

# 第15回NMR討論会

## 講演要旨集

1976年10月25日(月)・26日(火)・27日(水)

日本都市センター講堂

共 催

日本化学会・日本分析化学会

日本薬学会・日本農芸化学会



# 第 15 回 N M R 討 論 会

共 催 日本化学会, 日本分析化学会  
日本薬学会, 日本農芸化学会

日 時 1976年10月25日(月), 26日(火), 27日(水)  
会 場 日本都市センター講堂(東京都千代田区平河町, 電話(03)265-8211)

## 第 1 日

10月25日(月) (10:00~11:00)

I-1 状態分析から分子空間反応へ (東大理) 藤原 鎮男……2

(11:00~12:15)

101 PFT-100システムを利用した相関NMR法と生体物質での測定例  
(阪大蛋白研・日電子サービス) ○阿久津秀雄, 京極 好正, 加川 勲……6

102 相関NMRとその応用. VI. データ処理のシステム化  
(東大計セ・東大理) ○小澤 宏, 荒田 洋治, 藤原 鎮男……10

103 パルスFT法による $T_{1\rho}$ 測定  
(日本電子) ○大内 宗城, 藤戸 輝昭, 今成 司, 国領 憲治, 荒川 光明……14

(13:30~14:45)

104 I・I-Coupling における中間励起状態のとり方について  
(東北大理) 広池 英子……18

105 hetero 原子を含む系の核間スピン結合定数 (北大理) 三好 永作, ○吉田 克彦……22

106 窒素孤立電子対の磁気異方性について  
(京大工) ○吉川 研一, 唐津 正典, 森島 績……26

(15:00~17:00)

[ポスターセッション]

P-1-1  $^{13}\text{C}$ -NMRにおける $^1\text{H}$ -Long range Decoupling とH-C間の選択的  
NOEについて (理研) ○鶴沢 洵, 竹内 節男……30

P-1-2 NMRによるイオンの水和に関する研究 (北見工大) ○三浦 宏一, 福井 洋之……34

P-1-3 トリオルガノ(オキシナト)アンチモン錯体の配位子交換反応の研究  
(阪大工) ○川崎 吉包, 高橋 経則, 大河原六郎……38

- P-1-4 2-chloroethanol のヒドロキシルプロトンの多重度に関する研究  
(福井大工) ○水野 和子, 神藤 洋爾……42
- P-1-5  $^{13}\text{C}$ -NMRによるアセトアニリド類の水素付加に関する研究  
(芝浦工大・東大工) ○永田 親清, 岡崎 充良, 田中 誠之……46
- P-1-6 水溶液中におけるアミノ酸・遷移金属錯体の $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ 核磁気緩和 (第4報)  
(京大工) ○北川 進, 吉川 研一, 森島 績……50
- P-1-7 プラチン類の $^{13}\text{C}$ -NMR  
(城西大理・都老人研・東薬大) 粟原 照夫, 松尾 光芳, ○松本 茂信,  
太田 明宏, 渡辺 徳広, 秋田 安男……54
- P-1-8  $^2\text{H}$  NMRの生合成研究への応用  
(国立がんセンター研・共立薬大) ○斎藤 肇, 小田 泰子, 佐藤 良博……58  
(18:30~20:30)
- I-2 化学シフトの図表化, スペクトル解析, そしてデータ・ベースへ (東工試) 山本 修……62
- I-3 相互作用系のNMR (京大工) 米澤貞次郎……64

## 第 2 日

10月26日(火) (9:00~10:00)

- I-4 常磁性分子のNMR—有機化学, 生化学への応用— (京大工) 森島 績……70  
(10:00~12:30)
- 201  $\text{Eu}(\text{DPM})_3$ —Lewis 塩基系の付加体形成について  
(近畿大薬・阪大薬) ○川木 秀子, 岡崎 雄交, 藤原 英明, 佐々木喜男……72
- 202 ポルフィリン鉄(III) 錯体のNMR (第7報)  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMRによる  
axial配位子(ピリジン誘導体)の効果とその常磁性シフト  
(京大工) 森島 績, ○石川 隆利, 増田 秀樹, 米澤貞次郎, 生越 久靖,  
杉本 博司, 吉田 善一 ……………76
- 203 'DESERT'法によるアデノシン3', 5'-サイクリックモノリン酸の構造, (II) 中性  
溶液中でのSyn-Anti平衡の温度依存性  
(京大理) ○林 文和, 赤坂 一之, 波多野博行……80
- 204 ヌクレオチド類の水溶液中の構造—ランタニドプローブ法およびスピン結合定数  
による解析— (東大理) ○稲垣 冬彦, 横山 茂之, 田隅 三生, 宮沢 辰雄……84

- 205  $^{13}\text{C}$ -NMRによるグルタチオンと水銀塩の相互作用  
 (東工大) ○上遠野幸男, 井上 義夫, 中條利一郎...88
- 206 ポリ-L-アラニンのプロトン化学シフトとコンホメーションの研究  
 (東工大) ○朝倉 哲郎, 安藤 勲, 西岡 篤夫...92  
 (14:00~15:15)
- 207 Ribonuclease  $T_1$  のNMRによる研究  
 (東大理・阪大蛋白研・阪大医) ○荒田 洋治, 木村 定雄, 松尾 寿之,  
 成田 耕造 .....96
- 208 アスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性域構造に関する研究  
 (熊大医・京大理) ○山崎 政城, 永田 浩一, 田浦 洋子, 赤坂 一之,  
 森野 能昌 .....100
- 209 ポルフィリン鉄(III) 錯体のNMR (第9報)  $^2\text{H}$ -NMRによる軸配位子の常磁  
 性シフトとそのヘム蛋白質への応用  
 (京大工) 森島 績, ○増田 秀樹, 犬伏 俊郎, 米澤貞次郎, 生越 久靖,  
 杉本 博司, 吉田 善一 .....104  
 (15:30~16:30)
- I-5 NMRの生物化学への新しい応用—不均一系の高分解能NMRスペクトル—  
 (味の素中研) 甲斐荘正恒...108  
 (16:30~18:10)
- 210 核酸における  $^{31}\text{P}$  緩和機構とその応用  
 (京大理) ○赤坂 一之, 林 文和, 山田 篤子, 波多野博行...112
- 211 核緩和速度による金属酵素と基質の相互作用 (東大生研) ○飯田 武揚, 鋤柄 光則...116
- 212 生体膜における  $^{23}\text{Na}$ -NMR  
 (京都府立医大) ○西川 弘恭, 吉崎 和男, 山田 誠二, 亘 弘, 北里 宏...120
- 213 多糖ゲルの  $^{13}\text{C}$  NMR (その1) 直鎖(1→3) - $\beta$ -D-グルカン中の  
 ヘリックス構造 (国立がんセンター研) ○斎藤 肇, 大木 豊和, 佐々木琢磨...124

第 3 日

10月27日(水) (9:00~10:00)

I-6 高分子と歩んだNMR20年 (東工大) 西岡 篤夫...130

(10:00~12:05)

301 重水素化合物における<sup>13</sup>C核磁気緩和(第1報)ベンゼン-d<sub>6</sub>

(東工試) ○山本 修, 柳沢 勝...134

302 フリーラジカルを含んだ有機溶媒の緩和と分子運動

(京大理・京大工) ○遠藤 一央, 森島 績, 米澤貞次郎...138

303 フロッピーディスクを使用したFT-NMRによる化学反応の追跡

(東工大) ○横山 佳雄, 荒井 真, 西岡 篤夫...142

304 <sup>1</sup>H NMRによるポリ- $\gamma$ -ベンジル-L-グルタメート-n-パラフィン-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

の磁場配向と分子運動の研究

(東工大・山形大工) 安藤 勲, 藤井 裕二, ○平井 亨, 西岡 篤夫, 田中 宏...146

305 パルスNMRによるアガロース, ゼラチン水溶液のゲル化の研究

(出光中研) 佐藤 和夫...150

(13:30~14:30)

I-7 有機化学反応とNMR

(東大理) 岩村 秀...154

(15:00~17:00)

[ポスターセッション]

P-3-1 立体選択的重水素化によるアミノ酸の配座解析.  $\beta$ -水素間のシフト差と

立体配座の関係について

(味の素中研) ○鯉坂 勝美, 甲斐荘正恒...158

P-3-2 ペニシリンおよびその関連物質のNMR. II.

(東大理・東大医) ○三森 文行, 荒田 洋治, 藤原 鎮男, 村中 正治,

堀内 淑彦.....162

P-3-3 糖ペプチド抗腫瘍性抗生物質ブレオマイシンの<sup>13</sup>C-NMRについて

(微生物化学研・日本化薬薬品研) ○長縄 博, 村岡 靖彦, 佐藤 真弥,

滝田 智久, 梅沢 浜夫.....166

P-3-4 ポルフィリン鉄錯体のNMR(第8報) 異った配位子を持つヘム錯体のNMR. (II)

(京大工) 森島 績, ○松木 栄造, 犬伏 俊郎, 米澤貞次郎, 生越 久靖,

杉本 博司, 吉田 善一.....170

- P-3-5 ヘム蛋白質のNMR (29) —チトクロームP450における基質の効果—  
 (京大工・慶大医) 森島 績, ○犬伏 俊郎, 小川 諭, 米澤貞次郎, 石村 巽,  
 飯塚哲太郎, 島田 秀夫 .....174
- P-3-6 多糖ゲルの  $^{13}\text{C}$  NMR (その2) 分岐 (1→3) — $\beta$ -D-グルカンのゲル構造と  
 $^{13}\text{C}$  緩和 (国立がんセンター研) ○斎藤 肇, 大木 豊和, 佐々木琢磨...178
- P-3-7 H-NMR法による生体中の水の研究  
 (京都府立医大) ○吉崎 和男, 西川 弘恭, 亘 弘...182  
 (18:30~20:30)
- I-8 溶媒と異方性 (電通大) 中川 直哉...186
- I-9 NMRの有機化学への応用 (塩野義研) 通 和夫...190

I-1~I-9は招待講演, P-1-1~P-1-8およびP-3-1~P-3-7は  
 ポスターセッション, その他は一般講演です。

講演時間 招待講演40分(討論20分)  
 一般講演20分(討論 5分)

懇 親 会 10月26日(火)18時30分より都市センター食堂ホールにおいて行  
 います。

# 日本都市センター

## 交通のご案内

### ○ 地下鉄

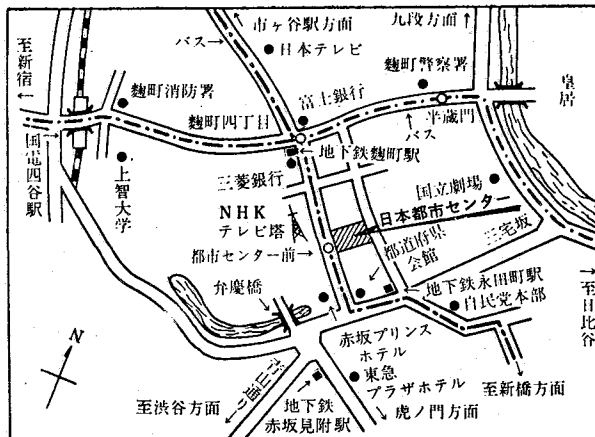
- 有楽町線 麴町駅・永田町駅より徒歩約3分
- 丸の内線・銀座線 赤坂見附駅より徒歩約6分

### ○ 国電

- 中央線 四谷駅(麴町口)より徒歩約12分

### ○ バス

- 都バス・京王バス(新橋↔中野哲学堂)  
平河町二丁目、都市センター前
- 都バス(新宿↔銀座) 麴町四丁目下車徒歩約3分





第 1 日

10 月 25 日 (月)

## 1. 状態分析の発想

演者は、ジルコニウムとハフニウムの分離分析法を研究し、その困難を経験するうち、類縁元素の分析には核分光が望ましいと考えるに到ったが、たまたま磁気共鳴の発見を聞き、その構成が、かねて手がけていた高周波分析<sup>(1)</sup>に磁場を加えたものであることを知り、昭和24年、最初の装置を試作した。その時考えたことは、小コイル、小試料による微量分析と標準電波による測定値の確度の向上で、前者では約2mgの固体アルミナ中のフッ素を定量<sup>(2)</sup>し、後者ではCu 63の核磁気回転比の測定となった。またこの間、<sup>フッ素及び石の</sup>フッ素とリンの格子定数を精密に測定し、固体中のフッ素とリンの構造についてX線データ(Wyckoff)の補正を行なった。<sup>(3)</sup>

その後、イリノイ大学Gutowsky研究室において最初の高分解能NMR分光計の試作に参加し1954年フッ化ベンゼンの陽子共鳴線の二重線を測定した。當時たまたまMulliken教授らは分子軌道論を展開しつつあり、これに囑発され、Gutowsky教授と藤原は、環状プロトンのエネルギー準位は、環電流により均等化されるものか、またそうでなく、本来スピン結合による準位が存在し、二重線はさらに高次の構造をもつものであるかを知りたいと考えた。もし後者であるならば、二重線はさらに多重線にわかれるはずである。よって分解能の向上につとめ、その測定に努力したが不成功に終わった。帰国後、演者はひきつづいてこの問題にとりくみ、自作した本邦最初の高分解能NMR分光計(27MHz)により多重線の実測に成功した。さらに清水は、東大高速電子計算機PC-2により当時としては画期的な6スピン系の完全解析を実行し、スペクトルのシミュレーションに成功した。<sup>(4)</sup>

これとはまた別に、演者は、イリノイ大学において、アンモニア水中の化学種は、はたして $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ のいずれであろうかということ考えた。そして、NMR測定の結果、実際はそのいずれでもなく、 $\text{NH}_3$ と $\text{H}_2\text{O}$ との間の高速の陽子交換であることを証明した。<sup>(5)</sup>

以上の経過から、演者は、固体ないし液体中の化学種の状態を知ることは、従来の分析化学で無視してきた問題であるが、きわめて重要であり、状態分析として系統的に研究を進めるべきであり、NMRとESRはその有用な手段であると考えに至った。<sup>(6)</sup>以後その研究を体系的に進めることとした。

## 2. 状態分析の展開

状態分析の対象として、演者は、A) 固体中の微量成分の分布、B) 回転異性体の定性定量 C) 不安定化学種(たとえば励起電子状態のイオンないし分子)を考え、1955年頃より以下の研究を進めた。

A) は、微量の極限において、微量成分がランダム分散をするか、あるいはまた固有の規則格子を形成するかの問題であり、古く1920年代にNoddack(前者の説)と、Goldschmidt

(後者の説)により論争され、今日まで未解決にとどまった問題である。演者は、炭酸カルシウム中のマンガンの ESR の線巾から、基本的には前者の立場が正しいことを実証した。(7) この問題はその後、地球化学的に興味ある問題を提起している。(8) また、この時の考えは固体中の化学種を存在状態のまま非破壊的に測定することに進み、ESR によって蚕の卵その他の生体中の色素の生成を追跡することとなり、(9) 最近ではこの研究の志向は Gross Chemistry といわれて盛んな研究が海外で行なわれている。

B) については、溶液中のアミノ酸に関し、詳細な研究がすすめられた。その結果アミノ酸のみの場合(10)、全誘導体(11)、キレート体(12)の場合などについて研究が行なわれた。また、2,4ペンタンジオールについても研究が進められ、(13) 総括して、この一連の研究の結果、分子内水素結合が異性体の重率をきめる要素であり、その結合エネルギーは、0.5 から約 1 Kcal/mol の範囲にあることが明らかにされた。この間、他核の NMR についても研究が進められ、Al の溶存形は、Td と Oh の二つであり、そのどちらに帰せられるかをシフトで確立しうることが明らかになった。(14) また Co の NMR からは、コバルト錯体の異性体として、mer-fac などが分光された。(15) この研究は、約 500種の錯体の合成と、そのうちの約200種についてのNMR測定値を基盤におくものである。(16)

C) は、NMR の研究対象としては不適當の面があり、たとえば ESR によるホットイオンの研究などがより深く進められたが、(17) ただ他核の NMR は、この問題にも有効であり、とくに Cu (II) - Cu (I) (18)、Co (III) 錯体の交換系の解析は典型的な例といえる。(19)

### 3. 分子空間反應

溶液状態のイオンないし分子は、通常等方的な運動を行っており、それには最小限必要な自由空間があると考えられる。これをかりに分子空間とよぶとすると、その大きさを磁気共鳴の線巾ないし異方性の線形などで推測することができる。演者は、これを銅イオンの水溶液(20)、シリカゲル中の銅イオン(21)の ESR の測定から推測し、さらにまた  $\gamma$ 線照射による架橋でつくったポリビニルアルコールゲルの應用で(22)、Cu イオンの分子空間は約 25 オングストローム径と推察するに至った。

#### 「分子空間中のアミノ酸の NMR」

溶存イオンないし分子が利用しうる運動空間を何らかの手段で分子空間より狭くすることができると、運動は自由等方的でなくなり、異方性をもつようになる。これは、無機イオンにあっては錯結合の形成のはじまりであり、分子にあっては、いくつかあるコンホメーションのうち特定のものへの偏倚である。したがって、これまでに得たアミノ酸の異性体の存在状態を基準にし、架橋ポリビニルアルコールの分子空間ゲル中の分子のコンホメーションを測定すれば、この偏倚を知ることができ、さらに、その際の化学性の変化を実証できるならば、分子空間と巨視的空間との間に化学性のちがいがおこることを言いうるであろう。そしてこのことは、たとえば細胞のような限られた空間での化学反応の特異性の出現を示唆する所があるかと思われる。演者はかくのごとく考えて、セリンの NMR スペクトルを測定することを試みた。この測定は、多量の溶媒と PVA 基質の共存下のアミノ酸の測定であるの

で、通常ではきわめて困難な問題であるが、荒田、小澤らによって開発された相関 NMR はこの測定を可能にした。さて測定の結果は、スピン結合の変化は、実験誤差の範囲で見出されず、すなわち、異性体の重率はほとんど変らぬことが知られた。すなわち、0.5ないし 1 Kcal/mol の程度の分子内水素結合で安定化されているセリンの内部回転異性体の重率は分子空間内の壁との衝突によってほとんど変化されることが結論される。ただし、わずかに  $\alpha$  プロトンの化学シフトに変化がみとめられた。これは若干の重率の変化がおこっていることを示唆するものである。 $\alpha$  プロトンの変化がみられたことは、とくに重要である。分子空間的に運動の制限がつけられて、特定の異性体の存在に偏倚したときは、通常、全体の平均として測られているアミノ酸の pK その他の化学性のパラメーターは十分変りうることが豫想される。事実我々は、セリンの各異性体それぞれの酸解離定数のちがいを、NMR により実測し有意のかなり大きな差があることを明らかにした。したがって、以上の結果を総括して考えると、分子空間内の分子の反応は、自由空間のそれとちがうことを本研究は示唆している。それは、生体の細胞内の反応などをとるまでもなく、化学の反応の考察には、実際のそれがおこる空間の大きさを考慮にいれる必要のあることを示唆するもので、重要な意義をもつといわねばならない。

- (1) 岡林英雄, 中野邦夫, 藤原鎮男, 東大放射研報告 4, 24 (1949)  
S. Fujiwara, S. Hayashi, Report of University of Electro-Communications, No.1, 119 (1950); No.2, 322 (1950); No.3, 91 (1951); Anal. Chem., 26, 239 (1954); K. Ishii, S. Hayashi, S. Fujiwara, Anal. Chem., 31, 1586 (1959)
- (2) 藤原鎮男, 林 昭一, 日化 72, 764 (1951)
- (3) U.S. Atomic Energy Commission, Oak Ridge National Laboratory report-1469 Supplement II, p.14, Walchli
- (4) S. Fujiwara, H. Shimizu, J. Chem. Phys., 32, 1630 (1960)
- (5) H. S. Gutowsky, S. Fujiwara, J. Chem. Phys., 22, 1782 (1954)
- (6) 藤原鎮男, 化学の領域 15, 487 (1961)
- (7) S. Fujiwara, Anal. Chem., 36, 2259 (1964)
- (8) 阿部, 綿拔, 藤原, 日化 85, 638 (1964) 87, 367 (1966) 阿部, 藤原, 91, 152 (1969)
- (9) S. Fujiwara, H. Tadano, M. Nakajima, Bull. Chem. Soc. Japan, 43, 3023 (1970); S. Fujiwara, M. Nakajima, Annals New York Acad. Sci., 222, 677 (1973); S. Fujiwara, M. Nakajima, K. Nakaizawa, Chem. Letters, 1974, 1419
- (10) S. Fujiwara, Y. Arata, H. Momoi, Bull. Chem. Soc. Japan, 36, 578 (1963); S. Fujiwara, Y. Arata, *ibid.*, 37, 344 (1964); H. Ogura, Y. Arata, S. Fujiwara, J. Mol. Spectroscopy, 23, 76 (1967)
- (11) 春日井由利, 東大修士論文 (1972)
- (12) H. Ishizuka, T. Yamamoto, Y. Arata, S. Fujiwara, Bull. Chem. Soc. Japan, 46, 468 (1973)
- (13) T. Fukuroi, Y. Fujiwara, S. Fujiwara, K. Fujii, Anal. Chem. 40, 879 (1968)
- (14) H. Haraguchi, S. Fujiwara, J. Phys. Chem., 73, 3467 (1969)

- (15) F. Yajima, Y. Koike, T. Sakai, S. Fujiwara, *Inorg. Chem.* 11, 2054 (1972)
- (16) F. Yajima, A. Yamasaki, S. Fujiwara, *Inorg. Chem.*, 10, 2369 (1971);  
Y. Koike, F. Yajima, A. Yamasaki, S. Fujiwara, *Chem. Letters*, 1974, 177;  
F. Yajima, Y. Koike, A. Yamasaki, S. Fujiwara, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 47,  
1442 (1974)
- (17) 藤原鎮男, *化学と工業* 27, 406 (1974)  
*International Review of Science, Phys. Chem. Series Two, Vol.4, Magnetic  
Resonance*, ed. C.A. McDowell, p.55, Butterworths, 1975
- (18) T. Yamamoto, H. Haraguchi, S. Fujiwara, *J. Phys. Chem.*, 74, 4369 (1970)
- (19) S. Fujiwara, M. Nakamura, *J. Chem. Phys.*, 52, 6299 (1970); S. Fujiwara,  
T. Watanabe, H. Tadano, *J. Coord. Chem.*, 1, 195 (1971); J. Isoya, S. Fujiwara,  
*Bull. Chem. Soc. Japan*, 45, 2182 (1972)
- (20) S. Fujiwara, H. Hayashi, *J. Chem. Phys.*, 43, 23 (1965)

## 1) はじめに

水溶液系を基本とする生物物質のプロトンNMRによる研究においては水のシグナルがしばしば測定の障害となる。特に蛋白質のペプチド結合のイミノプロトンや、核酸塩基のアミノ・イミノプロトンを観測する為には $H_2O$ を溶媒とすることも必須であり、その場合は水のシグナルは試料のシグナルとは桁違いに大きなものとなる。現在普及しているパルスフーリエ変換法はこのような系の測定には大きな弱点を持っている。それは既によく議論されているように、著しく強い信号と共存している弱い信号はAD変換器のタイミツクレンジを下回り、検出できなくなるからである。この困難をパルス法の工夫によって克服する試みがT<sub>1</sub>の差を利用するWEFT法あるいはその改良として行なわれている。他方Dadokらにより提案された相関NMRは掃引法によって、この困難を克服する試みである。この場合は溶媒のシグナルを掃引領域から外すことにより、容易にこの困難を解決できる。しかも相関NMR法は1回の掃引を数秒で行なうので測定時間の短かさ、S/N向上においてはパルス法に劣らないものであり、パルス法と並ぶ一般的測定法となりうるものである。このような観点から我々は水系のプロトンNMR測定における相関法のルーチン化と、パルス法との互換性を考慮して、JEOL PFT-100 システムをベースにした相関NMRシステムを開発した。

相関NMR法の原理と様々な問題点については荒田・小沢が既に沖3回の本討論会に詳しく報告しているのでそちらを参照していただきたい。ここではその要約を述べる。b rad/sec<sup>2</sup> で高速掃引した際の応答シグナルは回転座標系から見て、シグナル成分 R(t) とウィグル成分  $\exp(-ibt/2)$  の積

$$Y(\omega) = R(t) e^{-ibt/2} \dots \dots \dots (1)$$

として表わされる。このウィグル成分を消して、時間による歪みのないスペクトルを得ることが本法の目的である。式(1)を逆フーリエ変換してやると

$$F(t) = (1/2\pi) \int Y(\omega) e^{i\omega t} d\omega = h(t) e^{-t^2/2} \dots \dots \dots (2)$$

となる。ここでh(t)はシグナル成分のfree induction decayにあたるものである。(2)式右辺のウィグル成分  $\exp(-ibt/2)$  を消してやれば、h(t)のフーリエ変換により正規のシグナルを得ることができる。このウィグル成分の消し方には二通りある。1つは函数  $\exp(-ibt/2)$  をつくって(2)式にかけることによりh(t)を得る方法である。もう1つは線幅の狭いシグナル  $F_R(t)$  を対照として用い、F(t)と $F_R(t)$ の複素積をとることにより、ウィグル成分を消す方法である。(掃引条件は全く同じものを用いる) 即ち

$$F(t) \cdot F_R(t)^* = h(t) e^{ibt/2} \cdot h_R(t)^* e^{-ibt/2} = h(t) \cdot h_R(t)^* \dots (3)$$

となる。通常のNMR装置のようにsingle phase detectorを使っている場合には式(3)

○あくつひであ・きようごくよしまさ・かがわいさあ

は少し変わってくるが、本質的には同じである。これをフーリエ変換してやれば、周波数軸の正規のスペクトルが得られる。このように  $Y(\omega)$  と  $Y_R(\omega)$  についてフーリエ変換したものの複素積をとり、再びフーリエ変換して得られるものは  $Y(\omega)$  と  $Y_R(\omega)$  の相関をとることと数学的には同じであるので、相関NMRという名前がつけられている。この方法は実験的には簡単だが、式(3)からわかるように得られたシグナル成分に対照シグナルの線幅がかわって来る。我々はこの対照シグナルを使う方法(TMシグナルを使った)を採用した。

## 2) システムの概要

図1にシステムのブロックダイヤグラムを示した。パルスプロセッサから出たスタートパルスがEC-100コンピュータに入り、そこからソフトでコントロールされるサンプリングパルスが出る。このパルス幅が掃引時間を決定する。サンプリングパルスに合わせて、ノコギリ波が sweep generator

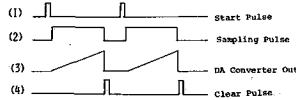
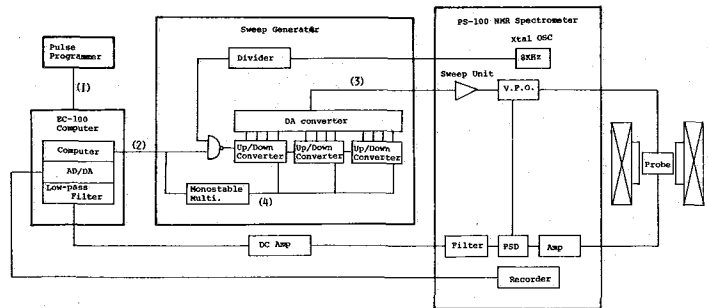
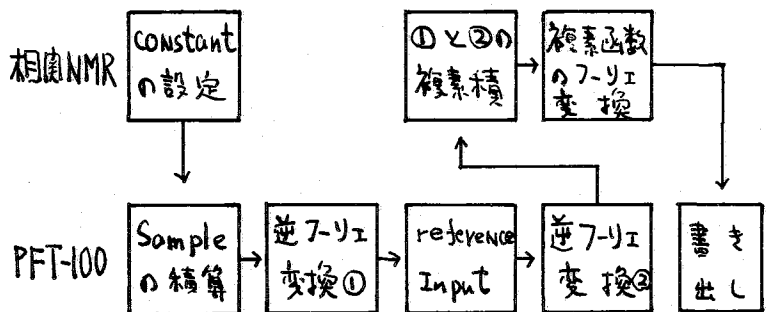


図1 本相関NMRシステムのブロックダイヤグラム

のDA変換器から出て来る。これがPS-100の可変周波数発振器に入り、変調周波数の掃引を行なう。シグナルはEC-100にサンプリングされ、このコンピュータ(JEC-9804)でデータ処理を行なう。AD変換器は12ビット、メモリは16ビットである。ハード的には sweep generator を自作して PFT-100 システムにつけ加えた。化学シフトを決定する為には掃引幅を正確に読みとる必要があるので、ノコギリ波発生には12ビットのDA変換器を用いた。ノコギリ波をデジタル化したことによる影響は測定範囲ではあまり見られ

ない。ソフトのブロックダイヤグラムを図2に示す。データの出し入れ、高速フーリエ変換等は全てPFT-100ブロックをそのまま用いてある。メモリの最後の4Kブロックに相関NMRのブロックを入れ、PFT-100ブロックの modify、複素積の計算、複素関数のフーリエ変換等を行なう

図2 [PFT-100を利用した相関NMRブロックダイヤグラムのブロックダイヤグラム]



いる。Sample側のスペクトルに4K、対照のスペクトルに4Kのメモリーを使うと、最終的には4Kの実領域、4Kの虚領域のスペクトルが得られ、最初の分解能も保たれる。基本部分のフクロウムは共通しているの、ハードの方の若干の切り変えだけで、パルス法による測定が可能である。

### 3) 周波数軸の校正と直線性の確認

掃引周波数の幅は、掃引後のノコギリ波の電圧をホールドして周波数カウンタで掃引後の周波数を直接読みとることにより正確に決定できる。この掃引幅を用いれば、化学シフトを正確に決定できる。周波数軸校正の正確さと、掃引の直線性をクロロホルム、ジクロロメタン、ジオキサラン、トトリクロロエタン、アセトン、シクロヘキサラン・TMSの混合試料を用いて確認した。

その高速掃引スペクトル、逆フーリエ変換スペクトル、相関スペクトルを図3に示す。直線性は満足すべきものであり、化学シフトは0.1%以内の誤差で決定できる。シグナルの裾野の線幅が広がっているのは対照のTMSの線幅が広がっている為である。

### 4) チトクロ-4 b<sub>5</sub> 水溶液の測定

図4はウサギ肝マイクロゾームの還元型チトクロ-4 b<sub>5</sub> (可溶性分画) のスペクトルである。濃度は7mM (MW約12000) 0.1Mリン酸緩衝液 pD 6.55 で測定した。測定領域は水を基準として低磁場側へ1ppm位のところから、8.75 ppmまで、所謂アロマティック領域を含んでいる。周波数軸は通常と逆になっている(右側が低磁場)。サンプリング点4096点、くりかえし2.1秒、掃引時間2.03秒、掃引速度381.5Hz/sec、フィルタ250 Hz、積算回数2561回である。(A)が高速掃引のスペクトルで、(B)がTMSと相関をとった後のスペクトルである。分解能もS/Nも満足すべきものであり、高分子の

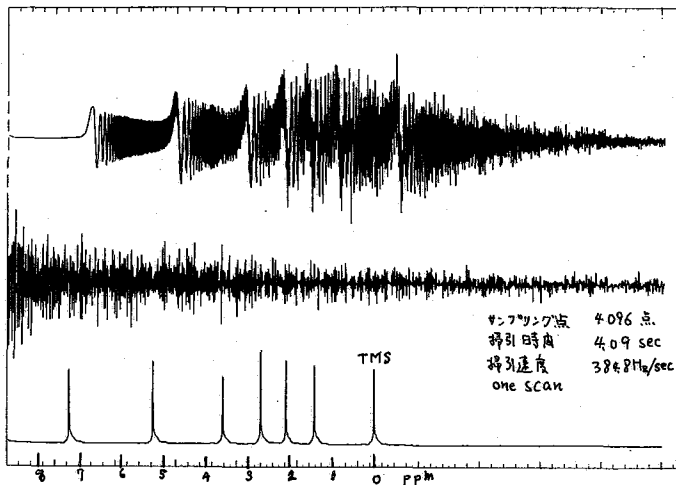


図3. 混合サンプルの(上)高速掃引、(中)逆フーリエ変換、(下)相関スペクトル。対照はTMS。

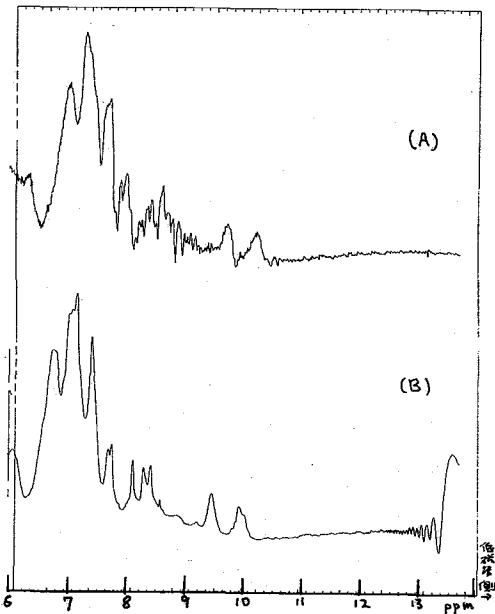
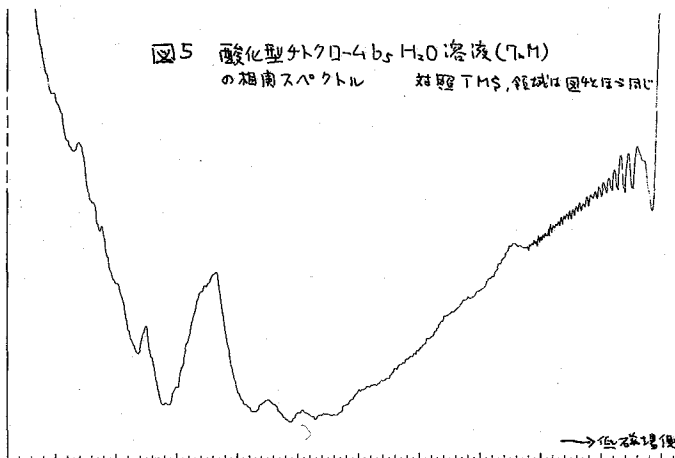


図4 還元型 外クロ-4 b<sub>5</sub> の(A)高速掃引 (D<sub>2</sub>O) (B)相関スペクトル 対照はTMS (7mM)



スペクトルではTMSによる振幅の広がりには問題にならずに)。図5は酸化型チクロロム6b<sub>5</sub> 7mM H<sub>2</sub>O溶液 (pH7.0)のほぼ同じ領域での相関をとった後のスペクトルである。一番強いシグナルはペプチド結合のNH由来のものである。図4で最も強かったアロマトニックなプロトンのシグナルは水の雑音に少し現われている。掃引条件は前記とほぼ同じ。積算数-3000回。



5) 稀薄H<sub>2</sub>O溶液中の水シグナルに近いシグナルの検出

0.1% 5'-アデノシン-リン酸 H<sub>2</sub>O 溶液 (約 2.5mM pH7.0) の C1' のプロトンのシグナル (TMS基準 6.1ppm 付近) をとることを試みた。通常の方法では不可能であったので、ハード面とソフト面とで一定の改良を行なって、シグナルの検出に成功した。ハード面では図1のPSPの前で、一次あるいは二次函数的にベースラインを差し引く回路を組み込んだ。ソフト面では

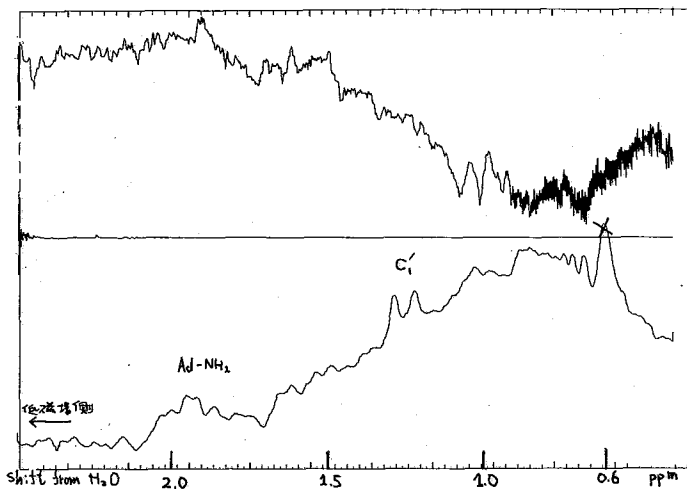


図6 5'-アデノシン-リン酸 H<sub>2</sub>O溶液 (2.5mM) の(上)高速掃引(中)逆フーリエ変換(下)相関をとったスペクトル 参照はTMS

積算効率を上げる為、毎回あるいは数回毎に水のベースラインを引いては積算していく方法をとった。このように二回にわたる水のベースラインの補正は水のシグナルに極く近い微弱信号の検出に非常に有効である。結果を図6に示してある。上は高速掃引スペクトル、中はその逆フーリエ変換、下は相関をとったスペクトルである。測定条件はサンプリング点 4096点、くり返し時間 6.0秒、掃引時間 4.09秒、掃引速度 51.3Hz/sec 掃引幅 210 Hz、積算回数 1000回である。周波数軸は通常と同じ。

本研究にあたり、懇切な御教示をいただきました日本電子AID開発部中川恵策氏、有益な御助言と励ましをいただきました東大理学部化学の荒田洋治博士、またチクロロム6b<sub>5</sub>を御供与下さいました阪大蛋白質研の田島正二氏に深く感謝いたします。

相関NMR分光法はスピン系を高速周波数掃引したときに得られる歪んだシグナル(高速掃引応答)から掃引の影響を除去して系の定常NMRスペクトルを求める方法である.<sup>1,2</sup> 我々は相関NMRにおいてはスペクトルの観測したい部分だけを励起できるため測定の際のダイナミックレンジの点でパルスFT法より有利であることに着目し, この方法の開発を行ってきた.<sup>3,4</sup> すなわち, A/D変換器の分解能を落とさずに多数回積算したときに必要な unfolding, 高速掃引応答のベースラインが傾いているときに用いる wing processing, サンプルング点の数を最小にするための zero supplement などの方法を考案し, さらにこれらすべての処理をNMR測定装置に結合した小型計算機でオンライン会話形式で迅速に実行できるよう, 小型計算機用プログラムを開発した. ここではこれらの点について述べ, またアルゴリズムの改良点についてもその概要を記す.

I. 相関NMRのアルゴリズム

系の周波数掃引の速さを  $b$  rad/sec, PSD検波後の高速掃引応答  $G(\omega)$  の逆フーリエ変換を  $g(t)$  とすると, 系の自由誘導減衰は  $h(t) = g(t) e^{-ibt^2/2}$  で与えられる.<sup>2</sup> いま高速掃引応答のサンプルング時間間隔を  $\sigma$  sec, サンプルング点の数を  $N$  とし, 時刻  $s\sigma$  ( $s=0, 1, \dots, N-1$ ) における  $G(\omega)$  の値を  $G_s$  で表わせば, 時刻  $k\Delta t$  ( $k=0, 1, \dots, \frac{N}{2}$ ) ( $\Delta t = \frac{2\pi}{b\sigma N}$ ) における  $g(t)$  の値  $g_k$  は

$$g_k \equiv A_k - iB_k = \frac{1}{N} \sum_{s=0}^{N-1} G_s e^{i\frac{2\pi}{N}ks} \quad k=0, 1, \dots, \frac{N}{2}$$

となり, また同時刻における  $h(t)$  の値  $h_k$  は

$$h_k \equiv D_k - iE_k = (A_k - iB_k) \left( \cos \frac{b(kt)^2}{2} - i \sin \frac{b(kt)^2}{2} \right) \quad k=0, 1, \dots, \frac{N}{2}$$

で与えられる. 相関NMRスペクトル  $H(\omega) \equiv U(\omega) - iV(\omega)$  は  $h(t)$  をフーリエ変換することにより得られるが, 常法でこれを行なうと  $G(\omega)$  を一つの位相でのみ観測したことに対応して  $H(\omega)$  の中の  $U(\omega)$  成分のみが  $N$  点求められ, スペクトルの位相補正が行ないくくなる. 我々は  $h_k$  の代りに

$$D'_0 - iE'_0 = D_0 - iE_0 \quad (1a)$$

$$D'_k - iE'_k = 2(D_k - iE_k) \quad k=1, 2, \dots, \frac{N}{2}-1 \quad (1b)$$

$$D'_{\frac{N}{2}} - iE'_{\frac{N}{2}} = D_{\frac{N}{2}} - iE_{\frac{N}{2}} \quad (1c)$$

$$D'_k - iE'_k = 0 \quad k = \frac{N}{2}+1, \frac{N}{2}+2, \dots, N-1 \quad (1d)$$

で定義される  $h'_k \equiv D'_k - iE'_k$  ( $k=0, 1, \dots, N-1$ ) に対して  $N$  点のフーリエ変換

$$H_s \equiv U_s - iV_s = \sum_{k=0}^{N-1} (D'_k - iE'_k) e^{-i\frac{2\pi}{N}sk} \quad s=0, 1, \dots, N-1$$

を行なうことにより  $\frac{b\sigma s}{2\pi}$  Hz における  $U(\omega), V(\omega)$  の値  $U_s$  と  $V_s$  を同時に  $N$  点ずつ求める方法を開発した. パルスFT法において自由誘導減衰を  $N$  点サンプルングした場合には  $U(\omega)$  と  $V(\omega)$  は  $\frac{N}{2}$  点ずつしか求められないが, 相関NMRで高速掃引応答を  $N$  点サンプルングしたときは  $U(\omega)$  と  $V(\omega)$  は  $N$  点ずつ求められる. スペクトルの位相補正は得られた  $U_s$  と

おさか ひろし あらた ようじ 小じわら しずお

$V_s$  を用いて  $U_s \cos \theta + V_s \sin \theta$  により容易に行なえる。なお  $b=0$  の場合にはここに示した方法で求めた  $U_s$  は  $G_s$  に一致することが確かめられる。また式(1)の代りに

$$D'_0 - iE'_0 = (D_0 + D_N) - i(E_0 + E_N) \quad (2a)$$

$$D'_k - iE'_k = 2(D_k - iE_k) \quad k=1, 2, \dots, \frac{N}{2}-1 \quad (2b)$$

で定義される  $h'_k = D'_k - iE'_k$  ( $k=0, 1, \dots, \frac{N}{2}-1$ ) に対して  $\frac{N}{2}$  点のフーリエ変換を行なえば  $U_s$  と  $V_s$  を  $\frac{N}{2}$  点ずつ求めることができ、その場合の  $U_s, V_s$  ( $s=0, 1, \dots, \frac{N}{2}-1$ ) はそれぞれ式(1)を用いて求めた  $U_s, V_s$  ( $s=0, 2, \dots, N-2$ ) に等しい。

## II. 相関NMRのデータ処理

相関NMRのデータ処理の流れを図1に示す。測定は周波数掃引回路、可変周波数増幅器、およびフィルタ部分を改造したNMR測定装置 JEOL PS-100で行ない、高速掃引応答をA/D変換して小型計算機 TI 980Bでサンプリングする。その際パルスプログラマから出るトリガパルスを用いて掃引とサンプリングの同期をとる。A/D変換器は12ビット、小型計算機のメモリは16ビットであり、16回以上積算したデータはfoldingされて(例えば16383+nは-16385+nとして)メモリに蓄えられているため、サンプリング結果はunfoldingしながら浮動小数点形式に変換し、以降の処理は浮動小数点形式で行なう。

相関NMRの測定は高いRFレベルで行なうため、装置上の問題から高速掃引応答のベースラインにうねりが生じることがある。その場合は試料を測定したときと同じ条件で、ただ磁場のオフセットのみを変化させてベースラインのデータもサンプリングし、unfolding およびスムージングを行なった後、高速掃引応答から差し引く。

N点のデータのフーリエ変換においては、そのデータにはN点の周期性があり、N点目の次には次の周期の1点目が続くものとみなされる。この影響で溶媒の大きなシグナルの肩にある小さなシグナルを観測するときなど高速掃引応答の1点目とN点目の値に大きな差があるときは、相関NMRの処理で求められるスペクトルのベースラインに振動があらわれる。これを避ける一つの方法は高速掃引応答から両端の値がほぼ等しくなる部分を取り出して(trimming)、その部分だけを処理することである。この方法を用いるのが困難な場合は、高速掃引応答の左右にそれぞれ1点目、N点目の値をもつ  $\frac{N}{2}$  点おりの直線形のwing、またはこのwingの両端に近い  $\frac{N}{8}$  点の部分正弦曲線で

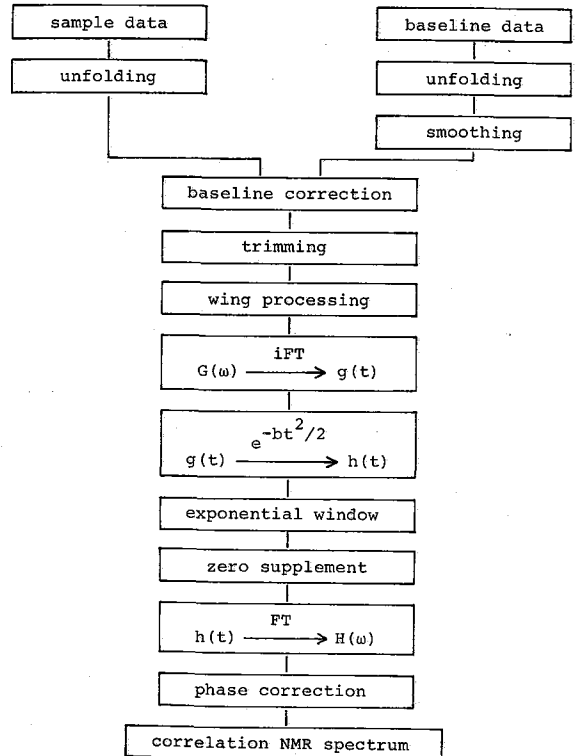


図1. 相関NMRのデータ処理

置き換え, 1点目と2N点目の値が等しくなるようにした wing を付け, この2N点のデータに対して相関NMRの処理を行ない, 得られた最終データの中央の部分から相関NMRスペクトルを求める (wing processing).<sup>4</sup>

相関NMRにおいては掃引とともに順次共鳴条件が満たされるためスペクトルの一部分のみを励起することができ, サンプリング点の数はサンプリング定理を満たす範囲で非常に少なくできる. 少数のサンプリング点を用いて求めたスペクトルは滑らかでないことがあるが, その場合も自由誘導減衰のうしろに値0をもつ点を補うこと (zero supplement) により容易にスペクトルのスムージングが行なえる.<sup>4</sup> すなわち m 倍の zero supplement を行なうには式 (1a)-(1d) において式 (1d) を

$$D'_k - iE'_k = 0 \quad k = \frac{N}{2} + 1, \frac{N}{2} + 2, \dots, mN - 1 \quad (1d')$$

で置き換え,  $h'_k = D'_k - iE'_k$  ( $k = 0, 1, \dots, mN - 1$ ) に対して  $mN$  点のフーリエ変換を行えばよい. 得られた  $H_s = U_s - iV_s$  ( $s = 0, 1, \dots, mN - 1$ ) は  $\frac{b\omega_s}{2\pi m}$  Hz におけるスペクトルであり,  $H_s$  ( $s = 0, m, 2m, \dots, (N-1)m$ ) は zero supplement を行なわないうちの  $H_s$  ( $s = 0, 1, 2, \dots, N-1$ ) と同じ値である. なおスペクトルの両端付近の値に大きな差があるときは, zero supplement により付け加えられた値  $H_s$  ( $s = 0, m, 2m, \dots, (N-1)m$ ) の両端に近い部分に対しては本来の内挿値からのずれが大きくなるため, このようなときはあらかじめ高速掃引応答に対して wing processing を行なっておくことよい.

図2にリゾチームの相関NMRスペクトルを求めるに際し zero supplement を行なった例を示す. 図2Aは  $D_2O$  中の卵白リゾチーム (30 mg / 0.3 ml  $D_2O$  (99.8%), pH=1.73, 35°C) の芳香環領域の, 掃引速度 530.0 Hz, サンプリング時間間隔 0.475 msec, サンプリング点の数 2048, 積算 256 回の条件での高速掃引応答であり, 図2Bは位相補正 180° を加えて求めた相関NMRスペクトル, 図2CはそのヒスチジンC-2プロトン部分である. また図2D, 2Eはそれぞれ図2Aのデータから8点ごとに1点ずつ取り出した256点の高速掃引応答から式(2)または(1)を用いて求めた128点, 256点のスペクトルの一部, 図2Fは同じ256点の高速掃引応答を処理する際に4倍の zero supplement を行なった1024点のスペクトルの一部である. 図2Fは高周波のノイズ以外は図2Cとよく一致しており, この測定条件ではサンプリング点は256点で十分だったことを示している. また図2D-2Fを比較すれば, このようにサンプリング点を少なくしたときはスペクトルのピーク位置を決めるにあたり, zero supplement が重要であることが理解される.

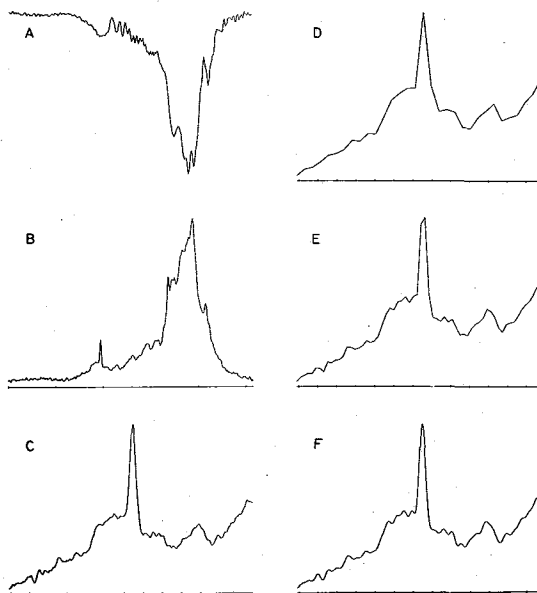


図2. リゾチームの相関NMRスペクトル

### Ⅲ. データ処理のシステム化

相関NMRのシステム構成図を図3に示す。我々は図1に示したすべての処理をNMR測定装置に接続した小型計算機でオンラインで行なえるよう、TI 980B用の相関NMRプログラムを開発した。高速掃引応答、ベースライン、自由誘導減衰、相関NMRスペクトルなどのデータはすべて小型計算機のモニター・ディスプレイ上で観測でき、ベースラインのスムージングの点の数、trimmingの位置、exponential windowの形、zero supplementの倍数などはディスプレイを見ながら会話形式で変化させることができる。小型計算機にはディスプレイの近くにあるつまみの回転角をA/D変換器を通して読み取る機能があり、ディスプレイ上のデータの上下左右方向の移動および拡大、スペクトルの位相補正などはこのつまみにより行なうことができる。またこのつまみでディスプレイ上のスポットを移動させてスペクトル線にあわせ、その位置を表示管上に数値で示すこともでき、化学シフトの読み取りが容易に行なえる。高速掃引応答、相関NMRスペクトルなどのデータはレコーダを用いて記録し、後に再び使用したい高速掃引応答はカセットテープに出力して保存する。また東大大型計算機センターのHITACシステムによるデータ処理に関しては、小型計算機のタイプ

ライタを音響カップラと電話を通して大型計算機のTSS端末として使用することにより、カセットテープを介して自動的にデータの転送ができるようにし、大型計算機がもつ大容量ファイル、グラフィックス、マイクロフィルム出力などの機能を容易に使用できるようにした。

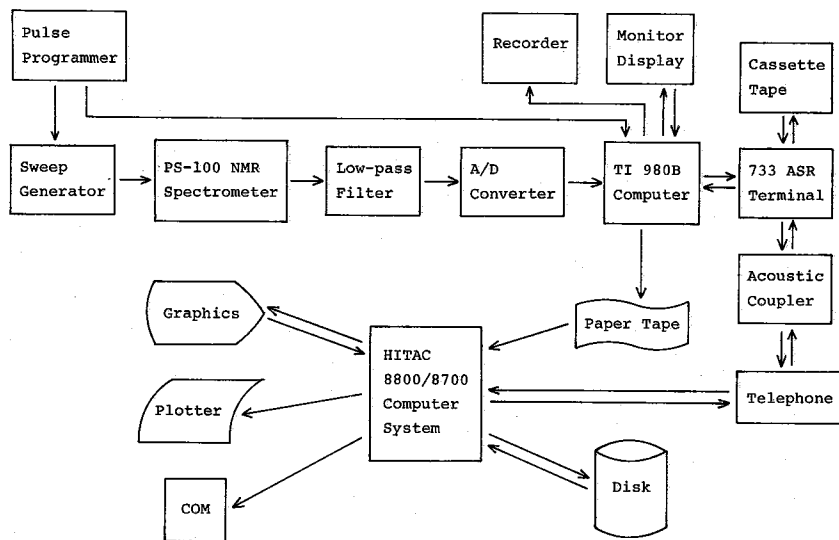


図3. 相関NMRのシステム構成

本稿では主に相関NMRのアルゴリズム、unfolding、wing processing、zero supplementなどのデータ処理の方法、およびそれをNMR測定装置に接続した小型計算機でオンライン形式で行った一例を示した。我々はこのようなシステムの完成により相関NMR分光法というすぐれたNMR測定法がさらに発展したものと考える。

1. J. Dadok and R.F. Sprecher, *J. Magn. Resonance* **13**, 243 (1974).
2. R.K. Gupta, J.A. Ferretti, and E.D. Becker, *J. Magn. Resonance* **13**, 275 (1974).
3. Y. Arata and H. Ozawa, *Chem. Lett.* **1974**, 1257; H. Ozawa and Y. Arata, *Chem. Lett.* **1975**, 239; Y. Arata and H. Ozawa, *J. Magn. Resonance* **21**, 67 (1976); Y. Arata, *J. Magn. Resonance* **22**, 327 (1976).
4. H. Ozawa and Y. Arata, *Bull. Chem. Soc. Japan* **49**, 1542 (1976).

パルスFT法による $T_{1\rho}$ 測定

103

(日本電子) 大内宗城 藤戸輝昭 今成 司  
国領憲治 荒川光明

〔序〕

最近、 $T_1$ を測定することによって、速度が共鳴周波数 $\omega_0$  ( $10 \sim 100$  MHz) の分子運動の研究が広く行なわれるようになってきた。一方、低周波の分子運動についての研究には、 $T_2$ 法や $T_{1\rho}$ 法<sup>1)</sup>が用いられる。我々は前回、高分解能FT-NMRによる $T_{1\rho}$ の測定をこころみ、問題点を指摘した。今回はさらに詳細に測定した結果にもとづき、実験誤差となる要因について考察を行った。また典型的なサンプル例として、①ケミカルシフトの異なる2つのサイト間で、化学交換を行っているニステカリンを、② $Q$ とのカップリングが四重極モーメントの影響をうけている、ブチルクロライドをとりあげ、いずれも $T_{1\rho}$ を測定し、解析を行った。

〔実験〕

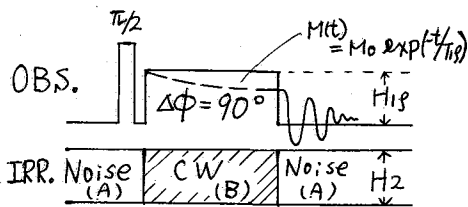


図1. スピンエコー法

装置は JEOL FX-100 FT-NMR にスピノロツキングユニットをつけて用いた。また、Quadrature Detection (Q.D.)法を使用して、オフレジナンス効果を少くした。 $^{13}C$ の $T_{1\rho}$ 測定には図1のようなパルス系列を使用した。 $^1H$ 観測の場合は OBS. 部のみである。 $^{13}C$ 観測の時スピノロツキングしている間は、CW モードでプロトデカップルを行う。これはノイズデカップルすると、 $^1H$ とのカップリングによって $^{13}C$ が

感じる磁場がランダムな変動をうけ、 $T_{1\rho}$ が短くなるのを防ぐためである。パルスパワーは、 $\frac{1}{2}$ パルスが  $12 \sim 17$  mW ( $^1H, ^{13}C$ とも) であり、ロツキングパワー  $H_{1\rho}$  はプロトでは、 $4.2 \sim 4.0$  G,  $^{13}C$ では  $0.5 \sim 8.0$  G で、発熱によるチューニングのずれを防ぐため、 $H_{1\rho}$  の最大値は $\frac{1}{2}$ パルスの半分以下に制限した。

〔実験誤差となる要因〕

上記のような条件で測定を行い、測定時の誤差の要因について種々なチェックを行った。

1) サンプルング

同じサンプルでもサンプルングの仕方が違っていると $T_{1\rho}$ 値が異なることがある。表1のように1%エチルベンゼンの $^1H-T_{1\rho}$ 値は、non-degas の場合、空気中の $O_2$  gas がとけこみ、短くなっている。これから分かるように $T_{1\rho}$ 値が数秒以上のものは degas する必要がある。またサンプルは、 $H_{1\rho}$  の不均一をのぞくため、球形のものを用いた。

|           | ベンゼン     | CH <sub>2</sub> | CH <sub>3</sub> |
|-----------|----------|-----------------|-----------------|
| degas     | 26.0 sec | 14.0            | 13.0            |
| non-degas | 5.1      | 5.9             | 4.8             |

表1.  $O_2$  gas の $T_{1\rho}$ への影響

おおうちむねき ふじとてるあき いまなりまもる  
こくりよけんじ あらかわみつあき

## 2) ロッキングパワー $H_{lp}$ の影響

| $H_{lp}$ | $CH_2$   | $CH_3$ |
|----------|----------|--------|
| 4 gauss  | 13.8 sec | 12.9   |
| 3        | 15.0     | 13.3   |
| 2        | 13.6     | 12.5   |
| 1        | 13.8     | 13.2   |
| 0.5      | 14.1     | 13.6   |

表2.  $H_{lp}$  の  $T_{lp}$  への影響

$H_{lp}$  依存性のない  $T_{lp}$  値をもつサンプルで、 $H_{lp}$  の大きさを変えて、その影響を調べた。これは、 $H_{lp}$  を増した時に、 $H_{lp}$  の不均一さや NMR ロックの不安定さによつて  $T_{lp}$  値が短くならないかどうかをチェックするためである。0.1% エタールベンゼンを使用しプロトンで測定したところ、表2に示すように、 $H_{lp}$  が 0.5G から 4.0G の間で、 $T_{lp}$  の値は変化なく、バラツキは ±4% 以内であった。 $^{13}C$  の場合も同様な結果を得ている。

## 3) オフレゾナンスの効果

高分解能 FT-NMR では測定条件がほとんどオフレゾナンスになっているため、オフレゾナンスの効果について検討を行った。表3は  $CH_3COOH + H_2O$  (Solvent  $(CD_3)_2CO$ ) の

| オフレゾナンス              | $CH_3$  | $OH$ |
|----------------------|---------|------|
| $\theta = 90^\circ$  | 4.1 sec | 0.14 |
| $\theta = 114^\circ$ | 2.9     | 0.14 |
| $\theta = 39^\circ$  | 9.6     | 0.16 |

表3. オフレゾナンスの影響  
( $H_{lp} = 0.2G$ )

$^1H$  の  $T_{lp}$  値についての結果である。オフレゾナンスの大きさ及び方向により、 $T_{lp}$  の値が異なる。即ち、オフレゾナンスが  $90^\circ$  より小さい時は  $T_{lp}$  は長くなり、 $90^\circ$  よりも大きくなると  $T_{lp}$  値は短くなる。(  $90^\circ$  よりも大きい場合についてはまだ報告されていない。 )  $^{13}C$  についても、これと同様な結果が得られた。n-ブチルクロライドのデータを図2に示す。この現象は次のように解釈される。

a. オフレゾナンス時の磁化は、半経験的に次式によつて与えられる。

$$M_y(t) = M_0 e^{-t/T_p} + M_0 \cdot B \cdot \frac{\Delta}{\omega_1} + M_0 \cdot e^{-t/T_p} \cdot f(\sin\theta)$$

ここで  $\Delta = \omega_0 - \omega_{obs}$ ,  $\theta = \tan^{-1}(\frac{\omega_1}{\Delta})$  で、 $\theta$  は図3のように  $H_0$  と  $H_{eff}$  のなす角度で  $\theta = 90^\circ$  の時が just resonance である。右辺第2

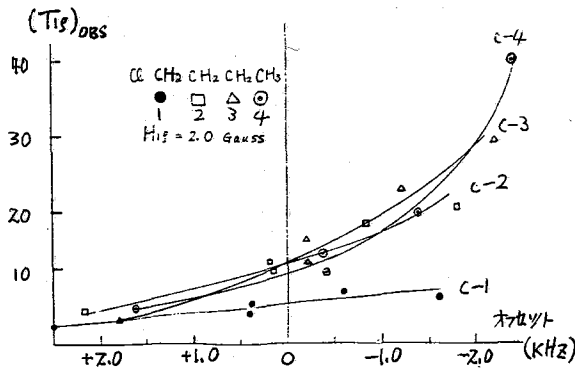


図2. n-ブチルクロライドの  $T_{lp}$  のオフレゾナンス効果

項及び第3項が off-resonance の項で、

$\theta < 90^\circ$  の時は  $\Delta > 0$  で  $(T_{lp})_{obs}$  は長くなり、

$\theta > 90^\circ$  の時は  $\Delta < 0$  で  $(T_{lp})_{obs}$  は短くなる。

b. また off resonance が大きくなると、スペクトルの強度がある周期で振動する。これは右辺第3項による振動である。

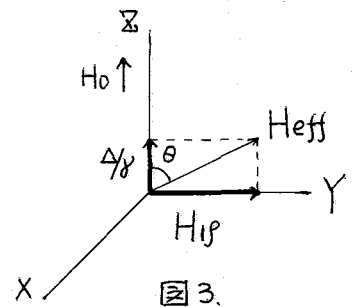


図3.

C. 以上の a. b. から分るように、正しい  $T_{1\rho}$  値は、just resonance 付近での測定から得られるものである。しかしオフレゾナンスが  $105^\circ \geq \theta \geq 75^\circ$  の範囲内であれば、 $T_{1\rho}$  の誤差は  $\pm 6\%$  以内におさえられる。Q.D. 法を使用した場合には、上記の条件を満たす  $H_{1\rho}$  の大きさは次のようになる。  $^1\text{H}$  では  $|\text{kHz}|$  観測中の時、 $H_{1\rho} = 0.47 \text{ G}$  ( $\tau_{1/2} = 128 \text{ MS}$ )

$^{13}\text{C}$  では  $H_{1\rho} = 1.87 \text{ G}$  ( $\tau_{1/2} = 128 \text{ MS}$ )

4) Cross Relaxation の影響<sup>3)</sup>

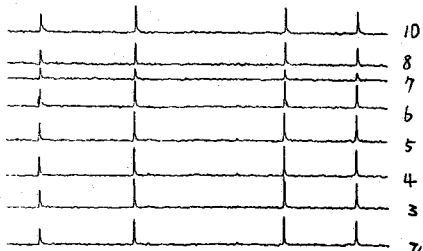


図4. Cross relaxation の影響

$^{13}\text{C}$  観測時、スピノロツキングパワー  $H_{1\rho} \approx 7 \text{ G}$  付近の時、ロツキングシグナルが急激に小さくなる。(図4) これは  $^1\text{H}$  ERR. Power (Hz) が約  $7 \text{ kHz}$  ( $\sim 1.7 \text{ G}$ ,  $\tau_{1/2} \approx 34 \text{ MS}$ ) でスピノロツキング時に、ハルトマンハイーン条件  $\gamma_{\text{C}} H_{1\rho} = \gamma_{\text{H}} H_z$  を満たし、 $^{13}\text{C}$  スピノ系と  $^1\text{H}$  スピノ系とがエネルギーの交換をおこし、 $^{13}\text{C}$  の decay がはやくなるためと考えられる。このため、ロツキングパワー  $H_{1\rho}$  は  $7 \text{ G}$  以下で使用した。

上記の諸点を注意して測定すれば、 $T_{1\rho}$  は  $\pm 5\%$  以内の精度で求まることになった。以下に測定の実例を示す。

[ニスデカリン]

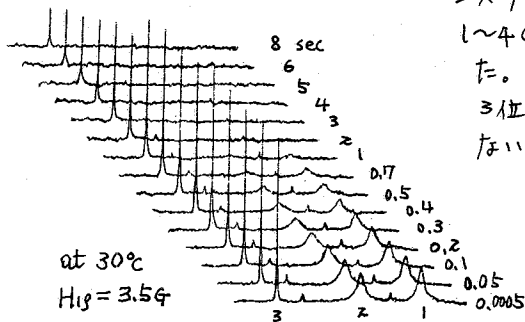


図5. ニスデカリンの  $T_{1\rho}$  スペクトル

ニスデカリンについて、ロツキングパワーを  $H_{1\rho} = 1 \sim 4 \text{ G}$  まで変化させ、 $^{13}\text{C}$  の  $T_{1\rho}$  の  $H_{1\rho}$  依存性を調べた。 $30^\circ\text{C}$  におけるスペクトルの例を図5に示す。

3位の炭素の  $T_{1\rho}$  値は長く、power 依存性はみられないが、1及び2位の炭素の  $T_{1\rho}$  値は短く、また、

$T_{1\rho} \propto H_{1\rho}^2$  なる関係が得られた。(図6)

ニスデカリンのようにケミカルシフトの異なる2つのサイト間で化学交換を行っている系に対しては次式が成り立つ。<sup>4)</sup>

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = \frac{1}{(T_{1\rho})_{\text{obs}}} - \frac{1}{T_1} = \frac{(\delta\omega)^2 \tau}{4(1 + \omega_1^2 \tau^2)}$$

ここで、 $\omega_1 = \delta H_{1\rho}$ ,  $\delta\omega$  は2つのサイトのケミカルシフト差、 $\tau$  が交換速度を表わす。このサンプソンの  $T_1$  の値、 $T_1^{(1)} = 4.1 \text{ sec}$ ,  $T_1^{(2)} = 4.6 \text{ sec}$  を代入して計算すると、 $\tau$  及び  $\delta\omega$  が求まる。

$$\left( \begin{array}{l} \tau_1 = 1.8 \times 10^{-4} \text{ sec} \\ \delta\omega_1 = 144 \text{ Hz} \end{array} \right) \quad \left( \begin{array}{l} \tau_2 = 1.8 \times 10^{-4} \text{ sec} \\ \delta\omega_2 = 150 \text{ Hz} \end{array} \right)$$

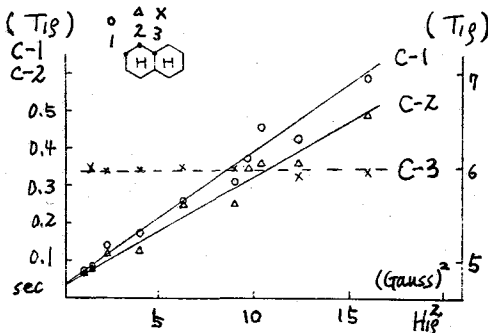


図6.  $T_{1\rho}$  値の power 依存性.



一方、低温 ( $-40^{\circ}\text{C}$ ) でのスペクトルから得られた  $\delta\omega$  の実測値は、次のとおりである。

$\delta\omega_1 = 155.3 \text{ Hz}$ ,  $\delta\omega_2 = 173.8 \text{ Hz}$   $T_{1\rho}$  測定から得られた 2 つのサイト間のケミカルシフト差  $\delta\omega$  の値は、実測値と 10% くらいの誤差でよい一致を示しており、この方法が有効なことが分かる。なお  $T_2$  と  $T_{1\rho}$  とは  $T_2 = T_{1\rho} (H_{1\rho} \rightarrow 0)$  の関係にある。

〔ブチルクロライド〕

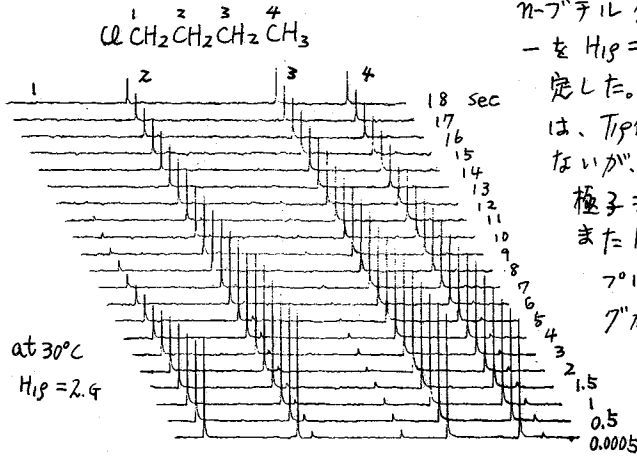


図7. ブチルクロライドの  $T_{1\rho}$  スペクトル ( $^{\circ}\text{C}$ )

| $H_{1\rho}$ (Gauss) | 0.5 | 1.2 | 1.5 | 2   | 2.5 | 4   |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| $T_{1\rho}$ (sec)   | 3.8 | 3.8 | 4.0 | 4.6 | 5.1 | 5.3 |

表4. C-1 の  $T_{1\rho}$  の  $H_{1\rho}$  依存性

が得られた。これは Winter<sup>6)</sup> らが  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

の  $T_2$  測定から求めた値  $T_{1\rho}^{\text{cl}} = 34 \mu\text{s}$ ,  $A_{\text{C-cl}} = 23 \text{ Hz}$  と少し異なる。

この違いについては現在さらに詳しい測定と解析とを行っている。

### 参考文献

1. R. Freeman and H.D.W. Hill; J. Chem. Phys. 55 1985 (1971)
2. T.K. Leipest et al. ; J. Mag. Res. 19 208 (1975)
3. R. Freeman and H.D.W. Hill; J. Chem. Phys. 58 3107 (1973)
4. C. Deverell et al. ; Mol. Phys. 18 553 (1970)
5. R.E. Morgan and J.H. Strange; Mol. Phys. 17 397 (1969)
6. J. Winter ; C.R. Acad. Sci. Paris ; 249 1346 (1959)

n-ブチルクロライドについては、ロッキングパワーを  $H_{1\rho} = 0.5 \text{ G} \sim 4 \text{ G}$  まで変化させて  $^{\circ}\text{C}$  の  $T_{1\rho}$  を測定した。その一例を図7に示す。2, 3, 4位の<sup>13</sup>Cは、 $T_{1\rho}$  値が長く、 $H_{1\rho}$  を変化させても、変化しないが、Cl に隣接している 1位の<sup>13</sup>CはClの四重極子モーメントの影響で、 $T_{1\rho}$  値が短くなり、また  $H_{1\rho}$  依存性も見られる。(表4) このサンプリングのように<sup>13</sup>CとClとのスカラーカップリングがClの短い  $T_{1\rho}^{\text{cl}}$  によって揺動をうけているような系の場合には、 $T_{1\rho}$  は次式で表わされる。<sup>5)</sup> (2種のスカラーカップリング)

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = \frac{1}{(T_{1\rho})_{\text{obs}}} - \frac{1}{T_1} = A^2 \frac{S(S+1)}{3} \frac{T_1^S}{1 + \omega^2(T_1^S)^2}$$

ここで  $T_1^S$  はClの  $T_1$ ,  $A$  は<sup>13</sup>CとCl間のスカラーカップリングコンスタント,  $S = 3/2$  (<sup>35</sup>Cl) である。上式に  $T_1(^{13}\text{C})$  の値 ( $\sim 15 \text{ sec}$ ) 及び  $T_{1\rho}$  の実測値を代入して

$$\begin{cases} T_{1\rho}^{\text{cl}} = 50 \text{ msec} \\ A_{\text{C-cl}} = 9 \text{ Hz} \end{cases}$$

著者は、1967年の論文<sup>1)</sup>で、電子を媒介とした核スピン間の相互作用 (I-I-Coupling) の結合定数の計算に於ては、電子相関が非常に重要な役割を持つことを指摘した。2重摂動法を使うと、分子内の2つの原子核  $N$  と  $N'$  の間の相互作用エネルギー  $E_{NN'}$  は次の式であたえられる。

$$E_{NN'} = E_{NN'}(0) + E_{NN'}(G) + E_{NN'}(I) \quad (1)$$

$$\text{但し、} \quad E_{NN'}(0) = -2 \sum_{m \neq 0} \langle 0 | Q_N | m \rangle \langle m | Q_{N'} | 0 \rangle / (E_m - E_0) \quad (2)$$

$$E_{NN'}(G) = 2 \sum_{m, l \neq 0} \frac{\langle 0 | Q_N | m \rangle \langle m | Q_{N'} | 0 \rangle + \langle 0 | Q_N | m \rangle \langle m | Q_N | l \rangle \langle l | \chi_1 | 0 \rangle}{(E_m - E_0)(E_l - E_0)} \quad (3)$$

$$\text{および} \quad E_{NN'}(I) = \sum_{m, l \neq 0} \frac{\langle 0 | Q_N | m \rangle \langle m | \{ \chi_1 - \langle 0 | \chi_1 | 0 \rangle \} | l \rangle \langle l | Q_{N'} | 0 \rangle}{(E_m - E_0)(E_l - E_0)} \quad (4)$$

(2)~(4) における  $Q_N(N')$  は核スピン  $I_N(N')$  と分子内の全電子との相互作用 (例えば、 $N$  がプロトンならば

$$Q_N = \sum_{\nu}^{2m} (16\pi\beta h/3) \gamma_p \delta(r_{\nu N}) S_{\nu} \cdot I_N \quad \text{である。}$$

$\chi_1$  は、全電子に対する静電的ハミルトニアン,  $\chi$ , と各電子に対する Hartree-Fock (H-F) 演算子  $F_0(\nu)$  の総和  $\chi_0$  ( $= \sum_{\nu}^{2m} F_0(\nu)$ ) との差、即ち

$$\chi_1 = \chi - \chi_0 \quad (5)$$

である。(1)~(4) の2重摂動展開は、 $\chi_0$  の固有関数を基底としているから、 $E_{NN'}(G)$  および  $E_{NN'}(I)$  は、夫々、分子の基底状態、及び、中間励起状態における C. I. (電子配置間相互作用) の  $E_{NN'}$  に対する影響をあらわしている。著者は、 $N$  と  $N'$  が結合していない時 (Long Range Coupling) には、~~直接~~

$$|E_{NN'}(G) + E_{NN'}(I)| \gg |E_{NN'}(0)| \quad (6)$$

であることを示し、(6) 式は、他の研究者によつて、 $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{OH}_2$  分子に対して数値的に確かめられている<sup>2)</sup>

さて、従来の H-F 演算子  $F_0(\nu)$  は次の式であたえられる。

$$F_0(\nu) = h(\nu) + \sum_j^m \{ 2J_j(\nu) - K_j(\nu) \} \quad (7)$$

ひるいわえいに

(7)式の  $J_j, K_j$  はいわゆるクーロン及び交換積分演算子であり、 $h(\nu)$  は、 $\nu$ 番目の電子の運動エネルギーと、この電子に対する分子内の全原子核からのポテンシャルエネルギーをあらわす演算子である。H-Fの方程式

$$F_0(\nu)\psi(\nu) = \epsilon\psi(\nu) \quad (8)$$

によつて決まる1電子軌道を  $\psi_i (i=1, 2, \dots, m, m+1, \dots, \infty)$  としよ。  $\psi_i$  が Occupied MO である場合 ( $i \leq m$ ) には (7) 式の右辺の  $i$  番目の項は、 $J_i$  と  $K_i$  が消しあう。従つて、問題の電子、 $\nu$ , に対しては、 $\psi_i$  以外の Occupied MO に入つてゐる  $2(m-1)$  コの電子と  $\psi_i$  自身に入つてゐるもう1つの電子と、合計  $2m-1$  コの電子からのポテンシャルが作用してゐる。ところが、 $\psi_i$  が Virtual MO の場合 ( $i > m$ ) には、問題の電子、 $\nu$ , には、すべての Occupied MO に入つてゐる  $2m$  コの電子からのポテンシャルが作用することになる。このようなポテンシャルによつて決められた Virtual MO は、中性分子の1電子励起状態よりはむしろ、1価のマイナスイオン分子 (外から新たに電子が1コ加つた) の状態を記述するのに適してゐる。困つたことに、結合定数の計算において本質的な役割を演じるのは、マイナスイオン分子ではなくて、中性分子の1電子励起状態である。つまり、(8)の解として決められた Virtual MO は、結合定数の計算には、はなはだ不適當である。この点を補正するために、従来の計算では、 $E_{mn}(I)$  の中に少量の1電子励起 C.I. を考慮に入れたのである (これを Orbital Polarization Effect とする)。

最近藤永等<sup>3)</sup>によつて、1電子励起状態の記述に適した Virtual MO を作る方法が工夫された。即ち、次の様な新しい H-F 演算子  $F_{mod}$  を導入する。

$$F_{mod}(\nu) = F_0(\nu) - (1-P)J_j^0(\nu)(1-P) \quad (9)$$

但し、

$$P = \sum_{occ.}^m |\psi_i\rangle \langle \psi_i|$$

$$J_j^0(\nu) = \int \psi_j^{0*}(\omega) \psi_j^0(\omega) (1/r_{\nu\omega}) d\tau_\omega \quad \left. \vphantom{J_j^0(\nu)} \right\} \text{である。}$$

射影演算子  $P$  の作用により、 $F_{mod}$  を使つた H-F の方程式

$$F_{mod}\psi = \epsilon\psi \quad (10)$$

は (8) と全く同じ Occupied MO をあたえるが、 $\psi_i$  が Virtual MO である場合には、( $i > m$ )  $\psi_i$  は、 $\psi_j^0$  に電子孔を持つ  $2m-1$  コの電子からのポテンシャルによつて決定される。結合定数を計算するに当つては、(8) の Virtual MO よりも、(10) の Virtual MO の方が有利なのは明らかである。(1)~(4) を (10) の軌道を使つて計算出来る様にあるには、ちよつとした工夫が必要であるが、その具体的な方法をのべることは、ここでは省略して、以下に、(8) のかわりに (10) を使うことによつて生じる式の上での変化の物理的意味を説明する。

$F_0$  のかわりに  $F_{mod}$  を使つると、 $E_{mn}(I)$  の中から、1電子励起 C.I. が完全に消える。

即ち、式の上では、次の式が恒等的に成立することが証明出来る。<sup>4)</sup>

$$\langle \psi_j^0 \rightarrow \psi_\nu; \sum_i \lambda_i | \psi_j^0 \rightarrow \psi_u; \sum_i \rangle = 0 \quad (\sum = 1, 2 \text{ or } 3) \quad (11)$$

但し、(11)式の $\lambda_i$ は、(5)式で定義された $\lambda_i$ ではなくて、新しく定義された非擾動ハミルトニアン $H_0$  (適当にえらんだ電子孔を持つ $F_{\text{mod}}(2)$ の総和)を $\lambda_i$ から差し引いたものである。 $\lambda_i$ の具体的な定義は、ref. 4)を参照されたい。たゞ、ここでは、(10)式によつて作られるVirtual MOは、(9)式の右辺の第2項のとり方 (つまり電子孔をどのOccupied MOの上に作るか)によつて異なり、(11)式を満足するのは、 $\psi_j^0$ に電子孔を持つ様な $F_{\text{mod}}$ によつて作られたVirtual MOだけである。(  $|\psi_j^0 \rightarrow \psi_\nu; \sum_i \rangle$  は、 $\psi_j^0$ の電子が $\psi_\nu$ に励起することによつて出来る3重項状態の1つである。) ことを注意しておく。

(11)式は、 $\psi_\nu, \psi_u$ においてはすでにOrbital Polarizationが含まれており、Occupied MOを固定する限り、 $\psi_\nu, \psi_u$ は  $|\psi_j^0 \rightarrow \psi_\nu; \sum_i \rangle, |\psi_j^0 \rightarrow \psi_u; \sum_i \rangle$  に対して最適な1電子軌道であることを示している。 $F_{\text{mod}}$ の使用は、 $E_{NN'}(0)$ における大巾な補正と、 $E_{NN'}(1)$ の大巾な減少をひきおこす。つまり、 $E_{NN'}(1)$ の主な部分が、 $E_{NN'}(0)$ に吸収されるわけである。但し、 $F_{\text{mod}}$ を使つて計算した $E_{NN'}(0)$ は、 $F_0$ を使つて計算した時の $\lambda_i$ によつて2次の補正項を含んでいるから、 $E_{NN'}(1)$ のへり高が、そのまゝ $E_{NN'}(0)$ のよえ高になるわけではない。

$E_{NN'}(1)$ の中から1電子励起C.I.の影響が消失するため、次の結果がえられる。

$$|E_{NN'}(G)| \gg |E_{NN'}(1)| \quad (12)$$

(12)式は、 $E_{NN'}(G)$ の中には普通の交換積分 ( $\psi_j^0 \psi_u | \psi_j^0 \psi_u$ ) が含まれているのに反し、 $E_{NN'}(1)$ の中には ( $\psi_j^0 \psi_u | \psi_u \psi_\nu$ );  $j \neq k, u \neq \nu$  という4つのMOがおべて異なるような分子積分しか含まれていないことから確かめられる。

$F_0$ を使つた計算では、 $E_{NN'}(1)$ は中間励起状態におけるOrbital Polarization Effectと電子相関の影響の両方を食んでいたが、 $F_{\text{mod}}$ を使つた計算では、 $E_{NN'}(1)$ は純粋に中間励起状態における電子相関の影響をあらわしている。従つて(12)式は、基底状態における電子相関の方が中間状態における電子相関よりもずっと重要であることを示している。近似的な計算では、 $E_{NN'}(1)$ は $E_{NN'}(G)$ に比べて無視出来るであろう。

化学結合で直接むすばれている原子核間のCouplingに於ては、 $E_{NN'}(G)$ は $E_{NN'}(0)$ に對する小さな(無視出来る程小さくはないが)補正項である。従つて、この時には、 $F_{\text{mod}}$ さえ使えば、C.I.を完全に無視しても、半定量的に満足しいく計算値を期待することが出来る。このことは、BinnstockとKlöpfferによつて、 $\text{CH}_4$ 分子等の $^{13}\text{C}-\text{H}$  Couplingの計算によつて数値的にたしかめられている。<sup>5)</sup>

Long Range Couplingの計算に於ては、 $E_{NN'}(G)$ は $E_{NN'}(0)$ に比べて決して小さくはない(むしろ大きい)ので、基底状態における電子相関を充分に考慮に入れなければならぬ。以下に、 $E_{NN'}(0)$ と $E_{NN'}(G)$ の相対的大きさの關係を、 $\text{CH}_4$ 分子の $\text{H}-\text{H}'$  Couplingを例にとつて考えてみる。<sup>4)</sup>  $F_{\text{mod}}$ を使うと結合定数 $J_{\text{HH}'}$ は、( $E_{\text{HH}'} = h J_{\text{HH}'} I_{\text{H}} \cdot I_{\text{H}'}$ )

$$J_{HH'} = \sum_{j=0}^3 [J_{HH'}^j(0) + J_{HH'}^j(G)] \quad (13) \quad \text{但し、}$$

$J_{HH'}^j(0)$ ,  $J_{HH'}^j(G)$  はそれぞれ、 $J_{HH'}(0)$ ,  $J_{HH'}(G)$  の中で  $\psi_j^0$  に電子孔を持つ励起状態が意味を持つ部分をあらわす。 $\psi_j^0$ ,  $\psi_j^r$  ( $j = 1, 2$  or  $3$ ) は群  $T_d$  の  $a_1$ ,  $t_2$  表現にぞくする Occupied MO である。(13)の右辺の各項は次の式であたえられる。

$$J_{HH'}^j(0) = -K_{HH'} \sum_{k=0}^3 \sum_{r=1}^{\infty} (\epsilon_k^r - \epsilon_j^0)^{-1} \psi_j^0(H) \psi_k^r(H) \psi_j^0(H') \psi_k^r(H') \quad (14)$$

$$J_{HH'}^j(G) \approx -K_{HH'} \sum_{k=0}^3 \sum_{r=1}^{\infty} (\epsilon_k^r - \epsilon_j^0)^{-2} \psi_j^0(H) \psi_k^r(H) \psi_j^0(H') \psi_k^r(H') (\psi_j^0 \psi_k^r | \psi_j^0 \psi_k^r) \quad (15)$$

$$(\text{但し、 } K_{HH'} \equiv (16\pi^2 \rho k / 3)^2 \delta_p^2 / h)$$

H と H' をそれぞれ  $x = y = z$  と  $x = -y = -z$  線上にのる様に座標をとると (C を原点にすえる)、 $\psi_j^r(H) = \pm \psi_j^r(H')$  (正は  $j = 0, 1$ , 負は  $j = 2, 3$  で成立) のので、

$$J_{HH'}^j(0) \text{ の } j \text{ 番目の項} = \mp K_{HH'} \{ \psi_j^0(H) \}^2 \left[ \frac{\{ \psi_0^r(H) \}^2}{\epsilon_0^r - \epsilon_j^0} + \frac{\{ \psi_1^r(H) \}^2}{\epsilon_1^r - \epsilon_j^0} - \frac{\{ \psi_2^r(H) \}^2}{\epsilon_2^r - \epsilon_j^0} - \frac{\{ \psi_3^r(H) \}^2}{\epsilon_3^r - \epsilon_j^0} \right] \quad (16)$$

$$J_{HH'}^j(G) \text{ の } j \text{ 番目の項} \approx \mp K_{HH'} \{ \psi_j^0(H) \}^2 \left[ \frac{\{ \psi_0^r(H) \}^2}{\epsilon_0^r - \epsilon_j^0} \Gamma(r; j, 0) + \frac{\{ \psi_1^r(H) \}^2}{\epsilon_1^r - \epsilon_j^0} \Gamma(r; j, 1) - \frac{\{ \psi_2^r(H) \}^2}{\epsilon_2^r - \epsilon_j^0} \Gamma(r; j, 2) - \frac{\{ \psi_3^r(H) \}^2}{\epsilon_3^r - \epsilon_j^0} \Gamma(r; j, 3) \right] \quad (17)$$

$$\text{但し、 } \Gamma(r; j, k) \equiv (\psi_j^0 \psi_k^r | \psi_j^0 \psi_k^r) / (\epsilon_k^r - \epsilon_j^0) \quad (18)$$

(16), (17) の負符号は  $j = 0, 1$ , 正符号は  $j = 2, 3$  の時成立つ。(16) と (17) の右辺は (17) の各項によけいな因子  $\Gamma$  がかかっている以外は全く同じである。 $\psi_j^r$  ( $j = 0, 1, 2, 3$ ) が近似的に縮退しており、これらの MO の H に於ける値がほぼ等しいならば、(16) の右辺の4項は互いに打消しあい、(16) の右辺はかなり小さくなる。(かも、(16) の右辺の符号は、 $j = 0, 1$  の場合と、 $j = 2, 3$  の場合とで必ず逆になるので、これらの  $j$  についての和をとると更に打消しあう。従つて、 $J_{HH'}(0)$  は非常に小さくなる。一か、(17) の右辺では、よけいな因子  $\Gamma$  の存在のために(16)の場合の様な打消しあいはおこらない。

(18) からわかるように、 $\Gamma(r; j, k)$  は  $j = k$  の時最大値をとる。そこで、 $j = k$  の項が他の項によつて打消されずにのこるものとすると、(17) の右辺は必ず負となる。従つて、 $J_{HH'}(G)$  も又、必ず負となる。これは、CH<sub>4</sub> における  $J_{HH'}$  の実験値の符号と一致している。(16) からわかるように、 $J_{HH'}(0)$  の大きさは、 $\epsilon_k^r$  ( $k = 0, 1, 2, 3$ ) の差に強く依存しているから、(10) 式は充分な精度の下で解かれなければならない。

Ref. 1) E. Hiroike; J. Phys. Soc. Japan 22 (1967) 379.  
 2) C. Barbier, B. Levy and P. Millie; Chem. Phys. Letters 17 (1972) 122.  
 M. Maestro, R. Moccia and M. Zandomeneghi; Chem. Phys. Letters 28 (1974) 373.  
 3) S. Huzinaga and C. Arnau; J. Chem. Phys. 54 (1971) 1948.  
 4) E. Hiroike; J. Phys. Soc. Japan 37 (1974) 856, 39 (1975) 753.  
 5) F. Birnstock and D. Klöpper; Chem. Phys. Letters. 20 (1973) 542.

