

第16回NMR討論会

講演要旨集

1977年11月14日(月)・15日(火)・16日(水)

京 都 会 館

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 16 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 1977年11月14日(月)，15日(火)，16日(水)

会 場 京都会館(京都市左京区岡崎 電話(075)-771-6051 市電 岡崎公園下車)

研究発表は次の6つのセッションに分けて行ないます。

- A NMRの新しい実験法1(ハードウェア，測定技術を主としたもの)
- B NMRの新しい実験法2(ソフトウェア，利用技術を主としたもの)
- C 生体およびその関連分子のNMR
- D 有機，錯体ならびに高分子の構造化学一般
- E 核磁気緩和一般
- F 電子構造その他一般

セッションA，Bは特別講演(1時間)ならびに一般講演(1件25分，C~Fはポスターセッション(2時間)とします。研究発表会場以外に展示会場も設けています。

プ ロ グ ラ ム

第 1 日 (11月14日，10:00~17:15)

セッションA(NMRの新しい実験法I(ハードウェア)) —(10:00 から)—

101(A1) 温度勾配NMRによって観測されるNMR線型の変化と液体の動的性質との関係について

(北大工) ○下川繁三 (日進ソフト) 神田勇一 … 1

102(A2) 高圧・高分解能NMRの測定

(神大・理) ○山田博昭・西谷新二・世良 明 …… 5

—(11:05 から)—

103 セッションA 特別講演

固体の高分解能NMR及び二次元FTNMRの現状と展望

(京大・理) 寺尾武彦 …… 9

—(13:30 から)—

104(A3) 固体中の弱共鳴核に対する高分解能NMR法の改良

(京大・理) ○松井 茂・前田史郎・寺尾武彦 …… 13

- 105 (A4) 市販一般波形解析装置によるパルス・フーリエ NMR の試み
(九大・薬) ○金沢洋子・田中彬嗣 (電総研) 亀井裕孟… 17
- 106 (A5) マイクロプロセッサの FTNMR への適用
(日立・那珂) 津田宗孝・武田政昭 ○横川 浩 …… 21
- ポスターセッション — (15:15 から) —
セッション C (生体およびその関連分子の NMR)
- 107 (C1) 抗原抗体反応の NMR による研究 I λ 型 Bence Jones タンパクの ^1H NMR
(東大・理, 阪大・医) ○荒田洋治・清水 章*・藤原鎮男
山村雄一* …… 25
- 108 (C2) フェリチンの NMR による研究。鉄核表面のリンと四次構造
(東大・理) ○今井 登・寺田春郎・荒田洋治・藤原鎮男… 29
- 109 (C3) 結晶タンパク質およびイオン交換樹脂の ^{13}C NMR。固体分子における局所的運動の不均一性について。
(味の素中研) ○鯉坂勝美・甲斐荘正恒 …… 33
- 110 (C4) ヒト赤血球ゴースト膜の ^{31}P -NMR による研究
(京都府医大) ○西川弘恭・吉崎和男・山田誠二・亘 弘… 37
- 111 (C5) ^{31}P NMR 法による生体組織中のリン化合物の動態の研究
(京都府医大) ○吉崎和男・西川弘恭・山田誠二・亘 弘… 41
- 112 (C6) 逆ミセル系極性基界面の特性
(東工大・工, 京都府医大) ○藤井博匡・河合徹
西川弘恭・亘 弘 …… 45
- 113 (C7) アスパラギン酸アミノ基転移酵素活性域周辺のマイクロ環境
(熊大・医, 京大・理, 東大・理) ○山崎政城・檜垣 強
赤坂一之・森野能昌・宮沢辰雄… 49
- 114 (C8) linear alkyl 鎖を側鎖にもつポリペプチドのヘリックス-コイル転移, poly-L-norvaline
(東工大・工) ○鈴木保之・井上義夫・中条利一郎 … 53
- 115 (C9) ^{13}C NMR によるポリペプチドのコンフォメーション (その 1) 塩基性ポリペプチドの Salt-induced Helix-Coil 転移
(国立がんセンター研) ○斎藤 肇・大木豊和・児玉昌彦
永田親義 …… 57
- 116 (C10) ^{13}C NMR によるポリペプチドのコンフォメーション (その 2) アミノ酸共重合体, $(\text{Lys}^{50}\text{Tyr}^{50})_n$, $(\text{Lys}^{50}\text{Phe}^{50})_n$ の中性塩存在下における aggregation 挙動

	(国立がんセンター研) 齊藤 肇 ○大木豊和・児玉昌彦・ 永田親義	61
117 (C11)	アラニン二量体モデル化合物の NMR における溶媒効果 (東工大・工) ○朝倉哲郎・神尾 優・長谷川隆・西岡篤夫...	65
118 (C12)	ペプチドおよび血清アルブミン水溶液中の水分子の核磁気緩和 (出光興産・中研) 佐藤和夫	69
 第 2 日 (11月15日, 9:00~17:30)		
セッション A (9:00 から)		
201 (A6)	Wide Band Probe と多核種観測システム (日本電子) 木田 淳 ○今成 司	73
202 (A7)	NMR スペクトル変化の自動追跡と多重相関測定 (東大・理) ○林 秀知佳・和田昭允	77
203 (A8)	パルス NMR の生体計測への応用。液流の測定 (電総研) 亀井裕孟	81
ポスターセッション — (10:30 から) —		
セッション C (生体およびその関連分子の NMR)		
204 (C13)	チトクローム C' 酸化型のスピン状態とアポ蛋白質の構造変化 (阪大・蛋白研) ○阿久津秀雄・京極好正・堀尾武一 ...	85
205 (C14)	標識化合物を利用した ^{15}N NMR によるヘム蛋白質ならびにその関連モデル錯体の研究 (京大・工) 森島 績 ○大伏俊郎・米沢貞次郎	89
206 (C15)	^{15}N 置換オクタエチルポルフィンとその誘導体の NMR スペクトル (阪大・蛋白研・京大・工) ○河野敬一・尾崎幸洋・京極好正 生越久靖*・杉本博司*・吉田善一*	93
207 (C16)	アセテートキナーゼと 2 価金属イオン (Mg, Ca, Mn, Hg) との特異的相互作用 (埼玉大・工) ○飯田武揚・谷 久司・三田村孝	97
208 (C17)	^1H NMR によるイミダゾール-Mg (II) 錯体の研究 (北見工大) ○三浦宏一・福井洋之・佐藤庄一	101
209 (C18)	NOE をランタンドプローブ法と組合わせた新しい構造解析法 (東大・理) ○老田哲也・稲垣冬彦・宮沢辰雄	105
210 (C19)	アセチル化糖とユーロピウムシフト試薬の親和性 (京工繊大) 泉 邦彦	109
211 (C20)	多糖ゲルの ^{13}C NMR (その 3) 直鎖 β (1 \rightarrow 3) グルカンの高次構造の分子量依存性	

- (国立がんセンター研) 齊藤 肇 ○宮田栄一・佐々木琢磨... 113
- 212 (C21) ^{13}C NMRのグルコシド化シフト。2級水酸基の絶対配位の決定への応用
(塩野義研) ○高山陽子・妹尾修次郎・富田 裕・通 和夫... 117
- 213 (C22) 核酸塩基の対形成に伴う動的過程
(阪大・蛋白研) ○岩橋秀夫・京極好正 121
- 214 (C23) 核酸系における ^{31}P 化学シフトの異方性
(京大・理) ○寺尾武彦・松井 茂・赤坂一之 125
- 215 (C24) 有機基をもつ重金属化合物とクラウンエーテルとの相互作用の研究
(阪大・工) ○北野隆一郎・川崎吉包・大河原六郎 ... 129
- (14:00 から) —
- 216 セッションB (NMRの新しい実験法2 (ソフトウェア))
特別講演 NMRの実験法と応用分野:最近の動向
(東大・理) 荒田洋治 133
- ポスターセッション — (15:30 から) —
- セッションD (有機, 錯体ならびに高分子の構造化学一般)
- 217 (D1) 対称性のよい重水素置換ベンゼンの $\{^2\text{D}\}$ -PMRスペクトル
(九産大) ○羽里源二郎・池上恒男・米光直志・添嶋康広
(日立邦珂) 青木信彦・藤枝邦美 136
- 218 (D2) 選択的に重水素化されたPAAの液晶状態における高分解能NMRスペクトル
(東工試) ○早水紀久子・山本 修 140
- 219 (D3) 高圧・高分解能NMR。フェニルアセチレン及びクロロホルムプロトンの化学シフトに対する圧力効果
(神大・理) 山田博昭・○西谷新二・藤野和彦・世良 明... 144
- 220 (D4) アセチレンを架橋団とする新型白金二核錯体の ^{31}P NMRスペクトル
(東大・生産研) ○鯉江泰行・篠田純雄・齊藤泰和 ... 148
- 221 (D5) 双極子会合のNMRによる研究 その2
(阪大・薬) ○藤原英明・高場紀和・山崎 浩・佐々木喜男... 152
- 222 (D6) 包接化合物 $[\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2]_3\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ の単結晶における ^{13}C の高分解能NMR
(京大・理) ○松井 茂・前田史郎・寺尾武彦 156

セッションF (電子構造その他一般)

