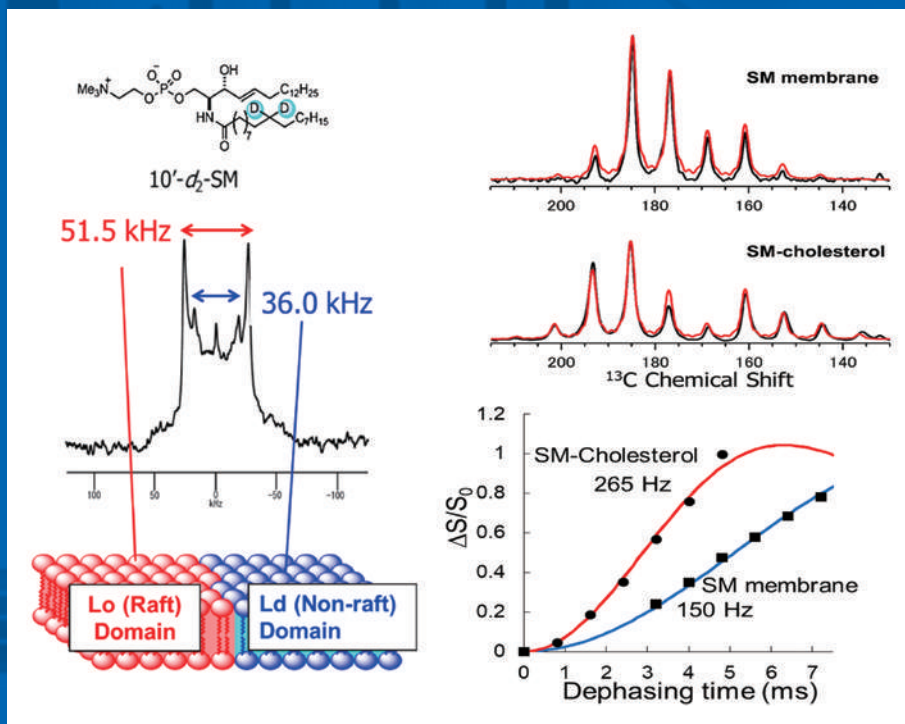


種々のフラーレンと内包化学種の¹H NMR化学シフト



脂質の²H NMRスペクトル、¹³C CP/MAS NMRスペクトルとC-N REDOR 曲線



表紙の図

(上段)：種々のフラーレンと内包化学種の ^1H NMR化学シフト (図1)

京都大学化学研究所 村田 靖次郎

(下段)：脂質の ^2H NMRスペクトル、 ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルとC-N REDOR曲線 (図5、8 抜粋)

九州大学大学院理学研究院化学部門 松森 信明

NMR

BULLETIN OF THE NUCLEAR
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN

Vol. **8**

October 2017

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

●会長メッセージ	
What's new?	4
竹腰 清乃理	
●巻頭エッセイ	
私のNMR装置遍歴	6
高橋 征三	
●解 説	
脂質ラフトのNMR解析	9
松森 信明	
NMRのハードウェアに関するメモ 3. 主に受信系について一分光計編	17
根本 暢明	
●トピックス	
Pure shift NMRを理解するためのZangger-Sterk法とPSYCHE法入門	25
堤 遊	
小分子内包フラーレンの有機合成とそれらの ¹ H NMRシグナル	33
村田 靖次郎	
●若手ポスター賞選考経緯報告	
第55回NMR討論会(2016)若手ポスター賞について	38
最優秀若手ポスター賞 (JEOL RESONANCE 賞)	
パルスODMRを用いた磁気センシング	40
田辺 竜太郎、五十嵐 龍治、白川 昌宏	
優秀若手ポスター賞 (大陽日酸賞)	
固体NMRによる光駆動型ナトリウムイオンポンプKR2のpH変化に対する レチナール結合サイトの構造変化の解析	42
重田 安里寿、伊藤 奨太、沖津 貴志、和田 昭盛、井上 圭一、神取 秀樹、川村 出	
優秀若手ポスター賞 (昭光サイエンス賞)	
Simultaneous observation of ¹ H detected ¹³ C/ ¹ H and ¹⁵ N/ ¹ H 2D correlation solid-state NMR spectra in natural abundance at very fast MAS > 60 kHz	44
You-lee Hong, Yusuke Nishiyama	
若手ポスター賞 (3社合同賞)	
NMRとSAXSによるRNA結合性マルチドメインタンパク質Nrd1の構造解析	46
小林 彩保、永井 敢、佐藤 亮介、伊藤 隆、杉浦 麗子、三島 正規	
多孔性配位高分子の空隙に物理吸着させた気体分子のダイナミクス	48
田村 優実、犬飼 宗弘、中村 浩一	
0.2T永久磁石MRIを用いた屋外樹木中の水輸送計測	50
長田 晃佳、福田 健二、巨瀬 勝美、寺田 康彦	
細胞内におけるALS関連タンパク質SOD1のフォールディングに関する動的構造解析	54
岩川 直都、森本 大智、ヴァリンダ エリック、菅瀬 謙治、白川 昌宏	
NMR-NQR二重共鳴法を用いたNQR信号高感度化	56
大平 龍太郎、大田垣 祐衣、韓 猛、宮戸 祐治、赤羽 英夫	
Satellite transition selective ²⁷ Al/ ¹ H D-HMQC experiment at very fast MAS for the determination of quadrupolar coupling constants	60
Nghia Tuan Duong, Manoj Kumar Pandey, Yusuke Nishiyama	
●NMR基礎講座	
常磁性効果の基礎と生体高分子解析への応用	64
八木 宏昌	

固体交換NMRにおける偏極移動 大橋 竜太郎	71
●NMR史点描	
わが国のNMR事始め 寺尾 武彦	79
●海外学会報告	
若手研究者渡航費助成金について	84
EUROMAR2017参加報告書 山田 隼嗣	86
The 20th ISMAR meeting参加報告書 若本 拓朗	88
19th IUPAB and 11th EBSA congressの参加報告書 末元 雄介	89
●技術レポート	
NMRサンプルチューブの話 関 充男	90
●NMR便利帳	
生体系NMRの解析ツール(機械学習と自動化) 小林 直宏	94
●NMR研究室便り	
石川県立大学 食品科学科 生体分子機能学研究室 小椋 賢治	99
九州大学先導物質化学研究所 物質機能評価センター 出田 圭子	102
株式会社三井化学分析センター 構造解析研究部 佐藤 浩子	105
第一三共株式会社 分析評価研究所 丸吉 京介	109
●若手NMR研究会便り	
かんぼの宿紀伊田辺で開催された第18回若手NMR研究会便り 牟田 寛弥	112
●ICMRBS報告	
第27回生体系磁気共鳴国際会議ICMRBS京都大会の報告	115
●NMR学会編新刊出版のお知らせ	
新刊書籍紹介 内藤 晶	118
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	120
2. 第56回NMR討論会(2017)	122
3. ニュースレターの記録	125
4. 日本核磁気共鳴学会規約	127
5. 日本核磁気共鳴学会機関誌投稿規程	131
6. 賛助会員名簿	133
7. 日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員会委員名簿(2017年度)	134
8. 編集後記	135

What's new?

日本核磁気共鳴学会会長

竹腰 清乃理

takeyan@kuchem.kyoto-u.ac.jp

日本核磁気共鳴学会 (NMR学会) は1961年の第一回NMR討論会を前身として、2001年に設立された学会です。その設立趣旨は「会員の間で生き生きとNMRに関する研究交流ができるように、NMR討論会の母体としての学会開催の支援、若手研究者の海外渡航支援、NMR学会会員のニュースレターの発行、NMR学会機関誌の発行等を学会活動事業の柱にし、さらに、学会事業の原点であった、国際会議の開催支援を強化するために設立された」であり、会員の研究交流のために存在する組織です。主力の交流の場は年に一回開催されるNMR討論会で、2016年度は広島 (広島大) で行われました。また、2016年の夏に、京都で国際的な磁気共鳴の学会の一つである第27回生体系磁気共鳴国際会議 (ICMRBS) を共催しました。この場をお借りして、お世話してくださった幹事の方々や参加者の皆様に、お礼を申し上げます。今年度のNMR討論会は南大沢 (首都大学) で11月14日から行われます。例年の通り、チュートリアルレクチャーを前日の11月13日に予定しています。幹事の先生に、あらかじめお礼を申し上げます。会員のみなさまのふるってのご参加を期待しています。また、国際学会の誘致も引き続き行っています。良いニュースをお伝えできるよう、担当の理事・評議員・幹事の先生方、よろしくお願い致します。

私がNMR討論会に参加する一つの理由は、当然、NMRの新しい技術・応用を勉強することです。NMRは1946年のPurcellやBlochらによる最初の実験以来、高分解能化による化学シフトやJ結合の発見、二次元法の発展に伴うタンパク質などの生体分子の立体構造解析、マジック角試料回転とデカップリングによる固体高分解能NMRの発展、四極子核のNMR、磁場勾配法による拡散研究・NMRイメージングなどなど数多くの新しいアイデア・実験が行われてきています。実際に、NMR討論会でも常に最新の手法・応用の発表があ

り、それを勉強することが学会に出席する楽しみであります。最近も、いわゆるbig dataの利用による代謝解析やmicrofabricationによる微細加工を用いたハードウェア・検出法などに目を引かれています。このようにNMRはNMR発のアイデアもありますが、他の分野のいろんな技術をどん欲に取り込んで発展してきているのだと思います。今後は、はやりのAIを取り込んで、我々の職業は奪われてしまうことになるのでしょうか……? このような多様で継続的な発展を可能にしているのは、一つに、spin系の挙動が量子統計力学で記述できること、および、rfパルスや試料回転などで精密に制御できるからであろうと思います。NMR学会では、新しいNMR実験の発想を生み出してもらうためにNMRのブラックボックス化を防ぐことなど、会員のみなさまへの情報発信を引き続き行いたいと考えています。その一助としての、NMR学会ニュースレターや本学会機関誌の発行を今後も充実させていきたい、担当の理事・評議員の先生の引き続きのご協力をお願い致します。

さて、私が討論会に参加するもう一つの動機は「出会い」であります。楽しんだ論文や本の実際の著者の方にお会いして質問したり、自分の発表内容について話しかけてきてくれた方々と知り合いになり、その後の共同研究につながるなど、学会は集まった研究者の方々と交流する非常に良い場があります。自分の抱えている問題の突破口・ヒントや新しい研究のきっかけを得るということもありますが、私は、単純に、変わった方と知り合いになる楽しみが実は大きいです。人は誰しも自分が偏差値50付近だと考えているもので、逸脱した方を見つけると、変わった人だな (褒め言葉です) と思うものですが、実は、自分が $>2\sigma$ なのかもしれない (自省)……。そういうユニークな方々と馬鹿話をしているうちにアイデアを思いつくことも、ごく希にありますが、最近は単に楽しむだけでも充分だと思いはじめています。

表題にした“What's new?”というのは、ポストドク時のボスの故McDowell先生が毎朝挨拶代わりに私に投げかける「お言葉」で、苦し紛れに「これこれのような新しい結果が・アイデアが……」などと、その場しのぎで景気の良いことを言うと、数週間後に「あれはどうなった」とのご下問があ

り、心の中で「言わなきゃ良かった」と思うことも良くありました。今では、自分がNMR討論会に参加するときのキーワードになっています。今年はどんなWhat's newなNMRや人物に出会えるのだろうか……。

私のNMR装置遍歴

旧日本女子大学理学部物質生物科学科

高橋 征三

takahashi.seizo@gmail.com

1969年、はじめてNMRに出会った。約1年半かけて合成したジヌクレオチドの全量を使って、味の素の中央研究所で活躍しておられた甲斐荘先生に、Varian社のXL-100で ^{31}P -NMRを測定して頂いたのである。一晩かけて積算したスペクトルを指してここに信号があると言われたが、ノイズの塊りにしか見えなかった。最終的に積算を重ね、S/N比が2か3ぐらいで、かろうじて ^1H - ^{31}P 間のスピン結合が推定できた。当時は現在では考えられないほど電源や装置が不安定で、先生は測定中、研究室に寝泊りして装置を見張ったはずである。確か信号積算装置(CAT)が日本に初めて輸入された時期だと思う。私は人、装置、時期の点で、じつに幸運に恵まれていた。

1972年に宮澤研が発足し、研究室立ち上げにあたり、装置の選定作業から勉強させて頂いた。宮澤研では、永久磁石で世界唯一の90MHzの装置、日立製R-22が採用された。永久磁石は電磁石よりは安定とはいえ、磁場強度が温度で鋭敏に変化する。磁石は大きな発泡スチロールの箱の中に入れ、温度を比例制御装置で制御していた。磁場変動を実用レベルに抑え、価格を電磁石NMR装置なみに抑えるためには、技術的にかなり無理を強いられたと思う。例えば、プローブはチューニング回路を固定し部品点数を減らしていた。使用者としては、周波数掃引中に磁場均一度がフラフラ変動し、見えるはずのピーク分裂がつぶれてしまうのを眺めるのは相当にストレスがたまった。納入された信号積算装置は、プラスとマイナス信号が別々の電子回路を通り、ゼロ信号を定めるバイアス電流が不安定なため、ゼロレベル近傍が不連続につながるという、実に不思議な装置だった。磁場変動に対しては、シグナルロックという方法で掃引ごとにピーク位置を合わせていたが、積算回数が増えるにつれピークの線幅が広がるのは避けられなかった。この経験から、甲斐荘先生が測定した ^{31}P -NMRは、3日積算したにもかかわらず、しっかり高分解能を維持した

驚異的な結果であると痛感した。

確か1977年に、宮澤研に日本で2番目にBrukerのWH-270という超伝導パルスFT-NMR装置が入った。R-22で一日積算した結果が、感度の点で1パルススペクトルにも及ばないことを体験し、NMRの研究は装置が死命を制することを痛感した。磁場が安定し、測定時間中の磁場変動に関しては、ほとんど気にならなくなり、ブロック積算法もほとんど忘れ去られた。スペクトル分解能で競争する時代もここで終わった感じがする。

1979年から約2年、CMUのメロン研究所でDadoc教授が設計製作した250MHzの装置を使った。部屋に入ると正面に複雑なピークが林立する、およそ長さ10mのチャートが貼ってあった。装置が完成した記念に最初のスペクトルとしてワインを測定し、同じワインで乾杯したそうである。水溶液なのに分解能が0.1Hzを切っていたと思う。この超高分解能スペクトルには戦慄を覚えた記憶が鮮明に残っている。

この装置はリボン状超伝導コイルに外部から電流を供給する形式だったので、磁場は電磁石なみに変動した。液体窒素は毎日、液体ヘリウムは毎月電磁バルブで自動補充していた。コンピュータは廊下を隔てた隣室の一角を占める巨大なもので、くもの巣のようにケーブルが這い回っていた。コンソールは研究用のため、装置の構成を自由に変更できた。Dadoc教授から教わったアンプの直線増幅部分だけを使う正当法では感度が稼げないので、中間アンプ出力を ^{19}F 用アンプを加えて増幅し、ケーブルやフィルター、プローブ等を試行錯誤で組み替えた。とくに注目領域に影響しないフィルターをはずした効果は大きかった。その結果、例えば当初は1晩積算する必要があったものが、2時間以内に短縮できた。これは極めて貴重で、もとのスペクトルはノイズしか見えない。そのベースラインを一定に保つよう、オシロを凝視しながら、位相ノブを手から離すことができない。突如位相がジャンプするの

で、うっかり居眠りすると、位相がずれた共鳴が混ざり、再測定が必要だった。

1980年、Dadocは同一方式で600MHzの超伝導磁石の開発に成功し、世界で2番目のユーザになる幸運を得た。600MHzの磁石は隣室に設置され、250MHzのコンソールからケーブルをドア越しに接続した。周波数を変更するだけで測定できたので、スペクトルを比較するとき、非常に便利だった。

前年にHo教授のもとにBrukerの300MHzワイドボアの装置が入った。待望のパルスFT-NMR装置である。設置の世話役を買って出て、磁石の組み立てから逐一立ち会った。初期不良は1年以上続き、技術者が来るまで、故障の原因を特定し応急手当をする勉強をした。装置が稼働するや早速20mm試料管にヘモグロビンを入れ、 ^{13}C 測定を試みた。当時、ノイズデカップルしか知らなかったもので、1時間後にはサンプルが過熱されてゲルになっていた。この装置では、Ho教授が電話で聞きかじった情報をもとに、溶媒信号非選択パルス列の先駆となったJump and Returnパルス($90_x^\circ-90_y^\circ$)を作り、愛用させてもらった。しかし常磁性シフトの定量的変化を追跡していた私には、相関NMRの方がはるかに使いやすかった。

1981年から約10年間、永山先生の世話になり、JEOLの装置を使わせてもらった。Decのミニコン^{*1}で制御された、近代的な装置で、紙テープやテレタイプが過去のものになっていた。ここではトップダウン構造化プログラムの洗礼を受け、コンピュータ経由でしか装置を制御できないストレスは予想以上だった。機械に支配されている雰囲気はどうしてもなじめなかった。スピナーの構造も気になった。落下の衝撃で、試料管の位置を正確に制御できないのである。不幸にしてこの欠点は今も改善されていないようである。

1992年、日本女子大にNMR装置を購入することになった。調査の結果、メーカ各社の基本性能は横並びだったが、使い勝手では依然として差があった。性能チェックに血液中の80ppmの常磁性シフトの測定を依頼し、測定に入る前の時間やスペクトル処理の様子を観察した。パルスの綺麗さ、アンプの残留ノイズ、フィルターの性能を手っ取り早く評価できる最適の試料だと思ったからである。結果はJEOLがベースラインを除き一番求める形に近かったが、永山研の山崎さんがボードに手を入れて観測可能になったと聞いた。私はかねがね水溶液と有機溶媒サンプルでは、アンプの使い方が異なる

べきだと考えていたので、じゅうぶん納得できる結果であった。次点がBrukerで、ベースライン補正にかなり苦労したあとが見えた。Varianはベースラインのうねりと信号の区別すら怪しかった。

臨床用MRI装置の操作を荻野さんのところで経験していたので、その技術が高分解能の世界に早晚導入されると予想した。JEOLはまだ開発予定もなかったが、Bruker製品の購入にあたって、グラジエント機能をつけるよう粘ったが、ガードが固く一切譲歩しなかった。装置が設置されたすぐ後にグラジエント付きの新製品の発表があったので、騙された感じがしたのは当然であろう。

この頃からデジタル技術は急速に進歩し、ハードとソフトの両面でブラックボックス化していった。唯一の例外はプローブ部分で、未だに職人の世界である。H-Xプローブの修理を、友人のWanに依頼したところ、感度が約10%改善した。彼によると磁化率調整した銅線よりも、日本から送ったオーディオ用の無酸素銅線の方が分解能や感度の点で優れているとのことだった。

その後も、BrukerとJEOLの装置を借り歩いたが、最近ではNMR装置の進歩が遅くなったように思う。完成の領域に入ったのかも知れない。しかしスマホの急速な普及を見ると、NMRが時代に取り残される危惧を感じる。パルス制御などMRIの最新技術を高分解能の世界に導入するタイムラグが大きすぎないだろうか。1量子と2量子遷移スペクトルの同時取り込みを試みたとき、手元の装置ではパルス位相の不安定さに辟易したが、最近はそのズレがほとんど気にならない。やがて位相誤差をキャンセルするCYCLOPS位相回しは過去の遺物になるのではないだろうか。

現在いちばん気になることは、メモリーが安価になったにもかかわらず、未だに昔のイメージでソフトやハードが設計されていることである。ADCの高速化にともない、FIDはオーバーサンプリングとデジタルフィルター処理が標準仕様になった。しかるに中身はサンプリングデータの加重平均だけである。転送速度の遅いハードディスクに圧縮データを保存するためである。これではオーバーサンプリングの利点をほとんど殺しているとしか言えない。例えばデータ保存の前に、次のようにデータを並べ替えてはどうだろうか。

測定ごとのスペクトル強度、位相、共鳴周波数の揺らぎは絶対に避けることができない、必然的に積算はスペクトル劣化を助長する。そこでデータ揺

らぎの大きい順にデータを並べ替え、主要部分だけ足し合わせて合成FIDとしてメモリーに保存するのである。図1はFIDの実数部分、虚数部分を計算し、得られた結果を複素数に戻してFFT計算した結果である。ロックをはずした状態でも、主値の第1成分(PC1)^{*2}は90%程度の強度を示し、PC1はノイズも含めて従来の積算スペクトルと一致した。1%以上の強度を持つ主値の4成分を足し合わせると、本来のスペクトルとほぼ同じ線幅のスペクトルが得られた。つまりこの方法で測定中の磁場変動はほとんど補正できたことになる。実現は容易ではないだろうが、FIDをメモリーに保存する前に、最初の256点をGPUで高速計算し、残りを従来の積算FIDで接続すればどうだろうか。メモリー容量が問題になるならば、GPUとFPGA^{*3}の助けを借りてランダムサンプリングで圧縮する方法もあると思うのだが。要するにNMR装置はもっと発展する余地があると主張したい。

注 釈

^{*1} DecはDigital Equipment Corporationの略で60～90年代にかけてミニコンで世界をリードしたアメリカの

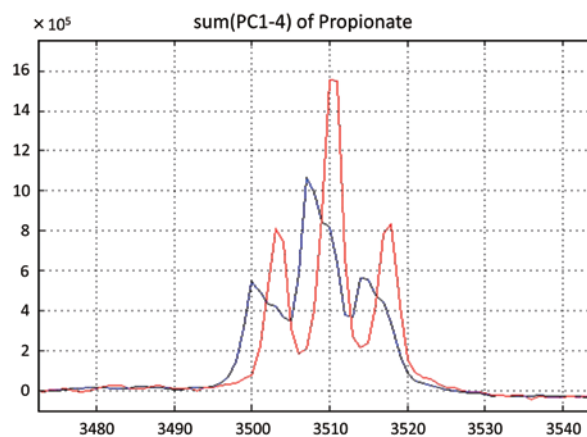


図1

ロックなしの1パルスの測定を32回保存してFIDの主値解析を行った。青色は一番大きい変動成分をFTした結果を示す。通常の積算スペクトルに相当する。赤色は変動の大きい上位4成分を足し合わせてFTした結果を示す。本来の1パルススペクトルと一致した。

コンピュータ企業であり、NMR装置の制御用としても使われていた (<http://museum.ipsj.or.jp/computer/mini/history.html> など参照)。

^{*2} 多変量解析の1種類である主成分解析で算出される第1主成分 (Principal Component 1: PC1) である。

^{*3} Field Programmable Gate Arrayの略、例えば <https://japan.xilinx.com/japan/fpga-koza/chapter01.html> などを参照のこと。



高橋 征三 (たかはし・せいぞう)

1967年 千葉大学薬学部卒
 1972年 東京大学薬学系大学院博士課程修了 薬学博士
 1972～80年 大学理学部生物化学教室助手
 1978年 ピッツバーグ大学 (Senior Research Associate)
 1979～80年 カーネギーメロン大学 メロン研究所 (Senior Research Associate)
 1981年 日本女子大学家政学部家政理学科一部化学系講師
 1984年 同助教授
 1989年 同教授
 1992年 理学部物質生物科学科教授
 2009年 定年退職
 2009年～ (株)シゲミ、(株)バイオネット 技術顧問

脂質ラフトのNMR解析

九州大学大学院理学研究院化学部門

松森 信明

matsmori@chem.kyushu-univ.jp

はじめに

筆者がNMRを本格的に使い始めたのは、博士課程の学生として、橘和夫教授、村田道雄助教授（現大阪大学教授）の下で行った天然物の構造決定に遡る。当時開発した手法が、遠隔C-Hスピン結合定数を用いた天然物鎖状部分の相対立体化学決定法、いわゆるJBCA (*J*-based configuration analysis) 法であった^[1]。この手法は被引用数が400を超え、発表から20年を経た現在でも年間30回程度引用されるなど広く天然物の分野で用いられていることは研究者冥利に尽きる。1999年に大阪大学村田研究室の助手として採用されて以降はこの手の研究から距離を置き、抗真菌剤 Amphotericin B や海産天然物 Amphidinol 3 のような膜作動性薬剤の作用機構のNMR解析^[2]や、脂質ラフトのように脂質膜そのものの解析へと研究をシフトしてきた。特にNMRに関しては膜タンパク質の解析を目指した研究が盛んに行われている中、脂質そのものをNMRの研究対象とすることは若干時代錯誤の印象を与えるかもしれない。しかし筆者の出自が天然物有機化学であること、脂質も天然有機化合物であることから、筆者らにとって脂質を研究対象とすることは自然な流れであった。本稿では脂質ラフトのNMR解析について紹介する。この手の研究は他では行われていないため、主に筆者らの研究紹介になることをご容赦頂きたい。

脂質ラフト

20世紀の中頃まで、細胞膜は脂質二重膜の外側をタンパク質で被覆された静的なものと考えられていた。その後、1972年に Sanger と Nicolson によって流動モザイクモデルが提唱され^[3]、脂質膜の理解は一気に進むことになる。このモデルは、脂質二重膜が二次元流体を形成し、そこにモザイク状に膜タンパク質が浮かんでおり、脂質および膜タンパク質は自由に側方拡散できる、というものである。しかし、1970年代後半から90年代にかけ

て、主に人工脂質膜の生物物理研究から、脂質膜は必ずしも均質な流体ではなく、膜の組成によってはドメイン構造と呼ばれる微小膜領域が存在することが示された。例えば、スフィンゴ脂質とコレステロールは秩序性の高い膜領域 (liquid ordered domain, Lo ドメイン) を形成し、秩序性の低い膜 (liquid disordered domain, Ld ドメイン) と相分離する^[4]。Simonsらは、このような人工脂質膜の知見を取り入れ、自身の細胞内小胞輸送に関する研究結果を説明するために細胞膜にも人工脂質膜に見られるようなドメインが存在すると考え、これを「脂質ラフト (lipid raft)」と命名した (図1)^[5]。この脂質ラフトは「細胞膜という海に浮かんだいかだ (raft) のような構造」との意である。脂質ラフトは、スフィンゴ脂質とコレステロールから構成されるナノスケールの密な膜領域であり、また GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカータンパク質をはじめとして種々の膜タンパク質が集積することで、シグナル伝達や膜輸送を効率的に行うためのプラットフォームとして機能していると考えられている^[6]。

この脂質ラフトモデルが1997年に提唱されて以降、細胞生物学、生化学および生物物理学の分野で脂質ラフトに関する研究が盛んに行われてきた。一方で、脂質同士の分子間相互作用に着目した化学的な視点でのラフト研究はほとんど行われてこなかった。一般に脂質ラフトの形成はスフィンゴ脂質とコレステロール間の相互作用によって説明されてきたが^[7]、ラフトの形成機構を分子・原子レベルで詳細に調べた実験的研究は皆無であった。そこで筆者らは、溶液および固体NMRと標識体の有機合成を組み合わせたアプローチで脂質ラフト形成の分子機構解明を試みた。

バイセルによるスフィンゴミエリン (sphingomyelin, SM) の配座解析^[8]

まずはバイセルと呼ばれる脂質膜モデルの

溶液NMR測定を行った。脂質ラフトやLoドメインは、界面活性剤TritonX-100に不溶性である。一方、バイセルは一般にDMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine) などの長鎖リン脂質で構成される脂質二重膜構造がDHPC (dihexanoyl phosphatidylcholine) やCHAPSOといった界面活性剤に取り囲まれた構造をしている(図2a)。つまり、界面活性剤に不溶性という点で、ラフトとバイセルは類似している。そこで筆者らは、代表的なスフィンゴ脂質であり主要なラフト構成脂質であるSM(図1参照)をDMPCの代わりに用い、SM-

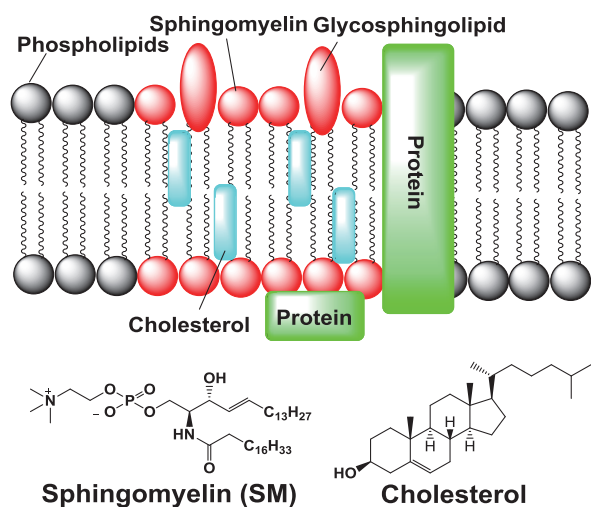


図1 脂質ラフトの模式図と主要構成脂質

DHPCバイセルを構築した。

バイセルは長鎖リン脂質と界面活性剤の比(q 値)が2以上で大型化し磁場配向性を示す。一方、その比が1以下になるとバイセルは小型化し等方的な運動性を示すため、溶液NMRの測定が可能になる^[9]。筆者らはSM-DHPC混合系がバイセルの特徴である磁場配向性を示すことを³¹P NMRによって確認した。図2bは $q=4$ の時の³¹P NMRであり、二重膜を取り囲んでいるDHPC由来の³¹Pは等方的な0 ppm付近のピークを与え、二重膜を構成しているSM由来の³¹Pは配向による異方性のため低周波数側のシグナルを与えた。このことから、SM-DHPC混合系はバイセルの特徴を備えていることが示された。

次に q 値を0.5にすることで等方的なSM-DHPCバイセルを調製し、溶液NMR測定を行った。ここから得られたスピン結合定数およびNOEを用いて、膜環境下でのSMの配座を決定した(図2c)。観測されたスピン結合定数がアンチ配座に典型的な値を取ることから、この配座は比較的稳定だと考えられる。同時に、SM-DHPCバイセルにコレステロールを含有させたが、コレステロールの含有量がSMに対して10%を超えると、等方バイセルを作成してもシグナルがブロードになってしまった。コレステロールの含有によってバイセル以外の相状態へと変

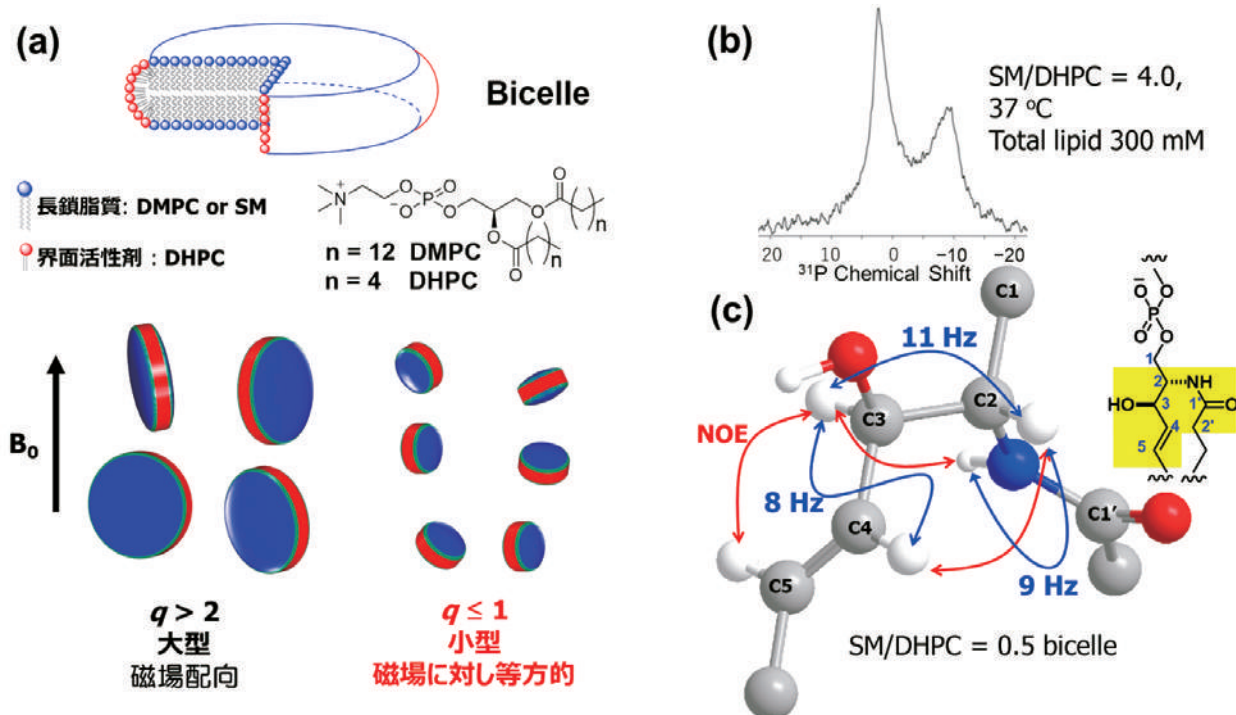


図2 バイセルを用いたSMの配座解析

(a) バイセルの模式図。 q 値は長鎖リン脂質と界面活性剤の比を表す。(b) SMとDHPCから調製した大型バイセル($q=4$)の³¹P NMRスペクトル。磁場中で配向していることがわかる。(c) SM-DHPC小型等方バイセル中におけるSMの配座。溶液NMR測定から得られたスピン結合定数とNOEを用いた。

化したものと考えられる。しかし、上述のように図2cで示した配座が比較的安定であることから、コレステロールによるこの部分の配座への影響は大きくないと考え、以下の解析を進めた。

^2H NMRを用いたSMアルキル鎖の動的挙動解析

次に脂質膜中におけるSMアルキル鎖部分の動的挙動を得るために、 ^2H NMR測定を行った。重水素は四極子核であり、図3aに模式的に示すように、 ^2H NMR測定から得られる四極子分裂の大きさから局所的な揺らぎを見積もることができる。すなわち、分裂が大きいほど膜中でのSMアルキル鎖の揺らぎが小さく、分裂が小さいほど揺らぎが大きい。このような脂質アルキル鎖の揺らぎは、C-C単結合のゴーシュートランス配座交換に起因しており、揺らぎが小さいほどトランス配座の割合が多いことを意味する。

これまででも ^2H NMRを用いてSMや他の脂質の膜中でのアルキル鎖の動的挙動を解析した研究は数多く存在する。しかし、アシル鎖の水素を全て重水素置換した標識脂質が市販されているため、それを用いることが一般的であった。このようなアシル鎖の全重水素置換体では、一度の ^2H NMR測定で多くの動的情報を得られる反面、同位体効果により脂質そのものの物理化学的な性質が変化すること(実

際に相転移温度が変化する)、およびオーバーラップしたシグナルの帰属が不確実になる、といった問題がある。一方筆者らは、一か所ずつ重水素を導入した19種類の同位体異性体を化学合成し(図3b)、それぞれについて ^2H NMRを測定した^[10]。実際に筆者らの結果との比較により、アシル鎖全重水素化SMから得られた ^2H NMRの帰属^[11]が間違っていることがわかった。ただし、19種類もの同位体異性体の合成は非常に手間がかかり、合成を担当した学生諸氏の努力に感謝するとともに、有機化学系出身の我々しかこのような面倒な実験を行わないだろうと、ある意味自負(自嘲?)している。

図3cにSMだけの脂質膜、およびSMにコレステロールを50%含有させた膜での四極子分裂幅のプロファイルを示す。この実験を含む以下の実験ではバイセルではなくリポソームを用いていることに注意されたい。上述のように四極子分裂が大きいほど揺らぎが小さいことを意味している。コレステロールが存在しない場合(青三角)は、SMの頭部から尾部にかけて四極子分裂が単調に減少していることから、アルキル鎖の先端にいくにつれて揺らぎが徐々に大きくなっていることがわかる。一方コレステロールが存在すると(赤丸)、アルキル鎖の中央付近で分裂幅が最大、つまり揺らぎが最も小さくなっている。これはコレステロールの硬い環構

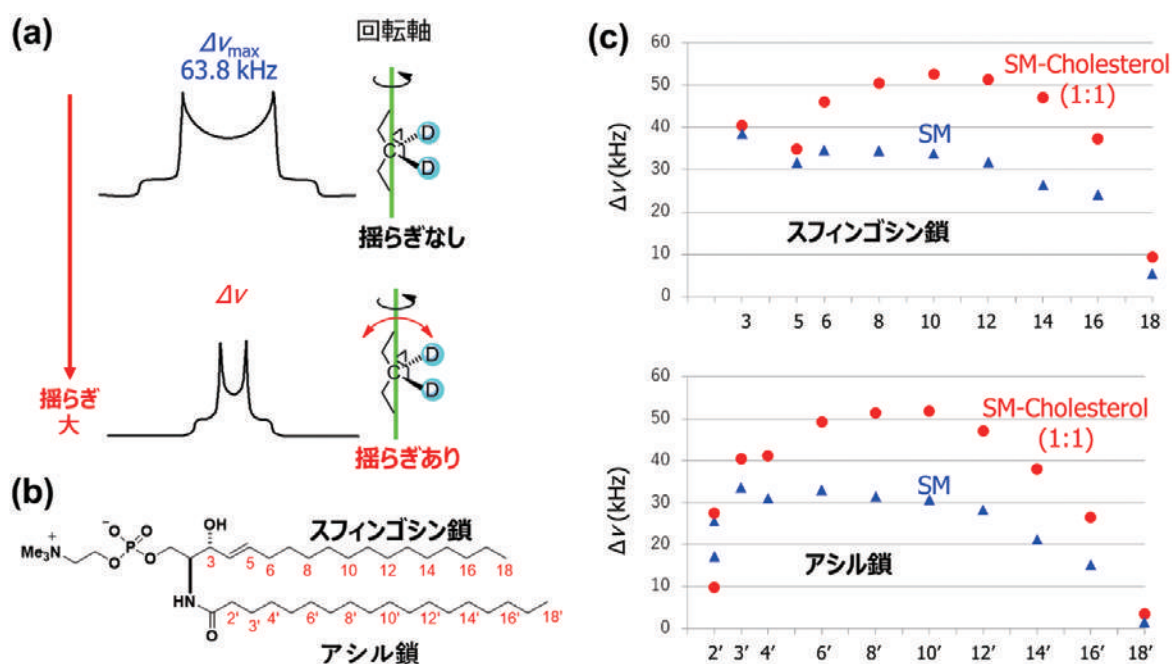


図3 SM膜の ^2H NMR測定

(a) ^2H NMRスペクトルの模式図。四極子分裂幅 ($\Delta\nu$) から、膜中でのアルキル鎖の揺らぎの程度を見積もることができる。アルキル鎖の揺らぎがない場合も膜中での脂質の回転運動が存在するため、 $\Delta\nu$ の最大値は64 kHz程度になる。(b) 合成した重水素標識化SM。赤字部分の水素を重水素に位置選択的に置換した19種類の同位体異性体を合成した。(c) スフィンゴシン鎖(上段)およびアシル鎖(下段)の四極子分裂プロファイル。SMのみの膜からのデータを青で、SM-コレステロール(1:1)膜由来の値を赤で示した。横軸は標識位置(b参照)。

造がアルキル鎖の中央部付近に存在し、アルキル鎖の揺らぎを効果的に抑制していることを示している。また、コレステロールの影響はスフィンゴシン鎖とアシル鎖どちらも差がないことから、コレステロールがどちらかの鎖と特異的に相互作用していることは示唆されなかった。繰り返しになるが、このように四極子分裂の正確な帰属は全重水素標識体では不可能であり、本研究のような部位選択的かつ網羅的な重水素標識によってはじめて可能となる。このように、筆者らの手法は脂質の局所的な動的挙動を正確に捉えることができることから、この手法を「脂質分子モーションキャプチャー」と名付けた^[10]。

次に、アシル鎖長がほぼ同じホスファチジルコリン (phosphatidylcholine, PC) でも同様に位置選択的な重水素標識体を合成し、²H NMR測定を行った^[12]。四極子分裂幅のSMとの比較など詳細な解析を行ったが、ここでは四極子分裂の温度依存性の比較について紹介する。図4に示すように、PC-コレステロール膜に比べてSM-コレステロール膜の方が四極子分裂の温度依存性が小さいことがわかった。これは、SMアルキル鎖が温度の影響を相対的に受けにくいことを意味している。生体膜の恒常性維持という観点から考えると、周囲の温度変化による物性変化の大きいPC-コレステロール膜よりも物性変化の小さいSM-コレステロール膜の方が有利であり、これが脂質ラフトにおいてPCよりもSMが用いられている要因の一つではないかと考えている。

SM アミドの配向解析^[13]

次に筆者らは、SMが膜中に存在する際のアミド部分の配向解析を行った。SMのような脂質分子は膜中で回転拡散をしている。したがって、アミド部分もある回転軸周りに揺らぎを伴いながら回転するとみなすことができる(図5a)。揺らぎは一般的に秩序パラメータ S で評価することができる。この秩序パラメータ S は1から0の値を取り、1の時は回転軸の揺らぎが全くないことを意味し、1から小さくなるにつれて揺らぎが大きくなる。ただし、この秩序パラメータ S は、回転軸方向に対する揺らぎ角がガウス分布していることを仮定している。

少々前置きが長くなったが、要するにアミド部分の膜中での配向解析を行う際には、アミド平面に対する回転軸の方向と秩序パラメータ S を求めればよいことになる。これらの値を求めるため、筆者らは固体NMR測定から得られる化学シフト異方性と双極子結合定数を用いることとした(図5a)。そこで、固体NMR測定用にSMアミド部分に¹³Cや¹⁵Nを導入した標識体(図5b)の合成を行った。合成の詳細は割愛するが、タンパクやペプチドの標識体の合成と異なり¹⁵N標識セリンからSMを全合成する必要があるため、実験的には固体NMR測定よりも手間も時間もかかったことは言うまでもない。

これらの標識体を用いて、上述の²H NMR測定同様にSMのみの膜、およびSM-コレステロール(1:1)膜を調製し、2種類の測定を行った。まずはマジック角回転の周波数を1kHz以下にすることで、化学シフト異方性を完全に消さずにスピニングサイドバンドとして¹³Cおよび¹⁵Nシグナルを観

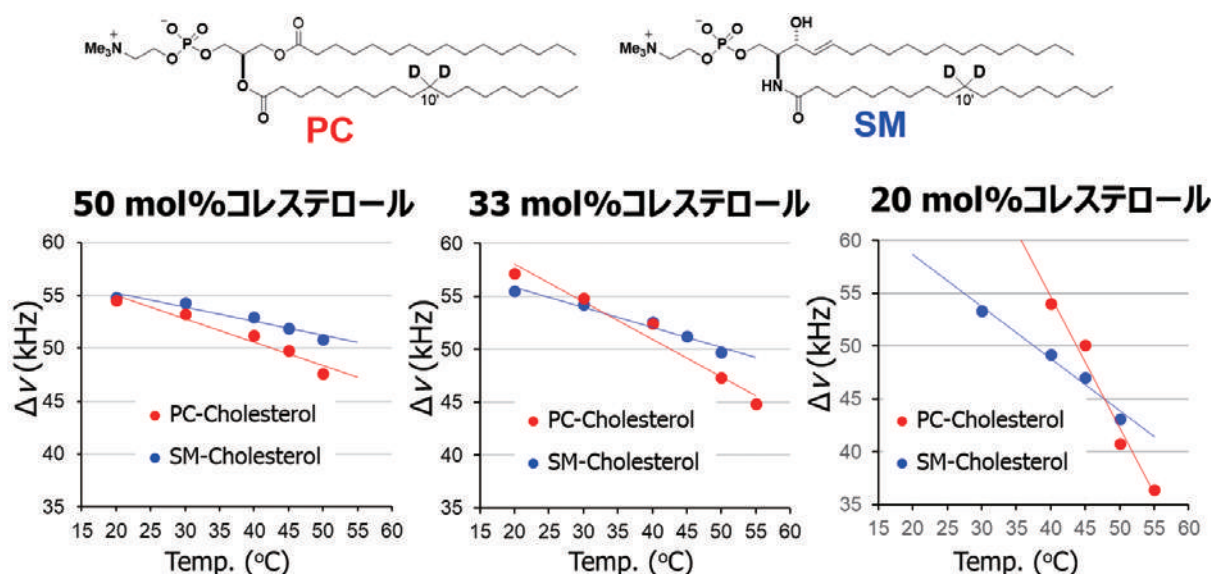


図4 PCとSMの四極子分裂幅の比較

全体にSM膜の四極子分裂の方が温度の影響が小さいが、コレステロール含有量が小さくなるとその差がより顕著になる。

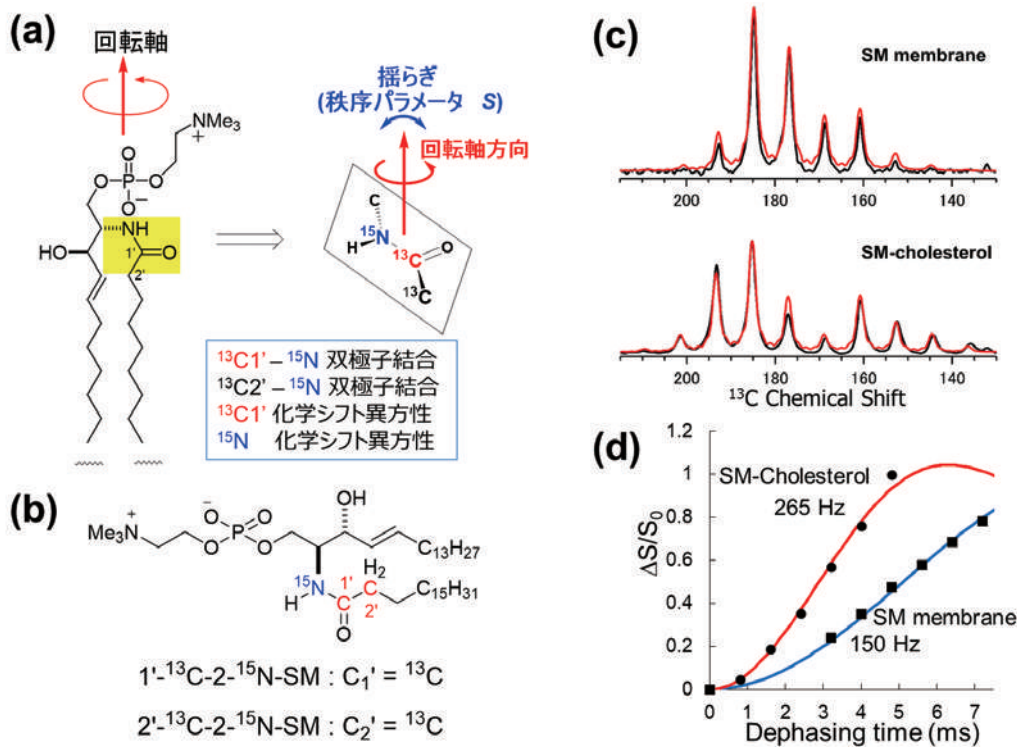


図5 SMアミド部分の脂質膜中での配向解析

(a) SMの膜中での回転拡散とそれに伴うアミド平面の回転。アミドの配向は回転軸方向と揺らぎを表す秩序パラメータ S によって定義でき、それらは化学シフト異方性と分子内双極子結合の解析によって求めることができる。(b) 固体NMR測定に用いた ^{13}C - ^{15}N 二重標識SM。(c) $1^{\cdot-13}\text{C}-2\text{-}^{15}\text{N}\text{-SM}$ を水和して調製した脂質膜の ^{13}C CP-MAS スペクトル。MASを600Hzにすることでスピニングサイドバンドを観測した。赤線はSIMPSONによるシミュレーション。このようにして化学シフトの異方性パラメータを決定した。(d) $1^{\cdot-13}\text{C}-2\text{-}^{15}\text{N}\text{-SM}$ で調製した膜に対しC-N REDOR測定を行い、分子内双極子結合定数を決定した。

察した。このスピニングサイドバンドのパターンを固体NMR用スペクトルシミュレーションソフトSIMPSON^[14]によるスペクトルと比較することで、アミドの $\text{C}_{1'}$ および N の化学シフト異方性を求めた(図5c)。ただし、上述のようにアミドは膜中で回転しているため、化学シフト異方性の主値は δ_{11} , δ_{22} , δ_{33} ではなく $\delta_{//}$ と δ_{\perp} で表され、異方性パラメータとして $\Delta\delta = \delta_{//} - \delta_{\perp}$ を導入した。このようにして、アミドの $\text{C}_{1'}$ および N の2種類の異方性パラメータ ($\Delta\delta_{\text{C}_{1'}}$ と $\Delta\delta_{\text{N}}$) を取得した。また、 ^{13}C - ^{15}N 二重標識SM(図5b)を用いてREDOR(rotational echo double resonance)測定^[15]を行うことで、 $\text{C}_{1'}$ - N 間および $\text{C}_{2'}$ - N 間の分子内双極子結合定数 ($D_{\text{C}_{1'-\text{N}}}$ と $D_{\text{C}_{2'-\text{N}}}$) を決定した(図5d)。

一方、 $\text{C}_{1'}$ の主軸 (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33} 軸) 方向を分子座標として用いることで、回転軸方向を α と β の極座標で表すことができる(図6a)。この際、主軸方向は実験的に取得することが困難なため、量子化学計算ソフトGaussianのGIAO(Gauge Including Atomic Orbital)法^[16]によって求めた。こうして回転軸方向を定義すると、上記の異方性パラメータ ($\Delta\delta_{\text{C}_{1'}}$ と $\Delta\delta_{\text{N}}$) と分子内双極子結合定数 ($D_{\text{C}_{1'-\text{N}}}$ と

$D_{\text{C}_{2'-\text{N}}}$) は、 α と β および秩序パラメータ S を用いて計算することができる。例えば、 $\text{C}_{1'}$ の異方性パラメータの計算値 $\Delta\delta_{\text{C}_{1'}}^{\text{Calc}}$ は以下の式となる。

$$\Delta\delta_{\text{C}_{1'}}^{\text{Calc}} = S \times [\delta_{33}(3\cos^2\beta - 1) + \delta_{11}(3\sin^2\alpha \sin^2\beta - 1) + \delta_{22}(3\sin^2\beta \cos^2\alpha - 1)]/2$$

式中の δ_{11} , δ_{22} , δ_{33} は粉末状態の $\text{C}_{1'}$ の主値であり、実験的に決定できる。ここで、すべての実測値を再現するような α , β , S を決めれば、アミドの回転軸方向と揺らぎを決定できたことになる。そこで、以下のRMSD(root mean square deviation)を導入した。

$$\text{RMSD}(\alpha, \beta, S) = \sqrt{\sum_i \left(\frac{D_i^{\text{Exp}} - D_i^{\text{Calc}}(\alpha, \beta, S)}{D_{\text{max}}} \right)^2 + \sum_i \left(\frac{\Delta\delta_i^{\text{Exp}} - \Delta\delta_i^{\text{Calc}}(\alpha, \beta, S)}{\Delta\delta_{\text{max}}} \right)^2}$$

図6bには、SM膜およびSM-コレステロール膜についてRMSDの等高線プロットを示している。この図からRMSDが最小になる α , β , および S を求めた。図6cにはこのようにして得られたSMアミドの配向を示している。この図のSMのアミド近傍の配座は、上述のバイセルから求めた配座を使用した。この結果から、コレステロールの有無でアミ

の回転軸方向はほとんど変化しないことがわかった。例えばSMアミド部分がコレステロールのOH基と水素結合を形成すると、アミドに何らかの配向変化が起こると予想されるが、本研究からはそのような配向変化は示唆されなかった。一方で、秩序パラメータ S はコレステロールが存在すると顕著に大きくなっており、揺らぎが小さくなっていることがわかる。さらに興味深いことに、SMのアミドは、**図6c**に模式的に示すように、隣接するSMのアミド間で水素結合を作りやすい配向をしていることがわかった。

ラフト形成のモデル

以上の結果をまとめると、

1. SM バイセルを用いた配座解析によって、SMの

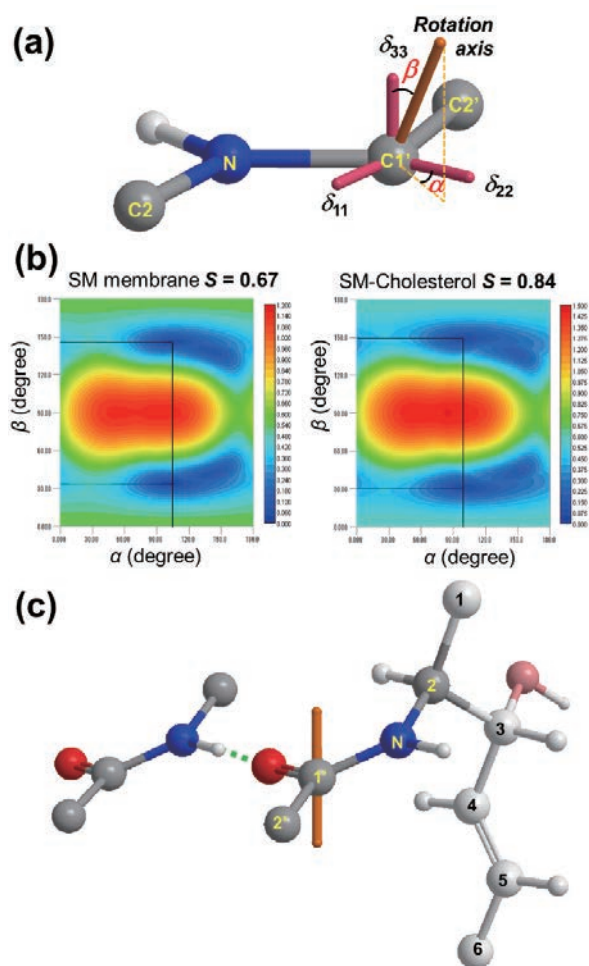


図6 SMアミド部分の脂質膜中での配向決定

(a) C1'の主軸方向を分子座標として、回転軸方向を極座標 α と β で定義できる。(b) RMSDの等高線プロット。ここから最も小さなRMSDを与える α 、 β 、 S を決定した。秩序パラメータ S はSM膜で0.67、SM-コレステロール膜で0.84と求まった。(c) 解析から得られた回転軸方向。この軸周りにSMは膜中で回転拡散をしている。SMの配座は**図2**の結果を用いた。回転軸方向はコレステロールの有無で変化しなかった。緑破線は、隣接するSMのアミドとの分子間水素結合を示す。

アミド近傍の配座を決定した。またこの部分の配座変化は有意でないことが示唆された。

2. ^2H NMR測定から、コレステロールはSMアルキル鎖の中央付近に存在し、その部分の揺らぎを抑制している。一方、コレステロールのスフィンゴシン鎖もしくはアシル鎖への特異的相互作用は観察されなかった。また、PC膜との比較により、SM-コレステロール膜はPC-コレステロールより温度依存性が低いことが分かった。
3. SMアミドの配向解析から、アミドの回転軸方向はコレステロールの影響を受けないことがわかった。一方、アミドの揺らぎはコレステロールの存在によって顕著に抑制された。また、隣接するSMのアミド間での分子間水素結合形成が示唆された。

これらの結果から、**図7**のようなラフト形成モデルを提唱した^[10, 12, 13]。コレステロールの存在しないSM膜のLd相では、SMアルキル鎖は大きな揺らぎを伴う運動をしている。したがって、アミド間での分子間水素結合形成も限定的であり、アミドの揺らぎも大きい。一方、コレステロールが存在すると、アルキル鎖中央部分付近に硬いステロイド骨格が位置し、この部分の揺らぎを効果的に抑制する。これによってSMアルキル鎖間のvan der Waals相互作用が増加し、それに協奏してSMアミド間の水素結合の形成も促進される。このようにしてSM分子間で水素結合のネットワーク(クラスター)が形成され、温度依存性の小さい熱的に安定なラフトが形成される。またこの分子間水素結合がアミドの揺らぎを抑えたと考えられる。このモデルでは、分子間水素結合したSM間にコレステロールの入る空間がないため、コレステロールが接着剤のようにSM同士を結びつけるわけではない。つまり、コレステロールはアミド間の水素結合形成に直接関与しているわけではなく、SM分子の土台であるアルキル鎖の秩序性を高めることで間接的にアミド間の分子間水素結合を促進している、という考え方である。したがって、SMとコレステロールの直接的な相互作用でラフト形成を説明している従来のモデル^[7]とは明確に異なっている。

展開と今後の展望

脂質膜の動的挙動は、実験データの取得が困難なため主に分子動力学(molecular dynamics, MD)シミュレーションによって議論されることが多かった。しかし、実験的に計算の妥当性を評価できな

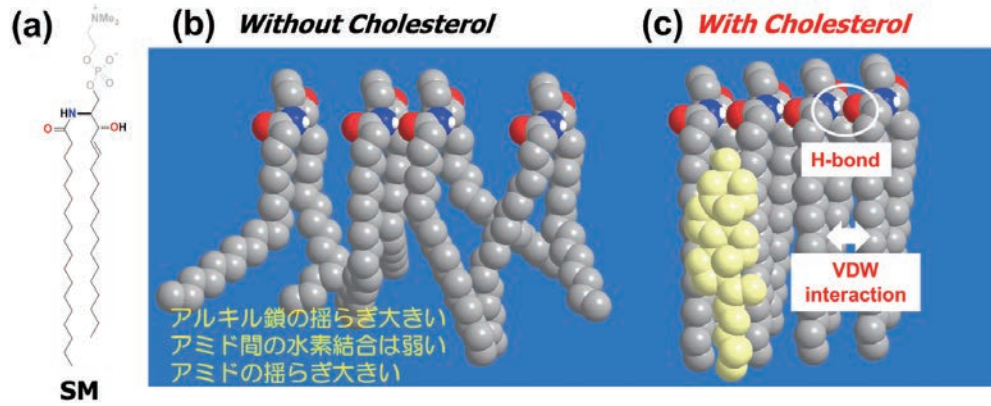
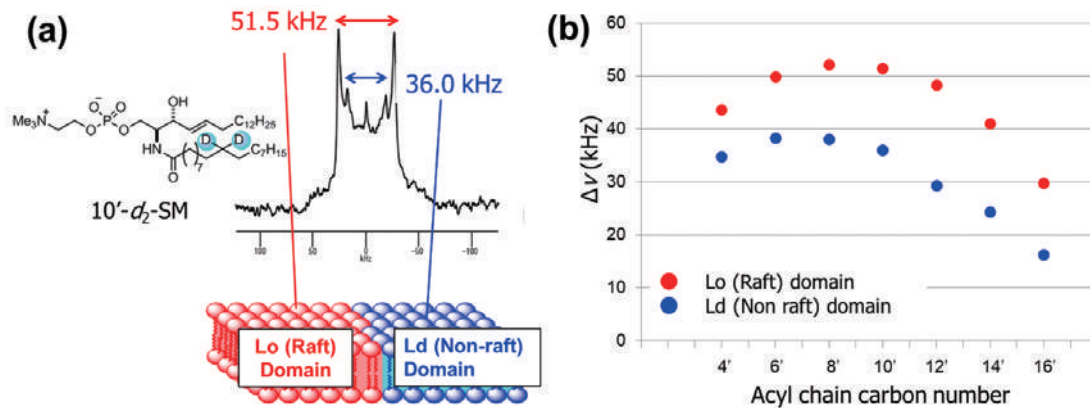


図7 ラフト形成モデル

(a) SMの灰色部分は(b, c)のモデルでは省略している。(b) SM膜の模式図。(c) SM-コレステロール膜の模式図。黄色い分子はコレステロールを示す。

図8 SM-不飽和リン脂質-コレステロール(1:1:1)3成分膜における ^2H NMR

(a) LoとLdそれぞれのドメインに存在するSM由来の四極子分裂が2組観測された。(b) LoおよびLdドメイン中でのSMの四極子分裂プロファイル。不飽和リン脂質として、DOPC (dioleoylphosphatidylcholine) を用いた。

いというのが現状であった。実際、SM膜のMD計算は数多くされてきたが、報告されたアルキル鎖部分の秩序パラメータプロファイルは、本研究の ^2H NMR測定からのそれといずれも異なっていた。最近、本研究の ^2H NMRデータを再現すべくSMの力場パラメータの修正が行われ^[17]、MD計算の精度向上につながっている。その計算では、やはりSMアミド間の分子間水素結合の重要性が示されている。

また、本稿ではSM膜およびSM-コレステロール膜について記述したが、3成分脂質膜やそれ以上複雑な脂質膜での検討も行っている^[18, 19]。これらの膜では、LoドメインとLdドメインの相分離が観測されるので、より生体膜に近い系と言える。例えばSM-不飽和リン脂質-コレステロールの3成分膜で重水素化SMの ^2H NMRを測定したところ、2組の四極子分裂が観測された(図8a)^[18]。大きな分裂幅はLoドメインに存在するSM由来、小さな分裂幅はLdドメインに存在するSM由来と帰属でき、ドメイン特異的な四極子分裂プロファイルが得られた(図8b)。このように、脂質膜の ^2H NMR測

定は古典的な手法であるが、選択的標識化技術と組み合わせることで、複雑な脂質膜においても有用な動的情報を得ることができる。今後は人工脂質膜だけでなく細胞膜に標識脂質を導入し、生体膜中での脂質の動的挙動の観測を目指すことになる。ただし、重水素よりも高感度かつ低バックグラウンドのフッ素で標識した脂質の動的挙動解析法^[20]や、NMR観測可能な試料量の生体膜への導入法を開発していく必要があるだろう。

謝辞

筆者が学生時代から長年にわたりご助言、ご指導を頂き、本研究の遂行に関して多大なるご支援を頂きました大阪大学村田道雄教授に感謝申し上げます。また、標識脂質の合成やNMR測定は、九州大学大石徹教授、大阪大学土川博史博士、山口敏幸博士、安田智一博士をはじめ多くのスタッフならびに学生諸氏の多大なるご尽力のもとに行われました。ここに深く感謝いたします。最後に本稿の執筆の機会を与えて頂きました北海道大学福

士江里博士ならびに防衛大学浅野敦志教授に感謝いたします。

引用文献

- [1] Matsumori, N., Kaneno, D., Murata, M., Nakamura, H., and Tachibana, K. (1999) Stereochemical determination of acyclic structures based on carbon-proton spin-coupling constants. A method of configuration analysis for natural products. *J. Org. Chem.* **64**, 866-876.
- [2] Matsumori, N., Tahara, K., Yamamoto, H., Morooka, A., Doi, M., Oishi, T., and Murata, M. (2009) Direct interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers as revealed by ^2H NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11855-11860; Umegawa, Y., Nakagawa, Y., Tahara, K., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., Oishi, T., and Murata, M. (2012) Head-to-tail interaction between amphotericin B and ergosterol occurs in hydrated phospholipid membrane. *Biochemistry* **51**, 83-89; Nakagawa, Y., Umegawa, Y., Matsushita, N., Yamamoto, T., Tsuchikawa, H., Hanashima, S., Oishi, T., Matsumori, N., and Murata, M. (2016) The structure of the bimolecular complex between amphotericin B and ergosterol in membranes is stabilized by face-to-face van der Waals interaction with their rigid cyclic cores. *Biochemistry* **55**, 3392-3402; Espiritu, R.A., Matsumori, N., Tsuda, M., and Murata, M. (2014) Direct and stereospecific interaction of amphidinol 3 with sterol in lipid bilayers. *Biochemistry* **53**, 3287-3293.
- [3] Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **75**, 720-731.
- [4] Sankaram, M.B., and Thompson, T.E. (1990) Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry* **29**, 10670-10675.
- [5] Simons, K., and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- [6] Lingwood, D., and Simons, K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50.
- [7] Silvius, J. R. (2003) Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 174-183.
- [8] Yamaguchi, T., Suzuki, T., Yasuda, T., Oishi, T., Matsumori, N., and Murata, M. (2012) NMR-based conformational analysis of sphingomyelin in bicelles. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 270-278.
- [9] Matsumori, N., and Murata, M. (2010) 3D structures of membrane-associated small molecules as determined in isotropic bicelles. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 1480-1492.
- [10] Matsumori, N., Yasuda, T., Okazaki, H., Suzuki, T., Yamaguchi, T., Tsuchikawa, H., Doi, M., Oishi, T., and Murata, M. (2012) Comprehensive molecular motion capture for sphingomyelin by site-specific deuterium labeling. *Biochemistry* **51**, 8363-8370.
- [11] Bartels, T., Lankalapalli, R.S., Bittman, R., Beyer, K., and Brown, M.F. (2008) Raftlike mixtures of sphingomyelin and cholesterol investigated by solid-state ^2H NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 14521-14532.
- [12] Yasuda, T., Kinoshita, M., Murata, M., and Matsumori, N. (2014) Detailed comparison of deuterium quadrupole profiles between sphingomyelin and phosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* **106**, 631-638.
- [13] Matsumori, N., Yamaguchi, T., Maeta, Y., and Murata, M. (2015) Orientation and order of the amide group of sphingomyelin in bilayers determined by solid-state NMR. *Biophys. J.* **108**, 2816-2824.
- [14] Bak, M., Rasmussen, J. T. and Nielsen, N. C. (2000) SIMPSON: a general simulation program for solid-state NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **147**, 296-330.
- [15] Gullion, T., and Schaefer, J. (1989) Rotational-echo double-resonance NMR. *J. Magn. Reson.* **81**, 196-200.
- [16] Ditchfield, R. (1974) Self-consistent perturbation theory of diamagnetism I. A gauge-invariant LCAO method for NMR chemical shifts. *Mol. Phys.* **27**, 789-807.
- [17] MacKerell, Jr.A.D., Pastor, R.W., and Klauda, J.B. (2014) CHARMM all-atom additive force field for sphingomyelin: Elucidation of hydrogen bonding and of positive curvature. *Biophys. J.* **107**, 134-145.
- [18] Yasuda, T., Tsuchikawa, H., Murata, M., and Matsumori, N. (2015) Deuterium NMR of raft model membranes reveals domain-specific order profiles and compositional distribution. *Biophys. J.* **108**, 2502-2506.
- [19] Engberg, O., Yasuda, T., Hautala, V., Matsumori, N., Nyholm, T.K.M., Murata, M., Slotte, J.P. (2016) Lipid interactions and organization in complex bilayer membranes. *Biophys. J.* **110**, 1563-1573.
- [20] Matsumori, N., Kasai, Y., Oishi, T., Murata, M., and Nomura, K. (2008) Orientation of fluorinated cholesterol in lipid bilayers analyzed by F-19 tensor calculation and solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4757-4766.