[序] 液体状態のNMRスペクトラムより得られる核スピン間結合は、分子内電子を媒介として生ずる為分子の結合状態を反映する。プロトン間、プロトン-カーボン<sup>13</sup>間結合は、主に *contact term* に帰因することから、注目している核に局所的に導入されたスピン密度の他の核への伝播として考えることができる。その伝播機構を $\sigma$ 電子を媒介とする部分と $\pi$ 電子を媒介とする部分に分け、スピン結合定数の舞いをこれらの伝播機構で理解することは有益であると思われる[1]。 $\sigma$ 電子、 $\pi$ 電子による伝播機構に関して、次のような特徴が知られている[2]。

A)  $\sigma$ 電子によるスピン密度の伝播機構 この機構による伝播は、カップルしている核を隔てる *bond* 配列によって、大ざっぱにジグザグ配列をとらない場合とジグザグ配列の場合の2つに分けられる。前者ではスピン密度は符号交代しながら、その大きさはカップルしている核を隔てる *bond* 数の増大にともない急速に減少する。後者の配列の場合、スピン密度は符号において常に正で、隔てる *bond* 数の増大にともない大きさの減少は前者の場合に比較してゆっくりしており、6 *bond* を隔てるプロトン結合定数において +0.2~0.3 Hz 程度である。又隣接する hetero 原子の電気陰性度に依存性を示す。

B)  $\pi$ 電子によるスピン密度の伝播機構 この機構による伝播は、カップルしている核を隔てる *bond* を形成している原子の系に供与する $\pi$ 電子の数によって、2つに大別される。系に $\pi$ 電子を1ヶ子える原子を伝播する時、スピン密度は隔てる *bond* 数にともない、符号交代しながら( $\pi$ 電子の非局在性を反映して)その大きさをゆっくりと減少する。その程度はカップルしている核を隔てる *bond* の二重結合性に依存する。他方、系に $\pi$ 電子を2ヶ供与する原子を伝播する場合、スピン密度は急速にその大きさを減じ、符号交代はともなわないことが多い。伝播の程度に関して、その *bond* の二重結合性、非局在性との関連は明確ではない。又隣接する原子の電気陰性度、*bond* 配列にはほとんど依存しない。

スピン密度の *bond* を通じる伝播に関するこれらの特徴は、今回発表予定の *thienothiophene*, *thienopyrrole*, 4-quinolizone, 五員環の2-アルデヒド誘導体, 2-thial 誘導体の結合定数の計算結果と一致し、一般的な特徴であることが確かめられた。

[計算方法] スピン-スピン結合定数は、INDO近似に基づく *finite perturbation theory* (INDO-FPT) [3] によって計算された。FPTでは、 $\sigma$ 系から $\pi$ 系あるいは $\pi$ 系からの系へのスピン密度の伝播は、 $\sigma$ - $\pi$ 間の密度行列が対角性よりゼロであるから、 $\sigma$ - $\pi$ 交換相互作用より生じる。INDO近似の枠内では、一中心交換相互作用のみ考慮するので、フォック行列の対角要素の一中心 $\sigma$ - $\pi$ 交換相互作用の部分、 $-P_{\alpha\alpha}^{\sigma}(\mu\alpha|\mu\alpha)$ ,  $-P_{\alpha\alpha}^{\pi}(\mu\alpha|\mu\alpha)$  より生じる。 $\pi$ 系に肉して、

$$F_{\pi\pi}^{\alpha} = U_{\pi\pi} + \sum_{\sigma\sigma}^A [P_{\sigma\sigma}(\pi\sigma|\sigma\sigma) - P_{\sigma\sigma}^{\alpha}(\pi\sigma|\sigma\sigma)] + \sum_{B(A)} (P_{BB} - Z_B) \chi_{AB}. \quad (\pi, \sigma: \text{atom } A)$$

$$F_{\sigma\sigma}^{\alpha} = (2P_{\sigma\sigma} - P_{\sigma\sigma}^{\alpha})(\sigma\sigma|\sigma\sigma) - P_{\sigma\sigma}^{\alpha}(\pi\sigma|\sigma\sigma). \quad (\pi, \sigma: A)$$

みよし えいさく, よしだ がつひこ

$$F_{AB}^{\alpha} = \frac{1}{2}(\beta^{\alpha} + \beta^{\beta})S_{AB} - P_{AB}^{\alpha} \chi_{AB}(\pi: A, \sigma: B)$$

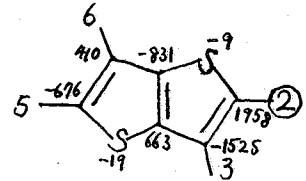
$$F = \begin{pmatrix} F^{\sigma} & 0 \\ 0 & F^{\pi} \end{pmatrix}$$

$\beta$ スピンのフォック行列 $F^{\beta}$ も同様の表現である。記号の意味は原報[3]と同じ意味である。 $\sigma$ 電子による機構 $J^{\sigma}$ は、 $\pi$ 電子のスピンドensityは生じない”すなわち $P_{AA}^{\alpha} = P_{AA}^{\beta} = \frac{1}{2}P_{AA}$ という要請のもとで解けばよい。この時 $\pi$ 系のスピンドensityは生じない。ここで、 $P_{AA}$ は、INDO近似によって求められた $\pi$ A.O.sの電荷密度である。 $\pi$ 電子による機構 $J^{\pi}$ は、 $\sigma$ - $\pi$ 結合の差として定義する;  
 $J^{\pi} = J^{\sigma} - J^{\sigma}$ 。この方法による $\sigma$ ,  $\pi$ 電子による伝播機構への分離は、McConnellによるものと一致する[4]。SCFのくりかえしは、 $1.7190 \times 10^{-3}$  eVの振動ポテンシャルのもとでスピンドensity行列の差が $1 \times 10^{-9}$ となるまで行なわれた。この収束条件による結合定数の計算誤差は、0.0016 Hzに相当する。

[結果と考察] (1) 五員環-五員環 *thieno*[3,2-*b*]thiophene, *thieno*[2,3-*b*]thiophene, *thieno*[3,2-*b*]pyrrole, *thieno*[2,3-*b*]pyrrole. *thieno*thiopheneの計算結果は、[2,3-*b*]の $J_{24}$ をのぞいて、実験とおおむね一致している。プロトン2の位置に振動ポテンシャルを加えた時の、この系の $\pi$ スピンドensityの伝播の様子を下図に示した。スピンドensityの大きさの減衰の様子と符号交代から、 $\pi$ 電子によるスピンドensityの伝播は炭素骨格(系に $\pi$ 電子を1ヶ供与する原子鎖)にもとづくことがわかる。 $\pi$ 電子による伝播機構は、カップルしている枝を隔てるbond配列がツグツグ型でないリング間結合([3,2-*b*]の ${}^3J_{26}$ , [2,3-*b*]の ${}^4J_{34}$ ,  ${}^5J_{24}$ )において支配的である。[2,3-*b*]の ${}^5J_{24}$ は、

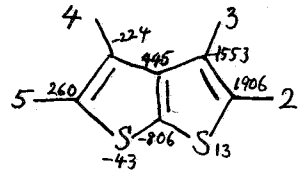
実験値は負の符号をもち、計算値は、 $\pi$ 電子の伝播機構による正の符号をもち。実験値を説明する為には、負の符号をもつ $\sigma$ 電子の伝播機構が $\pi$ 電子の機構に比較して同程度に大きくなければならないが、5 bondを隔て、炭素骨格を持つ $\sigma$ 結合に肉して、他の分子にこの様な例は報告されていない。通常の分子では、このタイプの $\sigma$ 結合は、支配的な $\pi$ 電子による機構にもとづく正の符号を与える(その大きさは0.1~0.2 Hz程度)。隔てるbondがツグツグ配列を持つ $\sigma$ 結合定数 ${}^5J_{36}$ は、 $\sigma$ 電子の機構が支配的であり、多くの分子と同様な値を持つ。6 bondを隔てるツグツグ

*thieno*[3,2-*b*]thiophene



| Exp. <sup>5)</sup>        | INDO  | $\sigma$ | $\pi$ | $\pi'$ | MRT   |       |
|---------------------------|-------|----------|-------|--------|-------|-------|
| ${}^3J_{23} = {}^3J_{56}$ | 5.25  | 4.39     | 3.35  | 1.04   | 1.02  | 1.17  |
| ${}^5J_{26} = {}^5J_{35}$ | -0.20 | -0.31    | -0.02 | -0.29  | -0.29 | -0.08 |
| ${}^5J_{36}$              | 0.75  | 0.85     | 0.66  | 0.19   | 0.18  | 0.00  |
| ${}^6J_{25}$              | 1.55  | 1.35     | 0.87  | 0.48   | 0.47  | 0.35  |

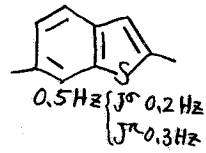
*thieno*[2,3-*b*]thiophene



| Exp. <sup>5)</sup>        | INDO  | $\sigma$ | $\pi$ | $\pi'$ | MRT   |      |
|---------------------------|-------|----------|-------|--------|-------|------|
| ${}^3J_{23} = {}^3J_{45}$ | 5.23  | 4.24     | 3.17  | 1.07   | 1.08  | 1.15 |
| ${}^4J_{34}$              | -0.18 | -0.13    | 0.05  | -0.18  | -0.16 | 0.00 |
| ${}^5J_{24} = {}^5J_{35}$ | -0.02 | 0.14     | -0.04 | 0.18   | -0.18 | 0.0  |
| ${}^6J_{25}$              | 1.20  | 0.76     | 0.93  | -0.17  | -0.17 | 0.0  |

型の ${}^6J_{25}$ は、[3,2-*b*] [2,3-*b*]とも同様な値をもち、計算値は $\sigma$ 電子の機構が支配的であることを示している。 $\sigma$ 電子の機構はほぼ+0.9 Hz程度である。この値は、ベンジチ

オフエンの6 bondを隔てるスピ結合の電子の機構が+0.2 Hz程度に比較して、非常に大きい。この事情は、*thiothiophene*で $J_{25}$ が2つのジグザグ配列をbond pathを持つことによると思われるが、計算値はカップル核を隔てるbond pathの結合定数に対する加算性を示しては



いない。注目すべき特徴は、 $[3,2-b]$ と $[2,3-b]$ の $J_{25}$ の値の差にみられる。実験値、計算値とも $J_{25}^{[3,2-b]} > J_{25}^{[2,3-b]}$ を与える。計算結果はこの差が $\pi$ 電子の伝播機構にもとづくことを示している。この電子の機構は両方の分子において、ほぼ同程度である。 $\Delta J_{25}^{INDO} = 1.35 - 0.76 = 0.59$ ,  $\Delta J_{25}^{\sigma} = 0.48 - (-0.17) = 0.65$ ,  $\Delta J_{25}^{\pi} = 0.87 - 0.93 = -0.06$ 。 $[3,2-b]$ と $[2,3-b]$ において、 $\pi$ 電子の伝播機構は異符号を与え、又強度は7 bondを隔てる $J_{25}^{\sigma[3,2-b]}$ が、6 bondを隔てる $J_{25}^{\pi[2,3-b]}$ より大きい。この事情はそれぞれのcoupling pathの二重結合性の配列の仕方依存していると思われる。 $[3,2-b]$ においては、二重、一重、二重、一重、二重であり、 $[2,3-b]$ では二重、一重、一重、二重となっている。前ページに示したスピ密度の値より、一重、一重の連結は元の大きさが早く減衰する傾向にあり、二重、一重の交代は元の大きさをほぼよに減少させることがわかる。 $J_{25}$ に関するこの特徴は、methyl replacement technique (MRT)の結果と一致している。

*thiothiophene*に見られるこれらの特徴は同様な化合物である*thioselenophene*, *N-benzylthienopyrrole*に見いだされる[5]。*N-benzylthieno[2,3-b]pyrrole*のスピ結合定数の実験値はジグザグ配列をもたない $J_{35}$ が大きい値を示している。*thieno[2,3-b]pyrrole*の計算結果は、*thiothiophene*と同じ結果で、おおよそ実験のassignmentはちがっているのだらう。 $[2,3-b]$ の $J_{34}$ は、この電子の機構の重要性を反映して、正の符号を与える。

この $\pi$ 電子の機構の正の符号は、1 bondを隔てる窒素原子の電気陰性度因子に基くものだらう。このhold型のcoupling pathを持つプロトン間結合定数は現在まで正の符号は報告されておない。それ故計算結果は、input dataのgeometryに依存するのかもしれないが、1 bondを隔てた電気陰性度の強いhetero原子を含む系のhold型のプロトン間結合の実験値は報告されていないことから、あまりはっきりした結論は得られない。

thieno[3,2-b]pyrrole

| Exp. <sup>5)</sup> | INDO  | $\sigma$ | $\pi$ | $\pi'$ |
|--------------------|-------|----------|-------|--------|
| $J_{26}$           | -0.30 | -0.03    | -0.27 | -0.24  |
| $J_{35}$           | -0.28 | -0.05    | -0.23 | -0.24  |
| $J_{36}$           | 0.6   | 1.02     | 0.90  | 0.15   |
| $J_{25}$           | 1.3   | 1.32     | 0.94  | 0.38   |

(2) 6員環-6員環 4-quinoligone  
 $\pi$ 電子によるスピ密度の伝播の様子を調べる為とその符号決定の為、4-quinoligoneの計算を行った。この分子の詳細なりンゲ間結合定数が最近報告されたが[6]、1つをのぞいてその符号は決定されなかった。計算結果より、符号は6員

thieno[2,3-b]pyrrole

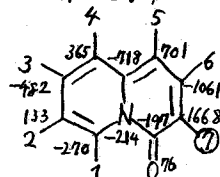
| Exp. <sup>5)</sup> | INDO | $\sigma$ | $\pi$ | $\pi'$ |
|--------------------|------|----------|-------|--------|
| $J_{34}$           | 0.16 | 0.31     | -0.15 | -0.14  |
| $J_{24}$           | 0.0  | 0.08     | -0.07 | 0.13   |
| $J_{35}$           | 1.0  | 0.06     | -0.06 | 0.11   |
| $J_{25}$           |      | 0.84     | 0.93  | -0.09  |



環-6員環のナフタレンと同じであることがわかった。しかしπ電子の伝播機構はかなり異なっており、4-quinolyoneでは、N-C=Oはほとんど伝播せず、もっぱら炭素骨格が主な coupling pathとなっている。特に窒素上を伝播する時のスピンドットの符号が反転しないのが特徴的である。

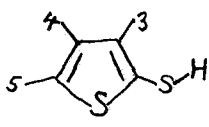
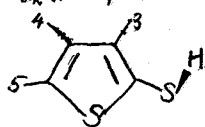
(3)コンフォメーション

2-thiophenethiolと2-thiophenealdehydeの置換基とチオフェン環とのコンフォメーションと結合定数との関係を調べてみよう。Hoffman, Gronowitz<sup>5</sup>はこの系とそのメタル誘導体の結合定数を決定し、 $J_{SH-5}$ ,  $J_{CHO-5}$ の比較的大きい値を説明するために、イオウ原子のπ電子を媒介とする機構の重要性を指摘したが、のちにMRTより $J_{CHO-5}$ は、π電子の伝播機構、 $J_{SH-5}$ はπ電子の伝播機構によって支配されていることを見いだした。とくに後者において、チオールサルファーのπ電子を通じる機構の重要性を述べたが、これらの系のコンフォメーションとの関連については述べられな



|                              | Exp.  | INDO  | σ     | π     | π'    |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <sup>4</sup> J <sub>45</sub> | 0.22  | -1.16 | -0.74 | -0.42 | -0.40 |
| <sup>5</sup> J <sub>35</sub> | 0.19  | 0.73  | 0.22  | 0.51  | 0.47  |
| <sup>5</sup> J <sub>46</sub> | 0.18  | 0.22  | 0.05  | 0.17  | 0.16  |
| <sup>5</sup> J <sub>17</sub> | 0.17  | 0.21  | -0.03 | 0.24  | 0.19  |
| <sup>5</sup> J <sub>15</sub> | 0.98  | 1.66  | 1.31  | 0.35  | 0.28  |
| <sup>6</sup> J <sub>27</sub> | 0.10  | 0.22  | 0.33  | -0.11 | -0.09 |
| <sup>6</sup> J <sub>36</sub> | 0.16  | 0.17  | 0.38  | -0.21 | -0.19 |
| <sup>6</sup> J <sub>25</sub> | 0.34  | -0.20 | -0.02 | -0.18 | -0.17 |
| <sup>6</sup> J <sub>47</sub> | 0.32  | -0.26 | 0.01  | -0.27 | -0.26 |
| <sup>6</sup> J <sub>16</sub> | -0.30 | -0.19 | -0.05 | -0.14 | -0.11 |
| <sup>7</sup> J <sub>26</sub> | 0.09  | 0.14  | 0.06  | 0.08  | 0.07  |
| <sup>9</sup> J <sub>37</sub> | 0.17  | 0.36  | 0.00  | 0.36  | 0.34  |

かった[7]。この2つの系における5 bond couplingの差異はチオール誘導体のS-Hは環に対してほぼ垂直で、それは大軌π電子(特に2位置のCπAO)の機構を与え、π電子の機構を減少させるのに対し、-CHO誘導体では、CHO基は環に平行で、ジグザグ配列をもつ配置をとり、π電子の機構の重要性を与える。チオール基が環と平行の時は、π電子を通じる機構は、ほとんどなくなっている。表に与えたものは次式によって求められたものである。



|                                | Exp.  | MRT   | INDO  | π'    |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <sup>5</sup> J <sub>SH,5</sub> | -1.00 | -1.05 | -1.81 | -1.72 |
| <sup>5</sup> J <sub>SH,4</sub> | 0.35  | 0.30  | 1.01  | 1.03  |
| <sup>4</sup> J <sub>SH,3</sub> | -1.70 | 1.30  | -2.40 | -2.27 |

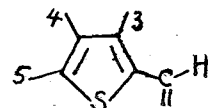
|                                | INDO  | π     |
|--------------------------------|-------|-------|
| <sup>5</sup> J <sub>SH,5</sub> | 0.55  | 0.00  |
| <sup>5</sup> J <sub>SH,4</sub> | 0.15  | 0.00  |
| <sup>4</sup> J <sub>SH,3</sub> | -0.35 | -0.01 |

1つの核に振動ポテンシャルが加わった時、他の核に結合している原子上のπAOのスピンドット密度(ρ<sub>π</sub>)より

$$\pi' = 0.7 \times 10^8 \rho_{\pi} \text{ (Hz)}$$

(ρ<sub>π</sub>は10<sup>-8</sup> unit)

References



|                                 | Exp.  | INDO | σ     | π    |
|---------------------------------|-------|------|-------|------|
| <sup>5</sup> J <sub>CHO-5</sub> | 1.25  | 1.0  | 1.42  | 0.4  |
| <sup>5</sup> J <sub>CHO-4</sub> | 0     | 0.3  | 0.08  | 0.2  |
| <sup>4</sup> J <sub>CHO-3</sub> | -0.12 | -0.5 | -0.10 | -0.4 |

1) M. Barfield and B. Chakrabarti, Chem. Rev. 69(1969)757 74年NMR討論

2) K. Yoshida 73, 74年分子構造討論会予講集。会予集。

3) J.A. Pople, J.W. McIver Jr and N.S. Ostlund, J. Chem. Phys. 49(1965)2960

4) H.M. McConnell, J. Mol. Spectry. 1(1957)11.

5) R.K. Olsen and H.R. Snyder, J. Org. Chem. 30(1965)184  
Abugge, B. Gestblom and O. Hartmann, Acta. Chem. Scand. 24(1970)105  
24(1970)1953.

6) R.Crows, R.R. Kintner, H.C. Radgett, J. Org. Chem. 38(1973)4391

7) B. Gestblom, S. Gronowitz, R.A. Hoffman 5. Arkiv kemi 23(1965)501.

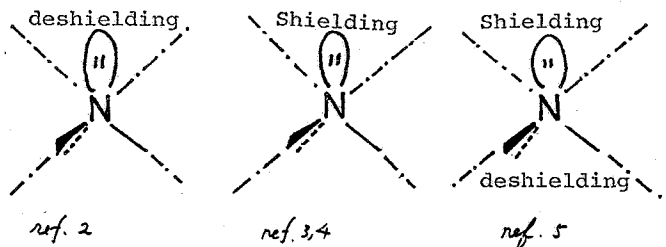
窒素孤立電子対の磁気異方性について

106

(京大・工) ○吉川研一、唐津正典、森島 績

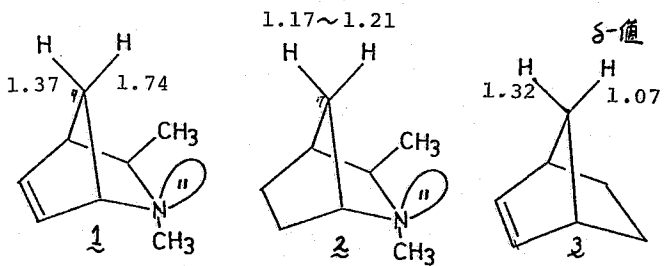
はじめに 窒素孤立電子対の磁気異方性については、(a) 異方性なし<sup>1)</sup>、(b) 孤立電子対の配向方向に正の磁化率(孤立電子対の方向に位置する核が低磁場シフト)<sup>2)</sup>、(c) 孤立電子対の方向に負の磁化率<sup>3,4)</sup>

(a) 孤立電子対の方向に負、反対方向に正の磁化率<sup>5)</sup>、等の報告があり、現在でも未だ確定的な結論がでない様に思われる。孤立電子対の配向を決定することは、種々の分光法の発達にもかかわらず、現状では



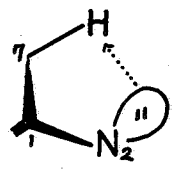
困難である。X線回折を使った場合でも、2級アミンのN-Hプロトンの位置を決定することは殆ど不可能であり、3級アミンについても、結晶の構造決定が可能であっても、溶液中の孤立電子対の配向に関する知見は得ることができない。又、双極子モーメントの測定、窒素原子のアルキル化反応の立体特異性、IRの測定(Bohlmann帯の測定等)等による孤立電子対の配向の研究もなされてきているが、これらはいずれも間接的な情報を与えてくれるだけである。窒素原子を含む有機化合物は、アルカロイドに代表される様に天然に多数存在しており、又、化学的にも重要な性質をもつものが多い。よって、孤立電子対の配向と、その磁気異方性を明らかにすることは意味があると考えられる。更に、窒素原子は、方向性のある典型的な孤立電子対を有しており、基本的な研究をすすめることは、他の種々のヘテロ原子(O, P, Sなど)を含む化合物の孤立電子対の性質を知る上でも役立つと考えられる。演者らは今迄に、種々の骨格を有する、環状、双環状アミンの孤立電子対の配向を、種々の方法を用いて決定してきた。これらの結果を整理したところ、孤立電子対の配向の垂直方向に正の磁化率(核が低磁場シフト)があると考えることによって、<sup>1</sup>H NMRの化学シフトの傾向をよく説明できることが明らかになった。更に、このことは、1,2の例外を除いては、現在までに報告されている種々のアミンの化学シフトについても成立していることがあつたので報告する。

<sup>1</sup>H NMR化学シフトの窒素原子による影響 右図に、CDCl<sub>3</sub>中の7位水素の化学シフトを、TMSからの $\delta$ 値(ppm)で示した。2-アザノルボルネン誘導体(1)では、より窒素原子に近い方の7



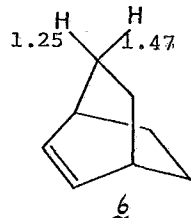
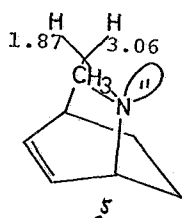
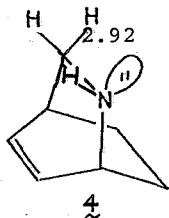
よしかわ けんいち、がさつ まさのり、もりしま いさお

位の水素核が、その反対側に比して、低磁場側に観測される<sup>6)</sup>。これとは逆に、ノルボルネン (3) では、2重結合に対して *anti* の位置にある水素核が高磁場側に観測されている<sup>7)</sup>。即ち、3では窒素孤立電子対の配向に対して垂直方向に位置する水素核が、大きく低磁場側へシフトしていることがわかる。3についても、7位の水素核は重なり、観測され、3に比べて、その化学シフト差が小さくなっており、2の場合と同様の傾向を示している。



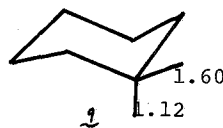
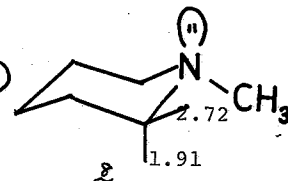
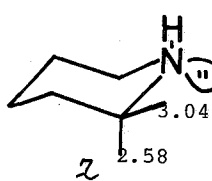
2.46

2-アザビシクロ[2.2.2]オクト-5-エン (4) 及びその *N*-メチル誘導体 (5) については、4では、孤立電子対は反転が早く、*exo*, *endo* にはほぼ等量配向し、5では、メチル基が2重結合側 (孤立電子対が2重結合と反対側) に

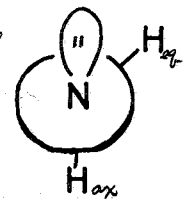


配向していることが明らかになっている。<sup>8)</sup> 5で、3位の水素核の化学シフト差 ( $\Delta = 1.19$  ppm) が、4や、その炭化水素誘導体 (6)<sup>9)</sup> に比して非常に大きいことが注目される。この場合も孤立電子対の配向に対して垂直方向に位置する水素核が低磁場側へシフトしていることがわかる。

*N*-Hピペリジンの孤立電子対の配向については、10報以上の論文が報告されているが、そのうち約半数が *equatorial* 方向へ優先的に配向し



ていると<sup>10)</sup> 更に、約半数が *axial* の方が多いと主張し、<sup>11)</sup> 又、2つの反転異性体が等量存在するとするものもある。<sup>12)</sup> いずれについても、孤立電子対が一方向にのみ配向することはないとい、た点では共通している。そして、この場合、*axial*, *equatorial* 水素の化学シフト差 ( $\Delta = 0.46$ ) は、シクロヘキサンの場合 ( $\Delta = 0.48$ ) と類似していることがわかる。これに対して、*N*-メチルピペリジンでは、その差 ( $\Delta = 0.81$ ) が大きくなっている。8では、孤立電子対は *axial* 位に優先的に配向していることが明らかとなり、<sup>13)</sup> このことから、孤立電子対に対して、*gauche* に位置する *equatorial* 水素が反シャヘイ効果を受けているとして、その化学シフトの傾向を説明することからできることがわかる。このような傾向は、孤立電子対の超共役による電荷密度差を考えることにより、説明できることも考えられる<sup>14)</sup> が、その可能性については、後で分子軌道法計算により検討する。

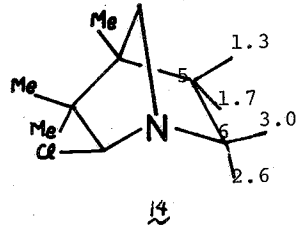
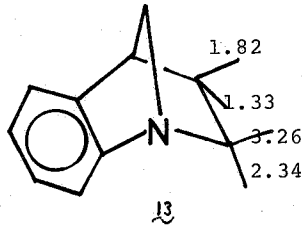
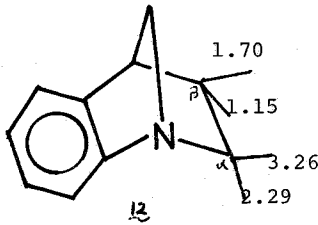


キノリジン誘導体では、*cis* 体で、 $\alpha$  位の水素核が大きく低磁場側へシフトしていることが報告されている。これも、ピペリジン類の場合と同様に、孤立電子対の磁気異性を考えに入れることにより、説明することからできる。Liskowicz は<sup>15)</sup> 孤立電子対の方向に負の磁化率を考慮することにより、キノリジン類の化学シフトを説明しており、こ

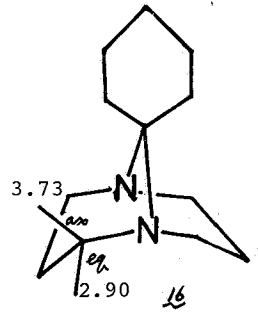
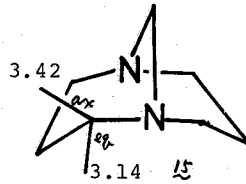
れによっても、双方の場合と同様の傾向を予測できるわけであるが、後述する様に、理論的考察から、孤立電子対の垂直方向に正の磁化率を考える方がより妥当であると考えられる。

次に、1-アザノルボルナン誘導体について検討する。図及び図<sup>12)</sup>は、2つのβ位のメチレンの化学シフト

差に比べ、α位の化学シフト差が大きくなっている。



これは、exo位の水素(α位)が、より孤立電子対の配向方向に対して垂直に近い位置することを考えれば、前述の様な孤立電子対の異方性があるはずであることがわかる。更に、図<sup>12)</sup>についても<sup>13)</sup>、5位と6位のメチレン水素は、exo, endoの化学シフトが逆転しており、同様な窒素孤立電子対の効果が観測されている。



1,5-ジアザビシクロ[3.3.1]ノナン誘

導体について<sup>15)</sup> Nelson は図に示した様な化学シフトの傾向を説明するために、孤立電子対の方向にシヤヘイ、反対方向に反シヤヘイ効果を提唱している。しかし、この場合も、Ca-H<sub>ax</sub>結合方向が、図から総にみるとより孤立電子対の配向方向に平行に近くなることを考えると、前述と同様の孤立電子対の磁気異方性を考えることにより、説明することが出来る。

理論的考察 磁場中(H<sub>0</sub>)での、誘起電流の電流密度 J(ψ)は、<sup>16)</sup>以下の様にあわせる。

$$J(\psi) = \frac{e}{2m} \frac{\hbar}{i} [\psi^* \nabla \psi - \psi \nabla \psi^*] - \frac{e^2}{mc} A_0 \psi^* \psi \quad (1)$$

但し、

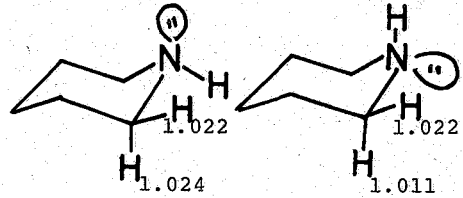
H<sub>0</sub> = rot A<sub>0</sub>, ψ, ψ\*は磁場H<sub>0</sub>中での基底・励起状態の波動関数。

磁場H<sub>0</sub>による振動を考え、振動ハミルトニアンの中で、A<sub>0</sub>の一次の項でひろい出し、一次の振動計算を行なると、(1)の右辺の第1項は、

$$J_p = \frac{-e^2 \hbar^2}{2m^2 c i} \sum_n \frac{(\psi_0 \nabla \psi_n - \psi_n \nabla \psi_0)(\psi_n | L | \psi_0)}{E_n - E_0} H_0 \quad (2)$$

今、MOを構成しているAOとして、s, p軌道だけを考えると、(2)は、 $\psi_0, \psi_1$ の中に、互いに直交するp軌道の成分を有すると共に、0でない値をもつことがわかる。そして、これによつて誘起された常磁性電流は、その互いに直交するp軌道の平面に対して、垂直方向に誘起磁場を生じさせる。これを、アミンの場合にあてはめて、励起エネルギーの小さい  $n \rightarrow \sigma^*$  遷移を考えると、 $\sigma^*$ 軌道には、 $n$ 軌道の配向方向と直交するp軌道の成分があり、このため孤立電子対の垂直方向に正の磁化率を生じることが予想される。同様な理論的考察は既にペリジンの場合についてなされており、 $n \rightarrow \sigma^*$ 遷移による誘起磁化を考慮することにより、 $\alpha$ 位の水素の核磁場シフトを説明することが出来る<sup>17)</sup>。又、(3)式の中には、反磁性電流  $J_{\alpha}$  による項もあるが、この項によつては、 $H$ 化学シフトの一般的な傾向を説明することはできない。

分子軌道計算 窒素原子に近い水素原子の化学シフトには、磁気異方性効果以外に、電荷密度の変化が影響を与えている可能性がある。このことを追究するために、CND02法で、ペリジンの2つの孤立電子対反転異性体についての計算を行った。図には、 $\alpha$ 位の水素の電荷密度の値を示したが、これからは、0.1ppm程度のシフト差しか予想されず、余り大きな寄与はないと考えられる。しかしながら、これは近似計算によるものであり、確定的な結論を下すためには、更に精密な理論計算を行う必要があると思われる。



まとめ 孤立電子対の配向方向に対して、垂直方向に位置する水素核が低磁場側に観測されることか明らかとなり、た。しかし、議論は行なわなかったが、コゲイノン類ではこれと異なる化学シフトの傾向があり、更に検討を要すると思われる。

謝辞 2-アザノルホルネン誘導体に関する研究の共同研究者の故医研池上博士に感謝します。又、塩野義の通博士、電通大の中川博士、東大応微研の奥田教授に本研究に対する助言を感謝します。

References

- 1) J. A. Pople, J. Chem. Phys., 37, 60(1962).
- 2) S. Yamaguchi et al., Chem. Pharm. Bull, 11, 1465(1963).
- 3) M. Uskokovic et al., J. Amer. Chem. Soc., 86, 3364(1964).
- 4) 通S, 日化会20年会, 予稿集Ⅲ, 145(1964).
- 5) S. F. Nelsen et al., J. Amer. Chem. Soc., 94, 7105(1972).
- 6) I. Morishima et al., submitted for publication.
- 7) K. Tori et al., Tetrahedron Lett., 9(1966).
- 8) I. Morishima et al., J. Amer. Chem. Soc., 97, 2950(1975).
- 9) K. Tori et al., Chem. Ber., 97, 2798(1964).
- 10) J. B. Lambert et al., J. Amer. Chem. Soc., 89, 3761(1967). 他6報
- 11) A. R. Katritzky et al., J. Chem. Soc., B, 127(1970). 他6報
- 12) H. Booth, Chem. Commun, 802(1968).
- 13) I. Morishima et al., J. Amer. Chem. Soc., 93, 3922(1971).
- 14) H. P. Hamlow et al., Tetrahedron Lett., 2553(1964).
- 15) S. McLean et al., Can. J. Chem., 47, 3647(1969).
- 16) P. G. Gassman et al., J. Amer. Chem. Soc., 90, 1355(1968).
- 17) 松岡S, 分子の電子状態討論会 (1961).

<sup>13</sup>C-NMRにおける<sup>1</sup>H-Long range Decoupling とH-C 間の選択的 NOE  
について

P-1-1

(理研) ○ 鷗沢 洵、竹内節男

1 はじめに

我々は第14回 NMR 討論会において<sup>1)</sup>ペンタレノラク톤の構造を<sup>13</sup>C-NMRを用いて検討し、グリシディックラク톤のエポキシサイドの出方に関する議論の最終結論を報告した。各炭素の帰属の確認は、主として<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}セレクトイブデカップリングを用いたが、4級炭素に関しては<sup>1</sup>H 照射パワーを小さくして選択的ロングレンジデカップリングを用いた。

今回は「Long range Decoupling」をはじめとして、弱いパワーによる<sup>1</sup>H 照射時に特有の問題について考察し、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C 間の選択的NOE について実験を試みたのでこれを報告する。

2 試料、装置、測定条件

試料はペンタレノラク톤 メチルエステルをCHCl<sub>3</sub>を用いたシリカゲルクロマトグラフィにより精製し、約80mg をCDCl<sub>3</sub> 0.6ml に溶解させ測定した。

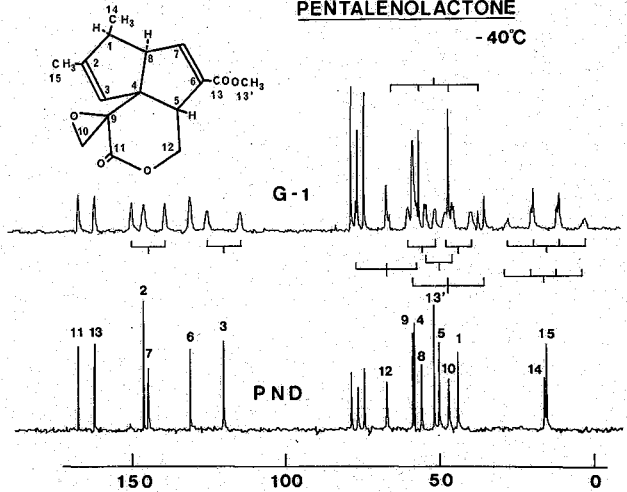
装置は予稿集の段階ではJEOL FX-60 型を8K ソフトプログラム、8K メモリーで使用した。

NOE 測定はS/N 向上のため-35°C ~ -40°C で測定した。このときの

PND およびGATED-1 (non-decoupling with NOE) のスペクトルを第1図に示す。前回の常温による測定と比較すると、ケミカルシフトについてはC-3、C-8、C-5、C-6、C-4が0.5~0.7PPM 低磁場にシフトし、カップリングコンスタントについてはC-10、C-5が2Hz 増加し、C-14、C-7が2Hz 減少した他は誤差の範囲で一致している。

低温にしたことにより、T<sub>1</sub>は短くなり、装置の感度も向上したので下表のとおり測定時間の短縮とS/N の向上が得られた。

第1図 <sup>13</sup>C-NMR SPECTRA  
PENTALENOLACTONE  
-40°C



| 測定温度  | パルスくりかえし時間 | 積算回数 | S/N |
|-------|------------|------|-----|
| 27°C  | 2秒         | 2万   | 3.1 |
| -40°C | 1秒         | 1万   | 9.1 |

カルボニル炭素2本の  
GATED-1のシグナルに  
よる比較

うざわ じゆん、たけうち せつお

### 3 弱いパワーによる<sup>1</sup>H照射時の<sup>13</sup>Cスペクトル

二重共鳴のNMRスペクトルは照射パワーを変えると特有のスペクトル変化を示すことが1962年にW.A.ANDERSONおよびR.FREEMANにより研究されている。<sup>2)</sup>

さて、<sup>1</sup>Hデカップリングに必要な照射パワーは  $H_2 = 0.452 \text{ (mG/Hz) J}$  であらわされているとおり、<sup>3)</sup> カップリング定数が小さければパワーは小さくて良い。しかしながら、照射パワーが弱くなると、1ボンドのカップリングに対しては不十分であり、近くの別のシグナルに対しては  $J_{C-H}$  により分裂したどちらか一方のシグナルを照射することになるので、ANDERSON, FREEMANの報告のとおり、<sup>2)</sup> 複雑なスペクトル変化を示す。この現象はロングレンジデカップリングの項で示す。

一方、NOE観測のため、ゲーテッドデカップリング (GATED-1, non-decoupling with NOE) を使った。

この場合も、R.FREEMANの報告のように、連続波の場合と異つてはいるがスペクトル変化を示す。<sup>4)</sup> ゲーテッドデカップリングをかけながら、<sup>13</sup>Cサテライトのピークのみ弱く照射する方法をPseudo INDOR, S.P.I. (Selective Population Inversion), S.P.T. (Selective Population Transfer), と呼んでいる。<sup>5)</sup>

S.P.I. はカップリングコンスタントの符号、エネルギーレベルの構造、シグナルの帰属等に有効な手段であるが、今回は「Long range decoupling」と選択的NOEのみについて検討した。

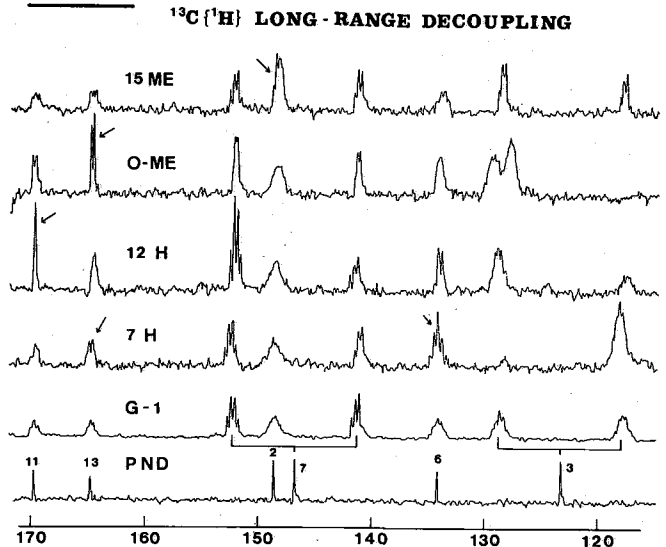
#### (1) long range decoupling

<sup>1</sup>Hの照射パワーを試料の位置でどのくらい照射されているか正確に測定するのはむずかしい。一般に、完全デカップリング時は余裕をもって照射しているが、セレクトイブデカップリング時は弱めにあてた方が選択性が良い。今回はFX-60の操作パネルについているアッテネータの表示であらわす。完全デカップリング時は70dB、セレクトイブデカップリング時は約40dBである。これに対し、ロングレンジデカップリング時は6dBで行った。

第2図にベンタレノラクトンの低磁場域をロングレンジデカップリングしたスペクトルを示す。

BHAGGAらはセレクトイブデカップリングと同等のパワーで4級炭素

第2図



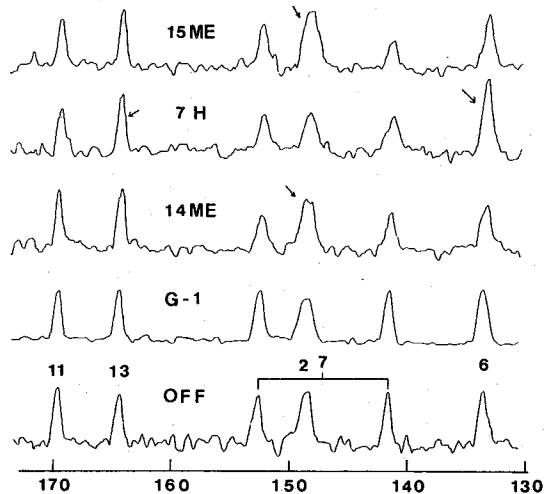
の帰属を行っているが、<sup>6)</sup> 強い照射では他のカップリングの情報を消してしまう。  
 我々の方法では第2図でわかるとおり、たとえば、OMe (<sup>13</sup>C) 照射時のC-13のようにダブルレットとして観察され、ロングレンジカップリングはそのまま残っているのがわかる。  
 C-3のシグナルはOMe (<sup>13</sup>C)、12-H、7-Hのいずれを照射した場合でも形がくずれていく。これは3-Hのケミカルシフトが5.05PPM、 $J_{C-H}$ が/64Hzであり、<sup>13</sup>Cサテライトのピークとそれぞれの照射周波数が近接しているため、このように変化している。  
 15-Meを照射したとき、C-2のシグナルの強度が大きくなっている。これはH-C間のNOEと思われる。

## (2) H-C 間 NOE

緩和機構が双極子相互作用であると仮定してNOE量を計算すると2.988倍となる。<sup>7)</sup>  
 今までの研究では、ノイズデカップリングにより全部の核のNOE量を比較検討しているが<sup>8)</sup> もし、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H間のNOEと同様に選択的に<sup>1</sup>Hを照射して<sup>13</sup>CシグナルのNOEを観測できれば、構造解析に有効な手段となるはずである。  
 しかし、次のようないくつかの実験上の制約がある。

- (1) どうしても non-decoupling との比較が必要であり、感度が悪く、積分値の誤差が大きくなる。
- (2) OX 法では局所的に掃引して比較できたが、PT 法では再現性が悪く、何か基準のシグナルとの相対値の比較で議論せざるをえない。
- (3) S.P.I. 等により、カップリングのあるシグナルは複雑な変化を示し、積分値も変る。
- (4) 濃度を極端に濃くすることは新たな緩和機構が問題となり、好ましくない。

## 第3図 <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} SELECTIVE NOE



我々は(1)については低温で測定して、S/Nを向上させた。(2)については溶媒ODCl<sub>3</sub>の3本の炭素シグナルの積分値を基準として、それぞれの照射条件で比較した。  
 (3)については今回は4級炭素のみを問題とした。逆に言えば、4級炭素のNOEこそ<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H間のNOEにない<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C間NOEの特長である。

第3図は各<sup>1</sup>Hを6dB GATED-1で照射したときのスペクトルで←印が強度変化の見られるシグナルである。

これを積分した値のODCl<sub>3</sub>との相対値を最後の表に示す。誤差が大きく問題はあがあるが、立体的に近い15-MeとC-2、7-HとC-13およびC-6との関係は示されている。



選択的<sup>1</sup>H照射による<sup>13</sup>Cシグナルの積分強度比

| 観測 \ 照射           |        | non-Irr. | 1 5 Me | 1 4 Me | 7 H  | GATED-1<br>70dB-noise |
|-------------------|--------|----------|--------|--------|------|-----------------------|
| C<br>11           | 積分値 mm | 8.5      | 8.0    | 10     | 7.5  | 8.0                   |
|                   | 相対値 1  | 0.12     | 0.11   | 0.125  | 0.12 | 0.18                  |
|                   | 相対値 2  | 1.00     | 0.92   | 1.04   | 1.0  | 1.5                   |
| C<br>13           | 積分値    | 8.0      | 8.0    | 10     | 9.0  | 8.5                   |
|                   | 相対値 1  | 0.11     | 0.11   | 0.125  | 0.15 | 0.19                  |
|                   | 相対値 2  | 1.00     | 1.0    | 1.13   | 1.36 | 1.73                  |
| C<br>2            | 積分値    | 14       | 19     | 18     | 13   | 14                    |
|                   | 相対値 1  | 0.20     | 0.30   | 0.225  | 0.21 | 0.31                  |
|                   | 相対値 2  | 1.00     | 1.5    | 1.13   | 1.05 | 1.55                  |
| C<br>6            | 積分値    | 12       | 13.5   | 14     | 19   | 14                    |
|                   | 相対値 1  | 0.17     | 0.19   | 0.175  | 0.31 | 0.31                  |
|                   | 相対値 2  | 1.00     | 1.12   | 1.03   | 1.82 | 1.82                  |
| CDCl <sub>3</sub> | 積分値    | 71       | 71     | 80     | 62   | 45                    |
|                   | 相対値 1  | 1.00     | 1.00   | 1.00   | 1.00 | 1.00                  |
|                   | 相対値 2  | 1.00     | 1.00   | 1.00   | 1.00 | 1.00                  |

相対値 1 : 同一スペクトル内の CDCl<sub>3</sub> の積分値との比

相対値 2 : 相対値 1 の non-Irr. との比

測定条件 : RF LEVEL • 6dB, GATE-1, PULSE REPETITION • 1sec, 10000回, TEMP • -40°C

4 むすび

選択的 NOE は多くの問題を含み、簡単に結論をくだせないが、S/N の良い装置でサンプルの濃度も <sup>1</sup>H-NMR 程度で測定できれば、有機化合物の構造解析に有効な手段となると考えられる。

文 献

- 1) 鶴沢, 竹内, 瀬戸, 第 14 回 NMR 討論会 1A12 (1975)
- 2) W.A. ANDERSON and R. FREEMAN, J. Chem. Phys., 37 85 (1962) 1bid 37 2053
- 3) A.L. BLOOM and J.W. SHOOLERY, Phys. Rev., 97 / 26 / (1955)
- 4) R. FREEMAN, J. Chem. Phys., 53 457 (1970)
- 5) E. A. LINDE, H. J. JACOBSEN, and B. J. KIMBER, J. A. C. S., 97 : 11 32 / 9 (1975)
- 6) W. S. BHACCA, F. W. WEHRLI and N. H. FISCHER, J. Org. Chem., 38 36 / 8 (1973)
- 7) K. F. KUHLMAN and D. M. GRANT, J. A. C. S., 90 : 26 7355 (1968)
- 8) G. G. LEVY, Chem. Comm., 47 (1972)

## P-1-2

(北見工大) O三浦宏一, 福井洋之

〈序〉 水を直接溶媒として、イオンの水和現象をNMRで観測する場合、OHプロトンの化学シフトの変化は水分子ごうしの水素結合の状態の変化と、イオンのつくる電場によるOHプロトンのまわりの電子状態の変化という2つの寄与を含んでいる。この2つの効果のうち前者の効果を消去するために、0.1M濃度の水をアセトン中に溶かしたものを溶媒として用いた。このような希薄な濃度では水分子は水素結合を形成しないので、化学シフトの変化は単にイオンの電場の影響によるシフト(錯体形成シフト)のみと考えられる。溶媒としてアセトンを用いたのは、アセトンと水のシグナルが重ならず、しかもアセトンのイオンに対する配位力が比較的弱いためである。本実験は常温で行ったが、常温では水和した水分子としていない水分子の交換速度が速いため、水のシグナルは平均化された位置に1本となって現われる。このためイオン濃度を変えて観測を行い、イオンと水分子が1対1の錯体を形成するという仮定のもとに解析を行い、錯体形成シフト( $\Delta_c$ )と平衡定数(K)を求めた。なお、塩類として各種金鳥塩、テトラブチルアンモニウム塩を用いた。

〈実験〉 アセトンは市販品をモレキュラーシーブ中で2度蒸留して脱水したものを用了。塩類は、市販品を脱水、乾燥したものを使用した。なお塩化テトラブチルアンモニウムについては精製を行った。

実験は0.1M水濃度に調整したアセトンに、濃度0.2Mまでは0.05Mきざみ、0.2M以上については0.1Mきざみに塩を溶解させたサンプルをつくり、各々について水のプロトンシフトを測定した。

プロトンNMRスペクトルは、日立R-20A型核磁気共鳴装置(60MHz)を用い、TMSを内部標準として34°Cで測定した。

(実験データの解析) イオン(I)に水和した水分子(C)としていない水分子(F)の交換速度が速い場合、観測されるシフト $\sigma$ は次式により表される。

$$\sigma = \frac{[F]}{C_w} \sigma_F + \frac{[C]}{C_w} \sigma_c \quad (1)$$

$C_w$ はアセトンに溶かした水の濃度である。1対1の錯体を形成した場合、平衡定数Kは次式で表される。

$$K = [C] / [F][I] \quad (2)$$

我々は錯体形成シフト $\Delta_c$ を次のように定義した。

$$\Delta_c = \sigma_c - \sigma_F \quad (3)$$

(1)式と(3)式より(4)式が得られる。

$$\sigma = \sigma_F + \frac{[C]}{C_w} \Delta_c \quad (4)$$

みうら こういち, ふくい ひろゆき

我々は $\sigma$ を一定の水の濃度(0.1M)のもとで、加えた塩の濃度 $C_s$ の関数と考え、イオン濃度を無限に大きくしたときの $(\sigma - \sigma_F)$ を錯体形成シフト $\Delta_c$ に等しいと置いた。データの解析は、コンピューターシミュレーション法を用いて行い、 $K$ と $\Delta_c$ を求めた<sup>2)</sup>。 $\Delta_c$ を一定として $K$ をパラメーターとした $\sigma$ の理論曲線を、Figure 1に示す。

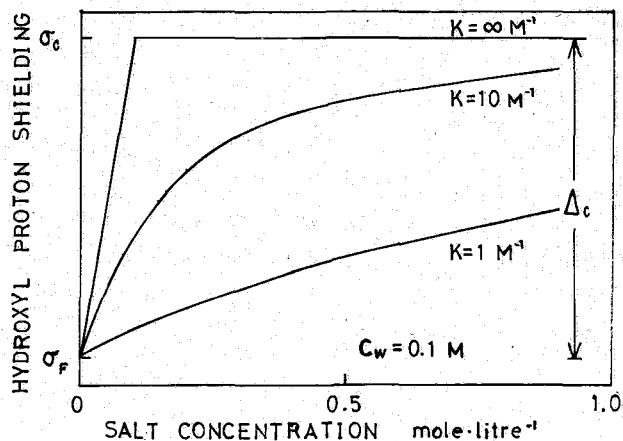


Figure 1. Simulation of the dependence of the hydroxyl proton shielding on the concentration of added salt for various equilibrium constants,  $K$ .

<結果と考察> 錯体形成シフトは、加えた塩のカチオンとアニオンの両方の寄与の和であると思われる。そこでまず、アニオンの寄与をできるだけ小さくして、カチオン

の効果のみによるシフトを求めるために、アルカリ及びアルカリ土類金属の過塩素酸塩を用いて実験を行った。この結果をTable Iに示す。錯体形成シフトは、Stockton等<sup>2)</sup>が重水素化アセトニトリル溶液で行った結果とほぼよく一致している。しかし平衡定数については、いずれのイオンに対しても小さい値が得られた。このことはアセトンの solvating abilityがアセトニトリルのそれよりも多少大きいことを示している。

アニオンの錯体形成シフトと平衡定数に対する影響を調べるために、他のアルカリ及びアルカリ土類金属塩を用いて実験を行った結果をTable IIに示す。この実験で非常に興味ある結果が得られた。Table IIより分かるように、アニオンを変えたことによる錯体形成シフトの変化が非常に小さく、カチオンが同一の塩はほとんど等しい値を示している。これは金属塩の錯体形成シフトは主に金属イオンによって決まり、アニオンはほとんど影響を与えないことを示している。このことから水分子は金属イオンと錯体を形成するが、アニオンとは錯体をつくらないと仮定することは、妥当と考えられる。しかし平衡定数はアニオンの種類によって大きな違いをみせている。この事実は錯体形成シフトに対する結果と矛盾するように思われる。錯体形成シフトと平衡定数に対するこのアニオンの効果の相違は、アニオンが水分子と結合しないが、カチオンとは ion-pair をつくと考えるとよく説明できる。アニオンは水分子と錯体を形成しないのであるから、カチオンにより生ずる錯体形成シフトには影響しない。しかし、カチオンと ion-pair をつくり、カチオンと水の結合を妨害する。したがってアニオンがカチオンと ion-pair をつくる能力が大きいほど、平衡定数は小さくなるであろう。故にTable IIより、アニオンの ion-pair をつくる能力は、 $\text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ の順と考えられる。

次に、カチオンの寄与をできるだけ小さくして、アニオンの効果のみによるシフトを求めるために、テトラブチルアンモニウム塩を用いて同様の実験を行った。この結果をTable IIIに示す。塩化テトラブチルアンモニウムによる錯体形成シフトは幾分大きいから、臭化・ヨウ化テトラブチルアンモニウムによるシフトは極めて小さい。平衡定数については規則的な傾向はみられなかった。錯体形成シフトの結果から、臭素、ヨウ素イオンはほとんど

水と錯体をつくっておらず、塩素イオンについてはわずかながら水と錯体を形成していると推測される。

Table Iに記した錯体形成シフトは、カチオンに対して規則的な変化をみせている。またTable IIに示したように、アニオンの錯体形成シフトに対する寄与は、カチオンによるシフトに比べて無視し得ることが分っている。Table Iの結果は、錯体形成シフトがカチオンの大きさや電荷と密接な関係があることを示唆している。そこでカチオンのつくる電場と錯体形成シフトの関係を調べてみた。

簡略化するため、錯体形成シフトは単に電場に比例すると仮定してみた。そうすると錯体形成シフトは次式の如く表すことができる。

$$\Delta_c = -Ane / (r+c)^2 \quad (5)$$

ここで  $ne$  はイオンの電荷、 $r+c$  はイオンの中心からOHプロトンまでの距離を表している。 $r$  はイオンの結晶半径、 $A$  は比例定数である。(5)式を変形すると(6)式となる。

$$r = A^{1/2} (-ne/\Delta_c)^{1/2} - c \quad (6)$$

もし錯体形成シフトがカチオンのつくる電場に比例するなら、カチオンの  $r$  は  $(-ne/\Delta_c)^{1/2}$  に対して直線的に変化するはずである。Table Iの結果を(6)式に従ってプロットしたのがFigure 2である。すなわち、カチオンの結晶半径を  $(-ne/\Delta_c)^{1/2}$  に対してプロットしたものである。Figure 2はシフトが電場にほぼ比例していることを示している。Figure 2の直線の傾きと切片から  $A = 0.45 \times 10^{-12} \text{esu} \times \text{C} = 0.44 \text{ \AA}$  という値が得られた。これらの値そのものは単純な仮定より得られたという点で、それほど重要な意味を持たないであろう。

錯体形成シフトと結晶半径との関係をさらに調べるために、アルカリ及びアルカリ土類以外の金属イオンによる錯体形成シフトを求めた。この結果をTable IVとFigure 3に示す。Figure 3から明らかのように、アルカリ及びアルカリ土類以外の金属イオンに対しては、結晶半径と錯体形成シフトの間になんら相関関係はみられない。Table IIIのアニオンシフトに対しても、同様の  $r$  対  $(-ne/\Delta_c)^{1/2}$  のプロットから、アニオン半径とシフトの間に相関がないことが分かった。

Table I. Hydration Constants,  $K$  ( $M^{-1}$ ), and Polarization Shifts,  $\Delta_c$  (ppm), of Alkali and Alkaline Earth Perchlorates in Acetone at  $34^\circ$ .

| Salt                        | $K(M^{-1})$ | $\Delta_c(\text{ppm})^a$ |
|-----------------------------|-------------|--------------------------|
| $\text{LiClO}_4$            | 12          | -1.84                    |
| $\text{NaClO}_4$            | 2.8         | -0.90                    |
| $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ | large       | -3.36                    |
| $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ | 48          | -2.33                    |
| $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ | 26          | -1.67                    |
| $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ | 6.0         | -1.46                    |

<sup>a</sup> The positive sign represents increased nuclear shielding.

Table II. Anion Dependences of the Hydration Constants and Polarization Shifts for Lithium and Calcium Salts in Acetone.

| Cation           | Anion            | $K(M^{-1})$ | $\Delta_c(\text{ppm})$ |
|------------------|------------------|-------------|------------------------|
| $\text{Li}^+$    | $\text{ClO}_4^-$ | 12          | -1.84                  |
| $\text{Li}^+$    | $\text{NO}_3^-$  | 4.6         | -1.92                  |
| $\text{Li}^+$    | $\text{Br}^-$    | 25          | -1.86                  |
| $\text{Li}^+$    | $\text{I}^-$     | 27          | -1.88                  |
| $\text{Ca}^{2+}$ | $\text{ClO}_4^-$ | 48          | -2.33                  |
| $\text{Ca}^{2+}$ | $\text{NO}_3^-$  | 11          | -2.22                  |

Table III. Hydration Constants and Polarization Shifts of Tetra-n-butylammonium Halides in Acetone.

| Salt              | $K(M^{-1})$ | $\Delta_C$ (ppm) |
|-------------------|-------------|------------------|
| $(n-C_4H_9)_4NCl$ | 12          | -0.75            |
| $(n-C_4H_9)_4NBr$ | 4.1         | -0.48            |
| $(n-C_4H_9)_4NI$  | 6.8         | -0.06            |

Table IV. Hydration Constants and Polarization Shifts of Some Cations Other Than the Alkali and Alkaline Earth Metal Ions, in Acetone.

| Cation    | Salt     | $K(M^{-1})$ | $\Delta_C$ (ppm) |
|-----------|----------|-------------|------------------|
| $Zn^{2+}$ | $ZnCl_2$ | 18          | -4.25            |
| $Cd^{2+}$ | $CdI_2$  | 10          | -3.44            |
| $Hg^{2+}$ | $HgCl_2$ | 0.21        | -5.45            |
| $Sn^{2+}$ | $SnCl_2$ | 11          | -5.27            |
| $Sb^{3+}$ | $SbCl_3$ | 0.36        | -5.49            |

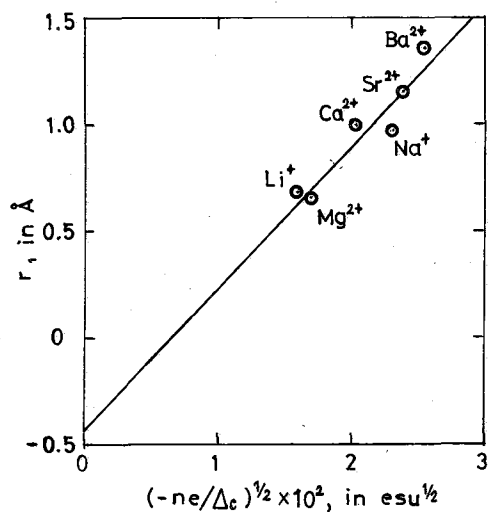


Figure 2. Relationship between the observed cation-water complex shift and the crystal radius, for alkali and alkaline earth metal cations.

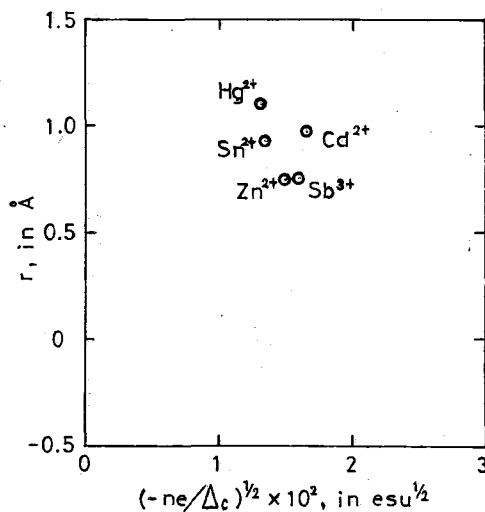


Figure 3. Relationship between the observed cation-water complex shift and the crystal radius, for some other cations than those in Figure 2.

### < 文献 >

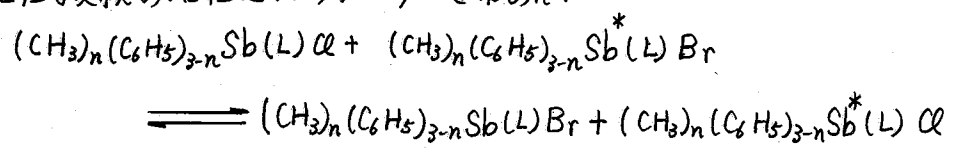
- 1) A. Fratiello, R. E. Lee, D. P. Miller, and V. M. Nishida, *Mol. Phys.*, **13**, 349 (1967).
- 2) S. Shimokawa, H. Fukui, J. Sohma, and K. Hotta, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1777 (1973).
- 3) G. W. Stockton and J. S. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6921 (1972).
- 4) A. Fratiello, V. M. Nishida, R. E. Lee, and R. E. Schuster, *J. Chem. Phys.*, **50**, 3624 (1969).
- 5) A. Fratiello, R. E. Lee, and R. E. Schuster, *Mol. Phys.*, **18**, 191 (1970).

P-1-3

トリオルガノ(オキシナト)アンチモン錯体の配位子交換反応の研究  
 阪大工 川崎吉包, 高橋経則, 大河原六郎

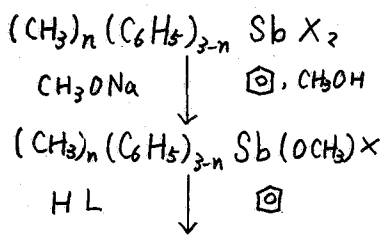
1. はじめに. 我々は第12回NMR討論会に於て<sup>1)</sup>下の様な系の配位子XとYとの交換の活性化パラメータを温度依存NMRスペクトルの波形解析より求めた. その結果 1) 活性化エントロピーの値は負でその絶対値は大きい. 2) 配位子交換の速度定数は活性化エネルギーではなく活性化エントロピーの変化に依存して変る. 3) 活性化状態は配位子の架橋したものである, というものであった.

本研究では配位子交換の更に詳しい機構を解明するために, 1)メチル基をフェニル基で置換した場合, 2)オキシニ上に置換基を導入した場合, 配位子交換がどの様な影響を受けるかを前報同様<sup>1)</sup>H NMRスペクトルの波形解析を行い配位子交換の活性化パラメーターを求めた.

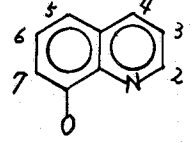


n = 1 ~ 3, L = オキシニ及びその誘導体.

2. 実験及び計算. 化合物は下の方法で合成した.<sup>2)</sup> 合成した化合物の一部の<sup>1)</sup>H NMR, IR及びUVスペクトルを表1に示す.



L = オキシニ及びその誘導体  
 X = Cl 及び Br.  
 n = 1 ~ 3



で行った.<sup>3)</sup> <sup>1)</sup>H NMRスペクトルの波形解析は以下の方法で行った.

$$I(w_i) \propto \text{Re} \left( P_A P_B \begin{pmatrix} -(\alpha_A + \frac{1}{2}\tau_A) & \frac{1}{2}\tau_B \\ \frac{1}{2}\tau_A & -(\alpha_B + \frac{1}{2}\tau_B) \end{pmatrix} \right)$$

$$\alpha_A = \frac{1}{T_{2A}} + i(W_A - w_i)$$

$$\alpha_B = \frac{1}{T_{2B}} + i(W_B - w_i)$$

ここで P<sub>A</sub>, P<sub>B</sub> は A 及び B 種の相対的存在割合を, τ<sub>A</sub>, τ<sub>B</sub> は夫々の平均寿命を, W<sub>A</sub>, W<sub>B</sub> は夫々のケミカルシフトを示す. スペクトルの計算に際して τ<sub>B</sub> = ([CB]/[CA]) × τ<sub>A</sub> なる関係を使った. 但し [C<sub>A</sub>], [C<sub>B</sub>] は夫々 A 及び B 種の濃度 (~0.1 mol/dm<sup>3</sup>) である. スペクトルを計算するのに必要な値 T<sub>2A</sub>, T<sub>2A</sub> 及び T<sub>2B</sub> は次式の値が最小になる様に最小二乗法を使って求

かわきよしかね, たかはし つねのり, おおかわら ちくろう.

Table 1.  $^1\text{H}$  NMR, IR and UV spectral data of  $(\text{CH}_3)_n(\text{C}_6\text{H}_5)_{3-n}\text{Sb(L)Cl}$

| n                      | L                    | Sb-CH <sub>3</sub><br>(ppm) | 2-H<br>(ppm) | 4-H<br>(ppm) | $\nu(\text{Sb-Cl})$<br>(cm <sup>-1</sup> ) | $\lambda_{\text{max}}$<br>(nm) |
|------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------|--------------|--|--------------------------------|
| 3                      | Ox                   | 2.08                        | 8.76         | 8.24         | 234  | 353                            |
|                        | 2Me-Ox               | 1.93                        | —            | 8.04         | 255  | 328                            |
|                        | 5Ac-Ox               | 1.95                        | 8.78         | 9.66         | 260  | 344                            |
| 2                      | Ox                   | 2.05                        | 8.84         | 8.26         | 266  | 361                            |
|                        | 2Me-Ox               | 2.14                        | —            | 8.10         | 260  | 332                            |
|                        | 4Me-Ox               | 2.02                        | 8.71         | —            | 265  | 341                            |
|                        | 5Me-Ox               | 2.05                        | 8.86         | 8.39         | 264  | 353                            |
|                        | 7Me-Ox               | 2.08                        | 8.86         | 8.59         | 269  | 352                            |
|                        | 5Ac-Ox               | 2.06                        | 8.88         | 9.72         | 271  | 349                            |
|                        | 5NO <sub>2</sub> -Ox | 2.11                        | 8.92         | 9.46         | 275  | —                              |
| 5,7Cl <sub>2</sub> -Ox | 2.13                 | 8.86                        | 8.54         | 271          | 356  |                                |
| 1                      | Ox                   | 2.06                        | 8.86         | 8.21         | 260  | 368                            |
|                        | 2Me-Ox               | 2.24                        | —            | 8.01         | 270  | 332                            |
|                        | 5Me-Ox               | 2.04                        | 8.91         | 8.33         | 270  | 369                            |
|                        | 7Me-Ox               | 2.04                        | 8.89         | 8.15         | 256  | 366                            |

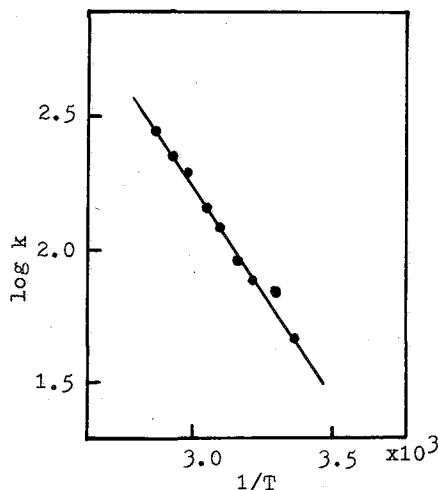


図 1.  $(\text{CH}_3)_2(\text{C}_6\text{H}_5)\text{Sb}(5\text{Ac-Ox})[\text{Cl-Br}]$  系の Arrhenius plot.

$$R = \sum_{i=1}^n (I^e(\omega_i) - I^{\text{cald}}(\omega_i))^2$$

た、ここで  $I^e(\omega_i)$  及び  $I^{\text{cald}}(\omega_i)$  は  $\omega_i$  に於ける実測及び計算スペクトルの強度である。実測スペクトルと計算スペクトルとの誤差は次式の表示

$$\text{Err} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |I^e(\omega_i) - I^{\text{cald}}(\omega_i)| / I^e(\omega_i) \times 100$$

で 2~6% であつた。配位子交換の速度定数は  $k = 1/(\tau_A \cdot [\text{C}_B])$  を使って計算した。図 1 に  $(\text{CH}_3)_2(\text{C}_6\text{H}_5)\text{Sb}(5\text{Ac-Ox})[\text{Cl-Br}]$  系の Arrhenius プロットを示す。この Arrhenius プロットから得られた配位子交換の活性化パラメーターを表 2 に示す。

Table 2. Activation parameters for  $(\text{CH}_3)_n(\text{C}_6\text{H}_5)_{3-n}\text{Sb(L)}[\text{Cl}-\text{Br}]$   
in  $\text{CHCl}_2\text{CHCl}_2$

| n | L                      | log k | $E_a$     | $\Delta H^\ddagger_a$ | $\Delta G^\ddagger_a$ | $\Delta S^\ddagger_a$ |
|---|------------------------|-------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|   |                        |       | (k·J/mol) | (k·J/mol)             | (k·J/mol)             | (J/K·mol)             |
| 3 | Ox <sup>b</sup>        | 4.46  | 39.3      | 37.5                  | 47.3                  | -33                   |
|   | 2Me-Ox                 | 2.63  | 27.1      | 24.7                  | 58.0                  | -112                  |
|   | 5Ac-Ox                 | 2.46  | 25.6      | 23.1                  | 59.0                  | -120                  |
| 2 | 7Me-Ox                 | 2.60  | 17.6      | 15.1                  | 58.1                  | -145                  |
|   | 4Me-Ox                 | 2.56  | 22.7      | 20.2                  | 58.4                  | -128                  |
|   | 5Me-Ox                 | 2.46  | 20.7      | 18.3                  | 59.0                  | -137                  |
|   | Ox                     | 2.25  | 23.8      | 21.3                  | 60.1                  | -129                  |
|   | 5Cl-Ox                 | 2.07  | 23.7      | 21.2                  | 61.2                  | -134                  |
|   | 5NO <sub>2</sub> -Ox   | 1.30  | 31.8      | 29.3                  | 65.6                  | -122                  |
|   | 5,7Cl <sub>2</sub> -Ox | 1.19  | 30.6      | 28.1                  | 66.2                  | -128                  |
| 1 | Ox                     | 2.17  | 14.2      | 11.7                  | 60.6                  | -163                  |
|   | 2Me-Ox                 | 2.04  | 12.1      | 9.6                   | 61.5                  | -172                  |

<sup>a</sup> value at 25°C. <sup>b</sup> Ref. 1.

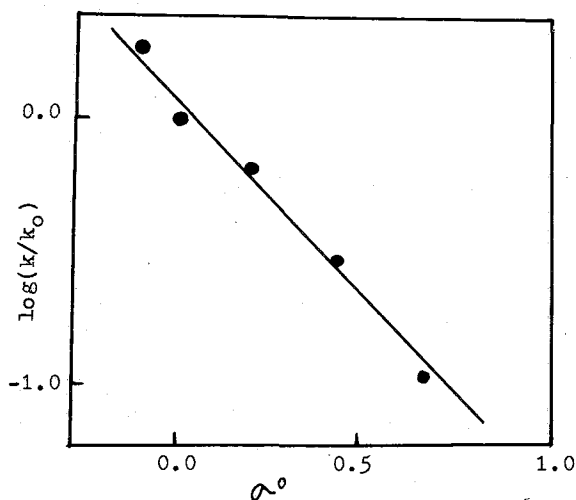
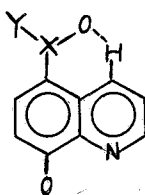


図2.  $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{Sb(L)}[\text{Br}-\alpha]$  系の  
ハメット プロット.

3. 結果と考察. 得られた錯体は  
2-メチルオキシンの錯体を除いて6配  
位構造を取っていることが UVス  
ペクトルの値より推定出来る. <sup>1</sup>H NMR  
スペクトルに於て5位にアセトキシ  
基或はニトロ基がある場合4位の  
水素のケミカルシフトは非常に低磁  
場へシフトしていることがわかる.



(X = C, Y = CH<sub>3</sub>)  
(X = N, Y = O)

このことはカルボ  
ニル基或はニトロ  
基の磁気異性性  
効果のためと考  
えられる。



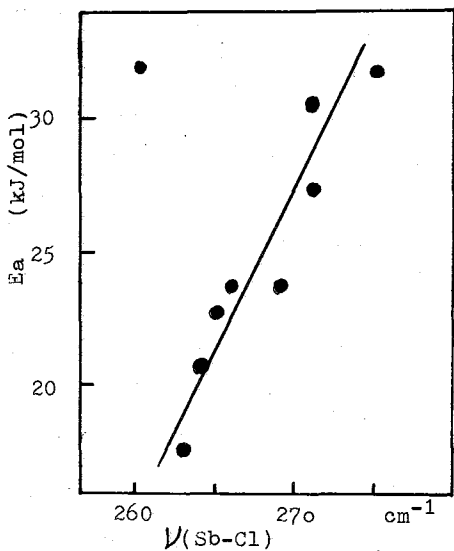


図3.  $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5\text{Sb}(\text{L})[\text{Cl}-\text{Br}]$ 系に於ける  $\nu(\text{Sb}-\text{Cl})$ :  $E_a$  プロット.

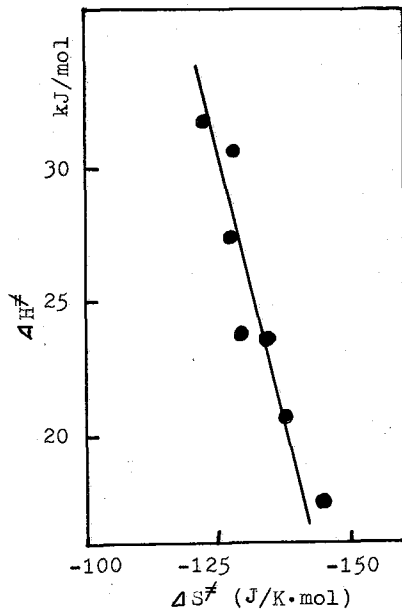
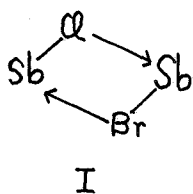


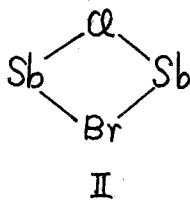
図4.  $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5\text{Sb}(\text{L})[\text{Cl}-\text{Br}]$ 系に於ける  $\Delta S^\ddagger$ :  $\Delta H^\ddagger$  プロット

配位子交換反応はフェニル基の数が多くなる程 1) 速度定数は小さくなり、2) 活性化エネルギーが小さくなり、3) 活性化エントロピーは負で大きくなる。ジフェニル化合物では 2), 3) の結果は顕著である。一オキシンの置換基の電気吸引性が大きくなる程 1) 速度定数は小さくなり、

2) 活性化エネルギーは大きくなり、3) 活性化エントロピーは正の方向に向うという結果が得られた。図2は  $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5\text{Sb}(\text{L})[\text{Cl}-\text{Br}]$ 系について Taft の  $\rho$  を使ってハメットプロットを示す。良い直線関係が得られた(相関係数 0.987,  $\rho = -1.31$ )。図3は同じ系について活性化エネルギーと  $\nu(\text{Sb}-\text{Cl})$  との関係を示したものである。



I



II

$\text{Sb}-\text{Cl}$  伸縮振動が高波数側に移動する程 活性化エネルギーが大きくなることが明らかである。1-カ-2-メチルオキシン錯体の場合はプロットは大きくはなれている。この事はメチル基の立体障害によるものと考えられる。 $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5\text{Sb}(\text{L})[\text{Cl}-\text{Br}]$ 系について配位子交換の

活性化状態は以上の結果より、[I] の様な  $\text{Sb}-\text{X}$  結合が緩むと共に相手側の  $\text{Sb}$  原子に配位した様なものと考えられる。一方  $(\text{CH}_3)(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Sb}(\text{L})[\text{Cl}-\text{Br}]$ 系では活性化エネルギーが小さく活性化エントロピーが負で絶対値が大きいことより活性化状態は [II] の様なものと考えた。図4は  $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5\text{Sb}(\text{L})[\text{Cl}-\text{Br}]$ 系の  $\Delta S^\ddagger$  対  $\Delta H^\ddagger$  を示してある。

1) 川崎 3: 第12回 NMR 討論会 1973. 広島.

2) Y. Kawasaki, Inorg. Nucl. Chem. Letter. 5, 805 (1969).

3) C. S. Johnson, Jr. Adv. Magn. Resonance, 1, 65 (1965). Academic Press, New York, N. Y.

(福井大工) 水野和子 神藤洋爾

## 1. 序

不活性溶媒中のアルコールのヒドロキシルプロトンの多重度については、アルコール、溶媒の精製が充分であれば、多重度が観測されることが定説になっている<sup>1</sup>。従って逆に、多重度が観測されれば、不純物は存在しないとされる一方<sup>2</sup>、観測されない場合には、酸などの混入が疑われることになる。ハロゲン化エタノールの四塩化炭素及びDMSO溶液におけるヒドロキシルプロトンは、いずれも多重度を示すことが、Moniz等<sup>3</sup>、及び Slocum等<sup>4</sup>によって報告されている。

我々は、ジペプチド化合物と 2-chloroethanol (2-ClEt-OH) との四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)溶液中での相互作用を、IR、NMR等で研究してきたのであるが<sup>5</sup>、水素結合の形成を検出するために、水を含まない試料溶液を真空ライン中で調整してきた所、2-ClEtOHのCCl<sub>4</sub>溶液のNMRにおいて、これ等の報告とは逆に、多重度を観測できなかった。一方ピペットを用いた試料の調整では、多重度(2-ClEtOHではtriplet)であり以後Tと記す)が観測されるのであるが、希釈が進むとSinglet(S)になった。我々は、このような変化が試料中に微量に存在する水と関係があるものと考え、以下のような実験、考察を行った。

## 2. 実験

**試料** 2-ClEtOH 及び CCl<sub>4</sub> (和光、試薬特級) は、MgSO<sub>4</sub>、及び P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> をそれぞれ脱水剤としてあらかじめ十分に脱水しておいたのち、新たにそれぞれ脱水剤・テフロン攪拌子と共に、真空ラインのアンプルに移して攪拌しておく。tetramethylsilane (TMS) はアセトン・ドライアイス中のアンプルから液体窒素中のアンプルに真空蒸留する。測定試料溶液は、pyrex製のNMR試料管、及び石英製IRセルを接続した試料用アンプルにアルコール、溶媒を真空蒸留して調整した。なお、調整前には必ずそれぞれ水の初留を真空蒸留して取り除いた。

**測定** 調整した溶液は、まずIR測定によって、不純物、水等が混入していないことを確認し、濃度を決定した後、NMR試料管に移してTMSを真空蒸留し、封じた後、NMR測定を行った。IRの測定はすべて21±1°Cにおいて行った。NMRの測定には日本電子4H-100型分光計、IRには日本分光A-3型分光計を使用した。IRのためのセルは、熔融石英製の光路長がそれぞれ0.5, 2, 20, 100 mmの4種類を、濃度に応じて用いた。これらのセルで測定できるアルコールの濃度は、 $3 \times 10^{-1} \sim 10^{-4}$  mole/l で、測定波長領域は4000~2700 cm<sup>-1</sup>であった。アルコールの濃度は、濃度によって回転異性体の比、含有率が異なること、及びピペットによる調整溶液では混入する水の吸収と重なるために、アルコールのOHが使えないので、アルキル部分の吸収について換算線を得、これより決定した。次に水分の有無の判定についてであるが、前述の方法で得られるCCl<sub>4</sub>中の水分は、100 mm光路長のセルでIRを測定しても、吸収が全く無いことと、吸収がある場合の吸

みずのせがこ しんどうようじ

光度と Carh-Fischer 法によって求めた  $\epsilon_{\max} = 24.8 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  より、 $10^{-6} \text{ mole/l}$  以下である。溶液中に存在する水に関しては後述する。

### 3. 結果と考察

#### 3-1. 温度の増加によるヒドロキシルプロトンの多重度の変化について

真空ライン中で前記のようにして調整した溶液のヒドロキシルプロトンは、 $22^\circ\text{C}$  において、neat から  $0.02 \text{ mole/l}$  の領域で S を示した。観測された S が 2-ClEtOH においては特に生成される危険性のある HCl 等に起因することがオーに疑われる。そこで、このような不純物とのプロトン交換反応であるか、アルコール分子にのみ基づく交換反応であるかを確かめるために、いくつかの濃度において、温度を増加させ NMR を測定した。結果を右側の濃度について、Table-1 に示す。明らかのように、 $0.042$ ,  $0.060 \text{ mole/l}$  の溶液は、温度の増加に伴って、ヒドロキシルプロトンのケミカルシフトの高磁場シフトと同時に S から T への多重度の変化を示し、T が現れる温度は濃度の増加と共に高くなり、 $0.11 \text{ mole/l}$  以上では、 $100^\circ\text{C}$  においても S または bS を保つ。この結果から、 $22^\circ\text{C}$  において、全濃度領域で観測される S は、酸などの不純物とのプロトン交換反応によるものではなく、アルコールの分子間相互作用に関係があるとしなければならぬ。我々が用いた測定機種では、 $0.02 \text{ mole/l}$  が NMR 測定可能な最小の濃度であるが、IR の測定によると、2-ClEtOH

Table-1. 温度増加による、ヒドロキシルプロトンのケミカルシフト\*、多重度\*\*の変化

| [2-ClEtOH] (mole/l)  |         |     |                      |         |     |                      |         |     |
|----------------------|---------|-----|----------------------|---------|-----|----------------------|---------|-----|
| $4.2 \times 10^{-2}$ |         |     | $6.0 \times 10^{-2}$ |         |     | $1.1 \times 10^{-1}$ |         |     |
| mole/l               | ケミカルシフト | 多重度 | mole/l               | ケミカルシフト | 多重度 | mole/l               | ケミカルシフト | 多重度 |
| 23 (°C)              | 171.8   | S   | 26 (°C)              | 171.9   | S   | 23 (°C)              | 195.5   | S   |
| 52                   | 165.5   | bS  | 50                   | 161.8   | bS  | 53                   | 172.9   | S   |
| 78                   | 158.1   | t   | 100                  | 154.7   | t   | 68                   | 165.7   | bS  |
|                      |         |     |                      |         |     | 100                  | 158.6   | bS  |

Table-2. 加えた水の濃度による、ヒドロキシルプロトンのケミカルシフト\*、多重度\*\*の変化

| [2-ClEtOH] (mole/l)         |         |     |                             |         |     |                             |         |     |
|-----------------------------|---------|-----|-----------------------------|---------|-----|-----------------------------|---------|-----|
| $3.0 \times 10^{-2}$        |         |     | $2.0 \times 10^{-1}$        |         |     | $2.2 \times 10^{-1}$        |         |     |
| [H <sub>2</sub> O] (mole/l) | ケミカルシフト | 多重度 | [H <sub>2</sub> O] (mole/l) | ケミカルシフト | 多重度 | [H <sub>2</sub> O] (mole/l) | ケミカルシフト | 多重度 |
| $0.0(\times 10^{-3})$       | 170.7   | S   | $0.0(\times 10^{-2})$       | 235.7   | S   | $0.0(\times 10^{-3})$       | 242.5   | S   |
| 4.0                         | 174.1   | bS  | 1.4                         | 237.6   | S   | 2.2                         | 249.6   | bS  |
| 9.0                         | 175.3   | t   | 7.0                         | 238.6   | t   | 4.4                         | 251.3   | bS  |
|                             |         |     |                             |         |     | 6.7                         | 253.9   | t   |

\* ケミカルシフトは TMS を起点とした低磁場方向への H<sub>2</sub> 値を示す。

\*\* 多重度はそれぞれ S = sharp singlet, bS = broad singlet, t = triplet を示す。

は、 $0.008 \text{ mole/l}$  当りから会合をし始め、 $0.02 \text{ mole/l}$  においてはすでに10%程度の分子が会合種として存在している。残念ながら我々は、温度可変のIR測定ができないので、Tが現れた時の温度において、会合種が存在しないことを確認できないのであるが、得られた結果から、 $22^\circ\text{C}$  において観測されるSは、アルコールの会合種内のプロトン交換に基づくもので、温度の増加によって、アルコールはモノマーとなり、モノマー同志の衝突回数が十分に小さいために、分子本来のTが観測されるものと考えられる。Dixon<sup>6</sup>はメタノールのシクロヘキサン、シクロペンタン、ベンゼン、四塩化炭素低濃度溶液において、前者ではヒドロキシルプロトンはSで、後二者ではTであると報告している。Sが現れる機構として、モノマーアルコールと会合種との間のプロトン交換反応に帰しているが、我々の実験結果からは、会合率が非常に小さい濃度においてさえもSであることを考えると、この観測されるプロトン交換反応にモノマーアルコールが全く関与しないとは考えにくいのであるが、引きがねになるのは、会合種におけるプロトン交換反応であると考えられる。

Sloucum等<sup>4</sup>は、 $66 \sim 0.2 (0.02 \text{ mole}) \text{ mole}\%$  においてTを得ており、分子内水素結合している gauche型が多く存在することと関連させているが、我々のIRの結果からは、これは全く不適当のように思われる。

### 3-2. 溶液中に加えた水の濃度と、ヒドロキシルプロトンのケミカルシフト・多重度の変化について。

次に、IRが測定できる濃度において、真空ライン中で調整した溶液に、異なる量の水を加え、NMRとIRを測定した結果をTable-2及びFig-1, Fig-2に示す。水は、イオン交換水をさらに精製蒸留して用いた。これらから明らかのように、水は $2\text{-ClEtOH}$ のヒドロキシルプロトンのケミカルシフトを低磁場シフトさせ、多重度をSからTへと変化させる。 $J_{\text{CH}_2\text{-OH}}$ は3-1においてと全く同じで、 $6.4$ であった。 $2\text{-ClEtOH}:\text{H}_2\text{O}$ のみかけのモル比が3:1ではいずれもTを示している。次にこの時のIRについて検討すると、まずFig.3に示されるように、 $\text{CCl}_4$ 中に存在する水のIRスペクトルは、 $2\text{-ClEtOH}$ がモノマーとしてしか存在しない濃度の溶液中に存在している水のIRスペクトルと一致することから、水-モノマーアルコール間の相互作用は起さないと考えられる。これに対して、Fig-2に示されるように、会合種が存在する溶液に水を加えると、会合種による吸収帯にかなりの増加が見られる。この現象は $2\text{-ClEtOH}$ のみに起るのではなく、 $\text{Et-OH}$ 等のアルキルアルコールについても共通であった。以上のような結果から、 $\text{CCl}_4$ 中のアルコールの会合種と水の間には、特別の相互作用があると考えなければならぬ。Table-2に見られるように、水を加えるとヒドロキシルプロトンは低磁場シフトすることから、水の酸素原子が、ヒドロキシルプロトンに配位すると考えられ、これはIRの結果によっても支持される。我々は3-1で、 $22^\circ\text{C}$ で観測されるSを、会合種におけるプロトン交換反応と関係があるとしたが、水を加えた場合のIR、NMRの結果はさらにこれを裏づけるものであると考えられる。すなわち、会合種の中に水分子が進入して、アルコールに配位し、プロトンをアルコールに固定化させる機構である。水が存在しない時にはSが、存在する時にはTが観測される。

Fig.-1.  
NMRスペクトラ

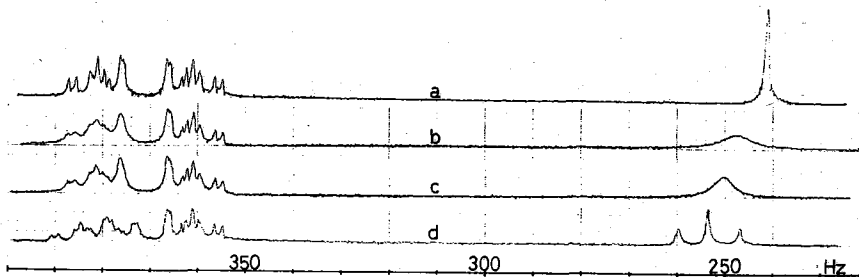


Fig.-2.  
IRスペクトラ

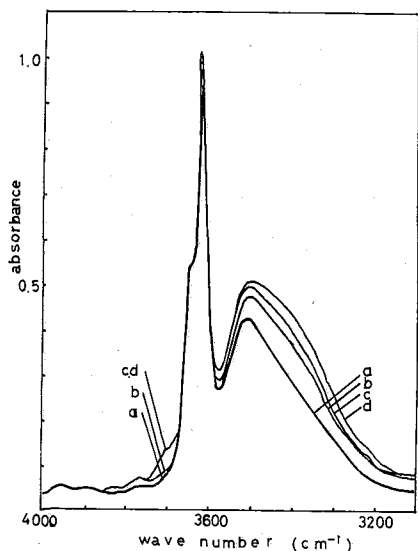
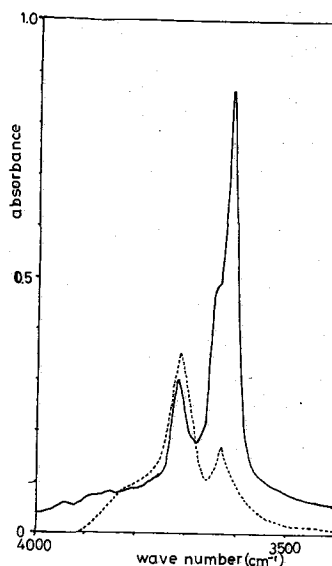


Fig.-1, Fig.2において、  
 a:  $[2\text{-ClEtOH}] = 0.22 \text{ mol}\%$   
 b, c, d は a に水を加えた場合で。  
 b:  $[\text{H}_2\text{O}] = 0.022 \text{ mol}\%$   
 c: " = 0.044 "  
 d: " = 0.066 "  
 である。

Fig.-3.  
IRスペクトラ

$[2\text{-ClEtOH}] = 7.4 \times 10^{-3} \text{ mol}\%$   
 [H<sub>2</sub>O] = 7.0 × 10<sup>-3</sup> mol%



以上、2-ClEtOHのヒドロキシルプロトンの多重度について述べてきたが、2-methoxy-ethanolについても同様の結果を得た。この2種のアルコールは、分子中にヒドロキシル基の酸素以外にプロトンアクセプターとなる原子を持っており、これが会合種におけるプロトン交換反応をよりしやすくするのではないが、もしくは、このプロトン交換反応に何等かの効果を及ぼしているのではないかと考えられるが、さらに溶媒であるCCl<sub>4</sub>の及ぼす効果も確かめる必要があり、溶媒を炭化水素とした場合、及びアルキルアルコール等の実験についても討論を行う予定である。

- 1) M.D. Joeste et al. "Hydrogen Bonding" Marcel Dekker, Inc. New York 1974, page 44. 2) T. Schaefer, J. Phys. Chem., **71**, 1888 (1975) 3) W.B. Moniz et al., J. Amer. Chem. Soc., **88**, 190 (1966) 4) D.W. Sloucum et al., Tetrahedron Lett., 3543 (1972) 5) 水野等, 日本生物物理学会第14回年報集 P175 (1975) 6) B. Dixon, J. Phys. Chem., **74**, 4221 (1970)

1) はじめに

アミノ基の結合した炭素の $^{13}\text{C}$ -NMR化学シフトはアミノ基への水素付加により、通常高磁場シフトを示す<sup>1)</sup>。これに対して、カルボン酸のカルボキシル炭素およびその結合した炭素の $^{13}\text{C}$ 化学シフトは水素脱離により低磁場シフトを示すことが知られている<sup>2)</sup>。このように水素原子の付加および脱離による $^{13}\text{C}$ 化学シフトの挙動はアミノ酸のpH変化によるシフト<sup>3)</sup>とも関連して興味をもたれている。 $^{13}\text{C}$ 化学シフトの変化は分子の電子状態の変動を明確に反映すると考えられることから、我々は前報<sup>4)</sup>でアニリン誘導体の水素付加について $^{13}\text{C}$ -NMR法および分子軌道法による検討を加え、 $^{13}\text{C}$ 化学シフトの変化はアミノ基への水素付加により窒素原子が $\text{sp}^2$ から $\text{sp}^3$ 混成へと変化することによる電子的效果が支配的であることを明らかにした。また、Reynoldsらは<sup>5)</sup>各種アミノ酸について、水素原子の付加および脱離による $^{13}\text{C}$ 化学シフトの変化を分子軌道法により考察している。

本報ではアニリン誘導体に引き続き、第2アミンやアミド基を有するアセトアニリド誘導体の水素付加について調べるために、DMSO溶液およびメタンスルホン酸溶液中における $^{13}\text{C}$ 化学シフトを測定し、さらにCNDO/2 MO法により中性分子および水素付加したカチオン分子の電子状態の計算を行なって、水素付加による $^{13}\text{C}$ 化学シフト差と電子密度変化との関係について検討した。

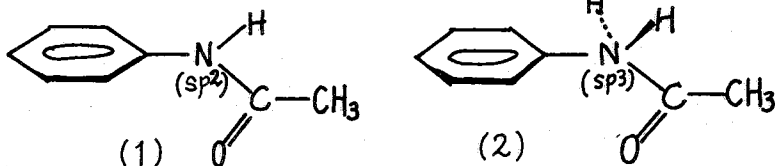
2) 実験

$^{13}\text{C}$ -NMRの測定  $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルの測定はDMSO溶液については日本電子製JNM-PS-100型分光計に同社製付属装置を使用し、フロン照射下、CW法により24°Cで4~8回の積算を行なった。メタンスルホン酸溶液はJNM-PS-100/PFT-100型分光計にEC-100コンピューター付属装置を使用し、フロン照射下、28°Cで100~500回の積算を行なった。測定試料はアセトアニリドおよびそのメタ置換体、パラ置換体であり、濃度はDMSO溶液は15~20 mol%, メタンスルホン酸溶液では5~8 mol%である。

分子の座標計算 座標計算に使用したアセトアニリドおよびそのカチオン分子図を(1)および(2)に示した。中性分子における環とアミド面との2面角は38°とした。

3) 結果および考察

$^{13}\text{C}$ 化学シフト アセトアニリド誘導体はアミド基のC-N結合が二重結合性を有するため、シス型とトランス型の存在が可能であるが、使用した



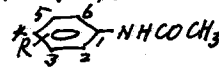
なかつたかきよ・おかげさしつよし・たなかしげゆき

溶媒中ではトランス型のみが存在することを確認した。表1に<sup>13</sup>C化学シフトの測定結果を示した。メタおよびパラ置換体における環炭素の化学シフトはSavitsky 則により帰属を行なった。しか

表 1. アセトアニリド誘導体の<sup>13</sup>C-NMR化学シフト

| R                 | C-1                    | C-2                                 | C-3                                 | C-4                                 | C-5                                 | C-6                                 | CO                     | CH <sub>3</sub>      |
|-------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------------|
| H                 | 140.6<br>133.9<br>-6.7 | 120.5<br>124.5<br>+4.0              | 129.8<br>130.8<br>+1.0              | 124.3<br>130.4<br>+6.1              | 129.8<br>130.8<br>+1.0              | 120.5<br>124.5<br>+4.0              | 169.8<br>177.8<br>+7.4 | 23.5<br>21.8<br>-1.8 |
| m-NO <sub>2</sub> | 141.5<br>134.8<br>-6.7 | 114.0<br>120.0<br>+6.0              | 149.0<br>149.4<br>+0.4              | 118.3<br>125.0<br>+6.7              | 130.7<br>132.1 <sup>x</sup><br>+1.4 | 125.7<br>130.9 <sup>x</sup><br>+5.2 | 170.3<br>179.0<br>+8.7 | 24.1<br>21.9<br>-2.2 |
| p-NO <sub>2</sub> | 146.7<br>139.5<br>-7.2 | 119.5<br>124.8 <sup>x</sup><br>+5.3 | 125.8<br>125.8 <sup>x</sup><br>±0.0 | 143.1<br>147.7<br>+4.6              | 125.8<br>125.8<br>±0.0              | 119.5<br>124.8<br>+5.3              | 170.5<br>179.2<br>+8.7 | 23.6<br>21.9<br>-1.7 |
| m-OH              | 141.5<br>134.9<br>-6.6 | 107.5<br>111.7<br>+4.2              | 158.8<br>156.8<br>-2.0              | 111.6<br>116.8 <sup>x</sup><br>+5.2 | 130.6<br>131.9<br>+1.3              | 111.2<br>117.5 <sup>x</sup><br>+6.3 | 170.0<br>177.3<br>+7.3 | 23.9<br>21.8<br>-2.1 |
| p-OH              | 132.2<br>127.0<br>-5.2 | 122.5<br>126.2<br>+3.7              | 116.3<br>117.4<br>+1.1              | 154.6<br>156.6<br>+2.0              | 116.3<br>117.4<br>+1.1              | 122.5<br>126.2<br>+3.7              | 169.4<br>176.4<br>+7.0 | 23.4<br>21.6<br>-1.8 |
| m-CH <sub>3</sub> | 140.5<br>133.8<br>-6.7 | 120.8<br>124.9<br>+4.1              | 139.0<br>141.1<br>+2.1              | 124.9<br>130.6 <sup>x</sup><br>+5.7 | 129.6<br>131.1 <sup>x</sup><br>+1.5 | 117.5<br>121.6<br>+4.1              | 169.5<br>177.1<br>+7.6 | 23.5<br>21.7<br>-1.8 |
| p-CH <sub>3</sub> | 138.2<br>131.4<br>-6.8 | 120.2<br>124.3<br>+4.1              | 130.2<br>131.2<br>+1.0              | 133.1<br>140.7<br>+7.6              | 130.2<br>131.2<br>+1.0              | 120.2<br>124.3<br>+4.1              | 169.6<br>176.7<br>+7.1 | 23.1<br>21.6<br>-1.8 |
| p-NH <sub>2</sub> | 129.8<br>135.3<br>+5.5 | 122.5<br>126.2<br>+3.7              | 115.3<br>126.2<br>+10.9             | 145.9<br>130.3<br>-15.6             | 115.3<br>126.2<br>+10.9             | 122.5<br>126.2<br>+3.7              | 169.3<br>178.5<br>+9.2 | 23.5<br>21.1<br>-2.4 |

上段:  $\delta$ DMSO, 中段:  $\delta$ CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H, 下段:  $\Delta\delta = \delta$ CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H -  $\delta$ DMSO  
(+) 低磁場シフト (ppm)



し、メタンスルホン酸溶液中におけるm-ニトロ置換体のC-5とC-6炭素、p-ニトロ置換体のC-2とC-3炭素、m-ヒドロキシ置換体のC-4とC-6炭素およびm-メチル置換体のC-4とC-5炭素はそれぞれのシフト差が小さく(1 ppm以内)、したがって入れ代わりうる可能性がある。

水素付加によるシフト。メタおよびパラ置換アセトアニリドのDMSO溶液中の化学シフトとメタンスルホン酸溶液中(水素付加)のそれとのシフト差を表1に示した。p-アミノ置換体を除いて、アミド基の結合している炭素(C-1)の化学シフトはアミド基への水素付加により5~7 ppmも高磁場シフトし、置換基の種類およびその結合位置による差違はみられないことがわかった。アミド基に対してオルト位炭素(C-2, C-6)は4~6 ppm, パラ位炭素(C-4)はp-ヒドロキシ置換体を例外として5~8 ppmの低磁場シフトがみられた。メタ位炭素(C-3, C-5)のシフト変化は非常に小さいことがわかった。このように水素付加による環炭素への効果はその大きさが交互に変化しており、アニリン誘導体におけるアミノ基への水素付加による効果と比較すると化学シフトの変化は小さいか同様な交互効果を示すことがわかった。アニリン誘導体と比べてシフト変化が小さいことは第1アミンと第2アミンの違いによるものと考えられる。アミド基のカルボニル炭素の化学シフトは窒素原子位への水素付加では高磁場シフトが考えられるが、7~8 ppm低磁場シフトすることから、このことはカルボニル炭素の酸素原子位への水素付加も起っていると考えられる。p-アミノ置換体の化学シフトの挙動が他の

置換体と異なるのはアミノ基への水素付加のためと考えられる

表 2. 全電子密度およびπ電子密度差 (×10<sup>3</sup>)

| R  | C-1    | C-2   | C-3   | C-4    | C-5   | C-6   | CO    | CH <sub>3</sub> |
|--|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-----------------|
| H  | +50.7  | -34.5 | -13.9 | -40.9  | -13.1 | -30.6 | +32.4 | +7.5            |
|  | +119.7 | -31.0 | -14.4 | -70.2  | -11.9 | -23.9 | —     | —               |
| m-NO <sub>2</sub>                            | +47.0  | -28.2 | -20.9 | -33.6  | -14.3 | -24.5 | +33.8 | +7.0            |
|  | +116.5 | -23.3 | -24.2 | -60.7  | -13.8 | -13.5 | —     | —               |
| p-NO <sub>2</sub>                            | +55.5  | -36.7 | -6.3  | -47.6  | -5.0  | -32.7 | +33.4 | +7.0            |
|  | +130.4 | -34.1 | -3.3  | -79.7  | -0.7  | -26.8 | —     | —               |
| m-OH   | +49.5  | -30.3 | -16.6 | -39.2  | -12.8 | -28.7 | +32.7 | +7.4            |
|  | +118.1 | -26.5 | -18.8 | -68.5  | -11.6 | -20.7 | —     | —               |
| p-OH   | +55.6  | -35.8 | -10.0 | -42.4  | -10.4 | -31.7 | +32.4 | +7.6            |
|  | +128.6 | -32.2 | -9.4  | -73.6  | -8.6  | -25.1 | —     | —               |
| m-CH <sub>3</sub>                            | +49.5  | -27.8 | -21.7 | -34.9  | -13.9 | -26.2 | +31.7 | +7.5            |
|  | +117.0 | -23.4 | -24.9 | -63.5  | -12.7 | -16.6 | —     | —               |
| p-CH <sub>3</sub>                            | +57.4  | -36.4 | -6.7  | -47.1  | -5.8  | -32.6 | +31.0 | +7.5            |
|  | +131.4 | -33.5 | -6.0  | -80.5  | -3.3  | -26.3 | —     | —               |
| p-NH <sub>2</sub>                            | +59.4  | -36.5 | -8.2  | -43.3  | -7.2  | -32.6 | +30.9 | +7.7            |
|  | +135.3 | -32.8 | -7.3  | -71.4  | -4.5  | -25.7 | —     | —               |
| p-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> <sup>a)</sup> | -18.6  | -32.9 | -61.4 | +22.3  | -61.0 | -28.8 | +32.5 | +8.7            |
|  | +8.2   | -23.8 | -77.5 | +110.9 | -75.6 | -16.6 | —     | —               |

$\Delta Q = Q_{\text{cation}} - Q_{\text{free}}$ , (+) 増加, 下段: π電子  
a) dication と 12 計算.