- 223 (F1) $^1\text{J}_{\text{C-H}}$ カップリング定数の溶媒効果とその理論的検討

	(東工大・工)	近藤正広・安藤 勲・中条利一郎・西岡篤夫	
	(都立港工高)	渡辺昌介	160
2 2 4 (F2)	Geminal 核スピンスピン結合に対する近似式		
	(東北大・理)	広池英子	164
2 2 5 (F3)	^1H NMR 化学シフトの電場依存性		
	(北見工大)	○福井洋之・三浦宏一・北村祐子	168
2 2 6 (F4)	複素芳香族ニトリルおよび芳香族ニトリル類の反応性と ^{13}C NMR (エナミノケトン形成反応の新指標, κ)		
	(塩野義研)	○照井彬弘・山川真透・本摩恒利・多田幸男 通 和夫	172
2 2 7 (F5)	^{13}C NMR化学シフト図表による有機化合物の構造解析		
	(旭電化, 芝浦工大, 三井東圧, ライオン油脂, 国衛試, 東大農, 東大工)	○武捨 清・永田親清・斉藤 純・橋本 茂 叶多謙蔵・戸田昭三・田中誠之	176
2 2 8 (F6)	脂肪族アミン及び脂肪族カルボン酸の ^{13}C NMR化学シフト		
	(芝浦工大, 東大工)	○永田親清・中山昌彦・長谷川隆 田中誠之	180

第 3 日 (11月16日, 9:00~15:50)

セッション B — (9:00 から) —

3 0 1 (B1)	^{13}C -NMRにおける低電力プロトン照射技術の構造解析への応用		
	(理研)	○鶴沢 洵・浦本昌和・竹内節男	185
3 0 2 (B2)	臭化メチルー d_3 における ^{13}C -Br スピン結合定数		
	(東工試)	○山本 修・柳沢 勝	189

ポスターセッション — (10:10 から) —

セッション E (核磁気緩和一般)

3 0 3 (E1)	鎖状分子のたて緩和。第5報 ^{13}C パルス NMRにおける高分子モデル化合物の分岐測定 の検討		
	(昭電中研)	○田中信義・櫛引信男・開田泰憲	193
3 0 4 (E2)	いくつかの溶液中における分子間相互作用と核磁気緩和		
	(出光興産中研)	佐藤和夫	197
3 0 5 (E3)	ベンゼン- d_6 の分子運動とスピン廻転相互作用		

	(東工試) ○山本 修・柳沢 勝	201
306 (E4)	金属リチウム・メチルアミン濃厚溶液の磁気緩和 (北大理 ^A , 北大工 ^B) 中村義男 ^A ・笈哲夫 ^{A*} ○下川繁三 ^B ・下地光雄 ^A	205
307 (E5)	有機物固体の ¹³ C緩和時間測定 (T ₁ , T _{1ρ}) (日本電子) ○藤戸輝昭・大内宗城・平野治男・細野政美 今成 司	209
308 (E6)	常磁性物質を含んだ溶媒の分子運動と緩和 (京大理, 京大工) ○遠藤一央・森島 績・小川 論 米沢貞次郎	213
309 (E7)	安定ニトロキシドラジカルのデカップリング試薬としての利用 (京大工, 京大化研) ○犬伏俊郎・森島 績・米沢貞次郎 植村 栄・三好晴雄・岡野正弥	217
310 (E8)	³⁵ Cl NMRをプローブとした状態分析 (国立公害研) ○古田直紀・不破敬一郎	221
311 (E9)	相転移を伴うリノール酸ナトリウム・水系の ²³ Na NMRによる研究 (京都府立医大) ○西川弘恭・吉崎和男・山田誠二・亘 弘	225
312 (E10)	ミトコンドリアの“エネルギー状態”とNMR (徳島大・教養・薬, 阪大蛋白研) ○吉川研一・寺田 弘 京極好正	229
セッションB — (13:30 から) —		
313 (B3)	NMRの雑音解析 (東大理) 藤原鎮男	233
314 (B4)	相関NMRとその応用。Ⅶ。周波数掃引のデジタル化による性能向上とデータ処理法の 検討 (東大計セ, 東大理) ○小沢 宏・荒田洋治・藤原鎮男	237
315 (B5)	相関プロトンNMRによる大腸菌細胞内における嫌氣的代謝の研究 (東大理, 東大農) ○荻野孝史・荒田洋治・藤原鎮男 祥雲弘文	241
— (15:00 から) —		
316 (B6)	NMRによる哺乳動物の計測 I (予報) (北大工) ○下川繁三・山田英三	245
317 (B7)	生命過程の高分解能NMRスペクトルによる追跡 (味の素中研) ○甲斐荘正恒・小西博子・鯉坂勝美	249

第 1 日

11 月 14 日 (月)

温度勾配NMRによって観測されるNMR線型
の変化と液体の動的性質との関係について

(北工大) ○下川繁三 (月丘ソフト) 神田勇一

[序] 温度が非定常な系を観測する時RFパルスによる磁化の時間応答成分のフーリエスペクトルに含まれる位相変化量について考察し、且此の現象を積極的に利用することによって液体の運動や構造についての新らしい知見が得られることを二・三の例について説明した。

一般に液体のNMR現象はパルスによる磁化の応答成分に含まれる緩和因子、或はそのフーリエスペクトルから得られる構造因子等の解析によって完全に説明することが出来ることと考えられて来た、液体の場合これはスピン系の集団が平均化出来ることに基づいている。しかしながら系が非定常にある場合にはスピン系の全磁化は平均化出来ず、スピンの微視的運動の平均和として性質が生じる。また T_2 の異常性となり、又或る場合には相分離の如く線型のもより程度として区別し議論されて来た。演者は温度勾配実験に於いてフーリエスペクトルの位相変化が著しい率に気がつきこれを一部報告して来た。今回はさらに詳細な実験により温度の過渡的応答によるスペクトルの位相変化を試作したプローブと温度勾配装置を用いて観測し、物質による相違、同位体効果、周波数依存性について調べて見た。

[観測装置上の問題点] NMR信号に位相ずれを生じさせる装置上の原因には、送信系の安定度、受信系の安定度、共振回路、AD変換器を含めた計算機内部の問題等が考えられる。高分解能NMRは長時間高安定を必要とするために安定性は十分考慮されておりここでは問題にする様な原因は無いと考えてよい。共振回路のLC部分は一定温度に保存されている場合、パルス出力が μsec のオーダーでは熱変動は十分小さく問題にはならない。一般の装置ではProbe内部の共振コイル(L)が送風系と直接つながっており温度による影響を直接受けている。此の場合コイルの材質の温度係数(コイルの保持材料も含めて)に依存した共振回路のQ(特にコイルのQ)の変化、或はLの値の変化によって共振周波数のズレを生ずる。

共振回路のQが高い場合Lの変化による共振周波数の変動が生じて位相のズレと信号強度の変化が生ずる(Qの変化は無いとした場合)と考えられる。

此の様な影響を調べる方法として1) 温度を変えて信号強度と位相ズレを測定し、2) 且物質による相違があるかないかを調べて見た。3) 今一つはプローブのコイルを送風系と断熱している位置において、同様の測定を行って見ることであろう。

[温度勾配発生装置とNMR法] 温度勾配を生じさせるにはどんな方法を用いても行なえる。しかしながら温度の勾配を発生させる再現性、送風系の制御を考えると従来のものと少し異なった考えで温度勾配を発生させなければならぬ。一つの試みとしてFig. 1に示す様なブロックダイアグラムで装置を構成して見た。

本装置の基本動作は、温度可変範囲を等分し、さらにその各範囲を指定された時間によって温度を変化させることにより、時間管理による温度勾配を発生させることが出来る装置としかゆ しげやう かんた ゆういち

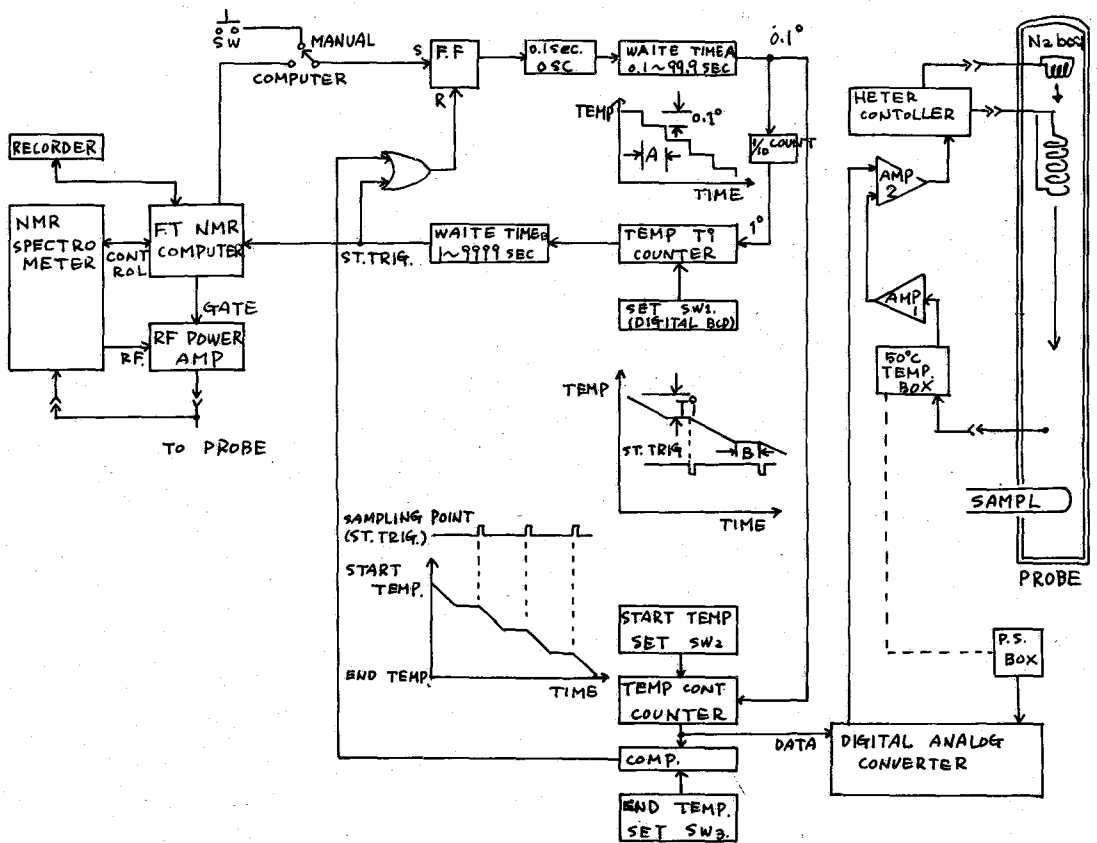


Fig. 1 Block diagram of the pulse fourier transform nmr spectrometer controlled by the temperature gradient apparatus.

