が高いペプチドがあった際に、①ペプチドリガンドの標的分子相互作用部位のうち、低分子リガンドとオーバーラップする部位としない部位を見分け、②オーバーラップしないペプチドの相互作用部位を、適

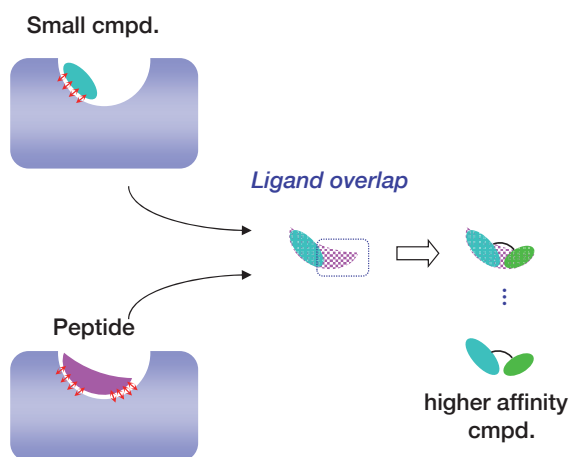


図5

ペプチドリガンドの相互作用情報を活用した、低分子化合物(フラグメント)親和性向上ストラテジー。説明については本文参照。

切なトポロジーで低分子リガンドに導入する、ことで、より広い相互作用面をもつ親和性が向上した化合物を合成できると考えた。我々は、このストラテジーの基幹を成す、①の過程にINPHARMA (interligand NOEs for pharmacophore mapping) 法を活用することで、ペプチドリガンドの構造・相互作用情報を統合し、低分子化合物(フラグメント)を高機能化することを試みた。

リガンド観測NMR測定によるリガンドエピトープ解析法のなかでも、マックス・プランク研究所のグループが開発したINPHARMA法は、きわめてユニークなアプローチである^[13]。標的分子の活性部位を競合することがわかっている2種類のリガンドがあり、それらが標的分子と共存した溶液試料のNOESY測定を行った際、競合リガンド分子間に負のNOEピークが観測される場合がある。彼らは、この競合リガンド間のNOEピークは、結合状態でリガンドプロトンの距離的近傍にある、標的分子のプロトンを介し、同じポケットに結合する競合リガンドに伝播する、間接的な分子間NOEであることを明らかにした。本手法から得られる相互作用情報の秀逸な点は、このような間接的な分子間NOEピークが現れる競合リガンドの部位同士は、標的分子の活性部位でオーバーラップするように結合している、と推定できるところにある。つまり、競合リガンド同士が、標的分子に結合する際に、どのような相対的位置関係で結合しているかについて、複合体立体構造決定を行わずとも、知ることができるのである(図6)。

本研究では、血液凝固の初期過程に関わり、血

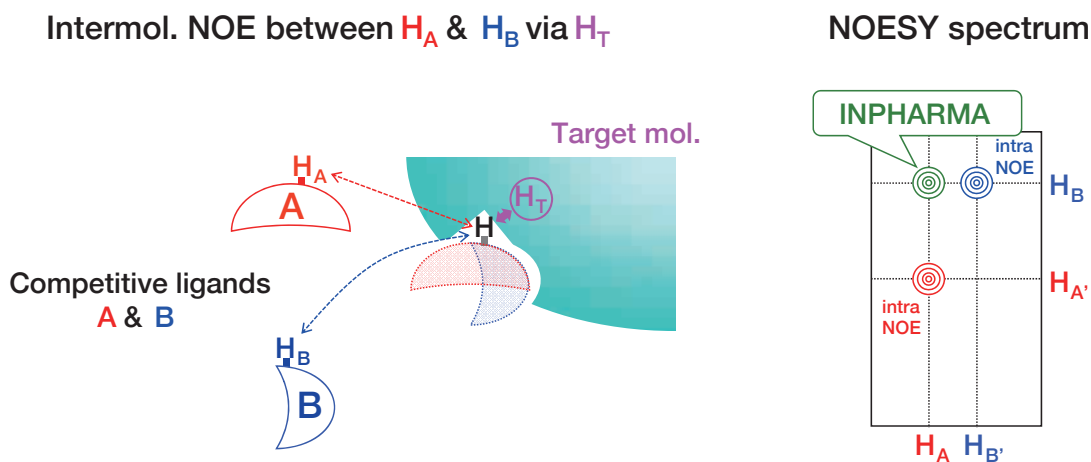


図6

INPHARMA法の概念図。リガンドA、Bが、左図のように競合的に標的分子に結合する場合、標的分子の結合部位のプロトン H_T を経由して、リガンドAのプロトン H_A とリガンドBのプロトン H_B の間に間接的なNOEが検出されることがある(右図)。この情報から、リガンドA、Bが標的分子の結合部位において、どのような相対的位置関係で競合するかを推定できる(左図)。

栓症の標的分子となり得る GPVI とコラーゲンの相互作用系を題材とした。我々は、これまでに、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬であるロサルタン (図 7) が、GPVI-コラーゲン相互作用を阻害するという臨床的知見に着目し、ロサルタンが GPVI に弱い ($K_d: 1.7 \times 10^{-4} \text{M}$) ながらも特異的に結合すること、さらに、分子内のフェニルテトラゾール基が結合に必須な部位であることを明らかにしていた^[14]。また、別途、ファージペプチドライブラリーを活用することで、ロサルタンより GPVI に対する結合が強い、12 残基から成るコラーゲン結合阻害ペプチド (pep-10L) を取得しており、複数のリガンド観測 NMR アプローチを適用することで、ペプチドリガンドの立体構造・相互作用に関する以下の重要な知見を得ていた^[15]: ① TrNOE 解析により、GPVI 結合状態の pep-10L の立体構造を決定し、ペプチドの中央部分がヘリックス構造を形成していることを明らかにした; ② STD によるリガンドエピソードマッピング結果から、pep-10L の Trp6、Leu7、Phe9 が GPVI とコンタクトする残基であることを示し、この結果は、アラニン変異実験により実証された (図 7)。

ロサルタンと pep-10L の競合実験により、両者が競合することが確認された後、INPHARMA 測定を行うことで、両リガンドの GPVI の結合サイトでの重ね合わせ構造についての検討を行った。その結果、pep-10L の Trp6、Leu7 が形成する疎水的

部位が、ロサルタンのフェニルテトラゾール基とオーバーラップした領域に結合することが判明した (図 8 (a)、(b))。一方で、より高い親和性を示す pep10-L に存在する Phe9 側鎖に由来する相互作用は、ロサルタンには存在しない相互作用であると推定された。ロサルタンのフェニルテトラゾール基と pep-10L の Phe9 の側鎖部分との距離は、結合状態のペプチドの立体構造を参照することで、9 Å 程度と見積もられたため、その構造情報に基づき、フェニルテトラゾール基のメタ位方向におよそ 9 Å 離れた部位にフェニル基をリンカー結合により導入した化合物群の合成を行った。新たに得られた化合物 (図 8 (c)) について、NMR 滴定実験を行った結果、その K_d 値は、 $5.2 \times 10^{-5} \text{M}$ であったことから、新規化合物は、pep-10L とほぼ同程度の親和性を持ち、ロサルタンの親和性を上回る結合力をもつことが明らかとなった^[16]。このようにして、INPHARMA 法を含むリガンド観測 NMR 法を駆使することで、ペプチドリガンドの構造・相互作用情報を活用した、低分子化合物の親和性向上が可能なが示された。

INPHARMA 法を利用した本アプローチは、 K_d が $1 \mu\text{M}$ 以上の親和力の系で、化合物とペプチドの K_d 比が 0.1 ~ 10 程度であれば適用できると考えられる^[17]。そのような観点から、適切なペプチドリガンドを選択すれば、低親和性ヒットフラグメントをグローイング、リンキングにより高親和性にしてい

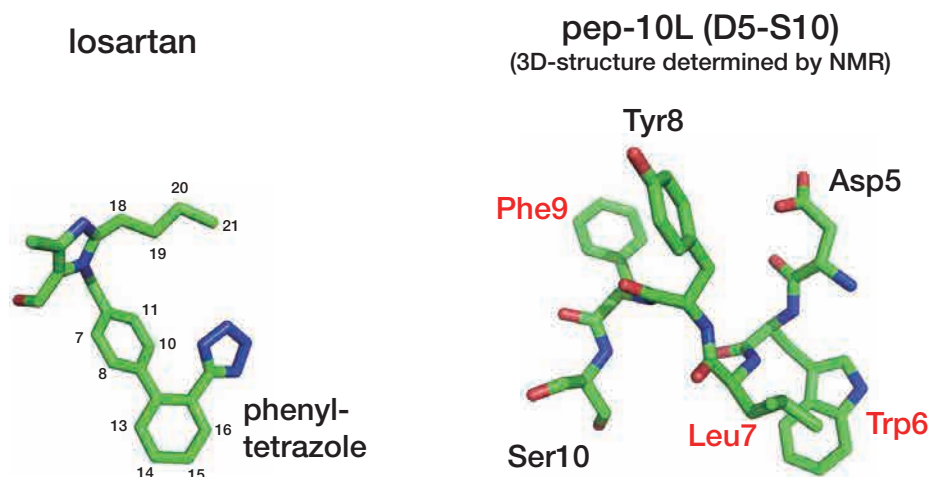


図 7

[左] ロサルタンの分子構造。緑は炭素原子、青は窒素原子、赤は酸素原子を表す (右図も同様)。

[右] ペプチドリガンド pep-10L のアミノ酸残基 5-10 の領域を示す。ペプチドの立体構造は、GPVI 存在下の TrNOE 解析より決定された。NMR によるリガンドエピソードマッピングおよびアラニン変異実験より明らかにされた、GPVI との結合に重要なアミノ酸残基を赤字で示した。

くFBDDの過程で、本アプローチを有効に活用していくことが可能になる。

3. おわりに

リガンド観測NMR法によるスクリーニング技術は、分子そのものを観測する方法であることから、他のアッセイ法に比べ、比較的曖昧さやアーティファクトが少ないとはいえ、リガンド-標的分子間の非特異的結合などにより、思わぬ結果が得られる場合もあり、その適用の際には、注意を要するとともに、適切な対応が必要となることもある^[18]。また、原子レベルの情報が得られたとしても、あくまでリガンド分子のみからの情報であるため、これらの情報は他の様々な手法、例えば、計算科学的アプローチと統合して用いることで、より効果的かつ有効な構造・相互作用情報となることも多い^[19]。

とはいえ、本稿で活用した TrNOE、STD、DIRECTION、INPHARMAといった、交換系を活用したリガンド観測NMR技術は、NMRならではの特徴的な手法であり、標的分子の分子量の問題に悩まされることもない上に、手の込んだ試料調製も必要とせず、迅速に結果が得られるアプローチであるといえるとともに、今後も有用なリガンド観

測手法を開拓していく余地も未だ多く残されているように感じている。その長所・短所を把握したうえで、弱い相互作用系を扱う創薬研究の分野において、NMR法が有効に活用されていくことを期待している。

謝 辞

共同研究者である東京大学大学院薬学系研究科・嶋田一夫教授、ならびに水越弓子博士、小野克輝博士、竹内恒博士をはじめとする、産業技術総合研究所/社団法人バイオ産業情報化コンソーシアムの研究員の方々にこの場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Lepre, C. A. et al. (2004) Theory and applications of NMR-based screening in pharmaceutical research. *Chem. Rev.* **104**, 3641-3675.
- [2] Jahnke, W. (2007) Perspectives of biomolecular NMR in drug discovery: the blessing and curse of versatility. *J. Biomol. NMR* **39**, 87-90.
- [3] Mashalidis, E. H. et al. (2013) A three-stage biophysical screening cascade for fragment-based drug discovery. *Nat. Protocols.* **8**, 2309-2324.
- [4] Mayer, M. and Meyer, B. (1999) Characterization of ligand binding by saturation transfer difference

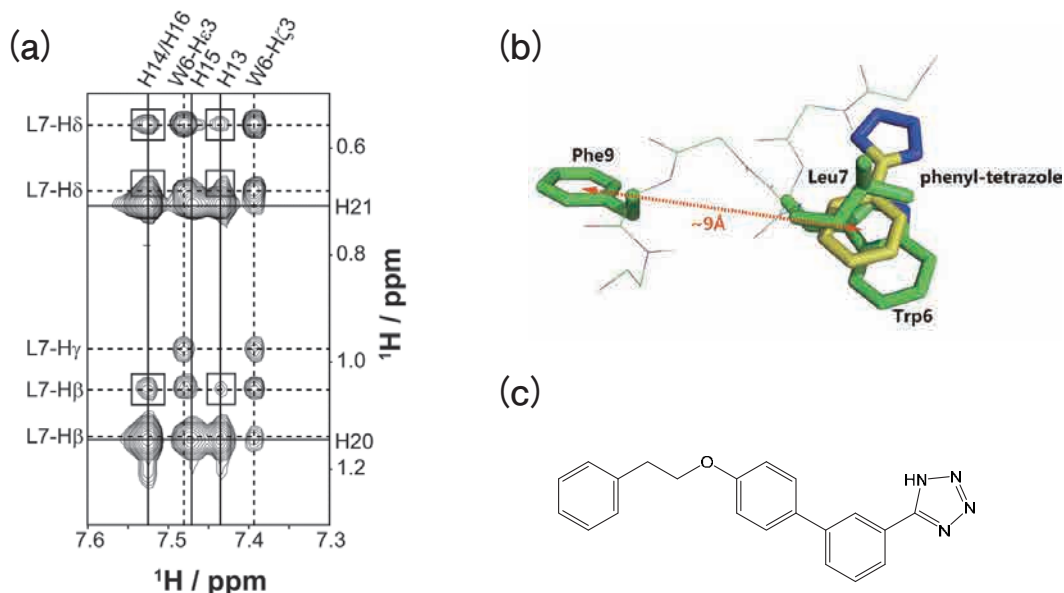


図8

(a) 1.4 mM ロサルタン、0.9 mM pep-10L、25 μ M GPVI 混合溶液 (20 mM リン酸緩衝液 pH6.5) の INPHARMA 実験結果 (NOE 混合時間 200 ms; メチル/芳香環領域)。四角で囲ってあるクロスピークが INPHARMA ピーク。それ以外は、リガンド分子内の TrNOE ピーク。

(b) INPHARMA 実験結果に基づく、pep-10L とロサルタンのフェニルテトラゾール基の重ね合わせ図。pep-10L の主鎖 (Thr4-Ser10) を細線で表示し、標的分子結合に重要な残基の側鎖をスティック表示で示している。pep-10L の炭素原子を緑、フェニルテトラゾール基の炭素原子を黄、窒素原子を青、酸素原子を赤で表す。

(c) 新規に合成した化合物の化学構造。

- NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1784–1788.
- [5] Mayer, M. and Meyer, B. (2001) Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6108–6117.
- [6] Yan, J. et al. (2003) The effect of relaxation on the epitope mapping by saturation transfer difference NMR. *J. Magn. Reson.* **163**, 270–276.
- [7] Mizukoshi, Y. et al. (2012) An accurate pharmacophore mapping method by NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 1362–1365.
- [8] Carr, R. A. E. et al., Fragment-based lead discovery: leads by design. *Drug Discov. Today* **10**, 987–992.
- [9] Smith, G. P. and Petrenko, V. A. (1997) Phage display. *Chem. Rev.* **97**, 391–410.
- [10] Roberts, R. W. and William, W. J. (1999) In vitro selection of nucleic acids and proteins: what are we learning? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 521–529.
- [11] Mizukoshi, Y. et al. (2006) Rapid preparation of stable isotope labeled peptides that bind to target proteins by a phage library system. *J. Biomol. NMR* **34**, 23–30.
- [12] Ni, F. (1994) Recent developments in transferred NOE methods. *Prog. NMR Spectrosc.* **26**, 517–606.
- [13] Sánchez-Pedregal, V. M. et al. (2005) The INPHARMA method: protein-mediated interligand NOEs for pharmacophore mapping. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 4172–4175.
- [14] Ono, K. et al. (2010) Structural basis for platelet anti-aggregation by angiotensin II type 1-receptor antagonist losartan (DuP-753) via glycoprotein VI. *J. Med. Chem.* **53**, 2087–2093.
- [15] Kato-Takagaki, K. et al. (2009) Structural and interaction analysis of glycoprotein VI-binding peptide selected from phage display library. *J. Biol. Chem.* **284**, 10720–10727.
- [16] Ono, K. et al. (2014) Structure-based approach to improve a small molecule inhibitor by the use of a competitive peptide ligand. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 2597–2601.
- [17] Orts, J. et al. (2009) The INPHARMA technique for pharmacophore mapping: A theoretical guide to the method. *J. Magn. Reson.* **200**, 64–73.
- [18] Mizukoshi, Y. et al. (2015) Suppression of problematic compound oligomerization by cosolubilization of nondetergent sulfobetaines. *ChemMedChem.* **10**, 736–741.
- [19] Fukunishi, Y. et al. (2011) Protein–ligand docking guided by ligand pharmacophore-mapping experiment by NMR. *J. Mol. Graph. Mod.* **31**, 20–27.



高橋 栄夫 (たかはし・ひでお)

1993年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了 博士(薬学)

1993年 日本学術振興会特別研究員

1994年 北里大学薬学部・助手

1995年 東京大学薬学部・助手

2001年 産業技術総合研究所・主任研究員

2010年7月より現職

溶液系 DNP-NMR の実際と応用

高知大学海洋コア総合研究センター

津田 正史

mtsuda@kochi-u.ac.jp

1. はじめに

NMRの信号強度は、ゼーマン分裂時のエネルギー準位におけるスピン占有数の差に比例する。そのため、最も感度の高い¹H核であってもその占有数の差は、現状のマグネットでは最大 10^{-4} オーダーであり、NMRではこのわずかな差を検出しているのに過ぎない。超偏極技術の一つである動的核偏極(DNP: Dynamic Nuclear Polarization)は、電子スピン偏極を核スピン系に移動させることにより、核のスピン占有数の比率を大幅に変化させることで、磁気共鳴感度を飛躍的に向上することができる技術である。2003年にArdenkjær-Larsenらは、高磁場中で試料と安定なトリチルラジカルを共存させ、極低温条件でマイクロ波を照射することで¹³C核を偏極し、その後加温加熱した水を加えることで瞬時にサンプルを室温へ戻し、MRIや溶液系NMR測定を行う溶液系DNP法^[1]を開発した。さらに、Golmanらは、超偏極¹³C標識尿素を用いた¹³C-MRI撮影に成功した^[2]。こうしたDNP超偏極と溶液化

をオートマテックに行う装置(HyperSense[®])がOxford Instrument社より製造・販売されて、溶液系DNPの研究事例が数多く報告されるようになった。本稿では、HyperSense[®]を用いた溶液系DNP-NMR測定の実際と、プローブ分子を用いた溶液系DNP-NMR/MRIの応用について紹介する。

2. DNP-NMR 実験の実際

HyperSense[®](**図1**)では測定試料を、3.35Tの超伝導磁石による強磁場下で、液体ヘリウムのポンピングにより得られる1.4Kまで冷却し、94GHzのマイクロ波を照射することでDNP超偏極を引き起こす。測定試料には、トリチルラジカルOX063(**図2**)等の不対電子をもつラジカル種を混合し、グリセリン/水といった混合溶媒に溶解する。トリチルラジカルの不対電子は電子スピンの供給源であり、電子スピンは、強磁場・極低温条件下で90%程度偏極する特性を示す。電子スピンの偏極にマイクロ波を照射することで、測定試料の核スピンへと分極移動が起こり、核スピンの高偏極が実現される。核スピンの高偏極は、溶解する溶媒の種類や混合比率、ラジカル種の選択やその濃度によって異なるが、試料の観測核における T_1 緩和時間が最も偏極効率に影響を与えている。例えば、カルボニル炭素等の四級炭素のような比較的長い T_1 を持つ¹³C核では、数時間の偏極時間で30%程度の偏極率が得られ、DNP時の偏極率は、熱平衡状態の偏極に比べて数万倍に相当する。最近になって、テトラアザシクロドデカンテトラ酢酸ガドリニウム(GdDOTA)



図1 溶液系 DNP 装置 HyperSense[®] (右) と 9.4T NMR/MRI マグネット

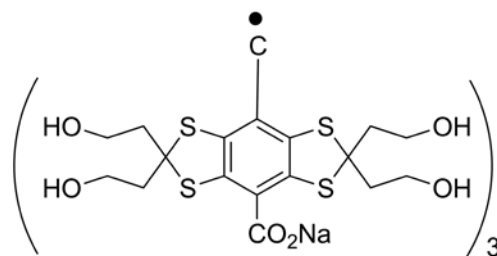


図2 トリチルラジカル OX063 の構造

等、MRI用ガドリニウム造影剤をドープすることでより高偏極が得られると報告された^[3,4]。それに対して、メチン、メチレン、メチルといった水素が結合した炭素種は、 T_1 緩和時間が短いため高い偏極は得られない。偏極を行った後は、溶液中でのNMR測定を行うために極低温で凍結した試料を昇温し溶液状態とする必要がある。約10気圧200°Cに加熱した水を凍結した試料へと一気に添加することで、瞬間的に試料を融解し、直ちに隣接するNMR装置内のNMR測定管へと移送し、NMR測定を開始する。凍結試料の融解から移送、NMR測定の開始までのラグタイムは約2秒であり、核スピンの高偏極をロスしない工夫がなされている。試料の超偏極は、溶解すると直ちに熱平衡状態への緩和が始まり、最終的に超偏極磁化は失われる。磁化の消失は、 T_1 緩和時間が長いほどゆっくりである。すなわち、DNP超偏極の信号強度の増強やその寿命は、 T_1 と密接に関連があり、以下に取り上げるDNPイメージング用プローブ分子の開発には、長い T_1 緩和時間をもつことが絶対条件である。

図3にはDNP ^{13}C -NMRスペクトル測定例として、 $2\text{-}^{13}\text{C}$ ピルビン酸ナトリウムのDNP ^{13}C -NMRスペクトルと従来の ^{13}C -NMRスペクトルを示した。DNP-NMRでは、試料濃度3mMで15mM OX063と0.5mM GdDOTAとともに1時間偏極し、1スキャン測定により ^{13}C NMRスペクトルを得た。一方、従来のNMRスペクトルは、同じ試料濃度で1,024回のスキャン測定を行った。シグナル強度とS/N比から判断すると、DNP超偏極によってカルボニル炭素の信号強度が強力に増幅されていることが容易に理解できるであろう。カルボニル炭素の T_1 緩和時間は、40秒ほどと極めて長いため、このような高偏極が得られ、信号も長時間維持される。

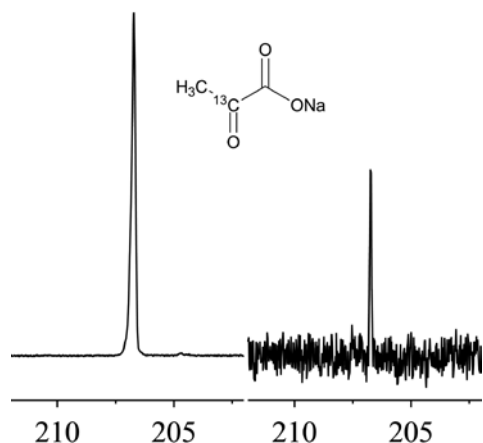


図3 $2\text{-}^{13}\text{C}$ ピルビン酸ナトリウムのDNP ^{13}C -NMRスペクトル(左)と従来の ^{13}C -NMRスペクトル(右)

3. 溶液系DNPでの ^{13}C 標識プローブ分子

図4では、溶液系DNP-NMRやMRIを用いた研究報告があるプローブ分子をいくつか取り上げた。DNP超偏極プローブの経時的な核信号変化の観測により、物質代謝のような生体内反応の解析や化学反応の追跡に応用可能である。溶液系DNPを用いた最も有望なアプリケーションとしては、超偏極 $1\text{-}^{13}\text{C}$ ピルビン酸を用いた乳酸あるいはアラニンへのリアルタイム代謝観測^[5]が挙げられる。本法は新しい腫瘍の非侵襲的診断法として期待されており、前立腺がんの診断法として臨床研究の報告がなされた^[6]。一方、超偏極 $2\text{-}^{13}\text{C}$ あるいは $1, 2\text{-}^{13}\text{C}_2$ ピルビン酸を用いた心臓機能のイメージングが報告されている^[7,8]。そのほかにも無水酢酸を使ったアミノ酸の検出^[9]、フマル酸のTCA回路による代謝^[10]、 ^{13}C 標識アスコルビン酸を用いたレドックス状態の検出^[11]、 $1\text{-}^{13}\text{C}$ 標識フルクトースを使った解糖系代謝観測^[12]、炭酸水素ナトリウムによるpHのイメージング^[13]、ベンゾイルギ酸による過酸化水素の検出^[14]等、ユニークな応用研究が発表されてきた。いずれの分子も ^{13}C 標識位置が10秒以上の長い T_1 緩和時間を示す四級炭素であり、代謝物との化学シフト差も比較的大きいのが特徴である。

代謝研究に重要なグルコースは、メチン、メチレンからなる全炭素の T_1 が1秒程度ときわめて短いため、DNP誘起を行ってもシグナルが弱く、消失も5秒以内と極端に速いことから、DNP-MR法での使用には不向きと報告されてきた^[15]。我々は、グルコースのDNP ^{13}C -NMR測定の適用に向けて、重水素置換グルコースのDNP実験を行った。その結

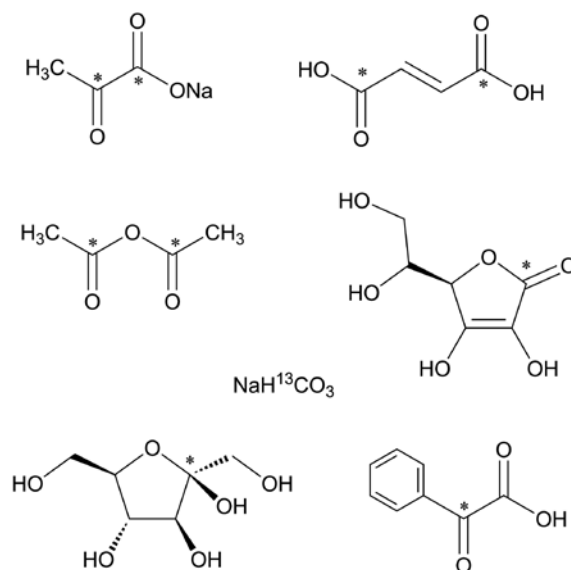


図4 溶液系DNP-NMR/MRI研究に用いられた ^{13}C 標識プローブ分子の例(*は ^{13}C 標識位置)

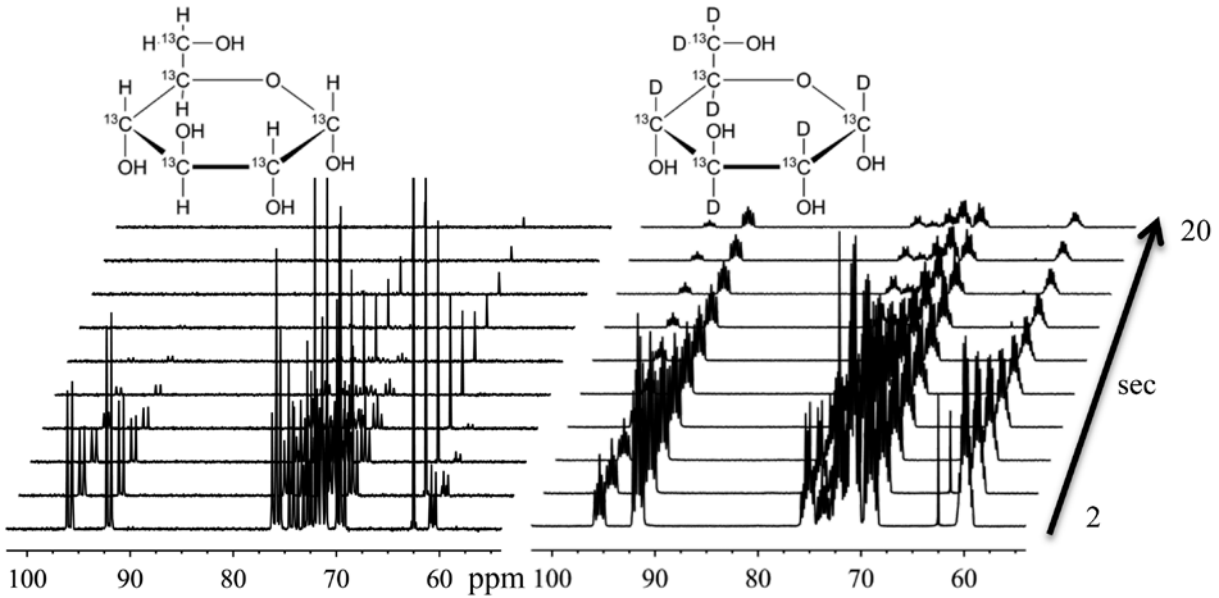


図5 超偏極した $^{13}\text{C}_6$ -グルコース (左) と $^{13}\text{C}_6$ -グルコース- d_7 の1スキャン ^{13}C -NMRスペクトル (10アレイ)

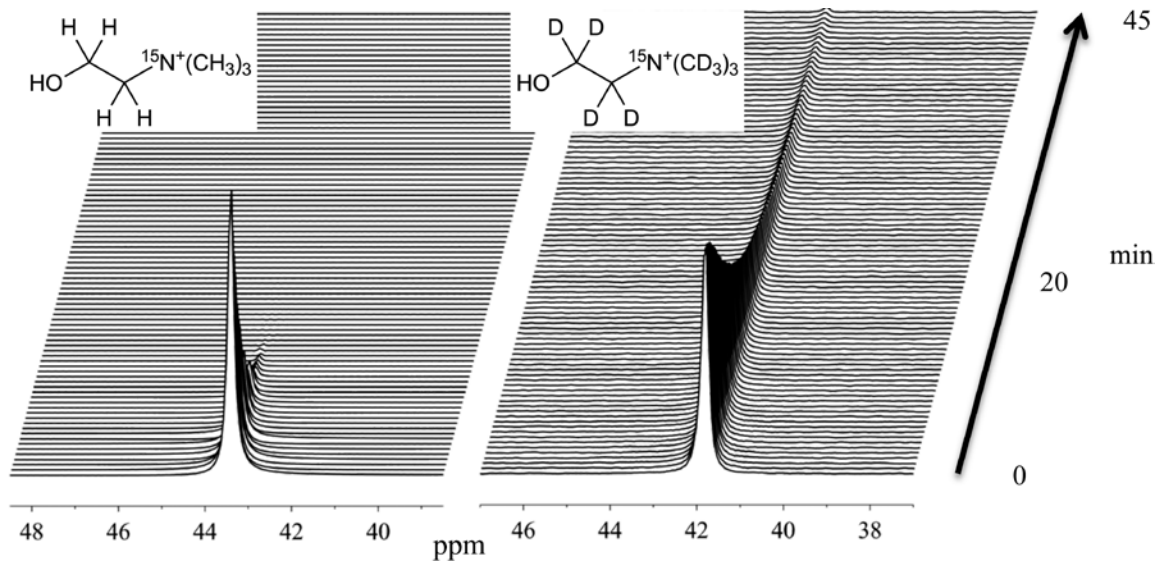


図6 超偏極した ^{15}N -コリン (左) と ^{15}N -コリン- d_{13} の1スキャン ^{15}N -NMRスペクトル (90アレイ)

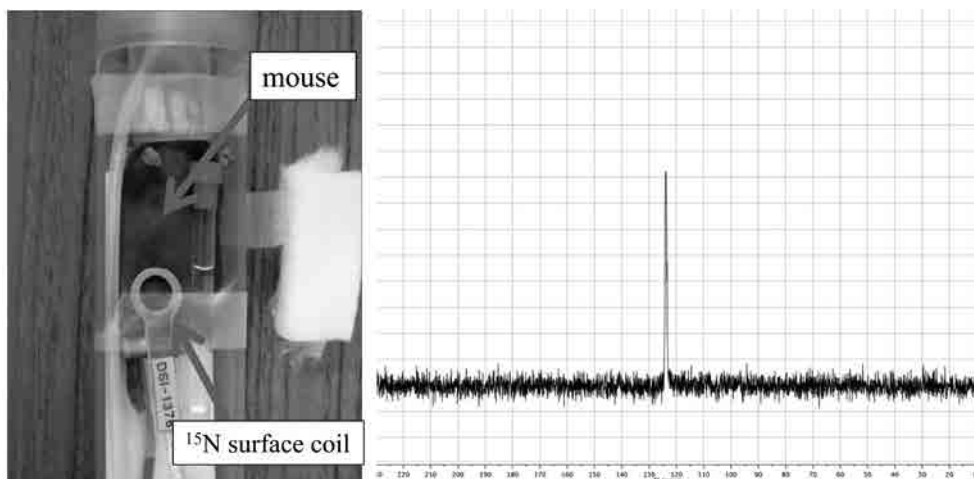


図7 ^{15}N サーフェスコイルを装着したマウス (左) と、マウスに超偏極 ^{15}N -コリン- d_{13} を投与して撮影した ^{15}N -MRSスペクトル

果、重水素標識グルコース ($^{13}\text{C}_6\text{-Glc-}d_7$) は、未標識グルコース ($^{13}\text{C}_6\text{-Glc}$) に比較して ^{13}C シグナルの観測時間も10倍程度(46秒)長く、強度も大きいことを見出した^[16](**図5**)。さらに、ヒト単球性白血病THP-1細胞溶解液に超偏極した $^{13}\text{C}_6\text{-Glc-}d_7$ を添加し、 ^{13}C -NMR測定を行ったところ、グルコースのシグナルとともにフルクトース-6-リン酸のシグナルが観察され、DNP ^{13}C NMRを用いることで解糖系によるグルコース代謝過程をリアルタイムに検出できることがわかった^[17]。超偏極 $^{13}\text{C}_6\text{-Glc-}d_7$ をヒト膵臓がんMIA Paca-2細胞にて代謝した場合、フルクトースのみならず乳酸のシグナルも観測され、細胞によって代謝能が異なることが示唆された。一方、Meierらは $^{13}\text{C}_6\text{-Glc-}d_7$ を用いた大腸菌や酵母の糖代謝観測^[18, 19]を、Rodriguesらは腫瘍での $^{13}\text{C}_6\text{-Glc-}d_7$ 代謝イメージング^[20]をそれぞれ報告している。

一方、比較的長い T_1 緩和時間を持つ ^{15}N 核も超偏極によりシグナルの増幅が観察されるため、DNP研究の対象として有用である。特にコリンは、ホスファチジルコリン等のリン脂質、メチル基結合体のベタイン、神経伝達物質のアセチルコリンなどの合成基質として、生体内で重要な役割を果たしているため、PETトレーサーとしてがん診断に利用されている。また、コリンは T_1 緩和時間の極めて長い四級アンモニウム窒素を有し、DNP用のプローブ分子として期待されている。Gabellieriらは、 ^{15}N ラベル化したコリン($^{15}\text{N-Cho}$)のDNP法によるシグナルと T_1 (203 ± 10 秒)の増幅を観察している^[21]。また、Sarkarらは、メチル基を重水素化したコリン($\text{Cho-}d_9$)においては、さらなる T_1 緩和時間の延長(390 ± 110 秒)を報告している^[22]。我々は、グルコースにおいて重水素標識がDNPによる超偏極に有効であったことから、 ^{15}N および完全重水素標識コリン($^{15}\text{N-Cho-}d_{13}$)を化学合成した。 $^{15}\text{N-Cho-}d_{13}$ の T_1 緩和時間は、報告のあるコリン化合物のなかでは最も長い 580 ± 10 秒を記録した。DNP ^{15}N -NMR測定を行ったところ、超偏極 $^{15}\text{N-Cho}$ では20分で信号が消失しているのに対して、超偏極 $^{15}\text{N-Cho-}d_{13}$ は、超偏極 ^{15}N シグナルが45分を超えて観察され、熱平衡状態に比べて16,800倍の信号増幅が認められ、きわめて高い偏極能をもつことが明らかとなった^[23](**図6**)。また、マウスを用いたMRイメージングを行い、コリンの ^{15}N 核シグナルを検出することに成功した(**図7**)。一方、 ^{15}N と重水素で二重標識したトリメチルフェニルアンモニウム化合物は、きわめて長い T_1 緩和時間を

もつことから、それを基本骨格としてデザインしたプローブ分子のDNPイメージングを用いて、カルシウムイオン、過酸化水素、エステラーゼを検出する方法論が報告された^[24]。

4. おわりに

溶液系DNPと ^{13}C 標識プローブを用いた生体反応等の観測については、近年多くの研究が行われており、本稿には全て紹介しきれないため、参考文献^[25]を参照されたい。また ^{13}C や ^{15}N だけではなく、 ^{89}Y 核^[26]などそれ以外の核種^[27, 28]を対象とした溶液系DNP実験も行われるようになってきた。今後は、溶液系DNPを様々な核種に適応することや、新しいNMR測定法を組み合わせることで、これまでとは異なる化学あるいは生命現象の観測に繋がるものと期待される。

本学に設置の溶液系DNP装置ならびに9.4T NMR/MRIは今後、全国共同利用・共同研究拠点のオープンファシリティーとして利用可能となる予定であり、動的核偏極を生かした共同研究装置として研究実績をあげていきたいと考えている。

参考文献

- [1] Ardenkjaer-Larsen J. H. *et al.*, (2003) Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10158–10163.
- [2] Golman K. *et al.*, (2003) Molecular imaging with endogenous substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10435–10439.
- [3] Corzilius, B. *et al.*, (2011) High-field dynamic nuclear polarization with high-spin transition metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 5648–5651.
- [4] Lumata, L. *et al.*, (2012) Impact of Gd^{3+} on DNP of $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{pyruvate}$ doped with trityl OX063, BDPA, or 4-oxo-TEMPO. *J. Phys. Chem. A* 116, 5129–5138.
- [5] Golman K. *et al.*, (2006) Real-time metabolic imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11270–11275.
- [6] Nelson, S. J. *et al.*, (2013) Metabolic imaging of patients with prostate cancer using hyperpolarized $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{pyruvate}$. *Science Trans. Med.* 5, 198ra108.
- [7] Schroeder, M. A. *et al.*, (2009) Real-time assessment of Krebs cycle metabolism using hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance spectroscopy. *FESEB J.* 23, 2529–2538.
- [8] Chen, A. P. *et al.*, (2011) Simultaneous investigation of cardiac pyruvate dehydrogenase flux, Krebs cycle metabolism and pH, using hyperpolarized $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{pyruvate}$ *in vivo*. *NMR Biomed.* 25, 305–311.
- [9] Wilson, D. M. *et al.*, (2009) Generation of hyperpolarized substrates by secondary labeling with $[1,1\text{-}^{13}\text{C}]\text{acetic anhydride}$. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5503–5507.
- [10] Gallagher, F. A. *et al.*, (2009) Production of hyperpolarized $[1,4\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{malate}$ from $[1,4\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{fumarate}$ is a marker of cell necrosis and treatment response in tumors *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19801–

- 19806.
- [11] Bohndiek, S. E. *et al.*, (2011) Hyperpolarized [^{13}C]-ascorbic and dehydroascorbic acid: vitamin C as a probe for imaging redox status in vivo. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 11795–11801.
- [12] Keshari, K.R. *et al.* (2009) Hyperpolarized [^{13}C]-fructose: a hemiketal DNP substrate for in vivo metabolic imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 17591–17596.
- [13] Gallagher, F. A. *et al.*, (2008) Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ^{13}C -labeled bicarbonate. *Nature* 453, 940–943.
- [14] Lippert, A. R. *et al.* (2011) A hydrogen peroxide-responsive hyperpolarized ^{13}C MRI contrast agent. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 3776–3779.
- [15] Harada M. *et al.* (2010) Selection of endogenous ^{13}C substrates for observation of intracellular metabolism using the dynamic nuclear polarization technique. *Jpn. J. Radiol.* 28, 173–179.
- [16] DNP-NMR分光法分析用試薬、津田正史ほか、特開2012-220269.
- [17] Kumagai, K. *et al.*, (2014) Observation of glycolytic metabolites in tumor cell lysate by using hyperpolarization of deuterated glucose. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1416–1421.
- [18] Meier, S. *et al.*, (2011) Metabolic pathway visualization in living yeast by DNP-NMR. *Mol. BioSyst.* 7, 2834–2836.
- [19] Meier, S. *et al.*, (2011) Real-time detection of central carbon metabolism in living *Escherichia coli* and its response to perturbations. *FEBS Lett.* 585, 3133–3138.
- [20] Rodrigues, T. B. *et al.* (2014) Magnetic resonance imaging of tumor glycolysis using hyperpolarized ^{13}C -labeled glucose. *Nature Medicine* 20, 93–97.
- [21] Gabellieri, C. *et al.*, (2008) Therapeutic target metabolism observed using hyperpolarized ^{15}N choline. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 4598–4599.
- [22] Sarkar, R. *et al.*, (2009) Proton NMR of ^{15}N -choline metabolites enhanced by dynamic nuclear polarization. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 16014–16015.
- [23] Kumagai, K. *et al.*, (2013) Synthesis and hyperpolarized ^{15}N NMR studies of ^{15}N -choline- d_{13} . *Tetrahedron* 69, 3896–3900.
- [24] Nonaka, H. *et al.*, (2013) A platform for designing hyperpolarized magnetic resonance chemical probes. *Nature Commun.* 4, 2411–2417.
- [25] Keshari, K. R. *et al.*, (2014) Chemistry and biochemistry of ^{13}C hyperpolarized magnetic resonance using dynamic nuclear polarization. *Chem Soc. Rev.* 43, 1627–1659.
- [26] Lumata, L. *et al.*, (2011) DNP by thermal mixing under optimized conditions yields >60000-fold enhancement of ^{89}Y NMR signal. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 8673–8680.
- [27] Van heeswijk, R.B. *et al.*, (2009) Hyperpolarized lithium-6 as a sensor of nanomolar contrast agents. *Magn. Reson. Med.* 61, 1489–1493.
- [28] Lumata, L. *et al.*, (2012) Production and NMR characterization of hyperpolarized $^{107,109}\text{Ag}$ complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 525–527.



