

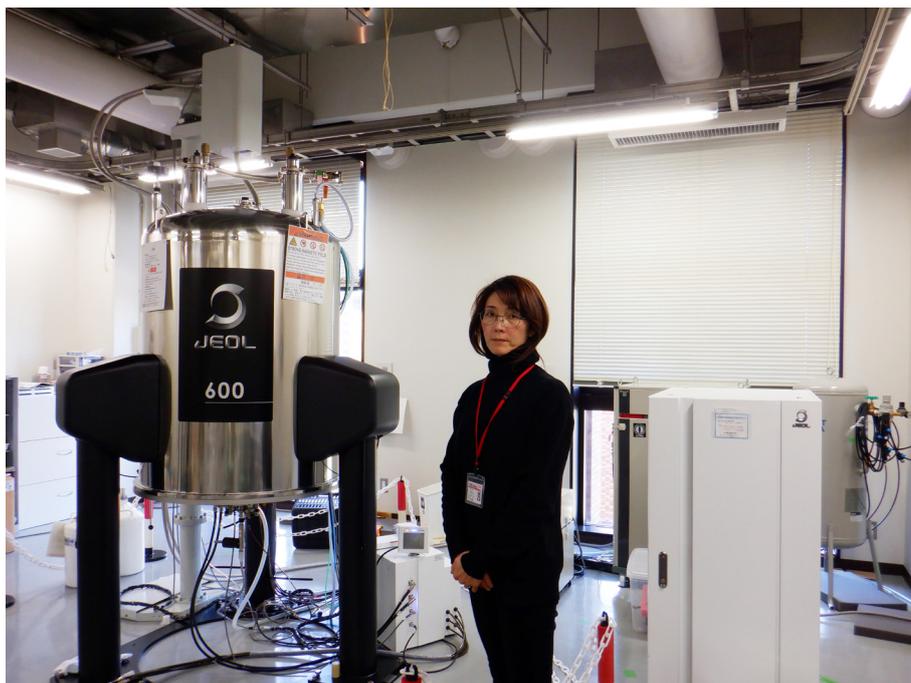


文部科学省 マテリアル先端リサーチインフラ 令和5年度技術スタッフ表彰 技術支援貢献賞 NMR, 熱分析装置等による技術支援

受賞者 自然科学研究機構 分子科学研究所 機器センター 長尾 春代氏に聞く

2021年度にスタートした文部科学省の委託事業である「マテリアル先端リサーチインフラ」(ARIM)は「ナノテクノロジープラットフォーム事業」(ナノプラ事業, 2012年度-2021年度)を引き継ぎ、「全国の最先端設備共用による研究開発支援」に加えて,新たに「マテリアルデータの収集・利活用」にも取り組んでいる。本事業は10年間事業で,全国25の大学,研究機関が参画し国のマテリアル革新力強化戦略に基づく7つの重要技術領域などの研究支援を推進している [1]。

この共用設備の有効活用には,設備の整備から装置使用上のノウハウ提供などの技術支援が不可欠である。ナノプラ事業では平成26年度より実施機関において実際に支援に携わっている方々の貢献に対し,技術スタッフを対象とした表彰を実施し,ARIMはこれを引き継いだ。2024年1月31日東京ビッグサイトで開催された第23回国際ナノテクノロジー総合展・技術会議に於いて,マテリアル先端リサーチインフラ 令和5年度「技術スタッフ表彰」の発表と表彰が行われ [2],「NMR,熱分析装置等による技術支援」に対して技術支援貢献賞が大学共同利用機関法人自然科学研究機構 分子科学研究所 機器センターの長尾 春代(ながお はるよ)氏に贈られた。今回 Web 取材により,どの様な支援が実施されたか,またそのご苦労,成果について長尾氏に伺った。



核磁気共鳴装置の前にて長尾 春代氏



1. 分子科学研究所の ARIM 事業とその利用状況

1.1 分子科学研究所の概要

分子科学研究所(以下,分子研)は1975年に分子構造研究系,電子構造研究系,分子集団研究系の3つの研究系と機器センターをもつ研究所として愛知県岡崎市に設立された,分子科学分野における日本の中核的な国立研究所である [3]。キャンパスは設立時からの明大寺地区

に加えて,2002年に山手地区が設けられた。

2004年には,国立大学法人化に合わせて創設された,大学共同利用機関法人自然科学研究機構を構成する5研究所の1つとして活動している。

大型測定機器や高速計算機など非常に大型/高額で大学単独では設置/購入することが難しい研究機器を整備し,全国の大学へ開放することで,世界トップクラスの分子科学研究を行う拠点としての役割を担っている。

図1に自然科学研究機構における分子研の組織図を示す [3]。

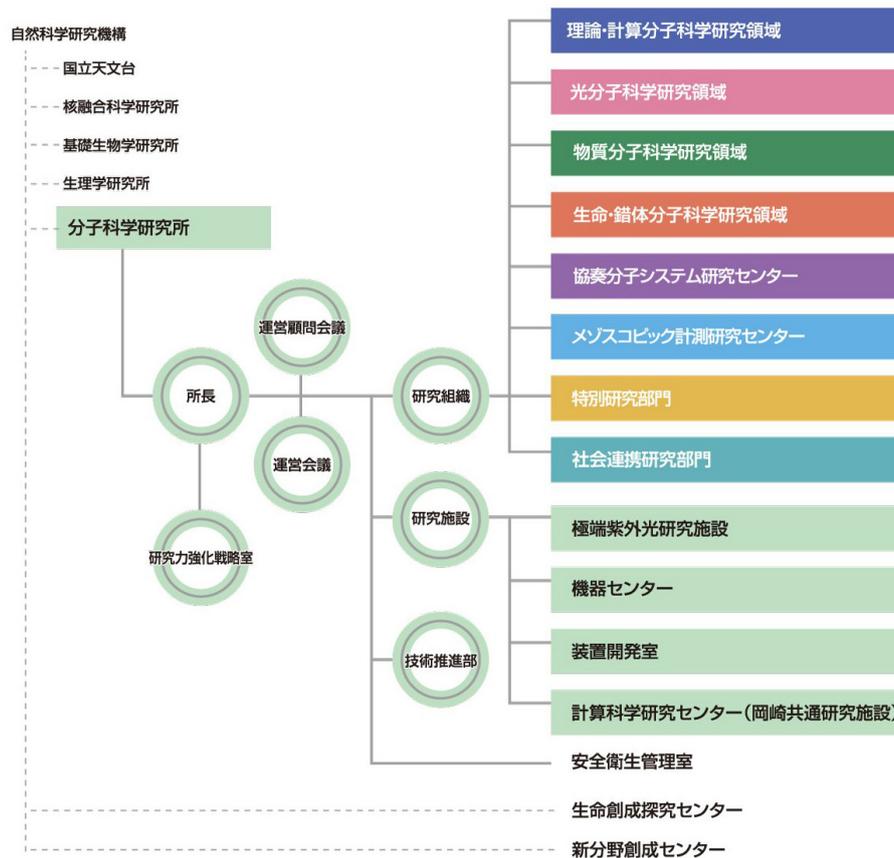


図1 分子研 組織図 [3]

1.2 分子研における ARIM 事業

ARIM は、7つの重要技術領域（1. 高度なデバイス機能マテリアル、2. エネルギー変換マテリアル、3. 量子・電子マテリアル、4. マテリアルの高度循環技術、5. バイオマテリアル、6. ナノスケールマテリアル、7. マルチマテリアル化技術・高分子マテリアル）のそれぞれに強みを持つ先端装置群を提供するハブ機関と、特徴的な装置・技術を持つスポーク機関からなるハブ＆スポーク体制で、利用者の研究開発を支援する。また、重要技術領域を横断する3つの技術領域（1. 計測・分析、2. 加工・デバイスプロセス、3. 物質・材料合成プロセス）を設けている [4]。

分子研は物質・材料研究機構（NIMS）をハブとする重要技術領域「マテリアルの高度循環のための技術」のスポーク機関、および運営機構横断領域『物質・材料合成プロセス技術分野（以下、合成分野）』の責任機関として ARIM に参画している [5]。前者としては研究所が保有する「先端計測技術」、「データ駆動型研究」を活用し、機器センターを中心に、装置開発室、極端紫外光科学研究施設（UVSOR）、計算科学研究センターとの協力体制の下、代替材料や再生材料由来の物質合成、材料削減に資する触媒反応の可視化など幅広くマテリアル循環に関わる支援を行っている。後者としては若手研究者、技術スタッフの技能向上のための研修会の企画・運営、共用設備の導