で、FT NMRと組合せて動作させることが出来る。装置の詳細についてはここでは述べないが、温度検出はCu-C熱電対であるので最小検出温度に限界がある。此のため熱起電力の1度当りの感度を10倍にするための複合型熱電対の導入を計画している。又将来は最小設定温度を0.01°Cにすることも考慮中である。

(温度過渡応答と位相ズレ) 我々は前報¹⁾の11つの場合についても位相変化量を測定して見た。ここでは送風系から断熱されたコイルによる実験結果を述べておく。図2図は水およびアセトンについての同じ温度設定条件での信号強度および位相変化を示す。この図で判る様に、水とアセトンでの10°C当りの位相変化量は全く異なることが判る。測定周波数は36MHzである。図3図は同じ温度設定条件で求めたベンゼンの位相変化量と強度変化である。信号強度はほぼ同じ値に設定してある。これから判る通り温度の変化に依存して生じる位相変化量は物質によって異なる。又強度変化量は11つれも位相補正してE値であつてこれは温度変化にともなうBoltzmann分布の差を一つの原因と考えることも出来る。温度の配を変えて、又サンプリングの待ち時間を長くした場合についても測定した。すべての測定は4回積算し、パルス中は1/4パルスを用いた。

(位相補正を
おこなった場合の
実験例)

1) 水の位相変化は
強度変化によく対応
していることが判明
したのでここでは、
1°Cづつに設定温度
を変えて測定した場
合の信号の変化を調
べて見た。1°Cづつ
の温度勾配実験によ
ると、温度の低下に
供するスペクトルの位
相変化は4°Cで一度

逆方向に進み、又0°Cを超えた過冷
却状態になると位相変化の進み方は
急となることが判明した。このこと
は次の様に理解される。即ち水の場
合観測される量は、水の集団運動の
モードであり、分子の回転相関時間
 τ_R (10^{-12} sec) や水プロトンの交換速
度 τ_{ex} ($\sim 10^3$ sec) ではなから、又
重水によってHプロトンの相互作用
を切りはなすことにより位相ズレが
減少し、重水と水の比が10:1の場合
は大きな位相ズレは観測されなかつ
た。部分的な集合、融数域5~6°Cの
温度範囲でくり返されていることが
判明した。此の様に水の集合構造の

全体像が此の実験によって明らかにされる。此の様子は塩を含む水溶液の温度勾配実験における塩の析出過程の進行が目で見える様に示され、又糖を含む溶液においては水の集団構造の変化が生じて糖濃度に強く依存することが判った。蛋白質を含む場合の様は高分子水溶液では水の集団構造は蛋白質の配向構造に強く支配されていることが判り、特に膜物質に存在する水の温度勾配応答は極めて平坦で変化が少からることが判明した。生物体中の水に対する適用はセクションBにおいて述べるが此の種の実験がスペクトルの解析即ち強度変化を位相ズレと見て判定する場合のいくつかの傾向についてのべておく。オ1は、水の

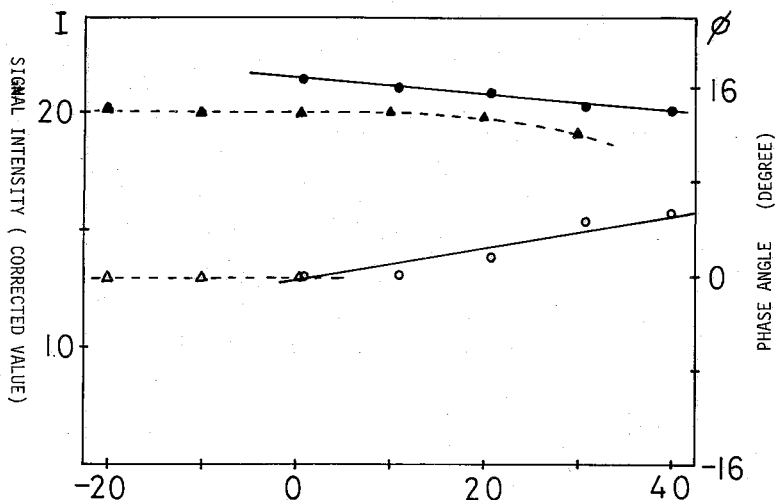


Fig. 2 The characteristic curve of the temperature gradient experiment for water (●), (○) and acetone (▲), (△).

(●) (▲) intensity corrected by phase change. (○) (△) phase angle.

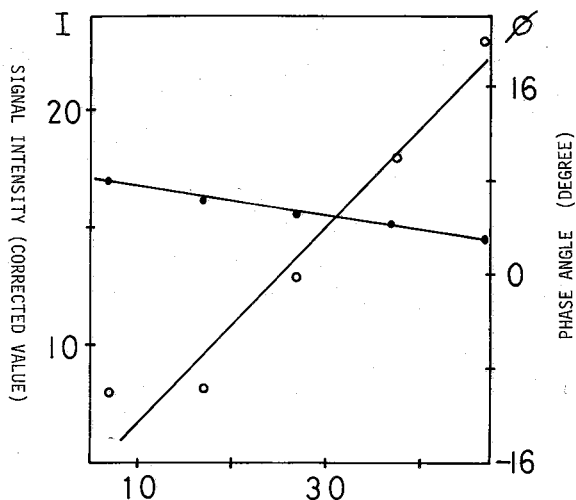


Fig. 3 The characteristic curve of the temperature gradient experiment for benzene. (●) intensity corrected by phase change. (○) Phase angle.

集合構造は周囲の環境を鋭敏に反映する。特に高分子液晶構造(膜構造等)の中に存在する水の集合体は膜自身の運動をよく反映する。このことは膜の運動を水分子集合体の運動としてとらえられる可能性がある。(セクションB参照)

2) シクロヘキサン. 有機純液体の運動の性質がスベクトルの位相にどのように反映するであろうか。シクロヘキサンの温度勾配実験を1°Cずつくわしく調べた。シクロヘキサンの位相は40~30°C迄ほとんど変化せず30~15°C位の間にだけ14%程度の位相変化量が観測された。その後位相変化はなくて純液体は結晶温度に至る。此の実験事実は次の様に解釈される。即ちシクロヘキサンのコンホメーションの変化(Ring Inversion)は常温附近ではイス型同子と考えられているが、此の平均構造に温度によつて偏りが存在していることを示している。

3) ベンゼン. 純ベンゼンでは温度勾配による位相変化量は温度と共に線型に変化している。これはベンゼンの分子間相互作用、即ちStacking作用が温度に対して一様に変化していることを示してあり。測定温度範囲ではStacking構造に変化がほとんどないことを示していると考えられる。

(物理的背景) 本研究における温度勾配法は対象とする液体物質の熱的性質を微視的にスピンの目で感じていることになる。位相が変化することは周波数ズレに対応する即ち、微視的に見てわづかた磁場の異なる同質の分子が多数生成していることを示している。そうしてこれは平均化してはいない。即ち

$$\langle M \rangle_{obs} = \langle M \rangle_a + \langle M \rangle_b \quad \text{但} \quad a \geq b$$

$\langle M \rangle_a$: 平衡系の磁化
 $\langle M \rangle_b$: 非平衡系に生ずる磁化

$$\text{平衡系では} \quad \langle M \rangle_b = 0 \quad \text{即ち} \quad \langle M \rangle_a = \langle M \rangle_b \text{ となる}$$

(周波数依存度) 以上では本研究ではどの位の速さの運動をとらえているか、これを明らかにするために周波数依存の実験を行つて見た。明らかに位相変化量は周波数依存性が出現した。水、ベンゼン、アセトンについての結果では、特に水の位相変化量は $10^7 \sim 10^8$ sec程度の集団運動モードであること、アセトンでは 10^7 sec程度に下ると均一系ととらえる。ベンゼンは $10^7 \sim 10^8$ secでStacking構造に変化はない。

Relation Between The Change of NMR Line Shape and The Dynamical Properties of Liquid State in Temperature Gradient NMR.

 by Shigezo Shimokawa and Yuichi Kanda
 NMR Research Laboratory, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo, 060, Japan.
 Nishin Software Co. Ltd. 2 Chome 13-8, Ueno, Daitoku, Tokyo, 110, Japan.

Abstract

A new method of FT NMR experiment connected with the temperature gradient unit is discussed. By using this method, new informations on dynamic properties of liquid state can be obtained both the change of phase and intensity caused by the temperature gradient.