松森 信明 (まつもり・のぶあき)

1992年 東京大学理学部化学科卒業

1997年 東京大学大学院理学系研究科化学専攻博士課程修了(橘和夫教授)

1997～1999年 東京大学大学院農学生命科学研究科生命工学専攻博士研究員(堀之内末治教授)

1999～2010年 大阪大学大学院理学研究科化学専攻助手、助教(村田道雄教授)

2000～2001年 MIT化学科在外研究員(Robert. G. Griffin教授)

2010～2014年 大阪大学大学院理学研究科化学専攻准教授(村田道雄教授)

2014年 九州大学大学院理学研究院化学部門教授、現在に至る。

NMRのハードウェアに関するメモ

3. 主に受信系について—分光計編

(株)JEOL RESONANCE ソリューション・マーケティング部アプリケーショングループ

根本 暢明

nnemoto@jeol.co.jp

「主に受信系について—分光計編」への序

本稿ではNMR (Nuclear Magnetic Resonance ; 核磁気共鳴) のハードウェアについて述べる。今回のトピックは受信系の後半、プローブからあと、分光計での受信に関してである。前回までにプローブに至る経路に関して述べた^[1,2]。つまりユーザが発したスタート命令が分光計に伝わり、その信号が分光計の中のシーケンサ、トランスミッタ、パワーアンプなどを通るうちに変換され^[1]、最終的にプローブに到達するところまでである^[2]。実はこれはNMRにおける電磁波の旅の片道に過ぎない。つまり、プローブに到達した電磁波は静磁場 B_0 中で(パルスNMRでは時間変動) 磁場 B_1 を発生させ、磁気共鳴現象が発生するわけで、信号を今度はプローブから受信系へ渡さないとイケない。言い方を換えると、プローブは送信系と受信系の折り返し地点とすることができる。したがって、本稿では、折り返し地点を過ぎ、その先について述べることになる。

2. NMR 分光計における受信系 (分光器)

おそらく多くのNMR初学者にとって、NMRのハードウェアにおいて最も理解が困難な項目の一つが、この受信系であると思われる。NMRの信号受信としてやっていることは、基本的にAMラジオとそんなに大きな違いはないはずなのだが、そもそも普通の高等学校の物理の教科書や大学の一般教養課程の物理学の授業で、最近はあまりAMラジオの構造と機能について触れられることはない。

例えば、600 MHz (^1H の共鳴周波数) の装置で ^1H -NMRスペクトルを測定するときに、信号が概ね0~15 ppmに分布することは理解でき(これは物理現象だからしょうがない)、そのスペクトル幅をHzに換算すると9,000 Hzであることは初学者にも簡単に理解できよう。しかし、スペクトル幅を9,000 Hzとして、なぜ興味のある部分だけの信号を取り込むことができるのか(さらに言えば、それらが0 Hz(直流、DC) から9,000 Hzまでになるのか)、とい

うことを理解することは、初学者にとって相当難しいと思われる。さらに、プローブは共振回路として働いて、そのコイルに発生する電圧の時間変化を、(途中はさておき) **最終的に**ADC (Analogue to Digital Converter ; アナログ・デジタル変換器) でデジタルデータにすることは理解できても、NMRのデータは通常実部 (Real) と虚部 (Imaginary) からなる複素数 (complex) で表されることは、通常の教科書に書かれているようで実はあまり丁寧な記述がなく、典型的なNMRの初学者の理解の範囲を遙かに超越していると思われる。また、最近市販されているNMR装置ではデジタルフィルタを利用することが当たり前になっているが、NMRの教科書におけるオーバーサンプリングとデジタルフィルタに関する記述は、筆者に言わせれば、嘘ではないが全く本質を突いてないと思う。この項ではそういった点に触れたいと考える。

2-1 受信系のオーバービュー

図1に、プローブからADCまでのNMR受信系に関するブロックダイアグラムを示す。プローブで得たNMR信号は、デュプレクサ (T/Rスイッチ) を経て、プリアンプ (前置増幅器) で増幅される。その後、シンセイサイザ (FSY) と局発 (Local) がミキサで混合され、周波数が中間周波数 (Intermediate Frequency ; IF) 付近に変更される。その後、バンドパスフィルタ (別名、帯域通過フィルタ ; Band-Pass Filter ; BPF) でIF近傍の信号以外を除去する。その後は、アナログ直交検波 (Analog Quadrature Detection ; AQD) の場合とデジタル直交検波 (Digital Quadrature Detection ; DQD) の場合で回路が異なっている。図1Aで示すようにAQDの場合、スプリッタで2系統に、その後Real信号とImaginary信号になる。これら2系統の信号はそれぞれ、別個のミキサにおいて、位相が互いに 90° 異なるリファレンス周波数と混合され、オーディオフィルタつまり低域通過フィル

タ (**Low-Pass Filter** ; LPF) で高域の信号が除去された後、ADCでデジタル化され、その後のデジタル処理を経てメモリに積算される。他方、**図1B**に示したようにデジタル直交検波 (DQD) の場合では、通常のアナログ直交検波で使用されるADCよりも高い周波数で動作するADCを用いてより高い周波数でデジタル化し、このデータに位相の90°異なるsin波を掛けあわせた後、デジタル低域通過フィルタ (**Digital Low-Pass Filter** ; D-LPF) を使い、必要な信号を得る。こういった受信系を理解するにあたって、押さえておくと良い点が2つある。1つ目は各部位において「どのように周波数が変わっていくか」であって、2つ目は各部において、信号が「どのように増幅されていくか」である。例えば600 MHz (¹Hの共鳴周波数) の装置で、IFが10 MHzであるような装置を考えると、プローブでの周波数は当然600 MHzであるが、これがアナログ直交検波の場合、最終的にオーディオ周波数 (“可聴” 周波数、~ 10 kHz程度) にまで落ちてくる。また、プローブで数μV程度しかない非常に微弱なNMR信号がADCの手前では数Vにまで増幅されている。勘違いして頂いては困るのだが、通常のNMR測定においては、このように共鳴周波数から

中間周波数を経て最終的なオーディオ周波数の信号にするのであって、共鳴周波数 (例えば¹Hの共鳴周波数600 MHz) で信号を高速サンプリングしているわけではない。数百MHzの周波数の信号を高速サンプリングして積算するようなメモリは高価すぎる (常軌を逸して高い)。この点に関しては是非理解して頂きたい。

以下、プローブからADCへの方角に向かって、受信系でいったい何が起きているかについて詳述する。

2-2 検波、特にアナログ直交検波

上述したように、通常、NMR信号をその共鳴周波数で直接デジタルサンプリングすることはなく、NMR信号からIFを経て、最終的にオーディオ周波数まで周波数を落としてからADCでデジタルサンプリングする検波自体 (アナログ直交検波の場合)、直交検波 (Quadrature Detection) であることを除けば、基本的にAMラジオの仕組みと一緒である。つまり、AMラジオにおいては、アンテナが捕まえたアナウンサーの声や音楽といった音声信号が乗った状態の搬送波 (NHK東京第一放送JOAKの場合、周波数594 kHzの電波) から、音声信号を取り出す

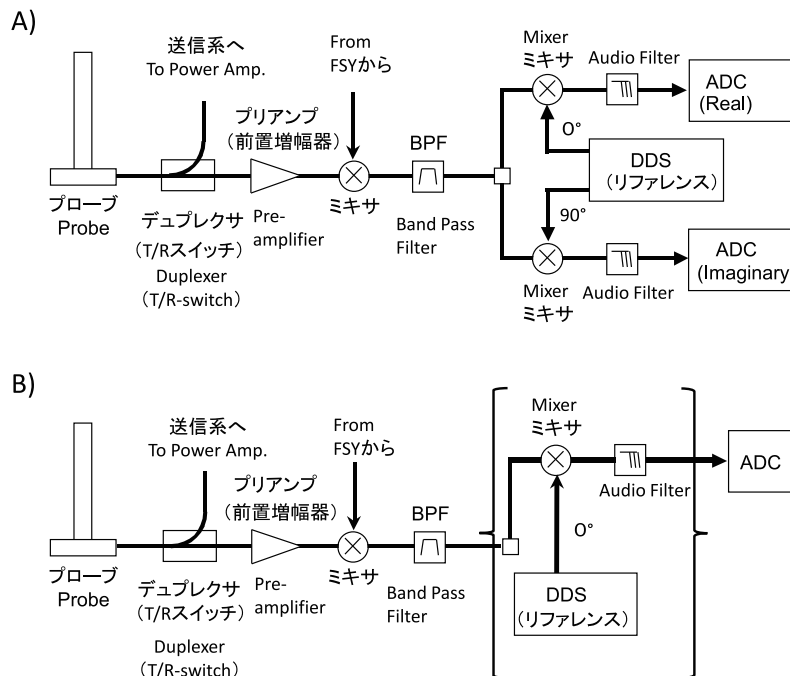


図1 受信系のアウトライン。図中のようにプローブで得られたNMR信号は、デュプレクサ、前置増幅器、と通過し、FSY (Frequency SYNthesizer ; 周波数シンセサイザ) からの局発周波数と混合される。

A) アナログ直交検波の場合、アナログ信号がスプリッタで2つに分けられ、2つの位相の90°異なる、DDSからの周波数と混合される。その後オーディオフィルタを通り、2つのADC (Analog to Digital Converter ; AD変換器) でそれぞれRealとImaginaryのデジタルデータに変換される。リファレンス信号は2種類の位相の異なる信号を用いる。

B) デジタル直交検波の場合、中間周波数帯域へ変更されたのち、すぐデジタル信号へ変換される。リファレンス信号は1種類の位相の信号のみ混合される。ADCで取り込まれたデジタル信号 (数列) に対し、位相の90°異なる数列を掛け合わせたのち、デジタルローパスフィルタ (Digital-Low-Pass Filter ; D-LPF) (これは数式) を作用させ、FID信号を得る。

ことを検波と呼ぶが、これと全く同じことをNMRの信号検出でも行う。ここでは、どのような形で周波数が落とされるのか、数学的に説明する(図2に受信系で登場する周波数の関係模式図を示す)。

ここでは緩和を無視し、カップリングもないと仮定して、NMR信号を、簡単に、

$$A_1 = \sin((\omega_0 + \omega_c)t + \phi_1)$$

のように書くことができたとする*1。ここで A_1 は強度、 ω_0 は周波数オフセット(中心周波数)、 ω_c は化学シフトによる中心周波数からのずれ、 ϕ_1 を位相とする。このとき、 ω_{IF} は中間周波数、 ω_{LO} は局発周波数(=シンセサイザの周波数)、 ω_0 には、

$$\omega_0 = \omega_{LO} - \omega_{IF}$$

の関係がある*2。プリアンプで増幅された信号は、局発の周波数とミキサで混合され(実際は信号が乗算され)、その結果、三角関数の積和の公式から*3、

$$\begin{aligned} A_2 &= \sin((\omega_0 + \omega_c)t + \phi_1) \times \sin(\omega_{LO}t + \phi_2) \\ &= \sin((\omega_{LO} - \omega_{IF} + \omega_c)t + \phi_1) \times \sin(\omega_{LO}t + \phi_2) \\ &= -\frac{1}{2} [\cos((2\omega_{LO} - \omega_{IF} + \omega_c)t + \phi_1 + \phi_2) \\ &\quad - \cos((\omega_{IF} - \omega_c)t - \phi_1 + \phi_2)] \end{aligned}$$

であるから、これをBPFかLPFで上の式における前の第1項(つまり高周波成分)を除き、後ろの第2項(つまり低周波成分)のみを通過させる(今、 ω_0 と ω_{LO} はほぼ同じで、例えば600MHzと610MHzであって、 ω_c はそれに比べはるかに小さい、例えば10kHz程度である)。そうすると、BPFないしLPF通過後の信号は第1項がフィルタで除去されて第2項のみとなり、下の式のように表すことができる。

$$A_3 = \frac{1}{2} \cos((\omega_{IF} - \omega_c)t - \phi_1 + \phi_2)$$

である。次にAQDの場合、引き続き中間周波数を掛け算する。その際、信号をスプリッタで2系統にわけ、位相の90°異なる中間周波数と掛け算する。

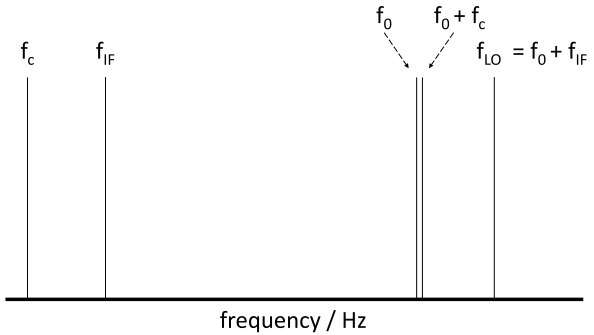


図2 受信系で登場する周波数の関係模式図。 ^1H の600MHzスペクトルを、中間周波数(IF)10MHzの装置で観測する場合、大まかな値は以下の通りである； f_c (化学シフトの周波数)~10kHz、 f_{IF} (中間周波数)=10MHz、 f_0 (オフセット周波数)~600MHz、 f_{LO} (局発周波数)=610MHzである。

$$\begin{aligned} A_{4R} &= \frac{1}{2} \cos((\omega_{IF} - \omega_c)t - \phi_1 + \phi_2) \times \cos(\omega_{IF}t + \phi_3) \\ &= -\frac{1}{4} [\cos((2\omega_{IF} - \omega_c)t - \phi_1 + \phi_2 + \phi_3) \\ &\quad + \cos(\omega_c t + \phi_1 - \phi_2 + \phi_3)] \\ A_{4I} &= \frac{1}{2} \cos((\omega_{IF} - \omega_c)t - \phi_1 + \phi_2) \times \sin(\omega_{IF}t + \phi_3) \\ &= \frac{1}{4} [\sin((2\omega_{IF} - \omega_c)t - \phi_1 + \phi_2 + \phi_3) \\ &\quad - \sin(\omega_c t + \phi_1 - \phi_2 + \phi_3)] \end{aligned}$$

となる。さらにそれぞれLPFを通過させると高周波成分が消え、結果として、

$$\begin{aligned} A_R &= -\frac{1}{4} [\cos(\omega_c t + \phi_1 - \phi_2 + \phi_3)] \\ \text{および} \\ A_I &= -\frac{1}{4} [\sin(\omega_c t + \phi_1 - \phi_2 + \phi_3)] \end{aligned}$$

となり、位相の90°異なる信号を得ることができた(筆者注：このあたり登場するのは三角関数の積和の公式、 $\cos(-x) = \cos x$ 、 $\sin(-x) = -\sin x$ 、あとBPFやLPFによる不要成分の消去ぐらいなので、初学者の皆さんは是非一度ご自分でチェックして欲しい)。これを別々のADCで信号をデジタルデータにし、それぞれをReal(実部)とImaginary(虚部)のデータとして、その後複素フーリエ変換に使用する。このような検波方法を直交検波(Quadrature Detection)、あえていうとアナログ直交検波(Analog Quadrature Detection; AQD)と呼ぶ。

2-3 デジタルフィルタ：ちょっとソフトウェアに脱線

ここでは、必要な周波数成分のみを得たり排除したりするために使用されるフィルタの内、デジタルフィルタについて述べる。デジタルフィルタとは、時間変化するデジタルデータ(=数列)から不必要

*1 もちろん、 $\omega = 2\pi f$ であるが、便宜上ここでは角速度 ω を周波数と記述していくことをご了承頂きたい。読者は ω を図中の f と読み替えてください。

*2 理屈の上では、 $\omega_0 = \omega_{LO} + \omega_{IF}$ でもよいのだが、低い ω_0 を出すために $\omega_0 = \omega_{LO} - \omega_{IF}$ とすることが多い。

*3 $\sin \alpha \times \sin \beta = -\frac{1}{2} \{\cos(\alpha + \beta) - \cos(\alpha - \beta)\}$

な周波数成分の信号を捨て、必要な周波数成分の信号を得るための計算方式であって、ソフトウェアプログラムが実態である。

NMRのデータ処理でデジタルフィルタを使用する場合、通常はLPFとして使用する。主な目的は、1) オーバーサンプリングしたデータに対してD-LPFを作用させ、折り返しノイズを低減させ、スペクトルのSN比を改善することと、2) 後述するデジタル直交検波における高調波の不要成分除去である。

ところで、時間変化するデータ点を

$$\vec{x} = (x_1, x_2, \dots, x_n)$$

とする (NMR的には、 x_1, x_2 が生FIDの1点目、2点目、というイメージを持って頂きたい)。nより小さいkを用いた数列が存在して、

$$\vec{h} = (h_1, h_2, \dots, h_k)$$

であるとき、

$$x'_n = \sum_{k=0}^n x_{n-k} \cdot h_k \quad \text{ただし } x_i = 0 \quad (i < 0)$$

で示されるような、 $\vec{x} \rightarrow \vec{x}'$ 変換をFIR (**F**inite **I**mpulse **R**esponse；有限インパルス応答) 型のデジタルフィルタと呼び、 h_k をフィルタ係数、 k をタップ数 (タップ段数ともいう)。実はFIR型のデジタルフィルタ以外にも、IIR (**I**nfinite **I**mpulse

Response；無限インパルス応答) 型のデジタルフィルタというものも存在する。表2にFIR型デジタルフィルタとIIR型デジタルフィルタの比較を示す。IIR型デジタルフィルタには、遅延が小さく、少ない段数で比較的良好な特性が得られる、またアナログフィルタとの類似性があるなど御利益も多いのだが、直線位相特性がないため、NMRの受信系で使用するとスペクトルの位相がメチャクチャになってしまう。そのため、使用されることがほとんどないので、ここではFIR型デジタルフィルタについてのみ取り扱うこととする。デジタルフィルタにおいて、フィルタ係数 h_k の与え方で、フィルタの特性が変化し、送信系のところで述べた4種類のフィルタ^[1]、すなわち、LPF (**L**ow-**P**ass **F**ilter；低域通過フィルタ)、HPF (**H**igh-**P**ass **F**ilter；高域通過フィルタ)、BPF (**B**and-**P**ass **F**ilter；帯域通過フィルタ)、BRF (**B**and-**R**ejection **F**ilter；帯域阻止フィルタ)^{*4}の4種類を作製することができる。詳しくは他書^[3,4]を参照していただきたい。

ここで、デジタルフィルタリングの身近な例として図3に株価チャートを示す。株価チャートに見られる13週移動平均線、26週移動平均線も一種のデジタルフィルタリングされた結果であり、日々の株価の細かい変動 (つまり高い周波数成分) を除き、長いスパンでの株価の変動 (つまり低い周波数成分) を抽出する。この結果、株価が長い目で見たときに上昇傾向にあるのか、下降傾向にあるのかが

表1 受信系の各部位における周波数の例と大まかな電圧*

場 所	周波数	電 圧
プリアンプ前	観測周波数	600 MHz
プリアンプ後	観測周波数	600 MHz
BPF 後	中間周波数	10 MHz
オーディオフィルタ後	オーディオ周波数	10 kHz

*600 MHz (¹H) で中間周波数が10 MHz、局発周波数が610 MHzであるような装置における例

表2 FIR型フィルタとIIR型フィルタの特徴比較

	FIR型	IIR型
インパルス応答	有限長	無限長
構 造	非再帰型	再帰型
安定性	常に安定	場合によっては不安定
直線位相特性の実現	実現可能	実現不可能
回路規模	高性能なものは大	一般に小
遅 延	高性能なものは大	一般に小

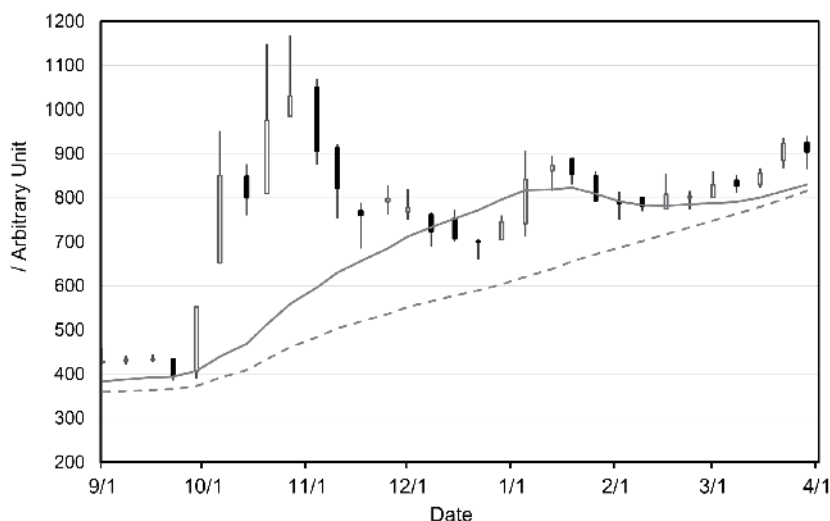


図3 株価推移の例。実線が13週移動平均線、点線が26週移動平均線：週ごとの終値を13週分あるいは26週分平均した。その他の「ローソク足」については他所を参照されたい^[5]。

わかる。また、株価の前日比は、ごく短期間の株価の上昇下降（つまり高い周波数成分）を判断する材料であり、これらも広義にはデジタルフィルタの一種と言って良い。FIR型フィルタにおいて、 k 日分の株価（株の世界では終値が使用される）の平均として考えると、フィルタ係数は非常に簡単で、 k の値に寄らず（ k は $k \geq 2$ を満たす整数）、 $h_k = 1/k$ である。また前日の終値との比較では、二日分の差であるから、 $x_n' = x_n - x_{n-1}$ であり、 $k=2$ で $h_2=1$ および $h_1=-1$ となる^{*5}。

図4に、FIR型デジタルフィルタによる高周波成分除去の例を示す。この場合、FIR型デジタルフィルタとして、49段からなるデジタルフィルタを作製し、三つの周波数の異なる信号に見立てた数列に作用させた。そうすると、一番細かい波形であるところの、最も周波数の高い成分が消え、残りの2つの低い周波数成分のみが残った。このように、時系列のデータにフィルタ係数をかけ算・足し算することで欲しい周波数成分を得ることができる。

実際のNMRのFIDデータにデジタルフィルタを作用させてみると、図5のようになる。ここで、上の段がスペクトル幅10kHzで測定したFIDで、下の段が64倍オーバーサンプリングした（つまりスペクトル幅640kHzで測定した）FIDにデジタルフィルタを作用させた後、ダウンサンプリング（デシメーションともいう）して、上の図と同じスペクトル幅にしたものである。両者を見ると、上のFIDは、おそらく多くの人に見慣れたFIDであって、FIDの先頭からデータが始まっているのに対し、下のFIDは、約8msの遅延時間後FIDが始まっている（ここでは遅延の様子がよく分かるように、通常より

もタップ段数の多いデジタルフィルタを使用している）。これは、デジタルフィルタによる遅延であって、この遅延時間にスペクトル幅をかけ算したものがタップ段数である。この遅延以外は、二つのFIDの形は非常に良く似ていることがお分かりいただけると思う。これら2セットのFIDをフーリエ変換したものを図6に示す。デジタルフィルタを使用する（B, E）・しない（A, D）で、信号強度にはほとんど差異が見られなかったが、（このケースでは）64倍オーバーサンプリングとダウンサンプリングでノイズが劇的に減少した（デジタルフィルタそのものはEとFを見る限りノイズにさほど影響を与えない）^{*6}。

2-4 デジタル直交検波

上述したアナログ直交検波には、いくつかのシリアスな問題点があり、この検波方法は後述するデジタル直交検波に順次置き換わっている。中間周波数近辺に落ちてきたNMR信号に対し、位相の異なる中間周波数をミキシング（乗算）するのだが、この時、二つの中間周波数の位相が非常に正確に90°ずれている必要があり、またその強度も非常に正確に同一でないといけな。ここが正確でないと、ス

*4 BEF (Band Elimination Filter)、ノッチフィルタ (Notch Filter) ともいう。

*5 テレビのニュースの最後に流れる株価のニュースを見たら、デジタルフィルタのことを思い出して欲しい。

*6 ただし、ここに示したデータは2005年に測定したものであって、最近のデジタル直交検波での測定、つまりオーバーサンプリングを前提とした装置で試したところ、当たり前といえば当たり前だが、ここまで大きな差が生じなかった (data not shown)。

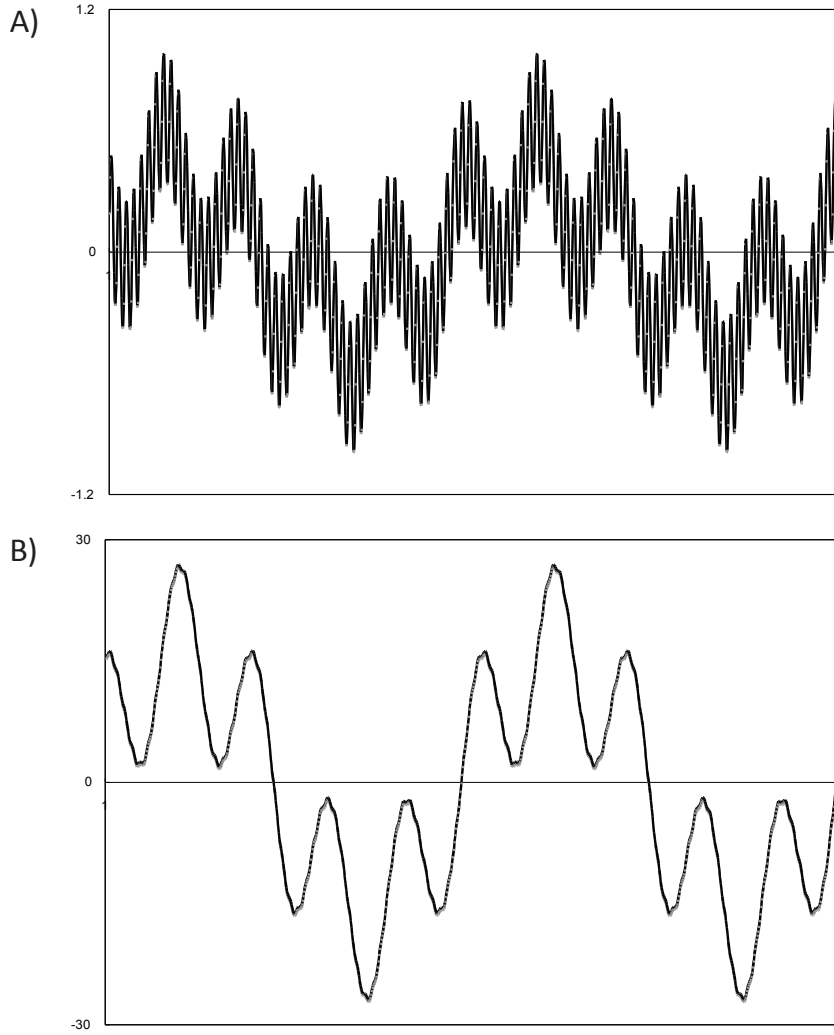


図4 FIR型デジタルフィルタによる高周波成分除去の例。A) 周波数比がそれぞれ100 : 10 : 2の正弦波を足しあわせた波形。B) Aの波形に49段からなるFIR型デジタルフィルタを作用させた場合の波形。

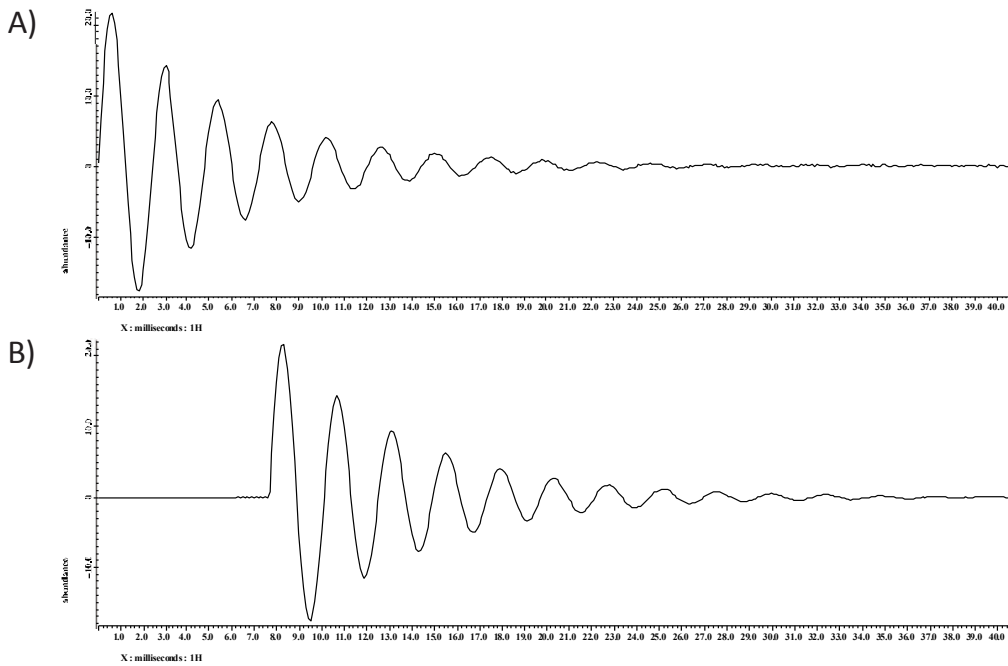


図5 水 H_2O の ^1H -単一パルス実験のFID信号。周波数オフセットを4.0ppmにして測定した。A) デジタルフィルタなし(スペクトル幅10kHz)。B) デジタルフィルタあり(観測幅640kHzのものをデジタルフィルタ通過後1/64ダウンサンプリング)。遅延の様子がよく分かるように、通常より遅延が起こるよう「脚色」してある。

ペクトル中に「折り返しイメージ」が発生してしまう。さらに、この方法ではADCを2セット使用するため、それらの間の取り込みゲインがずれていれば同様に折り返しイメージが発生し、また0V基準オフセットが同一でないとスペクトルのキャリア周波数(中心周波数)の場所に「センターグリッチ」と呼ぶアーティファクトが出現する。「折り返しイメージ」、「センターグリッチ」、どちらのアーティファクトも、単一パルス実験の場合では、RFパルスと受信器の位相を 0° 、 180° 、 90° 、 270° を1組とした位相サイクルを実行すると、通常は比較的簡単に消える。しかし、タンパク質の溶液多次元測定などの場合、間接測定軸側のデータポイント数を稼ぐために、極端なケースでは積算回数2回というのも珍しくなく、このアーティファクト消去のための位相サイクルを実行することができない場合も少なくない。また加えて、測定の感度やダイナミックレンジが要求されるときには、この問題は深刻になる場合がある。そういった場合、FSQD (Frequency Shifted Quadrature Detection、周波数シフト直交検出)を使用すると良いかもしれない。

ところで、アナログ直交検波は、**図1A**で示した最終段の周波数ミキシング、つまり、中間周波数近辺のベースバンドからオーディオ周波数領域へミックスダウンする際に位相の 90° 異なる中間周波数とかけ算し、それぞれをアナログのLPFを通過させた後ADCでデジタル化していた。これに対し、デ

ジタル直交検波では、比較的高いサンプリングレートでオーバーサンプリングする。つまり高い周波数成分を含むデジタルデータとし、数列のかけ算として位相の 90° 異なる周波数成分をかけ算し、デジタルのLPFを使用して、オーディオ周波数領域の信号を得る。かけ算をする位相の 90° 異なる周波数成分はソフトウェアで作成されるため、必ず同じ強度、きっちり 90° 位相がずれた状態にすることができる。したがって、上述のFSQDのようなアプローチをせずとも、センターグリッチ、折り返しイメージのないスペクトルを得ることができる。

ここまで受信系についていろいろ述べてきた。オーバーサンプリング、デジタルフィルタ、デジタル直交検波というのは本来一緒に議論されなければいけない。言い方を変えれば、デジタル直交検波の利点を最大限活用するために、オーバーサンプリングなりデジタルフィルタが必要なのであると言っておそらく差し支えない。デジタルフィルタが商用機に実装された当初、このデジタルフィルタで感度が上がったなどという議論が盛んになされていたが、実は陰にこういった問題が隠れていたことは意外と議論されてこなかった。

2-5 位相補正

NMRの一次元スペクトルを測定した際に、0次(周波数と無関係)の位相補正(以下p0)と1次(周波数と比例する)の位相補正(以下p1)をすること

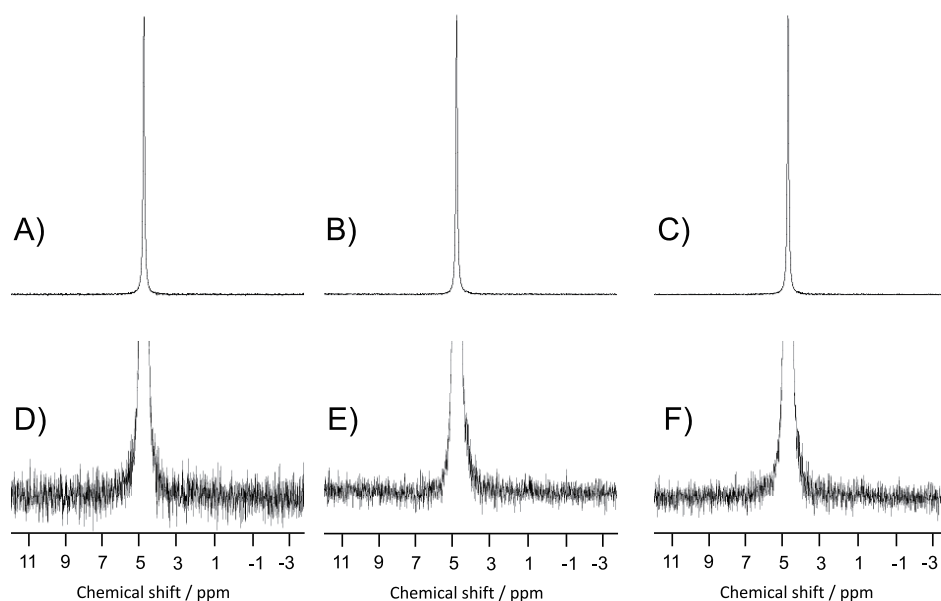


図6 水 H_2O の ^1H -単一パルス実験のスペクトル。図5のFIDデータをフーリエ変換した。A)およびD)は図5AのFID(デジタルフィルタなしの状態で観測幅10kHz)から得られた。B)およびE)は図5BのFID(デジタルフィルタあり、観測幅640kHzでデジタルフィルタ通過後1/64ダウンサンプリング)から得られた。C)およびF)は図5BのFIDを用いたが、デジタルフィルタを通していない(観測幅640kHzのまま)。A)~C)およびD)~F)はそれぞれ同じ縮尺で、D)~F)はA)~C)を縦方向に拡大したもの。

はご存知のことと思う。この場合、まずスペクトルの中央部に観測される、比較的大きな信号を見ながらp0をあわせ、スペクトルの端にあるピークの位相を見ながらp1をあわせる。では、なぜ位相あわせは必要なのだろうか？

まず、理由である。位相あわせするp0とp1で若干理由が異なる。p0の位相あわせをしないとくいけない理由は、上記で述べた直交検波において最終的に得られる、

$$A_R = -\frac{1}{4} [\cos(\omega_c t + \phi_1 - \phi_2 + \phi_3)]$$

および

$$A_I = -\frac{1}{4} [\sin(\omega_c t + \phi_1 - \phi_2 + \phi_3)]$$

が位相補正項 ϕ_1 、 ϕ_2 および ϕ_3 を含んでいること、およびこれらの位相は実際に検波してみないと通常知ることができないからである。つまり受信側の位相を送信側がうかがい知らないことに他ならない。

またp1の位相がずれる第一の原因は、例えば単一パルス実験において、パルスを打った直後にデータの取り込み開始ができないため (dead-timeという) である。このdead-timeの間、オフセットに近い信号はほとんど位相が回らないのだが、オフセットから離れたピークほど位相が回ってしまうからである (これを避けるためには、Hahn-echo取り込み、つまり、delay-180°-delay取り込み、とすれば良い。ただし、delayが2箇所、180°パルスが1本入ることによるデメリット、すなわち緩和や180°パルスの不均一性などによる信号強度の低下がある程度予想される)。それ以外にもp1の位相がずれる原因があって、それは、プローブから最終的にADCで信号を取り込まれた後からデジタルフィルタに至る

までに、周波数依存による位相遅延が起こることに起因する。これは通常のNMR装置の受信系にあって、基本的に無くしてあるか、あっても最小になるように抑えてある。デジタルフィルタの評価等をしてみるとたちどころに理解できることだが、周波数の1次に比例するp1というのはまだしも、位相補正量が周波数のむちゃくちゃな関数になっているようなものは、実はさらに存在する。そのような立場から眺めれば、NMR装置の受信系というのは実に気を使って設計されているものであると感心する。

最後に

3回にわたってNMRのハードウェアに関し述べた。まだまだ全く不足している感がぬぐえない。例えばField Gradient、イメージングについては全く触れることができなかった。大変申し訳なく思う次第である。本稿執筆にあたり、編集委員長の防衛大学校 浅野敦志 教授に大変ご心配とご迷惑をおかけしました。陳謝いたします。またJEOL RESONANCEの同僚たち、特に中井利仁 博士には「本稿作成に関し格別」の協力を仰ぎました。感謝いたします。

References

- [1] 根本暢明 (2014) NMRのハードウェアに関するメモ 1. 送信系について. *Bulletin of Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan*, **5**, 16-31.
- [2] 根本暢明 (2016) NMRのハードウェアに関するメモ 2. 主に受信系について—プローブ編. *Bulletin of Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan*, **7**, 19-25.
- [3] <http://www.digitalfilter.com/>
- [4] 岩田利王 (2004) 実践デジタル・フィルタ設計入門, CQ出版, 東京. 谷萩隆嗣 (2001) デジタルフィルタと信号処理, コロナ社, 東京.
- [5] <https://ja.wikipedia.org/wiki/ローソク足チャート>.



根本 暢明 (ねもと・のぶあき)

1967年 神奈川県横浜市生まれ。

1991年 大阪大学理学部化学科卒業。

1996年 大阪大学大学院理学研究科博士後期課程を「所定の年限在学し、所定の単位を修得の上退学」。

1996年 鳥取大学医学部教務職員。

1997年 バリアン・ジャパン (株) アプリケーションケミスト。

2002年 日本電子 (株) 研究員。

2005年 博士 (薬学)、大阪大学大学院薬学研究科 (2004年度)。

2011年 日本電子 (株) のNMR及びESR部門のスピンアウトに伴い、(株) JEOL RESONANCEへ異動、現在に至る。独身。

趣味

クラシック音楽鑑賞 (特にCDやハイレゾデータの蒐集)、国内J社の飛行機に乗りマイルを集めること。

Pure shift NMRを理解するための Zangger-Sterk法とPSYCHE法入門

ブルカー・バイオスピン株式会社

堤 遊

Yu.Tsutsumi@bruker.com

1. はじめに

天然存在比が高い ^1H のような核種のスペクトルでは、同種核間で J カップリングを持つことにより、信号は複雑に分裂し広幅化する。カップリング情報は構造解析をする上で大事な情報であるが、複雑に分裂した信号が狭い化学シフト範囲に集中すると、信号の重なりあいが避けられず、かえって解析が十分に行えないことがある。このように信号が混み合った場合に、同種核間での J カップリングをスペクトルから消し、すべての信号を天然存在比での ^{13}C -1次元(1D)スペクトルのようにシングレットのみに変換することができれば、とは多くの人が思うところである。もちろん溶液状態のNMRで観測される J カップリングは、固体NMRで見られるような強力な双極子カップリングに比べると高々十数Hz程度の弱いカップリングであるが、 J カップリングが運動による平均化で消えないことと、溶液のNMRで解析するのは半値幅が1Hzを大きく下回る信号の分離と相関であることを考えると、わずかな信号の広がりやスペクトルを解析する上では大きな弊害になるということは想像に難くない。このため、固体NMRほど盛んにではないが、溶液のNMRにおいても同種核デカップリングのための手法の研究は以前より続けられてきており、特に近年目覚ましい手法の進歩もみられる。このような同種核 J デカップリングが適用された測定法は総じて「pure shift」と呼ばれ、総説なども出てにわかに脚光を浴びている^[1,2]。

近年さまざまなpure shift測定法が実用的な形で提案されてきている。Zangger-Sterk (ZS) 法^[3]、PSYCHE (Pure Shift Yielded by Chirp Excitation) 法^[4]、BIRD-HSQC^[5,6]、covariance処理^[7]を利用したPSYCHE-TOCSY^[8]、PSYCHE-NOESY^[9]、constant time (CT)-COSY^[10]などがその代表的なものである。この中で、CT-COSYを除く測定法は、従来使われてきた溶液NMRの測定法とは少し変わった手法が使われており、初学者には理解が

難しい。本稿では、このような初学者に向けて測定を理解を深めてもらうために簡単に原理について解説していきたい。しかし本稿の範囲の中ですべての測定法について詳細に解説することはできないため、今回は、後に続く多くのpure shift手法で使われる基本的なアイデアのいくつかを導入したZS法と、近年のpure shift手法の中心となっているPSYCHE法の2つについて解説していく。

溶液NMRにおける同種核デカップリングといえば、長い間2D- J 分解測定^[11]の投影を取ることが主流であり、大きな進歩はなかった。そのような状況の中、pure shiftの手法開発が再び盛り上がりを見せ始めたのは、マンチェスター大のGareth MorrisらによるZS法を使った同種核デカップリングの掘り起こしがきっかけであった。ZS法は1997年に報告された決して新しい測定法ではないが、2D- J 分解測定法に比べると格段に感度が低いことから、分解能の改善は見られるもののあまり注目されてはなかった。ところが、2007年にMorrisらがZS法とDOSY法を組み合わせることで、スペクトルが複雑に重なり合う混合物を解析することができることを示した^[12]ほか、NOESYと組み合わせる上でcovariance処理を施すことで、pure shiftのNOESYを測定できることを示してからは^[10]、再度注目されるようになった。現在はPSYCHE法の登場により、ZS法をあえて使うことも少なくなってきたが、本稿ではまず歴史的な経緯を説明するという意味合いを込めてZS法の原理から解説していきたい。

2. Zangger-Sterk (ZS) 法

ZS法は短いパルスシーケンスでありながら、さまざまな手法を巧みに合わせた測定法である。まずZS法のパルスシーケンスを図1Aに示す。ZS法は大きく2つのアイデアからなる。1つ目のアイデアは、磁場勾配により空間分割したスライスごとに選択的スピンエコーを測定することであり、2つ目のアイデアは、 t_1 展開時間を延ばしながら2

次元状に短いFIDをブロック単位で取り込むことで J カップリングを発展させないことである。まず1つ目のアイデアから見ていきたい。このアイデアの基本となるのは、異種核間のカップリングがあるAXスピン系でのスピネコーである。AXスピン系でのスピネコーでは、A核かX核どちらかにのみ 180° パルスを与えれば J カップリングを巻き戻すことができる。これを踏まえた上で、ZS法のパルスシーケンスを選択的 180° パルスが当たる $^1\text{H}_{\text{OBS}}$ と当たらない $^1\text{H}_{\text{DEC}}$ に分けて考えてみる (図1B)。 $^1\text{H}_{\text{OBS}}$ 側は 180° パルスが2回当たるので正味0の回転を受け、 $^1\text{H}_{\text{DEC}}$ 側は 180° パルスが1回当たり反転する。これにより $^1\text{H}_{\text{OBS}}$ 側ではケミカルシフトはリフォーカスせず $^1\text{H}_{\text{DEC}}$ との J カップリングはリフォーカスする。また、選択的 180° パルスと同時に印加される磁場勾配 (図1B中の*)の効果を一旦無視すると、 $^1\text{H}_{\text{OBS}}$ 側は磁場勾配比 $1:-1:-2$ でリフォーカス

し、 $^1\text{H}_{\text{DEC}}$ 側はデフォーカスする。この一連の手順によりFIDの取り込み直前の時点で、最終的に観測する $^1\text{H}_{\text{OBS}}$ 側ではケミカルシフトが t_1 時間分だけ発展し、かつ J カップリングはリフォーカスするという状態をつくる。一方で不要な磁化である $^1\text{H}_{\text{DEC}}$ 側ではコヒーレンス選択によりなにも観測されない。

ここまでは、選択的 180° パルスを使った単なるスピネコー (選択反転スピネコー) に過ぎない。次に、選択的 180° パルスと同時に印加される磁場勾配パルス (図1B中の*)の効果について考える。図2に示すように、磁場勾配パルス中に選択パルスを照射することでサンプル管のZ軸方向全体を通して、位置依存的に異なる周波数に選択反転パルスを照射することができる。この時、磁場勾配によって加算された位相は、選択反転パルス自身によってリフォーカスする。この効果により十分に強い磁場勾配を掛けながら選択的 180°

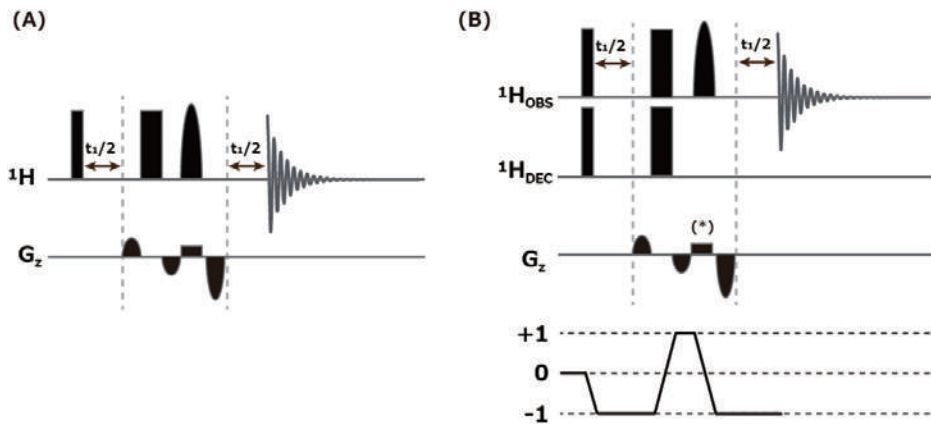


図1 ZS法のパルスシーケンス (左) とZS法のパルスシーケンスを $^1\text{H}_{\text{OBS}}$ と $^1\text{H}_{\text{DEC}}$ に分けたパルスシーケンス (右)。細い黒い四角は 90° パルス、太い黒い四角は 180° パルス、半円状のパルスは 180° 選択反転パルスをそれぞれ示す。

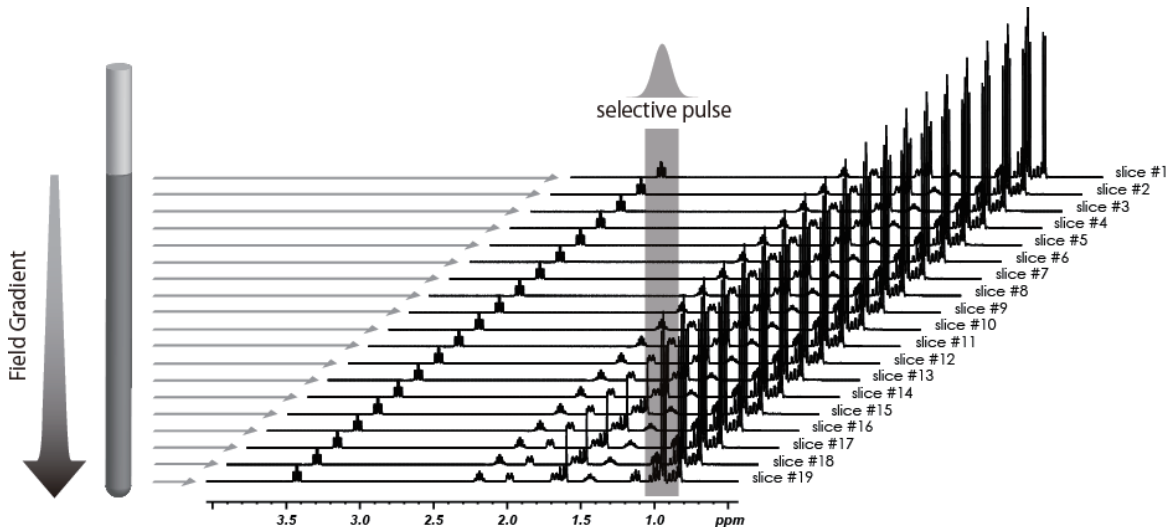


図2 磁場勾配と選択反転パルスを使った空間スライス の考え方を模式的に示す。磁場勾配によりサンプル管の中の各スライスは別々のオフセット周波数をもつ。この状態である周波数で選択反転パルスを印加するとスライスごとに異なる信号に照射されることになる。その代わりに、各スライスのほかの信号にはパルスが当たらないため、ZS法ではこれらの磁化は捨てられる。このため、ZS法は基本的に感度が悪い。

パルスを印加すれば、サンプル全体を通して、それぞれの周波数に選択的 180° パルスが当たった選択的スピンエコーのスペクトルを和として観測することができる。この観測されたスペクトルは、すべての信号が同種核デカップルされたpure shiftなスペクトルとなる。

さて、この時点で我々はまだ、FIDの取り込み直前の時点ですべての信号に対してケミカルシフトが t_1 時間分だけ発展し、 J カップリングがリフォーカスした状態を作っているに過ぎず、このままFIDを取り込んでも J カップリングによる変調がFIDにかかるだけであり、努力は報われない。そこで、 t_1 展開時間を延ばしながら二次元状にFIDを1点ずつ取り込むという2つ目のアイデアを導入する。ここまでのパルスシーケンスはスピンエコーであり、 t_1 の長さにかかわらずいつでもFIDの取り込み直前では t_1 時間分ケミカルシフトが発展し、 J カップリングがリフォーカスする。このため Δt_1 (2次元1点あたりの t_1 の加算分)を、スペクトル幅に応じたdwell時間に合わせて2次元測定状にFIDを1点ずつサンプリングすれば、データポイントを並べなおしたFIDは広帯域に同種核 J デカップリングされた信号になる。またこの時、厳密に言えば各FIDの最初の1点のみが完全にデカップルされたデータポイントになるのであるが、測定時間を短縮するために、 Δt_1 をdwell時間ではなく J カップリングの発展を無視できるほど短いある一定幅の時間として、FIDをブロックとしてまとめて取り込むのが一般的である。以上のFIDの取り込みを模式的に図3に示す。このように2次元状にブロック単位で取り込まれたFIDは、専用の処理用プログラム^[14]を使うことで一つのFIDにつながり合わせられ、以降は通常のデータ処理を経てスペクトルに変換される。

ZS法は一見複雑な測定であるが測定条件が整えば、比較的安定に広帯域同種核 J デカップリングを実現することができる。このZS法の測定例を図4に示す。測定条件として調整する必要があるのは選択反転パルスのパルス幅と選択反転パルス中に印加される磁場勾配の強度、そして Δt_1 である。

選択反転パルスのパルス幅は、感度およびデカップリングの良さに影響を与える。測定の原理から分かるように、サンプル中の全スピンの内、実際に観測される信号に貢献するのは選択反転パルスが当たった帯域のスピンのみであり、選択反転帯域が狭いほど感度は低下する。一方で、選択反転帯域を広くするとカップリングしている他のスピンの

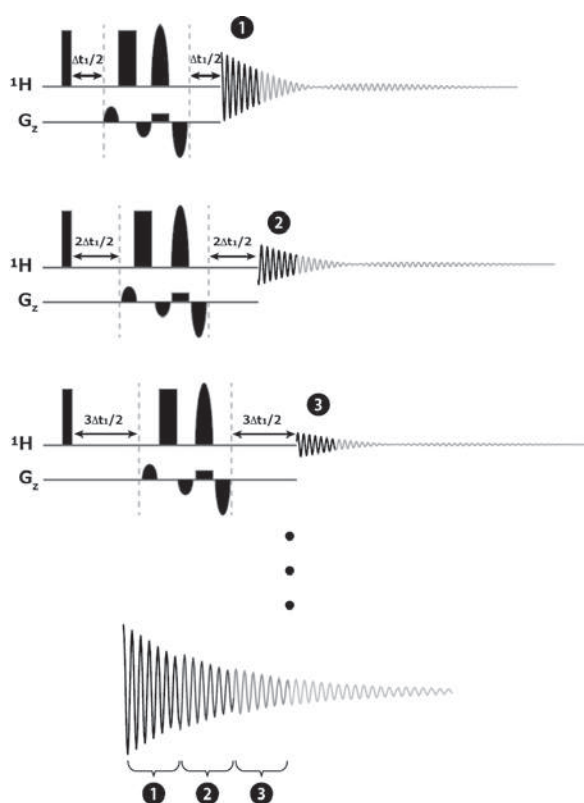


図3 ZS法のFIDの取り込みはブロック単位でおこなわれる。3つのFIDのブロック(①~③)はそれぞれ異なる t_1 で測定され、すべての測定が終わったあとに各ブロックをつなぎ合わせ、一つのFIDにする。

も影響を与えるため、デカップリング能力が低下する。通常この選択反転パルスのパルス幅は数十ms程度に設定する。

磁場勾配強度は選択反転パルスがスペクトルの幅全体に当たるように設定する。例えば、測定するスペクトル幅が4kHz (^1H : 400 MHzで10 ppm)で、使用するハードウェアが最大50 G/cmの磁場勾配出力を持ち、プローブのコイル長が2 cmだったとすると、 $\gamma_{\text{H}} = 42.577 \times 10^6 \text{ Hz/T}$ として、おおよそ1%程度の出力が必要になる。図2から分かるように磁場勾配強度をあまり大きくすると選択反転パルスがどの信号にも当たらないサンプル領域が増えるため、感度が全体的に低下する。一方で磁場勾配強度が不十分だと、サンプル中のどのスライスにおいても選択反転パルスが当たらず、検出されない信号が出てくる。このように、磁場勾配強度の設定は測定のたびに調整するものでもないが、適切な大きさにあわせておく必要がある。

Δt_1 の値は、測定時間とデカップリングの良さとのトレードオフで決める。前述のように、測定時間短縮のため64点($\Delta t_1 = \text{dwell} \times 64$)ずつなど、ある程度の幅をもってFIDのブロックを取り込むのが普通であるが、この時あまり Δt_1 を長く取ると

(FIDのブロックサイズを大きくすると) J カップリングの変調がFIDに現れデカップリングサイドバンド状のノイズが強く現れるようになるため注意が必要になる(図5)。これを防ぐためには Δt_1 は J カップリングの逆数より十分に短い時間に設定する。

ZS法は強力なpure shift測定法であり、実質的には単純なスピンエコーゆえに、さまざまなパルスシーケンスと組み合わせることができる特長があるものの、測定の原理上磁化のほとんどを捨てるため、 ^1H 1D測定と比べて数十分の1から百分の1程度にまで感度が低下するという大きな欠点があ

る。PSYCHE法はZS法に比べこの点で優れており、いまやZS法に代わってpure shift ^1H 1Dを測定するためだけではなく多くのpure shiftの測定の基本ブロックとしても使われるようになってきている。PSYCHE法の測定原理はZS法に比べると非常に理解しにくい、測定の条件設定に必要な程度の理解が得られるように要点を絞って解説する。

3. PSYCHE 法

図6AにPSYCHE法のパルスシーケンスを示す。このパルスシーケンスの特徴はシーケンスの中心に

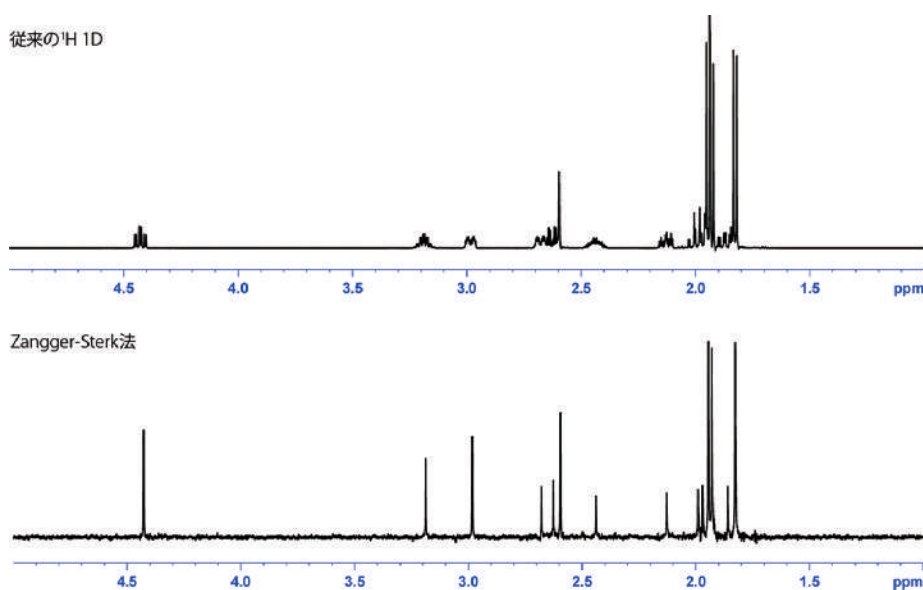


図4 ZS法の測定例。サンプルは CDCl_3 中のメントール。積算回数2回で512個のinterferogramからFIDを再構成した。測定時間は25分。従来法の ^1H -1Dは積算回数2回で測定時間は30秒。測定時間と感度の比較からZS法がいかに感度の悪い測定かがわかる。

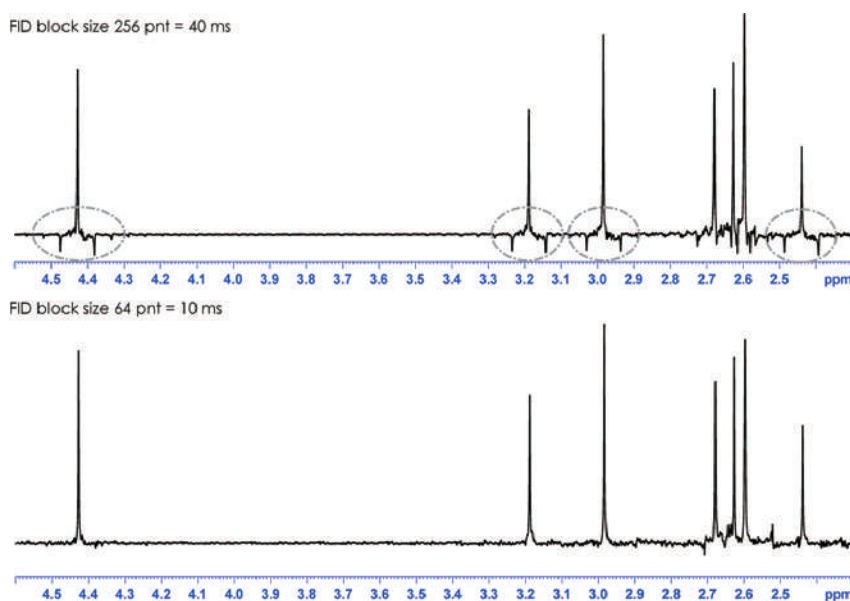


図5 ZS法スペクトルのブロックサイズ依存性(サンプルは CDCl_3 中のメントール)。FIDのブロックサイズが40msのスペクトル(上)では J カップリングの大きさ(数Hzから数十Hz)に対してブロックサイズが大きいため、FIDに変調が残りサイドバンドとして現れている(点線囲い)。一方でFIDのブロックサイズが10msのスペクトル(下)では比較的良好的なデカップリングが得られている。

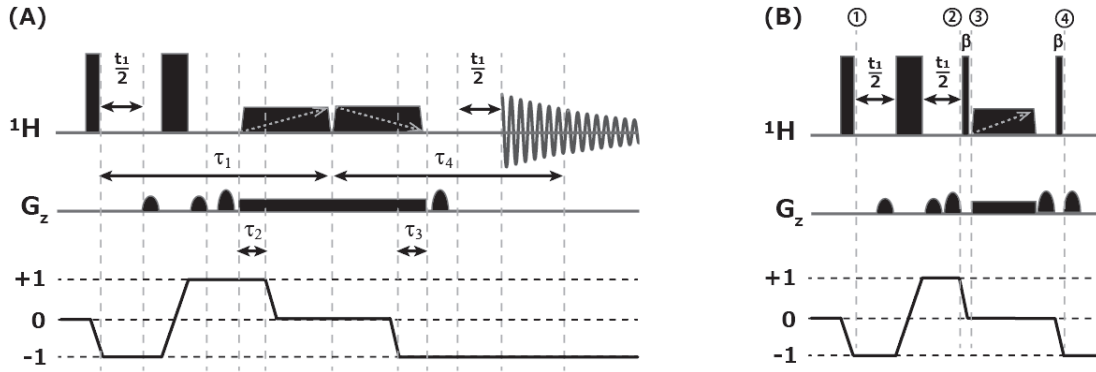


図6 PSYCHE (左) およびanti-z-COSY (右) のパルスシーケンス。細い黒い四角は90°パルス、太い黒い四角は180°パルス、矢印つきの黒い台形はadiabaticパルスをそれぞれ示す。また(B)でのβと記載のある細い黒い四角はフリップ角β°のパルスを示す。PSYCHEのadiabaticパルスをハードパルスに変更すれば両者がほぼ同じであることが見て取れる。PSYCHEの基本的なアイデアはanti-z-COSYに詰まっているため、まずはanti-z-COSYで磁化の動きを考えるとPSYCHEは理解しやすい。

配置されている2つの逆掃引のadiabaticパルスである。この二つのadiabaticパルスは浅いフリップ角になるように調整され、これがJカップリングをリフォーカスさせる中心的な役割を果たす。この動きを理解するためには、PSYCHE法の原型となっているanti-z-COSY^[15]に似せた形でPSYCHE法のパルスシーケンスを単純化し、2スピン系 ($\hat{I}_1 \hat{I}_2$) のモデルで考えてみるのがわかりやすい (図6B)。

まず同種核の2スピン系 ($\hat{I}_1 \hat{I}_2$) の \hat{I}_1 に着目して、最初の90°パルス直後 (①) の状態を考えると次式のようになる。

$$I_{1z} \xrightarrow{90^\circ_x} \frac{1}{2} i (\hat{I}_1 + \hat{I}_{2a} + \hat{I}_1 + \hat{I}_{2\beta}) - \frac{1}{2} i (\hat{I}_1 - \hat{I}_{2a} + \hat{I}_1 - \hat{I}_{2\beta})$$

さらに \hat{H}_{free} のもとで時間発展しながら180°パルスによるスピンエコーを受ける (②) と、次式のようになる。

$$\begin{aligned} \xrightarrow{\hat{H}_{free} \cdot \frac{1}{2} t_1} & -i \hat{I}_1 - \hat{I}_{2a} \cdot \exp \left\{ i (\Omega_1 + \pi J_{12}) \cdot \frac{1}{2} t_1 \right\} + i \hat{I}_1 + \hat{I}_{2a} \\ & \cdot \exp \left\{ -i (\Omega_1 + \pi J_{12}) \cdot \frac{1}{2} t_1 \right\} \\ & -i \hat{I}_1 - \hat{I}_{2\beta} \cdot \exp \left\{ i (\Omega_1 - \pi J_{12}) \cdot \frac{1}{2} t_1 \right\} + i \hat{I}_1 + \hat{I}_{2\beta} \\ & \cdot \exp \left\{ -i (\Omega_1 - \pi J_{12}) \cdot \frac{1}{2} t_1 \right\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \xrightarrow{180^\circ_x - \hat{H}_{free} \cdot \frac{1}{2} t_1} & -i \hat{I}_1 + \hat{I}_{2\beta} \cdot \exp (i \pi J_{12} t_1) + i \hat{I}_1 - \hat{I}_{2a} \cdot \exp (-i \pi J_{12} t_1) \\ & -i \hat{I}_1 + \hat{I}_{2a} \cdot \exp (-i \pi J_{12} t_1) + i \hat{I}_1 - \hat{I}_{2\beta} \cdot \exp (i \pi J_{12} t_1) \end{aligned} \quad \dots(1)$$

$$(\hat{H}_{free} = \Omega_1 \hat{I}_z + \Omega_2 \hat{I}_{2z} + \pi J_{12} 2 \hat{I}_{1z} \hat{I}_{2z})$$

計算の量を減らすためにここから先はこの(1)式の項のうち、最初の90°パルスの直後にp=-1の

コヒーレンスを持っていた項の一つである $\hat{I}_1 + \hat{I}_{2\beta}$ の項 (180°パルスの前は $\hat{I}_1 - \hat{I}_{2a}$ であった項) にのみ着目する。最終的には最初の90°パルス直後にp=-1となったコヒーレンスのみが観測され (図6Bのコヒーレンスダイアグラムを参照)、さらにその最初の90°パルスの直後にp=-1のコヒーレンスを持っていたもう片方の項である $\hat{I}_1 + \hat{I}_{2a}$ の動きは、αとβの記号を入れ替えれば $\hat{I}_1 + \hat{I}_{2\beta}$ の動きから容易に想像できるため、これ以外の項の計算は割愛させていただきます。

