

東京都立大学大学院理学研究科 教授

甲斐荘 正恒

「安定同位体利用NMR法の高度化と構造生物学への応用」

1. 研究実施の概要

高分子量蛋白質・核酸、及びそれらの複合体の溶液内立体構造を、迅速に、効率良く、しかも精密に決定するための新しい安定同位体利用 NMR 技術を開発することを目的として、高度選択的安定同位体標識アミノ酸・モノヌクレオシドの合成法を開発し、さらにそれらを利用して蛋白質や核酸を効率良く調製する技術を確立する。このようにして得られた標識生体高分子を利用して、従来は得ることのできなかった精密な立体構造情報を入手する新たな手法を確立する。

蛋白質・核酸、及びそれらの複合体の立体構造は、NMR 法で測定可能な水素原子核間の核オーバーハウザー効果 (NOE) を距離制限として決定することができる。X 線解析法は蛋白質が結晶として規則的に並ぶ、いわば人工的な環境が必要であるが、NMR による立体構造決定技術は、蛋白質が実際に機能を果たす場、即ち溶液や生体膜、において自由にうごきまわる状況下で適用可能である点に最大の特徴がある。つまり、NMR 技術は単に蛋白質等の生体高分子の静止画像的な立体構造情報の蓄積に寄与するに止まらず、それらの生物機能を果たす現場における立体構造の動きを解明できる唯一の方法である。立体構造と生物機能を関連づけることを最終的な目標とする構造生物学分野において、NMR 法の重要性が急速に高まっている理由がここにある。しかしながら、NMR 法はその半世紀の歴史の中で、蛋白質の立体構造決定技術として登場したのは僅か 10 余年程前に過ぎず、構造決定技術としては未だ揺籃期にあるに過ぎない。NMR 技術は測定・解析・試料調製の 3 主要技術を総合して初めて成立する複合技術であり、その全ての要素技術が厳しい開発競争にさらされている。本研究課題で取り上げた「安定同位体標識技術」は試料調製技術の中核をなすものであるとともに、本研究代表者が長年にわたって研究を先導して来た、国際的にも高い評価を受けている分野でもある。本課題の意図するところは、構造生物学への応用を念頭に置き、各研究グループ間、及び内外の関連研究者との共同研究を通じて従来の方法論的限界を越えた独創的な手法の開発を行うことにある。本章では、代表者グループにおける研究を中心に、本プロジェクトの 5 ヶ年間の研究実施内容を簡単に説明する。

NMR による立体構造決定技術は、従来は分子量 2 万以下程度の比較的分子量の蛋白質や核酸を対象として開発・利用されてきた。本プロジェクトにおける最終目標は、NMR 法の弱点として最たるものである分子量上限を、構造決定の精密化を犠牲にすることなく、4-5 万程度迄拡張することにある。このためには、安定同位体で標識した蛋白質・核酸試料の調製技術の開発が最大の難関となるが、同時にそれらを利用した様な先端的な NMR 技術の開発を進行させることも不可欠である。本プロジェクトで開発を図った新たな安定同位体利用 NMR 技術においては、位置・立体選択的に多重同位体標識したアミノ酸・モノヌクレオシド類の調製、それらを蛋白質や核酸オリゴマーに組み込む効率的技術の確立が重要な二つの要素技術である。過去 5 ヶ年間の研究成果により、これらの点においては大きな成果を上げることができた。特に、安定同位体標識核酸の調製技術の高度化に関し

ては、競合していた欧米の研究室に先駆けて多大な成果を収めた。さらに、同位体標識した核酸を利用した様々な NMR 研究は、国内研究室のみならず欧米の一線級の NMR 研究室との共同研究を積極的に実施した。この結果、DNA の Watson-Crick 水素結合を介するスピン結合の観測、弱い配向溶媒を用いて測定できる残余双極子相互作用の構造決定への応用など、大きなインパクトを持つ成果を数多く生み出した。一方、アミノ酸の位置・立体選択的多重標識体の合成と NMR 利用技術は、研究代表者が 60 年代に先鞭を付けた分野であるが、アミノ酸の微生物発酵生産技術、不斉有機合成技術の利用などを基礎として長足の進歩を遂げた。このような蓄積の結果、タンパク質立体構造決定に関する全く新しい概念の安定同位体利用 NMR 技術の発想に結びついた。以下、未完成ではあるが、次世代の標準技術と期待される本技術に関して簡単に説明する。

NMR による蛋白質・核酸、或いはそれらの複合体の立体構造決定は分子量の増大とともに急速に困難となる。従来の常識では、“分子量制限の緩和”と“立体構造精度”は両立できないと考えられてきた。もしこのような“常識”を覆す手法が開発できなければ、NMR 技術の構造生物学への応用は限定されたものになるであろう。高分子量蛋白質においては、NMR 構造情報はむしろ過剰すぎる位であるが、存在する NMR スペクトル情報が全て入手できるわけではない。実際の NMR スペクトルは重なりあい、最新のスピン技術（NMR 測定技術）を持ってしても解析は困難であり、結果的に高分子量のタンパク質になればなるほど、それらの立体構造決定は帰属のあいまいな、しかも相対的に少数のスペクトル情報に頼らざるを得ないことにある。従来は、核スピン技術、つまり多次元多核種 NMR 測定技術を利用して、物理学的手法により重なり合ったスペクトル情報をなんとか解析することに全精力が向けられてきた。この方向は既に限界に達しつつある。我々が本プロジェクトの結果明らかにした最大の成果は、今後はむしろタンパク質の NMR 構造解析に用いる試料を調製する段階において、不要な重複した構造情報を徹底的に取り除き、必要最小限の構造情報を持つように絞り込むことが、高分子量タンパク質の高精度、迅速構造解析法の開発につながることを示した点にある。

従来の高分子量タンパク質の NMR 立体構造解析は、非選択的にプロトン密度を低下させる“random fractional deuteration”（統計的重水素化）を利用するか、或は特定の基（例えばメチル基と芳香環）のみを残し、全てを重水素化するなどの方法が採られて来た。前者の手法では重水素で希釈することにより残余プロトンの NMR シグナルの線幅を鋭くさせ、後者はシグナルの数を著しく減少させることにより高分子量タンパク質のスペクトル解析を容易ならしめる。何れも、決定的な方法ではなく、得られる構造精度を犠牲にすることにより、高分子量タンパク質の構造決定を行ういわば“便法”である。しかしながら、もし統計的重水素化で生じる膨大な数の isotopomer 中で、特定の一種類の同位体異性体（isotopomer）のみを集め、NMR 測定試料に供することが可能ならば、構造決定に必要且つ十分な構造情報が、感度を全く犠牲にすることなく得ることができる。この考えが実は本プロジェクトの結果得られた基本的アイディアである。このような、いわば“夢の同位