(神大・理) ○山田博昭・西谷新二・世良明

高圧・高分解能 NMR の測定においては極めて均一な磁場内での、極めて高い圧力の、安全な維持と言う厳しい条件が満たされている必要がある。この為、主として装置を組み立てる際の技術的困難が故に長いあいだ未開拓の実験分野として放置されてきたようである。実験の成功例が殆ど時を同じくして報告され始めたのは最近のことであり^{1a-f)}、高圧下におかれた分子の挙動についてのユニークな情報を提供するひとつの新しい方法として注目されるようになった²⁾。

実験装置のタイプとして、(イ)耐圧プローブ法、(ロ)耐圧セル法の二つが考えられる。

●〔耐圧プローブ法〕^{1a, e, f)}

高圧ブロードライン NMR 法³⁾ にならって、耐圧性をもたせたプローブを高分解能用に設計変更したものと見なせる。この為、プローブの材質には高い抗張力と優れた磁氣的特性を兼ね備えたものを厳選し、熱処理と機械工作ののち RF coil などの配線を内部に組み込む。通常、チタン合金、ベリリウム銅などがプローブ本体の材料として使われているが微量の magnetic impurity の含有量、分布状態が磁場の均一性を大きく左右する。また高圧においてはプローブ本体に引張り応力が、RF coil には圧縮応力がそれぞれかゝるので磁場マップと S/N 比が常圧とは異なったものとなる。満足な耐圧プローブが得られるまで、材料を選びなおし、工作をやりなおすと言う試行錯誤が必要とされる^{1e)}。

●〔耐圧セル法〕^{1b, c, d)}

この方式では、試料セル内部に高圧が印じ込められるので、耐圧プローブ法で述べた問題点はほぼ解消される。耐圧プローブ法との根本的な違いは、セルの内部からの圧力によって強い引張り応力が主としてセルの円周方向にかゝってくることである。従って抗張力の高い非金属材料が要求される。

ガラスの耐圧強度は一般に $300 \text{ Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ (約 300 気圧) 程度とされているがこれは理論強度の $1/300$ に達しない値である。表面に存在するこまかいキズが強度低下の主原因であると言われ⁴⁾、これを HF 水溶液で表面処理して除去すると $2000 \sim 3000 \text{ Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ (文献⁴⁾ によれば最高 $2 \times 10^4 \text{ Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$) 程度のものが容易に得られる。われわれは先に通常の二級硬質ガラス管から出発してガラス細工と HF 処理により小型の耐圧セル・熱膨張昇圧システムを完成し、 $1600 \text{ Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ までの高圧実験に成功した^{1b)} が、これはわれわれの知る限り、液体試料についてプロトン化学シフトの圧力依存性を観測した最初の例となった。この装置は水銀の熱膨張を利用して高圧を発生し、エーテルの P-V 関係から圧力を見積る形式なので油圧ホープ、ブルドン管圧力計其他の専門的な高圧用機器類をいっさい必要としなかり。したがって装置の組み立ておよび作動に極めてデリケートな技術を要すると言う難点があった。

やまだひろあき・にしだにしんじ・せらあきら

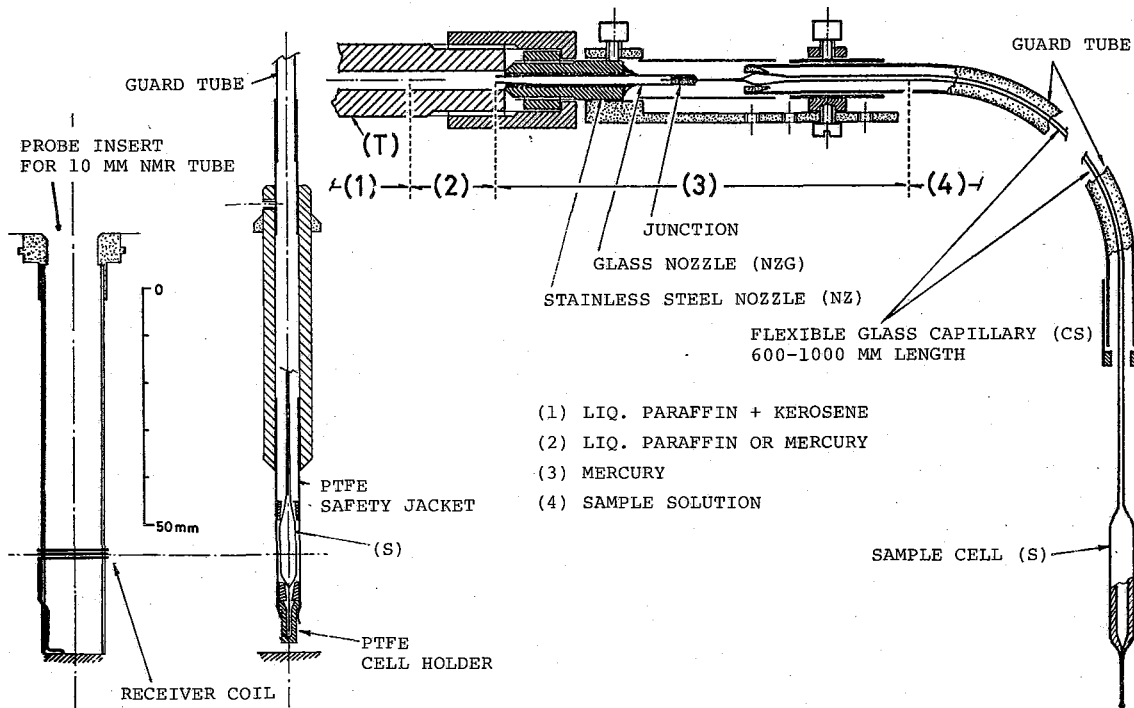


Fig. 1. Illustration of the pressure transmitting device and high pressure glass cell.

この点を克服する為に市販の昇圧系にガラス毛细管を接続する方法を開発し、通常 $2000 \text{ Kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ までの測定に耐え得る高压装置^{1d)}を完成した (Fig. 1)。試料セル (S)、フレキシブルな毛细管 (CS)、ガラス製ノズル (NZG) を接着したステンレス鋼ノズル (NZ) より成り、内部に試料 (<0.05 ml)、および水銀を満たす。水銀は昇圧系 (T)、圧力計、ハンドポンプ) 内の圧力伝達媒 (灯油 + 流動パラフィン) が試料溶液に混入するのを防ぐ。ハンドポンプのハンドル操作と殆ど同期して、水銀が (S) の方向に速やかに移動し、これによって圧力の伝達を確認できる。このように昇圧系 ↔ 試料の間の連絡はフレキシブルな毛细管によっておこなわれるので、耐圧プローブ方式 (鋼製パイプで両方を連結。プローブの内容積が大きい為毛细管では圧力伝達に長時間を要する) と異なり、セルを RF-coil および磁場の中心に正確にセットすることが容易である。

● (耐圧セル法による高分能 NMR の測定性能) (Jeol PS-100 スペクトロメーター使用)

(i) 分解能, 感度, 化学シフトの測定精度。 Fig. 1 から明らかなように試料のスピンゲはできないが、セルの内径が充分小さく (約 1 mm), $\Delta\nu_{1/2} = 0.8 \text{ Hz}$ 程度の分解能に到達する事は容易である。external lock で磁場制御をおこなひ、サイドバンド法を用いた 10 ~ 15 本のくりがえし測定で化学シフトの測定精度 $\pm 0.05 \text{ Hz}$ を得ている。S/N 比を高める為には太いセルが望ましいが、分解能および耐圧性能を考慮して通常は内径約 1 mm にあてられている。この為、例えば n-hexane 中、 HCCl_3 のシフトを精密測定する場合、+5 mol% の HCCl_3 濃度が必要である。磁場の安定性が良好な場合は internal lock を用いる測定⁵⁾も

可能で、ハルス FT 法による積算の S/N 比をあげ得る。したがって更に細い耐圧セルの使用も可能となり、分解能および耐圧性能の向上が期待される。

(ii) 測定温度範囲、圧力の上限、および安全性。セルの耐圧性の立場からすれば、常用の温度範囲 ($34.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$) よりも高温の方がむしろ有利であると思われ、試験的に $1500 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ で 300°C まで昇温した経験もある。しかし高温測定ではセルが破裂した場合の試料の突飛に備えて、強力な安全ジャケットを用意する必要がある。セルの耐圧限界は一般に $2000 \sim 2500 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ の近辺にあると思われるが、セルを小型化することにより、 $3000 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ を上まわす耐圧性を記録したこともある。耐圧性能の再現性が必ずしもよくないのは欠点であるが、 $2500 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ までの実験であれば、破裂時にも安全ジャケットの外部には危害が及ばないことは経験上分っている。

(iii) 他核種高圧 NMR。現在 internal lock 方式により高圧 ^{13}C -NMR の予備実験を進行中である⁵⁾。通常の 5 mm の試料管を用いての測定より大幅に積算面積を増やす必要があり、大型の耐圧セルの製作も検討中である。

● [将来への見通しについて]

(i) 化学シフトの圧力依存性を理論的に取扱う立場からすれば、1 気圧の外部基準物質から見た絶対圧力シフトを測定する事が望ましい。ところが現在的方式では試料のスピンングができない為、外部基準を用いる実験は困難である。そこで、昇圧後は圧力伝達用毛細管とセル本体を分離できるシステムを試験中であり、これによればセル本体と毛細管部はそれぞれ独立に製作することが可能で、ガラス細工もほろかに容易なものとなる。

(ii) ひとつの簡単な方法として熱膨張高圧マイクロセルの方式⁶⁾も実験中である。すなわち、ガラス製の耐圧カプセル内に試料を低温下に滴在したのを熔封し、スピニング可能な安全ジャケット中に入れて、温度制御されたプローブ内に置く。カプセル内部の試料が熱膨張 (又は固→液への相変化によって膨張) することにより高圧が発生するわけである。圧力シフト既知の物質を内部に (但し試料とは隔壁で隔てる) 共存させておき、試料と同時に化学シフトを測定すれば内部の圧力を推定することができる。

(iii) 以上の方式で到達可能な圧力の上限は $3000 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 程度と考えられるが、これは分子間相互作用に好する圧力効果を調べるには適当な圧力レベルであると言えよう。しかし更に高圧では分子構造自体の圧力による変形も、とらえることが可能となろう。そこで、 $5000 \sim 10000 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ のあたりに一応の目標を置いて、試料スピニングの可能な (したがって分解能其他は常圧における測定性能と同じ) システムを完成する為セルの材質を再検討し、昇圧器および増圧器とセルを組み合わせた一併となった小型装置を設計中である。

1. (a) Jonas, Rev. Sci. Instrum., **43**, 643 (1972); (b) Yamada, Chem. Lett., 1747 (1972); (c) Jouanne and Heidberg, J. Magn. Reson., **1**, 1 (1972); (d) Yamada, Rev. Sci. Instrum., **45**, 640 (1974); (e) Oldenziel and Trappeniers, Physica **82A** 565 (1976); (f) Merbach and Vanni, Helv. Chim. Acta, **60** 1124 (1977).