津田 正史 (つだ・まさし)

1989年 北海道大学薬学部薬学科卒業
 1991年 北海道大学大学院薬学研究科薬学専攻修士課程修了
 1993年 北海道大学大学院薬学研究科薬学専攻博士後期課程中退
 1993年 北海道大学薬学部 教務職員
 1995年 博士(薬学) 北海道大学
 1998年 北海道大学大学院薬学研究科 助手
 2001年 北海道大学大学院薬学研究科 助教授
 2007年 高知大学海洋コア総合研究センター 教授
 現在に至る

第53回NMR討論会(2014)若手ポスター賞について(報告)

昨年度に引き続き、若手ポスター賞Ⅰおよび若手ポスター賞Ⅱとして募集致しました。また、昨年度に引き続き「JEOL RESONANCE賞」が贈られました。

次に募集要項をニューズ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

★『若手ポスター賞』について

今年度も、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、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。

<http://www.nmrj.jp/NMR2014/poster.html>をご覧ください。

なお、理事会での次の合意に基づいて以下の対応を行いました。

- 今年度のNMR討論会では、たとえ応募者が少なくても、それはそれで受け入れる。
- 各賞担当理事の河合先生、山本先生が会社の方にコンタクトをとるような対応は行わない。
- 締め切りを延ばす程度のことは対応する。
- 応募者が少ない場合には若手ポスター賞Ⅱの受賞者も応募者数に応じて少なくする。
- 応募者が少なかった場合には、次回の理事会で若手ポスター賞Ⅱの継続についての審議を行う。

以上のような募集の結果、

若手ポスター賞Ⅰ：22名

若手ポスター賞Ⅱ：1名

の応募がありました。

「若手ポスター賞報告2012(日本核磁気共鳴学会機関誌Vol.4参照)」に示された選考方法に基づき、厳密、かつ、公正な選考基準に基づいて審査した結果、下記の通りの計7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、7万円および3万円としました。なお、選考過程で、実際にすべての規定が必要になったかどうかについては、従来どおり、公表しないこととさせていただきます。

(若手ポスター賞Ⅰ)

■最優秀若手ポスター賞(JEOL RESONANCE賞)

久美屋 雄太(京都大学大学院 工学研究科)

「ダイヤモンドスピンを用いた生体内ジャイロセンシング技術の開発」

森本 大智(京都大学大学院 工学研究科)

「ユビキチン化に伴うタンパク質構造不安定化」

徳永 裕二(一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム JBIC 研究所)

「MAPキナーゼp38 α のストレスシグナル伝達機構の解明」

■若手ポスター賞

佐々木 彬子 (英国グラスゴー大学大学院)

「天然存在比下での³³S STMASによるエトリンタイトの研究」

Manoj Kumar Pandey (理化学研究所)

「Measurement of Proton Chemical Shift Anisotropy Tensors Using Symmetry-Based Radio-Frequency Pulse Sequences and Ultrafast MAS Solid-State NMR Spectroscopy」

槇野 義輝 (横浜国立大学大学院 工学府)

「*In situ* 光照射固体NMRによる光受容センサー膜タンパク質 sensory rhodopsin Iの波長依存的な光反応過程の解析」

伊澤 研一郎 (京都大学大学院 理学研究科)

「固体NMRによるキンヒドロロン合成時の固相反応過程の研究」

(若手ポスター賞II)

該当なし

これらの若手がこれからもNMR関係の仕事について活躍することを期待致します。

なお、懇親会終了後に、大陽日酸株式会社から「大陽日酸賞」のようなものを出せないかとの打診があったことを付記致します。

各賞担当理事 河合剛太、山本泰彦、藤原敏道

P94

ダイヤモンドスピンを用いた生体内ジャイロセンシング技術の開発

○久美屋 雄太¹, 五十嵐 龍治¹, 杉 拓磨^{2,3}, 外間 進悟¹, 朽尾 豪人¹, 吉成 洋祐², 原田 慶恵², 白川 昌宏^{1,2}

¹京大院・工, ²京大・iCeMs, ³JST, さきがけ

Nanoscale gyroscope for measurements of cellular dynamics *in vivo* using diamond spins

Yuta Kumiya¹, Ryuji Igarashi¹, Takuma Sugi^{2,3}, Shingo Sotoma¹, Hidehito Tochio¹, Yohsuke Yoshinari², Yoshie Harada², Masahiro Shirakawa^{1,2}

¹Graduate School of Engineering, Kyoto University, Japan

²Institute for Integrated Cell-Material Sciences(WPI-iCeMs), Kyoto University, Japan,

³JST, PRESTO, Japan

Nitrogen-vacancy centers (NVCs), lattice defects in fluorescent nanodiamond (FND), are known to have an electron spin-triplet ground state, and exhibit extraordinary photostable fluorescence signals even in ambient conditions. Because the fluorescence intensity depends on the spin state, electron spin resonance measurements of NVC can be performed with significant sensitivity by monitoring the fluorescence signals. In this work, we focused on this property of NVC and established a method of “nanoscale gyroscope”. Our method enables quantitative measurements of rotational dynamics of FNDs by measuring the Zeeman effect, which depends on the relative orientation of NVCs to external magnetic fields. Here we show that the nanoscale gyroscope can be used for the determination of attitude of 200-nm FNDs with an angular precision of $\pm 3^\circ$ and the measurements of the dynamics of nanodiamond *in vivo* and in cell.

【緒言】

蛍光性ダイヤモンドナノ粒子 (Fluorescent Nanodiamond: FND) が生体計測プローブとして注目されている。FND内に存在する格子欠陥である窒素-空孔中心 (NVC: Nitrogen-Vacancy Center) は三重項電子スピンをもち、室温で安定な蛍光を呈する。またNVCの蛍光には、蛍光遷移とスピン状態との間に特有のカップリングが存在し、この性質を利用することで蛍光を通してNVCのスピン状態を計測することが可能である。この計測は光検出磁気共鳴 (Optically

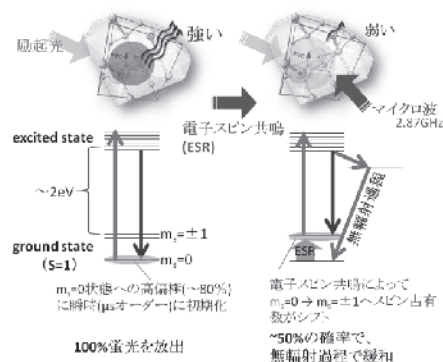


Fig 1. NVC の 2 つの遷移過程

キーワード: 光検出磁気共鳴, ダイヤモンド, *in vivo* イメージング

○くみやゆうた, いがらしりゅうじ, すぎたくま, そとましんご, とちおひでひと, よしなりようすけ, はらだよしえ, しらかわまさひろ

Detected Magnetic Resonance: ODMR) と呼ばれ、超高感度の電子スピン共鳴計測が可能となる。FNDのODMR計測を生体イメージングに応用することで、生体分子の構造・動態変化をナノ～サブミクロンのスケールでその場観察できると期待できる。本研究では、生体内における一分子の回転運動やねじれなどの構造変化をリアルタイムで計測する技術の実現を目指し、FNDの回転運動の定量計測手法「ナノジャイロセンシング技術」を開発した。発表では、開発したナノジャイロセンシング技術と、本技術を *in vivo* および *in cell* における動態計測に応用した実験について報告を行う。

【実験と結果】

(1) ナノジャイロセンシングの検証

カバースリップ上のFND(～200nm)について異なる四方位の外部磁場中でODMRスペクトルを取得し、FNDの姿勢決定を行った。その結果、8秒(34秒)の露光時間で、それぞれ $\pm 5^\circ$ ($\pm 3^\circ$)の角度精度が得られることを確認した。

(2) *in vivo* ジャイロセンシング

*C. elegans*の腸管内に摂食によりFND(～200nm)を導入し、FNDの姿勢を5分おきに決定した。2時間計測を続けた結果、腸管内においてFNDが一軸性の回転運動をしていることが観察された(Fig 2)。また、セロトニン(5-HT)投与によって腸周囲の筋肉活動を抑制した個体と、筋肉の周期運動が抑制された遺伝子変異体(*itr-1(sa73)*)を用いた測定でも一軸性の運動が保存された。

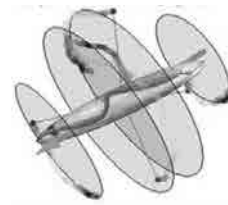


Fig 2. *C. elegans* 腸管内のFNDの運動観察

(3) *in cell* ナノジャイロセンシング

A431細胞膜上の上皮成長因子受容体を抗体修飾FNDで標識し、25秒おきにFNDの姿勢を決定することで細胞膜の運動性を計測した。更に、同様の計測を、アクチンフィラメントの重合を促進するEGF、またはアクチンフィラメントを破壊するLatrunculin Aで処理したA431細胞についても行った。その結果、細胞膜の運動性が細胞辺縁の細胞骨格の状態と負の相関があることが観測された(Fig 3)。

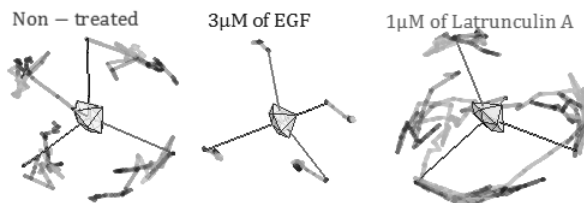


Fig 3. 細胞骨格の状態とFNDの運動性

【結論と今後の展望】

開発したナノジャイロセンシング技術によって *in vivo*、*in cell* の系において回転運動を高精度($\pm 3^\circ$)に計測できることが示せた。実験で用いたFNDは粒径～200nmのFNDであるが、5-50nmのFNDでも同様の精度で計測できることを確認している。本手法を用いることにより、既存の蛍光観察では計測が困難であるナノメートル～サブミクロンスケールの構造・動態変化を計測することが可能になると考えられる。課題は、数秒以上を要する計測時間である。分子構造の変化をリアルタイムで追跡するには秒を切る時間分解能が必要となる。今後は、装置や解析方法の検討により計測の高速化を行っていく。

P12**ユビキチン化に伴うタンパク質構造不安定化**

○森本大智¹, Erik Walinda¹, 菅瀬謙治², 深田はるみ³, 曾友深⁴, 蔭山 俊^{4,5}, 星野大⁶, 藤井高志⁷, 土屋光⁸, 佐伯泰⁸, 有田恭平⁹, 有吉眞理子¹⁰, 朽尾豪人¹⁰, 岩井一宏¹¹, 難波啓一^{7,12}, 小松雅明^{4,5}, 田中啓二⁸, 白川昌宏¹

¹京都大・工, ²サントリー生命科学財団, ³大府大・生命環境,

⁴東京都医学研・蛋白質リサイクル, ⁵新潟大・医, ⁶京都大・薬, ⁷理研・QBic, ⁸東京都医学研・蛋白質代謝, ⁹横市大・生命医, ¹⁰京都大・理, ¹¹京都大・医, ¹²大阪大・生命機能

Folding destabilization of a protein by ubiquitylation

○Daichi Morimoto¹, Erik Walinda¹, Kenji Sugase², Harumi Fukada³, Yu-shin Sou⁴, Shun Kageyama^{4,5}, Masaru Hoshino⁶, Takashi Fujii⁷, Hikaru Tsuchiya⁸, Yasushi Saeki⁸, Kyohei Arita⁹, Mariko Ariyoshi¹⁰, Hidehito Tochio¹⁰, Kazuhiro Iwai¹¹, Keiichi Namba^{7,12}, Masaaki Komatsu^{4,5}, Keiji Tanaka⁸ and Masahiro Shirakawa¹

¹Eng., Kyoto Uni., Kyoto, Japan, ²Suntory Fdn. Life Sci., Osaka, Japan, ³Life Envi. Sci., Osaka Pref. Uni., Osaka, Japan, ⁴Protein Metabolism Proj., Tokyo Metro. Ins. Med. Sci., Tokyo, Japan, ⁵Med., Niigata Uni., Niigata, Japan, ⁶Pharm., Kyoto Uni., Kyoto, Japan, ⁷QBic, RIKEN, Osaka, Japan, ⁸Lab. Protein Metabolism, Tokyo Metro. Ins. Med. Sci., Tokyo, Japan, ⁹Med. Life Sci., Yokohama City Uni., Yokohama, Japan, ¹⁰Science, Kyoto Uni., Kyoto, Japan, ¹¹Med., Kyoto Uni., Kyoto, Japan, ¹²Frontier Biosci., Osaka Uni., Osaka, Japan.

Ubiquitin is one of the most stable intracellular proteins, but it is often found in inclusion bodies associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. To gain insight into this contradictory behavior, we have examined the physicochemical properties of ubiquitin and its polymeric chains that lead to aggregate formation. We found that the folding stability of ubiquitin chains unexpectedly decreased with increasing chain length, resulting in the formation of amyloid-like fibrils. Not only polymerization of ubiquitin itself, but also ubiquitylation of substrate proteins causes fibril formation. Furthermore, when expressed in cells, polyubiquitin chains also formed aggregates depending on chain length. Notably, these aggregates were selectively degraded by autophagy. We propose that the instability of polyubiquitin chains drives fibril formation, which serve as an initiation signal for autophagy.

ユビキチンは極めて可溶性が高く、物理的・化学的に安定なタンパク質である。一方、アルツハイマー病等の神経変性疾患患者の脳病変部位ではユビキチンの凝集体形成が確認されている(Mori, *et al. Science*. 1987)。ユビキチンと凝集体形成との接点とは何か。本研究ではユビキチンの多重合体や基質結合体に着目し物理化学的解析を行なった。

Ubiquitin, amyloid fibrils

○もりもとだいち, ぐありんだえりつく, すがせけんじ, ふかだはるみ, そうゆうしん, かげやましゅん, ほしのまさる, ふじいたかし, つちやひかる, さえきやすし, ありたきょうへい, ありよしまりこ, とちおひでひと, いわいかずひろ, なんばけいいち, こまつまさあき, たなかけいじ, しらかわまさひろ

1. 鎖長依存的な熱力学的不安定化

まず、鎖長別にポリユビキチン鎖の示差走査熱量測定をし、熱力学的安定性解析を行なった。図1に示すように、ポリユビキチン鎖は鎖長が長くなれば長くなる程、熱変性点つまり熱力学的安定性が低下した。一般的に、独立した立体構造を有するタンパク質のポリマーは、その重合度が増えるに従い、熱変性点が上昇することが知られており (Cortajarena, *et al. Protein Sci.* 2011)、ポリユビキチン鎖の鎖長依存的な不安定化は非常に新規性が高い。

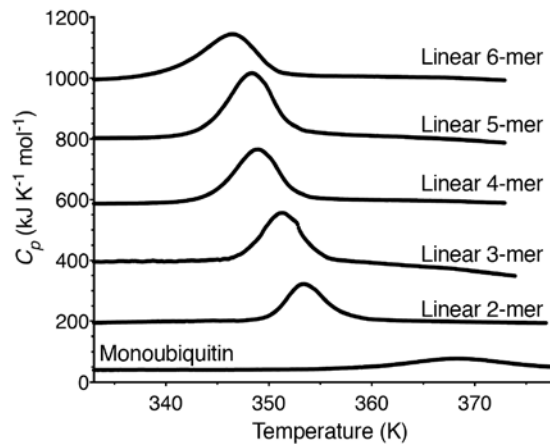


Fig. 1. Comparative analysis of thermal denaturation for polyubiquitin chains of different length.

2. 基質タンパク質の構造不安定化

前述のユビキチン化による熱力学的不安定化は、ユビキチン化タンパク質においても同様に起こる可能性がある。実際、分子動力学解析でユビキチン化による基質タンパク質の熱力学的不安定化が指摘されている (Hagai, *et al. PNAS.* 2006)。二種類の基質 (FKBP12、FABP4) に関し蛍光測定により検証した結果、ユビキチン化により熱力学的不安定化を引き起こすことが実験的に証明できた。さらに、 $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE 解析により、ユビキチン化により基質タンパク質主鎖の構造ゆらぎが引き起こることが分かった。

3. ポリユビキチン鎖及びユビキチン化タンパク質のアミロイド様線維形成

透過型電子顕微鏡 (TEM)、円偏光二色性 (CD) スペクトルならびに Thioflavin T 結合実験により、鎖長や結合型ならびに基質タンパク質との結合の有無に関係なく、熱変性や力学的応力によりユビキチン鎖はアミロイド様線維形成することが分かった。

4. 細胞内ポリユビキチン鎖凝集体形成とオートファジーによる凝集体分解

試験管内で解析した現象が、細胞内でも引き起こるか否か検証した。マウス胎児線維芽細胞においてポリユビキチン鎖あるいはモノユビキチンを細胞内で発現させた。モノユビキチンを発現させた細胞では、顕著な凝集体形成は確認出来なかった。しかし、ポリユビキチン鎖を発現させた細胞では、2 μm 程度の凝集体が形成していた。

細胞内のユビキチン陽性凝集体は選択的オートファジーにより分解される (Kirkin, *et al. Mol Cell.* 2009)。選択的オートファジーによる認識があるか否か検証するため、NMR 滴定実験を行なった。ユビキチン鎖線維を滴定した結果、p62 の ^{15}N 緩和速度が増加し (図2)、相互作用が示唆された。また、野生型の細胞では凝集体は24時間でほぼ全量分解されたが、オートファジー欠損細胞 (*Atg7^{-/-}*) では分解されなかった。これらの結果よりポリユビキチン鎖は鎖長依存的に凝集体形成し、その凝集体は選択的オートファジーにより分解されることが分かった。

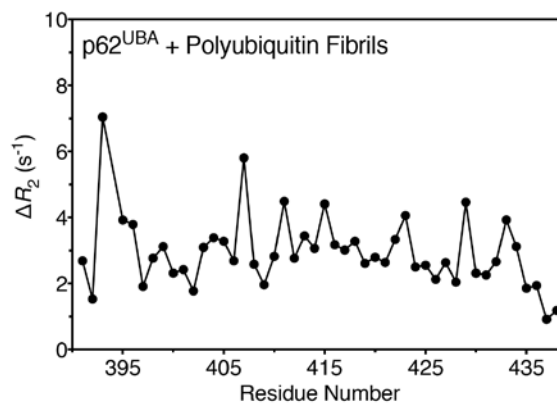


Fig. 2. Estimation of ΔR_2 , the difference of the transverse relaxation rates ($^{15}\text{N}-R_2$) of free p62^{UBA} and p62^{UBA} titrated with polyubiquitin fibrils.

P8

MAPキナーゼ p38 α のストレスシグナル伝達機構の解明○徳永 裕二¹, 竹内 恒², 高橋 栄夫³, 嶋田 一夫⁴¹JBIC・次世代天然物化学技術研究組合²産総研・molprof³横浜市大・生命医科学⁴東大・院薬系**Structural basis for the stress signal transduction via MAP kinase p38 α** ○Yuji Tokunaga¹, Koh Takeuchi², Hideo Takahashi³, and Ichio Shimada⁴¹*I, Technology Research Association for Next generation natural products chemistry.*²*Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology.*³*Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University.*⁴*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo.*

MAPK p38 α pathway plays essential roles in intracellular signal transduction in response to various stimulations. Within the pathway, p38 α phosphorylates its specific substrates, using ATP as a cosubstrate. On the other hand, intracellular ATP concentration is known to decrease considerably when cells are exposed to stressor. Currently, however, the molecular basis of how p38 α is kept active under low ATP conditions remains unknown.

Here, we investigated the effects of the interaction between p38 α and its specific substrates, as well as of the another stress-associated environmental change, pH decrease, on p38 α structure and activity. We found that both the specific interaction and the pH decrease independently enhance the kinase activity of p38 α , mainly via enhancements of affinity to ATP. Thus, the p38 α -mediated stress signal is able to concomitantly achieve its robustness and substrate specificity.

【序論・研究の目的】

細胞は恒常性維持機構を持つ一方、ストレス条件下では生体分子の細胞内濃度が変動することも知られており、ATP 濃度低下はこの一例である。MAP キナーゼ p38 α 経路は各種のストレス下において活性化され細胞応答を担うが、p38 α は基質リン酸化において ATP を共基質として用いるため、ストレス刺激に伴う ATP 濃度低下は p38 α のキナーゼ活性に不利に働く可能性がある。このように ATP 濃度低下を伴うストレス下においても、p38 α 経路シグナルが伝達される分子機構は不明である。同機構の理解には、p38 α と基質との特異的相互作用、およびストレス条件に固有の生理的環境が p38 α の構造および活性に与える影響の理解が必須である。基質との相互作用については、p38 α は活性部位 (ATP 結合部位および基質リン酸受容部位を結合する P+1 部位) から離れた“ドッキング部位”にて基質とアロステリックな“ドッキング相互作用”を形成し、特異的結合を達成する (図 1a)。しかしながら、既存の p38 α -基質複合体構造においては、ドッキング相互作用は形成されている一方、p38 α は活

protein kinase, stress response, signal transduction

○とくなが ゆうじ、たけうち こう、たかはし ひでお、しまだ いちお

性に必要な活性化ループ上の二重リン酸化を受けておらず不活性な状態であるため、活性部位には ATP、基質リン酸受容部位のいずれも結合しておらず、p38 α のキナーゼ活性の発現および調節に対するドッキング相互作用の役割は不明であった。一方、ストレス刺激に伴う生理的環境の変化として、細胞内 pH の低下が知られているものの、pH 低下に伴う p38 α の構造および活性の変化は不明である。本研究では、ATP 濃度低下を伴うストレス下において、p38 α 経路のシグナル伝達が達成される分子機構の解明を目的とした。特に、シグナル伝達の根幹を担う、p38 α -ATP-基質からなる“反応複合体”の形成過程に着目し、NMR法を用いた構造生物学的解析を行った(図 1b)。

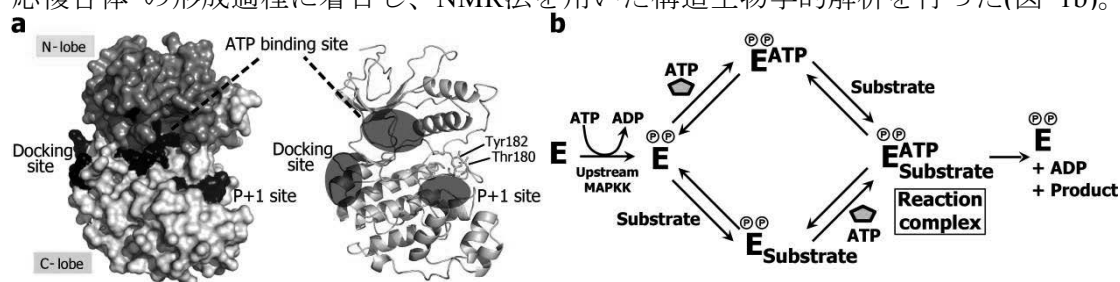


図 1. (a) p38 α の立体構造、および (b) p38 α の基質リン酸化反応経路

【方法】

ヒト由来 p38 α は大腸菌にて発現し、上流の MAPKK6 を用い活性化ループ上 Thr180 および Tyr182 を二重リン酸化した (以下、リン酸化 p38 α を p38 α と表記する)。p38 α の主鎖アミドシグナルは、化学交換に起因する横緩和速度増大のために約 40% が帰属不可能であった。この問題を解決するため、高感度の ILVM 残基メチル基のシグナルを利用し、これらについて95% を立体選択的に帰属した。相互作用解析の基質として、生理的基質である MAPKAPK-2 のリン酸受容部位 Thr334 および C 末端ドッキング配列からなる 334D-peptide を用いた。また、ドッキング相互作用と活性部位への基質リン酸受容部位の結合の影響を分離する目的にて、Thr334 周辺配列からなる 334-peptide、ドッキング配列 D-peptide を調製した。

【結果】

1. p38 α の構造および活性に対するドッキング相互作用の影響の解析

ATP アナログ非存在下および存在下にて、p38 α に対して等モル量の 334D-peptide を添加した。この結果、p38 α のメチル領域 ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル上に部位特異的な化学シフト変化が観測された。特異的結合を担うドッキング部位は ATP アナログの有無によらず化学シフト変化を示した一方 (図 2a)、リン酸受容部位が結合する P+1 部位は ATP アナログ存在下においてのみ、化学シフト変化を示した (図 2b)。このことは、p38 α は ATP の有無によらず基質との間にドッキング相互作用を形成できる一方、ATP を結合した状態においてのみ、活性部位にてリン酸受容部位を結合することを示す。即ち、p38 α -ATP-基質の反応複合体は ATP 結合を契機として形成されることが明らかとなった。

p38 α キナーゼ反応経路の各要素 (図 1b) に対するドッキング相互作用の寄与を解析する目的にて、p38 α の ATP に対する親和性、基質リン酸受容部位に対する親和性、およびリン酸転移反応速度を、D-peptide の有無にて比較した。この結果、いずれの要素も、D-peptide 存在下にてアロステリックに増強・促進されることが明らかとなった (図 3)。

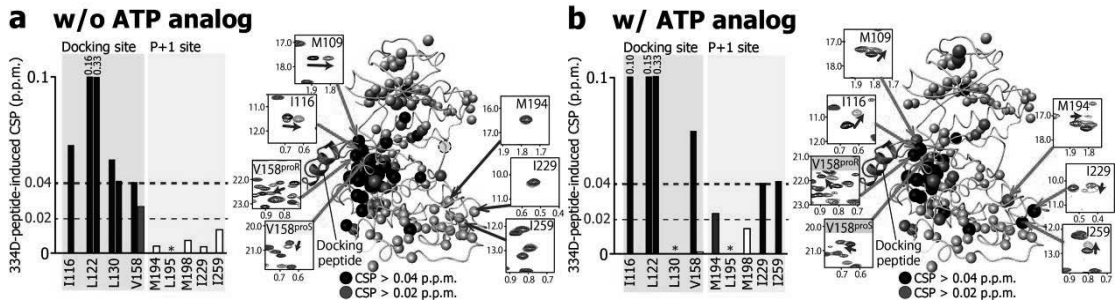


図 2. 334D-peptide 結合に伴う p38α の化学シフト変化

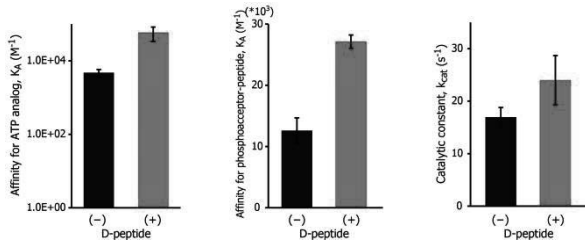


図 3. D-peptide 有無における p38α の ATP 親和性、334-peptide 親和性、および 334-peptide リン酸化の速度定数

2. p38αの構造および活性に対する pH 低下の影響の解析

p38α のキナーゼ活性を、ATP 濃度 2 mM および 0.5 mM、pH 8.0 および 6.3 にて測定した。この結果、pH 8.0 においては ATP 濃度低下に伴いキナーゼ活性の低下が認められた一方、pH 6.3 においては ATP 濃度が低下しても、キナーゼ活性は同等に保たれた (図 4)。即ち、低 pH 条件にて、p38α の活性は、ATP 濃度低下に対して頑強となることが示された。

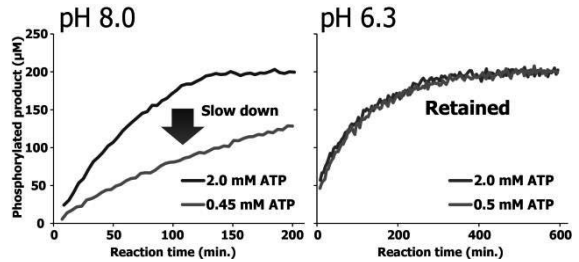


図 4. p38α の基質リン酸化活性の pH および ATP 濃度依存性

pH 低下に伴う p38α キナーゼ活性頑強化の構造基盤を解明する目的にて、apo 条件で p38α のメチル領域 1H - ^{13}C HMQC スペクトルの pH 依存性を解析した。この結果、pH 6.3 (低 pH 条件) にて一部のメチル基に、中性 pH にて観測されていたメジャーシグナルに加えて、強度の弱いマイナーシグナルが観測された (図 5a)。Z 磁化交換 (EXSY) 実験にてメジャー・マイナーシグナル間に交換ピークが観測されことから、p38α は低 pH 条件にて 2 状態間の平衡状態にあることが示された (図 5b)。以下、メジャー・マイナーシグナルを与える状態をそれぞれ A, B 状態と表記する。A 状態から B 状態への移行に伴う化学シフト変化は、p38α に対する ATP アナログ結合に伴う化学シフト変化とよく関連した (図 5c)。このことより、B 状態は ATP を結合した活性化構造に類似した状態であることが示唆された。p38α の ATP アナログに対する親和性は pH 低下に伴い増大し、これと対応して B 状態の存在割合も増大したことから、B 状態が ATP に対する高親和性を担うことが強く示唆された (図 5d)。このような pH 依存性を担う残基を、ATP アナログを結合した p38α の活性化構造モデル上に探索した結果、活性化ループ上および P+1 部位に存在する 2 個の His 残基、His174 および His199 が、酸性残基と近接することを見出した (図 5e)。これに基づき、pH 低下に伴うこれら His 残基のプロトン化により、酸性残基との静電相互作用が増強される結果、活性化構造が安定化されるモデルを考案した。実際に、

これら His 残基に変異導入した H174A, H199A 変異体においては、pH 低下に伴う B 状態の形成が認められず、モデルを支持する結果が得られた (図 5f)。さらに、これら His 残基の pH 滴定実験を実施し、側鎖 pK_a 値を決定した。得られた pK_a 値は 7 付近の比較的高い値を示したことから、ストレス刺激により誘起される中性から弱酸性への pH 低下に対し、敏感に応答できることが示された。

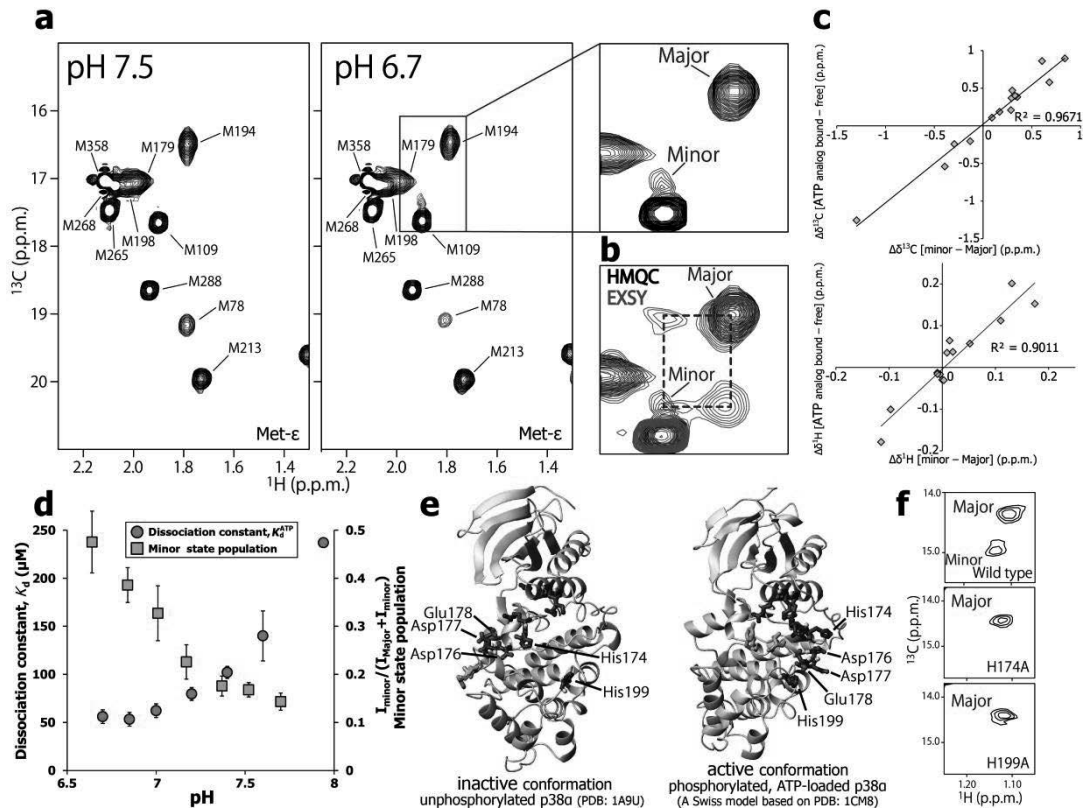


図 5. pH 低下に伴う p38α の構造平衡の変化および構造基盤

(a) pH 7.5 および 6.3 におけるメチル HMQC スペクトル (Met-ε 領域) (b) Z 磁化交換 (EXSY) スペクトルの重ね合わせ (c) A, B 状態間の化学シフト差および ATP アナログ結合に伴う化学シフト変化の間の相関プロット (d) p38α の ATP アナログに対する親和性および B 状態存在割合の pH 依存性 (e) p38α の不活性および活性構造モデルにおける His174 および His199 の位置 (f) pH 6.7 における H174A および H199A 変異体の Ile84 (ATP 結合部位) シグナル領域

【考察】

本研究にて、ATPの結合が p38α-ATP-基質の反応複合体形成の契機となること、またドッキング相互作用および pH 低下は、いずれも 10 倍程度の顕著な ATP 親和性増強に基づき、p38α の活性増強および活性維持に寄与することが明らかとなった。この基質存在下および酸性条件下での ATP 親和性の増大は、ストレス刺激に伴う ATP 濃度低下条件においても、p38αが ATP-基質との反応複合体の形成効率を維持し、シグナルを高効率に伝達することを可能にする巧妙な分子機構である。

【参考文献】

Tokunaga, Y., Takeuchi, K., Takahashi, H., and Shimada, I. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2014), **21**, 704-711.