体異性体”は、プロキラルグループ（メチレン、gem-メチル）においては全て一方が立体選択的に重水素化されており、メチル基や芳香環などの等価なプロトンは最小限必要なプロトン（各炭素あたり1個）を残して全て重水素化されている。無論、必要な位置の炭素、窒素は全て ^{13}C 、 ^{15}N に置換されている。このような、NMR 解析用に設計された試料の調製は容易ではない。しかし、過去5ヶ年間で必要な要素技術の開発は概ね終了している。以下、このために各グループが果たした寄与を述べる。

（都立大学グループ）

標識アミノ酸合成：タンパク質の構成アミノ酸20種類全てに関して、高分子量タンパク質に組み込んだ際に最も有効にタンパク質の立体構造情報を簡便に、高感度にもたらしように同位体標識パターンを設計した。この設計に基づき、微生物発酵、酵素反応、有機合成、不斉触媒反応などを利用して合成するルートを開発した。この結果、一部芳香族アミノの芳香環部分の最適標識パターンの実現を除き、殆ど全てのアミノ酸合成を終了した。量的には、無論僅かであり、合成ルートの最適化も今後の課題として残っているものの、タンパク質利用をテストケースとして行うには十分な量が確保できた。これらのアミノ酸の中にはプロリン、リジン、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、メチオニン、ロイシン、バリン、イソロイシン等の長鎖アルキル基を持つアミノ酸類も含まれ、これらのアミノ酸側鎖の精密な立体配座解析も可能となった。

標識タンパク質の無細胞タンパク質合成系による調製：標識アミノ酸を目的とするタンパク質へ組み入れる手法の開発にも着手した。このために必要な条件は3つある。第一に、標識アミノ酸に対して得られる標識タンパク質量が十分に高い、効率の良いタンパク合成系であること。第二に、代謝変換され易いアミノ酸を含めて、全てがそのままの標識パターンを保ったままで組み込むことが可能であること。第三に、多くのタンパク質が収量良く生産できる一般的は手法であること。我々は、大腸菌を用いた無細胞系タンパク質合成法がほぼこのような条件を満たすことを明らかにした。

標識タンパク質を利用した NMR 測定・構造解析技術の開発：800MHz 装置をはじめとする高磁場 NMR 装置を利用して、無細胞系で調製した標識タンパク質の NMR 測定を行いそれらの利点を検討した。この点は、着手したばかりであり、本技術の完成における最後の難関であるが、我々の最も得意とする分野であり、見通しは明るい。現在、CREST のテーマとして技術の完成と普及に向けての研究として、引き継がれている。

（東海大グループ）

標識アミノ酸合成：多年にわたる共同研究相手として、特に重水素化手法の技術開発に多大な貢献を果たして貰った。グルタミン酸の不斉重水素化反応、不斉重水素化グルタミン酸を出発原料とするアミノ酸合成等の基本的なルートの開発にも大きく寄与した。我々が最終的に採用したアミノ酸合成ルートの中で、本グループの開発したアイデアが幾つ

も利用されている。

(阪大グループ)

標識核酸の構造生物学への応用：同位体標識核酸の調製に関しては、本研究の開始時に都立大学グループにおいて基礎的技術は既に概ね完成していた。このため構造生物学的応用に関しては国内外の研究者との活発な共同研究を実施することができた。国内においては阪大と多くの共同研究を実施、多大な成果をあげることができた。

タンパク質の区分標識技術：特定のペプチド鎖のみを同位体標識する新たな技術として、ペプチド鎖のスプライシング反応の応用に取り組んだ。マルトース結合タンパク質をはじめ幾つかのモデルタンパク質に関して見事な成功を収めた。無細胞タンパク質合成系との組み合わせは魅力ある標識タンパク質の調製技術であるが、今のところ成功していない。今後、より連絡を密にし共同開発すべき課題の一つである。

2. 研究構想

本研究課題「安定同位体利用 NMR 技術の高度化と構造生物学への応用」を 1996 年に提案した当時、現在は日常的に耳にするタンパク質の網羅的立体構造と機能解析の時代が数年後に訪れることを予測するものはそれほど多くなかった。次ページより 3 ページに渡って記載する研究構想はまさに本プロジェクトの提案書からのそのままの形で引用したものである。構造ゲノム科学、機能ゲノム科学という言葉自体はないものの、ここで述べられている基本的な時代認識は現在の状況をまさに正確に予測したものである。

研究は基本的には計画通り進行したが、一部具体的な応用としてあげた核酸とタンパク質相互作用研究に関しては、今後開発されるタンパク質の側鎖立体配座の精密構造解析技術の進展を待って大きく発展する余地を残しており、またタンパク質結合水のダイナミクスなど現在も方法論的に未開拓な部分は予期した成果を上げることはできなかった。固体 NMR 技術に関しても、応用技術は 21 世紀前半の大きな課題として現在も残っている。極めて喜ばしいことに、アミノ酸の高度標識技術は有機合成手法の大幅な発展と、潤沢な研究費のおかげで予想を遥かに越える成果を生み、研究終了時にタンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のほぼ全てに関して、タンパク質立体構造情報の取得を最適化するように設計した標識体の合成を終了できた。これと同時に、研究 2 年目から開始した無細胞タンパク質合成系も苦労はしたものの、全てのアミノ酸を代謝拡散なく、満足すべき収率で目標とするタンパク質に取り込ませる技術を開発することができた。この結果、最終報告会にはカルシウム依存の制御因子タンパク質カルモジュリンの全アミノ酸を同時に高度標識体に置換した試料を用いて NMR 測定結果を示すことができた。試算によれば、このようなタンパク質は日常の構造決定手段に利用可能な経済性を持ち、従って 21 世紀における網羅的構造解析、機能解析に不可欠の標準的手段となることが視野に入った。研究開始時にはおぼろげなイメージしかつかめなかった新しい構造生物学研究技術としての同位体利用

NMR 技術の高度化がいまや誰の目にも明瞭な具体像として提示できたことは、本研究の最大の成果である。

ゲノム科学における研究手段として完成には更に1-2年程度を要し、一般化にとっては様々な枠組みの整備が必要ではあるが、幸にしてタンパク質の高精度・高効率立体構造決定技術開発として引き続き JST の援助を受けることが出来た。今後は標識アミノ酸の合成技術の改良(経済性の向上と多量合成技術の開発)、無細胞系タンパク質調製技術の改良(一般性の向上、コムギ胚芽などの他の無細胞系タンパク質合成系の利用)、さらには標識タンパク質を利用した広範な NMR 研究の応用へと発展させることをめざす。我が国の独創的な基盤技術として世界に向けて発信することも重要であり、既にそのために特許の取得なども進めている。これらは、研究終了後も引き続いて行わねばならない目標であり、また新プロジェクトの持つ大きな目標でもある。

[東海大グループ]