2. Jonas, Annu. Rev. Phys. Chem. **26**, 167 (1975). 3. Kushida et al, Phys. Rev., **104**, 1364 (1956). 4. Griffith, J. Am. Chem. Soc., **51**, 513 (1921). 5. 山田, 中村, 田良, 未発表. 6. 山田, 衣笠, 日化第 26 年会 (1972) 発表.

HIGH-PRESSURE HIGH-RESOLUTION NMR MEASUREMENTS

Hiroaki Yamada, Shinji Nishitani, and Akira Sera

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University, Nada-ku, Kobe

(1) Instrumentation using a pressure resisting glass cell¹⁾ for the measurements of 100 MHz proton NMR spectra of liquids at pressure up to 2000 kg·cm⁻² is reported. A reinforced glass cell (O.D./I.D. = 3 mm/1 mm, 20-30 mm length) having a tail of flexible capillary (O.D. = 0.3 mm, 600-1000 mm length) is placed in a PTFE safety jacket wound by a 0.2 mm \varnothing polyamide fishing line. The safety jacket, designed to fit a Jeol PS-100 high resolution probe equipped with a variable temperature controller, works effectively up to 2500 kg·cm⁻² in protecting the probe insert against possible damage which might be caused by accidental explosion of the cell body. The pressure is generated in a standard high pressure equipment and transmitted to the sample cell located in the NMR probe through the flexible glass capillary.

For ¹H-NMR measurement, the continuous wave operation is used while the field control is usually effected by means of the two sample system NMR lock which enables us to conduct easily the high resolution measurement to establish $\Delta\nu_{1/2} = 0.8$ Hz for the singlet proton resonance line with the accuracy of measured chemical shift of ± 0.05 Hz up to 2000 kg·cm⁻².

(2) We are now carrying out a preliminary experiment which uses a spinning high pressure cell, in which the high pressure is generated by thermal expansion of sample sealed in the cell body. The device allows us to conduct the external referencing system high pressure experiment to obtain absolute pressure dependence of the resonance. Pressure and temperature limitation and safety with this sort of simple equipment will be discussed.

A possibility to build a spinning high pressure assembly made up of the combination of a pressure-resisting cell and a compact pressure generator-intensifier will also be discussed in some detail.

(1) H. Yamada, Rev. Sci. Instrum., 45, 640 (1974).

近年開発されたパルスNMR法の中で、有用な情報を提供するが、まだあまり普及していない。固体の高分解能NMRと液体及び固体における二次元FTNMRの種々の方法、意義、実例及び将来の展望等について解説を行なう。

(1) 固体の高分解能NMR

固体で高分解能NMRを行う上で最も興味深い点は、固体では通常原子分子が静止しているため化学シフト及び間接スピンスピン相互作用が二階のテンソル量として求められることにある。それは、電子状態が立体的に把握される、ということであり、情報量の飛躍的な増大を意味する。単結晶の場合にはスペクトルの角度変化を測定することによりテンソルが決定され、多結晶の場合には化学シフトの異方性によるスペクトルの広がりからテンソルの主値が決定される。

しかしながら、固体においては伝統的手法では高分解能スペクトルは得られない。それは通常、大きな双極子幅 ($10^3 \sim 10^4 \text{ Hz}$) が高分解能スペクトルをおおい隠しているからである。したがって、固体の高分解能NMRを可能にするには、何らかの手段によって、双極子幅を消去しなければならない。それにはいくつかの方法が考案されているが、ここでは現在のところ比較的データの集積が行なわれている、magic-angle spinning法¹、multiple pulse法^{2,3} 及びproton-enhanced NMR⁴ について述べる。

magic-angle spinning法は、試料の高速回転によって双極子相互作用を0に平均化し得ることを見出したものである。但し、条件として磁場と回転軸のなす角を $\cos^{-1} \frac{1}{\sqrt{3}}$ にすること、及び回転速度は双極子幅を超えることが必要である。回転速度の限界から ^1H や ^{19}F に対しては効果がなく、ほとんど ^{31}P に対して測定が行なわれてきた。更に、固体で測定しながら、化学シフトや間接スピンスピン相互作用に対して流体と同様に等方平均値しか検出できないという欠点がある。

multiple pulse法は、magic-angle spinning法が座標空間で双極子相互作用を0に平均化するのに対し、特殊なパルス系列をスピン系に照射することによって、スピン空間と同様のことを行うものである。初期には、WAHUAサイクルと称される4パルス系列² が用いられたが、今日では、分解能、安定性等に優れている8パルスサイクル⁴ が主に用いられている。 ^{13}C のように磁気的に希薄なスピン系(S)に対する高分解能NMRは、Sスピン間の双極子相互作用は省略し得るから、 ^1H のような磁気的に密なスピン系(I)に対して強い高周波磁場を照射し、I-S間の双極子相互作用をdecoupleすれば可能となる。しかしながら、proton-enhanced NMRを用いれば、decoupleされるだけでなく、回転系二重共鳴⁵ により信号が増大され、しかもSスピン系よりT1の

てらお たけひこ

短い[スピン系のT₁]で実験を繰り返すことができ、非常に有利である。1回にアダマンタン中の¹³Cに対して行なわれた結果⁴を示す。

場合によってはこれらの方法を並用することも有効である。例えば多結晶の試料で multiple-pulse 又は proton-enhanced NMRを行なって、いくつもの多結晶スペクトルが重なり合って解析不能の場合に magic-angle spinning 法を並用して、等方平均値を分離測定することができる。

次に将来の展望について二、三述べる。magic-angle spinning 法は他の方法と並用される以外には単独で用いられることはほとんどないものと思われる。multiple pulse 法は画期的な方法であるが、装置製作及び測定の問題にわたってかなりの困難を伴う。したがって、より簡単な方法の出現が望まれるが、実際に2,3の新しい試みもなされている。^{6,7} ¹³C等の希薄なスピンの高分解能NMR法に関しては proton-enhanced NMRは基本的には最終的な方法であると思われる。実験も比較的容易であり、ある程度の普及も考えられるであろう。固体の高分解能NMRは、適用し得る試料の制限、分解能の限界等の問題を残しているが、今後共、技術的な改良が行なわれていくと共に、様々な分野に応用されて、ユニークな知見を提供し続けるものと思われる。

(2) 二次元FTNMR

1975年に初めて行なわれた新しいNMR法である二次元FTNMR^{8,9}は、一見、分離測定が不可能と思われる情報を互いに独立した二つの周波数軸に分離する可能性を持ちNMRの分野に新局面を持たらすものと期待される。二次元FTNMRにおいては、時刻 $t=0$ で 90° パルス等により横磁化を準備し、その後 $0 < t < t_1$ の間はハミルトニアン \mathcal{H}_1 のもとで、 t_1 以後はハミルトニアン \mathcal{H}_2 のもとで時間推進させる。そして t_1 以後の信号を $t_2 = t - t_1$ の関数として記録する。 t_1 の一連の値に対して実験をくり返し、得られた二次元信号 $s(t_1, t_2)$ を二次元フーリエ変換して、二次元スペクトル $S(t_1, t_2)$ を得る。例を2回に示す。⁸ これは n -ヘキサンの ¹³C に時刻 0 で 90° パルスを照射し、時刻 t_1 以後 ^1H にデカップリング用のrf磁場を照射する実験を行って得られた二次元スペクトルである。 ω_1, ω_2 軸に沿ってそれぞれ、デカップルされていないスペクトル及びされているスペクトルが示されている。こうして ¹³C-¹H 間の間接スピン-スピン相互作用が二次元的に ¹³C の

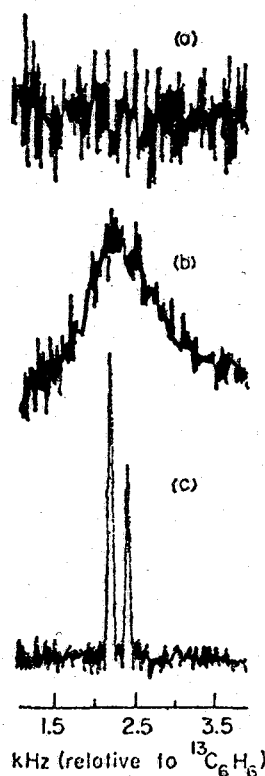


Fig. 1⁴⁾ Fourier transform NMR spectra of ¹³C in polycrystalline adamantane at 24.46 MHz. (a) Result of a single free induction decay. (b) Cross-polarization spectrum without decoupling. (c) Cross-polarization spectrum with proton decoupling.

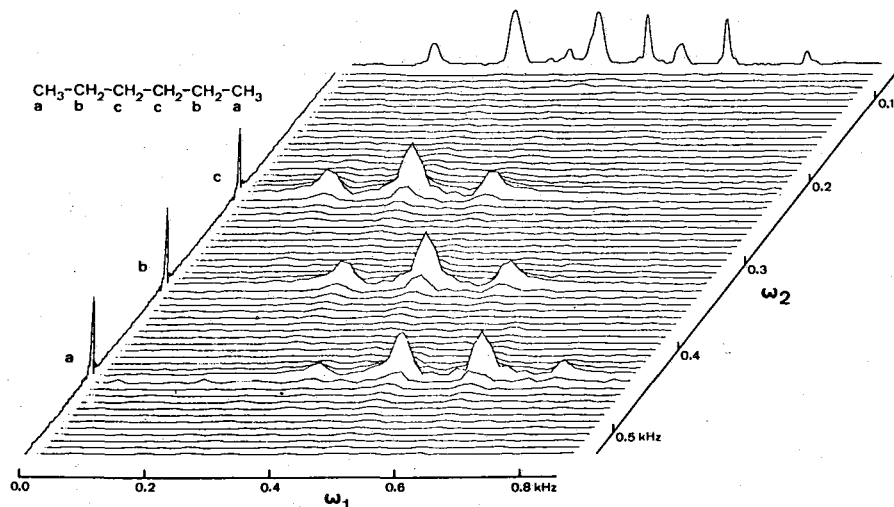


Fig. 2⁹⁾ 2D-resolved ¹³C spectrum of n-hexane. The uncoupled 1D spectrum is indicated along the ω_1 axis and the proton-decoupled spectrum is shown along the ω_2 axis.