P64

天然存在比下での ^{33}S STMASによるエトリンタイトの研究

○佐々木彬子, Stephen Wimperis
英国グラスゴー大学大学院

A natural abundance ^{33}S STMAS NMR study of ettringite

○Akiko Sasaki, Stephen Wimperis

School of Chemistry and WestCHEM, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, UK

There have been very few ^{33}S (spin $I = 3/2$) solid-state NMR studies in the literature, owing to the low natural abundance (0.76%), low gyromagnetic ratio ($\nu_0 = 30.7$ MHz at 9.4 T) and the high expense of ^{33}S isotopic enrichment. Owing to the recent advances in the development of high-field spectrometers, solid-state NMR studies of NMR insensitive nuclei are now accessible. Here we demonstrate the feasibility of high-resolution natural abundance ^{33}S NMR at $B_0 = 20.0$ T and 9.4 T for our compound of interest, ettringite. Our first-principle DFT calculations of ^{33}S NMR parameters using CASTEP code, upon comparison with experimental results, suggest the presence of fast dynamics in the vicinity of S nuclei in ettringite.

Introduction

Quadrupolar nuclei account for more than 70% of NMR-active nuclides. For quadrupolar nuclei with half-integer spin quantum numbers, the inverse dependence of the second-order quadrupolar interaction upon magnetic field strength makes the use of high-field spectrometers highly advantageous. The sensitivity limitations associated with low- γ nuclei can also be overcome by high-field NMR. Recently, following the development of high-field spectrometers, ^{33}S solid-state NMR studies have begun to attract interest owing to the prevalence of sulfur in nature and materials science. Natural abundance ^{33}S solid-state NMR, therefore, has great potential for future applications.

The MQMAS and STMAS NMR experiments both yield high-resolution NMR spectra of half-integer spin nuclei. STMAS is known for its increased sensitivity¹ owing to effective excitation of the single-quantum satellite transitions, making it advantageous for the study of NMR insensitive nuclei such as ^{33}S .

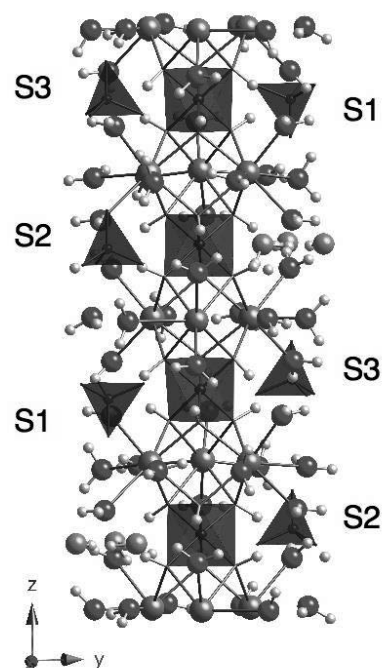


Figure 1. Crystal structure of ettringite (tetrahedron = SO_4^{2-}).

^{33}S NMR, quadrupolar nuclei, solid-state NMR

○ささきあきこ, スティーブン・ウインペリス

Ettringite

Ettringite ($\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{OH})_{12}\cdot 26\text{H}_2\text{O}$) is a cementitious mineral that is central to the chemistry of concrete and cement. The crystal structure is known² (Figure 1) and there has been an early ^{27}Al MAS NMR study.³ There have been two ^{33}S MAS NMR studies of ettringite at high field.^{4,5} These two studies disagree, with one simulating the ^{33}S MAS NMR spectrum with a single S site⁴ and the other simulating it with three S sites⁵ (in accordance with the diffraction study), leaving uncertainty in the number of crystallographically different S sites observed by ^{33}S NMR. Here, we aim to characterise the distinct S sites in ettringite using ^{33}S STMAS at natural abundance and resolve the ambiguity present in the current literature.

Implementing ^{33}S STMAS

Despite its sensitivity advantage, STMAS is known to be more technically demanding compared to the MQMAS technique. Here, for successful implementation of natural abundance ^{33}S STMAS, we thoroughly considered (i) the choice of diameters and effective ST excitation, (ii) STMAS pulse length optimisation using ^{33}S MAS of $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, (iii) spinning axis calibration using $^{85/87}\text{Rb}$ STMAS of RbNO_3 and (iv) sensitivity check at $B_0 = 20.0$ T using a model system (1:1 molar mixture of Na_2SO_4 and K_2SO_4).

^{33}S STMAS and CASTEP NMR calculations of ettringite

Natural abundance ^{33}S STMAS spectra of ettringite were successfully recorded at $B_0 = 20.0$ T and 9.4 T. The resulting two-dimensional STMAS spectra were analysed by centre-of-gravity method, and the quadrupolar parameters were refined by fitting to the one-dimensional MAS spectra. A set of quadrupolar parameters for three crystallographically distinct S sites was obtained to achieve consistency over the one- and two-dimensional ^{33}S spectra at different B_0 fields. Our isotropic (F_1) projection analysis reveals that our fitting parameters are in better agreement with the experimental results than the set of fitting parameters previously suggested in the literature.

CASTEP calculations of ^{33}S NMR parameters were performed, including chemical shift reference establishment and evaluation of geometry optimisation schemes. Notably, the calculated C_Q values of ettringite were significantly larger than the experimental parameters, implying the presence of motional narrowing of the central transition MAS lineshape, potentially arising from the dynamics of SO_4^{2-} ions or the surrounding H_2O molecules. The presence of dynamics could not have been proposed solely on the basis of either CASTEP calculations or experimental NMR spectra.

References

1. N. G. Dowell, S. E. Ashbrook, and S. Wimperis, *J. Phys. Chem. B* **108**, 13292 (2004).
2. F. Goetz-Neunhoeffler and J. Neubauer, *Powder Diffraction* **21**, 4 (2006).
3. J. Skibsted, E. Henderson and H. J. Jakobsen, *Inorg. Chem.* **32**, 1013-1027 (1993).
4. J.-B. d'Espinose de Lacaillerie, F. Barberon, B. Bresson, P. Fonollosa, H. Zanni, V. E. Fedorov, N. G. Naumov, and Z. Gan, *Cem. Concr. Res.* **36**, 1781 (2006).
5. M. R. Hansen, M. Brorson, H. Bildsøe, J. Skibsted, and H. J. Jakobsen, *J. Magn. Reson.* **190**, 316 (2008).

P52

In situ 光照射固体NMRによる光受容センサー膜タンパク質 sensory rhodopsin I の波長依存的な光反応過程の解析

○榎野 義輝¹、四方田 洋樹¹、友永 雄也¹、日高 徹朗¹、
川村 出¹、沖津 貴志²、和田 昭盛²、須藤 雄気³、
内藤 晶¹

¹横浜国大・院工, ²神戸薬大, ³岡山大・院医歯薬

Color-discriminating photocycle of sensory rhodopsin I as revealed by *in situ* photo irradiation solid-state NMR

○Yoshiteru Makino¹, Hiroki Yomoda¹, Yuya Tomonaga¹, Tetsuro Hidaka¹,
Izuru Kawamura¹, Takashi Okitsu², Akimori Wada², Yuki Sudo³, and Akira Naito¹

¹Grad. Sch. Emg, Yokohama Natl Univ.

²Kobe Pharm Univ.

³Grad, Sch, Med, Debt, Pharm, Okayama Univ..

Sensory rhodopsin I from *Salinibacter ruber* (SrSRI) is a photo receptor membrane protein with a retinal as a chromophore. SrSRI transfers signal to the cytoplasmic side and express multiple functions for negative and positive phototaxis during photocycle. To reveal the photoreaction pathway, we measured ¹³C NMR signal under the photo irradiation condition using *in situ* photo irradiation CP-MAS NMR. We have also implemented the photo irradiation system to apply color-selective photo-irradiation system. We demonstrated that the conformational change of retinal occurred under the photo illumination. Under the green light illumination, the retinal configuration changed from all-trans (13.8 ppm) of ground state to 13-cis (19.8 ppm) of M-intermediates. After the accumulation of M-intermediates, under the UV light illumination, 13-cis (19.8 ppm) transferred to 24.8 ppm of P-intermediate. Interestingly, NMR-signal of ground state directly changed to that of P-intermediate, under UV light illumination. These results showed color-discriminating pathways of srSRI such as G→M (green light), M→P (UV light), G→P (UV light).

[序論]

Sensory rhodopsin Iは微生物の膜中に存在するセンサー型膜タンパク質であり、フォトサイクルと呼ばれる特有の光反応経路を経て、正および負の光走性を示す多機能性をもつタンパク質である。SRIの信号伝達機構はシッフ塩基結合したレチナールの光異性化により引き起こされるが、膜タンパク質であるSRIの光刺激に対応した構造変化は、SRIが不安定であり、膜中のタンパク質の構造解析が困難であるため、その光反応経路の詳細は解明されていない。そこで、安定な*Salinibacter ruber*由来のSrSRIのレチナールについて、*in situ*光照射固体NMR装置を用いて光照射下でNMR測定を行った。

in situ 光照射固体NMR, 膜タンパク質, レチナール

○まきのよしてる, よもだひろき, ともながゆうや, ひだかてつろう,
かわむらいずる, おきつたかし, わだあきもり, すどうゆうき, ないとうあきら

[実験方法]

*SrSRI*は*E. coli* (BL21)を用いて発現し、 $[20-^{13}\text{C}]$ retinal標識*SrSRI*を脂質二重膜であるPG膜に*SrSRI*:PG膜=1:30のモル比で再構成し測定用試料とした。

再構成後の試料を*in situ*照射固体NMR法[1]によって照射下で ^{13}C NMRスペクトルを測定した。光源はLED光を使用し、光ファイバーを用いて試料管に直接光を導入した。光ファイバーをNMR試料管に非接触とすることで、マジック角回転数4 kHzで試料を高速回転しながら照射下で、 ^{13}C CP MAS NMR測定を行った。本実験では、さらに複数のLED光源(520 nm, 595 nm, 365 nm)をインストールして多波長での照射実験を可能にした[2]。

[結果と考察]

*SrSRI*の中間体への異性化は吸収光の波長に依存するため、*SrSRI*の光反応過程を解明するために、選択的に3つの波長を使用することで、照射下でのレチナールの化学シフト値の変化を測定した。

基底状態(G-state)の*srSRI*に -40°C で520 nmの照射条件で ^{13}C NMR測定をしたところ、G状態(13.8 ppm)の信号の減少とそれに伴うM中間体(19.8 ppm)の信号の増加が観測できた(Fig.2 A)。測定は照射下で行っているため、520 nmの照射下で定常的にM中間体を捕捉できたことが確かめられた。十分にM中間体を溜めた状態で、光源を365 nmに切り替えたところ、M中間体は減少し、24.8 ppmの信号が増加した(Fig. 2 B)。この信号は*SrSRI*の負の光走性に関わるP中間体であると同定でき、また化学シフト値からP中間体のレチナールの構造は13-cis型であることが決定できた。この実験により、G \rightarrow (520 nm) \rightarrow M \rightarrow (365 nm) \rightarrow Pの光反応経路が確かめられた。さらに、G状態に365 nmを直接照射したところG状態(13.5 ppm)の信号はP中間体を表す25 ppm付近に移動した。これは、1光子過程(G \rightarrow P)によるP中間体の捕捉を示唆している。以上より、照射固体NMRを用いることによって、*SrSRI*の波長依存的なフォトサイクルを決定し(Fig.3)、複数の波長の光を用いた新たな照射システムの有用性を示す結果が得られた。

[1]Y. Tomonaga, et al. (2011) *Biophys. J.* **101**, L50-L52.

[2]H. Yomoda, Y. Makino et al. (2014) *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**(27) 6960-6964.

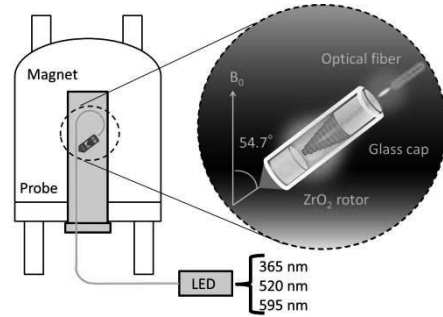


Fig. 1 Photo irradiation solid state NMR system [2]. The three wavelength (520 (green), 595 (orange), 365 (blue) nm) can be easily switched during measurements.

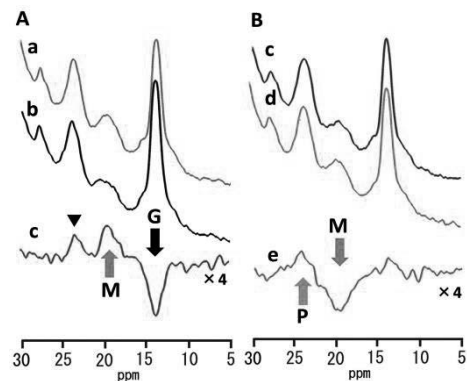


Fig. 2 ^{13}C NMR spectra of retinal in *SrSRI*, (A) in green light illumination(a), the dark(b) and green minus dark(c). (B) in blue(c), green(d) light illumination and blue minus green(e).

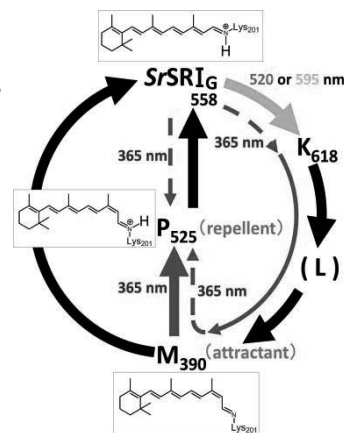


Fig. 3 Photo cycle of *SrSRI* [2]

P66**固体NMRによるキンヒドロロン合成時の固相反応過程の研究**

○伊澤研一郎, 野田泰斗, 竹腰清乃理
京都大学大学院理学研究科

Solid-State NMR on Solid-State Reaction Process of Quinhydrone

○Kenichiro Izawa, Yasuto Noda, and K. Takegoshi

Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

Solid-state reaction is important in, for instance, drug development. However, its detailed mechanism has not been explained yet. It is known that quinhydrone (QH) can be synthesized by grinding solid benzoquinone (BQ) and hydroquinone (HQ) together. In this work, in purpose of unraveling QH solid-state reaction mechanism, XRD, ^{13}C CP/MAS NMR and ex-situ measurements were carried out. We found that, in the solid-state reaction, the diffusion process relies on BQ molecular diffusion, and the growing process proceeds via QH microcrystallines, not via particular intermediates.

【1. 序論】

溶媒を用いない固相反応による分子結晶の合成は、液相反応では得られない物質の提供と低環境負荷を兼ね備えた有用な合成法として特に創薬分野において重要な位置を占める。固相反応過程は、固体中で原材料となる原子や分子が拡散して化学反応を起こす拡散過程と、その後中間体やアモルファス相を経由して最終的な生成物にいたる成長過程の、2つに大きく分けられる^[1]。

キンヒドロロン(QH)は原料であるヒドロキノン(HQ)粉末とベンゾキノン(BQ)粉末を 1:1 で混合するだけで合成される最も古く最も単純な分子結晶である(Fig. 1)が、その固相反応過程は未だ解明されていない。固相における拡散過程では、HQの水酸基の水素が拡散しても、BQ(あるいはHQ)分子が拡散してもQHは生成し得る(Fig. 2)。電荷移動錯体であるQHで水素の移動は考えにくい、その一方で、1原子より大きなBQ分子が室温でHQ結晶内部へ浸透することも考えにくく、どのような拡散過程を経由しているのかは不明である。また、QHには単斜晶(mono-QH)と三斜晶(tri-QH)の2つの多形体が存在する^[2,3]。これまでに、未加熱および加熱温度が低い条件下で固相反応させると mono-QH と tri-QH の混合物が得られ、この混合物を 85°C で熱処理すると、最終的に mono-QH が成長することが判明している^[4]。この転移は液相反応により合成した tri-QH では起こらず固相反応特有の現象である^[4]が、そのメカニズムは不明である。

本研究ではキンヒドロロンの固相反応過程を明らかにすることを目指し、固体 NMR を用いてミクロな視点から解析を行った。具体的には、拡散過程では次に提案する原理に基づき、重水素化原料を用いて合成したQHの ^{13}C CP/MAS 測定から原子と分子のどちらが拡散しているか判別した。成長過程では異なる温度で焼きなましたキンヒドロロンの ex-situ NMR と XRD を組み合わせることで、核形成と結晶多形の変遷を焼きなまし温度を変えて追跡した。

キンヒドロロン, 固相反応, ex-situ

○いざわけんいちろう, のだやすと, たけごしきよのり

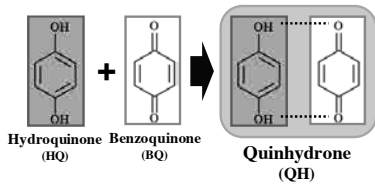


Fig. 1 Reaction formula of QH solid-state synthesis.

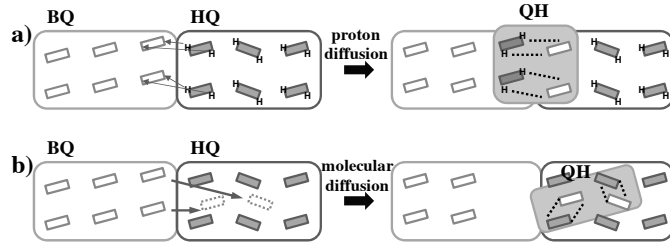
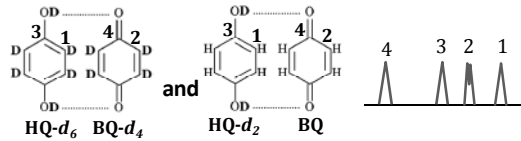


Fig. 2 Reaction and diffusion model of QH solid-state synthesis. (a) Proton diffusion model. (b) Molecular diffusion model.

【2. 原理】

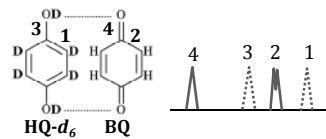
原料拡散過程は以下に述べる「A.プロトン拡散モデル(Fig. 2a)」と、「B.分子拡散モデル(Fig. 2b)」の2種が考えられる。拡散プロセスの解明は重水素化HQ ($C_6D_4(OD)_2$) (= HQ- d_6)を原料として作製したQHの ^{13}C CP/MAS 測定及び、QH各原子のコンタクトタイム(CT)依存性を解析することで可能となる。

A. プロトン拡散 : HQ分子のOH基の水素がBQ結晶内へ浸透してBQ分子と結合することでHQ分子へと変化し(拡散元のHQ分子はBQ分子に変化し)、このHQ分子(BQ分子)が周囲のBQ分子(HQ分子)と組を形成してQHが生成するというモデルである。化学的性質上、ベンゼン環上のプロトンは拡散しないと考えられるため、原料HQ- d_6 とBQからプロトン拡散過程を経て生成するQHは、HQ- d_6 とBQ- d_4 からなるQHと、HQ- d_2 とBQからなるQHの2つに限定される(Fig. 2a)。HQ- d_6 とBQ- d_4 からなるQHは全ての水素が重水素化されているため 1H - ^{13}C CP/MASでは観測されない。HQ- d_2 とBQからなるQHは 1H - ^{13}C CP/MASで観測され、サイト1, 3のピークのCT依存性と、サイト2, 4のピークのCT依存性はそれぞれ同じようになると予想される(Scheme 1)。



Scheme 1 Expected QH molecules (left) and the ^{13}C CP/MAS NMR spectrum (right) according to the reaction of proton diffusion model.

B. 分子拡散 : BQ分子そのものがHQ結晶内部へ浸透し、HQ分子と結合してQHが生成するというモデルである。QH分子内におけるproton hoppingが生じる場合を除き、BQとHQが後天的にそれぞれHQとBQへと変化することはない。このためHQ- d_6 とBQから分子拡散過程を経て生成するQHは、HQ- d_6 とBQから成るQHのみとなる(Fig. 2b)。この場合 ^{13}C CP/MAS測定において、CTが短いとpeak1, 3の強度はpeak2, 4の強度よりも相対的に小さく、CTが長くなるにつれBQのプロトンから磁化が移動し、相対的に同等の大きさになると予想される(Scheme 2)。



Scheme 2 Expected QH molecules (left) and the ^{13}C CP/MAS NMR spectrum (right) according to the reaction of molecular diffusion model.

【3. 実験】

試料調製：[拡散過程用] 通常のHQ、完全重水素化HQ- d_6 をそれぞれBQと混合し、乳鉢で十分に粉碎混合した。混合比率はBQの昇華性を考慮し、HQ : BQ = 1 : 1.05とした。これらの試料を80°Cにて焼きなました。

[成長過程用] 室温で通常HQとBQを乳鉢中で粉碎混合した後、小瓶にとりわけてそれぞれ所定の温度で焼きなました。焼きなまし温度は室温(未加熱)、55°C、90°Cの3種類である。一定時間経過後小瓶から試料を取り出し、試料管に詰め室温で測定した。

測定：[固体NMR] 7 T 磁場とChemagnetics社製5 mm MAS probeを用いて行った。 ^1H と ^{13}C の照射周波数はそれぞれ301.37 MHz、75.788 MHz、MAS速度は8 kHz とした。測定法は ^1H - ^{13}C CP/MASを用いた。

[XRD] 線源としてCu-K α を備えたRigaku社製 Mini Flex 600 を用いて測定を行った。

【4. 結果・考察】

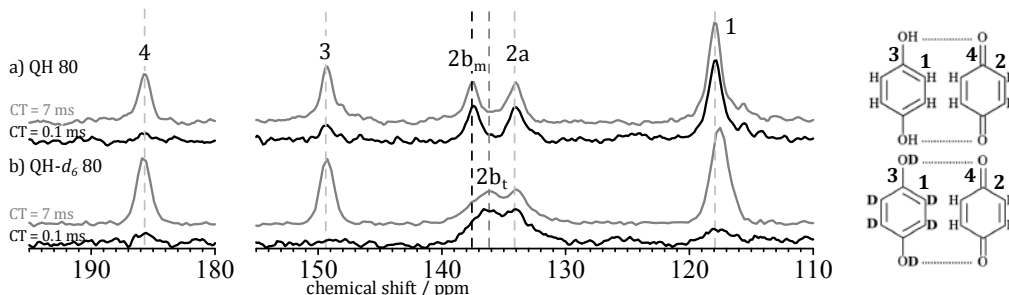


Fig. 3 ^{13}C NMR spectra of (a) QH and (b) QH deuteride on different contact time.

[4-1. 拡散過程] Fig. 3に (a)通常HQから合成したQHと (b)HQ- d_6 から合成したQHの ^1H - ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルを示す。黒線がCT 0.1 ms、灰色線が7 msで測定したスペクトルである。ピークは図中の番号に対応したサイトで帰属される^[5]。スペクトル(a)とスペクトル(b)でpeak2の形状が異なるのは、合成した試料がそれぞれ単斜晶と三斜晶であるためである。CTが7 msではQH分子の全ての ^{13}C に ^1H 磁化が移動しており、a、b両試料のピーク強度に違いは見られなかった。一方で、CTが0.1 msでは、試料aはpeak1, 3に ^1H の磁化が移動していたが、試料bについてはpeak2以外にほとんど磁化は移動していない。この結果は試料bのQH- d_6 分子がHQ- d_6 とBQの組で構成されることを示している。この結果から[2-A,B 原料拡散]の議論に従って、固相反応過程における原料拡散プロセスはBQの分子拡散が担うと結論できる。

[4-2. 成長過程] QHのpeak2b部分の化学シフトはtri-, mono-QHの結晶相によって異なり、それぞれpeak2 $_t$ 、peak2 $_m$ に対応する。Ex-situ NMR測定により得られたスペクトルについてピーク分離による解析を行い、焼きなまし温度と加熱時間によるQH全体に対するmono-QHの割合の変化をプロットしたものが(Fig. 4)である。mono-QHの割合は $\{(peak2b_m \text{面積}) / (peak2b_m \text{面積} + peak2b_t \text{面積})\}$ で表した。この結果、室温で焼きなますとmono-QHの割合は

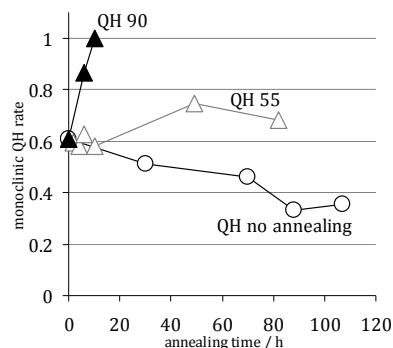


Fig. 4 Ex-situ experiment of QH on different annealing process.

時間とともに減少したが、80 hを過ぎるとほとんど変わらなくなった。55°Cではmono-QHの割合は時間が経過してもほとんど変化しなかった。90°Cではmono-QHの割合が時間とともに増加し、10 h後には全てのtri-QHがmono-QH単相に変化した。

この結果を踏まえると、焼きなまし温度に対応して反応速度が増加し得られるmono-QHの割合が増加することが分かった。特に90°C焼きなましに関しては、粉碎混合により得られたmono-QH、tri-QHが短時間でmono-QH単相へと変化しており、転移が起きていることは明らかである。一方で、55°C以下の焼きなましでは相転移は完全には進行せず、ある割合で停止する。これは粉碎混合によって生成したmono-、tri-QHの双方が、反応の進行により並行して増加し、一部のtri-QHのみがmono-QHへと変化するためと考えられる。

結晶子の成長との相関を解析するために、55°Cで焼きなましたQHについてex-situ XRDも測定した。XRD測定では4 h→82 hにおいて連続してmono-QHのピークが増加した(Fig. 5)。一方でNMRによる測定の結果では、4 h→49 hではXRD測定結果と同様にmono-QHのピーク増加が確認できたが、49 h→82 hではピークの変化は起こらず、tri→mono-QHの転移あるいはmono-QHの新規生成が完全に停止したことが分かる。この結果は49 h時点で55°CにおけるQHの転移を含む固相反応は停止し、その後はmono-QHの粒径が成長していくことでXRDでも観測ができる粒子が増加したことを示している。これは、固相反応では分子拡散後アモルファスのような中間構造をとることなく、直接QHの微結晶が生成することを示唆している。

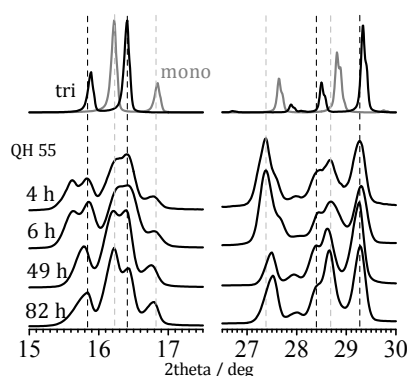


Fig. 5 Ex-situ XRD experiment of QH.

この結果を踏まえると、固相反応で生成したtri-QHと、液相反応で合成したtri-QHの間に存在する相違は、結晶子の大きさであると推察される。微結晶状態では自由度の高い表面の占める割合が大きいためtri-QHからmono-QHへの転移は容易に進行するが、溶液から合成したtri-QHは粒径が大きく転移は起こりづらいと考察されるためであり、これら転移機構の解明が今後の課題である。

【5. 結論】

^1H - ^{13}C CP/MAS 測定によるQH拡散過程の解析と、ex-situ NMR, XRD 測定によるQH成長過程の追跡を行った。拡散過程は原料BQ分子の分子拡散が担い、HQ結晶内部へBQ分子が浸透していくことで反応が進行する。成長過程は中間体を経由せず、拡散と同時にQHの微結晶が生成・成長する。tri-QHからmono-QHへの転移しやすさは温度に依存し、低温時には転移しづらい。

【6. 参考文献】

- [1] T. Frisšćić and W. Jones, *Crystal Growth & Design*, 2009, **9**, 1621-1637.
- [2] T. Sakurai, *Acta Cryst.*, 1965, **19**, 320-330.
- [3] T. Sakurai, *Acta Cryst.*, 1968, **B24**, 403-412.
- [4] 伊澤ら, 第52回NMR討論会要旨集, 2013, P87, pp.318-319.
- [5] J. R. Scheffer et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 4898-4904.

P46**Measurement of Proton Chemical Shift Anisotropy Tensors Using Symmetry-Based Radio-Frequency Pulse Sequences and Ultrafast MAS Solid-State NMR Spectroscopy**Manoj Kumar Pandey¹, Michal Malon^{1,2} and Yusuke Nishiyama^{1,2}¹CLST NMR Facility, RIKEN, Yokohama, Japan.²JEOL RESONANCE Inc., Musashino, Akishima, Japan.

It is well known that H-bonding interactions play a central role in providing structural stability to numerous chemical and biological compounds. Therefore it becomes important to get atomistic view of these interactions to obtain piercing insights using the state-of-the-art solid-state NMR technique. To accomplish this nothing can be better than the very basic NMR interaction parameter “chemical shift” which provides information about the local electronic environment and motions surrounding a nucleus. Furthermore, the distribution of charges inside the nucleus is mostly unsymmetrical which gives rise to orientation dependence to chemical shift and is known as chemical shift anisotropy (CSA) tensor. While the isotropic chemical shift values provide information about the magnetically inequivalent nuclear spins in the system, various anisotropic interactions such as chemical shift and dipolar couplings contain rich information about its structure and dynamics. Therefore, there is considerable interest in the development of methods based on recoupling techniques for the measurement of anisotropic interactions with a better accuracy. Over the past several years, ¹³C and ¹⁵N CSA values have been routinely measured for structural and dynamics studies in solids due to their large spread of chemical shift frequency. On the other hand, the extraction of small size ¹H CSAs from the homogeneously broadened NMR spectra in the presence of strong ¹H/¹H dipolar interactions due to their high abundance and sensitivity is a difficult process and methods for accurate measurement of ¹H CSA are still emerging. In the present work we have carried out a systematic study to find more efficient γ -encoded radio frequency (RF) pulse sequences based on *R*-symmetries in comparison to the earlier reported symmetry-based sequences to recouple ¹H CSA in the indirect dimension of a 2D ¹H/¹H anisotropic/isotropic chemical shift correlation experiment at ultrafast magic angle spinning (MAS) frequencies. Herein, without any application of ¹H/¹H dipolar decoupling the spectral resolution could be significantly improved in both frequency dimensions of a 2D ¹H/¹H correlation spectrum by the use of ultrahigh MAS rates (up to 70 kHz) which largely removes strong ¹H/¹H dipolar interactions, and at high *B*₀ field strength (16.4 Tesla) used to amplify rather small ¹H CSAs. The existing symmetry-based ¹H CSA recoupling sequences are sensitive to RF field (*B*₁) inhomogeneity, resulting in lineshape distortion, poor signal-to-noise ratio (SNR) due to a

Ultrafast magic angle spinning, ¹H Chemical shift anisotropy, Symmetry-based pulse sequence

○まのじ くまーる ぱんでい、みはる まろにゅ、にしやま ゆうすけ

strong central peak arising from non-oscillating components, and poor resolution and sensitivity. To overcome these difficulties, we have systematically carried out a study to find a set of more efficient symmetry-based CSA recoupling sequences as compared to earlier reported sequences based on R -symmetries through extensive numerical simulations in combination with experiments. We demonstrate that with a reasonable RF field requirement a set of symmetry-based recoupling sequences with a series of phase-alternating composite- 180° (namely 270°_0 - 90°_{180}) pulses are more robust towards B_1 inhomogeneity and show improved ^1H CSA recoupling efficiency and undistorted powder lineshapes in comparison to the earlier reported symmetry-based sequences with a series of phase-alternating 180° pulses at ultrafast MAS condition.

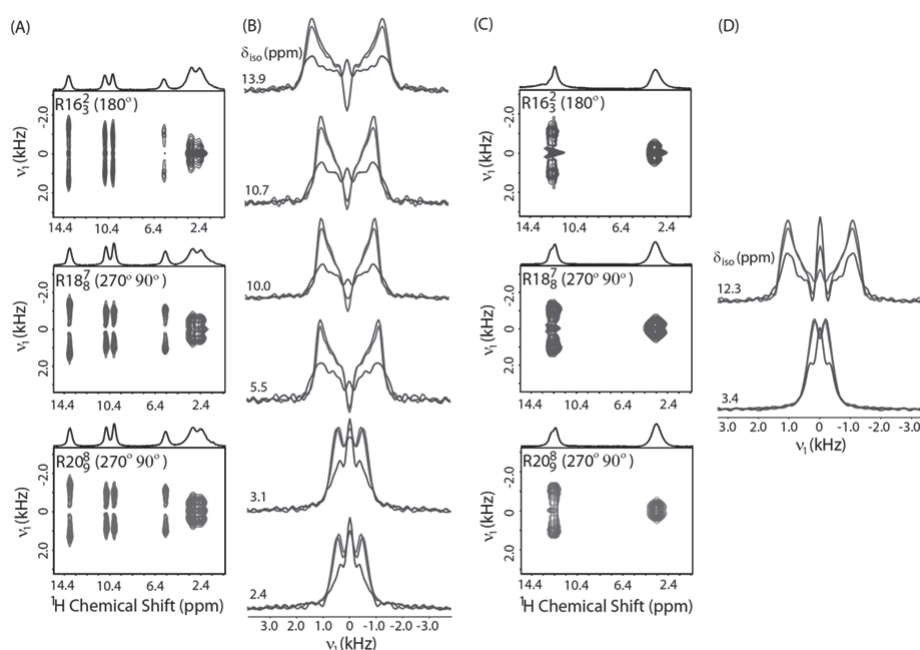


Figure 1: Two dimensional $^1\text{H}/^1\text{H}$ anisotropic/isotropic chemical shift correlation spectra of citric acid (A) and malonic acid (C) at MAS rates 70 kHz and 60 kHz, respectively, recorded using symmetry-based $R16_3^2(180^\circ)$ (blue), $R18_8^7(270^\circ 90^\circ)$ (brown) and $R20_9^8(270^\circ 90^\circ)$ (green) pulse sequences from 700 MHz spectrometer. Recoupled ^1H CSA powder lineshapes obtained from spectral slices parallel to the anisotropic dimension (ν_1) extracted at isotropic ^1H chemical shift values in the direct dimension for citric acid (B) and malonic acid (D).