入支援、「データ駆動型研究・教育」のための ARIM 共用データ利用支援などの推進がある。現在、合成分野における自動化、マテリアルインフォマティクス、プロセスインフォマティクス、ケモインフォマティクスに関する知識や技術習得のための支援をワーキンググループ活動を通じて行っている。

1.3 分子研の共用設備とその利用状況

分子研は表 1 に示す約 40 台の先端研究設備・機器を利用する機会を産学官の研究者に提供し [4]、従来にはない機能や優れた特性を持った有機・無機材料、金属系ナノ材料の探索・開発のための物質・材料合成、構造解析、分子設計などを支援している。なお設備 ID が水色でマークされているものは RDE（研究データを自動的に構造化して蓄積するシステム）に対応済を示す。RDE への対応が済んでいる装置では、装置からの生データを登録すると、自動的に利活用しやすい形に構造化されクラウドに蓄積される。

設備の利用は協力研究・施設利用の2形態で一部を除き技術代行はしていない。技術相談は装置利用を考慮する時に、実験に関する技術的な相談、利用形態について回答することで対応している [6]。協力研究については研究者が対応し、研究者と共同で実験を行うことにより、利用者は材料設計や分析・計測のノウハウを取得するこ

表 1 分子研の共用設備

(設備IDの表記中 は、RDEシステム対応済み設備を示す)

施設名	カテゴリ	設備 (設備群) 名		設備ID
分子研	電子顕微鏡	低真空分析走査電子顕微鏡	日立ハイテクノロジーズ社製 SU6600	MS-202
		電解放出型透過型電子顕微鏡	JEOL社製 JEM-2100F	MS-203
	走査プローブ顕微鏡	走査プローブ顕微鏡	Bruker社製 Bruker Dimension XR Icon NanoElectrical Bruker社製 Bruker Dimension XR Icon NanoElectrochemical	MS-204
	表面分析	電子線プローブマイクロアナライザー (EPMA)	日本電子社製JXA-8230、SS-94000SXES 分光器: SS-94000SXES	MS-236
	X線	単結晶X線回折 利用開始 2024.04.01	Rigaku社製 XtaLAB Synergy-R/DW	MS-235
		単結晶X線回折 (CCD-1)	Rigaku社製 MERCURY CCD-1・R-AXIS IV	MS-205
		単結晶X線回折 (CCD-2)	Rigaku社製 MERCURY CCD-2	MS-206
		単結晶X線回折 (微量結晶用)	Rigaku社製 HyPix-AFC	MS-207
		結晶スポンジ法を用いた分子構造解析	Rigaku社製 XtaLAB P200 (Rigaku社製 XtaLAB P200) Rigaku社製 SuperNova	MS-208
		オペランド多目的X線回折	Panalytical社製 Empyrean	MS-210
		粉末X線回折	Rigaku社製 RINT-UltimaIII	MS-209
		X線溶液散乱計測システム	Rigaku社製 NANO-Viewer	MS-211
	電子分光	機能性材料バンド構造顕微分析システム	光電子分光装置 (光電子分析器、真空紫外光源、試料冷却機構、真空チェンバー)	MS-212
		X線光電子分光	Scienta光電子分光装置 (光電子分析器R4000L1、Al-Kα単色X線源MX-650、真空紫外光源VUV5k、中和電子銃、グローブボックス)	MS-213
	電子スピン共鳴	電子スピン共鳴	Bruker社製E680	MS-214
		電子スピン共鳴	Bruker社製EMX	MS-215
		電子スピン共鳴	Bruker社製E500	MS-216
		電子スピン共鳴	Bruker社製 E580	MS-217
	SQUID	SQUID型磁化測定装置	QuantumDesign社製 MPMS-7	MS-218
		SQUID型磁化測定装置	QuantumDesign社製 MPMS-XL7	MS-219
		SQUID型磁化測定装置	QuantumDesign社製 MPMS-3	MS-220
	熱分析	熱分析: 示差走査型カロリメーター (溶液)	MicroCal社製 VP-DSC	MS-221
		熱分析: 等温滴定型カロリメーター (溶液)	MicroCal社製 PEAQ-ITC	MS-222
		熱分析: 熱分析装置 (固体、粉末)	Rigaku社製 DSC8231/TG-DTA8122	MS-223
	質量分析	MALDI-TOF質量分析	Bruker社製 Microflex LRF	MS-224
	分光	顕微ラマン分光	RENISHAW社製 inVia Reflex	MS-225
		FT遠赤外分光	Bruker社製 IFS66v/S	MS-226
		蛍光分光	HORIBA社製 SPEX Fluorolog 3-21	MS-227
		紫外・可視・近赤外分光光度計	SHIMADZU社製 UV-3600Plus	MS-228
		絶対PL量子収率測定装置	HAMAMATSU社製 Quantaaurus-QY C11347-01	MS-229
		円二色性分散	JASCO社製 J-1500	MS-230
	レーザー	ピコ秒レーザー	Spectra-Physics, Quantronix社製 Millennia-Tsunami, TITAN-TOPAS	MS-231
	高磁場 NMR	高磁場 NMR: 1H 600MHz (固体)	Bruker社製 AVANCE 600	MS-232
高磁場 NMR H 600MHz (溶液)		JEOL社製 JNM-ECA600 (溶液)	MS-233	
高磁場 NMR: 1H 600MHz (溶液)		JEOL社製 JNM-ECZL600G (溶液)	MS-237	
装置開発室	マイクロストラクチャー	マスクレス露光装置 (DL-1000/IMC) 段差計付き	段差計 (KLA-Tencor P7) スピナー (ミカサ社製 MS-A100)	MS-101
		3次元光学プロファイラーシステム (Nexview)	Zygo社製 Nexview	MS-102
		電子ビーム描画装置	エリオニクス社製 ELS-G100	MS-103
放射光	UVSOR	X線磁気円二色性 (XMCD)	UVSOR-III BL4B (100-1000eV円偏光)	MS-001
合成ものづくり支援	大規模量子化学計算	大規模量子化学計算	高精度ナノ構造電子状態計算	MS-302
	有機FET	有機FET	有機FETの設計・製作・各種評価	MS-301
	有機合成DX	有機合成DX	有機合成の自動化とAIの活用 有機分子および反応のDFT計算	MS-304
	磁性薄膜作製評価	磁性薄膜作製評価	超高真空下での磁性薄膜作成・磁気光学Kerr効果によるその場観察評価/紫外レーザー磁気円二色性 光電子顕微鏡も利可	MS-303
	機器センター長協力研究	機器センター 長協力研究	機器センター以外の分子研施設利用を実施する際に、機器センター機器(所内専用機器を含む)を補助的に利用するための区分	

とが出来る。特に物質合成の場合は手順を間違えると事故の危険も伴うが、専門の研究者との共同作業により未知化合物の合成方法等も確立することが出来る。一方、施設利用に対しては、分子研組織図にある、研究施設の機器センターに所属の技術職員が対応している。機器の操作は基本的には利用者自身が行うが、装置のトラブル、解析ソフトの使い方等に関しては、技術職員が対応する。分子研は大学共同利用機関法人であることから、大学・官公庁の利用は一部の装置と消耗品を除き、無料であるが、民間企業の施設利用は有償である。利用の結果得られた成果は公開とするが、民間には成果非公開での利用も認めている。

1年間の利用申請は民間企業の利用も含めて、およそ180件である。またマテリアルデータの蓄積についても力を入れており、2022年度からの2年間でおよそ1500件のデータを蓄積した。

技術スタッフ表彰は、令和元年度に、機器センターの電子スピン共鳴装置担当者3名が技術支援貢献賞を受賞している [7]。

2. 受賞題目に挙げられた NMR, 熱分析装置

2.1 NMR 装置の原理とその応用例

NMR とは、Nuclear Magnetic Resonance (核磁気共鳴) の略である。

核スピン量子数 I が 0 でない原子核は磁気モーメントを持ち、これを磁場中に入れると歳差運動を起こし、原子核はゼーマン分裂によって $2I+1$ 個のエネルギー準位に分かれる。このエネルギー差に相当する電磁波 (ラジオ波) を照射すると低いエネルギー準位にある原子核はエネルギーを吸収して高いエネルギー準位へと励起され (核磁気共鳴)、電磁波の照射を止めるとエネルギーが放出される (緩和)。この共鳴現象を観測することで、物質の分子構造を原子レベルで解析することができる。共鳴周波数は核種によって異なるが、同一核種においてもそれぞれの原子核の置かれた化学的環境に応じて若干の差