本グループ西山教授、大場助教授は有機合成化学を専門にしており、本研究の代表者と長年に渡ってアミノ酸の重水素化を中心に協力して貰ってきた。本課題においても、様々な新しい重水素化手法を開発し、その知見は多重標識アミノ酸合成に生かされている。特に、グルタミン酸を鍵中間体とする長鎖アルキル基を持つアミノ酸類の合成法は、大変重要な貢献である。

[大阪大学蛋白研グループ]

高分子量蛋白質の NMR 解析上問題となる点は幾つもあるが、その中で特に大きな問題は信号の数が多くなり過ぎ、相互に重なって合うことにある。このようなケースでは NMR 構造情報を得ることができない。本グループはこのようなケースに最適な標識手法“区分標識法”(segmental isotope labeling)を開発した。この標識法はある種の蛋白質は発現後に自己スプライシングにより、寄生配列を切り出し、成熟型の蛋白質に転換する性質を利用する。今後の標識技術の一つの手法として発展して行くと考えられる。本グループは核酸関係の構造生物学的研究へ大きな寄与をした。

以下に引用する構想は本プロジェクトの提案書からの引用である。

[研究の背景] タンパク質の溶液内立体構造が二次元 NMR スペクトル法により決定できることが、スイス工科大学の Wuethrich 等のグループにより示されてから、僅か10年程にしかならない。この間に、安定同位体利用多次元多核種 NMR 技術、コンピューター関連技術(ハード・ソフト両面)、超伝導磁石技術、タンパク質・核酸等の生体高分子調製技術等が一斉に、且つ急激に進歩し、NMR による溶液内立体構造決定法は結晶構造解析と並ぶ重要技術として広く知られることとなった。一方、一時は方法論的に完成したかに見えた X 線解析法も、放射光施設を用い高輝度線源・二次元検出技術の発達により新たな展開

を遂げた。ここに、構造生物学の洋々たる未来の礎は築かれたといってもよい。恐らく、今世紀の人類の知的枠組みに量子力学の発展が深く影響したように、来世紀の初頭には生命現象を立体構造とその動的変化に関連づけて理解する構造生物学の概念は、人間の様々な知的活動に多大な影響を与えて行くことと思われる。構造生物学は生産技術としてのバイオテクノロジーの基盤という位置づけには到底納めきれない、21世紀文明の潮流を決定するような、大きな存在意味を持つ。最近、我が国においても、特に重視すべき科学技術の基盤として、構造生物学の総合的推進が図れる機運にあることは大変喜ばしいことである。西播磨地区における放射光施設は、今後 X 線解析の世界的研究拠点の一つとして発展することが期待される。一方において、様々な生物種の遺伝情報の解読は世界的規模で進展しつつあり、それらが生み出す構造情報を、従来の分子生物学的水準から、立体構造を含めた構造生物学の水準に高めるに必要性は増すばかりである。今後、急激な技術的発展が予想される NMR 法の高度化こそは、構造生物学の基盤技術として我が国が国際的に大きく寄与できる数少ない分野である。若干遅れ気味の我が国の構造生物学への取り組みを、NMR 分野を先駆けとして世界の最先端に持ち上げようという構想が、本課題研究の基本的な戦略である。むろん、限られた、期間・組織の中でこのような目的を全て満たすことを考えてはいない。むしろ、今後続々と本格化する構造生物学振興のための様々な大型プロジェクトを視野に入れつつ、それらの成功にとって不可欠な前提条件である基盤技術の高度化、研究者のレベルアップ等を重要な目標においている。NMR の基盤技術として、国際的にも評価の高い、同位体利用 NMR 技術の高度化を図り、新たな技術開発の礎石とすることは、我が国独自の構造生物学分野の開拓にも有益であり、国際的にも大いに歓迎されることと思われる。

【研究目的・計画】 NMR により得られる生体高分子の立体構造情報は、単結晶の X 線解析から得られる情報に比べてはるかに多彩である。それらを分類すれば、①静止画像的な立体構造に関するもの、②溶液内における構造の揺らぎに関するもの、③生体高分子とリガンド（水を含め広い意味での）との相互作用に関するものにわけられる。X 線解析によって得られる立体構造情報は基本的には全て①のカテゴリーに属し、我々の生体高分子に関する描像そのものが、X 線解析のもたらす本質的に静止画像的なものとなってしまっている。構造生物学においては、生命現象を立体構造とその揺らぎにより捉えようとするものであるから、その意味では NMR のもたらす情報は X 線解析の構造情報を補完する性質を持つ。同位体利用 NMR 技術は上記全ての高度化に寄与することができる。本研究計画においては、従来の NMR 法によっては得ることが不可能であった高精度の局所情報を、しかも NMR の情報の特質をもっとも活かした形で、入手する手法の開発を目指す。個々のテーマの詳細は次に列挙するが、これらの究極の目標は、今後我が国において基盤整備が進むと考えられる、構造生物学への NMR 技術の展開を、我が国独自の技術を基盤とした独創的視点で展開するために必要な基礎を早急に確保することにある。

(a) 高分子量タンパク質の側鎖回転構造の精密決定技術の開発：現在の NMR による立体構造決定技術開発において、今後解決すべき重要な問題点が幾つか残されている。その内、NMR シグナルが一次構造上のどのアミノ酸に由来するか、いわゆる“帰属”（結晶構造解析の“位相”問題に対応すると考えられている）に関しては、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$ -標識を組み合わせる同位体利用技術により大きな進展が見られた。但し、本問題の根本的解決は、特定部位のアミノ酸残基を、位置選択的に同位体標識アミノ酸に置換する手法が発達することにより、将来的には解決されると考えられる。しかしながら、特定部位の立体構造取得法に関しては現在の方法論に固執する限り分子量が巨大化するにつれ適用不能となる。このような、様々な問題の解決は、安定同位体標識技術の更なる高度化を図らねばならない。特に立体・位置選択的重水素化と $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -標識を組み合わせる方法により、望みの部位のアミノ酸側鎖の溶液内構造を正確に記述できる。このような知見は、今後要求される溶液内立体構造の一層の精密化にとっても必須となる。

このような選択的同位体法は、その発展基盤を日本の独創的技術である、アミノ酸発酵法におく。微生物発酵・酵素合成法を化学合成と自在に組み合わせることにより、今後必要となるあらゆる選択的同位体標識化合物の要求に対応することができる。

(b) 選択的安定同位体標識核酸を利用した NMR 解析技術の開発：DNA/RNA の溶液内立体構造の決定手法は、基本的にはタンパク質のために開発されたプロトコルを援用したものである。しかしながら、多くの核酸構造では、近い空間距離制限を用いる手法では構造を一義的に決定することはできず、さらにヘリックス軸の歪みや折れ曲がりのような、長距離の空間距離に反映される構造変化を NMR により、詳細に得ることは大変困難であった。このような状況を今後改善しなければ、例えばタンパク質-核酸間の分子認識機構のような、極めて重要な構造生物学的問題に NMR が寄与できる余地は狭まる一方であろう。我々は過去数年間に、微生物によるプリン系核酸の発酵生産、ピリミジン系ヌクレオシドの完全化学合成法を確立し、それらを用いて固相合成により、DNA/RNA を標識する技術を確立した。これらの結果、世界に先駆けて様々な安定同位体利用 NMR 技術の開発に成功した。今後、超高磁場 NMR 装置の利用、特に高感度固体 NMR 測定技術を併用した構造情報の取得を念頭に置くと、特定原子を選択的に標識した核酸類の合成手法を早急に開発する必要がある。