フーリエ変換に代わる共分散変換の特徴

横浜市立大学 生命医科学研究科

長土居 有隆、池上 貴久

ikegamit@yokohama-cu.ac.jp

はじめに

むかし統計学で分散という語を習った。これの平方根が標準偏差であるが、どちらも受験の時の指標（「偏差値」という語）でしか聞いたり考えたりしたことはなかった。ましてや共分散などという言葉は聞いたこともなかった。一方、会社で電子顕微鏡のソフトウェアを開発している時に、複雑な画像のなかからあるパターンを自動で見つけるための方法の一つとして相関係数をつかった。つい最近まで、まさかこの共分散と相関係数が概念的に同じであり、ほとんど同じ式で表されることには気づかなかった。しかし、これにいったん気づくと、連鎖的にいろいろなことが見え出してきた。公式では飽きるほど見たはずのフーリエ変換とは何か？ 交差ピークと対角ピークの意味は何か？ すると、NMRスペクトルが一次元から二次元に拡張された時のその斬新性に、今になってあらためて驚かされた。共分散法は2004年頃よりNMRスペクトルに適用され始めた^[1]。今ではいろいろな目的に使われているが、当初はフーリエ変換では低いままの間接測定軸の分解能を共分散変換によって直接測定軸の分解能にまで上げることが目的であった。ここでは、その特徴だけでなく問題点についても簡単に紹介したいと思う。

共分散とは

一連の数値の配列が2つ1組ある場合、「各数値からそれが所属する配列の平均値を先に引いておき、その差を同じ位置どうしで掛け合わせて、さらにその平均をとった値」を共分散 (covariance) とよぶ。たとえば、データ配列 $A = \{13, 17, 15\}$ 、データ配列 $B = \{-5, 3, 5\}$ の1組があったとする。前者 A の平均値は15、後者 B の平均値は1である。したがって、偏差をとると A での偏差は $\{-2, 2, 0\}$ 、 B での偏差は $\{-6, 2, 4\}$ となる。それぞれで偏差をすべて足すと0になることを確かめておく ($-2+2+0=0$, $-6+2+4=0$)。これはちょうどデータ

配列が履いていた下駄を脱がせて、グラフで上下に揺れるデータ点を貫く線がちょうど真ん中になるように調整しているようなものである。もし、配列 A, B が下記の話のようにFID (インターフェログラム) であれば、溶媒の大きな t_1 リッジなどのオフセット信号を差し引いて、それぞれのFIDの正負の振幅が全体として同じ量になるように、 A, B それぞれで調整するような感じとなる。次に A と B の同じ位置どうしで二つの数値を掛け合わせる。 $A \circ B = \{-2 \times -6, 2 \times 2, 0 \times 4\} = \{12, 4, 0\}$ ^(注1)。最後にこれの平均をとる $(12+4+0)/3 = 5.333\dots$ 。先ほどのFIDに話を戻すと、もし A, B の上下の振動が似ていると (A が山にあるときは B も山)、両者の掛け算はかなり大きな正の値をとる (したがって、その平均値である共分散値も)。上下の振幅が逆向きでも構わない。その場合 (A が山にある時は B は谷)の掛け算は負の値をとるだろう。したがって、共分散は負のなんらかの値をとる。しかし、 A, B の上下の振動が両者で相関しておらず、ばらばらだとすると、掛け算は正や負のさまざまな値をとり、それらの足し算 (そして、その平均値) は0に近くなる。これが共分散であり、計算量は多いものの四則演算しか使わず、簡単なプログラムを組むだけで後はコンピュータが頑張ってくれ仕事をしてくれる性質のものである。

なお、同じデータ配列 A どうしで上記のような計算をした場合、これは統計学でよく出てくるように「分散variance」とよぶ。後ほど触れるが二次元のデータで分散をとると対角ピークが生じ、共分散をとると交差ピークが生じる。なお、分散は同じ偏差どうしを自乗していることになるので、これの平方根の値の方が感覚的に分かりやすい。単位も二乗のままではないので、感覚的に分かりやすい。そして、この平方根 (Root Mean Square Deviation, RMSD) を標準偏差 (standard deviation, σ) とよぶ^(注2)。NMRの共分散スペクトルにおいても平方根を最終的に計算する^(注3)。共分散を規格化するためにそれぞれの標

準偏差で割ると相関係数となる。したがって、二つのFIDの間で共分散を計算することは、二つのFIDがどれだけ似ているのか、相関しているのかを計算することに近い。ただし、相関係数のように -1 から $+1$ の範囲内の値に落ちるように規格化しているわけではないので、それぞれのデータ配列の振幅の強弱がある程度は反映されることになる。

フーリエ変換との類似性

共分散変換 covariance transformation やフーリエ変換 Fourier transformation の数式はウェブに載っているので、それを参照していただきたい。両者は一見するとお互いに全く異なった式に見えるかもしれないが、よく見てみると、かなり似た性質を帯びていることが分かる。まず、そもそもフーリエ変換を言葉で表すとどのようになるのであろうか？あるNMRの時間軸データがあり、それが核スピンの化学シフトの周波数 ω_i の振動を含んでいたとすると、その時間軸データは $\cos(\omega_i t)$ のような波の式で表される^(注4)。これに模擬データ $\cos(\omega t)$ を掛けて t で積分する。つまり、同じ t の位置の値どうしを掛け合わせるという操作を t が0からFIDの終端まで続け、最後にそれらをすべて足し合わせる。もし、たまたま ω の値が化学シフトの周波数 ω_i と一しょであり位相も同じであると、この掛け算はある正の値をとり、その結果として周波数 ω_i の位置にピークが現れることになる。逆にもし ω の値が ω_i からずれて ω_j であると、この時間軸データ $\cos(\omega_i t)$ と模擬データ $\cos(\omega_j t)$ の山と谷の位置はずれてしまう。この状況で両者を同じ t の位置どうしで掛け合わせていくとどうなるであろうか？山と山、谷と谷が偶然にも重なった場所では掛け算はなんらかの正の値をとるが、山と谷が重なった場所では掛け算は負の値をとる。このような正負が入り混じったデータをすべて足し合わせると0になってしまう、結果として ω_j の位置にはピークは現れない^(注5)。

フーリエ変換ではわざわざ模擬データとして数学的に理想的な式 $\cos(\omega t)$ を作って、それを時間軸データに掛け合わせた。しかし、共分散変換では模擬データの代わりに別の時間軸データを借りてくる。つまり、観測値どうしを掛け合わせる。もし、この模擬データとして借りてくる元を自分自身にすると、つまり分散をとるとどうなるであろうか？この場合、いかに複雑な時間軸データであろうとも、自分自身とは寸分の違いもない。したがっ

て、同じ t の位置で掛け合わせていくと必ず何かしらの0以上の値をとり(t の各々の位置の数値(平均値からの偏差)を自乗することに相当する)、それらの合計値も正の値となる。それでは逆に化学シフト ω_i を含む波 $\cos(\omega_i t)$ を時間軸データに、まったく別の相関のない化学シフト ω_j を含む波 $\cos(\omega_j t)$ を模擬データとしてみよう。ここで模擬データと書いたが実際には、これはどこか別に実測された時間軸データなのである。すると、両者の掛け算では山と山、谷と谷が重なる箇所もあれば、山と谷が重なる箇所もあり、それらを全て足し合わせると合計値は0になってしまうだろう。

このようにフーリエ変換と共分散とは定性的にはよく似ているようである。ただし、共分散を使うには、お互いに掛け合わせるための少なくとも二つのデータ配列が必要になってくる。そこで、まずは多数のデータ配列が連なる二次元の同種核間相関スペクトル homonuclear correlation spectroscopy を例に共分散による変換を見ていきたい(例えば、2D ^1H - ^1H COSY などであるが、簡単のため、COSY シグナルの多重線構造は考慮しない)。

二次元相関データにおける共分散

もし、化学シフト ω_i の ^1H 核と ω_j の ^1H 核とが3結合でつながっていたとする。2D COSYを測定すると、両者は ^3J -カップリングを通して相関を示すはずである。とりあえず、直接測定軸となる t_2 方向に沿って先にフーリエ変換しておく。そして、 ω_2 軸の ω_i の位置で今度は間接測定軸である t_1 方向に沿った時間軸データ(インターフェログラム($s[t_1, \omega_i]$))を眺めてみる(t_1 は t_1 軸上のある一点を指すのではなく、 t_1 軸に沿った配列であることを示す)。この波には少なくとも二つの周波数 ω_i と ω_j が混じっているはずである。もし、ここで t_1 軸方向に沿ってフーリエ変換すると、 ω_1 軸の ω_i と ω_j の位置にピークが出るはずであり、前者は対角ピーク、後者は交差ピークになる。しかし、ここではフーリエ変換はせずに、 ω_2 軸の ω_j の位置での t_1 軸方向に沿ったインターフェログラム($s[t_1, \omega_j]$)を眺めてみる。実は、この波にも周波数 ω_j と ω_i の波が混じっているのである。 ^3J -カップリングはその二つの核のどちらから見ても相手の核に対して同じ値をとる対称的な定数であり、COSYパルス系列では ω_i から ω_j へのコヒーレンス移動($\omega_1 = \omega_i, \omega_2 = \omega_j$)と同時に、そのまた逆向きのコヒーレンス移動($\omega_1 = \omega_j, \omega_2 = \omega_i$)も起こる。さて、このインターフェ

ログラムについても、もし t_1 軸方向に沿ってフーリエ変換してしまうと、 ω_1 軸の ω_j と ω_i の位置にピークが出るはずであり、前者は対角ピーク、後者は交差ピークになる。では、ここで t_1 軸方向に沿ってフーリエ変換せずに共分散を使ってみることにする。同じ t_1 の位置どうしで $s[t_1, \omega_i] \text{os}[t_1, \omega_j]$ と掛け算し、その値をすべて足し込んでいく。この二つのインターフェログラムには、ともに ω_i と ω_j の波が含まれているので、掛け算の平均値はなんらかの値をもつことになる。この値を($\omega_1 = \omega_j, \omega_2 = \omega_i$)と($\omega_1 = \omega_i, \omega_2 = \omega_j$)にプロットする。ついでに、自分自身どうしの掛け算、 $s[t_1, \omega_i] \text{os}[t_1, \omega_i]$ と $s[t_1, \omega_j] \text{os}[t_1, \omega_j]$ の平均値も、それぞれ($\omega_1 = \omega_j, \omega_2 = \omega_i$)と($\omega_1 = \omega_i, \omega_2 = \omega_j$)にプロットする。これでおよその共分散が完成したことになる(図1)。計算は量が多いが非常に単純である。そして、上記より共分散の結果は対称となることが分かる。掛けては足すを繰り返すところは、フーリエ変換と似ている(一般の解析ソフトで使われているfast-Fourier変換(FFT)のアルゴリズムとは異なる)。

共分散データの平方根

t_1 軸方向に沿った時間軸データ(インターフェログラム $s[t_1, \omega_i]$ と $s[t_1, \omega_j]$)には、もしかすると

ω_i と ω_j 以外の他の周波数の波も含まれているかもしれない。もし、第三の周波数 ω_k をもつ波が両者に共通に含まれていると奇妙なことが起こる。例えば、共鳴周波数 ω_i と ω_j をそれぞれもつ二つの核の間は遠く6結合も離れており、その真ん中に ω_k をもつ核があるとする。つまり、 ω_j と ω_k の共鳴周波数をもつ二つの核がお互いに 3J -カップリングで結合しており、同様に ω_i と ω_k の共鳴周波数をもつ二つの核も 3J -カップリングで結合している。すると、普通のCOSYスペクトルでは ω_i と ω_j の間に交差ピークは現れず、交差ピークは ω_i と ω_k の間、さらに ω_j と ω_k の間に出るはずである。ところが、この状況下で共分散をとると、 $s[t_1, \omega_i]$ と $s[t_1, \omega_j]$ はともに周波数 ω_k の波を含んでいるために、 ω_i と ω_j の間に交差ピークが出てしまうのである。つまり、COSYとして測定したはずのスペクトルがTOCSYに変身してしまう(図2)。NOESYにおいては、まるで混合時間を延ばしてspin-diffusionを起こさせたかのようなスペクトルになる。これを役立つ情報ととるか、それとも単に複雑さを増すだけの悪い情報ととるかは状況次第である。この交差の連鎖を防ぐためには、共分散で得たスペクトルを行列とみなし、その平方根をとるとよい。この場合、行列の(ω_i, ω_j)要素の値それぞれについて $\sqrt{\quad}$ (ルート)をとるのではない。これをまじめに計算するには、ス

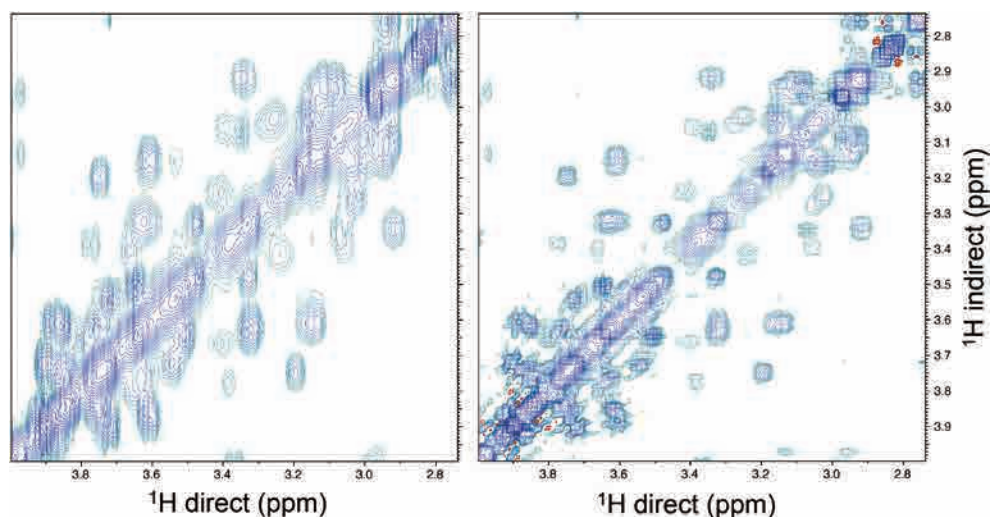


図1 共分散変換による間接測定軸の分解能の向上

(左)は $3,087(\omega_2) \times 200^*(t_1)$ の二次元NOESYにおいて、 t_1 軸をフーリエ変換した時のスペクトル(*はx, y複素ペアの数を表す)。一方、(右)は t_1 軸に沿って共分散をとった。NOESYにおける磁化移動はスピンの双極子-双極子相互作用によるが、これもスカラーJカップリングと同じように二つのスピンの対称的に作用しあう。このような性質のスペクトルに共分散を施すと、対角ピークに対して完全に対称なスペクトルが生じる。特に対角ピークの近くにある交差ピークが解析しやすくなっている。なお、よく二次元スペクトルに使われる「対称化」の操作とは根本的に異なる。対称化では、対称的な位置にあるスペクトルの強度 $I(\omega_j, \omega_i)$ と $I(\omega_i, \omega_j)$ を比べ、たとえば大きい方の値を小さい方の値で置き換え、両者ともに小さい方の値に換えてしまう。

ベクトルそのものを行列とみても、これをまずは対角化する。対角化には本来は固有ベクトルと固有値を得る必要があるが、巨大行列の対角化がそのように簡単に正確に行えるのであれば、さまざまな物理計算がもっと楽になるであろう。次にそれぞれの固有値の平方根をとり、最後に固有ベクトルを使って基底をもとに戻す。幸い、共分散スペクトルは対称行列であるため、行列の平方根を求めるのにCholesky分解が使えなくもない。しかし、難しいところは避けて通りたい筆者は、計算速度は遅いが着実なソフト *Mathematica* を使った^(注6)。

しかし、より簡単に特異値分解 singular value decomposition, SVD を利用する方法もある^[2]。スペクトルを N_1 行 N_2 列の行列 A とみなす。ちょうど二次元スペクトルをそのまま行列に見立てると、 ω_2 周波数軸に沿って N_2 列の数値が並び、 t_1 時間軸に沿って N_1 行のデータが並ぶ。すると、そもそも t_1 時間軸どうして共分散をとるといふことは、 $A^t \cdot A$ を計算することに等しい (A^t は A の転置行列) (また、それぞれの t_1 時間軸に沿って、そのインターフェログラムの平均値は先に引かれているものとする)。ここで $A^t = U \cdot W \cdot V^t$ を満たすような特異値分解をおこなう。ここで W は N_1 行 N_1 列の対角行

列で、成分は A^t の N_1 個の最大特異値である。 U と V は直交行列であるので、 $U^{-1} = U^t$, $V^{-1} = V^t$ である。また、 U の列は $A^t \cdot A$ の固有ベクトルである。すると、もとの $A^t \cdot A = (U \cdot W \cdot V^t) \cdot (V \cdot W \cdot U^t) = U \cdot W^2 \cdot U^t$ となる。ここで $A^t \cdot A$ の平方根を求めることは、 $U \cdot W \cdot U^t$ を計算することに等しくなる。したがって、 A^t の N_1 個の最大特異値を与える特異値分解を計算するだけで、それはほぼ共分散もその後の平方根も同時に行ったことになる。この計算は非常に速く、10万行10万列の4次元データのように、まじめな対角化法ではPCを暴走させたような計算が、特異値分解法では1時間足らずで終わった。

周波数軸データの共分散

このように共分散変換は、二つのデータ配列がどれほど似ているか、つまり相関を持っているかの程度を示す。したがって、FIDやインターフェログラムなどの時間軸データどうしではなく、フーリエ変換したあとの周波数データどうしを共分散にかけてもよい。例えば、直接測定軸、間接測定軸の両方をすでにフーリエ変換した二次元COSYスペクトルに対して共分散をかけてもよい。 $\omega_2 = \omega_1$ で

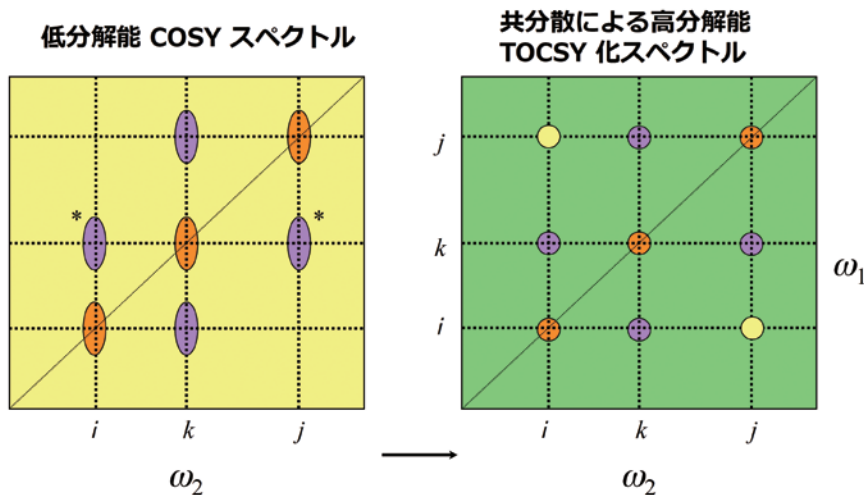


図2 共分散変換によるCOSYスペクトルのTOCSYスペクトル化

本文では、間接測定軸は時間軸 t_1 のままで共分散をとる説明になっているが、この図では後述のようにフーリエ変換後の周波数軸 ω_1 の状態で共分散をとっている。左のCOSYスペクトルでは ω_1 と ω_k の間、さらに ω_j と ω_k の間に交差ピークがでる。 ω_1 と ω_j の間には交差ピークが出ていない。一方、右の共分散スペクトルでは、 ω_1 軸の分解能が ω_2 軸の分解能にまで上がったと同時に、 ω_1 と ω_j の間にも交差ピークが生まれる。これは左のスペクトルで (*) を付した交差ピークが $\omega_1 = \omega_k$ の横軸に沿って共通に存在するためである。実は、目視でCOSYを解析していく場合、交差ピークをもとに i から k へ、そして k から j へと (あるいはその逆方向に) J カップリングを通して繋げていくことで連鎖的に帰属していく。したがって、この場合の共分散は、目で追っていくべき連鎖帰属の跡を交差ピーク形で直接 (右) に表したとも言える。これを防ぐには、このスペクトル全体を行列とみなしてこの平方根をとるとよい。なお、目視の場合、(*) のピークトップが少しでも ω_1 軸方向に沿ってずれていれば、これは連鎖していないと判断できる。ところが、共分散変換では少しでも overlap があると、 ω_1 と ω_j の間に交差ピークを生んでしまう。固体NMRのようにピークが少数の場合には問題ないが、溶液NMRのように多くのピークが密集している場合、これは大きな問題を引き起こす。この解決が共分散変換の今後の大きな課題の一つである。

の ω_1 軸に沿った1次元スペクトルを $p[\underline{\omega}_1, \omega_i]$ とする($\underline{\omega}_1$ は ω_1 軸上のある一点を指すのではなく、 ω_1 軸に沿った配列であることを示す)。同様に $\omega_2 = \omega_j$ での ω_1 に沿ったスペクトルを $p[\underline{\omega}_1, \omega_j]$ とする。ここで間接測定軸 t_1 はすでにフーリエ変換されて周波数 ω_1 軸になっていることに注意したい。この二つのデータ配列の共分散をとるには、同じ ω_1 でのデータどうしを $p[\underline{\omega}_1, \omega_i] \circ p[\underline{\omega}_1, \omega_j]$ のように掛け合わせ、その積をすべての ω_1 で足し合わせる。COSYの場合 $p[\underline{\omega}_1, \omega_i]$ には、 $\omega_1 = \omega_i$ に対角ピークが、 $\omega_1 = \omega_j$ に交差ピークがあるはずである。一方、 $p[\underline{\omega}_1, \omega_j]$ には、 $\omega_1 = \omega_j$ に対角ピークが、 $\omega_1 = \omega_i$ に交差ピークがあるはずである。したがって、両者を掛け合わせると0でない何らかの値をもつことになり、その結果として (ω_i, ω_j) と (ω_j, ω_i) にその同じ値がプロットされることになる。時間軸データどうしの共分散でもそうであるが、 ω_1 軸の点の数は ω_2 軸の点の数に置き換えられてしまう。したがって、 ω_2 軸が直接測定軸のように非常に高分解能であれば、間接測定軸の t_1 軸ないしはそのFT後の ω_1 軸がたとえ低分解能であっても ω_2 軸と同じ分解能にまで引き延ばされることになる。この高分解能化が、compressed sensingなどをはじめとするさまざまな変換法の一つに共分散変換が数えられる最も大きな理由である。

なお、時間軸データどうしの共分散と周波数軸データどうしの共分散とが同じ結果をもたらすかどうかについては興味深い。Parsevalの定理によると数式的には同じ結果となるが、実際にはやや違ってくる。周波数軸データをFTで得るのに、時間軸データに対してwindow関数やゼロフィリングなどの加工を行ったり、FT後のimaginaryデータを消したりする。それらが微妙な違いに関連しているのかもしれない^(註7)。これらの加工のためか、筆者の経験では周波数軸データどうしの共分散の方がアーティファクトが少ないように感じる。実際、途中で切ったような短い時間軸データをwindow関数をかけずにフーリエ変換するとwobbleが生じるが、共分散変換とフーリエ変換が定性的に似ていることを考えると、共分散でも同じことが起こることは容易に想像できる。また、時間軸データどうしを掛け合わせる場合、その二つの位相のずれが同じである限りにおいては共分散値も同じ値であり、位相とは無関係となる(二つの波がずれたとしても、同じ位相分だけずれたのであれば、依然として山と山、谷と谷の位置は同じであるため)。したがって、

時間軸データどうしの共分散 $\Sigma_{t_1}[s[t_1, \omega_i] \times s[t_1, \omega_j]]$ においては基本的には ω_1 軸方向の位相補正は不要となる。この概念は周波数軸データどうしの共分散 $\Sigma_{\omega_1}[p[\underline{\omega}_1, \omega_i] \times p[\underline{\omega}_1, \omega_j]]$ でも同じだと思うが、実際に ω_1 軸を故意に分散波形の状態にして共分散をとると、吸収波形どうしの共分散の時とは異なり、多量のアーティファクトが出た。

4次元データの共分散

感度が許すならば、次元数が多いほどピークどうしの重なりも減り解析がしやすくなる。また、蛋白質などの連鎖帰属において同じ化学シフト値をもつ ^1H 核が複数存在してしまうという状況がよくあるが、その場合その ^1H 核に直接結合した ^{13}C , ^{15}N 核などの化学シフト値も同時に分かれば、複数の可能性から絞り込んで一意的に連鎖帰属が可能になる場合も多い。4次元スペクトルはそのような意味で非常に役立つはずなのであるが、測定時間が長くなり過ぎるという制限からmixing-timeの前の測定軸(ω_H, ω_C)の分解能を低くせざるを得ないという点が人気を抑えてしまっているようである。そこで、共分散を4次元スペクトルに適用し、mixing-timeの前の測定軸の分解能を後の測定軸(ω_C, ω_H)の分解能にまで引き上げることができる。具体的には、 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ から $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ へのNOESYやTOCSYなどが適している。これらの測定法の特徴は、mixing-timeを通したNOEやJカップリングによる磁化移動が双方向であること、そして、分解能を除けば、スペクトルが対角ピークを軸として対称的であることである(shared-evolution法を使えば、この条件には必ずしも縛られない)。実は、この条件は上記の2D $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, NOESYなどでの条件と同じである。大きな違いは、2Dスペクトルにおける一つの次元が、4Dスペクトルにおける二つの次元に対応していることである。たとえば、4D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC-NOESY- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQCについて考えてみる。Mixing-timeの前の ^1H , ^{13}C 測定軸をそれぞれ ω_H^{donor} , ω_C^{donor} と表し、mixing-timeの後の ^{13}C , ^1H 測定軸をそれぞれ $\omega_C^{\text{acceptor}}$, $\omega_H^{\text{acceptor}}$ と表すことにする。このようにして比べてみると、4次元では、ある $(\omega_C^{\text{acceptor}}, \omega_H^{\text{acceptor}})$ に対応する $(\omega_H^{\text{donor}}, \omega_C^{\text{donor}})$ 2次元データ配列と、別の $(\omega_C^{\text{acceptor}}, \omega_H^{\text{acceptor}})$ に対応する $(\omega_H^{\text{donor}}, \omega_C^{\text{donor}})$ 2次元データ配列との間で共分散をとればよいことが分かる。1次元どうしではなく2次元どうしの共分散となる。しかし、この2次元データ配列を一行に並べてしまえば、それは

1次元データ配列に取って代わるので、2Dスペクトルで扱ったのと同じ共分散プログラムが使える。

ここで筆者は4次元データをフーリエ変換した後に共分散をとった。おそらく、ある $(\omega_c^{\text{acceptor}}, \omega_H^{\text{acceptor}})$ に対応する $(t_H^{\text{donor}}, t_C^{\text{donor}})$ 2次元インターフェログラム配列と、別の $(\omega_c^{\text{acceptor}}, \omega_H^{\text{acceptor}})$ に対応する $(t_H^{\text{donor}}, t_C^{\text{donor}})$ 2次元インターフェログラム配列との間で共分散をとることも可能かもしれない(2次元の時間軸データどうしの共分散)。しかし、間接測定軸はTPPI法ではなくTPPI-States法で検出したために t_H^{donor} と t_C^{donor} のそれぞれについてcosとsinに対応するインターフェログラム成分が存在し、両者をどのように組み合わせるとよいのか分からなかった。またデータの数が多くなり過ぎ、コンピュータのメモリー容量を圧迫してしまったので、フーリエ変換し、位相を補正し、分散波形成分を消した後の吸収波形成分どうしで共分散をとった。なお、計算時間を短縮させる方法として、 $(\omega_c^{\text{acceptor}}, \omega_H^{\text{acceptor}})$ のうち何かしらのデータが存在する領域のみで共分散をとってもよい。次元数を4に拡張するとピークどうしの重なりが減るが、同時にピークの存在しないノイズだけのスペクトル空間が広がる。したがって、最初に2D ^1H - ^{13}C HSQCをとっておき、そこでピークの存在する箇所の (ω_C, ω_H) を登録しておく。そして、4次元スペクトルでは登録しておいた $(\omega_c^{\text{acceptor}}, \omega_H^{\text{acceptor}})$ ピークを含むその周辺のみを取り出すと、データ量を大幅に削減できるだけでなく解析も簡単になる。あるいは、ノイズレベル以下の強度を強制的に0に換えてしまうのもよい。データ量は多いが0がほとんどなので、この行列計算を高速化できるだろう。これはちょうど蛋白質の主鎖の解析において、3D HNCACB, CBCACONHなどの3次元スペクトルを2D ^1H - ^{15}N HSQCのピークにもとづいて短冊に切り分け、その短冊を並べ替えながら連鎖的に帰属していく過程と似ている(短冊以外の領域はもう観ずに捨てている)。

実際、このような連鎖帰属を目的とした共分散法も提案されている^[4]。共分散は二つのデータがどれだけ似ているのかを示すので、上記のHNCACBからの短冊上にある $^{13}\text{C}\alpha_i, ^{13}\text{C}\beta_i$ の二つのピークと、CBCACONHからの短冊上にある $^{13}\text{C}\alpha_{i-1}, ^{13}\text{C}\beta_{i-1}$ の二つのピークが目で見ても一致すれば、二つの短冊の (ω_N, ω_H) は隣どうしのアミノ酸に対応することが分かる($j=i+1$)。この「目で見ても一致しているかどうか」を共分散という数値で表すわけである

が、残念ながらもまだ目視の方が優れているように思う。これは共分散はその本質上「少しでも重なりが見られれば何らかの0でない数値を出す」のに対して、目で見ても判断する方法では「ピークの等高線全体の偏りを総合的に判断しながらピークトップの位置を予測し、その残基*i*と*j-1*のピークトップがどれだけ一致しているのかを学習などにもとづいて判断する」ためであろう。経験を有する人の場合、ノイズがたくさん載ってピークがほとんど埋もれていたり、複数のピークが重なりあってピークトップがずれているような場合でも問題なく隠れたピークトップが一致しているかどうかをしばしば的中させることができる。しかし、何らかの工夫を加えていない単純な共分散法だけではそれは難しい^[4]。

間接的な共分散

直接測定軸が N_2 、間接測定軸が N_1 の二次元スペクトル($N_2 > N_1$)において、直接測定軸どうしで共分散をとってもかまわない。その場合は、両軸が N_1 の分解能が落ちたスペクトルが得られる。これは一見なんの得にもならないかのように思われるが、軽水の信号を消すのに使うこともできる。二次元NOESYスペクトルなどではプロセスの際に水消しの処理を行うと、水のピークを中心として左右いくぶんかの領域のデータが縦の帯状に間接測定軸に沿って消えてしまう。しかし、対称形スペクトルでは水ピークの上のデータは実は直接測定軸に沿って残っているのである($\omega_1 = 4.7$ ppm付近の ω_2 軸に沿って並んでいるピーク)。したがって、直接測定軸どうしで共分散をとると、スペクトルの中心部分を除いて幾らか復活させることができる。

また、分解能の向上を目指すのであれば、スペクトルは対角ピークをもった対称形である必要はない。その一例として2D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSYに施した共分散の例を図3に示す。このスペクトルの ^1H 直接測定軸どうしで共分散をとる^[5]。実際にTOCSY効果により磁化コヒーレンスが移動しているのは ^1H 核スピンどうしの*J*カップリングを通してである。したがって、 ^{13}C 核をスピンロックし ^{13}C 核を直接測定した時のスペクトルとはすこし異なる(4級炭素はこの共分散法では観えない)。しかし、まるで2D ^{13}C - ^{13}C TOCSYのようなスペクトルがこの間接的な共分散によって得ることができる。もし、このスペクトルを実際に ^{13}C を直接測定して得ようとしても、それは非常に感度が悪いはずであり、 ^{13}C がnatural-abundanceであれば、 ^{13}C どうし

のTOCSYはほぼ絶望的であろう。このようなスペクトルが感度のよい ^1H の直接測定から、しかも ^{13}C -natural abundanceで得られたら非常に嬉しい。しかし、**図4**に示すように、 ^1H 化学シフトとしてのピークトップは目で見ても明らかにずれているが、ピークの裾野付近はオーバーラップしているような状況では、やはりアーティファクトが出てしまう。

このようなアーティファクトをいかにして消すか、あるいは見つけるかの努力が近年なされている。一つは微分したスペクトルどうして共分散をとる方法である^[4]。差分をとる時の幅をうまく調整してやると、いくぶんアーティファクトを減らすことができ

るだろう。あるいは、事前に2D ^1H - ^{13}C HSQCだけを測定して、この ^1H 軸どうしの共分散を同じ様式で計算しておくという方法もある。この2D ^1H - ^{13}C HSQCの共分散スペクトルには理想的には交差ピークは出ないはずである。しかし、もし存在すれば、それはそれぞれの ^1H 核スピンの化学シフトが近い値でオーバーラップしているためであり、2D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSYの共分散スペクトルでどの交差ピークがアーティファクトであるのかを知ることができ^[6]。

この間接的な共分散は、一つのスペクトルに対して適用するだけでなく、二つのスペクトルに適用

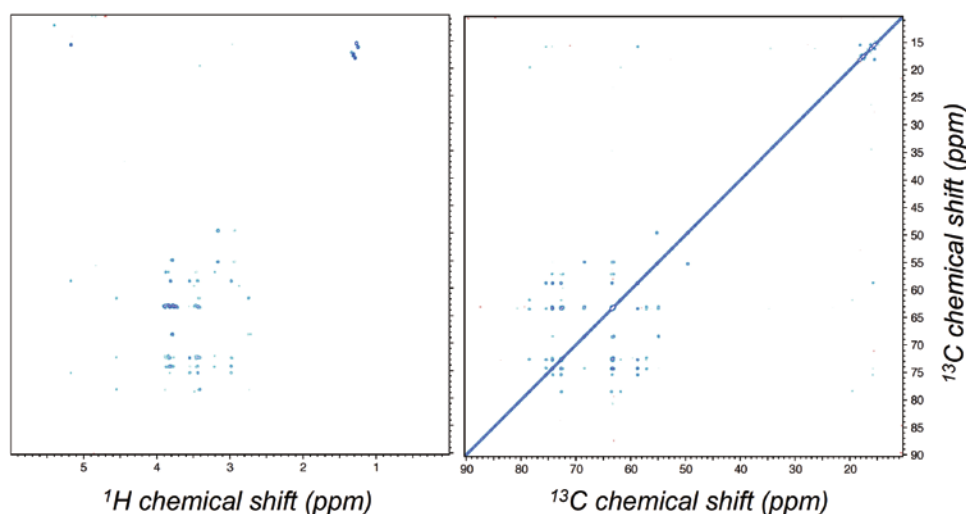


図3 (左) 2D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY スペクトルの間接的共分散。前半の ^1H - ^{13}C HSQCパルス系列で ^{13}C 核スピンの化学シフトを展開させた後、化学結合した ^1H 核スピンの磁化のコヒーレンスを戻し、そして ^1H の同種核スピンロックをかける。(右) 直接測定軸である ^1H 次元どうして共分散をかけた。高分解能である ^1H 次元が消える代わりに2D ^{13}C - ^{13}C TOCSYのようなスペクトルが生まれた。

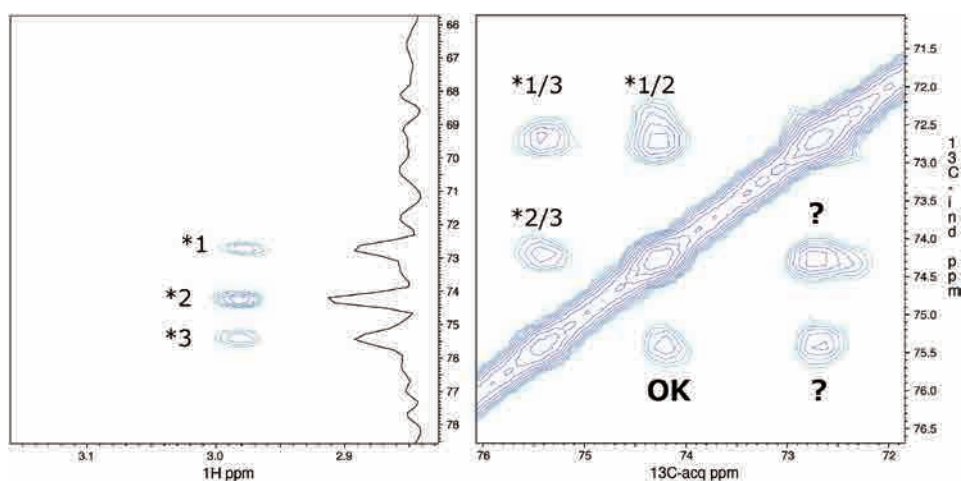


図4 共分散交換でもっとも大きな問題点である偽ピーク。ピーク(*2, *3)は ^1H の化学シフト値が同じであるため、共分散により交差ピーク(*2/3, *3/2)として現れる。しかし、ピーク(*1)は、 ^1H の化学シフト値が*2, *3とは少しずれており、本来*1/3, *1/2の交差ピークは出てもらっては困る。しかし、右の共分散スペクトルでは大きな交差ピークとして現れている。これは共分散の本質である「少しでも重なりが見られれば何らかの0でない数値を出す」から来るアーティファクトである。

してもよい。例えば、2D ^1H - ^{13}C HSQCと2D ^1H - ^1H TOCSYから ^1H 軸どうしの間接的共分散によって2D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSYを作ることができる^[7]。ここでも、2D ^1H - ^{13}C HSQCだけの共分散スペクトルを用意しておく、その交差ピークはアーティファクトであるので、共分散2D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSYにおいてアーティファクトを見つけるのに役立つ。また、代謝産物などの異なる試料の1D測定スペクトルどうしで共分散をとっても構わない。複数のリガンドをそれぞれ蛋白質に加えた際の化学シフト摂動において、どれとどのリガンドによる摂動どうしに相関があるのかを知るのに利用してもよい(これはむしろ主成分解析という名でも知られている)^[8]。

面白い利用例

まったく目的の異なる、しかし興味深い利用例もある。フーリエ変換スペクトルには嘘の交差ピークがでることはないが、間接測定軸の分解能が低い。一方、共分散スペクトルにはアーティファクトの交差ピークが出るが、間接測定軸の分解能は直接測定軸の分解能にまで高まっている。掛け算ではどちらかが0であるとその積も0になるので、二つのスペクトルを同じ位置どうしで掛け合わせると、両者の欠点を補い合うことができるだろう。この方法は2D TOCSYのような対称的なスペクトルにしか適用できないが、普通にフーリエ変換したスペクトルと共分散で処理したスペクトルどうしを単純に掛け合わせると、感度を上げることもできる^[9]。もし、二つのスペクトルでノイズも同じ挙動を示すのであれば、その積は $(S/N)^2$ の信号S対ノイズN比をもつことになり、得にはならない。しかし、ノイズの出方が両スペクトルで異なれば積スペクトルは大きなS/N比を得ることになる。共分散スペクトルでは二つの実測データを掛け合わせて、それを積分するのに対して、フーリエ変換ではひとつの実測データに $\exp(i\omega t)$ を掛け合わせて、それを積分する。このように掛け合わせる対象が異なるため、両スペクトルの間にはノイズにおける相関がない。

さいごに

共分散法はフーリエ変換に代わるかもしれない非常に強力な変換方法ではあるが、まだ期待ほどに浸透しているようには思われない。筆者は当初は蛋白質の4次元スペクトルの分解能を上げたく、この共分散法をいろいろと試してみた。しかしながら、偽ピークに悩まされ、結局はオリジナルのフーリエ

変換スペクトルと見比べながら解析に使うといった段階にとどまっている。この共分散法を通して「正確だが分解能が悪いスペクトル」と「正確さには少し欠けるが分解能の高いスペクトル」のどちらを選ぶべきかという問題について深く考えさせられた。これは何を解析の対象とするかにも依るだろう。さらに、デジタル画像処理という分野において、画像認識がどうして人間の頭脳を超えることが難しいのか(指紋認識など、ある特定のパターンに限っては秀でてはいるが)についても深く考えさせられた。もし、これができるのであれば、現在の蛋白質の連鎖帰属が自動化ソフトで失敗することはまずないはずである。このように共分散法の問題点は今や明らかになったので、今後はこの短所を克服するようなアイデアを考え出すと同時に、むしろ長所を強みとして活かせるような分野に活用していくことが重要であると思われた。

この共分散法は、現在、竹腰研究室の武田和行先生を中心に精力的に開発されています。すこし入手が難しいですが、武田先生の非常に詳しい総説を紹介しておきたいと思います^[10,11]。さいごに、ここに記載した基礎的実験の多くを試してくれた海江田修至博士、FDM法と比較検討してくれた横川大輔先生にお礼申し上げます。

- (注1) データ配列AとBとで同じ位置どうしを掛け合わせて合計するには、Aを行ベクトル、Bを列ベクトルにして内積をとればよい。したがって、A, Bそれぞれが二次元データである場合には $(t_1$ か t_2 のどちらどうしで共分散をとるかをよく考えた上で)一方の二次元データ行列を転置し $(t_1$ と t_2 を入れ替えて)両者の内積をとればよい。
- (注2) この場合のdeviationとは平均値からどの程度ずれているのかの偏差を意味する。平均値を50にずらし標準偏差を10倍に拡大した値が受験で使われる偏差値である。したがって、偏差値40とは、受験者全員の平均よりも 1σ 成績が悪いことを意味する。また、二乗を意味するsquareは、分散varianceでは文字どおりの自乗でよいが、共分散covarianceでは異なるデータどうしで掛け合わせると解釈するとよい。
- (注3) 多次元データの共分散プロセスでは、後で示すようにこの平方根の計算がもっとも厄介である。行列の平方根に代わる方法として特異値分解があるので^[2]、これと転置、内積のツールが含まれたような数値計算ソフトをつかうとプログラミングが楽である。
- (注4) ここで時間軸データと模擬データの両方を $\cos(\omega_i t)$ と表現した。しかし、quadrature detectionでは時間軸データを $\exp(i\omega_i t)$ と表した方がよい。そして、模擬データとしてこの複素共役である $\exp(-i\omega_i t)$ を掛けた時に、周波数 ω_i の位置にピークが現れる。この場合、渦巻き状にねじれている時間軸データを模擬データによって逆向きに巻き戻すというイメージになるのかもしれない。

- (注5) 時間軸データが短く、かつ ω_i と ω_j が近い値どうしの状況にあると、正負の値の分布に偏りが生じ、合計値は完全には0にはならない。これが線幅やwiggleを生み出す。
- (注6) 数式処理ではなく数値計算だけに限るならば、無料で優秀なソフトは存在する(*Octave*, *Scilab*など)^[3]。なお、行列の数値計算で優秀な*Matlab*は*Mathematica*, *Maple*などとともに有料である。大きな大学ではキャンパスライセンスを敷いているところが多い。また、無料で数式が処理できるソフトとして*Sage*, *Maxima*などがあるが、筆者が行列を指数とする数式処理(NMRのシミュレーションでは必須)を試した限りにおいては、両者の結果は芳しくなかった。また、*Fortran*などには各種の高速な数値計算ライブラリが存在するので、それをビルドして独自に最適化するのもよいだろう。
- (注7) TPPI-Statesなどの方法により、間接測定軸 t_1 の \cos 実数成分と \sin 虚数成分を別々に観測している場合、 \cos 成分どうしと \sin 成分どうしで別々に共分散にかけ、後でその結果を足し合わせるとよい。これは、先に \cos 成分と \sin 成分を組み合わせて複素数のデータにしてから、複素共役どうしで共分散をとり実数成分だけをとる方法に置き換えられる。

参考文献

- [1] Snyder, D. A., and Brüschweiler, R. (2007) Multidimensional Correlation Spectroscopy by Covariance NMR, in *eMagRes*. John Wiley & Sons, Ltd.
- [2] Trbovic, N., Smirnov, S., Zhang, F., and Brüschweiler, R. (2004) Covariance NMR spectroscopy by singular value decomposition. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* 171, 277–283.
- [3] Short, T., Alzapiedi, L., Brüschweiler, R., and Snyder, D. (2011) A Covariance NMR Toolbox for MATLAB and OCTAVE. *J. Magn. Reson.* 209, 75–78.
- [4] Harden, B. J., Nichols, S. R., and Frueh, D. P. (2014) Facilitated assignment of large protein NMR signals with covariance sequential spectra using spectral derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 13106–13109.
- [5] Zhang, F., and Brüschweiler, R. (2004) Indirect covariance NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 13180–13181.
- [6] Martin, G. E., Hilton, B. D., Blinov, K. A., and Williams, A. J. (2008) Using indirect covariance spectra to identify artifact responses in unsymmetrical indirect covariance calculated spectra. *Magn. Reson. Chem. MRC* 46, 138–143.
- [7] Snyder, D. A., and Brüschweiler, R. (2009) Generalized indirect covariance NMR formalism for establishment of multidimensional spin correlations. *J. Phys. Chem. A* 113, 12898–12903.
- [8] Selvaratnam, R., Chowdhury, S., VanSchouwen, B., and Melacini, G. (2011) Mapping allostery through the covariance analysis of NMR chemical shifts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 6133–6138.
- [9] Kaiser, C., Lopez, J. J., Bermel, W., and Glaubitz, C. (2007) Dual transformation of homonuclear solid-state NMR spectra—an option to decrease measuring time. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 3107–3115.
- [10] Takeda, K. (2015) Chapter Two - Solid-State Covariance NMR Spectroscopy, in *Annual Reports on NMR Spectroscopy* (Webb, G. A., Ed.) 84, pp 77–113. Academic Press.
- [11] 武田和行. (2013) 共分散データ処理を用いた二次元 NMR. 分光研究 *J. Spectrosc. Res. Jpn.* 62, 177–178.