さて、一つ目のβ°パルスのあとにzero quantum coherence filter^[16]とpurge gradientが入っているため、p=0の項のうち $\hat{I}_{1\alpha}$ 、 $\hat{I}_{1\beta}$ 、 $\hat{I}_{2\alpha}$ 、 $\hat{I}_{2\beta}$ の組み合わせからなる項しか残らないことを考慮したうえで、この一つ目のβ°パルスの $\hat{I}_1 + \hat{I}_{2\beta}$ に対する作用を考えると、

$$\begin{aligned} -i \hat{I}_1 + \hat{I}_{2\beta} \cdot \exp (i \pi J_{12} t_1) \\ \xrightarrow{\beta^\circ_x} \frac{1}{4} \sin \beta \cdot \exp (i \pi J_{12} t_1) \\ \cdot \left\{ \cos^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) \cdot \hat{I}_{1\alpha} \hat{I}_{2\beta} - \cos^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) \cdot \hat{I}_{1\beta} \hat{I}_{2\beta} \right. \\ \left. + \sin^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) \cdot \hat{I}_{1\alpha} \hat{I}_{2\alpha} - \sin^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) \cdot \hat{I}_{1\beta} \hat{I}_{2\alpha} \right\} \end{aligned}$$

となる (③)。

ここでさらに2つ目のβ°パルス (④) があたることで生成される項の内、最終的に観測されるp=-1の項だけ抜き出すと次の(2)式のようになる。

$$\begin{aligned} \xrightarrow{\beta^\circ_x} \frac{1}{8} i \sin^2 \beta \cdot \sin^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) \cdot \exp (i \pi J_{12} t_1) \\ \cdot \left\{ -\cos \beta \cdot \hat{I}_{1\alpha} \hat{I}_{2-} + \cos \beta \cdot \hat{I}_{1\beta} \hat{I}_{2-} \right. \\ \left. + \cos^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) 2 \hat{I}_1 - \hat{I}_{2a} - \sin^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) 2 \hat{I}_1 - \hat{I}_{2\beta} \right\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & + \frac{1}{8} i \sin^2 \beta \cdot \cos^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) \cdot \exp(i\pi J_{12} t_1) \\
 & \cdot \left\{ -\sin \beta \cdot \hat{I}_{1\alpha} \hat{I}_{2-} + \sin \beta \cdot \hat{I}_{1\beta} \hat{I}_{2-} \right. \\
 & \left. + \cos^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) 2 \hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\alpha} - \sin^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) 2 \hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta} \right\} \quad \dots(2)
 \end{aligned}$$

ここで (2) 式の項の内、最終的に欲しいのは $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta}$ の項である。計算の最初と最後だけを見ると、この項は $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\alpha}$ から $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta}$ へと変換されている。つまりこの項では 90° パルス直後からみてケミカルシフトは同じ向きに発展し続け (コヒーレンスオーダが $p = -1$ で同じ)、かつ J カップリングによる発展が逆向きになっており (カップリング相手が α から β に変わっている) リフォーカスする。これはまさにわれわれが同種核デカップリングされたスペクトルを観測するために必要な項である。

あとは不要な項を排除すればよい。まずは2スピン目にコヒーレンスに移った項である $\hat{I}_{1\alpha} \hat{I}_{2-}$ と $\hat{I}_{1\beta} \hat{I}_{2-}$ について考える。これらの項は (B) のパルスシーケンスでは取り除けないが、実際の PSYCHE のパルスシーケンス (A) では取り除くことができる。(A) と (B) を見比べると、(A) の adiabatic pulse がフリップ角 β に相当するような強度に調整されていたとすると、2つのパルスシーケンスはほとんど同じであることがわかる。違うのは、掃引の向きが異なる adiabatic pulse が、磁場勾配が印加されている間に照射されていることである。これは、(i) purge gradient、(ii) zero quantum coherence filter、(iii) 周波数ごとに2回の β° パルスが当たるタイミングが異なる、という3つの作用を兼ねている。(i) と (ii) の効果についてはすでに説明したが、特にこの

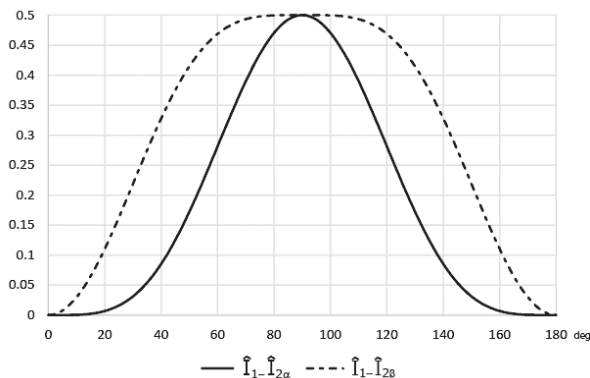


図7 PSYCHEの $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\alpha}$ と $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta}$ の係数の β 依存性。フリップ角の浅いところでは $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\alpha}$ と $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta}$ の強度に大きな差があるため、スペクトルには殆どデカップルされた信号しか観測されない。フリップ角が大きくなるにつれて全体的な信号強度も増加するが、同時に $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\alpha}$ と $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta}$ の強度が近づくため、デカップリングされていない信号が目立ち始める。

(iii) が $\hat{I}_{1\alpha} \hat{I}_{2-}$ と $\hat{I}_{1\beta} \hat{I}_{2-}$ の不要項を消去する役割を担う。これは、2回の β° パルスで2スピン目にコヒーレンスに移る項において、1回目の β° パルスが当たる時には1スピン目のケミカルシフトのタイミングで当たり、2回目の β° パルスが当たる時には2スピン目のケミカルシフトのタイミングで当たるため、 τ_2 と τ_3 の長さが変わり磁場勾配により獲得した位相がリフォーカスしないためである。この結果、最終的に残る成分は次のとおりである。

$$\begin{aligned}
 & - \frac{1}{4} i \exp(i\pi J_{12} t_1) \cdot \sin^2 \beta \\
 & \cdot \left[\cos^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) \cdot \sin^2 \left(\frac{\beta}{2} \right) \hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\alpha} \right. \\
 & \left. + \left\{ \cos^4 \left(\frac{\beta}{2} \right) + \sin^4 \left(\frac{\beta}{2} \right) \right\} \cdot \hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta} \right] \quad \dots(3)
 \end{aligned}$$

最後に残る不要項は $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\alpha}$ であるが、これはカップリングがそのままリフォーカスせずに発展し続ける項である。これを消すためには β が浅いフリップ角であるという条件が必要になってくる。(3) 式での $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\alpha}$ と $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta}$ の係数の β 依存性をプロットすると (図7)、確かにフリップ角が浅いところ (たとえば 20° 未満) では $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta}$ (必要な項) が強く残り、 $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\alpha}$ (不要な項) が殆どないことがわかる。一方で β があまりにも小さいところでは $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta}$ が弱いため感度が低いこともわかる。このため PSYCHE 法では、 β を調整することで感度 ($\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta}$ が多いこと) を優先するか、デカップリング ($\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\alpha}$ が少ないこと) を優先するかを測定者が調整することができる。

以上の議論をまとめると、最初の 90° パルスの後に生じた $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\alpha}$ の磁化は、2つの adiabatic pulse を境に $\hat{I}_{1-} \hat{I}_{2\beta}$ となる。ここで delay を調整してパルスシーケンスの真ん中でコヒーレンスが入れ替わるように調整すれば ($\tau_1 = \tau_2$)、パルスシーケンスを通してケミカルシフトは発展し、 J カップリングはリフォーカスすることとなる。これは ZS 法で得られた結果と同じであり、これ以降は ZS 法と同じように FID をブロック単位で取り込むことで pure shift のスペクトルを得ることができる。このように PSYCHE 法は直感的に何が起きているのかわかりやすいパルスシーケンスではないが、パルスシーケンスの各部位が何をしているのか概ね分かれば、動作のイメージはつかめるものと思われる。

4. ZS 法と PSYCHE 法

ここで PSYCHE 法と ZS 法で得られたスペクトルを比較してみる (図8)。この図8からわかるように、PSYCHE 法は ZS 法に比べて格段に感度が良い。さ

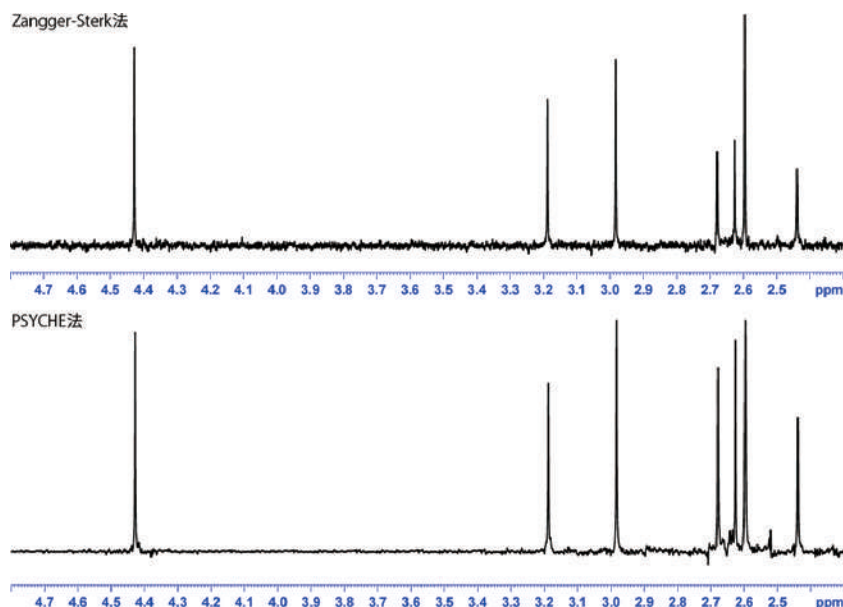


図8 Zangger-Sterk法とPSYCHE法の比較。サンプルは CDCl_3 中のメントール。いずれの測定も積算回数は4回、測定時間は30分であった。同じ積算回数で比較したとき、ZS法に比べてPSYCHE法がS/Nがよいことがわかる。

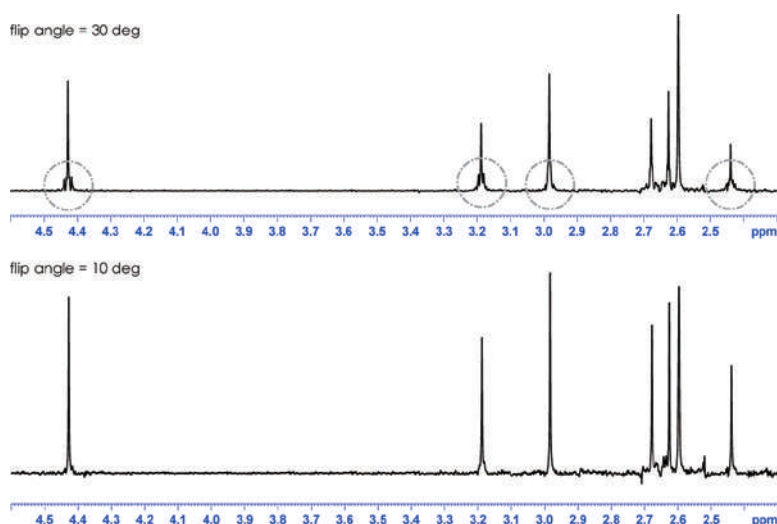


図9 PSYCHEスペクトルのフリップ角依存性 (サンプルは CDCl_3 中のメントール)。フリップ角 30° のスペクトルではデカップリングされていない信号が立ち上がってきているのが確認できる。一方でフリップ角 10° のスペクトルは 30° のときに比べてややノイズが多い。

らに、PSYCHE法ではadiabatic pulseの強さを変えることで、感度とデカップリングの質を天秤にかけることができるのが特徴である。図9にadiabatic pulseのフリップ角を変えた時のスペクトルの変化を示す。フリップ角を深くするほど感度が上昇するが、デカップリングサイドバンド状のノイズが増えてきていることが確認できる。このことは、先ほどプロダクトオペレータを用いて解説した通りの結果となっている。このように、PSYCHE法は感度面でZS法に比べて優れていること、調整するパラメータが少なくわかりやすいことから、ZS法に代わって現在のpure shift手法の主流となっている。

5. さいごに

ZS法もPSYCHE法も見目の複雑さとは裏腹に、実際にはスピネコーに過ぎないため、さまざまなパルスシーケンスと組み合わせてpure shiftの測定に供することができる。この点がこれらのパルスシーケンスの優れた特長となっていることはすでに述べた。例えば、PSYCHEを部品として使った代表的なパルスシーケンスにPSYCHE-TOCSYとPSYCHE-NOESYがある。これらの測定では、 t_1 展開時間にPSYCHEブロックを取り入れることでJカップリングの発展を防ぐ。そしてデータ処理にcovariance法を適用することで、 F_1 軸と F_2 軸両方がpure shiftとなるスペクトルを得ることができる。これらの測定は、pure shiftスペクトルで構造解析

をする上で、すでに欠かせないものとなっている。

また同種核の2次元相関測定だけではなく、HSQCやHMBCなども構造解析に必要であるが、これらにもそれぞれBIRD-HSQCやtilted-HMBC^[13]などpure shiftになる測定がある。これらのデカップリングのテクニックはZS法やPSYCHE法とは大きく異なるものであるが、紙面の都合で紹介することはできない。しかしいずれも応用の利くアイデアであり、興味のある読者諸氏にはぜひ文献を参照されたい。

今回は近年発達してきた数あるpure shift測定の手法のうちZS法とPSYCHE法のみを取り上げたが、これらの手法を組み合わせることで低分子の有機化合物をpure shiftで解析するための最低限の測定はできるようになってきている。また手法が一般化してきたことで、多くのNMRユーザがpure shift法を認識し、需要が高まってきているのを感じる。Pure shift測定のための技術が進んできたとはいえ、やはりきれいに測定できないサンプルがあったり、測定パラメータの設定が難しい測定があったりするなど、完全にルーチン的に使える安定性があるとは言い切れない部分もまだある。また普段溶液のNMRで見る線形や感度から考えると、pure shiftの測定では線形の悪さやアーティファクトが目立つことも事実である。しかし先鋭化のためのデカップリングと相関情報を得るためのリカップリングを組み合わせるような相互作用の操作はNMRの醍醐味であり、このようなツールが溶液NMRでも出てきたことは喜ばしい。これらpure shiftの手法によって溶液NMRのアイデアの幅が広がり、今後さまざまな応用につながる事が期待される。

- [1] Castanar L. and Parella T. (2015) Broadband ¹H homodecoupled NMR experiments: recent developments, methods and applications. *Magn. Reson. Chem.* **53**, 399-426.
 [2] Zangger K. (2015) Pure shift NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **86**, 1-20.

- [3] Zangger K. and Sterk H. (1997) Homonuclear Broadband-decoupled NMR spectra. *J. Magn. Reson.* **124**, 486-489.
 [4] Foroozandeh M., Adams R.W., Meharry N.J., Jeanerat D., Nilsson M. and Morris G.A. (2014) Ultrahigh-resolution NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 6990-6992.
 [5] Sakhaii P., Hasse B. and Bermel W. (2009) Experimental access to HSQC spectra decoupled in all frequency dimensions. *J. Magn. Reson.* **199**, 192-198.
 [6] Paudel L., W. Adams R.W., Király P., Aguilar J.A., Foroozandeh M., Cliff M.J., Nilsson M., Sándor P., Waltho J.P. and Morris G.A. (2013) Simultaneously enhancing spectral resolution and sensitivity in heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 11616-11619.
 [7] Zhang F. and Brüschweiler R. (2004) Indirect covariance NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13180-13181.
 [8] Foroozandeh M., Adams R.W., Nilsson M. and Morris G.A. (2014) Ultrahigh-resolution total correlation spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 11867-11869.
 [9] Ying J., Roche J. and Bax A. (2014) Homonuclear decoupling for enhancing resolution and sensitivity in NOE and RDC measurements of peptides and protein. *J. Magn. Reson.* **241**, 97-102.
 [10] Aguilar J.A., Colbourne A.A., Cassani J., Nilsson M. and Morris G.A. (2012) Decoupling two-dimensional NMR spectroscopy in both dimensions: Pure shift NOESY and COSY. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 6460-6463.
 [11] Aue W.P., Karahan J. and Ernst R.R. (1976) Homonuclear broad band decoupling and two dimensional J-resolved NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **64**, 4226-4227.
 [12] Nilsson M. and Morris G.A. (2007) Pureshift proton DOSY: diffusion-ordered ¹H spectra without multiplet structure. *Chem. Commun.* 933-935.
 [13] Sakhaii P., Haase B., Bermel W. (2013) Broadband homodecoupled heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **288**, 125-129.
 [14] 以前は測定者自身がこのようなコンピュータプログラムやスクリプトを用意する必要があったが、最近ではメーカー提供のソフトにも実装されているようである。
 [15] Pell A.J., Edden R.A.E. and Keeler J. (2007) Broadband proton-decoupled proton spectra. *Magn. Reson. Chem.* **45**, 296-316.
 [16] Thrippleton M.J. and Keeler J. (2003) Elimination of zero-quantum interference in two-dimensional NMR spectra. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 3938-3941.



堤 遊 (つつみ・ゆう)

1998年 東京理科大学基礎工学部生物工学科 卒業
 2000年 東京理科大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻博士前期課程 修了
 2003年3月 東京理科大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻博士後期課程 単位満了退学
 2003年4月 科学技術振興機構CREST研究員 着任
 2003年9月 東京理科大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻において博士号(工学)取得
 2005年 日本電子株式会社 入社
 2013年 ブルカー・バイオスピン株式会社 入社
 現在に至る

小分子内包フラーレンの有機合成と それらの¹H NMRシグナル

京都大学化学研究所

村田 靖次郎

yasujiro@scl.kyoto-u.ac.jp

はじめに

フラーレンはsp²混成炭素が球状に結合して構成される分子であり、分子内部に中空の空間を有している。1985年に質量分析により発見され^[1]、1990年に炭素棒のアーク放電による大量合成法^[2]が開発された後に、実験研究が爆発的に発展している。特に、最も対称性が高く、生成量が豊富なフラーレンC₆₀については、サッカーボール様の球状構造に由来する三次元的に広がったπ電子系に関する研究が幅広い分野から注目を集めている。例えば、C₆₀に有機官能基を付加させることにより、溶解度を向上させ、かつ機能性を付与することによって、C₆₀誘導体は有機薄膜太陽電池に欠かせないn型半導体材料となっている。また、C₆₀に比べて研究例は圧倒的に少ないものの、C₆₀の次に大きなC₇₀についても、類似の研究が進められている。

フラーレン内部の中空空間に金属イオン・金属クラスター・原子が存在する物質は、内包フラーレンと呼ばれている^[3]。金属内包フラーレンは、金属酸化物を練り込んだ炭素棒をアーク放電することによ

り、大量に得られるC₆₀と共に微量が発生する。この手法では主に希土類元素が用いられているが、C₆₀内部には金属が内包されることはほとんど無く、C₈₀やC₈₂を中心とする大きなフラーレン骨格に金属が内包される。こうして発生された金属内包フラーレンは、多段階のHPLCにより単離することが可能である。一方、C₆₀にイオンビームを照射すること、あるいは、プラズマ条件にさらすことにより、リチウムイオンや窒素原子を内部に導入することができる。また、3,000気圧・650℃の過酷な条件において、C₆₀の内部に希ガス原子を内包させることができる。しかしいずれの方法においても、内包フラーレン合成の収率は低く、かつ、フラーレンケージや内包化学種の種類には制限があるため、全く異なる方法による内包フラーレンの合成法の開発が必要である。

中空のフラーレンに開口部を設け、そこから小分子を内部に挿入し、その後開口部を完全に閉じることが出来れば、最も明快な内包フラーレンの合成法となり得る。この手法はフラーレンに対してあたか

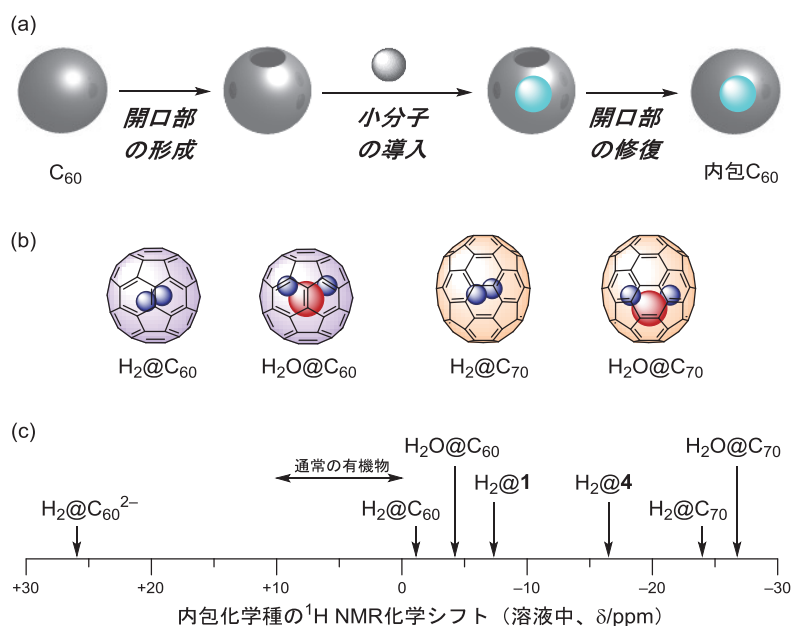


図1 (a) 分子手術法による小分子内包フラーレン合成、(b) 小分子内包フラーレンの例、ならびに、(c) 内包化学種の特徴的な¹H NMR化学シフト

も外科手術を施すものとも見なせるので、「分子手術法」^[4]と呼ばれている(図1)。我々の研究グループでは、温和な条件下での有機合成によりこの分子手術法の開発に取り組み、 H_2 分子や H_2O 分子をフラレン C_{60} や C_{70} の内部に閉じ込めることに成功している。内包化学種における水素原子はNMR活性であるため、その化学シフトや緩和時間を測定することによって、フラレン内部の磁氣的性質、ならびに、外界から隔離された特異な環境下に存在する小分子の性質を明らかにすることが出来る。本稿では、特徴的な化学シフトをもつ内包化学種のNMRについて述べていきたい。

H_2 分子ならびに H_2O 分子を内包したフラレン C_{60}

図2に示す C_{60} 開口体**1**は、 C_{60} から3段階の反応で合成することができる^[5]。これに800気圧の水素ガスを200°Cで接触させると、ほぼ定量的に一個の H_2 分子が**1**の内部に導入される^[6]。この H_2 分子の 1H NMRシグナルは、基準物質であるテトラメチルシランよりも高磁場領域である-7.2 ppmに観測され、 C_{60} 部分の環電流による強い遮蔽効果を反映している。このシグナル強度の時間変化を検証することによって、内包 H_2 分子の放出挙動が明らかにされ、160°C以上に加熱するとゆっくりと放出されるが、室温では全く放出されずに内部に留まっていることが明らかとなった。 $H_2@1$ の開口部は4段階の反応で完全に修復することが可能である^[7]。こうして合成された水素分子内包フラレン $H_2@C_{60}$ の 1H NMRでは、-1.4 ppmにシグナルが観測される。この C_{60} の場合では、開口部を修復する際に常磁性環電流を示す五員環が再生されるため、 $H_2@1$ よりも低磁場に内包 H_2 分子のシグナルが観測されるものと説明できる。溶媒に溶かした H_2 分子のシ

グナルは+4.5 ppmに観測されるので、 C_{60} ケージによる遮蔽効果は約6 ppmである。このように、内包分子の 1H NMRを測定することによって、これまで理論的な考察のみに留まっていたフラレン内部の磁氣的性質を実験的に明らかにすることが可能となり、 C_{60} 内部は磁氣的に弱く遮蔽されていることが分かった。

では、 C_{60} を二電子還元したジアニオンではどうなるであろうか? $H_2@C_{60}$ に過剰のNaSMeをアセトニトリル中で混合すると、そのジアニオンを発生させることができる。この $H_2@C_{60}$ ジアニオンの 1H NMRスペクトルでは、+26.3 ppmにシグナルが観測された^[8]。これは、二電子還元によりフラレン骨格の反芳香族性が増大し、その結果、内包 H_2 分子は磁氣的に強く反遮蔽されていることを示している。この現象は、 C_{60} の全ての五員環と六員環の中心におけるNICS値^[9]を調べた結果と一致している。

C_{60} 開口体**1**は H_2 分子を挿入するのに適しているが、より大きな分子を内部に導入するためには、より大きな開口部の構築が必要である。しかし、大きな開口部では、小分子の挿入が容易になるだけでなく、その放出も同時に起こりやすくなるという問題が生じる^[10]。さらに、大きな開口部は完全に修復することは難しい。そこで、必要な時にのみ自発的に大きくなり、かつ、開口部の修復が容易な化合物を新たに合成し、 H_2O 分子の内包に取り組んだ^[11]。 C_{60} 開口体**2**は、そのような要求を全て満たしている化合物である。開口部にはビスヘミケタール官能基が存在し、トルエン中115°Cに加熱すると脱水して開口部が拡大された**3**へと変化し、 H_2O 分子の通過が可能となる。その後、放冷することによって開口部が縮小し、**2**が再生する。実際、1気圧の条件下、**2**と H_2O をトルエン中で加熱したが、

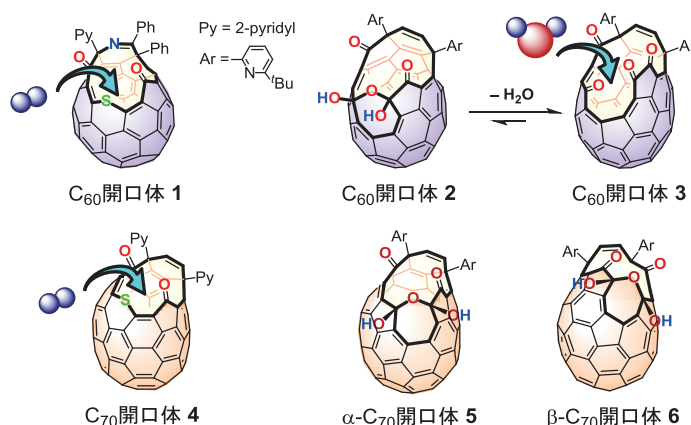


図2 開口部をもつフラレン誘導体とその内部への小分子挿入

2の内部へのH₂O挿入は8%収率でしかなかった。しかし、9,000気圧の超高压条件下でこの反応を行うことによって、ほぼ定量的にH₂O分子を2の内部に挿入することができた。この開口部は2段階の反応操作により完全に修復され、H₂O@C₆₀が合成された。通常、H₂O分子は気相でさえも分子間の水素結合形成によりオリゴマーとして存在しているが^[12]、H₂O@C₆₀では、水素結合の無いH₂O単分子が初めて実現されたことになる。この内包H₂O分子の¹H NMRシグナルは、-4.8 ppmに観測される。興味深いことに、2への水の挿入操作に、H₂O-D₂Oの混合物を用いると、H₂O, HDO, D₂Oの内包体が得られた。HDO@C₆₀においては、軽水素のシグナルは3つに分裂し、また、重水素のシグナルは2つに分裂しており、内包H₂O分子は外界のプロトン源とプロトン交換していないことを示している。

二個のH₂分子を内包したフラーレンC₇₀

フラーレンC₇₀はC₆₀よりも大きな内部空間を有しており、二個の小分子を内包できる可能性がある。C₇₀の化学反応性はC₆₀と類似していることは知られているものの^[13]、その低い対称性のため、付加体の構造決定はC₆₀のものよりも困難である。そのため、開口C₇₀誘導体の合成研究は、C₆₀の場合に比べて大きく立ち後れている。我々はまず、1と同様の官能基を有しているC₇₀開口体4に対して、H₂分子の挿入を検討した。すなわち、890気圧の水素ガス雰囲気下、4を230℃で加熱することによって、水素分子を挿入した^[14]。回収したサンプルの¹H NMRを測定したところ、-16.5 ppmに大きな一重線が観測された。この値は、C₆₀開口体H₂@1の値よりもより高磁場であり、一個のH₂分子が内包されたH₂@4が生成していることを示している。さらに、-15.2 ppmにも小さなシグナルが観測されていることが明らかになった。HPLCによる精製を行ったところ、このシグナルを与える成分を濃縮することが出来たので、その¹H NMRシグナルの温度変化を検証することにした。すると、室温ではやや幅広な一重線で観測されていたシグナルは、-60℃にて消失し、-100℃では-12.8 ppmと-17.3 ppmの面積比の等しい二本のシグナルへと変化することが明らかとなった。これは、二個のH₂分子が4の内部に内包されており、室温ではNMRの時間尺度よりも速い速度でお互いの位置を交換していること、ならびに-100℃においてはその交換が遅くなり、開口部に近いH₂分子と分子底部にあ

るH₂分子がそれぞれ異なる化学シフトのNMRシグナルを与えていることを示している。すなわち、二個のH₂分子がC₇₀開口体4の内部に挿入できることが明らかとなった。

H₂@4と(H₂)₂@4の混合物を用いて、開口部の修復を行った^[15]。これらC₇₀開口体では、C₆₀開口体の場合とは対照的に、開口部が修復されるに従って、内包H₂分子のNMRシグナルは高磁場に移動した。特に、完全に開口部を修復したH₂@C₇₀では-23.9 ppmという極めて高磁場にシグナルが観測された。これはC₇₀では部分構造であるピラシレンの環電流の影響が大きいためであると考えられる。また、¹³C NMR測定を行った結果、C₇₀骨格の上下の炭素は区別無く観測され、中空のものと比較して、中央部分の炭素シグナルの値がより変化していた。すなわち、内包H₂分子は非常に速い回転・並進運動をしていること、ならびに、その平均位置はC₇₀の中央であることが明らかとなった。

内包H₂分子のNMRシグナルは、通常の有機化合物のものとは全く重ならない極めて高磁場に現れるため、溶媒や系中の他の化合物に邪魔されることなく、その種類と存在量を決定することが可能である。そこで、内包されたH₂分子の数が外側への付加反応に影響を与えるかどうかを調べるため、H₂@C₇₀と(H₂)₂@C₇₀の混合物に対して、ジメチルアントラセンとの付加反応を行い、それぞれの平衡定数を算出した^[15]。その結果、二個のH₂分子を内包したもので、付加反応がより進行しにくくなることが明らかとなった。

二個のH₂O分子ならびにH₂O-HF錯体を内包したフラーレンC₇₀

フラーレンC₇₀においては、曲率の最も高いα結合が最も反応性が高く、β結合がそれに続く。α結合、ならびにβ結合から開口部形成を行うことによって、α-開口体5ならびにβ-開口体6を合成した(図3)^[16]。これらはいずれも13員環の開口部をもち、開口部の官能基の並び方は同一である。しかし、β-開口体の大きさはα-開口体のものよりも大きいことが明らかとなった。すなわち、二つの開口体に対して、9000気圧の超高压条件下でH₂O分子の挿入を検討したところ、β体6の内部にのみH₂O分子を導入することが出来た^[17]。この開口部を修復したところ、水を内包したH₂O@C₇₀が合成された。内包されたH₂O分子の¹H NMRシグナルは-27.1 ppmに観測された。このH₂O@C₇₀において¹³C

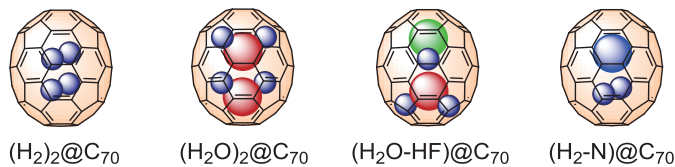


図3 2個の小分子を内包したフラーレン C_{70}

NMR測定を行ったところ、今度は、上下部分の炭素のシグナルの変化が大きかった。すなわち、内包 H_2O 分子は C_{70} の上あるいは下に偏った位置に存在することを示しており、 $\text{H}_2@C_{70}$ の場合とは対照的である。

さらに、注意深く生成物を分析した結果、二個の H_2O 分子を内包した $(\text{H}_2\text{O})_2@C_{70}$ も生成していることが明らかとなった。これは H_2O 二量体の初めての隔離である。この水二量体では、 H_2O 分子間で水素結合の生成と開裂がNMRの時間尺度よりも速く進行し、水単分子よりも低磁場である -25.2 ppm にシグナルが観測された。一方、 α 体**5**では、 H_2O よりも小さな HF 分子の挿入が可能であると考え、水の存在下で HF 挿入を試みた^[18]。その結果、予想した $\text{HF}@5$ だけではなく、 $\text{H}_2\text{O}@5$ ならびに $(\text{H}_2\text{O}-\text{HF})@5$ も同時に生成していることが明らかとなった。これは、最初に HF が C_{70} 開口体の内部に挿入された後、この HF が系中に存在している H_2O 分子を内部に引き込むことによって進行しているものと考えられる。その結果、 $\text{H}_2\text{O}-\text{HF}$ 錯体の内包体が生成し、そこから HF が抜け出すことにより、 HF 内包体が生成したものと考えられる。それぞれの開口部を修復した後に、 $(\text{H}_2\text{O}-\text{HF})@C_{70}$ の ^1H NMR測定を行った。その結果、 -17.5 ppm に 455 Hz に分裂した二重線と -25.3 ppm に一重線が観測された。 $\text{HF}@C_{70}$ の ^1H NMRでは、 -25.0 ppm に 509 Hz に分裂した二重線が観測されたことから、 $\text{H}_2\text{O}-\text{HF}$ 錯体では、 HF のプロトンが H_2O の酸素に水素結合し、 $\text{H}-\text{F}$ 間の結合が弱くなっていることが分かる。すなわち、これは一個の H_2O 分子によって水和された HF であることが明らかとなった。

終わりに

以上、分子手術法により小分子を内包したフラーレンを合成し、特徴的な内包化学種のNMR化学シフトについて述べてきた。一方、固体NMR・非弾性中性子散乱・比熱・テラヘルツ分光等の測定を行うことによって、 C_{60} 内部に閉じ込められた H_2 分子や H_2O 分子は極低温においても自由回転をしていることが明らかとなっている^[19]。そこで、NMR

の緩和時間測定により内包分子の運動性を評価することによって、周りの環境との相互作用を明らかにすることも可能である^[20]。今後は、さらに新しい化学種をフラーレン内部に隔離すること、ならびに、内包化学種の特徴を生かした物性開発を進めていきたいと考えている。例えば、開口 C_{60} 誘導体への N_2 , O_2 , CO_2 , CH_3OH , H_2CO 分子の挿入、ならびに、フラーレン C_{70} への窒素原子と水素分子の内包に成功している^[21]。

謝 辞

本研究の一部は、京都大学化学研究所共同研究・共同利用拠点の機器である800および600 MHz溶液NMR装置を利用しました。また、共同研究者の皆様、ならびに日夜遅くまで実験を行ってくださっている学生諸君に感謝いたします。

- [1] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, (1985) C_{60} : Buckminsterfullerene, *Nature* **318**, 162-163. doi: 10.1038/318162a0.
- [2] W. Krätschmer, L. D. Lamb, K. Fostiropoulos, D. R. Huffman, (1990) Solid C_{60} : A New Form of Carbon, *Nature* **347**, 354-358. doi: 10.1038/347354a0.
- [3] A. A. Popov, S. Yang, L. Dunsch, Endohedral Fullerenes, *Chem. Rev.* **113** (2013) 5989-6113. doi: 10.1021/cr300297r.
- [4] (a) K. Komatsu, Y. Murata, (2005) A New Route to an Endohedral Fullerene by Way of σ -Framework Transformations, *Chem. Lett.* **34**, 886-891. doi: 10.1246/cl.2005.886. (b) M. Murata, Y. Murata, K. Komatsu, (2008) Surgery of Fullerenes, *Chem. Commun.* 6083-6094. doi: 10.1039/b811738a.
- [5] Y. Murata, M. Murata, K. Komatsu, (2003) Synthesis, Structure, and Properties of Novel Open-Cage Fullerenes Having Heteroatom(s) on the Rim of the Orifice, *Chem. Eur. J.* **9**, 1600-1609. doi: 10.1002/chem.200390184.
- [6] Y. Murata, M. Murata, K. Komatsu, (2003) 100% Encapsulation of a Hydrogen Molecule into an Open-Cage Fullerene Derivative and Gas-Phase Generation of $\text{H}_2@C_{60}$, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7152-7153. doi: 10.1021/ja0354162.
- [7] (a) K. Komatsu, M. Murata, Y. Murata, (2005) Encapsulation of Molecular Hydrogen in Fullerene C_{60} by Organic Synthesis, *Science* **307**, 238-240. doi: 10.1126/science.1106185. (b) M. Murata, Y. Murata, K. Komatsu, (2006) Synthesis and Properties of Endohedral C_{60} Encapsulating Molecular Hydrogen, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 8024-8033. doi: 10.1021/ja061857k.

- [8] M. Murata, Y. Ochi, F. Tanabe, K. Komatsu, Y. Murata, (2008) Internal Magnetic Fields of Dianions of Fullerene C₆₀ and Its Cage-Opened Derivatives Studied by Encapsulated H₂ as an NMR Probe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 2039-2041. doi: 10.1002/anie.200705285.
- [9] Z. Chen, C. S. Wannere, C. Corminboeuf, R. Puchta, P. v. R. Schleyer, (2005) Nucleus-Independent Chemical Shifts (NICS) as an Aromaticity Criterion, *Chem. Rev.* **105**, 3842-3888. doi: 10.1021/cr030088+.
- [10] G. C. Vougioukalakis, M. M. Roubelakis, M. Orfanopoulos, (2010) Open-Cage Fullerenes: Towards the Construction of Nanosized Molecular Containers, *Chem. Soc. Rev.* **39**, 817-844. doi: 10.1039/B913766A.
- [11] K. Kurotobi, Y. Murata, (2011) A Single Molecule of Water Encapsulated in Fullerene C₆₀, *Science* **333**, 613-616. doi: 10.1126/science.1206376.
- [12] R. Ludwig, (2001) Water: From Clusters to the Bulk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 1808-1827. doi: 10.1002/1521-3773(20010518)40.
- [13] A. Herrmann, F. Diederich, C. Thilgen, H.-U. T. Meer, W. Müller, (1994) Chemistry of the Higher Fullerenes: Preparative Isolation of C₇₆ by HPLC and Synthesis, Separation, and Characterization of Diels-Alder Monoadducts of C₇₀ and C₇₆, *Helv. Chim. Acta* **77**, 1689-1706. doi: 10.1002/hlca.19940770703.
- [14] Y. Murata, S. Maeda, M. Murata, K. Komatsu, (2008) Encapsulation and Dynamic Behavior of Two H₂ Molecules in an Open-Cage C₇₀, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6702-6703. doi: 10.1021/ja801753m.
- [15] M. Murata, S. Maeda, Y. Morinaka, Y. Murata, K. Komatsu, (2008) Synthesis and Reaction of Fullerene C₇₀ Encapsulating Two Molecules of H₂, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15800-15801. doi: 10.1021/ja8076846.
- [16] R. Zhang, T. Futagoishi, M. Murata, A. Wakamiya, Y. Murata, (2014) Synthesis and Structure of an Open-Cage Thiafullerene C₆₀S: Reactivity Differences of an Open-Cage C₇₀ Tetraketone Relative to its C₆₀ Analogue, *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 8193-8196. doi: 10.1021/ja504054s.
- [17] R. Zhang, M. Murata, T. Aharen, A. Wakamiya, T. Shimoaka, T. Hasegawa, Y. Murata, (2016) Synthesis of a Distinct Water Dimer inside Fullerene C₇₀, *Nat. Chem.* **8**, 435-441. doi: 10.1038/NCHEM.2464.
- [18] R. Zhang, M. Murata, A. Wakamiya, T. Shimoaka, T. Hasegawa, Y. Murata, (2017) Isolation of the Simplest Hydrated Acid, *Sci. Adv.* **3**, e1602833 (6 pages). doi: 10.1126/sciadv.1602833.
- [19] (a) A. J. Horsewill, K. S. Panesar, S. Rols, M. R. Johnson, Y. Murata, K. Komatsu, S. Mamone, A. Danquigny, F. Cuda, S. Maltsev, M. C. Grossel, M. Carravetta, M. H. Levitt, (2009) Quantum Translator-Rotator: Inelastic Neutron Scattering of Dihydrogen Molecules Trapped inside Anisotropic Fullerene Cages, *Phys. Rev. Lett.* **102**, 013001 (4 pages). doi: 10.1103/PhysRevLett.102.013001. (b) Y. Kohama, T. Rachi, J. Jing, Z. Li, J. Tang, R. Kumashiro, S. Izumisawa, H. Kawaji, T. Atake, H. Sawa, Y. Murata, K. Komatsu, K. Tanigaki, (2009) Rotational Sublevels of an *Ortho*-Hydrogen Molecule Encapsulated in an Isotropic C₆₀ Cage, *Phys. Rev. Lett.* **103**, 073001 (4 pages). doi: 10.1103/PhysRevLett.103.073001. (c) C. Beduz, M. Carravetta, J. Y.-C. Chen, M. Concistre, M. Denning, M. Frunzi, A. J. Horsewill, O. G. Johannessen, R. Lawler, X. Lei, M. H. Levitt, Y. Li, S. Mamone, Y. Murata, U. Nagel, T. Nishida, J. Ollivier, S. Rols, T. Rööm, R. Sarker, N. J. Turro, Y. Yang, (2012) Quantum Rotation of *Ortho* and *Para*-water Encapsulated in a Fullerene Cage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 12894-12898. doi: 10.1073/pnas.1210790109.
- [20] (a) Y. Hashikawa, M. Murata, A. Wakamiya, Y. Murata, (2016) Synthesis and Properties of Endohedral Aza [60]fullerenes: H₂O@C₅₉N and H₂@C₅₉N as Their Dimers and Monomers, *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 4096-4104. doi: 10.1021/jacs.5b12795. (b) Y. Hashikawa, M. Murata, A. Wakamiya, Y. Murata, (2016) H₂O Entrapped inside Fullerene Cages: Potential Probe for Evaluation of Bond Polarization, *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 13109-13113. doi: 10.1002/anie.201607040.
- [21] (a) T. Futagoishi, M. Murata, A. Wakamiya, Y. Murata, (2015) Trapping N₂ and CO₂ on the Sub-Nano Scale in Confined Internal Spaces of Open-Cage C₆₀ Derivatives: Isolation and Structural Characterization of Host-Guest Complexes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 14791-14794. doi: 10.1002/anie.201507785. (b) T. Futagoishi, T. Aharen, T. Kato, A. Kato, T. Ihara, T. Tada, M. Murata, A. Wakamiya, H. Kageyama, Y. Kanemitsu, Y. Murata, (2017) A Stable, Soluble, and Crystalline Supramolecular System with a Triplet Ground State, *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 4261-4265. doi: 10.1002/anie.201701212. (c) T. Futagoishi, M. Murata, A. Wakamiya, Y. Murata, (2017) Encapsulation and Dynamic Behavior of Methanol and Formaldehyde inside Open-Cage C₆₀ Derivatives, *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 2758-2762. doi: 10.1002/anie.201611903. (d) Y. Morinaka, R. Zhang, S. Sato, H. Nikawa, T. Kato, K. Furukawa, M. Yamada, Y. Maeda, M. Murata, A. Wakamiya, S. Nagase, T. Akasaka, Y. Murata, (2017) Fullerene C₇₀ as a "Nano-flask" to Reveal Chemical Reactivity of a Nitrogen Atom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 6488-6491. doi: 10.1002/anie.201701158R1.



村田 靖次郎 (むらた・やすじろう)

1998年 京都大学大学院 工学研究科物質エネルギー化学専攻 博士後期課程修了、
博士(工学)の学位取得

1998年 日本学術振興会特別研究員(PD)

1999年 京都大学化学研究所 助手

2006年 京都大学化学研究所 助教授

2007年 京都大学化学研究所 准教授

2009年 京都大学化学研究所 教授

第55回NMR討論会(2016)若手ポスター賞について

今年度の『若手ポスター賞』は、特に優秀な発表に与えられる副賞『JEOL RESONANCE賞』と『大陽日酸賞』に加え、若手ポスター賞の趣旨にご賛同いただいた昭光サイエンス(株)からのご厚意により『昭光サイエンス賞』も併設いたしました。また、若手ポスター賞はJEOL RESONANCE、大陽日酸、昭光サイエンス三社合同賞として副賞を授与いたしました。

若手ポスター賞の歴史や応募資格など、詳しくは第55回NMR討論会(2016)のホームページ「若手ポスター賞」(<http://www.nmrj.jp/NMR2016/poster.html>)を御参照下さい。

今回は26名の応募がありました。研究内容や評価者の人数などを考慮し、応募者を3つのグループに分けました。グループ毎に日本核磁気共鳴学会の評議員6~7名が、規定の選考方針に基づいて応募者の発表を5点満点で採点しました。ただし、グループ内に評価者が利益背反になる応募者がいた場合には、その応募者分を評価者は採点しないこととしました。また、採点結果の各グループの平均点の差が0.5点以上の場合にはグループ間調整をすることにしていますが、今回は必要ありませんでした。

最優秀若手ポスター賞1名を選び、賞状を授与し、副賞としてJEOL RESONANCE賞12万円と記念の楯を贈りました。ついで、優秀若手ポスター賞2名を選び、賞状を授与しました。優秀若手ポスター賞の副賞として大陽日酸賞6万円と記念の楯を、また昭光サイエンス賞6万円と記念の楯を各受賞者に贈りました。さらに6名の若手ポスター賞受賞者を選び、副賞として三社合同賞3万円を学会長より贈りました。



左から：穴井^{*1}、田辺竜太郎、竹腰NMR学会会長、折笠^{*2}、重田安里寿、普照^{*3}、You-lee Hong



奥側左から：大平龍太郎、小林彩保、田村優実
手前左から：折笠^{*2}、穴井^{*1}、岩川直都、長田晃佳、Nghia Tuan Duong、竹腰会長、普照^{*3}

^{*1}：株式会社 JEOL RESONANCE 代表取締役社長 穴井孝弘

^{*2}：大陽日酸メディカル事業本部SI事業部長 折笠 敬

^{*3}：昭光サイエンス株式会社取締役製造本部長 普照祐一

■最優秀若手ポスター賞 (JEOL RESONANCE 賞)

田辺竜太郎 (京都大学 工学研究科 分子工学専攻)

「パルス ODMR を用いた磁気センシング」

■優秀若手ポスター賞 (大陽日酸賞)

重田安里寿 (横浜国立大学大学院 工学府 機能発現工学専攻)

「固体 NMR による光駆動型ナトリウムイオンポンプ KR2 の pH 変化に対する
レチナール結合サイトの構造変化の解析」**■優秀若手ポスター賞 (昭光サイエンス賞)**You-lee Hong (RIKEN Center for Life Science Technologies, JEOL Collaboration RIKEN Center for
Life Science Technologies)「Simultaneous observation of ^1H detected $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ and $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ 2D correlation solid-state
NMR spectra in natural abundance at very fast MAS $> 60\text{kHz}$ 」**■若手ポスター賞 (3社合同賞)**

小林彩保 (首都大学東京理工学研究科)

「NMR と SAXS による RNA 結合性マルチドメインタンパク質 Nrd1 の構造解析」

田村優実 (徳島大学大学院 先端科学技術教育部 知的力学システム工学専攻 機械創造システム工学コース)

「多孔性配位高分子の空隙に物理吸着させた気体分子のダイナミクス」

長田晃佳 (筑波大学大学院 数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻)

「0.2T 永久磁石 MRI を用いた屋外樹木中の水輸送計測」

岩川直都 (京都大学大学院 工学研究科 分子工学専攻)

「細胞内における ALS 関連タンパク質 SOD1 のフォールディングに関する動的構造解析」

大平龍太郎 (大阪大学基礎工学部電子物理科学科)

「NMR-NQR 二重共鳴法を用いた NQR 信号高感度化」

Nghia Tuan Duong (RIKEN Center for Life Science Technologies, JEOL Collaboration RIKEN Center
for Life Science Technologies)「Satellite transition selective $\{^{27}\text{Al}\}/^1\text{H}$ D-HMQC experiment at very fast MAS for the determination of
quadrupolar coupling constants」

各賞担当理事 藤原敏道、神田大輔、浅野敦志

P106

パルスODMRを用いた磁気センシング1

○田辺竜太郎¹, 五十嵐龍治¹, 白川昌宏¹¹京都大学大学院 工学研究科

Magnetic field sensing using Pulsed ODMR

○Ryotaro Tanabe¹, Ryuji Igarashi¹, Masahiro Shirakawa¹¹Graduate School of Engineering, Kyoto University

It is significant to analyze neural network quantitatively for gaining insight to information processing and mechanism of memory. In this work, I focused optically detected magnetic resonance (ODMR) using fluorescent nanodiamonds as a method for imaging neuronal network, and I developed a device for magnetic imaging. Consequently, I got an ODMR spectrum influenced by a magnetic field while real time fluorescent imaging.

神経細胞のネットワークを定量的に解析することは、脳内での情報処理や記憶のメカニズムを解き明かすのに大変重要である。しかし、高い時間分解能を持ちながら多くの神経細胞を同時に観測できるプローブは未だ存在せず、広い視野の神経ネットワークの活性化を視覚的に解析できる技術が求められている。

これを解決する手段として、蛍光性ナノダイヤモンドが期待されている。ダイヤモンドに不純物として含まれる窒素原子と、格子欠陥が隣り合ったNVC (Nitrogen-vacancy center)は安定な蛍光を発することから、ナノダイヤモンドは優れた蛍光プローブとしての活用を期待されている。さらに、NVCの発する蛍光は、励起電子のスピン状態を反映するため、磁気共鳴技術と組み合わせることにより、蛍光観察による磁気共鳴スペクトルの取得が可能である(光検出磁気共鳴:ODMR)。ODMRスペクトルは、NVCの電子スピンの外部から受ける磁氣的相互作用によって変化するので、ナノダイヤモンド周辺の微小空間での磁場情報の獲得に利用できる。これを用いれば、神経伝達における電気シグナルを微弱な磁場変動として観測できると考えられる。

本研究では、ナノダイヤモンドの持つ高い磁気感受性を利用し、神経細胞の磁気イメージングを目的としたパルスODMR装置の開発を行った。

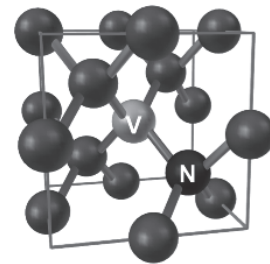


Fig. 1. NV center in diamond lattice.

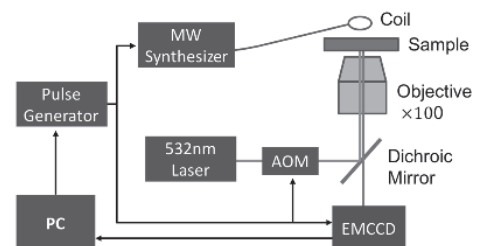


Fig. 2. Equipment set up for ODMR

光検出磁気共鳴, 磁場センシング

○たなべりょうたろう, いがらしりゅうじ, しらかわまさひろ

まず、ハードウェアとして、レーザーパルスによる励起系とマイクロ波照射系、EMCCD による検出系から構成されるFig.2に示すような装置を構築した。この装置を用いて、蛍光ナノダイヤモンド(Adamas ND-NV-100nm)のODMRスペクトルを測定したところ、外部磁場の印加によりスペクトルが分裂することを観測した(Fig.3(a))。これはNVC電子スピンの縮退した軌道のゼーマン分裂によるものであり、磁場測定が可能であることを示している。

次にパルスODMR実験を行った。最初の実験として、ラビ振動の観測を試みた。ラビ振動とは、NVCに共鳴マイクロ波パルスを照射すると、そのパルス幅に応じて電子スピン状態が二準位間を交代する現象の名前であり、 90° パルスや 180° パルスを決めるのに必要な実験である。Fig.3(a)のものと同じナノダイヤモンドサンプルを用いて、Fig.3(b)に示すパルス系列を用いて、蛍光を観察したところ、 τ の長さに応じて蛍光強度が正弦的に変化するのを観測した(Fig3(c))。この周期から、 180° パルスは 513 ± 13 nsと求められた。今後は、今回決定した 180° パルスと 90° パルスを用いて、ラムゼーフリンジ実験を行い、微小な磁場変動の観察を目指す予定である。

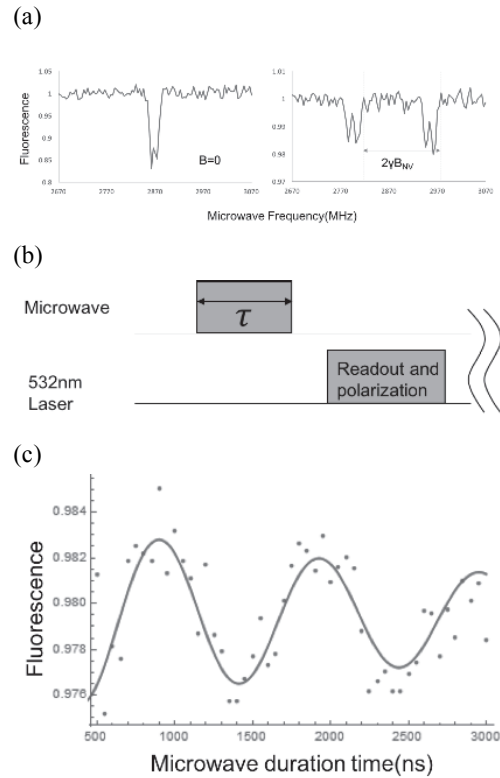


Fig. 3. (a)ODMR spectra of nanodiamonds applying external magnetic field. (b)Rabi pulse sequence(c)Rabi oscillation of NV electron spin.

P52

固体NMRによる光駆動型ナトリウムイオンポンプKR2のpH変化に対するレチナール結合サイトの構造変化の解析

○重田安里寿¹・伊藤奨太²・沖津貴志³・和田昭盛³・井上圭一^{2,4}・神取秀樹²・川村出¹¹横浜国立大学大学院・工学府 ²名古屋工業大学大学院・工学研究科³神戸薬科大学 ⁴JST・さきがけ

Structural analysis upon pH-change of retinal binding site in light-driven sodium ion pump rhodopsin, KR2, by solid-state NMR

○Arisu Shigeta¹, Shota Ito², Takashi Okitsu³, Akimori Wada³, Keiichi Inoue^{2,4}, Hideki Kandori², Izuru Kawamura¹¹ Graduate School of Engineering, Yokohama National University² Department of Frontier Materials, Nagoya Institute of Technology³ Department of Organic Chemistry for Life Science, Kobe Pharmaceutical University⁴ JST・PRESTO

Recent research revealed crystallographic structure of sodium ion pumping *Krokinobacter* rhodopsin 2 (KR2) extracted from marine bacteria. In the vicinity of retinal, specific residues are conserved depending on its function, for example, Asp85, Thr89 and Asp96 (DTD motif) for Bacteriorhodopsin (BR) and BR-like proton pump, and Asn112, Asp116 and Gln123 (NDQ motif) for KR2 and other sodium ion pump. These motifs are thought to be essential to express proper function, especially Asp116, a counterion, which side chain flips depending on its charge. Hence, we focused on the retinal binding pocket at neutral and acidic pH and determined chemical shifts of Retinal C20, Retinal C14, Lys255Cε, Schiff base and Tyr218Cζ. Chemical shift of Lys255Nζ indicated the torsion around retinal Schiff base which we revealed to be caused by the different location of Asp116 compared to BR-Asp85. This peak shifted upon pH-change which may indicate the protonation of Asp116 and reorientation of hydrogen bond. At the other side of retinal, Tyr218 forms weak hydrogen bond with nearby Asp251 in comparison with BR, which is probably characteristic feature for sodium ion pump as Asp251 works as temporal Na⁺ binding site. These features may give us new insights about unique mechanism of sodium pump.

【緒言】近年結晶構造が明らかになった光駆動型ナトリウムイオンポンプ *Krokinobacter* rhodopsin 2は海洋性細菌 *K. eikastus*由来のロドプシタンパク質である[1,2]。他のロドプシンと共通して、タンパク質中に結合したレチナール発色団の光異性化により機能を発現する。これまでに研究されてきたプロトンポンプロドプシンやクロライドイオンポンプロドプシンでは、レチナールのシ

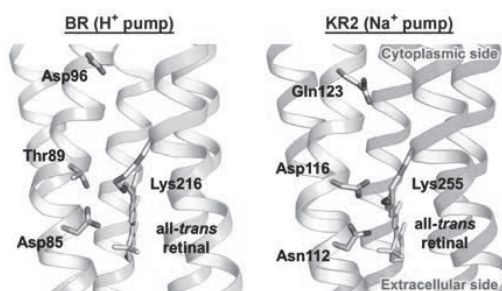


Fig. 1 DTD motif in BR and NDQ motif in KR2 [3]

膜タンパク質、光駆動型ナトリウムイオンポンプ、固体NMR

○しげたありす、いとうしょうた、おきつたかし、わだあきもり、いのうえけいいち、かんどりひでき、かわむらいずる

ツフ塩基に結合したプロトンを送信に利用、ないしは、そのプラス電荷をアニオン輸送に利用していた。しかし、プロトン以外のカチオン輸送に関しては前例がなく、他のロドプシンには見られないユニークな機構を持つと考えられる。レチナル近傍には機能に特有な残基が保存されており、バクテリオロドプシン様プロトンポンプではDTDモチーフ(BRの場合 Asp85, Thr89, Asp96)、KR2を含むナトリウムイオンポンプではNDQモチーフ(KR2の場合 Asn112, Asp116, Gln123)を有している[3]。特にKR2の極大吸収波長が変化する酸性の結晶構造において、シッフ塩基から遠ざかるAsp116のフリップが観測されている。そこで我々は、pH変化に対してレチナルのプロトン化シッフ塩基の対イオンであるAsp116の荷電状態及び側鎖の向きが異なることに注目し、レチナル及びその近傍残基を含むレチナル結合サイト(Fig. 2)の固体NMR構造解析を行った。

【方法】 *E. coli* による大量発現時に安定同位体ラベルアミノ酸とレチナルを導入し、[14, 20- ^{13}C]Retinal, [Phenyl-4- ^{13}C]Tyr, [6- ^{13}C]/[6- ^{15}N]Lys-WT-KR2を得た。安定同位体ラベルKR2はPOPE/POPG膜に再構成した。水和した膜試料を4.0 mmのジルコニア製MASローターに詰めて、固体NMR測定を実施した。固体NMR測定はBruker Avance III 600 MHz 固体NMR分光器および4.0 mmのE-freeプローブを用いて、測定温度5°C・MAS周波数10 kHzの条件で、 ^{13}C - ^{13}C Dipolar Assisted Rotational Resonance (DARR)測定および ^{13}C CP-MAS、 ^{15}N CP-MAS

測定を行った。DARR法は原子核間距離が長い ^{13}C 核同士の間スピンドットを観測できるため、結晶構造に含まれるレチナルからの距離情報を基に、レチナル近傍のアミノ酸残基の帰属に用いた。

【結果と考察】 上記の方法により、pH 8.0、pH 6.0、pH 4.0での、基底状態における、レチナルC20、C14、Tyr218C ζ 、Lys255C ϵ 、Lys255N ζ の信号帰属に成功した(Fig. 3)。また、これらの化学シフト値のpH変化から、以下4点の評価を行った。

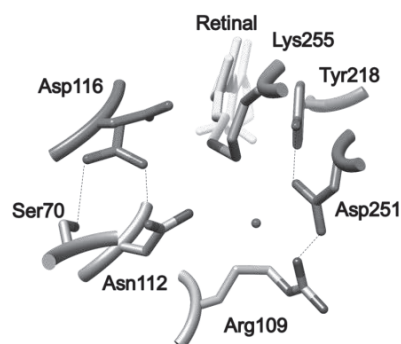


Fig. 2 Residues in the vicinity of retinal and hydrogen bonds

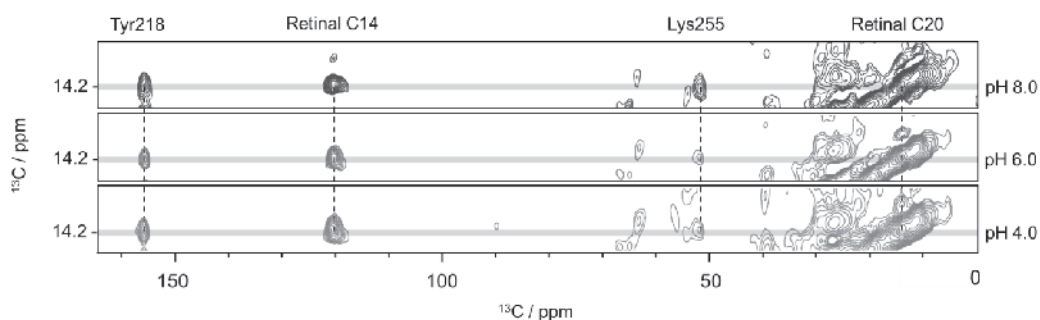


Fig. 3 Correlation peaks with retinal C20 at different pH

①レチナルの構造

レチナルC20とC14の信号はそれぞれ13位の*trans/cis*、15位の*syn/anti*の異性化に敏感である。DARRの結果より、レチナルC20は14.2 ppm、レチナルC14は120.5 ppmに信号を観測した。C20の信号は、13-*trans*のとき13 ppm付近、13-*cis*のとき20 ppm付近に、C14の信号は15-*anti*のとき120 ppm程度、15-*syn*のとき110 ppmに観測される[4]ことから、基底状態におけるレチナルの構造は*all-trans*、15-*anti*型と帰属した。pH変化に対し、化学シフト値は変化せず、レチナルの構造は変化しないことが明らかになった。

P104

Simultaneous observation of ^1H detected $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ and $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ 2D correlation solid-state NMR spectra in natural abundance at very fast MAS > 60 kHz

 You-lee Hong¹ and Yusuke Nishiyama^{1,2}
¹RIKEN Center for Life Science Technologies, JEOL Collaboration Center, Yokohama, Japan.

²JEOL RESONANCE Inc., Japan. ©

Heteronuclear correlation experiment is useful to investigate molecular structure and dynamics of naturally abundance samples by NMR. However, the low natural abundance of ^{13}C and ^{15}N together with intrinsic low sensitivity of NMR is challenge in NMR measurements and analyses. ^1H -detection alleviates these issues due to the high gyromagnetic ratio and natural abundance of proton and is optimal choice for solution NMR. On the other hand, ^{13}C and ^{15}N direct detections are much common in solid-state (ss-) NMR due to broad ^1H resonances of rigid solid. Recently, the developed very fast magic-angle spinning (MAS) > 60 kHz reduces severe line-broadening of ^1H resonances, making ^1H -detection of heteronuclear correlation experiments in ss-NMR routinely applied and enhancing the sensitivity in $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ and $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ experiments of natural abundance samples.¹⁻³ However, the each measurement of multidimensional spectra requires long times, especially in using naturally abundant materials. Thus, parallel acquisition of ^{13}C and ^{15}N signals are proposed to measure two distinct spectra simultaneously. This gives maximum 2 fold reduction in measurement time and extensively demonstrated both in solid and solution NMR. However, the requirements of additional equipment like parallel receivers hinder common usages.⁴ The ^1H detection with parallel acquisition, also proposed to improve the sensitivity in the solid, cannot combine the different magnetization transfer for ^{13}C and ^{15}N because ^{13}C and ^{15}N magnetizations are transferred to ^1H simultaneously by the second cross polarization (CP). Moreover, the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ and $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ correlation spectra are obtained by subtracting or adding the two spectra can induce additional t1 noise in the resultant spectra.⁵⁻⁶

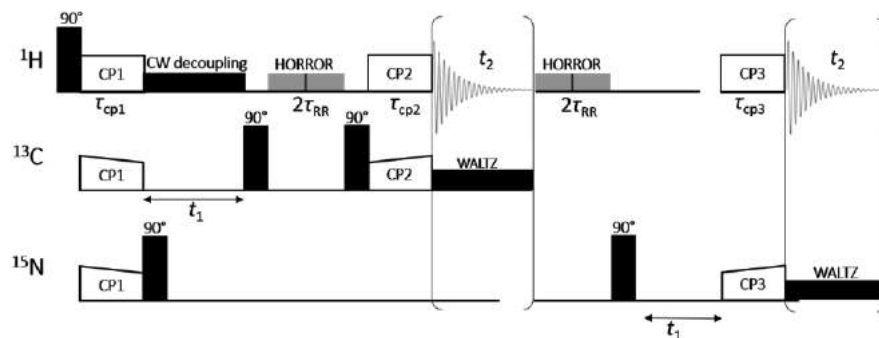


Figure 1. Pulse sequence of dual CP-based HSQC for ^1H detection in ss-NMR with 80 kHz MAS.

Here, we present a novel approach of parallel acquisition for multidimensional ss-NMR data experiments. Analogous to the previous parallel CP sequence, we utilize simultaneous CP to polarize ^1H to both ^{13}C and ^{15}N nuclei and then ^{13}C magnetizations are evolved, while ^{15}N magnetization is kept along the z axis. The resultant ^{13}C magnetizations are transferred to ^1H followed by ^1H detection. Finally, ^{15}N magnetizations are

Fast MAS, Dual cross polarization

brought to the transversal plane for time evolution and transferred to ^1H for detection. This sequence has several benefits which overcome the drawback of other dual CP sequences. 1) The parallel CP is able to reduce the measurement time to obtain two spectra with a maximum reduction factor of 2. 2) The separate transfer to ^1H for each nucleus allows different magnetization transfer schemes to be applied. It was demonstrated with a combination of J-coupling based $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ and dipolar-based $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ correlations, which requires similar measurement time, maximizing the time saving factor. 3) The additional t_1 noise which could come from addition or subtraction of spectra can be avoided, since the resultant $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ and $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ spectra are observed separately. 4) The two separated spectrum can be measured without any special hardware, since all the signals are observed by ^1H . 5) Since both the ^{13}C and ^{15}N are rare nuclei in natural abundance, there are no interference between $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ and $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ during dual CP. Unlike uniformly ^{13}C , ^{15}N labeled samples, no signal loss is expected. The developed dual sequence based on the heteronuclear single quantum coherence (HSQC) was demonstrated by 2D $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ correlation spectra of naturally abundant N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (f-MLF-OH) at the fast MAS (80 kHz) as shown in Figure 2.