(c) 生体高分子の溶液内における揺らぎと水和に関する研究手法の開発：タンパク質や核酸の水溶液における立体構造を NMR により研究する最大の利点は、立体構造や分子認識過程の動的過程に関して、各原子レベルでの情報を与える点にある。多次元 NMR 技術の進展から、 ^{15}N NMR シグナルの緩和時間測定などが簡便に行うことが可能となり、タンパク質構造の揺らぎを溶液（NMR の緩和パラメーター）と結晶（X線解析の温度因子）において比較するなど、様々な試みが始まっている。このような方向の研究は、緩和時間を

幾つかの異なった磁場強度で測定する（磁場依存性）、或いは主鎖・側鎖の¹³C-、²H-NMR シグナルの緩和パラメーターを同時に評価する等、様々な研究を展開すべき時期に差しかかっている。特に、¹³C-や²H-核の緩和時間測定は、¹⁵N-核に比し、遙に困難であり、安定同位体標識手法の高度化が不可欠となる。水和構造に関しても、NMR の与えることのできる水と水の交換寿命は水分子の生物学的機能と深く関わっており、今後開発すべき重要課題である。

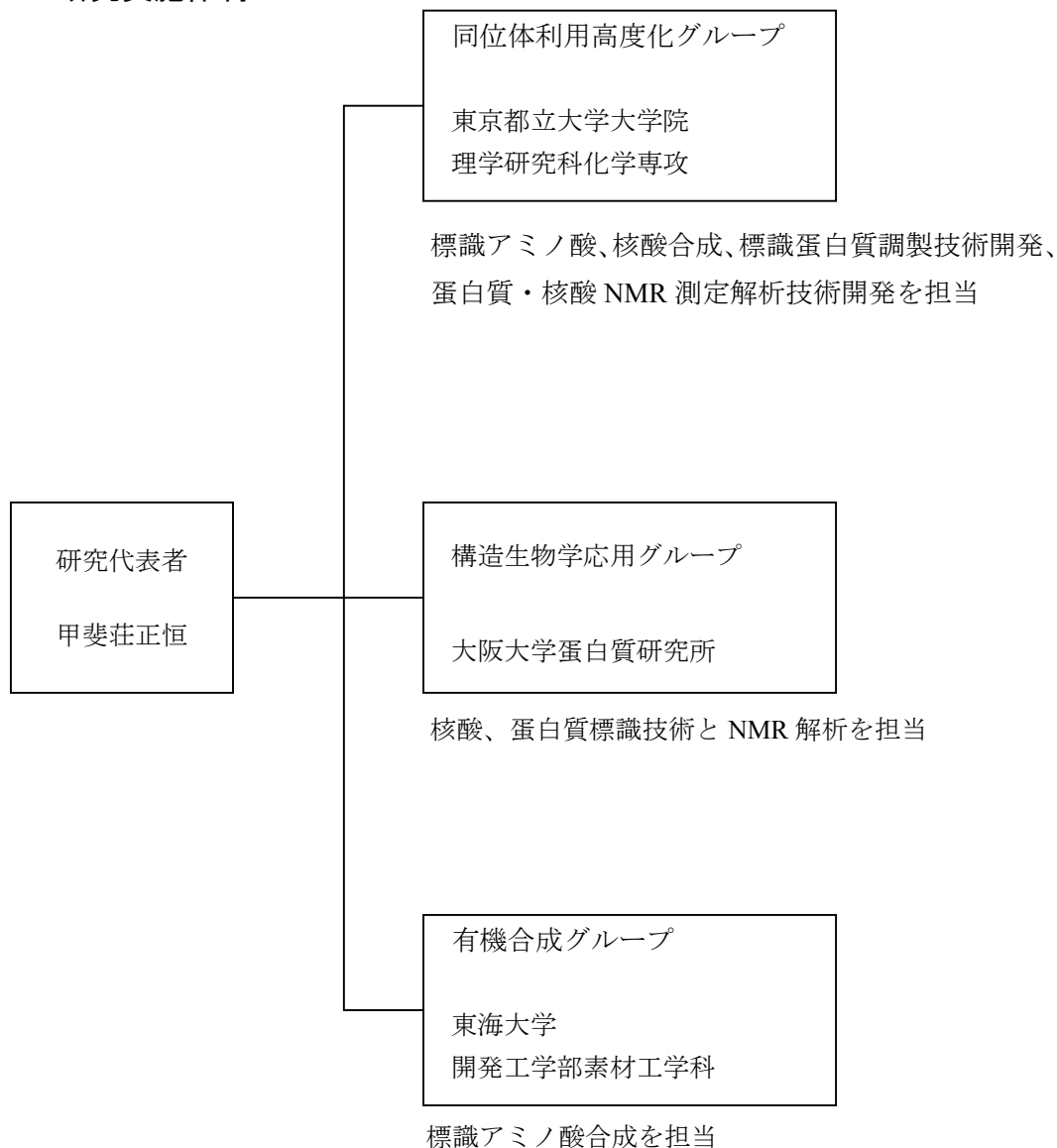
(d) 転写制御因子、修復酵素-DNA 相互作用系に対する応用：安定同位体利用 NMR 技術の利用は、蛋白質-蛋白質、或いは蛋白質-核酸等の生体高分子間の分子認識機構の解明にとって必須の手法となる。本課題研究においては転写制御因子や損傷 DNA の修復系に関与する酵素類への応用を通じて、構造生物学への有効性を実証する。具体的な研究対象としては構造生物学へ NMR 応用に関して最も深い経験と実績を有する国内外の研究グループとの密接な共同研究を実施する。スイス工大とは Antp ホメオドメインと DNA との相互作用に関し、大阪大学と RNA ポリメラーゼ α サブユニットと DNA との相互作用に関して、安定同位体標識した DNA を用い構造研究を行う。さらに、現在の NMR 研究手法の限界を拡大すべく、北陸先端技科大等との共同研究により、アルキル化損傷を受けた DNA の修復系に関与する Ada 蛋白質に関して、また筑波大学との間で、転写開始に関与する基本転写因子 TFIIB、TBP (TATA Box 結合蛋白質)、TAF (TBP-associated factor) に関して主として蛋白質-蛋白質複合体の分子認識機構の解明をめざす。このような複合系は結晶化が困難なものも多く、NMR に対する期待は大きい。しかしながら、現在の方法論では、分子量に由来する制約等から、NMR の利用が大きな成果を収めることは困難であった。本課題においては、高度な安定同位体標識技術、超高磁場 NMR から固体 NMR 技術迄を含めたあらたな展開を図る。とくに、DNA/RNA の安定同位体標識に関しては本学のグループが固相合成技術の徹底的利用を軸に世界をリードしており、以上に述べた具体的研究課題の遂行にとっても重要な礎石となろう。