が生じる。これは化学シフトと呼ばれ、この化学シフトから化合物に含まれる官能基の種類や位置といった原子核の置かれた環境の情報を推定することができる。特に、有機化合物および高分子材料の構造解析に威力を発揮し、製薬・バイオ・食品・化学といった分野で広く使われている。

しかしながら NMR の検出感度は質量分析法などの他の分析法と比較してきわめて低い。検出感度は共鳴周波数 (磁気回転比, 外部磁場強度)、試料濃度や天然存在比が高いほど上がる。このため、NMR 測定対象の核種には ^1H が最も多く用いられ、 ^{19}F 、 ^{13}C などがこれに次ぐ。また金属錯体などでは ^{183}W 、 ^{95}Mo などの重金属の核種の測定も必要になる。14.1T の磁場における共鳴周波数は、 ^1H : 600MHz、 ^{13}C : 150MHz、 ^{183}W : 25 MHz である。この高磁場を発生させるため超伝導磁石が用いられている。

NMR 測定に用いる電磁波は、当初、連続波を周波数掃引していたが、ラジオ波パルスを用いて得られた信号をフーリエ変換して共鳴信号を検出する手法が生まれた。その後も多くの測定法が開発され、NMR 測定によって得られる情報が多くなった。また、測定条件設定が多彩になり、測定の経験やノウハウの重要性が増している。

2.1.1 溶液 NMR による構造決定例

NMR による構造決定には、多彩な手法があるが、ここでは樟脳の構造決定を一例として示す。有機物は基本的に C と H を主体としており、まず ^1H 、 ^{13}C の NMR スペクトルから ^1H と ^{13}C の独立したサイトが分かる。図 2 に樟脳の ^1H 、 ^{13}C の NMR スペクトルを示した。 ^1H が 7 個の独立したサイト、 ^{13}C が 10 個の独立したサイトを有していることがわかる。水素の 4', 6', 7' は CH_2 (メチレン) の水素のうち、ピーク 8 や 9 から遠い方の水素を示している。

次に NMR による構造解析においては、水素 (^1H) と炭素 (^{13}C) の位置関係を調べて解析することが一般的である。図 3 に示す edited-HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) は二次元 NMR の一つで、横軸は ^1H の化学シフトを、縦軸は ^{13}C の化学シフトを示し、 ^1H - ^{13}C 間の直接結合の種類と強度が測定され、各軸の交点を見るこ

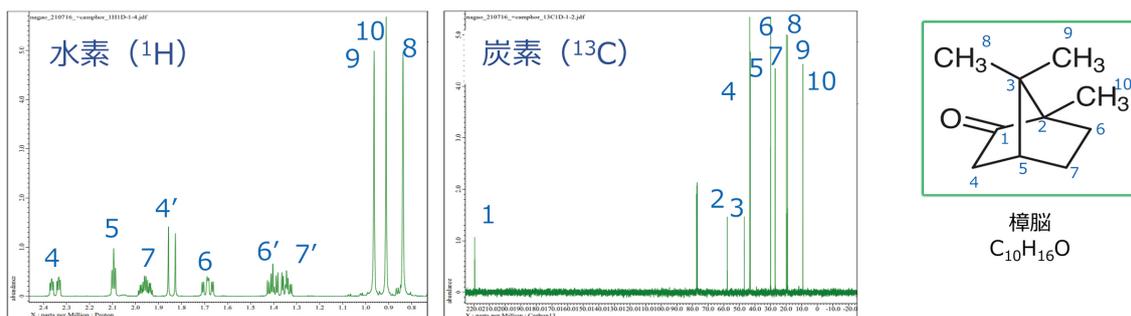


図 2 樟脳とその ^1H 、 ^{13}C の NMR スペクトル

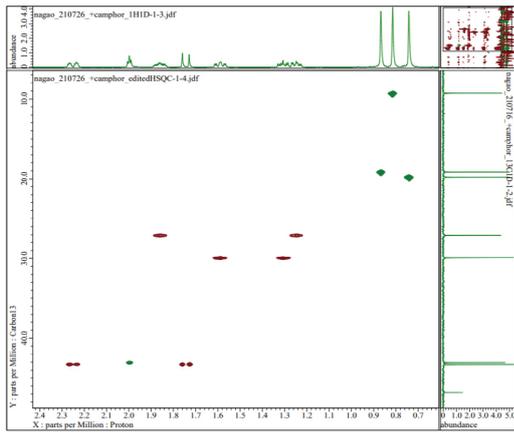


図3 樟腦の edited-HSQC 分析

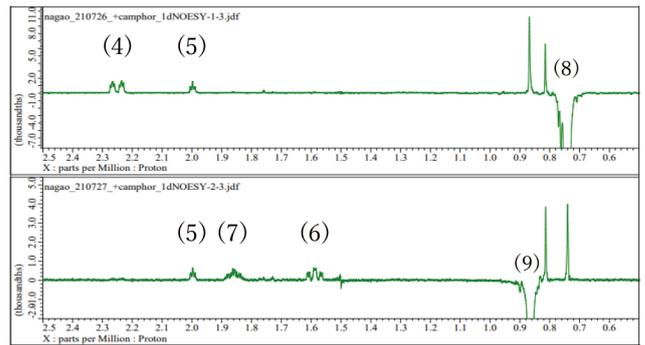


図4 樟腦の 1D NOESY スペクトル

とにより、直接結合した ^{13}C と ^1H とを帰属できる。さらに edited-HSQC は DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) という ^{13}C に結合している ^1H の数を判別するための機能を追加した測定手法である [8]。

また図 4 に 1D (一次元) NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) を示す。NOE とは、ある核に共鳴する周波数の電磁波を照射したときに、その核と磁氣的に相互作用している別の核のシグナル強度が変化する現象である [9]。図 4 の上段では ^1H の一次元測定ピーク 8 と空間的に近い ^1H のピーク 4, 5 が、下段では一次元測定ピーク 9 と空間的に近い ^1H のピーク 5, 7, 6 が現れている。この空間的に近接している (約 5 Å 以内の) ^1H 間の相互作用を利用して、分子内の ^1H 同士の距離や立体的

な配置を推定することも可能で、タンパク質のような巨大分子の立体構造解析にも役立つ。

NMR 測定にはこの他にも同種核 ^1H - ^1H の隣接水素情報を得る COSY、隣接水素網の全相関情報を得る TOCSY、異種核 ^1H - ^{13}C の 2 ~ 3 結合離れた H-C 相関情報を示す HMBC など、多くの測定法が開発されている。

2.1.2 多核 NMR 分析例

NMR では ^1H , ^{13}C 以外の核についても測定が可能であり、 ^1H と ^{13}C 以外を対象とした測定を多核 NMR と呼んでいる。NMR における各核種の検出感度 S は一定磁場下、次式で表される。