窒素原子位に水素付加したカチオン分子について、それぞれ CND0/2 法による計算を行なった。その結果を表 2 に示した。C-1 炭素では水素付加により電子密度が大きく増加し、オルト位、メタ位およびパラ位炭素では減少しているが、メタ位ではその変化値は小さく、化学シフトの変化と対応することかわかった。カルボニル炭素では電子密度は増加しており、化学シフトの変化とは逆であることかわかった。このことはカルボニル炭素位には他の効果が大きく寄与していることを示唆している。そこで、アセトアニリド類はメタンスルホン酸溶液中ではカルボニル基の酸素原子への水素付加も考えられることから、アセトアニリドについてカルボニル基の酸素原子に水素付加したカチオン分子について電子密度の計算を行なった。その結果、カルボニル炭素位的全電子密度が大きく減少し、実測値と対応することかわかった。したがって、アセトアニリド類においてはカルボニル基の酸素原子への水素付加も起こっていると考えられる。p-アミノ置換体については、アミノ基へも水素付加したジカチオン分子について計算したところ、電子密度の変化値が実測シフト差とよく対応することかわかった。

シフト変化の実測値と計算値。アミド基への水素付加による化学シフトに対する電子的効果を推定するために、Nelson らが置換ベンゼンについて提案している / 電子あたり、182 ppm の化学シフト値を使用し、電子密度の変化値 ( $\Delta Q$ ) から化学シフト差 ( $\Delta\delta$ ) を算出した。その結果を表 3 に示した。環炭素においては実測値よりも計算値が大きく



なること  
がわかつた。また、カルボニル炭素では実測値と計算値とは逆になることから、アセトアニリドについてカルボニル基の酸素原子に水素付加したジケオン分子の計算を行った。その結果を表4に示した。

表3. 全電子密度差から計算したシフト変化 (182ppm/e)

| R                               | C-1   | C-2  | C-3   | C-4  | C-5   | C-6  | C=O  | CH <sub>3</sub> |
|---------------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|------|-----------------|
| H                               | -9.2  | +6.3 | +2.5  | +7.4 | +2.4  | +5.6 | -5.9 | -1.4            |
| m-NO <sub>2</sub>               | -8.6  | +5.1 | +3.8  | +6.1 | +2.6  | +4.5 | -6.2 | -1.3            |
| p-NO <sub>2</sub>               | -10.1 | +6.7 | +1.1  | +8.7 | +0.9  | +6.0 | -6.1 | -1.3            |
| m-OH                            | -9.0  | +5.5 | +3.0  | +7.1 | +2.3  | +5.2 | -6.0 | -1.3            |
| p-OH                            | -10.1 | +6.5 | +1.8  | +7.7 | +1.9  | +5.8 | -5.9 | -1.4            |
| m-CH <sub>3</sub>               | -9.0  | +5.1 | +3.9  | +6.4 | +2.5  | +4.8 | -5.8 | -1.4            |
| p-CH <sub>3</sub>               | -10.4 | +6.6 | +1.2  | +8.6 | +1.1  | +5.9 | -5.6 | -1.4            |
| p-NH <sub>2</sub>               | -10.8 | +6.6 | +1.5  | +7.9 | +1.3  | +5.9 | -5.6 | -1.4            |
| p-NH <sub>3</sub> <sup>a)</sup> | +3.4  | +6.0 | +11.2 | -4.1 | +11.1 | +5.2 | -5.9 | -1.6            |

(+) 低磁場シフト (ppm), a) dicationとして計算

表4. カルボニル酸素位への水素付加の電子密度の計算値

|                          | C-1    | C-2    | C-3    | C-4    | C-5    | C-6    | C=O    | CH <sub>3</sub> |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| Q                        | 3.8952 | 4.0117 | 3.9668 | 3.9804 | 3.9662 | 4.0246 | 3.5564 | 4.1020          |
| $\Delta Q (\times 10^3)$ | +37.1  | -29.4  | -11.0  | -31.8  | -11.1  | -7.7   | -82.2  | +14.4           |
| $\Delta \delta$ (a)      | -6.6   | +5.4   | +2.0   | +5.8   | +2.0   | +1.3   | +15.0  | -2.6            |

$\Delta Q = Q_{\text{cation}} - Q_{\text{free}}$ , a) シフト変化の計算値, CC(=O)N

表からわ

かるようにカルボニル炭素の電子密度差から計算したシフト値は実測値と同様に低磁場シフトとなるが、実測値に比べて非常に大きくなることわかった。メタンスルホン酸溶液中における実測値はアミド基の窒素原子と酸素原子の両位置に水素付加したジケオン状態を表示していると考えられることから、ジケオン分子について計算する必要があり、これについては現在計算中である。

以上のことから、アセトアニリド誘導体のメタンスルホン酸溶液中の化学シフトがDMSO溶液中のそれと比べて大きく変化することはアミド基の窒素原子と酸素原子に水素付加することによる電子的効果が大きく寄与していると考えられる。

パルスNMRスペクトルの測定をして戴いた国立がんセンター研究所、大木豊和氏に感謝します。

文献 1) W. J. Horsely, H. Sternlicht, J. Am. Chem. Soc., 90, 3738 ('68).

2) R. Hagen, J. D. Roberts, ibid., 91, 4504 ('69).

3) H. Saito, I. C. P. Smith, Arch. Biochem. Biophys., 158, 154 ('73).

4) 永日親清, 沢田 修, 田中誠之, 日化誌, 1976, 1029 ('76).

5) W. F. Reynolds, I. R. Peat, M. H. Freedman, J. R. Lyerla, Jr. Can. J. Chem., 51, 1257 ('73).

(緒言) 遷移金属イオンとアミノ酸との水溶液中における相互作用の研究は、これらの金属を有し、効率良く反応を促進する酵素等の構造、電子状態、並にその機能を考察する上で有用な知見を与えるものと考えられる。核磁気共鳴法は、水溶液中の分子、金属イオン等の相互作用を研究する上で有用であることが、既に示唆されてきており、溶液の固体とは異なった特異性を知る上で重要な方法であると考えられる。しかしながら、従来、核磁気共鳴を用いた方法は、シフトに関する議論が主であり、分子の運動状態を鋭敏に反映する緩和時間については、最近、研究が行われ出したが、基本的な問題で未解決な点や、不十分な点が多く残されているため、余り多くの仕事が行われていない。それ故、緩和時間を観測し、追究することにより、多くの情報を引き出し得る方法を研究することは、重要であると考えられる。著者は、昨年の討論会に於て、ヒスチジン・コバルト錯体の水溶液中、 $\text{pH}$ 変化による $^{13}\text{C}$ nmr常磁性シフトと線幅(横緩和時間の逆数)を観測した結果を報告した。ここでは、常磁性シフトに対しては、電子スピンドensityを、線幅に関しては、緩和機構を考察することにより、ヒスチジン・コバルト錯体在水溶液中における、その官能基と金属イオンとの相互作用に注目して議論した。本研究では、上記錯体の $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ 緩和時間を観測して、その緩和機構を調べた。そして、その支配的な機構について、通常、金属イオン上の不対電子スピンドと、リガンド核間の双極子相互作用よりむしろ、リガンド核における $p$ -軌道に流れた電子スピンドとその核との双極子相互作用が重要であるという知見が得られた。

(実験) 用いたアミノ酸は市販のL-ヒスチジンであり、遷移金属は市販の塩化コバルトを使用した。試料調製は、1ccの重水に約0.6Mのヒスチジンを加え、 $\text{conc HCl}$ を用いて $\text{pH} \sim 1$ 以下の酸性条件下に溶解し、塩化コバルトをこれに加え、適当な濃度とした。 $\text{pH}$ は、 $\text{conc NaOH}$ を加えて、必要とする値に調節し、測定には、 $\text{pH}$ -ターを使用し、読みをそのまま用いた。この調製にあたっては窒素雰囲気下で行われた。プロトコルは、コバルト錯体溶液も同様に行った。

緩和時間測定  $^{13}\text{C}$  T<sub>1</sub>測定は、10mmφサンワール管を用いて、JNM PFT 100 Aのトドメターを使用し、29°C, 25.15 MHzにて、 $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$  sequence ( $90^\circ$ パルス 29  $\mu\text{sec}$ )で行った。 $^1\text{H}$  T<sub>1</sub>測定は、5mmφサンワール管を使用し、パリアン HR-220 Aのトドメターに Nicolet FT 100 コンセントレーターシステムを接続した $^1\text{H}$  FT 変換 NMRを用い、20°C, 220 MHzにて、 $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$  sequence ( $90^\circ$ パルス 36  $\mu\text{sec}$ )で行った。T<sub>1</sub>値の計算は、exponential関数を組み込んだ最小二乗法プログラムを用いて行った。

きたがわ すずむ

よしかわ けんいち

もりしま いさお

(結果と考察) ヒスチジンの諸官能基は、水溶液中、特定のpH領域で、コバルトイオンと特異的な相互作用をする。即ち、低いpH (<4) では、カルボキシル基が、中間のpH (4~8) その官能基の中で、特にイミダゾール基がコバルトイオンと優先的に相互作用をする。(Fig.1)

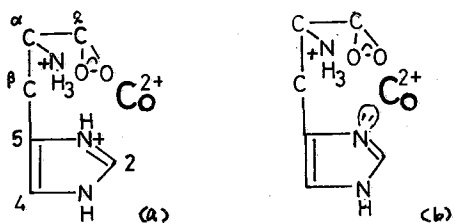


Fig. 1, ヒスチジン・コバルトイオン相互作用図  
(a) 低いpH領域 (b) 中間のpH領域

既に<sup>13</sup>C nmrを用いて、ヒスチジン・コバルト水溶液系の常磁性シフト、線幅を観測し、その結果を前記考察と合わせて報告<sup>(2)</sup>したが、その際、カルボキシル基がコバルトイオンと結合した場合に、 $\alpha$ 位の核の常磁性シフト、線幅の値が、 $C_{\beta}$ 核(カルボキシル炭素核)のそれらに比べて大きい事実があり、シフトに關してはスピ<sup>2</sup>伝達機構から議論したが、線幅については不十分な説明がなされなかった。このことを明らかにする

ために、さらにヒスチジンのイミダゾール基とコバルトイオンとの相互作用についての知見を深めるために、この錯体の<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H緩和時間を測定し、T<sub>1</sub>スワクトル(H)の一例をFig. 2に示して、得られたT<sub>1</sub>の値を表-1にまとめて示した。この系は、化学交換による効果を受けるために、観測されるT<sub>1</sub>の値は次式で表わされ<sup>(3)</sup>、表-1には、この値をのせた。

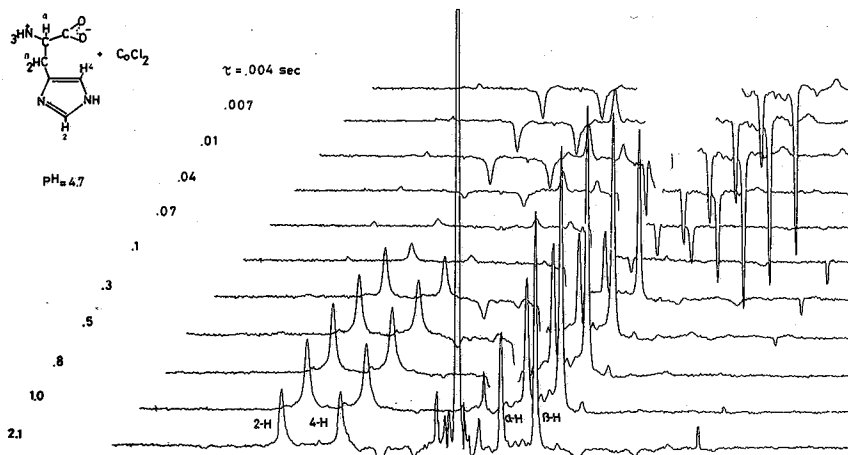


Fig. 2, ヒスチジン・コバルト錯体の<sup>1</sup>H T<sub>1</sub>緩和時間スペクトル。

表-1. ヒステジン・コバルト錯体の <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H, 緩和時間

| sec                               | C <sub>0</sub> | C <sub>α</sub>  | C <sub>β</sub> | C <sub>γ</sub> | C <sub>δ</sub> | C <sub>ε</sub> |
|-----------------------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <sup>13</sup> C Tip <sup>*1</sup> | 0.15<br>±0.03  | 0.083<br>±0.006 | 0.12<br>±0.02  | 0.14<br>±0.02  | 0.14<br>±0.02  | 0.14<br>±0.02  |
|                                   |                | α-H             | β-H            | γ-H            | δ-H            |                |
| <sup>1</sup> H Tip <sup>*2</sup>  |                | 0.15<br>±0.02   | 0.13<br>±0.02  | 0.07<br>±0.02  | 0.10<br>±0.02  |                |

\*1 <sup>13</sup>C T<sub>1</sub> 測定に際して; 29°C, pH=4.7, [Co<sup>2+</sup>]/[His] = 0.068

\*2 <sup>1</sup>H T<sub>1</sub> : : ; 24°C pH=4.7. [Co<sup>2+</sup>]/[His] = 0.035

$$T_{ip}^{-1} = (T_{i obs})^{-1} - (T_{i dia})^{-1} = \rho\beta / (c_M + T_{1H}) \dots (1)$$

ここで T<sub>i obs</sub> は観測される緩和時間, T<sub>i dia</sub> はコバルトイオンを含まない系の緩和時間, ρ はヒステジン・コバルト濃度比, β は配位数であり, c<sub>M</sub> は錯体状態における寿命時間である。T<sub>1H</sub> は Solomon-Bloembergen の式により表わされる量である。即ち, コバルトイオンを含む系の場合,

$$T_{1M}^{-1} = T_{2M}^{-1} = \left[ \frac{7}{3} \cdot \frac{S(S+1)g^2\beta^2\gamma^2}{r^6} + \frac{2}{3} \frac{S(S+1)A^2}{\hbar^2} \right] \tau_S \dots (2)$$

と表わされる。又、τ<sub>S</sub> は電子スピン緩和時間 (コバルトの場合 τ<sub>S</sub> ~ 10<sup>-13</sup> sec<sup>(4)</sup>。その他の相関時間に対して、この時間が支配的である), r は金属イオン・リガント核間距離, A は超微細結合定数である。ヒステジン・コバルト系に関して、pH ~ 5 における c<sub>M</sub> は緩慢の温度変化から c<sub>M</sub> ~ 10<sup>-9</sup> sec が得られており<sup>(5)</sup>。この値に基づいて、c<sub>M</sub> < T<sub>1H</sub> と仮定すると (1) 式は

$$T_{ip}^{-1} = \frac{\rho\beta}{T_{1M}} \dots (3)$$

と表わされる。(3) 式を基に、表-1 を考察する。<sup>13</sup>C Tip に際しては、C<sub>α</sub> 核のそれがいちばん短く、他の核は同じ程度の値を持っている。これは、Co<sup>2+</sup> からの距離が C<sub>γ</sub> 核と C<sub>α</sub> 核とほぼ同じであると (表-2) 考慮しても、r<sup>-6</sup> は緩和時間から比例する (2) 式第 1 項の通常の大極子相互作用による緩和機構では説明できない。一方 <sup>1</sup>H Tip に至っても、Im に属する核の Tip が最も短く、H<sub>β</sub> が H<sub>α</sub> より短い事実は前述と同じことが言える。そこで、ヒステジン残基核の常磁性シフト値を用いて、isotropic シフトの仮定の基に、A 値を計算し、Tip の寄与を見積った値を表-2 に示した。さらに、双極子相互作用項についても、X-線データ<sup>(6)</sup> に基づいて、その距離から計算し、表-2 に示した。この表から明らかのように、スカラー項による緩和時間への寄与は無視しうる程度の大きさであり、双極子項において、比較的寄与が

表-2. ヒステジン・コバルト錯体の <sup>13</sup>C Tip の数値計算値

|   | C <sub>0</sub>    | C <sub>α</sub>    | C <sub>β</sub>    | C <sub>γ</sub>    | C <sub>δ</sub>    | C <sub>ε</sub>    |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| exp. (ρβ/T <sub>ip</sub> ) <sup>-1</sup>                            | 50                | 90                | 62                | 53                | 53                | 53                |
| calc. <sup>*1</sup> (T <sub>ip</sub> <sup>dia</sup> ) <sup>-1</sup> | 11.5              | 11.5              | 3.8               | 9.5               | 1.2               | 7.3               |
| calc. <sup>*2</sup> (T <sub>ip</sub> <sup>sc</sup> ) <sup>-1</sup>  | ~10 <sup>-4</sup> | ~10 <sup>-4</sup> | ~                 | ~10 <sup>-2</sup> | ~10 <sup>-2</sup> | ~10 <sup>-3</sup> |
| γ A <sup>2</sup>  | 2.96 <sub>3</sub> | 2.96 <sub>2</sub> | 3.56 <sub>7</sub> | 3.05 <sub>7</sub> | 4.34 <sub>4</sub> | 3.19 <sub>8</sub> |

\*1 (2) 式 第 1 項

\*2 (2) 式 第 2 項

考えられるが、実験値と良い一致を示している。

今予で、金属イオンに局在する不対電子スピンヒリガント核内の双極子相互作用を考察してきたが、最近 Doddrell<sup>(7)</sup>は、遷移金属アセチルアセトナート錯体について、リガントに分布する不対電子スピンの観測核との双極子相互作用による緩和機構<sup>(8)</sup>、スピンの密度分布が十分小さいにもかかわらず支配的な緩和機構となることを理論的に考察し、議論を進めている。一方 Espersen<sup>(9)</sup>も、Cu-Imidazole系に関して同様の考察を行っており、本研究においても、リガントに分布した電子スピンによる双極子緩和機構を考慮して議論を進めると、観測される核の  $T_{1\rho}$  は次式のように書かれる。

$$(T_{1\rho})^{-1} = \frac{2}{3} g^2 \beta^2 \gamma_{IC}^2 S(S+1) \cdot \tau_s [ \rho_M^2 r_{MH}^{-6} + \rho_L^2 r_{LH}^{-6} ] \quad \dots (4)$$

ここで  $\rho_M$  は金属イオン上の不対電子スピン密度、 $\rho_L$  はリガントの観測核上の p-orbital にあける不対電子スピン密度であり、 $r_{MH}$  は  $C_{13}$  と観測核 (13C) 間距離、 $r_{LH}$  は観測核 L の核上 p-orbital に存在する不対電子スピン間距離である。(4)式に従って  $\rho_L^2 r_{LH}^{-6}$  を求めると表-3の結果が得られる。さらに  $^1H$  緩和時間(表-1)から計算した  $\rho_L^2 r_{LH}^{-6}$  もも示した。すなわち、 $^1H$  の場合

$$(T_{1\rho})^{-1} = \frac{2}{3} g^2 \beta^2 \gamma_{1H}^2 S(S+1) \cdot \tau_s [ \rho_M^2 r_{MH}^{-6} + \rho_L^2 r_{LH}^{-6} ] \quad \dots (5)$$

と表わされ、 $\rho_M, \rho_L$  は式(3)と同い量である。 $r_{MH}$  は、 $^{13}C$ 核とそれと結合する  $^1H$ 核間距離を示している。表-3から、イミダゾール  $^1H, ^{13}C$  については  $(\rho_L^2 r_{LH}^{-6})_{C_{13}}^{13C} / (\rho_L^2 r_{LH}^{-6})_{C_{13}}^{13C} \sim (\rho_L^2 r_{LH}^{-6})_{\alpha-H}^{13C} / (\rho_L^2 r_{LH}^{-6})_{\beta-H}^{13C}$  が成立し、このことから、この考え方の妥当性が裏付けされる。一方、 $^{13}C_{\alpha}, ^{13}C_{\beta}, \alpha-H, \beta-H$  に関しては、 $\rho_L^2 r_{LH}^{-6}$  の値の比が一致しない。これは  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  層格が、イミダゾール基の場合と比べて層格がないことから、スピンの分布が、1つの p-orbital のみに大きく分布していると考えられることから、この量については全ての p-orbital を考慮に入れ解析する必要があることを示唆している。カルボキシル基に関しては  $\alpha$  位と  $\beta$  位の  $C_{13}$  系に関する表-3. リガント分布不対電子スピン項

|                                    | $C_{\alpha}$ | $C_{\beta}$ | $C_{\gamma}$ | $C_{\delta}$ | $C_{\epsilon}$ |
|------------------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|----------------|
| $^{13}C$<br>$\rho_L^2 r_{LH}^{-6}$ | 0.005        | 0.010       | 0.007        | 0.006        | 0.007          |
|                                    | $\alpha-H$   | $\beta-H$   | $\gamma-H$   | $\delta-H$   | $\epsilon-H$   |
| $^1H$<br>$\rho_L^2 r_{LH}^{-6}$    | 0.0005       | 0.0007      | 0.001        | 0.001        |                |

場合も、やはり前記議論が成立すると考えられ、このことは、ヒステジンのような  $\alpha$  位と  $\beta$  位に対してだけならず、一般のカルボキシル基に  $C_{13}$  との相互作用においても現われる傾向であると考えられる。

ヒステジン-コハルチ系に関して、 $^1H$  緩和時間は、リガントに分布した電子スピンによる双極子相互作用緩和機構の寄与を大きく受けることがわかった。即ち  $^{13}C$  核については、全体の  $C_{\alpha}$  77%,  $C_{\beta}$  87%,  $C_{\gamma}$  97%,  $C_{\delta}$  82%,  $C_{\epsilon}$  88%,  $C_{\zeta}$  86% である。従ってこの種の系に関しては、常磁場中  $\alpha$  位と  $\beta$  位に、スピンの分布に関する有用な知見が緩和時間の観測から得られ、リガント分子の電子状態に関する情報が得られることが期待される。

表-4 Propionic acid- $C_{13}$ 系

|  | $C_{\alpha}$  | $C_{\beta}$   |
|--|---------------|---------------|
| $T_{1\rho}^{-1}$                                   | $1.0 \pm 0.2$ | $0.6 \pm 0.1$ |
| $\Delta\delta$ ppm                                 | -1.9          | -8.3          |
| $\rho^2 r^{-6}$                                    | 0.0005        | 0.002         |
| *1. 29°C, pH=9.0, $[C_{13}^{2+}]_{[Prop]} = 0.017$ |               |               |
| *2. 28°C $[C_{13}^{2+}]_{[Prop]} = 0.053$          |               |               |

(文献) (1) 北川訓壽, '75 日化春季年会.  
(2) '75 年 14 回 NMR 討論会.  
(3) Z. Luz, et al., J. Chem. Phys., 60, 2086 (1969).

(4) J. Fisinger, et al., J. Chem. Phys., 42, 43 (1962). R.G. Shulman, et al., J. Chem. Phys., 41, 3116 (64).  
(5) 北川訓壽, '76 日化春季年会. (6) M.M. Harding, et al., J. C. S., (A) 2554 (1968)  
(7) D.M. Doddrell, et al., C. P. Lett., 31, 85 (1976) (8) W.G. Espersen, et al., J. A. C. S., 98, 60 (1976)

# ピラチン類の<sup>13</sup>C-NMR

P-1-7

(城西大理・都老人研・東薬大) 栗原照夫・松尾光芳・○松本茂信  
太田明宏・渡辺徳広・秋田守男

(序) 含窒素複素6員環の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、トリアジンについて若干の報告がなされているが、ピラチンについては、無置換および、対称構造を持つ2,3-ジメチル誘導体についての報告<sup>1)</sup>があるのみである。また、含窒素複素芳香環のN-オキッド化合物に関しては、メチルピリジンN-オキッドの化学シフトの検討<sup>2)</sup>および、ピリダジンN-オキッドの炭素-水素結合定数についての研究<sup>3)</sup>があるのみで芳香環N-オキッド類の<sup>13</sup>C-NMRのデータは未だ不十分である。本研究は2,5種のメチルおよびフェニル置換ピラチンおよびそのN-オキッドを合成し、ピラチン核炭素の性質を他の芳香環と比較するとともに、対応するN-オキッド化合物から、ピラチン環のN-オキッド化による<sup>13</sup>C-NMR上の変化を、化学シフト、<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 結合定数について検討した。さらに、CNDO/2法により計算した全電子密度と化学シフトの関係についても検討を行った。

(実験) <sup>13</sup>C-NMRスペクトルは Varian 社製 XL-100-12 スペクトロメータにて測定した。化学シフトは、試料 1mM を重クロロホルム 1ml に溶解し(難溶性化合物は飽和濃度)、TMS を内部基準として測定した。また、<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 結合定数は試料約 500mg を重アセトン 0.5ml に溶解し、gated decoupling 法により求めた。

(結果・考察) 1) 化学シフト

化学シフトの帰属は off-resonance decoupling 法、置換基効果による推定、また一部化合物では T<sub>1</sub> の測定や gated decoupling により得られたスペクトルを解析して行った。また、帰属の困難なフェニルピラチンN-オキッドはピラチン核を重水素化した化合物を合成し、そのスペクトルを比較することにより決定した。

ピラチンの<sup>13</sup>C化学シフトは 145.3ppm。メチル及びフェニル置換体では 139.0~154.3ppm の範囲であるが、N-オキッド基導入により、その範囲は 128.7~158.1ppm と広がり、

一部ベンゼン核炭素と重なった。(表 1)

メチル基の置換基効果は、置換炭素について 8.9ppm の低磁場シフト(+), パラ位に対し 3.3ppm の高磁場シフト(-) とはベンゼン核同様の値を示したのに対し、オルト位(-0.4ppm), メタ位(-1.3ppm) に対する効果はかなりの差がみられた。フェニル基の置換基効果は C<sub>subst</sub>; +7.6, C<sub>o</sub>; -3.0, C<sub>m</sub>; -1.0, C<sub>p</sub>; -2.1 (ppm) となり、ベンゼン核と比べ置換炭素の低磁場シフトは小さくなっているが、オルト位およびパラ位への影響はかなり大きくなっている。ニ置換体では、2,5- または 2,6-ニ置換の場合は、メチル、フェニル基とも、かなりよい置換基効果の加成性がみられている。それに対し、2,3-ニ置換、即ちオルト位に他の置換基が存在する場合は、ジメチル体をはじめ計算値との不一致がみられた。

N-オキッド基の効果は、無置換の場合、N-オキッドに隣接する炭素に対し、11.1ppm の

くりはらてるお、まつおみつよし、まつもとしげのぶ、おおたあきひろ、わたなべとくひろ、あきたやすお

高磁場シフト、隣接しない炭素に対しては2.7ppmの低磁場シフトが観察された。メチルおよびフェニル置換体においても、すこし数値的なばらつきはあるもののほぼ同様な効果を示し、隣接する炭素は約10ppm程度の高磁場シフト、隣接しない炭素には3ppm程度の低磁場シフトとなっている。また、メチル基はN-オキシドに隣接する炭素に置換されている場合は平均して7ppm程度高磁場へシフトした。フェニル置換基へのN-オキシド基の影響は主にC-1'に対して観察され、N-オキシドに接して置換されている場合は、約7ppmの高磁場シフト、逆の場合は2ppm程度の高磁場シフトとなった。

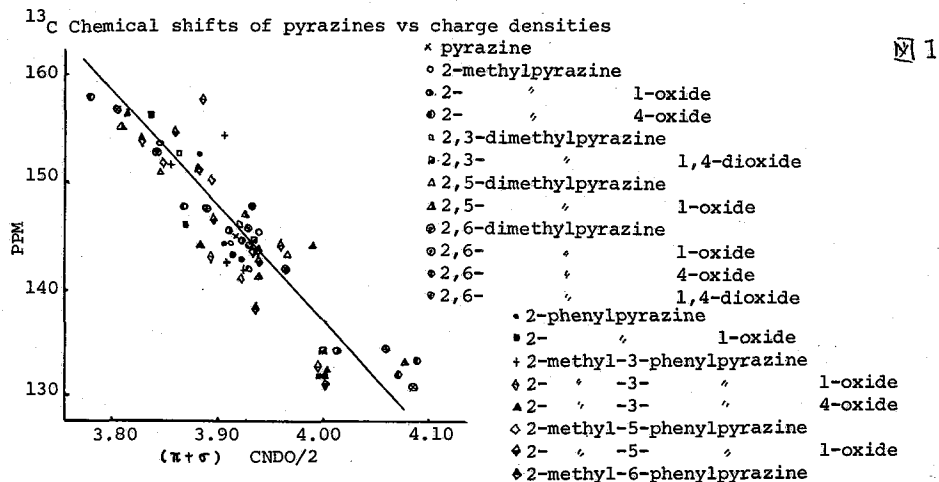
以上のようなピラジン核炭素のN-オキシド化による変化はピリジンの場合と類似してお

表1 <sup>13</sup>C Chemical shifts of pyrazines and their N-oxides

| Substituent                  | C-2   | C-3   | C-5   | C-6   | C-1'  | C-2'  | C-3'  | C-4'  | CH <sub>3</sub> |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|
| Nil                          | 145.3 | 145.3 | 145.3 | 145.3 |       |       |       |       |                 |
| 1-oxide                      | 134.2 | 148.0 | 148.0 | 134.2 |       |       |       |       |                 |
| 2-methyl                     | 154.2 | 144.9 | 142.0 | 144.0 |       |       |       |       | 21.7            |
| 2-methyl 1-oxide             | 144.6 | 148.2 | 145.6 | 133.8 |       |       |       |       | 14.5            |
| 2-methyl 4-oxide             | 158.1 | 133.1 | 131.6 | 146.9 |       |       |       |       | 21.8            |
| 2,3-dimethyl                 | 153.3 | 153.3 | 146.1 | 146.1 |       |       |       |       | 21.4            |
| 2,3-dimethyl 1-oxide         | 143.2 | 156.5 | 143.2 | 132.1 |       |       |       |       | 12.8(2)22.5(3)  |
| 2,3-dimethyl<br>1,4-dioxide  | 145.9 | 145.9 | 133.7 | 133.7 |       |       |       |       | 14.1            |
| 2,5-dimethyl                 | 150.6 | 143.5 | 150.6 | 143.5 |       |       |       |       | 21.0            |
| 2,5-dimethyl 1-oxide         | 141.3 | 146.9 | 155.1 | 132.5 |       |       |       |       | 14.0(2)21.3(5)  |
| 2,6-dimethyl                 | 152.9 | 141.7 | 141.7 | 152.9 |       |       |       |       | 21.5            |
| 2,6-dimethyl 1-oxide         | 145.6 | 144.0 | 144.0 | 145.6 |       |       |       |       | 14.7            |
| 2,6-dimethyl 4-oxide         | 156.9 | 130.4 | 130.4 | 156.9 |       |       |       |       | 21.7            |
| 2,6-dimethyl<br>1,4-dioxide  | 146.6 | 134.0 | 134.0 | 146.6 |       |       |       |       | 15.3            |
| 2-phenyl                     | 152.9 | 142.3 | 143.1 | 144.3 | 136.5 | 127.1 | 129.2 | 130.0 |                 |
| 2-phenyl 4-oxide             | 156.9 | 131.8 | 131.8 | 147.0 | 134.5 | 126.8 | 129.1 | 130.9 |                 |
| 2,6-diphenyl                 | 151.7 | 140.1 | 140.1 | 151.7 | 136.8 | 127.3 | 129.2 | 130.2 |                 |
| 2,6-diphenyl 4-oxide         | 155.9 | 128.7 | 128.7 | 155.9 | 134.9 | 127.1 | 129.2 | 131.0 |                 |
| 2,3-diphenyl                 | 152.9 | 152.9 | 142.2 | 142.2 | 138.8 | 128.3 | 128.7 | 129.8 |                 |
| 2-methyl-3-phenyl            | 152.0 | 154.3 | 141.7 | 142.3 | 138.9 | 128.6 | 129.1 | 128.9 | 23.2            |
| 2-methyl-3-phenyl<br>1-oxide | 143.7 | 158.1 | 143.5 | 132.1 | 137.5 | 128.6 | 129.1 | 129.6 | 14.7            |
| 2-methyl-3-phenyl<br>4-oxide | 157.1 | 144.5 | 132.2 | 144.9 | 130.3 | 129.1 | 129.4 | 129.8 | 23.0            |
| 2-methyl-5-phenyl            | 152.1 | 144.0 | 150.0 | 141.2 | 136.7 | 126.8 | 129.1 | 129.6 | 21.2            |
| 2-methyl-5-phenyl<br>1-oxide | 142.1 | 147.2 | 154.6 | 130.5 | 135.0 | 126.7 | 129.2 | 130.5 | 14.1            |
| 2-methyl-6-phenyl            | 153.2 | 142.6 | 139.0 | 151.7 | 136.7 | 127.0 | 129.0 | 129.7 | 21.7            |
| 2-methyl-6-phenyl<br>1-oxide | 144.5 | 146.0 | 146.0 | 144.5 | 129.8 | 128.6 | 129.5 | 130.3 | 14.9            |
| 2-methyl-6-phenyl<br>4-oxide | 157.0 | 130.7 | 130.7 | 155.8 | 134.8 | 126.9 | 129.1 | 128.2 | 21.9            |

り、N-オキッド酸素の lone pair の back donation による resonance-effect を考えよと説明される。即ち、その resonance form を考えよと (1-oxide の場合) 2, および 6 位に負の電荷が考えられ、2, 6 位の電子密度が増し、同時に 3, 5 位は電子密度が減少する。その結果として、2, 6 位は高磁場へ、3, 5 位は低磁場へシフトすることが予想される。このような  $\pi$ -resonance effect のみで N-オキッド化による変化を説明できるわけではないが、大きな奇挙をばしていることは推定される。

化学シフトに関し、さらに検討するため、ピラチン環各炭素原子上の電子密度 ( $\pi + \sigma$ ) を CNDO/2 法により求めた。



上図に示したようにフェニル置換体の数点を除いて、かなりよい直線関係が得られた。その勾配は約 110 ppm/e であった。

また同時に <sup>13</sup>C 核に対する  $\rho$  の値を Pople の方法<sup>4)</sup>により計算を行ったが、ばらつきが大きくなり、あまりよい直線関係を示さなかった。

(2) 結合定数 Gated decoupling 法を用い、メチルピラチンおよびその N-オキッドにおける <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 結合定数を求めた。ピラチンに関してはすでに報告<sup>5)</sup>があり、その値を使用した。本研究で用いた種々のメチル、ジメチル誘導体においても、ほぼ無置換の場合と同じ値を示し、メチル基による影響はあまり観察されなかった。メチル基プロトンとピラチン核炭素の結合定数は、メチル置換の炭素に対し (<sup>2</sup>J) 約 6 Hz、その隣の炭素に対し (<sup>3</sup>J) 約 4 Hz となり、他の芳香環に比べかなり大きな <sup>3</sup>J が観測された。しかし、さらに高次の long range coupling は観察されなかった。表 2 にモノメチルピラチンおよびその N-オキッドの <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 結合定数の値を、また図 2 に long range coupling の値を示した。N-オキッド化された場合、以下に列記するような相異が生じた。

- N-オキッドに隣接する炭素の one-bond の結合定数 (1J) は 8~10 Hz 大きくなり、190 Hz 程度の値が得られた。
- <sup>2</sup>J は N-オキッドの方向により明らかな差異を生じている。即ち、N-オキッドに隣接す



表 2

Carbon-proton Coupling Constants in the Pyrazines

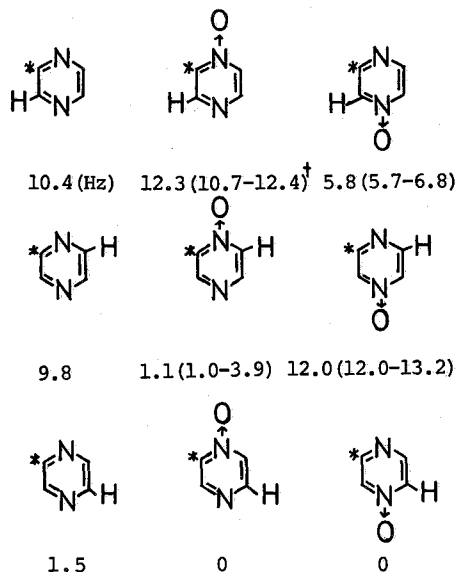
|                          | carbon | H-2   | H-3   | H-5   | H-6   | CH <sub>3</sub> |
|--------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-----------------|
| pyrazine                 | 2      | 182.7 | 10.4  | 1.5   | 9.8   |                 |
| pyrazine 1-oxide         | 2      | 191.3 | 12.3  | 0.0   | 1.1   |                 |
|                          | 3      | 5.8   | 186.4 | 12.0  | 0.0   |                 |
| 2-methylpyrazine         | 2      | -     | ND    | ND    | ND    | ND              |
|                          | 3      | -     | 180.5 | 9.2   | 1.2   | 4.2             |
|                          | 5      | -     | 10.0  | 182.4 | 10.0  | 0.0             |
|                          | 6      | -     | 1.3   | 10.9  | 181.3 | 0.0             |
| 2-methylpyrazine 1-oxide | 2      | -     | ND    | ND    | ND    | ND              |
|                          | 3      | -     | 184.4 | 12.0  | 0.0   | 4.4             |
|                          | 5      | -     | 13.2  | 186.2 | 6.8   | 0.0             |
|                          | 6      | -     | 0.0   | 12.4  | 189.9 | 0.0             |
| 2-methylpyrazine 4-oxide | 2      | -     | 6.5   | 0.0   | 13.0  | 6.5             |
|                          | 3      | -     | 189.4 | 1.0   | 0.0   | 0.0             |
|                          | 5      | -     | 1.0   | 193.5 | 10.7  | 0.0             |
|                          | 6      | -     | 0.0   | 6.1   | 185.5 | 0.0             |

ND; not determined

図 2.

る炭素と核プロトンとの coupling の値は、  
 ヤ、ピラチンに比べ大きくなるのに対し  
 逆の場合は著しく減少する。

- $^3J_{CNCH}$  は N-オキッド基を通じた場合  
 極端に減少し、逆の場合は増加する。
- N-オキッドを通じた  $^3J$  は観察されない。
- メチルプロトンと核炭素の  $^3J$  は、  
 2-methylpyrazine 1-oxide ではほぼピラチン環の  
 場合と同程度の値を示すのに対し、4-oxide  
 ではほとんど認められない。



†: モノメチルおよびジメチル誘導体における値

化学シフトの帰属の際、off-resonance 法や  
 置換基効果の考慮のみでは、幾分かのあい  
 まいさを除くことは難しいが、 $^{13}C$ - $^1H$  積  
 合定数の決定により、ピラチン類の場合に  
 おいても、より明確に帰属することができ

非常に有用な手段である。

## 文献

- 1) J.B.Stothers, "Carbon-13 NMR Spectroscopy" Academic Press, New York, 1972.
- 2) R.J.Cushley, D.Naugler and C.Ortiz, Can. J. Chem., 53 3419 (1975)
- 3) K.Tori and T.Nakagawa, J. Phys. Chem., 68 3163 (1964)
- 4) M.Karplus and J.A.Pople, J. Chem. Phys., 38 2803 (1963)
- 5) F.J.Weigert, J.Husar and J.D.Roberts, J. Org. Chem., 38 1313 (1973)

## $^2\text{H}$ NMR の生合成研究への応用

P-1-8

(国立がんセンター研) ○ 齊藤 肇

(共立薬大)

小田泰子, 佐藤吉博

### (1) はじめに

最近,  $^{13}\text{C}$  同位体ラベルを用いる生合成研究が, 広く行なわれている。 $^{13}\text{C}$  同位体の利用は, 骨格形成, 取りこみ位置決定にきわめて有効であるが, 水素原子に関する挙動までをふくめた生合成機構には限界がある。このような目的には,  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$  置換体と前駆体として用いるのがふつうであるが, 分析手段として MS あるいは放射能カウント法では種々の向題がある。また  $^1\text{H}$  NMR のピーク強度の減少からモニターする場合には, 取りこみが 5% 程度の少量の場合には, やはり向題がある。われわれは, 高分解  $^2\text{H}$  NMR 法がフーリエ変換 NMR の進歩によって感度上の向題が解決されていることから, 生合成研究への応用が可能であると判断し, *Penicillium urticae* による Griseofulvin の生合成実験に着手した。 $^2\text{H}$ -置換前駆体として,  $[\text{2-}^2\text{H}_2]$ 酢酸塩, または 50%  $\text{D}_2\text{O}$  を用い,  $^2\text{H}$  NMR 法がきわめて有効であることが明らかにすることができた。

### (2) 実験方法

$^2\text{H}$  NMR の測定は, 日本電子 PFT-100/EC-100 スペクトロメーターを用い, 15.28 MHz, フーリエ変換法によった。プロトン-ノイズデカップリングを行なうため, 磁場ロックは試料に数滴滴下した  $\text{C}_6\text{F}_6$  の  $^19\text{F}$  シグナルによった。試料は  $\text{CHCl}_3$  1.5 ml に溶解し, 10 mm o.d. 試料管を使用した。周波数観測中は通常 500 Hz, データポイント 2K で十分であるが, 場合によっては 8K を用いた。

$^2\text{H}$  スペクトルの帰属のために, 種々の化学的に重水素置換したグリセオフルビンと合成し, 生合成で作られた重水素置換グリセオフルビンと比較した。

### (3) 実験結果と考察

#### A $^2\text{H}$ スペクトルの線形とデカップリング効果

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  などのスピンの数/核と異なり,  $^2\text{H}$  スペクトルの線形は核四重極緩和時間  $T_Q$  ( $=T_1 = T_2$ : extreme narrowing 条件) によって決定される。生合成研究の詳細に入る前に,  $^2\text{H}$  NMR の線形とスピンドカップリング効果についてふれておく。 $^2\text{H}$  と隣接プロトンの間のスピン結合を  $J_{\text{DH}}$  とすると, 対応する  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  スピン結合  $J_{\text{HH}}$  に対して,

$$J_{\text{DH}} = 1/6.51 \cdot J_{\text{HH}}$$

の関係が成立する。磁場の不均一性,  $^2\text{H}$ - $^1\text{H}$  スピン結合が分離せず, 4 かけ上の線中の広がり, データポイントの不足のための線中の広がり, 等に影響されない理論上の線中として  $1/\pi T_1$  を用いると,  $J_{\text{DH}}$  と比較から  $^2\text{H}$  スペクトルの線形は,

case 1.  $\pi T_1 J_{\text{DH}} \gg 1$  (スピン多重線が分離して観測される)

case 2.  $\pi T_1 J_{\text{DH}} \approx 1$  (スピン結合によって線中が広がる)

さいとう・はじめ, ちだ・たいに, さとう・よしひさ

Case 3.  $\pi T_1 J_{OH} \ll 1$  (線中がT1のみにより決まる)  
 の三種類に分類される。したがって、case 3を除いて、スピンドカツリングによるピーク強度の比較を行えば、隣接プロトンの存在有無に関する情報が得られるはずである。  
 一例としてエタールのメチル部分のスペクトルはCase 1に属し、geminal, vicinalスピン結合で本線に分裂するが、プロトンデカップリングにより線中0.4 Hzのシングレットに変化する(上段)。

B. [2-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]酢酸塩によるグリセオフルビン合成法

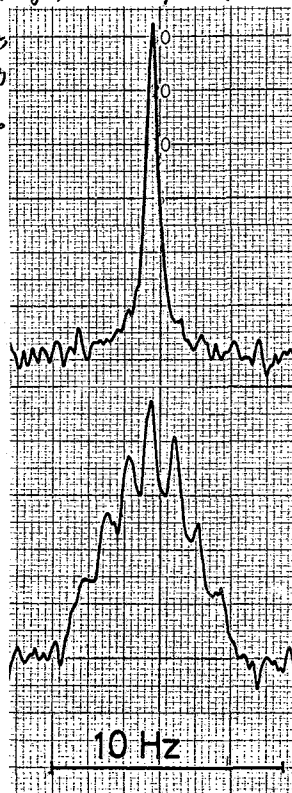
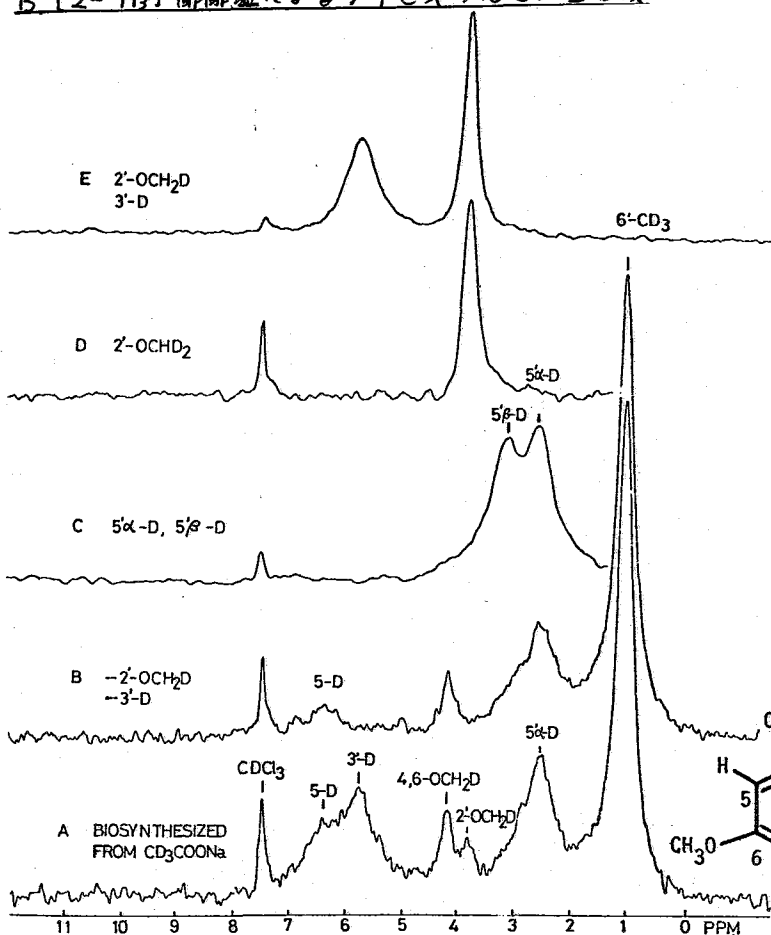


図1. 天然存在のエタールのCDH<sub>2</sub>部分<sup>2</sup>H NMR

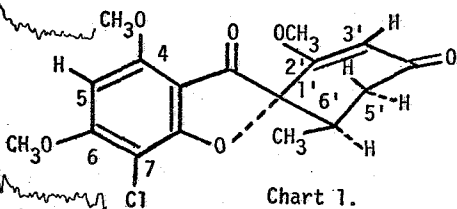


図2. 合成法(CD<sub>3</sub>COONaより)で得られたGriseofulvin (A)および化学的合成によりD化したGriseofulvin (B-E)の<sup>2</sup>H NMRスペクトル。  
 $\Gamma_{ds, 1.47}$

- (A) 40 mg, 1100回積算 (d<sub>0</sub> 61.4%, d<sub>1</sub> 4.3%, d<sub>2</sub> 5.2%, d<sub>3</sub> 8.6%, d<sub>4</sub> 10.6%, d<sub>5</sub> 6.4%)
- (B) 20 mg, 502回積算 (d<sub>0</sub> 56.7%, d<sub>1</sub> 6.9%, d<sub>2</sub> 11.6%, d<sub>3</sub> 14.8%, d<sub>4</sub> 6.6%, d<sub>5</sub> 2.8%)
- (C) 35 mg, 1000回積算 (d<sub>0</sub> 21.5%, d<sub>1</sub> 53.6%, d<sub>2</sub> 24.9%) (D) 16 mg, 1000回積算 (d<sub>0</sub> 68.8%
- (D) 27 mg, 200回積算 (d<sub>0</sub> 2.4%, d<sub>1</sub> 19.2%, d<sub>2</sub> 71.5%, d<sub>3</sub> 5%)

[2-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-酢酸塩を前駆体として生合成的に得られた Griseofulvin の <sup>2</sup>H NMR スペクトルを図 2(A) に示す。<sup>2</sup>H NMR スペクトルの帰属は、<sup>2</sup>H と <sup>1</sup>H の同位体効果が無視できることから、<sup>1</sup>H スペクトルの帰属に基づいて決定することができるとは。しかし、ここでは各位置に化学的に <sup>2</sup>H を導入または除去した Griseofulvin の <sup>2</sup>H スペクトル (図 2(B)-(E)) との比較にもとづいて行ったが、線幅が異なるピークの帰属には有用である。各ピークの帰属は図 2(A) の通りである。さらに、T<sub>1</sub> がメチル基 (6'-CD<sub>3</sub>, 2'-OCH<sub>2</sub>D, 4,6-OCH<sub>2</sub>D それぞれ 66, 106, 104 msec) の値が、5'-D, 3'-D (それぞれ 45, 46 msec) にくらべて長いことからも、この帰属は確認できる。

<sup>2</sup>H 磁気緩和は核四重極モーメントと周囲の電場こうばいとの相互作用によって決まるため、プロトンデカップリングによる NOE 効果が存在しない。それゆえ、各ピークの面積強度が <sup>2</sup>H の取り込みに比例する。生合成で得られた Griseofulvin の <sup>2</sup>H ピーク強度比は、44

% (6'-CD<sub>3</sub>), 23% (5'-α-D), 3.3% (2'-OCH<sub>2</sub>D), 6.3% (4,6-OCH<sub>2</sub>D), 24% (3'-D, 5-D) である。6'-CD<sub>3</sub> と 5'-α-D のピーク強度比は 2:1 であり、CD<sub>3</sub> とは考え難い。実際、図 3 に示すように、プロトンデカップリングを行えば <sup>2</sup>H スペクトル (A) は、(B) にくらべて、2'-OCH<sub>2</sub>D, 4,6-OCH<sub>2</sub>D 同様のピーク強度変化がみられる。強度変化はそれぞれ 27, 21, 17% である。

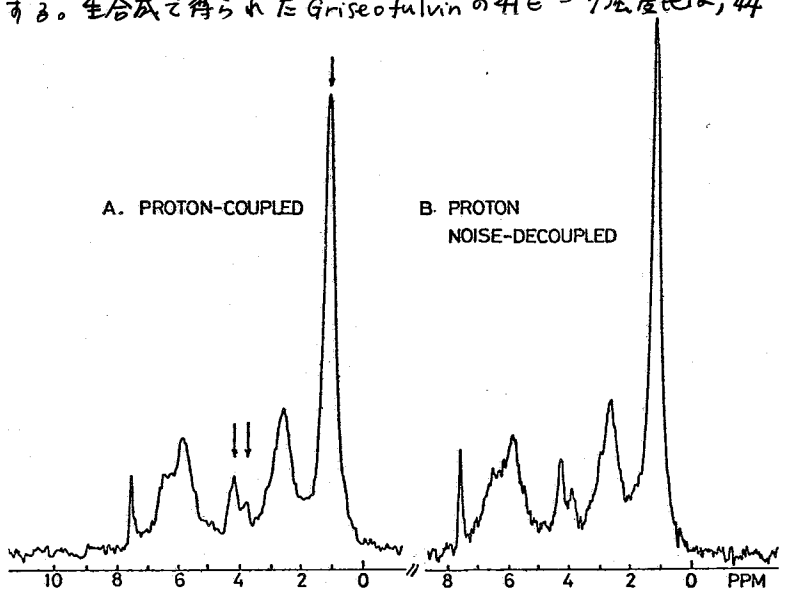


図 3 Griseofulvin の <sup>2</sup>H NMR スペクトルのプロトンデカップリング効果 (矢印を付けたピークの変化に注意)

これらのピークは  $\pi\pi_{\text{CH}}$  ~ 0.5 であり、前節 case 2 に相当しており、これらの結果から 6' は 6'-CD<sub>2</sub>H であり、部分的に H がとりこまれていることがわかる。この結果は次節でのべた実験結果に一致する。さらに、5'位置の D のとりこみは α 位置であり、2', 4, 6 のメチル基にも D がとりこまれていることが明らかにされた。

C. 培地に D<sub>2</sub>O をよく用いた生合成

上にのべた実験とは、裏返しにした実験法として、重水素源として 50% D<sub>2</sub>O を使用し、炭素源として通常の酢酸を用いた Griseofulvin の生合成が考えられる。このとき、前節とは逆に、本来 H (水素は天然由来) がとりこまれているものが、D 化され

スペクトルで観測されるはずである。図4は、この方法で重水素化した Griseofulvin の  $^2\text{H}$  NMR スペクトルである。菌体を 50%  $\text{D}_2\text{O}$  によく培地に移した後、1時間の培養で、前節の実験から予測されるように、 $2'-\text{OCD}_2\text{H}$ 、 $4,6-\text{OCD}_2\text{H}$  に重水素のとりこみがみられる。また、 $6'-\text{CDH}_2$  ビーグがみられることから、前節の実験と結論したように  $6'-\text{CD}_2\text{H}$  の存在を支持する。またこの実験では、 $\text{d.o}$  97.9% の低い重水素のとりこみでも、試料量を 51mg 使用すると overnight の培養（28, 28, 28 回）で満足すべきスペクトルも与えることを示している。前節の実験とは、さうと逆に 5 $\alpha$ -D, 3'-D, 5-D に重水素のとりこみがみられることがわかる。これは、前節の結果とあ

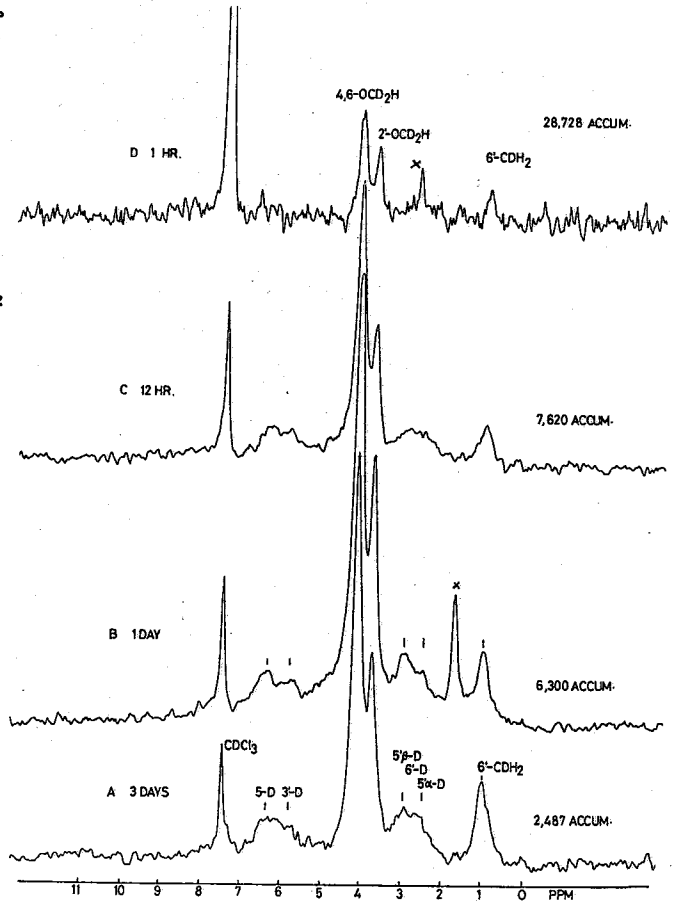
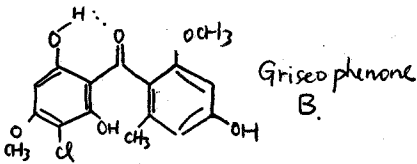


図4  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  1:1 混液から生合成的に重水素化したグリセオフルビンの  $^2\text{H}$  NMR

わせて、酢酸塩からの水素は、ホリケトメチレン中間体、ベンゾフエニン中間体の Griseophenone B を経由する過程では retention されることが、培地の水との間に幾分かの水素交換があることを示している。

以上、Griseofulvin の生合成実験に関する  $^2\text{H}$  NMR の応用への応答が、生合成、代謝研究に広く利用されることを示している。

文献 (1) 佐藤, 小田・斎藤, 日本薬学会第96年会講演要旨集; Sato, Y., Oda, T. and Saito, H. (1976), *Tetrahedron Lett.*, 2695-2698; 佐藤, 小田・斎藤, 第20回天然有機化合物討論会講演要旨集, 仙台, 1976.

I-2

(東工誌) 山本 修

NMRに化学シフトというものが発見され、それの化合物の構造と密接な関係をもつていふことか判らぬ時、赤外スペクトルの特性吸収帯に於いてなされたように、化学シフトと化学構造との関係を見易い図表の形にまとめ、精選決定や分析の便に供しようとする試みは、化学者であるからすぐ考へることであらう。Meyer, Saika, Gutowskyらはすでに1953年にこのような化学シフトの大きなチャートを発表している。その後このような要約の増大に伴い、1956年、58年にBothner-byら、また1958年にTiersが数値テーブルの形で化学シフトの表を発表した。一般NMRの研究者の間で秀やかな形での張りださるべきものとしてTiersの表であつた。一方チャートの形で発表されたものは1959年に去されたChamberlainのチャートが有名である。

1960年東工誌にVarianのDP-60型入プロトロンメータが導入された時期は大抵このような時代であつた。当時東工誌化学部に於いては、いわゆる分析センターの一環としてこの装置の導入されたのであつたが、われわれの研究室に於いては右へキターマとして、10ヶのプロトロンもさるころから、NMR分析の基本となるプロトンの図表化の完成を取上げれば、当時のNMR研究室長であつた額田健吉博士(現東工研究所開発企画部長)の卓見である。額田氏はしばらくして東工誌を去られたが、爾来われわれの研究室に於いてNMRテーブーアをより正確に抽出して用いることとすべし試みは大きな流れとなつたのである。

プロトンの図表化はメチル、メチレン、gemメチンおよびオレフィン型のプロトンに於いて行なつた。他の型のプロトンに於いてはチャート形式の表示法は繁雑すぎるように思われ、プロトンのシフトの濃度依存性、溶媒依存性が大きいことを考慮して、Tiersの表に掲載されているもの以外、一切文献値を採り、すべてわれわれの研究室での測定値を用いた。実際的に立場が立つた場合、このようなチャートが使い易いかというものは、一にかかるとその分類方法にある。われわれは先ずプロトンをその結合している炭素の結合形式により分類し、次にその炭素に結合している官能基により細分化してゆく方式をとつた。この方法は一見平凡であるが、未知物等の同定の際には非常に便利であると思われ、最近になって田中氏らにより<sup>13</sup>Cの化学シフトのチャート化も行なわれ、田中氏らもこの分類方法を採りされている。

プロトンのNMRの中で大きな分野を占めるのが芳香族のプロトンである。良く知られているように芳香族のプロトンでは、お互い同士の化学シフト差とスピン結合定数とがほぼ同じ位であるから、複雑なスペクトルが得られ、その解析には電算機が必要になる。次のわれわれの仕事はこのようなスペクトルから正確な化学シフトとスピン結合定数を抽出することであつた。Bothner-byらがアリル化合物の解析をやつていた時代であつた。最小二乗法によるNMRスペクトルの解析は、原理的には振動入りのルビに於ける解析計算と同じであり、それ自体原理的には新しいものではない。要は秀やかなスペクトルに實際に

ヤマトと おさむ

適用し、ある手に入れた系からいかに容易に NMR パラメータを抽出できるか、が問題である。その集大成が HORTRAN パッケージでは Bothner-by-Castellano の LAOCN3 になつたのであつたが、その頃の仲介には山本敬雄氏(理研大計算センター)がいた。山本氏の場合には取扱いが少しはましな状態であつたかも知れないけれども、いかにせよ HORTRAN プログラムが便宜上程度思ふに人はあつたかも知れないと思う。われわれの行つては KEAC-2101 という 4K の 10 桁計算機に機械語でプログラムを書き、5 スピン系の一途増バンパの解析を行つた。今は昔、なつかしい思いがあつた。その結果は Castellano のプログラムで、および Goldstein のプログラムと競争するようになつたけれども、環状分子のスピニング法発展に因つて加減を確立するところまで進んだ。スペクトル解析が成否はスペクトルの質に依存することになる。丁度この頃が A-60 型の外装ロッド方式から、HA-100 型の内部ロッド方式に移行し始めた頃であつた。内部ロッド方式になつて解析の精度および容易さはかなり向上したように思う。

「まだ回顧録を書く年令では無い、なつかしい思い出をつきながら私は今この原稿を書いている。われわれのこれまでの仕事において分析センターの一環であるというところ大きな支えであつたことは確かである。分析センターもその一なる目的を達してそのプロジェクトを終了しようとしてゐる現在、今後われわれの指針は当然今までの経験とあつて NMR テーマパッケージへの向うの方向はなつたと思ふ。この数年間各種テーマパッケージの確立の必要性が認められるようになった。1971 年の NMR 討論会において東大藤原教授から日本に於ける NMR テーマ集積の時期が訪れるのは一つのエポックであつた。次いで日本化学会内に NMR テーマ小委員会が藤原教授を委員長として設置され、科学技術庁の依頼書によつて NMR チート集積と行つたと共に「NMR テーマの収集、整理、分析評価に因つて調査活動が開始された。その後 5 年この仕事については全国 NMR 研究者の並々ならぬ御協力があつて、 $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  のスペクトルの標準化に大きな成果をあげたことのできた。この 5 年間の経験は今後われわれが NMR テーマパッケージの確立に何らかの糸を引くこととする際に、非常に大きな示唆とあつてくれたように思ふ。

昨年より東工研においてスペクトル標準テーマパッケージの確立に因つて特別研究が開始されている。これは NMR, IR, MS, ESR, ラマン等々の各分野においてそれぞれテーマパッケージの確立にはどのような手段が適当であるかを探るうが目的である。勿論テーマパッケージの確立は東工研のみで可能なものでは無い。同じ目的をもつた全国の研究者の方々と共に、何らかの共同の寄与ができれば幸いである。

最後に化学シフトの図表化の深い共同研究者であつた竹田誠氏(日本電子)、正富稔子氏、この間われわれの研究室の一員であつた鈴木昭夫氏(東京クリスタル・ラボラトリー)、渡部正利氏(工学院大)、純粋部材料のことで常にあつたお世話に因つて富田弘氏を始めとする東工研からスロガルーアの方を、装置に因つて御協力をあつた佐藤至朗氏を始めとする日電のリアン K K の方々に厚く感謝いたします。

I-3

相互作用系の NMR

(京大工) 米澤 貞次郎

相互作用のある系は物理化学の立場からも、物性の立場からも興味が深く、この相互作用を積極的に利用して分子の活性を変化させたり、分子構造などの変化をもたらすことも可能である。

この相互作用系を量子力学的に取り扱うには、A, B を閉殻分子として、その二体間の問題に単純化する。とすると系の電子状態を表わす全波動関数は電子配置間相互作用の形で書くと

$$\Psi = C_0 \bar{\Psi}(AB) + \sum_{i,k} C_{ik} \bar{\Psi}(A_i^* \rightarrow k B) + \sum_{l,m} C_{lm} \bar{\Psi}(A B_l^* \rightarrow m) + \sum_{p,q} C_{pq} \bar{\Psi}(A_p^+ B_q^-) + \sum_{r,s} C_{rs} \bar{\Psi}(A_r^- B_s^+) + \sum_{t,u} C_{tu} \bar{\Psi}(A_{tt \rightarrow uu}^{**} B) + \dots$$

とわかれる。なお

$\bar{\Psi}(AB)$ : A, B 基底状態分子間の電子交換, 電子雲の重なりなどによる相互作用状態

$\bar{\Psi}(A_i^* \rightarrow k B)$ : B と一重励起状態  $A_i^* \rightarrow k$  の相互作用状態

$\bar{\Psi}(A B_l^* \rightarrow m)$ : A と励起状態  $B_l^* \rightarrow m$  の相互作用状態

$\bar{\Psi}(A_p^+, B_q^-)$ :  $A_p^+$  と  $B_q^-$  との相互作用状態

$\bar{\Psi}(A_{tt \rightarrow uu}^{**} B)$ : A の 2 重励起状態  $A_{tt \rightarrow uu}^{**}$  と B との相互作用状態

であり、i, k, l, m, p, q, t, u は A, B 分子の分子軌道の番号を示す。このことは A 分子について見ると、閉殻系 B 分子との相互作用の結果、

- 1) B 分子の電子との交換がおこる
- 2) A 分子に局所的な励起がおこる。
- 3)  $A^+$  状態の寄与が考えられる
- 4)  $A^-$  状態の寄与が生じる。

などが考えられる。この取り扱いに A, B のいずれか一方が閉殻系、あるいは両者が閉殻系の場合にも容易に拡張しうる

相互作用系を NMR で観測する試みも数多い。溶媒シフト, 交換効果, あるいはシフト試薬の応用などはこの例であり、分子の相互配置, 相互作用の時間尺度, 分子構造などに関して有用な知見がもたらされている。いうまでもなくこれらの相互作用は、スペクトルの変化, シフト, スペクトルの強度の変化, 半値幅などの形の情報を解析することによって得られる。

われわれの研究室では、主として  $^1H, ^{13}C$  スペクトルなどをを用いて、閉殻系(反磁性)一

よねがわ ていじろう。



閉殻系(反磁性)の相互作用系のNMR, 開殻系(常磁性) - 閉殻系の相互作用系のNMRの測定と解析を行ない, 分子構造, 相互作用のかたちに関しいくつかの知見を得た。これらの主な結果と, その特長などについて述べる。

## I 閉殻 - 閉殻系の相互作用とNMR

われわれはベンゼンと分子との相互作用, ベンゼン - トリフルオロ酢酸などの特殊溶媒が有機化合物, 孤立電子対を有する化合物のケミカルシフトに及ぼす影響を明らかにし, スペクトルの同定, 構造決定への応用についての研究を行った。

ここではこのような相互作用系のNMRのスペクトルの解析から,  $\sigma$ 骨核の分子構造, 電荷分布に関する研究を行った例を示す。

$^{13}\text{C}$  NMRはとくに各炭素原子の電子状態の変化と敏感に反映すると期待される。ここでは種々のアミンの窒素原子をプロトン化した研究結果について述べる。

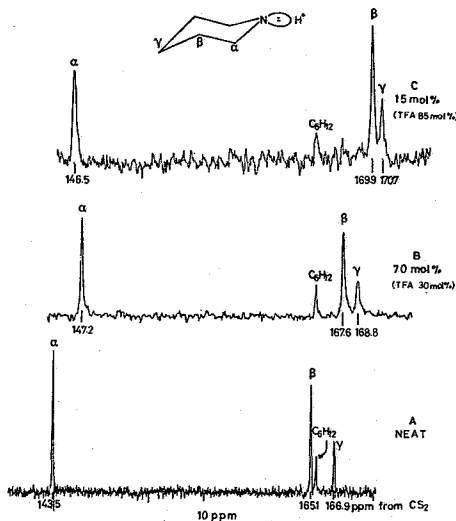


Figure 1.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of piperidine perturbed by the protonation in trifluoroacetic acid.

これらの $^{13}\text{C}$ 化学シフト( $\Delta\delta^{13}\text{C}$ )を, 酸のモル分率に対してプロットしたものを示した。これから予想される $\sigma$ -誘起効果は, 有機電子説と一致する。この原因を明らかにするためにCNDO/2法を用いて, ピペリジンをプロトン化したときの電子密度の変化の計算を行った結果は図3のごとくなる。図中の+は電子密度の増加を示す。これより明らかになるように, プロトン化により, 各炭素原子上の電子密度は水素 - 炭素結合の分極により, むしろ増大している。また $\alpha$ 位より $\beta$ 炭素の方が, この負電荷の増加は大きく, この結果は $^{13}\text{C}$  NMRの測定結果によく対応していることが明らかになった。

さらに図に示した様な化合物での $\alpha$ 炭素のプロトン化による化学シフトの変化に注目すると, その炭素原子に直接結合した水素原子の数によりシフトが大きく変化していることがわかる。すなわち $\gamma$ -ブチルアミンの $\alpha$ 位のメチレン炭素は高磁場シフトをしているの

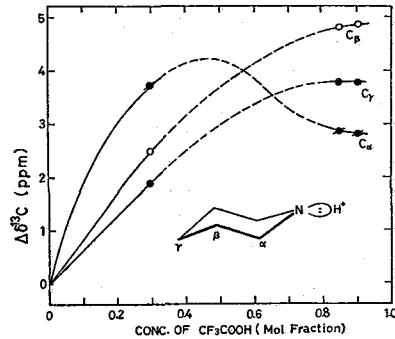


Figure 2.  $^{13}\text{C}$  chemical shifts relative to free amine ( $\Delta\delta^{13}\text{C}$ ) varying with acid-base ratios for piperidine. (We could not obtain the protonation  $^{13}\text{C}$  shifts for the solution with TFA concentration of 0.4-0.8 mol fraction (the dotted line) because in this region the piperidinium salt was precipitated.)

図1にピペリジンを, トリフルオロ酢酸を用いてプロトン化したときのスペクトル変化を示した。すべての炭素原子のスペクトルは高磁場シフトする。図2にはプロトン化によって誘起

に対し、一水素原子の少ないシクロヘキシルアミンでは-2.7 ppmと低磁場シフトし、更にアダマンチルアミンでは、-8.2 ppmと非常に大きい低磁場シフトを示す。同様を傾向はβ位、γ位炭素についても観察された。

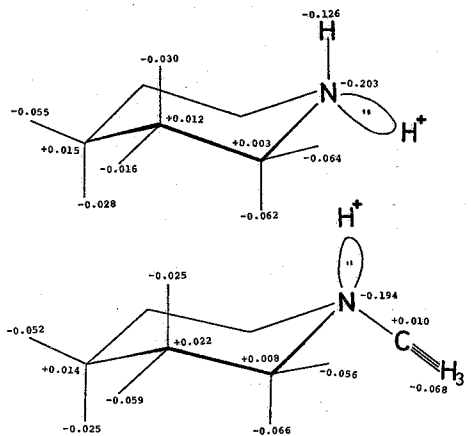
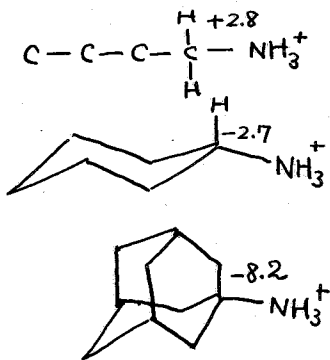


Fig. 3. ピペリジン、N-メチルピペリジンのプロト化物の電子密度の変化

またこれらのσ-誘起効果は分子の立体構造に反映する事が明らかにされている

## II 開殻-閉殻系の相互作用のNMR

めれば常磁性金属錯体、とくにビス(アセチルアセトナト)ニッケルと含窒素化合物との相互作用系によって生じるNMRコンタクトシフトに注目した。このシフトは

$$\frac{\Delta H}{H} = -a_N \frac{\gamma_e}{\gamma_N} \frac{g\beta S(S+1)}{3kT}$$

$$a_N = \frac{4\pi}{3} g\beta \gamma_N \langle S_z \rangle^{-1} | \chi_{Nz}(\text{or } N_x) |^2 \rho_{SN}$$

で与えられ、対象とする原子(Nで示す)のs軌道におけるスピン密度分布を反映する。シクロならびにビスシクロアミン類などにおけるこのシフトは、孤立電子対の配向、σ骨格の立体構造、スピン出現ならびに伝達構造を明らかにしうることを示した。

また有機ラジカル、例えば「ニトロキシド」などの安定ラジカルとの相互作用系のNMRスペクトルにおいて、<sup>1</sup>Hならびに<sup>13</sup>Cコンタクトシフトを測定し、このシフトが水素結合、および移動型などの相互作用によって誘起された電子スピン密度が、その大きさ、正負の符号を含めて明確に反映することを実験的に見出し、このシフトを理論的に解析することによって、相互作用にもとづくスピン伝達機構を明らかにする共に、このシフトの構造決定などに有用であることが明らかになった。

図4は「ニトロキシド」ラジカルとX-Hとの間の水素結合の型式を示したものであり、<sup>1</sup>Hの高磁場シフトはπ型水素結合型によることを、非判限SCF法の計算によっても確かめた。またこのπ型水素結合の存在はBDPAラジカルを用いて実験的にたしかめられている。

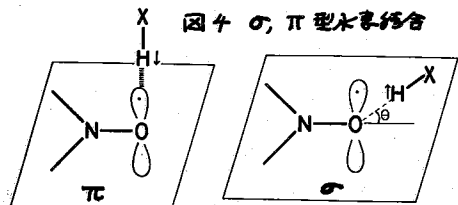
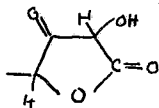


図4の、π型水素結合

またハロゲン化合物とジ-tert-ブチルニトロキッドなどのラジカルとは電荷移動型相互作用があり、スピノン非局在化機構によって電子スピンの伝達されることが主として $^{13}\text{C}$  NMRコンタクトシフトの測定と、その理論的解析から示された。(図5)

### III. その他

図6, 7は、25 MHzにて、 $180^\circ$ - $\tau$ - $90^\circ$ パルスによるアスコルビン酸の各シグナルの変化を示した。これによると $\text{H}_2\text{O}$ と $\text{D}_2\text{O}$ 中では $\text{C}_1, \text{C}_2, \text{C}_3$ 炭素の緩和速度が異なり、 $\text{H}_2\text{O}$ 中の方が早くなっていることがわかる。この緩和時間 $T_1$ の考察によりアスコルビン酸にはきわめてわずかながらあるが



で示される keto 型の考察があることが明らかとされる。緩和時間 $T_1$ を用いて相互作用についての考察はラジカル一分子の相互作用についても行われている。

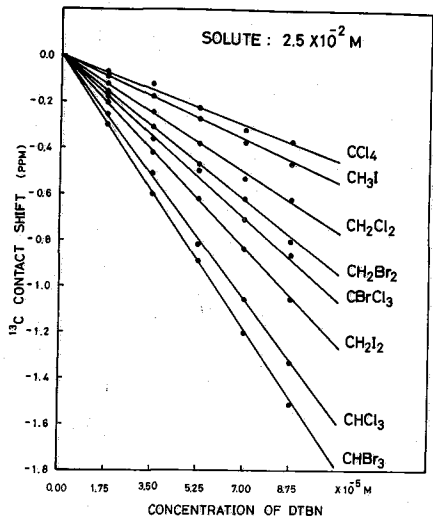


図5 Plots of  $^{13}\text{C}$  contact shifts versus the concentration of added DTBN radical for various halomethanes.

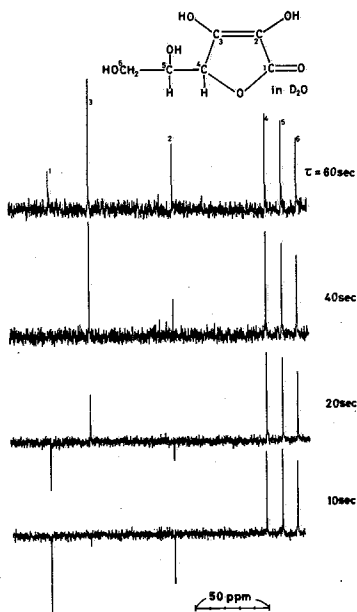


図6

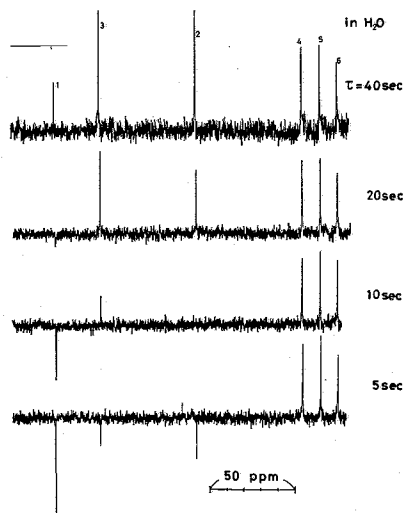


図7



第 2 日

10 月 26 日 (火)

## 常磁性分子の NMR.

I-4

— 有機化学, 生化学への応用 —

(京大. 工) 森島 積.

NMRにおいては、常磁性物質を有効に利用することから、その常磁性に基づく特異な現象が検出、解析でき、分子の構造やその運動状態についての知見を引き出すことが可能となる。これまでに、常磁性金属錯体、特にビス(アセチルアセトナト)ニッケル $[\text{Ni}(\text{acac})_2]$ と種々の含窒素有機化合物との相互作用による $^1\text{H}$ 、ならびに $^{13}\text{C}$ コンタクトシフトを測定し、これから得られるスピン密度の分布と分子の立体構造の関連を明らかにし、有機構造化学における諸問題へ応用してきた。

一方、生化学の分野においても、天然に金属を含むタンパク質、酵素は数多く存在する。なかでも、ヘム蛋白質はその補欠分子としてプロトヘム鉄錯体をもち、鉄原子は酸化状態や、種々の配位子との反応によって常磁性( $S \neq 0$ )の電子配置を取り、ヘム側鎖、あるいは軸配位子のプロトンシグナルが大きく高磁場、又は低磁場方向にシフトして、蛋白質部分の複雑に重なり合ったシグナル領域から分離して観測でき、一種の天然の常磁性プローブとして活用できる。従来、NMRの研究対象としてその糸口が見つけられなかった、分子量が十万以上の比較的大きなヘム酵素でも、ヘム側鎖常磁性シフトの観測が可能であり、しかもこの常磁性シフトは、配位子の種類、pH変化等によるヘム鉄の電子状態、あるいはヘム近傍のミクロな構造変化を極めて鋭敏に反映し、ヘム蛋白質、酵素の構造と機能の関連を調べざる上での有効な手段であることを明らかにしてきてきた。

以下に、議論の内容を要約する。

### I. 有機化学への応用.

- 含窒素有機化合物におけるコンタクトシフトの立体構造依存性
- 含窒素化合物における孤立電子対の配向、ならびに反応性との関連.

