

—Brief Reviews—

## タウタンパク質に存在する微小管結合ドメインの溶液構造と フィラメント形成機構に関する研究

箕浦克彦

### Study of the Solution Structure and the Filament Formation Mechanism of the Tau Microtubule-binding Domain

Katsuhiko MINOURA

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received November 27, 2006; Accepted December 21, 2006)

Microtubule-associated protein tau is a highly soluble protein and shows hardly any tendency to assemble under a physiological condition. However, in the brains of Alzheimer's disease (AD) patients, tau protein dissociates from the axonal microtubule and abnormally aggregates to form an insoluble paired helical filament (PHF). One of the priorities in Alzheimer research is to clarify the mechanism of PHF formation. In recent years, several reports on the regulation of tau assembly have been published. But, it is still unclear how transition of tau protein from its normal structure to a PHF state occurs in the neuron. To know which part and what structural change in tau protein participates in its transition into a pathological entity, our target is to analyze the structures of three- to four-repeat microtubule-binding domains (MBDs) in tau protein, focusing on the conformational and self-associational features of each repeat structure, because these repeat domains constitute the core moiety of the PHF structure. We investigated the initial *in vitro* aggregation feature of each repeat peptide using the thioflavin fluorescence method and determined the solution conformations of repeat peptides in trifluoroethanol by <sup>1</sup>H-NMR and molecular modeling analyses. On the basis of the present spectral and conformational results, we propose a model of the repeat-dependent PHF formation pathway of the four-repeated MBD in tau protein. We believe that this model is helpful in considering rational approaches to preventing tau deposition in AD and other tauopathies.

**Key words**—tau protein; microtubule-binding domain; aggregation; solution conformation; amphipathic structure

### 1. はじめに

アルツハイマー病 (AD) は初老期から老年期にかけて発症する進行性の認知症状を主徴とする神経変性疾患であり, 高齢化が進む現代においてその病態の解明と治療法の確立は大きな課題である. AD 患者の神経病理学的所見においてはβアミ

ロイドからなる老人斑とタウタンパク質が異常に重合し形成される神経原線維変化 (Neurofibrillary Tangles: NFT) の二つが特徴的であるにもかかわらず,<sup>1,2)</sup> 現在の AD 研究はアミロイドβペプチドの異常が AD 発症の引き金であるとするアミロイドβ仮説に基づくものが主流である. しかしながら, 前頭

側頭葉型認知症 (FTDP-17) ではタウ遺伝子の変異により NFT の形成が促進され認知症状が出現すること、タウタンパク質が脳内で凝集・蓄積するだけで神経細胞に異常が生ずることなどが明らかとなってきた。<sup>3-6)</sup> これらの知見に基づき近年、タウの異常凝集と AD 発症との関係についても大きな注目が集まっている。

タウタンパク質は微小管結合タンパク質の一種であり、通常は脳軸索内において微小管の形成と安定化に寄与している。しかしながら、過剰なリン酸

化を受けると微小管との結合能を失って自己凝集を起こし、PHF (Paired Helical Filaments) と呼ばれる不溶性線維を形成する (Fig. 1)。形成された不溶性線維は細胞内に NFT として沈着する。PHF の形成には、タウの C 末端領域に存在する相同性の高い約 30 残基のアミノ酸配列が 3 回ないし 4 回繰り返された配列を有する微小管結合ドメイン (MBD) が凝集のコアとして関与していると考えられている (Fig. 2)。<sup>7-9)</sup>

そこで我々は、タウタンパク質の機能発現領域

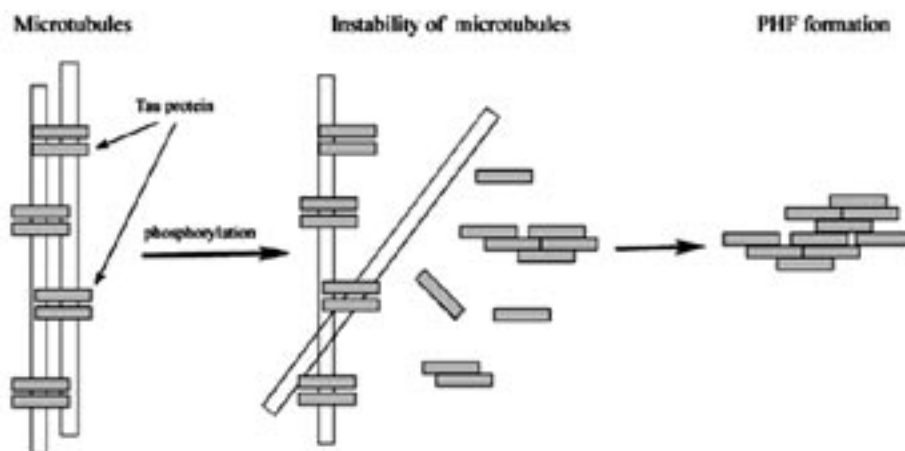


Fig. 1. Schematic Representation of Dissociation from Microtubules and Abnormal Aggregation to Form an Insoluble Paired Helical Filament (PHF) of Tau Protein

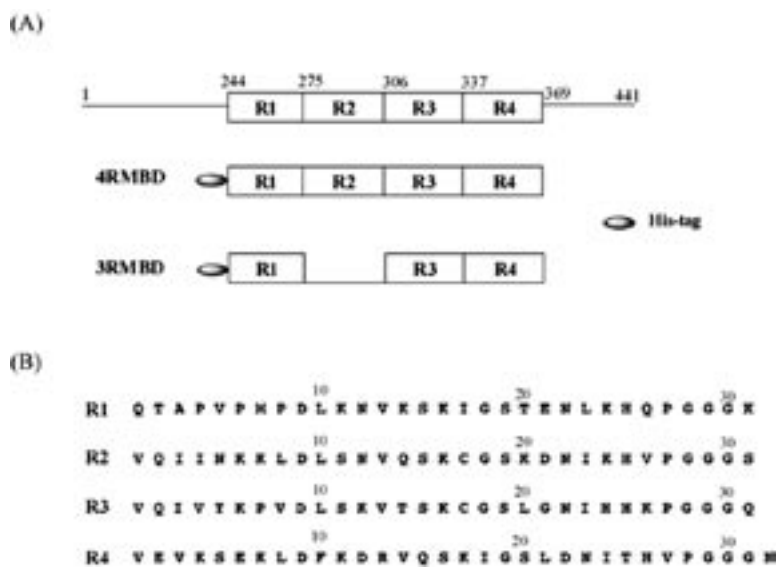


Fig. 2. (A) Schematic Diagram of the Entire Four-Repeat Human tau Protein, His-Tagged Four-Repeat MBD (4RMBD) and Three-Repeat MBD (3RMBD), and (B) the Amino Acid Sequences of These Repeat Peptides