【期待される成果】上記の研究項目は、安定同位体 NMR 技術の構造生物学への応用に向けて、方法論的開発に主点をおいて述べたものである。しかしながら、項目(d)に述べたよう、方法論的開発にあたって、幾つかの重要な具体的研究対象を選定し、共同研究を遂行することは重要であると考え。このように、実際的応用を同時に進行させることによつてのみ、構造生物学への有効な方法論の開発が実現できよう。本課題研究の成果をとりまとめれば、以下の3点に集約される。

- ① 構造生物学における安定同位体利用 NMR 技術の抜本的改良
- ② 立体構造と生物機能を結ぶ架け橋となるような、NMR 情報の取得手段の確立
- ③ 蛋白質と核酸の分子認識機構に関する安定同位体利用 NMR 法による構造生物学的解明

本研究課題で推進する安定同位体利用 NMR 技術は斬新にして、独創的なものである。したがって、安定同位体標識した蛋白質や核酸類の調製技術の高度化という基盤技術開発から、標識体を利用した NMR 測定・解析手法に至るまで、全て新規な技術開発が必要である。将来の構造生物学への NMR 技術の応用を視野に入れ、測定装置そのものも 800MHz 級装置を用いる等、本分野の研究手法を一新するような野心的試みを実施する。

3. 研究実施体制



4. ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
1998年 8月 23-28日	第18回生体系磁気共鳴 国際会議	東京都立大学	国内 382名 国外 395名 計 777名	生体系NMRに関する最大の国際会議
1998年 8月 29-30日	CREST&RRR-ワークショップ (多次元 NMR)	三島東レ研究センター	国内 45名 国外 5名 計 50名	多次元多核種NMR技術の基礎理論および実験に関する会議

5. 主な研究成果

(1) 原著論文 (1996-)

都立大グループ

1. “Structural Analysis of DNA by Isotope-aided NMR: Application of $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -Doubly Labeled DNA Oligomers”, T. Shiina, A. M. Ono, S. Kataoka, S. Tate, A. Ono, and M. Kainosho, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, 35, 17-18 (1996).
2. “Synthesis of (5'R)- and (5'S)-[5- $^2\text{H}_1$]-Ribonucleosides Using Asymmetric Hydride Transfer Reaction for 5-Formyl Ribose Derivatives”, A. M. Ono, T. Shiina, S. Kataoka, A. Ono, and M. Kainosho, *Nucleic Acids Res., Symp. Ser.*, 35, 73-74 (1996).
3. “Synthesis of 5'-Mnodeuterated nucleosides from Glucose with Various [(5'S)- $^2\text{H}_1$]/[(5'R)- $^2\text{H}_1$]-ratios”, Y. Oogo, A. M. Ono, A. Ono, and M. Kainosho, *Nucleic Acids Res., Symp. Ser.* 35, 77-78 (1996).
4. “Component and Chemical Shift of Phosphomonoesters on *in vivo* ^{31}P MR Spectra”, K. Imamura, A. Kitagawa, H. Kakajima, H. Nagoshi, T. Ishikawa, Y. Miyake, and M. Kainosho, *Jpn. J. Med. Phys.*, 16, 150-157 (1996).
5. “NMR Spectral and Structural Studies of a RNA Hairpin by Specific Isotope Labeling Method”, S. Kataoka, T. Shiina, A. M. Ono, A. Tate, A. Ono, and M. Kainosho, *Nucleic Acids Res., Symp. Ser.*, 35, 93-94 (1996).
6. “Synthesis of (5'S)-[5'- $^2\text{H}_1$;1',2',3',4',5'- $^{13}\text{C}_5$]-Thymidine *via* Stereoselective Deuteration of a 5-Oxoribose Derivative”, A. M. Ono, A. Ono, and M. Kainosho, *Tetrahedron Lett.*, 38, 395-398 (1997).
7. “NMR Analysis of the Hydrogen Bonding Interactions of the RNA-binding Domain of the Drosophila Sex-lethal Protein with Target RNA Fragments with Site-specific [3- ^{15}N]-Uridine Substitutions”, I. Kim, Y. Muto, M. Inoue, S. Watanabe, A. Kitamura, S. Yokoyama, K. Hosono, H. Takaku, A. Ono, M. Kainosho, H. Sakamoto, and Y. Shimura, *Nucleic Acids Res.*, 25, 1565-1569 (1997).
8. “Measurement of $^3\text{J}_{\text{CP}}$ Scalar Couplings in a 17 kDa Protein Complex with ^{13}C , ^{15}N -Labeled DNA Distinguishes the B_I and B_{II} Phosphate Conformation of the DNA”, T. Szyperki, A. Ono, C. Fernández, H. Iwai, S. Tate, K. Wüthrich, and M. Kainosho, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 9901-9902 (1997).