### II. 生化学への応用(ヘム蛋白質におけるヘム鉄の電子状態とヘム近傍ミクロ環境に関して)

- ヘム側鎖常磁性シフトに及ぼす配位子の効果.
  - pH効果。酸-アルカリ転移と解離性アミノ酸残基の検出。軸配位子のpK値.
  - スピン平衡の解析
  - ヘム-アポ蛋白質部の相互作用.
  - ヘム酵素における基質の効果とその役割。(チトクロームP450, トリプトファンピロラゼ, パルチンゲ)
- となる。

以上の様な常磁性プローブを用いるNMRの有機化学、生化学分野への応用を、最近のデータを含めて議論したい。

もりしま いさお



(近畿大薬) 〇川木秀子, 岡崎雄文

(阪大薬) 藤原英明, 佐々木喜男

## 〔序〕

Lewis 塩基と Eu(DPM)<sub>3</sub> 間の付加体形成の際の量論をモル比法および連続変化法を用いて NMR スペクトルのシフト値より明かにしたほか, ケイ光スペクトルを用いたモル比法からも検討を加え, 溶液内において 1:1 付加体形成であることを示した。<sup>1)</sup>

今回, 等モル混合溶液における希釈実験値を基準として, 平衡反応式から錯体シフト  $\Delta_c$  と平衡定数  $K_c$  を求めることができた。また別に, 等モル混合溶液の無限希釈シフトが  $V_1^{1/2}$  あるいは  $V_2^{1/2}$  に対して比例関係にあることから, 無限濃縮値  $\Delta_{ic}$  を求め, これが錯体シフト  $\Delta_c$  と互いにより対応を示すことを認めた。

また, これらのパラメーターと Lewis 塩基過剰の条件下に Benesi-Hildebrand 変形式を用いて得られた錯体シフト値および平衡定数の問題について検討を加えた。

さらに, Sanders-Williams<sup>2)</sup> により提出された, 常磁性シフトパラメーター  $\rho$  と  $\Delta_c$  との関係も求めることができた。

## 〔実験〕

使用したポリリン塩基および脂肪族アルコールは市販特級品に *Kind Molecular Science* 4A 上室温で数日放置したものをを用いた。シフト試薬 Eu(DPM)<sub>3</sub> は同仁薬化学製で减压昇華精製した後デシレーター中シリカゲル上で貯蔵した。サンプリングは空調室で行った。化学シフトは内部標準 Me<sub>4</sub>Si で Hitachi R-22 型スペクトル X-ターで 90 MHz, external lock mode で行った。測定温度は 38°C で化学シフトの精度は ±10 Hz である。実験条件は以下の通りである。

a) CCl<sub>4</sub> 溶液中, 等モル混合物の希釈実験

塩基 = Eu(DPM)<sub>3</sub> = 0.02 M. CCl<sub>4</sub> 溶液で希釈し  $2 \times 10^{-3}$  M まで通常の測定を行った。なお錯体シフト値と平衡定数の計算は平衡反応式(4)から大型計算機および手計算法によるシミュレーションによって求めた。ただし, 大型計算機は阪大大型計算センター, NEAC 2200, Model 700 でプログラムは DAVID を使用した。

b) CCl<sub>4</sub> 溶液中常磁性シフトパラメーター  $\rho$  値

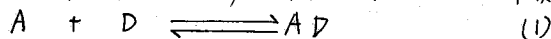
塩基 = 0.2 M, Eu(DPM)<sub>3</sub>  $\leq 4 \times 10^{-3}$  M

塩基 = 0.02 M, Eu(DPM)<sub>3</sub>  $3 \times 10^{-3} \sim 0.02$  M. 観測された化学シフトに対する Eu(DPM)<sub>3</sub>/塩基のプロットの直線関係の勾配を  $\rho$  値とした。

## 〔結果・考察〕

I. 等モル混合溶液の平衡式から錯体シフト  $\Delta_c$  および平衡定数  $K_c$  の算出

逐次反応の概念から等モル溶液において, 1:1 錯体についての平衡を以下のように考えれば



かきかきで, かかきかき, 及びわらびびあき, ささきよしふ



このとき若量係数が 1.0 であると仮定すると

$$K = \frac{CAD}{(CA - CAD)(CD - CAD)} \quad (2)$$

ここで、 $CA$  および  $CD$  は Acceptor と Donor の初濃度を表し、 $CAD$  は錯体の平衡濃度である。  
 さて、NMR は測定される化学シフトは free と complex の平均で表はされるから

$$\delta_{obs} = \left(\frac{CD - CAD}{CD}\right) \delta_D + \left(\frac{CAD}{CD}\right) \delta_{AD} \quad (3)$$

ここで、 $\Delta = \delta_{obs} - \delta_D$ 、 $\Delta_c = \delta_{AD} - \delta_D$  とおくと、(2)、(3) から

$$\Delta / C_D = K_c \cdot \Delta_c \left(\frac{CA}{C_D}\right) - K_c \Delta \left(1 + \frac{CA}{C_D}\right) + \frac{\Delta_c^2}{\Delta_c} \cdot K_c \quad (4)$$

$CA = C_D$  のとき、(4) は (5) になる。

$$\Delta / C_D = K_c (\Delta_c - 2\Delta) + \frac{\Delta_c^2}{\Delta_c} \cdot K_c \quad (5)$$

もし、第 2 項が無視できるなら  $\Delta / C_D$  に対し  $\Delta$  のプロットは直線関係を示し、勾配と切片からそれぞれ  $K_c$  および  $\Delta_c$  が求まるが、 $K_c$  が大きいと第 2 項が無視できなくなる。そこで、ここで得られた  $\Delta_c$  と  $K_c$  を初期値として、大型計算機法と手計算法の二つの方法によって計算を行った。1) 大型計算機法; 実験の部、参照 2) 手計算法; 以下に示す方法で行った。

(5) から変形して  $\Delta / C_D = K_c \cdot \Delta_c - K_c (2\Delta - \frac{\Delta_c^2}{\Delta_c})$  (6) この直線関係から最小二乗法により求めた。ただし  $R = \frac{\sum (\Delta_{obs} - \Delta_{cal})}{\sum (\Delta_{obs})^2} \left\{ \frac{1}{2} \right\} < 0.05$  ここで  $R$  は Agreement factor である。

ここで、計算回数は約 10 回以下で収束し、このときの  $K_c$  の誤差は ±10% 以下であった。表 I.  $\Delta_c$  と  $K_c$  の値

|                                    | $\Delta_c$ (ppm) |         |          | $K_c$ (mol <sup>-1</sup> ) |      |
|------------------------------------|------------------|---------|----------|----------------------------|------|
|                                    | $\alpha$         | $\beta$ | $\gamma$ | Me                         |      |
| Pyridine                           | 25.5             | 8.8     | 8.5      |                            | 1390 |
| 2-Methyl                           | 9.7              | 8.9     | 5.8      | 22.7                       | 310  |
| 3-Methyl                           | 28.1             | 9.2     | 9.0      | 5.9                        | 3580 |
| 4-Methyl                           | 27.4             | 9.5     |          | 6.9                        | 2770 |
| 3,5-Dimethyl                       | 24.7             |         | 8.1      | 5.3                        | 3210 |
| n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH | 26.4             | 14.6    | 9.2      |                            | 620  |
| n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH | 28.3             |         |          | 5.2                        | 820  |
| i-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH | 27.0             |         | 10.4     |                            | 610  |
| s-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH |                  | 15.1    | 9.3      |                            | 480  |

以上、2) から得られる  $\Delta_c$  と  $K_c$  の値を比較すると、良い対応を示すことがわかった。そこで、 $\Delta_c$  と  $K_c$  の値は大型計算機で算出した値の方を表 I にまとめた。なお、表 I について、 $\Delta_c$  と  $K_c$  の誤差はそれぞれ ±5% と ±10% 以下であった。

なお、ここで算出された  $\Delta_c$  と  $K_c$  の値は図 1 に示すように、実験値を良く再現しているといえる。

表 I のピリジン系について、メチル置換体の方が  $K_c$  が大きくなる傾向にあるが、

これは一般的に、メチル基が入ることにより、塩基性が増大するためと考えられる。

また、2-Methyl は 2 位のメチル基の立体障害により小さくなると考えられる。

また、脂肪族アルコール系についても、配位する原子に近しい原子にメチル基があるほど平衡定数が小さくなる傾向にあり、ピリジン系と同様に、立体効果が考えられる。

さらに、アルコール系に比べて、ピリジン系の方が平衡定数が大きいのは、塩基性が大きいからであろう。

以上の結果、等モル混合溶液の 0.02 M 以下の条件では 1:1 付加錯体の形成を考慮するだけである。

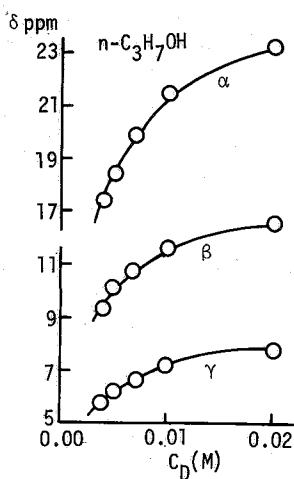
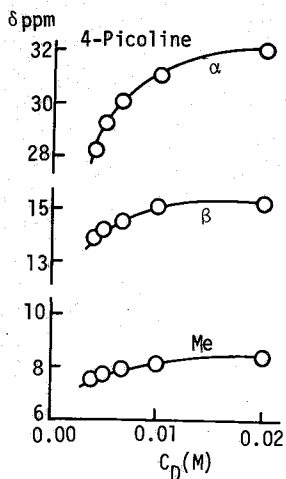


図1 等モル混合溶液の希釈シフトの計算値と実験値  
 — 計算値  
 ○ 実験値

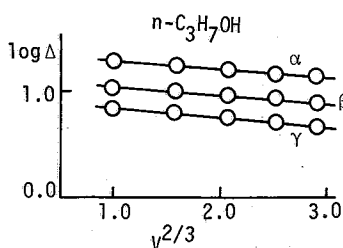
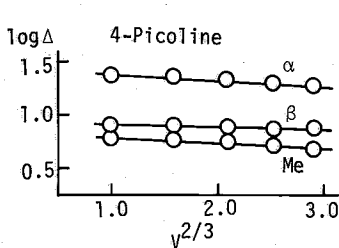


図2.  $\log \Delta$  と  $V^{2/3}$  との関係

表II 無限濃縮値  $\Delta_{i.c.}$  (ppm)

|                                    | $\alpha$ | $\beta$ | $\gamma$ | Me   |
|------------------------------------|----------|---------|----------|------|
| Pyridine                           | 24.7     | 8.5     | 8.1      |      |
| 2-Methyl                           | 9.4      | 7.1     | 5.9      | 20.3 |
| 3-Methyl                           | 27.7     | 9.1     | 8.9      | 5.8  |
| 4-Methyl                           | 26.8     | 9.3     |          | 6.8  |
| 3,5-Dimethyl                       | 24.3     |         | 8.0      | 5.2  |
| n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH | 24.4     | 13.6    | 8.5      |      |
| n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH | 26.7     |         |          | 4.9  |
| i-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH | 24.4     |         | 8.7      |      |
| s-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH |          | 13.7    | 8.5      |      |

## II. 等モル溶液の無限希釈シフトと容積との関係

Lewis塩基とEu(OPM<sub>3</sub>)<sub>3</sub>との等モル溶液の希釈シフトはこれらを含む系の容積が増大するにつれて、高磁場シフトを示し、しだいに、遊離塩基のシフトに接近してゆく。この関係は Lewis塩基/Eu(OPM<sub>3</sub>)<sub>3</sub> = 1のときの曲線と一致してくる。これは単位体積あたりの衝突頻度の減少に対応している。従って、今回、希釈シフトを  $V^{1/2}$  または  $V^{2/3}$  に対しプロットしたところ、両者ともに良好な反比例の関係が得られ(図2)、同時に  $V \rightarrow 0$  の可成り無限濃縮に対応する値  $\Delta_{i.c.}$  を求めることができた。

この値について、表IIにまとめられた。ここで、 $V^{1/2}$  の概念は  $N^{1/2}$  ( $N$ : Avogadro数) または  $C^{-1/2}$  ( $C$ : 濃度) とも対応するものである。 $V^{2/3}$  は  $V = \frac{4}{3}\pi r^3$  から求める  $4\pi r^2$  (球体表面積) の内容をもつことになり、Lewis塩基-Eu(OPM<sub>3</sub>)<sub>3</sub> の相互作用が球体モデルで説明でき

ることになる。

また  $V^{2/3}$  と反比例の関係があることは  $r^{-2}$  との関係があることを意味する。

いずれにせよ、シフト値と  $V^{1/2}$  および  $V^{2/3}$  との関係は直線性があり、系の切片 ( $V \rightarrow 0$ ) はほぼ同程度の大きさの無限濃縮値  $\Delta_{i.c.}$  を与えることになる。

CCl<sub>4</sub> 溶液中、等モル混合物から得られた  $\Delta_c$  値は  $\Delta_{i.c.}$  と図3、4に示すように、良い相関関係にあり、これらの関係式は次のようになる。

ピリジン系  $\Delta_c = 1.03 \Delta_{i.c.} + 0.13$   
 脂肪族ピロール系  $\Delta_c = 1.07 \Delta_{i.c.} + 0.30$

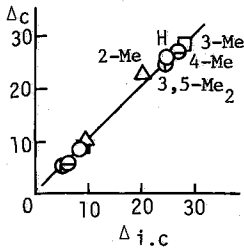


図3.  $\Delta_c$  と  $\Delta_{i.c}$  の関係 (ピリジン系)

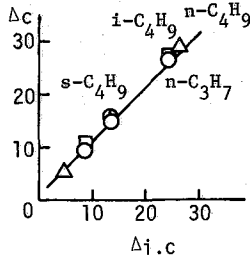


図4.  $\Delta_c$  と  $\Delta_{i.c}$  の関係 (脂肪族アルコール系)

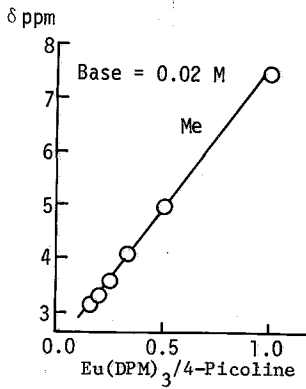


図5. 化学シフトとモル比の関係

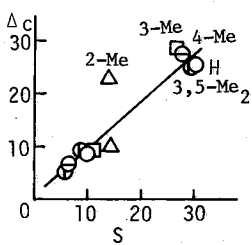


図6. ピリジン系における  $\Delta_c$  と  $\Delta_{i.c}$  の関係

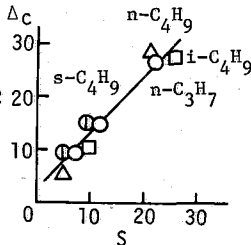


図7. 脂肪族アルコール系における  $\Delta_c$  と  $\Delta_{i.c}$  の関係

#### Ⅱ. 極基濃度過剰の場合

この場合、図5のような非常に良い直線関係が得られ、これから、平衡定数が非常に大きいことが平現されるが、その値を決定することは困難である。

表Iの  $K_c$  および  $\Delta_c$  の値は前回<sup>4)</sup>の Benesi-Hildebrand 変形式を用いた方法(グラフ法)の際の実験値を良く再現することから、わかった。

しかし、前回、グラフ法から求めた平衡定数と今回得られた値を比べると、前者の方が小さく見積られていたことがわかる。その原因として、グラフ法において、 $C_{AD}=0$  の近似が完全には成立してなかったためと考えられる。

また、図5の直線関係の傾斜は  $Eu(DPM)_3$  の逐次添加法から得られる、従来の常磁性シフトパラメータ  $\delta$  値に良く対応する値である。この  $\delta$  値は1:1錯体シフト  $\Delta_c$  と図6,7のような関係にあり、その関係式は次のようになる。

ピリジン系  $\Delta_c = 0.96\delta + 0.45$

脂肪族アルコール系  $\Delta_c = 1.07\delta + 2.29$

この系について、 $CCl_4$  溶媒で取扱うべき  $\delta$  値は便宜的に1:1錯体シフト値と考えても良いことになる。しかし、この条件下で1:2錯体の存在の可能性をまったく否定することはできない。この点についてもなお、詳細に検討を加えたい。

(文献)

1) 佐々木他, 第13回NMR討論会講演要旨集 P34

2) J. K. M. Sanders et al, J.A.C.S. 94, 5325 (1972)

3) A. F. Lodge et al, Tetrahedron Lett., 5149 (1970)

4) 佐々木他, 第14回NMR討論会講演要旨集 P120

生越 及晴, 杉本 博司, 吉田 善一

〔序〕 ポルフィリン鉄錯体はハム蛋白の活性中心をなし、例えばハモグロビン、ミオグロビン、チトクロームc等において見られるように、生体内反応において重要な役割を果たしている。我々は、これらハム蛋白の活性中心をなすオクタポルフィリンを簡約化したモデル化合物として、オクタエチルポルフィリン鉄(Ⅳ) (O.E.P.Fe<sup>Ⅳ</sup>, Fig.1) を取り上げ、ピリジン(Py) 誘導体を配位させ、220MHz  $^1\text{H-NMR}$  によりこの錯体の常磁性シフト及びリガンド効果等について報告してきた。その中でビスピリジン錯体のリガンドのシグナルに着目し、コン

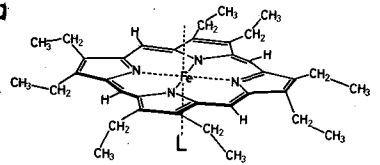


Fig.1 Octaethylporphyrin

タクトシフト(C.S.)を見積もりスピンスピン密度との比較により、ピリジン(Py)からFeへの電荷移動が起こっている事が明らかになった。更にモノピリジン錯体, Py-Fe-Im(イソニチル)のミックスリガンド錯体の可能性を示唆してきた。本研究では、ビスピリジン錯体については骨格の電子状態を鋭敏に反映する $^{13}\text{C-NMR}$ による解析と、 $^1\text{H-NMR}$ による結果を合わせて検討し、ハム蛋白への応用としてチトクロームc-Py 誘導体錯体との比較・検討を行ない、またモノピリジン錯体については、Py, Im 誘導体によるリガンド効果が、ポルフィリンの各 d-CH<sub>2</sub>-基に及ぼす影響等について解析を試みた。

〔実験〕  $^1\text{H-NMR}$ の測定には、Nicolet TT-100 を付属させた Varian HR 220 を使用し、 $^{13}\text{C-NMR}$ の測定には日本電子 PFT-100 (25.15MHz) を使用した。ハムのモデル化合物には、合成オクタエチルポルフィリン鉄(Ⅳ) (O.E.P.Fe<sup>Ⅳ</sup>(C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>)<sub>2</sub> or O.E.P.Fe<sup>Ⅳ</sup>(C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>)<sub>2</sub>) を用い、CDCl<sub>3</sub> 中、Py 誘導体 (Py, Py-d<sub>5</sub>, 4-NH<sub>2</sub>-Py, 4-Et-Py, 4-Me-Py, 3-Me-Py, 4-Vinyl-Py, 4-Ac-Py) & Im 誘導体 (Im, 2-Me-Im) を添加し、内野基準として T.M.S. を用い、+20°C ~ -60°C の間で温度変化による各シグナルのシフトを観測した。ハム蛋白は Horse Cytochrome c (約 10mM, 精製したもの) を用い、Py 誘導体を external Ligand として配位させ、 $\text{D}_2\text{O}$  中で  $^1\text{H-NMR}$  により数々回積算を行なった。

〔結果・考察〕

(I) モノピリジン-ポルフィリン鉄(Ⅳ)錯体のNMR

先の春期年会において、-43°C で O.E.P.Fe<sup>Ⅳ</sup>(C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>)<sub>2</sub> に Py を添加していくと、モノピリジン錯体と考えられるシグナルが -62, -28ppm (d-CH<sub>2</sub>), -8ppm ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), +17ppm (mesoH) に観測され、また、H<sub>2</sub>O が配位したと考えられるシグナルは -22, -20ppm (d-CH<sub>2</sub>), -3ppm ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), +8ppm (mesoH) というふうに帰属した<sup>2)</sup>。今回、Im について同様な実験を行なった結果を Fig. 2 に示した。(at -40°C)。モノ錯体のシグナルは -70, -50ppm (d-CH<sub>2</sub>), -11ppm ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), +15ppm (mesoH) に観測される。又、H<sub>2</sub>O が配位していると考えられるシグナルは Py の場合と同じ位置に観測される。更に、4-Me-Py, 4-Ac-Py, 2-Me-Im についても同様な実験を行なうと、各モノ錯体のシグナルは、Table 1. に示す位置に夫々観測された。(at -40°C)

ハム鉄の電子状態を鋭敏に反映すると考えられる d-CH<sub>2</sub>-基に注目すると、Py 誘導体では

もりしま いさお, いしかわ たかとし, ますだ ひでき, よねぢわ ていじろう,  
 おごし ひさのぶ, すぎもと ひろし, よしだ せんいち

| X       | $\alpha\text{-CH}_2$ | $\beta\text{-CH}_3$ | meso H |
|---------|----------------------|---------------------|--------|
| Py      | -62, -28             | -8                  | +18    |
| 4-Me-Py | -60, -29             | -8                  | +10    |
| 4-Ac-Py | -60, -30             | -10                 | +3     |
| Im      | -70, -50             | -11                 | +15    |
| 2-Me-Im | -73, -58             | -11                 | +36    |

(PPM from TMS)

-30, -60ppm付近に観測されるのに対し, Im誘導体では, -50, -70ppmとかなり低磁場に観測される。その理由としてモノ錯体は, そのシグナルの位置及び線中から High Spin (H.S.) と考えられるが, リガンドの Im系と Py系を考えた場合, Im系の方が配位力は大きく, その結果ポルフィリン平面からの鉄のずれが小さくなり, ポルフィリン上へのスピンの伝達がよりしやすくなり, より低磁場へシフトしたものと考えられる。また, Table 1 に示した各 Py, Im誘導体の添加に伴って現われた,  $\text{H}_2\text{O}$  が配位していると考えられるシグナル位置は全て同じであった。このシグナルは O.E.P.Fe(II)  $\text{ClO}_4$  に直接  $\text{H}_2\text{O}$  を添加しても観測され, ポルフィリンに  $\text{H}_2\text{O}$  が直接配位した錯体が生成したものと考えられる。

以上のように, モノ錯体生成には  $\text{H}_2\text{O}$  が関与し, Fig. 3 に示すような複雑な平衡から成り立っていると考えられる。尚,  $\text{H}_2\text{O}$  除去のため, Py,  $\text{CDCl}_3$  の蒸留, 精製, アルゴンガス中での sampling と完全に脱気した状態での測定にもかかわらず,  $\text{H}_2\text{O}$  の配位したシグナルは観測され, amine の添加に伴って更に増加した。シグナルの相対面積比により添加した Py 及び配位した  $\text{H}_2\text{O}$  の濃度を求めると, Py の添加量 0.10  $\mu\text{l}$  の時, Py,  $\text{H}_2\text{O}$  の濃度はともに  $10^{-6}$  Mol の order であり,  $\text{H}_2\text{O}$  は amine 中より供給されたというよりも, おしる amine の添加に伴ない溶液中の  $\text{H}_2\text{O}$  が解離しやすくなり  $[\text{Fe}(\text{O.E.P.XOH})]^+\text{ClO}_4\text{H}^+$  なる錯体が生成したためと考えられる。また, Fig. 3 に示したような, 生成アミンに直接  $\text{H}_2\text{O}$  が配位した錯体は報告されておらず, 今後,  $\text{H}_2\text{O}$  が配位した High Spin 状態のヘム蛋白を解折していく上で, 有益なモデル錯体になると期待できる。

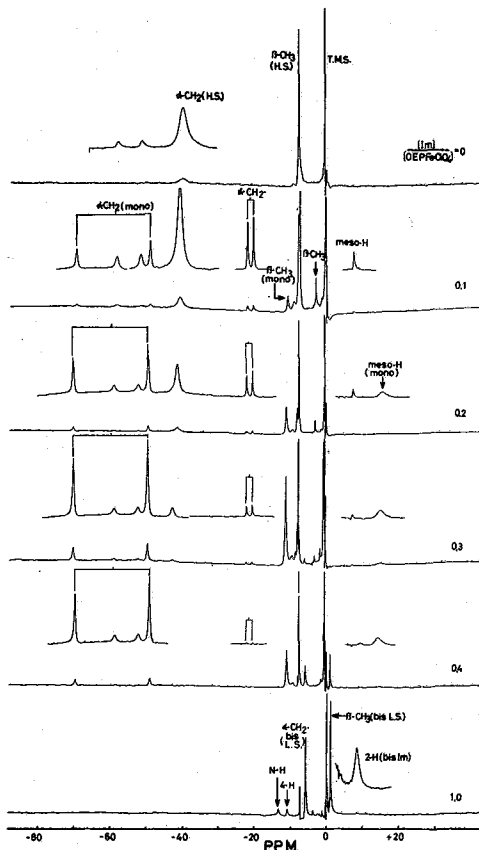


Fig. 2  $[\text{Fe}(\text{OEPXIm})]\text{ClO}_4$  at  $-40^\circ\text{C}$  in  $\text{CDCl}_3$

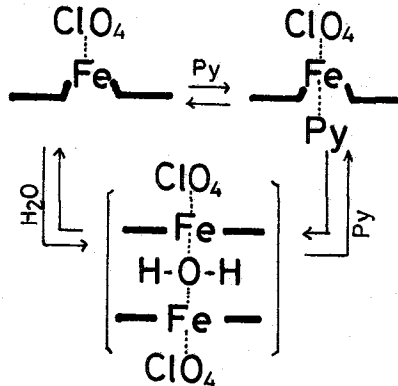


Fig. 3 Equilibrium of mono-pyridine complex

(I)ビスピリジン-ポルフィリン鉄(II)錯体のNMR

Fig. 4に主なピリジン類をリガンドとして、O.E.P.Fe(II)<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>に配位させた時の0°C, -30°C, -60°Cにおけるケミカルシフトをstick diagramで示してある。配位したPyの各シグナルは、-60°Cにおいて低磁場側から3-H(-22ppm), 4-H(-11ppm), 2-H(+11ppm)のように観測され、各シグナルのCurie Plotの傾きの比<sup>2)</sup>, X-ray data<sup>3)</sup>等からIsotropic Shift (I.S.)をContact Shift (C.S.)とPseudocontact Shift (P.S.)とに分離すると<sup>4)</sup>, Table 2に示す値になった。Table 2よりC.S.は全て高磁場シフトとなりPyのring上には負のスピンの分布機構により分布したものと考えられる。更にスピン分布機構を明らかにするためにUHF-INDO-MO計算によりPyのσ<sup>+</sup> radical, π<sup>+</sup> radical, π<sup>-</sup> radicalのそれぞれのスピン密度を計算した。(Table 3)。C.S.とスピン密度は符号が逆で絶対値が比割するため、Table 2と3を比較すると、σ<sup>+</sup> radicalで最もよい一致を示す。従って、[O.E.P.Fe(Py)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>錯体では、PyのNはσ<sup>+</sup> donorとしての性質が強いものと考えられる。更にこの結果を詳しく検討するために、<sup>57</sup>Fe-NMRにより解析を試みた。一例としてO.E.P.Fe(II)<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>に4-Me-Pyを約5倍量添加した時のスペクトルをFig. 5に示した。assignmentはプロトンとのハーフデカップルにより、低磁場より-CH<sub>3</sub>, meso-CH<sub>2</sub>が決定でき、Pyrroleのαとβ位は、シグナルの線中より低磁場からβ, αと決定した。残った-245, -195 ppmの各シグナルは配位した4-Me-Pyのシグナルと考えられるが、Pyにおいてもほぼ同じ位置(-220-190 ppm)に観測され、シグナル強度も同様

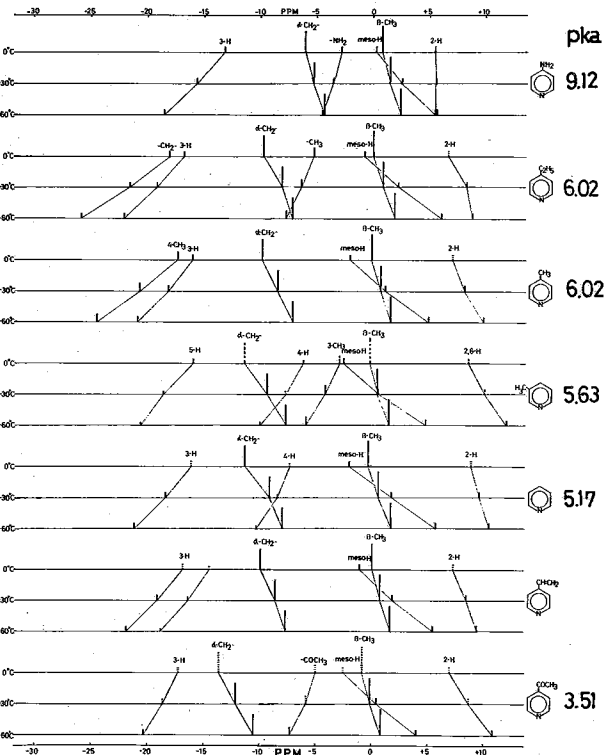


Fig. 4 Temperature Dependence of OEP Fe(X-Py)<sub>2</sub> Cl

Table 2 Contact Shift of Pyridine

| Position | Chem. Shift <sup>*</sup> | I.S.  | P.S.    | C.S.  |
|----------|--------------------------|-------|---------|-------|
|          |                          |       | (calcd) |       |
| 2-H      | +10.0                    | +8.5  | -57.9   | +66.4 |
| 3-H      | -21.0                    | -25.9 | -30.2   | + 4.3 |
| 4-H      | -10.5                    | -17.7 | -26.3   | + 8.6 |

(\*PPM from TMS at -57°C)

Table 3 Spin Density of Pyridine-radicals

| Position | σ <sup>+</sup> radical | π <sup>+</sup> radical | π <sup>-</sup> radical |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 2-H      | -0.035                 | -0.002                 | -0.007                 |
| 3-H      | -0.009                 | -0.004                 | +0.001                 |
| 4-H      | -0.019                 | -0.014                 | -0.016                 |

度である事を考慮すると、2-C, 3-Cと考えられる。各シグナルはCurie則に従う常磁性シフトを示している。今後、前述した<sup>1</sup>H-NMRの結果をまじえ、この<sup>13</sup>C-NMRの解析により、[O.E.PFe(Py)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>錯体のスピン伝達機構が一層明らかになると思われる。

### Ⅳ) ハム蛋白Aの応用

ハム蛋白においてハム環副鎖の-CH<sub>3</sub>基は特に興味深い挙動を示す事で知られているが、この-CH<sub>3</sub>基に相当する[O.E.PFe(X-Py)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>のα-CH<sub>3</sub>基に注目するとLigandのPy誘導体のpKaが増加するに従って、高磁場シフトを示す<sup>5)</sup>(Fig.4参照)一ろ、4トクロムCに種々のPy誘導体を配位させた時のシグナルを、Fig.6に示した。-CH<sub>3</sub>基(↓印)に注目すると、やはりpKaの増加とともに高磁場にシフトしている。このようにPy, β-Picoline, γ-Picoline, 4-AminoPy等比較的置換基が小さく、ハム蛋白に配位しやすく蛋白内でも比較的自由的な回転が可能なPy類は、合成ハミンに配位した場合と類似した挙動を示しておりpKa依存性が見られるが、4-Ac-Py, 4-Vinyl-Py, 4-Et-Py等、4位にbulkyな基が置換されているPy類の場合は、4位の置換基による立体障害のため配位しにくく、配位してもpKa依存性は観測されない。このように合成O.E.PFe(Ⅳ)はハム蛋白との類似点が多く、今後、ハム蛋白の電子伝達機構や構造と機能の関連性を解析するにあたって、有益な示唆を与えてくれるものと期待できる。

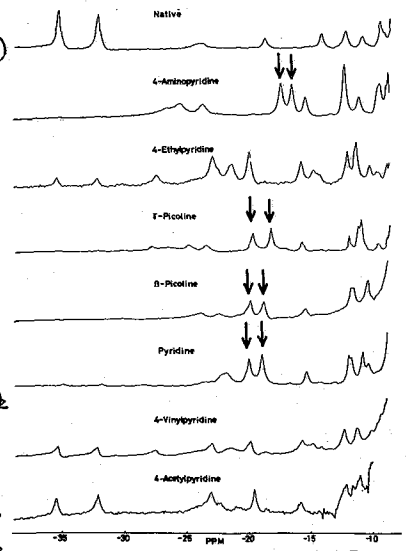
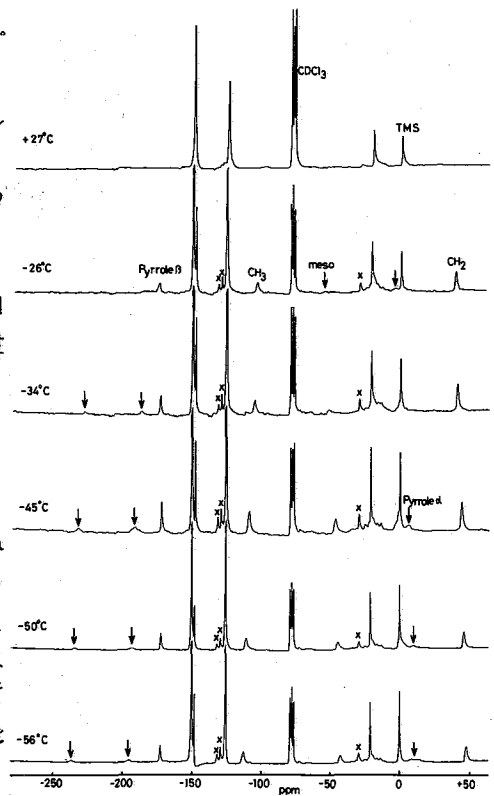


Fig.6 Horse Cytochrome C Pyridine Derivative

### 参考文献

- 1) I. Morishima, & T. Ishikawa, J. Amer. Chem. Soc., 投稿中
- 2) I. Morishima, et al., '76 日化春期年会
- 3) B. Bak, et al., J. Mol. Spect., 2, 361 (1958).
- 4) H. M. McConnell, et al., J. Chem. Phys., 29, 1361 (1958).
- 5) H. A. O. Hill, et al., J. Amer. Chem. Soc., 94, 731 (1972).

# 'DESERT' 法による P<sup>31</sup> シン-3':5'-サイクリック モリニ酸の構造。(II) 中性溶液中での Syn-Anti 平衡の温度依存性

(京大理) 林文和, 赤坂一乙, 波多野博行

## I. 目的

核磁気緩和を用いた溶液中の分子の構造決定に差緩和速度の方法 (DESERT 法)<sup>1</sup> がある。まず, 分子が  $n$  個のプロトンを含む所, 任意のプロトン  $i$  のスピーン格子緩和速度は主に双極子相互作用する他の  $(n-1)$  個のプロトンからの双極子緩和の和によって決まる。

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_i = \sum_{j \neq i}^n \frac{3}{10} \frac{\gamma_H^4 \hbar^2}{r_{ij}^6} \left\{ \frac{\tau_c}{1+\omega_H^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1+4\omega_H^2 \tau_c^2} \right\} \dots (1)$$

但し,  $r_{ij}$  はプロトン  $i, j$  間の距離,  $\tau_c$  は分子の回転相関時間,  $\gamma_H$  はプロトンの磁気回転比,  $\omega_H$  は角振数を示す。これは特定の H のみを D で置換 (= = = 2' は P<sup>31</sup> = シン環の H(β) に適用する) したとき, (1) 式の  $(\frac{1}{T_1})_i$  の値は H の D による置き換えで  $\frac{2}{3} \times (\frac{2}{3}) \times (\frac{\gamma_D}{\gamma_H})^2 = 0.041$  ( $\gamma_D$  は重水素の磁気回転比) に減少するから, 重水素置換前後で  $T_1$  を測定し, (1) 式の両辺を差をとる ( $\tau_c$  は両方の場合同じと仮定する) と, 差緩和速度 (DRR)<sub>i</sub> は

$$\begin{aligned} (DRR)_i &= \left(\frac{1}{T_1}\right)_i (\text{normal}) - \left(\frac{1}{T_1}\right)_i (\text{k-deutero}) = \frac{\gamma_H^4 \hbar^2}{r_{ik}^6} \left(1 - \frac{16}{9} \left(\frac{\gamma_D}{\gamma_H}\right)^2\right) \left\{ \frac{3}{10} \left(\frac{\tau_c}{1+\omega_H^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1+4\omega_H^2 \tau_c^2}\right) \right\} \\ &= 0.96 \left(\frac{\gamma_H^4 \hbar^2}{r_{ik}^6}\right) \left\{ \frac{3}{10} \left(\frac{\tau_c}{1+\omega_H^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1+4\omega_H^2 \tau_c^2}\right) \right\} \dots (2) \end{aligned}$$

従って重水素置換したプロトン (K) と任意のプロトン  $i$  との原子間距離  $r_{ik}$  はプロトン  $i$  に対する差緩和速度 (DRR)<sub>i</sub> の値と, 分子運動の相関時間 ( $\tau_c$ ) がわかれば一義的に決定出来る。

= = = 2' は Adenosine-3':5'-cyclic monophosphate (cAMP) を用いて, 中性 D<sub>2</sub>O 溶液中の cAMP の Syn-Anti 平衡の決定に上述の DESERT 法を適用した。cAMP のリボースリニ酸基は 3'-endo-4'-exo (<sup>3</sup>T<sub>4</sub>) 型の構造をとり, C(4') はリニ原子に対して C(3')-O と C(5')-O の両方の結合軸を通り gauche 構造をとり, 非常に安定した椅子型構造をとるため, 次の研究に適した nucleotide の一つである。DESERT 法により求めた原子間距離  $r_{ij}$  を使って, クリウド軸回りの回転に対する温度依存性を研究した。これには (1) Syn  $\rightleftharpoons$  Anti の平衡, (2) Monomer  $\rightleftharpoons$  Dimer の平衡を考慮しなければならない。このため cAMP 分子のプロトン H(1'), H(2), H(β) の濃度変化, P<sup>31</sup> = シン環プロトン, H(2), H(β) の温度変化による化学シフトを調べることに伴って, cAMP 分子の Monomer  $\rightleftharpoons$  Dimer 平衡についても併せて研究を行った。

## II. 実験

cAMP (廣人) 重水溶液は Bio-Rad Chelex-100 で処理し, 不純物の常磁性金属イオンを除き, 1/50 量 (モル比) の EDTA を加えた。cAMP の重水溶液は NMR 試料管 (5mm) 中で脱気 (溶存酸素を除く) し密封した。実験に用いた全ての cAMP 溶液の pH は

は 7.0 以下, あつかい, かす加さ, は 7.0 以下



7.0 ± 0.1 (PHX-2の読み) に希釈 NaOD 及び DCl を用いて調整した。T<sub>1</sub>測定には H(β) の重水素化前と重水素化後とは減圧密封した同一サンプルに於いて、正確に温度調整(±0.5°C)して行なった。後者の H(β) の選択的重水素置換は 95°C で初2時間加熱し、重水素化率が 99% 以上であることを NMR のスペクトル上で確かめた。緩和時間(T<sub>1</sub>)の測定は日本電子製 PS-100 NMR 分光器, PFT-100 FT ユニットを用い、180°C-90°C 10分スキャンを繰り返して行った。化学シフトは TMS を内部基準にして測定した。

### III. 結果と考察

#### (A) CAMP の H(1')-T<sub>1</sub> 測定による分子運動の相関時間の決定

H(β) 選択的重水素化した CAMP の 0.08 と 0.15 M 濃度のサンプルに於いて、25-78°C 間で温度変化させ、70ポント H(1') の T<sub>1</sub> 測定を行なった。H(1') の双極子緩和効果は周囲の分子内 70ポント H(2'~5', 5") と H(2) により決まると仮定して、(1)式に基づいて計算した。CAMP の原子座標は Laspinasse et al.<sup>2</sup> のデータを採用した。その結果を図1に示す。25-78°C の温度領域で、相関時間 τ<sub>c</sub> は 0.3-1.9 × 10<sup>-10</sup> (sec) の値を示し、次に行なう DESERT 法の H(1') と H(β) 間の双極子ペアトルの相関時間として使用した。この τ<sub>c</sub> の温度変化から、CAMP の回転運動の活性化エネルギーは 6~7 (Kcal/mole) であることがわかった。

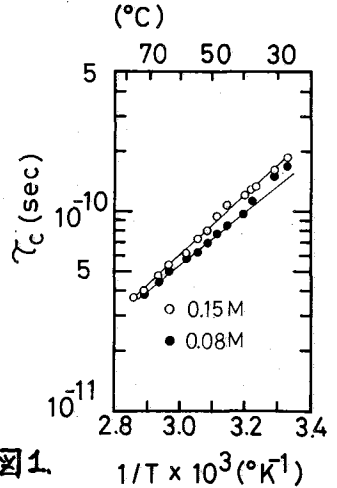


図1

#### (B) CAMP 分子の H(1') と H(β) の原子間距離 $\bar{r}_{1\beta}$

同じ CAMP の D<sub>2</sub>O 溶液 (99.75% D<sub>2</sub>O, PH 7.0 ± 0.1) に於いて、各一定温度で、非重水素化 CAMP と H(β) 選択的重水素化 CAMP の IRFT (Inversion Recovery Fourier Transform)-NMR スペクトルを測定し、その強度の 50% 回復の H(1') 70ポントの緩和時間 (T<sub>1</sub>)<sub>H(1')</sub> を最小自乗法で計算した。この二つの差緩和速度を (2) 式に従って計算し  $\bar{r}_{1\beta}$  を求めた。なお H(2'), H(3') に於いての緩和時間は NMR スペクトル上で分離出来ず、測定出来なかった。

(2) 式より、0.08 M と 0.15 M CAMP の各温度での差緩和速度及び相関時間 (τ<sub>c</sub>) (図1) の値から求めた原子間距離  $\bar{r}_{1\beta}$  を図2(a) に示した。この結果、PH 7.0 での CAMP の D<sub>2</sub>O 溶液では、低温領域で  $\bar{r}_{1\beta}$  は長 (3.0 Å 以上)、温度上昇とともに、 $\bar{r}_{1\beta}$  は短くなる (2.65 Å まで)。このことはアデニン環に Anti ⇌ Syn の平衡移動があることを意味する。なお 0.15 M に較べて 0.08 M の低濃度の CAMP では多少大きな変化 (±0.4 Å) が観測された。(T<sub>1</sub>) 測定、(2) の計算から  $\bar{r}_{1\beta}$  に入ってくる誤差は ±0.1 Å 以内であることが考慮される、すなわち観測された  $\bar{r}_{1\beta}$  の温度変化は有意の構造変化である。

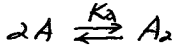
CAMP 分子のアデニン環が溶液中で Syn-anti 平衡にあるとき、観測された見かけの  $\bar{r}_{1\beta}$  の 6 乗分の 1 はその平衡時の各 fraction で取り syn, anti 構造での  $\bar{r}_{1\beta}^s$ ,  $\bar{r}_{1\beta}^a$  の 6 乗分の 1 の和に等しい。

$$\bar{r}_{1\beta}^6 = f^a (\bar{r}_{1\beta}^a)^6 + f^s (\bar{r}_{1\beta}^s)^6 \quad \dots (4)$$

CAMP の原子座標<sup>2</sup> から Syn (φ<sub>CN</sub> = 150°) と anti (φ<sub>CN</sub> = 330°) での原子間 H(1')-H(β)

の距離  $\bar{r}_{18}^s = 2.58 \pm 0.08 \text{ \AA}$ ,  $\bar{r}_{18}^a = 2.77 \pm 0.08 \text{ \AA}$  である。観測した  $\bar{r}_{18}$  の値から *syn, anti* 構造が占める *fraction*,  $f^s, f^a$  を求めることが出来た。図2(b)に  $f^a$  の値を示し、0.08M と 0.15M での CAMP での取りうる  $f^a$  の範囲を破線と示した。なお後述の化学シフトの温度依存性より見積られた温度での Dimer の *fraction* ( $f^d$ ) を併せて実線と示した。

(c) CAMP 700トニ化学シフトの濃度依存性  
 濃度 (0.03-0.25M) 変化に対し、CAMP 分子 700トニ, H(1'), H(2), H(8) の TMS からの化学シフト,  $\nu(\text{Hz})$ , を調べた (図3)。濃度を大きくすると、11本の700トニも明らかな高磁場シフトを示すが、 $\nu(\text{H}(2))$  700トニは大きくシフトする。これらのシフトの大きさ、方向性は AMP, Adenosine 類の  $\text{P}^{\text{Te}}$  ニ化合物から示す特徴と類似しており、 $\text{P}^{\text{Te}}$  ニ塩基間のスタッキングが起つてはることを予想される。スタッキングの残基構造を単純な二量体 (Dimer) 形成によりと仮定し、次のように非線形最小自乗法により、平衡定数を求めた。



$$K_2 = \frac{[A_2]}{[A]^2} = \frac{[A_2]}{([A]_0 - 2[A_2])^2} \quad (6)$$

但し、 $[A]_0, [A_2]$  は CAMP の全濃度 (M), 二量体濃度 (M) を示す。観測される化学シフトは

$$\nu_{\text{obsd}} = \frac{[A]_0 - 2[A_2]}{[A]_0 - [A_2]} \nu_A^0 + \frac{[A_2]}{[A]_0 - [A_2]} \nu_{A_2}^0 \quad (7)$$

但し、 $\nu_A^0, \nu_{A_2}^0$  は濃度が零及び無限大への外挿による Monomer, Dimer の化学シフトを示してゐる。こゝで得た  $\nu$  の値は Table I に示す。Dimer への平衡定数  $K_2 = 14 \sim 30$  (平均値 20)  $\text{M}^{-1}$  であつた。

(D) CAMP 700トニ化学シフトの温度依存性

0.08M CAMP の  $\text{P}^{\text{Te}}$  ニ二環の H(2), H(8) 700トニに於いて、25-78°C での温度変化に対する化学シフトの

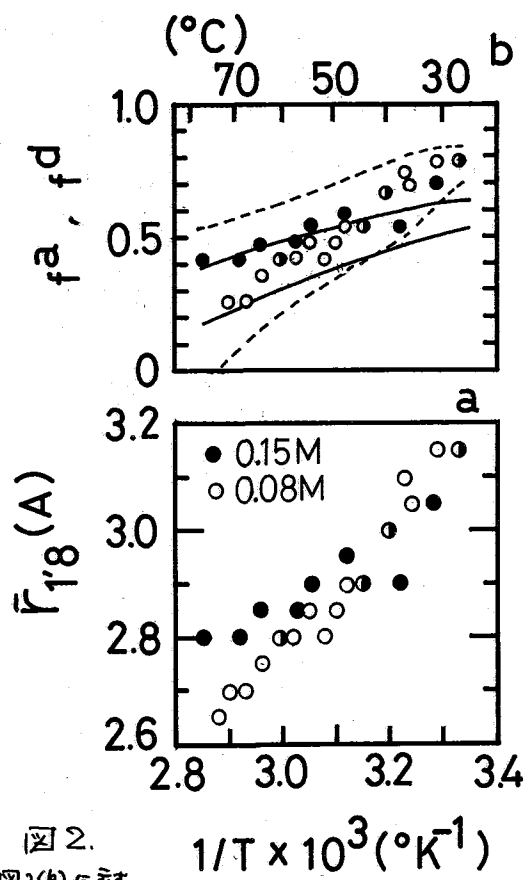


図2. 図2(a)に示す (---):  $f^a$  (Anti fraction) の取りうる上, 下限を示す。 (—):  $f^d$  (Dimer fraction) の上, 下限を示す (0.08M CAMP の場合)。

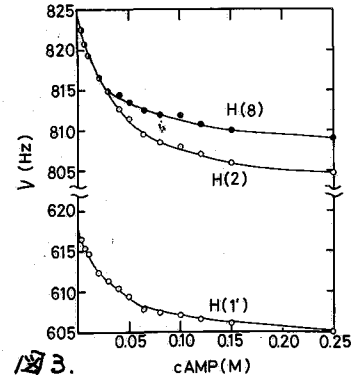


図3.

値を測定した(図4に示す)。アデニニ環の H(2), H(8) プロトンは温度上昇とともに低磁場へシフトし, 50°C 付近で TMSからの化学シフトの大きさが逆転している。

低温(27°C)ではスタック=7"による Dimer 形成(50-60%)が見られるが, 昇温とともに解離して"々"になる。このときシフト変化の大きさは H(2) プロトンは H(8) に比べて非常に大きい。H(2) プロトンは濃度依存性, 温度依存性に見られる化学シフトの大きさから Dimer 構造として, H(2) プロトンは隣りのアデニニの C6-プロトン付近に位置し, trans-stacking の構造から cis-stacking よりも優勢であることが示唆されている。

各温度に対する化学シフト値から, (6), (7) 式により, 温度変化に見られる平衡定数  $K_a$  の値を求めた(図5に示す)。Dimer から Monomer への解離焓平衡に示される標準エンタルピー変化は H(8) では 8.5 (Kcal/mole), H(2) では 8.7 (Kcal/mole) であった<sup>4</sup>。各温度で取る Dimer fraction の筆跡を求め(図2(b))に示した。

以上, (1) Syn ⇌ Anti, (2) Dimer ⇌ Monomer 平衡の温度依存性を調べるとき, 次のことが解かる。

- (1) 低温では Dimer 構造が優勢になり, アデニニ環は Anti 構造が優勢である(70%)。Dimer 構造では Anti 構造が取り易い (trans-stacking)。
- (2) 高温では Monomer の割合とともに, Syn 構造が優勢になり。Dimer fraction 対して Syn 構造が優勢であることが, Monomer では Syn ⇌ Anti の平衡に見られるとともに, 高温では Syn, 低温では Anti が優勢である。

(文献)

1. K. AKASAKA, et al. (1975) J. Mag. Res. 18, 328-343.
2. J. N. Lasparasse & D. Vasilescu. (1974) Biopolymers 13, 63-75.
3. F. E. Evans & R. H. Sarma (1974) Biopolymers 13, 2117-2121.
4. D. Pörschke & F. Eggers (1972) Eur. J. Biochem. 26, 490-498.

TABLE I. Parameters determined from a non-linear least-square analysis of the cAMP data at 25°C.

| Proton | $\delta_A^\circ$ (Hz) | $\delta_{A_2}^\circ$ (Hz) | $K_a$ ( $M^{-1}$ ) |
|--------|-----------------------|---------------------------|--------------------|
| H(2)   | 825.0                 | 795.0                     | 14.4               |
| H(8)   | 825.5                 | 804.0                     | 30.3               |
| H(1')  | 618.0                 | 599.0                     | 15.8               |

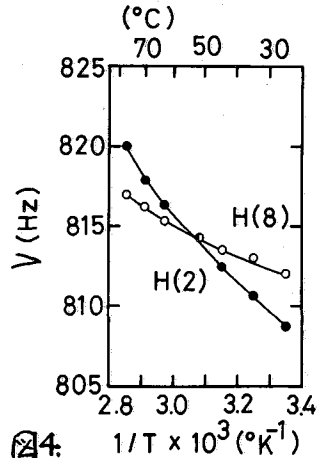


図4.

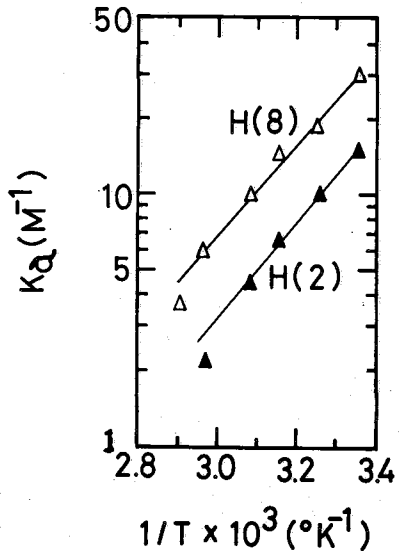


図5.

又フレオチド類の水溶液中の構造  
 —ランタニドプローブ法およびスピン結合定数による解析—  
 (東大理) ○猪垣冬彦・横山茂之・田陽三生・宮沢辰雄

生体分子の機能と理解する上で、水溶液中の分子構造を明らかにすることは基本的に重要な課題である。しかしながら従来の分光学的手法では定性的あるいは局所的な構造情報しかえられず、水溶液中の三次元構造および異性体平衡を定量的に研究するには新しい研究方法の開発が必要であった。このような要望にこたえうる有力な手法の一つがランタニドプローブ法である。われわれは水溶液中の分子について定量的な構造決定を行なうことを目的として、ランタニドプローブ法の基礎的研究を積みかさね、①ランタニドイオンと基質との化学平衡、②構造情報としてのGd(III)による誘起緩和速度の有用性、③ランタニドプローブ法とスピン結合定数の解析の両立性を明らかにして来た。本研究ではこれらの知見にもとづき、5'-ヌクレオチドおよび3'-ヌクレオチドについて、水溶液中における異性体の三次元構造と存在率を明らかにした。

**実験** 5'-UMPは協和酸酵より、3'-UMP、8-Br-5'-AMPはシグマより購入し、そのまま用いた。3'-CMPは、協和酸酵より求めた2'(3')-CMPよりカラムにより分離精製して用いた。ランタニドイオンとしてはLa(III), Pr(III), Eu(III), Nd(III)およびGd(III)の硝酸塩を用いた。測定pH領域は1.8~2.0でありLn(III)は一価のリン酸陰イオン部分に配位している。NMRスペクトルの測定は日立R-22/FT(90MHz)核磁気共鳴装置を用い、測定温度は37°Cである。化学シフトはDSSを内部標準とし、スピン-格子緩和時間の測定には180°-τ-90°パルス系列を用いた。NMRスペクトルの解析および構造解析にはそれぞれ当研究室で作製したNMRTRY, NMRFIT, NMRPLOTおよびPCS-I, PCS-IIを用いた。

5'-ヌクレオチド類の構造解析

結晶構造についてはX線解析により、溶液中の構造についてはNMR特にスピン結合定数およびNOEの解析により多くの研究が行われ、リボース環のコンホメーション、グリコシル結合およびエキソサイクリック結合まわりの内部回転の間に相関のあることが示唆されてきた。本研究では

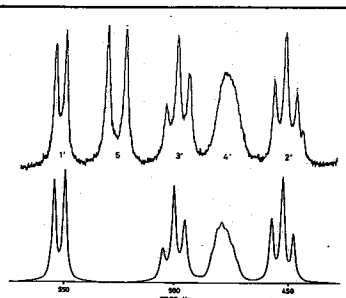


図1. (a) Pr(III), La(III)共存下での5'-UMPの実測スペクトル  
 (b) 5'-UMP計算スペクトル

表1. 5'-UMPのシフト比、緩和速度比およびスピン結合定数の実測値と計算値。

| 1H  | シフト比  |       | 緩和比  |      |
|-----|-------|-------|------|------|
|     | obs   | calc  | obs  | calc |
| 5'  | 1.00  | 1.00  | 1.00 | 1.00 |
| 5'' | 0.99  | 1.00  | 1.00 | 1.00 |
| 4'  | 0.33  | 0.35  | 0.18 | 0.15 |
| 3'  | 0.38  | 0.38  | 0.30 | 0.31 |
| 2'  | 0.20  | 0.20  | 0.17 | 0.18 |
| 1'  | 0.07  | 0.12  | 0.10 | 0.04 |
| 6   | 0.39  | 0.39  | 0.33 | 0.34 |
| 5   | -0.06 | -0.03 | 0.21 | 0.20 |

| 13C | obs  |       | calc |      |
|-----|------|-------|------|------|
|     | obs  | calc  | obs  | calc |
| 5'  | 1.00 | 1.00  | 1.00 | 1.00 |
| 4'  | 0.51 | 0.44  | 0.31 | 0.27 |
| 3'  | 0.29 | 0.26  | 0.24 | 0.18 |
| 2'  | 0.15 | 0.16  | 0.17 | 0.11 |
| 1'  | 0.15 | 0.17  | 0.08 | 0.09 |
| 2   | 0.08 | 0.05  |      | 0.05 |
| 4   | 0.09 | -0.01 |      | 0.07 |
| 6   | 0.20 | 0.16  | 0.23 | 0.20 |
| 5   | 0.04 | 0.03  | 0.20 | 0.16 |

| 3J <sub>HH</sub> | obs, Hz |          | calc, Hz |          |
|------------------|---------|----------|----------|----------|
|                  | obs, Hz | calc, Hz | obs, Hz  | calc, Hz |
| 1'2'             | 4.9     | 5.1      |          |          |
| 2'3'             | 4.8     | 5.1      |          |          |
| 3'4'             | 5.0     | 5.7      |          |          |
| 4'5'             | 2.3     | 2.8      |          |          |
| 4'5''            | 2.8     | 3.2      |          |          |

いながきふゆひこ・よこやましげゆき・たすみみつお・みやざわたつお

5'-UMPおよび8-Br-5'-AMPの構造および異性体分布を調べ強い相関関係が存在することと定量的に明らかにした。

5'-UMP  $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$ のシフトおよび緩和速度についてはすでに報告した方法に従って求めた。ランタニドプローブ法により得られる構造情報はLn(III)と錯体形成したものであり、スピン結合定数も錯体形成した基質について求める必要がある。図1(a)はPr(III)およびLa(III)が共存する溶液で観測した5'-UMPのリボース環部分のNMRスペクトルである。この条件下では8割程度の5'-UMPが錯体形成している。図1(b)は計算スペクトルであり、実測スペクトルとの対応は満足すべきものである。このようにして、錯体形成とした5'-UMPのスピン結合定数を求めた(表1)。それらの値は酸性条件下で求めたfreeの5'-UMPのスピン結合定数とほぼ一致するので、Ln(III)と配位しても、大きな構造変化のないことは明らかである。5'-UMPで求めたシフト比、緩和速度比も表1に示す。これらのデータは、Ln(III)にたいするいろいろな共鳴核の相対的配置によって与えられるので、スピン結合定数(局所的構造を反映)とは異質の構造情報を含んでいる。5'-UMPはフレキシブルな分子であり、図2と図3に示すように、種々の結合のまわりの回転異性およびリボース環の反転異性がある(反転異性は $\pi_1, \pi_2$ を組合わせて表わす)。これら以外の内部座標についてはX線結晶解析より得られた値に固定した。これまでの研究で明らかのように、Ln(III)の配位場所は一価のリン酸陰イオン部分であり、磁化率テンソルの主軸は $\text{O}_5'-\text{C}_5'$ 結合およびグリコシル結合まわりの内部回転については、X線結晶データ、NMRおよびコンホメーション解析の結果を考慮してそれぞれg'g', anti-形とした。Karplus式としては $^3J_{\text{HH}} = 9.8 \cos^2 \phi - 0.9 \cos \phi$ を用い、実測データ(表1)を満足する5'-UMPの異性体の構造と存在率は最小二乗法により求めた。実測値と計算値との対応を表1に示す。5'-UMPはいくつかの異性体(図4)の動的平衡として存在している。局所的な構造については $gg:gt:tg = 75:14:11$ および $3'endo:2'endo = 46:54$ となり、以前にスピン結合定数のみより推定されていたところと一致する。しかしランタニドプローブ法の特徴は分子全体の三次元構造を明らかにできることであり、5'-UMPは主にgg-3'endo-anti(図5)および

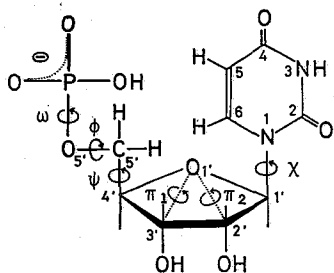


図2. 5'-UMPの構造式および解析に用いた内部座標

図1(a)はPr(III)およびLa(III)が共存する溶液で観測した5'-UMPのリボース環部分のNMRスペクトルである。この条件下では8割程度の5'-UMPが錯体形成している。図1(b)は計算スペクトルであり、実測スペクトルとの対応は満足すべきものである。このようにして、錯体形成とした5'-UMPのスピン結合定数を求めた(表1)。それらの値は酸性条件下で求めたfreeの5'-UMPのスピン結合定数とほぼ一致するので、Ln(III)と配位しても、大きな構造変化のないことは明らかである。5'-UMPで求めたシフト比、緩和速度比も表1に示す。これらのデータは、Ln(III)にたいするいろいろな共鳴核の相対的配置によって与えられるので、スピン結合定数(局所的構造を反映)とは異質の構造情報を含んでいる。5'-UMPはフレキシブルな分子であり、図2と図3に示すように、種々の結合のまわりの回転異性およびリボース環の反転異性がある(反転異性は $\pi_1, \pi_2$ を組合わせて表わす)。これら以外の内部座標についてはX線結晶解析より得られた値に固定した。これまでの研究で明らかのように、Ln(III)の配位場所は一価のリン酸陰イオン部分であり、磁化率テンソルの主軸は $\text{O}_5'-\text{C}_5'$ 結合およびグリコシル結合まわりの内部回転については、X線結晶データ、NMRおよびコンホメーション解析の結果を考慮してそれぞれg'g', anti-形とした。Karplus式としては $^3J_{\text{HH}} = 9.8 \cos^2 \phi - 0.9 \cos \phi$ を用い、実測データ(表1)を満足する5'-UMPの異性体の構造と存在率は最小二乗法により求めた。実測値と計算値との対応を表1に示す。5'-UMPはいくつかの異性体(図4)の動的平衡として存在している。局所的な構造については $gg:gt:tg = 75:14:11$ および $3'endo:2'endo = 46:54$ となり、以前にスピン結合定数のみより推定されていたところと一致する。しかしランタニドプローブ法の特徴は分子全体の三次元構造を明らかにできることであり、5'-UMPは主にgg-3'endo-anti(図5)および

図3. 5'-ヌクレオチド類の内部回転異性およびリボース環の反転異性

図3. 5'-ヌクレオチド類の内部回転異性およびリボース環の反転異性

図4. 5'-UMPの異性体分布

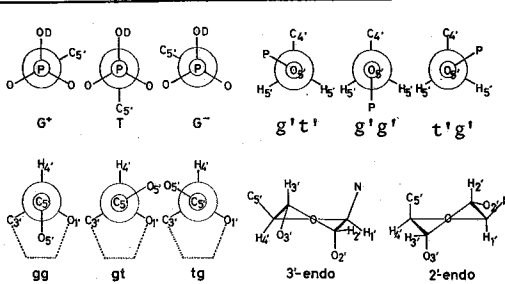


図3. 5'-ヌクレオチド類の内部回転異性およびリボース環の反転異性

図4. 5'-UMPの異性体分布

| $\text{C}_4'-\text{C}_5'$ Ribose Base |             |        |       |
|---------------------------------------|-------------|--------|-------|
| gg                                    | 3'endo-anti | 46±4%  | 0     |
|                                       | 2'endo-anti | 29±6%  |       |
| gt                                    | 3'endo-anti | 0      | 14±5% |
|                                       | 2'endo-anti | 14±5%  |       |
| tg                                    | 3'endo-anti | 0      | 11±5% |
|                                       | 2'endo-anti | 11±5%  |       |
| gg                                    | 75±5%       | 3'endo | 46±4% |
| gt                                    | 14±5%       | 2'endo | 54±4% |
| tg                                    | 11±5%       |        |       |

gg-2'-endo-anti (図6)の異性体として存在することが明らかになった。

8-Br-5'-AMP <sup>1</sup>H核について求めたシフト比と緩和速度比およびスピンの結合定数を表2に示す。5'-UMPと比較してH<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>のシフト比および緩和速度比の相対的な大きさはいちぢるしく異なっており、C<sub>4'</sub>-C<sub>5'</sub>結合まわりの構造が5'-UMPと異なることを示している。このことはスピンの結合定数の比較からも支持される。アデニン塩基のH<sub>2</sub>の緩和速度比も5'-AMPの場合と比べて大きな値となり、グリコシル結合まわりの内部回転はsyn型ととりやすことを示している。5'-UMPの解析で考慮したconformerの他にグリコシル結合まわりの配置としてsyn, antiの二型を考慮にいれ、最小二乗法により8-Br-5'-AMPの異性体の構造と存在率を求めた。表2に示すように実測値と計算値の対応は満足すべきものである。8-Br-5'-AMPの異性体は図7に示すように5'-UMPの場合といちぢるしく異なる。8位の大きなブロン原子と、リボース部分との立体障害により、gg-3'endo-anti および gg-2'endo-anti (5'-UMPでは安定)は存在せず、エキソサイクリック部分はgt および tg の配置をとる。また8-Brアデニン塩基はsyn型ととりやすくなる。8-Br-5'-AMPで特徴的に存在するgt-3'endo-syn および tg-2'endo-syn の異性体と図8, 図9に示す。このようにして、5'-ヌクレオチド類では、局所的な構造相互の間に強い相関の存在することが定量的に明らかになった。

3'-ヌクレオチドの構造解析 5'-ヌクレオチドとともに3'-ヌクレオチドの構造と明らかにすることは、ジヌクレオシドリン酸の構造と理解するための基礎として必要不可欠なことである。本研究では3'-UMPおよび3'-CMPにランタニドプローブ法と適用して、水溶液中の異性体の構造と存在率を検討した。

3'-UMP および 3'-CMP で求めたシフト比, 緩和

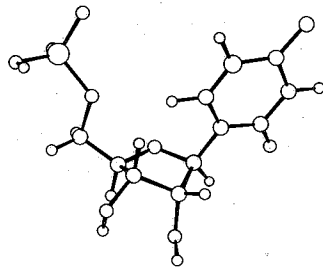


図5. 5'-UMPのgg-3'endo-antiの異性体

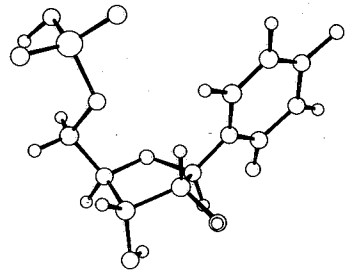


図6. 5'-UMPのgg-2'endo-antiの異性体

表2. 8-Br-5'-AMPのシフト比, 緩和速度比およびスピンの結合定数の実測値と計算値

| <sup>1</sup> H | シフト比 |      | 緩和速度比 |      |
|----------------|------|------|-------|------|
|                | obs  | calc | obs   | calc |
| 5'             | 1.00 | 1.00 | 1.00  | 1.00 |
| 5''            | 0.98 | 0.95 | 1.00  | 1.01 |
| 4'             | 0.45 | 0.46 | 0.38  | 0.33 |
| 3'             | 0.32 | 0.31 | 0.24  | 0.25 |
| 2'             | 0.15 | 0.18 | 0.11  | 0.08 |
| 1'             | 0.08 | 0.13 | 0.10  | 0.05 |
| 2              | 0.06 | 0.07 | 0.19  | 0.20 |

| <sup>3</sup> J <sub>HH</sub> | obs, Hz | calc, Hz |
|------------------------------|---------|----------|
| 1'2'                         | 4.9     | 5.4      |
| 2'3'                         | 5.8     | 5.9      |
| 3'4'                         | 4.9     | 5.3      |
| 4'5'                         | 5.0     | 5.0      |
| 4'5''                        | 5.0     | 5.0      |

| C <sub>4'</sub> -C <sub>5'</sub> | ribose | base |     |      |  |
|----------------------------------|--------|------|-----|------|--|
|                                  |        |      | syn | anti |  |
| gt                               | 3'endo | syn  |     | 30%  |  |
|                                  |        | anti |     | 8%   |  |
| tg                               | 2'endo | syn  | 7%  |      |  |
|                                  |        | anti | 7%  |      |  |
| gg                               | 3'endo | syn  | 11% |      |  |
|                                  |        | anti | 5%  |      |  |
| gg                               | 2'endo | syn  | 16% |      |  |
|                                  |        | anti | 16% |      |  |
| gg                               | 3'endo | syn  | 0%  |      |  |
|                                  |        | anti | 0%  |      |  |
| gg                               | 2'endo | syn  | 0%  |      |  |
|                                  |        | anti | 0%  |      |  |

図7. 8-Br-5'-AMPの異性体分布

速度比は  $H_5'$ ,  $H_5''$  を除き互によく似た値をとる。したがって、エキソサイクリック結合以外の部分については、類似した構造をとることが示唆される。はじめに、リン酸基部分およびリボース環のコンホメーションを決定することを目的とした。P-O<sub>3'</sub>およびO<sub>3'</sub>-C<sub>3'</sub>結合まわりの内部回

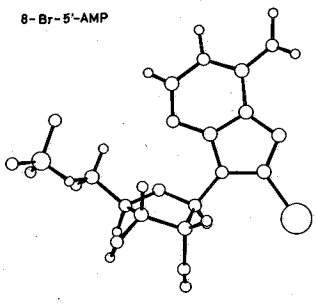


図8. 8-Br-5'-AMP  
gauche-3'endo-antiの異性体

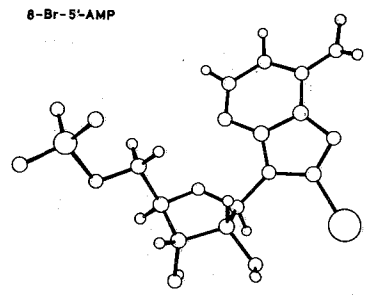


図9. 8-Br-5'-AMP  
gauche-2'endo-antiの異性体

転については図10(a), (b)のG<sup>+</sup>, T, G<sup>-</sup>の三形、リボース環については3'-endo, 2'-endoの二形を考慮し最小二乗法により3'-UMPおよび3'-CMPの構造と異性体分布を求めた。その結果P-O<sub>3'</sub>結合についてはG<sup>+</sup>, G<sup>-</sup>の二形、O<sub>3'</sub>-C<sub>3'</sub>結合については図10(b)のcis-形であることが明らかとなった。従来、O<sub>3'</sub>-C<sub>3'</sub>結合まわりの内部回転については、<sup>3</sup>J<sub>CP</sub>および<sup>3</sup>J<sub>PH</sub>の解析により異なる見解が出されている。Smithらは3'-UMPについて<sup>3</sup>J<sub>CP</sub>よりT型が30%存在するとし、Daviesらは<sup>3</sup>J<sub>PH</sub>より自由回転を主張している。これらに対し、3'-ヌクレオチド、ポリヌクレオチドは結晶でcis型に近いコンホメーションをとっている。またコンホメーション解析の結果でもcis型が安定形である。本研究の結果は、結晶解析およびコンホメーション解析の結果とも一致しており、3'-ヌクレオチド分子はO<sub>3'</sub>-C<sub>3'</sub>結合のまわりでcis付近の配置をとると考えるのが妥当である。グリコシル結合まわりの回転異性については、塩基部分のシフト比と緩和速度比の値が小さく一意的に分布をきめることはできなかったが、syn型がanti型と同程度に存在するという結果になった。3'-UMP、および3'-CMPのリン酸基部分およびリボース環部分について異性体分布を検討した結果、40%程度がcis-3'endoの異性体として60%程度がcis-2'endo異性体として存在していることが明らかとなった。

**結論** 5'-ヌクレオチドおよび3'-ヌクレオチドにたいしてランタニドプローブ法およびスピン結合定数の解析を行なって、水溶液中の三次元構造を明らかにした。その結果5'-ヌクレオチドでは回転異性および反転異性間の相関を定量的に示した。また3'-ヌクレオチドでは、O<sub>3'</sub>-C<sub>3'</sub>結合まわりの内部回転は、従来スピン結合定数のみの解析から得られた見解と異なり、cis-形をとることがわかった。本研究で得た結果は、コンホメーション解析の実験的検証として有用であり、水溶液中の構造に関して、いまままでより詳しい検討ができるようになった。

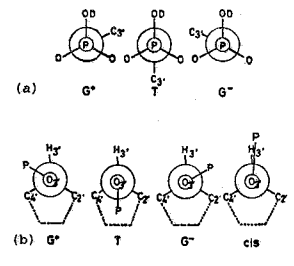


図10. 3'-ヌクレオチドのP-O<sub>3'</sub>, O<sub>3'</sub>-C<sub>3'</sub>まわりの回転異性体

(東工大) 上遠野幸男 井上義夫 中條利一郎

[序] 生体系における金属イオンの重要性と相まって、水銀、カドミウム等の重金属による環境の汚染が生命に与える影響についても多くの関心が集められている。多くの重金属イオンは、カルボキシル基、アミノ基、チオール基等の諸官能基と特異的な相互作用をすることが示唆されてきたが、特にこれらの重金属類のうちでも水銀は、生体内のタンパク質、核酸等の活性基と強い結合を結び、その結果、運動障害や知覚障害等、生体系に重大な影響を及ぼすことが明らかになってきている。そこで、本研究では、重金属である水銀が、アミノ酸；L-システイン、およびトリペプチド；グルタチオン ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-Cysteinyl-glycine) とどのような相互作用をするのかということと、<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C-NMRおのこの特徴を注かして調べた。L-システインは、多くの金属イオンと結合することや、トリペプチド中のシステイン残基が酵素機能の発現、あるいは高次構造の形成に重要な働きをしていること等広く知られており、またグルタチオンも血漿中等生体中に高い濃度で存在し酸化還元反応に関与する等、生理活性を持ったトリペプチドであることから、単にタンパク質のモデル化合物としてだけでなく、このような生理活性を持った生体物質の水銀との相互作用を究明することは興味深いと思われる。

[実験] 試料：アミノ酸；L-システイン (CySH)、L-シスチン (CySSCy)、トリペプチド；還元型グルタチオン (GSH)、酸化型グルタチオン (GSSG)、水銀塩；塩化第二水銀 (HgCl<sub>2</sub>)、重水 (D<sub>2</sub>O)、重水素化塩酸 (DCl) はいずれも市販のものを使用した。試料の調整は配位子分子それぞれの約0.5MDCl-D<sub>2</sub>O溶液を強酸性下で調整し、それに約0.05 mol/lのHgCl<sub>2</sub>を逐次添加し、各モル比における化学シフト、および<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H結合定数を測定した。測定：<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C-NMR測定はJEOL PS-100スペクトロメーターを使用し、それぞれ100MHz、25.15MHzで測定した。<sup>13</sup>C-NMR測定はFT法で行ない、繰り返し時間5~10秒で512~2048回積算した。基準としては、<sup>1</sup>H-NMRではTMS (外部基準) を、<sup>13</sup>C-NMRではジオキサン (内部基準) ( $\delta_{dioxane} = \delta_{TMS} - 67.4$  ppm) をそれぞれ使用した。測定温度はすべて25°Cである。

[結果と考察] 1. CySH, CySSCyと水銀塩との相互作用 CySHの $\alpha$ -CHおよび $\beta$ -CH<sub>2</sub>の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは、図1に示すように、水銀塩HgCl<sub>2</sub>とCySHのモル比が増加するに従って、A<sub>2</sub>X型からABX型に変化している。これは、HgCl<sub>2</sub>が存在しない時には等価であった2つの $\beta$ -プロトンがHgCl<sub>2</sub>の増加に伴って非等価 (以後H<sub>A</sub>, H<sub>B</sub>とする) になり、ていくことを示している。CySH、およびCySH 2分子が「ジスルフィド」 (-S-S-) 結合しているCySSCyそれぞれにHgCl<sub>2</sub>を添加していった時の、 $\alpha$ 、 $\beta$ -プロトンの化学シフト変化のモル比 (HgCl<sub>2</sub> / 配位子分子) 依存性を図2に示す。CySHでは、モル比2.0までに、H<sub>A</sub>が0.98ppm、H<sub>B</sub>が0.78ppm、 $\alpha$ -プロトン (He) が0.33ppmの1H磁場シフトをしている。

かとうの ゆまお いのうえ よしお ちゅうじょう りいちろう



また、HA, HBのシフト量は $\alpha$ -プロトンの2~3倍に達していることがわかる。それに反してCySSCyにおいては、モル比増加に伴う変化としては種かな小さなシフトしか認められない。これらのことからHgCl<sub>2</sub>はチオール(-SH)基に強く配位していることが考えられる。また、HA, HBの化学シフト変化がそれぞれモル比0.87, 1.00において屈曲点を持つことから、CySHとHgCl<sub>2</sub>の間には1:1錯体が形成されているものと思われる。次に結合定数の変化からCySHの3つのスタグ-型回転異性体のモル分率<sup>1)</sup>とモル比との関係を求めると図3のようになる。モル比増加に伴い、各回転異性体g, hのモル分率には大きな相異が押いてくるが、これらの原因としては、(1)チオール基にHgCl<sub>2</sub>が

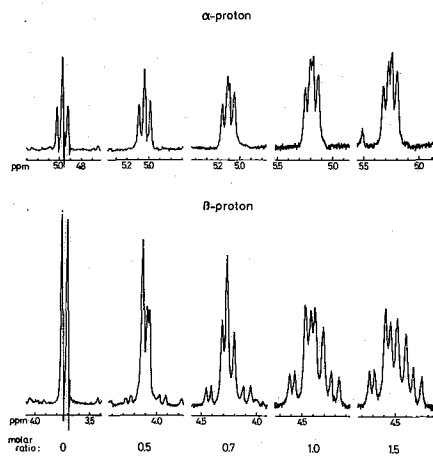


図1. CySH.  $\alpha$ -CH および  $\beta$ -CH<sub>2</sub> <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの変化。

配位した-SHgClとカルボキシル基との間の立体障害 (2) HgClと-NH<sub>3</sub>基との間の静電的反発が考えられる。

<sup>13</sup>C-NMRによって測定したCySH, CySSCyのスペクトルを図4に示す。スペクトルの帰属は、Jung<sup>2)</sup>のそれに従った。CySH, CySSCy各炭素の化学シフトのモル比依存性を図5に示す。AMSか

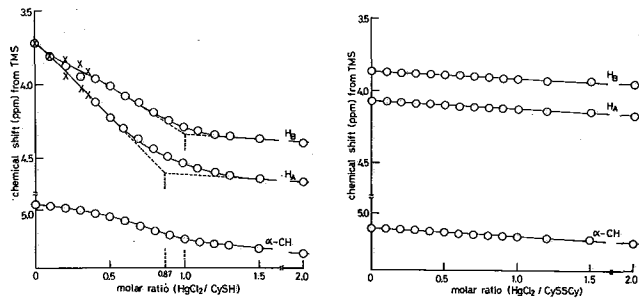


図2. CySH, CySSCy  $\alpha$ ,  $\beta$ -プロトンの化学シフト変化のモル比依存性。

にCySSCyの場合、いずれの炭素にもシフト変化は認められないうが、CySHにおいては各C-とも特徴ある変化をしている。C<sub>β</sub>は顕著な低磁場シフトをし、C<sub>α</sub>はモル比0.45付近まで低磁場シフト、それ以上のモル比では逆に高磁場シフトをしている。また、C=Oは、モル比0.3~0.4付近から高磁場シフトをしている。いずれも変化の様子には相関があり、またモル比1.0以上における変化はほとんど認められなくなっている。CySSCyにおいてはいずれの炭素にもシフト変化が認められなかったこと、およびC<sub>β</sub>がチオール基の隣接炭素であり、そのシフト量が最大であったことから、HgCl<sub>2</sub>はチオール基に配位していると考えられ、この点<sup>1</sup>H-NMRと一致した結果が得られた。また、水銀の配位による影響を強く受けているC<sub>β</sub>の化学シフト変化がモル比0.85において屈曲点を持ち、それ以上のモル比では変化がないうことから、<sup>1</sup>H-NMRの場合同様、CySHとHgCl<sub>2</sub>とは1:1錯体を形成しているものと考えられる。ところで、C=Oの変化については<sup>1</sup>H-NMRでは得られなかったカルボキシル基の情報を与えてくれるが、図5よりAMSからよように、わか

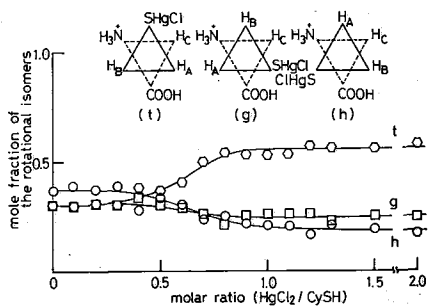


図3. CySH スタグ-型回転異性体のモル分率変化

から、HgCl<sub>2</sub>はチオール基に配位していると考えられ、この点<sup>1</sup>H-NMRと一致した結果が得られた。また、水銀の配位による影響を強く受けているC<sub>β</sub>の化学シフト変化がモル比0.85において屈曲点を持ち、それ以上のモル比では変化がないうことから、<sup>1</sup>H-NMRの場合同様、CySHとHgCl<sub>2</sub>とは1:1錯体を形成しているものと考えられる。ところで、C=Oの変化については<sup>1</sup>H-NMRでは得られなかったカルボキシル基の情報を与えてくれるが、図5よりAMSからよように、わか

かなから高磁場シフトをしており、カルボキシル基と水銀イオンの間に何らかの相互作用が存在するものと思われる。ここで水銀イオンのカルボキシル基への配位があるものとするれば、 $\underline{C=O}$ は水銀イオンによる誘起効果<sup>3)</sup>によって高磁場シフトすることになり実験結果との一致がみられる。ただしCysSH同様にカルボキシル基を持つCysSSCyの $\underline{C=O}$ にはシフト変化が認められないことから、HgCl<sub>2</sub>のCysSHカルボキシル基への配位は、チオール基への配位を前提とした二次的なものであると思われる。以上のことからCysSHとHgCl<sub>2</sub>はチオール基、およびカルボキシル基の両方に配位した[I]のような錯体を形成しているものと思われる。

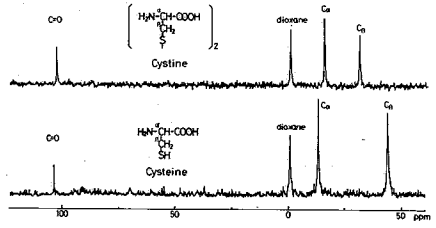
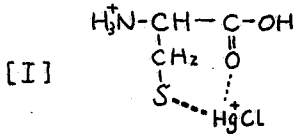


図4. CysSH, CysSSCy <sup>13</sup>C-NMRスペクトル

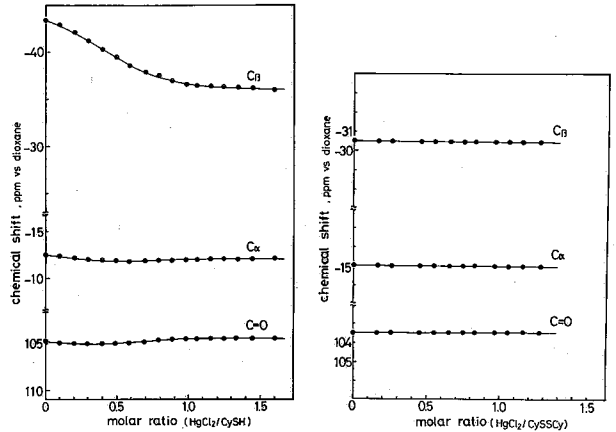


図5. CysSH(左), CysSSCy(右)各炭素の化学シフトのモル比依存性。

2. GSH, GSSGと水銀塩の相互作用 DCl-D<sub>2</sub>O溶液(pD1.0)中のGSH, GSSGそれぞれの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを図6に示す。帰属はいずれもJungら<sup>4)</sup>、Feenyら<sup>5)</sup>のそれに依った。GSH溶液にHgCl<sub>2</sub>を加えることによりCys残基の3つの炭素、Cα, Cβ, CONHにのみシフト変化が認められた。化学シフトのモル比依存性を図7左側に示す。Cys-Cαはモル比0.4付近までは、わずかな高磁場シフトを示し、それ以上のモル比では逆に高磁場シフトをしてい

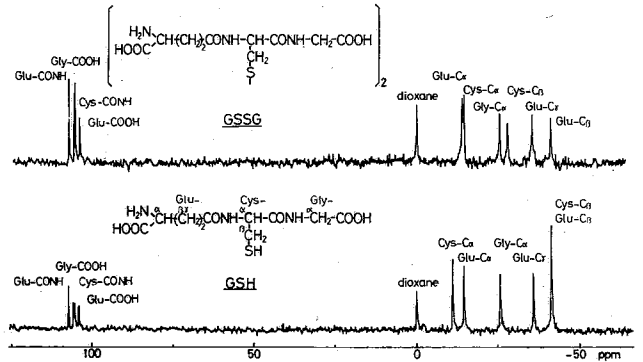


図6. GSH, GSSG. <sup>13</sup>C-NMRスペクトル (pD1.0)

Cys-Cβは、モル比1.0までに8.5ppmの高磁場シフトをし、それ以上のモル比では-33ppmの一定値に保たれている。また、Cys-CONHはやはりモル比1.0までに約1ppmの高磁場シフトをし、それ以上のモル比では105ppmの一定値に保たれている。図7右側には、GSSGの化学シフトのモル比依存性を示した。いずれの炭素原子にもシフト変化は認められない。以上のことから、グルタチオンの場合もシステインの場合と同様に、水銀はほとんどシステイン残基のチオール基に配位しており、その他にシステイン残基のカルボニル酸素に二次的

な配位をしているものと考えられる。

また、pD0.6においてモ Cys 残基 C $\alpha$ , C $\beta$  および CONH の 3 本のピークのみシフト変化が認められた。図 8 に pD0.6 (●), pD1.0 (○) におけるこれらの炭素の化学シフトのモル比依存性を示す。図 8 より、pD0.6 の場合には pD1.0 の場合よりシフト変化が急であることがわかる。このことは、pD の多少の変化がかかりシフト変化、すなわち GSH と HgCl<sub>2</sub> との間の相互作用の大きさに影響を与えていることを示唆している。Rabenstein および Fairhurst<sup>6)</sup>

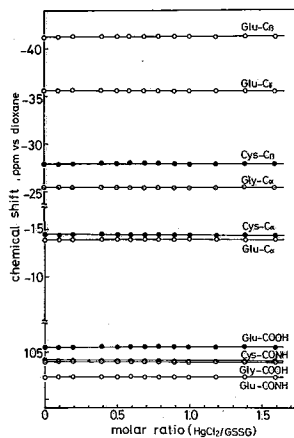
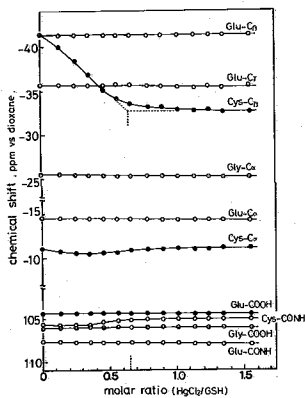
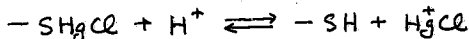


図 7. GSH (左), GSSG 各炭素の化学シフトのモル比依存性。

によれば、pH < 2 のような強酸性下においては、GSH の金属 free の状態と、金属の配位した状態との間の交換が生じておりこの交換は金属と溶液中のプロトンとの間の競合によって起こるものと考えられる。すなわち、我々の実験条件下においてはチオール基に対する水銀イオンとプロトンとの間の競合により次式のような錯体の解離平衡が存在するものと思われる。



その結果、チオール基に配位した H<sub>2</sub><sup>+</sup>Cl は不安定となり、システイン残基のカルボニル基に二次的な配位をすることが推定される。また、GSSG の Cys-CONH にはシフト変化が認められなことから、CysH の場合同様、この二次的な配位はチオール基への配位を前提としたものであると考えられる。以上のことから本実験条件下においては、システイン残基のチオール基とカルボニル基の両方に配位した [II] のような HgCl<sub>2</sub>-GSH 錯体が形成されているものと思われる。

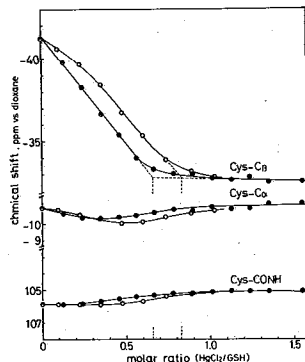
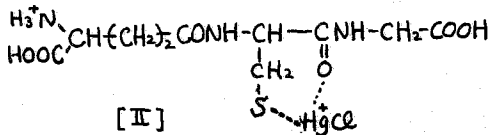


図 8. pD0.6 (●), pD1.0 (○) における GSH, Cys 残基炭素の化学シフトモル比依存性

[結論] 本実験条件下においては、



1) CysH は HgCl<sub>2</sub> と 1:1 錯体を形成し、水銀はチオール基、カルボキシル基両方に配位するものと思われる。またカルボキシル基への配位はチオール基への

配位を前提とした二次的なものであると考えられる。2) GSH は、やはり CysH 同様に、HgCl<sub>2</sub> と 1:1 錯体を形成し、その際、水銀はシステイン残基のチオール基との強い配位の他にシステイン残基のカルボニル基と二次的な弱い配位をするものと思われる。

文献:

- 1) D.F.S. Natusch and L.J. Porter, J. Chem. Soc. (A), 1971, 2529
- 2) G. Jung, Z. Naturforsch., 26b, 213 (1971)
- 3) I. Morishima, K. Yoshikawa, K. Okada, T. Yonezawa and K. Goto, J. Am. Chem. Soc., 94, 165 (1972)
- 4) G. Jung, E. Breitmaier and W. Voelter, Eur. J. Biochem., 24, 432 (1972) / 95, 165 (1973)
- 5) J. Feeney, P. Partington and G. Roberts, J. Magn. Reson., 13, 268 (1974)
- 6) D.L. Rabenstein and M.T. Fairhurst, J. Am. Chem. Soc., 99, 2086 (1975)

I. 緒言

これまで、我々はポリ塩化ビニル<sup>1)</sup>、ポリプロピレン<sup>2)</sup>等の典型的なビニルポリマーの<sup>1</sup>H化学シフトを、孤立鎖のコンフィグレーション、コンホメーションを考慮して理論的に評価し、実験結果とのよい一致を得てきた。これらのビニルポリマーでは、その<sup>1</sup>H化学シフトは主として分子内<sup>1</sup>や<sup>1</sup>へい効果の寄与により説明できた。

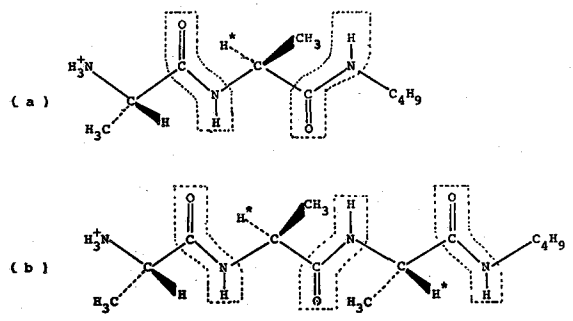
一方、ポリペプチドのヘリックス-コイル転移に関する高分解能NMRの研究から、転移に伴ない、主鎖の $\alpha$ -CH及びNHプロトンの化学シフトが変化することが見出されてきた。このシフト変化の原因として、ヘリックスとコイル状態で分子内<sup>1</sup>や<sup>1</sup>へい効果が変化したことによる可能性と同時に、ヘリックス溶媒としてCHCl<sub>3</sub>、コイル溶媒としてTFAのような強酸を用いるので、その溶媒効果が二状態で大きく異なる可能性が考えられ、この二つの原因を実験的立場から明確に区別して論ずることは困難であると思われる。したがって、ヘリックスとコイルの二状態の構造差を考慮して、分子内<sup>1</sup>や<sup>1</sup>へい効果を理論的に評価することは、この転移におけるコンホメーションと外部溶媒効果の寄与の差を検討する上に有意義であると思われる。

このような観点から、我々は、ポリペプチドのコイル状態に比べて、その溶媒効果を無視しうるヘリックス状態のポリ-L-アラニン(PLA)の<sup>1</sup>H化学シフトを、分子内<sup>1</sup>や<sup>1</sup>へい効果を考慮して理論的に評価することを試み、実験と計算結果とのよい一致を得た<sup>3)</sup>。その際、(O)=C-N及び(H)C<sup>\*</sup>-N結合の磁気異方性の値は、六種類のアミドの<sup>1</sup>H化学シフトの実測結果に基づいて評価した。ここでは、この化学シフトの評価法に基づいて、コイル状態のPLAの $\alpha$ -CHプロトン化学シフトを評価し、ヘリックス状態の計算値と比較することによって、分子内<sup>1</sup>や<sup>1</sup>へい効果の違いにより、どの程度のシフト差が生ずるかという点を明らかにした。

II. コイルモデル

コイル状態の $\alpha$ -CHプロトン化学シフトを求めるに当り、先ずどれだけの範囲の分子内<sup>1</sup>や<sup>1</sup>へい効果の寄与を考慮すればよいかを実験結果に基づいて検討した。

最初は一連のアラニンダイマー及びポリマーをTFA中で測定している<sup>4)</sup>中央残基の $\alpha$ -CHプロトンのピーク( $\alpha$ -CH<sup>\*</sup>)は二量体(a)と三量体(b)の場合にシフト差がなく、更にその共鳴位置はポリマーの場合とも差のないことがわかる。従って、本研究では



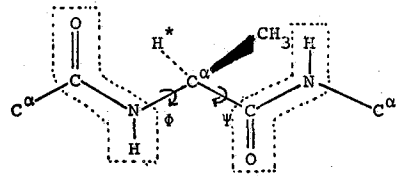
めさくらてつお めんどういお にしおかあつお

c) の範囲までの分子内 | $\alpha$  へい効果を考慮した。

このモデルでは、 $N-C^\alpha$  と  $C^\alpha-C$  結合のまわりの内部回転 (各  $R, \phi, \psi$  で表わした) が可能であり (c.1)

, 本研究では Ramachandran の Hard Sphere 近似によるエネルギーマップ (Model I)<sup>9)</sup>, 及び

Scheraga らの CNDO/2 法によるマップ (Model II)<sup>10)</sup> を用いて, その  $\alpha$ -CH 化学シフトを評価した。



### III. 理論的計算

孤立した PLA 鎖の  $\alpha$ -CH プロトン化学シフト,  $\alpha^E$ , は次のように表わすことができる。<sup>7), 8)</sup>

$$\sigma = \sigma^{dia.} + \sigma^E. + \sigma^{ani.}$$

ここで,  $\alpha^{dia.}$  は反磁性項で,  $K$  で表わされる。本研究では,  $K$  は 17.8 ppm の値を用いた。又,  $\rho$  は着目した  $\alpha$ -CH プロトンの電子密度で, 本研究では,  $N$ -アセチル  $N'$ -メチル-L-アラニン (Ac-Ala-NHMe) について, CNDO/2 法を用いて計算した値を用いた。 $\alpha^E$  は電場効果の項で, Buckingham の式を用いて次のように評価した。<sup>8)</sup>

$$\sigma^E. = -2.0 \cdot 10^{-12} E_z - 10^{-18} E_z^2$$

ここで,  $E$  は分子内の極性基から生じた分子内電場であり,  $E_z$  は  $E$  の着目したプロトンのついた結合軸方向への射影成分である。そして  $E_x$  及び  $E_y$  は, CNDO/2 法を用いて, Ac-Ala-NHMe について得られた電荷分布の値に基づいて見積もられた。

$\alpha^{ani.}$  は  $C=O$ ,  $(O=C-N)$  及び  $(H)C^\alpha-N$  結合による磁気異方性効果の項で, McConnell の式を拡張した ApSimon の式を用いて評価した。<sup>9)</sup>

$$\sigma_{A-B}^{ani.} = \frac{1}{3r^3} [\Delta\chi_1^{A-B} (1-3\cos^2\theta) + \Delta\chi_2^{A-B} (1-3\sin^2\theta\sin^2\gamma)]$$

ここで  $\Delta\chi_1^{A-B} = \chi_{yy} - \chi_{zz}$  は,  $\pi$  軌道の節平面に垂直な軸と,  $A-B$  結合軸との磁気異方性,  $\Delta\chi_2^{A-B} = \chi_{xx} - \chi_{zz}$  は,  $\pi$  軌道の節平面上で,  $A-B$  結合に垂直な軸と  $A-B$  結合軸との磁気異方性である。(  $\theta, \phi$  及び  $\gamma$  については, Fig. 1 を参照)。  $C=O$  結合の磁気異方性の値は, Zürcher の値 ( $\Delta\chi_1^{C=O} = -25.7$ ,  $\Delta\chi_2^{C=O} = -13.5 \times 10^{-30} \text{ cm}^3$ ) を用い, 炭素原子から 1 Å の所に  $N$  の磁気双極子をおいた。又  $(O=C-N)$  及び  $(H)C^\alpha-N$  結合の磁気異方性は, 既に報告した値, 各  $\Delta\chi_1^{(O=C-N)} = -20.6$ ,  $\Delta\chi_2^{(O=C-N)} = -13.2$ ,  $\Delta\chi_1^{(H)C^\alpha-N} = -10.4$  ( $\times 10^{-30} \text{ cm}^3$ ) を用いた。<sup>3)</sup> 又, 分子の幾何学的パラメータは, Scheraga らの報告値を用いた。<sup>11)</sup>

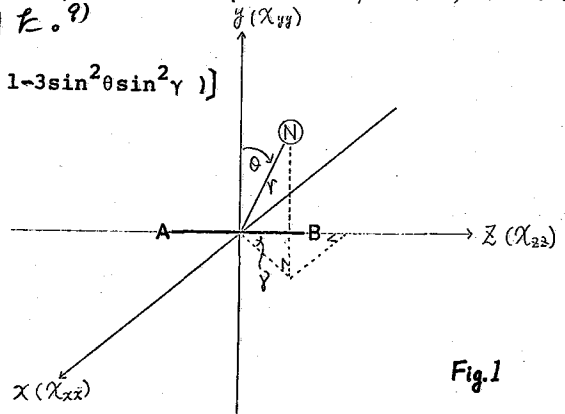


Fig. 1

#### IV. 結果と考察

まず, Ac-Ala-NHMeの電荷分布を,  $\phi(0^\circ \sim 360^\circ)$ ,  $\psi(0^\circ \sim 360^\circ)$ の関数として, 各々  $60^\circ$ 間隔毎に, CNDO/2法で計算した。α-CHプロトンの電子密度の  $\phi$ ,  $\psi$ 依存性を, Fig. 2に示した。このプロトンの電子密度, すなわち化学シフトの評価において, 反磁性値は  $\phi$ ,  $\psi$ に依存し, その依存性は  $\phi$ の方が大きい。同様に, 他の原子の電荷分布も  $\phi$ ,  $\psi$ に大きく依存する。従って, コイル状態のPLAのα-CHプロトンの反磁性値及び電場効果の値は, 各コンネクション毎に得られた電荷分布を用いて評価する必要がある。以下の計算は, この点を考慮して行った。

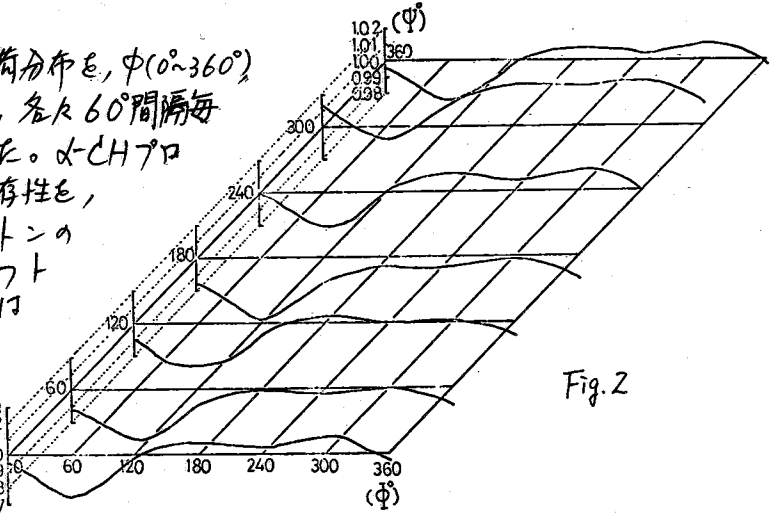


Fig. 2

状態のPLAのα-CHプロトンの反磁性値及び電場効果の値は, 各コンネクション毎に得られた電荷分布を用いて評価する必要がある。以下の計算は, この点を考慮して行った。

#### Model I.

Tab.1. α-CH chemical shifts,  $\sigma^T$ , calculated for 39 conformations chosen from the allowed regions in a Ramachandran's map.

