

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05882

研究課題名(和文) 三次元磁場配向ユニットを備えたin-situ固体NMRシステムの構築

研究課題名(英文) Development of in situ solid-state NMR system for magnetically oriented microcrystal suspension

研究代表者

久住 亮介 (Kusumi, Ryosuke)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：70546530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、固体NMRの強磁場を活用して異方性化合物の三次元磁場配向をNMRプローブ内で達成し、液状媒体中での単結晶構造解析とダイナミクス評価を実現するin situ磁場配向NMRシステムの構築を試みた。開発したNMRプローブを用いて三次元的に磁場配向した微結晶懸濁体の固体NMR測定を行なった結果、液体中にある微結晶から化学シフト異方性の情報を保持したスペクトルが得られた。観測されたスペクトル形状の変化から解析を行なった結果、化学シフト異方性を高精度で完全に決定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

汎用高分子や天然多糖、タンパク質・生体化合物など、高分子においてはX線回折や固体NMRといった主たる構造解析手法のための単結晶試料を準備することが難しい。本研究で開発した磁場配向微結晶懸濁体のin situ固体NMRを使用すれば、液体中にある微結晶から直接単結晶NMR解析を行うことができる。また、同手法は単結晶化が困難な物質の直接的な構造解析を可能とするだけでなく、生理条件下等でのin situ測定を介したダイナミクス・機能解析への道を拓くものである。よって、高分子構造・機能学等への波及効果はもちろん、生体分子の機能解明や創薬・医療工学への寄与の観点から社会的意義も極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：A probe for measuring solid-state NMR of a Magnetically Oriented Microcrystal Suspension (MOMS) was developed. In this probe, a sample tube is rotated around an axis perpendicular to the static magnetic field (B_0) but temporally stopped at the direction of the B_0 every 180° . Under such a modulated rotation, the microcrystals in a liquid medium are aligned three-dimensionally by a torque arising from the anisotropic bulk magnetic susceptibility of the crystal. We obtained in situ solid-state ^{13}C NMR spectra, which contains information on chemical shift anisotropy, by using the developed probe. Through the fitting analysis for the obtained NMR spectra, chemical shift tensors of microcrystals in a liquid were completely determined. These results clearly show that the in situ solid-state NMR of MOMS with the developed probe can be a powerful means to determine anisotropic interactions in NMR directly from the microcrystals dispersed in a liquid medium.

研究分野：磁場配向を利用した構造・物性制御，構造解析

キーワード：磁場配向 固体NMR in situ測定 単結晶解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ある物質を先進的な機能材料として有効活用するためには、その分子集合体レベルでの構造設計を通じた諸物性の精密制御が欠かせない。その達成には、対象の秩序構造に関する基礎的知見の集積が第一義的に要求される。固体構造の主な解析法として X 線結晶構造解析と固体 NMR 法がある。X 線結晶構造解析は方法論の確立された有力な手法であるが、立体構造を高精度で決定するためには μm スケールの単結晶が必要である。よって、一般に数十 nm 程度の単結晶しか得られない高分子分野においては、一軸あるいは二重配向化試料の X 線回折測定を行い、計算科学的手法を援用して間接的に構造を決定せざるを得ない。一方、固体 NMR は対象の形態を問わず、コンホメーション等の構造情報に加えて分子運動など動的な情報も提供する有力な構造解析手法である。化学シフトの異方性 (CSA) を評価すれば、分子のコンホメーションの情報を得ることができる。しかしながら、通常の固体 NMR ではマジック角回転 (MAS) が高分解能化に必須であるため、CSA が平均化されて異方性の情報が消失してしまう。リカップリング法など MAS 下の粉末から CSA を評価する手法も提案されているが、CSA、すなわち化学シフトテンソルを完全な形で精度よく決定できるのは数 mm 次元の巨大な単結晶が得られる場合にほぼ限られる。高分子をはじめとする“巨大単結晶化が困難な物質の単結晶構造解析”を実現する新たな手法の開発が必要である。

2. 研究の目的

以上の研究背景を踏まえ、本研究では、固体 NMR の強磁場を活用して異方性化合物の三次元磁場配向を NMR プロープ内で達成し、液状媒体中での単結晶構造解析とダイナミクス評価を実現する in situ 磁場配向 NMR システムの構築を試みた。