The regions from the first to the fourth repeat structure in MBD are named R1 to R4, respectively. The number of amino acid residues in (A) refers to the longest isoform of the human tau protein (441 residues).

である反面、異常な自己凝集に関与していると考えられている MBD に着目し、水溶性のタウタンパク質が不溶性のフィラメントを形成する際、MBD 領域のどのような配列や構造がトリガーとなっているのかを解明することを計画した。本稿では、MBD の 2 種のアイソフォーム (4RMBD, 3RMBD) およびそれらを構成する各リピートペプチド (R1-R4) のフィラメント形成能と構造化学的特徴を、Thioflavin S (ThS) 蛍光強度の変化、CD スペクトルの変化、NMR による解析および分子動力学計算などから検討し、タウタンパク質の自己凝集機構を解明する上での興味深い知見を得たので、その内容について記述する。

## 2. 4RMBD, 3RMBD およびリピートペプチド R1-R4 のフィラメント形成能

タウタンパク質のフィラメントは、Activation → Nucleation → Extension → PHF という過程を経て形成すると考えられている。<sup>10)</sup> この過程を *in vitro* でモニターする手法はいくつか提唱されているが、我々は ThS 蛍光強度測定法を用いた。ThS はフィラメント形成過程において生ずるタウの  $\beta$  構造を認識し、480-520nm に蛍光を発する。し

たがって、その蛍光強度を経時的にモニターすることで、フィラメント形成を評価できる。なお、生体内で起こる PHF 形成には数十年という歳月が必要であるが、本研究においては形成速度を増加させる目的で、フィラメント形成を促進することが知られているポリアニオンであるヘパリンを共存させて実験を行った。3RMBD および 4RMBD はいずれも経時的に ThS の蛍光強度を増加させたが、その程度には差異が認められた (Fig. 3A)。3RMBD は R2 リピートを欠いており、両者のフィラメント形成能の差はこの構造上の相違に起因していると考えられる。このことから、MBD のフィラメント形成においては、各リピートの働きが異なることが推測される。そこで、各リピートペプチドを化学合成し、同様の測定を行った結果 (Fig. 3B)、R1 と R4 による蛍光強度の増加はなく、R2 では僅かな蛍光強度の増加が認められたのみであった。これらに対し、R3 では蛍光強度の大きな上昇を示した。電子顕微鏡撮影により得られる R2, R3 のフィラメント像と、3RMBD, 4RMBD のフィラメント像は、同様の像を示すことより、<sup>11,12)</sup> 各リピートペプチドの物性について検討することは MBD のフィラメント形成機構を解明する上で有用であると考えられる。

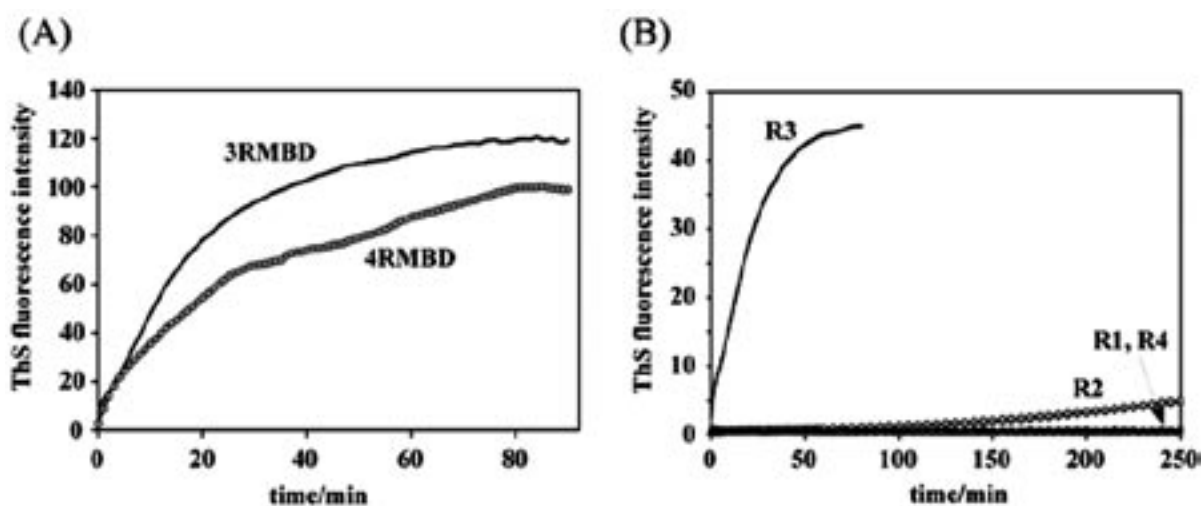


Fig. 3. Heparin-Induced *in vitro* Aggregation Profiles of (A) 3RMBD and 4RMBD, and of (B) Repeat Peptides, as Functions of Reaction Time, Monitored Based on ThS Fluorescence Intensity

The ThS fluorescence intensities of 15  $\mu$ M 3RMBD, 4RMBD, and repeat peptides (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5) were monitored after the addition of 3.8  $\mu$ M heparin, with the excitation and emission wavelengths both set at 440 nm and 550 nm.