Ramachandranのエネルギーマップから,  $30^\circ$ 間隔毎に, 39つのコンネクションを選び, α-CH化学シフトを評価した(Tab.1)。以下は, 各コンネクションの間で  $14.99 \text{ ppm}$  から  $16.29 \text{ ppm}$  まで大きく変化している。これらの化学シフトを一概に平均することにより得られたコイル状態のα-CHプロトン化学シフトは,  $15.75 \text{ ppm}$ となり, 既に報告したヘリックス状態の対応する値,  $15.67 \text{ ppm}$ と比較して, 若干 ( $0.08 \text{ ppm}$ ), コイルの方が高磁場に出現することを示唆している。

| ψ, DEGREES | 0     | 30    | 60    | 90    | 120   | 150 | 180 | 210 | 240   | 270 | 300 | 330 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|
| 330        | 16.13 | 15.87 | 15.67 | 15.84 | 16.13 |     |     |     |       |     |     |     |
| 300        | 16.29 | 16.00 | 15.84 | 15.94 | 16.26 |     |     |     |       |     |     |     |
| 270        | 16.23 | 15.94 | 15.78 | 16.01 | 16.18 |     |     |     | 15.83 |     |     |     |
| 240        | 16.01 | 15.71 | 15.57 | 15.81 |       |     |     |     | 15.68 |     |     |     |
| 210        | 15.82 | 15.66 | 15.38 | 15.55 |       |     |     |     | 15.54 |     |     |     |
| 180        |       |       |       |       |       |     |     |     |       |     |     |     |
| 150        | 15.56 |       |       | 15.28 | 15.53 |     |     |     |       |     |     |     |
| 120        | 15.52 | 15.26 | 14.99 | 15.26 | 15.50 |     |     |     |       |     |     |     |
| 90         |       |       |       |       |       |     |     |     |       |     |     |     |
| 60         |       |       |       |       |       |     |     |     |       |     |     |     |
| 30         |       |       |       |       |       |     |     |     |       |     |     |     |
| 0          | 16.00 | 15.62 | 15.55 | 15.68 | 15.93 |     |     |     |       |     |     |     |
|            | 0     | 30    | 60    | 90    | 120   | 150 | 180 | 210 | 240   | 270 | 300 | 330 |

既に報告したヘリックス状態の対応する値,  $15.67 \text{ ppm}$ と比較して, 若干 ( $0.08 \text{ ppm}$ ), コイルの方が高磁場に出現することを示唆している。

#### Model II.

Scheragaらは, Ac-Ala-NHMeの全エネルギーを,  $\phi$ ,  $\psi$ の関数として, CNDO/2法で計算している。<sup>6)</sup> そのエネルギーマップにおいて, 特定のコンネクションを四つ選び, α-CHプロトン化学シフトを評価した。(Tab.2)。最終的に, コンネクション間のエネルギー差を考慮して評価したコイル状態のα-CH化学シフトの値は,  $15.80 \text{ ppm}$ となり, ヘリックスの値より,  $0.13 \text{ ppm}$ 高磁場に出現するという計算結果を得た。

Tab.2. The charge distribution of a peptide residue ( in electronic units ), the total chemical shift,  $\sigma^T$ . ( in ppm ) and each chemical shift contribution to  $\sigma^T$ . calculated for four low-energy conformations in a Scheraga's map.

| $\phi^\circ, \psi^\circ$   | 170,280             | 250,130             | 175,105             | 110,235             |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| C'                         | 0.367 <sub>1</sub>  | 0.335 <sub>1</sub>  | 0.374 <sub>6</sub>  | 0.340 <sub>3</sub>  |
| O                          | -0.359 <sub>0</sub> | -0.350 <sub>9</sub> | -0.370 <sub>1</sub> | -0.359 <sub>8</sub> |
| N                          | -0.198 <sub>3</sub> | -0.215 <sub>5</sub> | -0.187 <sub>2</sub> | -0.203 <sub>5</sub> |
| H(N)                       | 0.112 <sub>3</sub>  | 0.120 <sub>2</sub>  | 0.110 <sub>1</sub>  | 0.121 <sub>0</sub>  |
| C <sup>α</sup>             | 0.066 <sub>5</sub>  | 0.061 <sub>6</sub>  | 0.064 <sub>4</sub>  | 0.061 <sub>8</sub>  |
| H(C <sup>α</sup> )         | -0.024 <sub>6</sub> | 0.005 <sub>0</sub>  | -0.003 <sub>3</sub> | 0.006 <sub>8</sub>  |
| C <sup>β</sup>             | -0.015 <sub>2</sub> | -0.021 <sub>1</sub> | -0.020 <sub>9</sub> | -0.014 <sub>4</sub> |
| H(Ave)                     | 0.010 <sub>9</sub>  | 0.016 <sub>8</sub>  | 0.006 <sub>9</sub>  | 0.011 <sub>4</sub>  |
| $\sigma^{dia.}$            | 18.237 <sub>9</sub> | 17.711 <sub>0</sub> | 17.858 <sub>7</sub> | 17.679 <sub>0</sub> |
| $\sigma^E.$                | -0.676 <sub>9</sub> | -0.655 <sub>2</sub> | -0.841 <sub>9</sub> | -0.726 <sub>4</sub> |
| $\sigma_{C=O}^{ani.}$      | -0.406 <sub>2</sub> | -0.225 <sub>0</sub> | -0.186 <sub>8</sub> | -0.239 <sub>7</sub> |
| $\sigma_{(O=C)C-N}^{ani.}$ | -0.560 <sub>1</sub> | -1.103 <sub>2</sub> | -0.885 <sub>1</sub> | -0.206 <sub>1</sub> |
| $\sigma_{total}^{ani.}$    | -1.359 <sub>1</sub> | -1.771 <sub>8</sub> | -1.554 <sub>2</sub> | -0.949 <sub>1</sub> |
| $\sigma^T.$                | 16.201 <sub>9</sub> | 15.284 <sub>1</sub> | 15.462 <sub>6</sub> | 16.003 <sub>4</sub> |

このように、かなり異なるエネルギーマップを用いて、コイルの化学シフトを評価したにもかかわらず、いずれも分子内やヘリックスの寄与からは、コイルとヘリックス状態の  $\alpha$ -CHプロトンのシフト差は小さい(コイルの方が約0.1ppm高磁場)という結果が得られた。

Goodmanらは、PLAをTFA-CDCl<sub>3</sub>溶液中、試料濃度、0.1%で測定し、その $\alpha$ -CHプロトンスペクトルを報告している。(2)ヘリックス状態の共鳴位置を、CDCl<sub>3</sub>100%に外挿した値、コイル状態の共鳴位置をTFA100%の時の値とすると、コイルピークは、ヘリックスピークより0.4ppm低磁場に出現している。従って、二状態の構造差からは、シフト差は約0.1ppmしか生じないという計算結果を考慮すると、この低磁場シフトは外部環境の違いによる電子状態の変化も含めて、大部分、外部環境効果に起因すると示唆される。

$$\sigma_{total}^{ani.} = \sigma_{C=O}^{ani.} + \sigma_{(O=C)C-N}^{ani.} + \sigma_{(H)C^{\alpha-N}}^{ani.}$$

### 参考文献

- 1) I. Ando, A. Nishioka and T. Asakura, Makromol. Chem., 176, 411 (1975).
- 2) T. Asakura, I. Ando and A. Nishioka, ibid., 176, 1151 (1975), 177, 523 (1976).
- 3) T. Asakura, I. Ando and A. Nishioka, Polymer Preprints, Japan, 25, 335 (1976), Makromol. Chem., in press.
- 4) A. Shoji, T. Kawai and A. Nishioka, Repts. Prog. Polymer Phys., Japan, 18, 555, 559, 563 (1975).
- 5) G. N. Ramachandran and V. Sasisekharan, Adv. Protein Chemistry, 23, 283 (1968).
- 6) F. A. Momany, R. F. McGuire, J. F. Yan and H. A. Scheraga, J. Phys. Chem., 75, 2286 (1971).
- 7) J. A. Pople, Proc. Roy. Soc., A239, 541, 550 (1957).
- 8) A. D. Buckingham, Can. J. Chem., 38, 300 (1960).
- 9) J. W. ApSimon et al. Tetrahedron, 23, 2357 (1967).
- 10) R. F. Zürcher, Progress in NMR Spectroscopy, 2, 205 (1967).
- 11) H. A. Scheraga, Adv. Phys. Org. Chem., 6, 103 (1968).
- 12) M. Goodman, F. Toda and N. Ueyama, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 70, 331 (1973).

# Ribonuclease T<sub>1</sub> の NMR による研究

207

(東大・理, 阪大・タンパク研, 阪大・医\*)

○ 荒田洋治, 木村定雄\*, 松尾素之\*\*, 成田耕造\*

Ribonuclease T<sub>1</sub> (RNase T<sub>1</sub>) は RNA 分子中のグアニン-3'-リン酸部分の phosphodiester 結合を選択的に切断する。図1の一次構造のうち Glu-58, His-40, His-92, Arg-77 が活性に関係があることが知られている<sup>1)</sup>。100MHz における NMR の簡単な研究がすでに報告されているが<sup>2)</sup>、ここでは 360MHz における測定をトリチウム交換法<sup>3)</sup>と組合せて His C2-H プロトンの帰属を行ない、さらに <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P NMR を用いてグアニン-3'-リン酸 (3'-GMP) と RNase T<sub>1</sub> の相互作用を調べることにより RNase T<sub>1</sub> の活性部位の構造を詳細に論じることが目的とする。

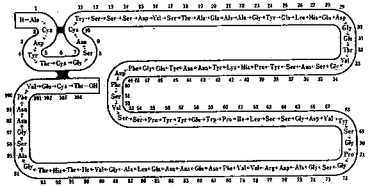


図1 RNase T<sub>1</sub> の一次構造

**(実験)** RNase T<sub>1</sub> は 0.2 M NaCl, D<sub>2</sub>O に溶解, 5mM とした。試料の詳細およびトリチウム化の実験についてはすでに報告した<sup>4)</sup>。NMR の測定は <sup>1</sup>H: 360 MHz (Bruker HX-360, FT) 100 MHz (JEDL PS-100, 相関 NMR<sup>5)</sup>), <sup>31</sup>P: 40.5 MHz (Varian XL-100, FT) により、化学シフトは外部基準 (<sup>1</sup>H: TMS 10% (W/W) CCl<sub>4</sub> 溶液, <sup>31</sup>P: 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) を用いて表示し、体積磁化率の補正は行っていない。測定温度は 32°, pH はメーターの読みをそのまま記載。

**(結果)** 図2に芳香環プロトンのスペクトルの pH による変化を示す。RNase T<sub>1</sub> を重水中, pH 8.73 において incubate した試料のスペクトル (図3) より H1, H2, H3 の強度が H1 >> H2 ~ H3 の順に減少することがわかる。一方、同一条件でトリチウム水中 C2-H プロトンのトリチウム交換速度を求めると His 40 >> His-92 ~ His-27 となりこれから H1 が His-40 に帰属できる。His-92, His-27 については H2, H3 の化学シフトの滴定曲線 (図4) をトリチウム交換速度の pH プロファイルと比較することにより最終的には明らかになるはずであるが (実験進行中) 以下に述べる事実により H2 → His-27, H3 → His-92 であることはほぼ確実である。図4において H1 は pK 4.1, 7.9 を有する二種の解離を示す。H3 も H1 に類似した形をしているが化学シフトの変化はよりなだらかなのである。H2 はシグモイド (pK 7.2) に近い。RNase T<sub>1</sub> (5mM), 3'-GMP (20mM) を含む系の H1, H2, H3 および 3'-GMP の C8-H プロトンの滴定曲線を図5に示す。3'-GMP の濃度を変化させた実験 (図6) より、3'-GMP が存在する場合としない場合とにおける H1, H2, H3 の対応づけが明確になる。RNase T<sub>1</sub>: 3'-GMP (1:1) において <sup>31</sup>P NMR スペクトル (図7) より化学シフトの滴定曲線を求めると図8のようになる。RNase T<sub>1</sub> 共存下では 3'-GMP の <sup>31</sup>P のシグナルは pH 1~4 においてなだらかにシフトを示し、また pH 7.5 ~ 9.5 に属する部分を有するものの特徴である。

**(議論)** pH < 6 においては活性中心にある His-40, His-92 のイミダゾール基 (カチオン型, Im<sup>+</sup>) は近隣の COO<sup>-</sup> と相互作用している。とくに、His-40 の相手は pK 4.1 のカルボキシル基で、Glu-58 の可能性が高いと考えられる。His-27 はカルボキシル基など Im<sup>+</sup> と相互作用しうる基を最近接位にもたない。RNase T<sub>1</sub>・3'-GMP 複合体においては His-40, His-92

あらたよらじ まむらさだあ まうあひさゆき かりたこうぞう



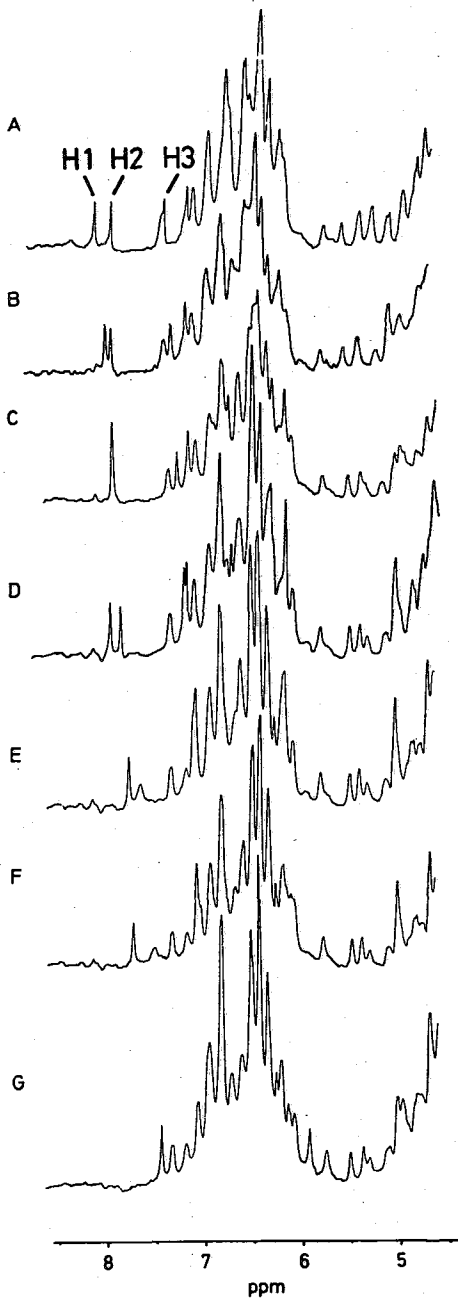


図2 RNase Ti の 360MHz  $^1\text{H}$  NMR スペクトル  
 PH: (A) 2.75, (B) 3.80, (C) 4.26, (D) 5.33  
 (E) 6.91, (F) 7.17, (G) 8.49

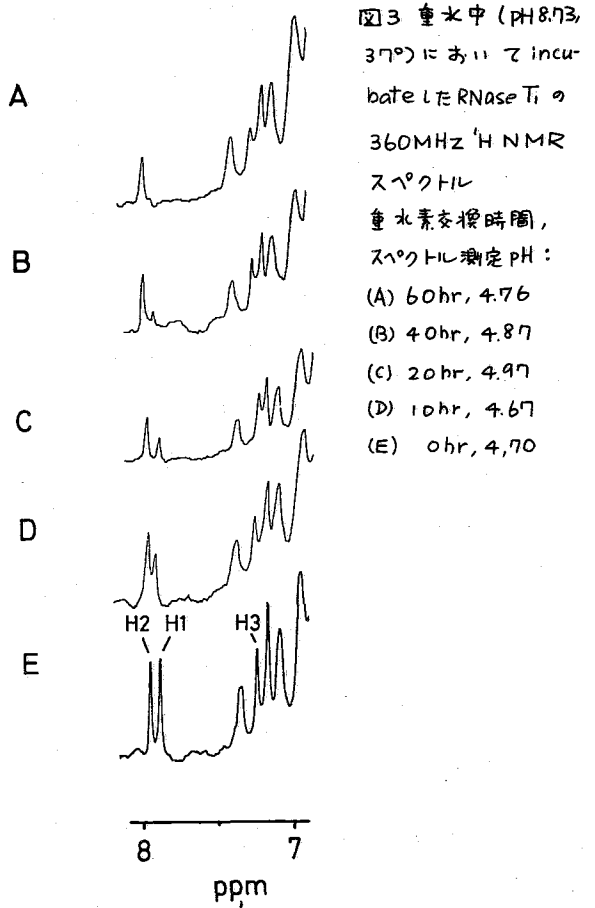


図3 重水中 (pH 8.73, 37 $^{\circ}$ ) において incubate した RNase Ti の 360MHz  $^1\text{H}$  NMR スペクトル  
 重水素交換時間, スペクトル測定 pH:  
 (A) 60hr, 4.76  
 (B) 40hr, 4.87  
 (C) 20hr, 4.97  
 (D) 10hr, 4.67  
 (E) 0hr, 4.70

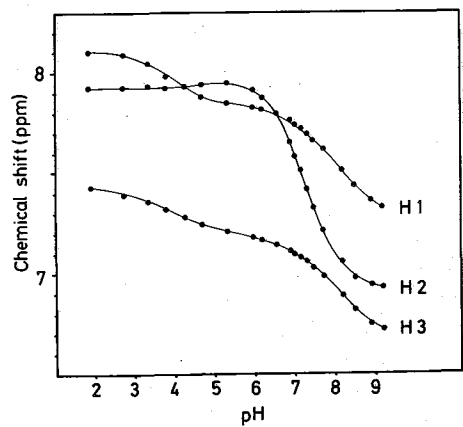


図4 RNase Ti の His C2-H プロトンの 滴定曲線 (360MHz)

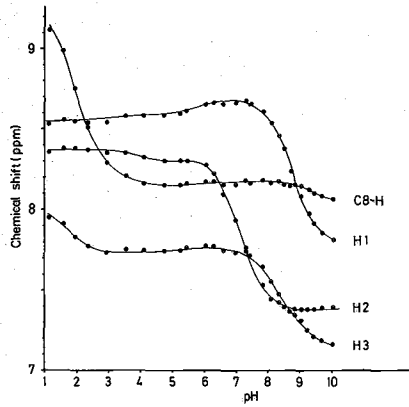


図5 RNase T<sub>1</sub> (5mM), 3'-GMP (20mM)  
0.2M NaCl, D<sub>2</sub>O 溶液における C2-H,  
C8-H プロトンの 100MHz NMR 滴定曲線

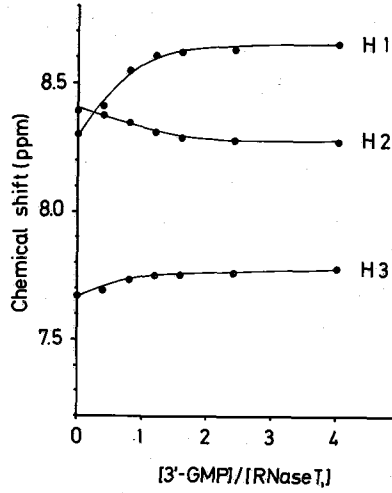


図6 RNase T<sub>1</sub>  
(5mM), 3'-GMP  
0.2M NaCl 溶液  
における C2-H  
プロトンの化学  
シフト (100MHz)

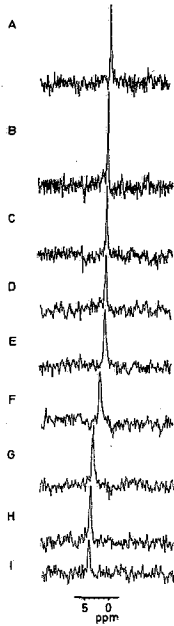


図7 RNase T<sub>1</sub> (5mM), 3'-GMP (5mM)  
0.2M NaCl, D<sub>2</sub>O 溶液における  
31P NMR スペクトル pH: A, 1.77  
B, 2.81 C, 3.96 D, 4.62 E, 5.40  
F, 6.45 G, 7.47 H, 8.33 I, 9.23

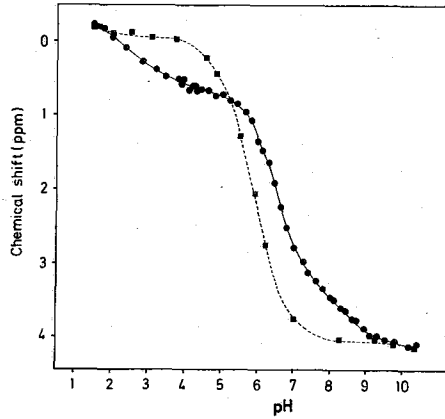


図8 3'-GMP (5mM)  
0.2M NaCl, D<sub>2</sub>O  
溶液における  
31P NMR の滴定  
曲線  
●—● RNase T<sub>1</sub> (5mM)  
共存の場合  
---■--- 3'-GMP のみ  
の場合

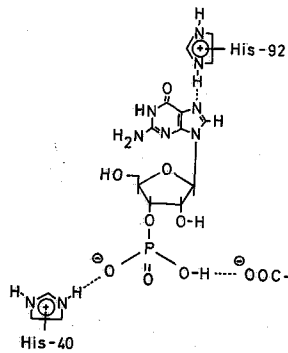


図9 RNase T<sub>1</sub> · 3'-GMP  
複合体の構造

と  $\text{COO}^-$  との相互作用が断たれることが図5からわかる。また H3 は C8-H とともに  $\text{pH} < 3$  において大きな値磁場シフトを示す。C8-H のシフトは N-7 のプロトン化によるものであるが図5の結果は  $\text{pH} > 3$  では  $\text{Im}^+(\text{His-92})$  は N-7 と水素結合していること、 $\text{pH} < 2$  において N-7 のプロトン化により  $\text{Im}^+(\text{His-92})$  は“自由”になることを示唆している。複合体における 3'-GMP のリン酸の第2解離の見かけの  $\text{pK}$  値は 6.7 である(図8)。(free の 3'-GMP では 5.9)。この結果は RNase A・3'-CMP の場合: 5.7 (free)  $\rightarrow$  4.1 (複合体) と対照的である。この事実からも RNase T<sub>1</sub> の触媒部位が 1 個の  $\text{Im}(\text{His-40})$  とカルボキシル基から成り立っていることが推論される。ゲル濾過法によって結合定数を求めると、イオン強度の 2 においては RNase T<sub>1</sub>: 3'-GMP (1:4) の場合  $\text{pH} 3 \sim 7$  では RNase T<sub>1</sub> は 99% 以上 3'-GMP と結合している。  $\text{pH} < 3$  では結合定数は急激に低下し  $\text{pH} = 2.1$  においては RNase T<sub>1</sub> は 66% が 3'-GMP と結合しているに過ぎない。この結果は  $\text{Im}^+(\text{His-92}) \cdots \text{N-7}(3'-\text{GMP})$  が結合に関与するとした上述の議論を支持する。一方、結合定数は  $\text{pH} 7 \sim 8$  でわずかに低下し、つづいて  $\text{pH} 8.5$  付近で急激に減少する。このことから、図8のリン酸基の滴定曲線とを考慮してつぎのように考えることができる。3'-GMP のリン酸の第2解離により  $\text{PO}_4^{2-}$  と  $\text{COO}^-$  の間の反発が結合定数をわずかに低下させるが、本質的には複合体の解離は  $\text{Im}^+$  の脱プロトン化に伴って起こる。His-40, His-92 の  $\text{pK}$  はそれぞれ 8.5 であることから、結合部位と目される  $\text{Im}^+(\text{His-92}) \cdots \text{N-7}(3'-\text{GMP})$  の結合が  $\text{Im}^+ \rightarrow \text{Im}$  の脱プロトン化により切断され、それと協奏的に  $\text{Im}^+(\text{His-40}) \rightarrow \text{Im}$  に変化するものと想像される。なお RNase T<sub>1</sub>・3'-GMP 複合体においては N-7 位が RNase T<sub>1</sub> の H<sub>3</sub> の基よりのプロトンを帯びてプロトン化され、ここに生じた正電荷が結合に主要な役割をはたしているとの報告(UV 差スペクトルによる)がある<sup>6)</sup>が上述の結論と相入れない。3'-GMP の C8-H プロトンの化学シフトは RNase T<sub>1</sub> を加えても全  $\text{pH}$  領域を通じて 0.05 ppm 以上変化しない。したがって複合体において 3'-GMP の N-7 位にプロトン化が起きていると考えることは極めて困難である。

(結論) 以上の実験結果により、図9に示す RNase T<sub>1</sub>・3'-GMP の結合様式を提出する。複合体の解離は低  $\text{pH}$  領域においては 3'-GMP の N-7 のプロトン化が、また高  $\text{pH}$  領域においてはリン酸の第2解離、His-92, His-40 の脱プロトン化が主要な役割をはたしていると考えられる。

(謝辞) 360MHz における NMR の測定は Stanford Magnetic Resonance Laboratory において行ったもので、実験に便宜を蒙りいただいた Oleg Jardetzky 教授に感謝いたします。また <sup>31</sup>P NMR の測定をしていただき、有益な議論により多くの重要な点を指摘いただいた味の素中研 甲斐荘正恒博士に厚くお礼申し上げます。

(文献)

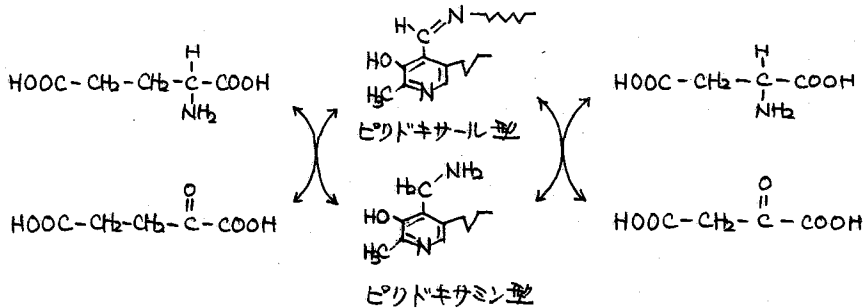
- 1) 高橋: 有機合成化学協会誌 32, 77 (1974)
- 2) Rüterjans et al: BBRC 31, 247 (1969); Eur. J. Biochem. 18, 313 (1971)
- 3) 松尾・寒川・木村・成田: 蛋核酵 20, 479 (1975)
- 4) 荒田・木村・松尾・成田: 第27回タンパク質化学討論会, 北大, 1976年9月
- 5) 荒田・小澤: J. Magn. Resonance 21, 67 (1976).
- 6) 大島・今堀: J. Biochem. 69, 987 (1971); Pongs et al: Eur. J. Biochem. 26, 434 (1972)

アスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性域構造に  
関する研究

(熊本・医, 京大・理) 山崎政城, 永田浩一,  
田浦洋子, 赤坂一之, 森野能昌

はじめに

アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (L-Aspartate :  $\alpha$ -Oxoglutarate Amino-transferase, E.C. 2.6.1.1, GOT) は生体内で下記のようアミノ基転移反応を触媒し, 重要な生理的意義をもつ酵素である。おとくに豚心



筋から精製結晶化の可溶性分画局在 GOT (s-GOT, 一次構造既知, 分子量 93250 (2量体)), 補酵素としてピリドキサルリン酸 2 分子, 8 His 残基/単量体) はグルタミン酸, アスパラギン酸など  $\alpha$ -カルボニル酸に対して基質特異性を示し, この基質の  $\omega$ -カルボキシル基が活性域への結合にあらがるのみならず, 図 1 に示すように, この結合による触媒塩基としての Lys<sub>258</sub> 残基の  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 基との間に charge relay system を形成し, アミノ基転移の触媒機構を促進することが知られている。<sup>2)</sup> さらに基質の  $\omega$ -カルボキシル基結合部位が活性域周辺に存在する His 残基であることも明らかになっている。<sup>3)</sup>

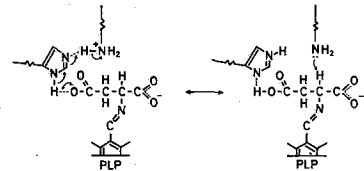


図 1

今回われわれは, 生体内で高次の機能をもち, おもひ高分子量の蛋白質の動的な挙動の解明に n.m.r. 法が直接適応でき得るかどうかを検討するため, n.m.r. の対象例として s-GOT を選り, あわせて本酵素の活性域内アミノ酸残基群の存在状態と活性域の構造との関連について考察した。

実験方法

豚心筋 s-GOT は既報の方法により精製結晶化の可溶性分画局在 GOT (s-GOT, 一次構造既知, 分子量 93250 (2量体)), 補酵素としてピリドキサルリン酸 2 分子, 8 His 残基/単量体) はグルタミン酸, アスパラギン酸など  $\alpha$ -カルボニル酸に対して基質特異性を示し, この基質の  $\omega$ -カルボキシル基が活性域への結合にあらがるのみならず, 図 1 に示すように, この結合による触媒塩基としての Lys<sub>258</sub> 残基の  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 基との間に charge relay system を形成し, アミノ基転移の触媒機構を促進することが知られている。<sup>2)</sup> さらに基質の  $\omega$ -カルボキシル基結合部位が活性域周辺に存在する His 残基であることも明らかになっている。<sup>3)</sup>

やましまさき, はがき こういち, ふうら ようこ, あがさか がすゆき,  
もりの よしよ

の酵素溶液は凍結乾燥法より重水素置換の酵素濃度を2.2 mM (50 mM ピロリン酸カリ後衝液)に調整し、常磁性金属イオンの影響を除くため0.1 mM EDTAを共存させた。<sup>1</sup>H-N.M.R.の測定はJEOL-PS-100 NMR分光器およびPFT-100, EC-100 フリエ変換システムより、10 mm φ 試料管を用い、測定温度24 ± 0.5 °Cで500回の積算を行った。各pHはpHメーターの読みを記載し、化学シフトの基準はDSSまたはTMAを対称基準として用いた。

光酸化反応はS-GOT 10 mg/ml, メチレンブルー 0.0001%, 50 mM ピロリン酸カリ後衝液 (pH 7.8) を含む全量15 mlの反応系で10 °Cで行った。光酸化過程におけるS-GOTのHis残基の減少は、酸化水分解後自動アミノ酸分析計により定量した。

### 実験結果および考察

(1) S-GOT (ピロドキカル型酵素) のHis領域のn.m.r.スペクトル

His領域の4個のピーク(左磁場側からH1, H2, H3, H4と名づける)を直接観測すること成功した(図2)。さうして、これらの4 His残基の化学シフトのpH依存性から図3に示すような滴定曲線が得られた。

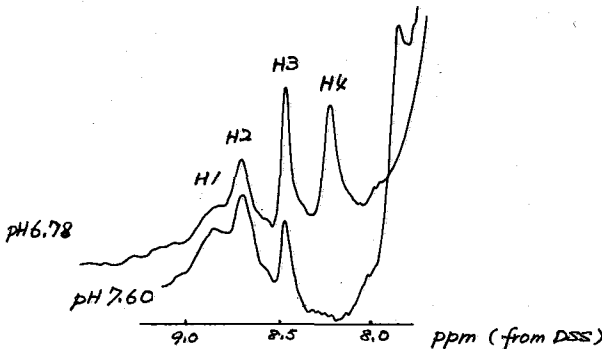


図2 S-GOT (ピロドキカル型) のn.m.r. スペクトル

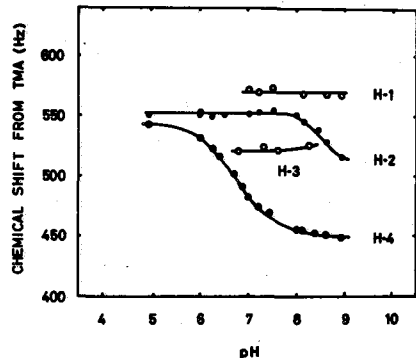


図3 S-GOT (ピロドキカル型) のHis C2-Hの化学シフトの滴定曲線

この滴定曲線からHis残基イミダゾール環のpKa値を求めると、H4はpKa = 6.8でほぼ正常な値を示すが、H2は8.5でかなり高いpKa値を示した。H1はpH 7.0 ~ 9.0の測定範囲ではpH依存性は認められず、より低いpH領域ではH2との重なりのため詳細なpH依存性を求めることが困難であった。220 MHz NMRを用いることにより両ピークを分離して求めることが明らかになった。さうして、H3ではpHが高くなるにつれて5倍程度磁場シフトをする臭が特徴である。

(2) S-GOTと基質および基質アナログとの相互作用

S-GOTと結合し、イミダゾール残基の段階で安定な複合体を形成することが知られている基質アナログであるL-α-メチルアスパラギン酸 (α-MA)<sup>12)</sup>の添加

Kよって His C2-H Kつぎのような変化が認められた(図4)。すなわち、4 His  
 ピークのうち、H1のピークのみが明らかK消失する傾向をとり、同時に 8.57  
 ppm付近K新しいピークが出現した。こ  
 のピークは H3 よりも 0.12 ppm 低磁場側K  
 位置し、 $\alpha$ -MA との相互作用Kよる conformation  
 の変化Kよって新しいピークが出現したもので、ま  
 たは H1 のピークが単Kシフトしたものである  
 のでは今後の課題である。また正常基  
 である L-フルタミン酸と S-GOT との相互作用  
 Kおいても、 $\alpha$ -MA と同様な結果が得ら  
 れた。すなわち基質または基質アナログと  
 の結合Kよって生じられた H1 のピークの変  
 化は、H1 が S-GOT の活性域内触媒基  
 とは関係なく必須 His 残基K由来するピ  
 ークであることを強く支持している。

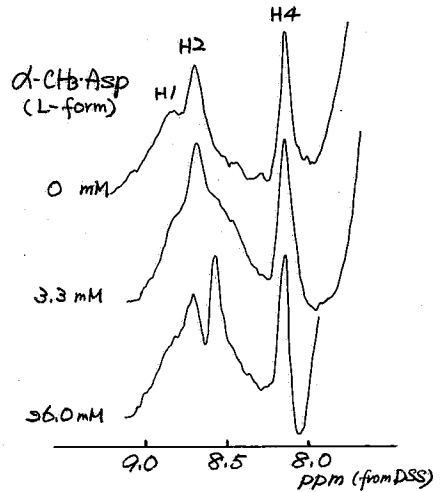


図4  $\alpha$ -MA の結合Kよる n.m.r. スパクトルの変化 (pH 6.80)

(3) 光酸化反応Kよる活性域内 His 残基の同定

S-GOT が単量体あたりもつ 8 His 残基のうち、1 His 残基が酵素触媒K  
 必須であることから、メチレンブルーを光増感剤として光酸化反応を行ない  
 His 残基の修飾を試みた。その結果、  
 $\alpha$ -アミノカルボン酸と L-アスパラギン酸のよう  
 な  $\omega$ -カルボキシル基をもつ基質周のアミ  
 基触媒活性は経時的K一次反応Kお  
 びて低下し、同時に 2 His 残基が酸化  
 されることK明らかKなった。

光酸化された S-GOT の His 領域の n.m.r.  
 スパクトルは、光酸化の進行とともに H4  
 が消失し、ついで H1 が酸化される(図  
 5)。H4 のピークは右K示すデータから  
 明らかKなように、S-GOT の残存活性とは  
 関係なく速く酸化され、H4 のピークの消  
 失の割合は 8 割と算出された。この値は、  
 同一条件で不活性化した S-GOT の蛋白  
 化学的解析から算出され、直接酵素の  
 触媒活性K関係なく 11 個の His 残基の  
 割合と一致する。

一方、H1 のピークが光酸化Kよる活性  
 低下Kともなって減少するといふ事実は、さ  
 きに述べた基質または基質アナログとの結合  
 Kともなう H1 のピークの変化から得  
 られた結論と一致する。

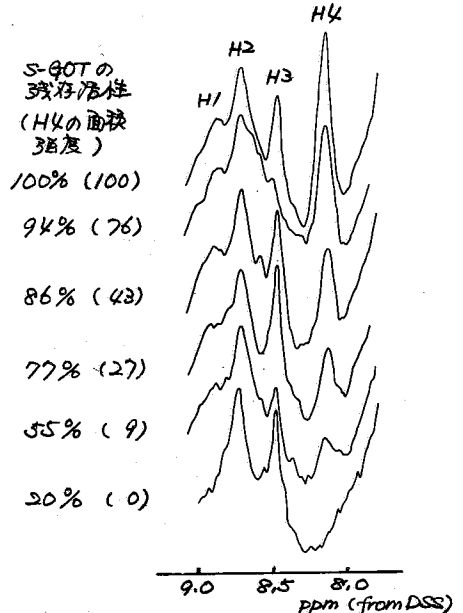


図5 光酸化Kともなう S-GOT His 領域の n.m.r. スパクトルの変化 (pH 7.0)

(4) S-GOT (ピリドキサミン型酵素, アホ酵素 等) の His 領域の n.m.r. スパクトル

アホ酵素では H3 のピーク (8.46 ppm) がほとんど消失するが (図6), ピリドキサミン型酵素では, 逆に面積強度の著しい増大が認められる (図7)。

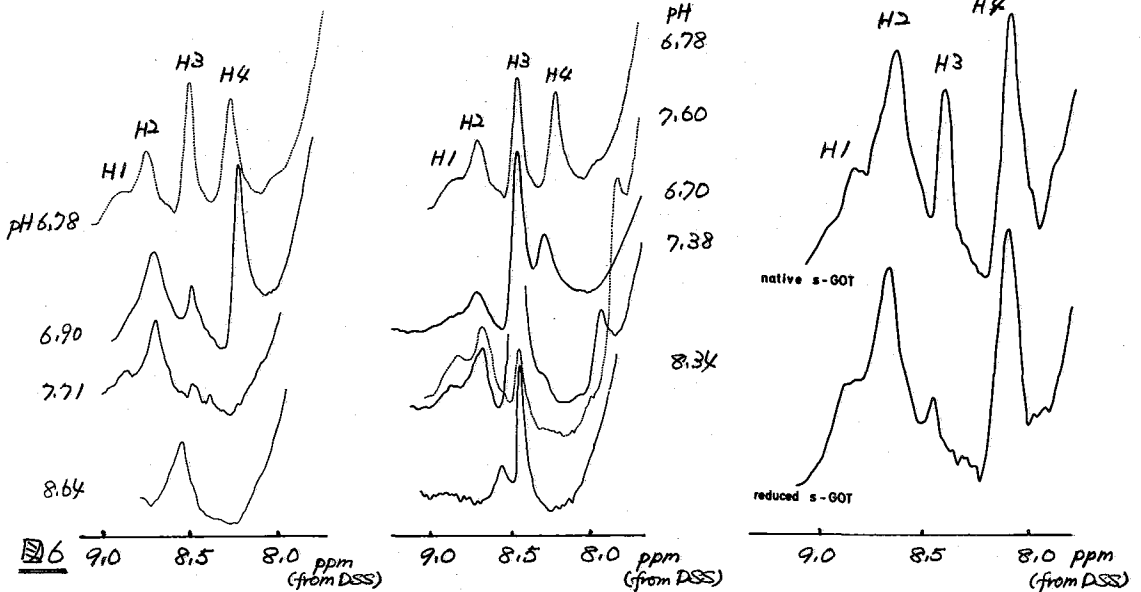


図6 アホ型 S-GOT の His 領域の pH 依存性 (破綻はピリドキカル型を示す)

図7 ピリドキサミン型 S-GOT の His 領域の pH 依存性 (破綻はピリドキカル型を示す)

図8 安定結合型 S-GOT の His 領域のスパクトル (pH 6.8)

さらに, 両酵素の H4 はとも K 正常に解離曲線を示さず, アホ酵素では 20 Hz, またピリドキサミン型酵素でも 4~10 Hz 程度の低磁場側へシフトすることが明らかになった。

一方, ピリドキカルリン酸の 4'-フォルミル基とアホ酵素の Lys-258 残基とで形成される aldimine 結合を NaBH4 で還元して安定な結合型酵素では, 8.46 ppm に吸収をもつ H3 のピークがほとんど消失すること (図8) から, H3 のピークは S-GOT の His C2-H に由来するよりも, aldimine 結合の C-H を含めた補酵素分子内の水素に由来するものと考えられる。また, 直接酵素の触媒活性に関与している H4 の His 残基が, 活性中心の構造変化ともなつて影響をうけているという事実は非常に興味深い。

文献

① Ovchinnikov, Yu. A. et al., FEBS Lett., 39, 31 (1973).  
 ② Morino, Y. et al., J. Biol. Chem., 249, 6684 (1974).  
 ③ Yamasaki, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 652 (1975).  
 ④ Fasella, P. et al., Biochemistry, 5, 197 (1966).

ポリスリン鉄(III)錯体のNMR(第9報)

209

$^2\text{H}$ -NMRによる軸配位子の常磁性シフトとその1μ蛋白質への応用  
(京大工)森島 績 ○増田 秀樹 犬伏 俊郎 米沢 貞次郎  
生越 久靖 杉本 博司 吉田 善一

(序) タンパク質のような巨大分子を研究する上で部分的にD化(重水素化)して、 $^1\text{H}$ -NMRのスペクトルを単純化した測定方法はよく知られ、広く使われている。<sup>1)</sup> 逆に特異的に重水素で *enrich* したタンパク質の $^2\text{H}$ -NMRによる研究も最近出始めている。<sup>2)</sup>  $^2\text{H}$ は核四重極モーメントを有するため極四極子緩和による線中の広がり、及び天然同位体存在比 0.015% でプロトンに比して相対感度が 0.0097 と低い。ため、あまり応用例は多くない。しかし、パルス法の発達により短時間積算が可能になったため、また特異的にD化したものだけを観測でき、 $^1\text{H}$ -NMRに比して非常に簡単なスペクトルが得られ、その有用性が報告されている。<sup>3)</sup>  $^2\text{H}$ は  $I=1$  で緩和は四重極機構によって支配される。常磁性金属による線中の広がり、は磁気回転比の二乗に比例するため、 $^1\text{H}$ の場合ほど著しいことはない。スピン-スピン緩和時間  $T_2$  は線中に逆比例する。 $^2\text{H}$ における  $T_2$  の、 $^1\text{H}$ の  $T_2$  に対する比は  $(\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{D}})^2$  に等しく 42.5 となる。それ故、常磁性金属による線中の広がり、は $^1\text{H}$ の場合のようなことはなく、*diamag* の線中と殆んど変わりない。<sup>3)</sup> この常磁性物質による $^2\text{H}$ への小さな効果は含金属タンパク質の研究を進めていく上で非常に有利である。Frank R.N. GurdらはD化した1ミンを Sperm Whale に再構成し、 $^2\text{H}$ -NMRを観測し、その有用性を示している。<sup>4)</sup>

これまでに私達は、1μ蛋白質における内部配位子及び外部配位子の常磁性シフトを解析するために、1μ蛋白質の活性中心である1ミンを簡略化したモデル錯体 (*low spin* オクタエチルポリスリン鉄( $\text{OEPFe}^{\text{III}}$ ) *etc*) を取り上げ、これに  $^5, 6$  配位子に相当する化合物 (イミダゾール誘導体<sup>4)</sup>,  $\text{P}^{\text{III}}$  誘導体<sup>5)</sup> *etc*) を種々配位させ、 $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR により検討してきた。<sup>4), 5)</sup> 今回私達は  $\text{OEPFe}^{\text{III}}$  と類似のテトラズニルポリスリン鉄( $\text{TPPFe}^{\text{III}}$ ) を取り上げ、配位子としてD化したイミダゾールを配位させ、その常磁性シフトを $^2\text{H}$ -NMRにより観測・解析し、更には1μ蛋白質への応用も試み、これらの結果を $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMRと合わせ検討した。

(実験)  $^2\text{H}$ -NMRの測定は、日本電子PFT-100パルスフーリエ変換NMRに、JEC-100コンピュータシステムを付属させた装置を使用し、1535 MHz,  $^{19}\text{F}$  内部ロック方式にて行なった。ロック用  $^{19}\text{F}$  には  $\text{CF}_2\text{Br}$ ,  $\text{CF}_2\text{Br}$

もりしま いさお, ますだ ひでき, いぬぶし としろう, よねざわ ていじろう,  
おごし ひさのぶ, すきもと ひろし, よした ぜんいち



を使った。ハムモデル錯体には、最もイミダゾールと配位し易いと思われるテトラフェニルポルフィリン鉄( $\text{TPPF}_2^{\text{III}}$ ) (Fig. 1) を主に用い、配位子としてイミダゾール(Im)を夫々選択的にD化したIm-d<sub>4</sub>(1,2,4,5-D), Im-d<sub>2</sub>(4,5-D), Im-d<sub>2</sub>(1,2-D), Im-d(1-D)を用い、ビス配位させ(Fig. 1),  $\text{CHCl}_3$  中で測定した。また、ハムタンパクとしては、ミオグロビン(Mb)15mM, サトクロームC(Cyt C) 5mM (from Horse) に  $\text{CD}_3\text{NH}_2$  を  $\text{H}_2\text{O}$  中、夫々配位させ(pH=11), 0~32°C の間で WEFT (water eliminated FT法) により測定した。(  $\text{H}_2\text{O}$  中の自然含有の  $\text{D}_2\text{O}$  が配位した  $\text{CD}_3\text{NH}_2$  に比して大きいため、WEFTを利用)。他に Im-d<sub>4</sub>, Py-d<sub>5</sub> も配位させ測定した。周波数領域は 1000 Hz に取り、45°パルス、繰り返し間隔 2.2 秒にて、FID を 2048 points でサンプリングし、数 1000 回程度の積算を行なった。

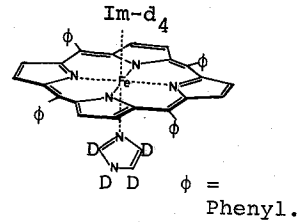


Fig.1 Structure of Bis(Im-d<sub>4</sub>)iron(III)-tetraphenyl porphyrin complex

<sup>2</sup>D FT NMR SPECTRA OF DEUTERATED AXIAL LIGANDS

(結果考察) イミダゾールD<sub>4</sub>の常磁性シフトとその温度依存性

$\text{OEPFe}^{\text{III}}(\text{Im})_2^{2+}$  の <sup>1</sup>H-NMR の測定より、配位した Im の各 ring proton は高磁場側から (0°C, TMS 基準) +7.5, -8.1, -11.2, -14.5 ppm に観測されている。<sup>4)</sup> これらの帰属は Im-d<sub>4</sub>, Im-d<sub>2</sub>, Im-d<sub>2</sub>, Im-d を Im-h<sub>4</sub> のかわりに  $\text{OEPFe}^{\text{III}}$  に配位させ、そのスペクトルの比較より完了しているが、この帰属をより確かなものにするために、<sup>2</sup>H-NMR により観測したところ、Fig. 2 のようなスペクトルが得られた。この図から明らかなように、4 及び 5 位に D が enrich されている時に見られる低磁場側、bulk の肩のシグナルが 4 及び 5 位のシグナル、また 2 及び 1 位に D が enrich された時に見られる高磁場側のシグナルは 2 位のシグナルと確認された。しかし、Im-d(1-D) についても測定したが、1 位のシグナルは観測できなかった。<sup>2</sup>H はそれぞれ自身、核四極子モーメントをもつため、ブロードであるが、隣

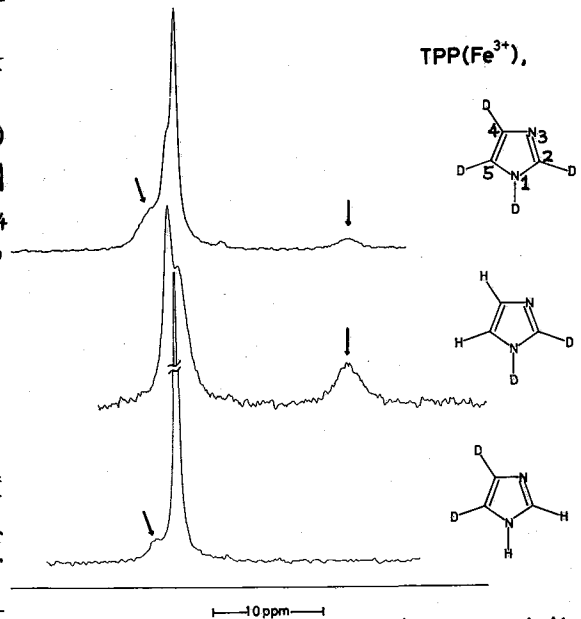


Fig2 選択的にD化したイミダゾールの<sup>2</sup>H-NMR スペクトル

と確認された。しかし、Im-d(1-D) についても測定したが、1 位のシグナルは観測できなかった。<sup>2</sup>H はそれぞれ自身、核四極子モーメントをもつため、ブロードであるが、隣

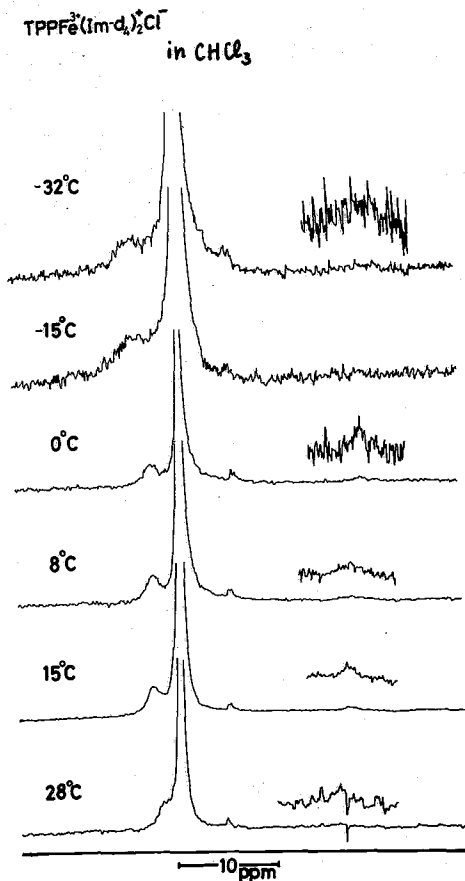


Fig. 3 2H-NMRによる温度変化のスペクトル

。即ち、次のような関係がある。

$$\frac{1}{T_{2f}} = \frac{1}{160} \left( \frac{e^2 q Q}{h} \right)^2 \left( 1 + \frac{\eta^2}{3} \right) \left\{ 9\tau_f + \frac{15\tau_f}{1 + \omega_0^2 \tau_f^2} + \frac{6\tau_f}{1 + 4\omega_0^2 \tau_f^2} \right\}$$

$(e^2 q Q/h)$ : 四極子結合定数,  $\tau_f$ : 相関時間

$\omega_0$ : 共鳴周波数,  $\eta$ : 非対称パラメータ

よこ37.  $\tau_f$ と温度Tとの間には、次のような関係があり、

$$\tau_f = \tau_0 \exp(-E/RT)$$

温度が上昇すると、 $1/T_{2f}$ は小さくなり、線巾は先鋭化する。従って、Fig. 3において温度が下がるに従って、ブロードニングする現象が見られるか、これは上の式からうまく説明できる。

接する<sup>14</sup>NはI=1をもち<sup>2</sup>Hとカップリングし、更に<sup>14</sup>Nの緩和時間が短かいため、相まってシグナルをよりブロードにし観測できなかったものと考えられる。他の各シグナルの常磁性シフトについては<sup>1</sup>H-NMRの場合と一致する結果が得られた。即ち、Fig. 3はTPPF<sub>2</sub><sup>III</sup>(Im-d<sub>4</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>の温度変化を示したスペクトルであるが、温度が下がるに従って、明らかに2位は高磁場、4, 5位は低磁場、Curie則に従う常磁性シフトを示した。擬コンタクトシフトを見積ると、1, 2, 4, 5位は夫々-13.6, -20.7, -20.3, -12.8ppmと低磁場シフトであり、観測された常磁性シフトと擬コンタクトシフトとの差より求めたコンタクトシフトは夫々+7.9, +27.0, +8.8, +9.6ppmと全て高磁場シフトを示した。従って、イミダゾール環の各重水素上には負のスピン密度がスピンスピン分極機構によって誘起されたものと思われる。

### 線巾の温度依存性

反磁性物質の<sup>2</sup>H共鳴線の線巾は主に四極子機構によって決定され

る。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

。

## Λ4蛋白質への応用

Cyt. C( $Fe^{3+}$ )- $CD_3NH_2$

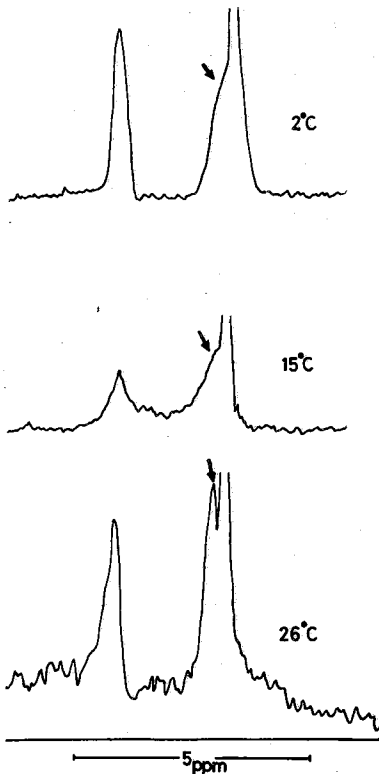


Fig.4 Cyt.C( $Fe^{3+}$ )- $CD_3NH_2$ の $^1H$ -NMRによる温度変化のスペクトル

Fig.4は軽水中、チクロ-4Cに $CD_3NH_2$ を配位させ(pH=10.8)た時のWEFTによる $^1H$ -NMRのスペクトルである。図の(↓)印に示すように配位した $CD_3NH_2$ のシグナルは温度変化に対してCurie則に従う常磁性シフトを示し、 $CD_3$ のシグナルと確認できる。このように配位した $CD_3$ のシグナルはbulk  $CD_3$ と $D_2O$ との間のdiamag領域に観測され、 $^1H$ -NMRでは $CH_3$ 基は大きなタンパクのシグナルにかく水、観測できない。また、ミオグロビンについても軽水中、 $CD_3NH_2$ を配位させると(pH=11)、同様に観測され、温度を下げると高磁場シフトを示した。Im-d<sub>4</sub>, Py-d<sub>5</sub>についても、軽水中、ミオグロビン、チクロ-4Cに各々配位させて測定したが、bulkの肩に見られるか、シグナル強度が $CD_3$ の場合に比して小さいことと、線巾がブロードなこと等のため確定できなかった。

### (結論)

以上のように $^1H$ -NMRは、スペクトルも簡単で、線巾の性質 $etc$ を利用すれば、有益な知見が得られることが分った。従って、 $^1H$ -NMRと結合させて、うまく使えば、常磁

性シフトしたシグナルの解析 $etc$ に非常に有力な手段として使えることは明らかである。

(謝辞)  $^1H$ -NMRプロブをお借り頂き、多大なる便宜を計って下さった東工大資源研 中村さん、及び $^1H$ -NMRの測定に御協力御指導下さった国立がんセンターの斉藤さんに感謝致します。

また、 $^{19}F$ ロック用 $CF_2BrCF_2Br$ を提供して下さい下さった京大工の久任さんに感謝致します。

### (Reference)

- 1) H.L.Crespi, Methods Enzymol., 26, 627 (1972).
- 2) J.L.Markley, ibid, 26, 605 (1972).
- 2) F.R.N.Gurd et al, J.Biol.Chem., 250, 7990 (1975).
- 3) P.Diehl et al, Helv.Chim.Acta., 47, 545 (1964).
- 4) 森島・増田ら, 第14回NMR討論会, 第14回生物物理学会 (1975).
- 5) 森島・石川・増田ら, 第15回NMR討論会 (1976).
- 6) A.Abragam, The Principles of Nuclear Magnetism, Chap.8, Clarendon Press, Oxford (1961).

NMRの生物化学への新しい応用 —— 不均一系の高分解能

I-5

NMRスペクトル ——

味の素(株) 中央研究所

甲斐荘正恒

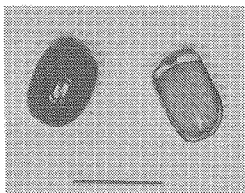
はじめに

伝統的な化学の方法論は、複雑な物質組成を持つ系のふるまいを、単離した純物質より成る組成の明らかな系——モデル系——の示すふるまいに単純化してゆく過程を含んでいた。クロマトグラフィ法によって代表される分離手法の発達、種々の分光学的方法によって代表される分析手法の発達により、この伝統的方法は化学の各分野に大きな影響を与え、極端に言えば、組成の完全に分かった系以外は研究の対象となり得ないといった考えすら生れていた。ところが、近年、例えば生体膜のように、不均一系であるが故に機能を発現できるといった系を分子レベルで研究するに際して、この伝統的考え方は明らかな限界を持つことが徐々にわかってきた(1)。最近、種々の“intact”系を用いる研究が活発に試みられるようになってきた理由は一つには以上のような背景が考えられるが、複雑な系から望みの情報を取り出す具体的な手段に乏しかったために、十分な成果をあげていないのが現状ではないだろうか。

筆者らも長年nmrにより、溶液中の“純”物質の構造研究を行ってきたが、最近になって種々の“不均一系”——物質の存在位置、状態について——を、分離することなく、そのまま試料とすることによりどのような情報が得られるかについて幅広く検討している。本講演では、将来のnmrの進歩の一方向を示すという意味で、この新しいnmrの応用の可能性について出来るだけ多くの実例を中心に述べたい。以下に講演に含まれる例の内、いくつかを示す。

実例

植物成分の直接測定 ----- 従来の天然物化学は、生体から様々な方法で単離した物質の構造研究を意味していたし、又生体物質を生体から分離せずに研究する手段が乏しかった為に、いわゆる“天然物”が果たして実際の生体内に含まれていたものと同じであるかどうか知ることが困難であった。ところが生体に含まれる水やイオン等の他にも多くの物質がそのままの状態、或いは状態を変化させることによって、高分解能のnmrスペクトルを与えることがわかった。一例としてアオキの臭の成分研究について示す(2)。



2 cm  
アオキの臭

アオキ (*Aucuba japonica* Thunberg) の赤熟果は左の写真のように約  $2 \times 1.5$  cm の回転楕円体なので  $12$  mm の試料管には少々大きすぎる。しかし薄い果肉の中に四の様に半透明の種子があり、丁度試料管に入り、その $^{13}\text{C}$ -nmrスペクトルを測定したところ次頁の図-1 に示した様に見事な高分解能スペクトルを与えた。

図-1 のスペクトルは種子中に含まれている蔗糖と苦味配糖

かいのしょう まさつぬ

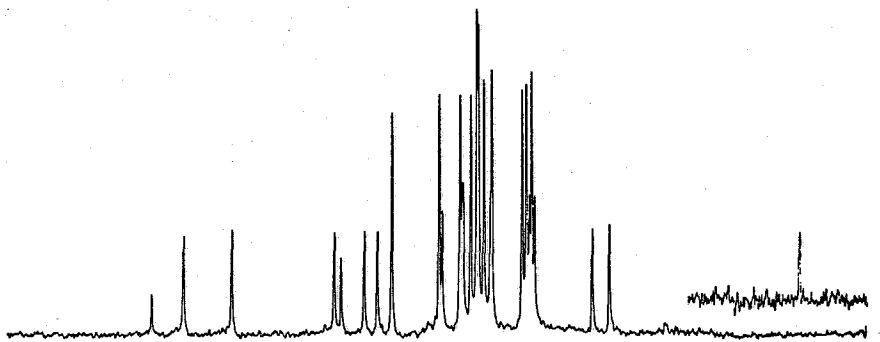
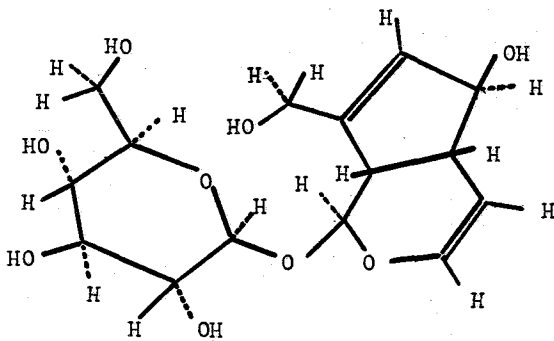


図-1. アオキの種子(一粒)の $^{13}\text{C}$ - $n\text{mr}$ スペクトル。右端, 上のスペクトルはテトラメチルシラン(四塩化炭素溶液)



Aucubin の構造

体 aucubin に由来していることはスペクトルから直ちに理解できる。CWデカップリングの方法, ケミカルシフトの値等の通常の $^{13}\text{C}$ - $n\text{mr}$ の解析から種子における aucubin ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_9$ ) の殆んど全ての $^{13}\text{C}$ スペクトルの帰属が可能であった。より詳細な解析は種子より単離した aucubin について行なったが、表-1. に示した様に、アオキ種子の細胞内に含まれている aucubin は単離して水に溶かしたそれと類似した $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ケミカルシフトを有することが明らかとなり、従って二つの状態において、

aucubin は立体配座を含めてほぼ完全に等しい構造をとっていることがわかった。同様に種子中の蔗糖のスペクトルと、水溶液中のそれとの比較から、蔗糖も両状態で同じ立体配座をとっていることがわかった。

興味あることに果肉の $^{13}\text{C}$ - $n\text{mr}$ スペクトルはブドウ糖と果糖のみを示し、蔗糖の吸収を示していない。一方、種子の中には果糖、ブドウ糖は存在せず蔗糖のみがあらわれる。又、アオキの未熟果には aucubin のみが含まれており、糖類は果実が熟するにつれて生成することを示している。

この他、種々の植物成分について、それらの存在状態と $n\text{mr}$ スペクトルを中心として述べる予定にしている。

表-1. Aucubin の  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  ケミカルシフト。種子中と単離水溶液中でのシフトの比較。 $^{13}\text{C}$ -nmr シフトは外部 TMS から、 $^1\text{H}$ -nmr は内部標準 TMP からの ppm 値を示した。

|    | $^{13}\text{C}$ nmr ppm |                   | $^{13}\text{C} - \{^1\text{H}\}$ ppm |                   | $^1\text{H}$ nmr |
|----|-------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------|------------------|
|    | seed                    | free              | seed                                 | free              | free             |
| A  | 61.0                    | 61.3              | c                                    | 4.23              | 4.30             |
| B  | 148.3                   | 148.5             | ---                                  | ---               | ---              |
| C  | 130.0                   | 130.3             | 5.85                                 | 5.85              | 5.85             |
| D  | 82.1                    | 82.3              | 4.60                                 | 4.54              | 4.54             |
| E  | 43.8                    | 44.1              | 2.70                                 | 2.66              | 2.77             |
| F  | 47.7                    | 48.0              | 3.00                                 | 2.95              | 3.13             |
| G  | 99.8                    | 100.1             | 4.75                                 | 4.76              | 4.78             |
| H  | 141.1                   | 141.3             | 6.30 <sup>b</sup>                    | 6.30 <sup>b</sup> | 6.30             |
| I  | 106.7                   | 106.9             | 5.15                                 | 5.07              | 5.12             |
| 1' | 96.8                    | 97.1              | 5.25                                 | 5.19              | 5.25             |
| 2' | 74.2                    | 74.6              | c                                    | 3.28              | d                |
| 3' | 77.6 <sup>a</sup>       | 77.9 <sup>a</sup> | c                                    | 3.31 <sup>a</sup> | d                |
| 4' | 71.1                    | 71.4              | c                                    | 3.35              | d                |
| 5' | 77.3 <sup>a</sup>       | 77.5 <sup>a</sup> | c                                    | 3.49 <sup>a</sup> | d                |
| 6' | 62.2                    | 62.5              | c                                    | 3.70              | d                |

a; 帰属は逆かもしれない。

b; H-プロトンを 6.30 ppm と仮定。

c; 蔗糖のピークと重なり正確なシフト値は得られなかった。

d; 解析困難

昆虫の変態過程の追跡----- 昆虫は短期間にめまぐるしく変態する。この間昆虫の体内でも種々の器管が出現したり、消失したり、やはり大きな変化をしている。これらの過程を昆虫体内の化学種の動的変化と関連づけて研究するためには、従来、個体からそれらの物質を取り出す必要があった。当然のことながら、その結果個体の生命は失われる。ところがnmrスペクトルは昆虫の生命には何の影響も与えずに、一つの個体の運命を連続して観察することが出来る点で画期的であろう。図-2はカイコ(家蚕)のサナギの $^{31}\text{P}$ -nmrスペクトルの一例である。

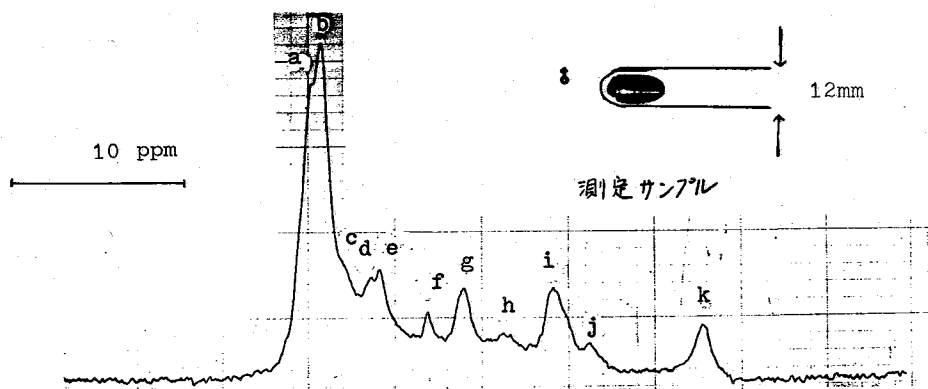


図-2. カイコサナギの  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトル。蛹化後約3日経過したもの。右上はNMR試料管に入れたサナギ

図-2. に示した a ~ k までの 11 本のピークはそれぞれ環境の異なるリン酸基に由来する  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトルである。これらのピークの確実な帰属はサナギからリン酸エステル画分を抽出し、標準物質と比較することによって初めて行なわれるが、一度そのような帰属が成功すれば、各個体についてはそのままの状態での NMR スペクトルから、カイコ体内のリン化合物の量的変化を知ることができる。講演においては、これらのスペクトル変化と変態過程との関係を中心として昆虫生理学への  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトルの応用について、特にこれらの試料の測定に伴う特殊な問題点について触れる予定にしている。

### 終りに

生物を特徴づける性質の多くは、種々の物質が不均一に共存していることに由来する。従ってこれらの系における物質の状態(変化)を知るためには、従来の分離過程を含む化学的方法は本質的な欠陥を含んでいる。最近、米国では“gross chemistry”という言葉が使われているようであるが、本講演で述べたような、不均一系の、分離を伴わない化学はまさにこの言葉によって表現できるだろう。

我が国においては、藤原教授によるカイコ幼虫の成長過程の ESR によるユニークな研究がある(3)。今後このような生命現象を、生物そのままを対象として測定する研究が盛んになることが予想される。

### 文献

1. 甲斐荘正恒; “NMR の生化学への応用” p.137, 化学増刊, 67, 化学同人 (1976), 生物物理, 16, 81, (1976)
2. 甲斐荘正恒; Tetrahedron Letters 投稿中
3. 藤原, 中島, 中井沢; Chemistry Letters 1419 (1974)

# 核酸における $^{31}\text{P}$ 緩和機構とその応用

210

(京大理) 赤坂一之, 林 文和, 山田篤子, 波野博行

## 序

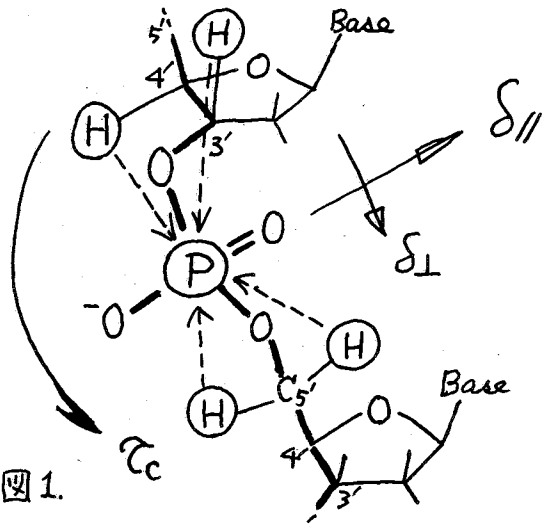
$^{31}\text{P}$  は生命現象にとって重要な核酸の主鎖を形成し、又生体膜の成分である  
 リン脂質を形成する重要な原子核であり、 $J$  結合磁気回転比  $\gamma$  が大きく、ま  
 た  $I = 1/2$  であるため NMR の測定を行い易い。現在まで、この  $^{31}\text{P}$  核の化学シフト  
 やスピンの結合定数の測定から、核酸の構造を研究することが行われてきた。 $(1, 2, 3)$ 。  
 一方、 $^{31}\text{P}$  核の核磁気緩和機構については、最近になってようやくリン脂質や核酸についての  
 研究が始められているが、(1) それも線中を用いた研究である  $(4, 5)$ 。われわれは最近、  
 核酸類についての  $^{31}\text{P}$  核緩和時間 ( $T_1$ ) を測定し、その緩和機構についての考察をするこ  
 とに、これを利用して核酸分子の構造や分子運動についての知見を得る努力を怠らな  
 くてこれらを集めて報告した。

## $^{31}\text{P}$ 緩和機構

核酸については  $^{31}\text{P}$  緩和は、 $J$  結合  $I = 1/2$  の核であると考えられて、  
 核分子中の周辺プロトンからの双極子場によるものと考えられる  
 (図 1 参照)。次に  $^{31}\text{P}$  化学シフトが極めて大きいことを考え、この化学シフトの  
 異方性を大きく考えられ、これがもう一つの緩和機構となることが考えられる。スピ  
 ン回転緩和はこのような比較的大きな分子では  
 重要でなく、右にスロー緩和も、少くとも  $T_1$   
 と緩和の遅さは考慮が必要である。一方、  
 リン酸基は常磁性イオンと相互作用し易いから、  
 このことは充分考慮する必要がある。結局、  
 核酸の  $^{31}\text{P}$  の  $T_1$  と緩和の遅さは

- (a) プロトンとの双極子相互作用
- (b) 化学シフトの異方性
- (c) 常磁性イオンとの相互作用

のうちの二つを考慮すればよい。この二つの機構  
 による緩和は、(1) それも同じ相関時間(分子の  
 回転相関時間)で緩和をうけている。(この場合、  
 分子は "rigid" と回転は準静的と見て近似  
 できるとする。) この二つの緩和機構を互に分離  
 して、それぞれの緩和を核酸の研究に有効に利用する  
 ことが出来る。



## 常磁性イオンの除去

上記 (c) の効果は今の目的にはしゃきであるので除外すること  
 が必要である。核酸試料(市販のもの)には通常かなりの  
 量の鉄イオンが含まれる。これを取り除く場合、これを除去は徹底的に  
 行うのがよい。さらに測定試料に EDTA を加えることにより、この効果はほとんど  
 完全に除去される。脱気による  $\text{O}_2$  の効果を除くことは当然である。

よかたか、かたゆま、ふたかあ、はせし、せまふあつ、(正)のふらゆま。



**双極子緩和と化学シフト異性緩和の分離**

両者は、温度を示す (a), (b) 2つのプロットに対して異なる

異なる振舞を示すことから、(a), (b) 1つだけの測定より両者を分離することはできる。

表1.

| 緩和機構     | (a) 外場H <sub>0</sub> に対する依存性        | (b) <sup>31</sup> P- <sup>1</sup> H NOE |
|----------|-------------------------------------|---|
| 双極子緩和    | なし                                  | あり (最大 2.235)                           |
| 化学シフト異性性 | あり (∝ H <sub>0</sub> <sup>2</sup> ) | なし                                      |

(a) の場合は周波数を変えて且つ超高温場下で測定することが必要となる。一方 (b) の場合は一般には extreme narrowing の条件下での測定を行う必要があり、且つ温度を変えて緩和機構が変化しないことと仮定する必要もある。おれおれは (b) の方法を採用した。その原理は次の通りである。

270MHz 照射時の <sup>31</sup>P 核の T<sub>1</sub> は

$$\begin{aligned}
 (1/T_1)_p &= (1/T_1)_{dip} + (1/T_1)_{CSA} \\
 &= A \left\{ (c_1/10) \left[ \frac{3}{1+\omega_p^2 \tau_c^2} + \frac{1}{1+(\omega_p - \omega_H)^2 \tau_c^2} + \frac{6}{1+(\omega_p + \omega_H)^2 \tau_c^2} \right] \right\} \\
 &\quad + B \left\{ \tau_c / (1+\omega_p^2 \tau_c^2) \right\} \tag{1}
 \end{aligned}$$

但し  $A = \sum (Y_p^2 Y_H^2 h^2 / r_{iH}^6)$  及び  $B = (3/10) (\delta_{H1} - \delta_{H2})^2 \omega_p^2$ .

(1) extreme narrowing の条件下では、

$$(1/T_1)_p = (A+B) \tau_c \tag{2}$$

となるから、この条件下での NOE (= 1+η) を測定すれば η = A/(A+B) の関係から A と B の比率を求めることができる。

(2) の場合は A と B の比率がわかると (2) の温度に初めに予変じたと仮定して、T<sub>1</sub> の温度依存性から T<sub>1</sub> 緩和定数の τ<sub>c</sub> が決まるから、(1) 式に T<sub>1</sub> 緩和定数を代入して A, B とおのおのの大きさを求められる。2式で (1) 式右辺の未知数は τ<sub>c</sub> にだけなる。

**得られた情報**

- 1) A の値から <sup>31</sup>P-H 間の平均距離 (r<sub>PH</sub>)
- 2) B の値から化学シフトの異性性 (δ<sub>H1</sub> - δ<sub>H2</sub>) の大きさ
- 3) (1) 式を用いて異なる T<sub>1</sub> から各温度での τ<sub>c</sub> (分子運動)

**T<sub>1</sub> の測定と NOE の測定**

これは日本電業製 PFT-100 システム (<sup>1</sup>H: 100 MHz, <sup>31</sup>P: 40.48 MHz) を用いて行った。T<sub>1</sub> は 70MHz 照射下での Inversion Recovery 法を行った。NOE は 70MHz 照射による <sup>31</sup>P NMR の面積密度の変化と測定し、基準として NOE を示すために pyrophosphate-Na salt を用いた。試料の昇温を避けるため、デカ 70% グリコールは 10℃ 以下に保ち、一部の測定に Gated decoupling の方法を用いた。

**ポリヌクレオチドへの応用**

この対象とする主な核種は poly(rA), poly(rC), poly(rU), 及び yeast as の phenylalanine-specific tRNA である。前者は SIGMA 社からのもので pH ~ 6, [Na<sup>+</sup>] = 0.1 M (poly(rC) のみ 0.2 M) の D<sub>2</sub>O 溶液, tRNA は pH 7.1, [Na<sup>+</sup>] = 0.02 M, [Mg<sup>2+</sup>] = 0.01 M の D<sub>2</sub>O 溶液での 1 本鎖状態の EDTA を含む。試料濃度は本記述のポリヌクレオチドは 1 M 酸基当り 60 ~ 90 mM, tRNA は分子当り 1 mM である。

本記述のポリヌクレオチドは T<sub>1</sub> の温度依存性を示す (図 2)。1 本鎖状態の T<sub>1</sub> の極小値は約 2.5 である。tRNA は 2 本のヒンジ領域を有し、1 本鎖状態の T<sub>1</sub> の極小値を示す (図 2) は本記述の通り。

(図 2) は本記述の通り。NOE は T<sub>1</sub> の測定温度範囲の最大値のみを示す。poly(rU), tRNA 以外は extreme narrowing の条件から推定されるが、これは 50% 以上の NOE を示し、3p 緩和の定積分の 2 倍の双極子相互作用によることを示している (表 2)。表 2 は解析の結果を列挙し、T<sub>PH</sub>, δ<sub>11</sub>-δ<sub>12</sub> の値を示す。図 3 は 1) を用いて導かれた δ<sub>11</sub>-δ<sub>12</sub> の値を示す。poly(rA), poly(rC) の最大 NOE が正確にわかると、この T<sub>1</sub> の A/B の比が決定でき、これは本記述の中を述べる。

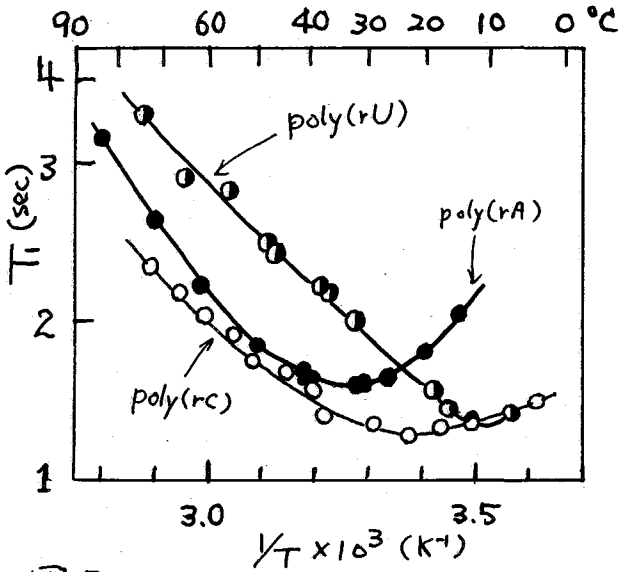


図 2

**考察**

表 2 と図 3 をもとに、以下はポリヌクレオチドの運動性や構造について考察する。

1) T<sub>PH</sub> (p-H 1H の "平均" 距離; 定義については巻 2 脚注参照) は互に比較的良好な値を示すことは、ポリヌクレオチドの構造による 2 本の酸基とリボースの配位工程が異なることを示していると考えられる。これは、ポリヌクレオチドの化学シフト (等分性項) が 0.5 ppm 以内でほとんど一致する (1) ことと両立する現象であると考えられる。しかし T<sub>PH</sub> にはポリヌクレオチド毎にかなりの差があり、化学シフトと共に核種の 2 本の酸基間の構造を異なるべきであると推定される。

2) 今回の NOE と T<sub>1</sub> の測定から δ<sub>11</sub>-δ<sub>12</sub> の値は 100 ppm 程度の範囲であると示されており、リボース残基間の構造と配位構造の訂正は困難に決まることが示される。なお、Gueren は 線中測定から、

表 2

| 核酸           | $T_{min}$<br>(°C) | NOE<br>(max) | 双鎖子後和<br>の割合(%) | $\bar{r}_{PH}^*$<br>(Å) | $S_H - S_L$<br>(ppm) | $\Delta E$ (kcal/mole)<br>(遷移の活性化エネルギー)   |
|--------------|-------------------|--------------|-----------------|-------------------------|----------------------|---|
| poly(rU)     | 1.18              | 2.0 (72°C)   | ~80             | 2.33                    | ~85                  | ~5.1  |
| poly(rC)     | 1.15              | 1.8 (83°C)   | >65             | 2.1 ~ 2.4               | <110                 | 5.3 ~ 6.0   |
| poly(rA)     | 1.41              | 1.6 (83°C)   | >50             | 2.2 ~ 2.6               | <105                 | 7.2 ~ 8.1   |
| tRNA<br>(**) | { 1.55<br>1.80    | 1.90 (80°C)  | ~73             | 2.26<br>2.32            | ~67<br>~63           | { 10.7 ± 0.5 (22.5-40°C)<br>21.5 ± 0.5 (40-57°C)<br>14.8 (22.5-31°C), 54 (31-37.5°C)<br>6.0 (45-50) |

\*  $P-H$  間の“平均”距離は、 $1/\bar{r}_{PH}^6 = \sum (1/r_i^6)$ 。  
 \*\* 表中上の値はヘリックス部分、下の random 部分に対応する。

tRNA についても  $S_H - S_L = 136$  ppm (2) の値を示しているが、今回の結果は、  
 2.4 ppm である。実際の  $S_H - S_L$  は、  
 小エッチを示している。

3)  $\tau_c - 1/T_1$  (図3) は、本  
 邦リヌクレオチドに於いては、ほぼ  
 単一の直線を示し、2.4 ppm の分  
 一本鎖で、協同的な構造変化がないこと  
 と一致している。一方  $\tau_c$  (分子運  
 動の速さの目安) は poly(rA),  
 poly(rC), poly(rU) の4塩基  
 中心、同じく分子運動の活性化エネ  
 ルギーも減少している(表2  $\Delta E$ )。  
 本邦リヌクレオチドの塩基内スタック  
 ングは、その減少を示している。この  
 事実は一塩基に於ける塩基内スタック  
 ングが、主鎖のリン酸基間の運動性を強く抑制  
 していることを示している。

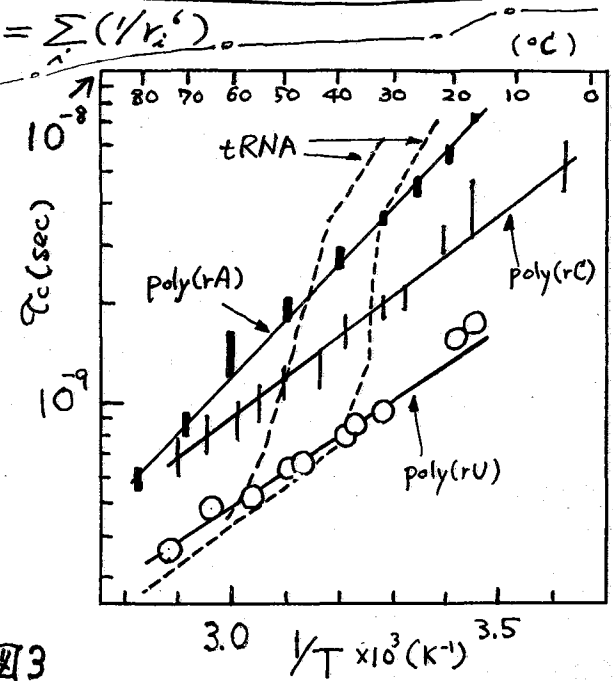


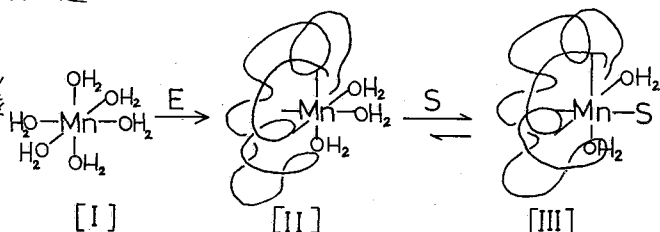
図3

一方 2.4 ppm の高次構造を有する tRNA では  $\tau_c - 1/T$  の直線は、一塩基  
 リヌクレオチドとは著しく異なり、一定の温度範囲で急激な  $\tau_c$  の減少が  
 示される。これは tRNA の高次構造の協同的な溶解 (2 塩基分子運動の活性化に  
 示されるもの) による。

(文献) 1) H. Tsuboi et al., Science 166, 1504 (1969). 2) Queron and Skulman  
 Proc. N.A.S. (USA) 22, 3482 (1975). 3) K. Akasaka et al., FEBS Letters 53,  
 239 (1975). 4) J.A. Berden et al., FEBS Letters 46, 55 (1974).  
 5) A.C. McLaughlin et al. J. Mag. Res. 20, 146 (1975).