長土居 有隆 (ながどい・ありたか)

1999年3月 横浜市立大学大学院 総合理学研究科 理学博士 取得
 1998年4月 日本学術振興会 特別研究員
 2001年4月 横浜市立大学大学院 総合理学研究科 助手
 2013年4月 同大学院 生命医科学研究科 助教 現在に至る



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
 2012年4月 京都大学 エネルギー理工学研究所 客員准教授
 2014年4月 横浜市立大学 生命医科学研究科 教授 現在に至る

固体NMRによる 生体分子立体構造解析の最近の展開

横浜国立大学 大学院工学研究院

川村 出

izuruk@ynu.ac.jp

1. はじめに

固体NMR分光法は細胞膜中に存在する膜タンパク質やアミロイド線維タンパク質をはじめとする生体分子の構造解析に有効である。図1にはProtein Data Bank (PDB) のサイトで“solid-state NMR”をキーワードに検索し、固体NMRによって構造決定された生体分子のPDB登録数の推移を示した。2015年8月28日現在で78件あり、膜タンパク質などの難解な生体分子の立体構造解析に対して固体NMR法が大きく寄与していることを物語っている。

固体NMRの構造決定法として、配向試料において細胞膜中のペプチドの配向に依存して変化する ^1H - ^{15}N 磁気双極子相互作用と ^{15}N 化学シフト異方性を相関させるPISEMA^[1]や配向に依存したカルボニル炭素の ^{13}C 化学シフト相互作用をアミノ酸残基ごとに観測することで、ヘリックスの傾き角やヘリックスのピッチを決定することができる方法(^{13}C 化学シフトオシレーション)^[2]など、ペプチド主鎖の異方性を積極的に取り扱う方法と、マジック角回転(MAS)法によって得られる等方化学シフトを利用した方法、もしくはこれらを組み合わせた方法がとられることもある。ここ5年の間にPDBに登録

された内容を見ると、DMPC膜中の7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体CXCR1^[3]、オートトランスポータYadA(微結晶試料)^[4]、光受容膜タンパク質アナベナセンサリーロードプシンASR(DMPC/DMPA細胞膜)^[5]、病原菌細菌のIII型分泌システムに存在するニードルタイプのタンパク質フィラメント^[6]、 $\text{A}\beta$ (1-42)のアミロイド線維構造^[7]、 $\text{A}\beta$ のIowa変異体^[8]やOsaka変異体^[9]の線維構造、RNAの構造^[10]などもMAS法が利用されている。本稿では筆者が経験した多次元MAS法によるアナベナセンサリーロードプシンの立体構造解析の例をもとに、膜タンパク質構造解析のアプローチについて紹介したい。

2. MAS法による構造決定の流れ

^1H 同士の磁気双極子相互作用が強いために、通常 ^1H を観測核として使用することが難しいため、構造解析には ^{13}C および ^{15}N 安定同位体標識した試料を大量に発現する必要がある。脂質二重膜環境中で運動が制限された膜タンパク質の固体NMR解析において、スペクトルの分解能と感度は化学シフト異方性や同種核および異種核の磁気双極子相互

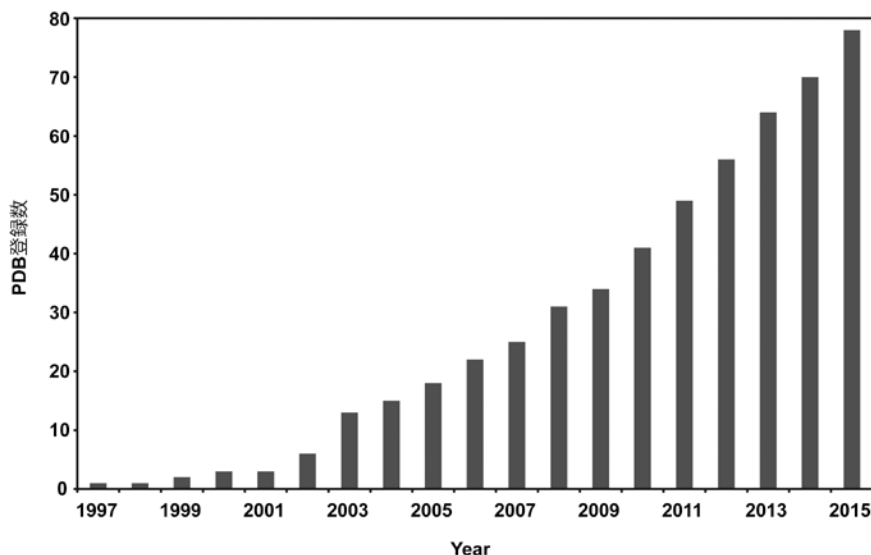


図1 固体NMR法によって決定された生体分子構造データのPDB登録数の推移

作用からの影響を強く受ける。そのため、CP-MAS法を基盤とした多次元NMR測定が必要であると同時に、アミノ酸配列情報を基にした連鎖帰属や核間の距離情報を得るためのリカップリング技術が必要である。なかでも Proton-driven spin diffusion (PDS) は構造解析に必要な ^{13}C - ^{13}C 相関を取るために最も基本的で使いやすい手法である^[11, 12]。2002年にH. Oschkinatらが、微結晶化したタンパク質(スペクトリンのSH3ドメイン)についてMAS法による構造決定をはじめて達成した際にも活躍した^[13]。このときの重要な点は、1,3- ^{13}C Glycerol または2- ^{13}C Glycerolを利用することで、疎らに ^{13}C 標識させたタンパク質試料を調製することで、分解能を上げるとともに、主に直接結合している ^{13}C - ^{13}C の強い磁気双極子相互作用によって生じるdipolar truncationの効果を除くことで、 ^{13}C - ^{13}C 間の磁化移動を妨げず、長距離の相関ピークの減少を防いだ。一方で、混合期にMAS周波数と同じ振幅のパワーを与えるDipolar-assisted rotational resonance (DARR)法は、たとえ均一 ^{13}C 標識試料であっても、dipolar truncationの影響を避けて ^{13}C - ^{13}C 相関を取ることができるため、多次元固体NMRによる実験に大きく寄与した手法である^[14]。さて、このようにして得られた ^{13}C - ^{13}C 相関スペクトル(5-70 ppm)にはアミノ酸残基特有の相関パターンが含まれているため、アミノ酸残基の指紋領域とも呼ばれる。3次元NMRを用いてタンパク質主鎖に沿った連鎖帰属を行うため、タンパク質を構

成する各残基の ^{13}C - ^{13}C 相関ピークの線幅が狭く分離が良いスペクトルが望まれる。この分解能が悪いと、帰属が著しく難しくなってくる。図2には、細胞膜中において立体構造を決定することができたアナバナセンサリーロドプシンASRの相関スペクトルを示すが、229アミノ酸残基からの信号としては良く分離しているのがわかる^[15]。これは800 MHzの分光計と3.2 mmのEfreeプローブを用い、タンパク質としておよそ11 mgをMASローターにパッキングして、温度5°CとMAS 14.3 kHzの条件で得られたスペクトルであり、主な交差ピークの線幅は0.5 ppmで、S/Nも良い。構造の分布があると線幅を広げることになるので、より均一性の高い試料を調製することも大事である。

つづいて、タンパク質主鎖のアミノ酸残基を結ぶように、3次元NCACX、NCOCX、CONCA実験を行う。この際に注意する点として、磁化移動の効率である。例えば、CONCAの場合は、交差分極で ^1H から ^{13}C に移した磁化をカルボニル炭素(C')からアミド窒素、アミド窒素からアルファ炭素(C α)へ2つのSPECIFIC CPを用いて移すために、この間に強度が減少する。うまく設定することができていても ^1H から ^{13}C への交差分極によって生まれる初期磁化に対して、10%ぐらいの強度になっていることが多い。そのため、すべての測定を完了するのに長い時間がかかるため、それに耐えうる熱安定性の高い試料の選択や動的核分極DNPなどによる感度向上の手法を組み合わせる必要があるだろう。このようにして得られた残基間相関を利用して、アミノ酸配列上の何番目のアミノ酸残基に当てはまるかを明らかにすることができる。C α やカルボニル炭素の等方化学シフトはタンパク質の二次構造と良く相関しており^[16]、その化学シフト情報からTALOS+^[17]を用いることで主鎖の二面角(ϕ と ψ)を見積もることができる。 ^{13}C および ^{15}N 均一標識試料の場合の核間距離はCCのスピンドiffusion法で得ることが多いが、複雑なスピンのために距離精度はそこまで良くないため、なるべく多くのペアで核間距離を取得することも必要である。ASRの場合、186の ϕ と ψ ペアと短距離から長距離まで2,000個近い核間距離情報を制限条件として、構造計算を行い、主鎖のRMSDが良く一致するいくつかの構造アンサンブルとして立体構造を示すことができる。ASRに関してはその後の解析で、三量体を作っていることが明らかとなり、常磁性緩和などを利用することによって、分子間の距離制限を得ることで、ユニークな三

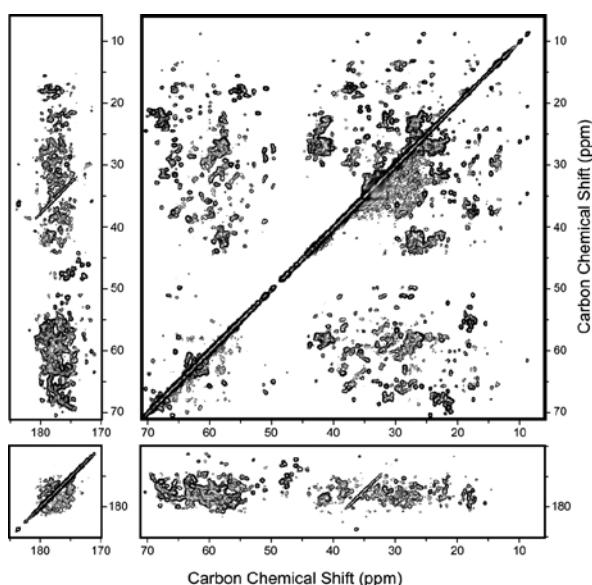


図2 均一 ^{13}C 、 ^{15}N 標識ASRの ^{13}C - ^{13}C DARRスペクトル^[15]

800 MHz NMR分光器、MAS 14.3 kHz、プローブ設定温度5°C

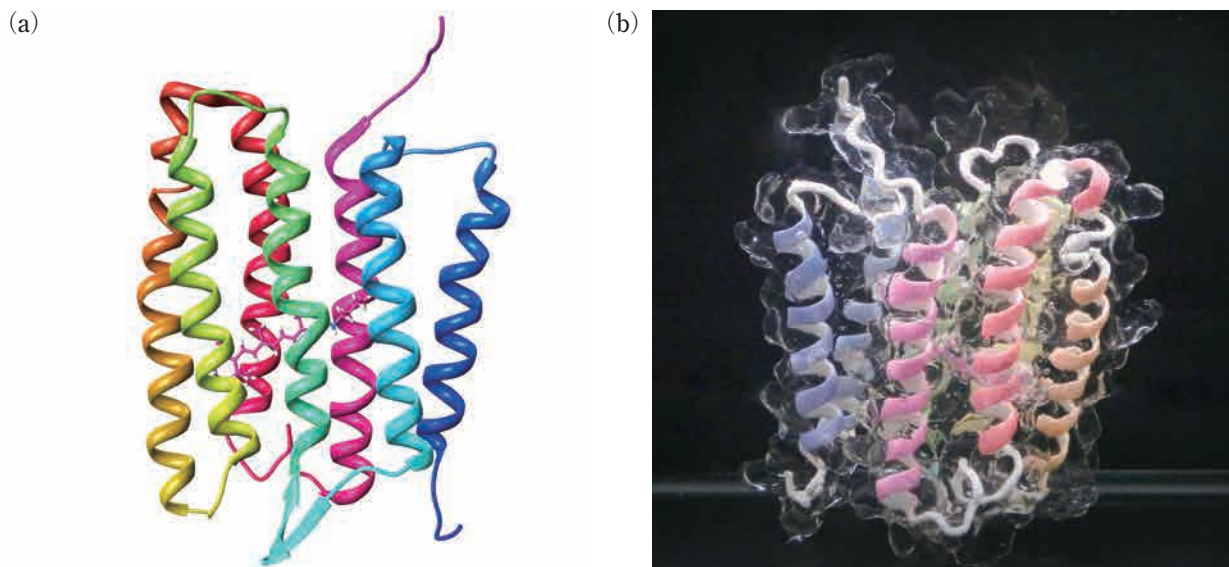


図3 (a) アナバセンサリーロドプシンASRの7回膜貫通型の立体構造 (PDB 2M3G)。(b) ASRの原子座標をもとに3Dプリンタで作成した2,200万倍構造モデル

量体構造の決定に至った^[5, 18]。この例だけでなく、複数のサブユニットが関与した四次構造を解明したデータも多い^[4, 6]。最後に図3(a)には固体NMRによって決定したASRの立体構造を示す。余談であるが、立体構造の決定によって数十nmサイズの分子の原子座標を手に入れることになる。これをもとに3Dプリンタによって2,200万倍の構造模型を作り上げることができ、より直感的にタンパク質構造の理解を助ける(図3(b))。

3. おわりに

固体NMR分光法によって膜タンパク質やアミロイド線維など難解とされてきた立体構造が解明され、構造生物学に大きな寄与を果たしている。前述したように構造決定の最初のポイントは¹³C-¹³C相関の分解能である。PDBには登録されていないが、良いスペクトルは多く報告されており、このようなデータの化学シフト値がBiological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB)にも登録されていることから、細胞膜環境中のタンパク質や線維化タンパク質など生理条件に近い条件で、立体構造決定が間近な生体分子もあるようだ。ここまで立体構造決定について述べてきたが、当然のことながら、構造決定が全てではなく、活性構造を理解して初めて構造と機能が結びつけられる。タンパク質の活性化に至る局所的な構造変化の情報を得るだけでも分子機構を理解することができる場合がある。我々の研究室では、ロドプシタンパク質を中心に、In-situ光照射固体NMR^[19~22]やMAS回転による圧力効果^[23]などを利用し、その反応中心であ

るレチナールの異性化反応に伴うタンパク質の構造変化を観測し、その分子機構に迫っている。このように、今後も固体NMR分光法を用いた生体分子の構造と機能の相関に関する研究は発展していくことが期待される。

最後に、多次元固体NMRによるアナバセンサリーロドプシンの構造決定の研究機会を与えていただいたグェルフ大学のV. Ladizhansky教授とL.S. Brown教授、その研究に導いていただいた横浜国立大学の内藤晶教授に感謝申し上げたい。

参考文献

- [1] Opella, S. (2015) Solid-state NMR and membrane proteins. *J. Magn. Reson.* **253**, 129-137
- [2] Naito, A. (2009) Structure elucidation of membrane-associated peptides and proteins in oriented bilayers by solid-state NMR spectroscopy. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **36**, 67-76.
- [3] Park, S.H., Das, B.B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H.J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A.A., Marassi, F. M. and Opella, S.J. (2012) Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* **491**, 779-783.
- [4] Shahid, S.A., Bradioux, B., Franks, W.T., Krabben, L., Habeck, M., van Rossum, B.J. and Linke, D. (2012) Membrane-protein structure determination by solid-state NMR spectroscopy of microcrystals. *Nat. Methods* **9**, 1212-1217.
- [5] Wang, S., Munro, R.A., Shi, L., Kawamura, I., Okitsu, T., Wada, A., Kim, S.Y., Jung, K.H., Brown, L.S. and Ladizhansky, V. (2013) Solid-state NMR spectroscopy structure determination of a lipid-embedded heptahelical membrane protein. *Nat. Methods* **10**, 1007-1012.
- [6] Loquet, A., Sgourakis, N.G., Gupta, R., Giller, K., Riedel, D., Goosmann, C., Griesinger, C., Kolbe, M., Baker, D., Becker, S. and Lange, A. (2012) Atomic model of the type III secretion system needle. *Na-*

- ture **486**, 276-279.
- [7] Xiao, Y., Ma, B., McElheny, D., Parthasarathy, S., Long, F., Hoshi, M., Nussinov, R. and Ishii, Y. (2015) A β (1-42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 499-505.
- [8] Sgourakis, N.G., Yau, W.M. and Qiang, W. (2015) Modeling an in-register, parallel "Iowa" A β fibril structure using solid-state NMR data from labeled samples with rosetta. *Structure* **23**, 216-227.
- [9] Schutz, A.K., Vagt, T., Huber, M., Ovchinnikova, O.Y., Cadalbert, R., Wall, J., Guntert, P., Bockmann, A., Glockshuber, R. and Meier, B.H. (2015) Atomic-resolution three-dimensional structure of amyloid b fibrils bearing the Osaka mutation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 331-335.
- [10] Marchanka, A., Simon, B., Althoff-Ospelt, G. and Carlomagno, T. (2015) RNA structure determination by solid-state NMR spectroscopy. *Nat. Comm.* **6**, 7024.
- [11] Suter, D. and Ernst, R.R. (1985) Spin diffusion in resolved solid-state NMR spectra. *Phys. Rev.* **32**, 5608-5627.
- [12] Grommek, A., Meier, B.H. and Ernst, M. (2006) Distance information from proton-driven spin diffusion under MAS. *Chem. Phys. Lett.* **427**, 404-409.
- [13] Castellani, F., van Rossum, B., Diehl, A., Shubert, M., Rehbein, K. and Oschkinat, H. (2002) Structure of a protein determination by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Nature* **420**, 98-102.
- [14] Takegoshi, K., Nakamura, S. and Terao, T. (2001) ^{13}C - ^1H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chem. Phys. Lett.* **344**, 631-637.
- [15] Shi, L., Kawamura, I., Jung, K.H., Brown, L.S. and Ladizhansky, L. (2011) Conformation of a seven-helical transmembrane photosensor in the lipid environment. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 1302-1305.
- [16] Saito, H. (1986) Conformation-dependent ^{13}C chemical shifts: A new means of conformation characterization as obtained by high-resolution solid-state ^{13}C NMR. *Magn. Reson. Chem.* **24**, 853-852.
- [17] 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**, 213-223.
- [18] Wang, S., Munro, R.A., Kim, S.Y., Jung, K.H., Brown, L.S. and Ladizhansky, V. (2012) Paramagnetic relaxation enhancement reveals oligomerization interface of a membrane protein. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 16995-16998.
- [19] Kawamura, I., Kihara, N., Ohmine, M., Nishimura, K., Tuzi, S., Saito, H. and Naito, A. (2007) Solid-state NMR studies of two backbone conformations at Tyr185 as a function of retinal configurations in the dark, light, and pressure adapted bacteriorhodopsins. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1016-1017.
- [20] Tomonaga, Y., Hidaka, T., Kawamura, I., Nishio, T., Ohsawa, K., Okitsu, T., Wada, A., Sudo, Y., Kamo, N., Ramamoorthy, A. and Naito, A. (2011) An active photoreceptor intermediate revealed by in situ photoirradiated solid-state NMR spectroscopy. *Biophys. J.* **101**, L50-L52.
- [21] Yomoda, H., Makino, Y., Tomonaga, Y., Hidaka, T., Kawamura, I., Okitsu, T., Wada, A., Sudo, Y. and Naito, A. (2014) Color-discriminating retinal configurations of sensory rhodopsin I by photo-irradiation solid-state NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 6960-6964.
- [22] Oshima, K., Shigeta, A., Makino, Y., Kawamura, I., Okitsu, T., Wada, A., Tuzi, S., Iwasa, T. and Naito, A. (2015) Characterization of photo-intermediates in the photo-reaction pathways of a bacteriorhodopsin Y185F mutant using in situ photo-irradiation solid-state NMR spectroscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 1694-1702.
- [23] Kawamura, I., Yamaguchi, S., Nishikawa, H., Tajima, K., Horigome, M., Tuzi, S., Saito, H. and Naito, A. (2012) Change in local dynamics of bacteriorhodopsin with retinal isomerization under pressure as studied by fast magic angle spinning NMR. *Polymer J.* **44**, 863-867.



川村 出 (かわむら・いずる)

2007年3月 横浜国立大学 大学院工学府 修士 博士 (工学)

2007年4月 横浜国立大学 大学院工学研究院 研究教員

2009年9月 University of Guelph, Visiting Scientist

2012年1月 横浜国立大学 大学院工学研究院 助教

2013年4月 横浜国立大学 大学院工学研究院 准教授 現在に至る

[専門] 構造生物化学

NMRの呼称について

京都大学

寺尾 武彦

terao@beige.plala.or.jp

初めて“核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance)”という術語が論文に現れたのは、Gorterの1942年の失敗実験の論文だった^[1]。Gorterは、分子線共鳴を実現させたRabiの造語だ、と論文に記している。しかし、Rabiらの論文には“磁気共鳴 (magnetic resonance)”は現れるものの上記術語は見当たらず、どこで使用したかは不明である。

凝縮系のNMRが成功してからも直ちに“核磁気共鳴”が使われたわけではなかった。それを成功させたPurcellら^[2]およびBlochら^[3]は、それぞれ彼らが発見した現象・方法を“核磁気能率による共鳴吸収 (resonance absorption by nuclear magnetic moments)”^[4]および“核誘導 (nuclear induction)”と呼んだ。これらのネーミングには二人の発想の違いが色濃く反映されている。Purcellは、軍事研究で開発していたレーダーの波長をどんどん短くしていったK-バンドに達したとき、感度と到達距離が日によって変化することを観測した。空気中の水分子の回転エネルギー準位間の一つの遷移がK-バンド内で吸収を起し、それが信号を弱めたのだ。Purcellは、このことから2準位系における遷移の問題を突き詰めて考えた。そのアウトプットの一つがNMRであった。したがって、ゼーマンエネルギー準位間でのrf電力の吸収により共鳴を検出するのはPurcellにとって必然であった。一方、Blochは、磁気共鳴の本質は核磁化の向きを変えることにあるという猫像をもっていた。軍事研究を通して電子回路を学んだBlochは、静磁場方向に沿っていた熱平行核磁化をrf照射で向きを変えて横磁化を作り、その運動が試料を囲むコイルに発生させる誘導起電力を測定することによって共鳴を検出したのだ。Blochは電磁誘導による検出が彼らの発見の最も際立った特徴と考え、この方法に対し、核誘導という名前を選んだ。磁気共鳴はRabiらが行ったことだからというのがBlochの考えだった。

Purcell、Bloch両研究室に属さない初期の研究者には、彼らの付けた名称を使う人もいれば、“核

磁気共鳴”を使う人もいた。多分、この3通りの名称以外にも使われたものがあっただろう。試みに、誰かが思い付きそうな名前“nuclear spin resonance”で文献データベースを検索してみると200件以上ヒットした。しかし、1949年には“核磁気共鳴”の使用件数(8編)がPurcell、Blochの名称の使用件数の和(4編)を上回り、この名称がどんどん使われていった。Blochは何年もの間、核誘導という呼び名に固執してきたが、ある日(1951年頃と推測される)学生たちを集めて、「私はPurcellと話した。学術用語を統一することは大事なことだ。これからは核磁気共鳴と呼ぶことにしよう」と言った^[5]。しかし、この提案はあまり功を奏しなかったようだ。Bloch自身、1956年発行の彼の最後のNMRの論文^[6]に至るまで“核誘導”を使い続けた。

核磁気共鳴という術語が好んで使われるようになっていったのは検出法を特定しない言い方であったためであろう。それは、PurcellとBlochの方法ばかりでなく、1950年に現れたHahnによるパルス法をも包含する。さらに電磁的検出ばかりでなく、光学的あるいは力学的な検出法なども含み得る。万能である。しかし、核誘導法とは言えるが、核磁気共鳴からは外れる例が一つある。大きな磁場に直交する小さな磁場があったとしよう。小さな磁場に垂直にコイルが置かれている。熱平衡状態で大きな磁場を切ったとする。核磁化は小さな磁場の周りに歳差運動をし、コイルに誘導起電力を起す。こうして核誘導信号は観測されるが、共鳴現象ではないから核磁気共鳴とは言えない。この方法はPackardとVarianにより地球磁場を測定するのに使われた^[7]。rfは照射しないので、彼らはこの方法を“free nuclear induction”と呼んだ。1983年にWeitekampらが行ったゼロ磁場NMR^[8]も、原理的には同じ手法で結晶中の双極子磁場を測定している。この例外を除いて、核磁気共鳴は一般的かつ単純でよくできた術語だといえる。では、たまたま

メジャーにならなかった *nuclear spin resonance* は *nuclear magnetic resonance* と全く同じであろうか。これまで行われた全ての NMR 実験は核スピンの基づく核磁気双極子モーメントを対象としており、その限りにおいて両者は同じである。しかし、核は磁気八重極子モーメントをも持ち得る。その存在は原子線磁気共鳴によって確かめられている。現時点では凝縮系の NMR で観測されていないが、原理的可能性を考慮すると *nuclear magnetic resonance* の方がその分広いと言える。

1950年代初期に、Varian社(1952年に世界初のNMR装置を販売した会社)にPackard, Rogers, Anderson, Arnold, Proctorら、Blochの優秀な学生たちが次々と入社した。カリフォルニア工科大学物理化学科のShooleryもArnoldたちが発表したメタノールのプロトンスペクトル^[9]に感動してNMRに携わるためにVarianに入社した。あるとき(1953～54年頃と推察される)Varian社では分光計を初めて海外に輸出する申告をしたが、なぜかなかなか承認されなかった。やがて、係官が“nuclear”という語に過敏に反応し、不必要な警戒心を抱いているためだということが判明した。そこでRogersとShooleryはVarianのカフェテリアのテーブルに座って対策を考え、*nuclear magnetic resonance*を今後、そのアクリニムで呼ぶことにした^[10,11]。NMRという略称の誕生である。彼らは機会あるごとにこの言葉を使った。その効果なのだろうか、1955年に初めてNMRという略語が論文に現れた。その年は、たった2件に過ぎなかったが、その使用は徐々にではあるが着実に広がっていった。

“nuclear”という言葉に対するアレルギー反応は30年後に再び現れた。1983年にハーバード大学医学大学院教授で神経放射線学の父と謳われたTaverasが、AJR (American Journal of Roentgenology)誌および彼がエディターを務めていたAJNR (American Journal of Neuroradiology)誌の12月号の論説欄において、“nuclear magnetic resonance imaging”と呼ばれていた技術からnuclearを取り除くことを提案した^[12]。翌月にはクリーブランド・クリニック放射線科所属の医学博士Meaneyが、Radiology誌で同様にそれを“magnetic resonance imaging (MRI)”と呼ぶことを提案している^[13]。彼らが挙げた理由の一つが、nuclearという言葉は一般大衆に不安感を与える、というものだった。これはある程度理解できるが、彼らはさらに、将来電子スピンも医用イメージングに使われるかも知れない

から、nuclearという制限を付けるべきではないし、その方がより正確な術語になると主張した^[13]。彼らはESRイメージングもNMRイメージングと同じような画像が得られると思ったのであろうか。ESRイメージングが実用化されたとしても、両者で撮像の対象も異なれば、得られる情報も全く異なってくる。(総称する場合は別として)当然両者は別の名前で呼ぶべきものである。しかし上記のジャーナルは彼らの提言を受けて掲載論文から“nuclear”を外した。多くのNMRの専門家が憤慨したり反論したりしたが、放射線学者、現場の医師や装置メーカーがMRIという新しい術語をすんなり受け入れ、やがて定着してしまった。

呼称の変更がNMRイメージングに留まっていればまだしもよかったのだが、彼らはさらにイメージングではない通常のNMR分光法からも“nuclear”を削除することを提言した。MRIと同様に、その方がESRも含むことができ、一般大衆の「望ましからぬ連想」を避けることができると主張した^[13]。イメージングの場合と異なり、大衆がその存在すら知らないであろうNMR分光法から、大衆のために“nuclear”を除こうという主張は全く筋が通らないし、ESRと同じ呼称にすると混乱を招くだけだ。しかし、上記3誌はこれを採用し、NMRはMRに、NMR分光法は“MR分光法 (magnetic resonance spectroscopy, MR spectroscopy, MRS)”となった。Web of Scienceで調べてみると、あろうことか、現在これらの用語が多く医学系雑誌に波及して使われており、その文献数はNMRの全文献数の～8.5%にも上っている。これらの論文は“NMR”で検索しても引っかかってこない、という由々しい事態となっている。特定の分野の研究者の独善的な考えがもたらした結果である。ただ、米国の物理学会および化学会ともに、説明なしに使用できる略語のリストにNMR、ESR、EPRは載せているが、MR、MRSは載せておらず、“本丸”は今のところ揺らいではない。しかし、今後ますますNMR法のルーチン化、大衆化が進んでいくことを考えると将来何が起こるか全く予断を許さない。本会会員の皆さんはこの問題をどうお考えであろうか。

文献など

- [1] Gorter, C. J. and Broer L. J. F. (1942) Negative result of an attempt to observe nuclear magnetic resonance in solids. *Physica*, **9**, 591.
- [2] Purcell, E. M., Torrey, H. C., and Pound, R. V. (1946) Resonance absorption by nuclear magnetic movements in a solid. *Phys. Rev.*, **69**, 37.

- [3] Bloch, F., Hansen, W. W., and Packard, M. (1946) Nuclear induction. *Phys. Rev.*, **69**, 127.
- [4] 次の論文からは“nuclear magnetic resonance absorption”などの言い方も行っている。
- [5] Proctor, W. G. (1996) When you and I were young, magnet. *Encyclopedia of NMR*, **1**, 548.
- [6] Bloch, F. (1956) Dynamical theory of nuclear induction. II *Phys. Rev.*, **102**, 104.
- [7] Packard, M. and Varian, R. (1954) Free nuclear induction in the earth's magnetic field. *Phys. Rev.*, **93**, 941.
- [8] Weitekamp, D., Bielecki, A., Zax, D., Zilm, K., and Pines, A. (1983) Zero-field nuclear magnetic resonance. *Phys. Rev. Letters*, **50**, 1807.
- [9] Arnold, J. T., Dharmatti, S. S., and Packard, M. E. (1951) Chemical effects on nuclear induction signals from organic compounds. *J. Chem. Phys.*, **19**, 507.
- [10] Shoolery, J. N. (1996) High-resolution NMR: A dream come true. *Encyclopedia of NMR*, **1**, 627.
- [11] Rogers, E. H. (1996) A personal NMR odyssey. *Encyclopedia of NMR*, **1**, 599.
- [12] Taveras, J. M. (1983) Nuclear magnetic resonance terminology. *Am. J. Roentgenol.*, **141**, 1352, (1983) *Am. J. Neuroradiol.*, **4**, 1160.
- [13] Meaney, T. F. (1984) Magnetic resonance without nuclear. *Radiology*, **150**, 277.