9. "Novel Approach to Diastereoselective Synthesis of 2'-Deoxy[5'-²H₁]-ribonucleoside Derivatives by Reduction of the Corresponding 5'-O-Acetyl-2'-deoxy-5'-phenyl-selenoribo-nucleoside Derivatives with a Bu₃Sn²H-Et₃B System", E. Kawashima, K. Toyama, K. Ohshima, M. Kainosho, Y. Kyogoku, and Y. Ishido. *Chirality*, 9, 435-442 (1997).
10. "Synthesis of Stereoselectively 5'-Monodeuterated Nucleoside with Defined S/R-Ratios. An Application to the Assignment of 5'-Methylene Signals of DNA Oligomers", Y. Oogo, A.M. Ono, S. Tate, A. Ono, and M. Kainosho, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 37, 35-36 (1997).
11. "Differential Isotope Labeling Strategy for Determining the Structure of Myristoylated Recoverin by NMR Spectroscopy", T. Tanaka, J.B. Ames, M. Kainosho, L. Stryer, and M. Ikura, *J. Biomol. NMR*, 11, 135-152 (1998).
12. "Stereospecific Assignment of H5' and H5'' in a (5'R)-/(5'S)-Deuterium Labeled DNA Decamer for ³J_{HH} Determination and Unambiguous NOE Assignments", C. Kojima, E. Kawashima, K. Toyama, K. Ohshima, Y. Ishido, M. Kainosho, and Y. Kyogoku, *J. Biomol. NMR*, 11, 103-109 (1998).
13. "Dual Amino Acid-selective and Site-directed Stable-isotope Labeling of the Human c-Ras Protein by Cell-free Synthesis", T. Yabuki, T. Kigawa, N. Dohmae, K. Takio, T. Terada, Y. Ito, E. D. Laue, J. A. Cooper, M. Kainosho, and S. Yokoyama, *J. Biomol. NMR*, 11, 295-306 (1998).
14. "Measurement of Deoxyribose ³J_{HH} Scalar Coupling Reveals Protein Binding-Induced Changes in the Sugar Puckers of the DNA" T. Szyperski, C. Fernández, A. Ono, M. Kainosho, and K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 821-822 (1998).
15. "NMR with ¹³C-¹⁵N Doubly Labeled DNA: the *Antennapedia* Homeodomain complexed with a 14mer DNA duplex" C. Fernández, T. Szyperski, H. Iwai, A. Ono, S. Tate, M. Kainosho, and K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR*, 12, 25-37 (1998).
16. "Collision Induced Spectra Obtained by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Using a ¹³C, ¹⁵N-Doubly Depleted Protein", S. Akashi, K. Takio, H. Matsui, S. Tate, and M. Kainosho, *Anal. Chem.* 70, 3333-3336 (1998).
17. "Systematic Synthesis of Specifically ¹³C/²H-Labeled Nucleosides from [*ul*-¹³C⁶]-D-Glucose", A. M. Ono, T. Shiina, A. Ono, and M. Kainosho, *Tetrahedron Lett.*, 39, 2793-2796 (1998).
18. "Synthesis of [5'-²H₁]-Nucleosides with Defined (5'S)/(5'R)-Ratios", Y. Oogo, A. M. Ono, A. Ono, and M. Kainosho, *Tetrahedron Lett.*, 39, 2873-2876 (1998).
19. "Determination of Peptide φ Angles in Solids by Relayed Anisotropy Correlation NMR", Y. Ishii, K. Hirao, T. Terao, T. Terauchi, M. Oba, K. Nishiyama, and M. Kainosho, *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 11, 169-175 (1998).
20. "NMR Structure of the Streptomyces Metalloproteinase Inhibitor, SMPI, Isolated from *Streptomyces nigrescens* TK-23: Another Example of an Ancestral βγ-Crystallin Precursor Structure", A. Ohno, S. Tate, S.S. Seeram, K. Hiraga, M.B. Swindells, K. Oda, and M. Kainosho, *J. Mol. Biol.*, 282, 421-433 (1998).
21. "Elucidation of the Mode of Interaction of Thermolysin with a Proteinaceous Metalloproteinase Inhibitor, SMPI, Based on a Model Complex Structure and a Structural Dynamics Analysis", S. Tate, A. Ohno, S.S. Seeram, K. Hiraga, K. Oda, and M. Kainosho, *J. Mol. Biol.*, 282, 435-446 (1998).

22. "NMR structure of the Histidine Kinase Domain of the *Escherichia coli* Osmosensor EnvZ", T. Tanaka, S.K. Saha, C. Tomonori, R. Ishima, D. Liu, K.I. Tong, H. Park, R. Dutte, L. Qin, M. Swindells, T. Yamazaki, A.M. Ono, M. Kainosho, M. Inouye, and M. Ikura, *Nature*, 396, 89-92 (1998).
23. "NMR Scalar Coupling Across Watson-Crick Base Pair Hydrogen Bonds in DNA Observed by TROSY", K. Pervushin, A. Ono, C. Fernández, T. Szyperski, M. Kainosho, and K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14147-14151 (1998).
24. "DNA Duplex Dynamics: NMR Relaxation Studies of a Decamer with Uniformly ¹³C-labeled Purine Nucleotides", C. Kojima, A. Ono, M. Kainosho, and T. L. James, *J. Mag. Res.*, 135, 310-330 (1998).
25. "Mutational Analysis of Reactive Site Loop of Streptomyces Metalloproteinase Inhibitor, SMPI", K. Hiraga, S.S. Seeram, S. Tate, N. Tanaka, M. Kainosho, and K. Oda, *J. Biochem.*, 125, 202-209 (1999).
26. "Quantitative Measurement of Transverse and Longitudinal Cross-Correlation between ¹³C-¹H Dipolar Interaction and ¹³C Chemical Shift Anisotropy: Application to a ¹³C-Labeled DNA Duplex", C. Kojima, A. Ono, M. Kainosho, and T.L. James, *J. Mag. Res.*, 136, 169-175 (1999).
27. "Determination of the Complete Structure of a Uniformly Labeled Molecule by Rotational Resonance Solid-State NMR in the Tilted Rotational Frame", K. Nomura, K. Takegoshi, T. Terao, K. Uchida, and M. Kainosho, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 4064-4065 (1999).
28. "Analysis of the Relationship between Enzyme Activity and its Internal Motion using Nuclear Magnetic Resonance: ¹⁵N Relaxation Studies of Wild-type and Mutant Lysozyme", S. Mine, S. Tate, T. Ueda, M. Kainosho, and T. Imoto, *J. Mol. Biol.*, 286, 1547-1565 (1999).
29. "Conformational Changes of the BS2 Operator DNA upon Complex Formation with the Antennapedia homeodomain Assessed by ¹³C/¹⁵N Labeling of the DNA" C. Fernández, T. Szyperski, H. Iwai, A. Ono, S. Tate, M. Kainosho, and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, 292, 609-617 (1999).
30. "The 2D: {³¹P} -Spin-echo-difference Constant-time[¹³C,¹H]-HMQC Experiment for Simultaneous Determination of ³J(¹H-³¹P) and ³J(¹³C-³¹P) in ¹³C-labeled Nucleic Acids and their Protein Complexes", T. Szyperski, C. Fernández, A. Ono, K. Wüthrich, and M. Kainosho, *J. Mag. Res.*, 140, 491-494 (1999).
31. "Backbone ¹H, ¹³C, and ¹⁵N Resonance Assignment of *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor", H. Sasakawa, A. Tamura, K. Akasaka, S. Taguchi, Y. Miyake, and M. Kainosho, *J. Biomol. NMR*, 14, 285-286 (1999).
32. "Stereo-divergent Synthesis of (2S,3S,4R,5R)- and (2S,3S,4R,5S)-[3,4,5-²H₃]-Proline Depending on the Substituent of the γ -Lactam Ring", M. Oba, A. Miyakawa, K. Nishiyama, T. Terauchi, and M. Kainosho, *J. Org. Chem.*, 64, 9275-9278 (1999).
33. "Well-Controlled Polymerization of Phenylacetylenes with Organorhodium (I) Complexes: Mechanism and Structure of the Polyenes", Y. Kishimoto, P. Eckerle, T. Miyatake, M. Kainosho, A. Ono, T. Ikariya, and R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 12035-12044 (1999).
34. "Determination of ^{2h}J_{NN} and ^{1h}J_{NH} Coupling Constants Across Watson-Crick Base Pairs in the *Antennapedia* Homeodomain-DNA Complex Using TROSY", K. Pervushin, C. Fernández, A. Ono, M. Kainosho, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR*, 16, 39-46 (2000).