1. はじめに 前回の報告にて<sup>13</sup>Cと<sup>31</sup>P核の緩和速度から得られるアセテートキナーゼ(以下AKと略す)と酢酸, ATPなどの相互作用について述べ、酵素反応の中間体として考えられる酵素-基質複合体のコンフォメーションについて考察した。<sup>1)</sup> 今回の報告では<sup>1</sup>H核の緩和速度から得られる知見を加えて、AKと酢酸あるいはプロピオン酸などの基質の解離定数(K<sub>D</sub>)とAKの基質特異性の研究を述べる。

Mn<sup>2+</sup>イオンが水中に存在するとき6個の水を周りに配位するので、Mn<sup>2+</sup>は水の<sup>1</sup>Hの緩和速度(PRR)を増大させる。このMn<sup>2+</sup>がAKのような酵素の活性中心に存在するときは酵素の分子に結合している多



くの水分子にタンパク質の骨格を通して影響を与えるので、Mn<sup>2+</sup>が酵素に結合することによって水の<sup>1</sup>Hの緩和速度にenhancement (E<sub>b</sub>)が観測される。E<sub>b</sub>は次式で与えられる。<sup>2)</sup>

$$E_b = \frac{1/T_{1P}^*}{1/T_{1P}} = \frac{1/T_{1(\text{obs})}^* - 1/T_{1(\text{o})}^*}{1/T_{1(\text{obs})} - 1/T_{1(\text{o})}} \quad (1)$$

ここで $1/T_{1(\text{obs})}^*$ ,  $1/T_{1(\text{o})}^*$ はそれぞれMnを含むと含まないAK溶液の水の<sup>1</sup>Hの緩和速度、 $1/T_{1(\text{obs})}$ と $1/T_{1(\text{o})}$ はそれぞれAKを含まないが同量のMnを含む系とMnを含まない溶液の水の<sup>1</sup>H緩和速度である。このようなAK-Mn binary complex [II]に基質分子Sが添加されるとAK-Mn-Sのternary complex [III]が生成し、Mn<sup>2+</sup>に配位している水の数を減少させるので、E<sub>b</sub>の値はSの添加量に応じて減少し、一定値E<sub>c</sub>へ近づいてゆく。AK-Mn-S complexの解離定数 $K_D = [AK-Mn][S]/[AK-Mn-S]$ は次式から求められる。<sup>3)</sup>

$$\frac{1}{E_b - E^*} = \frac{1}{E_b - E_c} + \frac{1}{E_b - E_c} \cdot \frac{K_D}{[S]} \quad (2)$$

この式でのE\*は[S]を増加させていったときに観測されるenhancementである。そこで基質の添加量を変えてE\*を測定し、 $1/(E_b - E^*)$ と $1/[S]$ のプロットをして直線が得られれば、その傾きよりK<sub>D</sub>が求められる。

## 2. 研究方法

AKはE. Coli(4157)より精製されてSigma社より市販されているもので、170±10 units/mgの活性をもっている。AKの分子量は4,6000で、酢酸あるいはプロピオン酸へATPよりPO<sub>4</sub>を転移させてアセチルリン酸を作るTCA回路に属する酵素である。多くの有機酸が基質として試みられたが、酢酸とプロピオン酸が基質となることが明らかにされ、酢酸はプロピオン酸より約10倍活性であることが知られている。<sup>4)</sup> 1/T<sub>1P</sub><sup>\*</sup>の測定の系としてはTris-Cl(10mM, pH 7.8, リン酸緩衝液30mM, pH 7.5, AK 37~40μM,

いいだけあき、すきからみつのり

\* PRR (Proton Relaxation Rate)

1) T.A.Iida, M.Tanabe, L.W.Cary, K.F.Kuhlman, 第14回NMR討論会予稿集 (1975)

dithioerythrol 1mM, KCl 0.20M, glycerol 10%,  $MnCl_2$  10-20 $\mu$ M を用い、これに基質としての酢酸、プロピオン酸を加えた。いずれもGのCOO基を $^{13}C$ で enrich してある。

$^{13}C$ の緩和速度の測定は通常の  $180^\circ$ - $\tau$ - $90^\circ$ -Tパルスを用いる inversion recovery 法により、Varian XL-100-15 nmr 装置 (25.14 MHz) を用い 25-27 $^\circ$ C で測定した。水の $^1H$ の緩和速度は Jeol PFT-100 (100 MHz) にて測定した。

### 3. 実験結果

酵素を含む溶液の水の $^1H$ の緩和速度に与える常磁性効果  $1/T_{1\rho}^*$  は図1に示すように基質としての酢酸とプロピオン酸を加えてゆくと徐々に減少してゆく。この現象はAKの基質として作用しない  $\eta$ -酪酸セイン酪酸を加えても観測されない。式(1)で定義される  $E_b$  は基質濃度零のところで  $4.0 \pm 0.1$  の値をとり、基質濃度を増加させてゆくと一定値  $E_c$  に近づく、この  $E_c$  の値は酢酸では  $1.9 \pm 0.1$ 、プロピオン酸では  $2.3 \pm 0.1$  の値であった。

これらの値を式(2)に代入して  $1/(E_b - E^*)$  と  $1/[S]$  の関係をプロットすると図2に示すようにほぼよい直線関係が得られる。この直線の傾きより  $K_D$  が計算されるが、その結果を表Iに示す。表Iには Scrutton と Mildvan によって PRR の測定から得られた  $Mn(II)$ -acetate の  $K_D$  と同様の方法で得られた  $Mn(II)$ -propionate の  $K_D$  も同時に示してある。これらの binary complex の  $K_D$  はかなり大きいものに対して、AK-Mn-acetate と AK-Mn-propionate の ternary complex の  $K_D$  は約  $1/5$  に減少している。Anthony と Spector によって決定されたAKのそれぞれの基質に対する Michaelis 定数  $K_M$  も比較のために表Iに示してある。

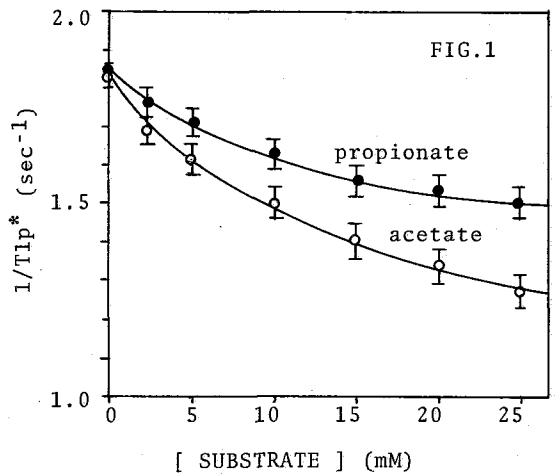
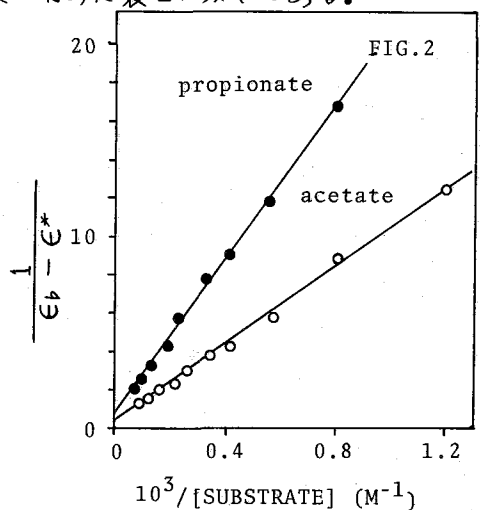


Table I : Comparison of the Dissociation Constants ( $K_D$ ) for Various Complexes Derived by Relaxation Rate of Water Protons and the Michaelis Constants ( $K_M$ ) for Acetate Kinase Determined by Kinetics Data

| Complex           | PRR Values $K_D$ (mM) | Substrate Kinetics Values $K_M$ (mM) |
|-------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Mn(II)-acetate    | 110 <sup>a</sup>      | —                                    |
| Mn(II)-propionate | 173                   | —                                    |
| AK-Mn-acetate     | 22                    | 20 <sup>b</sup>                      |
| AK-Mn-propionate  | 35                    | 32 <sup>b</sup>                      |

a) From Scrutton and Mildvan (1970)

b) From Anthony and Spector (1971)



2) A.S.Mildvan, M.Cohn, Advan. Enzymol., 33, 1 (1970)

3) A.S.Mildvan, et al, J. Biol. Chem., 241, 3488 (1966)

Table II  
 LONGITUDINAL ( $1/T_1$ ) RELAXATION RATE AND PARAMAGNETIC CONTRIBUTION  
 TO LONGITUDINAL ( $1/fT_{1p}$ ) AND TRANSVERSE ( $1/fT_{2p}$ ) RELAXATION RATES OF  
 THE METHYLENE CARBON-13 AND CARBOXYL CARBON-13 OF PROPIONATE  
 IN VARIOUS COMPLEXES AT 25.14 MHz

| Experiment | Propionate<br>1- <sup>13</sup> C and<br>2- <sup>13</sup> C<br>(mM) | MnCl <sub>2</sub><br>(μM) | Enzyme<br>(μM) | Divalent<br>Cations<br>(μM) | Methylene<br>- <sup>13</sup> C<br>T <sub>1</sub><br>sec | Carboxyl- <sup>13</sup> C |                                       |   |                        |   |
|------------|--|---------------------------|----------------|-----------------------------|---|---------------------------|---------------------------------------|---|------------------------|---|
|            |  |                           |                |                             |   | T <sub>1</sub><br>sec     | 1/T <sub>1</sub><br>sec <sup>-1</sup> | 1/fT <sub>1p</sub><br>sec <sup>-1</sup> | T <sub>2p</sub><br>sec | 1/fT <sub>1p</sub><br>sec <sup>-1</sup> |
| 1          | 100  |                           |                |                             | 7.9   | 36.0                      | 0.028                                 |   |                        |   |
| 2          | 100  | 47                        |                |                             | 4.6   | 6.0                       | 0.167                                 | 302                                     | 0.047                  | 45,400 ± 12,000                         |
| 3          | 109  |                           | 37             |                             | 7.4   | 34.0                      | 0.029                                 |   |                        |   |
| 4          | 102  | 15                        | 37             |                             | 5.1   | 8.1                       | 0.123                                 | 645                                     |                        |   |
| 5          | 98.5   | 20                        | 37             |                             | 5.4   | 6.1                       | 0.164                                 | 670                                     | 0.159                  | 31,400 ± 11,000                         |
| 6          | 100  | 18.5                      | 37             | HgCl <sub>2</sub> 11        | 6.7   | 17.2                      | 0.058                                 | 157                                     | 0.134                  | 37,100 ± 12,000                         |
| 7          | 103  |                           | 37             | MgCl <sub>2</sub> 43        | 7.7   | 35.0                      | 0.029                                 |   |                        |   |

表2にはプロピオン酸を基質としてAK-Mnに加えたときにプロピオン酸のCH<sub>2</sub>とCOO<sup>-</sup>の<sup>13</sup>C核の緩和速度がどのように変化するかを示した。表3には比較のために酢酸を基質として加えたときの酢酸のCOO<sup>-</sup>基の<sup>13</sup>C核の1/fT<sub>1p</sub>を示してある。表2と表3の1/fT<sub>1p</sub>を比較するとMn(II)-propionateとMn(II)-acetateの1/fT<sub>1p</sub>の値には大きな差はないが、AK-Mn-propionateとAK-Mn-acetateの1/fT<sub>1p</sub><sup>\*</sup>の値では前者の方がやや大きな値となっている。これらのternary complexのK<sub>D</sub>は表1に示したようにそれぞれ35 mMと22 mMであるので、AK-Mn-propionate, AK-Mn-acetate complexとして存在している割合は全体のAK-Mnの量に対して、それぞれ74.3%と83.3%となる。これらの値から補正された1/fT<sub>1p</sub><sup>\*</sup>の値はAK-Mn-propionateで895 sec<sup>-1</sup>で、AK-Mn-acetateで605 sec<sup>-1</sup>となり、前者の方が約1.5倍大きな値になる。これらの1/fT<sub>1p</sub><sup>\*</sup>の値と前報で

Table III: Longitudinal ( $1/T_1$ ) Relaxation Rate and Paramagnetic Contributions to Longitudinal ( $1/fT_{1p}$ ) and Transverse ( $1/fT_{2p}$ ) Relaxation Rates of the Carboxyl Carbon Atom of Acetate in Various Complexes at 25.14 MHz.

| Experiment | Acetate-1- <sup>13</sup> C<br>(mM) | MnCl <sub>2</sub><br>(μM) | Enzyme<br>(μM) | Divalent<br>Cation<br>(μM) | Carboxyl- <sup>13</sup> C (sec <sup>-1</sup> ) |                    |                    |
|------------|------------------------------------|---------------------------|----------------|----------------------------|--|--------------------|--------------------|
|            |                                    |                           |                |                            | 1/T <sub>1</sub>                               | 1/fT <sub>1p</sub> | 1/fT <sub>2p</sub> |
| 1          | 108                                |                           |                |                            | 0.019  |                    |                    |
| 2          | 100                                |                           | 37             |                            | 0.024  |                    |                    |
| 3          | 98.2                               | 40.0                      |                |                            | 0.152  | 328                | 80,000 ± 7,500     |
| 4          | 100                                | 12.5                      | 37             |                            | 0.088  | 514                |                    |
| 5          | 100                                | 18.5                      | 37             |                            | 0.115  | 493                | 33,800 ± 3,100     |
| 6          | 100                                | 20.0                      | 37             |                            | 0.125  | 505                |                    |
| 7          | 100                                | 18.5                      | 37             | HgCl <sub>2</sub> 11       | 0.049  | 136                | 40,500 ± 7,200     |
| 8          | 100                                |                           | 37             | MgCl <sub>2</sub> 35       | 0.025  |                    |                    |

$$f = \frac{[\text{常磁性イオンを含む酵素のモル数}]}{[\text{基質のモル数}]}$$

4) R.S. Anthony, L.B. Spector, J. Biol. Chem., 246, 6129 (1971)

5) M.C. Scrutton, A.S. Mildvan, Arch. Bio. Biophys., 140, 131 (1970)

報告した AK-Mn-acetate の ternary complex の相関時間  $\tau_c$  を使って、Solomon-Bloembergen の式から得られるプロピオン酸の  $^{13}\text{C}=\text{O}$  から  $\text{Mn}^{2+}$  までの距離と、同様にして得られた酢酸の  $^{13}\text{C}=\text{O}$  から  $\text{Mn}^{2+}$  までの距離を表4に示した。これからわかるようにプロピオン酸のカルボキシル基の  $^{13}\text{C}$  核の方が酢酸のカルボキシル基の  $^{13}\text{C}$  核よりも  $\text{Mn}^{2+}$  へ  $0.5 \pm 0.15 \text{ \AA}$  だけ近くなっている。

Table IV : Distances between the Bound Manganese and the Carboxyl Carbon Atom of Substrates in the Ternary Complexes.

| Complex          | Distances( $\text{\AA}$ ) from Mn(II) to Carboxyl Carbon Atom |
|------------------|---|
| AK-Mn-acetate    | $7.95 \pm 0.14$   |
| AK-Mn-propionate | $7.47 \pm 0.15$   |

#### 4. 考察

アセテートキナーゼ (AK) の酵素反応速度の研究の結果酢酸はプロピオン酸よりも10倍近く速い反応速度でリン酸化されることわかっている。AKは  $n$ -酪酸 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ) もイソ酪酸も基質とすることができない。このような kinetics で得られている結果とこの研究の結果からどのように説明できるかを考察してみよう。水の  $^1\text{H}$  核の緩和速度を測定することによって得られた解離定数  $K_D$  の値は酢酸で  $22 \text{ mM}$ 、プロピオン酸で  $35 \text{ mM}$  で ternary complex を形成している割合はそれぞれ  $83.3\%$ 、 $74.3\%$  となり、両者に大きな差がない。一方酢酸とプロピオン酸のカルボキシル基の  $^{13}\text{C}$  核の緩和速度の常磁性効果はむしろプロピオン酸の方が1.5倍近く大きくなり、プロピオン酸のカルボキシル基の方が、 $\text{Mn}^{2+}$  に近いところに位置していることが示唆されている。前報で緩和速度の周波数依存性より決定された相関時間<sup>1)</sup>と  $1/\tau_{\text{TP}}$  の値を用いて計算された  $\text{Mn(II)} \cdots ^{13}\text{C}=\text{O}$  の距離は表4に示したようにプロピオン酸のカルボキシル基は酢酸のそれより  $0.5 \text{ \AA}$  ばかり  $\text{Mn}$  に近くなっている。そこで  $\text{COO}^-$  が  $\text{Mn}$  により近くなっているプロピオン酸の方が酢酸にくらべて反応速度が  $1/10$  なの理由を考えてみると図3に示すような活性複合体のコンフォメーションを提出することができる。まず酵素の活性中心には  $\text{CH}_3$  基と結合する site A が存在し、これが  $\text{C}_3$  の  $\text{CH}_3$  をつかまえている。さらに  $\text{COO}^-$  基も酵素の site B に配位していると考えられるので、酵素によって ATP よりもち込まれた  $\text{PO}_4^{2-}$  に分子的接触する確率は  $\text{CH}_2$  基がもっとも高い。反応の速度は  $\text{PO}_4^{2-}$  からの速度で  $\text{COO}^-$  と結合するかで決まるので、プロピオン酸の場合反応が遅いと考えられる。酢酸はこれにくらべて  $\text{CH}_3$  基がつかまえられるのは同じ位置であるとするれば、図3の  $\text{C}_2$  の位置が  $\text{COO}^-$  基になり、これは  $\text{PO}_4^{2-}$  と直接分子的接触をすることができるので反応は速く進行すると考えられる。さらに今後は酢酸およびプロピオン酸の  $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2$  の  $^1\text{H}$  の緩和速度を測定し、この酵素を示す興味ある基質特異性について研究を進めてゆきたいと考えている。

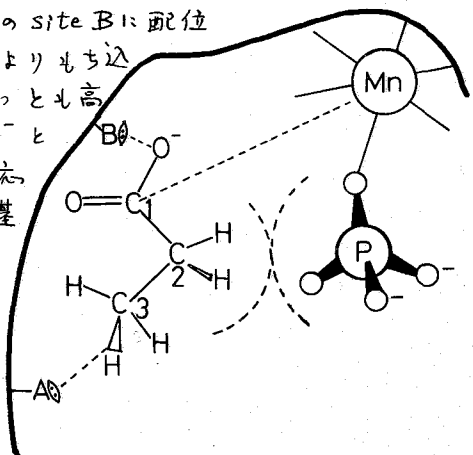


図3 アセトキナーゼ-Mn<sup>2+</sup>-プロピオン酸の活性複合体のコンフォメーション

謝辞：この研究に種々便宜をばかて下さった Stanford Res. Institute の Dr. M. TANABE に感謝します。

(京府医大) 西川弘恭, 吉崎知男, 山田誠二, 亘 弘, 北里宏

(序) 細胞膜は種々のリン脂質とタンパク質で構成され、これらが膜表面に負の電荷を与えている。一方細胞内外には種々の陽イオンが存在し、これらが膜表面の負電荷と相互作用していることは電気生理学的手法によって間接的に認められている。中でも $\text{Na}^+$ イオンは生体組織中に多量に存在し、しかも細胞内外でその濃度を異にし、細胞外により多く存在する。さらに神経細胞などの興奮膜においては活動電位および静止電位の発生など重要な役割を占めていることは言うまでもない。しかし $\text{Na}^+$ イオンと細胞膜との相互作用の分子論的解明はいまだ行われていない。

生体組織中の $\text{Na}^+$ イオンの存在状態を認識するのに非破壊的手法としてのNMR法が最適であり、種々の $\text{Na}^+$ イオンの存在状態における定量までが検討されるようになってきた。しかし、 $^{23}\text{Na}$ は $\frac{3}{2}$ の核スピン量子数を持ち、電気四重極モーメントがNMRの緩和に影響する。すなわち、Zeeman項のシフトのため線中や信号強度が影響を受けるために $^{23}\text{Na}$ のNMR測定に困難な点があった。Hubbard(1), Bull(2)やBerendsenら(3)は電気四重極モーメントの存在が $^{23}\text{Na}$ の $T_1$ と $T_2$ にそれぞれ2つ存在することを理論的に示した。 $\text{Na}$ 型イオン交換樹脂でBerendsenとEdzes(3)は2つの $T_1$ と1つの $T_2$ を観察し、生体組織でCope(5)およびBerendsenとEdzes(3)は1つの $T_1$ と2つの $T_2$ を観察した。福見と藤原(4)はセ-RNAで1つの $T_1$ を得た。信号強度について生体組織でCope(5)は試料中の $^{23}\text{Na}$ 含有量から期待される強度の30-50%であると報告し、ShporerとCivan(6)はリノール酸 $\text{Na}$ 懸濁液で $^{23}\text{Na}$ 含有量から期待される強度の34-39%がcentral bandとして検出され、さらにこれより5 KHzはなれた両側にsatellite bandを観察している。JardetzkyとWertz(7)はイオン交換樹脂浮遊液で樹脂量の増加とともに信号強度が減少するとのべている。BerendsenとEdzes( )はイオン交換樹脂で $^{23}\text{Na}$ 含有量の10 $\pm$ 7%の信号強度を得た。金沢と亀井(8)はステアリン酸 $\text{Na}$ で化学シフト、半値中と信号強度を検討している。

このように $^{23}\text{Na}$ のNMRによる測定結果について測定者によりまた試料の種類により、信号強度や $T_1$ と $T_2$ について観察結果が大きく異っている。生体の $^{23}\text{Na}$ にNMRを適用する場合の問題点として、次のようにあげられる。(a)  $\omega_0 T_c \gg 1$ を満足する $T_c$ をもつ状態の $^{23}\text{Na}$ は2つの $T_1$ と $T_2$ をもつが、 $\omega_0 T_c \ll 1$ では $T_1$ と $T_2$ は1つとなる。したがって試料中の $^{23}\text{Na}$ の $T_c$ を検討するのに、 $T_1$ と $T_2$ の測定を温度を変化させて行い解析する必要がある。(b) CW-NMRではrf field( $H_1$ )の強さによる飽和が問題となるが、パルスNMRでは問題とする必要はない。(c) 装置面での問題として、速い緩和をもつ $^{23}\text{Na}$ の場合90°-パルス後データのサンプリング開始までの遅延時間が信号強度に影響する。(d) 試料中の $^{23}\text{Na}$ の種々の存在状態向での交換時間が速い場合は1つの緩和を生じ、遅い場合は各々状態の緩和が観測される。これらの問題について $\text{Na}$ 型イオン交換樹脂とリノール酸 $\text{Na}$ 懸濁液を用いて検討し、生体試料ではヒト赤血球とザリガニ神経束における $\text{Na}$ の存在状態の解析を行ったので報告

にしがわひろやす, よしざきかずお, やまだせいじ, わたりひろし, きたさとひろし



する。

〔方法〕 陰イオン交換樹脂を10%塩酸で活性化し、蒸留水で過剰の塩酸を除いた後、一部は10%塩化ナトリウム溶液で、他は5%塩化ナトリウムと5%塩化カリウムを含んだ溶液で平衡させ、蒸留水で洗浄し、十分沈下したNa型イオン交換樹脂を試料とした。これら試料中の $^{23}\text{Na}$ 濃度を蛍光光度計で測定するとそれぞれ1.9Eq/Lと0.9Eq/Lであった。NMR試料管( $\phi=10\text{mm}$ )への充てん量は1mlである。

リノール酸ナトリウム懸濁液はリノール酸1g、これと等モルの水酸化ナトリウムと10mlの蒸留水または6mlの蒸留水とを十分攪拌したものを試料とした。10ml蒸留水の試料のNa濃度は300mEq/Lであった。試料は10mm $\phi$ NMR試料管に1ml充てんした。

ヒト赤血球の試料は採血直後血漿の除去のため生理的食塩水で十分洗い、次にNa free 燐酸緩衝液(pH7.3)で洗い、その後速心沈澱して、ヘマトクリット値94%のものを1ml 10mm $\phi$ 試料管に充てんした。

ザリガニより神経束を取出し、Harreveld液に浮遊させたものを使用した。

装置はパルス-FT NMR spectrometer (JNM-PS-100)を用いた。測定は $^{13}\text{C}$ 用プローブで磁場を21304ガウスに下げ、24MHzで行った。ロックはexternal $^2\text{D}$ ロックを使用した。 $T_1$ は $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ パルス系列を用い、 $T_2$ は $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$ パルス系列を用いた。試料の温度はJNM-VT-3 $\text{C}$ 温度可変装置を用いて制御した。

(結果と考察)

1) Na型イオン交換樹脂浮遊液とリノール酸Na懸濁液の $T_1$ と $T_2$ およびそれらの温度変化

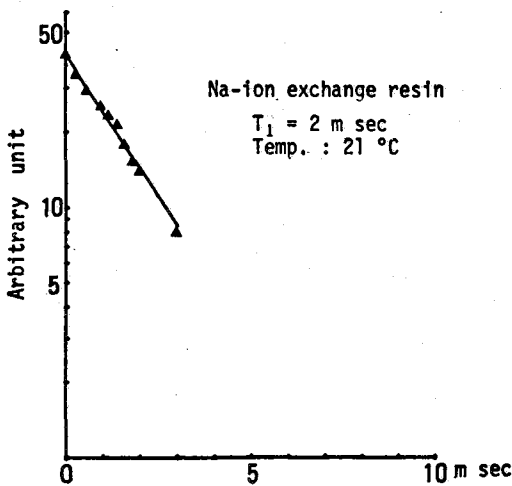


図1. Na型イオン交換樹脂の $T_1$ 測定  
 $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ パルス系列を使用

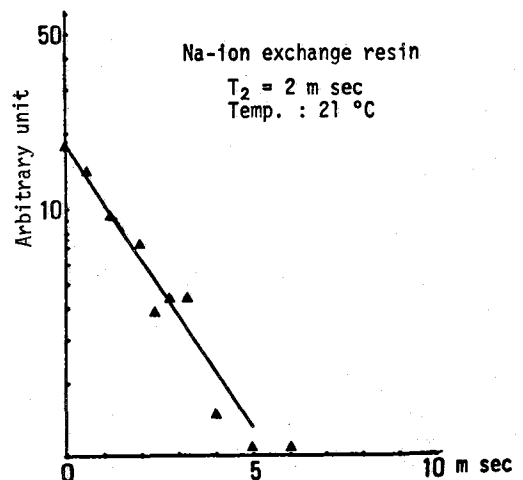


図2. Na型イオン交換樹脂の $T_2$ 測定  
 $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$ パルス系列使用

Na型イオン交換樹脂浮遊液とリノール酸Na懸濁液中のNaの $T_1$ と $T_2$ を測定したものを図1, 2, 3および4に示す。これらはすべて1成分より成立っている。次に $T_1$ と $T_2$ の測定を $10^\circ\text{C}$ より $80^\circ\text{C}$ まで温度を変えて行い、 $T_1$ と $T_2$ に対し絶対温度の逆数でプロットし、図5と6に示す。両試料とも同一温度に対しほぼ同じ $T_1$ と $T_2$ を示し、かつ温度の上昇と共に減少している。理論的には $I = \frac{1}{2}$ でも $\omega^2\tau^2 \ll 1$ では $T_1$ と $T_2$ は絶対温度の逆数とも目盛った時単

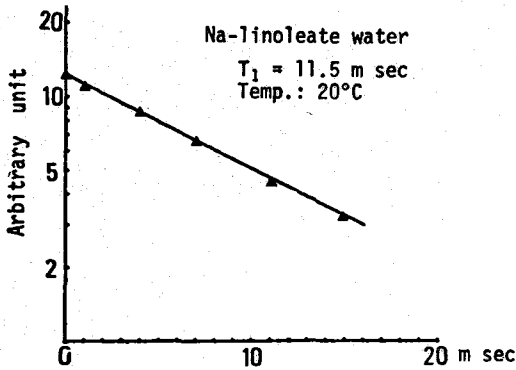


図3. リノール酸ナトリウムの  $T_1$  測定

リノール酸1gと等モルのNaOHを10mlの蒸溜水に懸濁。180°-90°パルス系列使用

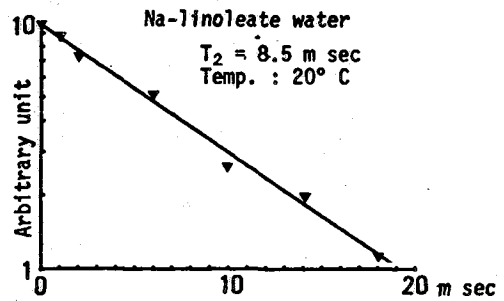


図4. リノール酸ナトリウムの  $T_2$  測定  
90°-180°パルス系列使用

減衰であり、かつ1成分よりなることを考慮すると、Na型イオン交換樹脂浮遊液とリノール酸Na懸濁液中のNaは  $W_0^2 \tau_c^2 \ll 1$  の関係にある  $\tau_c$  をもつといえる。

2)自由透過減衰(FID)とスペクトルによるNaの定量  
a) FIDの初期値とNa濃度

Cope (5)は塩化ナトリウム溶液でFIDを求め、そのGaussianプロットし、パルス後の時間を零に外挿して得られる初期値は試料

中のNa濃度と直線関係にあることを示した。我々は同様の試料でFIDの対数を時間についてプロットし、Na濃度と時間零に外挿した値とは直線関係にある結果を得た。(図7)

Na型イオン交換樹脂浮遊液とリノール酸Na懸濁液についてFIDの初期値を求め、図7を用いて試料中のNa濃度を求めた値と蛍光光度計で測定したNa濃度はよく一致しFIDの初期値では試料中のNaを100%検出していることを示している。

b)スペクトル面積とNa濃度

前述したように塩化ナトリウム溶液、リノール酸Na懸濁液とNa型イオン交換樹脂でFIDの初期値は試料中のNa濃度に比例する。故にフーリエ変換したスペクトル面積と濃度は直線関係にあるはずである。しかし、Na型イオン交換樹脂中のNaのように緩知の速いものではFIDの90°パルス後のsampling delay timeを大きくするとスペクトル面積は当然小

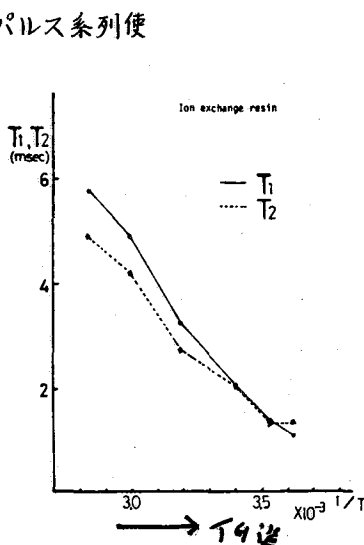


図5. Na型イオン交換樹脂中のNaの  $T_1$  および  $T_2$  と絶対温度の逆数との関係。

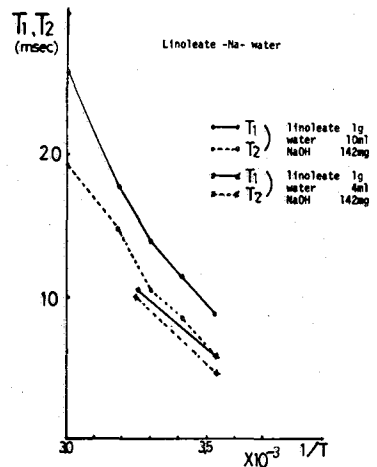


図6. リノール酸Na懸濁液中のNaの  $T_1$  および  $T_2$  と絶対温度の逆数との関係

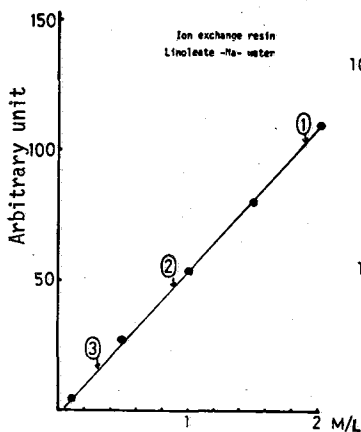


図7. 各種Na濃度とFID初期値との関係

• は塩化ナトリウム溶液(1M) ①は1.9Eq/L ②は0.9Eq/LのNa型イオン交換樹脂 ③は300mEq/Lのリノール酸Na.

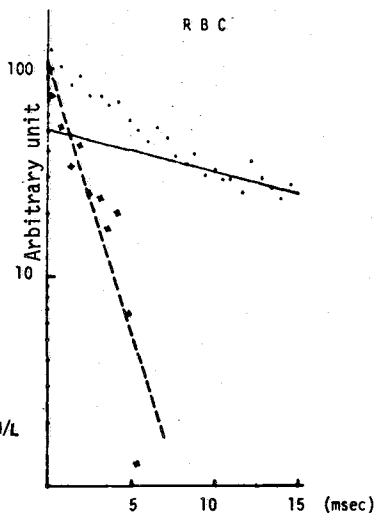


図8. 赤血球浮遊液のFID

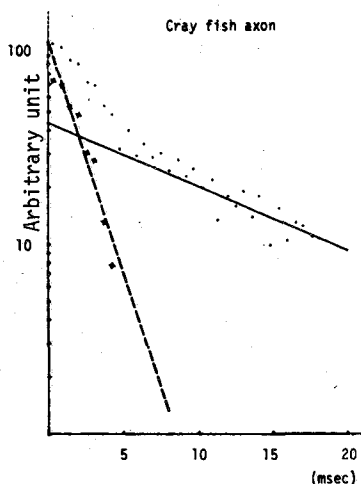


図9. サリガニ神経束のFID

さくなるがこれを確認した。

3) 生体試料中のNa. a) 赤血球浮遊液

FIDの対数を時間についてプロットしたものを図8に示す。このFIDは $T_2^*$ が3msecと8msecの2成分より成る。同一試料に $Ca^{++}$ イオンを加えると速い減衰成分が減少すること、イオン交換樹脂やリノール酸Naの例で $\omega^2\tau_c^2 \ll 1$ であることから、電気四重極モーメントにより $T_2$ が2成分になっているのではない。早い減衰成分は膜と相互作用したNa、遅いものは赤血球内のヘモグロビンと相互作用したNaであると推定できる。両成分の分画比と試料の蛍光分析による濃度から速い成分は約500mM/Lでこれは Boltzmannの法則から求められる膜表面近傍のNa濃度によく一致する。

b) サリガニ神経束

サリガニ神経のFIDの対数を時間に対してプロットすると $T_2^* = 1.2 \text{ msec}$ と $12 \text{ msec}$ の2成分が求まる。(図9) 同一試料に $Ca^{++}$ または $Li^+$ を加えると速い緩和をもつ成分が減少し、遅い成分の $T_2^*$ はHarreveld溶液のそれにほぼ等しいことから速い成分は神経細胞膜の膜表面の負電荷と相互作用しているNaの分画と考えてよいであろう。

## 文献

1. P.S. Hubbard, J. Chemical Physics, 53, 3, 985-987 (1970)
2. T.E. Bull, J. Magnetic Resonance, 8, 344-353 (1970)
3. H.J.C. Berendsen and H.T. Edzes, Annals New York Academy of Sciences, 204, 459-480 (1973)
4. 福見俊夫, 藤原鎮男, 才12回NMR討論講演要旨集 p207~209 (1973)
5. F.W. Cope, Biophysical J., 10, 843-858 (1970)
6. M. Shporer and M.M. Civan, Biophysical J., 12, 114-122 (1972)
7. O. Jardetzky and J.E. Wertz, J. Am. Chem. Soci., 82, 318-323 (1960)
8. 金沢洋子, 亀井裕孟 才12回NMR討論講演要旨集 p144~147 (1973)

(国立がんセンター研)〇斎藤 肇, 大木豊和, 佐々木政彦

## (1) はじめに

多糖ゲルの構造研究は, その生物学的意義からみて重要であるが, 研究手段の制限もあって十分進んでいない。ゲル構造は当然構成する高分子のコンホメーションと密接な関係があるが, ここで取りあげた(1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -D-グルカンのコンホメーション, 特に水溶液, ゲルでの構造については全くわかっていない。昨年のNMR討論会で演者らは, 分岐(1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -D-グルカンのゲル中でのコンホメーション研究に $^{13}\text{C}$ NMR法が有効な武器になり得ること示した。今回取りあげたのは, 側鎖をもたないCurdlan-type Poly-saccharide 13140で,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)以外の結合を全くふくまず, その他の(1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -D-グルカンであり laminaran や pachyman にくらべてコンホメーション研究に最もすぐれたグルカンである。この多糖は水には全く溶解せず, サスペンションを55 $^{\circ}\text{C}$ 以上に加熱すると弾性ゲルが生成する。小川ら<sup>2)</sup>は, ORD, 比旋光度, 複屈折, 粘度, コンゴレツドとの相互作用の研究から, 0.19M NaOH以下のアルカリ濃度で ordered コンホメーションが存在することと指摘している。また重合度25以下ではランダムコイル状態にあることを示した。

演者らは, 弾性ゲルで線巾150 Hzの中広い $^{13}\text{C}$ シグナルを観測し, 一本鎖のヘリックスに由来することを明らかにすることができたので報告する。また NaOH 添加によるヘリックス・コイル転移を観測し,  $T_1$ ,  $T_2$ , NOEとの関係と調べた。

## (2) 実験方法

$^{13}\text{C}$ NMRの測定は, 日本電子 PFT-100/EC-100 スペクトロメータによる。 $^{13}\text{C}$ 化学シフトは外部基準のTMSシグナルから求めた。多糖類の $T_1$ は150 msec以下でありため, 90 $^{\circ}$ パルス, パルスくり返し時間0.7 secで通常の測定を行った。NOEの測定はゲート・デカップリング法によるピーク強度比の測定による。

## (3) 実験結果と考察

A. ヘリックス構造

図1(B)に示すように, PS-13140弾性ゲルの $^{13}\text{C}$ スペクトルは(A)に示すランダムコイルと3 Fraction II (PS-13140の酸分解生成物, 分子量2000)に比べて, きわめてブロードである。いうまでもなく, Fraction IIのピーク位置は laminaran に一致する。図2(A)の水中でのサスペンション状態に比べて, 加熱して得られた弾性ゲル中のピーク強度は5倍に増加していることから, このピークはゲル構造に由来することは明らかにである。さらに, 低分子化合物に由来する可能性を消滅するために, ultrafiltrationで分子量10,000以下を除去しても全くピーク強度に変化はみられず。明らかに, 弾性ゲルの $^{13}\text{C}$

さいとう・はじめ, ちあき・とよかず, ささき・たくま

B. PS 13140 (RESILIENT GEL)

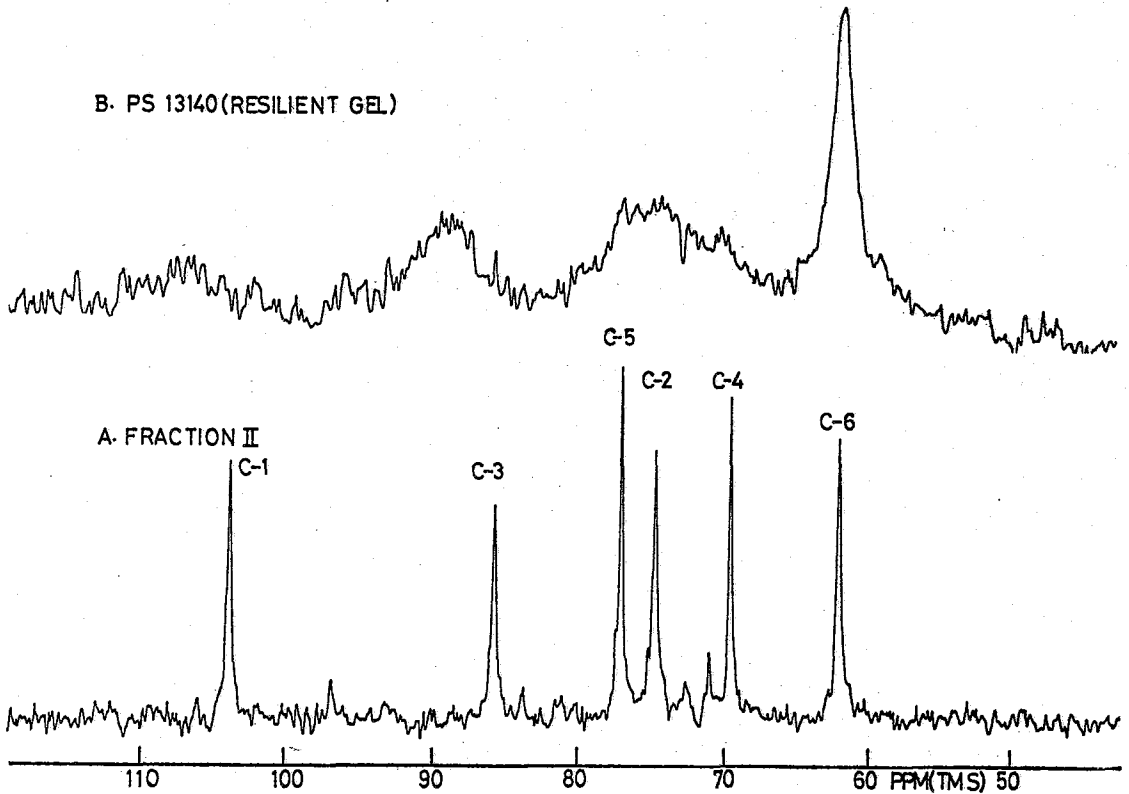
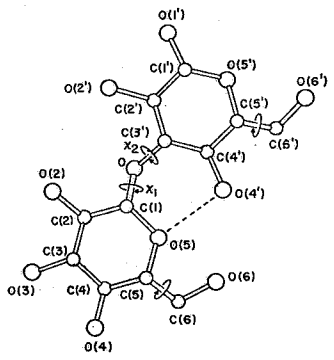


図1. PS-13140 (弾性ゲル) (B) および Fraction II (A) の<sup>13</sup>Cスペクトル (80,000回積算)

スペクトルは、C1, C3ピークとも Fraction IIにくらべて低磁場側にシフトしており、その値は、それぞれ2.8, 3.0 ppmである。0.9 ppmの低磁場シフトを与えC4を除き、C2, C5, C6に関しては全く変化が認められない。グルコシド結合にあるC1, C3のみがこのような特異的なシフト変化がみられるのは、明らかにC1-O, C3-Oの内部回転がゲル構造をとる場合に制限されることによるもので、実際 Jeffrey, Popleらによるモデル ab initio計算でコンホマーの内部回転に応じて0.01 Å程度の結合距離が変化し得るという。これは当然化学シフト変化に対応し得るはずである。このようなシフト変化は最近 Colson らによって、C-O結合の内部回転が許されないシクロデキストリン糖のC1 および C4 (この場合はα(1→4)結合)の<sup>13</sup>Cシフトがアミロースにくらべて、それぞれ1.6-2.0, 2.9 ppm低磁場シフトすることが報告されており、われわれの結果と一致する。理論計算にもとづく(1→3)-β-D-グルカンコンホマーシオンは、右まき、左まきのヘリックスが安定形として示唆されており、弾性ゲルの<sup>13</sup>Cピークはヘリックス構造に由来する可能性がきわめて大きいことがわかる。ヘリックスを伴った場合、隣接残基向の分子内水素結合の存在が重要で、計算では02...02' または04'...05'の水素結合

が示唆されている。しかし、最近の笹井らの laminaribiose の単結晶 X 線回折の実験では、O4<sup>+</sup>...O5 水素結合のみが存在し得ることである。C4 炭素の弾性ゲルにおける低磁場シフト 0.9 ppm は、上記の水素結合の存在に対応して、C4<sup>+</sup>-O4<sup>-</sup>-H<sup>+</sup>...O5 で表わされる分極効果によるものと考えられる。PS 13140 ゲル中での O4...O5 水素結合は右まきのヘリックスに対応する。



弾性ゲルの<sup>13</sup>Cピークはヘリックス構造に由来すること以上に示したが、ランダムコイル構造と異なり棒状の分子形をとるヘリックスではセグメント運動の mobility を著しく減少させることが期待される。表 1 に示すように、弾性ゲル中の<sup>13</sup>C

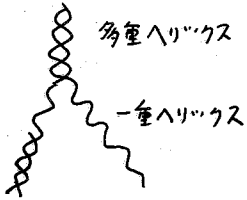
表 1. PS-13140 における T<sub>1</sub><sup>a</sup>, 線巾 (T<sub>2</sub>)<sup>b</sup>, NOE<sup>c</sup>

|    | ヘリックス          |                      |     |                      |     |                      | ランダムコイル |                |                      |         |                      |     |
|----|----------------|----------------------|-----|----------------------|-----|----------------------|---------|----------------|----------------------|---------|----------------------|-----|
|    | 弾性ゲル           |                      |     | 0.06 M NaOH          |     | 0.19 M NaOH          |         | 0.22 M NaOH    |                      | DMSO 溶液 |                      |     |
|    | T <sub>1</sub> | 線巾 (T <sub>2</sub> ) | NOE | 線巾 (T <sub>2</sub> ) | NOE | 線巾 (T <sub>2</sub> ) | NOE     | T <sub>1</sub> | 線巾 (T <sub>2</sub> ) | NOE     | T <sub>1</sub>       | NOE |
| C1 | 86             | 172 (1.9)            | 1.0 | 161 (2.0)            | 1.2 | 167 (1.9)            | 1.3     | 76             | 14 (23)              | 1.5     | 77 (44) <sup>d</sup> | 1.4 |
| C2 | 84             |                      | 1.4 |                      | 1.3 |                      | 1.5     | 78             | 15 (21)              | 1.4     | 73 (48)              | 1.5 |
| C3 | 76             | 156 (2.0)            | 1.2 | 167 (1.9)            | 1.3 | 183 (1.7)            | 1.3     | 84             | 14 (23)              | 1.4     | 85 (46)              | 1.4 |
| C4 |                |                      |     |                      |     |                      |         | 80             | 15 (21)              | 1.5     | 80 (52)              | 1.3 |
| C5 | 84             |                      | 1.4 |                      | 1.3 |                      | 1.5     | 83             | 14 (23)              | 1.3     | 84 (50)              | 1.4 |
| C6 | 62             | 50 (6.4)             | 1.4 | 50 (6.4)             | 1.8 | 53 (6.0)             | 1.6     | 54             | 17 (19)              | 1.9     | 57 (40)              | 1.7 |

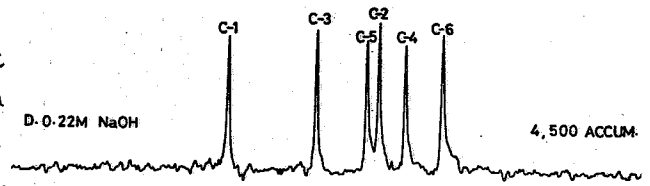
a) in msec, b) in Hz, c) in msec d. at 15 MHz

アの線巾は、CH<sub>2</sub>OH の内部回転をとり得る C6 を除き、約 150 Hz である。後者のベロランダムコイル構造の線巾 ~15 Hz にくらべて 10 倍の線巾である。T<sub>1</sub>, NOE, T<sub>2</sub> から、ヘリックス構造のセグメント運動の相関時間を求めると、それぞれ 2.3 or 0.63, 7.3, 120 nsec になる。T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> から得られる相関時間に著しい差があるのは、Schaefer が指摘しているように単一の相関時間の記述が不十分で、多数の相関時間の分布が存在し、特に slow motion が T<sub>2</sub> に反映するであろう。log-χ<sup>2</sup> 分布で分布関数 F<sup>(p)</sup>(s), log-time scale s: F<sup>(p)</sup>(s) = (ps)<sup>p-1</sup> e<sup>-ps</sup> p / Γ(p), s = log<sub>b</sub>(1 + (b-1)R/T) から、平均相関時間  $\bar{\tau}$  を求めると、T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, NOE からそれぞれ 30, 23, 50 nsec (p=20, b=1000) が得られた。

しかし、図 1 の<sup>13</sup>C スペクトルはゲル中の構成炭素すべてを観測しているわけでは無い。Fraction II と PS-13140 の混合ゲルでは、Fraction II がゲルを構成せず、すくじといピークを与える。これから、現在観測しているピークほどのくらいが推定でき、60-75% 程度 NMR-Visible であると結論できる。残りの 25-40% が観測されておらず、L-carageenan, コラーゲンの多重ヘリックスが<sup>13</sup>C NMR で観測できないことから右図

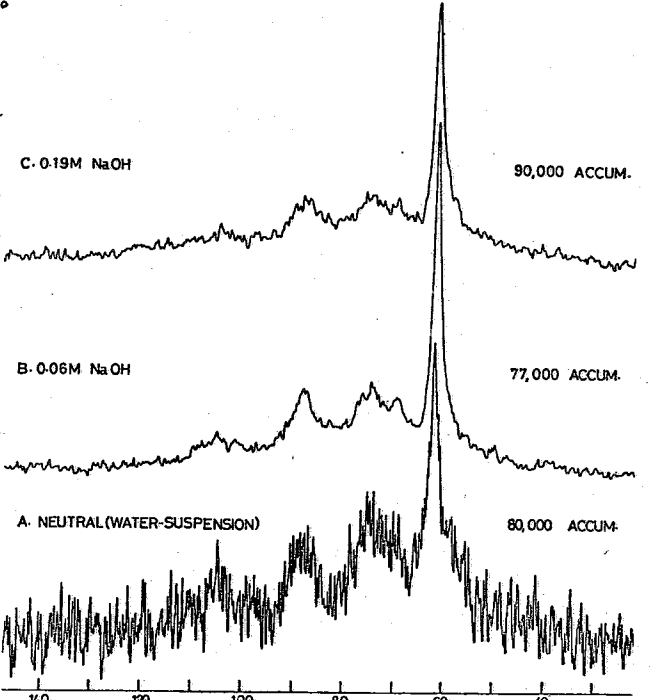


の多重ヘリックスの JUNCTION ZONE に帰着できる。現在問題にしているピークは一本鎖ヘリックスに帰着されるが、このように多量に存在することは、ゲルの弾力性との関係で興味深い。



B. ヘリックス・コイル転移

PS 13140 のサスペンションにアルカリを加えていくと、弾性を示さないものの、0.19 M までほきわめて高粘度で、弾性ゲルとほとんど変わらないスペクトルを与える。しかし、0.22 M NaOH では、ランダムコイル状態に変化し線幅が著しく小さくなる。この線幅の変化は、小川らの<sup>2)</sup>コンゴレッドとの相互作用、粘度、ORD、セ光光度変化と一致している。さらにこの<sup>13</sup>C NMR の変化は、可逆的の 0.22 M から逆に中和していくとヘリックス構造に近づくブロードピークが見られる。



ヘリックス・コイル転移にもかう  $T_1$ ,  $T_2$ , NOE の変化は表 1 にまとめられた。一見してわかるように線幅 ( $T_2$ ) の変化ほど、 $T_1$ , NOE 変化は顕著ではない。特に  $T_1$  はヘリックス、ランダム・コイル構造ともほとんど変わっていない。

図 2. PS-13140 の <sup>13</sup>C NMR とコンホメーション変化。

これは、一つにはランダムコイルにおいても Casu らが DMSO 溶液の フロトン NMR にて研究で指摘しているように、フレキシブルなランダムコイルでは多く短いヘリックスからなる rigid なあり残りとして、相関時間の分布において特に slow な運動が  $T_2$  に影響を与えているものの、fast component はヘリックス・コイルともあまり変わっていないことによるであろう。

<sup>13</sup>C 化学シフト変化は、C1, C3 とランダムコイル状態とそれぞれ 1.7, 1.1 ppm 高磁場シフトを示している。ランダムコイルと laminaran の PD 変化は、C1, C3 と PD 10.5-12.9 (中値 11.8) で著しい値磁場シフトがみられるのにくらべて対照的である。アルカリ添加によるピーク強度の変化が小さく、このヘリックス・コイル転移は cooperative である。

り青藤, 吉岡, 福岡, 第 14 回 NMR 討論会講演要旨集, 2) K. Ogawa, et al. Carbohydr. Res. 23, 399 (1972), 29, 397 (1973), 3) Cam et al, Tetrahedron. 22, 3061 (1966) 謝辞. 本研究にあたってご討論いただきました 阪大 厚田教授, 笠井教授, 試料提供いただいた 武田薬品工業 (株) に感謝申し上げます。





第 3 日

10 月 27 日 (水)





2. 栗工大 (1967 ~ 現在)

通称は20年程前までは白木が、この人の紀事にしたし、NMRは昔から10年とい  
いのときもついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
紀事はついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
す通称はついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
墓石の陰にたつてついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで

1968年12月60MHzの装置の研究室をつかちました。人々の条件が  
永井、神戸西柳町の法科大学院生、佐藤、井上と他の諸氏とあり環境はむづか  
しがたが大学総会がこの年より始り、1970年頃までつづいた。大学に来たのは紀事をつ  
ていついつのうちにたつてついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
今年と10年ほどついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
理結果は関係してついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
Rの分光法はついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
物にはついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
同様についでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
きついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで

生物化学のついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
のついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
のついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで

このついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
のついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
のついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで

ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで  
ついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついでついで



(東工試) 中山 本 修、 柳沢 勝

(1)  $^{13}\text{C}$  の核磁気緩和は主として C-H の双極子相互作用 (DD) によるものであるが、その他にスピン回転 (SR) 相互作用、スカラー (SC) 相互作用、化学シフトの異方性 (CS) による緩和の発現が知られている。特に小さな対称性の良い分子では SR の機構がかなり大きな役割を果たすことがすでに指摘されているが、プロトンを含む分子では C-H の DD 機構にマスクされて、SR の寄与を正確に見極めることは困難である。これに対し重水素化合物では D の磁気回転比が小さいために DD の寄与は  $(\gamma_D/\gamma_H)^2 \approx 0.02$  に減少することから予想されるので、 $^{13}\text{C}$  の緩和に SR が相対的に重要性を増し、従って SR の寄与を正確に見極めることができると考えられる。

本講演においては  $\text{C}_6\text{D}_6$  の  $^{13}\text{C}$  核磁気緩和を測定し、SR の寄与を見極め、得られた  $T_1^{\text{SR}}$  からベンゼンの anisotropic reorientation に関する知見を得る結果について報告する。

(2)  $^{13}\text{C}$  緩和時間の測定はウリアン XL-100-15 (25.2 MHz) および NV-14 (15.1 MHz) スペクトロメータにより、通常の  $180^\circ - \tau - 90^\circ$  パルス法により、 $\text{C}_6\text{D}_6$  の融点 (約  $4^\circ\text{C}$ ) から沸点 (約  $80^\circ\text{C}$ ) までの範囲内において行なった。25.2 MHz では D を T からフルシビル状態で測定を行なったが、15.1 MHz では T からフルシビルで測定した。後者の場合には D を分裂した 3本のシグナルの平均を取りこれを  $M_{\text{H}}$  の値とした。 $^{13}\text{C}$  の緩和時間の測定は 15.4 MHz にあり、また  $\text{C}_6\text{H}_6$  の  $^{13}\text{C}$  の緩和時間の測定は 25.2 MHz にあり ( $^1\text{H}$  を T からフルシビル) XL-100-15 により行なった。すべての場合 lock 用の物質を混入しているため、 $^1\text{H}$  の外部 lock を使用した。NV-14 の場合には  $\text{C}_6\text{D}_6$  の DE lock シグナルに用いた。温度は較正した銅-コンスタンタン熱電対により測定した。温度の測定精度は約  $\pm 1^\circ\text{C}$  である。

試料は市販の  $\text{C}_6\text{D}_6$  をそのまま使用したが、試料管に封入する時は十分注意して高真空系により少くとも 5 回以上の脱酸素操作を行なった。また 100 秒前後の  $T_1$  を測定するためにコイル部分での物質の migration を防止するために特殊な試料管を使用した。

(3) 測定結果を図 1 に示す。  $\log(T_1)$  と  $1/T_1$  に対してプロットした場合、 $\text{C}_6\text{D}_6$  の D の  $T_1$  ( $T_1^{\text{D}}$ ) はよい近似で直線に乗る。  $T_1^{\text{D}}$  は

$$T_1^{\text{D}} = 30.39 \exp(- (1.80 \pm 0.09) (\text{Kcal/mol}) / RT) \quad (1)$$

で表わされ、この値は今までの文献値と略々一致している。

これに対し  $\text{C}_6\text{H}_6$  の  $^{13}\text{C}$  の  $T_1$  は、温度と共に長くなるが、その割合は  $T_1^{\text{D}}$  よりも少なく、また  $\log(T_1) - 1/T_1$  のプロットは直線にならない。このことは明らかに SR の寄与が関与していることを示している。SR の寄与の割合は NOE を測定することにより、或

りともとある、やむを得ない。

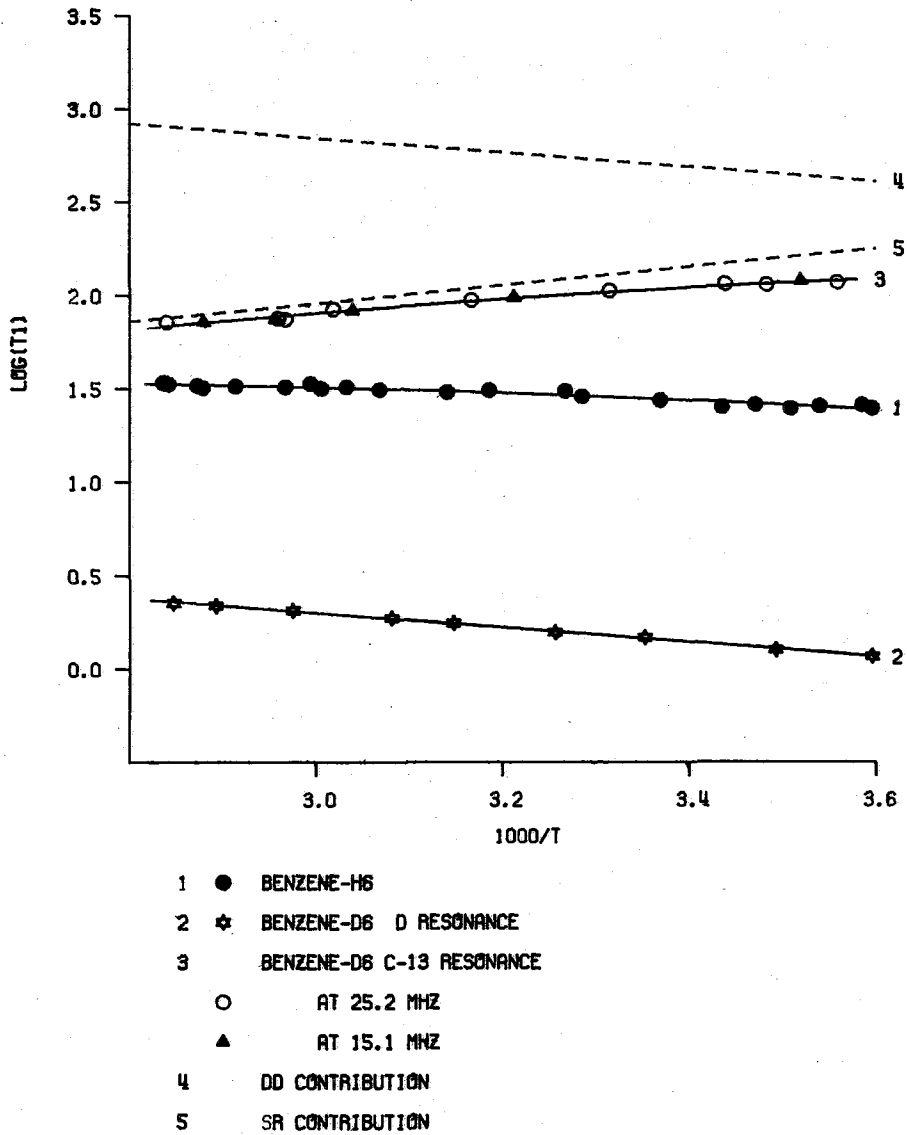


図1  $C_6D_6$  および  $C_6H_6$  の  $^{13}C$ ,  $^2D$ ,  $^{13}C(C_6H_6)$  緩和時間

程度の見積りを行なうことができる。この点に関し実験を現在行なっているところである。一方  $C_6D_6$  の  $^{13}C$  の緩和時間  $T_1^C$  は明らかに温度の上昇に伴って減少し、このことは SR が主な機構となっていることを示している。また 25.2 MHz での測定値と

15.1 MHz の測定値を同一曲線上に乗せていることは、CS の寄与がほとんどないことを示している。C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> において D の SC による効果はほとんど考えられぬから

$$\frac{1}{T_1^C} = \frac{1}{T_1^{DD}} + \frac{1}{T_1^{SR}} \quad (2)$$

と置く(これを仮定)。D の緩和機構はほとんどが四極子緩和であり、D の四極子モーメントの主軸と C-D の DD 相互作用の軸とは共に C-D の結合軸の方向を向いているために同じ相関時間  $\tau_c$  が使われるから、 $T_1^{DD}$  および  $T_1^D$  は次のように表される。

$$\frac{1}{T_1^D} = \frac{3}{8} \left(1 + \frac{7}{3}\right) \left(\frac{e^2 Q q}{h}\right)^2 \tau_c = 4.8367 \times 10^{11} \tau_c \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1^{DD}} &= \gamma_c^2 \gamma_D^2 \hbar^2 S(S+1) \left\{ \frac{J^{(0)}}{12} + \frac{3}{2} J^{(1)} + \frac{3}{4} J^{(2)} \right\} / r_{CD}^6 \times \tau_c \\ &= 1.3914 \times 10^9 \tau_c \quad (4) \end{aligned}$$

こゝに  $\frac{e^2 Q q}{h} = 180.7 \text{ KHz}$ ,  $\gamma = 0.041$ ,  $r_{CD} = 1.085 \text{ \AA}$ ,  $S=1$  である。従って  $T_1^C$ ,  $T_1^D$  の測定値から  $T_1^{SR}$  を求めたことができた。

以上の操作の結果得られた  $T_1^{SR}$  と  $T_1^{DD}$  とを図 1 の直線によって示した。  $\log(T_1^{SR})$  と  $1/T_1$  のプロットはかなり良い近似で直線を示す。  $T_1^{SR}$  の式(式(7))の中に含まれた  $kT$  の項は無視してアレ=ラスプロットを行なった。

$$T_1^{SR} = 3992 \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad (5)$$

で表される。図 1 からわかるように、C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> の <sup>13</sup>C 緩和は、特に高温側において SR がほとんど支配的である。

次に diffusional reorientation の場合、ベンゼンのような対称コマ分子に対しては  $\tau_c$  はその対称軸に対して平行及び垂直な成分  $\tau_{\parallel}$ ,  $\tau_{\perp}$  と次のような関係をもっている。(1)

$$\tau_c = \frac{\tau_{\perp}}{4} + \frac{9\tau_{\parallel}\tau_{\perp}}{4\tau_{\parallel} + 8\tau_{\perp}} \quad \text{但し } \tau_{\perp} > \tau_{\parallel} \quad (6)$$

ベンゼンにおける anisotropic reorientation を記述するたぐいは  $\tau_{\parallel}$ ,  $\tau_{\perp}$  の両方が必要であるが、現在  $\tau_c$  の値は測定できず、 $\tau_{\parallel}$ ,  $\tau_{\perp}$  を決定することはできない。一方ラマン散乱のデータから  $\tau_{\perp}$  が求められた。(2) これを利用して  $\tau_{\parallel}$  を計算すると表 1 のようになる。一方スピンの回転緩和時間  $T_1^{SR}$  は次式で表される。(3)

$$\frac{1}{T_1^{SR}} = \frac{2kT}{3\hbar^2} 4\pi^2 [g_{\parallel}^2 C_{\parallel}^2 \tau_{\parallel}^{SR} + 2g_{\perp}^2 C_{\perp}^2 \tau_{\perp}^{SR}] \quad (7)$$

こゝに  $g$ ,  $C$ ,  $\tau^{SR}$  はそれぞれ軸に関する慣性モーメント、スピンの回転結合定数、およびスピンの回転の相関時間である。

diffusional to limit において  $\tau^{SR} = g/(6kT\tau_c)$  の関係により  $\tau^{SR}$  を求めたことができた。これは  $\tau_{\perp}^{SR}$  により成り立つと考えられた。(しかし後述でも述べるようにベンゼンの対称軸回りの運動は diffusional といふよりもむしろ inertial であるから、この式から求めたことはできない。運動が diffusional あるいは inertial であるかは Hurdness の  $\alpha$  値(5) から判定することができよう。



表 1

| $^{\circ}K$ | $T_{10}$ (sec) | $T_c$ (psec) | $T_{\perp}$ (psec) <sup>(a)</sup> | $T_{\parallel}$ (psec) <sup>(b)</sup> | $\chi_{\perp}$ | $\chi_{\parallel}$ | $T_{\perp}^{SR}$ (psec) <sup>(c)</sup> | $T_{\parallel}^{SR}$ (psec) <sup>(d)</sup> |
|-------------|----------------|--------------|-----------------------------------|---------------------------------------|----------------|--------------------|--|--|
| 287.7       | 1.30           | 1.59         | 3.8                               | 0.62                                  | 5.6            | 0.65               | 0.020                                  | 1.36                                       |
| 298.2       | 1.46           | 1.43         | 3.1                               | 0.64                                  | 4.7            | 0.68               | 0.024                                  | 1.22                                       |
| 329.7       | 1.94           | 1.06         | 2.1                               | 0.54                                  | 3.3            | 0.61               | 0.032                                  | 2.25                                       |

(a) 文献

(b) (6)式から計算

(c)  $T_{\perp}^{SR} = g_{\perp} / 6kT T_{\perp}$  (d) (7)式から計算

式(7)から  $T_{\parallel}^{SR}$  を求めるためにはスピントル相互作用定数  $C_{\parallel}$ ,  $C_{\perp}$  が必要である。この値は求めらることはないので、次のようにして見積りこくことができる。遊離したベンゼン分子の各成分は次式により  $C$  の関数で与えられる。(6, 7)

$$\begin{aligned} \sigma_{kk} &= \sigma_{dia} \quad_{kk} + \frac{e^2}{mc^2} \frac{\hbar}{4Mg_{\mu} \mu_N^2} C_{kk} g_{kk} \\ &= \sigma_{dia} \quad_{kk} + 0.779 C_{kk} g_{kk} \quad (13 \text{ C に 対 し}) \end{aligned} \quad (8)$$

ここで  $C_{kk}$  は  $KHz$  単位、 $g_{kk}$  は  $10^{-40} g \cdot cm^2$  単位である。 $^{13}C$  の  $C$  は分子線の実験から  $-32.59 \pm 0.15 KHz$  であり、これは分子の平均値である。(8)  $\sigma_{dia}$  は各分子であまり変わらないこと、ベンゼンと  $CO$  の化学シフト差が  $53.5 ppm$  であること、およびベンゼンにおける  $^{13}C$  の化学シフトの異方性が  $180 ppm$  であることを用いると、 $C_6D_6$  における  $C$  は

$$C_{\parallel} = -0.30 KHz, \quad C_{\perp} = -1.88 KHz$$

でありと見積られる。この値、および表1の  $T_{\perp}^{SR}$  の値を用いて式(7)から  $T_{\parallel}^{SR}$  を計算すれば、表1の最も粗くに与えられた値を得ることができる。

$T^{SR}$  はスピントル相互作用の相関時間であるから、非常に粗く考えれば回転が持続する時間と見ることが出来る。これに対し  $T_c$  は双極子相互作用または四極子相互作用が持続する時間、いゝ変之れは静止した状態が持続する時間と考えてよい。 $T_{\perp}$  と  $T_c$ 、および  $T_{\perp}^{SR}$  と  $T_c^{SR}$  を比較すれば、液体状態におけるベンゼンの運動は非常に異方性をもっていることがわかるが、このことは  $T^{SR}$  において非常に顕著である。 $T_{\perp}^{SR}$  は約1~2 psec 程度があるが、freerotor と考える場合1回転するに要する時間は  $\parallel$  方向では約5~6 psec、 $\perp$  方向ではその半分である。このことは液体中においてベンゼンは  $\parallel$  方向に  $90^{\circ} \sim 180^{\circ}$  くらいに回転を行なっていることを意味する。これは固体において  $\parallel$  方向に回転が非常に低温で始まることと一致している。

$T_{\perp}^{SR}$  は  $T_{\parallel}^{SR}$  に比べて約1桁小さいけれども、 $C_{\perp}$  が  $C_{\parallel}$  に比べて約1桁大きいために  $T_{\perp}^{SR}$  に対する寄与は  $\parallel$ ,  $\perp$  両方向でほぼ同等である。

文献 (1) D. R. Bauer, G. R. Alms, J. I. Brauman, and R. Pecora, *J. Chem. Phys.* **61**, 2255 (1974), (2) K. T. Gillen and J. E. Griffiths, *Chem. Phys. Lett.*, **17**, 359 (1972), (3) C. H. Wang, D. M. Grant, and J. R. Lygerla, Jr., *J. Chem. Phys.*, **55**, 4674 (1971), (4) F. S. Hubbard, *Phys. Rev.*, **131**, 1155 (1963), (5) W. T. Huntress Jr., *Advance Magnetic Resonance* **4**, p. (19). (6) T. E. Burke and S. I. Chan, *J. Mag. Resonance*, **2**, 120 (1970), (7) C. F. Schmidt, Jr. and S. I. Chan, *ibid.*, **5**, 151 (1971) (8) I. Dzjer, L. M. Crapo and N. F. Ramsey, *J. Chem. Phys.* **46**, 1945 (1967), (9) C. S. Yannoni and H. E. Bleich, *J. Chem. Phys.* **55**, 5406 (1971), M. G. Gibby et al., *Chem. Phys. Lett.* **16**, 286 (1972)

フリーラジカルを含んだ有機溶媒の緩和と分子運動

302

(京大理・京大工) 遠藤一夫・森島績・米沢貞次郎

序) 演者らは、従来の開級系-閉級系分子間の相互作用の研究の一環として、更に動的立場での研究を進展させてきた。今回は 総まとめとして パルスnmr法によって、フリーラジカルを含んだ溶媒プロトンの緩和時間の周波数依存性及び温度依存性を調べて、この系の相互作用の型や溶媒プロトンの緩和機構や分子運動についてを明確にする。

実験) 装置は、(手製のパルスnmr)と(Varian HR 220MHz nmrと Nicolet FT ユニット)と(BrukerのSXP4~100(阪大桐山研))と(マテック社のパルスnmr(京都産大))とを用いた。T<sub>1</sub>は(120°C, 90°)パルスシーケンス法で、T<sub>2</sub>はCPMG法で測定した。温度変化の測定は、HR 220MHz nmr及び手製のパルスnmrを用いた。試料はすべて精製して使用した。

結果及び考察

1. 緩和時間に対する関係式

有機溶媒分子とフリーラジカルとの相互作用は 次の様に分類される。

- ① no chemical interaction
- ② formation of a labile complex

①は Hubbard 理論によるもので 溶媒分子のプロトンが球形と仮定した溶媒分子とラジカル分子とが衝突して並進拡散によって緩和される場合で、②は Solomon-Bloembergen のモデルで、一つの弱い結合(水素結合)のコンプレックスを形成して揺動運動(或回転運動)している時の緩和機構である。①と②の場合の緩和時間は 核スピンと電子スピンの双極子相互作用の反発項と、スカラーカップリングによる項との和と考えられる。

$$1/T_1 = (1/T_{1HE})_{dip} + (1/T_{1HE})_{sc}, \dots etc.$$

| 溶媒 (°C)                                       | N/N <sub>0</sub> | T <sub>1</sub> (m sec) | T <sub>2</sub> (m sec) | T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> |      |
|---|------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------|------|
| CH <sub>3</sub> OD                            | 25.5             | 0.0132                 | 48.1                   | 43.0                           | 1.12 |
| C <sub>2</sub> D <sub>5</sub> OH              | 25.5             | 0.0044                 | 37.9                   | 32.0                           | 1.18 |
| C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>                 | 19.0             | 0.0135                 | 72.5                   | 62.5                           | 1.16 |
| CHCl <sub>3</sub>                             | 16.5             | 0.0055                 | 25.1                   | 21.0                           | 1.19 |
| C <sub>6</sub> D <sub>5</sub> NH <sub>2</sub> | 16.5             | 0.0057                 | 24.9                   | 21.5                           | 1.16 |
| (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO            | 19.0             | 0.0061                 | 16.7                   | 14.5                           | 1.15 |
| C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>                | 19.0             | 0.0165                 | 77.5                   | 66.2                           | 1.17 |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>               | 19.0             | 0.0029                 | 14.1                   | 11.9                           | 1.18 |

(<sup>1</sup>H 20MHz の測定)

「表 1」

予備実験として、この系(DT BNラジカルを含んだ溶媒)の溶媒分子のプロトンの T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub> が 1 に近いことが表 1 で示され、従って緩和時間の式とから考え合せるとこの系の緩和機構は双極子相互作用が主要なものであると結論される。そこで、

おえんどうがづねが、もりしまいさお、よおざわていじろう。

①, ②の理論式としては、双極子項だけを考えるとそれぞれ次のように導ける。

① no chemical interaction

$$(1/NT_1)_{theo} \simeq (1/N) (1/T_{1HE})_{dip} = (2\pi \gamma_H^2 \gamma_e^2 \hbar^2 T_d / 75 d^6) \{3J_d(0) + 7J_d(\omega_s)\}$$

∴  $J_d(\omega_s) = \frac{1}{2} I(U)$ , ①式

$$I(U) = U^{-5} [U^2 - 2 + e^{-U} \{ (U^2 - 2) \sin U + (U^2 + 4U + 2) \cos U \}]$$

$$U = |\omega_s T_d|^{1/2}$$

$T_d$ ; 並進拡散による相関時間

$d$ ; 溶媒のプロトン核とラジカル中心との最近接距離

$\omega_s$ ; 電子スピンのラーモア周波数。

② formation of a labile complex

$$(N_0/NT_1)_{theo} \simeq (N_0/N) (1/T_{1HE})_{dip} = (n \gamma_H^2 \gamma_e^2 \hbar^2 / 10 r^6) \{3J_d(0) + 7J_d(\omega_s)\}$$

∴  $J_d(\omega_s) = T_c / (1 + \omega_s^2 T_c^2)$ , ②式

$r$ ; 溶媒のプロトン核とラジカル中心との有効隔間距離

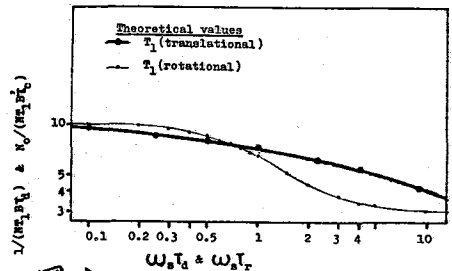
$T_c$ ; コンプレックスを作、て揺動運動している時の相関時間。

図1には①, ②の緩和速度に対する周波数変化を対数-対数プロットで表わした。①と②の相互作用が明らかに区別されることが見える。

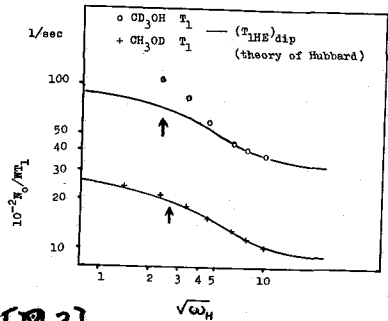
## 2. 周波数依存性の研究

溶媒分子として  $CH_3OD$ ,  $CD_3OH$ ,  $C_6H_6$ ,  $(CH_3)_2CO$ ,  $CHCl_3$ ,  $C_6D_5NH_2$  を常温で 5~220MHz までの周波数領域で  $T_1$  及び  $T_2$  を測定した。この結果は①式と②式の両方の理論値で解析された。例えば

図2, 3にはメタノールのプロトンの  $T_1$  について Hubbard 理論と Solomon-Bloembergen モデルで比較したもので、メチルプロトンは並進拡散が支配的であるのに対し、水酸基プロトンはラジカル分子と水素結合して、コンプレックスを作、て揺動運動している機構が支配的であることが示される。図4には、ベンゼンのプロトンの  $T_1$  について Hubbard の理論値と比較



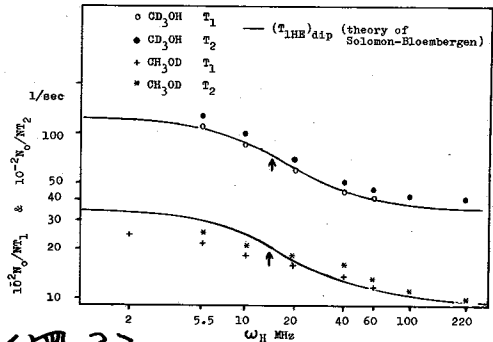
(図1)



(図2)

したもので、ベンゼンプロトンは並進拡散による緩和機構が支配的である。

従って「溶媒の中で比較的プロトン活性でないプロトンは(メタ)ルのメチルプロトン、ベンゼンプロトン、及びアセトンのメチルプロトン」  
 ④のHubbard理論に従い、つまりこのプロトン核は並進拡散によって支配的に緩和されている。④の場合の系については①式とT<sub>1</sub>の実測値とからω<sub>H</sub>T<sub>1</sub>によりT<sub>2</sub>を求め、dと共に表2に示した。



〔図3〕

〔表2〕 相関時間及び弛豫効果のプロトン核とラジカル中心との距離

| 溶媒 (°C)  | ( $\times 10^{-11}$ sec) | ( $\text{\AA}$ ) |
|--|--------------------------|------------------|
|  | $T_d$                    | $d$              |
| CH <sub>3</sub> OD (25.5)                            | 4.4 ± 0.6                | 3.6              |
| C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> (19.0)                 | 6.0 ± 1.0                | 3.8              |
| (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO (19.0)            | 4.5 ± 1.0                | 3.6              |
| CD <sub>3</sub> OH (25.5)                            |                          | 1.6 ± 0.4        |
| CHCl <sub>3</sub> (16.5)                             |                          | 2.0 ± 0.4        |
| C <sub>6</sub> D <sub>5</sub> NH <sub>2</sub> (16.5) |                          | 2.4*             |

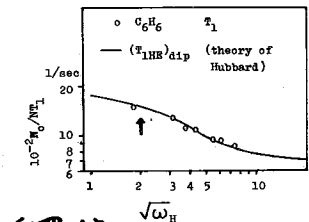
(\*は近似値)

プロトン、etc)はSolomon-Bloembergenのモデルに従い、溶媒プロトンはDTBNと支配的に水素結合していることを物語っている。この場合のT<sub>c</sub>及びrは表2に示した。

〔表3〕 回転相関時間及び化学交換速度

| 溶媒   | T <sub>r</sub>           | T <sub>e</sub>      |
|--|--------------------------|---------------------|
|  | ( $\times 10^{-11}$ sec) |                     |
| CD <sub>3</sub> OH (25.5°C)                            | 3                        | 4                   |
| CHCl <sub>3</sub> (16.5°C)                             | 6                        | 3                   |
| C <sub>6</sub> D <sub>5</sub> NH <sub>2</sub> (16.5°C) | 2.4                      | 2 × 10 <sup>2</sup> |

DTBNとの水素結合系におけるCD<sub>3</sub>OH、CHCl<sub>3</sub>及びC<sub>6</sub>D<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>のプロトンは



〔図4〕

又「溶媒の中で、プロトン活性なプロトン(メタ)ルのOHプロトン、CHCl<sub>3</sub>のプロトン、及びC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>のπ

更に、水素結合している時のコンプレックスの回転時間及びコンプレックスの寿命について求める為の厳密な緩和の式をもとめてみる。観測値からtotalのT<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>に対して、ω<sub>H</sub><sup>2</sup>T<sub>2</sub> << 1を満足する磁場中でのT<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>の逆数の差は、理論的に(T<sub>1</sub>)<sub>dip</sub> ≈ (T<sub>2</sub>)<sub>dip</sub>が与えるから、次式が得られる。

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)_{\text{obsd}} - \left(\frac{1}{T_1}\right)_{\text{obsd}} \approx \frac{1}{4} \frac{A_H^2 N_n \omega_H^2 T_c^2}{\tau^2 N_0 (1 + \omega_H^2 T_c^2)} \quad \text{③式}$$

(それぞれ  $\omega$  は  $2\pi \times 10^8$  が  $15, 12$  及  $10$  MHz であるから)  $5$  MHz の  $T_1, T_2$  の測定結果は③式を用いることができ、 $n=4$  を用いれば表3のようにならぬ。又  $1/\tau_c = 1/\tau_n + 1/\tau_e$  であるから回転時間も求めることができる。

以上フリーラジカルを含んだ有機溶媒の考慮される色々な相関時間は  $10^{-10} \sim 10^{-11}$  sec であり、並進拡散が双極的相互作用系での最近接距離  $d$  の値  $3.6 \sim 3.8 \text{ \AA}$  は、フンデルワールス半径などを用いた近似値  $\approx 3.8 \text{ \AA}$  によく一致している。又  $\text{CH}_3\text{OH} \cdots \text{DTBN}$  及び  $\text{CD}_3\text{OH} \cdots \text{DTBN}$  の水素結合距離として  $\text{OH} \cdots \text{O}$  は  $2 \text{ \AA}$ 、 $\text{CH} \cdots \text{O}$  は  $2.2 \text{ \AA}$  と  $5.25 \text{ \AA}$  なる。

### 3. 温度依存性の研究

相関数依存性の研究からフリーラジカルを含んだ溶媒プロトンの双極的結合機構が明らかになったので、プロトンの  $T_1$  の温度変化の測定を行い、 $T_d$  や  $\tau_c$  の温度プロットと巨視的な物理量である溶媒の粘性係数から得られる溶媒分子の並進拡散する時の相関時間の温度プロットと比較してみる。

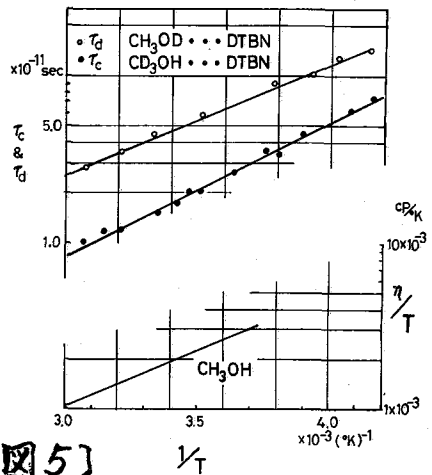
結局、比較的に活性でないプロトン(メチルメチルプロトン, ベンゼンプロトン, アセトンのメチルプロトン)の  $T_d$  の温度プロットは、粘性係数から得られるものと平行にならぬ(図5及び図6)ので、このフリーラジカルを含んだ溶媒プロトンは、溶媒分子自体の並進拡散の影響により複雑化していることが示された。又活性プロトンは、粘性係数からの温度プロットのものとは平行にならず、水素結合した相互作用が生じていることを示している。

最後に、室温における粘性係数から求めた相関時間を求め、 $n=4$  の  $T_d$  と比較してみる。

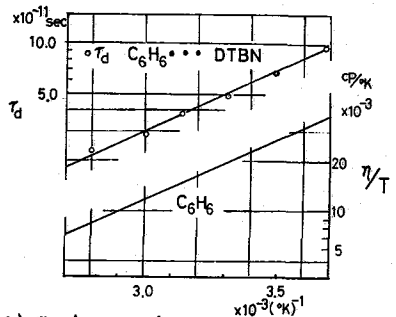
Stokes-Einstein の式は  $D = (kT/6\pi\eta a)$  なら  $T_d = (d^2/3(D_2 + D_3))$  を用いる。

$T_d = (2\pi\eta/kT) a_2 a_3 (a_2 + a_3)$  とおいて溶媒の粘性から並進拡散している時の相関時間が求まる。両方からの値は、共に剛体球モデルを仮定しているのにもかかわらず一致している。

(以上)



【図5】



【図6】

| 溶媒                     | $T_d$ ( $\times 10^{-11}$ sec) | $T_d$        |
|------------------------|--------------------------------|--------------|
| $\text{CH}_3\text{OH}$ | 4.5 (20°C)                     | 4.4 (25.5°C) |
| $\text{C}_6\text{H}_6$ | 3.4 (28°C)                     | 4.5 (29°C)   |
| $\text{C}_6\text{H}_6$ | 8.0 (20°C)                     | 6.0 (19°C)   |

1. 緒言

一般にFT-NMR法は、化学反応を含む動的現象を追跡するのに、始源系、生成系を含む系内に存在する全プロトンの共鳴を観測しうるので、動的過程解析に有利である。従来、この種の研究にCW法を用いた例はかなりあるが、化学シフト差から交換速度を求める場合を除いて、比較的遅い反応にのみ適用されている。CW法で速い反応を追跡する場合、掃引時間中に現象の変化があって好ましくなり。スペクトルの狭い部分のみを観測する場合は別として、広い範囲の変化を正確に観測することができない。

著者らは数秒のくり返し時間でNMRスペクトルを得ることが出来るH-FT-NMRに着目し、積算を行なう事なく、数秒程度の時定数を有する比較的速い反応を研究することを試みた。反応を連続的にオンラインで追跡するには大量の情報を貯える記憶媒体が必要である。本研究の目的には市販のフロッピーディスクドライブ(FD)が小型、低価格で、しかもかなり容量(3.2Mビット)を有するので適当と考え、H-FT-NMRにFDを接続する方式を採用し、これに必要なインターフェイスを試作した。

このシステムにより、ジメチルスルホキシド-d<sub>6</sub>(DMSO-d<sub>6</sub>)を溶媒とする2-フルアルデヒドと塩酸ヒドロキシルアミンの反応を研究し、生成物であるsyn-オキシムとanti-オキシムの生成速度を正確に求め、オキシムの異性体の生成比は、原料である2-フルアルデヒドの2種の異性体の比に等しいことを見出したので報告する。

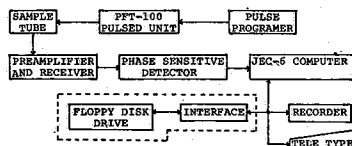
2. 実験

使用したNMR分光器は日本電子(株)製PS-100NMR分光器(100MHz)である。これにPFT-100パルスユニット, DP-1パルスプログラマー, JEC-6コンピュータ(16ビットx20ワード)を結合して使用した。又、FDはシュガート社製700A型を使用した。

2.2. 構成

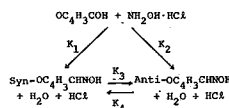
全体のブロック図を図1に示す。コントロールはオープンシステムである。DP-1は測定開始のトリガを出す。JEC-6はDP-1からのWAIT解除命令を受けた後、NMRからのフリーインダクションデイクイジングナル(FID)のサンプリングを開始する。今回新たに構成したのは実線で囲んだ部分であり、FIDのサンプリング後インターフェイスを介して高速度でFDに

Fig 1



転送できる様にした。この特別に設計、製作したインターフェイス回路は、JEC-6からFDへの転送速度を最高にするために、通常使用されているSECTORを使用せず、ディスク面のどこからでも転送開始可能とし、待ち時間が実質的に零となる様に設計されているので、4kワードのデータを通常の約1/10である0.5秒で転送できるという特徴を有する。ソフトウェアは日本電子(株)のJESFで組み、1回の実験について25個のFIDをサンプリングし、FDに転送できる様にした。パラメータのセットは全てテレタイプによる会話形式とし、付属のFDT-1フーリエ変換プログラムも使用できる。かくして必要な全パラメータをセットした後、NMRの試料管中で始源系の2液を混合することにより、反応を開始させ、同時にDP-1のハルススタートスイッチを押すことにより測定が開始される。このシステムはあらかじめ設定された反応中の各時刻のFIDを25個自動的にサンプリングしてFDに貯えた後、これを順次JEC-6に戻してフーリエ変換し、25個のスペクトルをうる。スペクトルの出力は、特定のスペクトルを1個ずつ出力することもできるし、又、連続式供給装置の付いているレューダに25個を連続的に出力することもできる。更に化学シフト等の解析は25スペクトル連続的に自動的に解析してテレタイプに出力することもできる。

Fig 2



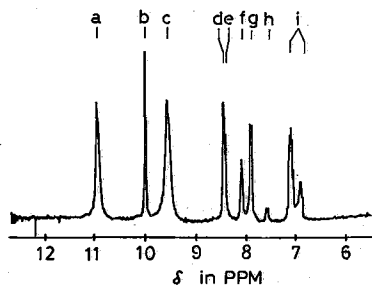
### 2. 3, 試料

使用した2-フルアルデヒドは東京化成(株)製試薬1級を使用直前に常法により精製して使用した。塩酸ヒドロキシルアミンは同じく東京化成(株)製試薬特級を、又、DMSO-d<sub>6</sub>はCEA France製をそのまま使用した。

### 2. 4, 実験

測定に必要な全パラメータをセットした後、0.86 ccのDMSO-d<sub>6</sub>に119 mg (0.0017 mol)塩酸ヒドロキシルアミンを溶解し、NMRアローブ中で、所定の温度に保ち、試料管を回転させ、NMRコントロールをONにする。これに所定の温度に保たれた2-フルアルデヒド0.14 cc (0.0017 mol)をテフロン管を介して注入する。混合が1秒で完了する事は前もって確認した。混合開始後1分経過してからハルスを送り測定を開始した。各ピークの内最も長いT<sub>2</sub>を与えるのは、60分の時のsyn-2-フルアルデヒドオキシムの5位のプロトンで149秒なのでハルスのくり返し時間はこの約4倍の1分とした。

Fig 3



### 3, 結果と考察

2-フルアルデヒドと塩酸ヒドロキシシロアミンの反応式を図2に示す。図3は反応の過程で観測したNMRスペクトルの一例を示す。各吸収ピーク又はピーク群に付した(a)~(i)の帰属は表1の第3欄に示した。この帰属に当たって別に合成したsynおよびanti-2-フルアルデヒドオキシムを用いると共に文献値を参考にした。

各ピーク又はピーク群の強度の各反応温度における経時変化を図4~図6に示す。60℃において(d)と(e)のピークが重なったので分離せず(d+e)としてプロットした。24℃においてsynとantiオキシム(e, h, f)が生成し、2-フルアルデヒド(b, d, g)が消費される様子が良くわかる。40℃においては(i)のピークが反応開始後35分付近から僅かに減少し鈍めており、かつ約20分経過後から(e)の増加速度より(h)の増加速度の方が大きくなる。この温度まで図中の各曲線の挙動に異常はなく、Beckmann転位は生じていないと考えられる。60℃になると(i)のピークの極大は反応開始後約10分付近にあり、(f)のピークの極大は約20分付近にある。このことはsyn↔antiの異性化により、(i)が減少し、ついでBeckmann転位によりオキシムが消費されるので(f)が減少するものと考えられる。つまり、Beckmann転位より異性化が優先するといえることを示している。1枚のスペクトルから反応を断片的に見た場合、Beckmann転位を特徴づける顕著な変化は観測されず、Beckmann転位を証拠づけることは困難であるが、オキシムの消費を表わすピーク(f)の減少等、各ピークの経時変化からBeckmann転位が生じているのが認められる。(i)のピークの極大は高温になる程左側にシフトし、(f)のピークは高温になることにより、極大が現われることも一見してわかる。又、60℃における(d+e)と(g)のピークが、約15分経過後以降(f)が減少しているのに増加しているのはBeckmann転位

Fig 4

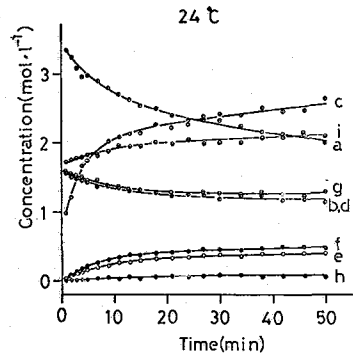


Fig 5

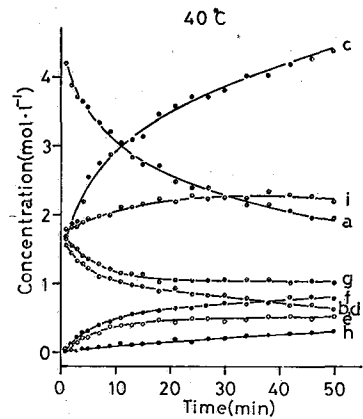
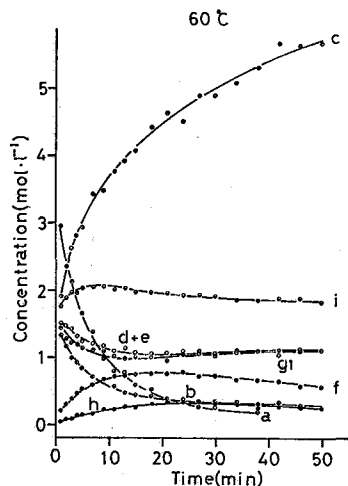


Fig 6

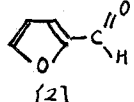
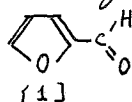




生成物と重なっているためである。本研究においては反応開始後10分以内は Beckmann 転位の影響を受けずにして反応速度定数を求めた。この反応系について  $k_1$  と  $k_2$  を区別して求めた例はなく、Jencks<sup>5)</sup> は水溶液中におけるフリーなヒドロキシルアミンの場合の1個の反応速度定数を求めたに止っている。

2-フルアルデヒドの構造に

ついて Dahlquist は -115.5°C における NMR の吸収線の形から [1] ⇌ [2] の平衡の研究を行ない、[1] と [2] の極小ポテンシャルの差が  $1.05 \pm 0.02$  kcal/mol であることを示した。これから 24°C における両回転異性体の存在比  $F_{[1]} \uparrow$



を計算すると [1]:[2] = 0.55:1.85 となる。全オキシムに対する *syn*-オキシムの量を時間に対してプロットしたものを図7に示す。*syn*の生成割合を時間0に外挿すると0.55となるが、これは2-フルアルデヒドの回転異性体の存在比に等しい。両者の比率が偶然一致したとは考え難く、[1]から[2]へは *syn*-オキシムが[2]から[1]へは *anti*-オキシムが生成した可能性が考えられる。ここで通常考えられているカルビノール

アミンの様な比較的安定な中間体を考えた場合、上記の可能性は少ないと考えられるが、Jencks<sup>5)</sup>も最近の報告で議論している様に会合錯体を形成していると考えれば上記の可能性は肯定的となる。前者の実験は DMSO 中で、塩化水素の存在下であり、脱水反応は早いと思われるので、2-フルアルデヒドの各回転異性体とヒドロキシルアミンが各回転異性体に対して2種類の会合を形成し、会合様式は不明であるが、これから脱水して各オキシムを生成したものと考えられる。

Table 1. The structure and chemical shifts at 24°C of three compounds\*\*

\*\*The assignment corresponds to alphabets in Fig.3. Double assignments are made for the unresolved peaks.

| Compound                                       | Species         | Assignment | Chemical Shift         |                   |
|--|-----------------|------------|------------------------|-------------------|
|  |                 |            | in DMSO-d <sub>6</sub> | in reaction mixt. |
| 2-Furaldehyde                                  | H <sub>1</sub>  | d          | 8.36                   | 8.42              |
|  | H <sub>2</sub>  | i          | 7.04                   | 7.10              |
|  | H <sub>3</sub>  | g          | 7.80                   | 7.88              |
|  | H <sub>4</sub>  | b          | 9.92                   | 9.97              |
| <i>s-trans</i> <i>syn</i> -2-Furaldehyde Oxime | H <sub>5</sub>  | f          | 8.03                   | 8.07              |
|  | H <sub>6</sub>  | i          | 6.84                   | 6.90              |
|  | H <sub>7</sub>  | i          | 6.99                   | 7.05              |
|  | H <sub>8</sub>  | e          | 8.31                   | 8.38              |
|  | H <sub>9</sub>  | a          | 11.55                  | 10.92             |
| <i>s-cis</i> <i>anti</i> -2-Furaldehyde Oxime  | H <sub>10</sub> | f          | 8.03                   | 8.07              |
|  | H <sub>11</sub> | i          | 6.91                   |                   |
|  | H <sub>12</sub> | h          | 7.51                   | 7.56              |
|  | H <sub>13</sub> | g          | 7.82                   | 7.90              |
|  | H <sub>14</sub> | a          | 12.11                  | 10.92             |

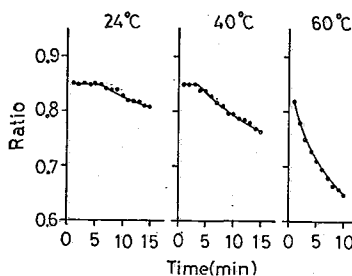


Table 2. Rate constants of product formation and isomerization at various temperature

| Temperature (°C) | Second Order Reaction X 10 <sup>4</sup> l mol <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> |                | First Order Reaction X 10 <sup>3</sup> sec <sup>-1</sup> |                |
|------------------|---|----------------|--|----------------|
|                  | K <sub>1</sub>  | K <sub>2</sub> | K <sub>3</sub>   | K <sub>4</sub> |
| 24               | 2.30  | 0.40           | 0.80   | 0.73           |
| 40               | 6.62  | 1.17           | 1.66   | 1.57           |
| 60               | 24.00   | 4.20           | 10.50  | 10.10          |

- 1) W. P. Jencks: J. Amer. Chem. Soc., 81, 475 (1959)
- 2) J. M. Sayer and W. P. Jencks: J. Amer. Chem. Soc., 95, 5637 (1973)

## 1. 緒言.

ポリ-*o*-ベンジル-L-グルタメート (PBLG) 液晶中の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Br}_2$  等の溶媒の分子運動が PBLG-溶媒相互作用により著しく束縛されたことは側島<sup>1)</sup>の <sup>1</sup>H-NMRの研究以来よく知られているがこのような系に第三の分子種を加え、その束縛状態における配向や分子運動に関する知見を得ることは興味深い。一方  $\alpha$ -クロロナフタレン ( $\alpha$ -ClNaph) 中で一定鎖長以上の *n*-パラフィンの  $\text{CH}_2$  プロトンシグナルが 2本観測されるという Liu の観測結果が比較的のべた状態の *n*-パラフィン分子の存在を仮定することにより理論的に説明されることを我々は既に報告した<sup>2)</sup>。ここでは二つの問題を関連させ、PBLG-*n*-パラフィン- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  三成分系における後二者の <sup>1</sup>H-NMRのデータより、この系における *n*-パラフィン分子及び溶媒分子の配向と分子運動を考察する。

## 2. 実験

PBLGは京大の中島幸夫教授から提供された平均重合度 3500のものを用いた。 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 及び *n*-パラフィン (*n*- $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$ , *n*- $\text{C}_{18}\text{H}_{38}$ , *n*- $\text{C}_{22}\text{H}_{46}$ ) は市販品をそのまま用いた。ポリマーを外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、次に *n*-パラフィン、溶媒の順に加え、試料管を熔封後注射器深く切った。測定は日本電子製 JNM-PS-100型分光器 (100 MHz) を用い、試料管をプローブ中に押し NMR 分光器の磁石で試料を配向させスピニングせず、適当な時間々隔で行なった。試料管の回転角度に対するスペクトルの依存性はプローブのスピナーと置いた円板により角度を定めて測定した。

## 3. 結果及び考察.

### 3.1. PBLG- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 二成分系.

*n*-パラフィンを含む PBLG- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  液晶系における  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  シグナルの時間依存性は多くの研究者により測定されており、そのシグナルがダブルレット分裂し、かつその間隔が時間と共に増加することが知られている。しかし本研究においては全体の傾向は彼らの結果と一致しているが初期においてシグナルはダブルレットが一度ブロードな一本となり、その後再びダブルレット分裂し、その間隔は時間と共に増加し一定値に漸近する (図 1)。初期におけるこの現象は系がコレステリックからネマチックに転移する過程で一度はランダムな状態を通過して再配向する過程を示していると考えられる。更にまたこの配向したと考えられる長時間後のダブルレットのピーク高さは等しくなく低磁場側の方が高磁場側より若干大きい。この傾向は *n*- $\text{C}_{22}\text{H}_{46}$  の添加により著しくなる。

### 3.2. PBLG-*n*-パラフィン- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 三成分系.

#### 3.2.1. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ シグナル.

*n*-パラフィンを含む系における  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  の線形とその時間依存性を *n*-パラフィンの濃度および炭素

あんどういさお ふじいゆうじ ひろいとある にしおがあつお たながひろし

数について検討した。先ず  $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$  の場合について濃度依存性を調べてみると、濃度が1%の系での分裂の時間依存性は、 $n$ -パラフィンを含まない系に似ているが同程度の配向に達するのにより長時間を要する。3%の系では初期に内側と外側の2つのダブルットが現われ前者の強度は時間と共に減少し約110分後には消失するが5%の系では1610分後でも消失しない(図2)。このような二組のダブルットから成る  $\text{CH}_2$  プロトンシグナルの出現については既に Orwoll<sup>5)</sup> が  $n$ -パラフィンを含まないこの系について報告しているがそれは、液晶の外部磁場に対する配向角の異なる二つの状態が一時的に現われることによるもので本実験のように十分長時間経過した後でも観測される二組のダブルットの存在は単純な配向角の差異だけでは説明し難く、二つの異なる状態の存在を示唆していると考えられる。しかし  $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$  の濃度が10%の高濃度の系での溶媒シグナルには3%と5%の系で観測された二状態は現われず初期においてダブルットが一度一重線になり、その後再びダブルットになり、定性的な傾向は0%や1%の場合と似ているが最終的な分裂が大きく、長時間を要する。これは明らかに3%や5%の傾向と異なっているが溶解性も内縁していると考えられる。次に  $n$ -パラフィンの炭素数に対する溶媒シグナルの依存性を濃度5%の場合について調べてみると  $n\text{-C}_{10}\text{H}_{22}$  の場合、長時間経過後もダブルットのピークが2本に分かれており  $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$  とは異なっている(図3)。これに対して  $n\text{-C}_{22}\text{H}_{46}$  の場合は  $n\text{-C}_{10}\text{H}_{22}$  とは異なり、 $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$  の傾向とむしろ近しいがダブルットの非対称性が著しく、ほぼ完全配向後ダブルットの低磁場側のピーク高さは高磁場側のそれの約2倍になるが各々の面積の等しいシグナルが得られる(図4)。十分配向が進んだと考えられる長時間後のシグナルが非対称なダブルットや二組のダブルットになるこの原因

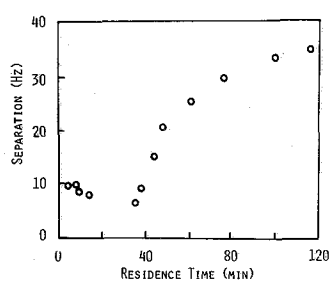


図 1.