### 3. TFE 溶媒環境下におけるリピートペプチド R1-R4 のフィラメント形成能と溶液構造

タウタンパク質のフィラメント形成に伴う構造変化は、アンフォールドなモノマーから規則的な $\beta$ シート構造が折り重なった構造への変化であると考えられている。この構造変化の過程において、Gouxらは一時的に $\alpha$ ヘリックス構造を経る機構を提唱している。<sup>13,14)</sup>しかし、原子レベルでの立体的な構造に関する知見が少ないために、過渡的な $\alpha$ ヘリックス構造の重要性については結論が得られていないのが現状である。アンフォールドな構造が規則的な $\beta$ シート構造へ転移するには、構造の柔軟性が重要であると考えられる。そこで、タンパク質やペプチドの構造を揺り動かす溶媒として知られている2, 2, 2-trifluoroethanol (TFE)<sup>15)</sup>存在下において各リピートペプチドのフィラメント形成能を評価した。また、TFE中と水溶液中でのフィラメント形成能の差異がペプチドの如何なるシーケンスや構造に起因するかを検討した。

#### 3.1. TFE 環境下におけるリピートペプチド R1-R4 のフィラメント形成能

TFE 混在下における各リピートペプチドのThS蛍光強度を測定した結果、R1, R4については水溶液中と同様にフィラメント形成は認められなかったが、R2とR3ではTFEを混在させるとThSの蛍光強度が水溶液中よりも著しく増大するという興味深い知見が得られた (Fig. 4)。両者はそれぞれTFE濃

度約20%, 40%で最も蛍光強度が増大し、その後TFE濃度の上昇に伴い蛍光強度は低下していることから、フィラメント形成の促進に対するTFEの至適濃度が存在することが明らかとなった。また両者の蛍光強度の経時変化には差が認められ、R3はすべてのTFE濃度で立ち上がり速いのに対し、R2は最も蛍光強度が高い20%TFE時においても比較的緩やかであることより、両者のフィラメント形成機構には違いがあると考えられた。

#### 3.2. TFE 環境下におけるリピートペプチド R1-R4 の全体構造

次に、TFE環境下における分子の全体構造に関する情報を得るためにCDスペクトルの測定を行ったところ、すべてのペプチドにおいてTFE濃度上昇に伴いランダムから $\alpha$ ヘリックスへの構造転移が認められた (Fig. 5)。構造転移点はTFE濃度約20~40%付近であり、この濃度でR2, R3は最も高いフィラメント形成能を示している。この構造変化は、100%TFEに溶解した試料に対して水溶液でTFEの濃度比率を変化させてCD測定を行っても同じ曲線を与えタイムラグも生じないこと、異なったpHにおいても同様のプロファイルを与えることより、 $\alpha$ ヘリックス構造を取る配列は、溶媒の疎水性/親水性のバランスにより構造を変化させると考えられた。

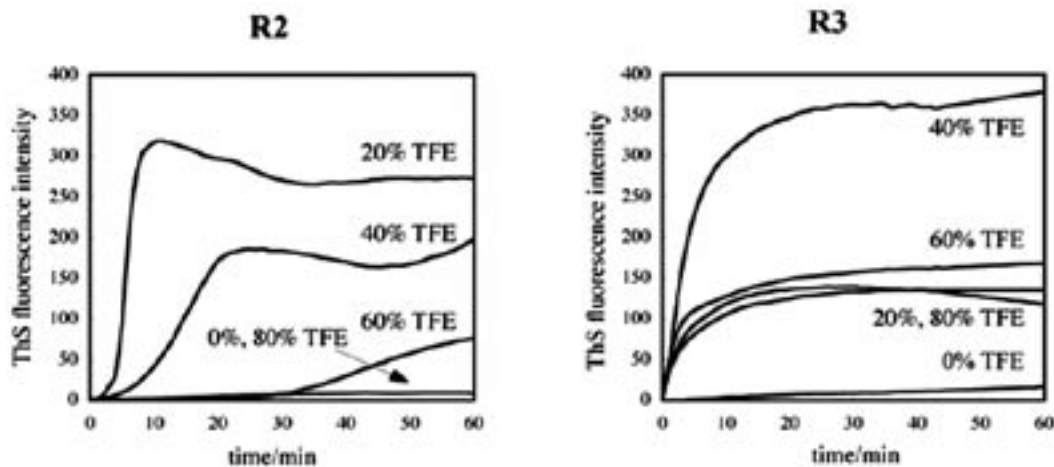


Fig. 4. Time Profiles of ThS Fluorescence Intensity Changes of R2 and R3 Peptides at Different Water /TFE Ratios