化学シフトから分離して測定される。一次元FTNMRではデカップリングせずには、スペクトルが複雑で解析できない場合が多く、従来、みすみす捨てていたスピンスピン結合に関する情報が二次元FTNMRでは見事に得られる訳で、その意義は大きいものと思われる。更に、二次元FTNMRはプロトンの巨視的な密度分布を得る目的で¹⁰⁾ あるいは固体内のC-H間距離を定める¹¹⁾ ために用いられている。今後も、二次元フーリエ変換はNMRに情報量の拡大を持たらすと共に、他のスペクトロスコピーにも応用されていくものと予想される。

- 1) E.R. Andrew, Progress in NMR spectroscopy, Vol. 8, eds. J.W. Emsley, J. Feeney and L.H. Sutcliffe (Pergamon Press, London, 1971) P. 1.
- 2) J.S. Waugh, L. M. Huber, and U. Haeberlen, Phys. Rev. Lett. 20, 180 (1968)
- 3) U. Haeberlen, High Resolution NMR in Solids, (Academic Press, New York, 1976)
- 4) A. Pines, M. G. Gibby, and J.S. Waugh, J. Chem. Phys. 59, 569 (1973)
- 5) S. R. Hartmann and E. L. Hahn, Phys. Rev. 128, 2042 (1962)
- 6) A. Pines, D. J. Ruben, S. Vega, and M. Mehring, Phys. Rev. Lett. 36, 110 (1976)
- 7) C. S. Yannoni and H.-M. Vieth, Phys. Rev. Lett. 37, 1230 (1976)
- 8) L. Müller, A. Kumar, and R. R. Ernst, J. Chem. Phys. 63, 5490 (1975)
- 9) W. P. Ave, E. Bartholdi, and R. R. Ernst, J. Chem. Phys. 64, 2220 (1976)
- 10) A. Kumar, D. Welti, and R. R. Ernst, J. Magn. Resonance 18, 69 (1975)
- 11) R. K. Hester, J. L. Ackerman, B. L. Neff, and J. S. Waugh, Phys. Rev. Lett. 36, 1081 (1976)

A Review of High Resolution NMR in Solids and Two Dimensional FT NMR

TAKEHIKO TERAO

Department of Chemistry, Kyoto University, Kyoto

The principles and applications of high resolution NMR in solids and two dimensional FT NMR are reviewed.

The first part of the review is devoted to high resolution NMR in solids, such as magic-angle spinning method, multiple pulse method, and proton-enhanced NMR. A combined method of magic angle spinning and another method is also treated. Two newly developed methods by Pines et al. and Yannoni et al. are briefly reviewed. Finally the limitation of resolution and the restriction of applicable samples are discussed.

The second part is concerned with two dimensional FT NMR which is a new method performed first in 1975 and has possibility of resolving two kinds of information on the two frequency axes. After the general idea of two dimensional FT NMR is given, J spectroscopy, spin density imaging, and structure determination by dipolar coupling measurements are mainly reviewed.

京大理 °松井茂, 前田史郎, 寺尾武彦

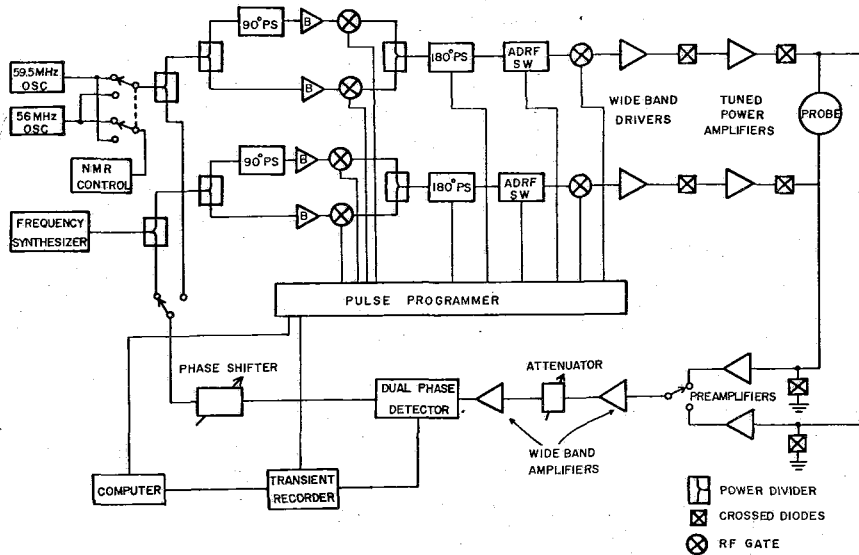
Proton-enhanced NMR¹⁾ (固体における¹³C等の微弱信号核の高分解能NMR法)における感度及び分解能を向上させた結果を報告する。

〔実験〕 実験は自作の装置を用いて常温で行った。試料は多結晶のアダマンタン、及びd-カンファーを用いて¹³Cに対して測定を行った。これらの試料は分子の等方的な回転運動のため、多結晶でも化学シフトの異方性による線中の広がりが見られず、テストサンプルとして有用である。装置のブロックダイアグラムを図1に示す。装置は versatility に重点をおいて設計した。送信器は二重共鳴用に、ほぼ同等なものも二台用意されている。電磁石は、日本電子の3H-60型高分解能NMR装置のものも利用しているため、周波数はプロトンに対して約60MHzである。パルスプログラマーは、どのようなパルス系列もプログラムできるパルス専用の自家製コンピューターシステムである。Multiple pulse NMR, Proton-enhanced NMR等の複雑なNMRも、単にソフトウェアによって可能になっている。また、このシステムはマイクロプロセッサを用いず、デジタルICを使用して作られているため非常に高速であり、数100nsecの中のパルスの直後に次のパルスも出力することも可能である。フリーディケイはトランジェントレコーダーでAD変換及び積算を行った後、ミニコンピューターに導かれる。このようにして、低速のコンピューターを用いても、高速AD変換(最短1μsec)及び高速積算(2~3msec)が可能となる。コンピューターは、TIの990/10を用いている。

〔感度の向上〕 Proton-enhanced NMRの感度を向上させるために、我々が改良した方法(2つ)を図2に示す。Sは観測する希薄スピン(¹³C等)を表わし、Iはabundantなスピン(¹H等)を示す。a)の方法は、デカップリングの直後に最初のパルスと180°位相の異なる90°パルスをかけて、スピンロックされている磁化を静磁場の方向にひきもどすことにより、T₁による待ち時間を短縮し積算効率を改善したものである。この方法によれば、IスピンのT₁が十分長い場合には、最後に90°パルスをかけない場合に比べて同一時間の積算で10倍程度SN比が改善される。acquisition timeに比べてT₁が相当短い場合や、T₁の数倍以上待ち時間をとる必要がある場合には効果がないが、少なくとも、悪影響を与えることはない。我々はこのタイプの実験を行う時には、常に最後に90°パルスをつけ加えて実験を行っている。b)の方法は、Iスピン系の回転系断熱消磁中にSスピン系と熱接触させることにより、Iスピン系の磁化を直接Sスピン系に移す方法であり、mixing time 及び緩和時間の影響を無視すれば、Sスピンの信号は、 $\sqrt{C_I/C_S}$ (C_S, C_Iはキュリー定数, I=¹H, S=¹³Cのとき $\sqrt{C_I/C_S} \sim 40$) 倍に enhanceされる。この方法はIスピン系に対して回転系断熱消磁を行って、いったんIスピン系のZeeman orderを、

すっいしげる, すえだしろう, てらおけひと

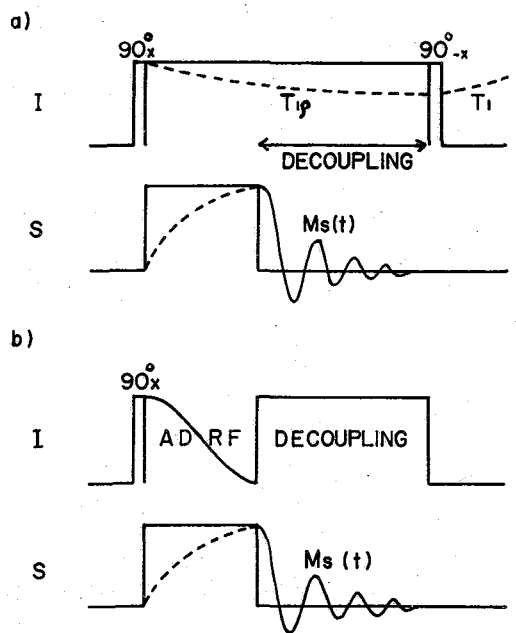
Fig. 1. BLOCK DIAGRAM OF THE DOUBLE-RESONANCE SPECTROMETER



dipole 系の order に移した後、S スピン系に対する回転系断熱昇磁によって、S スピン系の Zeeman order に移す方法²⁾に比べて、 $T_{1\rho}$ が短い場合に有利である。Pines らの original な方法¹⁾では、1 回の熱接触では γ_I/γ_S ($I = ^1H$, $S = ^{13}C$ の時 $\gamma_I/\gamma_S \sim 4$) 倍の enhancement しか得られず、 $T_{1\rho}$ が長い場合には多数回の熱接触によって SN 比を向上させる訳であるが、S スピン系の T_1 , $T_{1\rho}$ の測定を行う場合には、1 回の熱接触しかさせることができないので、b) の方法のように 1 回の熱接触で一挙に大きく磁化できる方法は、特に有利である。我々は、実際に、メタ-オールを色接した β -キ-ール結晶中の ^{13}C の $T_{1\rho}$ を、この方法を利用して測定した。