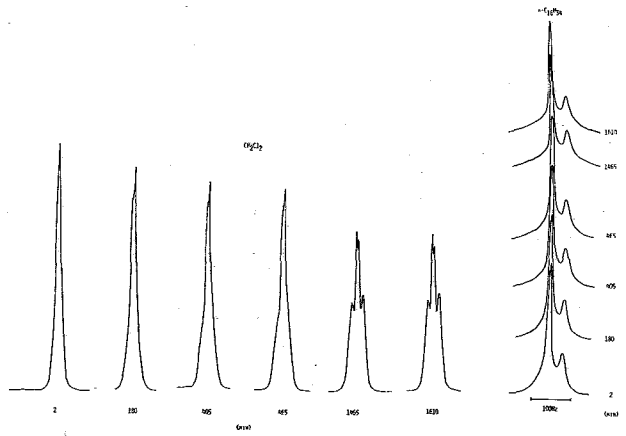


図 2.

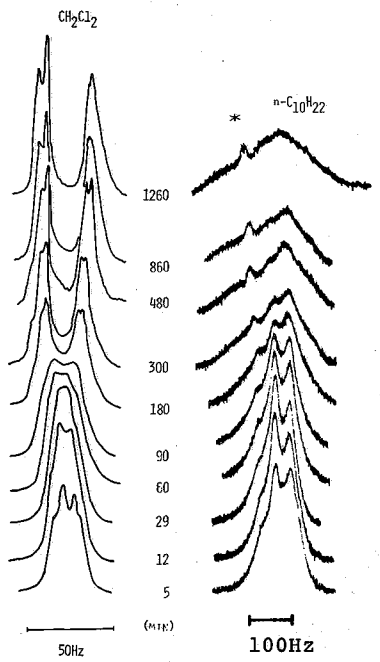


図 3. \*: impurities

として、ダブルレットの肩隔と化学シフトの異なる二つの環境が  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  分子のまわりが生じていることが考えられ、これが  $n$ -パラフィンへの添加により生じたと考えても不合理ではない。

### 3. 2. 2. $n$ -パラフィンシグナル

PBLG- $n$ -パラフィン- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  系の  $n$ -パラフィンシグナルの例を  $n\text{-C}_{10}\text{H}_{22}$ ,  $n\text{-C}_{22}\text{H}_{46}$  の場合について図3, 4に示す。全体としての特徴をあげると二本のピークを示し、初期にはやや強い低磁場側のピークは次第にブロードになり、配向が十分進んだ状態では全体が一つのブロードなシグナルになる。ここで特に興味のあることは、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  のダブルレットが一本になる時には  $n$ -パラフィンのシグナルの二本の分離はかなり良くなっていることで、配向が終った時、前者は分裂の大きなダブルレット、後者は分離できないブロードな一本になることで両者のシグナルの変化には相関があることがわかる。すなわち液晶の磁場中での配向に因って  $n$ -パラフィン分子も規則的な変化をうけており、 $n$ -パラフィン分子がランダムな運動をしているのではなく  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  分子の配向に相関をもった配向をしていることを示唆している。

PBLG- $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$ - $\text{CDCl}_3$  系における  $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$  のシグナルは  $\text{CH}_3$  基と  $\text{CH}_2$  基に相当するシグナルより成っており、後者は時間と共に非対称なシグナルを示す(図5)。これは  $d\text{-Cl}_2\text{Naph}$  溶液中での  $n$ -パラフィンの  $\text{CH}_2$  プロトンに因って観測されたものと似ており、この場合、液晶の配向は弱いが  $n$ -パラフィン分子はかなり伸ばった状態を一时的にしている可能性がある。

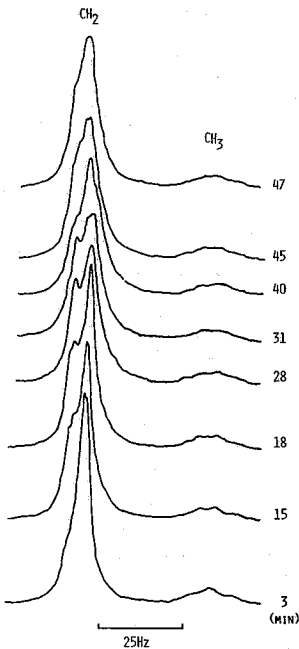


図5



図4

### 3. 3. 磁場方向に対するスペクトルの角度依存性

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  と  $n$ -パラフィンの  $\text{CH}_2$  のプロトン対の磁場に対する方向を知り、PBLG- $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$ - $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  系についてサンプル管の回転角に対する両シグナルの依存性を観測した(図6)。その結果  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  のダブルレットの肩隔は  $13\text{Cos}^2\theta - 1$  に比例することが判明した。このことは  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  分子のプロトン対の方向は PBLG のヘリックス軸と平行であり、磁場方向と一致していることを示している。

一方  $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$  のシグナルの形もまた  $\theta$  に依存している。すなわち  $\theta$  が増加すると共にブロードなシグナルは次第にシャープになり、二本のピークに分裂し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  のシグナルが重畳となる  $\theta \approx 55^\circ$  の時、最も鋭い二本のピークになる。このシフト差が約 0.4 ppm であることから高磁場では  $\text{CH}_3$  が、低磁場では

\* ; impurities

CH<sub>2</sub>が主として寄与するが、若干のブロードなシグナルが重なっている。このことは $\alpha$ -パラフィン分子の双極子相互作用による局部磁場がこの角度で見掛上ほとんど消失するいわゆる magic angle の効果があることを示している。すなわち CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>分子は PBLG 液晶中で配向していることはよく知られているが、この実験で第三成分として加えられた $\alpha$ -パラフィン分子はランダムな運動をしているのではなく特定の方向に優先的な配向をしていると考えられる。

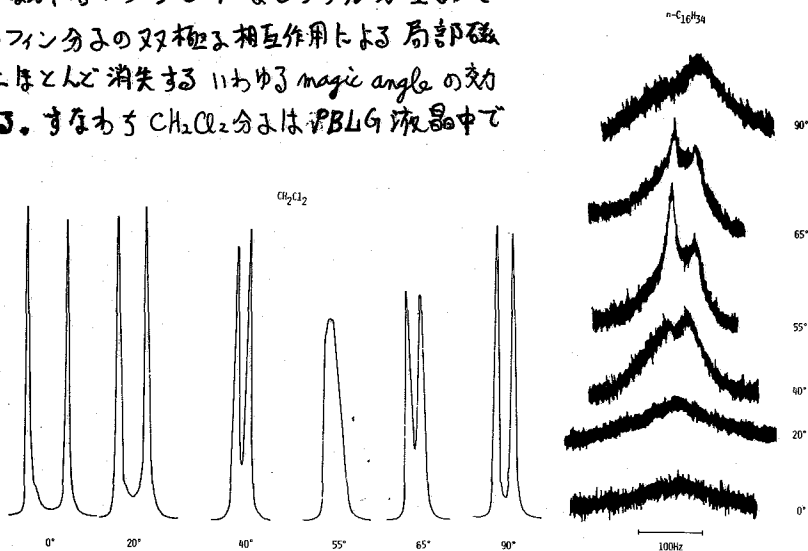


図 6.

### 3.4. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>シグナルの温度依存性.

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>のダブルレット

の肉隔は液晶溶液における CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>分子の運動性と密接に関係している。それ故 その肉隔の温度依存性からその系における CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>分子の運動の束縛に対する活性化エネルギーを求めることができる。我々は以下の Arrhenius の式を使用した。ここで  $S$  はダブルレットの肉隔 (Hz),

$$S = A \cdot \exp(\Delta E/RT)$$

$\Delta E$  は活性化エネルギー,  $T$  は絶対温度,  $R$  はガス定数,  $A$  は定数である。ln  $S$  vs.  $1/T$  のプロットから求めた  $\Delta E$  の値を表 1 に示す。明らかに  $\alpha$ -パラフィンを含む系の  $\Delta E$  はそれを含む系より小さい。但し室温における分裂肉隔は  $\alpha$ -パラフィンを含む場合 1 Hz 程度大きいが大差はない。

表 1

| サンプル  | $\Delta E^{**}$ |
|---|-----------------|
| PBLG(15)* - CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (85)  | 2.5             |
| PBLG(15) - $\alpha$ -C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> (1) - CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (84) | 1.6             |

\* 濃度: wt/vol

\*\* kcal/mol

### 参考文献

- 1) S. Sobajima, J. Phys. Soc. Japan, **23**, 1070 (1967)
- 2) I. Ando, A. Nishioka, Makromol. Chem., **160**, 145 (1972); **171**, 195 (1972)
- 3) R. D. Orwoll, R. L. Vold, J. Amer. Chem. Soc., **93**, 5335 (1971)

出光興産中研 佐藤和夫

## 1 はじめに

水が生体中で重要な役割を演じていることは広く認められていることである。このような水の役割を理解する一つの方向は、生体高分子などの生体構成物質と水分子との相互作用を明らかにすることであって、従来多くの研究者の興味の対象となり種々の手段を用いて検討されている。生きた生体そのものを対象にすることは理想的ではあるが、系がきわめて複雑になるため、多くの場合モデル的な系を取扱わざるを得なくなる。

本研究ではアガロースおよびゼラチンをモデル的な生体高分子としてとりあげた。パルス NMR によって、水および生体高分子のプロトンの  $T_1$ ,  $T_2$  を測定し、ブルーゲル転移に伴う水分子、生体高分子の動的挙動、相互作用を検討し興味ある結果が得られたので報告する。

アガロース、ゼラチン水溶液は  $30 \sim 50^\circ\text{C}$  で転移を起し、実験的に条件設定が容易であるため NMR によるいくつかの報告がなされているが、ほとんどが水分子の緩和に関する報告である。

## 2 実験

( $\text{H}_2\text{O}$ 系) アガロース、ゼラチンは和光純薬の試料であり、真空中で約一ヶ月間水分を除去した。水溶液は  $7\text{mm}$  径の NMR サンプル管中所定量の試料とイオン交換水で調製し、均一なゲルが得られるまで  $90^\circ\text{C}$  の恒温油槽中に保持した。試料調製後2日以内に測定を完了した。

( $\text{D}_2\text{O}$ 系) アガロース、ゼラチンには水と交換を起すプロトンが含まれているために、それぞれ約3%の  $\text{D}_2\text{O}$  溶液を調製し、約一ヶ月間真空中で溶媒を除去し、exchangeable proton をのぞいた試料を得た。これらの試料と  $\text{D}_2\text{O}$  (99.8%) から上記の方法で水溶液を調製した。

(NMR測定) 用いたパルス NMR は改良を加えた Bruker P-20 ( $^1\text{H}$ , 20 MHz) で、パルス幅  $5\ \mu\text{sec}$ 、回復時間  $4\ \mu\text{sec}$  である。  $T_1$  は通常の  $180^\circ\text{-T-}90^\circ$  パルス法、 $T_2$  は Carr-purcell (Meiboom-Gill) 法によった。  $180^\circ$  パルスのくりがえしは  $400\ \mu\text{sec}$  であった。

温度変化は NMR プログラム中で行い、低温側から高温側へ変化させた。指定温度に達した後約30分放置して測定を開始した。

## 3 結果と考察

水和 — 図1に  $20$  および  $95^\circ\text{C}$  から急激に  $-15$ ,  $-70^\circ\text{C}$  に凍結した場合の non-freezing water (NFW) の溶復濃度依存性を示す。NFW は水和状態にある水分子

さとうかお

であると考えられる。NFWに関してはまだいくつかの報告がなされている。<sup>1)</sup>  
 図からわかるように、ゲル状態から凍結したアガロースのオホ、ゾル状態から凍結した場合よりもより多くの水和を受けており、高次構造による水分子との相互作用の相違を反映している。また直線関係が得られていることから、検討した濃度範囲では水和の状態が同一であると判断できる。ちなみに水和分子数を求めると、ゲルアガロースではgrあたり0.85grの水和を受けている。これをくりかえし単位あたりに換算すると、約15個の水和分子数となる。ゾルアガロースではかなり小さく6個と見積られる。ゼラチンの水和はアガロースよりも小さい。

アガロース水溶液の  $T_{1,2}$  — 図2に水プロトンの緩和時間を示す。ゲル-ゾル転移に伴って  $T_2$  に大きな変化が見られる。特にゲル状態では  $T_2 \ll T_1$  であり、水分子の相関時間が単一のものではなく、大きな束縛を受けた成分が存在することから理解できる。30°C 近傍に  $T_2$  の極小がみられるが、これはすでに Derbyshire ら<sup>2)</sup> によって報告されており、bound phase にある水分子の lifetime が  $T_{2b}$  と同程度になったためと考えられる。水分子の緩和挙動に図1は Woessner-Zimmerman の phase model<sup>3)</sup> で議論したい。

D<sub>2</sub>O系でのアガロースの non-exchangable proton の緩和時間を図3に、FIDを図4に示す。  $T_1, T_2$  とともに転移の前後で明らかな変化が観測された。

ここで興味があることは、ゾル状態では凝磁化の回復が exponential で単一の  $T_1$  で表わされるが、ゲル状態では2つの  $T_1$  が観測されたことである。図4からゲル状態では、FIDの減衰が速い成分つまり solid like な成分が存在することからわかる。このような構造的なアガロース分子鎖間で形成されるヘリツクスめさらに凝集し、一つの Domain を形成したものと考えられる。この Domain が比較的大きなものであるため、mobile domain との間でのスピン拡散が充分起らず、2つの  $T_1$  が観測されたものと思われる。ゾル状態(95°C)では小さい Domain は FID から観測されなかった。

転移に伴って  $T_2$  に明らかな変化が見られ、60°C以上で新しい  $T_2$  成分が現われる。これらの結果をもとにゲル-ゾル転移に伴うアガロース分子鎖のコンフォメーションの変化を考察する。

ゼラチン水溶液の  $T_{1,2}$  — 図5,6に水プロトンおよびゼラチンの non-exchangable プロトンの緩和時間を示す。水の  $T_2$  に転移による変化が見られるがアガロースの場合のように大きなものではない。この系でも  $T_2 \ll T_1$  である。

ゼラチンの  $T_1, T_2$  とともに転移によって変化し、コンフォメーションが変換することが理解できる。2つの  $T_2$  が観測されたが、凝磁化の回復は単一の  $T_1$  で表わされた。

- 1) I. D. Kuntz J. Amer. Chem. Soc. 93, 574, 576 (1971)
- 2) W. Derbyshire, I. D. Duff, Disc. Faraday Soc, 52, 243 (1974)
- 3) D. E. Woessner, J. R. Zimmerman, J. phys. chem. 62, 1590 (1963)

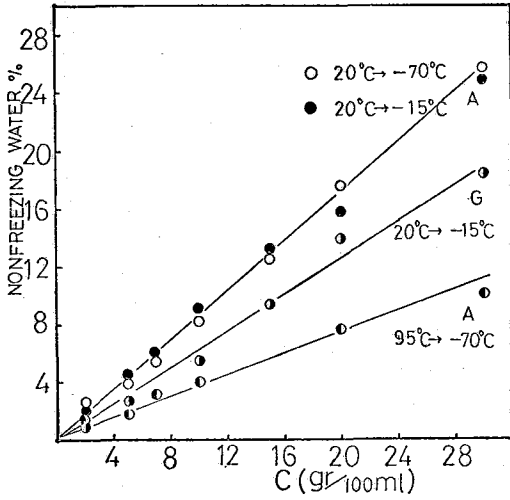


图1. non-freezing H<sub>2</sub>O fraction of agarose, gelatin 浓度依存性

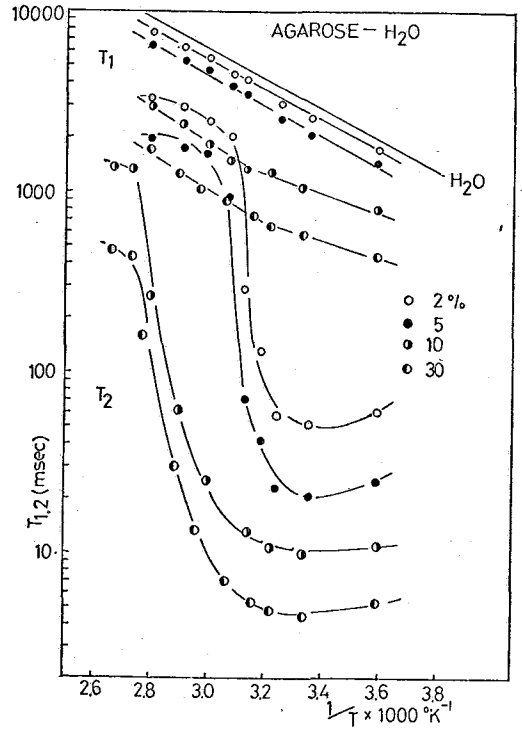


图2. agarose-H<sub>2</sub>O solution of T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> of 温度依存性 浓度; g/100 ml H<sub>2</sub>O

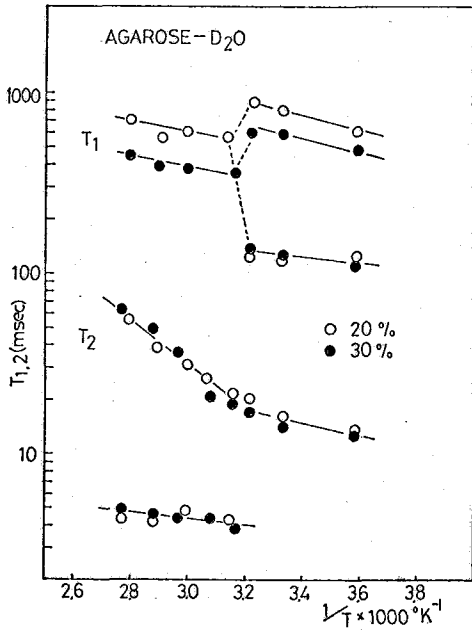
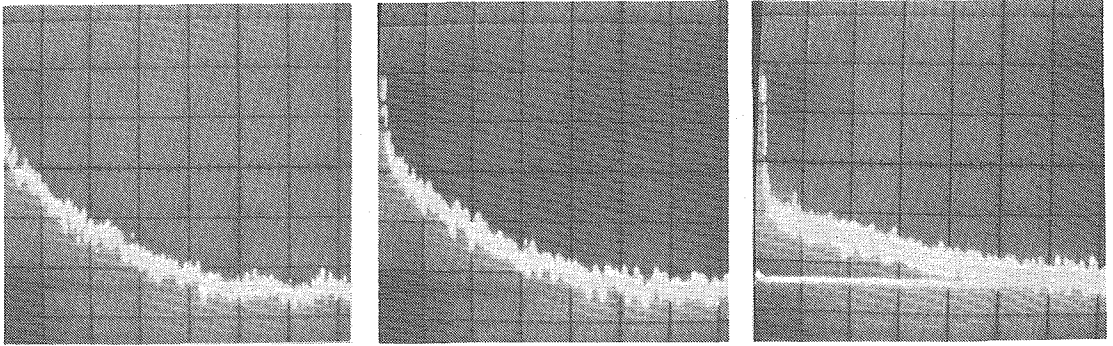


图3. agarose-D<sub>2</sub>O solution of T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> (of non-exchangable protons of agarose) of 温度依存性 浓度; g/100 ml D<sub>2</sub>O





(A)

(B)

(C)

图 4.

agarose-D<sub>2</sub>O solution (30%) の Free Induction Decay 0.5 msec/div.  
 (A) 95°C, (B) 50°C, (C) 25°C

图 5. gelatin-H<sub>2</sub>O solution の T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> の  
 温度依存性  
 濃度; 9g/100ml H<sub>2</sub>O

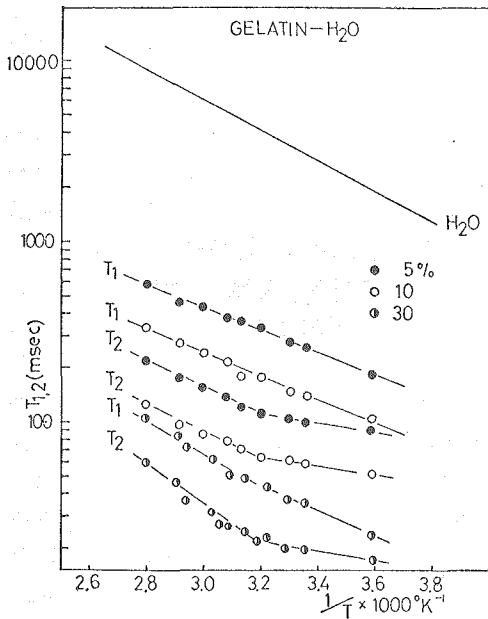
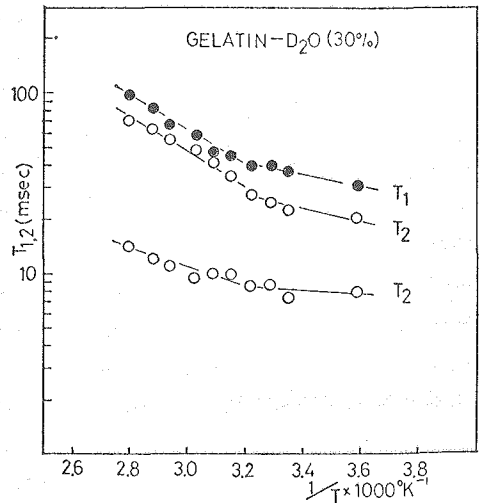
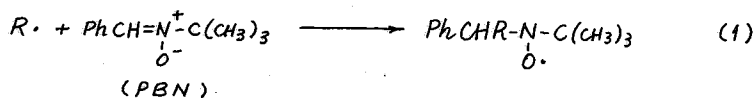


图 6. gelatin-D<sub>2</sub>O solution の T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>  
 (of non-exchangeable protons of  
 gelatin) の温度依存性  
 濃度; 9g/100ml D<sub>2</sub>O



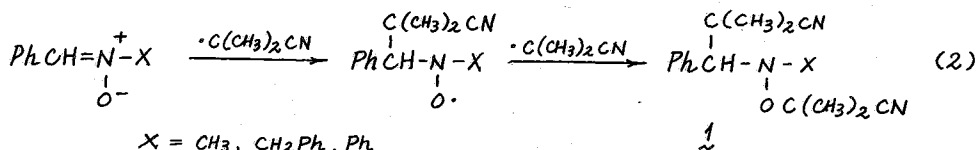
§1 はじめに 高分解能NMRの登場によって、有機化学反応は核の位置交換として取扱われるようになった。定常状態で得られるNMRの線形がこの交換速度に依存する現象を解析する方法では、一次反応速度定数にして $10^{-1} \sim 10^5 \text{ s}^{-1}$ の反応が対象となり、また一つの位置の飽和がもう一つの位置に移る効果を二重共鳴で観測すると、 $10^{-3} \sim 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ の速度が求まる。これらの方法で研究が行なわれた例は、プロトン交換、配位子交換、配座変換、流動構造の解析など枚挙に暇もないが、<sup>1)</sup>複雑多岐をきわめる有機化学反応全体からすればこれらは極く特殊な系であり、反応と呼ぶに相応しいのはCope転位ぐらいであろう。<sup>2)</sup>これに対してラジカルの電子スピンの核スピンの動的分極をもたらすCIDNPは、有機化学反応の一半を占めるラジカル反応すべてに係りを持ち、この分野の研究に欠かせない手法の一つとなっている。ここではCIDNPを使った我々の一連の研究の端緒と最近得られた知見のいくつかの流れによって報告したい。

§2  $\alpha, \alpha'$ -アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)とニトロソ類の反応 AIBNの熱分解で生ずるラジカル $\cdot\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$ が $\alpha$ -フェニル-N-tert-ブチルニトロソ(PBN)に付加して安定なニトロキンドラジカルを与えることが見出されたのが切掛けとなって、<sup>3)</sup>PBNは不安定なラジカルをESRで観測するためのスピン捕捉剤の一つとして用いられるようになった(式1)。<sup>4)</sup>



N-ベンジルニトロソでは $\cdot\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$ のビス付加体 $\underline{1}$ ( $X=\text{CH}_2\text{Ph}$ )が得られるが、当初室温60MHzで測定されたNMRスペクトルにはこの付加体のシグナルが現れないことから、ラジカルとの解離平衡や電子移動が起こっていて、電子スピンの双極子緩和が線幅の著しい広がりをもたらしているのではないかと考えられた。結果としてこの推論は正しくなく、この現象は付加体 $\underline{1}$ ( $X=\text{CH}_2\text{Ph}$ )における東緯回転、反転で線形が広まらずシグナルの融合温度付近にあったことが明らかとなった(図1参照)、この反応系を高分解能NMRのプローブ中で調べる端緒となった。

試料温度が130°Cになるように設定されたプローブ中でテトラクロロエタン溶液の反応を開始させると、幾本かの顕著なCIDNPシグナルが現れる。 $\underline{1}$ の4本のメチルプロトンシグナル(この温度では図1の右上のスペクトルに相当する)に關しては、常に2本のみが共鳴輻射(Eと略記)で、他の2本は分極を受けていないことが明らか



いわむら ひいず

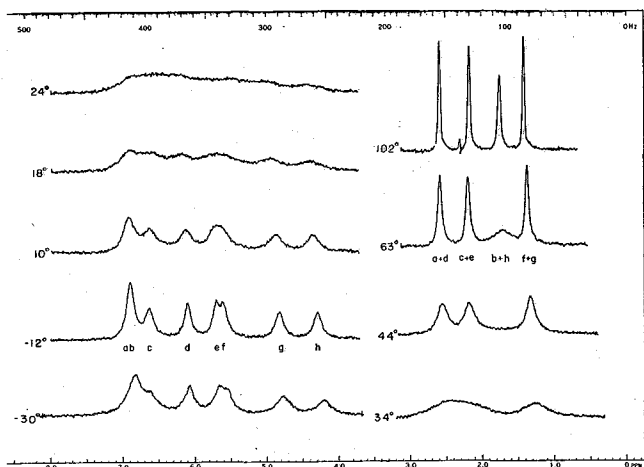


図1. ビス付加体 1 (X=CH<sub>2</sub>Ph) の <sup>1</sup>H NMR (60 MHz) の温度依存. δ 1~2 領域のメチルシグナルのみ示した. この温度変化は ΔG<sub>20°</sub><sup>‡</sup> = 14.6 kcal/mol の速度過程に対応し, C-O 結合の東緯回転に由来するものと考えられる.

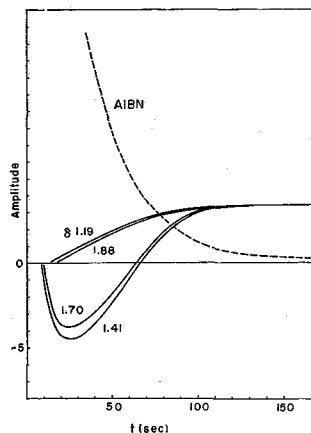


図2. 生成して来るビス付加体 1 (X=Ph) の4本のメチルシグナル強度の時間変化. 破線は試薬の一つである AIBN の消失を示す.

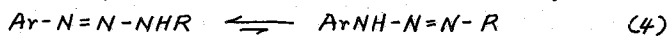
となる. 4本のシグナル強度の時間変化を図2に示した. この実験からラジカル停止反応が CIDNP の出現に手っつていることが明らかとなり, δ 1.41 および 1.70 のシグナルが O-C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CN に帰属可能となった. またこの方法で, 多重結合に対するラジカル付加反応の順序が決められるようになった. 図2の E シグナル包絡線を理論式

$$\frac{I(t)}{I_0(t)} = \frac{V\alpha - \beta}{\beta - \alpha} (e^{-\alpha t} - e^{-\beta t}) - e^{-\beta t} \quad (3)$$

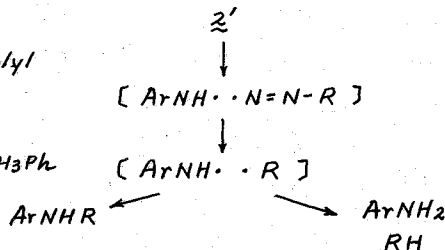
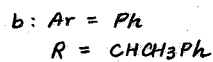
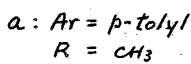
(V は分極係数, α は反応速度定数, β = 1/T<sub>1</sub>) に従って解析すると, V = -45 となる. またラジカル反応進行中でも 1 のメチルプロトンの T<sub>1</sub> は短縮していない.

このほか, 環状ニトロンの研究からは, ニトロキシドラジカルの不斉化反応が明らかとなった.

§ 3 1-アール-ル-3-アルキルトリアゼンの熱分解反応 オニウム化合物と求核試薬の反応にラジカル機構が関与する可能性が問題になって来た. この反応のモデルとして, トリアゼン誘導体の熱分解がとり上げられた. このトリアゼンは 2 の型で存在することが知られている



が, なお 20% 程度の互変異性型 2' と共存し, 式4であらわされる過程の ΔG<sup>‡</sup> はおよそ 13 kcal/mol である. CIDNP スペクトルならびに生成物の分析から, 反応は 2' のホモリシスで



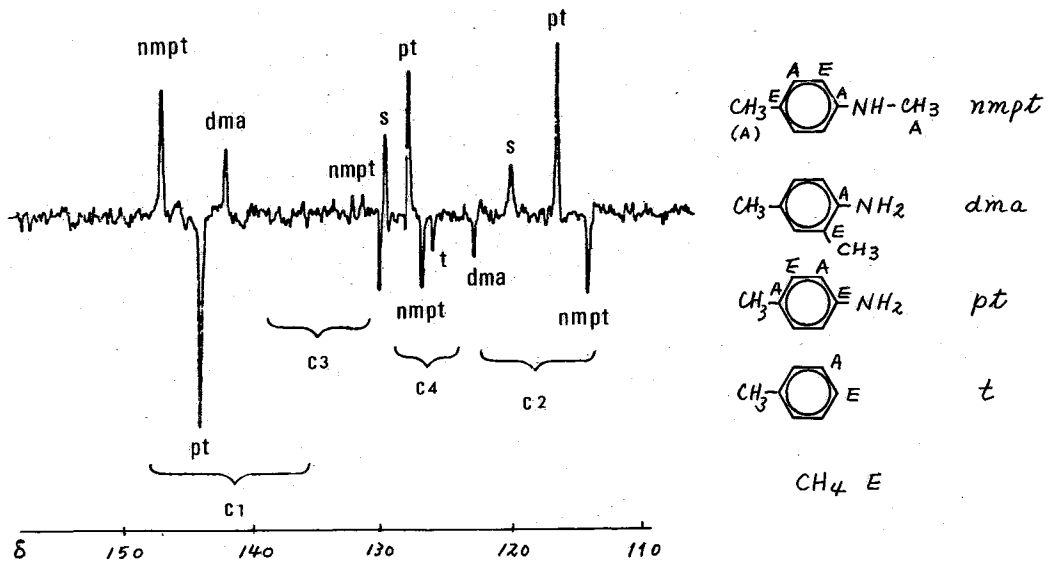
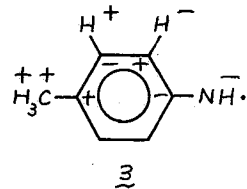


図3. トリアゼン2aの熱分解で観測される<sup>13</sup>C CIDNPスペクトル(22.63 MHz)とその符号の要約。

起こっていることが明らかとなった。アールアミニルラジカルは3種の共鳴限界構造式が示すような位置で反応し、負のスピン密度が現われるC-3位では反応しない。芳香環炭素領域のCIDNPスペクトルは、図3に示すような符号の交代を示し、アミニルラジカルにおける超微細結合定数の符号が3のように交互に現われることが実験的に確かめられた。従来ESRスペクトルから絶対値が、INDO-MO計算などから符号が決められていた。<sup>5)</sup>Rにキラルなα-フェニルエチル基を持つトリアゼン2bの熱分解反応における光学収率とCIDNP強度の相関から、ラジカル対における回転相関時間とCIDNP効果の時間尺度を明らかにする研究が現在進められている。

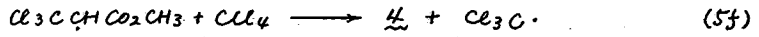
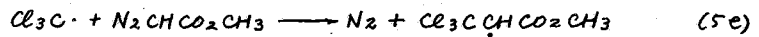
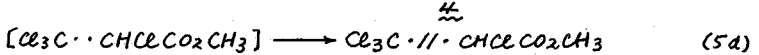
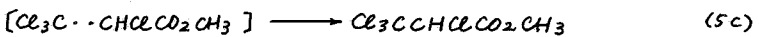
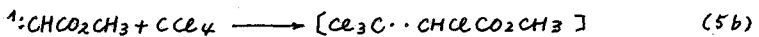
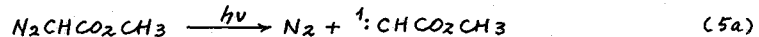


#### §4 ポリハロメタン中におけるジアゾ酢酸メチルの光分解

この反応では、メトキシカルボニルカルベンがC-ハロゲン結合に挿入した生成物4,5が得られるが、

5e~5f式の連鎖反応機構がどれほど起こっているか、またこの過程がCIDNPに着手するかどうかと言うことが同題文の一つであった。

<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C CIDNPスペクトルは次の式



5cで生成していることを示している。光量が反応速度を支配している零次反応のCIDNPシグナル強度の時間変化は図4で一般化され、各パラメータは式6で与え

られる。先のメタンプロトンシグナルからは  $k = 1.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $\beta^{-1} = 70 \text{ s}$ ,  $V = -640$  の値が得られる。先の標品について独立に求められた  $T_1$  は  $74 \pm 4 \text{ s}$  であり、この解析法の妥当性が示される。

一方すべての信号が式5cに従って生じると仮定し、ラジカル対理論に従って分極係数の理論値を求めると、 $V(\text{theoret}) = -825$  となり、実験値の方が20%ほど小さい(絶対値で)。すなわち式5c以外の機構でも信号が生成し、これはCIDNPに寄与していないことを示唆している。この考えは *tert*-BuSH をラジカル捕捉剤に使った実験で確認された。すなわち、*tert*-BuSH を共存させると信号は30%弱減少し、代わりに  $\text{CHCl}_3$  と  $\text{CH}_2\text{ClCO}_2\text{CH}_3$  が生成して来る。

$\text{CBrCl}_3$ ,  $\text{CBr}_2\text{Cl}_2$  などの反応では、従来 C-Br 結合への挿入は起こらないとされて来た。<sup>6)</sup> これは多分に生成物の分析の困難さから来ていた誤解であり、実際には  $\text{CCl}_2\text{XCHBrCO}_2\text{CH}_3$  (a: X=Cl, b: X=Br) が主生成物となり、これらに現われるCIDNPが式5に対応する共通の機構でできていることが明らかとなった。

§5 おわりに 反応機構の研究は、対象とする各個の反応の全容を明らかにするに止らず、有機化学反応を支配する一般原理を求めて地味に進められている。特に電子移動が先行しかちであると言う最近の見解は、従来考えられていたよりも多くの反応にラジカルが寄与していることを示唆しており、CIDNPを中心とするNMRの役割が重要になっている。

- 1) L. M. Jackman, F. A. Cotton 編, "Dynamic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Academic Press, New York, N. Y. (1975).
- 2) Cope 博士も *no-mechanism mechanism* の反応と考えられた時期があったが、半経験的なMO計算の対象となってから一人前の反応とみなされるようになった。
- 3) M. Iwamura, N. Inamoto, Bull. Chem. Soc. Japan, 40, 702, 703 (1967); 43, 856, 860 (1970).
- 4) E. G. Janzen, Accounts Chem. Res., 4, 31 (1971).
- 5) R. V. Lloyd, D. E. Wood., J. Amer. Chem. Soc., 96, 659 (1974).
- 6) J. W. Wilt, "Free Radicals," J. K. Kochi 編, Wiley, New York, N. Y. (1973) pp 365.

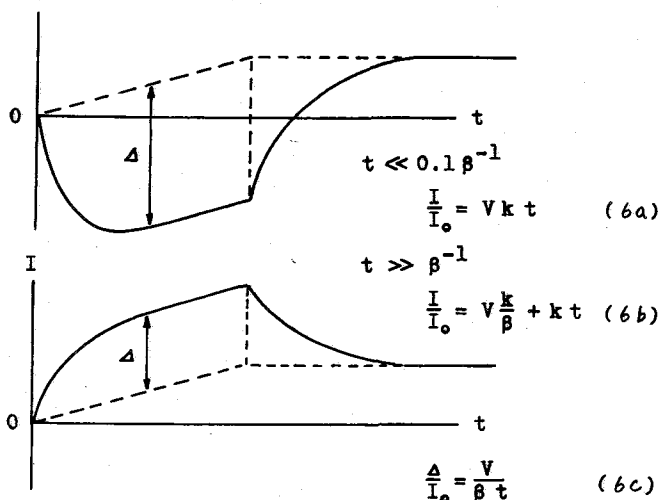


図4. 零次反応のCIDNPシグナル包絡線の解析例

立体選択的重水素化によるアミノ酸の配座解析。β-水素間のシフト差と立体配座の関係について。

P-3-1

(味の素中研) 鯨坂勝美 甲斐荘正恒

緒言。アミノ酸は蛋白質を構成する最小の化合物であることから、アミノ酸の溶液中のコンホメーション解析を行ないそのコンホメーションを安定にしている因子を明らかにすることは、蛋白質の側鎖部分の構造を考えるうえで重要なことである。

アミノ酸のコンホメーション解析、即ち  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  軸のまわりの回転異性体の存在比の計算は、 $J_{H_{\alpha}H_{\beta 1}}$ 、 $J_{H_{\alpha}H_{\beta 2}}$  という2つのカップリング定数を用いて(1)式から計算することができる。

$$P_I = \frac{J_{H_{\alpha}H_{\beta 1}} - J_{\beta}}{J_{\alpha} - J_{\beta}}, \quad P_{II} = \frac{J_{H_{\alpha}H_{\beta 2}} - J_{\beta}}{J_{\alpha} - J_{\beta}}, \quad P_{III} = 1 - (P_I + P_{II}) \quad (1)$$

ところが、この  $J_{H_{\alpha}H_{\beta 1}}$ 、 $J_{H_{\alpha}H_{\beta 2}}$  を求めるに際して2つの重要な問題がある。第一の問題としてはアミノ酸のα-及びβ-水素のケミカルシフトは溶液のpHによって変化し、ある領域では接近して  $AB_2$  型のスペクトルを与え解析不可能になる場合が出てくるといふ点である。第二の問題点としては、たとえその<sup>1</sup>H NMRスペクトルの解析ができたとしても、スペクトル上のシグナルを  $H_{\beta 1}$  あるいは  $H_{\beta 2}$  に帰属できないという本質的な問題がある。従ってそこで得られたカップリング定数を  $J_{H_{\alpha}H_{\beta 1}}$  あるいは  $J_{H_{\alpha}H_{\beta 2}}$  として一義的に帰属することはできず、それらの値を(1)式に代入して得た  $P_I$  及び  $P_{II}$  も2つの組合せの可能性が出てくる。このような理由からこれまで行なわれてきたカップリング定数を用いるアミノ酸のコンホメーション解析は、いずれも<sup>1</sup>H NMRスペクトルの解析が可能なpH領域に限られており、しかも帰属は推定に基づくものであった。

我々はこの数年来、アミノ酸、ペプチドのコンホメーション研究を行ってきたが、上に述べた問題点を解決し、できるだけ多くのアミノ酸について全pH領域のコンホメーションを一義的に決定することが目的である。そのために我々はアミノ酸のβ水素の片方のみを立体選択的に重水素で置き換えることにより帰属を一義的なものに行なう試みを行ってきた。この立体選択的重水素化アミノ酸の<sup>1</sup>H NMRスペクトルは  $AB$  型のスペクトルを与えるため容易に  $J_{H_{\alpha}H_{\beta 1}}$  (又は  $J_{H_{\alpha}H_{\beta 2}}$ ) を求めることができる。したがって立体選択的重水素化アミノ酸を用いれば  $J_{H_{\alpha}H_{\beta 1}}$  及び  $J_{H_{\alpha}H_{\beta 2}}$  を一義的に求めることができ、コンホメーションも一義的に決めることができる。我々はこの方法によりセリン等6種

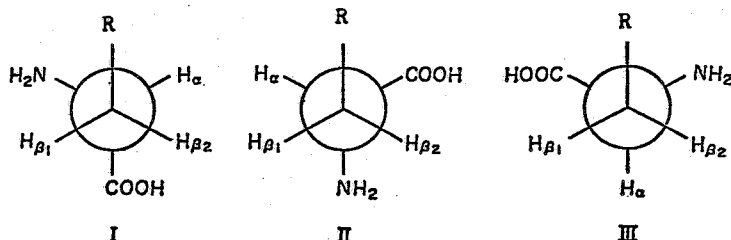


図1. α-アミノ酸の  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  軸のまわりの回転異性体

あじさかかすみ, かいのしょうまさつね

類のアミノ酸のコンホメーション解析を行ない既に報告した<sup>1)</sup>

今回この立体選択的重水素化法により解析した結果を検討したところ、 $H_{\alpha 1}$ と $H_{\alpha 2}$ のシフト差とコンホメーションとの間に密接な関係があることが見い出され、この関係を用いて $H_{\alpha 1}$ 及び $H_{\alpha 2}$ のシグナルの帰属ができる場合があることがわかった。本報告では新たにトリプトファン、ヒスチジン、システイン、シスチンの4つのアミノ酸のコンホメーション解析を行ない、それらを含めてこれまでに我々が行なった13種類のアミノ酸のコンホメーション解析の結果について、それらのコンホメーションを規定している要因について考察する。

結果と考察。 緒言で述べたアミノ酸のコンホメーション解析を行なう際の2つの問題のうち、第一の問題については立体選択的重水素化法を用いなくても超高磁場で<sup>1</sup>H NMRスペクトルを測定すればシグナルは分離することが予想される。

事実、pD4.50におけるヒスチジンは、100 MHzでは $AB_2$ 型のスペクトルを与えるため解析できないが、360 MHzでは図2.に示すように $ABX$ 型のスペクトルを示し解析可能となった。他のアミノ酸についても同様の結果が得られ、360 MHz程度の超高磁場NMR装置を用いれば大部分のアミノ酸は解析可能となることが示された。

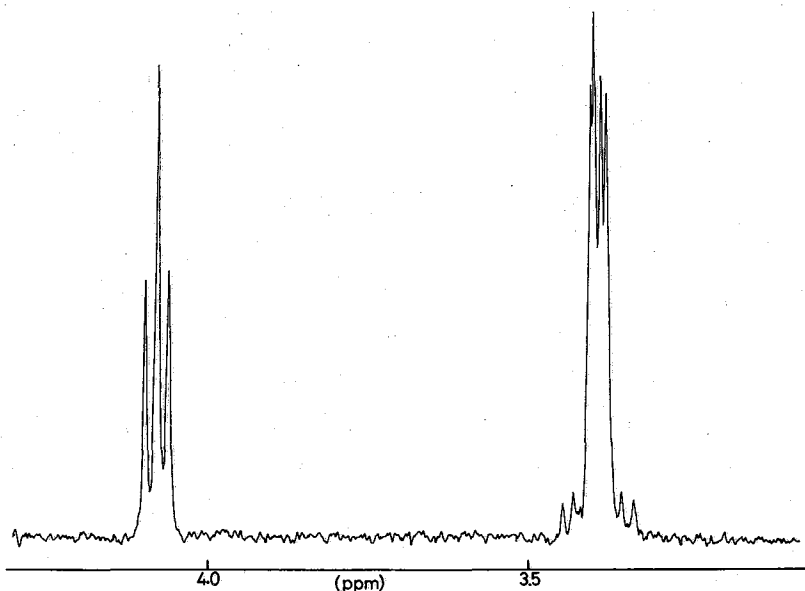


図2. L-ヒスチジンの360 MHz <sup>1</sup>H NMRスペクトルの一部分 pD4.50. 室温における測定. Bruker Hx-360による。

次に第二の問題についても立体選択的重水素化法を用いなくてもすむ場合があることが見出されたので次に述べる。即ち図1.の各回転異性体において $H_{\alpha 1}$ と $H_{\alpha 2}$ とが周囲から受ける磁気的影響は互いに異なったものであると予想されるが、回転異性体I, II, IIIにおける $H_{\alpha 1}$ と $H_{\alpha 2}$ の間のシフト差をそれぞれ、X, Y, Z (Hz)とすると、観測される $H_{\alpha 1}$ ,  $H_{\alpha 2}$ 間のシフト差 $\Delta\delta$ は(2)式で示される。

$$\Delta\delta = P_I X + P_{II} Y + P_{III} Z \quad (2)$$

まずこれまでにコンホメーションが明らかにされたアミノ酸の $P_{\beta}$ ,  $P_{\alpha}$ ,  $P_{\text{NH}}$ 及び $\Delta\delta$ 値を用いて最小二乗法によりX, Y, Zの値を求めると表1のような結果が得られた。

ここで $H_{\beta_1}$ と $H_{\beta_2}$ が受けるシフト差の原因としては、 $\alpha$ 炭素上のカルボキシル基及びアミノ基のイオン化の状態によって誘起される電子効果が主原因と考えられ、表1の結果もそれによりよく説明される。

例えば、カチオン型のアミノ酸ではカルボキシル基が電子を引く効果は弱く、一方、アンモニウム基の方に電子が流れ込もうとする効果は強いと考えられるが、そのとき図1の回転異性体Iでは、アンモニウム基とトランス位にある $H_{\beta_2}$ の方が、ゴーシュ位にある $H_{\beta_1}$ より電子密度が小さくなり、 $H_{\beta_2}$ の方が $H_{\beta_1}$ より低磁場側で共鳴することが予想される。事実、表1の結果は $H_{\beta_2}$ が $H_{\beta_1}$ より58.8 Hz低磁場側で共鳴することを示しており、よい一致を見せている。回転異性体IIではアンモニウム基は $H_{\beta_1}$ と $H_{\beta_2}$ との両者に対しゴーシュ位にあるが、カルボキシル基の方は $H_{\beta_1}$ とトランス位にあるために $H_{\beta_1}$ から電子をより多く引くため $H_{\beta_1}$ は低磁場にくる。この場合も表1の+43.0 Hzとよく一致している。また回転異性体IIIでは $H_{\beta_1}$ はアンモニウム基とトランス位にあり、 $H_{\beta_2}$ はカルボキシル基とトランス位にあるが、アンモニウム基の寄与の方がより強いために $H_{\beta_1}$ の方が低磁場にくることになる。ここでは酸性の場合についてのみ述べたが、中性、アルカリ性でも同様な議論が成り立ち、以上行ってきたように回転異性体I, II, IIIにおけるシフト差を分離して考えることは妥当であることが示された。

このように2つの $\beta$ 水素間のシフト差とコンホメーションは一次の関係にあることから逆にX, Y, Zの値と観測されたシフト差から回転異性体の存在比を決めることも可能なはずである。まず選択的重水素化法により帰属の確定しているアミノ酸について計算すると、すべてのアミノ酸について、正しい帰属による計算値(case 1)の方が誤った帰属による計算値(case 2)より有意に実測値に近いことがわかる(表2)。また今回始めて解析を行なった4種のアミノ酸では、ヒスチジンとシステインでは有意に暫定的な帰属による計算値(case 1)の方がcase 2よりよく一致しているが、トリプトファンとシスチンでは有意差がないために断定できない。従って本法は必ずしも一般的に $\beta$ 水素の帰属に有用であるわけではないが、選択的重水素化法の実験的労力を考えれば一応試みるに足る方法であろう。なお、ヒスチジンの帰属は選択的重水素化法により正しいことを確認した。又、トリプトファンとシスチンについては $\beta$ 水素のケミカルシフト及びスピン結合定数のpH変化の様子が芳香族アミノ酸のそれと極めて類似していることから、芳香族アミノ酸の $\beta$ 水素の帰属をそのまま採用したが、これらの帰属については更に確認するつもりである。

表1. 最小二乗法により求められたX, Y, Zの値 単位 Hz

| イオン化状態 | X     | Y     | Z     |
|--------|-------|-------|-------|
| カチオン型  | -58.8 | +43.0 | +18.8 |
| 両性イオン型 | -49.8 | +25.7 | +19.4 |
| アニオン型  | -71.3 | +65.2 | +6.7  |

$H_{\beta_1}$ が $H_{\beta_2}$ より低磁場のとき正とした。



表2. 各種アミノ酸の回転異性体存在比、及び実測及び計算されたβ水素間のシフト差

| Amino Acid                         | pD    | PI   | PII  | PIII | $\Delta\delta_{obs.}^a$ | $\Delta\delta_{calc.}^b$ |         |
|------------------------------------|-------|------|------|------|-------------------------|--------------------------|---------|
|                                    |       |      |      |      |                         | case 1.                  | case 2. |
| Phenylalanine                      | 0.16  | 0.46 | 0.28 | 0.26 | -12.3                   | -10.1                    | -8.2    |
|                                    | 4.84  | 0.48 | 0.24 | 0.28 | -16.7                   | -12.3                    | -5.7    |
|                                    | 12.50 | 0.45 | 0.26 | 0.29 | -15.5                   | -13.2                    | -12.7   |
| Tyrosine                           | 0.52  | 0.47 | 0.26 | 0.27 | -10.9                   | -11.3                    | -10.0   |
|                                    | 5.20  | 0.49 | 0.21 | 0.30 | -14.8                   | -13.2                    | -7.9    |
|                                    | 11.91 | 0.46 | 0.22 | 0.32 | -19.0                   | -16.4                    | -16.4   |
| Serine                             | 0.40  | 0.15 | 0.07 | 0.78 | +9.0                    | +8.9                     | -17.1   |
|                                    | 6.20  | 0.29 | 0.10 | 0.61 | -4.4                    | 0                        | -14.3   |
|                                    | 12.18 | 0.30 | 0.15 | 0.55 | -6.2                    | -7.9                     | -12.6   |
| Aspartic Acid                      | 0.43  | 0.35 | 0.15 | 0.50 | -4.1                    | -4.7                     | -15.7   |
|                                    | 5.78  | 0.56 | 0.09 | 0.35 | -15                     | -18.8                    | -16.7   |
|                                    | 12.25 | 0.66 | 0.12 | 0.22 | -35                     | -37.7                    | -35.9   |
| Asparagine                         | 0.39  | 0.32 | 0.17 | 0.51 | -4.0                    | -1.9                     | -13.4   |
|                                    | 4.97  | 0.50 | 0.12 | 0.38 | -9.3                    | -14.4                    | -14.3   |
|                                    | 12.33 | 0.59 | 0.19 | 0.22 | -24.1                   | -28.2                    | -26.5   |
| Aspartic $\beta$ -<br>Methyl Ester | 0.35  | 0.36 | 0.17 | 0.47 | 0                       | -5.1                     | -14.3   |
|                                    | 4.17  | 0.40 | 0.17 | 0.43 | 0                       | -7.2                     | -10.1   |
|                                    | 12.10 | 0.45 | 0.25 | 0.30 | -12                     | -13.8                    | -13.5   |
| Tryptophan                         | 0.62  | 0.46 | 0.22 | 0.32 | -6.4                    | -11.5                    | -12.9   |
|                                    | 4.19  | 0.52 | 0.16 | 0.32 | -17.9                   | -15.6                    | -11.6   |
|                                    | 12.30 | 0.46 | 0.23 | 0.32 | -17.2                   | -15.7                    | -17.1   |
| Histidine                          | 0.97  | 0.32 | 0.41 | 0.27 | +4.0                    | +3.9                     | +5.2    |
|                                    | 4.50  | 0.40 | 0.31 | 0.29 | -2.8                    | -6.3                     | -0.5    |
|                                    | 12.15 | 0.47 | 0.22 | 0.31 | -14.4                   | -17.1                    | -17.0   |
| Cysteine                           | 0.61  | 0.24 | 0.18 | 0.58 | +5.6                    | +4.5                     | -10.6   |
|                                    | 4.13  | 0.26 | 0.16 | 0.58 | +5.5                    | +2.5                     | -10.0   |
|                                    | 12.34 | 0.64 | 0.09 | 0.27 | -42.8                   | -37.9                    | -37.1   |
| Cystine                            | 0.11  | 0.44 | 0.19 | 0.37 | -14.0                   | -10.7                    | -14.7   |
|                                    | 6.30  | 0.54 | 0.12 | 0.34 | -20.0                   | -17.2                    | -14.5   |
|                                    | 11.90 | 0.47 | 0.17 | 0.35 | -20.0                   | -20.1                    | -20.8   |

a) 表中に示された帰属によって行なった計算値

b) 表中の帰属と逆の帰属による計算値でその符号を逆にしている。

我々はこれまでに表2の10種のアミノ酸他にバリン、スレオニン、アロスレオニンのコンホメーションを明らかにしてきた。そしてこれらのアミノ酸のコンホメーションの安定化に寄与していると考えられる因子として次の(1)~(3)を提出した。

(1) 立体的相互作用

(2) 静電的相互作用

(3) 水の構造破壊を少なくするために丸まろうとする作用

NMR討論会においては各アミノ酸についてこれらの因子をあてはめて説明してゆきたいと考えている。

参考文献 DM.Kainosho and K.Ajisaka, J. Amer. Chem. Soc., 98, 5630 (1975).

# ペニシリンおよびその関連物質のNMR. II.

P-3-2

(東大理・医\*) O三森 文行・荒田 洋治・藤原 鎮男  
村中 正治・堀内 淑彦\*

## 《 序 》

前報においてペニシリンGの水溶液中での自発的分解過程についての報告を行い、その初期分解速度が、従来考えられていたよりかなり大きいことを示したが、<sup>1)</sup>今回はペニシリンGとリゾチームとの相互作用についての報告を行いたい。ペニシリンはその作用機構においても、細胞壁合成酵素の阻害剤として働くと考えられており、<sup>2)</sup>またその重大な欠陥であるアレルギー反応においても、ハプテンとしてキャリアーの蛋白質と相互作用し、またその抗体との反応も蛋白質との相互作用と考えられる。従って、ペニシリンの蛋白質との相互作用の様態を知ることにはその生理作用と関連し、重要であると考えられる。本研究においては、蛋白質として最も詳細に研究がなされているリゾチームを用いた。ペニシリンとリゾチームとの相互作用についてはこれまでに、X線結晶解析、<sup>3)</sup>酵素活性の阻害、<sup>4)</sup>平衡透析、<sup>5)</sup>ペーパークロマトグラフィー<sup>6)</sup>など様々な方法を用いて研究がなされており、その結果、X線結晶解析では、ペニシリンVがリゾチームの活性部位から12 Å離れた部位で1対1の相互作用をすること、活性阻害では、24 mMのペニシリンGがリゾチームの活性をおよそ半分に阻害することが報告されている。またペーパークロマトグラフィーにおいては、両者の非可逆的相互作用が報告され、リゾチーム中のリシン残基のε-アミノ基がその相互作用に関与するのではないかという推論がなされている。しかし、これらの研究においては、いずれもその相互作用の大きさ、作用部位などは十分解明されているとはいえない。さらに、平衡透析による研究からは、この相互作用を否定する結果が得られている。本研究においては、相関NMRを用いペニシリンG、およびリゾチームのトリプトファン残基のインドール環NHプロトンのシグナルを観測することにより、この相互作用の大きさ、相互作用部位等についての考察を行なった。

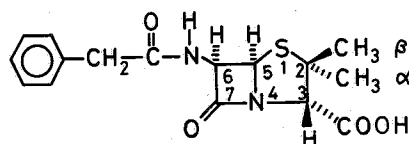
## 《 実 験 》

ペニシリンG (SIGMA, Lot. 24C-2180)、卵白リゾチーム(生化学工業, Lot. E5210)は市販品をそのまま使用した。ペニシリンG、およびリゾチームのヒスチジンC-2プロトンを観測する際は重水中、またリゾチームのトリプトファン残基のインドールNHプロトンを観測する際は軽水中に溶解して行なった。化学シフトの規準には、DSSを外部規準として用いた。測定はJEOL PS-100および、これを基本にした相関NMRシステム<sup>7)</sup>を用いて行なった。

## 《 結果および考察 》

### (1) ペニシリンのスペクトルの変化

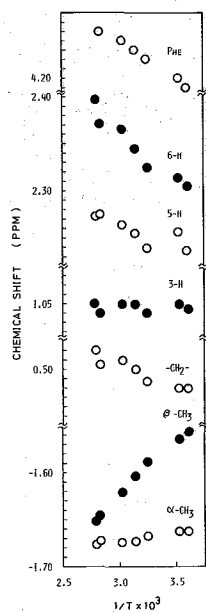
ペニシリンGの水溶液にリゾチームを加えると、いくつかのピークが数Hz~10Hzのシフトをおこす。すなわち、β-メチル基およびα-Hのピークは小



図I. ペニシリンG

みつもり ふみゆき・あらた ようじ・ふじわら しずお  
むらなか まさはる・ほりうち よしひこ

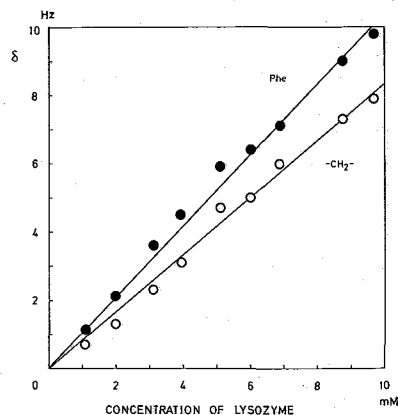
さな高磁場シフトを示し、側鎖のCH<sub>2</sub>基、フェニル基のピークは大きな高磁場シフトを示す。しかし、これらのシフトのうちリゾチームとの相互作用による本質的なものは、フェニル側鎖のものだけであると考えられる。ペニシリンGのシグナルを温度変化をさせて測定すると、図IIに示すように、低温化に伴い6-Hの高磁場方向への、またβ-メチル基の低磁場方向へのかなり大きなシフトが認められるからである。これはペニシリンGの水溶液中において側鎖のフェニル部分がチアゾリジン、β-ラクタムの複合環部分とβ-メチル基の側から分子内相互作用をしているためであると考えられる。実際、ペニシリンGのフェニル側鎖のない6-アミノペニシラニックアミド(6-APA)においては、6-Hの若干の高磁場シフトを除いてこのような温度変化は認められない。従って、ペニシリンGがリゾチームと相互作用をするのはフェニル側鎖の部分においてであり、β-メチル、6-Hのシフトはこの相互作用によりペニシリンの分子内相互作用の形態が変化したことに伴う二次的なものであると考えられる。



図II. ペニシリンG  
スファトルの温度変化、TMA内部規準  
PH 7.0

ペニシリンGとリゾチームとの相互作用を定量的に議論するために、ペニシリンGの濃度を一定に保ち、リゾチームの濃度を1~10 mMに変化させて、ペニシリンGのフェニル側鎖のシフトを追跡した。その結果を図IIIに示す。ここでは、1対1の可逆的な相互作用を仮定し、 $A+B \rightleftharpoons AB$ のパターンに従って最小二乗法により、結合定数K、およびfreeのペニシリンと複合体を形成したペニシリンとのシフト差、 $\Delta$ を算出した。この結果、 $K \sim 20 M^{-1}$ 、 $\Delta_{\text{Phenyl}} \sim 90 \text{ Hz}$ 、 $\Delta_{\text{CH}_2} \sim 70 \text{ Hz}$ を得た。この値は、リゾチームとその代表的な阻害剤であるNAGとの相互作用の大きさとほぼ同程度のものである。<sup>8)</sup>

また、リゾチームが存在する場合には上述のようなシフトのほかには側鎖のCH<sub>2</sub>ピークの線中の広がりも観測される。しかし、このCH<sub>2</sub>基は100 MHzでは単一ピークに見えるが、360 MHzにおいて観測すると、シフト差0.05 ppm、 $J = 15 \text{ Hz}$ のAB系を形成しており、ここで観測された線中の広がりには実際にはAB系のシフト差の広がりを見せるものであると考えられる。これはフェニル部分がリゾチームに固定化されることによりCH<sub>2</sub>基の二つのプロトンの不等化が押し進められたことによると考えることができる。

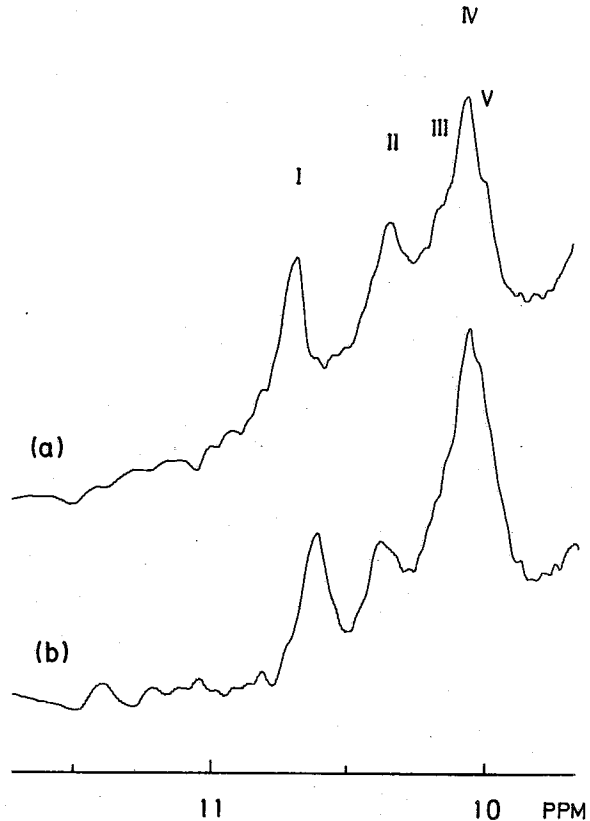


図III. リゾチームの濃度変化に伴うペニシリンG (36.3 mM)のピークのシフト、33°C、PH 5.5。  
 $\delta$ : リゾチームのあるときとないときの化学シフトの差。

## (2) リゾチームのスペクトルの変化

100MHz分光計では、リゾチームのスペクトルにおいて、分離して観測されるピークは多くないが、ここではヒスチジン-15のC-2プロトンおよび、トリプトファンインドール環NHプロトンを相関NMR法により観測した。特にトリプトファンは、活性部位にある3個を含めて6残基があり、ペニシリンとの相互作用部位に関して重要な情報を与えることが期待される。

ヒスチジン-15のC-2プロトンには、予期したごとくペニシリンGを加えても変化は認められない。トリプトファンのインドール環NHプロトンは、図IVに示すように、6個のうち5個について分離したピークが得られ、最も低磁場側に見られるピークIがペニシリンGの添加により高磁場シフトすることがわかった。ペニシリンの濃度変化に伴う各ピークのより詳細な動きを図Vに示した。Glicksonらは、これらのピークについて帰属を行い、低磁場側から Trp-28 または III, Trp-108, Trp-62, Trp-123, Trp-63 と帰属している。<sup>9)</sup>一方、Campbellらは、標和試薬を用いてVが Trp-108 であるとの帰属を行なっている。<sup>10)</sup>これらの帰属に従えば、ペニシリンGと相互作用をするのは Trp-28 あるいは III、またはその周辺部分と考えられる。GlicksonらのリゾチームとNAGとの相互作用の実験では、ピークIII、Vがシフトするという結果が得られているので、ペニシリンのリゾチームとの相互作用の仕方は、NAGとは異なることがわかった。また、ここで得られた結果は、リゾチームに含まれる6個のトリプトファン残基のうち1個だけが特異的にペニシリンと



図IV. リゾチームのトリプトファン残基インドール環NHプロトンの相関NMRスペクトル。

(a). 5.0mM リゾチーム水溶液, 0.1M NaCl  
pH 5.5, 48°C.

(b). (a)に31.2mM ペニシリンGを加えた場合。  
掃引速度 417 Hz/s, サンプリング時間 0.512s  
掃引くりかえし時間 0.8s, サンプリング回数  
512回, 積算 2048回, フィルター 125Hz

の相互作用に参与していることを示している。Felsenfeldらは、活性阻害の結果から6個のトリプトファンすべてが相互作用に参与するのではないかとの推定を行なっているが、<sup>4)</sup>実際にはペニシリン-リゾチームの相互作用には、より高度の specificity があることが示された。

しかし、リゾチームの相互作用部位が活性部位を離れた Trp-28 または III であるとすると、ペニシリンがリゾチームの活性を阻害するという報告とは一致せず、またX線結晶解析の結果から考えられる Trp-28 および III の残基の露出度はかなり小さく、外界のペニシリンと相互作用をするための条件はあまり良いとはいえない。

### 《 結 論 》

ペニシリン-リゾチームの相互作用について、ペニシリンのスペクトルの変化から、その大きさがおよそ  $20 \text{ M}^{-1}$  であり、作用部位は側鎖のフェニル部分の疎水的相互作用であること、リゾチームのスペクトルの変化から、リゾチーム側の相互作用部位には Trp-28 または III と考えられるトリプトファン残基一つが参与していることがわかった。

### 文 献

1. 三森, 荒田, 藤原, 村中, 堀内, 日本化学会第34春季年会4K02 (1976)
2. E.H.Flynn, "Cephalosporins And Penicillins", Academic Press (1972).
3. L.N.Johnson, Proc.Roy.Soc.B. 167, 439 (1967).
4. H.Felsenfeld and R.E.Handschumacher, Mol.Pharmacol. 3, 153 (1967).
5. I.M.Klotz, J.M.Urquhart and W.W.Weber, Arch.Biochem. 26, 420 (1950).
6. P.H.Corran and S.G.Waley, Biochem.J. 149, 357 (1975).
7. Y.Arata and H.Ozawa, J.Magn.Resonance 21, 67 (1976).
8. M.A.Raftery, F.W.Dahlquist, S.M.Parsons and R.G.Wolcott, Proc.N.A.S. 62, 44 (1969).
9. J.D.Glickson, W.D.Phillips and J.A.Rupley, J.Am.Chem.Soc. 93, 4031 (1971).
10. I.D.Campbell, C.M.Dobson and R.J.P.Williams, Proc.R.Soc.London.B. 189, 485 (1975).

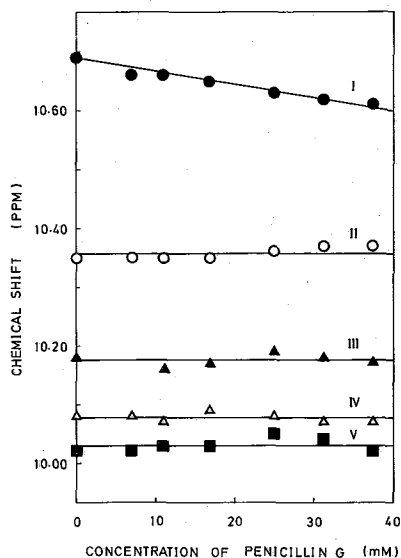


図7. ペニシリンGの濃度変化に伴うリゾチーム (5.0 mM) のトリプトファン残基インドール環NHプロトンの各C<sup>13</sup>-Fのシフト pH 5.5, 48°C

## P-3-3

(微化研, 日本化薬薬品研\*) °長縄 博, 村岡靖彦\*, 佐藤真弥  
 滝田智久, 梅沢永夫

## 〈序〉

ブレオマイシン(BLM)は1966年, 梅沢らによって発見された抗腫瘍性抗生物質で, 現在扁平上皮癌, 悪性リンパ腫などの治療に世界中で広く用いられている抗生物質である。

BLMの構造は1972年, 滝田らによって提出された。その構造決定はまず, 酸加水分解により得られる分解生成物を構造決定し, 次に選択的切断によってより大きな分解生成物を得てその構造を決定し, 全体の構造を組立てた。その構造は通常のアミノ酸が大きな修飾を受けて生成されたと思われる異常アミノ酸を多く含む1本のペプチド鎖のN端がβ-ラクタム環を形成し, そのC端はそれぞれのBLMで異なるアミンが結合し, 更にβ-hydroxy-his. にL-guloseと3-O-carbamoyl-D-mannoseがα-glycoside結合することによって形成されている。BLMの構造研究の最終段階で<sup>13</sup>C-NMRは大きな役割を果たしたが, その個々の帰属は未だなされていなかった。BLMのように複雑な化合物の<sup>13</sup>C-ラゲナルの帰属はそれ自体で意義のあることと考えられるが, その完成は今後のBLMの化学及び生物学的研究に大きく寄与すると思われる。

## 〈装置及び試料〉

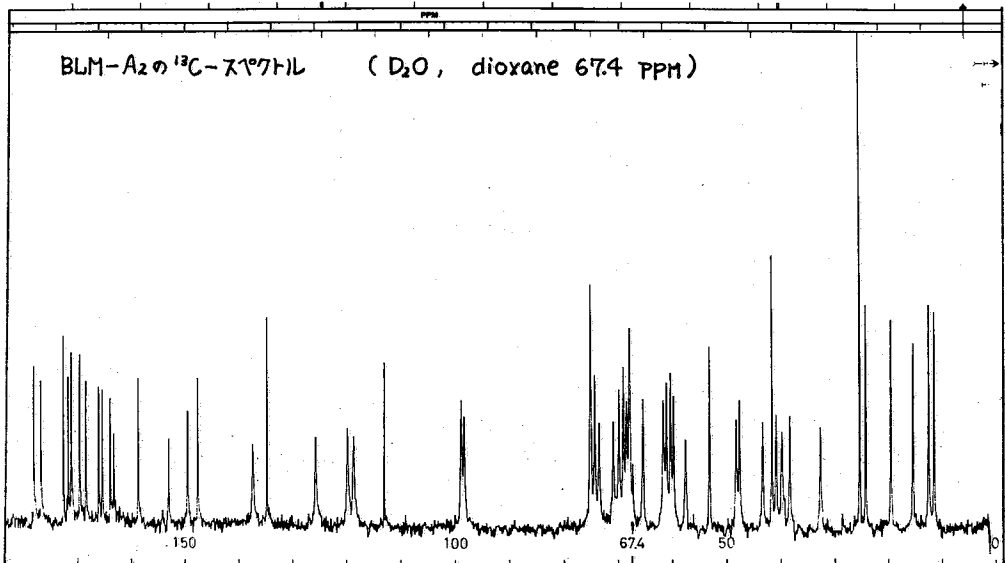
CMRスペクトルはVarian XL-100 FT NMR Spectrometer (25.2 MHz)を使用した。BLM群は100~130 mg, 分解物は20~100 mg程度用いて, D<sub>2</sub>O 0.6 ml に溶解して, 8mm管にて, <sup>1</sup>H-Lock modeで測定した。probe温度35~40°C, spectrumwidth 5120 Hz, 8K memory, pulse flipping angle 30~45°, 積算回数10~70K, 1,4-dioxaneを内部基準(67.4 ppm)としてδ値で示した。

構造研究の過程で数多くの構成成分及び誘導体が得られ<sup>1)</sup>, これらのスペクトルを測定して経験則, 文献値を参照することによってBLMの全てのラゲナルの帰属が可能となった。完全加水分解によって得られるアミノ酸6種と末端のアミンは, BLMのペプチド部分の全ての炭素を重複することなく含んでいる。ペプチド成分としてはN→O acyl migrationをともった選択的酸水解で得られるtripeptide-S, その片方のpseudo-tetrapeptide A, NB S 酸化で得られるtetrapeptide-S, pseudo-tetrapeptide Aの部分水解で得られるpseudo-tripeptideの4種が測定された。誘導体としてはアルカリ性Tris Buffer液中で保存すると得られるde-carbamoyl体, 脱銅体BLMの含水アルコール溶液中でbase処理して得られるiso-BLM体, 含銅体と同じ処理して得られるepi-BLM体<sup>2)</sup>, BLM不活性化酵素により生成されるde-amide体, Fusariumの酵素又は化学的に得られた末端アミンの無いBLM-acid, BLMの培養液中より得られたde-glyco-BLM-acid, ラクタム環の拡大体, de-pyruvamide体の8種類が測定された。糖成分として, Me-α-L-guloside, Me-α-D-mannoside及びその2-と3-O-carbamoyl体が測定された。後の三者はde-carbamoyl BLM, iso-BLM及びBLMのmannose部分にそれぞれ相当する。

字がゆめひろし・むらおかやすひこ・さとうまさや・たまたともひさ・うめざねはまお

### <結果と考察>

最終構造を提出するにあたり、分子式が不明でそれまでに得られた部分構造が全ての構成原子を含んでいるか不明であった。BLM-A<sub>2</sub>のCMRスペクトルには52本のピークが観測され、このうち $\delta$  25.7,  $\delta$  68.0,  $\delta$  75.2のピークは各2個の重なりであることがわかり、BLM分子中に55個の炭素が存在しそのうち21個がsp<sup>2</sup>-Cであることを示した。この結果が有力な手懸りとなり最終構造が提出された。



BLMの各シグナルの帰属は前述の各種化合物のスペクトルについて、経験則、文献値を参考にして決定された。55個のシグナルのうちから末端アミン部分を選び出すには、BLM-A<sub>2</sub>とA<sub>2</sub>-Cのスペクトルの比較をする事によって互に対応するシグナル対以外に、それぞれ5個の対応しないシグナルがありこれが末端アミンに由来することが判った。次にmannose部分(Table 1)については、Me- $\alpha$ -D-mannosideの帰属をもとにして、まずそのcarbonyl誘導体の帰属をcarbonyl基の結合による近接炭素のシフト変化を考慮して決定された。さらにde-carbamoyl-BLM A<sub>2</sub>-C, BLM A<sub>2</sub>-C, iso-BLM A<sub>2</sub>-Cのmannose部分の変化をこれらに対応させて決定した。gulose部分の帰属は、galactoseの3位のOHがegからaxになったのがguloseである事から、Table 2に示されるようにMe- $\alpha$ -L-galactosideの帰属をもとにして、3位のOH基の影響をPerlinらの方式を用いて予想してMe- $\alpha$ -L-gulosideの帰属をした。BLM中のgulose部分では、2位がglycoside結合していることから、その低磁場シフトを考慮してassignされた。なお、glycoside結合について2種の糖が共に結合であることは、<sup>1</sup>H-NMR及びHudson則により決定されたが、その後gated decoupling法によるproton nondecouplingのスペクトルでmannose J<sub>C-H</sub> = 170.1 Hz gulose J<sub>C-H</sub> = 172.9 Hzが観測されさらに確認された<sup>2)</sup>

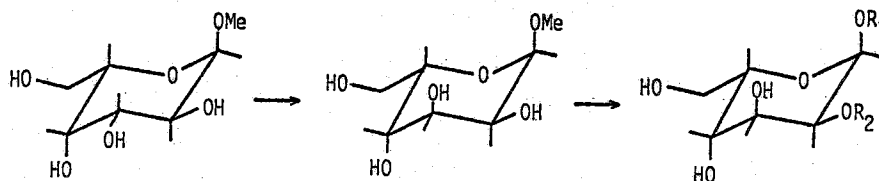
Table 1.

Mannose の Me glycoside, O-carbamoyl 体及び BLM の mannose 部位の  $^{13}\text{C}$ -chemical shift

| Compound                              | Carbon |                  |                            |                            |                |                |                |                   |
|---------------------------------------|--------|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|
|                                       | CO     | 1                | 2                          | 3                          | 4              | 5              | 6              | CH <sub>3</sub>   |
| Me- $\alpha$ -D-mannoside             |        | 101.6<br>(101.7) | 71.4<br>(71.5)             | 70.8<br>(70.8)             | 67.6<br>(67.7) | 73.4<br>(73.4) | 61.8<br>(61.9) | 55.7*<br>(56.0)** |
| 3-O-carb.-derivative<br>$\Delta$      | 159.0  | 101.4<br>+0.2    | 69.1<br>+2.3               | <u>75.2</u><br><u>-4.4</u> | 65.4<br>+2.2   | 73.4<br>0      | 61.7<br>+0.1   | 55.6              |
| 2-O-carb.-derivative<br>$\Delta$      | 158.8  | 99.2<br>+2.4     | <u>73.3</u><br><u>-1.9</u> | 69.9<br>+0.9               | 67.7<br>-0.1   | 73.3<br>+0.1   | 61.5<br>+0.3   | 55.8              |
| De-carb.-BLM A <sub>2</sub> -c        |        | 98.9             | 71.4                       | 70.2                       | 67.6           | 74.3           | 61.9           |                   |
| BLM A <sub>2</sub> -c<br>$\Delta$     | 158.5  | 98.2<br>+0.7     | 69.1<br>+2.3               | <u>75.2</u><br><u>-5.0</u> | 65.6<br>+2.0   | 73.7<br>+0.6   | 61.8<br>+0.1   |                   |
| Iso-BLM A <sub>2</sub> -c<br>$\Delta$ | 158.6  | 96.2<br>+2.7     | <u>73.5</u><br><u>-2.1</u> | 69.9<br>+0.3               | 67.7<br>-0.1   | 73.9<br>+0.4   | 61.6<br>+0.3   |                   |

\*  $\delta$ -value: internal dioxane as  $\delta$  67.4\*\* A.S. Perlin et al., Can. J. Chem. 48 2596 (1970),  $\delta$ -value: CS<sub>2</sub> as  $\delta$  193.5

Table 2.