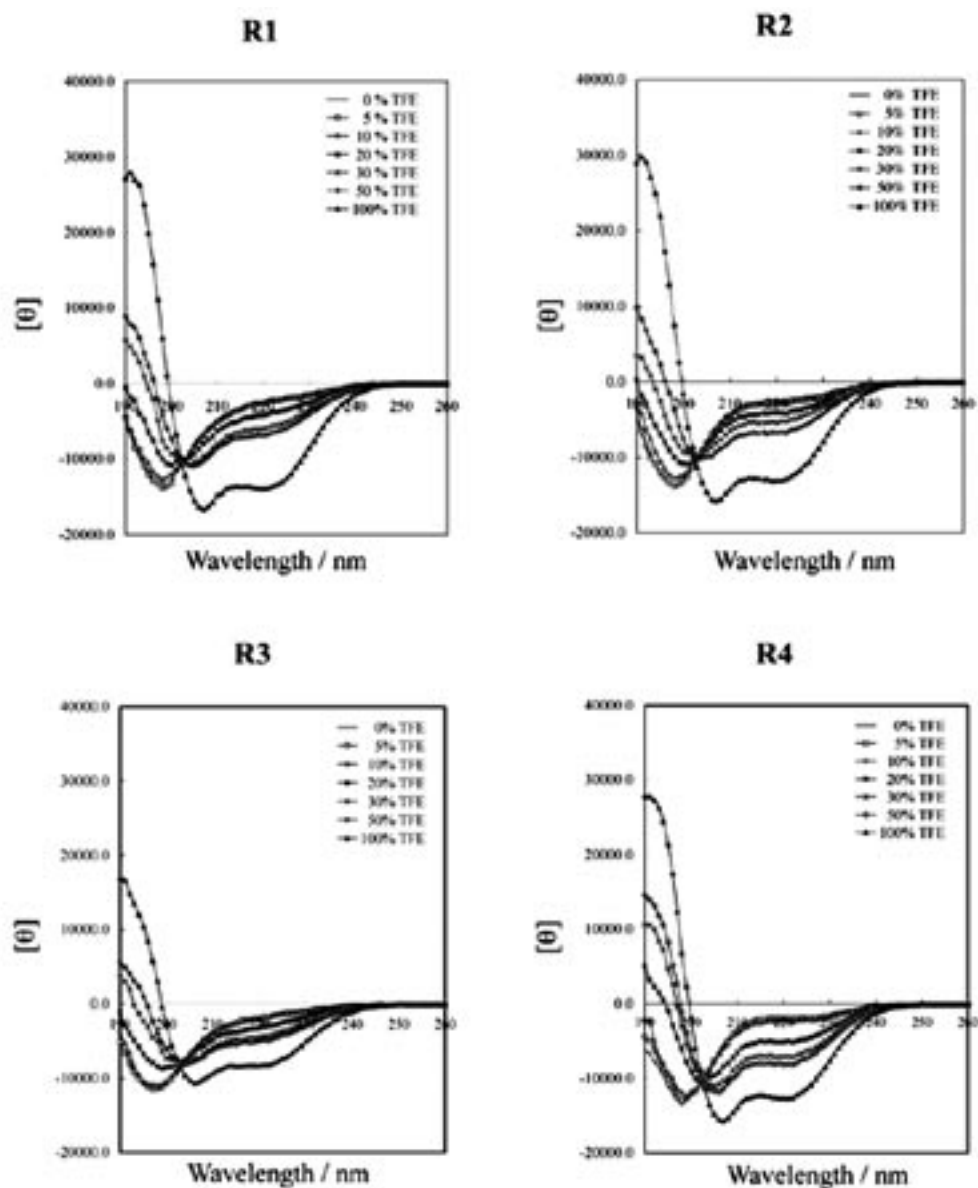


Fig. 5. CD Spectra of R1-R4 Repeat Peptides at Different Ratios of Water/TFE Mixture at PH 4.3

The sample solution was adjusted to 40  $\mu\text{M}$  in water, TFE, and a mixture of these solvents. Data were expressed in terms of a mean residue ellipticity( $\theta$ ) in units of  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ .

### 3.3. TFE 環境下におけるリピートペプチド R1-R4 の溶液構造

これまでの結果より、TFE の共存という特殊環境下において、R2, R3 は TFE 濃度 20 ~ 40% 時にフィラメント形成能が最も高く、この濃度ではランダムとヘリックスの中間体のような構造で存

在していることが判明した。しかしながら、CD スペクトルは分子の全体構造を反映しており、局所構造に関する知見を得ることは出来ない。そこで、より多くの構造情報を得ることを目的とし、100% TFE 環境下における各リピートペプチドの立体構造を NMR<sup>16,17)</sup> および分子動力学計算<sup>18,19)</sup> を用い決定

した. 各リピートペプチドのNMRデータを詳細に解析することにより, Table 1 に示した NOE<sup>20)</sup> と二面角情報<sup>21)</sup> を取得した. これらの情報を基に計算プログラム CNS<sup>22)</sup> により分子動力学計算を行い,

100 個の構造データを算出し, それらのうちエネルギー的に安定な 20 個の構造データを各リピートペプチドの最終構造とした (Fig. 6). 最終構造のデータを Table 2 に, 平均構造を Fig. 7 に示し

Table 1. Number of constraints of R1-R4 peptides

Peptides	R1	R2	R3	R4
Total number of NOEs	373	374	273	395
Intra-residue NOEs	208	211	157	222
Sequential NOEs	103	106	82	115
Inter-residue NOEs	62	57	34	58
Peptides	20	25	23	24