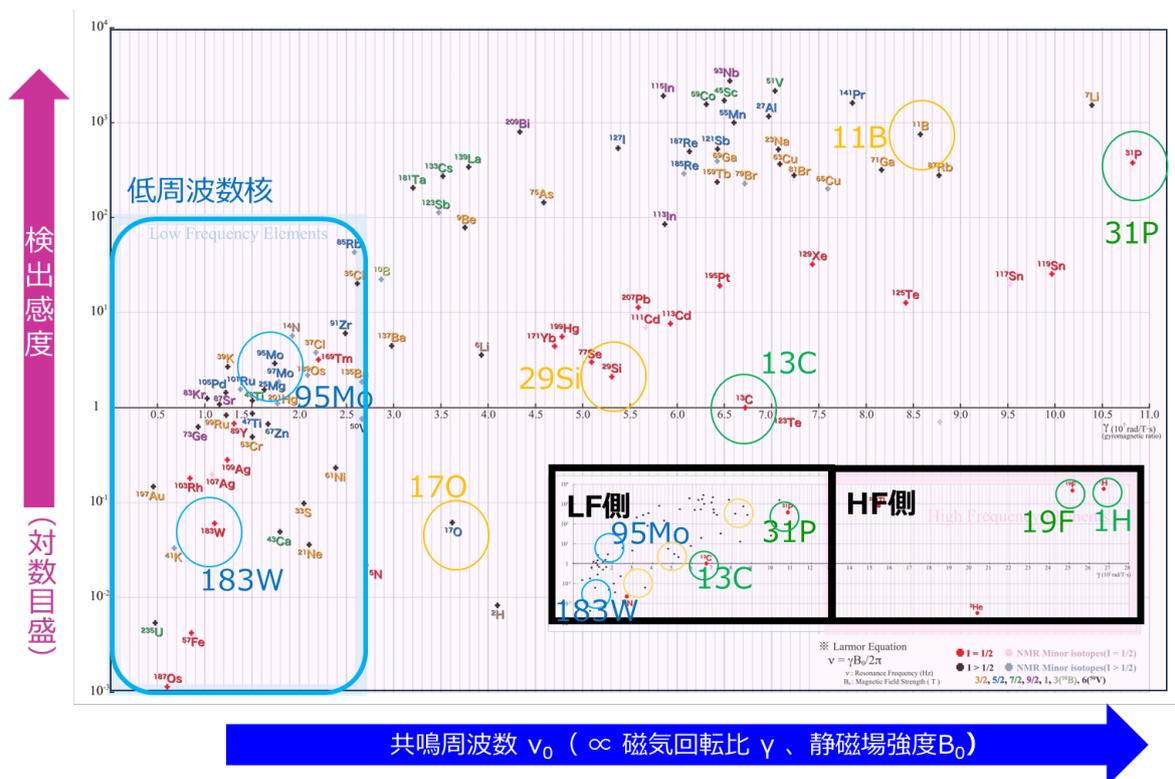


図5 NMRにおける各核種の検出感度 (縦軸は ^{13}C の感度を 1 とし、対数表示) 【JEOL 殿より掲載許諾頂き改変】

$$\text{検出感度 } S \propto I(I+1) \nu_0^3 N$$

I : 核スピン (核種ごとの固有値)

ν_0 : 共鳴周波数 ($\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$)

N : 核スピン濃度 (試料濃度, 天然存在比)

γ : 磁気回転比 (核種ごとの固有値)

B_0 : 外部磁場強度 (マグネットの磁場の大きさ)

ここで、観測者が変更可能なパラメータは試料濃度と磁場強度のみである。図5にNMRにおける各核種の検出感度を示す。ここで縦軸の検出感度は対数目盛である。

分子研 機器センターは低周波核用プローブを開放しており、低周波数核のNMR測定を実施できる数少ない共同利用機関である。図5に示す通り、低周波数核の γ は ^1H の100分の1以下である。また I (核スピン) が $I > 1/2$ の四極子核である核種 (図5で赤字以外の核種) では信号の線幅が広がる。これにより見掛け上の検出感度も低下するため、測定には長時間を要することになる。

機器センターではタングステン (^{183}W), モリブデン (^{95}Mo), 窒素 (^{15}N) などの測定実績を有している。

2.2 熱分析装置 (カロリメータ) の原理とその応用例

分子研の有する熱分析装置はタンパク質などの生体分子を対象とした溶液用の熱分析装置であり、溶液中の極めて小さな熱変化を精度よく測定出来るマイクロカロリ

メータである。このマイクロカロリメータには等温滴定型カロリメータ (ITC : Isothermal Titration Calorimeter) [10] と示差走査型カロリメータ (DSC : Differential Scanning Calorimeter) [11] の2種がある。

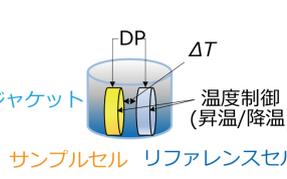
ITCは生体分子間の相互作用を、DSCは生体分子の熱変性等を、いずれも断熱ジャケット中に設置されたサンプルセルとリファレンスセルの温度差をゼロに制御するために変化した補償電力量を直接プロットし、熱量変化を測定するものであり、その概要を表2に示す。

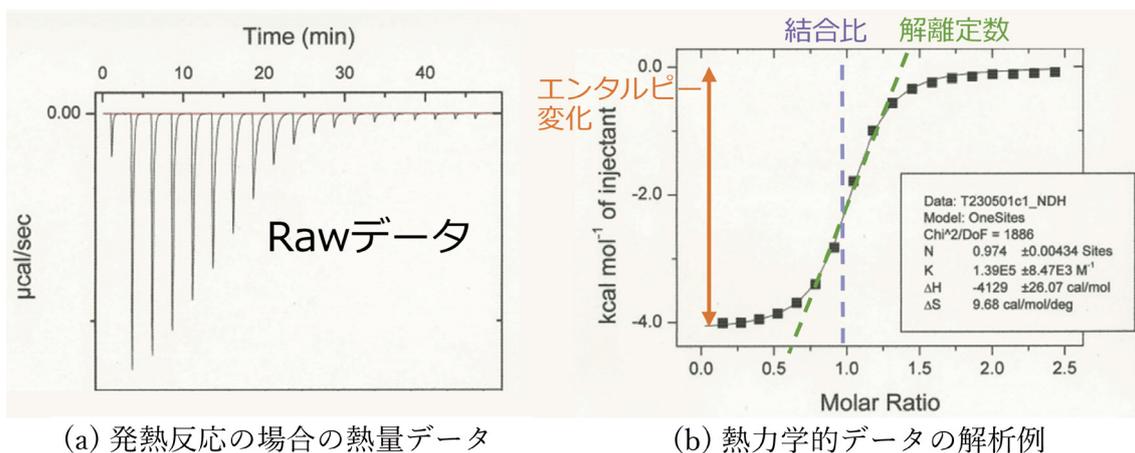
2.2.1 等温滴定型カロリメータ (ITC) 測定例

溶液中の生体分子間相互作用に伴う熱量変化を直接測定し、各種熱力学的パラメータを得る装置で、測定に用いるタンパク質、リガンド等の標識や固定化を必要とせず、ラベルフリーの天然に近い環境下で測定することが可能である。

測定は、リガンド溶液を充填した滴定シリンジから一定量を一定時間ごとにサンプルセルに攪拌しながら注入する。断熱ジャケット内の2つのセルは任意の一定温度に保たれ、サンプルがリガンドと相互作用した時に熱の発生もしくは吸収が起こり、サンプルセルの溶液温度がわずかに変化する。ここで生じたりファレンスセルとの温度差 (ΔT) をセンサーによって検知し、温度差がゼロになるよう制御がかかる。このフィードバック電力をプ

表2 熱分析装置 (ITCおよびDSC) の概要

	ITC	DSC
測定原理	溶液中、温度制御された状況で、サンプルとリガンドとの相互作用に伴う微小な反応熱量をラベルフリーで直接測定	溶液中、温度制御された状況で、タンパク質や生体分子の熱変性に伴って起こる極めて小さな熱量変化を直接測定
装置模式図	 <p>滴定シリンジ リガンド溶液 断熱ジャケット サンプルセル リファレンスセル</p>	 <p>断熱ジャケット 温度制御 (昇温/降温) サンプルセル リファレンスセル</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ・サンプルセル、リファレンスセルと滴定シリンジから構成されている ・サンプルセルにシリンジからリガンド溶液が一定量・一定間隔で注入される 	<ul style="list-style-type: none"> ・サンプルセルとリファレンスセルから構成されている。 ・2つのセルの温度を上昇させる際、これらのセルが同じ温度で維持されるように設計
測定プロセス	<ol style="list-style-type: none"> ①リファレンスセルに水を充填し、サンプルセルにサンプル充填 ②サンプルセルに相互作用させる分子 (リガンド) を一定間隔で少量ずつ滴下 ③発熱・吸熱反応により、リファレンスセルとサンプルセル間に温度差が発生 ④温度差をゼロに制御するために変化した補償電力量を直接プロットし、熱量変化を測定 	<ol style="list-style-type: none"> ①両セルに緩衝液を充填して一定速度で昇温し、熱履歴を作成する ②サンプルセルをサンプル溶液に入れ替え、同条件で昇温する ③発熱・吸熱により、リファレンスセルとサンプルセル間に温度差が発生 ④温度差をゼロに制御するために変化した補償電力量を直接プロットし、熱量変化を測定
取得可能パラメーター	解離定数 (K_D) 結合比 (n) エンタルピー変化 (ΔH) エントロピー変化 (ΔS)	変性中点温度 (T_m) エンタルピー変化 (ΔH) 熱容量変化 (ΔC_p)
主な用途	タンパク質と低分子化合物、タンパク質とタンパク質等の分子間相互作用の解析	タンパク質等の安定性評価