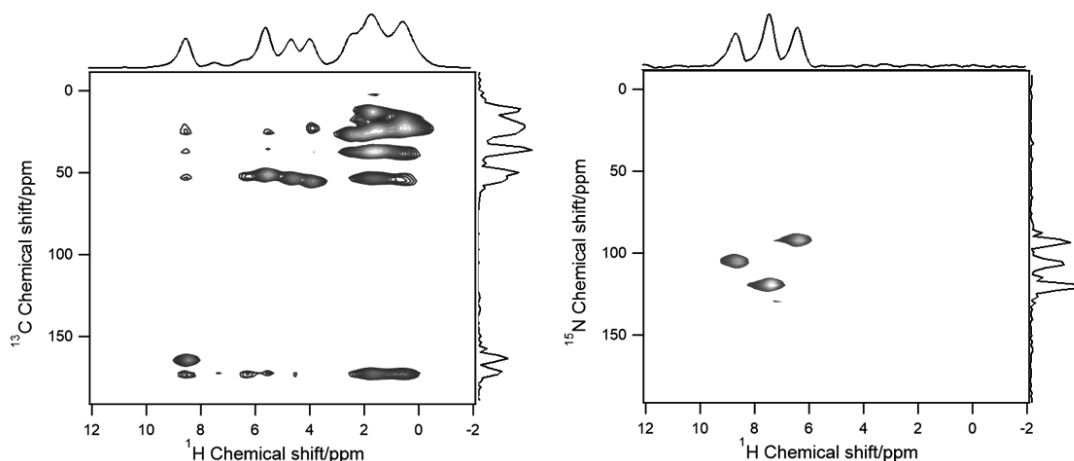


Figure 2. 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ and $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ correlation spectra of f-MLF-OH obtained by dual CP-based HSQC. The $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ and $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ spectra is right and left. The 2D spectra were acquired with a total number of 1200 scans, relaxation delay is 3s, and total time of measurement is 1day 20hr for both experiment. $\nu_R=80$ kHz $\tau_{CP1}=2\text{ms}$, $\tau_{CP2}=2\text{ms}$, and $\tau_{CP3}=0.4\text{ms}$.

Reference

1. Nishiyama, Y.; Endo, Y.; Nemoto, T.; Utsumi, H.; Yamauchi, K.; Hioka, K.; Asakura, T. *J. Magn. Reson.* **2011**, *208*, 44-48.
2. Du, L.-S.; Samoson, A.; Tuherm, T.; Grey, C. P. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 3611-3616.
3. Agarwal, V.; Tuherm, T.; Reinhold, A.; Past, J.; Samoson, A.; Ernst, M.; Meier, B. H. *Chem. Phys. Lett.* **2013**, *583*, 1-7.
4. Kupče, Ě.; Freeman, R.; John, B. K., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9606-9607.
5. Das, B. B.; Opella, S. J. *J. Magn. Reson.* **2016**, *262*, 20-26.
6. Gopinath, T.; Veglia, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2731-2735.

☺

P22

NMRとSAXSによるRNA結合性マルチドメインタンパク質Nrd1の構造解析

○小林彩保¹, 永井敢¹, 佐藤亮介², 伊藤隆¹, 杉浦麗子², 三島正規¹
¹首都大・理工, ²近畿大・薬

Structural studies of the RNA-binding multi-domain protein Nrd1 by NMR and SAXS

○Ayaho Kobayashi¹, Kan Nagai¹, Ryosuke Satoh², Yutaka Ito¹, Reiko Sugiura² and Masaki Mishima¹

¹Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

²School of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Nrd1 (Negative regulator of differentiation 1), a multi-domain protein, consists of four RRM (RNA recognition motif), which one of the key components of stress granules. In addition, Nrd1 functions as an RNA-binding protein and the physiological role is known as a negative regulator of sexual differentiation in fission yeast. Recently, it has been revealed that Nrd1 also regulates cytokinesis, in which physical separation of the cell is achieved by a contractile ring comprising many proteins including actin and myosin. Nrd1 binds and stabilizes the mRNA of Cdc4, which encodes a myosin II light chain, required for cytokinesis. Interestingly, Nrd1 is phosphorylated by Pmk1 (fission yeast MAPK) and results in markedly reduced RNA binding activity. The mechanism by which Pmk1 regulates the RNA binding activity of Nrd1 is unknown. In an effort to delineate the relationship between Nrd1 structure and function, we took the combination approach that utilize NMR and SAXS (small angle X-ray scattering).

【序論】

Nrd1は4つのRRMドメイン(RNA recognition motif)を持つ分裂酵母のRNA結合タンパク質で、アクトミオシン環の収縮に必須なミオシンIIの軽鎖をコードするCdc4のmRNAに結合し安定化することで、細胞質分裂を制御することが知られている⁽¹⁾。興味深いことに、Nrd1は、Pmk1 MAPキナーゼによってThr40及びThr126がリン酸化されるとRNA結合能が抑制される(Fig. 1)⁽¹⁾。またストレス顆粒に取り込まれ、その形成に重要な役割を果たすことが知られており、その際、Cpc2(RACK1)と結合する⁽²⁾。本研究は、マルチドメインタンパク質であるNrd1の構造解析により、MAPキナーゼによる翻訳マシナリーの直接のリン酸化が分子スイッチとして機能するメカニズムを明らかにすることを目的としている。柔軟なリンカーによってRRMが結ばれた数珠状の構造を成すNrd1の構造解析をNMRとSAXSにより行い、結晶化が困難であるマルチドメインタンパク質の構造解析の手法の確立も目指している。

SAXS, マルチドメインタンパク質

○こばやしあやほ, ながいかん, さとうりょうすけ, いたうゆたか, すぎうられいこ, みしままさき

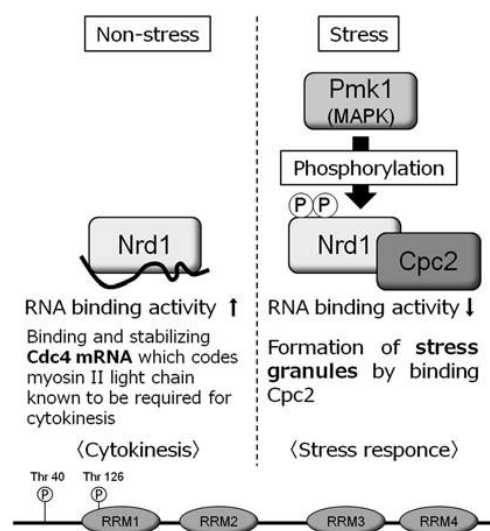


Fig. 1. Biological background.

(Top) Schematic drawing of Nrd1 function.

(Bottom) The domain organization of Nrd1.

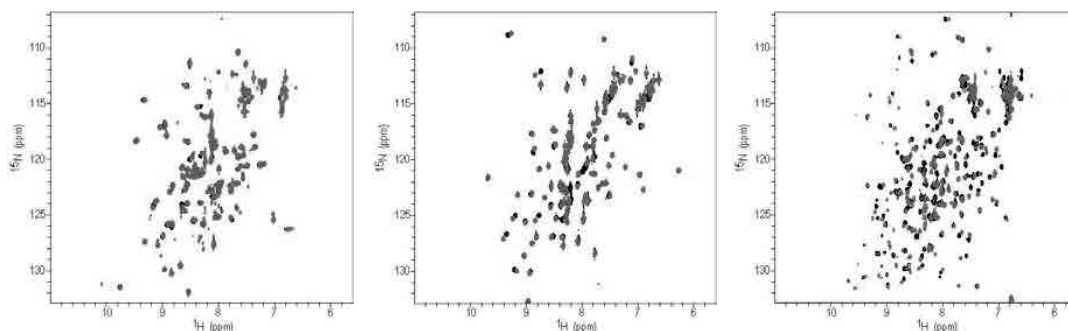


Fig. 2. The ^1H - ^{15}N HSQC spectra of RRM1, RRM2 and RRM3-4.

The ^1H - ^{15}N HSQC spectra of the ^{15}N -labeled RRM1, RRM2, and RRM3-4 shown of the left, middle and right, respectively. The spectra of RNA-free and 4-fold excess unlabeled UUCUU are shown in black and red, respectively.

【結果】

RNAとの結合実験

はじめに、Nrd1のどの領域がRNAとの結合に重要であるのかを調べるため、各RRMごとに発現系を作製し、その調製を行い、NMRによる*Cdc4* mRNAとの結合実験を行った。大変興味深いことに、Pmk1によりリン酸化されるThr126が存在するRRM1ではRNAとの結合が見られず、RRM3-RRM4タンデム領域で比較的強い結合が確認された(Fig. 2)。RRM3単独サンプルは高塩濃度下においてのみ調製可能であったため、RNAとの結合実験を行うことができなかったが、RRM4単独ではRNAとの結合が見られなかったことから、RRM3がRNAとの結合に重要であることが示唆された。

RRM間の相互作用

RNAとの結合実験の結果、直接リン酸化されるRRM1ではなく、リン酸化部位からはアミノ酸配列的には遠いRRM3がRNAとの結合に重要であることが示唆されたことから、Nrd1のRNA結合能の制御を理解するためには、ドメイン間の配置がリン酸化によってどのように変化するのかを調べる必要がある。そこで、RRM1-RRM2のタンデム領域と該当する各RRM単独の ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを比較したところ、化学シフトは一致しなかったことから、RRM1とRRM2のドメイン間相互作用の存在が示唆された。RRM3-RRM4タンデム領域についても同様の結果が得られた。4つのRRM全てを含んだ領域であるRRM1-2-3-4についてもサンプル調製に成功し、スペクトルをRRM1-2及びRRM3-4と比較したところ、それぞれのスペクトルと一致した(Fig. 3)。したがって、RRM1-2とRRM3-4の間には相互作用が存在しないことが示唆された。また、RRM2-3、RRM1-2-3のサンプル調製も行ったが、どちらも凝集を起こした。RRM1-2-3-4、RRM2-3-4、RRM3-4でのサンプル調製には成功しており、RRM4はRRM3の安定化に寄与していると考えられた。

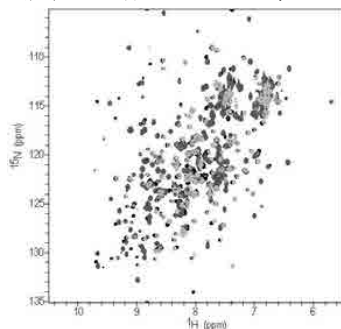


Fig. 3. The ^1H - ^{15}N HSQC spectra of RRM1-2-3-4, RRM1-2 and RRM3-4.

The spectra of RRM1-2-3-4 in black, RRM1-2 in light gray, and RRM3-4 in dark gray are superimposed. The peaks of RRM1-2 and RRM3-4 were well corresponded to those of RRM 1-2-3-4.

P74

多孔性配位高分子の空隙に物理吸着させた
気体分子のダイナミクス○田村優実¹, 犬飼宗弘¹, 中村浩一¹¹徳島大学大学院 理工学研究科**Dynamics of gas molecules in porous coordination polymers.**○Masanori Tamura¹, Munehiro Inukai¹, Koichi Nakamura¹¹ Graduate School of Science and Technology, Tokushima University

Porous coordination polymers (PCPs) constructed from metal ions and organic ligands have been recently expected for functions including gas storage and separation. In addition to new schematic synthesis, fundamental understanding such as the dynamics and the local structure of gas molecules has been essential to improve the amount of the gas storage. In this work, we show high-resolution NMR for CO₂ and D₂ adsorbed into PCPs. To tightly seal gas molecules into the NMR rotor, we fabricated a inner cap with two O-rings. ¹³C or ²H MAS NMR spectra reflected the interaction of CO₂ or D₂ molecules with the [Zn(CH₃-ip)(bpy)]_n or [Ca(C₄O₄)(H₂O)]_n. This analyses indicate a slow dynamics of CO₂ or D₂ molecules in PCP, leading to a new design to trap the gas molecules in pores.

[序論]

水素や二酸化炭素の貯蔵・分離技術を確立させることは、環境・エネルギー問題を解決するための重要な課題の一つである。近年、ガスの貯蔵・分離を低エネルギーで可能とする材料として多孔性配位高分子 (PCP: Porous Coordination Polymer) が期待されている。PCPは金属イオンと架橋配位子から成り、その組み合わせ次第で細孔の大きさや形状、化学的性質を精密に設計することができる結晶性の金属錯体である¹⁻³。これまでに、PCPが有する巨大な細孔表面積や自由度の高い設計性を活かして、様々なガス分子の優れた吸着・分離能を示すPCPが報告されている⁴。今後、実用化に向けて優れたH₂貯蔵能やCO₂分離能を示すPCPを設計する上で、これまで行われてきた体系的な合成に加えて、細孔内部に取り込まれたガス分子の物性解析が重要である⁵。中性子やX線回折により、吸着させたガス分子の局所構造解析の研究⁶⁻⁷は僅かにあるが、詳細なダイナミクスの解明には至っていない。

本研究の目的は、PCPにガス分子を封入させながらMAS NMR測定を可能とするNMRロータを作製し、吸着させたガス分子の局所構造・ダイナミクスに関する新たな知見を得ることである。製作したインナーキャップはO-ringを2つ用いることでロータ内にCO₂、H₂、D₂等のガスを封入可能である。得られたMAS NMRスペクトルやT₁解析を元に、PCP細孔内に吸着したガス分子が特異的に遅い運動性を示すことを明らかにした。

多孔性配位高分子, 気体分子

○たむらまさのり, いぬかいむねひろ, なかむらこういち

[ガス封入用の特殊インナーキャップ製作]

市販品のキャップ等を用いて、ロータ内部にファンデルワールス半径が小さい水素分子(2.75 Å)を封入することは困難である。本研究では、特殊インナーキャップを製作し、水素ガスの封入を試みた。図にインナーキャップの写真と模式図を示す。インナーキャップにはO-ringを2つ取り付けることが可能となっている。使用するO-ringは内径4.2 mm×線径0.5 mmのシリコンゴム ($[\text{Si}_2\text{O}_2\text{C}_5\text{H}_{12}]_n$)、インナーキャップ本体の材質には水素を含まないKel-F ($[\text{CF}_2\text{-CFCl}]_n$)を用いた。一般的にO-ringの密封性能はつぶし率(O-ring線径に対する圧縮させた量の割合)に依存する。円筒面において、O-ringが破断せずに使用できる最大のおつぶし率である25%を実現するインナーキャップを作成した。

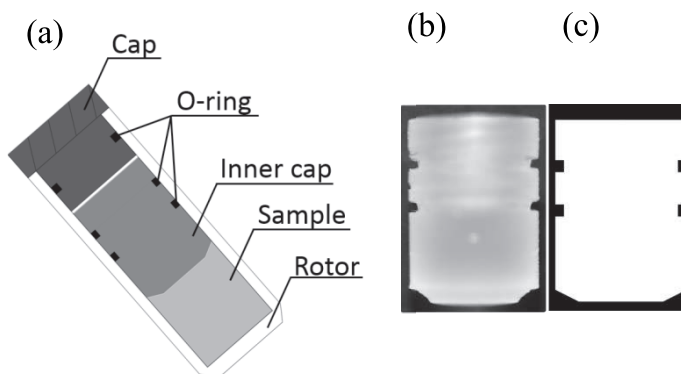


Fig. 1. (a) Home-made inner cap in a rotor, (b) photograph of the inner cap, and (c) schematic illustration of the cap.

[PCPの合成と構造]

CO_2 の吸着材料として、亜鉛イオン、4,4- bipyridine (bpy)、5-methylisophthalic acid ($\text{CH}_3\text{-ip}$)から組み上がる一次元シート構造を持つPCPに注目した。Zinc nitrate hexahydrate と 5-methylisophthalic acid をDMFに溶かした溶液1と bipyridine をMeOHに溶かした溶液2を混合し、70°Cで一晩攪拌加熱し、 $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{-ip})(\text{bpy})]_n$ (以下CID-Meと呼ぶ)を得た (Fig.2.(a))。CID-Meは、c軸方向に左右をbpyに挟まれた細孔入口 ($1.9 \times 4.5 \text{ \AA}^2$) があり (Fig.2.(a)中央)、細孔内部に CO_2

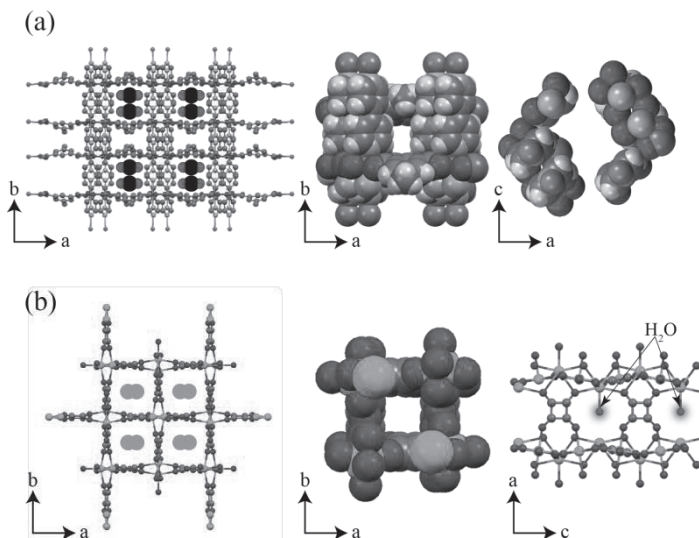


Fig. 2. Crystal structures of (a) CID-Me adsorbed CO_2 and (b) CaSq adsorbed H_2 .

をトラップすることが可能な、 $6.2 \times 6.8 \times 4.5 \text{ \AA}^3$ の $\text{CH}_3\text{-ip}$ に挟まれた空隙を有している (Fig.2.(a)右)。296 Kの等温吸着測定により、100 kPa下で8wt%、1細孔あたり1.4個の CO_2 吸着を示した。

一方、 H_2 の吸着材料として、カルシウムイオン、squaric acidから組みあがる $[\text{Ca}(\text{C}_4\text{O}_4)(\text{H}_2\text{O})]_n$ (以後、CaSqと呼ぶ)⁸に注目した。CaSqはc軸方向に配位子のsquaric acidに囲まれた正方形の1次元細孔 ($3.4 \times 3.4 \text{ \AA}^2$)を有する (Fig.2.(b))。3,4-dihydroxy-3-cyclobutene-1,2-dioneとNaOHを水に溶かした溶液1と CaCl_2 と $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ 、 CH_3COOH を水に溶かした溶液2を混合し、室温で攪拌させてCaSqを得た。300 Kの等温吸着測定により、室温10気圧下で0.1wt%の H_2 吸着を示した。

P82

0.2T永久磁石MRIを用いた屋外樹木中の水輸送計測

○長田晃佳¹, 福田健二², 巨瀬勝美¹, 寺田康彦¹¹ 筑波大学大学院 数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻² 東京大学大学院 農学生命科学研究科 森林科学専攻**Measurement of water transport in an outdoor tree using a 0.2T permanent magnet MRI**○Akiyoshi Nagata¹, Kenji Fukuda², Katsumi Kose¹, Yasuhiko Terada¹¹ Institute of Applied Physics, University of Tsukuba² Department of Forest Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

We have developed a 0.2T permanent magnet MRI system to measure an outdoor tree since 2013. In this study, we measured water transport in principal cross-section of an outdoor *Zelkova serrata* tree using the MRI. The tree height was about 4 m. Water transport was measured by q-space imaging (QSI) and the volume flow maps were calculated on basis of the propagator approach. We analyzed diurnal changes in the volume flow in the xylem and phloem regions where the sap flow was transported. The xylem exhibited upward flow which was faster at midday than at night. The phloem exhibited downward flow which was almost constant during the day.

1. はじめに

我々の研究室では2013年に屋外樹木用の0.2 T永久磁石MRIを開発した[1]。そして、2015年11月にはq-space imaging(QSI)によるケヤキ内樹液の流速計測に成功した[2]。しかしその頃のケヤキは落葉途中で樹液流速が活発な時期ではなかった。そのため現在は、ケヤキの葉が再び芽生え、樹液の水輸送が活発となる時期(5~8月頃)の樹液の水輸送計測を目指している。

主幹断面における樹液には、葉で行われる光合成に必要な水を供給するための上向きの流れと、光合成により生成された糖などの養分を樹木全体に供給させるための下向きの流れがある。それぞれ通導に関与する組織が異なり、上向きの流れは木部内の導管、下向きの流れは師部内の師管を流れる。

そこで、本研究では8月における屋外ケヤキ内の両方向の樹液流をQSIにより計測し画像化した。

2. 実験方法

実験には2013年2月に苗木を移植した樹高約4 m、目通り(地上1.2 mの高さでの幹の外周の長さ)0.26 mのケヤキを用いた (Fig. 1)。測定部は地面から40 cmの高さとした。測定に使用した磁石は0.2T永久磁石磁気回路、ギャップは16 cmである。グラジエントコイルの勾配磁場効率は $G_x = 6.76 \text{ mT/m/A}$, $G_y = 1.23 \text{ mT/m/A}$, $G_z = 2.62 \text{ mT/m/A}$ であった。ただし、各軸の方向は木の伸長方向をx、磁石の奥行き方向をy、磁石の静磁場方向をzとした。RFプローブには直径120 mm、長さ60 mm、ターン数12のソレノイドコイルを用いた。

Plant imaging, Outdoor MRI system, Flow

○ながたあきよし, ふくだけんじ, こせかつみ, てらだやすひこ

木部と師部の樹液流速にはかなり違いがあるため、それぞれ別の QSI パラメータを用いた。

2.1 木部内を流れる樹液流の QSI

木部の計測には pulse field gradient - spin echo (PFG-SE)シーケンスを用い、撮像パラメータを TR/TE = 800 ms/40 ms、field of view (FOV) = 256 mm×128 mm、スライス厚 = 40 mm、matrix size = 256×64 とした。motion probing gradient (MPG) のパラメータを $\Delta = 20\text{ms}$ 、 $\delta = 8\text{ms}$ 、q値の範囲を $-23.0 \sim 22.7\text{mm}^{-1}$ とし、この間を 128 等分するように q 値を変えて画像を取得した。全測定時間は 2 時間 18 分であった。ピクセルごとに縦軸を信号強度、横軸を q とした減衰曲線を作成し、propagator を計算した。求めた propagator から 1 ピクセル当たりの体積流の分布を出力した[3]。ただし、得られた信号減衰曲線にノイズ除去のため移動平均フィルターをかけた。さらに画像化にはピクセルの近傍 8 点を用い、平均化処理を行った propagator を用いた。

2.2 師部内を流れる樹液流の QSI

師部の計測には pulse field gradient - stimulated echo (PFG-STE)シーケンスを用い、撮像パラメータを TR/TE = 800 ms/40 ms、FOV = 256 mm×128 mm、スライス厚 = 40 mm、matrix size = 256×64 とした。MPG のパラメータを $\Delta = 200\text{ms}$ 、 $\delta = 10\text{ms}$ 、q値の範囲を $-28.8 \sim 27.7\text{mm}^{-1}$ とし、この間を 32 等分するように q 値を変えて画像を取得した。全測定時間は 34 分であった。こちらも 2.1 節と同様の方法で体積流を画像化した。こちらも、得られた信号減衰曲線にノイズ除去のため移動平均フィルターをかけた。平均化処理は行っていない。

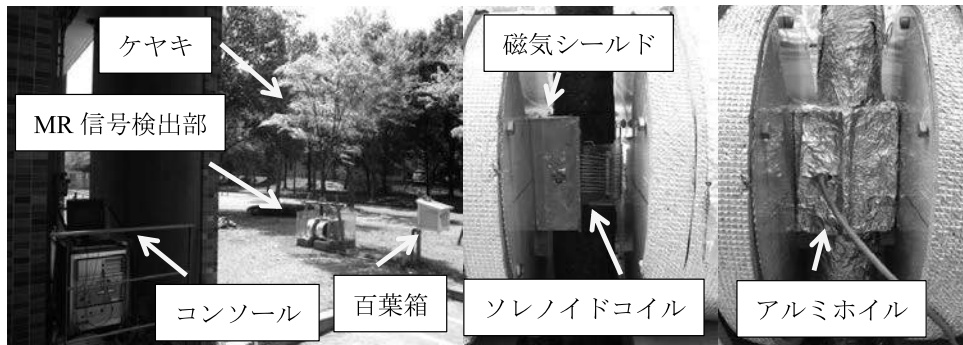


Fig. 1 (Left) MRI system and Stevenson screen. (Center, right) Installation of the RF probe. The solenoid RF coil was (center) covered by the shield box and (right) covered by aluminum foil.

3. 実験結果

3.1 木部内を流れる樹液流の QSI

QSI による木部の樹液流計測を行った結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 (a) は spin echo (SE) 法により取得した屋外ケヤキの主幹断面像である。周囲には 4 つのオイルファントムと水ファントムを設置している。これらは、渦電流磁場により発生する一次の位相シフトの補正や、QSI 解析時の静止水リファレンスファントムとして使用される。外側の層に形成層という組織があり、その内側が木部、外側が師部である。

Fig. 2 (b) は、2.1 節で述べた木部計測用の QSI パラメータにより、2016 年 8 月 2 日の 13 時に計測した主幹断面の体積流分布である。ケヤキは環孔材と呼ばれる木部構造をもち、年輪に沿って大径導管が分布している。そのため円状に大きな体積流の値が観測された。特に今年生成された

木部の体積流値が大きかった。これより、今年生成された木部を中心に多くの樹液を輸送していると言うことができる。

Fig. 2 (c) は 2016 年 8 月 3 日の 0 時半に計測した主幹断面の体積流分布である。Fig. 2 (b) の分布と比べ大きな体積流の値は観測されていない。これは夜間では葉に日が当たらず気孔からの蒸散が行われないため、水輸送も活発でなかったためだと考えられる。

また、昼夜にかかわらず体積流の値は正であった。これは木部の流れが上向きであることを示している。

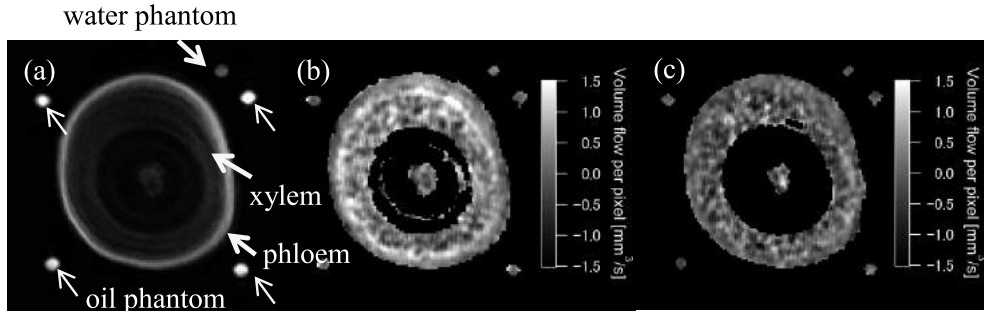


Fig. 2 Diurnal change in the volume flow in the xylem. (a) SE image ($q=0$). (b),(c) Volume flow maps measured with PFG-SE (b) at 13:01 on August 2, 2016 and (c) at 0:36 on August 3, 2016.

3.2 師部内を流れる樹液流の QSI

QSI による師部の樹液流計測を行った結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3 (a) は stimulated echo (STE) 法により取得した屋外ケヤキの主幹断面像である。

Fig. 3 (b) は、2.2 節で述べた師部計測用の QSI パラメータにより、2016 年 8 月 2 日の 12 時半に計測した主幹断面の体積流分布、Fig. 3 (c) は 2016 年 8 月 3 日の 0 時に計測した体積流分布である。それぞれ、STE 画像を基に師部の領域のみを抽出して表示している。師部の体積流は昼夜で差が表れなかった。また、師部の体積流の値は負であり、師部の流れが下向きであることを示していた。

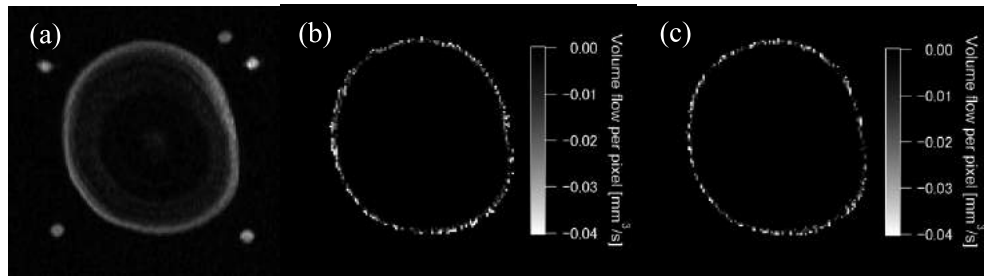


Fig. 3 Diurnal change in the volume flow in the phloem. (a) STE image ($q=0$). (b),(c) Volume flow maps measured with PFG-STE (b) at 12:26 on August 2, 2016 and (c) at 0:01 on August 3, 2016.

3.3 樹液流の QSI による連続計測

木部と師部の樹液流を 8 日間連続で計測した。関心領域の propagator を平均したものから体積流を求め、その時刻の体積流とした。また同時に、樹液流計測のスタンダードである Sap flow meter を使って樹液流速を計測し、体積流に換算して比較した。Sap flow meter は熱拡散による温度変化を計測することで樹液流速を求めることができる。Fig. 3 (a) に示すグラフは今年生成された木部

の体積流の時間変化である。これと、Fig. 3 (c) に示す Sap flow meter で計測した流量変化とは定性的に一致していることが分かる。しかし、全体的に、QSI で計測した流量の方が大きかった。

Fig. 3 (b) に示すグラフは師部の体積流の時間変化である。師部の体積流の時間平均値は $-0.0122 \pm 0.00483 \text{ mm}^3/\text{s}$ であり、定常的に下向きの流れが観測された。師部の体積流には時間帯による違いは表れなかった。

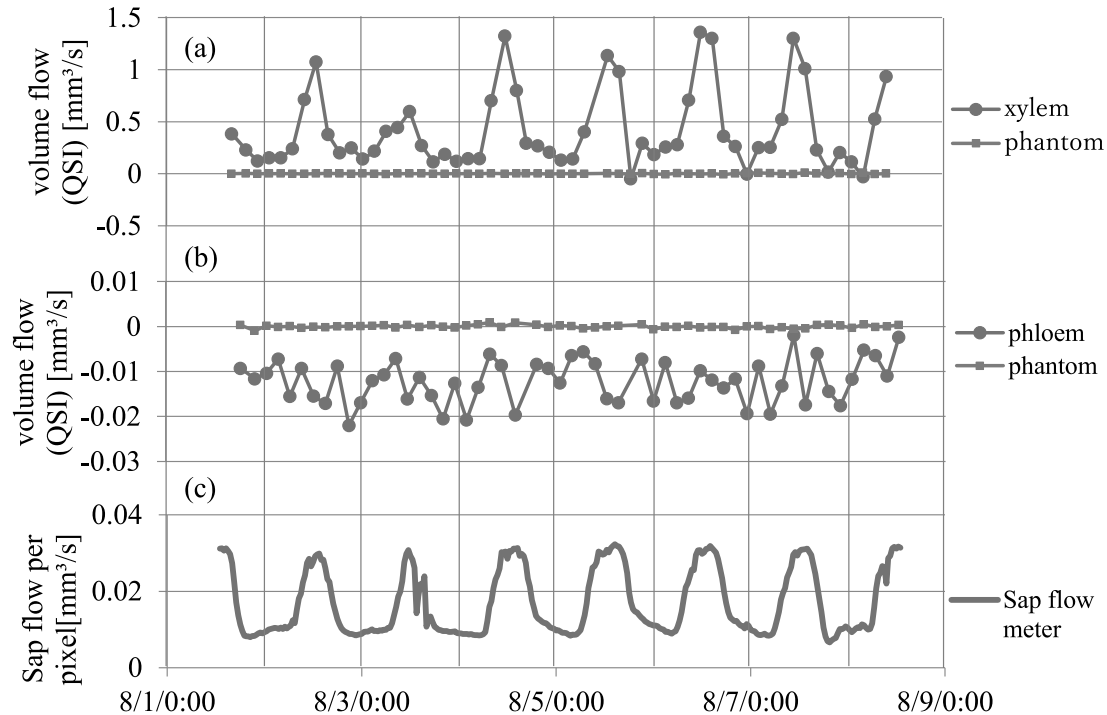


Fig. 3 Volume flow measured at different times of the day (from 8/01/2016 to 8/08/2016). (a) Volume flow averaged over the whole region of xylem developed in 2016. (b) Volume flow averaged over the whole region of phloem. (c) Sap flow measured with the conventional sap flow meter.

4. 結論

屋外樹木計測用 MRI を用いて、QSI により木部と師部を流れる樹液の体積流計測を行った。木部においては、上向きの流れが観測され、昼夜で水輸送の活動に変化が見られた。一方、師部においては、下向きの流れが観測され、時間帯によって明らかな変化は表れなかった。

References

- [1] Y. Terada, A. Fukita, S. Moriwaki, K. Kose, In situ living tree measurements using a 0.2 T permanent magnet. August, 2013, 12th International Conference on Magnetic Resonance Microscopy, Fitzwilliam College, Cambridge, UK (P79).
- [2] A. Nagata, K. Kose, Y. Terada, Development of an outdoor MRI system for measuring flow in a living tree, *J. Magn. Reson.* 265(2016), 129-138.
- [3] C. W. Windt, F. J. Vergeldt, P. A. de Jager, and H. Van As, MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco, *Plant, Cell and Environment*, 29(2006), 1715-1729.

P86

細胞内におけるALS関連タンパク質SOD1のフォールディングに関する動的構造解析

○岩川直都¹, 森本大智¹, ヴァリンダエリック², 菅瀬謙治¹, 白川昌宏¹¹京都大学大学院・工学研究科・分子工学専攻²京都大学大学院・医学研究科

Structural dynamic analysis of SOD1 in living cells

○Naoto Iwakawa¹, Daichi Morimoto¹, Erik Walinda², Kenji Sugase¹, Masahiro Shirakawa¹¹Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University²Graduate School of Medicine, Kyoto University

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease that leads to movement disorders. One of the causes of ALS is intracellular aggregation of Superoxide dismutase 1 (SOD1). Unfolded monomeric SOD1 is thought to be a precursor of aggregation; therefore, we focus on the folding equilibrium of monomeric SOD1. In many previous studies, this equilibrium has been investigated in diluted solution. By contrast, the aggregation occurs in highly crowded intracellular environment consisting of various biomacromolecules such as nucleic acids and proteins. In this study, we quantitatively analyzed the effects of crowded environment on folding of SOD1 by adding protein crowders using relaxation dispersion NMR spectroscopy. Our results show that the crowded environment thermodynamically destabilizes but kinetically stabilizes the folded state. Similarly to these results, the folding equilibrium of SOD1 would be affected by the crowded environment in living cells.

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)とは、運動ニューロンが侵され、随意運動に障害が起きる難病である。進行性が高く、発症から3~5年で呼吸困難により死亡する。現在、発症原因の一つとして考えられているのは、Superoxide dismutase 1 (SOD1)というタンパク質の細胞内での凝集体形成である。通常、SOD1は二量体として機能し、細胞内の活性酸素を分解する。一方で、二量体が解離し、立体構造が折り畳まれたフォールド状態 (F状態) は凝集体形成の前駆体となるアンフォールド状態 (U状態) との平衡状態となる (Fig. 1)。家族性ALSにみられるSOD1遺伝子の変異は、SOD1の構造を不安定化し、U状態を占める割合を上昇させるために凝集体形成が促進すると報告されている。そこで本研究においては、このフォールディング平衡に着目した。

SOD1のフォールディングに関する研究はこれまでに数多く行われている。しかし、その多くが希釈溶液中での研究であり、細胞内という高濃度の生体高分子で混みあった環境における知見は乏しい。そこで、細胞内環境がSOD1のフォールディング平衡に与える影響を解析することを目的として研究を行った。

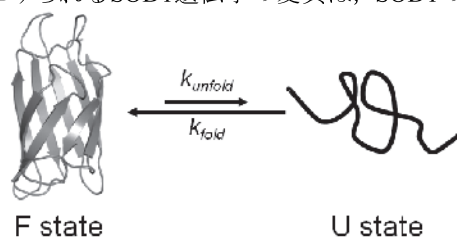


Fig. 1. Folding equilibrium of SOD1.

The SOD1 mutant used in this study shows a simple two-state folding equilibrium.

SOD1, folding, in-cell NMR

○いわかかなおと, もりもとだいち, ぐありんだえりつく, すがせけんじ, しらかわまさひろ

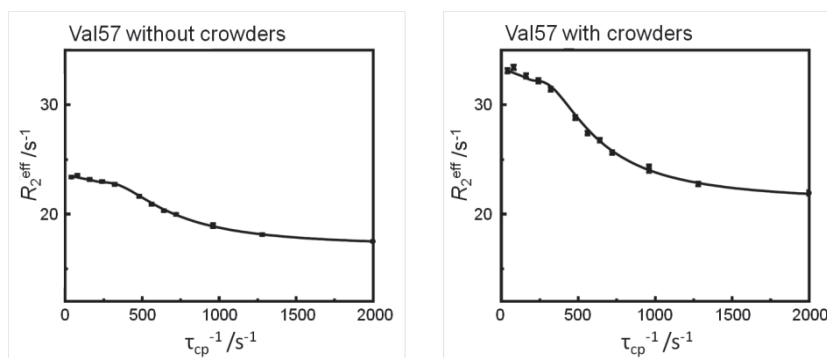


Fig. 2. ^{15}N R_2 relaxation dispersion profiles for Val57.

The relaxation dispersion profiles for Val57 without (left) and with (right) protein crowders at 310K. Obtained R_2^{eff} were plotted by the Carver and Richards equation⁽¹⁾.

細胞内の混みあった環境を模倣し、その影響を解析するために、*in vitro*において高濃度のタンパク質クラウダーを共存させた状態および、通常の希釈溶液中の二つの条件において、298Kから310Kの7点でNMR測定を行った。測定手法には R_2 dispersion測定法を用いた。この手法は平衡状態にある構造変化を検出するものであり、平衡反応における各構造の存在比および交換速度を得ることができるため、熱力学的および速度論的な解析が可能である。

測定により得られた横緩和速度 R_2^{eff} を二状態平衡モデルのCarver and Richards equation⁽¹⁾に従ってフィッティングし (Fig. 2), フィッティングパラメーターからU状態の存在比 P_U およびアンフォールディング (F状態からU状態への変化) の速度定数 k_{unfold} を算出した。その結果、クラウダーの添加により P_U は310Kにおいて1.0%から2.1%に増加していることが明らかとなった。また、 k_{unfold} の温度依存性からArrheniusプロットを作成し (Fig. 3), アンフォールディングの活性化エネルギーを見積ると、クラウダーの添加により52 kJ/molから59 kJ/molへと増加していることが明らかとなった。以上から、細胞内を模倣した混みあった環境においてSOD1は熱力学的には不安定化し、速度論的には安定化していることが示唆された。つまり、F状態およびフォールディング平衡における遷移状態はともに不安定化していると考えられる。

本研究において、細胞内の混みあった環境によるSOD1のフォールディングへの影響を定量的に解析した。しかし、実際の細胞内においては、混みあった高分子どうしが衝突し合うことによる物理的な力もはたらいていることが考えられる。そこで、今後は一方向に一定の外力を与えた条件下でNMR測定を行う手法であるRheo-NMR法を用い、物理的な力がSOD1の安定性に与える影響を評価していく予定である。また、生きた細胞内においてNMR測定を行う手法であるin-cell NMR法を用いることにより、実際の生細胞内におけるSOD1のフォールディングの実態を解明していく。

References

- (1) Carver and Richards, J Magn Reson. 6. (1972)

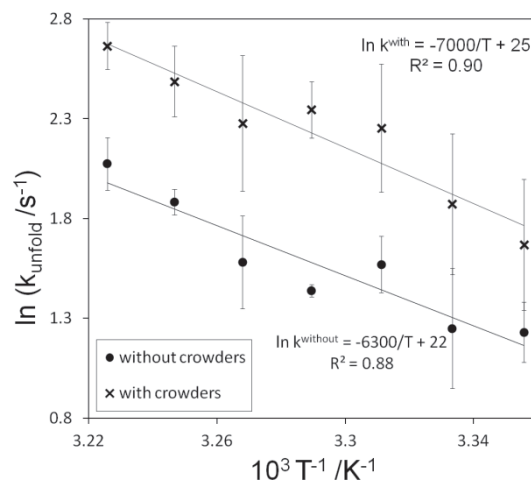


Fig. 3. Arrhenius plots for k_{unfold} .

The calculated rate constants, k_{unfold} , were plotted and fitted to the Arrhenius equation.

P90

NMR-NQR二重共鳴法を用いたNQR信号高感度化

○大平龍太郎, 大田垣祐衣, 韓猛, 宮戸祐治, 赤羽英夫
大阪大学・大学院・基礎工学研究科

NMR-NQR double resonance technique for enhancement of NQR signals

○Ryutaro Ohira, Yui Otagaki, Meng Han, Yuji Miyato, Hideo Sato-Akaba

Department of Engineering Science, Osaka University

Nuclear quadrupole resonance (NQR) is a promising method for detection of the counterfeit medicines, since almost all of the pharmaceutical products contain nitrogen with the nuclear quadrupole spins, and their NQR frequencies are specific to the crystal structures. However, NQR signals are too weak to be measured within a reasonable detection time from a small amount of sample such as tablets. In order to increase the NQR signal intensity, we used NMR-NQR double resonance technique, which enhances the NQR signal intensities by transferring polarization from ^1H spin and ^{14}N spin systems via dipole-dipole interaction. A prototype of the experimental equipment to observe the effect of NMR-NQR double resonance was developed, and the signal enhancement factors were evaluated due to the cross polarization. Four of the tested five samples showed the signal enhancement and their enhancement factors were 1.7, 17, 9.1 and 7, for imidazole, metformin hydrochloride, diethylamine hydrochloride and acetaminophen, respectively.

◎

[序論] 核四極共鳴(NQR)は、四極子核と電場勾配との電気的な相互作用によって核スピンのエネルギー準位が分裂することで生じる磁気共鳴現象である。また、NQR周波数は物質に固有であるため、物質同定法として有効である。そこで、多くの医薬品が四極子モーメントを持つ窒素原子核を含む点に着目し、近年世界的な脅威となっている偽造医薬品のNQR法を用いた摘発技術が期待されている。しかし、NQR信号は非常に信号強度が弱く、医薬品のような微量サンプルから短時間に十分な信号対ノイズ比を得ることは困難である。そこで、NQR信号の高感度化技術として、事前分極した水素原子核の磁化を窒素原子核に移動させる交差分極NMR-NQR二重共鳴法²⁾が報告されている。本研究では、NMR-NQR二重共鳴法を利用した実験装置を作製し、実際に5種類の医薬品もしくはその原料からNQR信号を取得することでNMR-NQR二重共鳴法の有用性を検討した。

[交差分極NMR-NQR二重共鳴法] 交差分極法とは、静磁場下で試料に含まれる水素原子核を事前に分極させ、水素原子核のスピンの系が得た磁化を窒素原子核のスピンの系に移すことによって、窒素原子核スピンの分布比を操作する手法である。つまり、磁化移動により励起可能な窒素原子核スピンの数が増え、NQR信号の高感度化が可能になる。

まず、熱平衡状態における水素原子核と窒素原子核のスピンの系を考えると、エネルギー準位間におけるスピンの分布比は、両者ともにボルツマン分布に従う。ここで、水素原子核の2準位間の核スピンの分布比 ΔN_p は、ゼーマンエネルギー E_H を用い(1)式のように書ける。

$$\Delta N_p = \exp(-E_p/kT_p) = \exp(-h\nu_p/kT_p) \quad (1)$$

NQR, 二重共鳴, 偽造医薬品

○おおひらりゅうたろう, おおたがきゆい, かんもう, みやとゆうじ, あかばひでお

ただし、 T_p を水素原子核のスピン温度、 ν_p を水素原子核のNMR共鳴周波数とした。四極子モーメントを有する窒素原子核スピンの分布比 ΔN_Q も同様にして、四極子核と電場勾配との相互作用によって分裂するエネルギー準位の大きさを E_Q とすると(2)式のように書ける。

$$\Delta N_Q = \exp(-E_Q/kT_Q) = \exp(-h\nu_Q/kT_Q) \quad (2)$$

ただし、 T_Q を窒素原子核のスピン温度、 ν_Q を窒素原子核のNQR共鳴周波数とする。ここで、水素原子核の磁気回転比(γ_p)は窒素原子核のそれ(γ_Q)に比べて14倍である。つまり、 $\gamma_p > \gamma_Q$ となるため、高磁場下においては、水素原子核のNMR共鳴周波数は窒素原子核のNQR共鳴周波数よりも大きく、(1), (2)式より以下の関係が成り立つ。

$$\Delta N_p > \Delta N_Q \quad (3)$$

ここで、水素原子核の格子緩和時間より速く、外部磁場の印加を止めた場合において、スピン温度の観点から両者のスピン分布差について議論する。(1),(2),(3)式からわかるように、水素原子核のスピン系は冷たい熱浴、窒素原子核のスピン系は暖かい熱浴であると考えられることができる。ここで、外部磁場の強度を(4)式の条件を満たすように調整することによって、両者のスピン系の熱的接触が実現される。

$$h\gamma_p B / 2\pi = h\nu_p = h\nu_Q \quad (4)$$

この状態において、それぞれの原子核スピンの分布差は、異種スピン間の磁気双極子相互作用を通じ、(5)式を達成するように拡散する。

$$\Delta N_p = \exp(-h\nu_p/kT_S) = \exp(-h\nu_Q/kT_S) = \Delta N_Q \quad (5)$$

ただし、 T_S は熱的接触によって新たに達成される熱平衡状態にある両者共通のスピン温度である。以上の過程を模式的に示したものが、Fig.1であり、交差分極の前後でスピンの分布差が変化する。さらに、Fig.2に示すように、四極子モーメントに起因する窒素原子核スピンのエネルギー準位は3つ存在するので、交差分極の過程が3回起こる。その結果、窒素原子核スピンの分布差が拡大し、NQR信号増幅されることになる。

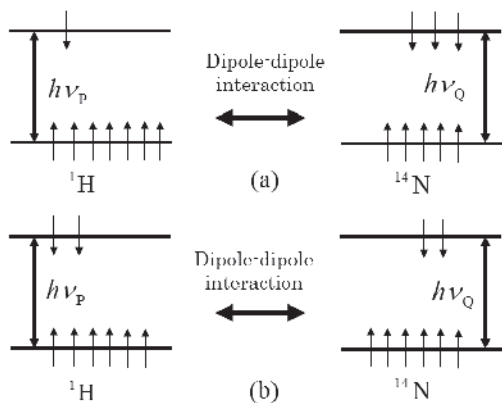


Fig.1 Schematic diagram of energy diagram (a) before and (b) after cross polarization. When ^1H NMR and ^{14}N NQR energy splittings become equal (level crossing), the relative spin population difference equalize via dipole-dipole interaction.

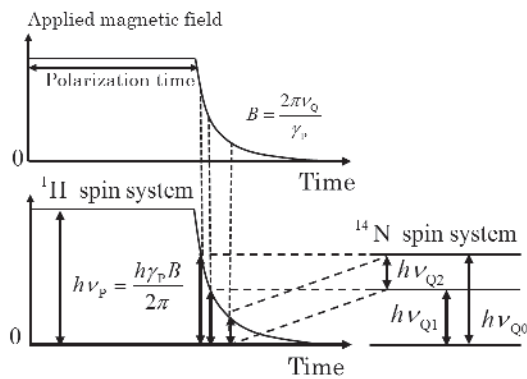


Fig.2 Schematic diagram of level crossings during the ^1H demagnetization process. ^{14}N has three different NQR frequencies, which means the level crossing occurs three times during the demagnetization process.

[実験方法] Fig.3 に示すような計測装置を構築した。まず、永久磁石からなる磁気回路を用いるこ

とで試料を静磁場下に一定時間置き、分極させる。その後、試料を試料移動機構を用いて、NQR 検出用プローブの位置まで移動させる。その際、移動機構の制御回路は、NQR spectrometer (TECMAG 社, Apollo)から出力させるトリガー信号に同期させ、移動用コイルに流す電流を制御する。移動用コイルは左右2つあり、Fig.3 に示した場合には、左側の移動用コイルに発生させた磁場と反発することにより、移動用磁石が左から右へ移動し、右側の移動用コイルには、吸引するように磁場を発生させて、移動用磁石を停止させる。この時、移動用コイルに連結さ

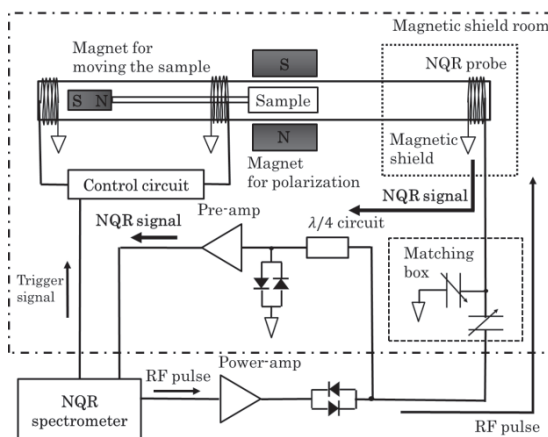


Fig.3 Schematic diagram of the NQR measurement system using cross polarization method.

せたアクリルの棒の先にある試料がNQRプローブの中心に移動することになる。NQR 励起用パルスシーケンスは、試料がNQRプローブに到達すると同時に開始し、NQR信号を取得できる仕組みとなっている。また、窒素原子核スピンも外部磁場とゼーマン相互作用が加わると、四極子エネルギーの分裂幅に分布が生じ、NQR信号の取得が困難になる。そのため、NQRプローブ近傍の磁場を低減する必要がある。NQRプローブ近傍の磁場強度とNQR信号強度の関係調べた結果、NQRプローブ近傍磁場強度が1 mTよりも小さければ、その影響をほぼ無視できることが分かった。そこで、NQRプローブを磁気シールドで覆うことにした。試料は、医薬品等の主成分であるイミダゾール、メトホルミン塩酸塩、ジエチルアミン塩酸塩、アセトアミノフェン、HMTの5種類を用いた。また、励起パルスシーケンスとして、高感度検出に有利なSpin-Locking Spin-Echo (SLSE)法を主に用い、格子緩和時間が短いHMT (hexamethylenetetramine)にはStrong Off Resonance Comb (SORC)法を用いた。

[結果と考察] 試料それぞれのNQR周波数、および試料の質量、分極時間、スピン-格子緩和時間ならびに実験で得られた信号の増加率をTable. 1に記載する。また、Fig.4にはHMTを除いた4種類の物質の分極時間と信号強度の関係を調べた結果を示す。ここで増加率は、分極により飽和した信号強度を分極前の信号強度で割ることにより算出した。HMT以外の試料において信号の増強が確認された。一方、HMTでは、信号の増強が確認できなかった。その理由は、HMTにおいて ^{14}N のスピン-格子緩和時間が試料の移動時間(160 ms)に比べ20倍短いことから、信号計測時には、励起された分極が交差分極前の熱平衡状態に戻ってしまったためだと考えられる。次に、メトホルミン塩酸塩を試料

Table 1 NQR frequency, sample weight, polarization time, spin-lattice relaxation time and measured enhancement factor of each sample.

	Imidazole	Metformin hydrochloride	Diethylamine hydrochloride	Acetaminophen	HMT
NQR frequency	1.368 MHz	2.61 MHz	1.006 MHz	2.564 MHz	3.308 MHz
Sample weight	100 mg	66 mg	100 mg	200 mg	100 mg
Polarization time	5.5 s	30 s	10 s	99 s	5 s
T_1	1.2 s	11 s	1.1 s	11 s	8 ms
Enhancement factor	1.7 (730 mT)	17 (730 mT)	9.1 (800 mT)	7 (800 mT)	1 (800 mT)

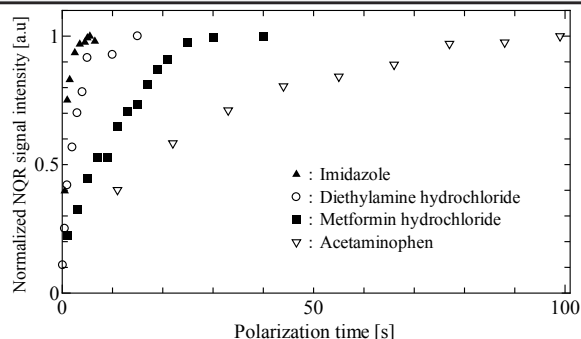


Fig.4 Dependence of the NQR signal intensity of imidazole, diethylamine hydrochloride, metformin hydrochloride and acetaminophen on polarization time.

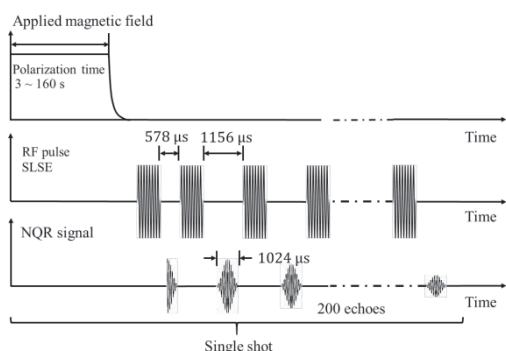


Fig.5 Schematic diagram of single measurement sequence for metformin hydrochloride.

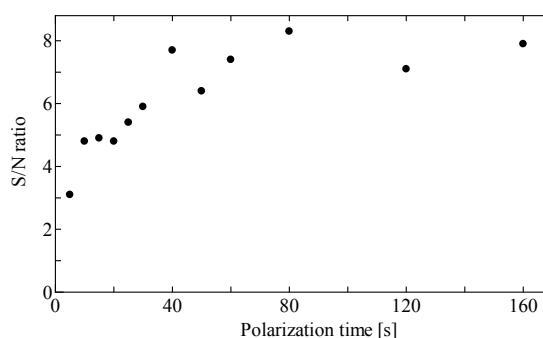


Fig.6 Dependence of signal-to-noise ratio on polarization time for metformin hydrochloride.

として積算回数1回の条件でNQR信号のS/N比と分極時間の関係を調べた。分極時間を、3 sから160 sの範囲に設定し、Fig.5に示すシーケンスを用いて計測を行った。その結果がFig.6であり、交差分極を用いることで信号強度が増強されており、100mg以下の試料であっても、積算1回でNQR信号を検出できることが示された。

さらに、装置の再現性評価として、実際の医薬品タブレット(アセトアミノフェン)を用いて、NQR信号のばらつきを調べた。実験の条件として、分極時間 22 s、積算回数 16回、パルスシーケンスとしてSLSEを用いて、エコー信号の取得回数を500, 1000, 2000回とした3通りの場合に対し、NQR信号をそれぞれ10回測定した。得られた結果の平均値を1として規格化し、それぞれの場合に対し標準偏差を計算してみると、500回 : 0.014, 1000回 : 0.054, 2000回 : 0.034 という結果が得られた。本研究の目的は、偽造医薬品の摘発技術への応用であり、この結果から本装置は、十分実用に耐えうる精度を有していると考えられる。

以上の結果より、NMR-NQR二重共鳴法を用いることで、試料の移動時間よりもスピン-格子緩和時間が短いHMT除いた4種類の試料で信号強度の増強が確認できた。以上より、NMR-NQR二重共鳴法がNQR信号のS/N比の改善に非常に有効な手段であることが示された。また、本研究で用いた装置系の評価も行い、その結果、一定の信頼性を保っていることを確認した。今後の展望としては、可搬型でより経済的な偽造医薬品検査装置の開発に取り組むことを考えている。

[謝辞] 本研究はJSPS科研費 JP26702007の助成を受けたものです。

[参考文献]

- 1) Jamie Barras, Darragh Murnane, Kaspar Althoefer, Sulaf Assi, Michael D. Rowe, Iain J. F. Poplett, Georgia Kyriakidou, John A. S. Smith, "Nitrogen-14 Nuclear Quadrupole Resonance Spectroscopy: A Promising Analytical Methodology for Medicines Authentication and Counterfeit Antimalarial Analysis", *Anal. Chem.*, 2013, 85 (5), pp 2746–2753
- 2) Janko Lužnik, Janez Pirnat, Vojko Jazbinšek, Tomaž Apih, Robert Blinc, Janez Seliger and Zvonko Trontelj, "Improved ^{14}N nuclear quadrupole resonance detection of trinitrotoluene using polarization transfer from protons to ^{14}N nuclei", *JOURNAL OF APPLIED PHYSICS* 102, 084903 (2007)

P102**Satellite transition selective $\{^{27}\text{Al}\}/^1\text{H}$ *D*-HMQC experiment at very fast MAS for the determination of quadrupolar coupling constants**Nghia Tuan Duong¹, Manoj Kumar Pandey^{1,2}, and Yusuke Nishiyama^{1,2}.¹RIKEN CLST-JEOL collaboration center, RIKEN, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan²JEOL RESONANCE Inc., Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan

Solid-state Nuclear Magnetic Resonance (ssNMR) spectroscopy is a powerful analytical technique to characterize the atomic-level structure and dynamics of materials. However, unlike spin $I = 1/2$, the applications of ssNMR to quadrupolar ($I > 1/2$)-containing materials are still limited owing to the large anisotropic interaction, arising from the interaction of electric quadrupolar moment and electric field gradient. This interaction, not completely averaged by magic-angle spinning (MAS), severely broadens the spectral lines, resulting in the low resolution and low sensitivity of acquired spectra, preventing the extraction of valuable structural information. Multiple Quantum MAS (MQMAS)¹ is a two dimensional (2D) sophisticated technique that enables the acquisition of high resolution spectra for half-integer nuclei, hence facilitate the structural investigations. From the spectra acquired, not only are the number of sites of nuclei of interest determined but also are their quadrupolar parameters (C_Q , η_Q) as well as the chemical shift information extracted. Despite being widely used for characterizing materials containing quadrupolar nuclei, the disadvantages of this technique lie on two points. The first point is the inefficiency in exciting sites experiencing large quadrupolar interaction since the excitation of forbidden triple quantum is required. The second point is the analytical fitting of MQMAS by SIMPSON simulation² is time consuming.

The proton-detected dipolar heteronuclear multi-quantum coherence (*D*-HMQC)^{3,4} at very fast MAS is one of the alternatives to alleviate the problematic issues when studying quadrupolar nuclei. By utilizing this approach, the advantages are multifold, including the larger sensitivity as proton is detected; better resolved correlation peaks between ^1H and quadrupolar nuclei; and probe ringing avoidance. Furthermore, recent study has demonstrated the application of *D*-HMQC to probe $^1\text{H}/^{35}\text{Cl}$ on pharmaceutical compounds to determine quadrupolar coupling constant (C_Q) based on the relative shift difference between the ST and the central transition (CT) peaks.⁵

The applicability of this technique is further investigated on spin $I = 5/2$, namely ^{27}Al ; and kaolin was used as the sample since it consists of one site, and this site does not experience large quadrupolar interaction.⁶ However this is not a straightforward study owing to the intrinsic characteristics of ^{27}Al nucleus and the conventional *D*-HMQC, especially if the quadrupolar interaction is small like kaolin. For the first point, ^{27}Al consists of three transitions, namely CT and inner (ST1) and outer (ST2) ST, in which CT and ST1 are partially unresolved no matter how “soft” the radiofrequency (rf) pulse is. Regarding the conventional *D*-HMQC, the T_2' of ^1H detrimentally affect the resolution of ^{27}Al in the indirect dimension. In order to overcome these limitations for reliable C_Q achievement, we performed *constant time D*-HMQC⁷, in which the time duration between two recoupling blocks is fixed. The advantage of this modified version compared

Keywords: *Constant time D*-HMQC at very fast MAS; 1D *satellite selective excitation* experiment; quadrupolar coupling constant (C_Q) determination for spin $I = 5/2$ nuclei (^{27}Al)

to conventional *D*-HMQC is that the broadening effect caused by T_2' of ^1H in the indirect dimension is alleviated, hence providing better resolution for ^{27}Al spectrum. Moreover, no peaks shift or splitting were observed unlike the conventional *D*-HMQC.

The CT shift was determined by the use of *constant time D*-HMQC without rotor-synchronization in the t_1 dimension. The unsynchronized indirect dimension prevents the overlap of spinning sidebands (ssb) to the center bands of STs, hence dramatically reduces the intensity for these transitions. As ^{27}Al CT is not affected by the first order quadrupolar interactions, under MAS condition this is the only detectable peak in the indirect dimension; hence this resonance is reliably assigned.

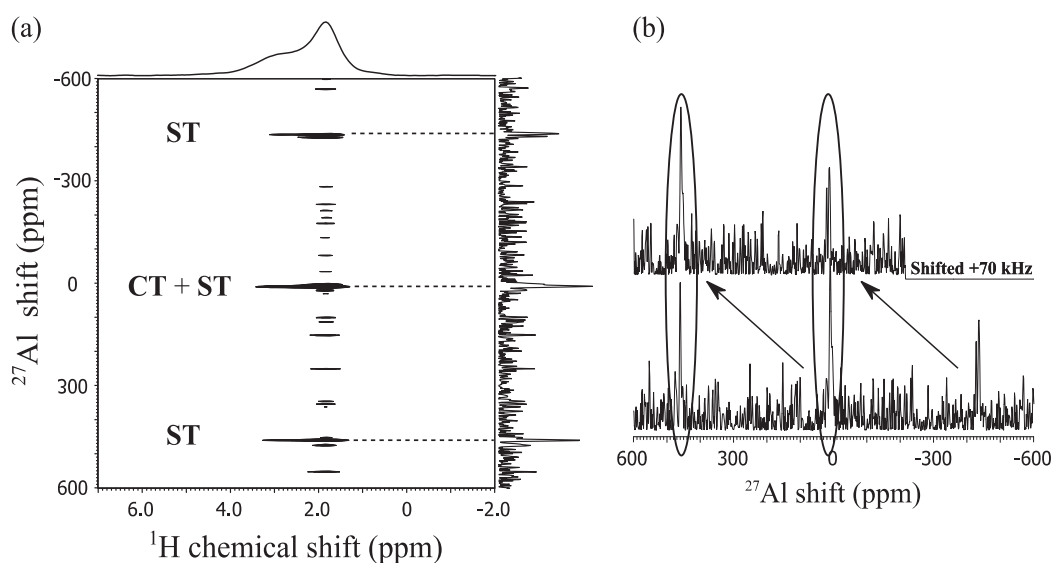


Figure 1. (a) The 2D ^1H - ^{27}Al correlation spectra acquired by *constant time D*-HMQC at MAS frequency of 70 kHz, in which the indirect dimension was set to 210 kHz and (b) the projection of the indirect dimension was (up) and was not (bottom) shifted by the spinning frequency of 70 kHz. The arrows in (b) help visualization of the shift of identical resonances while the ellipses denote the shift differences between the ssb of STs with the CT and center band STs.

After the precise assignment of the CT resonance, the next step is the ST shifts determination. In this study, we performed *constant time D*-HMQC at very fast MAS (70 kHz) under rotor-synchronization with the indirect dimension equal to 210 kHz, three times the spinning frequency. As STs are affected by the first order quadrupolar coupling, this results in the occurrence of ssb in the spectrum. Hence, based on the shifts of spinning sidebands, we could identify the ST shifts as shown in Figure 1(a) and (b).

Knowing the shifts of CT and ST1 and assuming η_Q equal to 0.5, C_Q is estimated to 3.5 MHz, which is in excellent agreement with literature.⁶ Since the experiment with large indirect bandwidth is time-consuming, and low sensitivity was achieved, we further developed *selective sidebands excitation* approach for getting ST resonances. Instead of applying rf field at the center band resonance, it is applied to the first ssb, namely at 460 ppm for the sake of intensity. The aim of this experiment is to selectively excite the ssb of STs, not the center bands; and from the direct one-dimensional (1D) spectrum, the ST resonances would be precisely acquired. Numerical simulations were performed (not shown) so that the intensity of center band is negligible

compared to those of ssb STs. The experiment for numerical verification was demonstrated in Figure 2 below. Based on the ST resonances from this 1D experiment and the CT shift achieved above, C_Q is calculated to 3.3 MHz, still in good agreement with literature.⁶ Further step was performed for higher resolution by the application of similar 1D *satellite selective* experimental conditions to the conventional *D*-HMQC, the shifts of STs were identified and C_Q was calculated to 3.3 MHz, which provided similar results as the 1D experiment aforementioned. The reason for similar result obtained could be explained owing to the utilization of conventional *D*-HMQC, leading to the broadening effect of ^{27}Al nucleus in the indirect dimension.

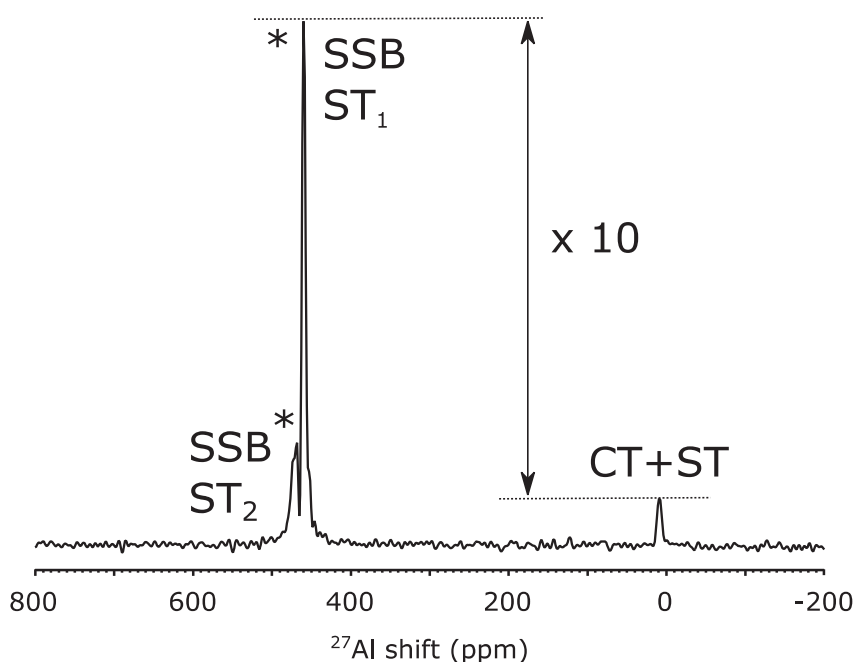


Figure 2. The one-dimensional ^{27}Al spectrum acquired by the application of rf field at the first ssb (460 ppm) instead of the center band at 10 ppm. At the optimized conditions, it is observed that the intensities of center band peaks are one tenth compared to that of the ssb of ST1, leading to no significant interference of center band resonance to the shifts of the ssb ST peaks. The asterisk denotes the spinning sidebands.