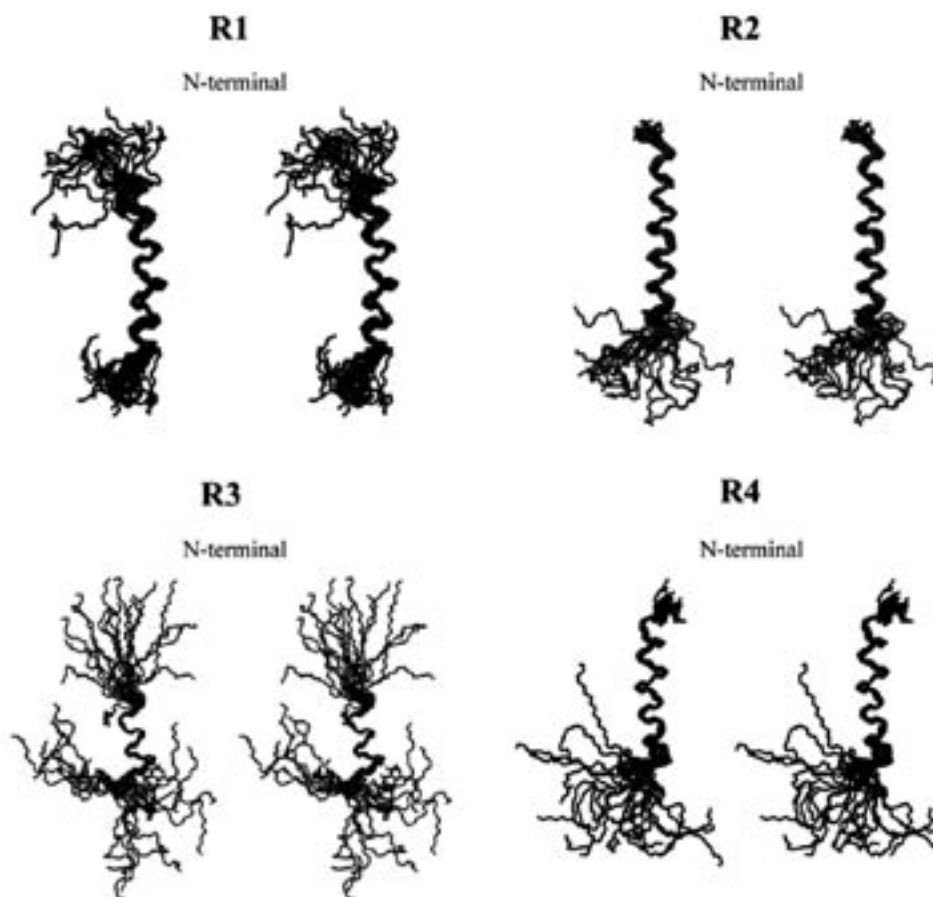


Fig. 6. Stereoscopic Superpositions of the Most 20 Stable Conformers of R1-R4

Each conformer is projected so as to be superimposed on the Leu10-Lys24 (R1), Ile3-Lys20 (R2), Leu10-Leu20 (R3), and Ser5-Ser20 (R4). The upper and lower sides of conformers correspond to the N- and C-terminal regions, respectively.

Table 2. Structural statistics of stable 20 structures of R1-R4 peptides.

Peptides	R1	R2	R3	R4
Average value (esd)				
RMS deviation* (backbone) (Å)	0.81 (37)	0.68 (25)	0.55 (17)	0.73 (22)
RMS deviation from NOE (Å)	0.093 (1)	0.069 (2)	0.008 (1)	0.070 (2)
NOE violations > 0.10Å	10.5 (12)	11.0 (8)	3.2 (4)	13.1 (9)
Energy (kcal/mol )				
overall	387 (7)	315 (6)	85 (2)	335 (4)
noe	182 (7)	133 (7)	32 (1)	142 (4)
angle	80 (3)	90 (3)	30 (1)	99 (3)
bond	25 (1)	25 (1)	7.3 (3)	25 (1)
improper	20 (1)	9.0 (8)	6.4 (1)	21 (2)
van der Waals	79 (4)	58 (4)	8 (1)	45 (3)

\*Calculated from residues 10 to 24 for R1, residues 3 to 20 for R2, residues 10 to 20 for R3, and residues 5 to 22 for R4.

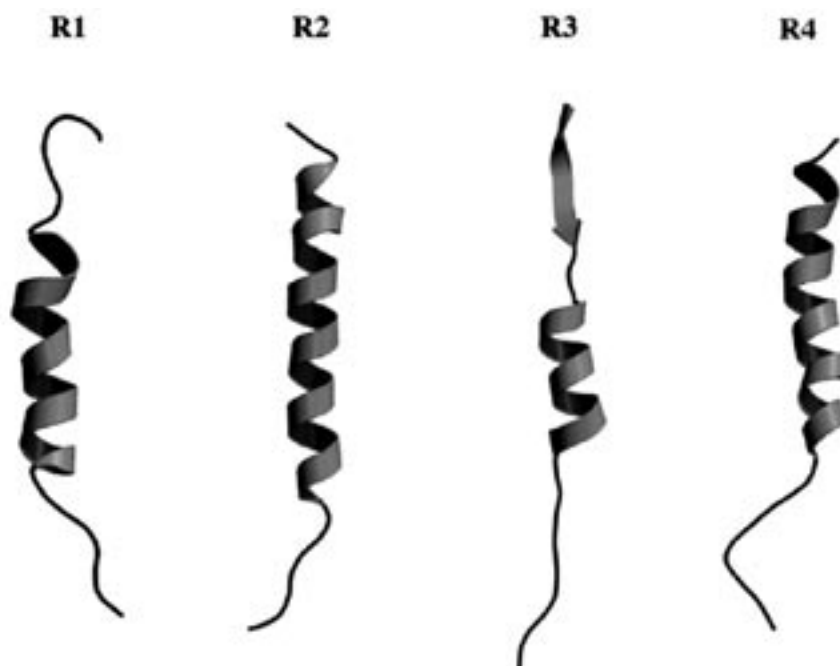


Fig. 7. Averaged Backbone Conformations of R1-R4 Peptides in TFE Solution, Constructed by <sup>1</sup>H-NMR and Molecular Modeling Analyses

The N- and C-terminal regions correspond to the upper and lower sides, respectively. The arrow, ribbon and thin line represent the  $\beta$ -sheet,  $\alpha$ -helical and random structures, respectively.

た。TFE という特殊環境下で各リピートペプチドにおいて  $\alpha$  ヘリックス構造を形成している配列は、構造柔軟性が高い配列であると考えられる。TFE 中で R3 の N 末端で認められた  $\beta$  構造については水溶液中においても同様の二次構造が保持されていることを NMR 解析によって明らかにしている。<sup>23)</sup> このことから、この部位の  $\beta$  構造は、周りの環境に影響を受けない rigid な構造であると考えられた。このような構造特性と水溶液中の R3 のフィラメント形成能を考え合わせると、この rigid な  $\beta$  構造がフィラメント形成に極めて重要であると考えられる。しかし一方で、R3 のフィラメント形成能は TFE 濃度に依存性を示し、TFE40% 時に最も高かったことから、N 末端以外の配列における構造特性もフィラメント形成に関与していると考えられる。

そこで、100% TFE 時の構造を参考にし、40% TFE 時における構造の特徴を  $C\alpha$  プロトンのケミカルシフト値を用い検討した。一般に、ポリペプチ