(a) 発熱反応の場合の熱量データ

(b) 熱力学的データの解析例

図6 ITCにより得られる生データおよび解析データ

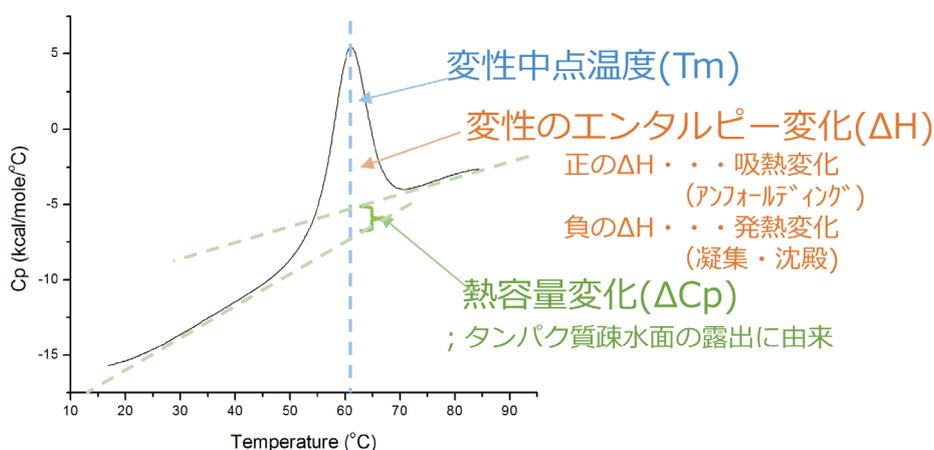


図7 DSCにより得られるパラメータ

ロットすることにより、熱変化を測定する。図6にITCにより得られる生データおよび解析データ例を示す。実際の測定 (iTC200, PEAQ-ITC) では発熱反応は負のピークとして (図6 (a)), 吸熱反応は正のピークとして時間軸に対して各滴定ピークの面積として表される。これをリガンドとサンプル分子のモル比に対してプロットすることにより図6 (b) に示す相互作用のエンタルピー変化を表すデータに変換される。滴定が進行すると結合部位が徐々にリガンドで飽和され、熱シグナルも減少していき、滴定実験の終了時点付近では、観察される熱量はほぼリガンドの希釈熱のみとなる。

得られた熱量変化から、解離定数 (K_D), 結合比 (n), エンタルピー変化 (ΔH) が求められる (図6 (b))。また、以下の計算式により自由エネルギー変化、およびエントロピー変化 (ΔS) の熱力学的データを得ることが出来る。

$$\Delta G = -RT \ln (1/K_D)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

2.2.2 示差走査型カロリーメータ (DSC) 測定例

溶液中のタンパク質やその他の生体分子の熱変性に伴う

変性中点温度、エンタルピー変化や、熱容量変化を温度制御された状態で測定する装置である。

断熱ジャケット内に設置されたサンプルセルとリファレンスセルは同じ温度に維持される様に設計されている。両セルに緩衝液を充填して一定温度での昇温を繰り返すことにより熱履歴を作成する。サンプルセルをサンプル溶液に入れ替えて同条件で昇温する。この昇温中の熱変性により生じる微小な温度差 ΔT をゼロに制御するように、セルへ供給されるフィードバック電力を直接プロットすることで、図7に示す変性中点温度 (T_m), 変性のエンタルピー変化 (ΔH), 熱容量変化 (ΔC_p) を得られる。ここで変性中点温度とは変性が半分進んだ温度で、変性状態と天然状態の存在比が等しくなった状態の温度である。



3. 長尾氏の技術スタッフ活動

3.1 活動の概要

長尾氏は、山手地区に勤務し、表3に示すNMR、熱分析装置を各3台、さらにICP発光分光分析装置1台の計

表 3 長尾氏担当装置群

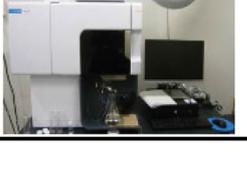
装置群	名称	型式	外観	概要	設備ID
核磁気共鳴	核磁気共鳴装置 600MHz NMR (溶液)	JEOL JNM-ECZL600G		溶液測定専用の600MHzの核磁気共鳴装置。HFX RoyalプローブによりH,F,Xの三重共鳴が可能。T10Lプローブを使用した低周波数核種の多核測定や、30Lデュウを使用した液体窒素による低温測定などの特殊な測定に対応。	MS-237
	核磁気共鳴装置 600MHz NMR (溶液)	JEOL JNM-ECA600		溶液測定専用の600MHzの核磁気共鳴装置。Royalプローブの他にT10Lプローブを所有しており低周波数核種の多核測定が可能。30Lデュウを使用した液体窒素による低温測定、FTSによる長時間低温測定などの特殊な測定に対応。	MS-233
	核磁気共鳴装置 400MHz NMR (溶液)	JEOL JNM-ECS400		溶液測定専用の400MHzの核磁気共鳴装置。所内専用装置であり、短時間の測定に主に使用されている。10Lデュウを使用した液体窒素による低温測定に対応。	ARIM登録外
熱分析	等温滴定型カロリメーター ITC (溶液)	MicroCal PEAQ-ITC		等温滴定型のカロリメーター。一定温度下で、リガンド滴下によって生じる溶液中の相互作用の熱変化を測定できる。解離定数(KD)、結合比(n)、エンタルピー変化(ΔH)、エントロピー変化(ΔS)のパラメータを得ることができる。温度範囲は2℃~80℃。	MS-222
	等温滴定型カロリメーター ITC (溶液)	MicroCal iTC200		等温滴定型のカロリメーター。一定温度下で、リガンド滴下によって生じる溶液中の相互作用の熱変化を測定できる。解離定数(KD)、結合比(n)、エンタルピー変化(ΔH)、エントロピー変化(ΔS)のパラメータを得ることができる。温度範囲は2℃~80℃。	MS-222
	示差走査型カロリメーター DSC (溶液)	MicroCal Vp-DSC		示差走査型のカロリメーター。温度変化による、溶液中の試料の転移または変性の熱変化を測定できる。転移中点温度(T_m)、エンタルピー変化(ΔH)、熱容量変化(ΔCp)のパラメータを得ることができる。生体試料に特化した仕様のため、温度範囲は1℃~130℃。	MS-221
その他	ICP発光分光分析装置 ICP-OES	Agilent 5110 ICP-OES		溶液試料中の多元素の定性・定量分析が同時に可能。	ARIM登録外

表 4 NMR, 熱分析装置の支援件数推移

年度	H26	H27	H28	H29	H30	R1	R2	R3	R4	R5	合計
NMR	3	3	5	3	3	3	6	6	4	10	46
ITC	1	7	8	8	7	3	5	4	6	8	57
DSC	2	4	5	8	5	6	1	0	5	2	38

7台を管理、運用している。また、山手地区低温施設の副担当を務めている。

表4に長尾氏が支援担当となった平成26年度から令和5年度までのNMR, 熱分析装置の支援件数年次推移を示す。R1年度からR3年度はやや落ち込んでいるが、R4, R5年度と増大傾向にあり、NMR, ITCの新規装置の導入効果もあると考えられる。

3.2 幅広い共用装置の維持, 管理

長尾氏は技術スタッフとして装置の保守・管理・運用、利用者への講習・操作指導などを行っている。担当装置はNMR, 熱分析装置, ICP発光分光装置と測定原理の異なる3つの装置群にまたがっており、支援には幅広い技術の習得が求められる。NMRや熱分析装置の担当は分子

研に短時間契約職員として採用されて以来、10年になる。当初は全く知識のないところから、書籍からの自学自習や、他機関のNMR担当者やメーカーのサポートから習う学外の研修会等に参加する等により、技術の向上に努めてきた。ICP-OESは2019年から主担当となり、その技術をゼロから学習し、現在に至っている。また山手地区内には低温施設（ヘリウム液化機）が配置されており、保安係員代理（補佐）として、時間を見つけて低温業務の習得にも努めている。