In short, this study provided the utilization of *constant time D*-HMQC for the precise determinations of CT and STs shifts, from which the C_Q of ^{27}Al ($I = 5/2$) could be derived, which is in excellent agreement with literature. The selective sidebands excitation method is another alternative approach for the STs measurements, providing a reliable C_Q value. For the perspective, we aim to apply these approaches for investigating of more complex systems where more than one sites are involved.

REFERENCES

1. Frydman, L. & Harwood, J. S. Isotropic Spectra of Half-Integer Quadrupolar Spins from Bidimensional Magic-Angle Spinning NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5367–5368 (1995).
2. Bak, M., Rasmussen, J. T. & Nielsen, N. C. SIMPSON: a general simulation program for solid-state NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **147**, 296–330 (2000).
3. Gan, Z. $^{13}\text{C}/^{14}\text{N}$ heteronuclear multiple-quantum correlation with rotary resonance and REDOR dipolar recoupling. *J. Magn. Reson.* **184**, 39–43 (2007).

4. Cavadini, S., Abraham, A. & Bodenhausen, G. Proton-detected nitrogen-14 NMR by recoupling of heteronuclear dipolar interactions using symmetry-based sequences. *Chem. Phys. Lett.* **445**, 1–5 (2007).
5. Pandey, M. K., Kato, H., Ishii, Y. & Nishiyama, Y. Two-dimensional proton-detected $^{35}\text{Cl}/^1\text{H}$ correlation solid-state NMR experiment under fast magic angle sample spinning: Application to pharmaceutical compounds. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 6209–6216 (2016).
6. Pike, K. J., Malde, R. P., Ashbrook, S. E., McManus, J. & Wimperis, S. Multiple-quantum MAS NMR of quadrupolar nuclei. Do five-, seven- and nine-quantum experiments yield higher resolution than the three-quantum experiment? *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **16**, 203–215 (2000).
7. Rossini, A. J., Hanrahan, M. P. & Thuo, M. M. Rapid Acquisition of Wideline MAS Solid-state NMR Spectra with Fast MAS, Indirect Proton Detection, and Dipolar HMQC Pulse Sequences. *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2016). doi:10.1039/C6CP04279A

常磁性効果の基礎と生体高分子解析への応用

理化学研究所生命システム研究センター

八木 宏昌

hiromasa.yagi@riken.jp

はじめに

常磁性効果を生体系（特にタンパク質）NMRに利用した研究は、1970年代初頭に一次元 ^1H -NMRによるヘムタンパク質の活性中心の構造解析に始まり、80年代には金属結合タンパク質の構造解析へと発展した。さらにここ数十年で、その応用範囲は急速な広がりを見せ、今や常磁性NMRは金属結合タンパク質以外にも適用できるスタンダードな手法になりつつある。その要因として、第一にタンパク質への常磁性標識が比較的容易に行えるようになったことが挙げられる。ケミカルバイオロジーの発展に伴い、構造生物学の分野にも有機合成の研究者が参入し、多種多様な常磁性金属キレート剤（常磁性タグ）が化学合成されるようになった。その結果、目的タンパク質への部位特異的な常磁性標識がある程度自由な箇所安定に施せるようになった。次に、常磁性効果を解析するツールが充実してきたことも挙げられる。CYANAやXPLOR-NIHあるいはCS-ROSETTAなどの構造計算ソフトに常磁性効果から得られる拘束条件を組みこむことが出来るようになってきた。さらに、NMRの解析対象が複雑になり、マルチドメインを持つタンパク質やタンパク質複合体などの大きな系の解析、あるいはリガンドとの相互作用解析など、構造解析を行う上で遠距離の構造情報が必須となってきたことも大きな要因の一つであると考えられる。本稿では常磁性効果の基本的な概念を紹介し、後半は常磁性効果の中でも特に擬コンタクトシフト（pseudocontact shifts : PCS）に焦点をあて、測定の仕事および解析に関する注意点等を述べたいと思う。

常磁性体と常磁性効果

NMRにおける常磁性効果とは、観測対象の分子に不対電子を持つイオンや原子（常磁性体）が結合あるいは接近すると、その分子のNMR信号が変化する現象をいう。常磁性体は不対電子から生じる

永久磁石となる磁気双極子モーメントを持つため、静磁場中に置かれるとその方向に弱く磁化する性質がある。電子の磁気双極子モーメントの大きさは水素原子のそれに比べおよそ660倍大きいので、核スピンとの相互作用は非常に強く、核スピン同士のあらゆる相互作用を超える距離範囲で影響を及ぼす。そのため、常磁性効果を利用することで長距離の構造情報を獲得することが出来る。不対電子は有機ラジカルや遷移金属原子にみられる。通常、有機ラジカルは反応性が非常に高いため水溶液中で常磁性体として存在するケースは稀であるが、ニトロキシラジカルは安定に存在する。一方、遷移金属に関しては、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、そしてほとんど全てのランタノイド（図1）が不対電子を持つ常磁性体である。

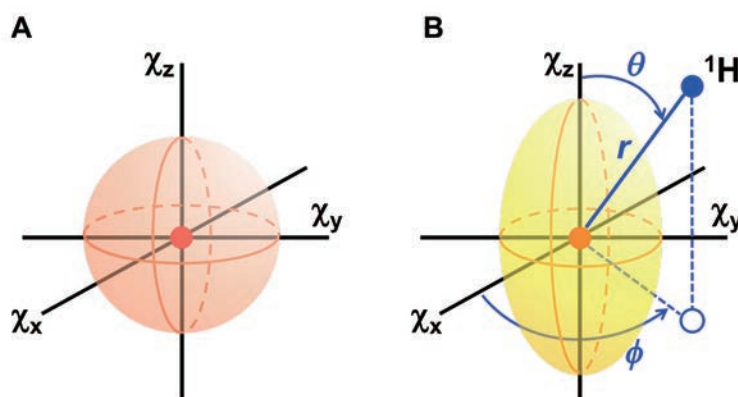
反磁性リファレンスの重要性

意外と見落とされがちなのが反磁性リファレンスの重要性である。常磁性効果とは常磁性と反磁性の差で定義されているため反磁性のリファレンスは正確な常磁性効果を求めるうえで必須である。例えば、MTSL (S-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro- ^1H -pyrrol-3-yl)methylmethanesulfonothioate) などのニトロキシラジカルを目的タンパク質に部位特異的に標識して常磁性スペクトルを得たとする。その際、常磁性効果とはニトロキシラジカルを持つ不対電子を取り除いた反磁性スペクトルとの差である（ニトロキシラジカルを“標識していない”スペクトルとの差ではないことに注意したい）。一般的にはアスコルビン酸などの還元剤を使って、ラジカルをヒドロキシルアミンに置換することで不対電子を取り除いて反磁性スペクトルを得る。遷移金属の場合、 Mn^{2+} および Co^{2+} は化学的に性質に近い Mg^{2+} および Zn^{2+} をそれぞれの反磁性リファレンスとして用いる。ランタノイドの場合は原子番号57の La^{3+} と71の Lu^{3+} が反磁性リファレンスとなる（これらの原子はランタノイド原子群

	f1	f2	f3	f5	f6	f7	f8	f9	f10	f11	f12	f13
	Cerium	Praseodymium	Neodymium	Samarium	Europium	Gadolinium	Terbium	Dysprosium	Holmium	Erbium	Thulium	Ytterbium
	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb
J	5/2	4	9/2	5/2	0	7/2	6	15/2	8	15/2	6	7/2
$\chi / 10^{-32} \text{m}^3$	5.6	11.2	11.4	0.6	-6	55.1	82.7	99.2	98.5	80.3	50.0	18.0
PRE												
$\Delta\chi_{ax} / 10^{-32} \text{m}^3$	2.1	3.4	1.7	0.2	-2.3	0	42.1	34.7	18.5	-11.6	-21.9	-8.3
$\Delta\chi_{rh} / 10^{-32} \text{m}^3$	0.7	2.1	0.4	-0.1	-1.6	0	11.2	20.3	5.8	-8.6	-20.1	-5.8
PCS												
τ_e / s		10^{-13}				10^{-7}	10^{-13}					

図1 ランタノイドの常磁性性質

常磁性を示すランタノイドのみを表示した。タンパク質の ^1H NMR信号がPREの影響を受ける範囲(分子の回転相関時間が15 ns、800 MHzの ^1H 周波数で測定し、80 Hzの広幅化が見られる領域)を黄色の円で示した。カルビンジン D_{9k} のカルシウム結合箇所(ランタノイドを固定した際の χ テンソルおよび $\Delta\chi$ テンソルの値を表記し、 ± 5 ppmのPCSが観測される領域をisosurfacesで表示した^[10]。電子の緩和時間(τ_e)は18.8 Tでの値を記した^[3]。

図2 磁化率テンソル(χ テンソル)の等方性と異方性

常磁性中心(赤丸)を原点として、 χ_x , χ_y , χ_z を主軸とした主軸座標系(principle axis system: PAS)で磁化率テンソル(χ テンソル)を表示した。A) 等方性 χ テンソルを持つ場合は三軸の長さが等しい。B) 異方性 χ テンソル($\Delta\chi$ テンソル)を持つ場合は三軸の長さは等しくない。 $\Delta\chi$ テンソルは χ テンソルの異方性成分であり、同じ座標系を共有する。式(2)で記述される常磁性中心と ^1H 核スピンの距離 r と角度 θ , ϕ の関係を重ねて表示した。

の最初と最後に位置する反磁性原子である)。どちらの原子を使ってもあまり差し障りないが、厳密には原子番号が早いものに関しては La^{3+} を、遅いものに関しては Lu^{3+} を用いる方が、より原子半径が近いという理由で好ましい。ちなみに原子番号が中間に位置するものに関しては Y^{3+} を反磁性リファレンスとして用いることを推奨する(Y^{3+} は厳密にはランタノイドではないが、その原子半径は Ho^{3+} の原子半径に近い)。

磁化率テンソルの等方性と異方性

分子の持つ常磁性は磁化率テンソル(χ テンソル)

で記述することができる。磁化率とは分子が磁場中に置かれた場合、どのくらい磁化しているか、あるいは磁場とどのくらいの強さで相互作用しているかを表す指標である。分子の χ テンソルは、常磁性中心を原点に置き、 χ_x , χ_y , χ_z を主軸とした主軸座標系(principle axis system: PAS)で記述できる(図2)。それぞれの軸の長さは外部磁場によって誘起される電子の磁気双極子モーメントの大きさに対応する。今、三軸の長さが等しいとき χ テンソルは等方性を示す(図2A)。 Mn^{2+} および Gd^{3+} は等方性の χ テンソルを持つ。 Cu^{2+} およびニトロキシラジカルは、ほとんど等方性である。一方、 Co^{2+} および

Gd^{3+} を除く全ての常磁性ランタノイドは χ テンソルに異方性を持つ(図2B)。これは不対電子の持つ磁気双極子モーメントの大きさが分子の回転によって変調を受けることに由来する。 χ テンソルの異方性成分を $\Delta\chi$ テンソルと呼び以下の式で記述できる。

$$\begin{aligned}\Delta\chi_{ax} &= \chi_z - (\chi_x + \chi_y)/2 \\ \Delta\chi_{rh} &= \chi_x - \chi_y\end{aligned}\quad (1)$$

ここで $\Delta\chi_{ax}$ と $\Delta\chi_{rh}$ はそれぞれ、 $\Delta\chi$ テンソルのaxial(軸)成分とrhombic(菱形)成分を表す。 χ テンソルと $\Delta\chi$ テンソルは同じ主軸座標系を共有する。すなわち $\Delta\chi$ テンソルの場合は $\chi_x = \chi_y = \chi_z$ が成り立たないことを意味する。

等方性もしくはほとんど等方性の χ テンソルを持つ Mn^{2+} , Gd^{3+} , Cu^{2+} およびニトロキシラジカルは不対電子の緩和時間が10 ns程度と比較的遅い^[1,2]。一方、 χ テンソルに異方性を持つ($\Delta\chi$ テンソルを示す) Gd^{3+} を除く全ての常磁性ランタノイドは不対電子の緩和時間が非常に速く0.1 ps程度である^[3]。電子の緩和時間の違いは核スピンの常磁性緩和に異なった機構で寄与している。このことに関して事項でもう少し詳しく述べることにする。

常磁性緩和

不対電子との双極子相互作用によって核スピンの横緩和時間が促進されると、常磁性中心からの距離に依存してNMR信号の線幅が増大する。いわゆる常磁性緩和促進(paramagnetic relaxation enhancements: PRE)と呼ばれる現象である。PREの機構は前述の通り不対電子の緩和時間の違いによって二つのクラスに分類される。不対電子の緩和時間が遅い場合、電子の磁気双極子モーメントの大きさは分子の回転によらず一定である。この時に働く緩和機構をsolomon機構と呼ぶ^[4]。一方、ランタノイドのように不対電子の緩和時間が分子の回転相関時間より著しく速い場合(タンパク質分子の回転相関時間がnsオーダーに対し、ランタノイドが持つ不対電子の緩和時間は0.1 ps程度)は、電子の磁気双極子モーメントの大きさは分子の回転に伴って変調を受ける。この時に働く緩和機構をCurie spin機構(あるいは単にCurie緩和)と呼ぶ^[5]。またCurie spin機構は異方性双極子遮蔽(dipolar shielding anisotropy: DSA)とも呼ばれ、数学的記述が化学シフト異方性(chemical shift anisotropy: CSA)と類似しており、CSAと同様な取り扱いが行える^[6]。ところでCSAは核スピ

ンの代表的な緩和機構の一つとして知られている。またCSAはこれもまた代表的な核スピンの緩和機構のひとつである双極子-双極子相互作用と交差相関し、共有結合している二つの核スピン(例えばアミド 1H と ^{15}N)のダブレット成分に異なる線幅を与えることが知られている。いわゆるTROSYの基となる現象である。さてCurie spin機構(DSA)もCSAと同様に核スピンの双極子-双極子相互作用と交差相関し、こちらもダブレットの線幅に影響を与える^[7]。さらにCurie spin機構(DSA)はCSAとも交差相関する(このようにCurie spin機構が他の緩和機構と交差相関することを、cross-correlated relaxation: CCRと呼ぶ)。Curie spin機構(DSA)とCSAは、ともに分子の回転によって変調を受ける機構であるため、両者の相対的な位置関係によってその交差相関は核スピンの緩和を強めあったり、弱めあったりする^[8]。したがってPREの主な要因がCurie spin機構の場合、緩和項の中にCSAとの交差相関が含まれるので、その取り扱いが複雑になってしまう。PREはSolomon機構、Curie spin機構によらず常磁性中心からの距離 r^{-6} に比例して減少するが、実際に観測する場合は上記の理由によりsolomon機構が支配するニトロキシラジカルや Mn^{2+} および Gd^{3+} などを使う方が望ましい。

常磁性シフト

$\Delta\chi$ テンソルを持つ常磁性金属は常磁性緩和に加えてNMR信号の化学シフト値にも変化を与える。この現象を常磁性シフトと呼ぶ。常磁性シフトは化学結合を介するコンタクトシフト(contact shifts)と空間を通じて生じる擬コンタクトシフト(pseudocontact shifts: PCS)に分けられる。コンタクトシフトは核スピン同士のスカラーカップリング同様、共有結合の数や二面角に依存しており、その影響は結合数が増えるにつれ急速に減少する。したがって直接金属に配位している原子核、もしくは極近傍の原子核にしかその影響を観測することができない。ただし、そのような近距離にある核スピンのNMR信号は、強いPRE効果によって観測することが難しいため、タンパク質などの生体高分子解析に必要な遠距離情報にはコンタクトシフトの影響は無視して考えても問題ない。一方、PCSは空間を通じて常磁性中心から40 Å程度の範囲まで影響を及ぼす。PCSはppm単位で観測され、 $\Delta\chi$ テンソル座標(図2B)を用いて下記の式で記述できる^[9]。

$$\Delta\delta^{\text{PCS}} = 1/12\pi r^3 [\Delta\chi_{\text{ax}}(3\cos^2\theta - 1) + 1.5\Delta\chi_{\text{rh}}\sin^2\theta\cos 2\phi] \quad (2)$$

ここで r , θ , ϕ は電子と核スピンの距離と角度の関係を $\Delta\chi$ テンソル座標系に対して極座標表記で記したものである。式(2)から分かるようにPCSは常磁性中心からの距離 r^{-3} に依存する。つまりPCSはPREと比べ距離に対する依存性が弱く、PREの影響に妨げられることなく、より遠くの核スピまで観測できる。分子のどの位置にどれくらいの大きさのPCSが観測されるかを視覚的に表現したものをisosurfacesと呼ぶ。図3Aにisosurfacesとタンパク質の立体構造の重ね合わせを示した。Isosurfacesの大きさと向きは、それぞれ $\Delta\chi$ テンソルの大きさと主軸座標系の向きを表している。青色と赤色の領域には、それぞれ正(+)と負(-)のPCSが観測され、色の濃さはPCSの大きさに対応している。分子に対するisosurfacesの位置関係、つまり分子に対して主軸座標系がどのように置かれるかは、観測したすべてのPCSが式(2)を満たすように $\Delta\chi$ テンソルの値を決めることで決定される。分子とisosurfacesの位置関係が分かれば、逆に分子のどの位置にどれくらいの大きさのPCSが観測されるかを予測することができる。次の項ではPCS測定に関してもう少し詳しく紹介する。

PCS 測定

ここではタンパク質のNMRで汎用的に測定されている二次元 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQCスペクトルを例にとっ

て、ランタノイドを使ったPCS測定を紹介する。PCSは常磁性と反磁性ピークの化学シフト値の差なので単純に常磁性と反磁性スペクトルを一枚ずつ測定してその差を取れば良い。常磁性ピークの信号帰属は反磁性ピーク(信号帰属情報があるものとする)との比較から比較的容易に行える。 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQCスペクトル上のクロスピークは直接共有結合している ^1H 核と ^{15}N 核の相関であり、その核間距離はおおよそ 1\AA 程度なので、常磁性中心とそれぞれの核とを結ぶ距離に比べれば十分短い。したがって同一残基の ^1H 核と ^{15}N 核は、“ほぼ同じ”値のPCS値になり、図3Bで示すようにPCSは傾斜がほぼ1の右肩上がりの直線上に乗る。ランタノイドは化学的性質が似ているので、常磁性中心を全てのランタノイドで置き換えることが可能である。一方で磁気的性質は異なるので、それぞれのランタノイドはタンパク質分子に異なる $\Delta\chi$ テンソルを与え^[10](図1を参照)、観測されるPCSの大きさもそれぞれで異なる。ただし、基本的にはそれらは全て同一直線上に乗る。PCSの大きさと向きはisosurfacesの大きさと向きに比例するので、それぞれの相対的な化学シフト値はおおよそ予測できる。例えば、 Tm^{3+} と Tb^{3+} を使った場合、それぞれの常磁性ピークは反磁性のピークを挟んで逆側に現れ、かつ Tb^{3+} のピークは Tm^{3+} のピークよりも少し大きくシフトした位置に現れるはずである(図3B)。こうした事前情報を使えば常磁性ピークの信号帰属は比較的容易に行うことができる。

ところで、先ほど同一残基の ^1H 核と ^{15}N 核のPCS

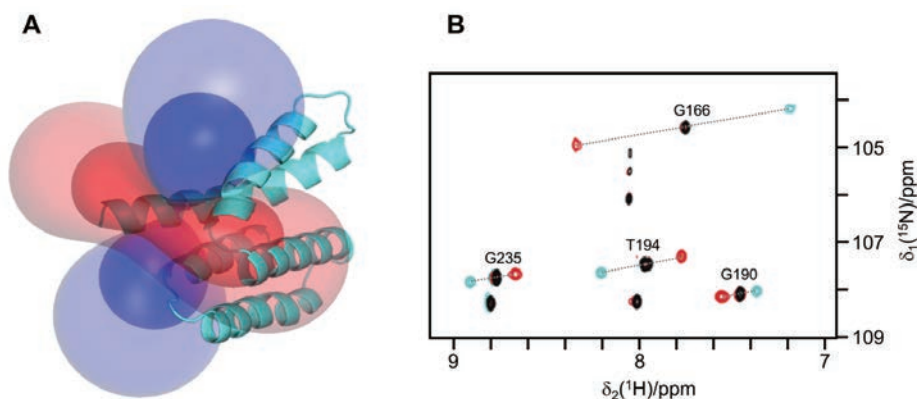


図3 IsosurfacesとPCS測定

A) ERp29 C末ドメインの構造とisosurfacesを重ね合わせて表示した。 Tb^{3+} をNTA-SHタグを用いてタンパク質に導入し、観測したPCSを構造にフィットして得られた $\Delta\chi$ テンソルからisosurfacesを作成した。青色の領域は正(+),赤色の領域は負(-)のPCSを示し、色の濃い領域と薄い領域はそれぞれ $\pm 0.7\text{ ppm}$ と $\pm 0.2\text{ ppm}$ のPCS値を示す。B) 二次元 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQCスペクトルによるPCS測定。ERp29 C末ドメインにNTA-SHタグを用いて常磁性ランタノイドの Tb^{3+} (シアン)と Tm^{3+} (赤)を導入したスペクトルと反磁性リファレンスの Y^{3+} (黒)を導入した二次元 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQCの部分スペクトルを重ねて表示した。 Tb^{3+} (シアン)と Tm^{3+} (赤)の常磁性ピークは反磁性の Y^{3+} (黒)を挟んで反対方向に観測され、同一残基の三つのピークは直線上(破線)に乗る。また Tb^{3+} (シアン)のピークは Tm^{3+} (赤)のピークより少し大きくシフトしている。これは Tb^{3+} と Tm^{3+} の持つisosurfacesの性質の違いによる(図1参照)。

は“ほぼ同じ”値になると述べたが、実際には少し注意が必要である。常磁性効果にはPRE、PCSの他に分子を弱く配向させる効果もある(これにより残余双極子相互作用:RDCの観測も可能であるが本稿ではその詳細は省く)。このためランタノイド標識することにより化学シフト値にもわずかに影響を与える。この効果を残余異方性化学シフト(residual anisotropic chemical shifts:RACS)と呼び、CSAの強い核ほど影響を受け、かつ磁場依存性もある。したがって高磁場で測定したアミド ^{15}N 核のPCSはわずかではあるが補正を加える必要がある(同様な補正はカルボニル ^{13}C 核にも必要である)^[11]。

タンパク質へのランタノイド標識

PCSを観測するためにはランタノイドを目的タンパク質に導入する必要がある。多くの場合はランタノイド結合タグ(lanthanide binding tag:LBT)と呼ばれる金属キレート剤を使って導入する。LBTには大きく分けて、 Ca^{2+} 結合モチーフのEFハンドを改良したペプチド性のタグと化学合成タグとがある。ペプチド性LBTはタンパク質の末端に融合ペプチドとして結合させたり^[12]、一次配列上にシステインを加えてタンパク質中のシステイン残基とジスルフィド結合を形成させたり^[13]することで標的タン

パク質に導入する。また融合ペプチドとジスルフィド結合を組み合わせることでLBTの運動性が抑えられ、非常に効果的なPCSが獲得できる^[14]。化学合成LBTは金属キレート剤に官能基を導入して標的タンパク質に化学修飾することで導入する^[15]。多くの場合は、ペプチド性LBTと同様にタンパク質中のシステイン残基にジスルフィド結合を介して導入するが、最近還元的环境下においても安定な結合が形成できるように官能基に工夫がなされているものも多い^[15](図4)。また、標的タンパク質に非天然アミノ酸を導入し、その側鎖とLBT側の官能基を特異的に反応させることでシステイン残基に依存しない導入方も開発されてきている^[15](図4)。化学合成LBTの中でも、サイクレン骨格を持つ通称DOTAと呼ばれる化合物は飛び抜けて強い親和性($K_d \sim 10^{-25}\text{M}$)でランタノイドを結合する^[16](図5)。通常PCS測定は、予めLBTをタンパク質に付加し、後から好みのランタノイドを滴定することで行われる。しかしながらDOTAの場合はタンパク質が安定に存在できる水溶液条件下では、ランタノイドをサイクレン骨格内に挿入することが出来ない。したがってランタノイドを含んだまま化学合成する必要がある。その反面、測定中にランタノイドがタグから逸脱する心配がなく、またランタノイドを後から滴定する必要がないのでタンパク質表面への非特異吸着の影

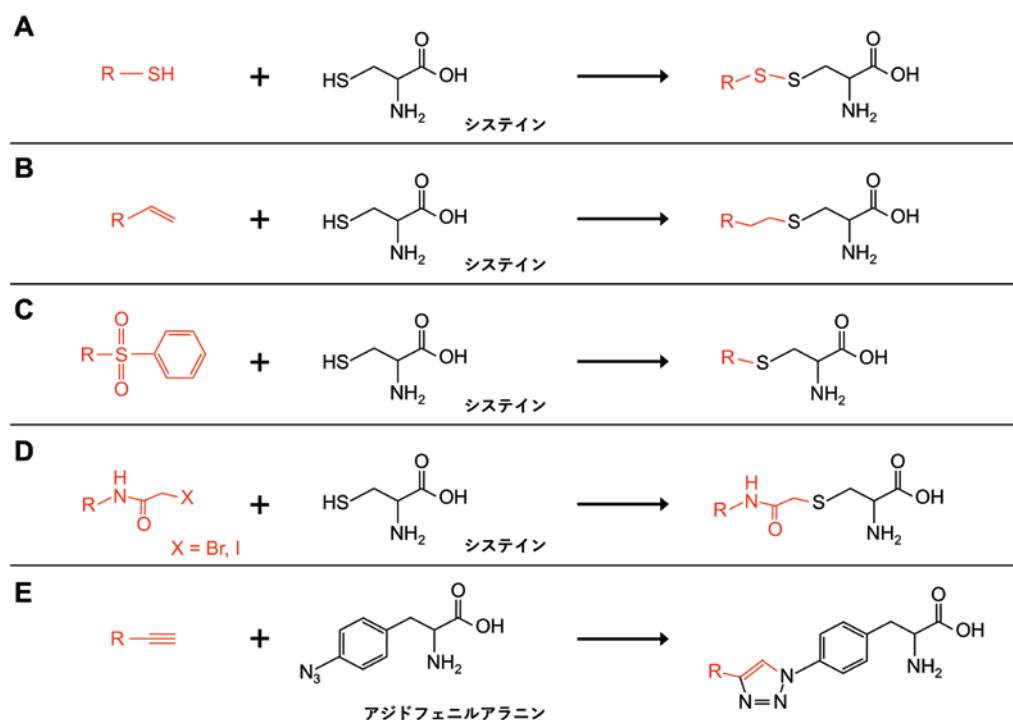


図4 化学合成LBTのタンパク質への導入法

化学合成LBT(赤で表示、Rにそれぞれの金属キレート構造)を共有結合によってタンパク質へ導入する際の代表的な反応を表示した。A)ジスルフィド結合によるシステイン残基への導入。B~D)還元的环境下でも安定な結合を介してシステイン残基に導入。E)非天然アミノ酸のアジドフェニルアラニンにアセチル基を持つLBTを“クリック反応”で導入。

響を考慮しなくても良いという利点がある。

タグの運動性と PCS の信頼性

LBTをタンパク質に固定する際、その間を繋ぐリンカー部分の運動性は常に問題となる。リンカーの運動性が高いとランタノイドの位置(常磁性中心)が正確に決まらず、 $\Delta\chi$ テンソルは幾つかの常磁性中心からの総和になってしまう。結果として得られるPCSは平均化されてしまい、“堅く”固定化された常磁性中心から得られるPCS(理想的な値)より小さくなってしまいます。リンカーの運動性を抑えるためにLBTを2箇所固定したり^[15]、長さを出来るだけ短くして、かつ芳香環などを挿入して結合角の自由度に制限をもたせたりする工夫がなされている^[15]。

ではLBTに高い運動性がある場合、そこから得られるPCSはどれくらい信頼がおけるのだろうか? OttingらはLBTをタンパク質に一箇所固定したモデルを立て、タグの運動性とそこから導かれるPCSの確からしさの関係を包括的に検証している^[17]。その結果、タグの運動性が高くても、ある特定箇所の核スピンのPCSを予測する場合には、その特定箇所周辺から集めたPCSのみを使って決めた $\Delta\chi$ テンソル(実効 $\Delta\chi$ テンソル)は非常に精度よくPCSを予測することが分かった。一方、予測したい箇所から離れた場所のPCSを加えて実効 $\Delta\chi$ テンソルを決めた場合、つまり分子全体からPCSを集めた場合には、予測したい箇所におけるPCSの予測精度が下がることが判明した。これらの結果は次のことを示唆している。今、タンパク質とリガンドの相互作用様式をPCSの拘束条件を基にしたドッキングによって求めたいとする。そしてリガンドの結合箇所が大まかに分かっているとす。タグに高い運動性がある場合、タンパク質側のPCSはリガンドポケット周辺の原子のみを使う方がドッキングの精度が高まる。このことは実際の実験結果においても証明されている^[18]。それではPCSをタンパク質分子全体から集める必要がある場合、例えばタンパク質-タンパク質相互作用の解析や、PCSを構造リファインメントとして使いたい場合には、運動性の高いタグは使えないのであろうか? このような場合は、LBTを数カ所、分子の異なる場所に標識して出来るだけ多くのPCSを分子全体から獲得することで精度をあげる必要がある^[19]。

終わりに

常磁性効果の歴史は古い。その理論は1950年代

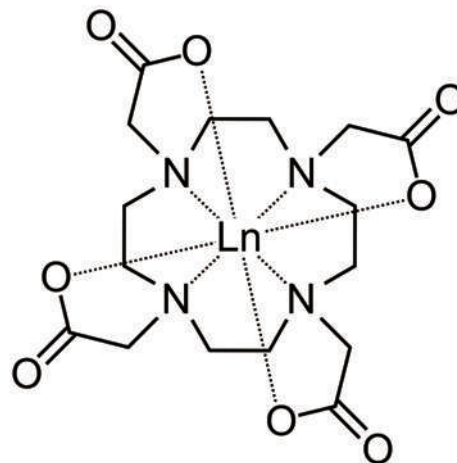


図5 ランタノイドが配位したDOTAの構造

ランタノイド(Ln)はサイクレン骨格を形成する4つの窒素原子と、そこから延びているカルボキシル基の4つの酸素原子によって配位される。

にすでに確立していたが、タンパク質解析に応用するための技術が追いついていなかった。近年の目覚ましい技術の進歩が解析対象の幅を広げ、逆に研究者の飽くなき挑戦が技術躍進に貢献してきたことは言うまでもない。しかしながら常磁性効果の活用法はまだ見ぬ可能性をも秘めている。最後に一つ面白い例を紹介したい。先ほど「Curie spin機構(DSA)とCSAの交差相関は、両者の相対的な位置関係によって核スピンの緩和を強めあったり、弱めあったりする」と述べた。もし弱めあうのであれば、それは横緩和時間を遅くする“負のPRE”を誘導することになり信号の線幅をより狭めるはずである。この理論は10年以上も前に“paramagnetically effected narrowing: PEN”^[8]という名で既に提唱されていたが、これまで実験的な証拠がなかった。しかし昨年、カルビンジン D_{9k} の Ca^{2+} 結合サイトの一つをランタノイドに置き換えてPCSを測定し、常磁性ピークと反磁性ピークの緩和時間測定をアミド基の ^{15}N 核について行った結果、ある残基においては緩和時間が確かに遅くなっていることが証明された^[20]。この実験では実際に負のPREによるシャープな信号が観測されたわけではないが、常磁性中心からおよそ9ÅあたりにPENの効果が最も現れると述べられている。しかしながら通常の 1H 観測の場合、このあたりの信号は強いPRE効果によって観測が非常に難しい(PENはあくまでもDSAとCSAの交差相関による影響であって、Curie spin機構(DSA)そのものによる常磁性緩和は常に働いている)。では ^{15}N 観測はどうだろうか? PENの効果は、核スピンの緩和機構のうちCSAの寄与が大きいものほど顕著に現れることも分かっているので、主鎖アミ

ト基の ^{15}N 核は大いに可能性がある。近年、 ^{15}N の直接観測が現実味を帯びてきており、その感度は1.2GHz (^1H 周波数)で最大と言われている^[21]。もしかしたら近い(?)将来、常磁性効果はもはや信号を“見えなくする”だけのものではなく、“より尖鋭に観測する”ものにもなっているかもしれない。

謝 辞

本稿を執筆するにあたり、オーストラリア国立大学のGottfried Otting教授より図1を提供していただいた。また北海道大学理学部の齋尾智英博士から有益な助言をいただいた。この場をお借りして感謝いたします。

参考文献

- [1] Benmelouka, M., Borel, A., Moriggi, L., Helm, L., and Merbach, A. E. (2007) Design of Gd(III)-based magnetic resonance imaging contrast agents: static and transient zero-field splitting contributions to the electronic relaxation and their impact on relaxivity. *J. Phys. Chem. B* **111**, 832-834.
- [2] Pintacuda, G., Moshref, A., Leonchiks, A., Sharipo, A., and Otting, G. (2004) Site-specific labelling with a metal chelator for protein structure refinement. *J. Biomol. NMR* **29**, 351-361.
- [3] Alsaadi, B. M., Rossetti, F. J. C., and Williams, R. J. P. (1980) Electron relaxation rates of lanthanide aquocations. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2147-2150.
- [4] Solomon, I. (1955) Relaxation processes in a system of two spins. *Phys. Rev.* **99**, 559-565.
- [5] Guéron, M. (1975) Nuclear relaxation in macromolecules by paramagnetic ions-novel mechanism. *J. Magn. Reson.* **19**, 58-66.
- [6] Bertini, I., Kowalewski, J., Luchinat, C., and Parigi, G. (2001) Cross correlation between the dipole-dipole interaction and the Curie spin relaxation: the effect of anisotropic magnetic susceptibility. *J. Magn. Reson.* **152**, 103-108.
- [7] Ghose, R., and Prestegard, J. H. (1997) Electron spin-nuclear spin cross-correlation effects on multiplet splittings in paramagnetic proteins. *J. Magn. Reson.* **128**, 138-143.
- [8] Pintacuda, G., Kaikkonen, A., and Otting, G. (2004) Modulation of the distance dependence of paramagnetic relaxation enhancements by CSAxDSA cross-correlation. *J. Magn. Reson.* **171**, 233-243.
- [9] Bertini, I., Luchinat, C., and Parigi, G. (2002) Magnetic susceptibility in paramagnetic NMR. *Prog. NMR Spectrosc.* **40**, 249-273.
- [10] Bertini, I., Janik, M. B. L., Lee, Y. M., Luchinat, C., and Rosato, A. (2001) Magnetic susceptibility tensor anisotropies for a lanthanide ion series in a fixed protein matrix. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4181-4188.
- [11] John, M., Park, A. Y., Pintacuda, G., Dixon, N. E., and Otting, G. (2005) Weak alignment of paramagnetic proteins warrants correction for residual CSA effects in measurements of pseudocontact shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 17190-17191.
- [12] Wöhnert, J., Franz, K. J., Nitz, M., Imperiali, B., and Schwalbe, H. (2003) Protein alignment by a coexpressed lanthanide-binding tag for the measurement of residual dipolar couplings. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13338-13339.
- [13] Su, X.-C., Huber, T., Dixon, N. E., and Otting, G. (2006) Site-specific labelling of proteins with a rigid lanthanide-binding tag. *ChemBioChem* **7**, 1599-1604.
- [14] Saio, T., Ogura, K., Yokochi, M., Kobashigawa, Y., and Inagaki, F. (2009) Two-point anchoring of a lanthanide-binding peptide to a target protein enhances the paramagnetic anisotropic effect. *J. Biomol. NMR* **44**, 157-166.
- [15] 化学合成LBTの種類およびタンパク質への導入に関する詳細は例えば下記のレビュー等を参照されたい。Nitsche, C., and Otting, G. (2017) Pseudocontact shifts in biomolecular NMR using paramagnetic metal tags. *Prog. NMR Spectrosc.* **98-99**, 20-49.
- [16] Rocklage, S. M., and Watson, A. D. J. (1993) Biodistribution and toxicity of MR imaging contrast media. *Magn. Reson. Imaging* **3**, 167-178.
- [17] Shishmarev, D., and Otting, G. (2013) How reliable are pseudocontact shifts induced in proteins and ligands by mobile paramagnetic metal tags? A modelling study. *J. Biomol. NMR* **56**, 203-216.
- [18] Chen, W. N., Loscha, K.V., Nitsche, C., Graham, B., and Otting, G. (2014) The dengue virus NS2B-NS3 protease retains the closed conformation in the complex with BPTI. *FEBS Lett.* **588**, 2206-2211.
- [19] Yagi, H., Pilla, K. B., Maleckis, A., Graham, B., Huber, T., and Otting, G. (2013) Three-dimensional protein fold determination from backbone amide pseudocontact shifts generated by lanthanide tags at multiple sites. *Structure* **21**, 883-890.
- [20] Orton, H. W., Kuprov, I., Loh, C.-T., and Otting, G. (2016) Using Paramagnetism to slow down nuclear relaxation in protein NMR. *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 4815-4818.
- [21] Takeuchi, K., Arthanari, H., Shimada, I., and Wagner, G. (2015) Nitrogen detected TROSY at high field yields high resolution and sensitivity for protein NMR. *J. Biomol. NMR* **63**, 323-331.



八木 宏昌 (やぎ・ひろまさ)

2000年 横浜国立大学大学院工学研究科博士課程後期修了 博士(工学)
 2000年 大阪大学蛋白質研究所 助手(助教)
 2008年 オーストラリア国立大学 博士研究員
 2013年 モナッシュ大学(オーストラリア) 博士研究員
 2015年 理化学研究所生命システム研究センター 研究員 現在に至る

固体交換NMRにおける偏極移動

金沢大学大学院 自然科学研究科 物質化学専攻化学コース 理論化学研究室

大橋 竜太郎

ryu@se.kanazawa-u.ac.jp

NMRは原理的には試料の状態が、気相、液相、固相、どの状態でも測定が可能な分光法である。特に固体NMRはX線結晶構造解析や溶液NMRなどでの測定が困難な、非晶質かつ難溶性の試料の解析が可能であるため、膜タンパク質、繊維状タンパク質などへの応用が期待され、構造解析手法の開発が盛んに行われてきた。既に幾つものタンパク質試料で固体NMRによる構造解析結果が報告されており^[1~6]、固体NMRによるタンパク質の構造解析法は確立されてきている。これらの構造解析では、固体交換NMRから求められた¹³C-¹³C間、¹³C-¹⁵N間などの距離情報が用いられている。本稿では、特に¹³C-¹³C間の固体交換NMRでの偏極移動について、NMRスペクトルのピーク強度の変化を中心に説明していく。

1. 用語の定義

偏極移動についての説明を行う前に、本稿でよく出る、かつ意味を混同しやすい幾つかのNMR関連の用語について、NMR分光学上での定義を再確認しておく。特に「2-4. 核A、Bのモル比が異なるときの偏極移動」や「4. 偏極移動と化学交換との違い」を考える上で、原子核や磁化についての定義が重要となる。用語の説明が不要な方は以下、2節まで読み飛ばしても2節以降を読む上で不都合はない。

【原子核 (核)】 NMRにとっての核とは、「核スピンという性質を持つもの」となる。核同士の区別は、核種、化学シフト、その核の周辺構造などによって決められる。(もし炭素原子に紐付けができたとする) 同じ炭素原子核でも化学シフトが変わるだけで別の核になったと観測される。

【核スピン (スピン)】 原子核の持つある性質。反磁性を持つ核 (¹H, ¹³Cなどよく観測される核は反磁性であることが多い) の場合は磁場中にあるときに異なるエネルギーを持つ状態に分裂する (ゼーマン分裂)。エネルギー固有値以外に位相と呼ばれる

性質を持ち、その位相がエネルギー分裂のエネルギー差に相当する周波数で振動する。エネルギー差は磁場、核種、核の化学的状态などにより決まるため、この位相の振動を観測することで核種ごとに化学的状态を観測することができる。

【上向きスピン、下向きスピン】 2つの状態にエネルギー状態が分裂するスピン ($\frac{1}{2}$ スピン) のうち、エネルギーの低い方を上向きスピン、高い方を下向きスピンと呼ぶ。

【巨視的磁化 (磁化)】 磁場、核種、化学的状态、周辺構造などがほぼ同じ状態にあるスピンの集まり。集まったスピンの持つ上向きか下向きの状態、位相に偏りがあると磁化は大きさと方向を持つ。上向き、下向き、位相が全てランダムで全く偏りのない状態 (磁化が0となる状態) を「飽和された状態」と呼ぶ。上向き、または下向きのスピンの偏りによる磁化を「縦磁化」、位相が偏りによる磁化を「横磁化」と呼ぶ。

【偏 極】 磁化が0でない状態になること、つまりスピンの持つ上向き、下向き、位相に偏りがあることを「偏極」と呼ぶ。また、その偏り度合いを「偏極率」と呼ぶ。本稿では上向きスピンの下向きスピンより多めに偏っている場合の偏極を主に扱っている。

【偏極移動】 偏極率が小さい核から大きい核へとエネルギーの移動が起こり互いの偏極率が近づき、それぞれの核の磁化の大きさが変化することを「偏極移動」と呼ぶ。また本稿では、偏極移動により変化した磁化の大きさを「偏極移動量」、短時間あたりの偏極移動量を「偏極移動速度」と呼ぶ。

2. 偏極移動の理解のための幾つかの思考実験^[7,8]

ここでは、スピン $\frac{1}{2}$ の同種核同士の上向きスピンと下向きスピンのエネルギー準位を用いて、縦磁化同士の偏極移動について考える。試料中には、存在率が1:1の原子核A (核A) と原子核B (核B) があると、幾つかの例について考えてみる。

2-1. 核Bの磁化のみを飽和させてからの偏極移動

核Aのピークだけ残して核Bのピークを打ち消し、偏極移動を1次元NMRで観測する場合を考える。パルス系列は図1(a)のように励起(初期磁化を横磁化に変えること)時間に核Aの磁化のみ残し、核Bの磁化を飽和させるパルス(選択励起パルス、幾つか方法があるが具体的な方法については説明を省く)を照射する。この実験を行うと、偏極移動を行う時間(交換時間)に対して、図2(a)のように信号が変化する。核Aの磁化が磁場中での熱平衡状態、核Bの磁化が飽和状態にあるとき、2つの磁化の状態は図2(b)のように表される。巨視的な視点で考えると、核Aはより冷たいスピン状態(冷たい、といっても試料の温度に変化はないと考えて差し支えない)にあり、核Bは熱いスピン状態(平衡状態ではないが、無理やりスピン温度を考えると無限大の温度、冷たいスピン状態と同様に試料温度への影響はないと考えて良い)である。このとき、核Aと核Bの間にエネルギー移動を起こす条件が満たされていれば(かつエネルギー移動がスピン-格子緩和より速ければ)、熱い状態の核Bから冷たい状態の核Aへのエネルギーの移動が起こ

る。微視的な視点で考えると、エネルギー移動を起こす条件とは、核A、Bの上下のスピン間のエネルギー差(図2(b)の ΔE)が等しく、核A、B間にスピンの上下を入れ替える相互作用があること、となる。これらが満たされると、核Bでは1つの下向きスピンの上向きスピンに変わることによってエネルギーを放出し、核Aでは1つの上向きスピンの下向きスピンに変わることによって ΔE のエネルギーを受け取る。2つの核の上下スピン間のエネルギー差が異なるとエネルギー保存則が成り立たずエネルギーの移動が起こらないため、エネルギー差が等しくなる必要がある。これが繰り返されると、核Aの偏極が減った分、核Bの偏極が増える、すなわち核AからBへの偏極移動が起こったことになる。

もしエネルギー移動を起こす条件を満たさない場合は、核Aは熱平衡状態のまま、核Bは分子運動や格子振動にエネルギーを放出するスピン-格子緩和のみを起こし、熱平衡状態の偏極に戻る(偏極率が熱平衡状態になるまで下向きスピンの上向きとなる)。スピン-格子緩和は熱平衡状態でなければ常に起こるため、上記のエネルギー移動がある場合でも、偏極移動とスピン-格子緩和が同時に起こ

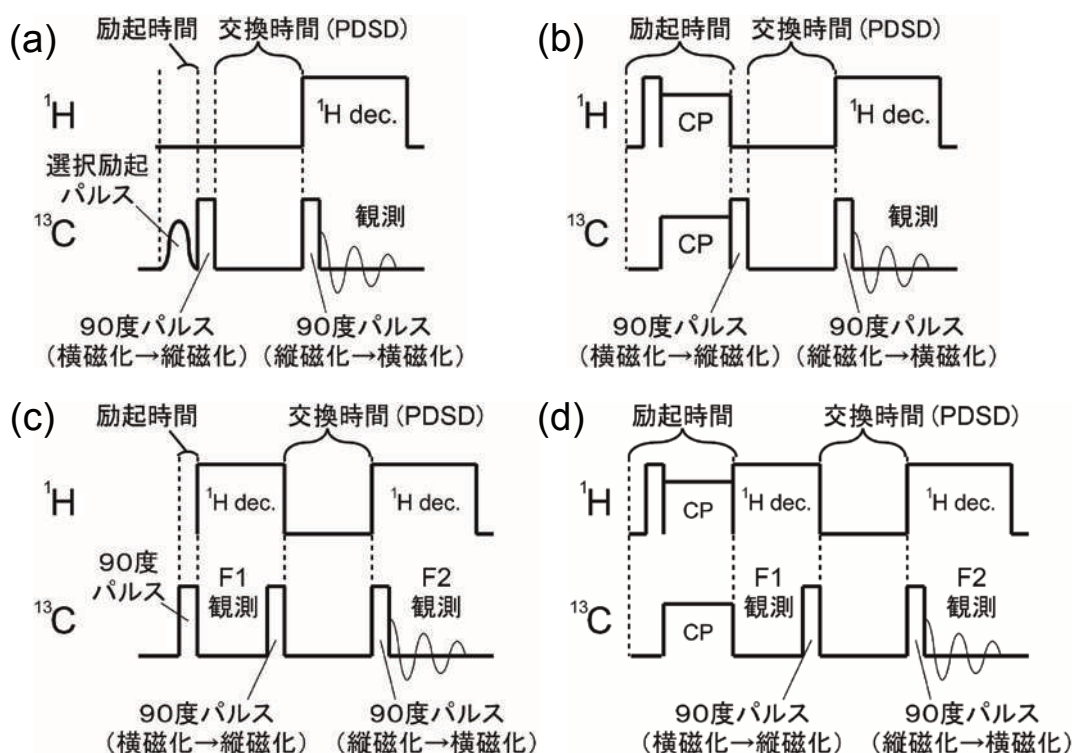


図1 ^{13}C - ^{13}C 間の偏極移動を1次元NMR [(a), (b)]と2次元NMR [(c), (d)]で測定するためのラジオ波パルス系列。初期磁化を横磁化に変える励起時間に(a)では選択励起パルス(図はガウシアンパルスの模式図だが、ピークAだけ残せば他の方法でも良い)を、(c)では90度パルスを、(b), (d)ではCP法を用いた場合を示した。また偏極移動を起こさせる交換時間には、(a)-(d)の全ての図で ^1H -drivenスピン拡散(PDS)法の場合を示したが、この交換時間に偏極移動の方法に合わせたパルスを照射する(例えばDARR法^[10]の場合は ^1H への照射を行い、 ^1H - ^{13}C 間の双極子相互作用を復活させる)。また、「3. 交換行列を用いた偏極移動の微分方程式」で示すように、90度パルスは縦磁化の方向を+Z、-Zに反転させながら測定する方が良い。

り、核A、Bの磁化の大きさの和は偏極移動前よりも熱平衡時の大きさに近づく(2-1節の場合、初めの大きさが熱平衡時の半分なので、2つの磁化の和は大きくなる)。

2-2. 熱平衡状態の磁化同士での偏極移動

次に2次元交換NMRを用いて、核A、Bがどちらも熱平衡状態にある偏極移動を考える。パルス系列は図1(c)のように励起時間に熱平衡状態の+Z方向の縦磁化をそのままの大きさで横磁化に変えるためのパルス(^{13}C の90度パルスなど)を用いた方法となる。励起された横磁化をF1観測の信号として観測後、次の2つ目の90度パルスで交互に+Z、-Z方向の縦磁化に変化させ、3つ目の90度パルスでF2観測時に+Zと-Z方向の磁化が足し合わされるように縦磁化を横磁化に変える。+Z、-Z方向と交互に反転させる理由については「3. 交換行列を用いた偏極移動の微分方程式」で述べる。2次元交換NMRでは、図1(b)のF1、F2の2つの観測により核Aから移動した偏極による磁化と、核Bから移動した偏極による磁化を区別することができる。偏極移動前の核Aの磁化を赤、核Bの磁化を青で表すと、観測されるスペクトルは図3(a)のように変化する。1次元NMRでは偏極移動前の状態(赤、

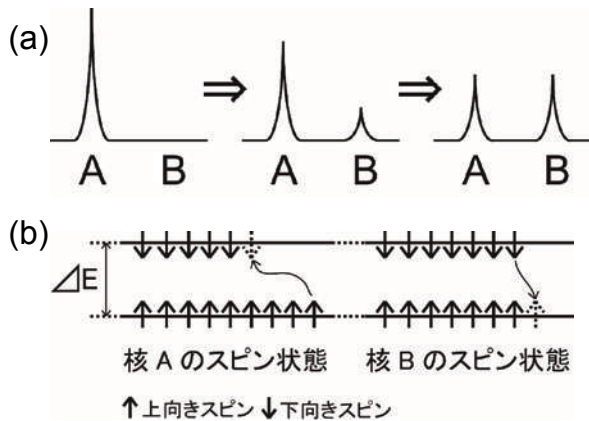


図2 (a) 核Bの磁化のみを飽和させた後、核AからBへの偏極移動を測定した場合の1次元NMRスペクトルの模式図。左から順に偏極移動前、偏極移動量が飽和時の半分のとき、ピーク強度の変化が飽和したときのスペクトルを表す。ここではスピン-格子緩和の影響を無視しているため、核A、Bのピーク強度がそれぞれ半分ずつになるまでピーク強度が変化する。(b) 熱平衡状態の核Aから飽和させた核Bへと偏極移動するときのspin状態をエネルギー準位を用いて表した模式図。 ΔE は上向きと下向きスピンのエネルギー差を表す。核AからBへの偏極移動では、核Aの上向きスピンのエネルギーを受け取って下向きスピンの状態になり、核Bの下向きスピンのエネルギーを放出して上向きスピンの状態になる。

青)を区別できないので変化が全くないかのように観測されるが、2次元NMRでは、赤、青で表された信号を分離し、図3(b)のようなスペクトルが得られる。微視的に見ると、図3(c)のように、核Bで下向きスピンの状態になり核Aで上向きスピンの状態になる核Aから核Bへの偏極移動と、核Aで下向きスピンの状態になり核Bで上向きスピンの状態になる核Bから核Aへの偏極移動が試料内の別の組の核A、B間で起こる。このため、核A、Bの磁化が交換されたように観測される。また、磁化Aと磁化Bがどちらも熱平衡であるため、核AからBへの偏極移動量と核AからBへの偏極移動量は等しくなる。

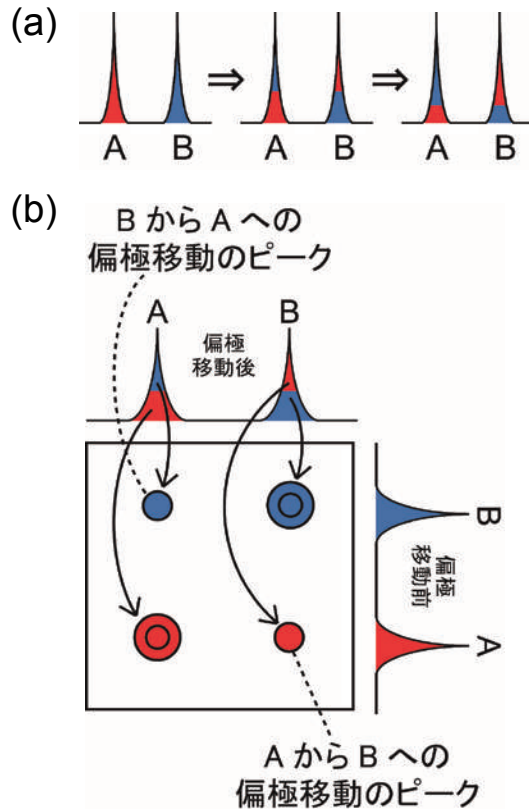


図3 (a) 核A、Bの磁化がどちらも熱平衡状態にあるときの偏極移動を1次元スペクトルで表した模式図。左から順に偏極移動前、偏極移動量が飽和時の半分のとき、ピーク強度の変化が飽和したときのスペクトルを表す。図中の赤、青の色分けは偏極移動前に核AとBだった磁化の量をそれぞれ表している。(b) 核A、Bの磁化がどちらも熱平衡状態にあるときの偏極移動を2次元スペクトルで表した模式図。左下の正方形が等高線で描いた2次元スペクトルで、2次元スペクトルの右に偏極移動前、上に偏極移動後の1次元スペクトルを置いた。1次元スペクトル上では赤、青の区別はないため、偏極移動前の状態は実際の測定では区別できないが、2次元スペクトルでは偏極移動後の赤、青の信号は、図の矢印のように分離されるため、偏極移動前後にどの状態だったかを区別できる。

2-3. 交差分極法 (CP法) を用いたときの偏極移動

ここでは核A、Bが熱平衡状態ではない場合を考える。パルス系列は図1 (b) となる。固体NMRでは、信号の増幅のために ^1H から ^{13}C への偏極移動を行う交差分極法 (CP法) を用いることが多いが、 ^1H から ^{13}C への偏極移動後は熱平衡状態とは異なるため、 ^{13}C - ^{13}C 間の偏極移動前の磁化が熱平衡ではない場合は頻繁に起こりうる。ここで核A、Bの熱平衡での磁化の大きさをどちらも100、CP法によって増幅された核A、Bの磁化の大きさをそれぞれ200、120とする。この場合、核A、B間の相互作用は同じであっても偏極率が核Aの方が大きいので、核AからBへの偏極移動量が大きく、核BからAへは小さい。もしスピン-格子緩和を無視できるぐらい偏極移動が速い場合は、磁化の大きさの総和は変わらず、核A、B共に160に向かって磁化の大きさが変化する (図4 (a))。十分に長い時間が経つと、核AからBへと核BからAへの偏極移動量はもとの磁化の大きさの比の100 : 60となる。100 : 60になると核Bの磁化160のうち100は核Aからの磁化、残りの60が核Bにそのまま残ったとされる磁化 (B \rightarrow A \rightarrow B、B \rightarrow A \rightarrow B \rightarrow A \rightarrow Bなどの移動

を経てBのままと観測される) となるので、この時点で核Bにある磁化は100 : 60の比で核Aへと移る。核Aの磁化160も同様に100が核Aに残っていた磁化、60が核Bからの偏極移動による磁化となる。このため、これ以降は常に偏極移動量が100 : 60となり、偏極移動量が変化しない。

次にスピン-格子緩和を考慮すると、十分に長い時間が経つと核A、Bの磁化の大きさは共に熱平衡状態での100となる。偏極移動の方が十分に速い場合は、まず上記のように核A、Bの磁化の大きさがどちらも160となる。このうち核Aにそのまま残っている磁化が100、核AからBへの移動した磁化が100、核BからAへ移動した磁化が60、核Bにそのまま残っている磁化が60となる。もし核A、Bでのスピン-格子緩和が異なってもそれぞれのスピンは両方の核を行ったり来たりするため、緩和は全スピンに等しく影響する。このため、磁化の大きさの比を保ったまま減衰し、偏極移動後に核Aとして観測される磁化100のうち、62.5が核Aのまま残ったと観測される磁化、37.5が核Bから移動したと観測される磁化 (BからAへの偏極移動量が37.5) となる。偏極移動後に核Bとして観測される磁化は逆に、62.5が核Aからの偏極移動量、37.5が核Bのまま残ったと観測される磁化となる。スピン-格子緩和が十分に遅い場合は核A、Bの緩和時間が異なっても初期磁化の比に比例した偏極移動量となる。逆にスピン-格子緩和が偏極移動速度に対して十分に速い場合は、まず核A、Bの磁化の大きさがどちらも100となり、その後偏極移動が起こることになる。このため、偏極移動量は核AからB、核BからAともに50となる。

実際の測定では偏極移動量は前者と後者の間となる。偏極移動開始から十分に長い時間が経つと核AからBへの偏極移動量は50と62.5の間となり、核BからAへの偏極移動量は37.5と50の間となる。スピン $\frac{1}{2}$ の固体での交換NMRの場合、双極子相互作用が偏極移動を起こす相互作用となることが多いため、核A、B間の距離が短くスピン-格子緩和に対して偏極移動が十分に速い場合はスピン-格子緩和が十分に長い場合と近似でき、2次元交換NMRで観測される偏極移動量 (2次元スペクトルの交差ピークの大きさ) は1度増えてから減衰していく。また核A、B間の距離が長ければ長いほどスピン-格子緩和が十分に短い場合に近づき、偏極移動量が1度上がってから下がるような変化は観測されなくなる。

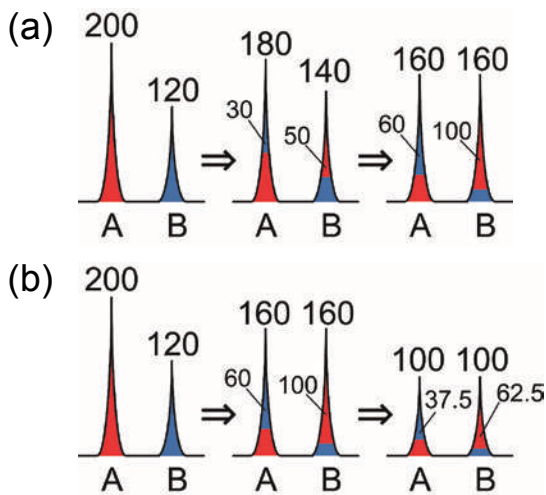


図4 (a) 交差分極 (CP) 法により核A、Bのピーク強度が200、120 (熱平衡時のピーク強度をどちらも100とする) となった後の偏極移動を1次元スペクトルで表した模式図。左から順に偏極移動前、偏極移動量が飽和時の半分のとき、ピーク強度の変化が飽和したときのスペクトルを表す。図中の赤、青の色分けは偏極移動前に核AとBだった磁化の量をそれぞれ表している。図のように偏極移動前に核Aだった磁化からの偏極移動量 (赤) と核Bだった磁化からの偏極移動量 (青) が元のピーク強度の5 : 3を保ちながらピーク強度が変化する。(b) 図4 (a) の偏極移動後、熱平衡のピーク強度に戻るときの1次元スペクトルの模式図。左から順に偏極移動前、偏極移動の飽和後、熱平衡時の磁化に戻ったときのスペクトルを表す。

2-4. 核A、Bのモル比が異なるときの偏極移動

最後に核A、Bのモル比が2:1である場合について考える。熱平衡での核A、Bの磁化の大きさを200と100とする。パルス系列は熱平衡状態の磁化を励起するため、2-2節と同様に図1(c)のパルス系列で測定する。熱平衡状態の磁化の交換NMRを観測した場合、核A、Bの磁化の大きさは200と100のままである。また、偏極移動前は核Aだった磁化と核Bだった磁化が偏極移動前と同じ大きさになるように配分すると、十分に長い偏極移動時間後は、核Aの200の磁化のうち67が核Bからの偏極移動した磁化、残り133が核Aのまま残っている磁化と観測される。また核Bの100の磁化のうち、67が核Aから偏極移動した磁化、33が核Bのまま残っている磁化と観測される(図5右側)。このように元の磁化の大きさが2倍異なるにも関わらず核AからBへと核BからAへの偏極移動量は等しくなる。これはモル比が大きい核Aの方が移動してくる偏極を受け取るスピンの数も多く、その分だけ核BからAへの偏極移動が起こりやすいためである。上記に挙げたように2つの原子核のモル比が等しくCP法などにより偏極率が異なる場合は核AからBへと核BからAへの偏極移動量が異なるが、最後の例のように偏極率が等しい場合はモル比に関わらず2つの偏極移動量は等しくなる。

3. 交換行列を用いた偏極移動の微分方程式^[7,8]

ここで偏極移動の変化を表す数式を考える。これまで考察してきたように、ある時刻での偏極移動量(磁化の大きさの時間に対する変化量)は、その時刻での移動元の磁化の大きさと移動先の原子核のモル比(磁化の大きさの比ではない)に比例する。ある時刻 t と微小時間後の $t+dt$ との間の偏極移動量は、時刻 t での核A、Bの磁化の大きさ $M_A(t)$ 、 $M_B(t)$ 、核A、Bのモル比 χ_A 、 χ_B 、偏極移動速度(単位時間、モル比1、磁化の大きさ1当たりの偏極移動量) k を用いると、核AからBへの偏極移動量が $\chi_B k M_A(t) dt$ 、核BからAへの偏極移動量が $\chi_A k M_B(t) dt$ となる。また、核A、Bのスピン-格子緩和時間を T_{1A} 、 T_{1B} とすると緩和による $M_A(t)$ 、 $M_B(t)$ の変化量はそれぞれ $-\frac{1}{T_{1A}} [M_A(t) - M_A(\infty)] dt$ 、 $-\frac{1}{T_{1B}} [M_B(t) - M_B(\infty)] dt$ となる。ここで $M_A(\infty)$ 、 $M_B(\infty)$ はそれぞれ核A、Bの熱平衡状態での磁化の大きさを表す。以上より、時刻 t から $t+dt$ の間での磁化の大きさの変化は、

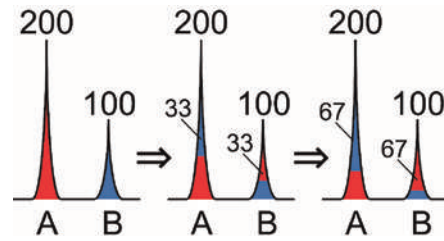


図5 核A、Bのモル比が2:1、熱平衡時のピーク強度をそれぞれ200と100とし偏極移動させたときの1次元スペクトルの模式図。左から順に偏極移動前、偏極移動量が飽和時の半分するとき、ピーク強度の変化が飽和したときのスペクトルを表す。図中の赤、青の色分けは偏極移動前に核AとBだった磁化の量をそれぞれ表している。偏極移動量は初期磁化の大きさと移動先の核のモル比を掛けた値に比例するので、核AからBへと核BからAへの偏極移動量は互いに等しくなる。

$$dM_A(t) = -\chi_B k M_A(t) dt + \chi_A k M_B(t) dt$$

$$-\frac{1}{T_{1A}} [M_A(t) - M_A(\infty)] dt,$$

$$dM_B(t) = \chi_B k M_A(t) dt - \chi_A k M_B(t) dt$$

$$-\frac{1}{T_{1B}} [M_B(t) - M_B(\infty)] dt$$

となる。 $M_A(\infty)$ 、 $M_B(\infty)$ を考えるのは面倒であるため、測定のとときに磁化を奇数回目は $+Z$ 方向、偶数回目は $-Z$ 方向に向けて積算する手法を用いて $M_A(\infty)$ 、 $M_B(\infty)$ を打ち消すと $M_A(t)$ 、 $M_B(t)$ の変化は、

$$dM_A(t) = -\chi_B k M_A(t) dt + \chi_A k M_B(t) dt$$

$$-\frac{1}{T_{1A}} M_A(t) dt,$$

$$dM_B(t) = \chi_B k M_A(t) dt - \chi_A k M_B(t) dt$$

$$-\frac{1}{T_{1B}} M_B(t) dt$$

この2式を行列を用いて表すと、

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} M_A(t) \\ M_B(t) \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} -\chi_B k - \frac{1}{T_{1A}} & \chi_A k \\ \chi_B k & -\chi_A k - \frac{1}{T_{1B}} \end{pmatrix} \begin{bmatrix} M_A(t) \\ M_B(t) \end{bmatrix} \quad (1)$$

ここで核A、Bの磁化の大きさをまとめたベクトル $\mathbf{M}(t)$ 、交換行列 \mathbf{L} を

$$\mathbf{M}(t) = \begin{bmatrix} M_A(t) \\ M_B(t) \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{L} = \begin{pmatrix} -\chi_B k - \frac{1}{T_{1A}} & \chi_A k \\ \chi_B k & -\chi_A k - \frac{1}{T_{1B}} \end{pmatrix}$$

とすると、上の微分方程式の解は初期磁化のベクトル $\mathbf{M}(0)$ を用いて

$$\mathbf{M}(t) = \exp(\mathbf{L}t) \mathbf{M}(0) \quad (2)$$

と表される。

4. 偏極移動と化学交換との違い^[7,8]

交換NMRは、それぞれの核スピン状態の偏極のみが移動する偏極移動だけではなく化学交換も観測できる。実際、文献7は化学交換に関する文献であり、偏極移動とは異なる点もあることを意識しておく必要がある。化学交換の場合、2つの核Aと核Bが入れ替わると、核AからBへの磁化移動と、核BからAへの磁化移動が同時に起こる(図6(a))。このため、2つの磁化移動量は常に一致する。偏極移動の場合、核AからBへの偏極移動は核Aで上向きスピンの下向きに、核Bで下向きスピンの上向きになる移動である(図6(b))。NMRでは上向きスピンか下向きスピンのどちらかしか観測しない。ここでは上向きスピンを観測することになると、この偏極移動では核Aの磁化が減り、核Bの磁化が増えたように観測され、逆の変化は観測されない。つまり、この2つのスピン間では、核AからBへの偏極移動のみが観測され、核BからAへの偏極移動は観測されないことになる。試料内には数多くの上向き、下向きスピンの間では核BからAへの偏極移動が起こっている。し