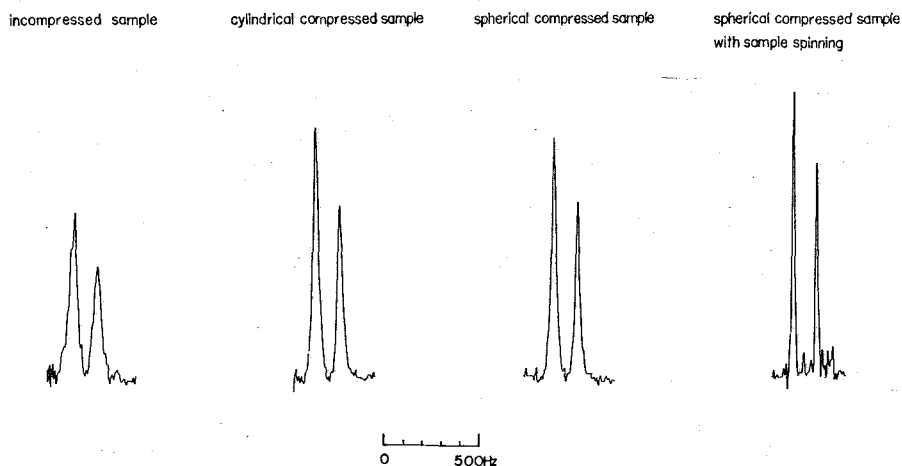
[分解能の向上] Proton-enhanced NMR において、I スピン系に十分大きい H_1 を照射し、完全に I-S 間双極子相互作用を decouple したとしても、なお 40~50 Hz の線中の広がりが見られる。従来、この原因は S-S 間双極子相互作用と静磁場の不均一性に帰されて

Fig. 2. Representations of the Modified Methods



いた。¹⁾しかし我々は両者の和を10 Hz以下にしても、なおアダマントンで47 Hz、d-カンファーで33 Hzの線中を観測した。我々は残りの中は主として、体積磁化率によるものではないかと考え、試料を圧縮固化(円筒形)したところ、アダマントン及びd-カンファーで線中がそれぞれ35 Hz及び24 Hzに減少した。これは、体積磁化率の値(この場合は、isotropic)と個々の微結晶の形及び、磁場に対する方向によって定まる局所的な磁場の乱れが圧縮固化によって消失したと考えるものと考えられる。更に圧縮固化した試料を、球形(直径4 mm)に磨くと、線中はそれぞれ28 Hz及び15 Hzとなった。これは試料全体の形による不均一性の広がり、回転楕円体にするところによってなくなるためである。更に、試料を磁場に垂直な軸のまわりに回転させたと、線中はそれぞれ14 Hz及び10 Hzに減少した。通常液体で行なわれる試料回転は、試料内の磁場の不均一性を減少させるものであるが、この場合は、もともと磁場の不均一性は1 Hz以下であり、他の原因による広がりを減少させているものと思われる。少なくとも ^{13}C - ^{13}C 間双極子相互作用(アダマントンで5.3 Hz; Meiboom-Gillの実験より測定した)は、回転により $1/2$ に減少するが、これのみでは説明されない。また、最終的に得られた線中の主な原因が何であるかも、今のところ不明である。図3に、アダマントンにおけるnarrowingの状況を示す。

Fig. 3. Resolution Enhancement for Proton-Enhanced ^{13}C NMR in Polycrystalline Adamantane



- 1) A. Pines, M. G. Gibby, and J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.*, **56**, 1776 (1972)
- 2) A. Pines and T. W. Shattuck, *J. Chem. Phys.*, **61**, 1255 (1974)

Improvements of Sensitivity and Resolution in ^{13}C High Resolution NMR in Solids

Shigeru Matsui, Shiro Maeda, and Takehiko Terao
Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606

We have succeeded in improvements of sensitivity and resolution in ^{13}C proton-enhanced NMR. Two methods are reported for sensitivity enhancement. The first one is the method which allows the recycle time to shorten. The spin-locked proton magnetization is brought back to the static field by a 90° pulse immediately after decoupling. This modification reduces the accumulation time to about $1/100$ in an ideal case. The second is a new "total cross-polarization" method. While the proton-spin system is being adiabatically demagnetized in the rotating frame rf field for ^{13}C is irradiated, and the polarization is directly transferred from ^1H spin system to ^{13}C spin system. This method for "total cross-polarization" is advantageous compared with that previously reported in case T₁ is short. Resolution of ^{13}C spectra of polycrystalline adamantane and d-comphor was considerably improved by compressing them into hard lumps. This effect is attributable to elimination of the local field disturbance depending on the shape of each small crystal by compressing a polycrystalline sample. Additional improvement was observed in a spherically shaped sample of the compressed lump. The resolution was further enhanced by spinning the sample. The final obtained full-linewidths at half height were 14 Hz and 10 Hz for adamantane and d-comphor, respectively. Each of them is below one third of the usual line-width obtained in ^{13}C proton-enhanced NMR.

市販一般波形解析装置によるパルス・フーリエNMRの試み

(九大・薬) 金沢洋子, 田中邦副 (電認研) 亀井裕益

比較的緩和時間の短い核種のNMRを測定するとき、積算に有利なパルス・フーリエシステムを用いることが多し。とくに市販のFT-NMRシステムは一般に高価でなかなか入手できないのが現状である。我々は線幅が広く、共振線の数もあまり多くない核の測定のために安価な市販の一般波形解析装置を組み込んだシステムを試作した。このデータポイント数に関する要求を捨て、早いデータ取り込みが可能な機種を選んだ。¹⁵Nに関しては実用になることが認められたことと測定結果について報告する。

[測定方式]

図1のブロックダイアグラムに示す方式にやうに測定した。(自)は自家製。

磁石 ; 日本電子KK, JNM-PS-100 用 電磁石

プロトンはなる外部ロック方式を使用

プローブ ; 日本電子KK製, 7MHz用, 10mm OD

DCパルス発生器 ; 10MHzをクロックとするディジタルパルス発生器 (自)

RFゲート ; ホットキャリアダイオードによるダイオードソリッド (自)

電力増中器 ; 最終段は2B27P×2, H1は今のところは15~20年, プローブの改造により大きくする事は可能である (自)

位相検波器 ; HPのバラニストミキサ10534Aを用いたもの (自)

ビデオアンプ ; 741型オペアンプ×3を使用。最大利得 120 db (自)

トリガ遅延回路 ; ディジタルメモリのトリガ用。遅延時間 0~990μs

ディジタルメモリ ; 岩崎通信機KK, DM302型
入力は100mV~20V, 1μs/word, 8bit, 2kword

7-9.7°ロセッサ ; 岩崎通信機KK, SM1330型
容量8kword, 16bit, 11-ドによる演算回路をもつ。2¹⁵回の積算, FT, IFT (共に2kwordで5秒)が可能。位相補正ユニットは特注で追加した。

レコーダ ; 横河電機KK, X-Yレコーダ3077型

[結果]

次の測定条件によ、乙得¹⁵Nのスペクトルを以下の図に示す。データ取り込みは図4, 5以外は2048実, パルス中は40μs, トリガ遅延時間は図6以外は250μs, rf周波数はかなざわよう、たなかましつつ、かめいひうたけ

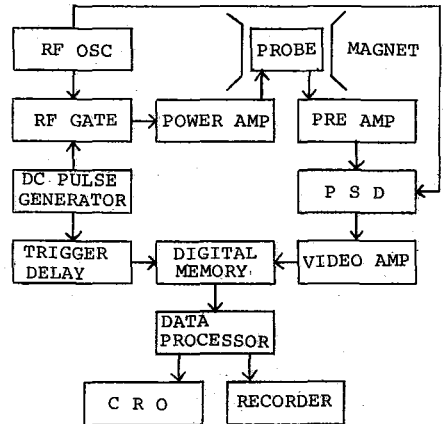


Fig.1 BLOCK DIAGRAM

7, 223から7, 226 kHzで、試料に合わせた。測定温度は29°C。データレリ=み速度、分解能、積算回数Nはこの順で表した。

図2ではNH₄NO₃ 飽和溶液のNH₄の部分を示した。

(A)は試料の回転を行な、たもつ、(B)は行なわれないもつ、またこの測定条件はNO₃の共振線は折返、こしつて、両方を同時に観測できる条件では分解能が5Hz/ptとなり、NH₄の信号が抜け落ちこしつてしまう。

図3には溶液中の広い範囲に用いて解像を示した。

図4はS/Nに対するノイズの折返し効果を示したものである。現在のシステムでは周波数領域におけるデータポイント数かめずか1024であり、S/Nの衰減不利であることも予想される。A: データポイント数1024を用いて周波数領域10kHzに含めこてとりこしたもつ、B: 512から5kHz、C: 256から2.5kHz これら三種にっきはじめの2.5kHzの部分を比較こしてみた。これはフィルタなしの結果であるが、差がみられる。一般の測定には3kHzまで平均なフィルタを用こしているこので、その場合のスパンと右側に示した。なお、10ルスタ中40μsのとき、共振線の強度は2kHzまでほい一定であるが、3kHzでは約5%にみちる。したが、こ今のこころ3kHz以上の周波数での測定はこしつてこない。

図5はアセトニトリルでT₁を測定したもつである。

多重回積算を行なう場合の積算時間、DM302からSM1330への搬送時間を含みこつた次の表に示す。

データレリ=み速度	tag X データ長 (2048)	最低レリ=み時間 (ops.)	25回の積算時間
tag (μs/w)	(ms)	(ms)	(min)
5	10.2	100	55
10	20.5	115	63
20	41.0	135	74
50	102.4	197	108
100	204.8	299	163
200	409.6	504	205