3. 研究の方法

まず、磁場配向した微結晶懸濁体 (Magnetically Oriented Microcrystal Suspension, MOMS) の固体 NMR 測定を実現するべく、試料管を NMR の静磁場と直交した軸周りで変調回転させることのできる固体 NMR プロープ (MOMS プロープ I) を設計・作製した。作製には汎用の 7.5mm 二重共鳴プロープを使用し、MAS スピナー等を取り外した後、3D プリンタ等を用いて作製した試料管回転ユニットを取り付けた。試料管の変調回転の駆動には、回転の厳密な制御が可能なステップモーターを採用した。試料管の回転角度検出のための光センサーも設置し、検出信号をトリガーとして NMR 測定用の rf パルスを照射できるようにした。試料管は強度が高くバックグラウンド信号の出ない PCTFE 製とし、懸濁体を封入できるように業者に加工を依頼した。その他、ドライブシャフトや軸受など必要な部品は全て非磁性ステンレスもしくは樹脂製のものとした。超電導磁石 (300 MHz, 7.05 T) およびパワーアンプには既存のものを使用し、分光計には FPGA 集約型 NMR 分光計 OPENCORE を使用した。標準物質を用いて測定のセットアップを行い、信号の正常な送受信を確認した。その後、L-アラニン微結晶 ($<20 \mu\text{m}$) の懸濁体をモデル試料として、静磁場、回転磁場、および変調回転磁場下での in situ 固体 ^{13}C CP NMR 測定を行った。また、 ^{13}C ラベル化された L-アラニン微結晶の懸濁体を使用して、積算 1 回の条件で変調回転磁場下での in situ 固体 ^{13}C CP NMR 測定を繰り返し、微結晶の三次元磁場配向化に伴うスペクトルの変化を観測した。

次に、微結晶の三次元磁場配向の達成のための試料管の変調回転軸に加え、その回転軸を任意のタイミングで傾ける機構を備えた、二軸可変型の MOMS プロープ II を開発した。まず間欠回転により微結晶を三次元磁場配向させ、そこから静磁場下で一時的に試料管を傾けた場合でも三次元配向が維持されるかについて、磁場による拘束力と配向ゆらぎの関係から検証した。その上で、上記の機構を有する MOMS プロープ II を設計し、汎用の 7.5mm 二重共鳴プロープを元に作製した。先の実験と同様に、三次元磁場配向化の実績のある L-アラニンをモデル試料として MOMS プロープ II による in situ 固体 NMR 測定を行い、液体中にある微結晶からの CS テンソルの完全決定を試みた。

4. 研究成果

Fig. 1 に、MOMS プロープ I により観測された L-アラニン微結晶懸濁体の固体 ^{13}C CP NMR スペクトルを示す。ここでは、試料管を定速で 180° 回転させ、静磁場方向で一定時間停止を繰り返す間欠型の変調回転磁場を使用した。rf パルスの照射のタイミングを変化させるにつれて、各共鳴ピークの発現位置が連続的に変化していることが分かる。また、その変化のパターンは、L-アラニン単結晶の振動パターンを想定したシミュレーションの結果と良く一致した。これらの結果から、開発したプロープを用いて、液体中にある微結晶からの異方性相互作用の直接解析が可能であることが示された。また、変調回転磁場下において微結晶の三次元配向化が進行する過程をシングルスキャンで追跡した結果、磁場の印加時間が経過するにつれてスペクトルパターンが変化する様子をリアルタイムで観測することができた。