ドが示すアミノ酸の  $C\alpha$  プロトンのケミカルシフト値がランダム構造の場合よりも低磁場シフトしている場合、その配列は  $\beta$  構造に近い構造を取っており、逆に、高磁場シフトした場合は  $\alpha$  ヘリックス構造に近い構造を取っていると考えられている。<sup>24)</sup> そこで、水溶液中でランダム構造である R3 のケミカルシフト値と、TFE 存在下におけるその値との差を求めその結果を Fig. 8 に示した。R3 の Lys12-Thr14 の配列において最も大きな高磁場シフトが観測され、この配列がヘリックス構造を取りやすい、つまり構造柔軟性が最も高い配列であった。また、最もフィラメント形成能が高い TFE 濃度 40% 時の場合では Leu10-Thr14 配列がヘリックス様構造を取っていることから、この配列のヘリックス構造へのなりやすさがフィラメント形成には重要であると考えられる。

そこで、ヘリックスという構造に着目して 100% TFE 中の各リピートペプチドの構造を考

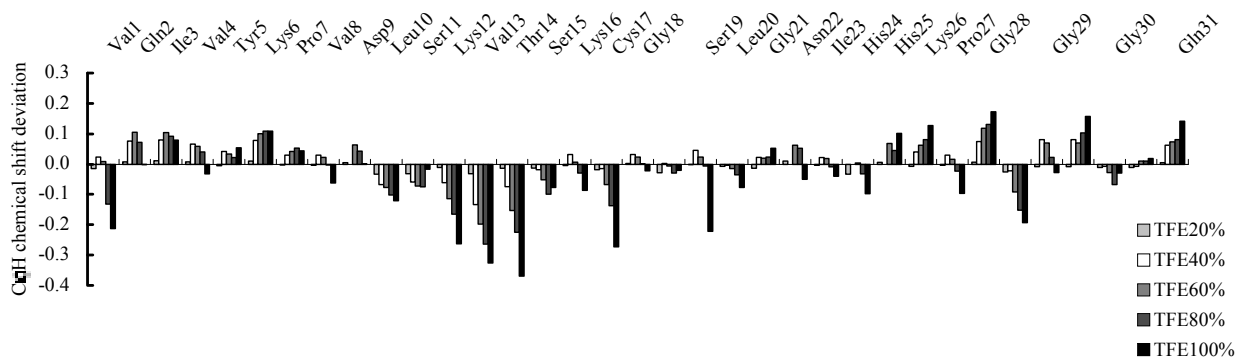


Fig. 8. TFE Content-Dependent Deviations of the  $C\alpha$ H Proton Chemical Shifts of R3 Peptide Compared with Those in Water

The bars arranged from left to right for each residue, represent the differences (in ppm) in chemical shifts in 20, 40, 60, 80, and 100% TFE compared with those in water, respectively. The horizontal line corresponds to the chemical shift of each residue in water. The upper and lower sides of the base line represent the downfield and upfield shifts of the proton, respectively.



察した. Fig. 9 に示したように, 塩基性残基 (Lys, Arg) を挟んで疎水性残基 (Val, Leu, Ile, Phe) と親水性残基 (Ser, Asn, Gln, Asp, Thr) がヘリックス構造内で対面に配置する両親媒性ヘリックス構造を形成していた. また, R2, R3 に存在する Cys 残基がその疎水性側に配置しているという特徴的な構造を有していた. リピートペプチドがこのような構造特性を有していることは, そのフィラメント形成機構を考える上で非常に興味深い知見である.

#### 4. 4RMBD のダイマー形成モデル

TFE 環境下における R1-R4 の構造特性についての検討により, フィラメント形成には, ①ランダムとヘリックス構造との中間体のような構造が重要であること, ② R3 の Leu10-Thr14 配列がヘリックス様構造を取るときが最もフィラメント形成に適していること, ③ N 末端の rigid な  $\beta$  シート構造がフィラメント形成に重要であること, ④すべてのリピートペプチドが 100% TFE 中では両親媒性ヘリックス構造を形成することなどを明らかにした. これら

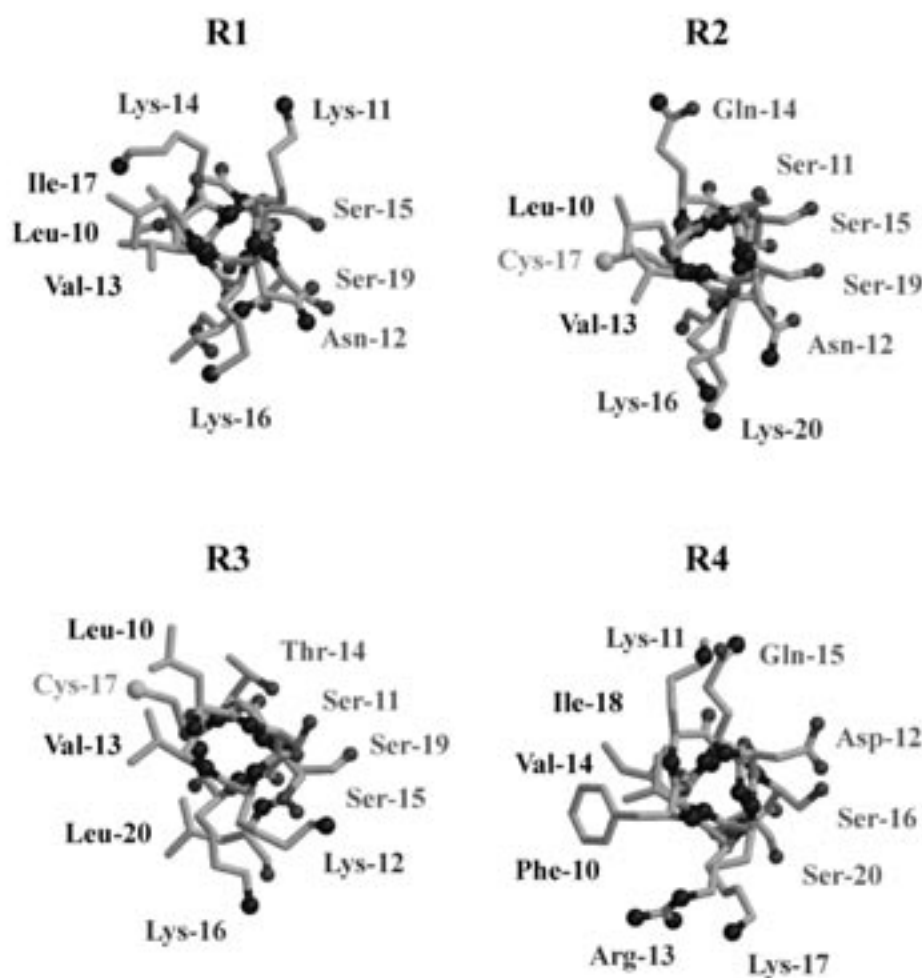


Fig. 9. Helical Wheel Drawings of 10-20 Sequence of the Most Stable Conformers of Respective Four Repeats, Viewed From the N-Terminal Side