35. "Simple Suppression Method of Spurious Peaks in TROSY Experiments", C. Kojima and M. Kainosho, *J. Magn. Res.*, 143, 417-422 (2000).
36. "The NMR Structure of a DNA Dodecamer in an Aqueous Dilute Liquid Crystalline Phase", N. Tjandra, S. Tate, A. Ono, M. Kainosho, and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 6190-6200 (2000).
37. "Solution Structure of an RNA Duplex Including a C-U Base Pair", Y. Tanaka, C. Kojima, T. Yamazaki, T. Kodama, K. Yasuno, S. Miyashita, A. M. Ono, A. Ono, M. Kainosho, and Y. Kyogoku, *Biochemistry*, 39, 7074-7078 (2000).
38. "Reelin Molecules Assemble Together to Form a Large Protein Complex, which is Inhibited by the Function-blocking CR-50 Antibody", N. Utsunomiya-Tate, K. Kubo, S. Tate, M. Kainosho, E. Katayama, K. Nakajima, and K. Mikoshiba, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 9729-9734 (2000).
39. "Three-dimensional Structure Determination of a Uniformly Labeled Molecule by Frequency-selective Dipolar Recoupling under Magic-angle Spinning", K. Nomura, K. Takegoshi, T. Trerao, K. Uchida, and M. Kainosho, *J. Biomol. NMR*, 17, 111-123 (2000).
40. "Backbone ^1H , ^{13}C , and ^{15}N Resonance Assignments of an 18.2 kDa Protein, *E. coli* peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase b (EPPib)", E. Kariya, S. Ohki, T. Hayano, and M. Kainosho, *J. Biomol. NMR*, 18, 75-76 (2000).
41. "Studies of Physicochemical Properties of N-H \cdots N Hydrogen Bonds in DNA, Using Selective ^{15}N -labeling and Direct ^{15}N 1D NMR", C. Kojima, A. Ono, and M. Kainosho, *J. Biomol. NMR*, 18, 269-277 (2000).
42. "Structural Comparison between WT and P25S Human Cystatin A by NMR Spectroscopy. Does this Mutation Affect the ^{15}N α -Helix Conformation?", N. Shimba, E. Kariya, S. Tate, H. Kaji, and M. Kainosho, *J. Struct. & Funct. Genomics*, 1, 26-34 (2000).
43. "NMR Structure of *Streptomyces* Killer Toxin-like Protein, SKLP: Further Evidence for the Wide Distribution of Single-domain $\beta\gamma$ -Crystalline Superfamily Proteins", S. Ohki, E. Kariya, K. Haga, A. Wakamiya, T. Isobe, K. Oda, and M. Kainosho, *J. Mol. Biol.* 305, 109-120 (2001).
44. "[^{13}C , ^{13}C]- and [^{13}C , ^1H]-TROSY in a Triple Resonance Experiment for Ribose-base Intrabase Correlations in Nuclei Acids", R. Riek, K. Pervushin, C. Fernández, M. Kainosho, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 658-664 (2001).
45. "Sugar Conformation of the Stereospecific 2'-R or 2'-S Deuterium-Labeled DNA Decamer Studied with Proton-Proton J Coupling Constants", C. Kojima, E. Kawashima, T. Sekine, T. Ishido, A. Ono, M. Kainosho, and Y. Kyogoku, *J. Biomol. NMR*, 19, 19-31 (2001).
46. "H-N Hydrogen Bond Lengths in Double Stranded DNA from Internucleotide Dipolar Couplings", Z. Wu, A. Ono, M. Kainosho, and A. Bax, *J. Biomol. NMR*, 19, 361-365 (2001).
47. "Methods for Sequential Resonance Assignment in Solid, Uniformly ^{13}C , ^{15}N Labeled Peptides: Quantification and Application to Antamanide", A. Detken, E. Hardy, M. Ernst, M. Kainosho, T. Kawakami, S. Aimoto, and B. H. Meir, *J. Biomol. NMR*. 20, 203-221 (2001).
48. "Slow Motion in the CAA/TTG Sequence of a DNA Decamer Duplex Studied by NMR", C. Kojima, N.B. Ulyanov, M. Kainosho, and T.L. James, *Biochemistry*, 40, 7239-7246 (2001).
49. "Synthesis of $^{13}\text{C}/\text{D}$ Doubly Labeled L-Leucines: Probes for Conformational Analysis of the Leucine Side-chain", M. Oba, M. Kobayashi, F. Oikawa, K. Nishiyama, and M. Kainosho, *J. Org. Chem.*, 66, 5919-5922 (2001).

50. "Structural Features of an Influenza Virus Promoter and Their Implications for Viral RNA Synthesis", S.-H. Bae, H.-K. Cheong, J.-H. Lee, C. Cheong, M. Kainosho, B.-S. Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 10602-10607 (2001).
51. "Target-induced Conformational Adaptation of Calmodulin Revealed by the Crystal Structure of a Complex with Nematode Ca²⁺/calmodulin-dependent Kinase Kinase Peptide", H. Kurokawa, M. Osawa, H. Kurihara, N. Katayama, H. Tokumitsu, M.B. Swindells, M. Kainosho, and M. Ikura, *J. Mol. Biol.*, 312, 59-68 (2001).
52. "Developing Model Systems for the NMR Study of Substituent Effects on the NH...N Hydrogen Bond in Duplex DNA", R. Ishikawa, C. Kojima, A. Ono, and M. Kainosho, *Magn. Res. Chem.*, 39 (S1), 157-163 (2001).
53. "Characterization of the ATP Binding Domain of the Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase: Probing Nucleotide Binding by Multidimensional NMR", M. Abu-Abed, T. Mal, M. Kainosho, D.H. MacLennan, and M. Ikura, *Biochemistry*, 41, 1156-1164 (2001).
54. "Solution NMR Structure of the Myosin Phosphatase Inhibitor Protein CPI-17 Shows Phosphorylation-induced Conformational Changes Responsible for Activation", S. Ohki, M. Eto, E. Kariya, T. Hayano, Y. Hayashi, M. Yazawa, D. Brautigan, and M. Kainosho, *J. Mol. Biol.*, 314, 839-849 (2001).
55. "Graphical Analysis of the Relative Orientation of Molecular Alignment Tensors for a Protein Dissolved in Two Different Anisotropic Media", K. Nomura and M. Kainosho, *J. Magn. Res.*, 154, 146-153 (2002).