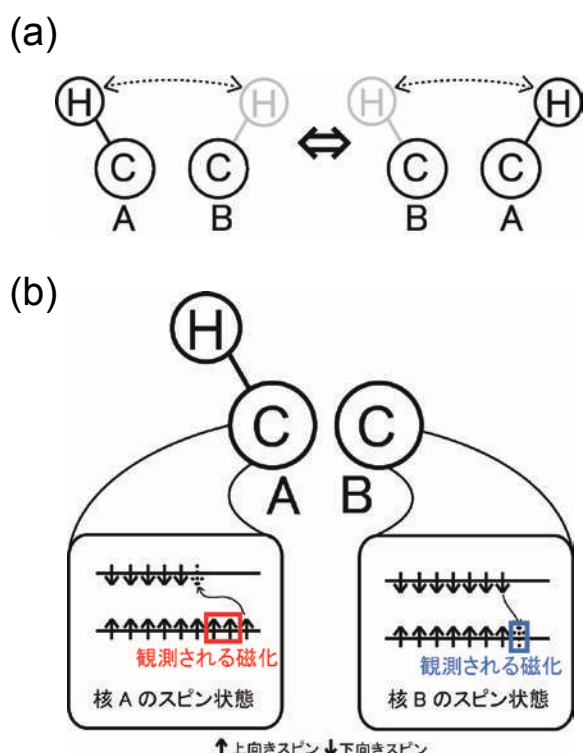


図6 (a) 化学交換の模式図。丸の中のC, Hは炭素原子、水素原子を示す。ここでは水素の付いた炭素を核A、付いていない炭素を核Bとした。この化学交換では水素原子が動くと、核AとBが入れ替わる。つまり、核AからBへの移動とBからAへの移動が同じ原子核同士で同時に起こる。(b) 偏極移動の模式図。上向きスピンのみが観測されるため、(b)の場合では核AからBへの偏極移動のみが観測される。

かし、核AからB、核BからAへの偏極移動が別々の現象であるため、上節で挙げたように偏極移動前の偏極率が異なれば、核AからBへと核BからAへの偏極移動量は異なる。

5. 炭素間の距離と偏極移動速度の関係^[9]

式(2)を用いれば、交換NMRでのピーク強度の変化を求めることが出来る。これらの式の中の変数のうち、初期磁化の大きさ $M_A(0)$ 、 $M_B(0)$ とスピン-格子緩和時間 T_{1A} 、 T_{1B} は、個別の測定によって求めることが出来る値である。スピン-格子緩和時間は炭素間の偏極移動があると短い方に近づくので、偏極移動のない状態(^{13}C 測定の場合、 ^1H decoupling下、または天然存在比の試料でのスピン-格子緩和時間測定)で測定する必要がある。あとは偏極移動速度を炭素間の距離から求めることが出来れば、式(2)により実測のピーク強度(=磁化の大きさ)を再現できる。ここでは式(2)を用いるため、偏極移動速度 k は時間依存しない、つまり時間平均をとった偏極移動速度を考える。また、 ^1H - ^{13}C 間の双極子相互作用の時間平均が0となる場合を考える。例えば ^1H -drivenスピン拡散法の場合、 ^{13}C と結合した ^1H スピンの ^1H - ^1H 間の双極子相互作用によってマジック角試料回転と近い周期でスピンの上下交換(フリッパーフロップ)を起こしていると、 ^1H - ^{13}C 間の双極子相互作用の時間平均が0とならないが、フリッパーフロップが試料回転より十分に速いか、あるいは遅い場合には時間平均は0となる。この場合、 ^{13}C - ^{13}C 間を結ぶ直線と試料回転軸との角度を β とすると、文献9より偏極移動速度 k は

$$k = d_0 \sum_{m_A = \pm 1, \pm 2} \frac{1}{m_A} \sin^{2m_A} \frac{2\beta}{m_A} \cdot \frac{T_R}{l_{A, m_A} \{1 + [2\pi(m_A \nu_R + \Delta)T_R]^2\}} + d_0 \sum_{m_B = \pm 1, \pm 2} \frac{1}{m_B} \sin^{2m_B} \frac{2\beta}{m_B} \cdot \frac{T_R}{l_{B, m_B} \{1 + [2\pi(m_B \nu_R + \Delta)T_R]^2\}} \quad (3)$$

ここで、 d_0 は ^{13}C - ^{13}C 間の双極子相互作用定数で、2つの ^{13}C 間の距離 r 、 ^{13}C の磁気回転比 γ 、真空の透磁率 μ_0 を用いて、

$$d_0 = \frac{\mu_0 \gamma^2 \hbar}{r^3}$$

と書ける。また、 ν_R はマジック角試料回転の回転周波数、 Δ は2つの ^{13}C のピークの周波数差、 l_{Am} 、 l_{Bm}

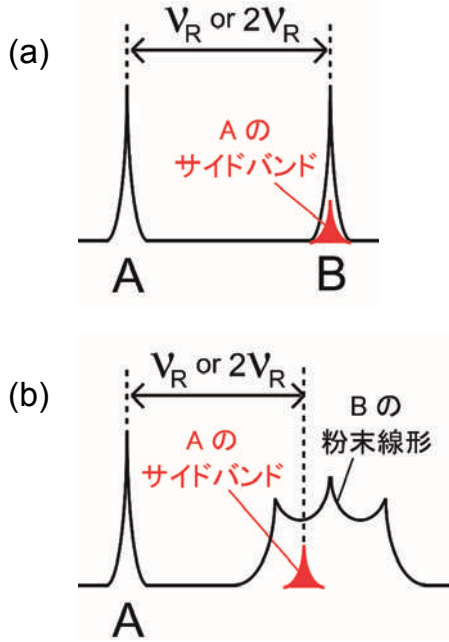


図7 (a) ^{13}C のピークがブロードニングされていない場合の、偏極移動が起こる条件にあるスペクトル。片方のピークのサイドバンド(図中の赤いピークはピークAのサイドバンド)がもう片方のピーク(図ではピークB)と重なると偏極移動が起こる。(b) ^{13}C のピークがブロードニングされている場合の、偏極移動が起こる条件にあるスペクトル。片方のピークのサイドバンド(図中の赤いピークはピークAのサイドバンド)がもう片方のピークBの粉末線形のピークと重なると偏極移動が起こる。

は偏極移動時の線形の核A、Bのm番目のスピニングサイドバンドの強度を表す。式(3)の分母について考えると、図7(a)のように片方のピークともう片方のサイドバンドとが重なったときにkが最も大きくなる。 ^1H - ^{13}C 間の双極子相互作用の時間平均を復活させる手法(DARR法^[10]など)を用いる場合は、 Δ は化学シフト等方値と ^1H - ^{13}C 間双極子相互作用の両方による周波数差となる。 ^1H - ^{13}C 間双極子相互作用の大きさが粉末中の粒子の向きによって広がりを持つ(粉末線形となる)ため、化学シフト等方値の差が試料回転周波数とずれていても、図7(b)のようにピーク同士が重なり、kが大きくなる場合が増える。式(3)の T_R はゼロ量子状態を保持えられる時間、ゼロ量子緩和時間を表す。ここで考えている偏極移動は、2つの核A、Bのスピニングが、どちらかが上向き、もう片方が下向きの状態(ゼロ量子状態)で起こる。 T_R が短いと、偏極移動できる状態にある時間が短くなり、偏極移動速度は小さくなる。 T_R はゼロ量子状態での変数であるが、ゼロ量子状態を直接観測することはできないため、偏極移動中と同じ実験条件下(外部磁場強度、試料回転や ^1H 、 ^{13}C へのラジオ波照射など)で観測された単量

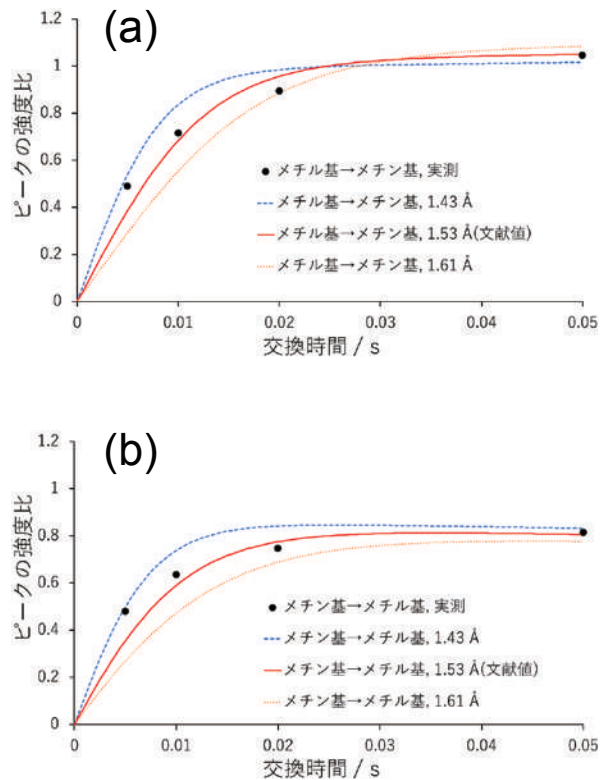


図8 メチン基とメチル基を ^{13}C ラベルしたl-alanineの2次元交換NMRによる非対角ピーク強度の交換時間に対する変化。(a)はメチル基からメチン基への偏極移動を示す非対角ピークをメチル基の対角ピークで割った強度比、(b)はメチン基からメチル基への偏極移動を示す非対角ピークをメチン基の対角ピークで割った強度比を表す。●が実測のピーク強度比、曲線が距離を変えたときの計算によるピーク強度比を表す。距離の上限(1.61 Å)は0.005, 0.01, 0.02sの3点とも計算が実測を下回る距離、下限(1.43 Å)はその3点とも計算が実測を上回る点とした。

子遷移の変数から求める。 T_R については、単量子遷移での核A、Bのスピニング緩和時間を T_{2A} 、 T_{2B} とすると

$$T_R = \frac{1}{T_{2A}} + \frac{1}{T_{2B}}$$

の近似式から求めることができる。以上のように変数を代入して、kの粉末積分を行った後、式(2)に代入することで交換NMRにおけるピーク強度の交換時間に対する変化を求めることができる。

6. 実測との比較

実測との比較として、メチン基、メチル基を ^{13}C ラベルしたl-alanineでのDARR法^[10]による2次元交換NMRでの結果を示す。図1(d)の交換時間に ^1H に対して ^{13}C の双極子相互作用を復活させるパルス照射を行うパルス系列を用いた。分子間の影響をさけるためにラベル試料を天然存在比試料で10%に薄めてある。またラベルされた分子内で

はラベル率98%以上であるため、ラベル分子中でメチン基、メチル基ともにラベルされる確率を0.96 (0.98×0.98) としてピーク強度を計算した。図8に、2次元スペクトルの非対角ピークをF1側(偏極移動前)のスペクトルで同じピーク位置となる対角ピーク(図3(b)参照)で規格化したピーク強度の交換時間に対する変化(●)と、2つの炭素間の距離を変えて計算した結果を示す。計算による曲線が飽和する前の実測(交換時間0.005, 0.01, 0.02sの3点)よりも大きくなったときを距離の下限、小さくなったときを距離の上限とすると、文献値1.53Åに対し^[11]、1.43~1.61Åの範囲で距離を求めることが出来た。

本稿では、前半の偏極移動の概念的な説明が長くなったが、後半で示した式(2)と(3)を用いれば、2スピンのみ¹³Cラベルした試料であれば、炭素間距離の解析を行える。3つ以上の炭素をラベルした試料については、例えば天然存在比の試料を動的核偏極などの信号増幅法を用いて測定すれば、いろいろな組み合わせの2炭素をラベルした試料の和として観測されるため、同様の解析が可能となると考えられる。

引用文献

- [1] Castellani F, Rossum B. v., Diehl A., Schubert M., Rehbein K., and Oschkinat H. (2002) Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Nature* **420**, 98-102.
- [2] Zech S. G., Wand A. J., and McDermott A. E. (2005) Protein Structure Determination by High-Resolution Solid-State NMR Spectroscopy: Application to Microcrystalline Ubiquitin. *J. AM. CHEM. SOC.* **127**, 8618-8626.
- [3] Schmidt H. L. F., Sperling L. J., Gao Y. G., Wylie B. J., Boettcher J. M., Wilson S. R., and Rienstra C. M. (2007) *J. Phys. Chem. B* **111**, 14362-14369.
- [4] Egawa A., Fujiwara T., Mizoguchi T., Kakitani Y., Koyama Y., and Akutsu H. (2007) Structure of the light-harvesting bacteriochlorophyll c assembly in chlorosomes from *Chlorobium limicola* determined by solid-state NMR. *PNAS* **104**, 790-795.
- [5] Shahid S. A., Bardiaux B., Franks W. T., Krabben L., Habeck M., Rossum B.-J. v., and Linke D. (2012) Membrane-protein structure determination by solid-state NMRNMRNMR spectroscopy of microcrystals. *Nature Methods* **9**, 1212-1217.
- [6] 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 NMRNMRNMR spectroscopy structure determination of a lipid-embedded heptahelical membrane protein. *Nature Methods* **10**, 1007-1012.
- [7] Jeener J., Meier B. H., Bachmann P., and Ernst R. R. (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **71**, 4546-4553.
- [8] Ohashi R. and Takegoshi K. (2006) Asymmetric ¹³C-¹³C polarization transfer under dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *J. Chem. Phys.* **125**, 214503.
- [9] Kubo A. and McDowell C. A., (1988) Spectral Spin Diffusion in Polycrystalline Solids under Magic-angle Spinning. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **84**, 3713-3730.
- [10] Takegoshi K., Nakamura S. and Terao T., (2003) ¹³C-¹H dipolar-driven ¹³C-¹³C recoupling without ¹³C rf irradiation in nuclear magnetic resonance of rotating solids. *J. Chem. Phys.*, **118**, 2325-2341.
- [11] Harry J. Simpson H. J., Jr. AND Marsh R. E. (1965) The Crystal Structure of L-Alanine. *Acta Cryst.* **20**, 550-555.



大橋 竜太郎 (おおはし・りゅうたろう)

平成21年4月1日～ 金沢大学理工研究域物質化学系 助教、現在 在職中

平成20年4月1日～平成21年3月31日 (独) 物質材料研究機構ナノ計測センター
NIMS ポストドク研究員

平成19年4月25日～平成20年3月24日 アメリカ合衆国ミズーリ州セントルイス市

私立ワシントン大学文理学部化学科 ポストドク研究員

平成19年2月1日～平成19年3月31日 京都大学大学院理学研究科 研究員(科学技術振興)

平成15年4月1日～平成19年1月23日 京都大学大学院理学研究科化学専攻 博士後期課程

平成13年4月1日～平成15年3月24日 京都大学大学院理学研究科化学専攻 修士課程

平成 7年4月1日～平成13年3月31日 京都大学理学部理学科

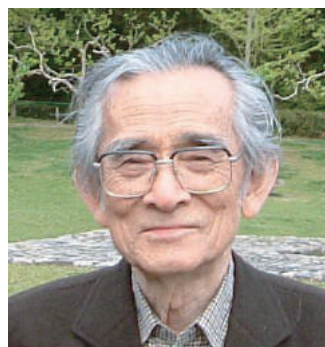
わが国のNMR事始め

京都大学

寺尾 武彦

terao@beige.plala.or.jp

今回は、日本で初めてNMRの実験を行なわれた故伊藤順吉大阪大学名誉教授が日本物理学会の会誌に書かれた記事「磁気共鳴の夜明け」^[1]に基づいて、当時の話を紹介する。同学会の許可を得て、その抜粋を以下に転載し、最後に捕捉を加えたい。なお、〔 〕で囲んだ注釈は筆者が付け加えたものである。



伊藤順吉 (1914 ~ 2009)

写真提供：大阪大学

日本物理学会が発足してから今年〔1996年〕で50年になる。これを記念して、この50年間の我が国の物理学の進歩を、いろいろな分野でまとめた記述が会誌を飾っているが、私は50年前の前後それぞれ数年間にまたがる我が国の磁気共鳴誕生の歴史を、当時の我が国のおかれた情況に触れながら記述した。戦争を挟む前後の時代を体験した一人の昔の話としてお読みいただきたい。

〔中略〕大阪帝国大学はこの間の1933年に理学部が開設され、第一回生として私も入学した〔伊藤の経歴については付記1を参照〕。1934年には理学部の建築が完成したが、当時としては世界に通用する60万ボルトの加速器が作られ、当時たしか31歳であった菊地正士先生を中心に、中性子の研究が勢力的に行われた。さらに、先生はサイクロトロンサイクロトロンの有用性に着目され、その設置を熱望された。大阪の財界人の一人がオーナーである財団からの、今の価値で約3億円に相当する寄付を得て、1936年にサイクロトロンサイクロトロンの建設が始まり、ちょうど卒業した私が菊地先生の指揮の下で、それに従事した。しばらくして、後に大阪市立大学学長になられた渡瀬譲さんと原子核研究所で活躍された山口省太郎さんが加わり、三人で建設に従事した（菊地、渡瀬、山口三氏ともすでに故人となられた）。〔中略〕われわれの当面の研究目標は、人工放射性元素の β 線および γ 線の研究であり、その精密測定のために、当時としては世界有数の180°収斂の β 線スペクトロメーターを作り、正確なエネルギー分布を求めるこ

とに努力した。

Berkeleyに遅れることはほぼ4年で、われわれの実験結果が出だしたのは1938年からであった。〔中略〕

さて、原子核の構造を論ずる時には、その核のスピン、磁気能率は重要な指標となる。スピンは超微細構造の線の数から求められるが、Rabiは磁気能率の精密測定精密測定の殆ど唯一の方法として、分子線による磁気共鳴を開発したのであり、最初の研究は塩化リチウム分子中のリチウム7の核磁気共鳴による磁気能率の測定であった。この方法はサイクロトロンサイクロトロンで生産される人工放射性核についても適用できる可能性があると思われるので、われわれにとって関心の的であった。〔中略〕この時点で、菊地研究室でも、将来は放射性核についての実験に進むことを期待しつつ、分子線磁気共鳴の装置の建設に取り掛かった。〔中略〕菊地研究室の場合も、幾多の困難に遭遇した。まず、分子線を曲げるための勾配のある磁石の場合には、長さが数十cmで複雑な形をした磁極を、1mmほどの間隔で精密に仕上げるのが要求されたが、これは当時大砲の砲身の内孔を加工している軍需工場に頼み込んで製作してもらった。その他幾多の困難なところがあったけれども、これを担当された渡瀬さんが次々に解決し、完成に近づいていった。しかし、最後の段階で、表面イオン効果を用いる検出器に使うタングス

テンの細線が、線引きの時の潤滑材の影響のためか、不純物を含み、微弱な分子線の検出には不適當であることが分かった。しかし、戦時態勢に切り替わったその時代に、特別に不純物のないように線引きを依頼することは不可能であった。そうこうするうちに、1941年12月には太平洋戦争が開始され、その後半年ほどで要員の減少、物資の欠乏などが始まり、分子線磁気共鳴、加速器類の運転など、中止せざるを得ない情況となった。これが菊地研究室における分子線磁気共鳴研究の顛末である*。

1943年になると、菊地先生の海軍技術研究所への出向に伴って、渡瀬さんは静岡県島田の大電力マグネトロンの研究所へ、私と山口さんとはマイクロ波のレーダーの製作のために、東京の海軍技術研究所分室へ、いずれも出向した〔海軍技術研究所における電波兵器開発については付記2を参照〕。これが私とマイクロ波との初めての遭遇である。このレーダーの受信部については、東大の霜田光一さんが大変貢献されたと聞いている。島田には理論の先生方も来られて、マイクロ波関係の研究をされていた。小谷正雄先生のマグネトロンの発振機構に関する理論、朝永振一郎先生の量子力学のSマトリックスと類似の方法での立体回路の理論などの解説を聞く機会もあった。われわれは立体回路と全体の構成を担当したが、与えられた最終目標はこのレーダーで敵の軍艦を的確に捕え、これによって大砲の照準を定めて、闇夜でも砲撃が可能な装置の開発であった。米軍はすでにこのような装置を開発しており、南方海域の夜の戦闘において、こちらが敵艦を発見する以前に砲撃を受けたと聞いた。装置の開発が得意であった山口さんのアイデアで、1944年になって、ほぼこの要求を満たす装置に見通しがつき基礎実験を行っていた。海軍の専門家が兵器化を検討していたが、何分波長が10cmであるので、立体回路が大きいものになり、これをまとめて兵器として設計することは容易なことではない。一方、1944年の夏すぎになって、かりに兵器化ができて、これを積む軍艦の数が少なくなり、これらの兵器を用いる可能性のある海戦は期待できなくなった。これらの理由で、これ以上の研究は中止することになった。折から、Saipanが陥落し、そこから直接本土を爆撃機で空襲できるようになり、晩秋に第一回の東京空襲が行われたが、これを体験した後、大阪に帰ったのが、終戦の9箇月ほど前であった。東京滞在中も、大阪に帰ったときにも研究ができるように、ある程度の装置を大学にも整備

していたし、引き上げるときに、マグネトロンなどを幾つか持ち帰った。1945年になると東京は3月から、関西も5月から、夜間の空襲が度々行われ、東京も大阪も次第に焦土と化していった。大阪大学は、木造の仮教室など以外は焼け残ったが、西側一帯は焼け野原となった。そして8月15日の終戦を迎えたのである。

終戦になり、留守をしていた人々も徐々に復帰したが、身内の人に戦争犠牲者のあるもの、戦災で家を失ったものなども多く、また、研究に必要な物資は勿論のこと、明日の食糧にもこと欠く生活のもとで、組織的に実験を開始できる環境ではなかった。サイクロトロンなども、いまさら数年前の状態を再現するのみというのも気がすすまなかったし、なによりも、戦争に負けた心身ともにどん底の状態の無気力さのうちに、日をすごしていた。12月になって、理化学研究所を始め、日本中の総てのサイクロトロンが米軍によって破壊され、阪大のものは大阪湾に投棄された。同時に、私が研究に使っていたβ線スペクトロメーターも、単にそれがサイクロトロンの磁石をずっと小形にしたような形をしているという理由で投棄され、大学卒業後の総ての努力の結集は完全にゼロとなった。その他にもいろいろあったけれども、結局これが私の原子核物理学の研究との決別となった。

ここで、科学研究の鎖国について触れておく。太平洋戦争開始の約半年前の夏ころから、今でいう経済封鎖が行われ、以後、42～45の4年間は戦争で、さらに終戦後も連合軍総司令部(GHQ)の管理下にあった46～48年までの6年半の間、外国文献は一切入らず、学問的な鎖国状態が続いた。私のように、サイクロトロンについては、Lawrenceの一、二の論文と、仁科先生の所から戴いたBerkeleyの最初の小さいサイクロトロンの設計のブループリントを頼りに製作し、その後の実験も先陣を務めているBerkeleyを手本にし、ただ、β線スペクトルを精密に測定することに努めていたので、戦時研究から解放された段階での、6年半に互る鎖国状態は、羽根をもちがれた鳥にも等しい状態と言えた。勿論、このような状態を自分独自の考えを深めるいい機会として、着実な発展を遂げられた方も多くおられたのであるが。

このような状況にあったある時、多分1946年始めの頃であったと記憶しているが、渡瀬さんとの会話の時に、どちらからか、Rabiが分子線で行った磁気共鳴が固体でできないであろうかという話に

なった。渡瀬さんは勿論、私も波長10cmのマイクロ波を用いたときの電子磁気共鳴の共鳴磁場は約1,000 Gaussであることはよく知っていた。詳しい検討はしなかったが、電子スピンの最も多くあって並んでいるのは強磁性体であるから、何らかのレスポンスが得られるであろう、一度やってみようということになった。手元にマイクロ波の装置のあるのは私であったので、私がレイアウトを考え、東北大学出身の渡瀬さんが強磁性の材料を手に入れることになった。渡瀬さんは二、三の方にこの話をされたが、そんなことができますかね、という物理的意義があるのですか、というようなことであったと聞いた。試料はずっと後になって、東北大学のどなたからか、超パーマロイの板などをいただいた。しかし、結局、この実験は行わなかった。多分、他に雑用が生じてそれにかまけてしまったからであったろう。空洞共振器のQの測定なども行っていたから、外国でこの種の実験が行われた頃に、われわれの技術でも何らかの結果が得られていたであろう。もっとも、強磁性共鳴〔付記3参照〕の結果の解析は簡単ではなかったであろうが。結局は、磁気共鳴の物理的意義をよく検討し、その重要性を認識していなかったことが、敗戦の沈滞状態のもとでも敢えて実験を行う気力を起こし得なかった原因であったろう。

1948年1月になって、GHQはまず東京に、続いて地方都市にアメリカ文化センターを設置し、各種の書籍や資料と共に、学術文献をも閲覧できるようになった。これと相前後して大阪大学（他大学も同様であったろう）に学術雑誌が寄贈された。それでわれわれは6年半ぶりにバックナンバーも含め *Phys. Rev.* などに接することができるようになった。しかし、帯出禁止であり、今のようなコピー機もないので、必要なものは手書きで写した。そして、1946年にわれわれも行おうとした強磁性共鳴も、ESRもNMRも行われていることを初めて知った。〔中略〕

このころは原子核実験は、GHQから禁止命令が出ていたばかりでなく、到底できる状況でなかったため、マイクロ波の装置を動かしていた研究室の若い人々と、FMRとESRを開始した。私自身はNMRの方により興味を持ったが、これを始める余裕はなかった。そのころに、神戸大学工学部教授の神田貞之助さんが、新制大学に切り替わる時に新設される理学部に移られることが内定していた。その神田さんと共同で、新しいNMRを始めようという話がまとまった。そこへ1946年4月に入学した

終戦後の第一回の学生が3年になり、この中2名が卒業研究としてわれわれに加わるようになった。名古屋大学を定年退官した益田義賀さんと新日鉄東京研究所を経て豊橋科学技術大学を定年退官した草鹿履一郎さんである。この4人で、菊地研究室に転がっている鉄材で磁石を作り、これにコイルを手巻きすることから始めて実験を開始した。回路は神田さんが専門であったので、専らその指導によった。FMRとNMRで研究結果が出始めて、学会に報告したのは1949年の10月の年会であった。そのときFMRは後に日本無線に就職した秋岡哲夫さんと、NMRは上記の人々との共同研究であった。翌1950年になると、後にカナダの大学の教授になった藤本稔さんが加わって、ESRの研究結果が出始めたが、このころになると、東北大学科学計測研究所の岡村俊彦氏、東京大学理工学研究所の熊谷寛夫氏のグループの研究が発表され始めた。岡村氏の方は、もっぱら東北大学の磁気の研究をバックにしてFMR、熊谷氏のほうは専らESRであった。岡村氏は割合に早く故人となられた。熊谷氏自身は間もなく原子核の研究に戻られ、今は故人となられたが、ESRは阿部英太郎さんに引き継がれた。私が上記の共同研究者との共著で成果を学会誌に発表したのは1951年のことであった。磁気共鳴の原理はRabiの研究で周知のことであり、また、マイクロ波は、世界中を通じて、戦前は市販の発信管一つなく、すべて戦時中のレーダーの製作に伴って発達したものであり、戦争中にこれに関係した物理学者の数はアメリカに比しては少ないとはいえ、日本でもかなりの数に上っていた。勿論、戦災を受けた敗戦国と戦勝国とでは条件は大いに異なるとはいえ、この方面の新しい研究が鎖国の間に芽生えなかったのは、やはりわれわれが模倣の科学の域を越えられなかったことを現しているのであろうか。

ここで初期の我が国の核磁気共鳴の実験的研究の進歩に貢献した一、二を述べておく。1953年の日本における初めての国際学会に出席した、NMRの創始者の一人ともいい得るBloembergenは、訪問した各大学において、また大阪大学で開かれたシンポジウムの講演などで、NMRが物性の研究に役立つことを示し、我が国のNMRの研究者に多大の影響を与えた。また、1954年の久保亮五、富田和久の論文は磁気共鳴のすぐれた一般理論であるが、色々な問題について直接教示を受け得たので、われわれ実験をしている者は大きい寄与を受けた（両氏とも故人となられた）。この二つを特に

挙げておきたいと思う。それから後の国の内外の磁気共鳴の進歩については、この稿の意図の外であるので、ここには述べない。〔後略〕

* Rabiは戦後の我が国の教育改革の顧問団の一員として1948年12月に来日し、その機会に東京と京都で講演を行った。私は京都のを聞いたが、内容は水素の超微細構造の精密測定であった。研究の物理的意義、実験の詳細、その的確な解釈など、Rabiに敬服していた私は深い感銘を受けた。また、1957年にColumbia大学のKuschの研究室を見学したが、かれの秘蔵の分子線の装置が奇麗に磨きあげられており、それを示しながら電子の磁気能率の測定の話などをしてくれた。昔の菊地研究室の装置などを思い出して感慨無量であった。

この記事は、伊藤順吉が原子核物理学者として出発し、軍事研究を経て、戦後の混乱の中、磁気共鳴の研究を始めるまでの様子を生々しく伝える貴重な資料である。分子線磁気共鳴^[2]は別として、凝縮系の磁気共鳴は、ESR^[3]が戦中(1945年)、NMR^[4,5]およびFMR^[6]は終戦直後(1946年)に、いずれも何らかの意味で戦争と関わり合いを持って開発された。NMRは、BlochもPurcellも軍事研究のなかでヒントを得て、終戦とともに意気軒高に開発に打ち込んだ。伊藤は、せっかくFMRのアイデアを得ながら実験に着手しなかったのは、“その重要性を認識していなかった”ため、“敗戦の沈滞状態のもとでも敢えて実験を行う気力を起こし得なかった”のが原因だろうと謙虚に述べているが、研究に必要な物資はもちろん、明日の食糧にもこと欠いて打ちひしがれた状態では、たとえその重要性を認識していたとしても実現は難しかったかも知れない。戦勝国と敗戦国の差はやはり大きいと思われる。

戦後の混乱もやや落ち着いてきた1948年に、6年半に及ぶ“鎖国状態”が解け、*Phys. Rev.*などからESR、NMR、FMRが開発されているのを知った伊藤は共同研究者とともに電磁石や回路を製作し、実験を開始した。電磁石の電源には有り合わせの自動車用の蓄電池を使ったという^[7]。翌年10月に物理学会年会でNMRとFMRの結果を発表している。学術雑誌には、1950年、51年にそれぞれFMRとESRを2編ずつ発表し、NMRについては1951年、52年にそれぞれ¹⁹Fと⁷Li、²³Na、²⁷Al、³¹Pの γ の¹Hに対する相対値をそれまでの報告より高精度に決めて*Phys. Rev.*に発表している^[8,9]。¹Hの共鳴周波数は8MHzであった。1952年にはさらに、K₂HgCl₄・H₂Oの単結晶の¹Hスペクトルの角度変化

を観測し、隣接水和水間の陽子間距離(3.60 Å)を決定した結果を*J. Chem. Phys.*に発表している^[10]。これはPakeがCaSO₄・2H₂Oの単結晶で水和水内の陽子間距離(1.58 Å)を決定した手法の2スピン系から4スピン系への拡張であり、4スピン系の双極子スペクトルを解析した最初の例である。以後、伊藤はNMRを手段とした物性研究を行ない、多くの優れた業績を挙げたが、それを紹介するのは本稿の範囲外である。

付 記

1. 伊藤順吉の経歴

1914年誕生。1936年大阪帝国大学理学部物理学科卒業。同年理学部助手。1939年同講師嘱託。1940年同助教授。1945年同教授。1946年大阪帝国大学音響科学研究所勤務。1951年大阪大学産業科学研究所勤務。1958年大阪大学理学部教授。1963年大阪大学基礎工学部に配置転換。1977年停年退職。その間、日本物理学会会長など多くの要職を務めた。2009年死去。享年94。

2. 戦時中の電波兵器開発^[11]

1943年から44年にかけて海軍技術研究所(在東京)は電波兵器開発のために少なくとも23名の物理学者を動員した。その名簿には記事に現れた人物以外に仁科芳雄、小谷正雄、湯川秀樹、永宮健夫、伏見康治らの名も見られる。最も中心的なメンバーが菊池正士であり、彼は1943年春、同研究所に海軍技師として出向した。その使命はマグネトロンを利用したセンチ波レーダーおよび高出力マグネトロン(Z装置あるいは殺人光線)の開発だった。

3. 強磁性共鳴FMR (Ferromagnetic Resonance)

強磁性体のESR。強磁性体の巨視的磁化Mは磁場H中で歳差運動をする。その周波数はHだけでなく、Mや磁気異方性によって決まる。したがって、FMRは通常強磁性体の磁気異方性の測定手段として使われる。

文 献

- [1] 伊藤順吉 (1996) *日本物理学会誌*, **51**, 491, <http://www.jps.or.jp/books/50thkinen/50th_07/003.html>.
- [2] Rabi, I. I., Zacharias, J. R., Millman, S., and Kusch P. (1938) *Phys. Rev.*, **53**, 318.
- [3] Zavoisky, E. J. *Phys. USSR* (1945) **9**, 245.
- [4] Purcell, E. M., Torrey, H. C., and Pound, R. V. (1946) *Phys. Rev.*, **69**, 37.
- [5] Bloch, F., Hansen, W. W., and Packard, M. (1946) *Phys. Rev.*, **69**, 127.

- [6] Griffiths, J. H. E. (1946) *Nature* **158**, 670.
- [7] 伊藤順吉 (1994) *固体物理*, **29**, 507.
- [8] Kanda, T., Masuda, Y., Kusaka, R., Yamagata, Y., and Itoh, J. (1951) *Phys. Rev.*, **83**, 1066.
- [9] Kanda, T., Masuda, Y., Kusaka, R., Yamagata, Y., and Itoh, J. (1952) *Phys. Rev.*, **85**, 938.
- [10] Itoh, J., Y., Kusaka, R., Yamagata, Y., Kiriya, R., and Ibamoto, H. (1952) *J. Chem. Phys.*, **20**, 1503.
- [11] 河村豊 (2001) 博士論文, 第5章, 第2節, (<http://tdl.libra.titech.ac.jp/hkshi/xc/contents/pdf/117044335/9>).



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ための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であること。
- ・ 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 池上 貴久 (ikegamit@yokohama-cu.ac.jp)

◆選考方法

若手研究者渡航費助成金選考委員会において、応募締切日までに受け付けた応募者からA、B、C各期に若干名の援助金受領者を選考し、各応募締切日から1カ月以内に、その結果を会長名で本人宛てに通知します。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(右記参照)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ニューズレターの投稿規定に従うこと）を帰国後1カ月以内に選考委員長宛に提出してください。NMRニューズレター、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29年7月～10月開催の学会に参加した助成金採択者

山田隼嗣 名古屋大学大学院生命農学研究科 博士後期課程1年

EUROMAR 2017 (ワルシャワ) 7/2～7/6に参加

末元雄介 首都大学東京理工学研究科 博士前期課程1年

19th IUPAB, 11th EBSA (エディンバラ) 7/16～7/20に参加

若本拓朗 立命館大学大学院生命科学研究科 博士後期課程2年

20th ISMAR 2017 (ケベック) 7/23～7/28に参加

若手研究者渡航費助成金選考委員 池上貴久、朝倉哲郎、浅野敦志

EUROMAR2017 参加報告書

名古屋大学大学院生命農学研究科生命技術科学専攻 博士後期課程1年

山田 隼嗣

shunji.yamada@riken.jp

この度、日本核磁気共鳴学会の平成29年度第1回若手研究者渡航費助成の支援を受け、2017年7月2日から6日の間にポーランドのワルシャワで開催されたEUROMAR2017に参加致しました。本助成金により海外におけるNMRの国際学会に参加させて頂いたことを、故京極好正先生と故阿久津政明様ならびにご家族の皆様、株式会社エルエシステムズ、日本核磁気共鳴学会竹腰清乃理会長をはじめ関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

欧州最大規模のNMR学会である本会では、世界各国から先端的な研究者が集い、口頭発表及びポスター発表を含め400題を超える発表が行われました。また、企業ブースではNMR装置や関連製品などの主要メーカーから最新情報を入手することができました。

本会では、溶液・固体NMR、Computational、メタボロミクス、ハードウェア、Hyperpolarizationの最新の研究動向を知ることができました。中でもHyperpolarizationに関する研究が数多く見られました。NMRは低感度であることが弱点とされますが、Hyperpolarizationにより核スピンのエネルギー順位差を増加させ、より強いシグナルを得ることができます。マイクロ波を照射することにより、スピン偏極を電子から原子核へと移動させる動的核分極(DNP: Dynamic Nuclear Polarization)

法がありますが、極低温で分極を行う必要があり、装置のセットアップやコストの面で実用性に欠ける点があります。パラ位水素を用いた過分極として、不飽和前駆体の水素化に基づくPHIP (Para-Hydrogen Induced Polarization) や遷移金属触媒を用いることで水素化を伴わないSABRE (Signal Amplification By Reversible Exchange) 等の手法により低磁場NMRでの高感度化が注目されました。さらには、ダイヤモンド窒素・空孔中心(NVC: nitrogen-vacancy center) を用いて光学的に観測する技術は、既存の技術としてはサンプル容量が最小で最も高感度な技術として今後の発展が期待されました。

また、混合物のNMR計測においては分離せずそのまま計測できる利点がありますが、混合物の場合シグナルのオーバーラップが問題となります。複雑に重なったシグナルを分離する手法として、Pure shift法では同種核間でのJカップリングをスペクトルからすべて消去し、シグナルを単純化できます。特に、従来のZS (Zangger-Sterk) 法やBIRD (Bilinear Rotation Decoupling) 法で見られた感度の低下を改善したPSYPHE (Pure Shift Yielded by Chirp Excitation) 法を導入することで高分解能化/感度上昇が著しく進んでいました。Pure Shift法の問題点としてサイドバンドの存在がありますが、残



写真 ポスター発表会場の様子

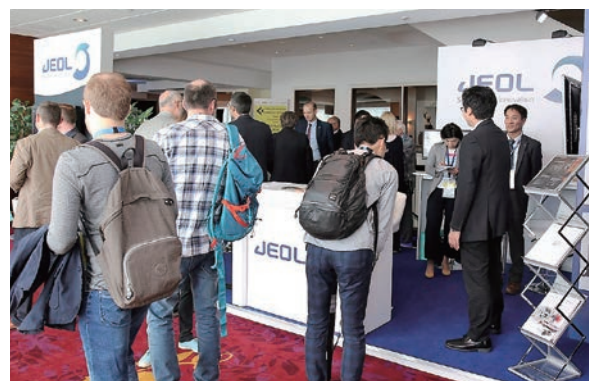


写真 企業ブースの様子

存する J 変調の位相を調整することでサイドバンドを完全に抑制する Ultraclean pure shift NMRの研究が発表されており、JMR AWARDを受賞されていました。

NMRのハードウェアの面では、これまでの低温超電導 (LTS) 素材を用いた装置では1GHz (23.5T) が限界でしたが、高温超電導 (HTS) 素材による超高磁場化 (1.2GHz)、コンパクト化が大きな話題でした。また、magritek社のブースではベンチトップNMRである Spinsolveの展示が行われていました。従来の高価で大掛かりな装置であるという印象を刷新する製品であり、永久磁石を使用し、ヘリウム不要でわずかなスペースで使用可能な装置です。ワークショップでは、最大80MHzのモデルが製品化され、アセトアルデヒドのアセタール化を例にオンラインで化学反応のプロセスをモニターリングできることが紹介されました。また、ソフトドリンク中での糖の測定や尿の代謝物同定において水のシグナルを消すことに成功しており、食品成分や代謝物分析において実用的なレベルになったことが示されていました。

Computationalのセッションでは、温度変化によって生じる化学シフトの変化を抽出するラドン変換を用いた手法により迅速かつ高感度な連続NMR測定が可能であるとの発表があり、数学の活用によるNMRの発展が期待されました。

NMR分野における機械学習の活用では、タンパク質の構造解析におけるシグナル帰属の自動化に機械学習を適用した研究が見られました。報告者の所属研究室からもメタボロミクスにディープニューラルネットワーク (DNN) を活用することにより従来の部分最小二乗法 (PLS) に比べ大幅に分類精度を向上させることや、量子化学計算により算出した理論化学シフトに機械学習を用いることで実験的化学シフトに近似されNMRスペクトルの予測に有効であることを発表し、機械学習やケモインフォマティクスの活用でイニシアチブをとっていきたいと考えています。

ウェブツール関連としては、本会ではNMRスペクトルフィッティングソフトウェアINFOSやsdfデータを用いてNMRスペクトルデータと化学構造を関連付けるNMReDATA、代謝物同定システ



写真 口頭発表会場の様子

ムCOLMAR Webサーバー (<http://spin.ccic.ohio-state.edu/index.php/colmar>) が発表されており、今後の展開に注目したいと思います。

報告者は“InterSpin : Database and webtool for small to macromolecular mixture analysis”と題したポスターを発表しました。InterSpin (<http://dmar.riken.jp/interspin/>) のデータベースであるSpinLIMSは、NMRスペクトルデータとPubChemなどの公共データベース、化合物の構造情報であるSMILESやsdfなどの情報が関連付けられている点が特徴です。 ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルの代謝物同定システムSpinAssignと2D J resスペクトルを基盤とするSpinCoupleを統合することにより相互のデータを活用した機能を追加予定であることや機械学習を応用することで蓄積されたデータを利用して代謝物の同定精度を向上させる構想をアピールしました。さらには、実験データだけではなく、原子帰属データから量子化学計算による理論的な化学シフトや J 値を予測し登録していくことで計測していない代謝物も同定できるようにすることを今後の展望としました。聴講者からは高分子の同定について興味を持って頂き、類似構造を持つ高分子代謝物の判別が今後の重要な課題であることを認識しました。

本学会で集めたNMRの高感度化、高分解能化、ベンチトップNMR、数学や機械学習の応用などを自分の研究に取り入れるべく、詳細を追跡していきたいと考えています。

最後に、貴重な機会を与えてくださいました日本核磁気共鳴学会に重ねて御礼申し上げます。

The 20th ISMAR meeting 参加報告書

立命館大学大学院生命科学研究所生体分子構造学研究室 博士後期課程2年

若本 拓朗

sc0019sh@ed.ritsumei.ac.jp

私はこの度、平成29年度日本核磁気共鳴学会第1回若手研究者渡航費助成の支援により7月23日から7月28日にカナダのケベックにて開催された「The 20th ISMAR meeting」に参加しました。日本核磁気共鳴学会会長・竹腰清乃理先生、若手研究者渡航費助成金選考委員長・池上貴久先生、関係者の皆様に深く感謝申し上げます。開催地であるケベックでは日中の気温が20℃前後ということもあって非常に快適な環境の下で学ぶことができました。

私は「Structure determination of the locally disordered state of ubiquitin by high-pressure NMR spectroscopy」という題目でポスター発表を7月25日に行いました。ユビキチンは天然状態よりも高いギブズ自由エネルギーを持った状態（高エネルギー状態）が水溶液中で少なくとも2つ存在していることが明らかにされています（準安定状態 N_2 と局所変性状態I）^[1]。 N_2 状態の3次元原子座標は高圧力NMR法を用いた研究によって解かれていましたが、I状態に関しての精密な原子座標決定の成功には至っていませんでした^[2,3]。今回私は、天然状態の構造を不安定化させた変異体Q41Nを用い高圧・酸性・低温の条件でI状態の原子座標決定に成功することができました。特筆すべき点として、1気圧では分布率の少ないI状態を圧力下で安定化し構造決定を行ったことです。I状態は高圧下で33-41番のNHの信号が著しく減弱しているため核オーバーハウザー（NOE）法だけに基づいて原子座標決定をすることが困難でした。NMR信号が減弱して

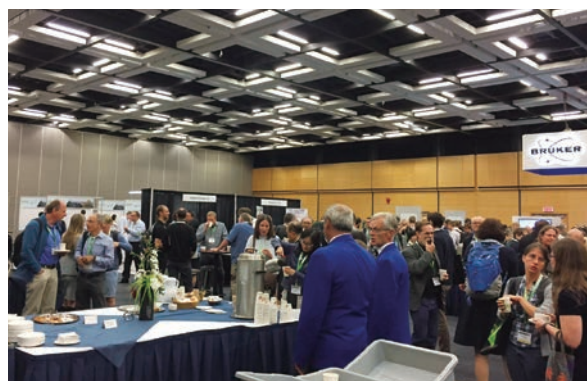


写真 会場の様子

いる領域であるQ40C及びK33Cに常磁性プローブ（MTSL）を導入し常磁性緩和促進（PRE）法によりNOEだけでは不足していた距離情報の獲得に成功しました。最終的にベイズ推定を用いた立体構造計算により精密な座標決定に至りました。ポスター発表を通じて自身の研究成果を多くの参加者に伝えることができ非常に有意義な時間を過ごすことができました。また高圧力NMR法について興味を持ってくださる方が多くエキサイティングな議論の連続という印象の強い学会となりました。最後になりますが、今回の学会参加に関してご支援くださいました日本核磁気共鳴学会関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- [1] Kitahara, R. et al., *J. Mol. Biol.*, **347**, 277-285 (2005).
- [2] Kitahara, R. et al., *PNAS*, **100**, 3167-3172 (2003).
- [3] Kitazawa, S. et al., *Biochemistry*, **53**, 447-449 (2014).

19th IUPAB and 11th EBSA congressの参加報告書

首都大学東京理工学研究科分子物質化学専攻 博士前期課程1年

末元 雄介

suemoto-yusuke@ed.tmu.ac.jp

この度2017年7月16日～20日の5日間、19th IUPAB and 11th EBSA congressに日本核磁気共鳴学会様の若手研究者渡航助成金のご支援によって参加させていただきましたのでご報告いたします。

本学会が開催された、スコットランドの首都であるエディンバラは、真夏の7月でも冷涼な気候で、かつ学会期間中は雨も降らなかったため、極めて快適に学会を楽しむことができました。またキャッスル・ロックの上に聳え立つエディンバラ城が非常に印象的な都市でした。

私はこの学会で“Protein structure determination in living eukaryotic cells by in-cell NMR spectroscopy”というタイトルでポスター発表を行いました。内容は、還元環境でも安定なヨードアセトアミド基をリンカーに持つ新しいランタノイド結合タグをデザインし合成した結果、ヒト培養細胞内で良好なin-cell PCS実験を行うことに成功したというものです。この研究の一部はすでに昨年論文になっています [Hikone, Y. et al., *J. Biomol. NMR* **66**, 99-110 (2016)]。

今回の学会では細胞機能に関する研究発表も多くあったため、私のin-cell NMR関連の発表に興味をもたれた参加者も多かったようで、非常に多数の方にポスターにお越しいただき、様々なディスカッションを交わすことができました。例えば、蛋白質に対するタグの固定法について、いろいろと提案を

してくださった方もあり、ポスターセッションは非常に有意義でした。

また、NMRが専門ではない方も多く参加されていた本学会では、「PCSの化学シフト変化はユビキチンが構造変化していることを表している」というように誤解された方もおり、そうでないということを私の未熟な英語で伝えることに非常に苦勞いたしました。相手の表情をうかがいつつジェスチャーを交えてディスカッションをして、最終的には理解していただいたのではないかと思います。このセッションの前後で私の英語でのコミュニケーション・スキルが多少なりとも向上したのでないかと思いました。

口頭発表では、蛋白質のフォールディングに関する細胞機構など、私自身の研究に比較的近い内容の講演を聞いたほか、アルツハイマー病に関連するアミロイドのミスフォールディングに関する非常に印象深い講演をいくつか聞くことができました。勉強不足で理解できない内容もありましたが、これらの口頭発表の内容には大変勉強になることが多く、自らの知見を広げるうえで大変有意義な時間となりました。今後の研究に生かしていきたいと思っています。

最後になりますが、基金設立にご尽力くださいました故京極好正先生、故阿久津政明様、ご遺族の方々、また参加をご支援くださいました日本核磁気共鳴学会関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。

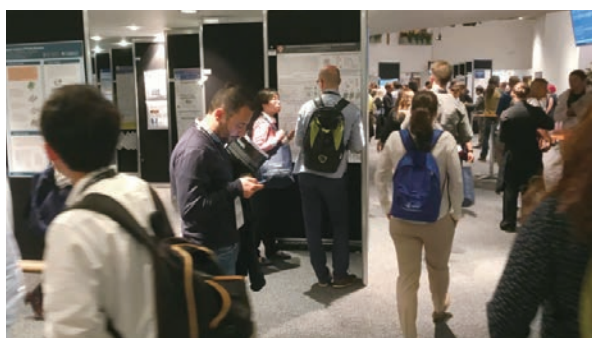


写真 ポスター発表会場



写真 口頭発表会場

NMRサンプルチューブの話

株式会社シゲミ

関 充男

shigemi-corp@nifty.com

はじめに

NMRの測定において、感度や分解能を考慮すれば、サンプルを容器に入れない状態で測定できればベストなのですが、現在の技術では物理的、金銭的に容器に入れないと測定できない構造になっています。つまり、NMRのサンプルチューブは測定において最も重要なファクターのひとつであり、分解能調整に影響を与えるとともに、感度にも影響を与えます。また、汚れや、ガラスの成分の中に測定に影響を与えるような物質が混入していれば正しい測定結果が得られません。サンプルチューブを目的にあった実験に合わせ上手に使い、通常の5mmサンプルチューブより良い結果が得られることがあります。

例えば、絶対量が限られた量であれば高濃度になれば感度が稼げますが、液量がある程度ないと分解能調整ができません。3mmサンプルチューブにサンプリングあるいは対称形マイクロサンプルチューブにサンプリングして測定すれば、普通の5mmプローブでも感度を稼ぐことができます。また、DIFFUSIONなどの測定においては、パルス磁場勾配で局所に発生した熱により対流が起こりデータの精度が著しく損なわれる場合も、サンプル量を少なくする工夫をすれば良い結果が得られます。

この機会に、サンプルチューブのことを少しでも

気に留めていただき、今後の測定に生かしていただければ幸いです。

材料の話

サンプルチューブの材料は大手ガラスメーカー、いわゆる窯業（ガラスを溶かして製品にする設備を持った会社）からチューブの形で購入いたします。大型の設備が必要なため窓ガラスや自動車のガラスなどが主力で、ガラスチューブを製造販売している会社は少ないのが現状です。例えばパイレックスを製造しておりました、ダウコーニングは理化学用ガラス部門をすべて売却してしまいましたので、パイレックスというブランド名は理化学ガラスからは消えてしまいました。今は、ドイツのショット社が一番大きい会社です。ショット社の創設者のオットー・ショットが耐熱ガラスであるホウ珪酸ガラスを発明しました。

ショット社より購入したチューブを開梱すると写真1のようになっています。指定のサイズのものは何トンという単位でないと購入することができません。また、NMRサンプルチューブのような精度が必要なものは、素材の段階で曲がりやが少なく、偏肉差が少ないなどの精度選定が必要です。

一般的なチューブはホウ珪酸ガラスで作られています。表1のように、ホウ珪酸ガラスには線膨張係数の異なる2種類のJIS規格があります。柔らかく、安価で加工しやすいが、熱膨張係数が大きいので温度変化に弱く、アルカリ溶出度が高いのが、ホウ珪酸ガラス-2に分類されます。硬く、高価で加工しにくいですが、熱膨張係数が小さく温度変化に強く、アルカリ溶出度が少ないのが、ホウ珪酸ガラス-1です。

ホウ珪酸ガラスと石英ガラスの組成は表2のような成分になります。

耐熱ガラス、硬質ガラスなどと呼ばれる、ホウ珪酸ガラスの組成は二酸化ケイ素、酸化ホウ素、酸化ナトリウム、酸化アルミニウムなどです。石英



写真1 ホウ珪酸ガラスチューブ

表1 JIS R-3502化学分析用ガラス器具についての品質等級抜粋

等級	線膨張係数	アルカリ溶出量 (ml/g)
ホウ珪酸ガラス-1	$35 \times 10^{-7}/^{\circ}\text{C}$ 以下	0.10以下
ホウ珪酸ガラス-2	$55 \times 10^{-7}/^{\circ}\text{C}$ 以下	0.20以下
ソーダ灰ガラス	$55 \times 10^{-7}/^{\circ}\text{C}$ 以下	2.0以下

表2 ホウ珪酸ガラスと石英ガラスの組成

種類	SiO ₂	B ₂ O ₃	Na ₂ O + K ₂ O	Al ₂ O ₃
ホウ珪酸ガラス	81%	13%	4%	2%
石英ガラス	100%			



写真2 白金の坩堝



写真3 円柱加工

は一番硬く、熱膨張係数も非常に小さいのですが、硬いので加工が非常に困難です。ホウ素フリーのため¹¹B等の測定に使われますが、プローブの材料にホウ珪酸ガラスが使用されている場合もあります。

NMR サンプルチューブ製作の話

一般的なサンプルチューブでなく、対称形マイクロサンプルチューブの作成方法についてお話しさせていただきます。

1. 磁化率調整ガラスの作成

最初から最後の工程まで機械を使って人の手で作業しています。

磁化率調整ガラスの作成にはホウ珪酸ガラスの中に各溶媒に合わせた磁化率になるような物質を添加すると同時に、溶媒の種類によって区別がつくようにガラスに色を付けます。これを写真2のような白金坩堝で不純物が入らないよう溶融します。冷えて固まったガラスブロックを角柱に切り出したのち写真3のように円柱状に加工し、センタレス加工で外周を精密研削し、長さを整えます。磁化率が最

も大切ですが、熱膨張係数も大切で、ケースになる外管の熱膨張係数と合わないとは溶着できず製品になりません。

磁化率調整ガラスの作成は1回の発注には大量であることが条件なので、大量に作成する前に各溶媒に対応する磁化率が正しいかを確認するために、NMRの装置で厳しい条件で分解能調整ができるかテストしております。製品にする前に、磁化率測定を何回も行います。執筆中にタイミングよく、新製品であるアセトン用磁化率調整ガラスの試験を横浜市立大学で「成果非公開(占有)利用(有償利用)」600MHz NMR(クライオプローブ付)を利用していただき、栗田さんに測定をしていただきました。試作の磁化率調整ガラス管に重アセトンd₆(99.9%)をサンプルとして、表3に示したように、液高を15mm、10mm、5mmと変えて分解能を確かめました。15mm、10mmの液高という非常に厳しい条件ながら、栗田さんの腕で、スペクトル1のようなきれいなスペクトルを得ることができました。さすがに5mmの液高は十分な分解能を得られませんでした。ピークは確認されておりますので、この液高

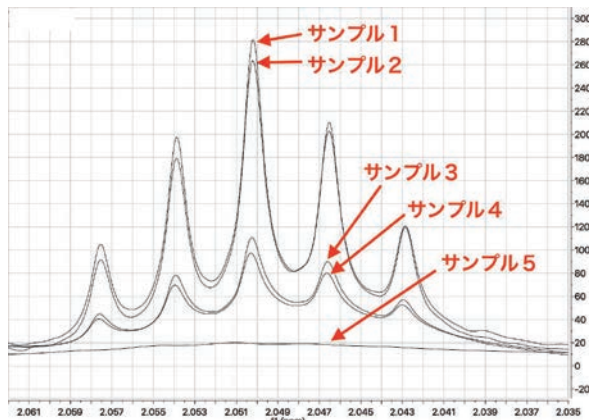
は検出コイルより短いためと考えられます。

2. 組み立て

外管になるチューブをイラスト1のような、シュリンク法という真空成型を行い、内径を高精度±0.0025mmの公差まで仕上げます。沢山のパラメータがありますが、ほとんど経験と勘で行います。外径は写真4のようなセンターレス研磨で±0.0025mmの公差に研削・研磨します。こちらのほうがパラメータは少ないですが、機械は1000分台の単位で目盛通りに働いてくれません。やはり経験と勘が必要です。また、この作業は少しずつ削り

表3 サンプルACETON-d₆ 99.9%

	液 高	容 量
サンプル1	15mm	208uL
サンプル2	15mm	208uL
サンプル3	10mm	138uL
サンプル4	10mm	138uL
サンプル5	5mm	69uL



スペクトル1 重アセトン (99.9%) 中の軽アセトン

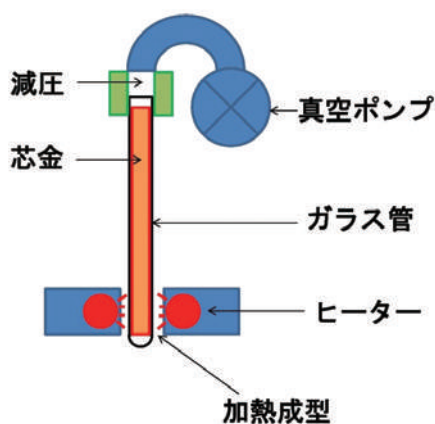


イラスト1 真空成型

取っていきますので、何回もの研削をします。最後に研磨器で表面を滑らかにします。

内外径を仕上げたら、気泡や傷のあるものを排除し、曲がりがあるものを取り除き、磁化率調整ガラスをガラス管に挿入溶着し、アニール処理します。アニール処理とは、溶着したところだけ高熱になることで生じたひずみ(内部応力)を取り除く作業のことをいい、560℃付近までいったん温めて、徐々に冷却する操作を指します。ガラスに限らず、金属や樹脂加工などでも行われています。仕上がった外管は写真5のようになります。

写真6のように内管になる磁化率調整ガラスをサンプルが逃げるができるようにより細い管で接合し、さらに、太い管に接合します、この時すべての中心が同一でないと外管にうまく挿入できませんので、専用の機械を使いセンターが一直線になるように溶着します。

3. 印刷

最終組み立てが終わると、写真7のようにガラスの曲面にスクリーン印刷で印字を施します。この方法では、ほとんどどんなものにも印刷可能ですが、装置が今どきのプリンターと違い、すべてがアナログですので、経験と勘が必要です。非常に柔軟に印刷対象物に適応することができます。

ちなみに、iPhoneのガラスパネル内側部分には、当社と同じインクでスクリーン印刷されています。また、円筒ガラスにスクリーン印刷でプリントパターン(電子回路)等も印刷できます。

当社の製品で一番外径が細い対称形マイクロサンプルチューブ2.5mmの内管1.7mmに印刷するのは

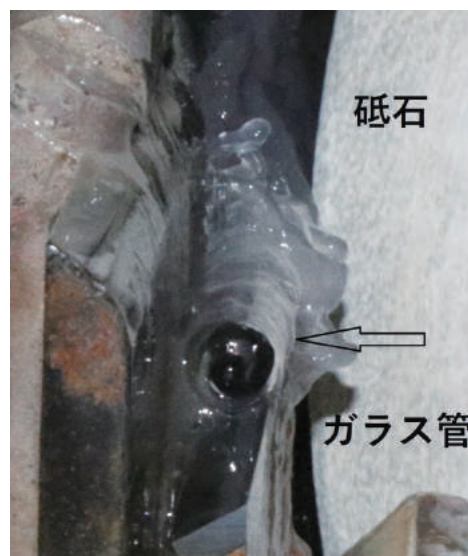


写真4 センターレス研削



写真5 対象形マイクロサンプルチューブ外管

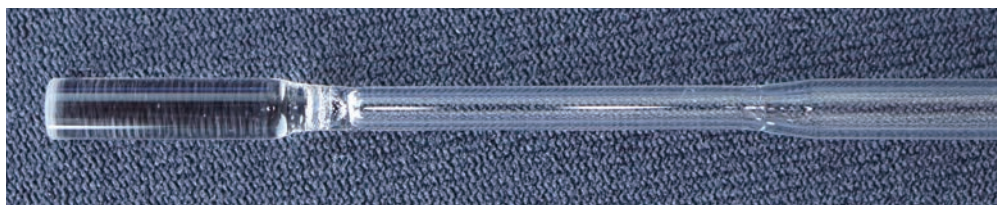


写真6 対象形マイクロサンプルチューブ内管

調整が非常に難しいです。また、SLOT TUBEのスロットの目印の青いラインをスロットの位置に合わせるのも目視なので、経験がないと正しく印刷するのは至難の技です。

磁化率調整ガラスの性能試験で厳しい条件にもかかわらず、素晴らしいデータをとっていただいた横浜市立大学栗田さんに感謝しております。また、ガラスに関するすべてのことをご教示いただいた会長及び社長に御礼申し上げます。

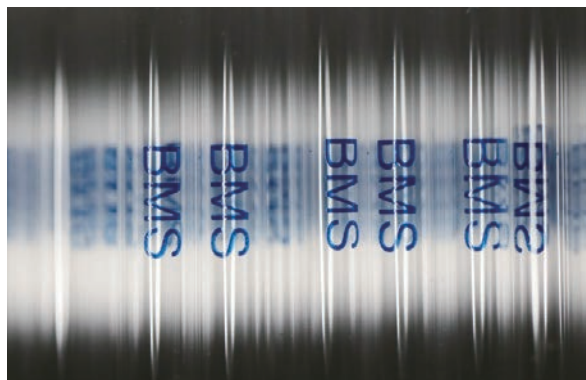


写真7 BMSの印字



関 充男 (せき・みつお)

1989年 バリアンインスツルメンツリミテッド入社

2013年 株式会社シゲミ入社

生体系NMRの解析ツール(機械学習と自動化)

大阪大学蛋白質研究所

小林 直宏

naohiro@protein.osaka-u.ac.jp

近年のNMR装置技術の進歩や解析技術の高度化により、安定同位体ラベル体として残基数100～150程度の小型タンパク質ならば、場合によっては測定時間を除いて1週間程度で精密な構造モデルを得る事が可能である。NMR法による構造モデルの構築には距離情報、2面角情報、配向情報など固体・溶液問わず必要不可欠である。当然ながらこれらの構造情報を得るためには多次元スペクトルを多数測定する必要がある、期待されるNMRシグナルの位置、強度、体積などを検出させる。現在においては、スペクトル情報と検出ピーク情報を元に自動的なシグナル帰属を達成可能な複数のプログラムが存在する。特にGüntertらにより開発されたFLYA^[1]、Hermannらにより開発されたUNIO^[2]はシグナル帰属と立体構造モデリングとを協奏的に実行する事でそのシグナル帰属精度と構造モデルの決定精度を高める事に成功している。その一方で、これら自動解析プログラムの多くはNMRシグナルを手動で検出する事を推奨しており、ユーザーは未だスペクトルビューア上で目視によるピーク検出を強いられる事になる。

NMRデータ解析においては、観測される核スピンの共鳴周波数とスピン間の相互作用の結果として期待された化学シフトおよび強度を持つシグナルを、スペクトルデータから探索し帰属するという、もはや近代NMRの解析法ではごく当たり前の作業を行う。古くは1次元スペクトルのシグナル同士の重なり合いの解析を目的としたデコンボリューションの方法論などがNMR法の黎明期に多数開発された。しかしながら、現在でも標準的に用いられている多次元NMR法では各サンプルあたり、例えば残基数が76個しかない¹³C/¹⁵Nユニフォームラベル体のUbiquitinですら3次元NMRスペクトル上で4,000個を超えるピーク群を解析する必要があり、それら全てに対して厳密な非線形解析を実行することはあまり得策とはいえない。FLYA、UNIOといった自動帰属ツールはピークの厳密な位置(¹H

シグナルにして約0.03ppmの要求精度など)、強度あるいは線幅情報を必要としない(詳細は原著を参照していただきたい)。これはNMRシグナルの定量的な情報を高精度に求める事が現実的には困難であるケースが多いためであり、解析精度の向上にはむしろ定性的な情報量としてシグナル帰属あるいは構造計算のためのデータに高い冗長性を求めている。例えば、ある¹HシグナルがNMR測定パルスシーケンスおよび化学構造あるいは立体構造上妥当な化学シフト位置を示すピークとしてスペクトル上で検出される場合を考えてみよう。そのシグナル位置が複数のピーク、複数のスペクトル上で予測と近い位置に観測されれば、その頻度によりシグナル情報の信頼性が高まると言える。このシグナル情報の冗長性は統計的な情報量を増大させ、シグナル帰属や距離制限情報の帰属解を取束させることになり決定精度を向上させることが出来る。したがって、出来る限り正しいピークと判断し得るシグナルデータ(偽ピークと明白に判断できないデータ)を数多く入力する(情報量を増やす)ことが、これらの解析自動化技術には必須と考えるべきであり、誤ったピークが多ければ帰属解は取束しないことになる。検出されたNMRシグナルの帰属精度には信頼度が存在してしかるべきであり、なんらかのパラメータとして記録されるべきだろう。また、NMR構造と化学シフト情報の正確さに関する客観的な評価方法開発は今もって大きな課題であり、自動解析では特に構造モデルと実験的に測定された残余双極子(RDC)との整合性を評価する方法などの利用が強く望まれる。

一方、全くノイズの無い(期待されないシグナルを含まない)NMRスペクトルを得る事はほぼ不可能と考えた方が良い。これは装置の状態、サンプルの安定性、測定者の技量など様々な要因があるが、限られたマシンタイム、苦勞して調製したサンプルの濃度が低いなどの諸事情により、多数のノイズと悪戦苦闘を強いられる事も多いのが実情である。