を基に、ヘパリン存在下でのMBDのフィラメント形成開始ユニットになると考えられるダイマー形成モデルを構築した (Fig. 10).

各リピートペプチドでは、R3が最も速い自己凝集能を持ち、また、R3リピートペプチドの凝集能はN末端 (VQIVYK) 配列の $\beta$ シート構造と

Leu10-Thr14配列のヘリックス様構造の形成が要因であることから、フィラメント形成は、まずR3リピートの $\beta$ シート構造における重合、続くヘリックス様構造の形成によって開始される。次に、このヘリカルな構造がヘパリンのアニオン基の影響で伸張することにより、過渡的な両親媒性構造

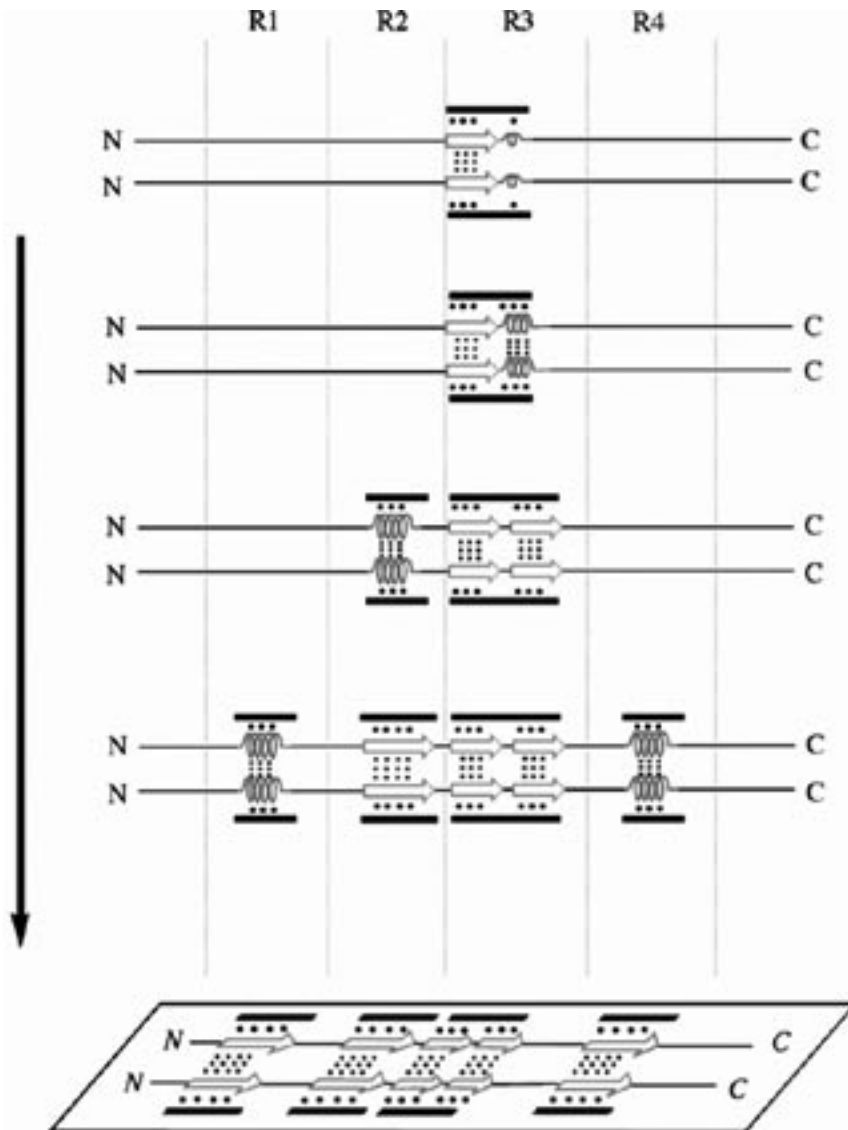


Fig. 10. A Model for the *in vitro* Repeat Peptide-Dependent Dimer Formation of 4RMBD

Dimer formation of 4RMBD is promoted by heparin. Heparin promotes (a) hydrophobic interactions between the R3 extended regions through electrostatic interactions, and (b) the successive hydrophobic interactions between amphipathic  $\alpha$ -helical-like intermediate structures of the R1-R4 peptides through electrostatic interactions of heparin with the polar and/or basic residues of the heparin-induced amphipathic intermediate structures of repeat peptides. In this figure, the black bars, open arrows and springs represent heparins,  $\beta$ -sheet structures, and  $\alpha$ -helical-like intermediate structures, respectively. The large and small dotted lines represent electrostatic (including hydrogen bonds) and hydrophobic interactions, respectively. N and C indicate the N- and C-terminals of 4RMBD, respectively.