山手地区のスタッフは現在3名で、地区内の全ての装置を使える状態に保守管理するなど、測定とはかかわらないところでの苦勞も多い。

例えば、NMRはマグネットを維持する必要があるが、冷媒（液体ヘリウム（He）、液体窒素）が必須であるが、山手地区の低温施設が老朽化しており、またコロナ禍での液体ヘリウム充填作業等を控えるため、Heの再凝縮装置を2台設置し、気化したHeや窒素をその場で凝縮させていた。しかしながら現在も、その装置自体のエラー、マグネットのクエンチなど様々なトラブルが発生している。次々に発生するトラブルに対して、利用者の不便を少しでも軽減できるような配慮、手作業での定期的な液体窒素補充作業などにも多くの時間を使っている。

3.3 技術支援

設備利用は「施設利用」という利用者自身が測定する形態である。技術支援では、予め標準サンプルの調製、装置の設定、マニュアルの準備等を行っておく。「施設利用」の利用者自身が測定・解析できるようになるまで、装置やオプション類の操作方法と解析方法をレクチャーする。うまくいかない時には軌道に乗るまで一緒に測定や解析を行う。それでも行き詰った時にはメーカーや他機関の担当者等に相談しながら進めることもある。

多核NMR測定、低温NMR測定、特に液体窒素で直前まで冷やしたNMR測定、溶液熱分析装置で充填しづらいサンプルを用いた測定等、マニュアル通りでは難しい測定内容の場合は、トラブルも起き易い。

例えば、多核NMR測定ではデフォルトの測定条件のままではうまくいかないことが多々ある。測定の際には、化学シフト範囲、励起範囲、緩和時間、検出感度、基準物質や二次標準物質等を考慮に入れる必要がある。特に低周波数核のような感度の低い核種では重溶媒に試料が溶けにくく、試料濃度をあげられないことがネックになることもある。

一方、熱分析装置（ITC、DSC）に関してはNMRとは異なり、利用出来るデータがそれほど多く蓄積されていないため、トライ&エラー方式で溶媒や濃度を変えて、データ取得までの準備をしている。

ITCではサンプルの調製がうまくいっていないと、目的の熱量を全く測定できない。極微量の熱量（数～1 μ Cal/

sec以下）を測定するため、コントロール測定で大きな熱変化が起こらないことが重要だが、ここがハードルとなる。初回の利用者はまずここでつまずき、サンプル調製をやり直すことも多々ある。ここをクリアできても、調製すべき適切な濃度がほとんどの場合は分からず、ある程度の結果を出すのに数日かかってしまうこともある。

したがって、利用者への支援はまず要望を聞き取るところから始める。現時点では業務が多様かつ多量で、共同研究のように特定の利用者の支援に集中することは難しいため、利用者全てが不安なく自ら装置を利用し、目的の結果が出せるようになるまでの丁寧な支援を心掛けている。

そのために、液体窒素や必要な器具などを補充しながら測定を支援し、数日間つきっきりになることもあるが、平均的には2～3日ほどで操作の習得が可能となっている。今までに経験のない解析、手法の希望に対して、こちら側にその要望に応える経験・知識等が不足する場合には種々の事前学習により対応してきた。2.1.1で述べたNMRの解析手法であるNOESYの習得もその一例である。ARIM事業ではデータ利活用が推進されており、今後、利用者の把握している情報だけでなく、過去の測定者からの情報があれば、結果の取得までの時間が短縮されるのではないかと期待している。

3.4 マニュアル作成

NMRは頻繁に利用され、多種多様な目的に応じた測定法やオプションがあるため、利用者にとって、測定方法が分かり辛い等のトラブルが多々ある。そのため、利用者が迷わないようメーカーのマニュアルに、測定に必要な知見、過去のトラブルやエラーの事例を反映させた独自マニュアルを作成している。

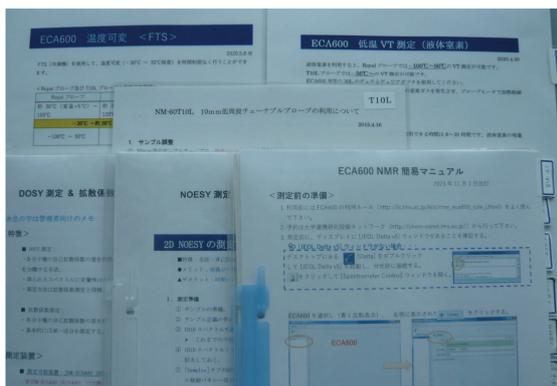
例えば、入力する測定パラメータの計算方法や注意事項の記載、ソフトウェアがフリーズする場合に、技術職員が不在の時でも利用者だけで対応できる対処法等である。

基本的なマニュアル以外にも、水素間の距離を知ることができる立体構造測定用の3種類あるNOESYプログラムの選択法、測定時のパラメータ設定法等を記載したNOESYのマニュアル等も個別に作成している。

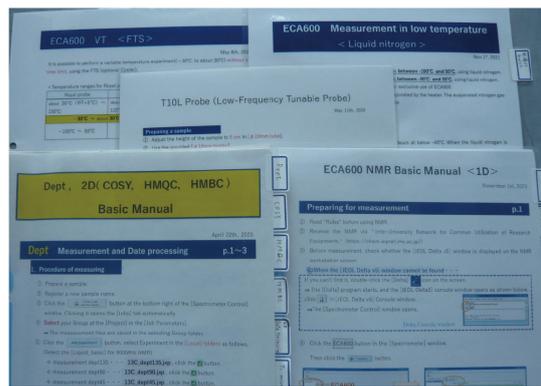
各種マニュアルの作成には、簡単なものでも2週間、難しいものでは1か月を要しており、完成しても、不足したものが新たに出てくると付加するなど、利用者なるべく短時間で目的の結果が出せるように、随時改訂を繰り返している。

また、利用者には海外の人たちも多く、作成した英語版のマニュアルをもとに一緒に作業することもある。図8にNMR装置に関する簡易マニュアルを示す。

ITCやDSCなどの熱測定装置については注意点やポイントをメーカーのマニュアルに補足し、活用している。



日本語版簡易マニュアル



英語版簡易マニュアル

図8 自作の日本語版, 英語版のNMR操作マニュアル

3.5 装置購入提案

利用者が実験を中断することなく継続して装置を使用できるよう、2020年度にはNMR用液体ヘリウム蒸発防止装置の導入を検討段階から進めた。また老朽化により部品サポートの終了が迫っていた等温滴定型カロリメータ (iTC200), および核磁気共鳴装置 (JNM-ECA600) の後継機として、それぞれPEAQ-ITCを2021年度に、JNM-ECZL600Gを2023年度に導入した。PEAQ-ITCは洗浄機能が強化されており、測定に不可欠なセル洗浄の手間が大幅に軽減するとともに、セル汚染も軽減し、より精密な測定が可能になっている。JNM-ECZL600Gは利用者からの三重共鳴測定の要望にも応えることが出来るとともに、測定時間の短縮効果が大きい。また低周波数核測定時のチューニングがより正確となり感度の上昇が期待できる。



4. 研究支援事例

ここでは当初、シグナルが観測できなかった多核¹⁵NのNMR測定及び、メタノール溶液を用いたITC測定など利用報告書が提出されている事例について、どのような準備・検討を進めたかを簡単に記す。

4.1 多核NMR (¹⁵N) : トリアミドアミンリガンドを有するバナジウム錯体による窒素固定 [12]

常温常圧での窒素固定法の研究開発はハーバー・ボッシュ法に替わる人工窒素固定法の研究として盛んに行われている。愛知工業大学工学部応用化学科の梶田 裕二教授は、トリアミドアミン配位子上の末端N原子上の置換基を系統的に変化させることで、単核および二核の窒素