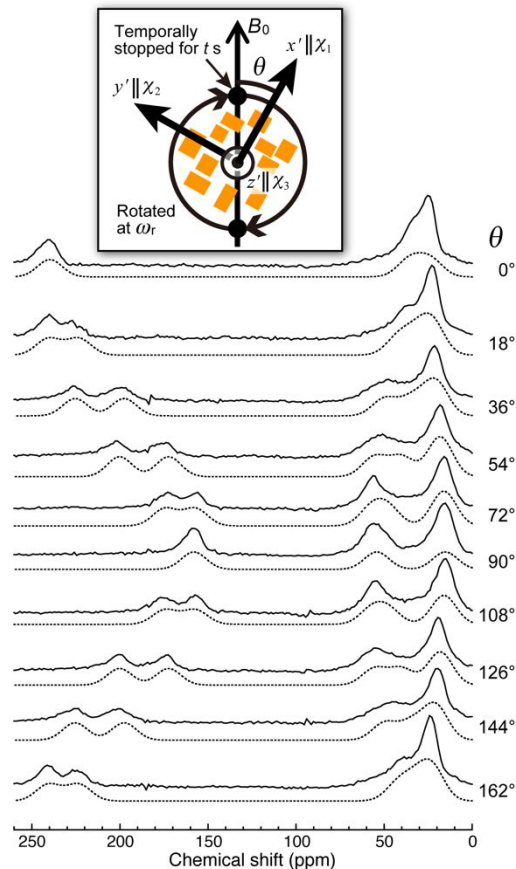


Fig. 1 MOMS プローブ I により観測された，三次元磁場配向した L-アラニン微結晶懸濁体の固体 ^{13}C CP NMR スペクトル[R. Kusumi et al., *J. Magn. Reson.* **309**, 106618 (2019)] . θ は静磁場 B_0 と配向した L-アラニンの磁化容易軸 χ_1 のなす角度を表す . 点線は，L-アラニン単結晶のデータから理論的にシミュレートした結果である .