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。1973年、京都大学理学博士。1975年、京都大学理学部（化学科）講師。同助教授、同教授を経て、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。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関連会議等のほか、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ことは可)。
- ・ 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名のみ応募可。

◆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 朝倉 哲郎(asakura@cc.tuat.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。

◆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27年3月－6月開催の学会に参加した助成金採択者

松永 達弥 京都大学大学院理学研究科 博士課程後期5年 56th ENCに参加

水島 良太 理化学研究所生命システム研究センター 特別研究員 56th ENCに参加

津田 真人 筑波大学大学院数理物質科学研究科 修士課程1年 ISMEM 23rd Annual Meetingに参加

平成27年7月－10月開催の学会に参加した助成金採択者

神庭 圭佑 京都大学大学院エネルギー科学研究科 博士課程3年 6th APNMR Symposiumに参加

重田 安里寿 横浜国立大学大学院工学府 博士課程1年 6th APNMR Symposiumに参加

若手研究者渡航費助成金選考委員 朝倉哲郎、浅野敦志

56th ENC 参加報告書

理化学研究所生命システム研究センター特別研究員

水島 良太

このたび、日本核磁気共鳴学会の若手研究者渡航費助成を受け、カリフォルニアのAsilomar Conference Center で開催された、56th ENCに参加しました。会場はサンフランシスコ国際空港から高速バスで3時間弱のモンテレーの海岸沿いであり、講演会場や宿泊施設、食堂などが入る木造のロッジのような建物が、広大な敷地に多数点在しているという環境でした。今回、私はBiomolecules in solutionのセッションで“NMR characterization of the interaction of the endonuclease domain of MutL”という題目でポスター発表を行いました。溶液NMRの手法としては、スタンダードな内容でしたが、MutLの生物学的な面については、おもしろいと言ってくれる方も何人かいました。ポスター発表会場で印象的だったのは、溶液NMRの発表数の少なさと、全体的な人の数の少なさでしょうか。ENCの雰囲気ということもあるでしょうが、溶液NMRの分野としての退潮具合を若干感じるようになりました。In-Cell NMRに関する発表がかなりあるのではないかと想像していたのですが、意外と少なかったです。逆に目立ったのは、固体NMRとDNPに関する発表で、特にDNPがこれだけ普及してきているということは印象的でした。また、MRIに関する発表も、ハードウェアの開発から分子プローブの設計まで、多岐にわたる発表が行われており、ENCという学会の学際的な雰囲気を

実感しました。現在私はMRIの分子プローブの研究を行っており、クリプトフェンA (CrA) という分子ケージを使って、Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) 法と超偏極¹²⁹Xe-MRIを組み合わせた、HyperCESTというMRIにおける高感度のコントラスト生成手法に興味を持っているのですが、ドイツのグループからいくつかポスター発表が行われており、直接質問できたのはとても良い機会でした。まだ*in vivo* 個体への適用はこれからという新しい技術ですが、既存のMRIの分子プローブ(造影剤)の感度の低さを克服する有望な技術だと感じました。講演では、Wagner 教授の夕食後のセッションが印象に残っています。自身の生い立ちから、ノーベル賞を受賞したビュートリッヒのラボでの研究を経て、続けてきたこれまでのキャリアを振り返ると、それがそのままNMRの発展の歴史でもあるというスライドの構成で、希有な人生を歩まれてきた方ですが、自身の成功は“Pure Luck”だったと語るその姿勢は、ユーモラスで謙虚な人物だと感じました。

最後に、このようなすばらしい学会に参加する機会を与えてくださった、日本核磁気共鳴学会の関係者の皆様、それから、ご多忙なか、推薦書を書いていただいた、蛋白質研究所所長の中村春木先生に深くお礼申し上げます。ありがとうございました。

the 56th ENC 参加報告書

京都大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程6年

松永 達弥

私はこの度、本学会の支援事業である若手研究者渡航費助成を受け、アメリカ合衆国カリフォルニア州のパシフィックグローブで2015年4月19日～24日まで開催されました第56回 Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (ENC) に参加して参りました。日本核磁気共鳴学会会長である内藤先生や選考委員長である高橋先生をはじめ、携わって下さった先生方に深くお礼を申し上げます。

本学会は年に一度、ボストンとカリフォルニアで交互に行われている学会で、アメリカ合衆国を中心に各国の研究者が集い、NMR、およびMRIについて包括的な発表が行われる大きな学会です。今回は Direct Nuclear Polarization (DNP) を用いた物質の解析やタンパク質の構造解析が多く、新規手法や装置の開発に関する物がやや少なかったことが少し残念でした。しかしながら Clifford Rower 先生のパラ水素を用いた感度向上手法 Parahydrogen-Induced Polarization (PHIP) の新たな手法の開発や Klaus Woelk 先生の Non-Negative Least Square Fitting を用いた T_1 測定の精度上昇など、ユニークな視点の研究に数多く触れることができ、大変有意義な体験でありました。特に Rower 先生の発表は propene へのパラ水素の付加と脱離を繰り返すことで propene の超分極を高めることを可能にしたもので、実用的な PHIP の利用へ大きな一歩となると思っております。

手法開発としては目立ちませんでしたが DNP による信号感度の向上は強力で、多くの研究者が DNP を用いた測定を行っていたのが印象的でした。DNP は今後ますますスタンダードな手法となっていくことでしょう。他には液体ヘリウムの循環系開

発について何点か発表があったことも興味深かったです。天然ガス採掘の多くがシェールガスに移り、ヘリウムの供給が不安視されるなか、ヘリウムの回収、再凝縮は大きな関心事の1つとなっています。そのなかでも Michael Opyr 先生と Quantum Technology が発表したシステムはヘリウムの回収、再凝縮、供給を1つの NMR 実験室で行えるシステムであり、そのコンパクトさに大変驚かされました。ヘリウムの問題は現在の NMR を使ううえで避けては通れない問題であり、これからも注目していきたいです。

私自身は、「An X_0 Shim Coil for Precise Setting of the Magic Angle」というタイトルでポスター発表を行いました。Magic Angle Spinning (MAS) は超伝導磁場に対して Magic 角だけ傾けた軸を中心に試料を高速回転させ、固体 NMR で特徴的な異方性相互作用を均一化して高分解能なスペクトルを得る手法です。MAS は試料回転軸の角度に対して非常に敏感ですが、この調整は長い間ギアを回して物理的に MAS モジュールを傾けるという粗い手法で行われており、細かい角度調整が必要な実験では実験者の負担となることもありました。そこで私は、試料に超伝導磁場と垂直に均一な静磁場を与えることで試料が受ける静磁場の向きを変え、回転軸の角度を調整する手法として X_0 シムコイルを開発しました。これにより、 0.01° 以下という非常に細かい角度変化が可能となりました。少し変わった内容の発表ではありましたが、この発表を聞きに来て下さった方々にはご好評頂きました。

最後になりましたが、今回このような貴重な体験の機会を与えて下さいました日本核磁気共鳴学会に重ねてお礼申し上げます。

ISMRM 23th annual meeting 参加報告書

筑波大学大学院数理物質科学研究科博士前期課程2年

津田 真人

この度、平成26年度若手研究者渡航費助成金の支援により、5月30日から6月5日にカナダのトロントで開催されたInternational Society for magnetic resonance in medicine (ISMRM) 23th Annual meetingに参加いたしました。この学会は参加者が6,000人ととても大きな学会であり、あらゆる国と地域から参加しています。開催都市のトロントは北米では有数の世界都市であり金融センターとしてその中心を成しています。移民が多く文化多様性がある一方、治安が良く、清潔な街並みであり世界で最も住みやすい都市のひとつです。そのため滞在期間中は特に不便を感じることはありませんでした。学会期間中は寒暖の差が激しいため体調を崩すこともありましたが、それを忘れさせるぐらい充実した日々を過ごさせていただきました。

私は“Development of a digital MRI console using general purpose digital Instruments and board computers”という題目でポスター発表をしました。オシロスコープや任意波形発生器などの汎用デジタル機器を用いて開発時間と開発費用を抑えたデジタルMRIシステムの開発を行ったという内容です。発表中はたくさんの方に足を運んでいただけました。英語力不足ですべての方々に適切な回答をすることができませんでしたが、一人ひとり

が熱心に質問してくださいました。開発したシステムをオープンソース化して公開したほうがいいという意見や今後が楽しみとってくださる方もいて、興味を持っていただけたことを実感しました。

本学会の参加者は医者、技師、エンジニアなどあらゆる専門家が参加しています。したがって発表内容も臨床からMRIのハードウェアに関するものまで幅広いです。臨床系に関しては勉強不足ということもあり、発表内容を理解することがとても難しかったです。一方、ハードウェアに関しては興味深い発表がたくさんありました。特にソフトウェアラジオのモジュールを利用してMRIトランシーバーを開発するという発表がとても興味深かったです。私もソフトウェアラジオのモジュールを用いればMRIトランシーバーを開発することは可能であると考えていました。今後、NMRやMRI装置の開発に既存のモジュールを用いるというアプローチで開発することが増えていくと考えています。そのアプローチが有効であることを証明できた点において私の研究は大きな成果であったと思います。

最後に、この学会参加に対してご支援していただきました故京極好正名誉教授、故阿久津政明氏、ご遺族の方々、ならびに日本核磁気共鳴学会の関係者の皆様に厚くお礼申し上げます。

6th Asia-Pacific NMR Symposium 参加報告書

京都大学大学院エネルギー科学研究科博士課程3年

神庭 圭佑

私はこの度、本学会の若手研究者渡航費助成の支援を受け、2015年8月13日～16日に香港にて開催された「6th Asia-Pacific NMR Symposium (APNMR6)」に参加しました。日本核磁気共鳴学会会長・内藤晶会先生をはじめ、選考をしていただいた先生方、関係者の皆様に深く感謝申し上げます。会場となるHong Kong University of Science and Technologyは香港・新界の海のすぐそばに位置しており、学会期間中は曇が多くて暑さが緩和されたためか、心地よい潮風のなかで学ぶことができました。6回目となる今回は、アジア各国から200人を超える研究者が集まり、彼らとの交流、議論を通じて非常に有意義な時間を過ごすことができました。

私は「Real-time NMR methods reveals deamination mechanism of human antiviral factor APOBEC3」という題目で、ポスター発表を行いました。ヒトAPOBEC3Gタンパク質(A3G)は、A3Gは一本鎖DNA中のシトシンを脱アミノ化しウラシルに変換する抗ウイルス因子で、HIVの感染に対する防衛機構として働きます^[1]。A3Gの活性は配列特異性が高く、CCC配列の3番目のシトシンを脱アミノ化しCCUに変換します。CCC配列が複数ある場合、A3Gは5'端に近いCCC配列ほど強

く脱アミノ化する傾向があり、この性質を3'→5' polarityと呼びます。これまでに片平研究室では、リアルタイムNMR法を用いて核酸基質のシグナル強度を追跡することにより、A3Gの脱アミノ化活性を定量解析するアッセイを確立しています^[2]。さらに、酵素活性がスライディングの方向に依存すると仮定した速度論モデルを導入することで、3'→5' polarityを解析的に再現することに成功しました^[3]。A3Gの構造については、いくつかのグループによりA3G単体の構造が報告されています。一方で、A3Gと一本鎖DNAとの結合は非常に弱い(解離定数100 μM～1 mM程度)、A3Gと一本鎖DNAの相互作用機序に関する知見は乏しいです^[1]。そこで我々はリアルタイムNMRを駆使し、種々の溶液条件下で様々な核酸基質に対するA3Gの活性を定量解析しました。その結果、A3Gの認識配列はCCCとその前後1塩基ずつを含めた計5塩基であり、静電相互作用を介してリン酸骨格上をスライディングすることを明らかにしました^[4]。

発表の際、多くの参加者の方々に興味を持っていただき、議論を交わすことができました。例えば、スライディングを評価するうえでDNAの長さの影響、とりわけ末端効果について課題があることを指摘していただきました。今回は主に50塩基前後の長さのDNAを使用しましたが、HIVのウイルスRNAは約9,000塩基であり、その逆転写産物のウイルスDNAは50塩基より長いです。しかしながら、長鎖DNAを使用したリアルタイムNMR解析は技術的に困難であるため、行っておりませんでした。帰国後、研究室のメンバーと話し合い、実験のデザインに着手しております。本会では、溶液NMRをはじめ、固体NMRや分子動力学法とNMRを組み合わせた計算化学手法、ESR、MRI等の最新の研究内容を知ることができました。また、蛋白質、核酸、分子間相互作用等といった私の研究に直接関係している発表が多く、大変参考になりました。来年京都でICMRBSが開催される際には、



写真 受付前にて

今回APNMR6に参加された方で来年のICMRBSに参加される方が多数おられるかと思えます。APNMR6参加者の方々と再会したときに、良い話をするためにも、よりいっそう精進しなければと思いました。

末筆となりますが、今回の海外渡航を通じて多くの方々と関わる機会をいただきました。海外で発表、議論を行うことができ、会場内外で学会参加者の方々と話すことで大いに成長できたと思いま

す。このように貴重な機会を設けていただいた関係者の皆様に、この場をお借りして心より御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Aydin, H. et al., (2014) *Structure* **22**, 668-684
- [2] Furukawa, A. et al., (2009) *EMBO J.* **28**, 440-451
- [3] Furukawa, A. et al., (2014) *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **53**, 2349-2352
- [4] Kamba, K. et al., (2015) *PLoS One* **10**, e0124142

若手研究者渡航費助成による 6th Asia-Pacific NMR Symposium 参加報告書

横浜国立大学工学府機能発現工学専攻博士課程後期1年

重田 安里寿

この度、若手研究者渡航費助成金を得て、香港で開催された6th Asia-Pacific NMR Symposiumに参加させていただきました。日本核磁気共鳴学会会長 内藤晶先生をはじめ、故京極好正先生、故阿久津政明様ならびにご家族の皆様、核磁気共鳴学会関係者の方々に心より御礼申し上げます。6th Asia-Pacific NMR Symposiumは2015年8月13～16日まで、香港のHong Kong University of Science and Technology (香港科技大学)にて開催されました。あいにく雨や曇りで湿気の多い日が続きましたが、会場は冷房が効いており快適に過ごすことができました。キャンパスでは新入生受け入れのイベントを開催しており、現地学生の活気を間近で感じることができました。

私は、Understanding of structure in inactivated 13-*cis*, 15-*syn* photocycle of Bacteriorhodopsin by photo-irradiation solid-state NMR というタイトルでポスター発表を行いました。高度好塩菌 *H. salinarum* 由来の膜タンパク質の一つであるバクテリオロドプシンは、長年構造と機能の相関が研究

されてきたロドプシンの代表例です。タンパク質中に存在するレチナル発色団が光によって構造変化し、13-*cis*, 15-*syn* : all-*trans* が1:1で存在する状態から～100% all-*trans*へ変化しフォトサイクルを回することで、プロトンを輸送し基底状態である all-*trans*へと戻ります。過去に一部の論文で、13-*cis*, 15-*syn*を基底とする光反応サイクルも存在することが報告されており、本研究ではそのフォトサイクルの解明を目的としました。レチナルおよびタンパク質側が安定同位体ラベルされたバクテリオロドプシンを用い、研究室独自の技術である光照射固体NMRで測定を行いました。光照射固体NMRは光により変化するタンパク質の構造解析に優れた手法で、LED光を光ファイバーを用いてプローブ内に導入し、試料管に直接光を照射する方法です。この方法を用いることで、NMR測定中も光を照射し続けることができ、寿命の短い中間体も定常的に捕捉され、時間分解能が低い固体NMRでも観測が可能になります。本研究では、これまでに野生型バクテリオロドプシンで13-*cis*, 15-*syn*のフォトサイクル中の中間体の捕捉に成功し、その結果から既存のフォトサイクルに13-*cis*, 15-*syn*を基底とするフォトサイクルを追加した新たなフォトサイクルを提唱しております。さらに、暗順応状態での13-*cis*, 15-*syn*型の割合の多いY185F変異体を用いて同中間体捕捉率の増加に成功し、そのレチナル構造を明らかにしました。発表の際には台湾の先生方や中国、インドの学生に興味をもって頂き、ディスカッションすることができ、さらにポスター賞を戴くことができました。

シンポジウムでは、The Scripps Research Institute (USA) のPeter E. Wright先生のNMRの緩和時間を利用したタンパク質の動的エネルギーランドスケープの解析方法や、National Institutes of Health (USA) のAd Bax先生のケミカルシフトや双極子相互作用を用いてタンパク質の構造決定をする方法などの講演を聞くことができました。本国際



写真 香港科技大学モニュメントの前にて

会議で聞くことのできた貴重な講演を糧に今後も研究に邁進してまいります。

参考文献

- [1] Yomoda, H., Makino, Y., Tomonaga, Y., Hidaka, T., Kawamura, I., Okitsu, T., Wada, A., Sudo, Y., Naito, A., (2014) Color-Discriminating Retinal Configurations of Sensory Rhodopsin I by Photo-Irradiation Solid-State NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 6960–6964.
- [2] Oshima, K., Shigeta, A., Makino, Y., Kawamura, I., Okitsu, T., Wada, A., Tuzi, S., Iwasa, T. and Naito, A., (2015) Characterization of photo-intermediates in the photo-reaction pathways of a bacteriorhodopsin Y185F mutant using in situ photo-irradiation solid-state NMR spectroscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 14, 1694–1702.

NMR分光計の開発

京都大学大学院理学研究科

武田 和行

takezo@kuchem.kyoto-u.ac.jp

はじめに

筆者が十数年にわたって開発・改良を行ってきた自作のNMR分光計を紹介します^[1~4]。開発のきっかけ等の逸話は省略しますが、結局相当の-effortを注ぎ込んで、研究に使えるくらいのレベルのものは完成しました。改良は現在も続けています。回路基盤デザイン・ソースコード等のリソースは公開しており^[5]、興味ある方は自己責任のもと自由に閲覧・使用・改変することができます。

お金でNMRシステムが買えるこの時勢に、わざわざNMR分光計を作るのは何故か？ 実は市販品と競合する気は全くなく、むしろ補完することを意図しています。たとえば新しい研究のアイデアを思いついたとして、それがハードウェアに大幅な変更を加える必要があるような類のものだったとします。こんなときにこの分光計だと、迅速・柔軟にアイデアを実行に移すことができる。もちろん標準的なNMR測定も可能で、きちんと作りさえすれば、市販品に遜色ない性能を発揮します。また、市販品の価格よりはるかに低い材料費で製作することができます。ただし金銭的以外のコストも触れておくのがフェアで、分光計を作るにはエレクトロニク

スの知識とスキル、相当の時間と忍耐が必要です。よってこの分光計は万人に受け入れられるものではありません。むしろNMRで何か変わったこと・新しいことをしたい人向けです。単に安くNMRを手に入れたいというだけならば…、止めたほうがいいかも(笑)。なおNMRをやるには分光計だけではなく、磁石、プローブ、パワーアンプ、低雑音アンプ等の装置群も必要です。

Opencore NMR 分光計

この分光計は、FPGA (Field-Programmable Gate-Array) をフルに活用するという設計思想で開発を行いました。FPGAとは、プログラム可能な半導体デバイスで、任意のデジタル回路をハードウェア記述言語によってコーディング、そして実装できます。その特徴として、(a) FPGAに組み込まれた複数のデジタルモジュールは同時並行的に動作すること、(b) FPGAの中身は何回でも書き換えられること、(c) ひと昔前のLSIに相当するような大規模なデジタル半導体を、個人レベルで実現できること、等が挙げられます。このプロジェクトで筆者は、1チップのFPGAにNMR分光計が必要とする

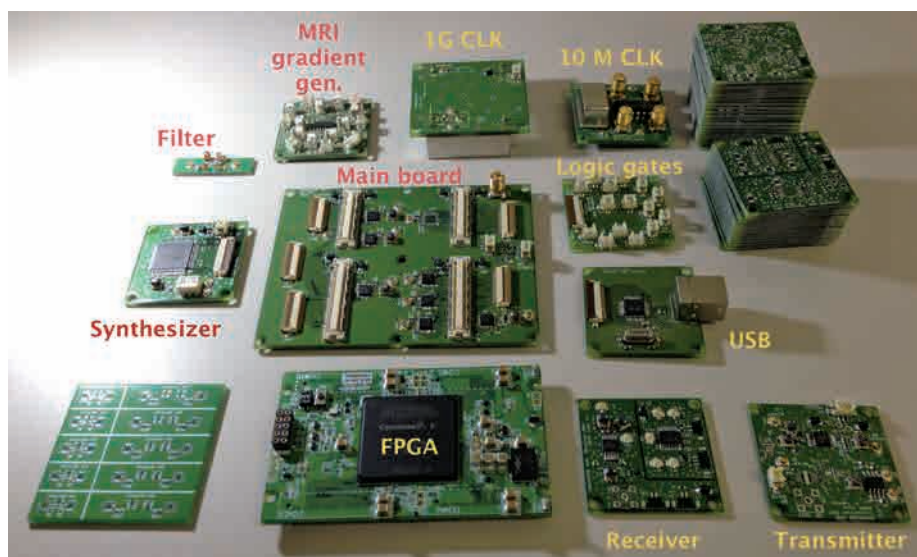


図1 NMR分光計を構成する回路基板

すべてのデジタル回路を実装する、という目標を掲げました。現状では、デジタル回路の規模と動作速度の制約上、例外的にFPGA外にもデジタル回路は存在していますが、FPGAデバイスの性能は飛躍的に進化しつつあるので、将来は本当にすべてのデジタル回路を集約することを視野に入れていきます。FPGAボード、および周辺機器のボードの一覧を図1に示します。

FPGAには、パルスプログラマ、ダイレクトデジタルシンセサイザ、デジタル直交復調回路、デジタルフィルタ等のモジュールをコーディングして実装しました。一般に、FPGAに組み込まれた回路はcore moduleと呼ばれています。これらをオープンリソース化したので、このNMR分光計のことを

Opencore NMRと呼ぶことにしました。完成品の例を図2に示します。左側に示すボードむき出しの装置は、稼働させながら配線の変更等の調整が容易に行えます。またお好みで図2(右)に示すように筐体に入れる手もあります。

図3に、簡略化したOpencore NMR分光計のアーキテクチャーのダイアグラムを示します。図3の点線の内部に描かれたモジュール群が1チップのFPGA内に実装されています。点線をまたいだモジュールはアナログ部位とデジタル部位が混在しているために部分的にFPGAに実装されていることを意味します。

分光計には3つの独立したラジオ波送信チャンネルを実装することができるようになっています。送



図2 Opencore NMR 分光計の外観。左は基板むき出しタイプ。右はシャーシに入れてコネクタを取り付けたタイプ

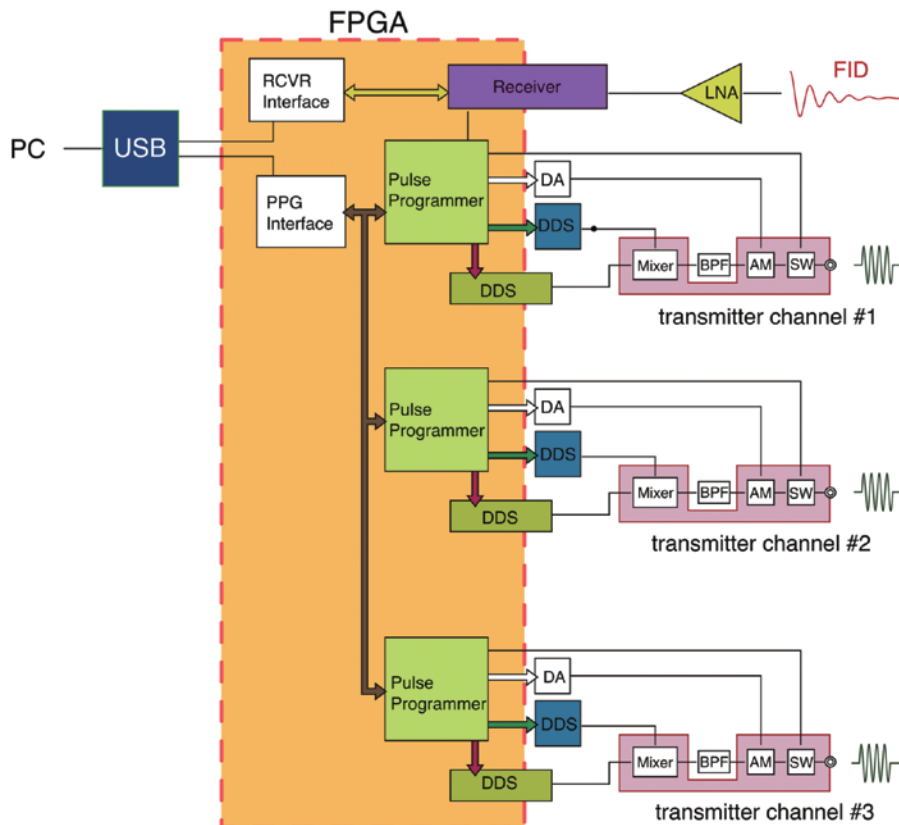


図3 Opencore NMR 分光計のアーキテクチャー。点線内部のモジュールが1チップのFPGA内に組み込まれている

信器の上限周波数は約600MHzで、振幅変調、位相変調、周波数変調を行うことができます。ラジオ波の送信・変調の制御、外部機器の制御、受信信号のサンプリングの制御等はすべてパルスプログラマが担っています。パルスプログラマはハードウェア記述言語を用いてFPGA内に実装されています。その時間分解能は最小時間幅25ns、最小の時間増分6.25nsとなっています。パルスプログラマを制御するために、ホストコンピュータ上で実行したいパルスシーケンスに対応したコードを記述します。ソフトウェアが構文解析を行って、FPGA内のパルスプログラマ用の機械語に変換(コンパイル)します。コンパイルされたパルスプログラムはUSB経由でFPGA内のパルスプログラマに転送されて、実行されます。

またNMR信号は14ビット分解能・80MsのADコンバータで標本化してFPGAに送られます。その後デジタル直交復調・デジタルフィルタ等の処理がFPGA内で行われたのち、USBケーブルを介してデータがホストコンピュータに送られる仕組みになっています。

応用例

筆者の所属する研究室では日常的にOpencore NMRを用いて固体NMR測定を行っており、この分光計で得られたデータを用いて論文を執筆しています。最近の例では、マイクロコイル実験^[6]、

新規シム開発^[7]、二重回転(DOuble NUTation: DONUT)デカップリング^[8]、薄膜リチウム電池のキャラクタリゼーション^[9,10]、MRI^[11]等が挙げられます。これらは市販のシステムでも実験可能という意味で「通常の」NMR測定に分類されます。

また、新規アイデアに特化してシステムを改変して行った研究例としては、FID取得中に動的にレシーバゲインを変化させて実行的な信号検出のダイナミックレンジを向上させるAPodization after Receiver-gain InCrement during Ongoing sequence with Time (APRICOT)^[12]、2台の分光計を同期させデュアルレシーバシステムを構築しておこなった異種核共分散NMR^[13]、無冷媒磁場可変マグネットと組み合わせて行ったNMR元素分析^[14]等が挙げられます。またDNPシステムに組み込んで使用した研究例もあります^[15]。さらに、送信周波数をアップコンバートしてESR分光計として用いることも可能です。現在のところ、送信信号を約10GHzにまでアップコンバートしてESR実験を行い、ESR信号を正常にダウンコンバートして取得できることを確認しています。その他、現在絶滅しかけのcw NMR測定や、スピンノイズ実験を行えることも確認しています。

予告：Opencore NMR 2 (仮称)

Opencore NMRを数年間使用してきた結果、もっと性能・使い勝手を良くして研究に役立てたい

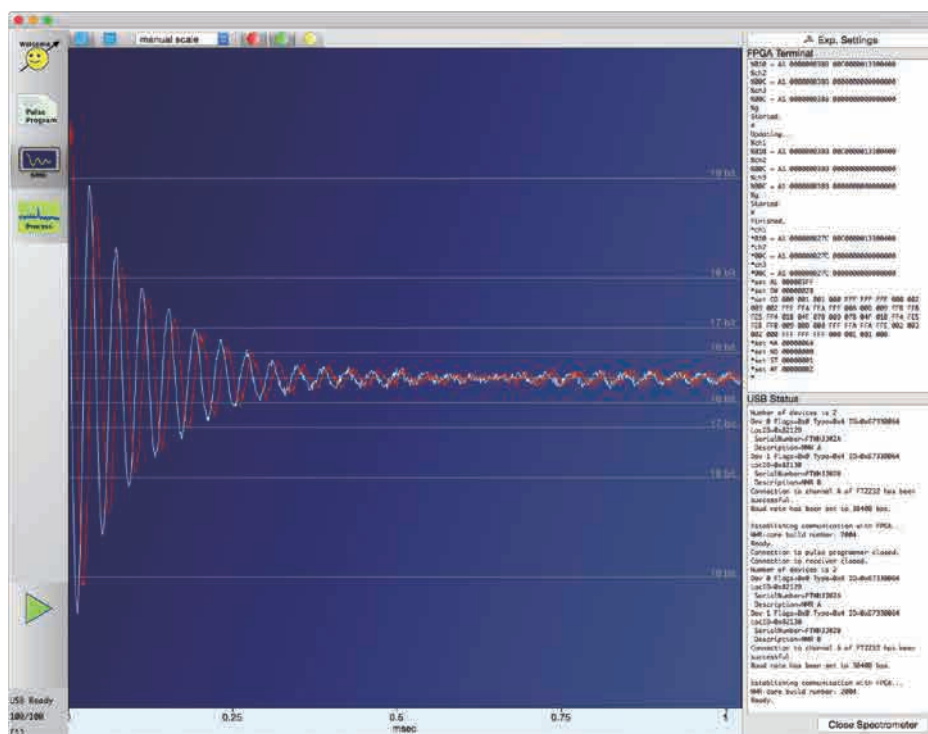


図4 Opencore NMR 2 (仮称) コンソールソフトウェアのスクリーンショット

と思うようになりました。そのため、新バージョンの開発を始めました。今回のバージョンアップでは回路基板の互換性を保ちつつ、FPGAの書き換えとホストコンピュータ上のソフトウェアの開発に注力しています。主な特徴は以下の通り：

- ・クロスプラットフォーム(Linux、OS X、Windows)でネイティブに動作。
- ・拡張され、便利になったパルスプログラミング言語。
- ・分光計とコンピュータの通信を安定化。
- ・よりシンプルな画面デザインにして、実験やデータに集中できるように…。

開発中の分光計ソフトウェアのスクリーンショットを図4に示します。

まとめ

Opencore NMRによって、フツの実験とともに、何やら変わった実験を行うことができることを示しました。研究者として肝心なのはアイデアを思いつくことだと考えています。そしてアイデアを実行する、しかも物凄く迅速に行うためのツールとして、Opencore NMRを役立てたいと考えています(この思想に賛同していただける方、歓迎!)。研究者にとって装置開発は目的ではなく、目的を達成するための手段です。そしてこのプロジェクトの真のねらいは、NMR分光学を通して次世代の科学のフロンティアを開拓することにあります。

付録：よくある質問

Q：買えますか？売ってくれますか？

A：いいえ、残念ながら現在のところ販売はしていません。

Q：作るのにいくらかかりますか？

A：ざっくりとしか言えませんが、材料費として数

十万円あれば作れます。ただし、お金で買えないコストも発生することに御留意ください。エレクトロニクスに関するそれなりの知識とスキルと、手間と時間、そしておそらく相当の忍耐が要ります(笑)。

参考文献

- [1] K. Takeda, Review of Scientific Instruments 78 (2007) 033103.
- [2] K. Takeda, Journal of Magnetic Resonance 192 (2008) 218-229.
- [3] K. Takeda, Annual Reports on NMR Spectroscopy 74 (2011) 355-393.
- [4] <http://www.spectroscopy-solutions.org/Information/Archive/1579-/An-Open-resource-NMRspectrometer-Promotes-Cutting-edge-Research>.
- [5] <http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/bun/indiv/takezo/opencorenmr/index.html>
- [6] K. Takeda, T. Takasaki, K. Takegoshi, Journal of Magnetic Resonance, 258 (2015) 1-5.
- [7] T. Matsunaga, T. Mizuno, K. Takegoshi, Journal of Magnetic Resonance 256 (2015) 1-8.
- [8] K. Takeda, A. Wakisaka, K. Takegoshi, Journal of Chemical Physics, 141 (2014) 224202.
- [9] K. Gotoh, M. Izuka, J. Arai, Y. Okada, T. Sugiyama, K. Takeda, H. Ishida, Carbon, 79 (2014) 380-387.
- [10] J. Arai, Y. Okada, T. Sugiyama, M. Izuka, K. Gotoh, K. Takeda, Journal of The Electrochemical Society, 162 (2015) A952-A958.
- [11] Y. Terao, O. Ozaki, C. Ichihara, S. Kawashima, T. Hase, H. Kitaguchi, S. Kobayashi, K. Sato, I. Nakajima, N. Oonishi, M. Poole, K. Takeda, S. Urayama, H. Fukuyama, IEEE Transactions on Applied Superconductivity, 23 (2013) 4400904.
- [12] K. Takeda, K. Takegoshi, Journal of Magnetic Resonance 208 (2011) 305-308.
- [13] K. Takeda, Y. Kusakabe, Y. Noda, M. Fukuchi, K. Takegoshi, Physical Chemistry Chemical Physics 14 (2012) 9715-9721.
- [14] K. Takeda, N. Ichijo, Y. Noda, K. Takegoshi, Journal of Magnetic Resonance 224 (2012) 48-52.
- [15] M. Batel, M. Krajewski, K. Weiss, O. With, A. Däpp, A. Hunkeler, M. Gimersky, K. Pruessmann, P. Boesiger, B.H. Meiser, S. Kozerke, M. Ernst, Journal of Magnetic Resonance 214 (2012) 166-174.



武田 和行 (たけだ・かずゆき)

2000年3月 京都大学大学院理学研究科博士後期課程 研究指導認定退学
 2000年4月 JST CREST 研究員
 2003年7月 京都大学博士(理学)学位取得
 2004年4月 大阪大学大学院基礎工学研究科 COE 特任助手
 2004年10月 大阪大学大学院基礎工学研究科 助手(その後助教)
 2007年9月 京都大学大学院理学研究科 化学専攻 講師

循環型 極低温ヘリウムガス駆動 DNP-MAS-NMRプローブの開発と応用

大阪大学 蛋白質研究所

松木 陽

yoh@protein.osaka-u.ac.jp

1. 極低温 MAS

低温のマジック角試料回転 (MAS)-NMRという電気ガスチラーを使う試料温度 $T = -60^{\circ}\text{C}$ くらいまでか、液体窒素に対して熱交換した窒素ガスで回転/冷却する $T = 100\text{K}$ 付近までの実験が多く、これらは比較的安価容易に実行できる。しかし本稿で言う極低温はもう少し低めである ($T = 30\text{--}100\text{K}$)。そんな温度でMAS-NMRをする意義は何だろうか。まず、1. 感度があがる。キュリー則に従って低温ほど核スピンの分極が増大するし、一方でコイルやリード線から来る熱雑音は減る。うまくいくとせいぜい $T = 25\text{K}$ 程度でも数十倍の感度向上が期待できる^[1]。2. DNP効率が良くなる。これも感度向上に関連し、元々これが我々の最大のモチベーションである。というのも強い電子スピンの分極をマイクロ波照射によって核スピンの分極をマイクロ波照射によって核スピンの分極を向上する動的核分極 (DNP) 法の効率は、しばしば高磁場に行くほど大きく悪化する。これは高価な高磁場DNP装置の費用対効果比を下げるし、蛋白質のような多信号系の解析では高磁場—高分解能条件が命だから大問題である。一方、高磁場で有効な交差効果によるDNP効率は、特定の電子スピン遷移を飽和できると最大にできるから、従来よりもずっと低い温度 ($T \ll 100\text{K}$) で実験できるなら効率を大きく巻き返せるだろう。よって極低温で動くMAS-NMRプローブの技術は高磁場DNP法の核心にある。なお、項目1と2の感度向上効果は相乗的である。例えば低温NMRで20倍、DNPから100倍の分極増大があると、あわせて2,000倍の感度向上、4百万倍の測定時間短縮となる。もっと言えば、3. 極低温でしか見えないモノが見える。普通は見られない現象や物性が見えると言えば科学者なら誰も心動かされる。例えば、二次元電子系の量子ホール効果、超伝導ボロン化合物の物性、閉じ込め分子の量子化された分子運動から、立体障害によるメチル基の回転特性のばらつきなど既存の研究例も幅広い。生体系へ

の応用では、メチル基の低温回転特性が蛋白質の折りたたみや、蛋白質間相互作用界面の同定法に応用できるかも知れない。さらに極低温では膜蛋白質の複数の機能性中間体を、変異を入れることなく作り分け、トラップして構造を調べるという芸当も可能で、これは結晶構造回折に対する大きな強みである。

極低温MASをやる意義は十分だろう。しかし近年の応用例は非常に少ない。次に挙げるように技術的な問題が多く、汎用にならなかったのだろう：A) ヘリウムガスは低温で動粘度が急激に変化し、従来のMASモジュールでは安定な試料回転を得にくい。B) 高次元測定を多用する生体系試料の解析では極低温MASを1週間くらいは維持したいが、これが難しい。液体ヘリウムを蒸発させて高圧、極低温の試料回転用ガスを生成する従来法では、ヘリウム容器が加圧されており、測定中に継ぎ足すのが容易でないからである。液体ヘリウムに対して熱交換するような装置であっても、冷媒の消費による液面の経時変化で試料温度や回転周波数はゆっくりドリフトするし、冷媒継ぎ足し時に条件の変化を生みやすい。C) ヘリウムは高価で長期測定や普段使いには向かない。D) コイルや可変コンデンサがヘリウム環境にあると放電しやすく、NMRデータを放電ノイズでダメにすることがある。E) 低温では分子運動とデカップリング磁場との干渉や、不均一線幅のせいで線幅が太くなり、分解能が低下することがままある、などである。そこで我々の「循環型プローブシステム」が威力を発揮する^[2]。始めにシステムに導入したヘリウムガスを再圧縮、再冷却しながら循環させ極低温MASを維持するもので、原理的にはヘリウムを全く消費することなく長期の極低温MASが可能である。実際、以下に紹介するように、上に挙げた問題点A)–D) ははすっきり解決、E) についても著しく改善することに成功した。このプローブは我々阪大蛋白研、藤原敏道教授とそのチームが考案、開発したものである。また

開発の成功には (株) JEOL RESONANCE、(株) クライオバックの卓越した技術力が不可欠であった。ここに明記しておきたい。では装置の中身を見ていこう。

2. 循環型プローブシステム

循環型 極低温ヘリウム駆動 MAS-NMR プローブシステムは大きく Cryogenic Helium Circulation (CHC) ユニットと専用 DNP-NMR プローブからなり (図1)、CHC ユニットは熱交換器と、コンプレッサやバッファタンク、流量制御器を搭載したラックからなる。ヘリウムガスは室外のボンベから専用のクリーンラインを通して CHC ユニットに導入し、使用後は別の専用ラインで大型再液化センターに直送できる。2台のペローズポンプで作られた圧縮ヘリウムガスはバッファタンクと流量制御器を経て熱交換器に送られ冷却される。真空容器中の熱交換器にはベアリング、ドライブガスの冷却用にそれぞれ 10 K-GM 冷凍機が一台ずつ設置してあり、大体 150 L/min の室温ヘリウムガスを 20 K に冷却できる。使用電気量は 16 kW/hr で、1 時間あたりの運転コストは約 300 円と低い。冷えたヘリウムガスは真空二重管トランスファーチューブを伝ってプローブに送られ、試料を回転、冷却 (~ 30 K) する。プローブから排出されるガス (~ 40 K) は熱交換器の初段で再利用され、この結果室温に戻ることになる。この「戻りガス」は再び二系統に分けられ、元のコンプレッサに戻る。ガスの経路は完全密閉型で、環境からの窒素や湿気を寄せ付けない設計になっており、ヘリウムを汚染、消費することなく数週間にわたって極低温 MAS を維持することが

できる。

NMR プローブ内の各ガス配管にも真空断熱を施し、さらにプローブ本体とプローブジャケットとの隙間にも真空領域を保持して全体を高度に断熱している。また MAS モジュールから排出された低温ヘリウムガスは、試料室直下にある可変コンデンサ室を通してプローブ外に排出される設計になっており、RF コイル、リード、コンデンサなどラジオ波回路の高電圧部周辺には、少し加圧気味で、高いヘリウム流量を維持する設計になっている。これはヘリウムガスの平均自由行程を減少させ、アーキングを抑える。RF 回路は ^1H - ^{13}C の二重共鳴で、ハイパワーを要求する交差分極や ^1H デカップリング下の高分解能測定ができる。DNP に使う 460 GHz マイクロ波はプローブ上部から専用導波管で導入され、コイルを通して試料管を横から照射する構造になっている。