阪大グループ

56. "Flexible Linker in the RNA Polymerase Alpha Subunit Facilitates the Independent Motion of the C-terminal Activator Contact Domain", Y. H. Jeon, T. Yamazaki, T. Otomo, A. Ishihama and Y. Kyogoku; *J. Mol. Biol.*, 267, 953-962 (1997).
57. "Solution structure of the IRF-2 DNA-binding domain: a novel subgroup of the winged helix-turn-helix family", J. Furui, K. Uegaki, T. Yamazaki, M. Shirakawa, M.B. Swindells, H. Harada, T. Taniguchi and Y. Kyogoku; *Structure*, 6, 491-500 (1998).
58. "Segmental Isotope Labeling for Protein NMR Using Peptide Splicing", T. Yamazaki, T. Otomo, N. Oda, Y. Kyogoku, K. Uegaki, N. Ito, Y. Ishino and H. Nakamura; *J. Amer. Chem. Soc.*, 120, 5591-5592 (1998).
59. "NMR backbone assignments of the cyanobacterial transcriptional factor, SmtB, that senses the zinc concentration in the cell", E. H. Morita, T. Kosada, T. Yamazaki, K. Kyogoku and H. Hayashi; *J. Biomol. NMR*, 12, 453-454 (1998).
60. "Cloning of the RNA polymerase α subunit gene from *Thermus thermophilus* and characterization of the protein", T. Wada, T. Yamazaki, S. Kuramitsu, and Y. Kyogoku, *J. Biochem.*, 125, 143-150 (1999).
61. "Intermolecular Contacts between the λ -Cro Repressor and the Operator DNA Characterized by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", H. Tochio, C. Kojima, H. Matsuo, T. Yamazaki and Y. Kyogoku; *J. Biomol. Str. Dyn.*, 16, 989-1002 (1999).
62. "Improved Segmental Isotope Labeling of Proteins and Application to a Larger Protein", T. Otomo, K. Teruya, K. Uegaki, T. Yamazaki and Y. Kyogoku; *J. Biomol. NMR*, 14, 105-114 (1999).

63. "Backbone NMR assignments of a cyanobacterial transcriptional factor, SmtB, that binds", T. Kosada, E.H. Morita, A. Miura, T. Yamazaki, H. Hayashi and Y. Kyogoku, *J. Biomol. NMR*, 14, 191-192 (1999).
64. "Identification by NMR Spectroscopy of Residues at Contact Surfaces in Large, Slowly Exchanging Macromolecular Complexes", H. Matsuo, K.J. Walters, K. Teruya, T. Tanaka, G.T. Gassner, S.J. Lippard, Y. Kyogoku and G. Wagner, *J. Amer. Chem. Soc.*, 121, 9903-9904 (1999).
65. "NMR Observation of Selected Segments in a Larger Protein: Central-Segment Isotope Labeling through Intein Mediated Ligation", T. Otomo, N. Ito, Y. Kyogoku and T. Yamazaki, *Biochemistry*, 38, 16040-16044 (1999).
66. "The Structure and the Characteristic DNA Binding Property of the C-terminal Domain of the RNA Polymerase α Subunit from *Thermus thermophilus*", T. Wada, T. Yamazaki and Y. Kyogoku., *J. Biol. Chem.*, 275, 16057-16063 (2000).
67. "Structure of the CAD Domain of Caspase-activated DNase and Interaction with the CAD Domain of its Inhibitor", K. Uegaki, T. Otomo, H. Sakahira, M. Shimizu, N. Yumoto, Y. Kyogoku, S. Nagata and T. Yamazaki, *J. Mol. Biol.*, 297, 1121-1128 (2000).
68. "Structural Study of the N-Terminal Domain of the Alpha Subunit of Escherichia coli RNA Polymerase Solubilized with Non-Denaturing Detergents", T. Otomo, T. Yamazaki, K. Murakami, A. Ishihama and Y. Kyogoku, *J. Biochem.*, 128, 337-344 (2000).
69. "Structural Understanding of the Allosteric Conformational Change of Cyclic AMP Receptor Protein by Cyclic AMP Binding", H-S.Won, T. Yamazaki, T-W. Lee, M-K. Yoon, S-H. Park, Y. Kyogoku and B-J. Lee, *Biochemistry*, 39, 13953-13962 (2000).
70. "Structure of the heterodimeric complex between CAD domains of CAD and ICAD", Takanori Otomo, Hideki Sakahira, Koichi Uegaki, Shigekazu Nagata, and Toshio Yamazaki *Nature Struct. Biol.*, 7, 658-662 (2000).
71. "Interaction of the C-terminal Domain of the *E. coli* RNA Polymerase α Subunit with the UP Element: Recognizing the Backbone Structure in the Minor Groove Surface", K. Yasuno, T. Yamazaki, Y. Tanaka, T.S. Kodama, A. Matsugami, M. Katahira, A. Ishihama and Y. Kyogoku, *J. Mol. Biol.* 306, 213-225 (2001).

東海大グループ

72. "Stereoselective Synthesis of (2S,3S,4R,5S)-Proline-3,4,5-d₃", M. Oba, T. Terauchi, J. Hashimoto, T. Tanaka, and K. Nishiyama, *Tetrahedron Lett.*, 38, 5515-5518 (1997).
73. "Stereoselective Deuterium-Labeling of Diastereotopic Methyl and Methylene Protons L-Leucine", M. Oba, T. Terauchi, A. Miyakawa, H. Kamo, and K. Nishiyama, *Tetrahedron Lett.*, 39, 1595-1598 (1998).
74. "Stereoselective Synthesis of Deuterium-Labeled Proline Using 4-Hydroxy-L-proline as a Chiral Template", M. Oba, T. Terauchi, and K. Nishiyama, *J. Deuterium Sci.*, 7, 31-36 (1998).
75. "Stereo-Divergent Synthesis of L-threo- and L-erythro-[2,3-²H₂]Amino Acids Using Optically Active Diketopiperazine as a Chiral Template", M. Oba, T. Terauchi, Y. Owari, Y. Imai, I. Motoyama, and K. Nishiyama, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1275-1281 (1998).
76. "Asymmetric Synthesis of L-Proline Regio- and Stereoselectively Labeled with Deuterium", M. Oba, T. Terauchi, A. Miyakawa, and K. Nishiyama, *Tetrahedron: Asymmetry*, 10,

- 937-945 (1999).
77. "Synthesis of [3,4-D₂]Lysine Using Deuterated Pyroglutamate Derivative as a Chiral Template", M. Oba, T. Terauchi, and K. Nishiyama, *J. Deuterium Sci.*, 8, 11-15 (1999).
78. Synthesis of L-[4,5,5,5-D₄]Isoleucine: Determination of Approximate Rotamer Population about the C_b-C_g Bond, M. Oba, A. Miyakawa, M. Shionoya, K. Nishiyama, *J. Labelled Compds. Radiopharm.*, 44, 141-147 (2001).

(2) 特許出願

① 国内 1) 甲斐荘正恒／寺内勉

「位置選択的安定同位体標識フマル酸と酒石酸の製造方法」

特願 2002-22446、2002 年 1 月 30 日、A021P40

2) 甲斐荘正恒／寺内勉

「安定同位体標識アミノ酸とその標識蛋白質への組み込み方法、並びに蛋白質の NMR 構造解析方法」

特願 2001-386823、2002 年 12 月 19 日、A021P43

② 海外 上記 2) の PCT 出願