次に，静磁場に直交な軸周りでの変調回転により三次元配向状態にある微結晶の方向を，変調回転を一時的に停止した上で変化させても配向状態が維持されるかどうかを，磁場下で微結晶に働く拘束力を計算して検証を行った . その結果，変調回転軸を静磁場方向から傾けても，短時間であれば配向ゆらぎはほとんど生じないことが分かった . この結果を踏まえ，作製した MOMS プローブ II を用いて L-アラニン微結晶の三次元磁場配向懸濁体の固体 ^{13}C CP NMR スペクトルを測定した結果，一般角周りで単結晶振動パターンを得ることができた . 得られた振動パターンについて理論式によるフィッティング解析を行なった結果，L-アラニンのカルボキシ炭素の化学シフトテンソルを主軸方向を含め完全に決定することに成功した . この結果は従来の単結晶法による結果と良好に一致しており，特に方向余弦すなわち主軸方向における差は先行の擬単結晶法を用いて決定したもの[R. Kusumi et al., *J. Magn. Reson.* **223**, 68 (2012)]よりも小さいことが分かった . このことは，試料作製時に媒体の固化に伴う配向の乱れや軸ズレが生じる擬単結晶法に比べ，液状媒体中で三次元配向した微結晶をそのまま測定する MOMS の in situ 固体 NMR の方が高精度であることを示している . 以上の結果から，MOMS プローブ II による磁場配向微結晶懸濁体の in situ 固体 NMR は， μm 次元の微結晶から高精度かつより簡便に化学シフトテンソルを決定できる有力な構造解析手法であることが例証された .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kusumi Ryosuke, Teranishi Sachi, Kimura Fumiko, Wada Masahisa, Kimura Tsunehisa, Horikawa Yoshiaki, Kawai Takahiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Crystal Orientation of Poly(L-Lactic Acid) Induced by Magnetic Alignment of a Nucleating Agent	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 653-653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/polym10060653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kusumi Ryosuke, Kadoma Hiroshi, Wada Masahisa, Takeda Kazuyuki, Kimura Tsunehisa	4. 巻 309
2. 論文標題 In situ solid-state NMR of a magnetically oriented microcrystal suspension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 106618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.106618	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kita Yusuke, Kusumi Ryosuke, Kimura Tsunehisa, Kitaoka Motomitsu, Nishiyama Yusuke, Wada Masahisa	4. 巻 27
2. 論文標題 Surface structural analysis of selectively ¹³ C-labeled cellulose II by solid-state NMR spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellulose	6. 最初と最後の頁 1899-1907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s10570-019-02896-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 He Qinfeng, Kusumi Ryosuke, Kimura Satoshi, Kim Ung-Jin, Deguchi Kenzo, Ohki Shinobu, Goto Atsushi, Shimizu Tadashi, Wada Masahisa	4. 巻 237
2. 論文標題 Highly swellable hydrogel of regioselectively aminated (1-3)-D-glucan crosslinked with ethylene glycol diglycidyl ether	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 116189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 久住亮介	4. 巻 10
2. 論文標題 磁場配向NMR -反磁性体の磁場配向を利用した構造解析-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本核磁気共鳴学会機関誌	6. 最初と最後の頁 57-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 久住亮介, 木村史子, 和田昌久, 木村恒久, 出口健三, 大木忍, 藤戸輝昭, 後藤敦, 清水禎	4. 巻 68
2. 論文標題 一軸配向化させたセルロース微結晶の化学シフトテンソル解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 材料	6. 最初と最後の頁 643-648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2472/jsms.68.643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 久住亮介	4. 巻 27
2. 論文標題 三次元磁場配向体の固体NMR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellulose Communications	6. 最初と最後の頁 44-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計28件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 久住亮介, 木村史子, 和田昌久, 木村恒久
2. 発表標題 磁場配向を利用したNMR構造解析
3. 学会等名 第14回日本磁気科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久住亮介, 門間啓, 和田昌久, 木村恒久, 武田和行
2. 発表標題 三次元拘束磁場下にある微結晶懸濁体のin situ固体NMR
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門間啓, 久住亮介, 和田昌久, 木村恒久, 武田和行
2. 発表標題 微結晶の三次元磁場配向機構を備えたin situ固体NMRプローブの開発
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久住亮介, 門間啓, 木村恒久, 和田昌久, 武田和行
2. 発表標題 三次元磁場配向下にある微結晶懸濁体の in situ 固体NMR
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久住亮介, 門間啓, 和田昌久, 木村恒久, 武田和行
2. 発表標題 三次元磁場配向プローブを備えたin situ固体NMRシステムの構築 -セルロース系多糖の構造・ダイナミクス・特性理解への応用を目指して-
3. 学会等名 セルロース学会第26回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門間啓, 久住亮介, 和田昌久, 武田和行
2. 発表標題 磁場配向微結晶懸濁体のin situ固体NMR -セルロース系材料への応用-
3. 学会等名 セルロース学会第26回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kadoma Hiroshi, Kusumi Ryosuke, Wada Masahisa, Kimura Tsunehisa, Takeda Kazuyuki
2. 発表標題 In situ solid-state NMR of three-dimensionally magnetically oriented microcrystal suspension
3. 学会等名 8th Asia-Pacific NMR Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kusumi Ryosuke, Kadoma Hiroshi, Wada Masahisa, Kimura Tsunehisa, Takeda Kazuyuki
2. 発表標題 Applications of magnetically oriented microcrystal array and suspension to analysis of anisotropic interactions
3. 学会等名 8th Asia-Pacific NMR Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門間啓, 久住亮介, 和田昌久, 木村恒久, 武田和行
2. 発表標題 三次元磁場配向した微結晶懸濁体のin situ固体NMR
3. 学会等名 高分子学会19-1NMR研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門間啓, 久住亮介, 和田昌久, 木村恒久, 武田和行
2. 発表標題 磁場配向微結晶懸濁体のin situ固体NMR
3. 学会等名 第13回日本磁気科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久住亮介, 門間啓, 和田昌久, 木村恒久, 武田和行
2. 発表標題 磁場配向を利用した微結晶粉末からの異方的相互作用の解析: 擬単結晶から磁場配向懸濁体へ
3. 学会等名 日本核磁気共鳴学会第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 門間啓, 久住亮介, 和田昌久, 木村恒久, 武田和行
2. 発表標題 磁場配向微結晶懸濁体のin situ固体NMR測定 - 磁場配向プローブの開発 -
3. 学会等名 日本核磁気共鳴学会第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 核磁気共鳴装置、及び微結晶構造解析方法	発明者 久住亮介、武田和行、木村恒久、門間啓	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-162723	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 核磁気共鳴装置、及び微結晶構造解析方法	発明者 久住亮介、武田和行、木村恒久、門間啓	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/33687	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

生物繊維学分野ホームページ
<http://www.fiber.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	木村 恒久 (Kimura Tsunehisa) (40264593)	京都大学・農学研究科・名誉教授 (14301)	
連携研究者	和田 昌久 (Wada Masahisa) (40270897)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	
連携研究者	武田 和行 (Takeda Kazuyuki) (20379308)	京都大学・理学研究科・准教授 (14301)	