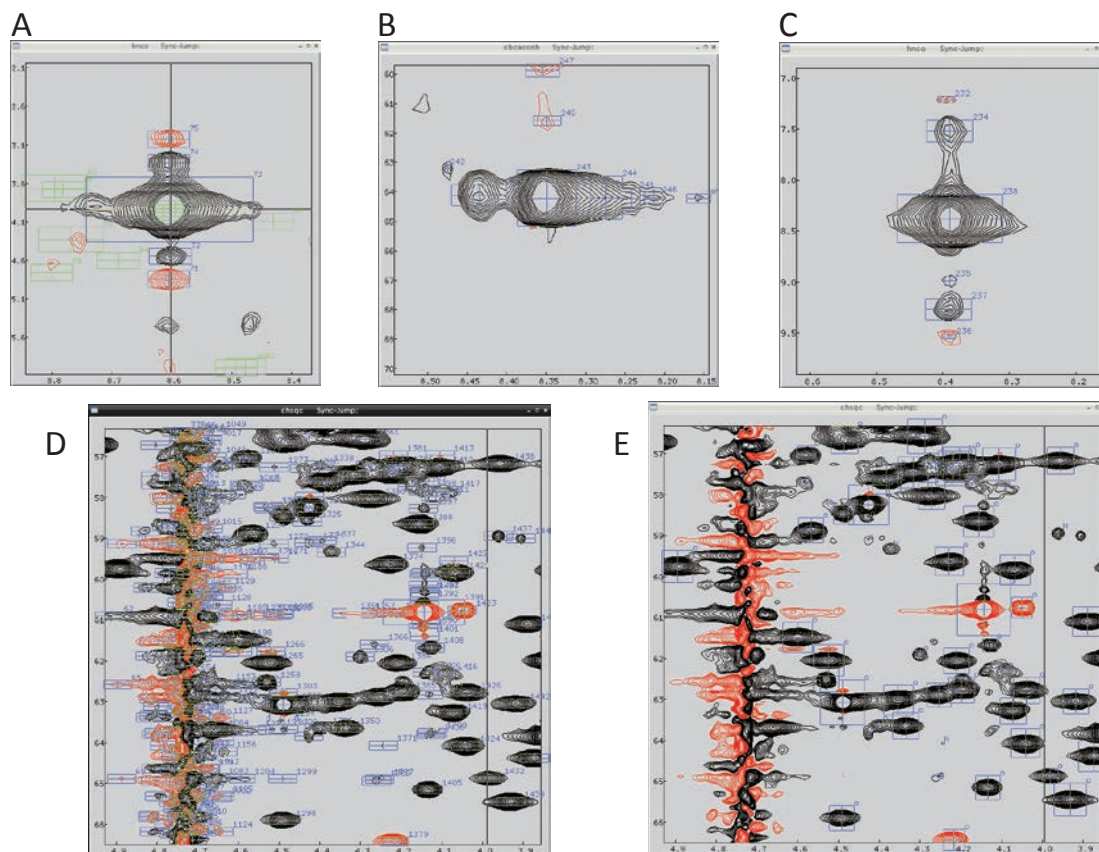


図1 A: 強いシグナルからの波打つようなノイズ、B: テール状のピーク由来のノイズ、C: デカップリングが不十分であったためのノイズ

DとEの2次元スペクトルは、軽水由来のノイズ除去を行った ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを自動検出でピーク選別した場合(D)とCNNフィルタ処理でピーク選別した場合(E)の比較。

NMRスペクトルにおけるノイズ(あるいはアーティファクト)とは、測定者の意図しない望まないシグナルであり、多くの場合微量の混入物由来のシグナルであったり、ベースラインの歪み、パルス長やdelay time、デカップリングパルスなどパルスシーケンス中のパラメータ設定が不十分であったりと、発生する原因は様々である。とりわけ ^1H 核観測の実験の場合、巨大なバルク水由来のシグナルは、大きなノイズとして貴重なシグナル検出の妨げとなる(かつてはpre-saturationという方法が積極的に用いられた時期もあったが、貴重な $^1\text{H}\alpha/^{13}\text{C}\alpha$ などを由来とするシグナル強度が減衰あるいは消去してしまうため、軽水中での実験では現在ほとんど用いられていない)。自動ピーク検出機能を有するスペクトラムビューアは多数存在するが、無情にもこれらのツールはノイズ、シグナルの区別無くピークを検出してしまうため、図1A~Cで示したようにNMR研究者なら一目でノイズと判断できる偽ピークを多数無駄に拾い集める事になる(計算機の側から見れば強いシグナルの近傍に出るノイズピークのパターンなどはいかがい知る事が出来ないため回避は困難である、図1D参照)。さて、このような場合

は手作業で丁寧にピークを確認しながら検出するのが妥当な選択肢であるが、なぜ人間はこうも簡単にノイズとシグナルの区別が正確に実行出来るのであろうか? 筆者はこの疑問に長年思いをめぐらせてきたがこの数年における機械学習の進歩が本稿で述べる技術開発の発端となった。

この5年ほどの深層学習の進歩は目覚ましいものがある。深層学習とは機械学習の一種と考えられ、その成果はGoogleの猫^[3]、AlphaGO^[4]による囲碁対戦などメディアを賑わせている。本稿で述べる深層学習は、その技術の一端であり、とりわけ成功を収めている畳み込みニューラルネットワーク(CNN)による高度な画像認識とNMRデータ自動解析への応用について述べる(図1DとEの比較からCNNの顕著な優位性がわかる)。CNNの歴史は意外にも古く、福島^[5]によって提唱されたニューラルネットワークの一種であるネオコグニトロンに始まり、LeCun, Hintonら^[6,7]による活性化関数や誤差伝播法の導入などの技術革新により、大きく進展し現在の多くの深層学習ツールに標準的に搭載されるようになった。CNNは高等生物の網膜視覚細胞とその連結を模した形態になっており、入力画像の直前

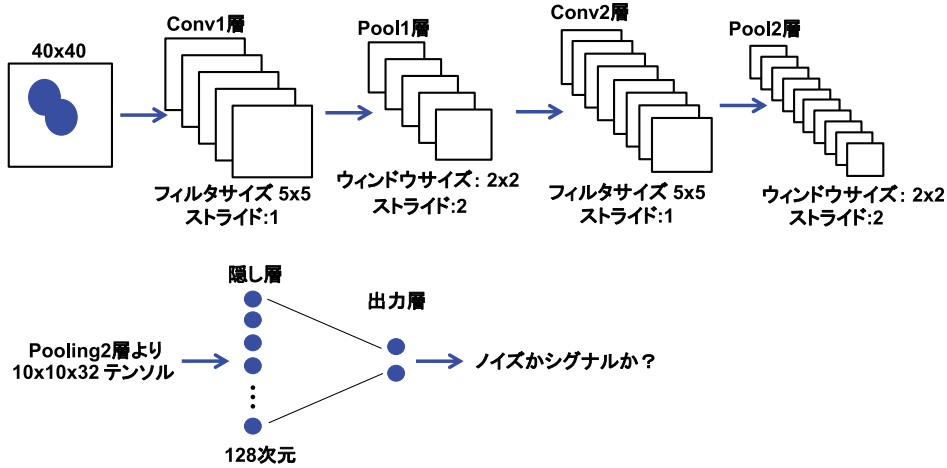


図2 ノイズ判定用畳み込みニューラルネットワークの模式図

に配置された畳み込み層とプーリング層はこれら網膜視神経のネットワークとよく似た機能を示すことで高い画像認識性能を発揮できる事として理解されている。図2に本稿で用いられるCNNのネットワーク構成を示す。入力画像に対して左上から5×5など小さなフィルタ行列によって順に指定された活性化関数(式1)による積和演算しながら徐々にずらしていく畳み込み演算を行う：

$$r = \phi (w * h - b) \quad [式1]$$

r は出力ベクトルであり活性化関数 ϕ にはフィルタ行列 w と入力行列 h の積をバイアス行列 b で差し引くごく単純な演算である。この演算層を畳み込み層と呼ぶ。通常、畳み込み層はランダムに作成された多数のフィルタで演算されるため、その演算結果はフィルタ数を厚みとした3次元データとなる。畳み込み層のデータを、3×3など特定の範囲から得られる代表値(通常は最大値)を用いて、さらに下層の3次元マトリックスに畳み込み層同様に徐々にずらしながら演算結果を入力していく。これをプーリング層と呼ぶ。単純な画像認識では、この畳み込み層とプーリング層のセットを数段重ねる事で、十分な画像認識性能が得られる。CNNの最終段では2～3層程度のニューラルネットワークが用いられる。学習初期には各層にランダムに作成されたフィルタと重み、バイアスが用意され、教師データによる入力値が与えられると最終段の出力値との誤差が発生し、その値に従って誤差伝播法による修正が行われる。近年の深層学習では確率的勾配降下法(Stochastic Gradient Descent : SGD)、ミニバッチ法、ReLU (Rectified Linear Unit) 活性化関数、ドロップアウト法など多くの方法論の確立により勾配消失問題の解消、高い過学習の耐性が獲得

され、高い並列度と高速計算が実現された。また、nVIDIA社が次々とリリースするGPUの演算性能の向上により現在も更なる発展を続け、CNNはこれら技術の恩恵をひととき強く受けている。CNNを含めた深層学習技術の詳細については、多くの著書が出版されているのでそれらを参考にさせていただきたい^[8]。特筆すべき点は、CNNが従来の機械学習法で必要であった特徴量を明示する必要が無いことであり、視覚的に判断していた判別作業をそのまま入力値として学習し再現できる。CNNによる判別器の設計においては、どの程度のパターンが存在するかをある程度予想し、出力層としてどの程度の次元数を必要とするか、どの程度の判別性能を求めるとネットワーク構造は大きく異なる。また、過学習を避け、汎化性を高めるためにも極めて大量の学習データが必要である。

筆者の用意した訓練用データは、真のシグナルデータに典型的なノイズのパターンを加味したものである。ノイズのパターンとしては、軽水由来のノイズ、強度の強いシグナル付近でよく見られるわずかな位相のずれ、あるいは裾のようなパターンであり、総数で2,000個ほど収集した。真のシグナルパターンも同様にそれぞれ2,000個用意した。使用した3次元スペクトルデータは児嶋らのグループにより測定されたHNCO, HNCACB, CBCA (CO) NH, HNCA, HN (CO) CAである。ピーク検出には3次元方向差分による頂点検索法を用い、3次元2次元関数補間*によりピーク位置を決定した。検出されたスペクトルデータマトリックスより、頂点デー

* 検出点近傍のグリッド、x, y, z各軸方向に(i-1), (i), (i+1)の3点の位置強度を使って2次元関数の逆関数補完を行う方法でinverse quadratic interpolationと呼ばれる。

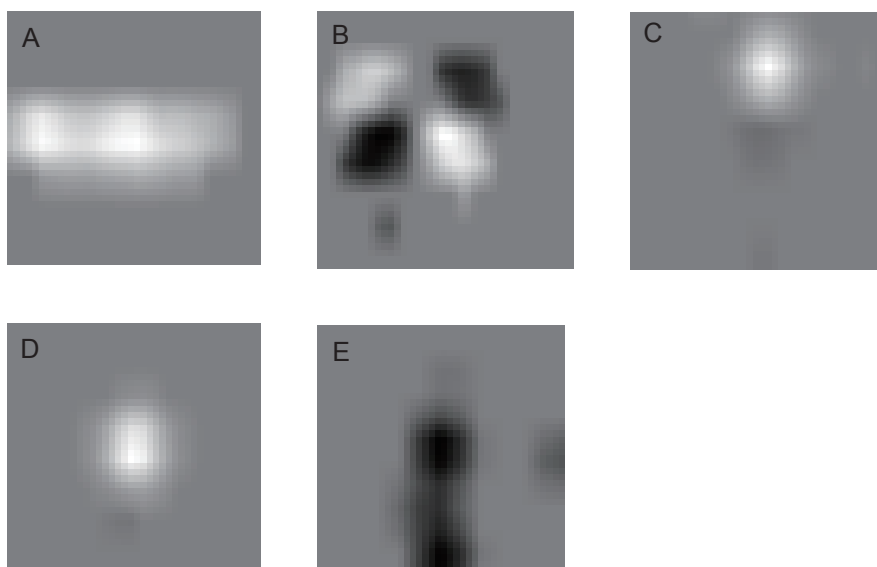


図3 実際の入力画像とCNN単独による判別結果A～C：ノイズ、D：シグナル、E：ノイズ（実際はシグナルであるが最終的には図4のZNNによりシグナルとして判定）

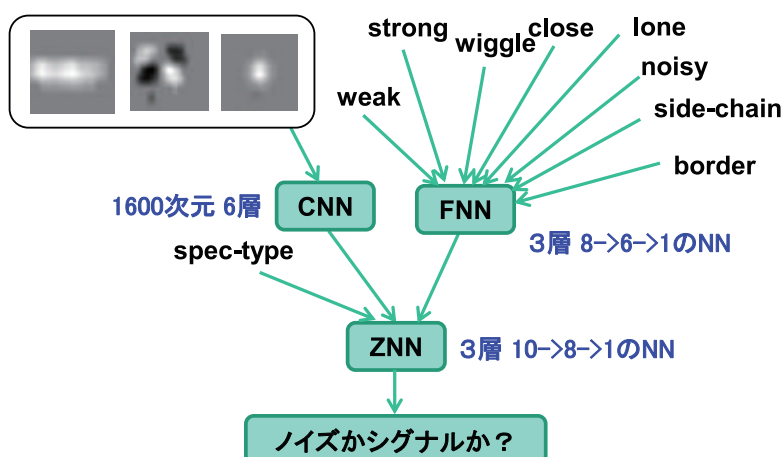


図4 ノイズ判別システムの概略図。FNNではピークの統計的な強さ、弱さの指数 (strong/weak)、wiggle型ノイズの特徴量 (wiggle)、孤立性 (lone)、各軸での密集性 (noisy)、側鎖シグナルの特徴量 (side-chain)、スペクトル境界との距離 (border) を入力とする。ZNNではスペクトルタイプ (spec-type) も考慮に入れる。

タ周辺を2次元データとして横軸 ^1H で0.4 ppm、縦軸を ^{13}C 2.0 ppmあるいは ^{15}N 4.0 ppmの範囲で切り出し、バイリニア補間により 40×40 256階調のグレースケール画像として作成した。その際、データ強度は0-127をnegativeおよび128-255をpositiveの諧調としてスケール後表示した。これらの画像データに対し鏡像反転、回転、符号反転などをさらに施し、32,000個のデータ群に拡張した。学習にはMicrosoft社のCNTK 1.7^[9]を用い、GPUとしてnVIDIA社のGTX980を利用した。深層学習の訓練に要する計算時間は、GPU有りで10分程度、GPU無しでCPUのみ (2-Core 3.0 GHz) では120分ほどかかるため、GPU無くして深層学習の開発が容易ではないことがお分かりいただけよう。このことは、前述の通りCNNがReLU関数の微分形も含め

極めて単純でサイズの小さい単精度積和演算を多数並列実行することが、小さな高速キャッシュをもつ2,000個にも及ぶCUDAコア^[10]に極めて有利だからである。ちなみに学習後のモデルデータ (ネットワークの各ノードにおける重みとバイアス) を用いれば、CPU単体でも高速に動作し、2,300個を対象とするピークデータの判定処理は僅か数秒で終了する。

CNNにより学習されたデータのノイズ判別精度は偽陽性が約90%、偽陰性が約98%程度であり、特にHNCACBなど複雑なスペクトルパターンの場合、認識精度はさらに下がる傾向にある (図3A～D)。これはCNNの画像認識範囲が狭いための必然である。著者は、ピークの統計的相対強度、周囲のシグナルの混み具合などCNNで検知出来な

い情報を処理する補助的な3層のニューラルネットワーク(入力8ユニット、隠れ層6ユニット、出力1ユニット)として[FNN]を作成した。CNNおよびFNNの処理する情報を総合的に判定させるため最終段にもう一つの3層ニューラルネットワーク(入力10ユニット、隠れ層8ユニット、出力1ユニット)[ZNN]を作成追加して全システムを完成させた(図4)。このシステムによりHNCACB由来のピークの判定を正しく実行出来るようになった(図3E)。このノイズ判定システムと筆者により独自に開発された焼きなまし法による連鎖帰属プログラムAnneal_Robotとの組み合わせで、従来は30~60分ほどかかっていた半自動的連鎖帰属が、4-CPUでおよそ60秒程度の短時間で完了できることを昨年度のNMR討論会において示した^[11]。なお、本稿で解説しているバージョンでは、2次元スペクトル、3D ¹⁵N-edited NOESYなどより多くのピークが重なり合うスペクトルにおいては、十分な性能が発揮できなかった。これは訓練データに多数のシグナルが重なり合うようなパターンが不足している事、軽水由来のノイズやAnti-phaseの消え残りノイズを含めていることによる副作用の一つであり、正負が多く混在するDQF-COSYなどでは全てのピークをノイズと判定してしまうだろう(HSQCの例としては図1D)。またJ-結合により分裂したピークに対してもシグナルとしての認識性能は弱いため、今後より多種多様な学習データによる追加訓練で認識性能を向上させる事が必要と思われる。一方、ピークリストには深層学習により信頼性パラメータが付加されるため、この情報を利用した将来的な自動解析プログラムとの連携は興味深いところである。

本稿で強調したいのは、この深層学習を応用することで、ノイズの典型的なイメージを計算機に習得させる事が可能であったことを示した点であり、人間の視覚と直感に近い機能をノイズ判別に応用出来た事にある。したがって視覚的かつ経験的な操作によって実行されていた解析作業を、近い将来計算機に実行させることが出来ると期待できる

う。ただし、本システムで恩恵が受けられるスペクトルデータは質的に良いサンプルより得られたものに限られ、ノイズが多い難度の高いデータへの適用は今後の課題である。本稿で述べた自動解析プログラムの今後の進展は、見えないシグナルが見えるような技術ではなく、純粋に作業効率を向上させるものであると考えるべきである。現在、CNNによるノイズ判定に関する論文を投稿準備中であり、ノイズ判別機能を搭載した解析プログラムMagROを近日リリースする予定である。

References

- 1) Schmidt, E. and Güntert, P. (2012) A new algorithm for reliable and general NMR resonance assignment. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12817-12829.
- 2) Serrano, P., Pedrini, B., Mohanty, B., Geralt, M., Herrmann, T., Wüthrich, K. (2012) The J-UNIO protocol for automated protein structure determination by NMR in solution. *J. Biomol. NMR* **53**, 341-354.
- 3) Le QV et al., (2012) Building High-level Features Using Large Scale Unsupervised Learning. Proceedings of the 29th International Conference on Machine Learning, Edinburgh, Scotland.
- 4) Silver D. et al., (2016) Mastering the game of Go with deep neural networks and tree search. *Nature* **529**, 484-489.
- 5) Fukushima, K. Neocognitron: A self-organizing neural network model for a mechanism of pattern recognition unaffected by shift in position. (1980) *Biol. Cybern.* **36**,193-202.
- 6) LeCun, Y., Bottou, L., Bengio, Y., and Haffner, P. (1998) Gradient-based learning applied to document recognition. *Proceedings of the IEEE*, **86**, 2278-2324.
- 7) Krizhevsky, A., Sutskever, I., and Hinton, G.E. (2012) ImageNet classification with deep convolutional neural networks. *Advances in Neural Information Processing Systems* 25. Montréal, Canada.
- 8) 岡谷貴之 (2015) 深層学習、講談社。
- 9) Agarwal, A. et al., (2014) An Introduction to Computational Networks and the Computational Network Toolkit, <https://cntk.codeplex.com/>
- 10) nVIDIA, GPUコンピューティングについて, <http://www.nvidia.co.jp/object/cuda-parallel-computing-platform-jp.html>
- 11) 小林直宏、服部良一、永田崇、児嶋長次郎、藤原敏道 (2016) 深層学習に支援されたNMRシグナルの自動解析、第55回NMR討論会要旨集、94-95.



小林 直宏 (こばやし・なおひろ)

1996年 筑波大学大学院応用生物化学系 博士号取得

1998年 学術振興会 海外特別研究員 Cambridge 大学 Fersht グループ

2001年 理化学研究所 研究員

2009年 大阪大学蛋白質研究所 特任研究員

2016年 大阪大学蛋白質研究所 特任准教授 現職

石川県立大学 食品科学科 生体分子機能学研究室

石川県立大学生物資源環境学部食品科学科

小椋 賢治

k-ogura@ishikawa-pu.ac.jp

1. 石川県立大学

石川県立大学は、1971年に設置された石川県農業短期大学を前身として、2005年に開学した4年制の公立大学です。学部として生物資源環境学部、研究所として生物資源工学研究所、附属施設として農場などを有する、いわゆる農学系の単科大学です。生物資源環境学部は、生産科学科、環境科学科、食品科学科の3学科より構成されていて、大学全体での入学定員は120名と、とても小規模な大学です。入学者のうち40%は北陸三県（富山、石川、福井）の出身で（2017年度）、地域密着型の大学といえると思います。

石川県立大学は金沢市の隣の野々市市のいちにあります。野々市市は人口5万人の小さな自治体ですが、東洋経済新報社が全国の市を対象に調査・発表している「住みよさランキング」ではランキング上位の常連で、毎年2位（2013年）から5位（2017年）のあたりにランク付けされています。たしかに、野々市市に住んでいると、家賃は安い、買い物は便利、医療機関が多い、スターバックスもある、と暮らしやすいところだなあ、と思います。市内には大学が2つあって（もうひとつは金沢工業大学です）若いひとが多いためか、なんとなく街全体に活気があるような気がします。石川県立大学は田園地帯のなかにはぽつんと建っていて交通の便はあまりよくないですが、静かでアットホームな雰囲気のなか、小規模

大学のメリットを活かして少人数教育やきめ細かな実験・実習指導に取り組んでいます。研究面では、教員ひとりずつ独立した研究室を主宰しており、毎年、研究室あたり3名程度の卒年次学生を受け入れています（図1）。卒業後、大学院に進学する割合は10～15%程度です。

2. 研究テーマ

2014年4月に本学の食品科学科に教授として着任して以来、3年半が経ちました。前職（北海道大学薬学部および大学院先端生命科学研究院）での研究テーマは、細胞内シグナル伝達タンパク質の溶液NMRによる立体構造およびダイナミクスの解析と医薬品開発への応用、でした。縁あって薬学から農学への異動となったので、私のようなタンパク質の構造屋が食品科学の分野に貢献できることを考えてみたのですが、実はそれほど多くありません（笑）。タンパク質を食品として考えた場合、経口摂取後はアミノ酸に分解されて吸収されてしまうので、立体構造はあまり関係がないのです。しかし、食品加工用酵素や食品添加物としてのタンパク質は立体構造と機能の関係を議論することができます。これらのテーマについては、まだ研究の初期段階にあるので、後日、別の機会にてご報告できれば、と思います。

もうひとつ、こちらに来てから始めた研究テーマは、NMRによる食品メタボロミクスです。食品はさまざまな有機化合物の混合物なので、試料を精製せずにそのまま測定試料として用いるメタボロミクスの良い研究対象です。メタボロミクス分野では、LC-MSを使用した解析が主流ですが、NMRメタボロミクスでは、測定前処理が簡単である、非破壊的である、定量性がある、二次元NMR法により成分の同定が可能である、といったNMRの特徴を活かしたアプローチが可能です。

NMRを用いた食品メタボロミクスの分野では既にワイン、ジュース、日本酒、コーヒーなど数多く



図1 生体分子機能学研究室のメンバー

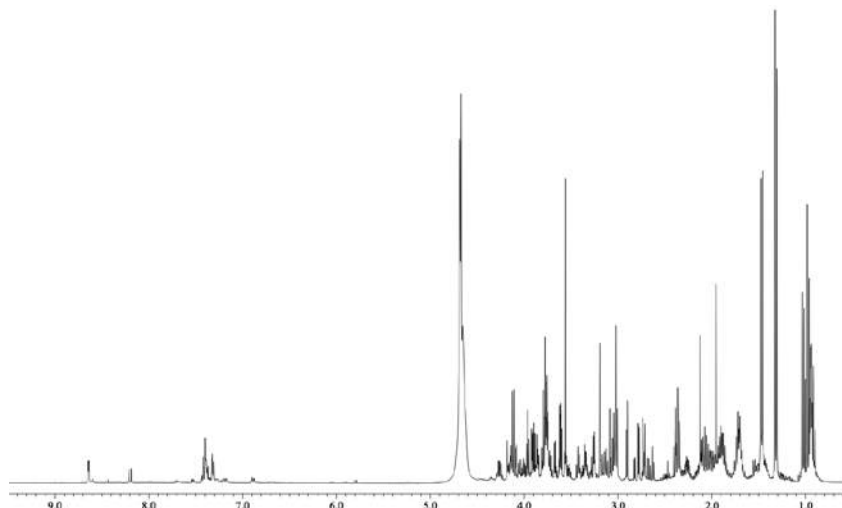


図2 石川県輪島市A商店が製造したいしるの¹H-NMRスペクトル

の研究がなされています。そこで、地域密着型大学の特性にマッチする研究対象として、現在、魚醬のNMRメタボロミクスに取り組んでいます。魚醬は、魚を塩とともに樽に漬け込み、数ヶ月の発酵作用により生じる液体状の調味料です。主にアジアで生産されており、東南アジアのナンプラー、ヌクナム、秋田県のしょうつるが有名です。石川県でも魚醬が生産されており、いしると呼ばれています。いしるの400MHz¹H-NMRスペクトル(図2)を測定すると、意外に信号の分離がよく、アミノ酸、有機酸が豊富に含まれていることがわかります。石川県、秋田県、北海道、および東南アジアの魚醬製品を約40種収集してNMRスペクトルを測定し、主成分解析したところ、製品を特徴づける成分を数種類、同定することができました。これらの成分の含有量は、原料魚種や製造方法、さらに、発酵過程における菌叢を反映していることがわかりました。

国際食品規格を制定するコーデックス委員会において魚醬中のヒスタミン濃度は400ppm未満が望ましいとの勧告が制定されています。ヒスタミンはアレルギー疾患の原因物質とされていますが、ヒスチジンを前駆体として、魚醬の発酵過程で生成されることがあります。魚醬に含まれるヒスタミンの濃度をNMRで定量したところ、さいわいなことに、市販されている魚醬製品でヒスタミン濃度がコーデックス規格を超えたものはありませんでした。ただし、魚醬中のヒスタミン濃度は製品ごとに大きなばらつきがあることから、今後は、製造過程におけるヒスタミン産生微生物の制御方法を考案する必要があります。

以上のように、魚醬のNMRメタボロミクスは、

地域特産食品のブランド保護および品質管理に役立つものと期待されます。

3. NMR 装置

本学には溶液400MHz NMR装置(図3、日本電子ECX-400P型)が一台あります。プローブはチューナブルの5φ型と10φ型です。5φプローブは通常の溶液高分解能スペクトルの測定に、10φプローブは食品(米や麺など)をそのまま試料管に入れて緩和時間や拡散係数の測定に使用しています。薬学部や理学部とは違って有機合成の研究室が無いのでマシンタイムには余裕があります。定量的な実験をするにはじっくり腰を据えて測定する必要がありますのでいい環境だと思います。

高感度・高分解能のスペクトル、あるいは、タンパク質立体構造解析のための多次元スペクトルの測定は、北陸先端科学技術大学院大学(大木進野教授)の800MHz NMR装置を使用させていただいています。また、北海道大学の先端NMRファシリティ(出村誠教授)に測定を依頼することもあります。



図3 石川県立大学の400 MHz NMR装置
(日本電子ECX-400P型)

す。本学のような小規模大学では高磁場NMR装置を維持・運営することは困難なので、近隣の共同研究者の存在やNMR装置共用化の仕組みはたいへんありがたいと感じています。

最近になって、2016年度で本学を定年退職された石田信昭教授から小型MRI装置(図4)を譲っていただきました。永久磁石を用いているので静磁場は0.2T(^1H 共鳴周波数8.9MHz)と弱いですが、プローブ径が110mmと大きいので、肉類、果実、野菜などをそのままのかたちで断層画像を測定することができます。この装置を使って、今後は食品のMRI研究にも取り組んでいきたいと考えています。



図4 石川県立大学の小型MRI装置(永久磁石0.2T)

4. 教育について

大学教員の仕事は研究と教育が二本柱である、とよく言われます。この学会誌の主な読者層はバリバリの研究者のようですので、ふだんは研究がメインで教育はサブみたいな感じで毎日お仕事されているのだと思います。一方、大学教育はいま大きく変わりつつあって、知識伝達型の授業から知識活用型の授業への転換、さらに、教える側の視点ではなく学ぶ側の視点に立った授業デザインの必要性が議論されています。いわゆるアクティブラーニングといわれる授業形態で、わたしたち大学教員はその流れと無関係ではられません。恥ずかしながら前職では教育にはまったく関心が無かったのですが、本学に着任してから週に数コマの授業を担当

するようになって、一方通行の講義形式では、居眠り、スマホいじり、私語、遅刻などを防止できないことを痛感しました。そこで、授業中に学生の活動を盛り込むように授業デザインを見直し、学生にグループディスカッションやプレゼンテーションをしてもらい、学生自身が考え、議論する時間を設けました。その結果、前述のような問題点が解消され、授業アンケートでもよいレスポンスが得られていますし、全体の成績評価も向上しています。

この学会誌の読者の大多数は研究者で、かつ、理科系教員でもあると思います。授業デザインで試行錯誤しているかた、悩んでいるかた、問題点を共有して、よりよい授業デザインを一緒に考えてみませんか？



小椋 賢治(おぐら・けんじ)

1990年北海道大学大学院理学研究科高分子学専攻修士課程修了

日本電子株式会社、東京都臨床医学総合研究所研究員、北海道大学薬学部助手、北海道大学先端生命科学研究院特任准教授を経て

2014年4月より石川県立大学食品科学科教授

1999年理学博士

九州大学先導物質化学研究所 物質機能評価センター

九州大学先導物質化学研究所

出田 圭子

keiko@cm.kyushu-u.ac.jp

はじめに

物質機能評価センターは先導物質化学研究所（以下、先導研）の中に置かれた分析を専門とした組織です。先導研は国立大学附置研究所の1つで、機能物質科学研究所と有機化学基礎研究センターが統合され、2003年に発足しました。それとほぼ同時に所内の大型分析機器と技術系職員を集約した研究支援センター（2010年に物質機能評価センターと改名）も誕生しました。

先導研は統合前の2組織がもともと異なるキャンパスにあったため、現在も筑紫キャンパスと新キャンパスである伊都キャンパスの2つに分かれています。物質機能評価センターに関しても少し前に伊都分室が設置されましたが、今回は筑紫キャンパスのみ紹介させていただきます。

センターでは共通機器のすべてを外部に公開するという所の方針のもとに機器の公開を行い、少しずつ学内外からの利用を増やしながらこれまでの十数年過ごしてきました。当初3名であった技術系職員は装置や業務が増えるにしたがって増員され、現在は6名です。各種分析のほか、所内の環境安全管理やネットワーク型事業に関する業務を行っています。せっかくこのような機会をいただきましたので、800MHz固体NMRを紹介する前に、センター技術職員の業務を紹介させていただければと思います。

研究所の中の技術・分析部門として

所有している主な装置は、NMR、ESR、単結晶及び粉末X線構造解析装置、電子顕微鏡、各種質量分析計等です。小さいものを含めると20台を超えるので、一人5台くらい面倒を見るのは普通です。随時装置の更新等があるので、新たに導入する装置についてはもちろん、装置のバージョンアップやアタッチメント追加を検討するため、なかなか難しいのですが、各研究室の研究内容を把握し、装置の新機能や新しい測定法・分析法などを紹介

できるよう努めています。

私の担当はもちろんNMRですが、ESRやDSC、CDなども担当しています。ESRが導入された際にはNMRと似ているからと当然のように面倒を見ることになりましたが、NMRとは勝手が違い途方にくれました。

日常の仕事は装置の管理や操作方法の指導のほか、専門性が求められる場合はそれぞれの研究をお手伝いすることもあります。また、九大全体の共同利用施設である中央分析センターや、分子科学研究所が中心となっている大学連携研究設備ネットワークを通じて送られてくる学内外からの試料の受託分析も年々増えています。ここまでは専門的な業務ですが、大学の技術職員の仕事はそれだけではありません。

分析にまつわる仕事も利用状況の集計、新規装置の料金設定、分析相談から試料のやりとり、請求手続き等、いろいろと複雑ですが、センターには事務職員・秘書という事務を専門に行ってください方はいないため、分析等の合間に行います。分析以外の仕事はネットワーク・サーバーやセキュリティ関連、最近増えたテレビ会議やWeb配信、エアコンや省エネ電灯・電子錠など職場の環境整備、危険物の管理、ボンベ管理ドラフト点検などの安全衛生関連、所のパンフレットや要覧作成などいろいろこなします。

NMRの技術職員として

NMRに直接かかわっているのは2名ですが、5台のNMRの液体窒素、液体ヘリウム供給は職員全員の仕事となっており、NMR担当としては助かっています。

先導研筑紫キャンパスは研究室数が10くらいと多くはありませんが、基礎化学から実用材料まで幅広く、面白い試料には事欠きません。また、小規模なだけに、多くの先生と、ふと廊下ですれ違った際に「今度こんな測定がしたいけど、できるかな？」

と言われる距離感です。気軽に問い合わせられるのはお互いにとっても良いと思いますが、2001年に着任した時はごく基本的な測定しか知らなかったので試練の連続で、 ^{13}C スペクトルの面積を取りたい、 ^{29}Si -DEPTを測ってほしい、Saturation transferで活性化エネルギーを求めてほしい等々の要望は途切れることがなく、学生さんに指導したり、測定を請け負ったりするのですが、自力では分からない事も多く、周りにいる先生を捕まえて尋ねたり、メーカーさんに連絡したりして細々と経験値を増やしていきました。これらの溶液測定はLA600(2004年に分光計をECA600に更新)で行っており、この時代はFGプローブにはオートチューンがついておらず、手作業にてチューニングやプローブ交換をする必要があり、また多核の要望が多いため、その後の固体測定を覚えるのに役立ったと思います。現在のECA600にはDOSY測定のために30Aの磁場勾配電源を備えていますし、低周波核用のプローブも備えており、年数は経っていますが今もよく働く装置です。

ECA400は開所とほぼ同時に導入された、先導研初の固体NMRであり、「すべての大型装置は公開」という方針に最も苦労した装置の1つです。研究所で初めての固体NMRということで経験者ほぼゼロ、初心者の自分がメーカーさんとやりとりしながら、手探りの状態で他人の試料を測定するという状況のため綱渡り的なことも多かったです。この時のプローブは6mmのCPMAS probeのみで、MQMAS等のパワーが必要な測定は難しい仕様でしたが、それでも測定すべき試料が次々と送られてきましたし、当初予想していた ^{13}C CPMASだけでなく、 ^7Li , ^{11}B , ^2H , ^{31}P , ^{29}Si , ^{27}Al , ^{51}V などの多核を測

定する機会を得て、固体NMRの需要を強く感じました。

ECA800との出会い

先導研には共通のNMR以外に、固体無機物質を主なターゲットとしているJEOL-ECA800があります(図1)。ゆんそんほ 尹聖昊 先生、みやわきじん 宮脇仁 先生の研究室所属ですが、NMR専門の技術職員ということで、多くの分析に関わらせてもらっています。この装置の仕様を考え始めたのはECA400導入の3~4年後でした。その当時の私の仕事は、先生方の要望を仕様に反映させる作業が主でしたが、直前に行った固体測定の経験が生かされ、また400MHzでは諦めざるを得なかった測定がもうすぐできるという期待感もあり、貴重で楽しい作業でした。多くの方に相談に乗って頂いたことも、その後のNMRにまつわるすべてのことに役立っています。

800MHzでは無機材料の固体NMRを測定するために、複数のプローブを備えています。プローブはすべて3.2mm径で、 ^1H と多核のCPMASプローブのほか、1チャンネルで感度の良い2本のMQMASプローブ(通常の周波数範囲と低周波核用)があります。また ^{27}Al - ^{29}Si に設定されたXYプローブと、バックグラウンドフリーの ^{19}F プローブは微量の ^{19}F 測定が可能ですし、STMASプローブは感度の良い ^{27}Al , ^{23}Na のSTMAS測定が可能です。これらのプローブは装置の木枠の中に棚を作ってもらい、図2のように保管してあります。

STMAS 測定の準備

STMASはMQMASと同様二次の核四極子総合作用を除去する測定法でMQMASより感度が良い



図1 ECA800の外観



図2 プローブの収納の様子

測定法です。精密なマジックアングルが要求されるため、調整後に試料管の交換ができません。そのため仕切りのある専用の試料管を使います。ボトムキャップ側に少量の調整用試料を、スピニングキャップ側に測定試料を入れ、一度調整したら測定が終わるまでプローブは降ろしません。測定試料とマジックアングル用の試料を同時に試料管に入れるので、 ^{27}Al の測定を行う際には ^{23}Na でマジックアングル調整を行います。調整と言ってもこの作業はSTMAS測定そのものなので、角度を変えるごとに数分の測定を行い、スペクトルを確認するという苦行です。所有するSTMASプローブで ^{79}Br も測定できるとわかってからは、まずKBrと Na_2SO_4 の混合試料を用意して、KBrで調整後に Na_2SO_4 のSTMASを行うようにしています。マジックアングルの正確さがどの程度STMASスペクトルに影響を与えるのかを見てもらうため、マジックアングルの精密調整前後の標準試料 Na_2SO_4 のSTMASスペクトルを図3に示します。このスペクトルを得た時の達成感は大変大きく、ここまで来たら ^{27}Al を測定するだけです。

おわりに

以上、先導研の物質機能評価センターとそこから少しはみ出した800 MHzの測定風景を一部紹介させていただきました。

最後に測定指導や修理メンテナンスを行ってくださるメーカーの皆さま、日頃からサポートしてくださっているNMR関係者の皆さまに感謝いたします。

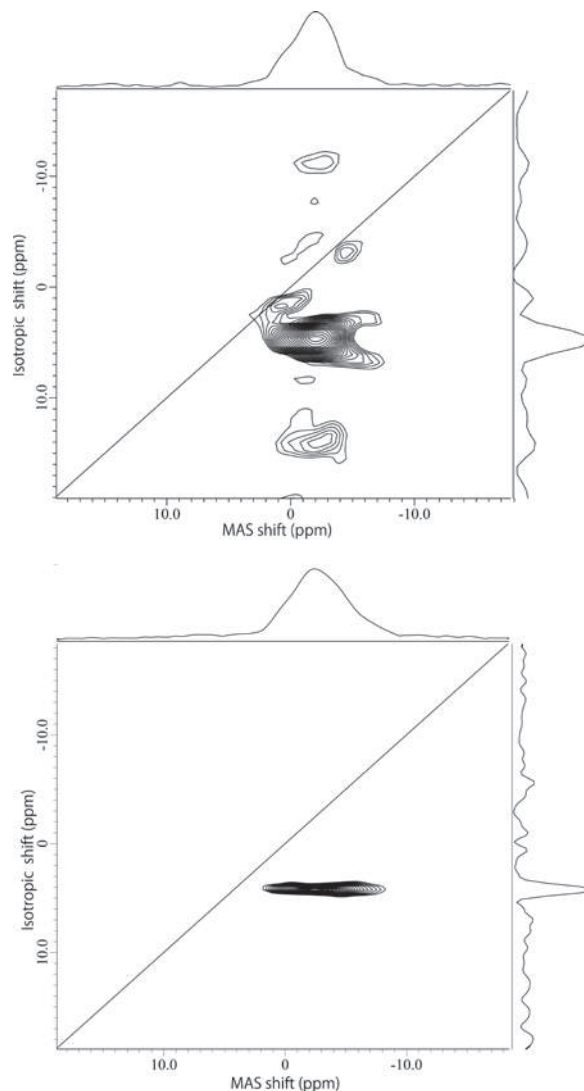


図3 Na_2SO_4 のマジックアングル調整前(上)、調整後(下)の ^{23}Na -STMASスペクトル



出田 圭子 (いでた・けいこ)

H6年3月 九州大学工学部応用化学科 卒業

H6年4月 九州工業大学情報工学部生物化学システム工学科 技官

H13年10月 九州大学機能物質科学研究所 技官

H15年4月 改組により 九州大学先導物質化学研究所 技術職員

株式会社三井化学分析センター 構造解析研究部

株式会社三井化学分析センター構造解析研究部

佐藤 浩子

Hiroko.Sato@mitsuichemicals.com

株式会社三井化学分析センターは、1999年に三井化学株式会社の試験・分析部門を機能分社して設立された受託分析会社です。三井化学の樹脂製品、機能製品の研究開発や品質管理における長年の分析業務を通じて、高い分析技術とともに、樹脂製品、機能製品についての豊富な知見を蓄積してきました。これらの技術と知見は三井化学グループ外のお客様にも広くお役に立てるものと考え、積極的に事業展開を進めております。現在では様々なお客様の製品開発やトラブル対応などのニーズにお応えし、信頼を頂いております。分析拠点としては、三井化学の各工場地区（千葉県市原市・愛知県名古屋市・大阪府高石市・山口県岩国市・福岡県大牟田市）と研究地区（千葉県袖ヶ浦市/茂原市）にラボを構え、NMRは大阪、岩国、大牟田、袖ヶ浦、茂原の各所に配備されています。なかでも構造解析研究部が本拠地とする袖ヶ浦では、溶液NMRと固体NMRを用いて、温度可変測定、多核測定を含む種々のNMR測定・解析を実施しており、連日多くの分析試料が持ち込まれています。

依頼試料の多くは、ポリオレフィン、ポリエステル、ポリアミド、ポリイミド、ポリウレタンなどのポリマー材料です。ポリマー材料は身の回りの様々なものに使われており、それぞれの用途において必要な機能を発揮することが要求されます。ポリマー開発の現場では、望む機能を発現させるための物性制御とそのため樹脂設計が行われており、NMRは各種ポリマー材料のモノマー組成、連鎖分布、立体規則性、末端構造といった一次構造評価を通して、ポリマー開発に重要な役割を果たしています。また、そのままでは溶媒に溶けない耐溶剤性ポリマーや、様々な成分を含有するコンパウンド製品の場合は、加水分解や溶媒分別等の前処理を加えたうえでNMR分析を行い、一次構造情報を取得しています。熱分解GC-MSや高温GPC、グラファイトカーボンカラムを用いた高温LC^[1]など、NMR

以外の新旧様々な手法を組み合わせる総合的に解析するケースもあります。

近年、ポリマー材料は高機能化が進み、より複雑な、あるいは、より微細な構造制御がなされるようになってきました。それに伴いNMR分析についても、従来の評価法だけでは通用しなくなりつつあり、より高度な評価法の開発が望まれています。こうした背景から、弊社ではNMRによる新しい評価法の開発に取り組んでおり、以下にその例を紹介します。

① ¹³Cの定量性と感度の両立

～改良 Q-POMMIE (Quantitative Phase Oscillations to Maximize Editing) 法^[2,3]～

ポリオレフィンの一次構造解析において¹³C NMRは極めて有効な手法です。ここで評価されるモノマー連鎖分布や立体規則性などの構造パラメータは、数ある分析手法のうち¹³C NMRでしか求められないものが少なくありません。これらのパラメータは材料の物性を決定づける因子として重要なものであり、時に非常に厳密な精度を求められることもあります。

近年、世の中ではNMRによる定量分析；qNMR (quantitative NMR) が注目されており、分析条件を最適化することでNMRでも高精度の定量分析が可能であると考えられるようになってきました。しかしそれは感度に優れる¹H NMRや¹⁹F NMRでの議論であり、低感度な¹³C NMRは高精度の定量分析には適さないと言われているようです。確かに、NOEによる感度増強を狙った通常の¹³C NMR測定（完全¹Hデカップリング；CPD法）ではNOEの効き方が官能基ごとに異なり定量性に欠けますし、定量モードとも呼ばれるインバースゲートデカップリングによる¹³C NMR測定（IGD法）は、感度増強分を補うために非常に長い測定時間を必要とするため現実的ではありません。現状、ポリオレフィンの定量分析においては、CPD法で測定し、NOEによる感度増強が同等のシグナルを選択して解析に用い

る、といったことが広く行われています。しかし、精度に対する要求が厳密化する中、また、様々な新規ポリマーが次々に開発される中、定量性に欠けるCPD法でその都度適切なシグナルを選択する従来の方法では限界があります。IGD法の定量性とCPD法の感度増強を両立できないかと考え、目を付けたのがスピン結合を介した分極移動です。

分極移動による感度増強はスピン系 (CH , CH_2 , CH_3) とカップリング定数 ($^1J_{\text{CH}}$) に依存します。Jiangら^[4]が提案したQ-POMMIE法は、2種の測定パラメータ ($\Delta = 1/(2^1J_{\text{CH}})$ とリードパルスの位相 ϕ) を適切に組み合わせることで、 $^1J_{\text{CH}}$ 範囲 90 ~ 230 Hz のスピン系について、シグナル感度を等しく約2倍に増強することが可能です。彼らにより最適化された測定パラメータの組み合わせは Δ 8 通り \times ϕ 6 通りの 48 通りにもおよびますが、ポリオレフィンの場合 $^1J_{\text{CH}}$ はいずれのスピン系も 125 Hz 近傍ですので、 $^1J_{\text{CH}}$ 範囲を 125 Hz 近傍に限定して最適化することにより、測定パラメータの組み合わせは Δ 1 通り \times ϕ 6 通りに大幅に簡略化され、さらにシグナル感度は計算上は約3倍に増強できると予想されました (表1、図1)。そこで実際に $\Delta = 1/$

(2^1J_{CH}) = 4 ms に固定し、 ϕ を変化させ、各スピン系のシグナル感度増強が理論通りの挙動を示すか確認したところ、実測値は理論値より低い結果となり (図2)、計算で得られた6通りの組み合わせは実際には適用できないことが分かりました。しかし ϕ が 122.76° の時に各スピン系の実測シグナル感度が等しく約2倍に増強されていたので、この条件 ($\Delta = 4$ ms、 $\phi = 122.76^\circ$) でポリオレフィンのQ-POMMIE測定を実施することとしました。この測定を以後、改良Q-POMMIE法と呼びます。

図3にポリ4-メチルペンテン-1 (P4MP) の各種 ^{13}C NMR スペクトル ((a) 改良Q-POMMIE法、(b) IGD法、(c) CPD法) を示しました。積算回数は全て同じで、主鎖 CH_2 のシグナル強度を 1.00 で規格化し基準値としています。定量性に着目すると、IGD法および改良Q-POMMIE法は全てのシグナルが基準値から4%以内のずれに収まっており、どのシグナルも解析に用いることができますが、CPD法ではNOEの大きい側鎖 CH_3 で27%ものずれが生じており、このシグナルを用いるのは適当ではありません。一方感度に着目すると、IGD法のノイズレベルが最も高く、CPD法、改良Q-POMMIE法

表1 Q-POMMIE法の測定パラメータの組み合わせ

(a) Jiangら^[4]による $^1J_{\text{CH}}$ 範囲 90-230 Hz で最適化した組み合わせ、(b) $^1J_{\text{CH}}$ 範囲を 125 Hz 近傍に限定して最適化した組み合わせ。

	$^1J_{\text{CH}}$ (Hz)	Δ (ms)	ϕ (°)
(a)	90-230	1.331, 1.922, 1.995, 3.321, 3.346, 4.094, 5.292, 6.987	80.2, 106.3, 112.4, 114.6, 130.5, 149.7
(b)	125	4.000	90, 120, 125, 128, 140, 149

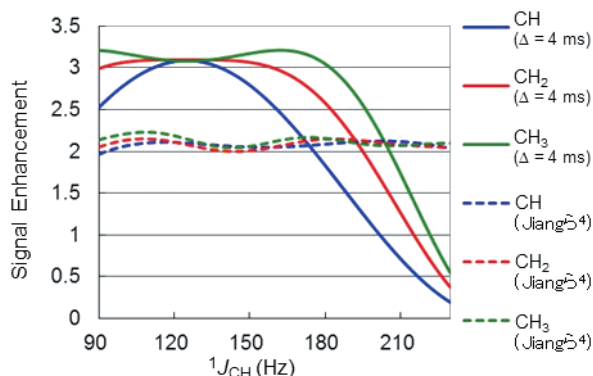
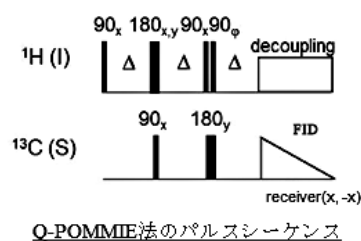


図1 Q-POMMIE法によるシグナル感度増強計算値 (実線は $^1J_{\text{CH}}$ 範囲を 125 Hz 近傍に限定して最適化した $\Delta = 4$ ms の組み合わせ (表1 (b)) を用いた場合、破線は Jiangら^[4]による組み合わせ (表1 (a)) を用いた場合) $\Delta = 4$ ms の組み合わせを用いた場合は、125 Hz 近傍の各スピン系のシグナル感度を等しく約3倍に増強できると予想される。

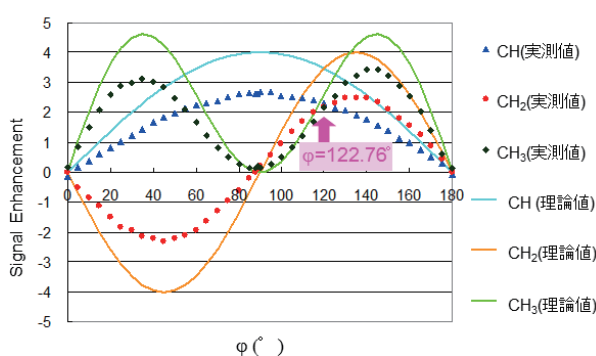


図2 $\Delta = 4$ ms に固定した時の ϕ と各スピン系のシグナル感度増強 (実線が理論値、点線が実測値) 実測値が理論通りの挙動を示していない。一方で、 ϕ が 122.76° の時に各スピン系の実測シグナル感度が等しく約2倍に増強されている。

の順にノイズレベルが低下しています。これらの結果から、改良Q-POMMIE法はIGD法に匹敵する定量性とCPD法を上回る感度を両立できていると言えます。ポリオレフィンの ^{13}C NMR測定に改良Q-POMMIE法を適用すれば、IGD法よりも短時間で全てのシグナルを用いた定量的な構造解析が可能になると期待されます。

② ポリオレフィンを混合物のまま構造解析 ～高温 ^{13}C -DOSY法～^[5]

NMRは混合物の構造解析が苦手ですので、まず精製して目的化合物を単離したうえでNMR測定す

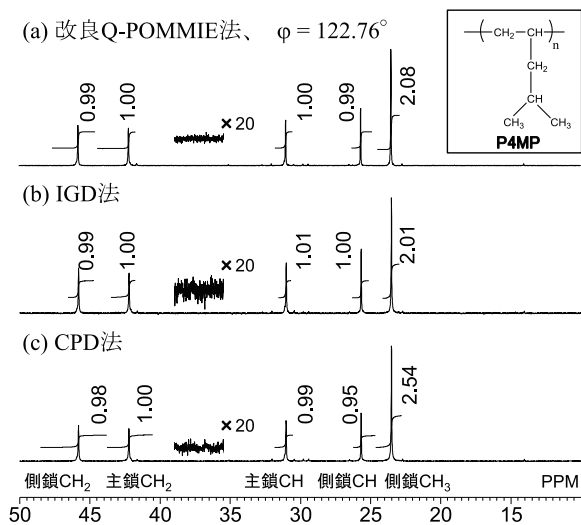


図3 P4MPの各種 ^{13}C NMRスペクトル ((a) 改良Q-POMMIE法、(b) IGD法、(c) CPD法)

測定装置はJEOL ECA500 (124.50 MHz)、フリップ角 90° 、繰り返し時間20秒、積算回数1536回。主鎖 CH_2 のシグナル強度を1.00に規格化して各シグナル強度を表示した。

るのが定石です。そのような中、近年では混合物の構造解析にDOSY法が適用されることが多くなってきました^[6,7]。DOSY法は、複数の分子種から成る混合試料について、各分子種の自己拡散係数の差を利用してスペクトルを分離することができるため、分取操作等の煩雑な前処理が不要という大きなメリットがあります。ただし、これまでの報告の多くは低分子化合物や室温で測定可能な一部のポリマーについてのみであり、ポリエチレン等のポリオレフィンに適用した例は殆どありませんでした。理由は、ポリオレフィンのNMR測定温度が 120°C 前後とかなり高温であるためです。高温下では試料溶液中に発生する対流の影響で正確なデータが得られにくいため、高温測定が必須のポリオレフィン系試料へのDOSY法適用は難しいという現状がありました。また、脂肪族炭化水素のみで構成されるポリオレフィンは、 ^1H NMRから得られる情報があまりに少ないため ^{13}C NMRが効果的ですが、 ^{13}C 観測のDOSY測定には、「 ^{13}C の検出感度が低い」、「実験に必要なPFG (Pulse Field Gradient) 強度が ^1H よりもかなり大きく装置のハード的な制限がある」、等の問題があり、やはりポリオレフィンへの適用は困難と考えられてきました。

これらの問題を解決するため、我々は、 ^1H の磁化移動により ^{13}C 観測のできるINEPT-DOSY法と、対流の影響を低減する効果をもつDouble STimulated-Echo (DSTE)法を組み合わせたパルスシーケンス；DSTE-INEPTを作成しました。これにより、 ^{13}C シグナルを高感度で検出でき、 ^1H の拡

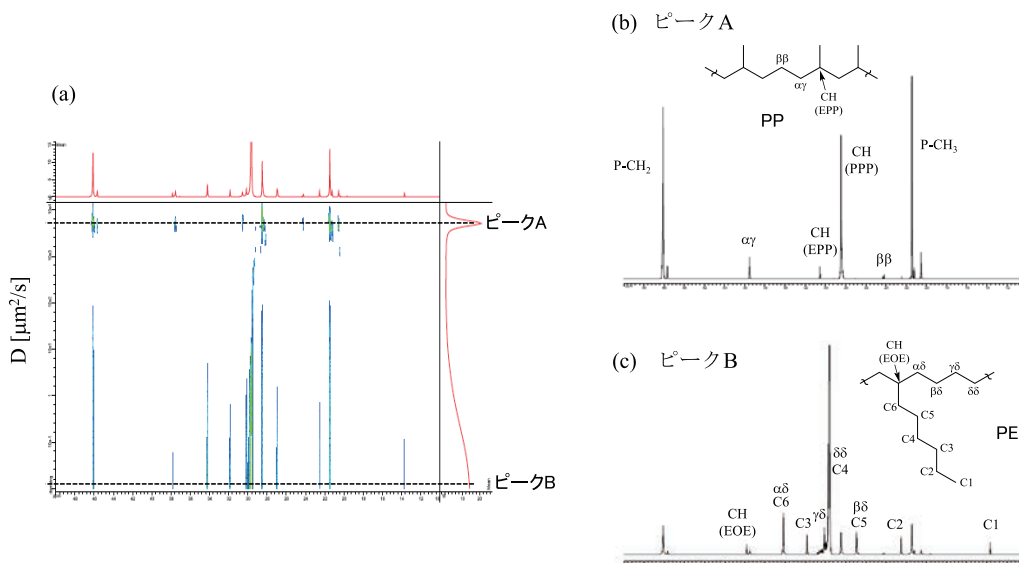


図4 (a) PEとPPから成る混合試料の高温 (120°C) DOSYスペクトル、(b) ピークAの1Dスライス、(c) ピークBの1Dスライス

DOSYスペクトルにおいて拡散係数の異なる2つのピーク (AおよびB) が観測された。各ピークの1Dスライスより、成分AはランダムPPであり、成分BはLLDPEであった。1Dスライスに構造式と帰属を付記した。

散条件(すなわち小さなPFG)で高温 ^{13}C -DOSY測定が可能となりました。なお、DOSYのデータ処理アルゴリズムは様々なものが提案されていますが、分子量分布を持つ試料に対して有効と言われる最大エントロピー法(MEM)が、我々の検討においても合理的な結果を与えていると考えられました。

図4(a)にポリエチレン(PE)とポリプロピレン(PP)から成る混合試料を 120°C で測定したDOSYスペクトルを示します。縦軸(拡散係数)を見ると、拡散係数の異なる2つのピークが見られ(下方のピークは途中で途切れていますが)、概ね2成分に分離しています。各成分の1Dスライス(図4(b)、(c))のシグナルパターンより、PP成分は少量のエチレンをモノマーとして含むランダムPP、一方、PE成分はオクテンをモノマーとする直鎖状低密度PE(LLDPE)であることが分かりました。

この事例から、高温 ^{13}C -DOSY測定によりポリオレフィン混合物の各成分のモノマー分析や連鎖構造解析(いずれも定性)が可能であることがお分かり頂けるかと思えます。今後は定性のみならず定量も目指し、さらに検討を進めたいと考えております。

以上、弊社が近年取り組んでいる、NMRによる新しいポリマー評価法検討の一部を紹介いたしました。ここでは社内で実施したポリオレフィン材料の話に偏ってしまいましたが、他にも、文部科学省「先端研究施設共用・プラットフォーム形成事業NMR共用プラットフォーム(平成27年度)」の課題として、理化学研究所様と共同で市販のポリエステル、ポリアミド等の末端基および微量構造の測定法開発にも取り組んでいます。末端基などの極めて微小なシグナルは、通常の測定ではポリマーの繰り返し構造や溶媒由来する巨大なシグナルに妨害されてしまい、 ^1H NMRであっても観測が困難な場合が多いですが、複数の周波数成分を持ち個々の励起範囲が数十Hzと狭い特殊なパルスを用いて複数のシグナルを選択消去するMultiple-WET(water suppression enhanced through T_1 effects)法を考

案し、超高磁場装置(900 MHz)に適用することにより、より選択性の高い、高感度な測定が実現しました^[8,9]。種々の末端基、部分構造が特定できるようになり、新しいポリマー材料の開発や、既存ポリマーの品質改良、用途開発などに役立つ方法として、各方面よりご注目頂いております。これからも日々進化するポリマー開発の現場を支えるべく、我々も分析法を日々改良して進化させ、分析会社という立場から社会の発展に広く貢献していきたいと考えています。

- [1] 山之上 巧(2017) 樹脂材料の総合的な分析・評価技術と組成分布解析法の目覚ましい進化. *工業材料* **65**, 31-36.
- [2] 茂呂 ふみか, 佐藤 浩子, 恩田 光彦(2014) Q-POMMIE法によるポリオレフィンの溶液 ^{13}C NMRスペクトルの定量性. 第63回高分子討論会予稿集.
- [3] Moro, F., Sato, H. and Onda, M. (2014) Quantitative evaluation of ^{13}C NMR peak intensity for polyolefin solution. 5th International Symposium on Polyolefin Characterization.
- [4] Jiang, B., Xiao, N., Liu, H., Zhou, Z., Mao, X. and Liu, M. (2008) Optimized Quantitative DEPT and Quantitative POMMIE Experiments for ^{13}C NMR. *Anal. Chem.* **80**, 8293-8298.
- [5] Hiroike, K., Sato, H. and Onda, M. (2015) Spectral separation of mixtures of polymers by diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) at high temperature. World Polyolefin Congress 2015.
- [6] Socha, A., Kagan, G., Li, W., Hopson, R., Sello, J. and Williard, P. (2010) Diffusion Coefficient-Formula Weight Correlation Analysis via Diffusion-Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (DOSY NMR) To Examine Acylglycerol Mixtures and Biodiesel Production. *Energy Fuels*, **24**, 4518-4521.
- [7] Durand, E., Clemaney, M., Quoineaud, A., Verstraete, J., Espinat, D. and Lancelin, J. (2008) ^1H Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) as a Powerful Tool for the Analysis of Hydrocarbon Mixtures and Asphaltenes. *Energy Fuels*, **22**, 2604-2610.
- [8] Tanaka, K., Oouchi, M., Hayashi, F., Maeda, H. and Waki, H. (2016) Structural Analysis of the End-groups and Substructures of Commercial Poly(ethylene terephthalate) by Multiple-WET $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR. *Macromolecules*, **49**, 5750-5754.
- [9] 大内 宗城, 田中 紀美子(2017) ポリマーの微細構造を正確に解析!. *化学* **72**, 19-24.



佐藤 浩子(さとう・ひろこ)

2000年 静岡大学大学院理工学研究科博士前期課程化学専攻修了

2000年 株式会社三井化学分析センター 入社

2010年 株式会社三井化学分析センター 構造解析研究部 主席研究員

第一三共株式会社 分析評価研究所

第一三共株式会社 分析評価研究所 研究第一グループ

丸吉 京介

maruyoshi.keisuke.p4@daiichisankyo.co.jp

はじめに

第一三共株式会社は、「革新的医薬品を継続的に創出し、多様な医療ニーズに応える医薬品を提供することで、世界中の人々の健康で豊かな生活に貢献する」という企業理念に基づき、生命関連企業としてふさわしい高い倫理観をもって企業活動を遂行しております。その中で、分析評価研究所は、医薬品の品質を正しく適切に保証するための様々な分析評価系を作り上げる部所として、品川（東京都）と平塚（神奈川県）の2拠点で研究を推進しています。

医薬品の研究開発については、新規な構造、あるいは薬理作用を有した化合物の創製に注目が集まりがちですが、化合物を医薬品に育て、高品質な製品として継続的に世の中に提供することも製薬企業の重要な使命です。医薬品の製品化に向けた研究開発には、原薬（有効成分）プロセス開発や製剤処方設計、それらの品質評価系の構築があり、これらを総称するCMC (Chemistry Manufacturing and Control) 研究の一翼を分析評価研究所が担っております。

CMC 研究における NMR

品質評価と一口に言っても、評価を行う項目は、有効成分の確認（確認試験）や含量値、混在する不

純物の定量（純度試験）、物性評価など、多岐にわたります。これらを検査するために、私たちは様々な分析機器・手法を利用しますが、NMRも有用な手法の一つになります。

現在、平塚研究所では、溶液/固体測定兼用機としてBruker社製AVANCE 400 (^1H 共鳴周波数400.13 MHz)、溶液/LC/NMR測定兼用機としてAVANCE 600 (^1H 共鳴周波数600.13 MHz)、固体測定専用機としてJEOL RESONANCE社製JNM-ECA 600 II (^1H 共鳴周波数588.18 MHz) の計3台を保有しています(図1、2)。このうち、AVANCE 600に関してはクライオプローブを装着しており、感度が求められる微量サンプルやタンパク質の測定に使用しています。

以下、当研究所において、これらの装置がどのように活用されているか、ご紹介いたします。

溶液NMR

溶液NMRについては、試料の化学構造が原薬や中間体に相違ないことを確かめるための確認試験、申請資料に記載するシグナル帰属のためのデータ



図1 LC(-SPE)-NMRシステム
(Bruker社製 600 MHz NMR装置)

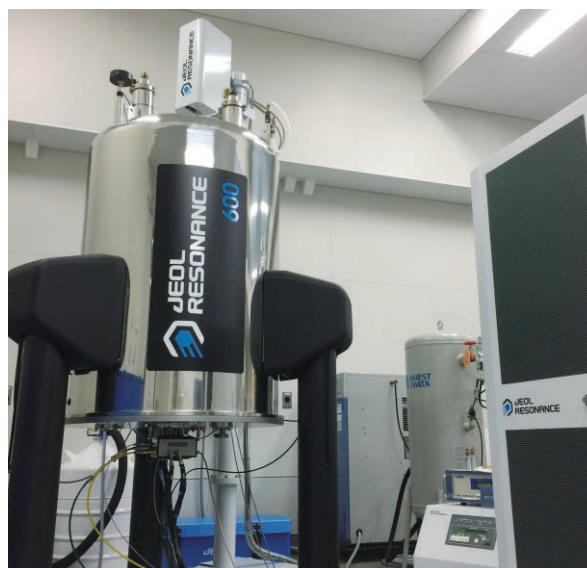


図2 固体専用機
(JEOL RESONANCE社製 600 MHz NMR装置)

取得、定量NMR、及び医薬品中に含まれる微量不純物の構造決定といった、主に低分子の評価に利用されています。

このうち、微量不純物の構造決定については、LC/NMRを使用しています。日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH)は、原薬及び製剤中に含まれる有機不純物について、安全性を保証するために投与量に応じた閾値を設定していますが、1日に投与される原薬の量が1~10mgの医薬品の場合、構造決定が必要とされる不純物の量は、原薬で0.1%、製剤で0.5%(対原薬)と非常に低レベルです^[1,2]。

このような微量成分を高純度に単離・精製することは難しく、また、単離後に分解することがあるため、対象不純物を系外に取り出さずに測定できるLC/NMRが有効になります^[3]。基本的には、LC/MS測定から得た情報と¹H NMRスペクトルから不純物の構造を決定しますが、¹H NMRスペクトルからだけでは構造確定に至らない場合には、二次元スペクトルを取得します^[4]。特に¹H-¹³C相関二次元NMRスペクトルが必要な場合は、固相抽出(SPE)を組み入れたLC-SPE-NMRシステムを用いて、不純物を高濃度に濃縮、精製し、測定を行います^[5,6]。

固体NMR

固体NMRは、主に原薬の結晶形を評価するために使用しています。医薬品は複数の結晶形を持ち、個々の結晶形が固有の物理化学的特性を有するため、医薬品開発において結晶形を評価することは大変重要です。通常、原薬の結晶形評価には、粉末X線や熱分析が適用されますが、複数の結晶形を含む原薬や製剤のような多成分系を評価する場合など、これらの手法で解析が困難な試料に対しては、¹³C CP/MASで評価を行っています。CP効率を考慮すれば、シグナル強度から定量的な議論をすることも可能であるため、特に混合物の評価には固体NMRが重宝されています。また、分子のコンホメーションが類似した結晶多形に関しては、¹H DQ MASスペクトルを取得することもあります。さらに、¹H DQ MASの定量性が評価されたことにより^[7]、結晶多形の定量方法として¹H DQ MASも選択肢の一つになってきました。

原薬形態の評価として、固体NMRを用いた塩と共結晶の判別にも取り組んでいます。共結晶とは、同一結晶格子内に存在する2つ(あるいはそれ以上)のイオン化していない分子によって構成される

結晶性物質で、近年、欧米では共結晶に関するガイドラインが発行され、薬事規則上での区別が要求されています^[8]。現状、いくつかの判別方法が提唱されていますが、固体NMRでは、¹Hや¹³Cの化学シフトに加え、¹H DQ MASや¹H-¹⁴N HMQCスペクトルから得られる原子間の近接情報から、プロトン移動の有無を解析し、塩と共結晶を判別しています^[9]。

最近では、単結晶を必要としない結晶構造解析法として、固体NMRと粉末X線解析法を組み合わせた手法(NMR Crystallography)にも挑戦しています^[10]。

おわりに

以上、第一三共株式会社 分析評価研究所におけるNMRの利用例について簡単に紹介させていただきました。弊社ではNMRが医薬品の出荷の適否判定に関わる試験に使われる頻度はごく稀であり、むしろ品質評価系の妥当性を明確にするために活用されている、という状況です。

最近では、低分子化合物以外の抗体や核酸、低分子量タンパク質などの開発品を扱う機会も増えてきており、これらの次世代医薬品の品質評価においても、NMRが活用可能であることが分かってきました。製品そのもの(非標識試料)を用いてどのような実験・解析・評価を行うかは、引き続き議論と検討が必要ではありますが、他の分析手法では得ることが困難なユニークな情報を与えてくれるNMRに熱い期待が寄せられています。

「イノベーションに情熱を。ひとに思いやりを。」

第一三共が掲げるスローガンの下、分析評価技術力を磨き、その幅を広げていくためにも、今後もNMR技術の新しい活用法を見出すことに挑戦していきたいと考えています。

参考文献

- [1] 新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインの改定について(平成14年12月16日、医薬審発第1216001号)。
- [2] 新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドラインの改定について(平成15年6月24日、医薬審発第0624001号)。
- [3] Murakami, T., Konno, H., Fukutsu, N., Onodera, M., Kawasaki, T., Kusu, F. (2008) Identification of a degradation product in stressed tablets of olmesartan medoxomil by the complementary use of HPLC hyphenated techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 553-559.