Me- $\alpha$ -L-guloside 及び BLM の gulose 部位の  $^{13}\text{C}$ -chemical shift

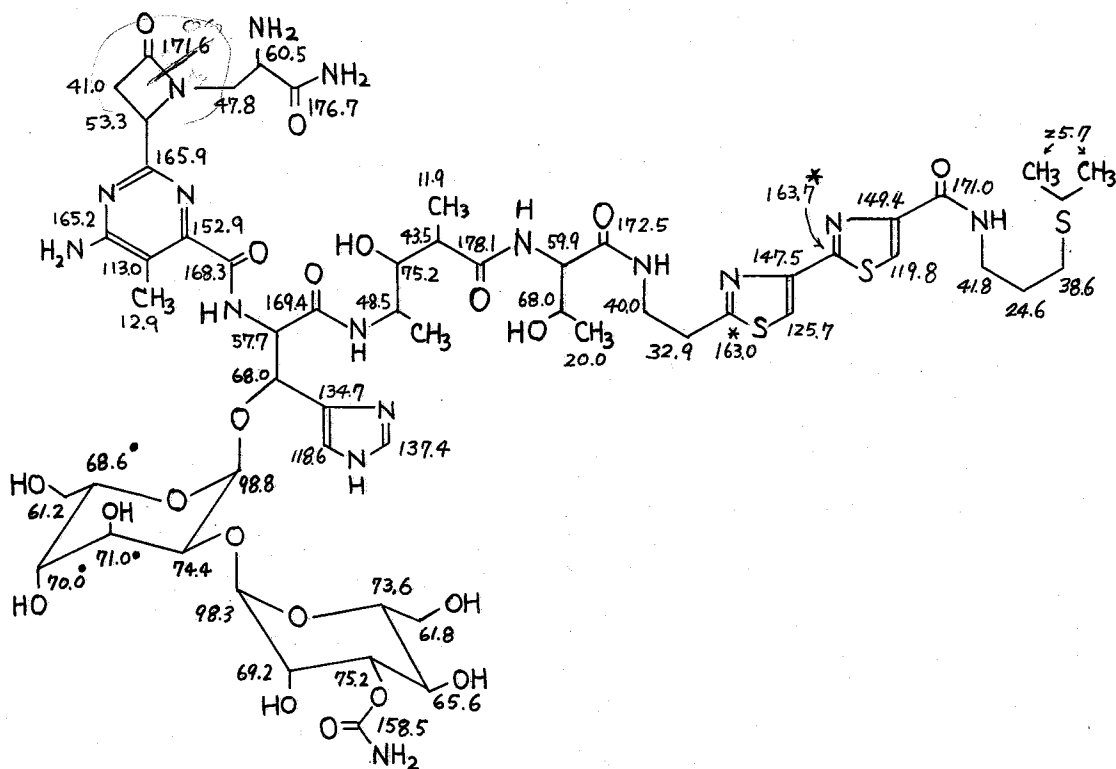
| Carbon          | Me- $\alpha$ -L-galactoside* | Interaction*                                       | Expected shielding*   | Me- $\alpha$ -L-guloside | Gulose moiety of bleomycin |
|-----------------|------------------------------|--|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1               | 100.5                        | O// O-3, -O// H-3                                  | +, -                  | 100.4                    | 98.9                       |
| 2               | 70.6                         | adj.3,   | +                     | 65.5                     | 74.4                       |
| 3               | 70.9                         | { ax.0, O// O-1<br>O// H-5, -O// O-4<br>-H// O-1 } | { +, +<br>+, -<br>- } | 71.4                     | 71.0                       |
| 4               | 69.6                         | adj.3, -O// O-3                                    | +, -                  | 70.4                     | 69.9                       |
| 5               | 71.9                         | H// O-3  | +                     | 67.3                     | 68.6                       |
| 6               | 62.5                         | O  | 0                     | 62.0                     | 61.2                       |
| CH <sub>3</sub> | 56.3                         |  |                       | 56.3                     |                            |

\* A.S. Perlin et al., Can. J. Chem. 48 2596 (1970)



アミノ酸部分の帰属は前述の構成アミノ酸、フラグメント、誘導体の測定値を考慮して決定されたが、構成アミノ酸の chemical shift のみからでは、それらより構成されるペプチドの帰属ができないことがここにも示された。かくしてすべての試料の chemical shift が帰属された。これらを一枚の表にまとめた。(これにわいわいわはBLMの<sup>13</sup>C-chemical shift mapと名付けた。) このmapにはchemical shiftに遠隔部位の影響が反映されている。この原因を解明することによりBLMのconformationに関する情報が得られると思われる。

BLM-A<sub>2</sub>の帰属を一例として示す。



<文献>

1. 梅沢栄夫, 芝哲夫, 滝田智久 編集, 「微生物のつくる生理活性ペプチド」P. 76~92, 共立出版 (1976)
2. Y. Muraoka, H. Kobayashi, A. Fujii, M. Kunishima, T. Fujii, Y. Nakayama, T. Takita & H. Umezawa, J. Antibiotics, 29, 853~856, (1976.)
3. a) K. Bock, I. Lundt & C. Pedersen, Tetrahedron Lett., 1037~1040, (1973)  
b) K. Bock & C. Pedersen, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 293, (1974)

ポルフィリン鉄錯体のNMR(オ8報)

P-3-4

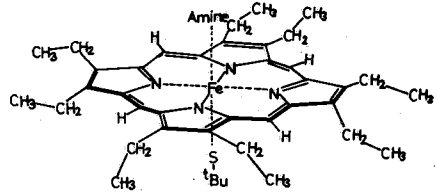
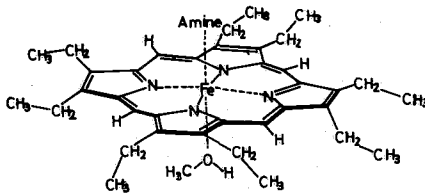
異, た配位子を持つヘム錯体のNMR.(II)

(京大・工) 森島 績・松本 榮造・犬伏 俊郎・米沢 貞次郎・

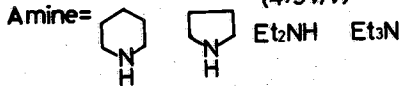
生越 久靖・杉本 博司・吉田 善一

〔序〕ヘム蛋白質・ヘム酵素は、生体内に広く分布し、夫々個々の重要な役割を果たしており、その補欠分子族としてポルフィリン鉄錯体を含むものである。数年来、我々は220MHz<sup>1</sup>H-NMRにおけるヘム側鎖の常磁性シフトを用いて、ヘム蛋白質の機能と構造の関係を追求して来た。さらに、これらのモデル化合物として、アポ蛋白部分を持たないポルフィリン鉄錯体を取り上げ、

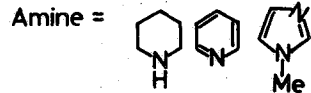
その常磁性シフトから、ヘム環及び各種配位子の電子状態ならびに、鉄-配位子間の結合状態に関する知見を得て来た。前回<sup>1)</sup>では天然のヘム蛋白質における



OEP(Fe<sup>3+</sup>)(MeOH)(Amine) in CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD (4:3v/v)



OEP(Fe<sup>3+</sup>)(S<sup>t</sup>Bu)(Amine) in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>



ヘム部分の役割を考察する目的で (1) OEP(Fe<sup>3+</sup>)(MeOH)(Amine) *high spin* (2) OEP(Fe<sup>3+</sup>)(S<sup>t</sup>Bu)(Amine) *low spin* を考察する目的で、図1の錯体が、Amineを添加した場合の中間体として存在し得ることを、<sup>1</sup>H-NMRの結果から、明らかにした。

今回は、220 MHz FTNMRを用い、これまで、非常に大きなシフトのため観測出来なかった、OEPのメリアプロトン及び配位子S<sup>t</sup>Bu基のシグナルを含め、全てのシグナルについて、特に、OEP(Fe<sup>3+</sup>)(MeOH)(Amine)系では、メタノール・アミンの濃度依存性から、この混合配位子系における錯形成のメカニズムについて新しい知見を得たので報告する。メタノールが少量の場合には、アミン添加による配位子の交換は、NMRの観測時間よりも遅く、このことが有用な結果を与えた。

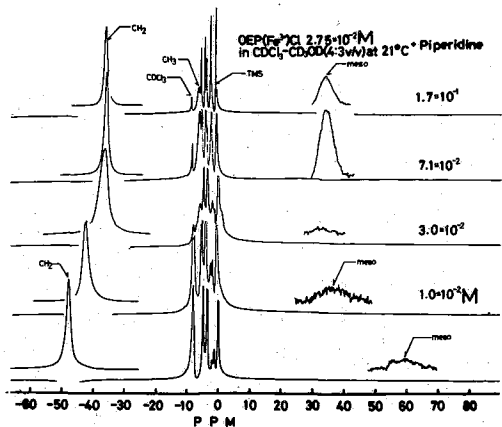


図2. CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD 混合溶媒中において、ピペリジンを添加した場合のCH<sub>2</sub>シグナルの高磁場シフト。

【結果と考察】

(I) OEP(Fe<sup>3+</sup>)(MeOH)(Amine) 高スピン錯体。

もりしま いさお・まつき えいろう・いぬがし としろう・よねざね ていじろう  
おごし りまのぶ・あぎもと ひろし・よしだ ぜんいち

前回報告したように、メタノール-クロロホルム  
混合溶媒中では、 $\text{OEP(Fe}^{3+})\text{Cl}$  は、 $\text{Cl}^-$

が  $\text{MeOH}$  との配位子交換が速い結果  
隣接エテル基間の束縛回転のため二  
重線として観測されるメチレンプロト  
ンは、その非等価性が失われ一重線へと  
変化した。これに種々のアミンを添加す  
ると、図2のごとく側鎖メチレンシグナル  
のシフトが観測され、しかもシグナルの  
位置から高スピン錯体であることが、明  
らかとなった。このことから、 $\text{OEP(Fe}^{3+})$   
( $\text{MeOH}$ ) (*Amine*) 高スピン錯体 (図5③)  
が形成されると結論した。今回、さらに

メタノールが少量の場合、アミンの添加を  
行なうと、図3のごとく二種の錯体に  
由来するメチレンプロトンが共存して、  
観測された。このことは、メタノールを少量  
添加した場合、アミン添加による配位子の交換が、  
NMRの観測時間よりも遅いことを示してい  
ると同時に、明らかに新しい高スピン錯体  
(図5, ⑤) が形成されたことを示してい  
る。次に、この状態の試料に、メタノール  
を添加してゆくと、図4のごとく、この  
新しい錯体にもメタノールが配位し、その  
結果メチレンシグナルは一重線となつて  
観測され、この場合、両錯体の間で  
配位子の交換が速いことを示している。  
一方、メタノールが存在しない場合には、  
アミン (ピペリジン・ピロリジン・ジエチルア  
ミン・トリエチルアミン) を添加すると、  
 $\mu\text{-oxo}$  錯体 (図5, ④) が形成される  
ことは前回<sup>4)</sup> 明らかにした。従つて、  
図3の新しい高スピン錯体 (図5, ⑤) は  
そのメチレンシグナルが二重線であるこ  
とから、メチレンプロトンの非等価性が保持さ  
れた錯体構造を示唆し (図5⑤)、メタノールは  
溶媒和している状態にあると解釈される。

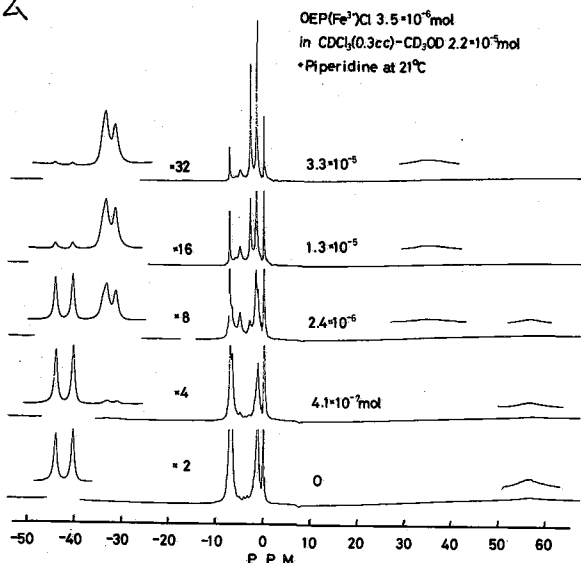


図3.  $\text{CD}_3\text{OD}$  少量の場合、ピペリジン添加により  
生ずる新しい高スピン錯体のスペクトル。

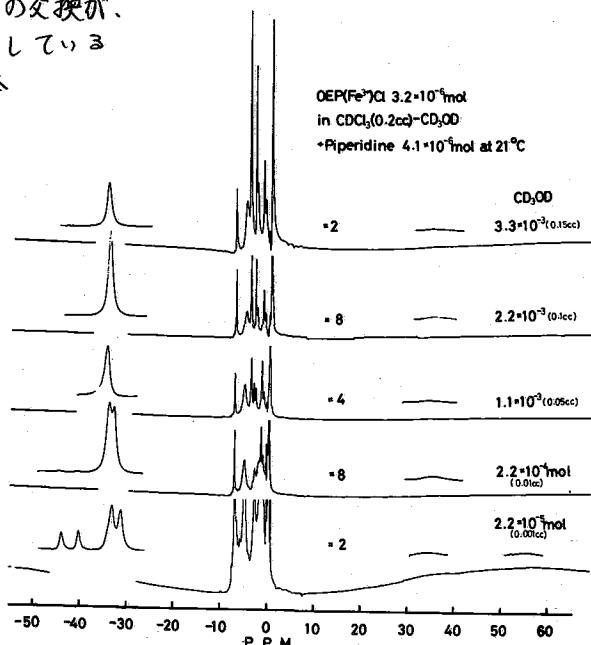


図4. 少量  $\text{CD}_3\text{OD}$  中において、ピペリジン添加に  
より生じた新しい錯体スペクトルの  $\text{CD}_3\text{OD}$   
濃度依存性。

以上の、メタノール、アミンの濃度依存性によるOEPメチレンプロトンの挙動から、図5の錯形成スキームが結論された。シグナルは、メチレンシグナルのパターンを示しており、メタノールが少量の場合、メタノールが溶媒和し、鉄原子とメタノールは破線で表わした。メタノール多量の場合、メチレンプロトンの非等価性は失われ一重線となり(図5.③)、この場合、

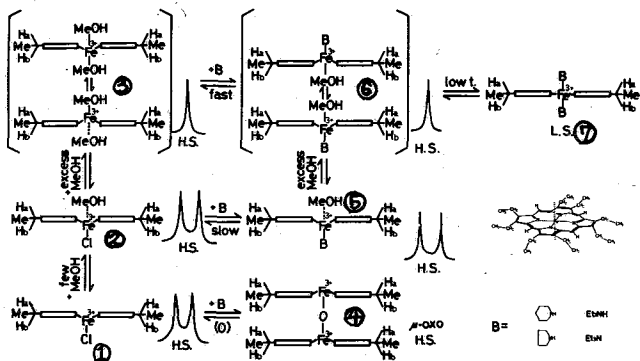
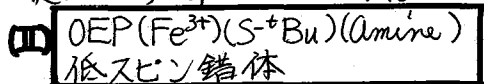


図5. メタノール及びアミンの添加により生じる反応のスキーム。

アミン添加による配位子交換はNMRの観測時間よりも速く、メチレンシグナルのシフトとして観測されるものと結論された(図5.③⇒④)。また、低温においてはOEP(Fe<sup>3+</sup>)(Amine)<sub>2</sub>低スピン錯体(図5.①)が形成され、図6のごとくピペリジンの各誘導体について配位子のシグナルが得られた。種々のメタル誘導体の結果および、シグナルの強度比ならびにpiperidine-d<sub>4</sub>との対比から、図8のごとく配位子ピペリジンの帰属が確定した。また、メタノール少量の場合(1)、多量の場合(2)、ビスピペリジン錯体(3) 共に、夫々キーラー則に従っており、単一のスピン状態である



チトクロムP450CAMは、λの生理機能の多様性ならびに、分光学的性質の特異性から、λの第五配位子の性質は、未だ不明確な点があり、ハム環の電子状態など、酵素活性機構との関連で未解決な問題が残っている。λここで、λのモデル錯体として合成されたOEP(Fe<sup>3+</sup>)S<sup>+</sup>Buを用いてアミン添加により、新しい錯体の形成が起こることをNMRにより検討した。OEP(Fe<sup>3+</sup>)S<sup>+</sup>Buを用いて、アミン添加により新しい錯体の形成が起こることをNMRにより検討した。OEP(Fe<sup>3+</sup>)S<sup>+</sup>Buは、トルエン溶媒中、OEP(Fe<sup>3+</sup>)αとは、異な常磁性シフトを示し、メチレン・メチルシグナルの常磁性シフトは示さず、さらに、これ

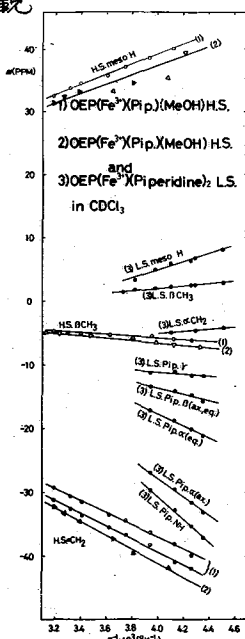


図7. 錯体(1)・(2)・(3)の温度依存性

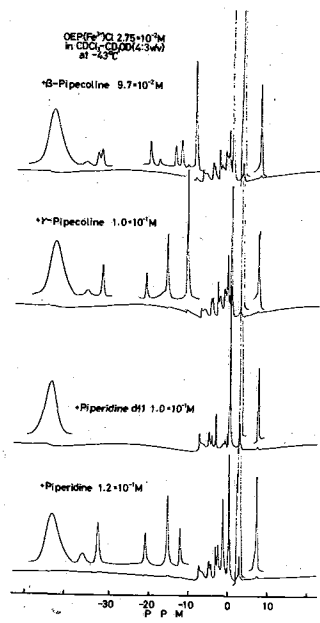


図8. ピペリジン誘導体を配位子とするビスアミン低スピン錯体のスペクトル

まで、高スピン錯体では、配位子のシグナルの観測は、常磁性シフトが大きく、シグナルの線幅が極端に広いため困難であったが、今回  $t\text{Bu}$  基のシグナルが低磁場側  $-92$  ppm に観測された<sup>(4)</sup> (図 8.9)。これに、アミンを添加すると、それだけ各シグナルの反磁性領域への移動として観測され、メチレンシグナルは、二重線のまま別々にシフトした。これは、隣接エテル基間の束縛回転によるメチレンプロトンの非等価性が保持されたままであり、軸方向における配位子の種類が異なる混合配位子系錯体であるものと解釈された (図 10)。さらに、 $t\text{Bu}$  基が配位したまま、オク配座にアミンが配位する平衡反応が起り、上記の結論を指示するものである。

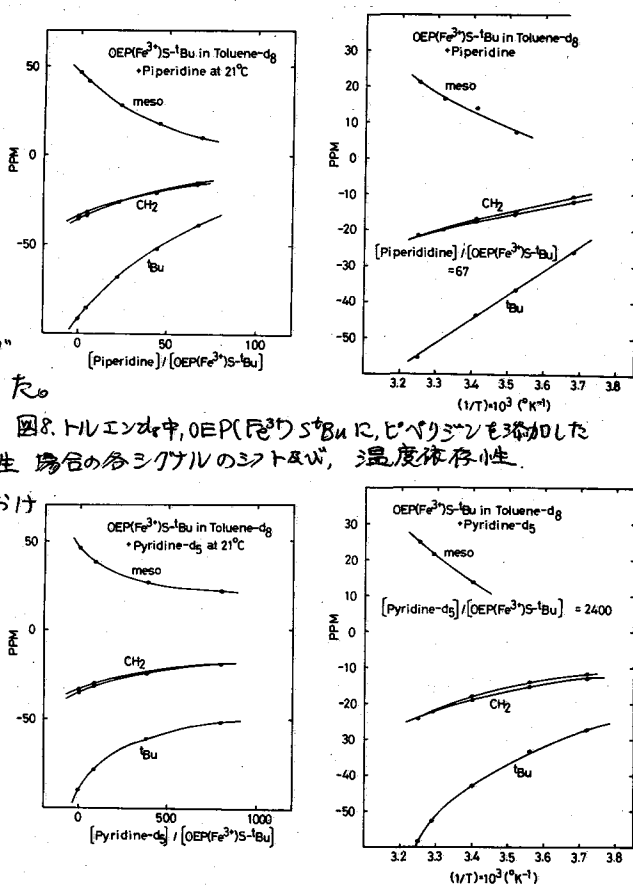


図5. ピリジン $d_5$ 添加によるシグナルのシフト及び温度依存性。

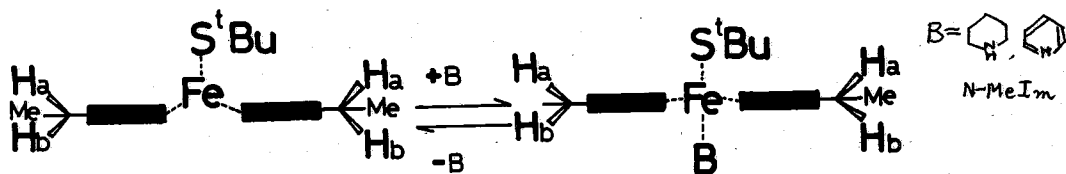


図10. アミン添加によっても保持されるメチレンプロトンの非等価性。

(文献)

- (1) 第14回 NMR討論会, p.215
- (2) W. S. Caughey, *Chem. Comm.*, 1362 (1969).
- (3) H. Ogoshi, H. Sugimoto and Z. Yoshida, *Tetrahedron Lett.*, 2289 (1975).
- (4) S. C. Vang, S. Koch, G. C. Papaethymiou, S. Foner, R. B. Frankel, James A. Ibers and R. H. Holm, *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 2414 (1976).

ヘム蛋白質のNMR(29)

P-3-5

— 4+クロームP450における基質の効果 —

(京大、工) 森島 纈, 大伏 俊郎, 小川 諭, 米沢 貞次郎  
(慶大、医) 石村 聖, 飯塚 哲太郎, 島田 秀夫

[序] ヘム蛋白質, ヘム酵素は鉄原子の酸化状態, あるいは種々の配位子との反応によって常磁性( $S=0$ )の電子配置を取り得る。この場合, NMR法では, ヘム側鎖, ならびにヘム周辺に位置するアミノ酸残基のプロトンシグナルが, 大きな常磁性シフトを与え, 複雑な蛋白部分のシグナル領域から分離して観測でき, その同定が比較的容易となる利点をもつ。既に, 我々はこの常磁性シフトが, 酸化状態, 配位子効果, pH効果, イオン強度の変化などによって引き起される,

ヘム鉄の電子状態, とりわけ, 軸配位子の化学的性質, ならびにヘム近傍の僅かな構造変化を極めて鋭敏に反映し, ヘム蛋白質の構造と機能との関連を調べることが有効な手段であることを明らかにして来た<sup>1)</sup>。さらに, NMRシグナル検出の感度向上によって, 試料の大量調製が困難なヒモヤ, 酵素自体の不安定さのため, 本方法が適用できなかった広範なヘム酵素への拡張, 発展が可能となった。今回

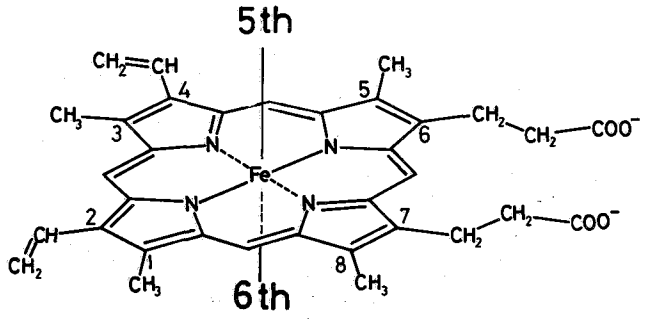


図1. プロトヘムIXの化学構造

取り上げた, D-カンファーによって誘導される緑膿菌(*Pseudomonas putida*)の4+クロームP450(以下, 単にP450と略記)は分子量約45,000, 一分子あたり一個のプロトヘムIX(図1)を含むモノオキシゲナーゼの一つであり, 分離・精製が可能だから, その反応機構(図2)等の生化学的知見や, 分子物性的知見も多く蓄積されて来ている。一般にP450は動物組織や細菌などに広く分布し, 前者ではステロイドホルモンの代謝や, 薬物の解毒作用等, 多種類の生理的に重要な反応を触媒するのみならず, 分光学的性質が一般のヘム蛋白質と大きく異なる点で, 特に注目を集めて来た<sup>2)</sup>。そこで今回は, 図2に見られる反応サイクル中の種々の酸化状態やスピン状態での<sup>1</sup>H NMRスペクトルを測定し, 主にヘム側鎖メチルシグナルに着目しながら, 内来性配位子(オキ配座)の化学的性質や, 本酵素に対する基質の効果を検討した。

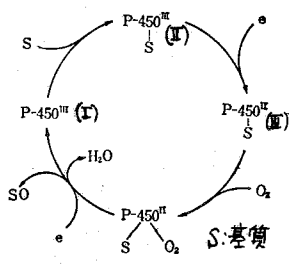


図2. P450の反応サイクル

[実験] <sup>1</sup>H NMRの測定には, Nicolet社製TT-100 FTシステムを付属した Varian HR-220 分光器(220MHz)を用い, 試料濃度は通常, 0.5 mM ~ 2 mM, 90°パルス(35 μsec), ±20 KHz 周波数領域をQPDモードで測定した。積算回数は通常 10,000 ~ 100,000の間であった。

もりしま いさあ, いぬがし としろう, おがわ さとし, よねざわ ていじろう,  
いしむら ゆずる, いいづか てつたろう, しまた ひであ

[結果と考察]

1. 4-クロム P450における配位子効果と内部配位子の性質

a. 酸化型高スピンP450の<sup>1</sup>H NMR.

図3は基質D-カンファー存在下の酸化型高スピン( $\delta = 5/2$ ) P450 (図2-II) の種々の温度における各磁場側スペクトルを示している。A~Dの4個の $\alpha$ シグナルはその強度比からヘム側鎖の4個のメチル基に帰属でき、20°Cで、それぞれ、61.8, 59.1, 41.1, 36.7 ppm (DSS基準)であった。また、これらのシグナルはキュリー則に従う温度依存性を示すことから、明らかに常磁性シフトに基づきことが分かる。一方、このメチルシグナルのシフトを、他の酸化型高スピンヘム蛋白類と比較したものが図4である(太線がメチルシグナルを表す)。外葉性配位子の非存在下におけるミオグロビン(Mb)・D<sub>2</sub>O、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)とP450と比較すると、前二者におけるメチルシグナルの常磁性シフトが類似しているのに対し、P450は全く異ったシフトを与え、内部配位子の種別が、前二者のヒスチジン・イミダゾール基と異なることを示唆する。また、Mbの場合、メチルシグナルの常磁性シフトは、分光化学系列における配位子の強さの順に小さくなり、常磁性シフトの比較的小さいはP450はかなり強い内部配位子を持つことが推察される。

b. 酸化型低スピンP450の<sup>1</sup>H NMR.

基質存在下の酸化型P450は、種々の配位子と反応し、低スピン型のヘム蛋白類を与える。図5は、Mb, HRP, P450のシアノ誘導体の他、高磁場側スペクトルの比較を示す。P450で、メチルシグナルの常磁性シフトが特に小さい点が注目され、高スピン型(図2-II)の場合と同様、第五配位子がMb, HRPと異なることが示唆される。また、P450の場合、CN<sup>-</sup>, N-MeIm, MP(メチラポン), Py, t-BuNC等の配位子で、25ppm付近のメチルシグナルは配位子によってあまり差が見られず(5ppm以内)、Mbに比べてその変化は明らか

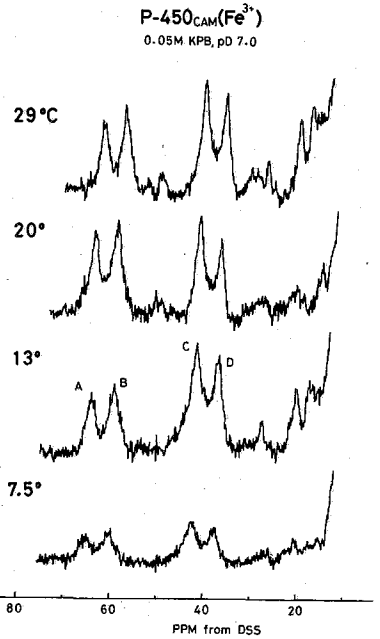


図3. 酸化型高スピンP450の2ボルトの温度依存性

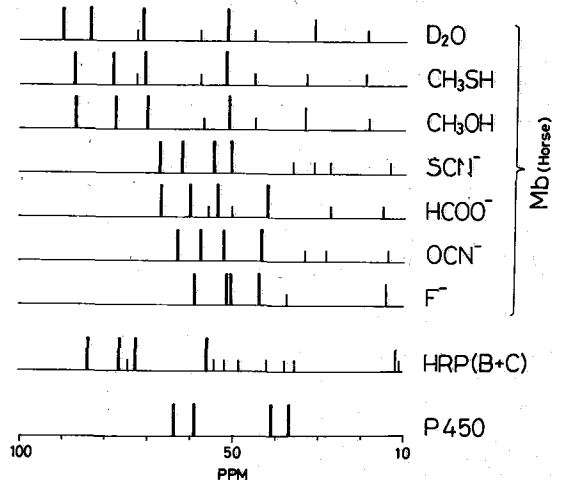


図4. Mb, HRP, P450における常磁性シフト比較

かに小さい。これはオキ五配位が強い(オキ  
来性の配位子の影響を受けにくい)ためシ  
フトが小さいことに対応していると解釈で  
きる。

c. 環元型高スピン P450 の  $^1\text{H NMR}$

図2のIIIに対応する環元型高スピン状態  
P450 ( $\text{Fe}^{2+}$ ), ( $S=2$ ) のスペクトルを図6  
に示した。ヘム側鎖×4ルシグナルは、低  
磁場側, 27.35, 19.98, 17.27 ppmに  
A~Cとして3種類観測できる。一方,  
Mb  $\alpha$  場合, ×4ルシ基の常磁性シフトは  
P450 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) よりも小さく, 16.85, 14.20  
, 11.44 ppmであった。 $S=5/2$  の Mb ( $\text{Fe}^{2+}$ )  
・ $\text{D}_2\text{O}$  (図4) に比較して, 有効ボーア磁  
子数のあまり変わらない Mb ( $\text{Fe}^{2+}$ )  $\alpha$  シフト  
が著しく小さい ( $S=1/2$  の Mb ( $\text{Fe}^{2+}$ ) $\cdot\text{CN}$   
よりも小さい) ことは, 環元型で鉄原子  
が, ホルフィリン面内より0.7Å 浮き  
上っているため, ヘム環へ電子スピンの  
伝達が起こりにくいと考えられている。一  
方, P450 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) と P450 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) を比べよ  
るとその差は, Mb  $\alpha$  のそれより小さく, 鉄原  
子の位置が, Mb  $\alpha$  より面内よりもズレて  
いないことに基づくものか, あるいは,  
環元型でオキ五配位が醗化型の場合と異  
なることが推定される<sup>3)</sup>。

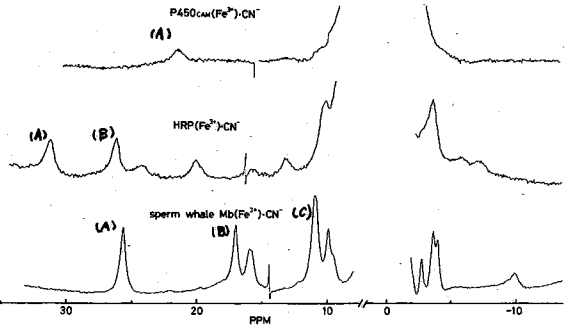


図5. P450, HRP, Mb  $\alpha$  1H NMR スペクトル

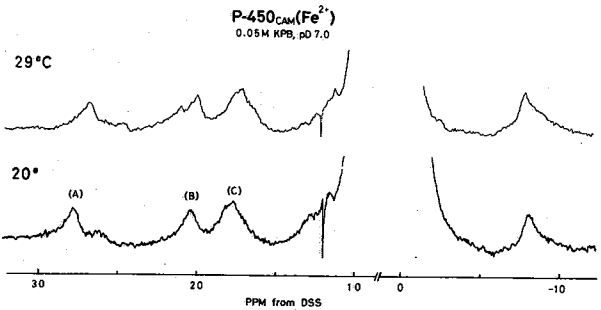


図6. P450  $\alpha$  環元型高スピンの  $^1\text{H NMR}$ .

2. 4トクローム P450 における基質

D-カンファ- $\alpha$ 効果

a. 醗化型 P450 におけるスピン状態  
の変化

図7-aは基質存在下の高スピン型 P450  
 $\alpha$  スペクトルであるが, 図2-Iに対応す  
る基質非存在下の醗化型 P450 (-CAM) は,  
図7-bに示す様に低磁場側, 20.00,  
と 14.91 ppm に2本のヘム側鎖×4ルシ

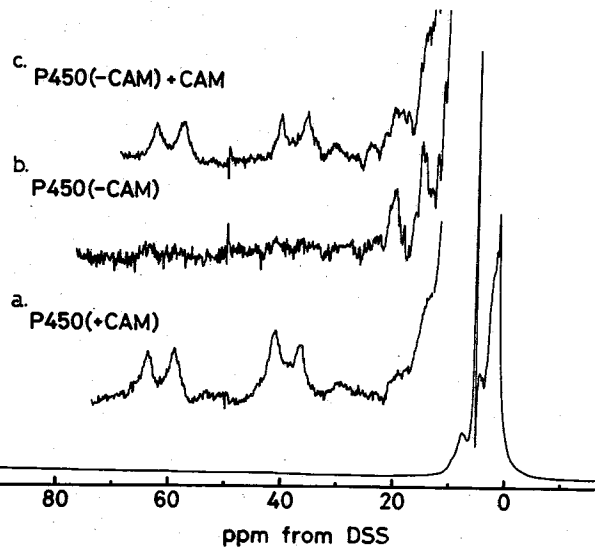
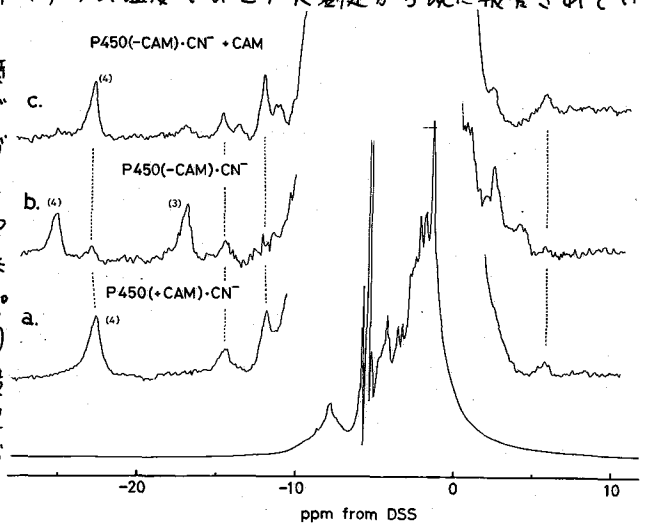


図7. 基質の有無による P450 ( $\text{Fe}^{2+}$ )  $\alpha$  スピン状態の変化。  
a. 基質結合型, b. 基質非結合型, c (b) に基質を添加  
したものの。



グナルを与え、その常磁性シフトが小さいことから低スピン型の P450 と考えられる。この試料に基質 D-カンファーを添加すると、低スピン型のシグナルは消失し、酸化型高スピンの P450 に変化し (図 7-C), もとの基質結合型スペクトルを与えた。この基質存在の有無によるスピン状態の変化は、液体ヘリウム温度での EPR 測定から既に報告されているが、同じ変化が常温においても起っていることを示している。また、基質非結合型 P450 (-CAM) の  $\times 4$  ルシグナルが、P450 (Fe<sup>3+</sup>)-CN ( $\delta = 1/2$ ) のシグナルより、その線幅が極端に広いことに注目される。また、これは Mb にアルキルチオレート (RS<sup>-</sup>) を添加した Mb (Fe<sup>3+</sup>)-RS<sup>-</sup> ( $\delta = 1/2$ ) のプロトンスペクトルに極めて類似し、P450 (-CAM) の軸配位子が S<sup>2-</sup>, His の可能性を示唆するものである。即ち、基質非結合型では軸配位に His 等の強い配位子が存在するものと考えられる。



b. P450・シアノ誘導体における基質の効果

図8. 升コロム P450(Fe<sup>3+</sup>)-CN の基質添加効果。(a) 基質結合型, (b) 基質非結合型 (c), (b) に基質を添加した。

図 8 は P450 シアン化物に対する基質の効果を示している。図 8-a は基質存在下のスペクトルで、22.62 ppm に  $\text{h}$  側鎖の  $\times 4$  ル基が、14.46, 11.91 ppm に夫々 1 個分、及び 2 個分のプロトンに由来するシグナルが観測された。この試料から基質をはずしたもののスペクトルが (b) である。一部基質結合型のシグナルも検出されるが、26.00, 17.82 ppm に基質非結合型に特徴的な  $\times 4$  ルシグナルが見られ、同じ  $\delta = 1/2$  のシアノ誘導体においても基質の有無でスペクトルに差を生じている。さらに (b) に再び基質を加えるともとのスペクトル (a) にもどる (図 8-c)。 (b), (c) の差は基質導入による蛋白部分の構造変化が、 $\text{h}$  鉄の電子状態を変化させていることは明らかである。即ち、基質非結合型の  $\times 4$  ルシグナルの常磁性シフトが結合型に比べ大きい (新に  $\times 4$  ルシグナルが出現している) ことは、 $\text{h}$  環に鉄原子からより多くの電子スピンの残ったものと考えられ、逆に基質結合によってその流れ方が小さいこと、即ち、鉄原子上により多くの電子スピンの残っているものと推察できる。この点、オキシゲナーゼ反応における酸素活性化のメカニズムと関連して興味を持たれる。

[文献] 1) 森島ら J. Amer. Chem. Soc., 96, 5297 (75), 2) Ed. O. Hayashi, "Molecular Mechanism of Oxygen Activation." Academic Press, New York 1974, 3) R. Tsai, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 66, 1157 (1970), 4) R. Chiang, et al., Biochem., 14, 4166 (1975)

(国立がんセンター研) 齊藤 肇, 大木豊和, 佐々木琢磨

(1) はじめに

抗腫瘍性を示す種々のゲル状の分枝(1→3)-β-D-グルカンが単離され、その構造はいしほコンホメーションと、抗腫瘍性活性との相関関係が示唆されている。その一つの証拠は、しいたけから得られた抗腫瘍性多糖レンナン<sup>1</sup>の部分分解物の抗腫瘍活性は、高次構造を作りやすい低分子量では著しく失われることである。われわれは、その1において、直鎖(1→3)-β-D-グルカンの一本鎖ヘリックスの<sup>13</sup>C NMRスペクトルの帰属を行った。さらに、分枝(1→3)-β-D-グルカンの側鎖のうち、フレキシブルな disordered 構造をとるものの<sup>13</sup>C NMRスペクトルの測定を行った。これらの結果をもとに、抗腫瘍性多糖レンナン<sup>2</sup>、シゾフィラン、A<sub>3</sub><sup>3</sup>のゲル構造における主鎖、側鎖のコンホメーションについて<sup>13</sup>C NMRから得られる結果を報告する。

(2) 実験方法

<sup>13</sup>C NMRの測定は、日本電子 PFT-100/EC-100 スペクトロメーターによる。測定条件はその1とほぼ同じである。試料の詳細は表1にまとめた。

表1. GEL-FORMING BRANCHED (1→3)-β-D-GLUCANS WITH ANTI-TUMOR ACTIVITY

(3) 実験結果と考察

A. DMSO-d<sub>6</sub> 溶液

その<sup>13</sup>C スペクトル

DMSO-d<sub>6</sub>、またはPD>13.2での水溶液中では、ランダムコイル状態の挙動を示し、高次構造に関する情報が失われる。図1に、表1の各種分枝(1→3)-β-D-グルカンの<sup>13</sup>C

|                                       | MAIN-CHAIN | SIDE-CHAIN         | ANTI-TUMOR ACTIVITY.. |
|---------------------------------------|------------|--------------------|-----------------------|
| A <sub>3</sub> (PLEUROTUS OSTREATUS)  | β-(1→3)    | α-(1→4)            | +++                   |
| LENTINAN (LENTINUS EDODES)            | β-(1→3)    | β-(1→3)<br>β-(1→6) | +++                   |
| FRACTION IV (LENTINAN)                | β-(1→3)    | β-(1→3)<br>β-(1→6) | +++                   |
| SCHIZOPHYLLAN (SCHIZOPHYLLUM COMMUNE) | β-(1→3)    | β-D-GLUCOSE        | +++                   |

M R スペクトルを示す。側鎖にあるグルカンの種類の差にかかわらず、図1の<sup>13</sup>C NMR スペクトルパターンは極めてよくていえるのが特長である。主鎖のβ-(1→3)-β-D-グルカンのC1-C6、および分枝点のC5', C6' (β-D-(1→3)結合)で矢印をつけたもののみである(次ページ図1の下に構造式参照)。β-グルコース、β-(1→6)結合の側鎖β-グルコースは、β-7強度の大きい主鎖のβ-(1→3)シグナル中に重なり、DMSO-d<sub>6</sub>溶液中では識別するのは困難である。C5', C6' β-7の帰属は、グリコシド結合生成にもとづく<sup>13</sup>C化学シフトの変化から、決定することができず、ここではTi, NOE測定結果にもと

さいとう・はじめ, おおき・とよかず, ささき・たくま

すいた結論について述べることにする。  
 下図の構造式から明らかなように、  
 枝分れしていない所でのC6と、分岐点  
 でのC6'ではCH<sub>2</sub>OHの内部回転の自由  
 度が異なるため、T<sub>1</sub>, NOEに差異がで  
 るはずである。T<sub>1</sub>値は極小値の右側に  
 あるため、mobilityが下がるとT<sub>1</sub>値は  
 大きくなる。(表2)。またNOE値の減少  
 も、C6, C6'間での違いも明確にあらわ  
 している。C5, C5'の間には有意差は  
 見出せない。主鎖のその他の炭素に因

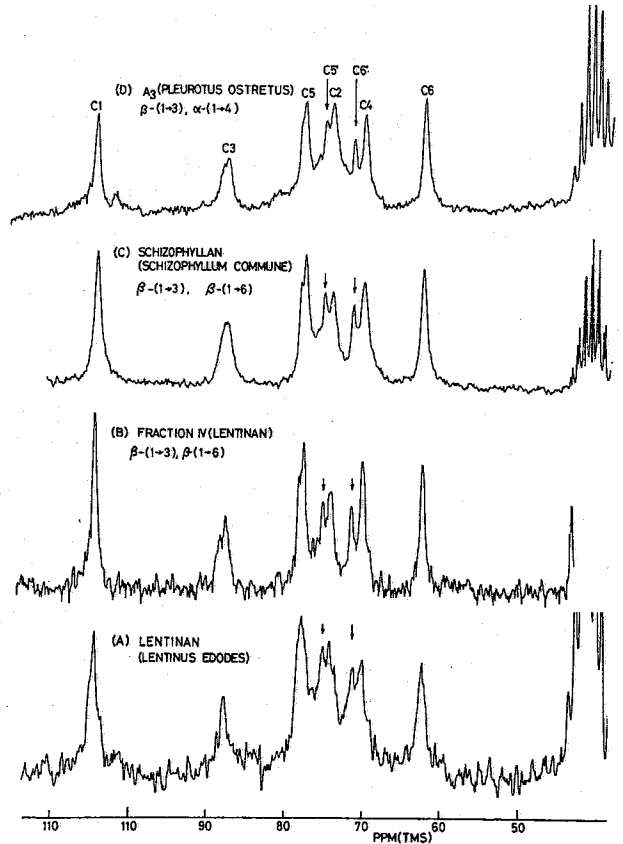
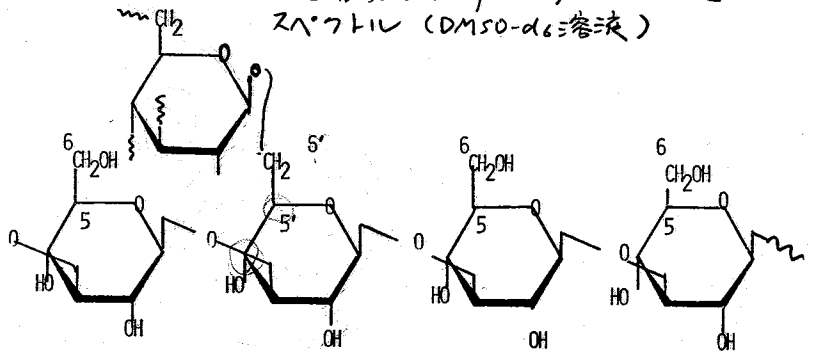


表3. A<sub>3</sub>の主鎖β-(1→3)結合のT<sub>1</sub>, NOE値の  
 DMSO-D<sub>6</sub> SOLUTION

| BACKBONE (β-(1→3))   |     |            | SIDE-CHAIN (α-(1→4)) |
|----------------------|-----|------------|----------------------|
| T <sub>1</sub>       | NOE | LINE-WIDTH | LINE-WIDTH           |
| 95 (63) <sup>c</sup> | 1.5 | 22         | 28                   |
| 91 (49)              | 1.4 |            |                      |
| 71 (44)              | 1.6 | 42         |                      |
| 84 (44)              | 1.4 | 31         | ~94                  |
| 97 (55)              | 1.5 | 33         |                      |
| 100 (68)             | 1.9 | 22         |                      |

図1. 各種分岐(1→3)-β-D-グルカンの<sup>13</sup>C NMR  
 スペクトル (DMSO-d<sub>6</sub>溶液)

るT<sub>1</sub>, NOE, 線幅は  
 A<sub>3</sub>について表3に示す。  
 相対時間τは, 0.26 × 10<sup>-7</sup>  
 (T<sub>1</sub>), 0.36 × 10<sup>-7</sup> (NOE),  
 0.2 × 10<sup>-7</sup> (T<sub>2</sub>), 0.39 ×  
 10<sup>-7</sup> (T<sub>1</sub> at 15 MHz) だ  
 0.2 - 0.4 × 10<sup>-7</sup> sで極小  
 値より低温側にある。



B. ゲル状態のスペクトル

前節の結果とは異なり、  
 水中でのゲルの<sup>13</sup>Cスペ  
 クトルは種類によつて著し  
 く異なる。これは、主  
 鎖のβ-(1→3)結合に由  
 来するピークが図2, 図  
 3に与えられるように、

表2 分岐点におけるNT<sub>1</sub>, NOE

|                                       | C-5             |     | C-5'            |     | C-6             |     | C-6'            |     |
|---------------------------------------|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|
|                                       | NT <sub>1</sub> | NOE | NT <sub>1</sub> | NOE | NT <sub>1</sub> | NOE | NT <sub>1</sub> | NOE |
| LENTINAN (DMSO-D <sub>6</sub> )       | 93 msec         | 1.2 | 81 msec         | 1.3 | 86 msec         | 1.5 | 126 msec        | 1.1 |
| LENTINAN (0.35M NaOH)                 | 76              | -   |                 |     | 115             |     | 190             |     |
| A <sub>3</sub> (DMSO-D <sub>6</sub> ) | 97              | 1.5 | 89              | 1.3 | 100             | 1.9 | 196             | 1.4 |

消滅する。図2の上段のスペクトルは側鎖の  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)結合にもとづくもので、側鎖としてフレキシブルである。したがって、側鎖の同定にはゲル状態での<sup>13</sup>C NMR測定が有用である。<sup>2,3)</sup> 主鎖の  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)結合にもとづくピークがゲル状態で観測されるのは、ordered conformationを形成し、相対時間が  $10^{-5}$  秒程度になるからである。しかし、下の1でのべたように直鎖(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンではかなり多くの一本鎖ヘリックスが観測されている。分岐グルカンでは一本鎖ヘリックスがみられるのは、3~5残基あたりの側鎖同士の相互作用と、側鎖と有する一本鎖ヘリックスの mobility が著しく減りやすいため、両方の理由に基づくものと思われる。主鎖のヘリックスがランダムコイルに転移し

は他アルカリ濃度(0.03M~0.06M)で、図2、図3の中段に示すようにPS 13140で昇圧した一本鎖ヘリックスピークが出現することがわかる。このことは、上で指摘したようにゲル構造において、側鎖同士の会合により分子の結合が重要な役割をはたしていることを明確に示している。さらに、図4にみごとく、NaOH添加と変化すると、下の1でのべたヘリックス。コイル転移と異なり uncooperative に転移が進み、ランダムコイル(D)に到達するまでにピークパターンが変化している。特に、Cでは、ピークC、 $\alpha$ とヘリックス、コイルの二状態のピークが33Hzはなれて観測され、

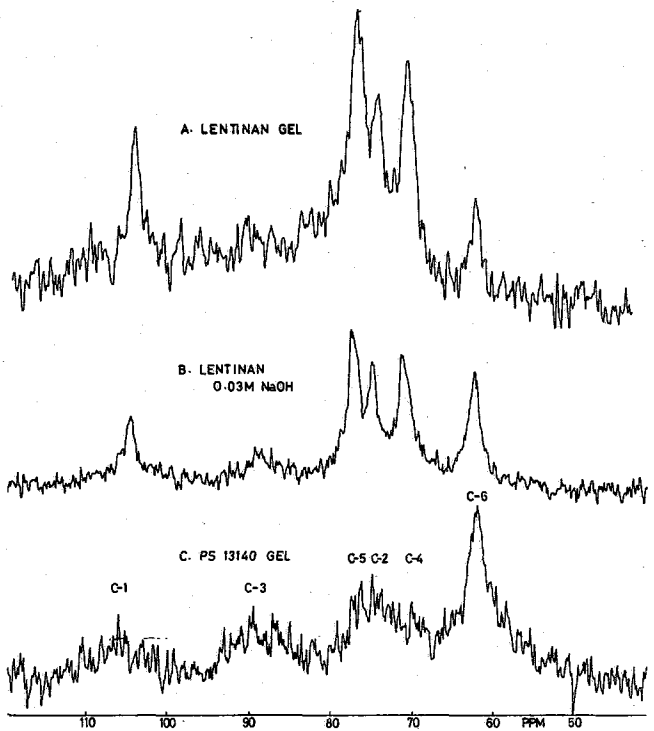


図2. レンチナン・ゲルの<sup>13</sup>C NMR  
SCHIZOPHYLLAN  
 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), D-GLUCOSE

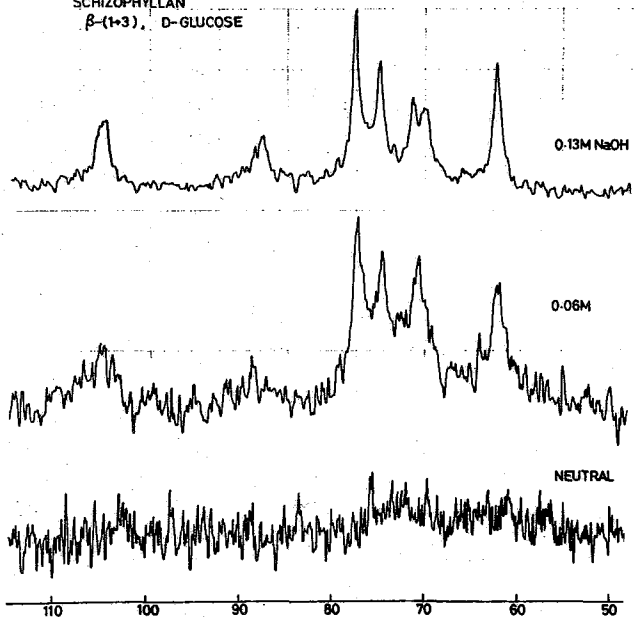
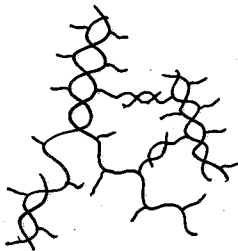


図3 シンフィラン・ゲルの<sup>13</sup>C NMR

交換速度は0.014秒より速くはな  
 じがわかる。uncooperativeに進む  
 由は、側鎖同士の相互作用が不  
 利な側にならなくなるためであ  
 る。図3のシフトランに於いて  
 も、事情はほぼ同じである。

分岐ゲルカンのゲル構造を模式的にか



くと上図のようになるとある。その  
 一を詳しく述べたように、一本鎖  
 による多重ヘリックスから分子  
 鎖同士の結合の他に、側鎖間の  
 多重ヘリックスによる分子鎖の  
 結合が、上に述べたようにあり  
 得るわけである。しかし、分子  
 鎖間の結合に参加していない側  
 鎖は、基本的にはランダムコイル  
 をとる。表4

に示す  $T_1$ , NOE, 特に線幅は表3  
 に与える DMSO- $d_6$  中のランダム  
 コイル状態の値に近い。シフト  
 ランのように側鎖が一何の  
 グルコースから成るものは、分  
 子内回転の自由度が十分得られ  
 ないために、ゲル状態のスペク  
 トルが観測されるわけである。

文献) (1) Sasaki, T. et al, Gann.  
 62, 191 (1976), (2) 斎藤, 千原, 佐林

生体分子の構造討論会講演要旨集 (1975), (3) 斎藤, 吉岡, 福岡, 第14回NMR討論会  
 講演要旨集; FEBS Lett., in press.

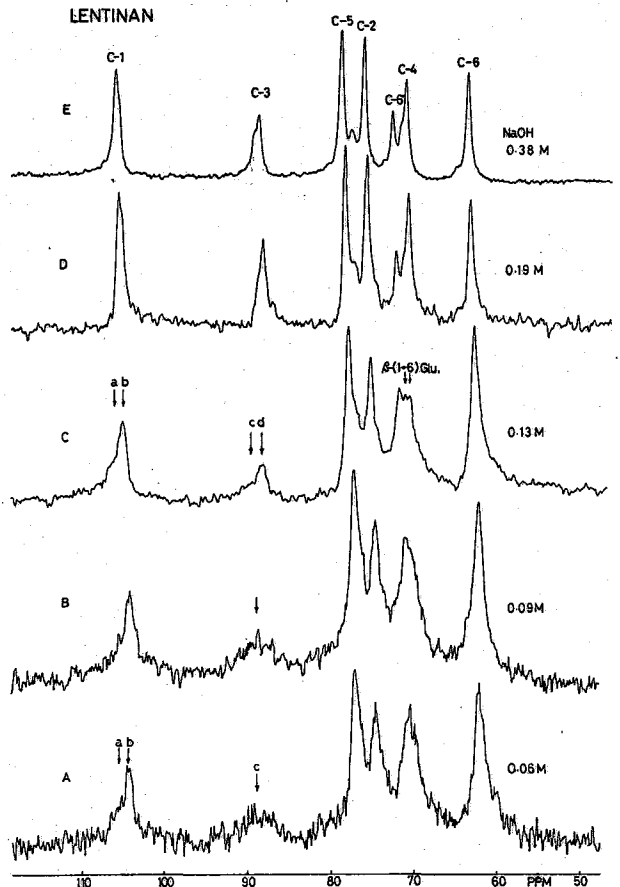


図4 レンチナンのヘリックス-コイル転移

表4 ゲル状態の側鎖の  $T_1$ , NOE, 線幅  
 (A<sup>3</sup>) (レンチナン)  
 SIDE-CHAIN ( $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)) SIDE-CHAIN ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6))

|     | $T_1$ | NOE                    | LINE-WIDTH | $T_1$ | NOE | LINE-WIDTH |
|-----|-------|------------------------|------------|-------|-----|------------|
| C-1 | 76    | 1.4 (1.4) <sup>B</sup> | 18         | 64    | 1.3 | 28         |
| C-2 | 78    | 1.4 (1.3)              | 34         | 70    | 1.1 | 50         |
| C-3 | 78    | 1.3 (1.2)              | 29         | 70    | 1.5 | 50         |
| C-4 | 78    | 1.2 (1.3)              | 34         | 46    | 1.4 | 55         |
| C-5 | 78    | 1.4 (1.3)              | 34         | 70    | 1.5 | 55         |
| C-6 | 112   | 1.6 (1.6)              | 20         | 92    | 1.4 | 55         |

## 〔序〕

生体中の水は人体では体重の約60%をしめ、細胞内液および細胞外液に区別され、各種臓器での水分画の比率は異なる。この細胞内・外液量の測定は細胞内に透過しない物質の稀釈率などから計算され、医学的に重要な意義をもつ。たとえば腎疾患における足の浮腫や脳の酸素欠乏による神経細胞の腫化などの現象は、水の分布の変化によるものとされている。この解析のために浸透圧による細胞体積の変化の測定や、これに基づいた結合水の存在などが報告されている。H-NMR法はこの水の状態や分布を短時間に、非破壊的に測定可能な生体にとって理想的な研究方法である。今回、筋組織中の水につき、その横緩和時間 $T_2$ と凍結水について報告する。Bratton et al.<sup>2)</sup>はcw-NMR法により筋肉のスペクトルは単一のbroadな水のシグナルよりなり、その半値巾が強縮時に狭くなり、pulse-NMR法にてその $T_2$ の長くなることを報告している。一方、近年Belton et al.<sup>3)</sup>およびHazlewood et al.<sup>4)</sup>は、pulse-NMR法により筋肉の水の横緩和は3成分の指数関数的減衰に分離でき、蛋白質などの水和水、細胞内液および細胞外液に対応すると報告している。故にこれらの追試をなし、特に筋収縮時における水の挙動を明らかにすべく基礎的な実験を行なった。

## 〔方法〕

装置はJOEL PFT-100 NMR ( $\omega_0 = 100 \text{ MHz}$ )で90°パルス中は約28 $\mu\text{sec}$ である。温度制御は温度可変装置VT-3Cを用いた。試料はカエル大腿部の筋肉と腓腹筋の神経・筋標本を用いた。筋強縮刺激は白金電極を通じ1V, 0.5 msecのパルスを50Hzで神経に与えた。筋肉はRinger液(0.65% NaCl, 0.01% KCl, 0.025% CaCl<sub>2</sub>, 0.01% NaHCO<sub>3</sub>)にたもち、測定直前にとりだし、沪紙にてふいた後測定した。

## 〔結果および考察〕

## I. 筋組織中の水の測定について。

筋組織中の水測定に際し、組織以外の水を沪紙でとり除くと良いが、この方法では筋肉の乾燥を防ぐために、できるだけ短時間で計測し終る必要がある。あるいはRinger液などに、あらかじめ常磁性イオンのMn<sup>2+</sup>を加え、そのスペクトルをbroadにしておく方法がある。この点につき検討した一例を示す(図1)。沪紙にてふいた筋組織の水のスペクトルの半値巾は、約60Hzであった。この時、等張のMnCl<sub>2</sub>溶液を加えるとその半値巾は増加し約15分後に110Hz前後の定常値に達し、9時間後に再び増加し始めた。なお、等張のMnCl<sub>2</sub>溶液の水のスペクトルは、非常にbroadで検出不能である。この結果は次の様に説明できる。Mn<sup>2+</sup>溶液を加えると筋組織の細胞外液にMn<sup>2+</sup>イオンが浸透して細胞外液の水は検出不能となる。この浸透に約15分要す。一方、細胞内液は、膜をとおしての水の交換により、その半値巾が増加して110Hzになり、9時間後、膜の透過性が元進し、Mn<sup>2+</sup>イオ

よしぎきかずお、にしかめひろやす、わたりひろし。

ンが細胞内へも浸透し始めたと考えている。この様に  $Mn^{2+}$  イオンを用いると細胞内の水のみでの測定が可能となるが、神経刺激による筋収縮がみられなくなるので好ましい方法ではない。

## II. 筋収縮時における水の $T_2$ の変化

### 1). スペクトルの半値巾による測定

Bratton et al.<sup>2)</sup> は筋収縮時に筋組織の水のスペクトルが狭くなることを報告しているが、CW-NMRを用いているため、長い筋強縮による疲労の影響が大きかったものと思われる。pulse-FT-NMR法を用いた結果、筋強縮時間を短縮できなが、スペクトルの形や位置は試料ごとに变化した。これは試験管内での筋の位置により、静磁場が変化するものと思われる。しかし同一試料においては強縮の半値巾は弛緩時に比し、約20%減少し、この変化は可逆的であった(図2)。疲労により、刺激に反応しない筋ではこの変化はみられなかった。これはBratton et al.<sup>2)</sup> の報告と一致するが、しかし、この半値巾  $\Delta H_{1/2}$  による  $\pi \Delta H_{1/2} = \frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_2} + \gamma^2 \Delta H^2$  と表わされ<sup>3)</sup>、真の  $T_2$  以外に  $\Delta H_0$  の磁場の不均一性による寄与がある。

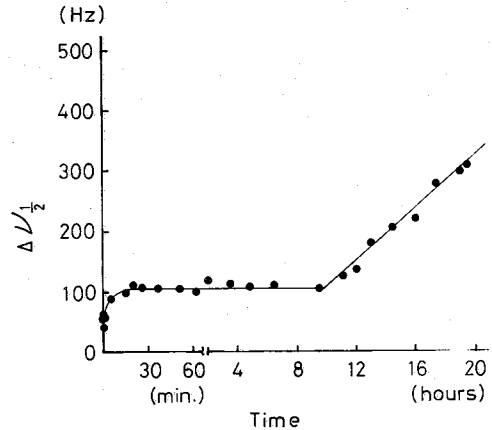


図1. 筋肉中の水のスペクトルと  $Mn^{2+}$  イオンの影響

強縮による  $\Delta H$  の変化は  $\Delta H_0$  の変化の可能性があり、強縮時の半値巾の解析はできなかった。

### 2). Meiboom-Gill法による測定

$\Delta H_0$  の影響を除くにはHahnの方法やMeiboom-Gill法がある<sup>5)</sup>。Hahnの方法では  $90^\circ - \tau - 180^\circ$  のパルス系列の繰り返しに時間を要する。一方Meiboom-Gillの方法では筋肉の水が1秒以内に測定でき、一過性の現象、特に筋強縮時の  $T_2$  の測定も可能

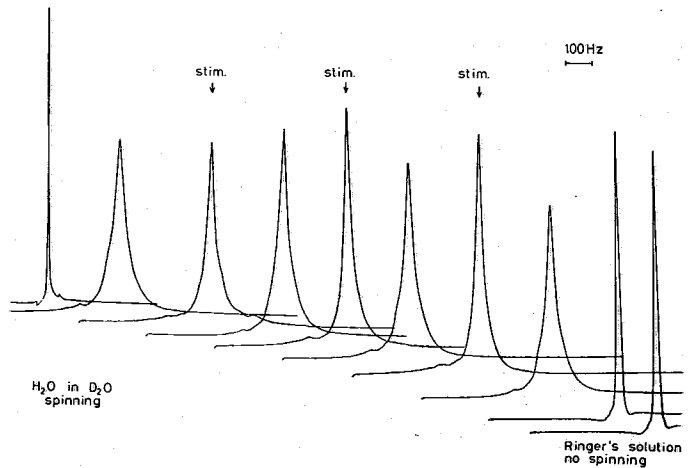


図2. 筋強縮によるスペクトルの変化

となる。この方法での装置の状態につき検討した。まず、試料の量を検討するべく、試料管 ( $\phi = 5 \text{ mm}$ ) の中へ筋肉中の水と同程度の  $T_2$  をもつ  $Mn^{2+}$  doped water を芯から、24, 32, 40 および 48 mm の高さまで入れ echoes を測定した(図3)。その結果、高さ32 mm まで、単一指数関数的減衰で、約1%の減衰まで測定可能であった。

次にMeiboom-Gill法による  $T_2$  は  $\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_2} + \gamma^2 \Delta H^2$  と表わされ<sup>3)</sup>、拡散係数  $D$  の影響は、 $180^\circ$  パルス間隔 ( $2\tau$ ) を小さくすれば除きうる故、この  $\tau$  の下限につき検討した。同一

試料で  $\tau = 1, 0.75, 0.5$  および  $0.25$  msec で測定した (図4)。その結果  $\tau = 0.25$  msec では FID & echoes が小さく、かつばらつきが生じた。この時の RF パルスの回復時間は約  $600 \mu\text{sec}$  で、個々の  $180^\circ$  パルスが互いに干渉しあうにめと考え、 $\tau$  の限界であると思われる。

筋肉の  $T_2$  測定を行なった結果、その echoes の減衰は2つの指数関数的減衰に分離でき、その  $T_2$  は  $170$  msec と  $34$  msec で、その分画は  $13.6\%$  と  $86.4\%$  とであった。弛縮時にはわずかながら遅い緩和成分の増加

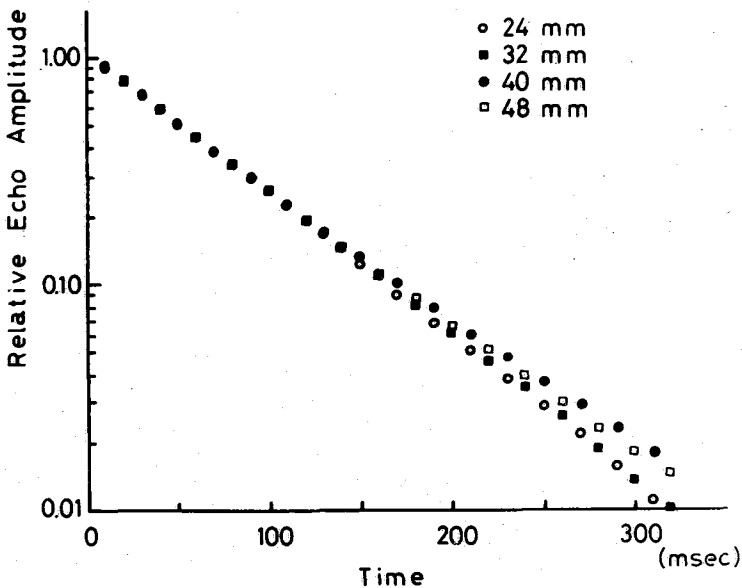


図3.  $T_2$  と sample 量。

とその  $T_2$  の延長がみられ、 $T_2$  は  $192$  msec と  $34$  msec でその分画は  $14.2\%$  と  $85.8\%$  となった (図5)。この緩和の遅い成分の増加は、筋硬直においてもみられることが報告されている<sup>6)</sup>。なお、この緩和の遅い成分は細胞外液に速い成分は細胞内液に対応すると考えている。

### Ⅲ. 筋組織中の不凍水について

筋組織を凍結させた場合 FID の振幅の変化を測定した。試料温度は銅・コンスタンタン熱電対で測定し、 $-5^\circ\text{C}$  より  $-10^\circ\text{C}$  への移行時に  $0^\circ\text{C}$  付近への一過性の温度上昇が認められ、この時、凍結が生じたものと思われる。筋肉中の水の FID は  $-5^\circ\text{C}$  までは増強し、 $-10^\circ\text{C}$  への移行に際し、凍結とともに急激に減少し、 $0^\circ\text{C}$  の値の  $17\%$  となり、さらに低温になるにつれ漸減し、 $-70^\circ\text{C}$  ではほぼ消失した。一方、Ringer 液でも、温度低下に伴って FID の振幅の増強がみられながら凍結とともに急激に減少し、消失した (図6)。

この結果は、筋肉中の水には低温 ( $-10^\circ\text{C} \sim -70^\circ\text{C}$ ) でも凍らない部分の存在を示している。この不凍水は、蛋白質の溶液でも存在することが報告され<sup>7)</sup>、蛋白質の水和水と

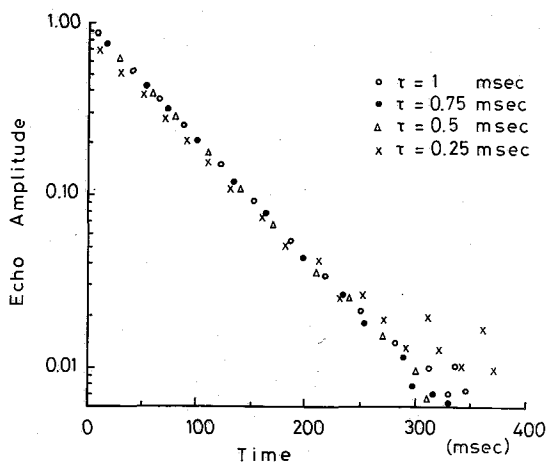


図4.  $T_2$  と  $\tau$  の下限



考えられる。一方、Ringer 液では不凍水のみのためにより、イオンの水和水と蛋白質の水和水とは、その分子の挙動が全く異なると思われ、筋肉中の水の緩和時間も蛋白質の水和水によるものと思われる。

(結語)

1. 筋組織中の水は二種類の  $T_2$  よりなる。
2. 筋収縮時、遅い緩和成分の増加が認められる。
3. 筋肉中に不凍水が存在する。
4. 下の短縮や不凍水の存在はイオンの水和水ではなく、蛋白質の水和水に由来するものと思われる。

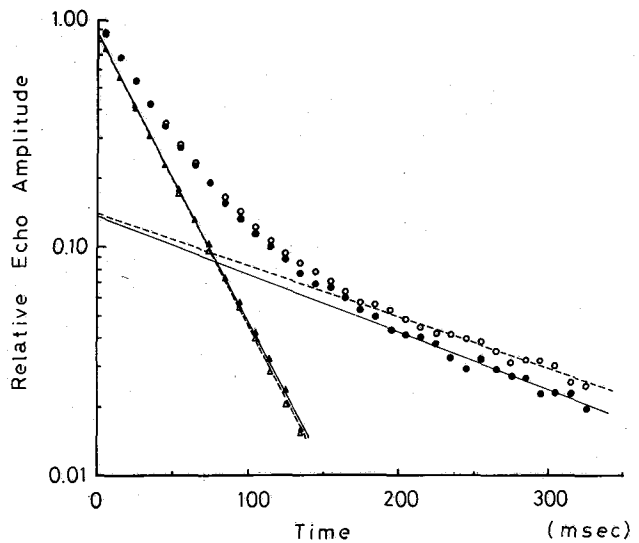


図 5. 筋強縮による  $T_2$  の変化

本研究は文部省科学研究費(048253; 177037)に依った。

(謝辞)

本研究をすすめるにあたり、種々の討論と御教示をいただいた京大・理・赤坂氏、また日本電子・藤田、加川両氏に感謝の意を表します。

(文献)

1). H. Davson (1970) "A Textbook of General Physiology", 4th Ed., Chap. VII., Churchill, London

2). C.B. Bratton et al. (1965) Science, 147, 738

3). P.S. Belton et al. (1972) Biochim. Biophys. Acta. 286, 16

4). C.F. Hazlewood et al. (1974), Biophys. J., 14, 583

5) 赤坂, 井元 訳, J.C. Farrar & E.D. Becker 著, "パルスおよびフーリエ変換 NMR", 吉岡書店

6). R.T. Pearson et al. (1974), Biochim. Biophys. Acta., 362, 188

7). I.D. Kuntz (1971), J. Amer. Chem. Soc., 93, 514

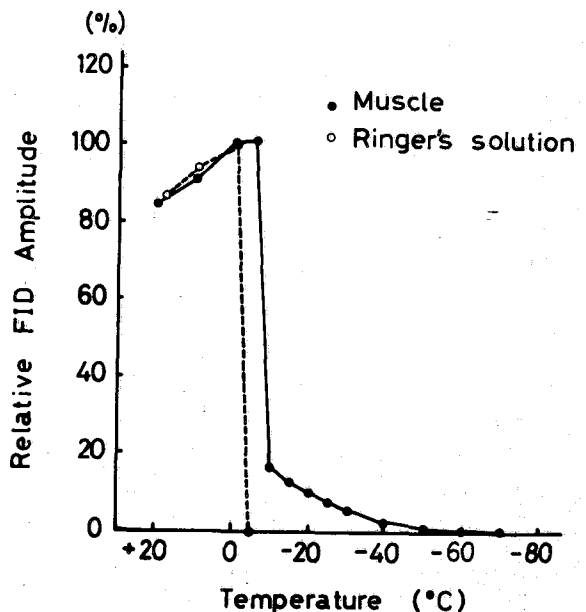


図 6. 筋肉中の不凍水

# 溶媒と異方性

I-8

電気通信大学 化学 中川直哉

1956年頃、駒場の東大教養学部の化学学生実験室の控室では、毎週木曜日の夕方、核磁気懇談会が開かれていた。藤原、西岡、額田、高橋詢、知井内、及川、神尾、林昭等々の人々が以前から Andrew や Pake の論文を読んでいた。当時高校の教師をしていた筆者は、時々まこの会に出席していたが、しばらくして有機化学の方面でも核磁気が使われているらしいから調べてみようかと高橋さんに云われたのが、NMR とのつき合いのはじまりになった。<sup>1)</sup>

年間数報から十数報に過ぎない報文だったが、ベンゼンの環電流によるシフト、ジメチルニトロサミンの内部回転、クロロホルムとベンゼンの相互作用シフト、シクロヘキサンの  $ax_1$  と  $eq_1$  の違い、すべてこれまでの常識の外にある話ばかりで、別世界に迷い込んだような新鮮な驚きで目を見張ったものであった。

$-CH_3$ ,  $-CH_2$ ,  $X=CH_2$ ,  $-C=CH$  の化学シフトのシリーズでエチル基水素が  $H^+$  として電離し易いのにはエチレンより高磁場なのは変だということから、それなら電通大藤原研の 27 MHz の NMR で測定してみればと話が逸んだ。名大教養部に移ったばかりの筆者はアセチレンやフェニルアセチレンを合成して、3.5 mmφ, 7cm 長のがラス管については準急東海号で調布へ運んだものである。電通大の永久磁石の装置は主に林昭一さんの手になったスペクトロメーターで分解能も高かったが、危険防止と安定したシフト値をよすためスピナーを止め数回測定して平均し、間隔の基準はトルエンを時々はかつて物差しにした。アセチレンは濃度不足でシグナルがでず、フェニルアセチレンとその  $CCl_4$ ,  $C_6H_6$  溶液が測定できたが、やはりエチレンより高磁場で 3 つの試料の値がフェニル基プロトンより 4.2, 4.3, 4.35 ppm と異なっていた。エチルプロトンがエチレンプロトンより高磁場なのは sp 混成の炭素原子の磁気異方性によるものであるが、このことが磁気異方性へ目を向けるきっかけとなった。

溶媒はもろくエチルプロトンの化学シフトに変化が生ずることは、更にジエチルアミン、エーテル、ピリジンも溶媒にしてみればはっきりしたし、溶質をシアン化水素にして測定してもっと大きな溶媒シフトが観測できた。これが NMR での最初の仕事になった。1959年の夏休みのことである。

## 溶媒効果

NMR の測定はラジオ波を使うのでその電波を分子が吸収しても、それによる分子構造や分子運動の変化は少ない。又分子間相互作用の僅な違いで大きな変化がえられるので分子と分子の配向、結合力などの研究にはよい手段である。NMR のチャートでは化学シフト、スピン結合定数、シグナル中、及びそれらの時間変化、温度変化、濃度(圧力)変化から情報をとるのであるが、溶媒効果の場合は、その他に溶媒のシリーズ、溶質のシリ

ながわ なおや

ーズの選り方によっていろいろな data のとり方がある。溶媒を芳香族と脂肪族に分ける場合、極性と無極性に分ける場合、屈折率や誘電率の大きさを並べる場合、沸点の順に並べる場合、プロトン受容力の大きさを分類する場合等とそれぞれある。

溶媒の場合でも溶媒の時と同じ分類も可能であるが、更に NMR では  $^1\text{H}$  や  $^{13}\text{C}$  か  $^{19}\text{F}$  か他の核種かでも並べ方が違うし、置換基をどんなシリーズで並べるか、例えばハメット則が電気陰性度か、分極率か、で異なった集合をつくることができる。したがって溶媒効果の研究はほぼ無限にあるといえる。

しかし分子間の相互作用の本質となると、本質的には電子と原子核の電磁場における運動形態であるから広い意味での化学結合になるが、これをモデルで表わせば、比較的安定している状態である個々の孤立した分子の状態を基準にして考えれば、近似的に古典的静電相互作用で取扱える型と静電的だけでは近似できない型とになる。

静電近似の可能な相互作用はいわば、イオン結合の延長で次のマトリックスで八極子以上ははぶいてある。 $q$  は点電荷、 $\mu$  は双極子、 $Q$  は四極子である。 $\alpha$  は分極率で  $U_L$  は London の分散力でありこれは静電的というわけではないが、双極子-誘起双極子相互作用と同じ遠達力なので入れておいた。この中で  $\mu\mu'$  と  $\mu\alpha'$  の相互作用は Keesom 相互作用, Debye 相互作用とし London 相互作用とともに

|          |                           |                                 |                                |   |
|----------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---|
|          | $q$                       | $\mu$                           | $Q$                            | $\alpha$                                |
| $q$      | $U \propto \frac{q^2}{r}$ | $U \propto \frac{q\mu'}{r^2}$   | $U \propto \frac{qQ'}{r^3}$    | $U \propto \frac{q\alpha'}{r^4}$        |
| $\mu$    |                           | $U \propto \frac{\mu\mu'}{r^3}$ | $U \propto \frac{\mu Q'}{r^4}$ | $U \propto \frac{\mu\alpha'}{r^6}$      |
| $Q$      |                           |                                 | $U \propto \frac{QQ'}{r^5}$    | $U \propto \frac{Q\alpha'}{r^8}$        |
| $\alpha$ |                           |                                 |                                | $U_L \propto \frac{\alpha\alpha'}{r^6}$ |

よく知られている。しかし  $\mu Q$  相互作用、 $Q Q$  相互作用もかなり遠達力による大きなもので、芳香族無極性溶媒を使う場合には無視できないものである。これらの相互作用は共有結合のような飽和性や一定の配向を強いられていることはないが、分子相互の配向の位相によってポテンシャルが異なるので統計的には配向の傾向が現われる。ASIS (芳香族溶媒によるシフト) はこれらによるものが多い。

静電近似では表わせない結合は 1:1 Complex 形成の場合で、これは所謂共有結合に近い型で  $\pi$ -Complex  $\sigma$ -Complex と云われていて一定の配向で結びつき飽和性がある。

クロロホルムとベンゼンは静電的というよりはむしろ  $\pi$ -Complex に近い。これは溶媒溶質とともに多少とも、出発分子の結合状態に変化がある。

-C≡CH の次はハロメタン  $\text{CH}_n\text{X}_{4-n}$ , ニトロメタン, メタノール, アセトニトリル等のメタン-置換体, マロニトリル等のメタン=置換体, トルエン置換体, アニソール置換体, ピコリン類, メチルアミン, ジメチルアミン, アセチル化合物, エチル化合物, セブチル化合物等 70 種を溶媒として  $\text{C}_6\text{H}_6$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_{12}$ ,  $\text{CS}_2$ , dioxane,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Br}_2$ ,  $\text{CHBr}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{I}_2$  等に溶かして電通大藤原研の 270 MHz NMR で 1959 年秋から 1960 年の春まで、主に冬休みに測らせてもらった。夏休み 31°C の室温は冬休み 12°C 以下になり、地球の公転軌道を利用したこの恒温槽がフェニルアセチレンの合成工

エネルギー数百カロリー/モルを見つもらたりした。こうした安定した温度変化の実験ができ、シアン化水素の測定が窓をあけて測定できることは空調の完備した今の実験室では望めないことである。

1960年6月電通大に転任してくると27MHzは東大に移管され、溶媒効果の実験はいまさらやめて、~~data~~の整理にかかった。この頃の仕事は“化学の領域”に連載してくりをつけ、~~溶媒効果の実験はその後12年程して電通大に初めてNMR装置を購入することになってから~~再考されることになる。

### 異方性

ベンゼンやピリジンによる溶媒効果は芳香環の磁気異方性 $\Delta\chi$ が影響を与えている。エチルプロトンの化学シフトの原因も同じである。その又原因は外部磁場によって誘起された分子内の電流という概念に到達する。このモデルはなかなかないのだったが全沢大の服部香三、松岡煥一両氏の懇切な教え方でどうにか計算のまかどてができたが、反磁性電流、常磁性電流、座標の原点などまで理解が不十分で胸にすとんと落ちるところまで達していない。いろいろの分子の誘起電流が簡単に画けるようにすれば、かなり理解が進むことと思われた。

磁気異方性の研究や化学シフトの計算に切實さを感心させたのは、60年頃東海刊に54MHzの高分解能NMRが入り、又東工試の額田さんをはじめ各方面の好意でVarian DP60の夜間使用が許され教音大や東大の若手とともに夜毎、食糧を持ち込んで空調のきいた快適な部屋で徹夜してたべりながら測定できるようになり、天然物有機化学の人達とつき合うようになってからである。これはその頃から残った薬学や有機化学の人たちをはじめたNMR学習会の影響もある。清水氏、荒田氏を講師にしてはじめたこの会で色々な質問がでてその都度勉強不足を痛感させられ、今にも放り出したくなる量子力学の勉強をまげさせたものであった。

異方性ではじめたの仕事は共同研究で全沢大の服部、松岡氏と東大教養部部の鈴木~~さん~~氏とともにピリジンの $\alpha$ 水素が $\beta$ より1ppmも低いのが酸性溶液では0.3ppmに縮むこととN原子の孤立電子対と $\pi$ 電子系との遷移280nmの値を入れて計算して解明した。

これはN原子の孤立電子対とO原子との結合でおきかえたNオキソド類の薬学の川添さんたちの仕事にも関連していて、 $n-\pi^*$ 遷移と化学シフトとして分子の電子状態討論会の<sup>3)</sup>1961年と第一回NMR討論会(同年)に発表した。

異方性の研究は、東工試の夜間測定で話しかけた川添氏や岩村氏から二重結合や三員環の異方性について聞いていたが、ステロイド類の測定でえらめた所謂川添ルールでは知らなかった二重結合平面上でC-C方向の位置にあるプロトンが、応答所の奥田、山田氏とのモルフィン類のNMRでまさかになり、C=Cの $\pi$ 電子方向に負の $\Delta\chi$ があることを見つけた。<sup>4)</sup>これはベンゼンの芳香環の $\Delta\chi$ にも関係しているから所謂環電流による効果は $1/2 \sim 2/3$ になることになる。奥田氏とはキイチジンのボールマン帯の赤外線吸収に関連するNの隣りの $\alpha\chi$ プロトンの高磁場シフトについて $n \rightarrow \sigma^*$ を含む超共役で説

明した。(1964)<sup>4)</sup>

三員環・四員環の磁気異方性については北大工学部の鈴木章氏とピネン・カレン氏の化学シフトから三員環は従来通りの反磁性環電流、又四員環では常磁性環電流で近似できる $\Delta\chi$ をもっていることを見出した。この際、ファンデルワールスシフト(圧縮シフト)について近似式をつくらせて取り除いた。(1966)<sup>6)</sup>

異方性には直接関係ないが、化学シフトの計算例として1967年重原子シフト(又はLSシフト)の計算をしたがこれは化学シフトとスピン結合の合いの子のようなもので、ヨード等の重原子と結合しているものに見られるシフトであるが、きっかけは、1961年、服部・松岡両氏のハロメタンの<sup>13</sup>Cの化学シフトでヨード・ブロムが入ると説明がつかないという報告があったことである。

これらの異方性については南江堂の天然物'68に「置換基の磁気異方性」として不十分なまとめをしているが、中には訂正すべきことも多い。とくにN原子の異方性についてはモルフィンのシフトから孤立電子対の方向に $\Delta\chi > 0$ としたが、その異方性の説明には孤立電子対の軌道半径をばらばらにして苦心していたが、その後通氏吉川氏らによって $\Delta\chi < 0$ というdataが寄せられ、ていて、むしろ安心した次第であるが、ではモルフィンの場合は何故だろうと問題が新たになった。

1969年頃から2~3年は大学紛争で研究は事実上ストップ、NMRとは1963年以来毎月続いているNMRオペレーターの集りに出席して輪講をつづけるので精一杯であった。

1972年に12年ぶりに電通入に高分解能NMRが設置されることになり、NMRをやめて窒素分子の研究へと志していた筆者は再びNMRに引きこもられ、測定回数が多い溶媒効果ができるようになった。

その後の研究は主に仁木氏によって進められていて、<sup>8)</sup>溶媒の双極子と溶媒の四極子の相互作用で近似できるAS|Sや、四重極子四重極子相互作用によるものなど、C6H6とC6F6の四極子モーメントの符号の正負異なる溶媒を自由に駆使して進めている。最近はその溶媒の代りに<sup>19</sup>Fをもつ溶媒のNMRの溶媒効果は進んでいて、大きなファンデルワールスシフトのかげにかくれたAS|Sの影響を解明しているが、この<sup>19</sup>Fは電通大で有名な川村理研の高田氏が中心となっている。NMRオペレーターの会のメンバーである。

1) 高橋・中川 "化学の領域" 13 554 (1959)

2) 中川 "化学の領域" 15 606, 665, 787 (1961)

3) 松岡・服部、鈴木・中川 "分子の電子状態 研究会" (1961. oct)

4) H.P. Hamlow, S. Okuda & N. Nakagawa *Tetrahedron Lett.* 1964 2553

5) 山口・奥田・中川. *Chem. Pharm. Bull.* 11 146 (1963)

6) N. Nakagawa, S. Saito, A. Suzuki & M. Itoh *Tetrahedron Lett.* 1967 1003.

7) 中川. 天然物化学'68 (化学の領域 増刊 86号別冊) 241~282 (1968)

8) N. Kiki & Nakagawa. *Chem. Lett.* 1974 699; K. N. Kiki, N. Nakahata & N. Nakagawa *Tetrahedron Lett.* 1975

3811; K. N. Kiki, N. Nakagawa & Y. Takeuchi, *Bull. Chem. Soc. Japan.* 48 2902 (1975)

われわれは、1962年1月に Varian A-60 型分光器を設置して以来、表題による研究を続けてきた。これは主として、広い意味での有機化合物の構造と NMR 現象との関連の追求——規則性の発見とその応用——を目的としている。この間、1965年3月に HA-100 型、同年7月に A-60A 型、1968年10月に A-56/60D 型、1974年10月には NV-14  $^{13}\text{C}$  FT NMR 分光器を備置し、数多くの化合物について測定を行った。しかし、種々の制約の下で、一貫した主題を追求することは困難であり、多くの場合、一連の化合物ごとに断片的に結果をまとめてきたに過ぎない。これらの中、ステロイド類、<sup>1)2)</sup> 3員環化合物、<sup>3)4)</sup> 10員環セスキテルペン類<sup>5)</sup> については、すでにまとめて紹介されている。今度、ここに機会をいただき、われわれの約15年間の研究の結果をご紹介するに当り、それらの中から NMR 法にとって重要であったと考えられる結果を選び、これを化合物別に説明せず、NMR の各現象ごとに組替えで述べた。以下、概要を記す。

1. 化学シフト

a. 官能基の磁気異方性効果。ステロイド類は、比較的固い骨格をもつと考えられ(図1)、多くの置換基の  $^1\text{H}$  化学シフトに及ぼす異方性効果を見積るのによく利用される。<sup>1)</sup> われわれも、これを用いて OH, OAc, SH, SAc, SCN, NH<sub>2</sub>, NHAc, ハロゲン基などの置換基効果について検討し、特に NO<sub>2</sub>, S=O, C≡N 基の異方性や、OH, SH 基のアセチル化シフトについては詳しく調べた。<sup>6)</sup> また、アジン類 N-オキシドの研究に際して、N→O 基の異方性について考察した。<sup>6)</sup>

b. 二重結合の異方性。橋環状化合物は立体化学に対していろいろのモデルを提供してきたが、NMR でも重要な役割を果たしてきた。われわれは、二重結合の異方性効果をシクロ[2.2.2]オクタン、[2.2.1]ヘプタン環系について考察し、その際、後者において、橋状メチレンの化学シフトの異常性を発見した(図2)。<sup>6)7)</sup>

c. 3員環の異方性。シクロプロパン、オキシラン、アジリジン環の異方性効果を橋環状化合物について検討し、シクロプロパン環については、その大きさを見積る簡単な計算法を提案した(図3)。<sup>3)6)</sup>

d. 孤立電子対の異方性。N原子の孤立電子対の異方性については、種々の議論が存在

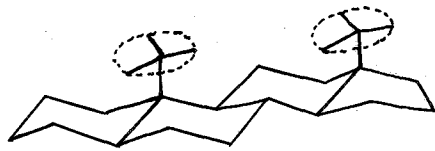


図1. 5 $\alpha$ , 14 $\alpha$ -ステロイド

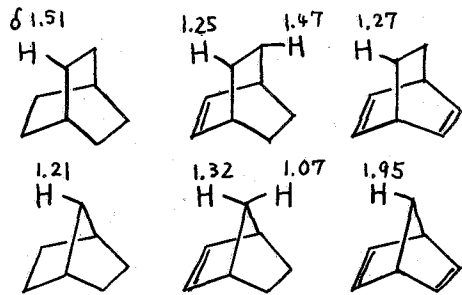


図2. 二重結合の異方性効果 (CCl<sub>4</sub>)

するが、ヒガンバナ科植物アルカロイド類の研究に関連して、<sup>7)</sup>この議論に参加した。<sup>3) 6)</sup>

e. van der Waals シフト。立体障害を受けた<sup>1</sup>H核の歪みによる NMR シグナルの低磁場シフトは、Winstein-Anet らの

半かご型分子による証明が有名であるが、<sup>8)</sup>これより先に、この現象による立体構造の推定を提案した(図4)<sup>9) 6)</sup> また、上記 c. の研究に際してもこの現象を見出した(図3)<sup>3) 6) 11)</sup>

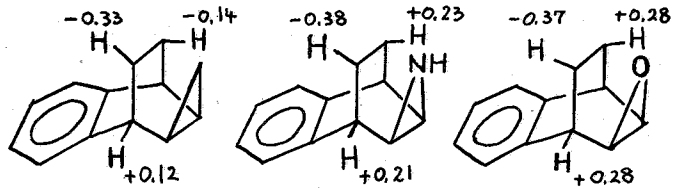


図3. 3員環の異方性効果 (ppm, CCl<sub>4</sub>)

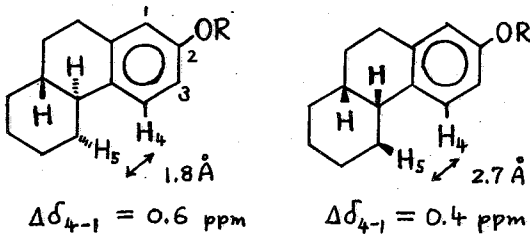


図4. van der Waals シフトの応用

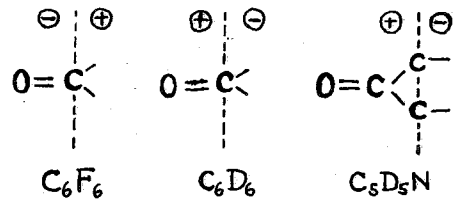


図5. 溶媒効果のカルボニル平面則

f. 溶媒効果。有名なベンゼンの溶媒効果は、N→O基、S→O基をもつ化合物について考察した。OH基を有する化合物のピリジン溶媒中での独特の溶媒シフトを、化合物の構造推定に利用する提案をした。<sup>3)</sup>後に、Demarco-Wenkertらにより、この溶媒効果の広範囲な規則化が行われた。<sup>9)</sup>最近、ヘキサフルオロベンゼンの特異な溶媒効果を、カルボニル基をもつ種々の化合物について検討中である(図5)<sup>10)</sup>

g. <sup>13</sup>C化学シフト。多くの化合物について、置換基のα-, β-, γ-, δ-効果を議論したが、橋環状化合物でのシクロプロパン環の及ぼす大きな効果(図6)<sup>11)</sup>ステロイドA環におさまるオキシラン、チラン環の諸効果が興味深い。<sup>12)</sup>ビシフロ[2.2.1]ヘプタジエンの橋状メチレンの<sup>13</sup>C化学シフトは、<sup>1</sup>Hと同様異常であった(図6)<sup>13)</sup>

h. 天然有機化合物の<sup>13</sup>C NMR スペクトル。天然有機化合物の構造研究、生合成研究には、<sup>13</sup>C NMR 法は特に有用であるが、それにはすべてのシグナルの帰属が必要である。われわれも、フラノセスキテルペン、カルテノリド、オレアネン系トリテルペノイド、モルヒネアルカロイド、14員環マクロリド、各種抗生物質などについて、<sup>13</sup>Cシグナル帰属を行

った。特に、トリテルペノイドについて、仮説に過ぎなかったE環の生合成過程の証明に、実際に応用された。<sup>14)</sup>

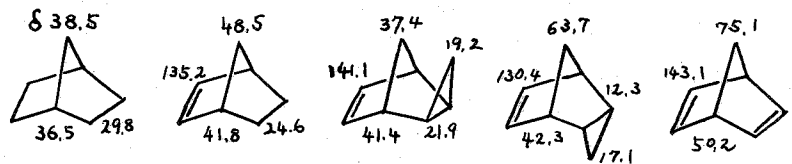


図6. <sup>13</sup>C化学シフト ( $\delta_C$ , CDCl<sub>3</sub>)

## 2. スピン結合

a.  $^2J_{H,H}$  と置換基効果。  $sp^3-CH_2$  と  $sp^2-CH_2$  との中間としての、3員環  $CH_2$  に着目し、種々のヘテロ3員環化合物の  $^1H$  NMR スペクトルの解析から、 $^2J_{H,H}$  値を求め、ヘテロ原子や置換基の効果について考察を加えた(図7)。<sup>3,4)</sup> この際、チランおよびそのオキシド、ジオキシドでの異常性が注目された。<sup>4)</sup>

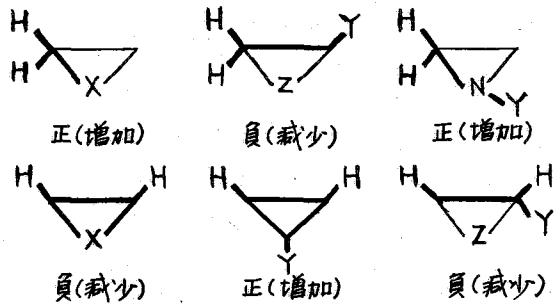


図7. 原子または置換基 X, Y の電気陰性度の増加にともなう  $J$  値の変化

b.  $^3J_{H,H}$  と置換基効果, Karplus 式。上記 a. と同じく3員環化合物について考察した(図7)。<sup>3,4)</sup> その際、チラン-1-オキシドでは、2つの  $^3J_{H,H}(cis)$  値,  $J_{syn,syn}$  と  $J_{anti,anti}$ , が得られたことが注目された。<sup>3,4)</sup> 一方、多くのオキシラン、チラン環をもつステロイドにおいて、種々の2面角に対応する  $^3J_{H,H}$  を求め、3員環を含む系の Karplus 改訂式を提案した。<sup>3)</sup>

c.  $^3J_{H,H}$  による立体配座の推定。主としてステロイド類において、置換基の付根の炭素上の  $^1H$  シグナルの示す  $^2J_{H,H}$  値から、環の立体配座を推定した。すなわち、図8の [A] ( $6\beta$ -置換) の B 環は外側へ歪んだイソ型, [B] ( $6\beta, 19$ -橋状) では内側へ歪んだイソ型,

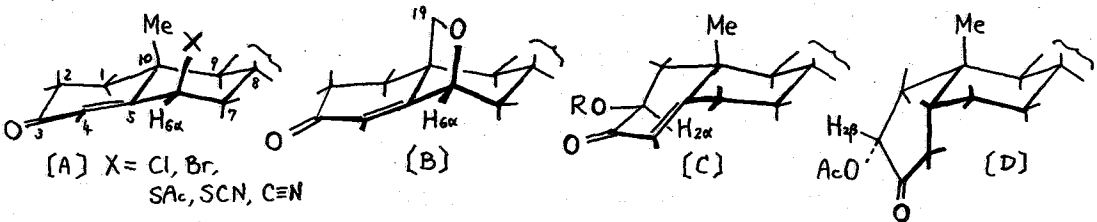
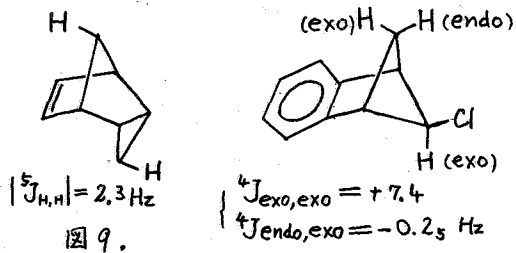


図8. 種々のステロイドの立体配座

[C] ( $2\alpha$ -置換  $\Delta^4$ -3-ケトン) の A 環は反転半イソ型,<sup>6)</sup> [D] ( $2\alpha$ -置換  $5\beta$ -3-ケトン) では歪んだフネ型をとっていることがわかった。

d. 遠隔スピン結合。多くの化合物で観測されたが、特別な例として、endo-トリシクロ [3.2.1.0<sup>2,4</sup>] オクテンでの大きな  $^5J_{H,H}$  の発見<sup>6)</sup>、ベンゾシクロ [2.1.1] ヘキセン環での  $^4J_{H,H}$  の符号の決定(図9)、 $^4J_{H,H}$  のいわゆる "W 字則" に対する置換基効果の考察が挙げられる。

e.  $^1J_{CH}$ 。  $^{13}C$  サテライトスペクトルにより、種々の芳香族化合物、3員環化合物





物や,<sup>3)4)</sup>橋環状化合物<sup>13)</sup>の $J_{CH}$ と構造との関係調べた。

f.  $J_{NH}$ 。  $^{15}N$ を濃縮したキノリン、アジリジン誘導体およびいろいろの型の4級アミンニウム塩を用いて、 $J_{NH}$ 値と構造との関係を検討し、 $J$ 値の符号の決定、置換基の電気陰性度の効果の考察、 $^3J_{NH}$ の角度依存性の発見などを行った。<sup>15)</sup>

### 3. 核 Overhauser 効果 (NOE)

われわれは、比較的早くから NOE の測定を行ってきた。<sup>16)</sup>これにより、多くの化合物の立体化学を解明した。<sup>17)</sup>特に、10員環(シクロデカ-1,5-ジエン)をもつセスキテルペンおよび誘導体の立体配座の決定、配座異性体の発見、立体配座と Cope 転位反応との関係(図10)などについての一連の研究を実施した。<sup>5)17)</sup>また、ステロイドに対する応用では、<sup>17)</sup>緩和時間  $T_1$  の化学構造との関係に関する考察へ進んだが、測定法の問題から中断した。

### 4. シフト試薬

$Ni(acac)_2$ を用いた研究は、 $^1H$  NMR シグナル帰属への応用のほか、6-アミノベンゾビシロ[2.2.1]ヘプテンおよびヘプタジエンを用いた遠隔スピン伝達機構の解明や、<sup>18)</sup>ベンツアゾール類での環間のスピン非局在化に関するものを行った。<sup>19)</sup>一方、大流行をみたランタノイドシフト試薬の応用では、構造決定への簡単な応用のほか、誘起シフトの角度依存性、コンタクト項寄与の存在、錯体形成シフトの存在の証明など、<sup>20)</sup>甲斐荘一麿氏らの一連の研究に協力した。

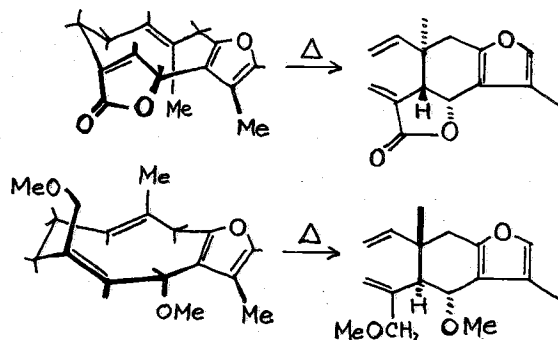


図10. Cope転位と立体配座の関係

最後に、これまで種々ご助力、ご助言下さったすべての方々に心から感謝致します。

### 〔引用文献〕

- 1) J. E. Page, Ann. Rept. NMR Spectrosc., 3, 149 (1970).
- 2) 通, 近藤, 日化誌, 87, 1117 (1966).
- 3) 通, 植山, 化学の領域増刊 92号, “ヘテロ環の化学”, 第2集, 1 (1968).
- 4) 植山, 通, 日化誌, 92, 741 (1971).
- 5) K. Takeda, Tetrahedron, 30, 1525 (1974).
- 6) 後藤, 通, 実験化学講座続 12, “核磁気共鳴吸収”, 第6章(丸善) (1967).
- 7) 通, 化学の領域, 20, 901 (1966).
- 8) S. Winstein ら, J. Amer. Chem. Soc., 87, 5247 (1965).
- 9) P. V. Demarco ら, Ibid., 90, 5480 (1968).
- 10) K. Tori ら, Tetrahedron Lett., 2199, 2849 (1975).
- 11) K. Tori ら, Ibid., 327 (1974).
- 12) K. Tori ら, Ibid., 1157 (1974); 135 (1975).
- 13) K. Tori ら, Org. Magn. Resonance, 6, 324 (1974).
- 14) S. Seo ら, J. C. S. Chem. Comm., 270, 954 (1975).
- 15) R. L. Lichter, Determination Org. Struc. Phys. Methods, 4, 195 (1971).
- 16) 通, ファルマシア, 4, 475 (1968).
- 17) R. A. Bell, J. K. Saunders, Top. Stereochem., 1, 1 (1972).
- 18) K. Tori ら, J. Amer. Chem. Soc., 93, 6324 (1971).
- 19) K. Tori ら, Chem. Lett., 11 (1973).
- 20) 通, 化学と工業, 28, 642 (1975).