3. 極低温 MAS

運転に際しては、システム全体を高純度ヘリウムガス (99.999%) で充分置換することから始める。パージガスと運転用のガスを合わせても必要なヘリウムガス量は約半立米 (~ 0.7 L liq.) 程度である。運転にはコツが要るものの、装置の反応は素直で習得は難しくない。また最初に室温から 30 K まで冷却するのに約 6 時間を要するが、つきっきりで監視する必要は無い。したがって夜、帰り際にスイッチを入れ CHC ユニットの冷却を開始しておき、試料とプローブの冷却は (1 時間程度で終わる) 翌朝開始するという使い方ができる。

循環型システムの最大の利点は高度な長期安定

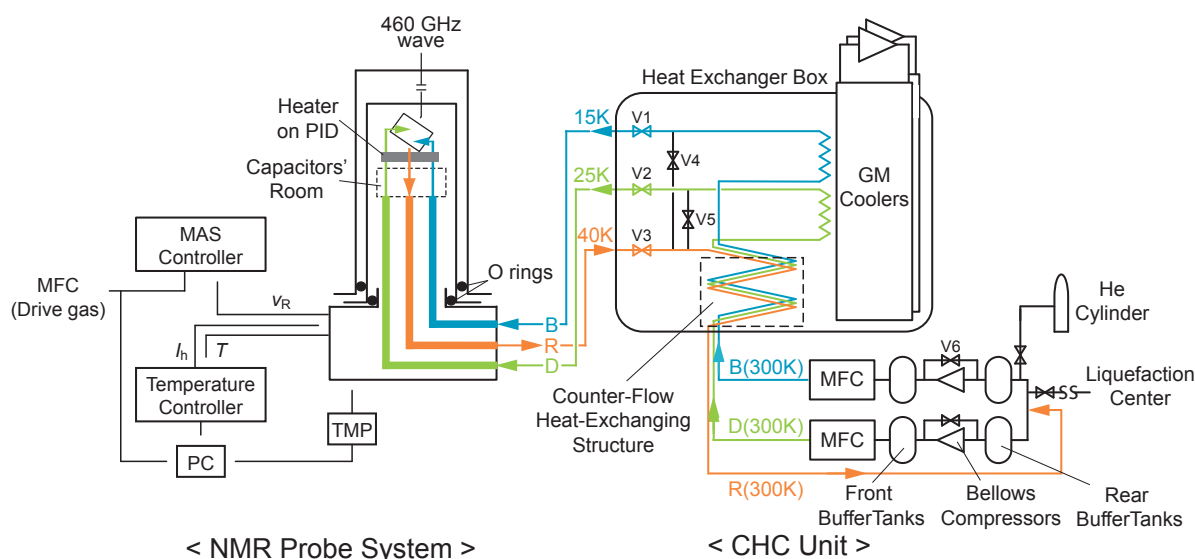


図1 循環型 極低温ヘリウム駆動 DNP-MAS-NMR プローブシステム的气体フローダイアグラム。文献[2]から。

性で $T=40\text{K}$ 、 $\nu_r=4\text{kHz}$ を2日半にわたって維持した初期実験では、温度と試料回転数をそれぞれ標準偏差 $\pm 0.5\text{K}$ 、 $\pm 5\text{Hz}$ に維持できた。試料管外径は $2\mu\text{m}$ 単位で最適化しており、また回転用ガスの全経路にわたって、液化-気化のサイクルが皆無のため、条件の安定性は本質的に非常に高い。現時点で14日間の連続運転まで確認しており、この間ガス流量や圧力に変化が見られないことから、もっと長い運転も可能と考えている。

循環型システムの第二の利点はその低コストにある。液体ヘリウムを沸騰させて低温ガスを生成する従来のシステム^[3]と比べて、ヘリウム消費量は1/100以下、運転経費はほぼGM冷凍機にかかる電気代(¥300/hr)だけで、従来の1/50以下になった。これほど安価に安定なヘリウムMAS-NMRを実現する装置は世界的にも類を見ないが、ここまで来てやっと汎用に耐える装置になったと言える。今後はさらに低温、さらに高速の試料回転を目指す。

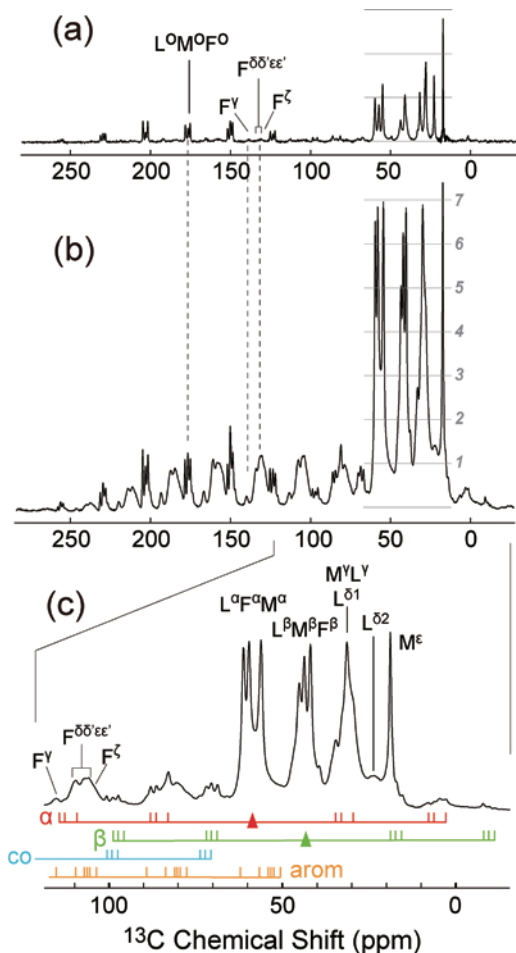


図2 MLF微結晶試料の1次元 $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C 交差分極スペクトル。

^1H 周波数700 MHz、 $\nu_r=4.7\text{kHz}$ 。(a) $T=300\text{K}$ 、(b) and (c) $T=40\text{K}$ 。下部に示すのはスピニングサイドバンドの位置。縦軸は熱雑音強度で規格化。文献[2]から。

4. 極低温 NMR

極低温NMRの最大の利点はやはり感度の向上である。図2はトリペプチド *N*-formyl-Met-Leu-Phe (MLF) 微結晶試料の1次元 $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C CPスペクトルを $T=300\text{K}$ と 40K で比べている。脂肪族信号領域の積分強度は 40K では 300K の7.1倍大きく、温度比 $300/40=7.5$ と良く一致する。一方熱雑音は 40K において30%減であったから、室温NMRと比べると合わせて9倍強の感度向上が得られた。さらに言うと、感度は一般に磁場の3/2乗で向上するから、例えば $B_0=9.4\text{T}$ (400 MHz) で稼働する汎用装置に比べ、我々のシステム ($B_0=16.4\text{T}$ (700 MHz)) では $(16.4/9.4)^{3/2}=2.3$ 倍感度が高い。よって高磁場、極低温による感度利得は合計20倍を超える。この利得はスピン種 (e -, ^1H , ^{13}C etc.)、スピン量子数 ($I=1/2, >1/2$) によらず、試料に増感剤などを混ぜる必要もなく得られるので適用範囲は著しく広い。感度だけでなく、当該プローブは市販のシムスタックに収まる寸法で、標準的な固体NMR装置と変わらない高分解能が得られる(図2)。

高い長期安定性と、低運転コストを実現して初めて、生体試料特有の長時間積算、高次元測定が $T=40\text{K}$ で行えるようになった(図3)。多次元ス

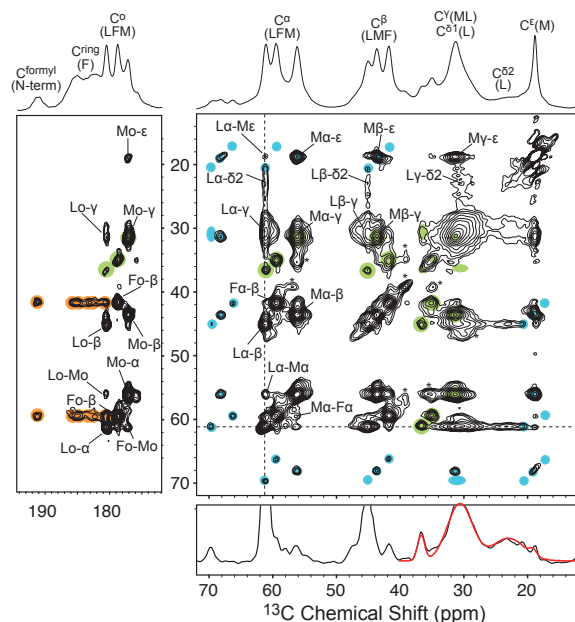


図3 MLFの二次元 ^1H 駆動 ^{13}C - ^{13}C スピン拡散(PDS)スペクトル。

$T=40\text{K}$ 、 $\nu_r=4.3\text{kHz}$ 、混合時間100 ms、積算8回、繰り返し30 s。330 t_1 ポイントで測定時間は10 h。 C^α 、 C^β 、芳香族炭素信号のスピニングサイドバンド(SSB)への交差信号位置がそれぞれ緑、青、橙でハイライトしてある。SSBへのシャープな交差信号は、試料回転の長期安定性を証明している。文献[2]から。

ペクトルでスペクトルの分解能はぐっと増す。例えば、MLFのロイシン側鎖メチル基炭素 C^{02} の線幅は40Kでは分子運動とデカップリング磁場との干渉で、室温と比べ10倍以上広幅化しており(図2c, “L 02 ”), 1次元データでは線幅の定量は難しかった。一方、二次元PDS Dスペクトル(図3)では残基内 $C^{\alpha}-C^{02}$ 相関など、いくつかの交差信号は二次元平面でよく分離しており、1Dスライスのフィッティング(赤線)から線幅を容易に定量できた(FWHH=1150Hz, 6.6ppm)。蛋白質主鎖の二次構造の分布からくる不均一線幅が最大4ppm程度であることを考えると、これは特別太い部類の信号の定量例である。また高分解能を得るのに長い高出力デカップリング(70kHz, 15ms)を行っているが、アーキングは一度も観測されなかった。長期安定性、低コスト、CPやデカップリングに十分なRF効率、高い磁場均一性、アーキングフリーであること、あらゆる点で実用に最も近い極低温プローブである。

5. 展望

「高磁場固体NMRの感度を1,000倍上げる」を目標に、我々はこれまでに「超10T」のDNP初観測($B_0=14.1T$)^[4]、周波数可変光源の導入^[5]、ヘリウムによる極低温DNP法の導入^[3]、 $B_0=14.1T$ において感度向上率500倍の達成など、高磁場-高分解能条件におけるDNP法の発展に力を注いできた。これをさらに発展させ、本稿で紹介したプローブシステムでは長期間、高度に安定な極低温MAS-NMR測定を安価に実現可能にし、高磁場DNP-MAS-NMR法を実用レベルにまで押し上げた。今後はもっと低温、もっと高速回転、三重共鳴プローブ、極低温試料交換システム、低温プリアンプの導入などさらに発展させる。 $B_0=16.4T$ におけるDNPデータも近く報告できるだろう。

感度向上率も500倍にとどまらない。マイクロ波

周波数の高速変調、円偏光マイクロ波の使用、複数のマイクロ波周波数を同時に使う高度な照射スキームの開発、高磁場-極低温専用ラジカル分極剤の開発など複数の計画を同時進行させており、今後5~7年くらいの間には感度は数万倍に達するだろう。MAS下、高磁場条件という、実際の応用研究に利用可能な形でこのような感度が得られることが大変重要だと考える。固体NMRの感度向上によって、まずは膜蛋白質複合体などの構造研究が進むだろう。また同位体標識が難しい天然物や微量医薬品、材料表面の構造解析なども容易になるだろう。蛋白質の高次構造解析の多くが非標識試料で行える日さえ来るかもしれない。装置や手法の開発と並行し、そろそろアプリケーションにも力を入れ始めるべき時期に来たと思う。

引用文献

- [1] Lipton, A.S., Sears, J.A., Ellis, P.D., (2001) A General Strategy for the NMR Observation of Half-Integer Quadrupolar Nuclei in Dilute Environments, *J Magn Reson.* 151, 48-59.
- [2] Matsuki, Y., Nakamura, S., Fukui, S., Suematsu, H., Fujiwara, T., (2015) Closed-Cycle Cold Helium Magic-Angle Spinning for Sensitivity-Enhanced Multi-Dimensional Solid-State NMR, *J. Magn. Reson.* 259, 76-81.
- [3] Matsuki, Y., Ueda, K., Idehara, T., Ikeda, R., Ogawa, I., Nakamura, S., Toda, M., Anai, T., 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.
- [4] Matsuki, Y., Takahashi, H., Ueda, K., Idehara, T., Ogawa, I., Toda, M., Akutsu, H., Fujiwara, T., (2010) Dynamic Nuclear Polarization Experiments at 14.1 T for Solid-State NMR, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 5799-5803.
- [5] Matsuki, Y., Ueda, K., Idehara, T., Ikeda, R., Kosuga, K., Nakamura, S., Toda, M., Anai, T., 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.



松木 陽(まつき・よう)

2003年3月 大阪大学理学研究科博士後期課程修了、博士(理学)

2003年4月 大阪大学蛋白質研究所、博士研究員

2006年4月 ブランダイス大学、博士研究員

マサチューセッツ工科大学、客員研究員

2009年4月 大阪大学蛋白質研究所、助教(現職)

長岡技術科学大学 グリーン資源科学研究室

河原成元

kawahara@mst.nagaokaut.ac.jp

緑の稲穂が眼下に広がる長岡の丘に、長岡技術科学大学は悠然とそびえ立つ。1976年の創設以来、主として高等専門学校卒業生を受け入れ、実践的かつ先導的技術者として育ててきた実績が、勾玉に磨きかけたように深く輝いている。それは、技術を科学することにより新しい産業を創出する(技学)という新たな潮流を生み出し、理学でもない、工学でもない、独自の教育へと繋がっている。例えば、長岡技術科学大学では、大学院修士課程に進学する学生は、企業で約5か月間のインターンシップ(実務訓練)を行うことが義務付けられており、高等専門学校から学部で得た知識を企業という実践の場で着床させ、自身の長所と短所を理解し、大学院進学後は長所を伸ばしながら短所を補うことができるようにカリキュラムが構成されている。この技学教育では、高度分析機器が企業の研究・開発に果たす役割を理解し、それに必要な知識を修得し、かつ、実践することが重要となる。それ故、長岡技術科学大学では、企業における実際の使用を想定し、400MHzのNMR分光計を物質材料工学専攻に3台保有している。

グリーン資源化学研究室(図1)は、有機化学および高分子化学に基づき、植物資源由来の高分子の分子構造、ナノ構造および高次構造を理解し、

階層的に制御することにより、新規有機材料を創製することを目指して研究を行っている。具体的には、天然ゴム、糖鎖、タンパク質が研究対象となっていて、これまでの研究で解析できていない末端基、特定の官能基、架橋点、分岐点等、微量であるが材料の物性を支配する構造単位の精緻な解析を行っている。それ故、溶液NMR法および固体NMR法はもちろんのこと、新たに開発されたラテックスNMR法や半固体NMR法を駆使し、ゴムやゲルの構造解析を行っている。

ラテックスNMR法は通常の溶液NMR法をラテックスに応用したものである。一方、半固体NMR法はグリーン資源化学研究室のゴム構造解析の知識と日本電子(JEOL)のNMR装置製作の経験が融合することにより開発されたFG-MASプローブを適用したものである(図2)。FG-MASプローブは、20kHz以上の高速マジック角回転を掛けながら磁場勾配測定を行うことができる。

溶液NMR法は、天然ゴム、種々の改質天然ゴムおよびフノリの構造解析に用いられている。天然ゴムは、*cis*-1,4-イソプレン単位を主構成単位とする植物資源由来の高分子多成分系であるが、末端基の構造は未だに解明されていない。天然ゴムに含まれる約6w/w%のタンパク質や脂質等の非ゴム成分



図1 グリーン資源化学研究室メンバー

がそれらよりも少量の末端基の構造解析を妨げているからである。そこで、天然ゴムからタンパク質および脂質を完全に除去する精製法を開発し、精製天然ゴムの構造を精緻に解析した。植物資源由来の低分子量モデル化合物を用いることにより、天然ゴムの基本骨格はタンパク質と相互作用する変性されたジメチルアリル基、2個の*trans*-1,4-イソプレレン単位、約5,000個の*cis*-1,4-イソプレレン単位および脂質に結合したイソプレレン単位から構成され、両末端基は分岐点または架橋点を形成していることを見出した。一方、改質天然ゴムとして用いたものは、エポキシ化天然ゴム、カーボネート化天然ゴム、水素化天然ゴム、ヒドロキシル基含有天然ゴム、フェニル基含有天然ゴムであり、2次元NMR法を駆使することにより構造解析を行っている。

固体NMR法は、イオン伝導性高分子電解質、無機ナノ粒子の表面構造解析、無機ナノ粒子とゴムの相互作用解析に用いられている。天然ゴムから

調製したリチウムイオン伝導性高分子の構造解析およびリチウムとの相互作用の解析、プロトン伝導性高分子の構造解析およびプロトンとの相互作用の解析、シリカの表面構造解析、シラノール基の定量を行っている。

ラテックスNMR法およびFG-MAS固体NMR法は、加硫ゴム、ラテックスの構造解析に用いられている(図3)。これらの方法では、これまでの研究で不可能とされてきた加硫ゴムの炭素(^{13}C)とプロトン(^1H)の相関をゴム状態で正確に解析できる。それ故、架橋点の構造を実証的に解析する道を切り拓いた。ラテックスNMR法およびFG-MAS固体NMR法を用いて加硫天然ゴムの ^{13}C と ^1H の相関を解析することにより、架橋点の構造はこれまでに報告されてきた硫黄に結合した3級炭素だけではなく硫黄に結合した4級炭素も含まれることが明らかとなった(図4)。また、ラテックスNMR法は、ラテックスの合成や天然ゴムラテックスの改質の*in situ*観察にも用いられている。例えば、乳化重合における反応率や反応機構の解析、ラテックスの状態における天然ゴムの水素化、エポキシ化、加硫等の反応の*in situ*観察と反応機構の解析、架橋点の構造の解析等、煩雑な溶液試料の調製を省略し、ラテックスの状態で迅速に構造解析を行っている。

NMR分光計は、海外の大学や研究機関と共同研究を行うのに欠かせない分析機器となっている。例えば、ベトナムとの共同研究では、天然ゴム精製テストプラント(図5)や400MHzのNMR分光計をハノイ工科大学に設置し、天然ゴムの構造解析の共同研究を行っている。NMRの原理、スペクト



図2 FG-MASプローブ

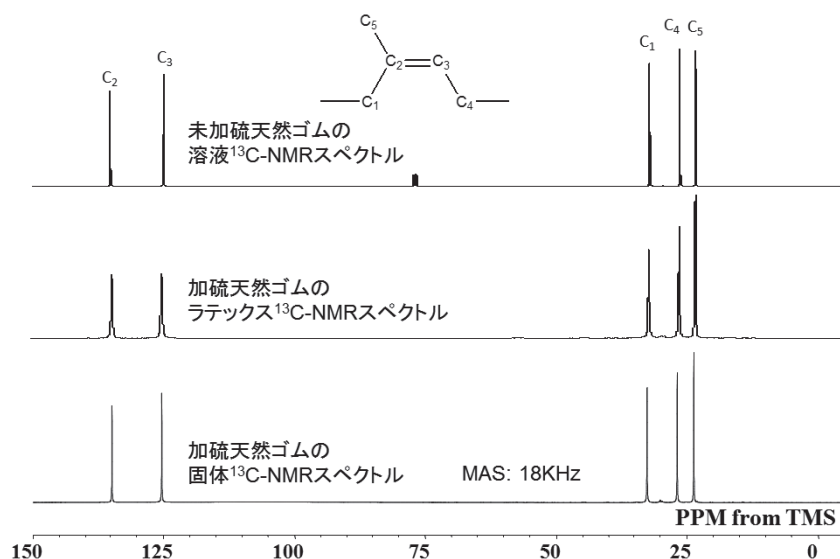


図3 未加硫天然ゴムの溶液NMRスペクトルおよび加硫天然ゴムのラテックスNMRスペクトルと固体NMRスペクトル

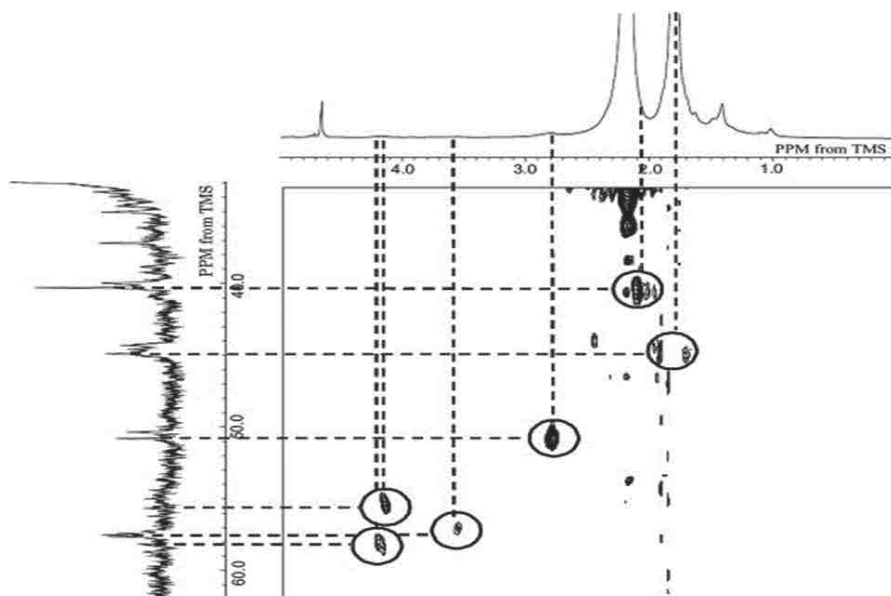


図4 加硫天然ゴムのHMQCスペクトル

ルの解析のノウハウを出張講義し、実際にNMR測定を行っている。また、ハノイ工科大学の教員を博士後期課程に社会人留学生として受け入れ、研究指導を行っている。ベトナムでは、稼働しているNMR分光計はハノイ工科大学の1台だけであるため、NMR分光計を用いた共同研究が将来のベトナムの科学技術の発展に繋がると考えられる。同様な国際共同研究はタイでも実施している。

NMR分光計を用いた、基礎研究および応用研究、人材育成および国際共同研究が実を結び、ゴムの科学技術の分野が発展することを心から願っている。



図5 天然ゴム精製テストプラント

株式会社東レリサーチセンター

品質保証部¹、構造化学研究部²、有機分析化学研究部³

川口 謙¹、崎山 庸子²、日下田 成³

Ken_Kawaguchi@trc.toray.co.jp

はじめに

株式会社東レリサーチセンターは、東レ株式会社の研究開発部門から1978年6月に独立して発足した、分析受託を主要な業務としている会社です。「高度の技術で社会に貢献する」という基本理念に基づき、研究開発や生産技術における「原因解析」や「問題解決」の要請に、分析技術や物性解析による技術支援を行ってきました。Technology & Trustをモットーに、東レグループ以外からも広く受託しており、当然のことながらNMRの利用も活発です。

株式会社東レリサーチセンターの研究部署は3地区に分かれており、そのうちNMRを保有している研究部は神奈川県鎌倉市にある生物科学研究部と滋賀県大津市にある構造化学研究部および有機分析化学研究部の3研究部です。各研究部はそれぞれ特徴があり、生物科学研究部は医薬品関係や天然物、生体物質関係の分析、構造化学研究部は主に固体NMRを用いた材料分析、有機分析化学研

究部は種々の工業材料の組成分析にNMRを利用しています。以下、各研究部に分けて紹介いたします。

生物科学研究部

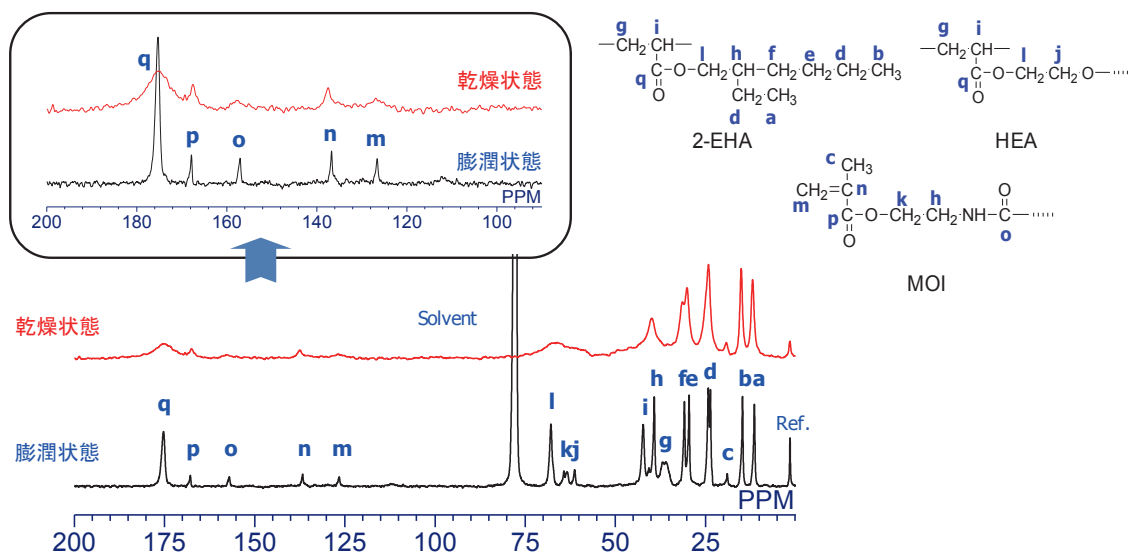
生物科学研究部のNMRグループの前身は、東レ株式会社基礎研究所の物理化学研究室です。ここに1963年当時、日本で初めての100MHz装置(バリアン社製)が設置されました(世界でも2番目だったそうです)。同時に60MHz装置も設置し、ここから東レグループにおけるNMRの利用が始まりました。その後、1982年に初めての超伝導FT-NMR(400MHz)を導入し、現在は600MHz1台、500MHz2台が稼働しています。いずれも溶液NMRです。

当研究部で最も力を入れているのは、医薬品中の未知類縁物質の構造決定です。類縁物質とは薬効主成分から派生した不純物のことです。対象となる類縁物質は、薬効主成分に対して0.1%程度の含有量しかないことがしばしばあり、微量成分の測定となります。そのため一晩積算してやっと¹H NMRスペクトルを得ることもあります。ところで0.1%という数値は、医薬品開発において不純物の構造決定の努力が要求される閾値であり、国際的な規制によって定められています(実際にはこの数値は投与量などに応じてもっと細かく分類されています)。

このような微量類縁物質のNMR測定を行うためには、類縁物質を分取して量を確保することが必要です。しかしミリグラムオーダーを分取するのは事実上不可能なことも多いので、10マイクログラムオーダーを分取して測定しています。微量成分を高純度に分取することは難しいため、NMR測定にはしばしば液体クロマトグラフィー(LC)-NMRを用いています(図1)。分取の際に直面する困難の例として、分取物が不安定、さらには、濃縮や乾燥の際に分解してしまう、あるいは溶けなくなっ



図1 LC-NMRの写真(UNITY INOVA 600)

図2 粘着剤の固体¹³C NMRスペクトル

しまうということがあります。そういう場合にLC-NMRが有用というわけです(もちろんLC-質量分析(MS)も使用します)。なお、類縁物質の含有量がおおよそ1%以上であれば、通常は分取せずにそのままLC-NMR測定が可能です。また、現在はLC-NMRの測定以外に、自動分取装置を用いて、クライオプローブで測定することにも挑戦中です。

類縁物質をはじめとする医薬品分析以外では、天然物や生体物質の構造解析を行っています。たとえば糖鎖の構造解析では、NMR以外にメチル化分析などの手法と組み合わせて総合的に解析しています。脂質関係の構造解析も同様です。また、構造解析以外にも、タンパク質とリガンドの相互作用解析などについて実施しています。

構造化学研究部

主に固体NMRを担当するグループで、高分子、電池材料(リチウムイオン電池、燃料電池、太陽電池等)、カーボン・石炭、無機材料(触媒、シリカ等)、医薬品・生体物質といった幅広い分野に携わっています。固体NMR装置を5台保有しているほか、最近では高強度PFG-NMRプローブを導入しました。

高分子関連では、溶媒に不溶な樹脂やゴムの組成分析や化学構造解析、作製条件や劣化前後での非晶/結晶成分の変化といった樹脂の高次構造解析を実施しています。図2および表1にUV硬化型の粘着剤(未硬化)の固体¹³C NMRスペクトルと組成比を算出した事例を示します。固体NMRは溶液NMRと比較してスペクトル分解能が低いために、溶媒に不溶な樹脂の詳細な組成分析や構造解析が

表1 粘着剤の組成比

成分	2-EHA	HEA	MOI
存在比	71 mol%	19 mol%	10 mol%

困難な場合があります。しかし、図2のように試料を膨潤する、あるいはガラス転移温度以上の高温で測定する等の工夫により、スペクトル分解能や定量精度を向上させることが可能です。現状、溶媒に不溶な高分子の組成比を最も正確に算出できるのは固体NMRだと考えています。

リチウムイオン電池やキャパシタ、次世代の電池材料(固体電解質やナトリウムイオン電池等)の分析においても、固体NMRは重要な役割を果たしています。リチウムイオン電池等ではリチウムイオンの存在状態を特定する、あるいは、金属リチウムが析出しているか等の状態分析や劣化解析を実施できるのはラボレベルでは固体NMRだけです。弊社では電池セルの解体から不活性雰囲気でのサンプリングや測定、温度可変測定(-80~300℃)にも対応しています。測定可能な主な核種は、¹H、²H、⁶Li、⁷Li、¹¹B、¹³C、¹⁵N、¹⁹F、²³Na、²⁷Al、²⁹Si、³¹P、¹¹⁹Sn等です。

有機分析化学研究部

当研究部では、溶液NMRを解析ツールの一つに利用して、さまざまな工業材料に対する有機組成分析を行っています。紫外線硬化樹脂、エポキシ樹脂、ポリエステル樹脂、シリコーン樹脂、インク、オイルといった工業材料の組成分析をはじめとして、劣化解析や異物分析など、対象試料は

非常に多岐にわたります。組成分析についてはIR, NMR, MSが三種の神器であり、これらの測定結果を相補的に解析して、如何に矛盾のない構造を決定していくか、という点が非常に重要です。このためには、NMRのみならずIR, MSを含めた深い総合解析力、材料に関する知識、さらには「測定に用いる前」の材料に対する前処理技術力などが試されます。

拡散係数の違いを利用して分離を行うDOSY測定などにより、混合物の場合でもNMRのみである程度の構造解析が可能な場合もありますが、多数の成分から構成される試料や拡散係数が同じような化合物が存在する場合は、このままでは解析が非常に困難です。そのため当研究部では、溶媒抽出・再沈(時には誘導体化も使用)などによる粗分離やクロマト分離などを用いることで分離を行い、化合物の詳細な構造解析を行っています。さらには、溶媒に難溶な未知化合物解析において、そのままでは固体NMRや熱分解GC/MS測定などでも

解析が難しいような試料(例えばポリイミドなど)については、化学分解、誘導体化、分離などを行い、解析していきます。

このように適切に前処理した化合物について、IR, NMR, MSにより構造解析を行っていきませんが、特に共重合組成比の算出や、詳細構造の解析、末端構造解析、シーケンス解析などにNMRは必要不可欠です。2D-NMRなども併用し、これらの解析を行っています。

おわりに

ここまで、株式会社東レリサーチセンターにおける3部署のNMRグループの紹介をさせていただきましたが、分析内容によっては1部署だけで完結せず、共同して問題解決に当たることもあります。部署は違いますが、NMRに携わっている者どうし相互のコミュニケーションを良くして、お互いの得意分野を知ること努めています。

日本核磁気共鳴学会の決定事項

2014年度 通常総会 議事次第

日時：2014年11月4日(火) 12時10分～12時40分

場所：大阪大学コンベンションセンター MOホール

総会次第

1. 開会の辞
2. 会長挨拶
3. 2014年NMR討論会世話人 挨拶
4. 事業報告
5. 2013年度 収支決算の承認
6. 2014年度 中間報告の承認
7. 2015年度 収支予算案の承認
8. 2015年度 役員を選任
9. 名誉会員推戴の提案
10. 2015年NMR討論会世話人 挨拶
11. その他
12. 閉会の辞

会員数

会員種別	2012年 9月30日	2013年 9月30日	2014年 9月30日
正会員	421	431	438
学生会員	140	143	151
名誉会員	12	12	12
賛助会員	8	8	8
合計	581	594	609

H26 年度現役役員名簿

■ 会長 (H26-H27)

内藤 晶 横浜国立大学

■ 理事 (H26-H27) 会長 (*) 副会長 (**)

朝倉 哲郎 東京農工大学

嶋田 一夫 (**) 東京大学

加藤 晃一 自然科学研究機構

竹腰清乃理 京都大学

藤原 敏道 大阪大学

■ 理事 (H25-H26)

内藤 晶 (*) 横浜国立大学

伊藤 隆 首都大学東京

河合 剛太 千葉工業大学

山本 泰彦 筑波大学

■ 会計監査 (H26-H27)

河野 敬一 北海道大学

神藤平三郎 東京薬科大学

■ 評議員 (H26-H27)

朝倉 哲郎 東京農工大学

片平 正人 京都大学

加藤 晃一 自然科学研究機構

菊地 淳 理化学研究所

児嶋長次郎 大阪大学

嶋田 一夫 東京大学

高橋 栄夫 横浜市立大学

竹腰清乃理 京都大学

楯 真一 広島大学

西村 善文 横浜市立大学

原田英里砂 サントリー生命科学財団

福士 江里 北海道大学

藤原 敏道 大阪大学

村上 美和 京都大学

吉水 広明 名古屋工業大学

■ 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財団

武田 和行 京都大学

栃尾 豪人 京都大学

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

■ 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	東京大学
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

事業報告

I. 現時点での会員数

II. 活動報告と方針の提案

●2013年度

1. 第52回NMR討論会の開催
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. 学会機関誌Vol. 4の発行
4. 会員サービスの推進

●2014年度

1. 第53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. 5の発行
5. その他

●2015年度(方針)

1. 第54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. 6の発行
5. その他

*配布資料と投影資料に基づき全て承認された。

*2013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

平成27年度の評議員が選出、承認された(会計監査は今年度は留任のため選出はなし)。

■評議員(H27-H28)

阿久津秀雄	日本学術振興会
浅川 直紀	群馬大学
浅野 敦志	防衛大学校
金橋 康二	新日鐵住金
木川 隆則	理化学研究所
神田 大輔	九州大学
佐藤 一	ブルカーバイオスピン
白川 昌宏	京都大学
菅瀬 謙治	京都大学
武田 和行	京都大学
朽尾 豪人	京都大学
西山 裕介	(株) Jeol Resonance.
松木 陽	金沢大学
水野 元博	金沢大学
山本 泰彦	筑波大学

11月4日(火)開催の新評議員会および新理事会にて、平成27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27年度理事、会計監査、幹事は以下のように決定した。会長(*)副会長(**)

■理事

内藤 晶(*)	横浜国立大学	H25-H27
嶋田 一夫(**)	東京大学	H26-H27
朝倉 哲郎	東京農工大学	H26-H27
加藤 晃一	自然科学研究機構	H26-H27
竹腰清乃理	京都大学	H26-H27
藤原 敏道	大阪大学	H26-H27
浅野 敦志	防衛大学校	H27-H28
神田 大輔	九州大学	H27-H28
菅瀬 謙治	京都大学	H27-H28
山本 泰彦	筑波大学	H27-H28

■会計監査(H26-H27)

河野 敬一	北海道大学
神藤平三郎	東京薬科大学

■幹事

出村 誠	北海道大学
阿久津秀雄	日本学術振興会
河合 剛太	千葉工大
楯 真一	広島大学

2014年度 通常総会 議事録

出席：出席82名+委任状24名

*定足数[一般会員438名(2014年9月30日現在)]
/5=88名

第54回NMR討論会 (2015)

第54回NMR討論会を千葉で開催いたします。今回は、「1つの会場を使うスタイル」とし、すべての参加者が一堂に会して議論をできるようにいたします。会場の千葉工業大学は東京から30分程度と交通のアクセスも良く、また十分な設備を備えています。是非、多くの方々にご参加いただき、白熱した討論をお願いいたします。

例年どおり、NMR研究の第一線で活躍する海外の研究者を招待講演者としてお招きいたします。また、若手ポスター賞表彰およびチュートリアルコースを行います。核磁気共鳴分野の若手、大学院生、学生の方に、この絶好の機会を活かして積極的に参加していただきたく思います。また、展示会場に多くの参加者が足を運ぶよう工夫したいと思っています。

有意義な討論会となりますようぜひご参加、ご協力をお願いいたします。

第54回NMR討論会 世話人 河合 剛太 (千葉工業大学)

会期：2015年11月6日(金)～8日(日)

チュートリアルコース 2015年11月5日(木)

会場：千葉工業大学 津田沼キャンパス (千葉県習志野市津田沼2-17-1)

招待講演・特別講演のプログラム

第2日目 11月7日(土)

招待講演1 座長：松木 陽

11:50 ~ 12:25 Magic Angle Spinning Solid State NMR Studies of Membrane Proteins in Synthetic Lipids and Cell Membranes

Dr. Vladimir Ladizhansky (University of Guelph, Ontario, Canada.)