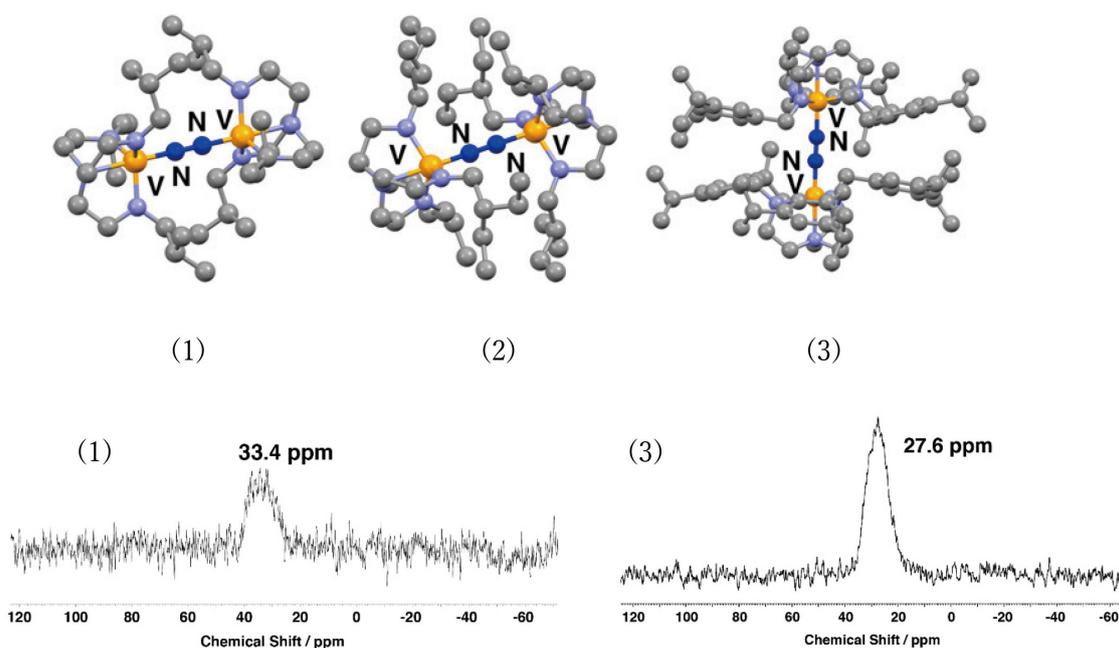


図9 トリアミドアミンを有するバナジウム錯体の構造とその¹⁵N NMRスペクトル [12]

錯体の作り分けを行っている。今回、図9に示すバナジウム(Ⅲ)を用いた二核窒素錯体1~3の合成に成功したため、 ^{15}N 核などの多核NMR測定を利用して構造を確認したいとのことであった。

^{15}N 核の共鳴周波数は図5の共鳴周波数の低周波数核領域上にあり、検出感が低く、測定時間がかかるところがネックとなる。そこでサンプルチューブを5mm径から10mm径に変えて、サンプル量を増やし、低周波用プローブで測定を行った。測定パラメータの待ち時間(次のパルスを照射するまでに待つ時間)は参考値が見つからず、当初は、待ち時間を短く設定して、積算回数を増やす方針で、測定を実施したが、 ^{15}N 核のシグナルを見出せなかった。そこで、待ち時間を何度も変更し、構造1及び3は緩和時間を考慮して待ち時間を100sまで延ばしたところで、それぞれ33.4及び27.6ppmに帰属するピークを検出できた(図9)。なお構造2については緩和時間がさらに長いので、同じ条件下でもピークは観測されていない。構造1では12,000回程程度の積算を要し、約2週間連続のマシントimeが必要になった。しかしながら、1グループで自由にマシントimeを占有できないため、梶田教授のご理解を得て、全ての信号を観測できるまでに数か月を要した。

4.2 ITC：絡み合い構造を持つクリプタンドのゲスト認識特性の解明 [13]

キラルなクリプタンド(2つ以上の環から成るかご状の多座配位子)は不斉場由来した不斉識別や不斉反応への応用が期待されている。福井大学の内藤 順也講師らの研究グループでは、絡み合い構造を持つキラルなクリプタンドの合成と機能創出に関する研究を展開している [13]。本クリプタンドのゲスト認識特性を解明するため、これまでにUV-vis吸収分光法が試みられてきたが、測定濃度範囲におけるシグナルの変化量が小さいことから定量的な評価が困難であった。そこで等温滴定型カロリメータiTC200を活用し、本クリプタンドが溶解するメタノール溶媒中で測定したいとの要望であった。

メタノール中での測定は分子研としては初めてのケースであり、メタノールは水とわずかに混じるだけで、発熱し、熱測定に影響を与え、また装置メーカーも有機溶剤を使用した測定を推奨しておらず、高価な共用装置を守るために以下の検討を行った。

① ITC装置の10点以上の部品(チューブ類、シリンジ等)のメタノール耐性をメーカーに問い合わせ、WebSiteによる調査を実施。チューブ類などの洗浄モジュールの部品が傷むことが懸念された。②そのため、洗浄操作やサンプル充填を手動として、汚れを残さないこと、耐溶剤性のない部品にメタノールが触れないことに留意した手順を決め、そのマニュアルを作成。③水の混入を防ぐため、器具のゆすぎ方、使用する器具を検討し、器具の

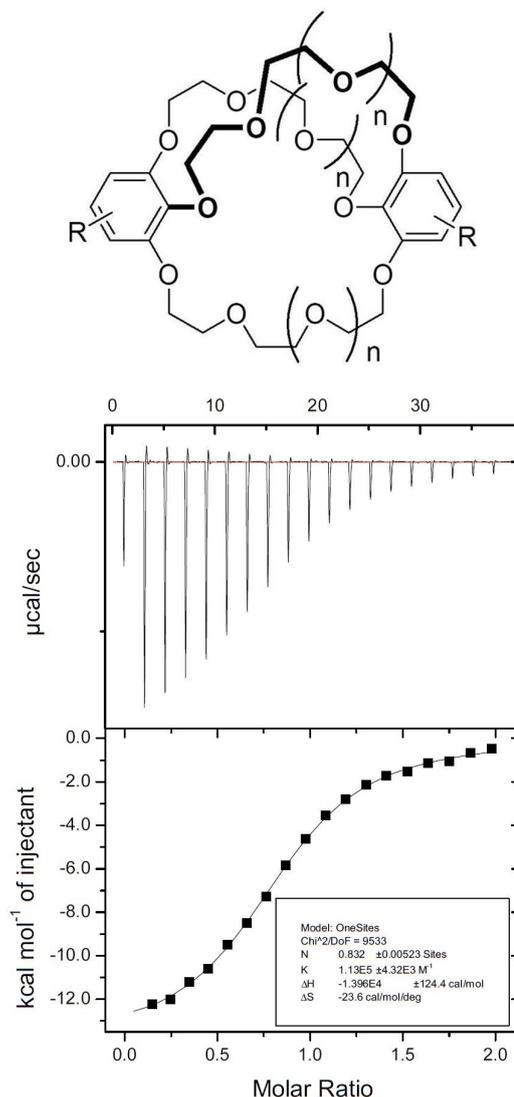


図10 クリプタンドの構造例とそのITCスペクトル

付け替えも実施し、サンプルを充填するセルやシリンジ、使用する器具もメタノールで十分に置換する手順とした。

こうした準備の上に、内藤講師の綿密な実験計画を基にした測定を実施した結果、メタノール中での種々のゲストに対する認識特性の評価と会合定数の算出に成功した。図10にクリプタンドの構造例と得られたITCデータを示す。

4.3 多核NMR (^{183}W): 重合触媒として機能するタングステン錯体の分子構造研究 [14]

岡山大学大学院 環境生命自然科学研究科 応用化学専攻 押木 俊之講師はジシクロペンタジエンのメタセシス重合触媒として機能するタングステン錯体の研究を進めている。構造不明のタングステン錯体混合物が、液相で何種類存在するのか調べる目的で、 ^{183}W のNMR測定を試みたいとのことであった。 ^{183}W は $I = +1/2$ の核だが、 ^{183}W の相対感度は ^{13}C の6%と極めて低い低周波数核であり、

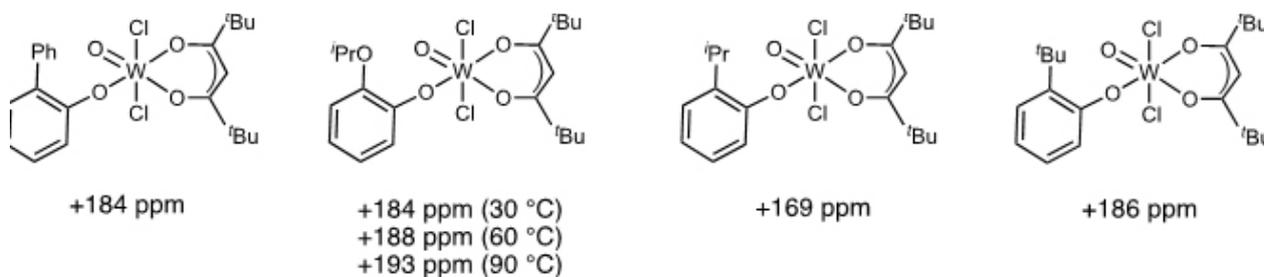


図 11 タングステン錯体における ^{183}W NMR ケミカルシフトの分子構造・温度変化 [14]

