

(様式 1-1)

提出日：2026 年 5 月 13 日

2025 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名（下記より該当事業名を選択し、ほかは削除してください。）

超高磁場 NMR

(2) 研究代表者

氏名：武田 光広

所属機関名・部局名・職名：東京薬科大学・薬学部・講師

(3) 研究課題名

高圧下における水素結合の挙動の NMR 研究

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：宮ノ入洋平准教授（研究室名：高磁場 NMR 分光学研究室）

(5) 研究成果の概要

*背景および目的、方法と結果について、公開して差し支えない範囲で記載。

背景および目的：生体分子中に形成される水素結合を解析する上で NMR は有力な手段となる。水素結合は加圧や特殊な局所環境により結合距離が短くなるとプロトンが非局在化して、水素結合を形成する原子の NMR シグナルの化学シフト、スピン結合の値に変化が生じてくると考えられる。しかし、従来のプロトン検出型の NMR 解析では水との交換等によりシグナルが広幅化して精密な解析が難しい場合も多い。近年、安定同位体標識技術と NMR 装置の高度化により、 ^{13}C 、 ^{15}N の直接測定が実用化してきている。水素結合のドナーあるいはアクセプターとなる炭素、窒素原子を位置選択的に ^{13}C 、 ^{15}N 標識して直接観測すると、プロトンに比べて先鋭なシグナルが観測され、化学シフト、スピン結合等の値を精密に測定できる可能性がある。本研究では、加圧状態において水素結合を形成する炭素、窒素を直接観測することで、プロトンの非局在化に関連した化学シフト、スピン結合値の変化を捉え、それらの相関を明らかにすることを目的とする。

方法と結果：プロトンの脱着が速く従来のプロトン検出型測定が適用出来ない状況でも ^{13}C 観測により化学シフト値等の精密な解析が実施できるか調べるため、光受容蛋白質 GR1 のリジン側鎖の ^{13}C NMR 解析を実施した。GR1 は、我々が以前に脱プロトン化リシンを同定した光受容蛋白質 RcaE (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2024) 121, e2404472121) の類縁タンパク質である。GR1 の場合、リジン側鎖に結合したプロトンは水と速く交換するためそれら NH のシグナルを検出できなかった。ε 位のみ ^{13}C 標識して重水素化したリシンを取り込ませた GR1 を調製し、蛋白質研究所の 500 MHz クライオ BBO プローブを用いて ^{13}C NMR 測定を実施した。検出された ^{13}C シグナルの線幅は 4 Hz と先鋭で化学シフト値の精密な測定が可能であり、実際に軽水と重水中で化学シフト値を測定して 0.1 ppm 単位の同位体シフト値の差を区別することで、GR1 中にも脱プロトン化リシンが形成されることを明らかとした。次に、加圧実験の解析対象として、低障壁水素結合 (LBHB) を形成する可能性が報告されている、デングウイルスの NS2B-NS3 プロテアーゼの NMR 試料の調製系を構築した。変性巻き戻し操作を行い調製した非標識 NS2B と ^{15}N 標識 NS3 の複合体に対して阻害剤を結合させた三者複合体を調製して、NMR 測定を行った。アミノ基の $^1J_{\text{NH}}$ は、通常の 90 Hz であるが、LBHB の形成が示唆されているアミドのは $^1J_{\text{NH}}$ は 54 Hz の値を示し、結合距離が短いことを反映していると考えられる。