が現れ、その疎水性領域間の相互作用により会合が進む。それと共に分子間ジスルフィド結合を形成し、ダイマー形成の基盤を作る。続いて、R2 リピートもヘパリンのアニオン基によって、一時的な両親媒性ヘリックス様構造へと誘導され、疎水性基間での会合と、分子間ジスルフィド結合形成によって、ダイマー構造はさらに安定化される。その後、R1, R4 リピートも同様の機構により会合し、最終的に平面的なシート構造をしたダイマーが形成されることが考えられる。

## 5. おわりに

PHF の形成は、タウタンパク質の異常なリン酸化やタウ遺伝子の点突然変異により引き起こされると考えられており、主に病理学的、形態学的、遺伝学的立場から研究が進められ、タウタンパク質の異常性と病態、特に脳神経病理との関連についてはかなり解明されている。しかしそれとは対照的に、病変の本体であるタウタンパク質の PHF 形成機構については、世界中で活発な研究が展開されているにもかかわらず、現在までのところ統一的な結論は得られていない。これは生理機能を有するタウタンパク質が極めて水溶性が高く、一定の二次構造を取らないために、原子レベルでの立体構造情報を得難いことに起因している。

近年 AD 発症の直接的な原因は、不溶性 PHF の出現によるものではなく、タウタンパク質が不溶化する前の可溶性オリゴマーが直接神経細胞死を引き起こすと考えられるようになってきた。<sup>25)</sup> 我々の研究は、タウタンパク質が可溶性から不溶性へと変化する際の構造特性とフィラメント形成の関係を分子レベルで解明することを目指しており、本稿において提唱したダイマー形成モデルは、タウタンパク質のリピート構造依存的な PHF 形成メカニズムの解明、さらには抗認知症薬を開発する上で重要な指標となることを期待している。

**謝辞** 本研究を遂行するに際し、終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました大阪薬科大学薬品物理化学教室石田壽昌教授に心より感謝致しま

す。本研究に関し、御討論頂き有益なご助書を賜りました大阪薬科大学薬品物理化学教室友尾幸司講師、ご協力とご支援を賜りました尹康子助手、時政真理子修士、平岡周子修士、水島史絵修士をはじめ同研究室の皆様へ深謝致します。タウ遺伝子を御提供頂くとともに、御助言を賜りました行動医科学研究所谷口泰造博士、澄田美保氏に深く感謝致します。また、蛍光強度測定に関して有益な御助言を頂きました Shanghai Tongji University, Tian-Ming Yao 教授に謹んで御礼申し上げます。

## REFERENCES

- 1) Friedhoff P., Von Bergen M., Mandelkow E.-M., Mandelkow E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1502**, 122-132 (2000).
- 2) Mandelkow E.-M., Mandelkow E., *Cell. Biol.*, **8**, 425-427 (1998).
- 3) Goedert M., Spillantini M. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1502**, 110-121 (2000).
- 4) Hutton M., Lendon C. L., Rizzu P., Baker M., Froelich S., Houlden H., Pickering-Brown S., Chakraverty S., Isaacs A., Grover A., Hackett J., Adamson J., Lincoln S., Dickson D., Davies P., Petersen R. C., Stevens M., de Graaff E., Wauters E., van Baren J., Hillebrand M., Joosse M., Kwon J. M., Nowotny P., Heutink P., *Nature*, **393**, 702-705 (1998).
- 5) Spillantini M. G., Murrell J. R., Goedert M., Farlow M. R., Klug A., Ghetti B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7737-7741 (1998).
- 6) Poorkaj P., Bird T. D., Wijsman E., Nemens E., Garruto R. M., Anderson L., Andreadis A., Wiederholt W. C., Raskind M., Schellenberg G. D., *Ann. Neurol.*, **43**, 815-825 (1998).
- 7) Friedhoff P., Von Bergen M., Mandelkow E. -M., Davies P., Mandelkow E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15712-15717 (1998).
- 8) Wille H., Drewes G., Biernat J., Mandelkow E.-M., Mandelkow E., *J. Cell. Biol.*, **118**, 573-584 (1992).
- 9) Wischik C. M., Novak M., Edwards P. C., Klug A., Tichelaar W., Crowther R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4884-4888 (1998).

- 10) Barghorn S., Mandelkow E., *Biochemistry*, **41**, 14885-14896 (2002).
- 11) Minoura K., Yao T.-M., Tomoo K., Sumida M., Sasaki M., Taniguchi T., Ishida T., *Eur. J. Biochem.*, **271**, 545-552 (2004).
- 12) Hiraoka S., Yao T.-M., Minoura K., Tomoo K., Sumida M., Taniguchi T., Ishida T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 659-663 (2004).
- 13) Sadqi M., Hernandez F., Pan U., Perez M., Schaeberle M. D., Avila J., Munoz V., *Biochemistry*, **41**, 7150-7155 (2002).
- 14) Goux W. J., *Biochemistry*, **41**, 13798-13806 (2002).
- 15) Buck M., *Q. Rev. Biochem.*, **44**, 453-475 (1998).
- 16) Wuthrich K., *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York (1986).
- 17) Wider G., Lee K. H., Wuthrich K., *J. Mol. Biol.*, **155**, 367-388 (1982).
- 18) Clore G. M., Nilges M., Sukumaran D. K., Brunger A. T., Karplus M., Gronenborn A.M., *EMBO J.*, **5**, 2729-2735 (1986).
- 19) Nilges M., Clore G. M., Gronenborn A. M., *FEBS Lett.*, **229**, 317-324 (1988).
- 20) Noggle J. H., Schirmer R. E., *The Nuclear Overhauser Effect*, Academic, New York (1971).
- 21) Piantini U., Sorensen O. W., Ernst R. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6800-6801 (1982).
- 22) Brunger A. T., Adams P. D., Clore G. M., DeLano W. L., Gros P., Grosse-Kunstleve R. W., Jiang J. S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N. S., Read R. J., Rice L. M., Simonson T., Warren G. L., *Acta Crystallogr.*, **D54**, 905-921 (1998).
- 23) Minoura K., Tomoo K., Ishida T., Hasegawa H., Sasaki M., Taniguchi T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **76**, 1617-1624 (2003).
- 24) Spera S., Bax A., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5490-5492 (1991).
- 25) 宮坂知宏, *Dementia Japan*, **19**, 273-283 (2005).