- [4] Murakami, T., Fukutsu, N., Kondo, J., Kawasaki, T., Kusu, F. (2008) Application of liquid chromatography-two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy using pre-concentration column trapping and liquid chromatography-mass spectrometry for the identification of degradation products in stressed commercial amlodipine maleate tablets. *J. Chromatogr. A* **1181**, 67-76.
- [5] Murakami, T. (2009) Identification of Low-level Impurities in Pharmaceuticals by LC/MS and LC/NMR. *Bunseki* **418**, 549-554.
- [6] Murakami, T., Fukutsu, N. (2012) Structure Elucidation of Impurities in Pharmaceuticals by HPLC Hyphenated Techniques. *CHROMATOGRAPHY* **33**, 179-190.
- [7] Maruyoshi, K., Iuga, D., Watts, A.E., Hughes, C.E., Harris, K.D.M., Brown, S.P. (2017) Assessing the Detection Limit of a Minority Solid-State Form of a Pharmaceutical by ^1H Double-Quantum MAS NMR Spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* in press.
- [8] Guidance for Industry: Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals., U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (April 2013).
- [9] Maruyoshi, K., Iuga, D., Antzutkin, O.N., Alhaleh, A., Velaga, S.P., Brown, S.P. (2012) Identifying the intermolecular hydrogen-bonding supramolecular synthons in an indomethacin-nicotinamide cocrystal by solid-state NMR *Chem. Commun.* **48**, 10844-10846.
- [10] Watts, A.E., Maruyoshi K., Hughes, C.E., Brown, S.P., Harris, K.D.M. (2016) Combining the Advantages of Powder X-ray Diffraction and NMR Crystallography in Structure Determination of the Pharmaceutical Material Cimetidine Hydrochloride. *Cryst. Growth Des.* **16**, 1798-1804.



丸吉 京介 (まるよし・けいすけ)

2001年3月 大阪大学理学部化学科 卒業

2003年3月 大阪大学大学院理学研究科化学専攻博士前期課程 修了

2006年3月 大阪大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程 修了

2006年4月～2007年3月 三共株式会社 (現 第一三共株式会社) 分析評価研究所

2007年4月～現在 第一三共株式会社 分析評価研究所

2011年8月～2012年8月 英国ウォーリック大学 物理学科 客員研究員

(University of Warwick, Department of Physics, UK)

かんぽの宿紀伊田辺で開催された 第18回若手NMR研究会便り

大阪大学蛋白質研究所蛋白質構造形成研究室所属 博士3年

牟田 寛弥

h-muta@protein.osaka-u.ac.jp

初めまして、『第18回若手NMR研究会』(以下、研究会)にてスタッフを務めました、大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質構造形成研究室所属の牟田寛弥と申します。

本研究会は、核磁気共鳴 (NMR) 法を使用して研究活動を行っている全国の研究者による、合宿形式の研究交流会です。毎年、学生もしくは若手研究者が主体となり、様々な分野の最先端の研究現場で活躍するNMR法について、その原理と応用を学び合う大変刺激的な会として盛り上がりを見せています。和歌山県田辺市で行われた今年の研究会も無事に盛況を収めましたので、その旨をお伝えいたします。

会 期：2017年9月2日(土)～4日(月)

会 場：和歌山県・田辺市・かんぽの宿紀伊田辺

かんぽの宿紀伊田辺HP：

<https://www.kanponoyado.japanpost.jp/kiitanabe/>

規 模：総勢70名

第18回研究会HP：

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/wakatenmr2017/>

綺麗な海を一望できる抜群のロケーションで開催

毎年研究会は、温泉地や山間部の宿で開催され

ています。今年は、夏の暑さの残る9月上旬に、海水浴で賑わいを見せる和歌山県南紀は、田辺市の温泉宿ということもあって、ロケーションは抜群でした。

宿の客室の窓からは、透明度の高いエメラルドグリーンな海を臨むことができます。2日目には自由散策の時間も設けました。天候にも恵まれ、会期を通して快晴でしたので、会場の宿の対岸にあたる小島(元島)を始め、沿岸部を散策し、綺麗な海を存分に満喫できました。

NMRの基礎から応用まで

もちろん南紀の豊かな自然だけでなく、みっちり勉強も詰め込みました。

1日目は開会の挨拶とともに現在横浜国立大学に所属していらっしゃる児嶋 長次郎 先生より、NMRのパルスシーケンスにおいて磁化の動きを追う際に必須となる、プロダクトオペレータ(直積演算子)の計算の基礎的内容を講演していただきました。

パルスシーケンスを書いたことのある人ならば、普段から慣れ親しんだ計算ですが、初心者の方や構造解析ツールとしてNMR測定を行っている方はかなり手こずっておりました。

しかし、児嶋先生の分かりやすい講演のおかげで、NMR測定の複雑な原理のブラックボックス化も改善されたのではないのでしょうか。



写真1 会期中に撮影した集合写真



写真2 宿からの眺め。対岸の元島と弁財天を祀る大鳥居を一望できる



写真3 オープニング、児嶋 長次郎 先生の講演中の様子



写真5 大盛り上がりとなった近畿大学水産研究所の招待講演



写真4 黄田 育宏 先生の招待講演の様子



写真6 会期中に行われたポスター発表の様子

以上の基礎を踏まえた上で、最新鋭の研究成果の講演が後に続く構成としましたので、普段の学会よりも内容の理解が進んだことと思います。

特に今回参加者の半数を占めていた大学院生の方には、自身の研究力を高める大変良い機会になったことでしょう。

NMR測定をさらに進化させる！

今回も協賛をいただいている、ブルカー・バイオスピン株式会社、日本電子株式会社 (JEOL) の企業セミナーがございました。日々進歩していく技術により、より高感度・高分解能に、または多核種で測定できるツールやソフトウェアの進歩に参加者ともども舌を巻いておりました。研究には大学だけでなく、実験装置や試薬を提供して下さる数々の企業の方々との繋がりも重要です。この場を通して、企業と大学との深い繋がりがより多く得られたことでしょう。

さらに、今回はまさに最新鋭の研究紹介として、情報通信研究機構 (NICT) 脳情報通信融合研究センターより、黄田 育宏 先生をお招きし、匂いを感じる脳の動きを核磁気共鳴画像 (MRI) 法から解析するという研究成果をご講演いただきました。脳の動きが映像で見えるというエキサイティングな研究に、会場は沸き立ちました。

近畿大学水産研究所より特別講演

今回は、研究会の主催に近畿大学の先生ならびに学生の方々に協力していただきました。また会場が南紀ということで、白浜に所在する近畿大学水産研究所から、家戸 啓太郎 先生をお招きし、特別講演をしていただきました。

講演内容は、ゲノム編集技術を用いた最新鋭の品種改良の研究でした。研究会の参加者は、生体分子について研究されている方がほとんど。CRISPR/Cas9 (クリスパー・キャスナイン) を用いたゲノム編集技術と来れば、皆さんの注目度は否が応にでも高まりました。まるで、近未来作品の世界に入ったような内容。人類の技術の進歩と、それを正しく発展させるにはどうすれば良いのか。分野外の研究内容にもかかわらず、議論の活発度合は最高潮を見せました。

研究者同士の交流も活発でした

研究会は最新鋭の研究成果を共有し、知識を深めるだけでなく、議論や会話を通して研究者同士の交流を深める目的もあります。

初日の夕食後には、恒例の研究室紹介が行われ、それぞれの所属する研究室を紹介し、アイスブレイキングとしました。その後の懇親会を経て、打ち解けた面々の中で、2日目は学生によるポスター

発表が行われました。

親睦が深まったのちの発表ということもあり、いつもより鋭く、深い指摘もあり、発表者にとっては大変に刺激的な経験になったのではないのでしょうか。

おわりに

南紀の豊かな自然の中、天候にも恵まれ、今年で18回目となる研究会は盛況のうちに幕を閉じました。これも、主催およびスタッフを受け持ってくださいました方々、ご講演をいただいた方々、ご協賛をいただいた方々、ならびに会場を提供していただいたかんぼの宿紀伊田辺の皆様のおかげでございます。この場をお借りしまして、御礼を申し上げます。

次回第19回若手NMR研究会は、広島大学 分子生物物理学研究室が中心となって2018年に開催される見込みでございます。こちらの記事を読み、ご興味を持たれた方は、奮ってご参加のほどよろしくお願いいたします。

最後に、今回、ご講演をいただいた方々、ご協賛をいただいた方々を連名いたしまして、研究会の報告の終了といたします。

今回の招待講師の方々

児嶋 長次郎 先生 (横浜国立大学大学院 工学研究院)

廣明 秀一 先生 (名古屋大学大学院 創薬科学研究科)
 小林 直宏 先生 (大阪大学 蛋白質研究所)
 家戸 啓太郎 先生 (近畿大学 水産研究所)
 西村 慎一 先生 (京都大学大学院 薬学研究科)
 黄田 育宏 先生 (情報通信研究機構 (NICT)
 脳情報通信融合研究センター)

今回ご協賛をいただいた企業一覧 (お申し込み順)

株式会社シゲミ
 ブルカー・バイオスピン株式会社
 日本電子株式会社
 株式会社セルフリースサイエンス
 株式会社東京インスツルメンツ
 昭光サイエンス株式会社
 太陽日産株式会社

今回ご賛助をいただいた学術研究領域

新学術領域「動的構造生命」
 新学術領域「柔らかな分子系」
 新学術領域「動的秩序と機能」

特別謝辞

和歌山県 田辺市
 和歌山県 田辺観光協会
 かんぼの宿 紀伊田辺

第27回生体系磁気共鳴国際会議 ICMRBS京都大会の報告

生体系磁気共鳴国際会議 International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS) が1998年に八王子で開催されてから既に10年以上が経過しようとしていた頃、この間の研究の発展を踏まえて、再びこの国際会議をわが国で開催しようという機運が研究者の間で高まってきていた。おりしも、ICMRBSの国際評議委員会が、2012年にリヨン（フランス）において開催される第25回ICMRBSを機会に、2016年開催予定の第27回ICMRBS開催国候補の募集を始めた。これを受けて、日本核磁気共鳴学会理事会は本国際会議のわが国への招致に取り組むことを決定し、嶋田一夫教授（日本核磁気共鳴学会会長（当時）、東京大学大学院薬学系研究科）を中心とした招致準備委員会を2012年1月に設置した。この委員会で2016年ICMRBSの開催要項を決定し、



The 27th ICMRBS-2016 Kyotoのロゴマーク（天羽沙織さん作）。ホームページ、要旨集、会議トートバッグなどに利用され、参加者より大好評を得た。五重の塔は磁気共鳴（MR）の時間信号を、山は周波数信号を模している。

ICMRBS国際評議委員会に対して、本国際会議を2016年に国立京都国際会館で開催するとした要望書を提案した。2012年8月末にリヨンで開催された第25回ICMRBSでの国際評議委員会において、提案内容のプレゼンテーションに基づいて審査が行わ



京都国際会館メインホールにおける基調講演の様子。写真はfMRI法（機能的磁気共鳴画像法）の開発で著名な小川誠二先生。本講演の座長は2002年ノーベル化学賞を受賞されたKurt Wüthrich先生。



京都国際会館メインホールにおけるプレナリー講演の様子。写真は座長を務める嶋田一夫実行委員長。



京都国際会館メインホールにおける口頭講演の様子。プロジェクターなどの設備類も完璧にオーガナイズされており、たいへん居心地のよい会場であった。写真の後方2階にも座席が続くが、会場はしばしば満席になった。



200人規模の小部屋での口頭発表の様子。各セッションに特化した、より専門的な内容について質疑応答がなされた。写真は「膜蛋白質と脂質 II」セッションにおいて、有名なStephan Grzesiek先生の講演における質疑応答の様子。

れ、2016年は京都で第27回ICMRBSを開催することが決定された。これを受けて、わが国の生体系磁気共鳴関係の諸団体、および日本核磁気共鳴学会の協力を得て本会議の準備が進められ、2016年(平成28年)のICMRBS京都大会の開催に至った。

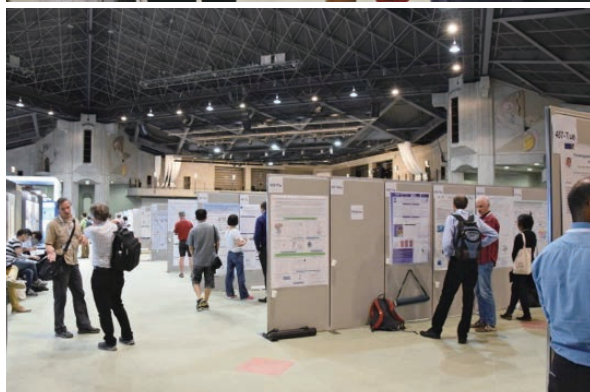
ICMRBS京都大会は、2016年8月21日(日)～8月26日(金)の6日間、京都市の国立京都国際会館にて開催された。甲斐荘正恒教授(首都大学東京)、阿久津秀雄教授(大阪大学)、嶋田一夫教授(東京大学)の3名の組織委員を中心に、オールジャパン体制で万全を期して開催に臨み、正規登録者772名(招待講演者117名、招待参加者18名、一般427名、学生197名、同伴者13名)、大会スタッフや出展企業を含めた総参加者982名を迎えることができた。また、30の国々からの参加があり、海外からの参加者は全体の約7割を占める大変国際色豊かな学会となった。多くの参加者やICMRBS評議員から最も成功した大会の一つであったとの評価を受けた。

学術プログラムはKurt Wüthrich博士(スイス連邦工科大学チューリッヒ校、2002年ノーベル化学賞受賞)の格調高いKeynote Lectureから始まり、Keynote Lectures 2演題、Plenary Lectures 8演題、

Award Lecture 1演題、24のParallelセッションで120演題、Poster 470演題(うち35件はoral発表もあり)、総演題数601の発表があった。日本からは、fMRI法(機能的磁気共鳴画像法)の開発者である小川誠二教授(東北福祉大学)のKeynote Lecture、クライオ電子顕微鏡法の開発者である藤吉好則教授(名古屋大学)と蛋白質の三重共鳴帰属法の開発者である伊倉光彦教授(トロント大学)のPlenary Lectureなどがあった。特に、藤吉先生の講演は印象的で、近年のクライオ電子顕微鏡による超高分解能のタンパク質構造解析が構造生物学の未来を大きく拓いている現状が伺えた。高分解能化に至った技術革新は、検出器の感度向上だけでなく、解析プログラムや試料調製法など周辺技術の改良も大きく影響しており、NMRの技術革新に極めて



Hospitality Suiteの様子。古都京都をアピールするような演出も行われた。Welcome ReceptionやBanquetも含め、全日、会場内で簡単ながらも夕食をとるようにスケジュールを工夫した。(写真上) Hospitality Suiteでの開会の挨拶(嶋田一夫実行委員長)。(写真下) 2002年ノーベル化学賞を受賞され、当国際会議で基調講演をされたKurt Wüthrich先生。



イベントホールにおけるポスター発表の様子。面積が広がったため、数百人が同時にディスカッションすることができた。アジア諸国をはじめ世界中の若手研究者が自らの研究成果を発表し議論する機会を得た。



最終日前夜に開かれた懇親会 (Banquet) 終盤の様子。会場の前のグランドプリンスホテル京都で行われた。前半は2年後の次回ICMRBS幹事(アイルランド)の挨拶や各種の表彰式なども行われた。



京都国際会館の周りにはあまりレストランが無いことが問題点であったが、全日お弁当(ベジタリアン対応もあり)を用意することによって対応した。

重要なヒントを与えているように思われる。また、若手研究者には、NMRが構造生物学にどのように貢献していくべきかを改めて考える良い機会を与えたようである。他にも、溶液NMRのJane Dyson博士(スクリプス研究所)、Gottfried Otting博士(オーストラリア国立大学)、Arthur G. Palmer III博士(コロンビア大学)、およびGerhard Wagner博士(ハーバード大学)、固体NMRのMei Hong博士(マサチューセッツ工科大学)とBeat Meier博士(スイス連邦工科大学チューリッヒ校)から、極めてレベルの高い重厚なPlenary Lectureがあった。また、Award Lectureは固体NMRのAdam Lange博士(ライプニッツ分子薬理学研究所)であった。その他の発表も極めてレベルが高く、国内外のNMR研究者を大いに刺激したと思われる。

学会公式の社交プログラムとしては、Welcome Receptionを初日の8/21(日)夜に京都国際会館スワン・庭園で、Conference Banquetを5日目の8/25(木)夜にグランドプリンスホテル京都プリンスホールにて開催したほか、希望者に対して4日目の8/24(水)午後エクスカッションを設けた。また、2日目の8/22(月)と3日目の8/23(火)は協賛企業主催のイベントやセミナー(企業night)が催された。学会期間中は、幸いにも晴天に恵まれたが、京都国際会館付近は日中33℃前後の真夏日となった。蒸し暑い日が続いたが、海外から来日された参加者も含めて、京都滞在を大いに楽しまれていたように見受けられた。今大会では、Welcome Reception、Conference Banquet、企業night、企業ブースなどを通じて、日本の文化が多数発信された。



受付登録の様子。参加者数が予想を上回ったため、英語での受付に慣れるまでに若干の混雑が見られた。受付や会場整理は近隣の大学の学部生や院生(60人)に協力していただいた。数時間後にはほぼ問題なく英語で対応できるようになり、良い経験となった。

最後になりましたが、厳しい経済状況のなかでこのような盛大な国際会議を開催できたのは多くの学会員の積極的な参加に加えて、関連企業、財団の厚いご支援のおかげです。また、株式会社JTBコミュニケーションデザインの方々には、企画から進行、まとめまで多くの業務でお世話になりました。アジアとりわけ日本の生体系NMR研究のレベルの高さや、日本の産業界の底力を世界に示す機会を与えていただき、組織委員一同、心から感謝いたします。

謝辞

北原亮先生(立命館大)よりVol.7掲載の資料を多数ご提供していただきました。ここに厚くお礼申し上げます。

ICMRBS 2016 組織委員会一同
(文責：児嶋長次郎、池上貴久)

新刊書籍紹介

日本NMR学会 NMR書籍編集委員長

内藤 晶

naito@ynu.ac.jp

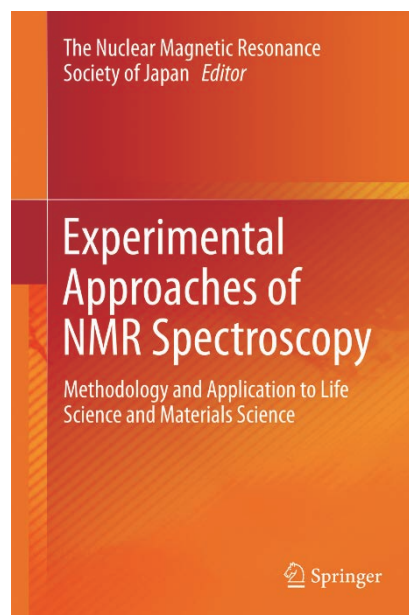
Experimental approaches of NMR spectroscopy
–Methodology and application to life science and
materials science–

The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan
Editor

Springer: ISBN 978-981-10-5965-0

日本NMR学会では表記タイトルのNMRの実験法に焦点を絞ったNMR書籍の出版を企画し、NMR学会にNMR書籍編集委員会（内藤 晶、朝倉哲朗、嶋田一夫、竹腰清乃理、山本泰彦）を設立してNMR書籍の編集を行ってきました。このほど、下に示す内容のNMR実験書籍がSpringer社より2017年10月28日頃出版される予定になりました。

本書では、現在NMR関連分野の最前線で研究をされている先生方に実験手法を中心にした研究の総説を執筆していただいております。Part Iでは、特に方法論の研究を中心に、高圧NMR法、同位体標識NMR法、NMRデータ解析法、DNP-NMR法、超高速MAS回転NMR法、光およびマイクロ波照射NMR法、緩和分散NMR法、常磁性プローブNMR法、固体NMRによる膜結合生体分子の構造解析法についての実験法の詳細が述べられています。Part IIでは、シルク材料のNMR、高分子材料のNMR、機能性材料の重水素NMR、天然物の



NMR、糖タンパク質のNMR、RNAのNMR、メタボリックNMR、常磁性物質のNMR、有機四極子核のNMR、無機四極子核のNMR、NMRによるタンパク質ーリガンド相互作用の解析法、残余異方相互作用を利用したタンパク質の立体構造と動的構造の決定法について、NMRの広範な応用研究が中心に述べられています。詳しくは本書籍についての出版社ホームページも併せてご覧ください。

<http://www.springer.com/jp/book/9789811059650>

Contents

Part I Methodology

- | | |
|------------------|---|
| Chapter 1 | Protein studies by high pressure NMR
Kazuyuki Akasaka |
| Chapter 2 | Isotope-Aided Methods for Biological NMR Spectroscopy: –Past, Present and Future–
Masatsune Kainosho, Yohei Miyanoiri, Mitsuhiro Takeda |
| Chapter 3 | Advances in NMR data acquisition and processing for protein structure determination
Tepei Ikeya, Yutaka Ito |

- Chapter 4** **Advances in high field DNP methods**
Yoh Matsuki, Toshimichi Fujiwara
- Chapter 5** **Photoirradiation and Microwave irradiation NMR Spectroscopy**
Akira Naito, Yoshiteru Makino, Yugo Tasei, Izuru Kawamura
- Chapter 6** **Solid-state NMR under ultrafast MAS rate of 40–120 kHz**
Yusuke Nishiyama
- Chapter 7** **Elucidating Functional Dynamics by $R_{1\rho}$ and R_2 Relaxation Dispersion NMR Spectroscopy**
Erik Walinda, Kenji Sugase
- Chapter 8** **Structural Study of Proteins by Paramagnetic Lanthanide Probe Methods**
Fuyuhiko Inagaki, Tomohide Saio
- Chapter 9** **Structure determination of membrane peptides and proteins by solid-state NMR**
Izuru Kawamura, Kazushi Norisada, Akira Naito
- Part II Application to life science and materials science
- Chapter 10** **NMR studies on silk materials**
Tetsuo Asakura, Yugo Tasei
- Chapter 11** **NMR studies on polymer materials**
Atsushi Asano
- Chapter 12** **Solid-State ^2H NMR studies of molecular motion in functional materials**
Motohiro Mizuno
- Chapter 13** **NMR Spectral Observations of the Gases in Polymer Materials**
Hiroaki Yoshimuzu
- Chapter 14** **NMR studies on natural product – Stereochemical determination and conformational analysis in solution and in membrane –**
Nobuaki Matsumori and Michio Murata
- Chapter 15** **Technical basis for nuclear magnetic resonance approach for glycoproteins**
Koichi Kato, Saeko Yanaka, and Hirokazu Yagi
- Chapter 16** **NMR studies on RNA**
Taiichi Sakamoto, Maina Otsu, Gota Kawai
- Chapter 17** **NMR analysis of molecular complexity**
Jun Kikuchi
- Chapter 18** **NMR of paramagnetic compounds**
Yasuhiko Yamamoto and Tomokazu Shibata
- Chapter 19** **NMR of quadrupole nuclei in organic compounds**
Kazuhiko Yamada
- Chapter 20** **NMR of quadrupole nuclei, inorganic materials**
Toshikazu Takahashi
- Chapter 21** **Protein ligand interactions as studied by NMR**
Hidekazu Hiroaki, Daisuke Kohda
- Chapter 22** **Protein structure and dynamics determination by residual anisotropic spin interactions**
Shinichi Tate

NMR学会からのお知らせ

日本核磁気共鳴学会の決定事項

2016年度 通常総会 議事次第

日時：2016年11月16日(水) 11時50分～12時10分

場所：広島国際会議場

国際会議ホール「ヒマワリ」

総会次第

1. 開会の辞
2. 会長挨拶
3. 第55回NMR討論会(2016)世話人挨拶
4. 事業報告
5. 2015年度収支決算の承認
6. 2016年度中間報告の承認
7. 2017年度収支予算案の承認
8. 2017年度役員を選任
9. 第56回NMR討論会(2017)世話人挨拶
10. その他
11. 閉会の辞

会員数

会員種別	2014年 9月30日	2015年 9月30日	2016年 9月30日
正会員	438	439	436
学生会員	151	158	147
名誉会員	12	12	12
賛助会員	8	8	8
合計	609	617	603

H28年度現役役員名簿

■会長(H28-H29)

竹腰清乃理 京都大学

■理事(H28-H29) 会長(*) 副会長(**)

竹腰清乃理(*) 京都大学

加藤 晃一(**) 自然科学研究機構

朝倉 哲郎 東京農工大学

池上 貴久 横浜市立大学

浅野 敦志 防衛大学校

神田 大輔 九州大学

菅瀬 謙治 京都大学

内藤 晶 横浜国立大学

藤原 敏道 大阪大学

山本 泰彦 筑波大学

■会計監査(H28-H29)

芦田 淳 (株) JEOL RESONANCE

林 文晶 理化学研究所

■評議員(H28-H29)

朝倉 哲郎 東京農工大学

池上 貴久 横浜市立大学

大澤 匡範 慶應義塾大学

梶 弘典 京都大学

片平 正人 京都大学

加藤 晃一 自然科学研究機構

児嶋長次郎 大阪大学

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

出村 誠 北海道大学

内藤 晶 横浜国立大学

野村 薫 サントリー生命科学財団

半沢 宏之 第一三共RDノバーレ(株)

廣明 秀一 名古屋大学

藤原 敏道 大阪大学

吉水 広明 名古屋工業大学

■評議員(H27-H28)

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

金橋 康二 新日鐵住金(株)

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(株)

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 大阪大学

水野 元博 金沢大学

山本 泰彦 筑波大学

事業報告

I. 現時点での会員数

II. 活動報告と方針の提案

●2015年度

1. 第54回NMR討論会(2015)
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6巻の発行
5. その他

●2016年度

1. 第55回NMR討論会(2016)
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7巻の発行
5. その他

●2017年度(方針)

1. 第56回NMR討論会(2017)
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8巻の発行
5. その他

北原 亮	立命館大学
神田 大輔	九州大学
佐藤 一	ブルカー・バイオスピン(株)
武田 和行	京都大学
朽尾 豪人	京都大学
西山 裕介	日本電子(株)
松木 陽	大阪大学
三島 正規	首都大学東京
村田 道雄	大阪大学
山田 和彦	高知大学
■会計監査(H29-H30)	
芦田 淳	(株)JEOL RESONANCE
林 文晶	理化学研究所

11月16日(水)開催の新評議員会および新理事会にて、平成29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29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

竹腰清乃理(*)	京都大学	H28-H29
加藤 晃一(**)	自然科学研究機構	H28-H29
朝倉 哲郎	東京農工大学	H28-H29
浅野 敦志	防衛大学校	H29-H30
池上 貴久	横浜市立大学	H28-H29
伊藤 隆	首都大学東京	H29-H30
河合 剛太	千葉工業大学	H29-H30
神田 大輔	九州大学	H29-H30
内藤 晶	横浜国立大学	H28-H29
藤原 敏道	大阪大学	H28-H29

■会計監査(H29-H30)

芦田 淳	(株)JEOL RESONANCE
林 文晶	理化学研究所

■幹事

阿久津秀雄	日本学術振興会
出村 誠	北海道大学

2016年度 通常総会 議事録

出席：出席者数(90名)と委任状受領数(24名)の合計114名

* 定足数[一般会員436名(2016年9月30日現在)]/5=88名

* 配布資料と投影資料に基づき全て承認された。

* 2015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29年度の評議員と会計監査が選出、承認された。

■評議員(H29-H30)

浅野 敦志	防衛大学校
伊藤 隆	首都大学東京
河合 剛太	千葉工業大学
川村 出	横浜国立大学
木川 隆則	理化学研究所
菊地 淳	理化学研究所

第56回NMR討論会 (2017)

第56回NMR討論会を、2017年11月14日(火)、15日(水)、16日(木)の3日間で開催します。会場の首都大学東京は、1998年にICMRBSを開催した会場でもあり、1,200名収容可能な講堂をはじめとして設備も整っております。ぜひ多くの方々にご参加いただき、NMRについての白熱したご討論をお願いいたします。

プログラムとしては、例年同様にNMRチュートリアルコースを開催し、若手ポスター賞表彰も行います。若手研究者、大学院生・学生の方に積極的に参加していただければ幸いです。第2日目の午前には“isotope-aided methods in biological NMR”と題したシンポジウムも企画しています。また、海外からの招待講演者として、国際的に活躍している4名の研究者を招聘することができました。それぞれ個性的な研究を進めている研究者ですので、NMRを利用した新たな研究の可能性を考える上ではよい機会になると思います。

それでは、皆様のご参加を南大沢でお待ちしています。

第56回NMR討論会 世話人 伊藤 隆 (首都大学東京)

会期：2017年11月14日(火)～16日(木)

チュートリアルコース 2017年11月13日(月)

会場：首都大学東京・南大沢キャンパス (東京都八王子市南大沢1-1)

招待講演・特別講演のプログラム

第2日目 11月15日(水)

招待講演1 座長：浅野 敦志

14:40～15:15 Applications of dynamic nuclear polarization (DNP)-enhanced solid-state NMR to materials science

Dr. Takeshi Kobayashi (Ames Laboratory, USA)

招待講演2 座長：川村 出

15:15～15:50 NMR on membrane proteins—The use of magic angle sample spinning and dynamic nuclear polarization for the investigation of ABC transporters, GPCRs and Photoreceptors

Prof. Clemens Glaubitz (Goethe University Frankfurt, Germany)

招待講演3 座長：三島 正規

16:00～16:35 Chaperone-client-interactions: From basic principles to roles in health and disease
Prof. Sebastian Hiller (University of Basel, Switzerland)

招待講演4 座長：横山 茂之

16:35～17:10 Single cell Hi-C and single molecule imaging to study nuclear architecture
Prof. Ernest Laue (University of Cambridge, UK)

特別講演1 (学術賞) 座長：河合 剛太

17:30 ~ 18:05 Small Volume. Why not?

高橋 征三 (日本女子大学)

チュートリアルコース

日時：11月13日 (月)

会場：首都大学東京・南大沢キャンパス

国際交流会館1F大会議室

13:00 ~ 14:30

最適な測定を考える

八木 宏昌 先生 (理化学研究所)

溶液NMRの方法論は成熟期を向かえ、今やほとんどの測定は予め用意されたパラメータを読み込んでルーチンでおこなえるようになった。しかし、ふと立ち止まってみると、例えばHSQCを測定しようと思えば標準測定法を呼び出してみると、同じHSQCなのに幾つもの測定法があるのに気づく。いったい何が違うのだろうかと考えてみたことはないだろうか？ 今回のチュートリアルコースでは、これらの基本的な違いを原理に基づき解説し、どういったときにどのような測定を行うのが最適なのかを、タンパク質の解析を例にとって、自らの経験を踏まえて紹介したい。NMR業界の現状を見渡すと必ずしも測定時間がふんだんに確保できるとは限らない。限られた時間内でベストな測定をするには何に注目したら良いか？ もしかしたら今より効率の良い測定法があるかもしれない。この機会に自分のルーチンを少し振り返ってみてはいかがでしょうか。

14:40 ~ 16:10

固体NMRにおける ^{13}C - ^{13}C 間の偏極移動

大橋 龍太郎 先生 (金沢大学)

固体NMRは、X線回折や溶液NMRなどの測定法では構造解析が困難な試料にも適用できる測定法として期待されており、近年では膜タンパク質などの構造も解析できるようになっている。NMRでは、溶液NMRの ^1H - ^1H NOESY法に代表されるように、原子核間の距離情報から分子構造が解析される。固体NMRの場合は ^1H よりも ^{13}C の方が高分解能で測定が可能であるため、 ^{13}C - ^{13}C 間の距離情報を得るための測定法が盛んに研究されてきた。約10年前までは、 ^{13}C - ^{13}C 間の距離は2つの炭素原子のみに限定した手法では ^{13}C - ^{13}C 間の距離を正確に求められるが、3スピン以上の ^{13}C 同士の距離を求めるためのブロードバンドな手法ではおおまかな距離しか求められなかった。しかし最近では、天然存在比の試料を用いて 0.1\AA 以下の精度で ^{13}C - ^{13}C 間の距離を決定したという報告例のようにブロードバンドな手法で求められる ^{13}C - ^{13}C 間の距離の精度が上がってきており、固体NMRによる ^{13}C - ^{13}C 間距離の測定法を用いた構造解析が今後より発展していくことが期待される。本講演では、ブロードバンドな測定法の中でも広く用いられているPDSO、DARRなどの ^1H - ^{13}C 間の双極子相互作用を用いた ^{13}C - ^{13}C 間の偏極移動について、偏極移動の基礎的な概念や偏極移動速度導出の概要などについて説明する。

16:20 ~ 17:50

NMRを創った人たち：第1話 夜明け前**2. Rabiの分子線NMRの成功とGorterの凝縮系NMRの失敗**

寺尾 武彦 先生(京都大学 名誉教授)

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

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

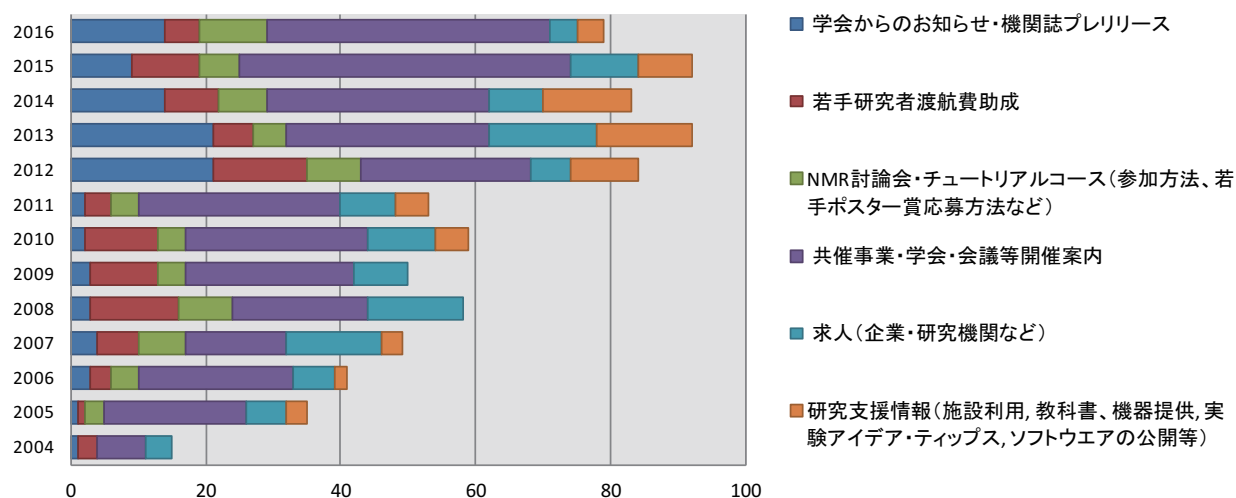
学会ホームページ <http://www.nmrj.jp> から「NMRニュースレター」→「バックナンバー」を選択してください。キーワード、発行日検索もできます。

◎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.621-797 (2016年4月～2017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 (2017年4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

昭光サイエンス株式会社

株式会社JEOL RESONANCE

株式会社シゲミ

ジャパン スーパーコンダクタ テクノロジー株式会社

太陽日酸株式会社

ブルカー・バイオスピン株式会社

平成29年9月1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 (2017年度)

委員長	浅野 敦志	防衛大学校
副委員長	池上 貴久	横浜市立大学
	吉水 広明	名古屋工業大学
委員	浅川 直紀	群馬大学
	恩田 光彦	株式会社三井化学分析センター
	梶 弘典	京大化研
	金橋 康二	新日鐵住金株式会社
	北原 亮	立命館大学
	児嶋長次郎	横浜国立大学
	野村 薫	公益財団法人サントリー生命科学財団
	橋本 康博	旭化成株式会社
	福士 江里	北海道大学
	村上 美和	京都大学
	山本 泰彦	筑波大学

編集後記

NMR学会機関誌第8巻を会員の皆様方にお届けします。お忙しい中、第8巻の原稿に時間を割いてご執筆いただいた諸先生には、編集委員を代表しまして心よりお礼申し上げます。本巻の編集作業も編集委員の力添えで無事完了することが出来ました。これまでのNMR学会機関誌同様、本巻も充実の内容となっていると自負しております。会員の皆様には、ぜひお手にとっていただき、お楽しみいただければと思います。

NMR学会機関誌は、冊子体およびPDF形式で会員の皆様に配布しておりますが、第5巻から冊子体の配布は、原則、受領を希望する会員に限らせていただいております。冊子体の代わりにPDF形式を希望する会員へは、NMR学会のWebページからダウンロードできる体制を整えております。全ページ版の高解像度PDFも試験的に提供しています。

今号では、4件のNMR研究室だよりを掲載いたしました。これまでは研究室だよりの著者を紹介していませんでしたが、今回、他の記事同様、ご執筆いただいた著者の写真と抄歴を「試験的に」紹介させていただきました。この形式が好評を得るようでしたら、今後投稿規定の改定を経て継続していきたいと考えております。賛否両論ご意見いただければと思います。

最後になりましたが、株式会社クバプロ様および株式会社プロアクティブ様にはNMR学会機関誌第8巻発行に向けて多大な御尽力をいただきましたことに対し、心より感謝申し上げます。会員の皆様には、今後ともNMR学会機関誌の発展にさらなる御協力をお願い申し上げ、私のあいさつとさせていただきます。

2017年10月 NMR学会誌編集委員長 浅野敦志

E-mail: asanoa@nda.ac.jp



NMR学会誌アーカイブ <http://goo.gl/UXpAji>

NMR

**BULLETIN OF THE NUCLEAR
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN**

Vol.8

2017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



NMR (核磁気共鳴) 装置

NMR (Nuclear Magnetic Resonance) systems

NMR spectrometer Z

JNM-ECZR/JNM-ECZS series

NMR spectrometer Z は、多様化するニーズに幅広く応えるため、世界最高の性能と世界最小のコンパクトさを実現した次世代 NMR 装置です。最先端デジタル技術を搭載した高集積回路により、従来性能を最大 70 倍以上に向上、装置のメイン制御機器である NMR 分光計は、小型汎用モデルの従来比で、サイズを 55% 以上削減し、消費電力を 65% 以上削減しました。

The ECZ NMR spectrometer is a “next generation” system that incorporates the world’s highest performance in the smallest chassis, so that it can fulfill a wide variety of applications. The heart of the NMR, the spectrometer, was reduced in size by 55% and the power consumption by 65% compared to earlier models.



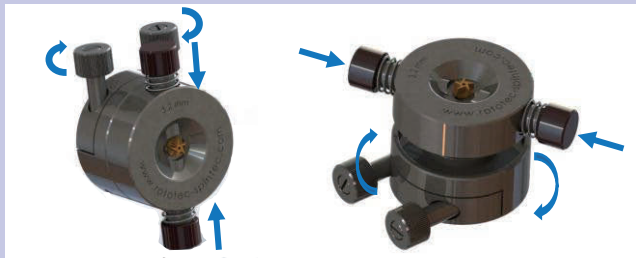
GOOD DESIGN AWARD 2016

Solids NMR Sample Handling Safety

Rototec-Spintec社製
キャップリムーバー



Bruker社のMASローターキャップの取り外しを、安全かつ容易に行うことが出来ます(4mm, 3.2mm, 2.5mmに対応)。



各種ローター(Bruker, Agilent)、キャップ、サンプル封管用インサートガラスなど多数の製品の取り扱いが出来ます。

Bruker用
Kel-Fキャップ
O-ring付き



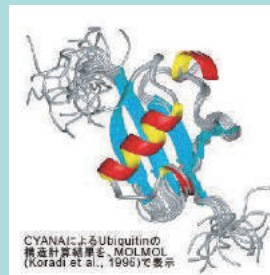
Bruker用
3.2mm Rotor(貫通型)



Protein Research

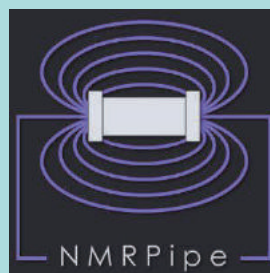
タンパク質用構造解析・計算プログラム
CYANA

帰属されたアミノ酸配列情報とプロトン核間の距離情報を与えるNOESYスペクトルデータから、自動的に立体構造計算を行います。



タンパク質解析用
NMRデータ処理ソフトウェア
NMR Pipe

PDB (Protein Data Bank)に登録された約40%のタンパク質の構造決定に、NMR Pipeが使用されています。



Solids NMR

Doty Scientific社製
固体NMR用プローブ



BMAXプローブはMagnetのトップロードに対応し、HX, HXY(Triple), HXYZ(Quad)など多くのラインナップを有します。CryoMAS, DNP-MASプローブの製品化も成功しています。

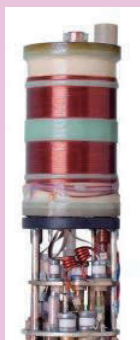
各社NMR装置(Bruker, JEOL, Agilent)に対応しています。



Diffusion NMR

Doty Scientific社製
拡散係数測定プローブ

RFデザインは1H/X, direct or indirectから選択可能で、傾斜磁場強度は接続する傾斜磁場電源の電流値に依存します。最大4,000 G/cm (40 T/m)の傾斜磁場強度に対応します。



Data Management

LASオリジナル
NMR/MRI用データサーバー

各研究施設様において、LinuxやWindowsを利用した各種サーバ、HPC、NAS、ネットワークを構築し、NMR、MRIなどの実験データの安全な保存やデータ解析の向上、効率化の支援を行っています。

NMR Automation

LASオリジナル
自動NMR測定支援システム

大手製薬・化学メーカー様に提供している多検体用の自動NMR測定制御システムです。実験データベースから出力したCSVファイル、あるいはNMRサンプル管に貼付したバーコードから測定情報を読み込み、オートサンプラーを有するNMR装置のホストコンピュータに測定指令を自動で送信します。

各社NMR装置(Bruker, JEOL, Agilent)での対応実績がございます。



株式会社エルエイシステムズ
L.A. Systems Incorporated(L.A.S)

〒110-0005 東京都台東区上野1-11-5 時計会館ビル1F
TEL: 03-5812-5311, FAX: 03-5807-4050, URL: <http://www.las.jp>, E-mail: support@las.jp

© 2017 L.A. Systems, Inc.

Aceton-d₆ 用対称形マイクロサンプルチューブ

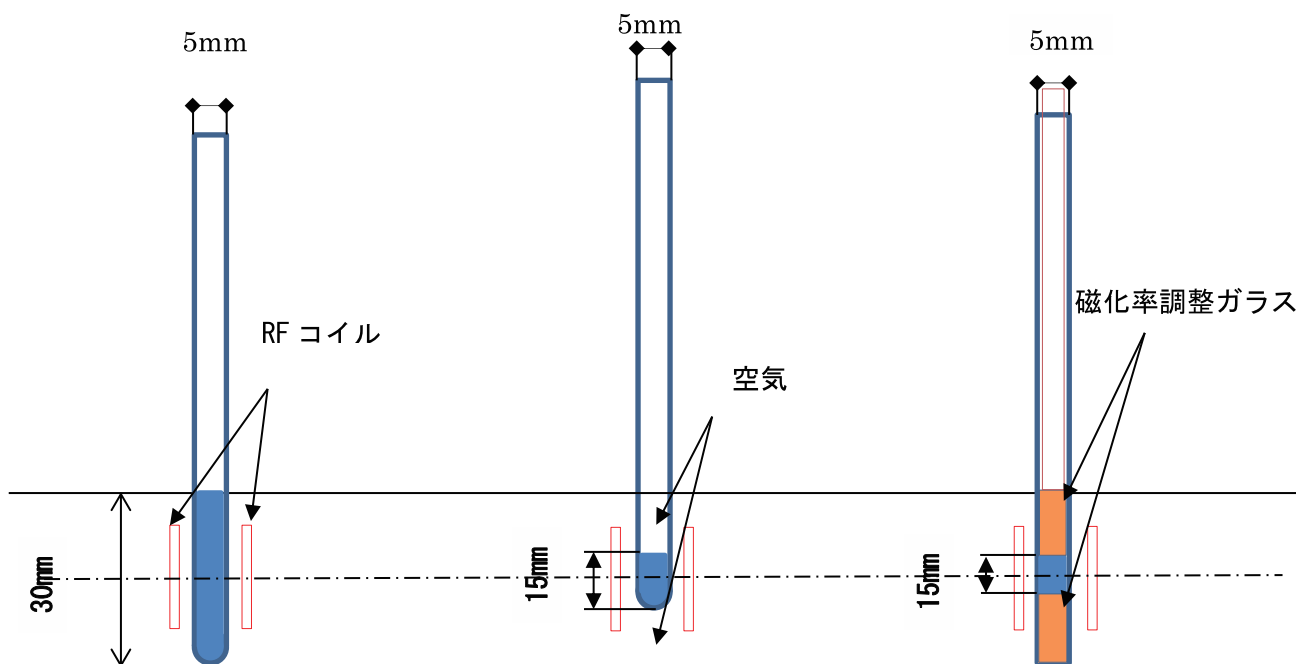
重アセトン用対称形マイクロサンプルチューブが2017年12月1日発売されます。



5mm サンプルチューブ

5mm サンプルチューブ

対称形マイクロサンプルチューブ



5mmφ用プローブでの測定例

5mmφサンプルチューブにシムが十分調整可能な液高に注入。	5mmφサンプルチューブに濃度を上げるために溶媒を減らしたが、液高が低いためシム調整できない。	5mmφ対称マイクロ形サンプルチューブに5mmφサンプルチューブの半分の量注入。シム調整問題なし。
液高：30mm	液高：15mm	液高：15mm
量：410 μL	量：210 μL	量：210 μL

平成21年度「日本化学会科学有効賞」受賞製品

電話 042-624-2207
FAX 042-622-0937



株式会社

シゲミ

<http://www.shigemi.co.jp>
mail:shigemi-corp@nifty.com

無細胞タンパク質合成キット

Cell-Free Protein Expression Kit

理化学研究所の高度な無細胞タンパク質合成技術をキット化したしました。

大腸菌抽出液を用いており、抗体や膜タンパク質などをはじめ各種タンパク質を迅速・簡便に大量合成し、高効率に安定同位体標識できます。

無細胞くん[®] SI SS



安定同位体標識タンパク質合成キット

無細胞[®] SS
くん SI

■特徴

SS結合を持つ抗体やサイトカインなどの分泌系タンパク質合成専用キットです。任意の酸化条件を選択可能で、ジスルフィドイソメラーゼを含みます。

製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格(円)
A89-0126	無細胞くんSI SS	1キット (1mL反応×1回分)	-80℃	65,000

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

■特徴

各種安定同位体標識アミノ酸(別売)と組み合わせてご使用いただくことで安定同位体標識タンパク質を合成するキットです。16時間でCATタンパク質を1キットにつき最大5mg合成できます。

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

■ご使用方法：テンプレートDNAとしては、T7プロモーターとリボソーム結合部位を含む市販のベクターに目的タンパク質の遺伝子をクローニングしたものを我们用います。また、PCRで調製した直鎖状DNAもご使用いただけます。詳しくは弊社までお問合せください。

科学技術振興機構「産学共同シーズイノベーション化事業」の支援を受け、開発された製品です。

無細胞くん用 安定同位体標識アミノ酸

New!

■SAIL メチル・芳香族選択標識

製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
SAT2001	SAIL アミノ酸混合物水溶液-UL-d	1mL	220,000
G07-0226	[δ-2-13CH3;2H]Leu+ [γ-1-13CH3;2H]Val + 18種重水素標識アミノ酸	1mL	120,000

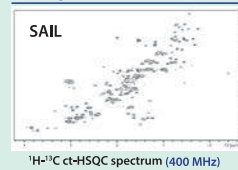
■各種安定同位体標識アミノ酸

製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
A107-0144	アミノ酸混合物水溶液-UL-d	1mL	25,000
A39-0072	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹⁵ N	1mL	15,000
A41-0074	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹⁵ N,d	1mL	18,000
A40-0073	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	30,000
A42-0075	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹³ C, ¹⁵ N,d	1mL	35,000
A91-0128	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Arg-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	20,000
A92-0129	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Leu-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	20,000
A108-0145	アミノ酸混合物水溶液-SeMet	1mL	12,000

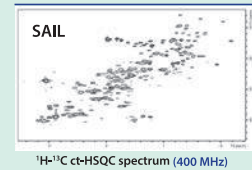
20種類のアミノ酸を含有しております。

NMRスペクトル

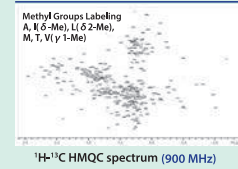
Ubiquitin (8.5 kDa)



RAS (22 kDa)



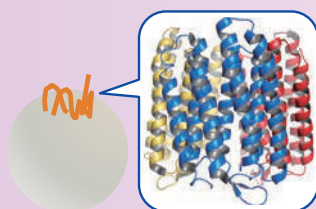
MSG (82 kDa)



**Sample Prepared by
1 Cell-Free kit**

New!

無細胞くん用 膜タンパク質合成用試薬



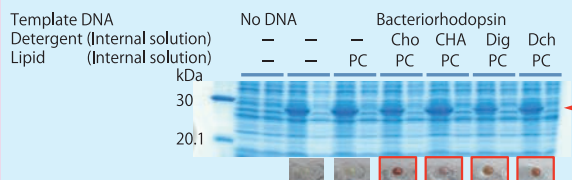
■特徴

膜タンパク質を発現しプロテオリボソームを形成するための界面活性剤・脂質サプリメントです。

製品名	数量	希望納入価格(円)
膜タンパク質合成用脂質溶液	1キット	30,000

発現例

Bacteriorhodopsin



Purplish brown color represents proper folding of Bacteriorhodopsin.
PC, L-α-Phosphatidylcholine; Cho, Cholate; CHA, CHAPS; Dig, Digitonin;
Dch, Deoxycholate; Left lanes, total; Right lanes, supernatant



大陽日酸株式会社 SI事業部
〒142-8558 東京都品川区小山1-3-26 東洋Bldg.
Tel.03-5788-8550 (代表) Fax.03-5788-8710

●資料のご請求は、大陽日酸までお気軽にご用命ください。
メールアドレス Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
ホームページアドレス <https://stableisotope.tn-sanso.co.jp>



 nanalysis

学生実験や確認試験に最適!!

卓上型 NMR

NMReady

- ✓ オールインワン設計
- ✓ タッチパネルで直感的に操作
- ✓ ^7Li , ^{11}B , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P の多核種に対応

- 1核種モデル：NMReady60e (^1H または ^{19}F)
- 2核種モデル：NMReady60Pro ($^1\text{H}/^7\text{Li}$, ^{11}B , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P)



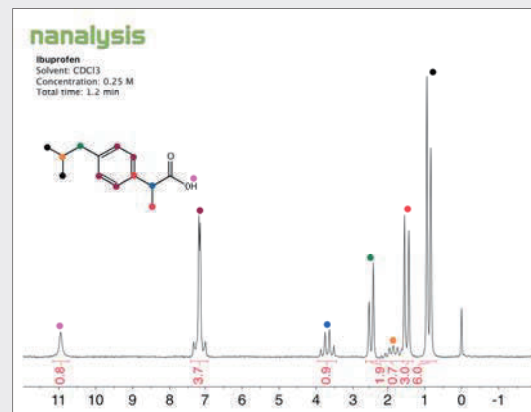
グローブボックス内での操作



マイクロフロー合成系

仕様

動作周波数	60 MHz
測定項目	1D, JRES, COSY, DEPT, T1, T2, Nutation
寸法・重量	30×28×49 cm, 25 kg
動作環境	冷媒不要 He フリー 18~26℃ 1.5℃以内 / 時間あたり



測定例：イブプロフェン ^1H -NMR
濃度：0.25 M, 測定時間：1.2 分

 株式会社 東京インスツルメンツ
TOKYO INSTRUMENTS, INC.
Mutual Satisfaction

本社：〒134-0088 東京都江戸川区西葛西 6-18-14 T.I.ビル
大阪営業所：〒532-0003 大阪市淀川区宮原 4-1-46 新大阪北ビル

URL <http://www.tokyoinst.co.jp/>

TEL: 03-3686-4711 FAX: 03-3686-0831
TEL: 06-6393-7411 FAX: 06-6393-7055

No.A-NNMR-3601A.2017-0810

【製品の詳細情報へ】



PHOENIX HXY PREMIUM PROBE



HXYプレミアムプローブはプローブヘッドとプローブベースが分割され、プローブヘッドを交換することにより数種類のサンプル径に対応します。プローブヘッドの交換はお客様自身で交換できる設計となっております。

HiBand:H1-F19, Midband:P31-N15, LoBand:P31-N15の測定核チューニングが可能。オプションによりHiBandポートをH1,F19のダブルチューニング仕様にもカスタマイズできます。

対応サンプル径:1.2mm,1.6mm,3.2mm,4.0mm,5.0mm,6.0mm,7.5mm

対応周波数: 400MHz~900MHz

PHOENIX HX PROBE



HXプローブはSolid T3タイプのプローブとなります。Chemagnetic社、VARIAN/AGILENT社、JEOL社CMXで採用されていたSolidT3プローブタイプの2チャンネル専用プローブです。

HiBand:H1-F19, LoBand:P31-N15の測定核チューニングが可能。オプションによりHiBandポートをH1,F19のダブルチューニング仕様にもカスタマイズできます。

対応サンプル径:1.2mm,1.6mm,3.2mm,4.0mm,5.0mm,6.0mm,7.5mm

対応周波数: 300MHz~900MHz

JTEバルテック社では上記製品取り扱い及び、Solid T3タイププローブの修理調整を行っております。オプション品、ケーブル等の修理調整にも対応させていただきます。

T3プローブ用サンプルアセンブリー、サンプルパッキングシステム等も取り扱っております。

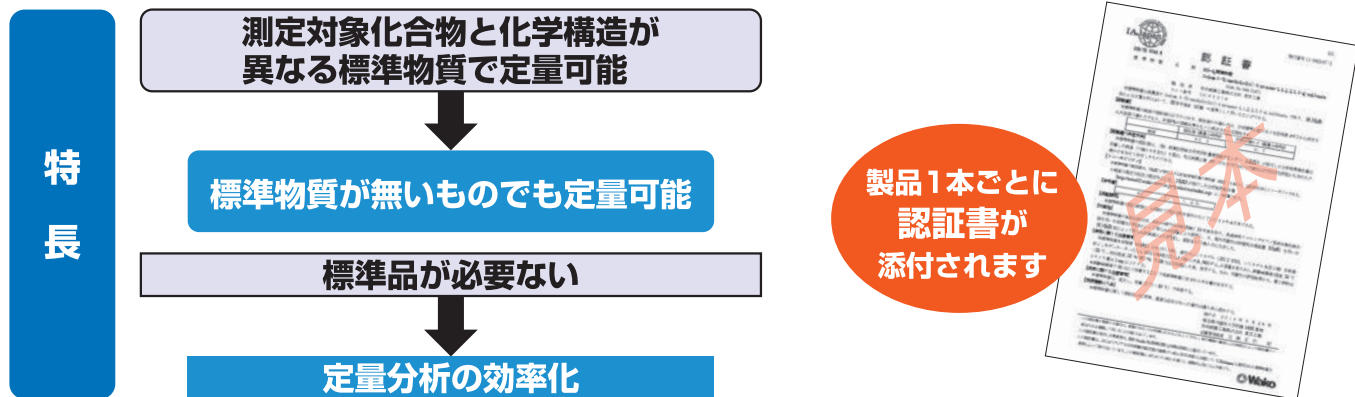
JTEバルテック株式会社



〒252-0425 / 本社
 神奈川県相模原市田名塩田1-17-17
 TEL:042-772-6284/FAX:042-711-8647
 〒564-0052 / 大阪オフィス
 大阪府吹田市広芝町8-12 第3マイダビル304
 TEL:06-4860-6501/FAX:06-4860-6502
 お問い合わせE-Mail: info@vartec.co.jp

定量NMR用 標準物質

NMRによる純度検定は、適切な国家標準品を用いることで国際単位系 (SI) へのトレーサビリティが容易に実現できるため高い信頼性を得ることが出来る分析法です。



(独)産業技術総合研究所 計量標準総合センター(NMIJ)のISO/IEC17025に基づく純度校正サービスによって純度値が決定されます。

コードNo.	品名	規格	容量
024-17031	1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄ 標準物質	TraceSure®	50mg
020-17033		TraceSure®	50mg×4
048-33271	ジメチルスルホン標準物質	TraceSure®	100mg
044-31671	DSS- <i>d</i> ₆ 標準物質	TraceSure®	50mg
040-31673		TraceSure®	50mg×4
135-17951	マレイン酸標準物質	TraceSure®	100mg
093-06731	定量NMR用内部標準物質セット(4種) 【セット内容】 ・1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄ (50mg×1) ・DSS- <i>d</i> ₆ (50mg×1) ・ジメチルスルホン(100mg×1) ・マレイン酸(100mg×1)	定量NMR用	1セット

【標準液】内標準法及び外標準法として使用することができる標準液です。

コードNo.	品名	規格	容量
041-33641	DSS- <i>d</i> ₆ 標準液(500mg/1重水)	定量NMR用	1ml×5A

【標準品】標準物質を用いて定量NMR法によって値付けされた標準品です(※含量値には不確かさがついてます)。

コードNo.	品名	規格	容量
207-20411	1,3,5-トリメトキシベンゼン標準品	定量NMR用	500 mg
204-20421	トリフェニルメタン標準品	定量NMR用	500 mg
028-19011	安息香酸標準品	定量NMR用	500 mg
166-27911	フタル酸水素カリウム標準品	定量NMR用	500 mg
046-34171	テレフタル酸ジメチル標準品	定量NMR用	500 mg

ご購入に際し製品情報(適用法規・保管条件など)のご確認は、当社総合カタログおよび検索サイト(siyaku.com)をご参照ください。

和光純薬工業株式会社

本社：〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
 東京本店：〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号
 営業所：北海道・東北・筑波・藤沢・東海・中国・九州

問い合わせ先

フリーダイヤル：0120-052-099 フリーファックス：0120-052-806

URL：<http://www.wako-chem.co.jp>

E-mail：labchem-tec@wako-chem.co.jp



最先端NMR技術の結晶

AVANCE NEO 核磁気共鳴分光計



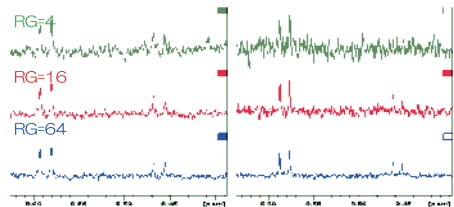
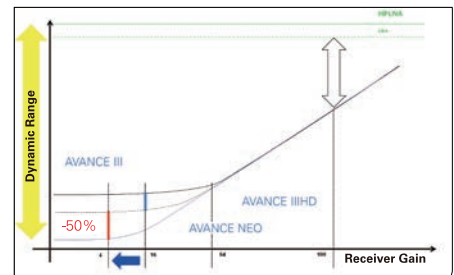
最新のエレクトロニクスで進化を遂げた Bruker BioSpinの核磁気共鳴分光計

Bruker BioSpin の最新の核磁気共鳴 (NMR) 分光計 **AVANCE NEO** は従来の Avance 型分光計の伝統を受け継ぎつつ、最新のエレクトロニクスを導入した新世代の分光計です。RF 送受信系の性能強化により、感度の上昇とより複雑なパルスシーケンスの実装を可能とする自由度が加えられています。最先端の研究の現場からルーチン的な分析にいたるまで、大きな変革をもたらすポテンシャルをもつ **AVANCE NEO** をぜひ体験してください。



大幅に強化されたトランシーバ性能

- 送受信系 1 対が 1 つのボードに実装されたコンパクト設計
- ノイズを低減する 1.852 GHz IF
- 960 MSPS の RF デジタル出力
- 240 MSPS 16 bit ADC
- ダイナミックレンジの 50% 改善
- 12.5 ns 分解能の任意 RF 変調
- 波形生成用 FIFO メモリを 1GB 搭載



AVANCE NEO ではダイナミックレンジが大幅に改善され、今まで観測できなかったような微弱な信号も捕らえることができます。このような改善は分析対象中の微量な成分や不純物を分析する上で重要となってきます。

ブルカー・バイオスピン株式会社
横浜事務所
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9
電話：045-444-1390
電子メール：info.bb.io.jp@bruker.com

大阪事務所
大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29
電話：06-6394-8989
ウェブサイト：www.bruker.com

AVANCE NEOの詳細情報はこちら
<https://www.bruker.com/products/mr/avance-neo.html>





文部科学省
先端研究基盤共用促進事業（共用プラットフォーム形成支援プログラム）

NMR共用プラットフォーム ご利用案内

NMR共用プラットフォームでは、
参画機関が保有するNMR装置を産業界・アカデミアに開放しております。

「最先端利用開発」利用枠 平成30年 第1回公募

【公募期間】 1月9日～2月9日

NMR技術領域の拡大発展に寄与する利用課題を対象とし、最先端のNMR装置を利用した先端的かつ新規の測定技術の開発や、NMR共用プラットフォーム全体における測定技術等の向上を目指した課題を募集します。

NMR装置一覧や応募方法等の
詳細はWebサイトをご覧ください

URL : <http://nmrpf.jp/>

◆ご利用前の相談も随時、承ります。

NMR共用プラットフォーム

検索



各機関では、このほか独自の利用枠を設けております。

“最先端”装置・技術を核として、“開発”と“利用”を橋渡しし、“知”を蓄え“人”を育てます

日本のNMR研究開発の持続的な維持・発展を先導する技術プラットフォームとなることを目指します。理化学研究所、横浜市立大学、大阪大学、北海道大学の4機関がプラットフォームを構築し、先端的なNMR設備を産官学の皆様に広くご利用いただくことを目的としています。

NMRのプロフェッショナルが
豊富な経験に基づいて、皆様の研究をサポートいたします。

◇NMR施設紹介（装置一例） この他にも多種多様なNMR装置、NMRプローブを取り揃えております。

理化学研究所

世界最大規模のNMR装置集積台数を誇り、溶液・固体NMRにおけるアクセサリーの充実とNMR立体構造解析パイプラインで多様な試料測定に対応可能。



600MHz溶液NMR
DCH ¹³C高感度測定



900MHz固体NMR
高速MAS



NMR立体構造解析
パイプライン

横浜市立大学

世界最高レベルの共用装置：通常の溶液NMRに加えてLC-NMR、固体NMR、オートサンプラー測定により多くの企業の成果に活用された豊富な実績。



950MHz溶液NMR、
LC-NMR、固体NMR



800MHz溶液NMR
最大480本オートサンプラー



700MHz溶液LC-NMR
最大60本オートサンプラー

大阪大学蛋白質研究所

950MHz溶液NMRや700MHz固体DNP-NMRなど世界最大級・世界最高性能の装置群で、装置開発から創薬まで幅広くサポート。



700MHzDNP固体NMR
高速MAS



950MHz溶液NMR



400MHz溶液NMR
¹⁹Fスクリーニング

北海道大学先端NMR

北日本最大のNMR施設として研究・産業界の幅広いNMR測定のニーズに答えます。



800MHz溶液NMR
ランタニドプローブ



600MHz固体NMR
高速MAS、FG-MAS



装置実習、
教育プログラム

参画機関

◎代表機関 国立研究開発法人 理化学研究所（ライフサイエンス技術基盤研究センター）

○実施機関 公立大学法人 横浜市立大学（大学院生命医科学研究科生命医科学専攻）

国立大学法人 大阪大学（蛋白質研究所）

国立大学法人 北海道大学（先端生命科学研究院）

協力機関 日本電子株式会社、ブルカー・バイオスピン株式会社

NMR共用プラットフォームポータルサイト

URL : <http://nmrpf.jp/>

広告掲載一覧

(順不同)

日本電子株式会社

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

株式会社 東京インスツルメンツ

JTEバルテック株式会社

株式会社システムプラス

和光純薬工業株式会社

ブルカー・バイオスピン株式会社

文部科学省 先端研究基盤共用促進事業
NMR 共用プラットフォーム

本学会機関誌への御賛助に対して、厚く御礼申し上げます。