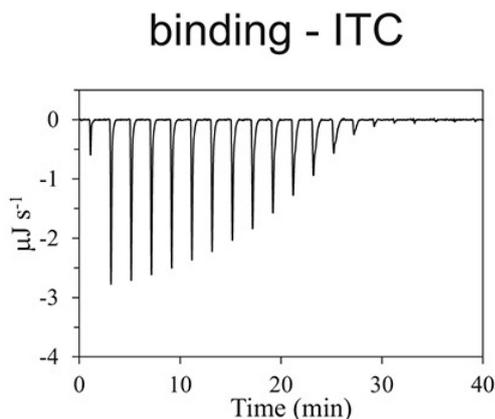


図 12 コラーゲン抗体の熱分析 [17]

有機配位子をもつ錯体化学分野において系統的な測定例は極めて少なかった。そこで、NMR 低周波プローブを公開している分子研にてタングステン錯体の NMR 測定に 2014 年から取り組んだ。当初は既知錯体のシグナルすら全く観測できなかった。そこで NMR 測定は一旦中断し、別の角度から錯体合成の研究を始め、高純度タングステン錯体の大量合成法を確立した。通常の溶液 NMR としては常識外れの高濃度でサンプルチューブに詰めることにより、標準的な測定条件を確立することに成功した。合成研究着手からルーチン測定ができるまでに 5 年以上費やした [15]。新規タングステン錯体の ^{183}W NMR を 3 時間程度で測定し、温度可変測定による分子構造変化の可能性も調べた。図 11 はその結果の一例である。分子構造と NMR シグナルとの関係の系統的理解には至っておらず、タングステン中心の化学結合を調べるための遠赤外吸収スペクトル測定も加えた研究を続けている。

4.4 ITC：コラーゲンの構造物性と抗体との分子間相互作用解析 [16]

京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 織田 昌幸教授は、抗体などの各種タンパク質が相手をどの様に認識するか、結合する際の構造変化を含む動的構造要因は何かなど、生体システムの解明に繋がる生体分子間相互作用の研究を行っている。その中で、ミズクラゲ由来コラー

ゲンは、中性 pH での溶解度も高く、生体親和性も高いことから、再生医療分野などへの素材としての利用が期待されている。織田教授らは、同コラーゲンに対するモノクローナル抗体を取得したため、コラーゲンと抗体との結合を、ITC を用いて解析した。4 種類の抗コラーゲン抗体のうち 1 種類について、コラーゲンとの結合熱も ITC により観測され、コラーゲン検出抗体としての利用価値が見込まれた。図 12 にコラーゲン抗体の熱分析結果を示す [17]。また織田教授は熱分析の専門家でもあり、長尾氏は、織田教授との仕事を通して、熱分析の勘所を学習させて頂いたとのことである。



5. 終わりに

長尾氏は受託分析会社での職歴があり、子育て期間の専業主婦を経て、分子研にて短時間契約職員として入職し、NMR、熱分析装置等の担当になって 10 年になる。当初は時短勤務のため装置の管理だけで手いっぱいだったが、高圧ガス保安係員、放射線取扱主任者などの資格取得や、数回の試験を経て、先生方からのご指導をいただきながら、正規職員として採用されることになった。子育てなどでキャリアの途切れた女性への門戸を広げるためにも、さらに勉強し、より責任をもって、仕事に対応して行きたいと考えている。現在、装置 7 台を一人で管理し、さらには低温業務、安全衛生、自衛消防等の業務も付加される中、特定の利用者だけに集中することができないため、利用者の研究内容まで深くかかわるような支援は少ない。

しかしながら、導入した NMR 及び熱分析の最新鋭装置をさらに多くの人に利用して頂くためにも、利用者と一緒に測定やトラブル対応をする中で、NMR や熱分析装置を更に深く理解し、より多くの研究内容にも関与したい、そこで得られた知見を蓄積することで、これからの支援をより良いものにできるよう業務を進めていきたいとのこと。

こうした前向きな方の地道な努力が日本の新しい材料開発に繋がって行くことに期待している。

- [1] ARIM Japan
<https://nanonet.mext.go.jp/>
- [2] 令和 5 年度技術スタッフ表彰
https://nanonet.mext.go.jp/page/awards_for_technical_staff_R05.html
- [3] 分子科学研究所 | 分子研について
<https://www.ims.ac.jp/about/>
- [4] 分子科学研究所 マテリアル先端リサーチインフラ事業
<https://arim.ims.ac.jp>
- [5] 分子科学研究所 機器センター
<http://ic.ims.ac.jp>
- [6] 機器センターたより No.15 分子科学研究所 機器センター
<https://ic.ims.ac.jp/tayori/%E6%A9%9F%E5%99%A8%E3%82%BB%E3%83%B3%E3%82%BF%E3%83%BC%E3%81%9F%E3%82%88%E3%82%8A%No15.pdf>
- [7] 文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム 令和元年度技術スタッフ表彰 技術支援貢献賞 電子スピ
 ン共鳴装置による研究支援 藤原 基靖, 浅田 瑞枝, 伊木 志成子 (分子・物質合成 PF 自然科学研究機構 分子科学研究所)
https://nanonet.mext.go.jp/page/awards_for_technical_staff_R01.html
- [8] HSQC and Edited HSQC Spectra
<https://u-of-o-nmr-facility.blogspot.com/2007/11/hsqc-and-edited-hsqc-spectra.html>
- [9] NOESY T1 簡易測定 (Delta ver4)
<https://study.eqnet-portal.jp/attachment/210323031034.pdf>
- [10] MicroCal PEAQ-ITC (等温滴定型マイクロカロリメータ)
<https://www.malvernpanalytical.com/jp/products/product-range/microcal-range/microcal-itc-range/microcal-peaq-itc>
- [11] MicroCal PEAQ-DSC (示差走査型カロリメータ)
<https://www.malvernpanalytical.com/jp/products/product-range/microcal-range/microcal-dsc-range/microcal-peaq-dsc>
- [12] Yoshiaki Kokubo, Chiaki Yamamoto, Kazuki Tsuzuki, Takuya Nagai, Akira Katayama, Takehiro Ohta, Takashi Ogura, Yuko Wasada-Tsutsui, Yuji Kajita*, Shinichi Kugimiya, and Hideki Masuda, “Dinitrogen Fixation by Vanadium Complexes with a Triamidoamine Ligand” *Inorg. Chem.* 2018, 57, 19, 11884–11894
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.inorgchem.8b00982>
- [13] Hiroki Fujihara, Masaya Naito, Takafumi Yashima, Yusuke Okada, Nagao Kobayashi, Shinobu Miyagawa, Hikaru Takaya, and Yuji Tokunaga*, “Synthesis of Cross-Chain Bridging Cryptands and Induction of Molecular Chirality” *Org. Lett.* 2023, 25, 8959.
<https://pubs.acs.org/toc/orlef7/25/50>
- [14] 重合触媒として機能するタングステン錯体の分子構造研究 ARIM Japan 利用報告書
https://nanonet.mext.go.jp/user_report.php?mode=detail&code=512&key=85jsd4xhKqqD2Ua8
- [15] 押木 俊之『183W 核の溶液 NMR 測定から始まった多核 NMR への取り組み』日本電子ニュース Vol.55, No.1, 16 – 23 (2023)
https://www.jeol.co.jp/s3/jeolnews/jeolnews_j55_2.pdf
- [16] コラーゲンの構造物性と抗体との分子間相互作用解析 ARIM Japan 利用報告書
https://nanonet.mext.go.jp/user_report.php?mode=detail&code=491&key=ukOEMmWjrCDhb58d
- [17] Takahiro Hayashi a, Yuji O. Kamatari b, Masayuki Oda, “Evaluation of multi-specificity of antibody G2 using its single-chain Fv and its covalently linked antigen peptides” *Biophysical Chemistry* Vol. 290, November 2022, 106893
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301462222001351>

(図表は全て長尾氏より提供された)

(金久 修)