招待講演2 座長：片平 正人

14:00 ~ 14:35 A hybrid methods approach to determine the structure of Tetrahymena telomerase holoenzyme

Prof. Juli Feigon (University of California, Los Angeles)

招待講演3 座長：坂本 泰一

14:35 ~ 15:10 Probing the Conformational Dynamics of the Active and Inactive Forms of the Mitogen-Activated Protein Kinase ERK2

Prof. Arthur Pardi (University of Colorado, Boulder)

特別講演1 座長：内藤 晶

15:30 ~ 16:05 High Frequency Dynamic Nuclear Polarization

Prof. Robert G. Griffin (Massachusetts Institute of Technology)

特別講演2 座長：藤原 敏道

16:05 ~ 16:40 From Structural Analysis of Polymers with NMR to Development of Silk Vascular Graft

朝倉 哲郎 (東京農工大学)

特別講演3 座長：嶋田 一夫

16:40 ~ 17:15 Chemistry of natural products and NMR
 岩下 孝 (サントリー生命有機科学研究所)
 ※都合により、来年度に延期

チュートリアルコース

日時：11月5日(木)
 会場：千葉工業大学 津田沼キャンパス

13:00 ~ 14:30

NMR教科書のここがよく分からない

池上 貴久 先生 (横浜市立大学 教授)

初学者は講義や教科書を通して NMR を学んでいきますが、そこに書かれた何気ない記述でつまづいてしまうことが多いです。例えば「溶液 NMR では、分子の回転拡散によりこのような dipolar 相互作用が平均化されて、ピークがシャープになる」などの記述です。「拡散がなぜ回転するの？平均化とは？なぜシャープになるの？ product-operator のプロダクト (直積) って何？」このような疑問が学習の進行をそこで妨げているかもしれません。一方、熟練者の中にも、分からないままに放置して長い時を経てしまい、ある時に逆に初心者から尋ねられてドキッとする方がいるかもしれません。あるいは、「 $(3 \cdot \cos^2(\theta) - 1)$ を積分したら 0 になるでしょ」のような説明で済ませてしまっているかもしれません。今回はこのようなよく分からない教科書の記述を何点か採り上げ、これらをいつものように図で理解することを目指したいと思います。

14:40 ~ 16:10

固体 NMR による生体分子構造解析の最近の展開

川村 出 先生 (横浜国立大学 准教授)

固体 NMR 分光法は高分子や固体材料など幅広い分野で活躍している。近年、細胞膜中に存在する膜タンパク質やアミロイド線維など難解な生体分子について固体 NMR を利用した構造決定の研究がいくつか成され、固体 NMR によるプロテインデータベース (PDB) への登録数も増加している。このような研究を支える測定技術と合わせて、具体的な最新の研究例を紹介し、解説する。

16:20 ~ 17:50

NMR はいかに創られたか：9. MRI を中心に

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結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す。今回は MRI を中心に話す予定である。

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 (<http://www.nmrj.jp>) 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 (受信メールアドレス変更設定も含む)。

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

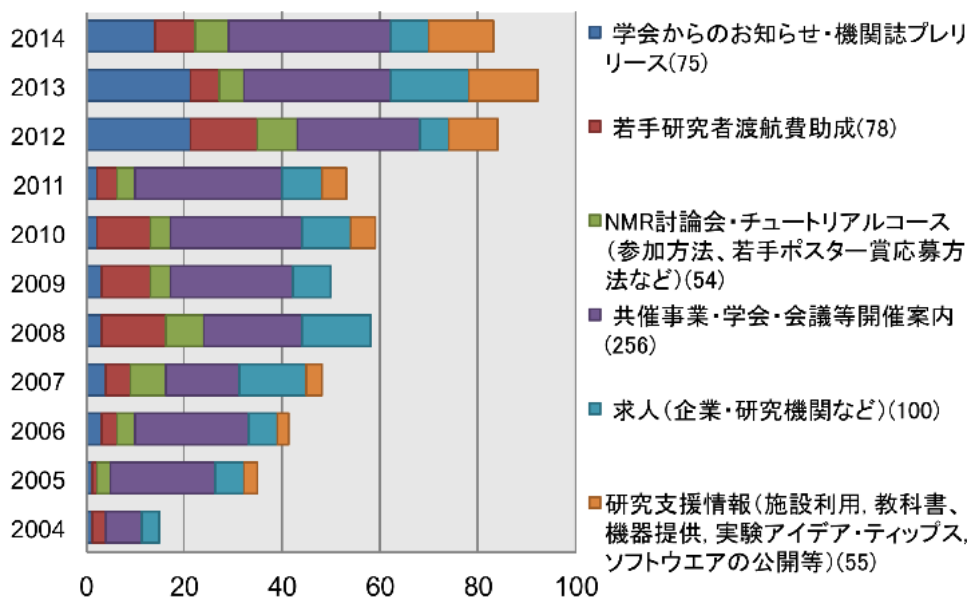
学会ホームページ <http://www.nmrj.jp> から「NMRニュースレター」→「バックナンバー」を選択してください。キーワード、発行日検索もできます。

◎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、以下に掲載の「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.545-637 (2014年4月～2015年3月)

年度別発行数



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いただき、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 (2015年12月31日まで)

※指定送付先 kyoumei_postman@t.kyoto-u.ac.jp (2016年1月1日から)

▶ 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。役員の内選は2年とする。ただし、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
の半数の任期を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 毎年役員を半数を改選する。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
補者とともに一般会員に公示し、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10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回の役員の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

2014年3月9日

第5章 第9条と第10条の内容を交換

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公表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投稿規程

(2014年9月30日改訂)

日本核磁気共鳴学会機関誌 (NMR学会誌) 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。会員の皆様からは、下に示す原稿の分類のうち、会長メッセージと巻頭エッセイを除外した原稿の投稿を歓迎します。また、解説、トピックス、技術レポートには、非会員の方からの投稿も受け付けます。ただし、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。また、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。

原稿は下に示す原稿作成要領を参考に作成し、NMR学会ホームページのトップページ (<http://www.nmrj.jp/index.php>) にあるNMR学会誌ページの原稿投稿フォームから投稿して下さい。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使用許可を得た上で、原稿投稿フォームから原稿と共に使用許可書 (PDF) を提出して下さい。

原稿の分類

●会長メッセージ

NMR学会会長からのメッセージ。2,000字以内、1ページ。

●巻頭エッセイ

主にNMR討論会特別講演者からの寄稿。NMR学会、NMR討論会との関わりなどについてのエッセイ。NMR討論会の講演要旨と同一でも可。2,000～4,000字、1～2ページ (図表を含む)。

●解説

著者の研究成果および関連分野の現状の分かりやすい解説。8,000～16,000字、4～8ページ (図、表を含む)。

●トピックス

数年以内に発展した新しいNMRの展開についてのミニレビュー。4,000～8,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

●研究報告

会員が単著あるいは共著 (非会員でも可) で投稿するオリジナル研究報告。6,000～12,000字、3～6ページ (図、表を含む)。

●NMR基礎講座

主にNMR討論会のチュートリアル講演者などによるNMRの基礎の解説。4,000～10,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

●技術レポート

NMRの装置や測定方法の開発に関するレポート。4,000～8,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

●NMR便利帳

NMR実験に便利な装置 (ハードウェア) や実験方法・解析 (ソフトウェア) の工夫、安全衛生 (磁場、高圧、高電圧、酸欠、毒物劇物) などに関する分かりやすい解説。4,000～6,000字、2～3ページ (図、表を含む)。

●海外学会参加報告

主に、若手研究者渡航費助成金受領者による寄稿。NMRニューズレターとして公開される報告書でも可。会員からの寄稿も歓迎します。2,000～4,000字、1～2ページ (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、研究テーマ、構成員、特徴など、研究室の内容を紹介する。2,000～6,000字、1～3ページ (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。4,000～8,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

原稿作成要領

- ・和文は明朝体、英文はTimesのフォントを用い、表題は14ポイント、本文は12ポイントで、docまたはdocxファイルで作成してください。
- ・原稿は、表題、執筆者氏名・所属、本文、引用文献、表、図の順番にまとめ、1つのファイルとして提出して下さい。
- ・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便利帳の執筆者は、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

- 像度で作成してください。
- ・ 図、表には、番号を付すと共に、それぞれの説明を記入してください。
 - ・ 引用文献は、次を参考にして書式を統一して下さい。
- 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.

賛助会員名簿

味の素株式会社

SIサイエンス株式会社

株式会社カモソフトウェアジャパン

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

太陽日酸株式会社

ブルカー・バイオスピン株式会社

平成27年9月15日現在の本学会賛助会員は、上記の通りです。
本学会の事業への御賛助に対して、厚くお礼申し上げます。

日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員会委員名簿 (2015年度)

委員長	山本 泰彦	筑波大学
副委員長	浅野 敦志	防衛大学校
	池上 貴久	横浜市立大学
委員	浅川 直紀	群馬大学
	上田 卓見	東京大学
	恩田 光彦	株式会社三井化学分析センター
	児嶋長次郎	大阪大学
	柴田 友和	筑波大学
	菅瀬 謙治	サントリー生命科学財団
	出村 誠	北海道大学
	鳥澤 拓也	中外製薬株式会社
	福士 江里	北海道大学
	村上 美和	京都大学
	吉水 宏明	名古屋工業大学

編集後記

NMR学会誌第6巻を会員の皆様方にお届けします。原稿を御執筆いただいた方々および編集委員の方々のお力添えのおかげで、編集作業を無事完了することができました。本巻も充実の内容となっておりますので、会員の皆様にはお楽しみいただけることと自負しております。

本巻も昨年の第5巻同様に、受領を希望する会員のみで冊子体を配布しました。会員宛の冊子体受領希望調査の回答フォームには、“学会誌に関する意見”欄が用意されており、会員からの貴重なフィードバックの機会を提供しています。「いつも見やすい冊子で楽しみにしております。」「いつも大変勉強になり感謝しています。次の冊子を楽しみにしているところです。」等を目にした時は、私の顔は自然とほころび、編集作業の苦勞が報われる思いが致しました。「著者のEメールアドレスが載っていると、掲載論文に対して質問等のレスポンスがとりやすいのではないかと思います。」との御提案は、早速、本巻から採用させていただきました。また、「NMR研究室便りの掲載件数を増やしてほしい。」との御要望は、次期編集委員長の浅野敦志防衛大学校教授への申し送り事項とさせていただきました。浅野教授には、4年間の編集委員としての経験から得た知識と知恵をNMR学会誌のより一層の発展に御活用いただくことを期待しています。

最後に、NMR学会役員および会員の皆様、株式会社クバプロ 松田國博 社長、阿部美由紀 氏、岡崎美希 氏、株式会社プロアクティブ 奥村美樹 氏には、NMR学会誌第6巻発行に向けて、多大な御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NMR学会誌の発展にさらなる御協力をお願い申し上げます。

2015年9月 NMR学会誌編集委員長 山本泰彦

NMR

BULLETIN OF THE NUCLEAR
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN

Vol.6

2015年10月20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



MRTechnology, Inc.

MRI科技株式會社 (筑波市)

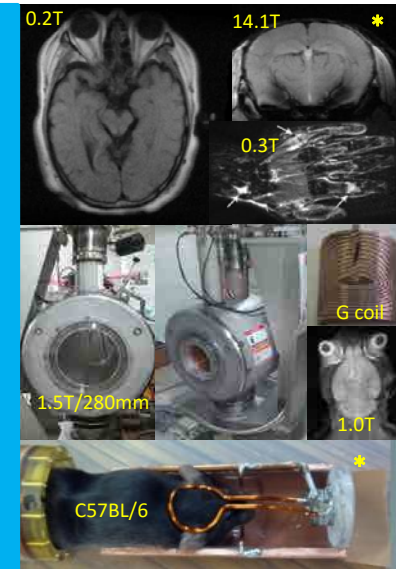
數位MRI專業製造廠 (Windows®-based Programmable console)
 協助進行NMR/MRI設備相關領域的研究及開發
 Digital MRI developer (GPGPU, DTI, MRF, compressed sensing, etc).
 Supporting your R&D for NMR/MRI equipment and image acquisitions.

14.1Tesla超高磁場MRI, 0.2T~2T小型永久磁石MRI等的專用機訂製
 提供人體頭部/四肢、老鼠、植物、食品等最優化的MRI
 14.1Tesla ultrahigh filed MRI and 0.2T~2T permanent magnet's MRI.
 Customized MRI for Human head/peripheral, mice, plants, food, and etc.

徵求業務合作及共同研發廠商: 中國、印度、韓國及其他各地
 開發符合各國資源及預算的MRI系統, 並促進商業化
Wanted: Business partners and collaborators in your country.
 Let us make a new MRIs for venture business and science together.



(*) 14.1Tでの生体マウス画像は「超高磁場NMR磁石を活かすマウス用MRIユニット」によって取得しました。これは、JSTの先端計測分析技術・機器開発プログラムの支援の下、エム・アール・テクノロジー、東京大学、筑波大学により開発されたものです。

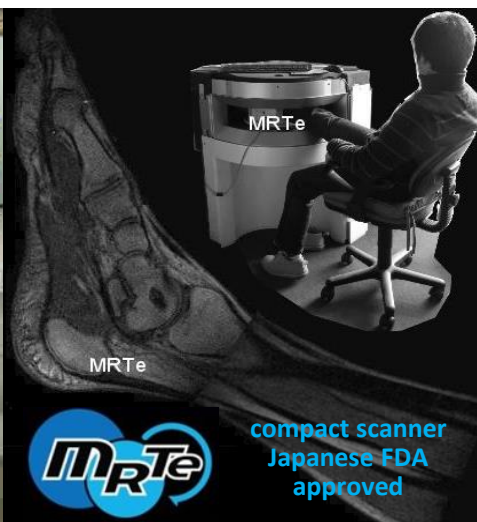


日本學術用MRI頂級製造廠 / The top Japanese company of scientific MRIs.

- ✓ 小型NMR/MRI專家 / Professional of compact NMR/MRIs.
- ✓ RF線圈、G線圈的設計及製造 / Custom made RF coils and small G coil inserts.
- ✓ 裝備影像脈衝的開發工具 / Development tool for latest MRI sequences.
- ✓ 50台以上開發實績: 美國、英國、日本的研究機關及大學 / Installed in NASA, Cambridge.
- ✓ 導入成本為傳統產品的10%~50% / Low cost and maintenance free MRI systems.
- ✓ 日本厚生勞動省的認可實績 / JIS safety instrument approved by Japanese FDA.
- ✓ 世界最尖端的樹木用MRI / The leader of outside/inside MRIs for plant physiology.
- ✓ 麻醉器&心拍同步呼吸裝置 / Mouse gas anesth. and synchronization system.

【Address】 Sengen 2-1-6, Tsukuba, Ibaraki, 305-0047 Japan
 【Phone/FAX】 +81-29-859-5075 / +81-3-5953-8878
 【President】 拝師智之 (Tomoyuki Haishi, Ph.D.)
 【email】 information.mrte.tsukuba.japan@mrtechnology.co.jp

- ☑ 既設NMR装置用の3Dイメージンググローブの製造販売及びパルスシーケンス記述のサービスを行っております。
- ☑ 拡散計測用GZコイルによる1Dプロファイル計測(1Dイメージング, 数ミクロン分解能)も可能になります。ご相談ください。



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

「主要製品; Fast Field Cycling NMR Relaxometry」

SPINMASTER FFC2000 – High performance 1T system: T_1 measurements from 10 kHz to 42 MHz (^1H Larmor frequency) and T_2 (depending on conditions); Multi-nuclear operations (including ^1H , ^2D , ^{19}F , ^7Li , enriched ^{13}C); Fast field switching time allows measurement of relaxation times down to a fraction of a millisecond; Fully automated acquisition of NMRD profiles; Precise temperature control (range from -140 to +140 °C with a 0.1 °C resolution); **New more powerful PCNMR console supports a wider range of NMR experiments;** Integrated NMR Windows software; Minimum operating costs (no cryogenic gases necessary).

NEW SPINMASTER FFC2000 0.5T Wide Bore Edition: Ideal for FFC measurements on 1 inch rock cores.

NEW SPINMASTER FFC2000 DUO: The most comprehensive FFC system with both 1 Tesla narrow bore and 0.5 Tesla wide-bore magnets incorporated. Ideal for 10 mm and 25.4 mm samples.

SMARTracer™ – Innovative compact bench-top 0.25T system: Measurement of T_1 and T_2 (depending on conditions) for ^1H and ^{19}F nuclei; Measurement of NMRD profiles from 10 kHz to 10 MHz (^1H Larmor frequency); Temperature control and PCNMR console as for SPINMASTER.

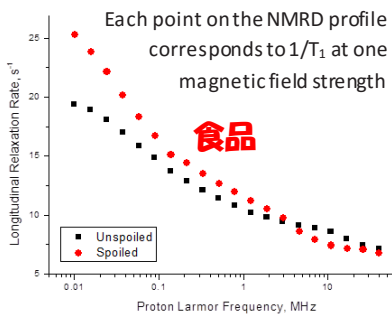
3T 高温超電導磁石オプション – High- T_c cryogen-free superconducting magnets for high field relaxometry: Manufactured by HTS-110; T_1 and T_2 measurements ideal from 10 MHz to 125 MHz (^1H Larmor frequency); Extends the NMR field range up to 3 Tesla either in combination with Spinmaster or SMARTracer™ or can be run alone through the new more powerful Stelar PCNMR console.



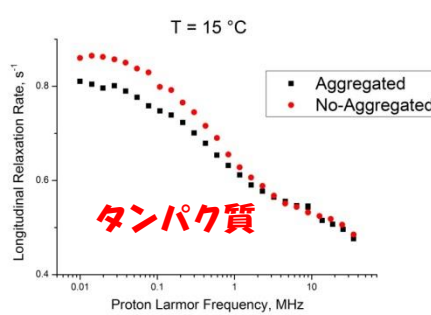
HTS-110

「FFC-NMR Relaxometry Applications が拓くアプリケーションの代表例のご紹介」

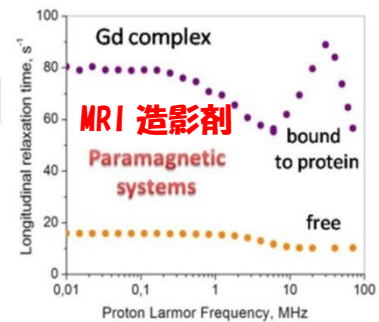
PHARMACEUTICAL / BIOTECHNOLOGY	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Paramagnetic agents (MRI contrast/Therapeutic nanoparticles) ✓ Protein dynamics (aggregation states, cross-linking) ✓ Formulations (hydration states, crystalline states, micelles for drug delivery)
OIL, GAS & PETROLEUM	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Rock core studies (wettability, porosity, pore size distribution) ✓ Aggregates in crude oil
POLYMERS	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Polymer dynamics (cross-linking density, fillers) ✓ Quality control
HIGH-TECHNOLOGY / ELECTRONICS	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Battery electrolytes (Lithium dynamics) ✓ Liquid crystal phase studies
FOOD	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Quality control & shelf-life ✓ Counterfeit products (DOC/DOGC/DOP product control)



NMRD of food before and after expiry



NMRD of aggregated and non-aggregated proteins



NMRD of Gadolinium contrast agents

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！

STELAR s.r.l. via E. Fermi 4, 27035 Mede (PV), ITALY, Tel.+39-0384-820096 Fax.+39-0384-805056

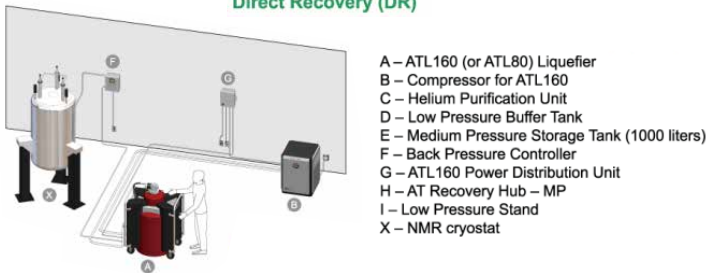
マルチシステム対応

NMR用 液体ヘリウムリカバリー装置

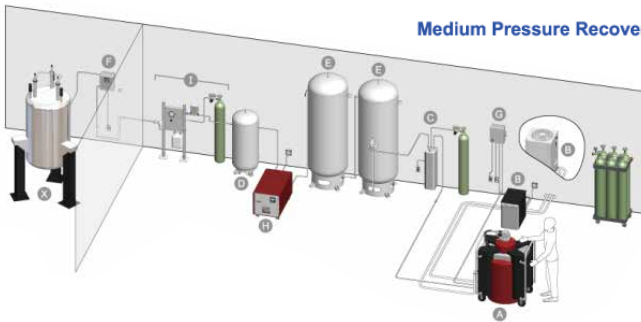
複数台のNMRより蒸発したヘリウムガスを回収し、リカバリーを行うことで、
直面している供給不安・価格高騰といったヘリウムの諸問題を解決！
装置の安定稼働とランニングコストの削減を実現します。

リカバリーシステム構成例

Direct Recovery (DR)



Medium Pressure Recovery (MPR)



ATLシリーズの特徴

マルチシステム対応

複数のNMRからヘリウムを回収し、再凝縮を行うことが可能。

スペクトルへの影響なし

回収配管で接続するため、ATL設置による測定への影響はありません。

簡便なトランスファー

内部にヒーターを内蔵しており、圧力調整が可能な為、トランスファー時にガスボンベやバルーンは不要です。

タッチパネル式完全自動制御

設定や操作は、タッチパネルで行うことが可能。稼働開始後は完全自動制御です。



Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens.

国内実績

- ・九州工業大学
- ・沖縄科学技術大学院大学

海外実績

- ・サラゴサ大学
- ・カリフォルニア大学
- ・ジョージア大学 他

型式	ATL80	ATL160
再凝縮能力	12 L/日	22 L/日
デュワー容量	80 L	160 L
コンプレッサー	空冷式	分離型空冷式 or 水冷式
消費電力	3.8 kW ~ 5.4 kW	6.5 kW ~ 7.5 kW
設置寸法	530 mm×1370 mm×1440 mm	790 mm×1780 mm×1550 mm

※再凝縮能力は使用するヘリウムの純度や圧力によって異なります。設置寸法はWxDxHです。



Quantum Design Japan

日本カンタム・デザイン株式会社

〒171-0042 東京都豊島区高松1-11-16 西池袋フジタビル
Tel:03-5964-6620 Fax:03-5964-6621 Email:info@qdj.co.jp

<http://www.qd-japan.com/>

液体ヘリウム消費ゼロ

NMR用 液体ヘリウム蒸発防止装置

NMR単体にて設置することにより、液体ヘリウム消費ゼロを実現する
ゼロボイルオフ型の装置。冷凍機の振動は、除振構造により最小限に抑えられており、
常時稼働中でも測定に影響を与えません。



NMRに搭載したHe蒸発防止装置



凝縮ユニット

JHRSシリーズの特徴

完全無冷媒型(液体ヘリウム供給不要)

クライオスタット内の圧力を検知し、圧力信号に応じて冷凍能力を制御することで、液体ヘリウムを一定に保ちます。

スペクトルへの影響がない

冷凍機の振動は、独自の除振構造により最小限に抑えられているため、常時稼働中でも測定に影響を与えません。

既設NMRへレトロフィット可能

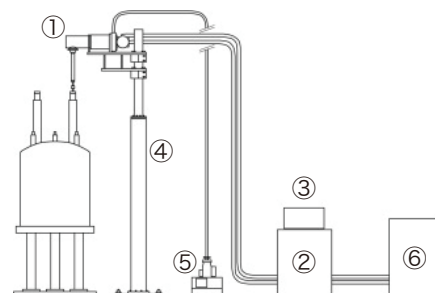
すでにお持ちのNMRへ後付が可能です。
Agilent, Bruker, JEOLのNMRで動作実績があります。

完全自動制御

稼働開始後は、全自動・無人運転のため、長期休暇中でも安心です。

JHRSシリーズ機器構成

- ① 凝縮ユニット
- ② ヘリウム圧縮機(水冷)
- ③ コントローラー
- ④ 専用架台
- ⑤ ターボ分子ポンプ
- ⑥ 冷却水循環装置



型式	JHRS-100CW-N	JHRS-100CW-O	JHRS-150CW-O
蒸発防止能力	0.6 L/日		0.9 L/日
適応マグネット	300 MHz ~ 500 MHz		300 MHz ~ 600 MHz
GM冷凍機	形式	RDK - 408D2	RDK - 415D
	冷凍能力	1.0 W at 4.2 K	1.5 W at 4.2 K
ヘリウム圧縮機	形式	F - 50 L	
	消費電力	6.5 kW ~ 7.5 kW	

※蒸発防止能力は使用するヘリウムの純度や圧力によって異なります。
JHRS-100CW-Nは1台でヘリウムと窒素の再凝縮が可能な製品です。

<納入実績>

・徳島文理大学
・東京理科大学 他

※NMR主要メーカー装置に実績あり

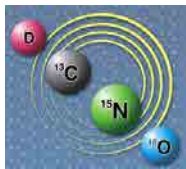


Quantum Design Japan

日本カンタム・デザイン株式会社

〒171-0042 東京都豊島区高松1-11-16 西池袋フジタビル
Tel:03-5964-6620 Fax:03-5964-6621 Email:info@qdj.co.jp

<http://www.qd-japan.com/>



安定同位体標識試薬

(¹³C ¹⁵N D ¹⁷·¹⁸O)

Cambridge Isotope Laboratories.Inc(C.I.L)

- NMR用
アミノ酸 糖 塩安 CHL培地 NMR溶媒 ユビキチン
- トレーサー試験用
硫酸 硝酸塩 尿素 被覆肥料 ¹³CO₂ NaHCO₃ 他
- メタルアイソトープ各種
Fe Cu Ni Cr Cd Ca Na K 他
- 希ガス 及び混合ガス
He Ne Ar Kr Xe他



<その他、下記メーカー品の販売代理店もしております。>

クロレラ工業(株)(日本)、ISO FLEX社(ロシア)、ICON社(米国)、OMICRON社(米国)

安定同位体受託分析

安定同位体比質量分析計(IR-MS)を導入し、安定同位体(¹³C ¹⁵N D ¹⁸O ³⁴S)の受託分析を行っています。

- 測定項目
¹³C ¹⁵N D ¹⁸O ³⁴S の Natural 及び Tracer
- 測定機器
サーモ フィッシャー サイエンティフィック(株)製
DELTA plus XL DELTA plus Advantage
DELTA V Plus、DELTA V Advantage 他



SIサイエンス(旧 昭光通商(株)安定同位体G)は国内唯一の¹⁵N濃縮メーカーです。¹⁵N標識化合物のほか、永年にわたりCIL社(ケンブリッジアイソトープラボラトリーズ)の国内販売代理店として、安定同位体(SI)標識アミノ酸をはじめ様々なSI標識化合物をご提供しております。また、SIメタルやSI標識希ガスなど、安定同位体関連商材を幅広く取り扱っております。

 **SI サイエンス株式会社**

〒345-0023 埼玉県北葛飾郡杉戸町本郷473-3

TEL:0480-37-1555 FAX:0480-37-1533

E-mail:isotope@si-science.co.jp

URL:http://www.si-science.co.jp/

NMRプローブ/アクセサリ

NMR Probes and Accessories



タンパク質用構造解析・計算プログラム

Combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications

Cyana



固体NMR用アクセサリ

Solids NMR Accessories



リアルタイムコラボレーション電子ノート

Electronic Laboratory Notebook

Biovia Notebook

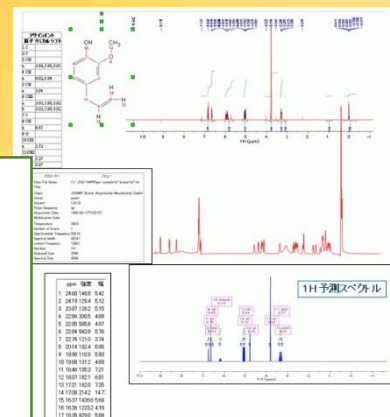


- 現在入手可能な電子実験ノートの中で最も使いやすく、また最も迅速に展開可能な製品
- 紙ベースのプロセスに対して20%の効率改善を実現

高性能NMRプロセッシングソフトウェア

Multivendor, multiplatform software for visualization, Processing, analysis and reporting of NMR data

Mnova



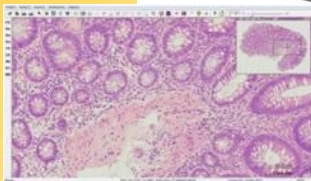
- 高性能・低価格のNMRデータ処理・レポートツール
- 多彩な編集機能
- マルチNMRベンダーのファイルフォーマット対応

小型・高性能バーチャルスライド

Compact Digital Microscope

Fino (フィノ)

new



- 顕微鏡画像をデジタル化
- ライブモードとスキャンモードで手軽な閲覧

プローブスキャン型高速原子間力顕微鏡

Probe-scanning High-speed Atomic Force Microscope

new

NanoExplorer PS-NEX

- タンパク質やDNAなど生体分子のナノスケール動画撮影の実現
- 光学顕微鏡と組み合わせて使用可能
- 試料サイズが大幅緩和



卓上型電子スピン共鳴スペクトロメータ

Benchtop Electron Spin Resonance Spectrometer

Micro-ESR™

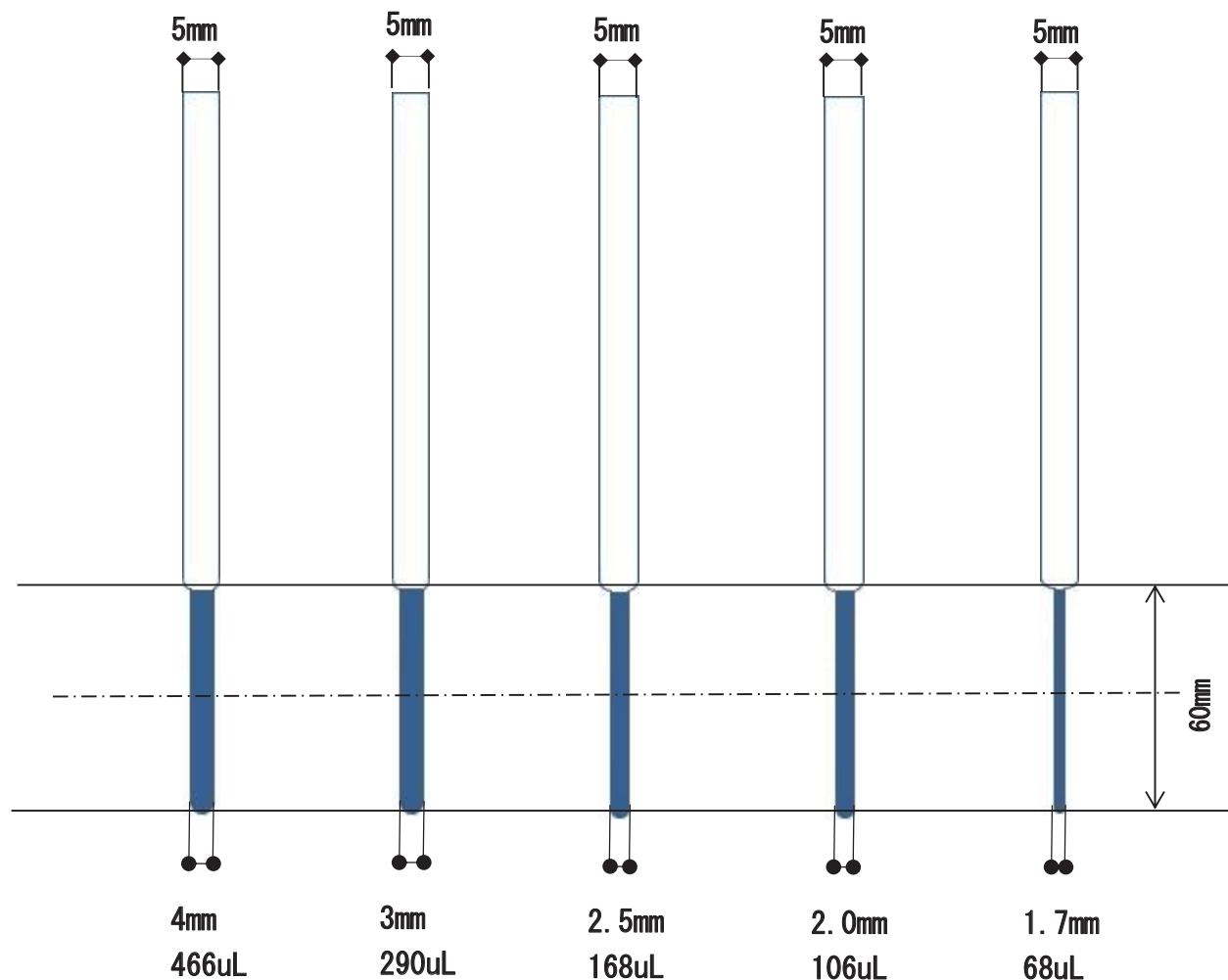
new



- 世界最小の卓上型電子スピン共鳴スペクトロメータ
- Windows搭載
- タッチパネルによる簡便操作

5mmφ マイクロボトムチューブ

溶媒量あるいはサンプル量そのものを少量にして測定したい方で対称マイクロ形試料管にない溶媒な場合ご使用ください。5mmφ マイクロボトムチューブは上部が 5mmφ なので 5mm のスピナータービンが使用できます、特にオートサンプラーをご使用のお客様にはプローブを変更してもスピナータービンを変更しなくてよい、あるいは 5mm のプローブでもそのまま使用できるメリットがあります。下部が 1.7mmφ、2mmφ、2.5mmφ、3mmφ、4mmφ のラインアップがあります。



種類と価格

型式	全長	上部外径	下部長さ	下部外径	下部内径	下部内径公差	価格	サンプル量(高さ 60mm の時)uL
SP-501	180mm	5mm	50mm	1.7mm	1.2mm	±0.01mm	3,500 円	78
SP-502	180mm	5mm	50mm	2mm	1.5mm	±0.01mm	3,500 円	106
SP-503	180mm	5mm	50mm	2.5mm	1.9mm	±0.01mm	2,500 円	168
SP-504	180mm	5mm	50mm	3mm	2.5mm	±0.01mm	2,500 円	290
SP-505	180mm	5mm	50mm	4mm	3.2mm	±0.01mm	2,500 円	446

5mmφ の 60mm の液高の時の容量は 800uL です。

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・お求めやす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

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。

抗体用

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も可能です。

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



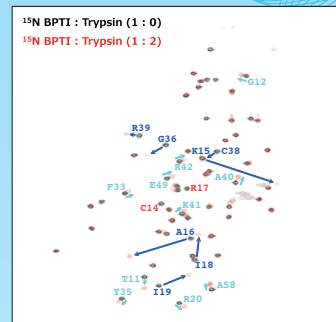
安定同位体標識タンパク質合成キット

無細胞[®]くん SI

迅速・簡単なタンパク質大量合成用キットです(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。

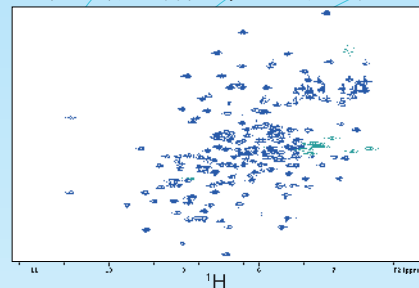
製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格(円)
A29-0059	無細胞くんSI	1キット	-80℃	55,000

BPTI プロテアーゼインヒビター 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：理化学研究所生命分子システム基盤研究領域 NMRパイプライン高度化研究チーム殿

無細胞くん用 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。

※ Biomolecular NMR専門カタログをご用意し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



4・5倍の感度向上！

固体NMR用 極低温プローブ

<http://www.j-resonance.com/>

クライオコイル MAS プローブは、固体高分解能NMR用の「極低温プローブ」として、試料を室温下で高速回転させながら、検出系の冷却により高い信号雑音比を実現。極低温プローブ技術を応用した4 mm チューナブル クライオコイル MAS プローブは、従来の室温プローブと比較して4.5倍の感度を達成しました。(磁場強度14.1 T ^1H 共鳴周波数 600 MHz)



111 kHz MAS Probe

- Gain new insights from your NMR analysis

Brukerの111 kHz 超高速MASプローブは、通常では測定困難な固体生体試料の構造やダイナミックスの研究に必要な測定を実現する画期的なプローブです。

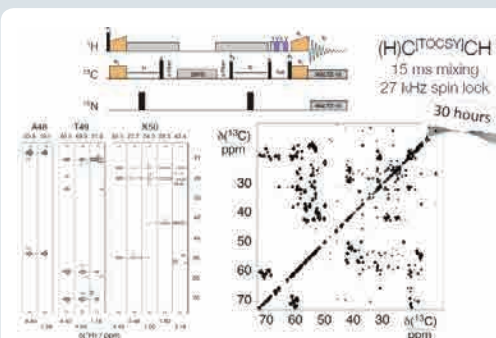
0.5 μ lという極微量のサンプル量と超高感度により、サンプル量や回転速度に制限されることなく、研究対象となる試料で固体NMRの測定が可能になります。

また、新たに開発されたマジック角回転制御システムMASIIIは超低速から超高速回転の幅広い回転条件下においてでも安定に回転を制御し、111 kHz 超高速MASプローブの性能を最大限に引き出します。

111 kHz 超高速MASプローブはどのBrukerの固体システムにも取り付け可能であり、サンプルパッキングのための専用の精密作業ツールと試料管をチェックするための実態顕微鏡が付属します。

- 111 kHzの超高速MAS
- MASIIIによるMASの高精度制御
- 材料分野とバイオ分野の双方に対応できるラインアップ
- 使いやすさを追求したサンプリングツール
- 微量サンプル量ながらも超高感度
- 広帯域の励起と高効率なrecouplingを可能とする非常に高いRF性能

GB1 side chain connectivity



Side chain connectivity in a microcrystalline GB1 detected by use of TOCSY based solid-state sequences.

広告掲載一覧

(順不同)

株式会社エム・アール・テクノロジー

日本カンタム・デザイン株式会社

SIサイエンス株式会社

株式会社エルエイシステムズ

株式会社シゲミ

大陽日酸株式会社

日本電子株式会社

ブルカー・バイオスピン株式会社