次に多重回積算による測定例を示す。

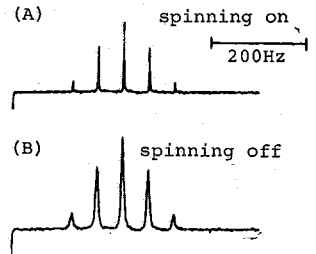


Fig.2 NH₄NO₃(aq. satd.)
0.5ms/w, 1Hz/pt, N = 64

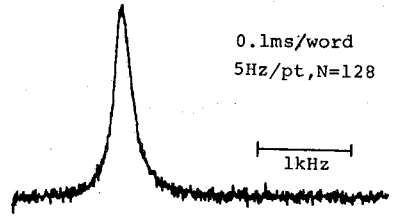


Fig.3 Pyridine (pure liquid)

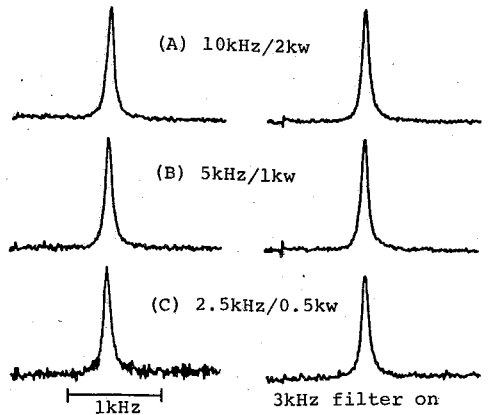


Fig.4 Effect of aliasing on S/N
CH₃CN N=8

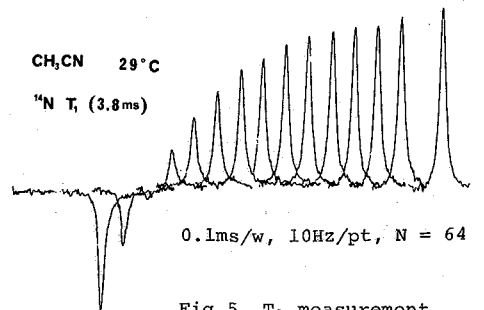


Fig.5 T₁ measurement

図6は卵黄レシチンのコリンのNである。(A)はクロロホルム中に0.3M, 単分子で溶解しているときのもので、2048回積算(18分)。(B)は水中で超音波処理したもので、vesicle

になっている
ほかのもので
ある。約0.2M,
32,768回積算
(約10分)。
たまたまトリ
がの遅延時間
が長かった

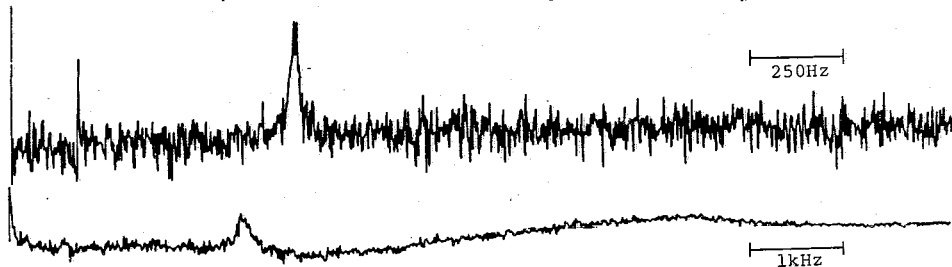


Fig.6 Egg Yolk Lecithin(crude)

(A) 0.3M in CHCl_3 , 0.2ms/w, 2.5Hz/pt, N = 2,048

(B) ca 0.2M in buffer(sonicated) 50 μ s/w, 12.2Hz/pt, N = 32,768

($<50\mu$ s)にもかかわらず観測できた。線中の古い共鳴線であるとすれば、遅延時間を短くするだけでもS/Nはかなり改善されるはずである。なお図6に用いる試料は九大薬学部、古賀けい子氏の提供によるものである。

図7は複数値の共鳴線がある例である。図中のoriginalはFIDとFTしたまいのもの。位相補正をしたスペクトルのベースラインの波にフワワは図8で論じる。

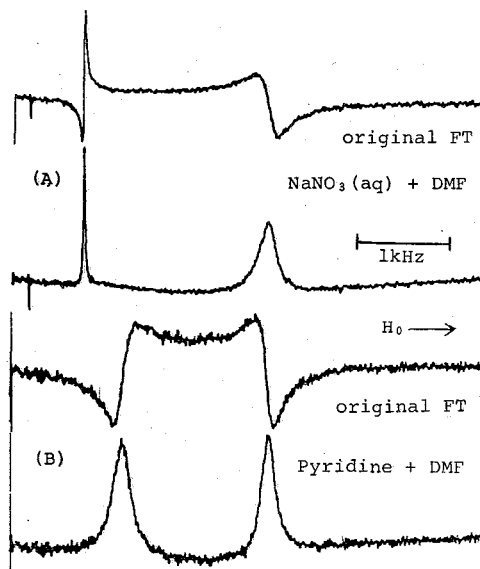


Fig.7 0.1ms/w, 5Hz/pt, N = 128

図8は周波数依存の位相補正にもなるベースラインのうねりを検討したものを示す。アセトトリルを用いた。(A)はトリニル下まいのFID, (B)はそのFT, (C)は位相の周波数依存部分の補正を行なったもの。ベースラインのうねりを抑えるために、補正值を大きくと、こみた。

(D)は(C)の逆FT。

時間軸がずれとせう分だけゼロ信号がはじ、こいる。ゼロ信号からFIDのあたりに向けて上、こいる分は関数の連続性の要求によって生じたものとみえてくる。さらに(D)のFTをとると(C)と全く同じものになる。

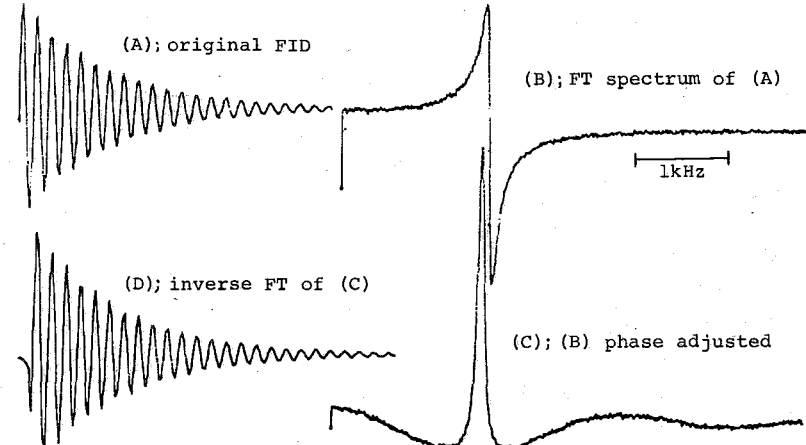


Fig.8 Effect of phase adjustment on the base line; CH_3CN 0.1ms/w

うねりの周波数はFIDの時間軸のずれに1:1で対応し、FIDに階段関数を掛け合わせたもののFTと理解できる。一方、時間軸のずれはFTパルスのあと信号より2倍程度の遅延時間を補正する必要がある。もしこの位相補正がFIDの時間軸を動かすことになれば、補正にもなるベースラインのうねりの出現は不可避であり、中の広い共鳴線によると、これは問題になる。この突には、これは検討中である。

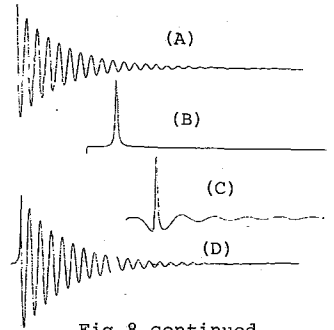


Fig.8 continued

[評価]

検出系、データ処理系ともにまだ改善すべき点があるため、評価は下等のはむかかしいが、まがとのシステムで容易に¹⁴Nの実用可能なシステムが得られたことかいたす。

データポイント数からくる制約にあり、線中のせまい共鳴線が数多くある核(たとえば¹H, ¹³Cなど)の使用は無理であるが、共鳴線の数が少なく、せまい周波数帯域にあれば処理可能であり、また共鳴周波数が広い帯域に分布していても線中がなければ十分に使えることが示された。データ処理系の能力としては最大1MS/wordの速度よりこめる(観測周波数500kHz)突で、むしろ共鳴線の中が広く周波数帯域の広く分布する核に有用である。

位相の周波数依存部分の補正にもなるベースラインのうねりの問題が未解決である。図7に示すおうなきれいな系では2kHz離れた信号の位相を同時に補正してもベースラインの波はあまり問題にならない。しかしS/Nが良くさらに解像が予測できな時は、少しのベースラインのうねりが非常に問題になる。この突は生体系を扱おうときにはほとんどの重要である。一つにはコンピュータの位相補正のプログラムを改善すれば根本的に解決できると思われる。一方、将来FFT, LSIをNMNに活用可能な場合はこのシステムと同じ方式で位相補正を行なうことがおそらく有利であろう。そのいみではスペクトロメータのデータタイムを極力短くする方向で、この問題を回避するよう努力すべきかもしれない。

¹⁴N FT NMR system - A use of a commercial waveform analyzer

by

Yoko Kanazawa and Yoshitsugu Tanaka (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University)

and

Hirotake Kamei (Electrotechnical Laboratory)

Abstract;

An NMR system composed of a home made pulse system and a commercial waveform analyzer is tested for ¹⁴N resonances. An inexpensive system of this kind is found to be very useful for the nuclear species which does not require a fine resolution.

106 (A5) マイクロプロセッサのFT-NMRへの適用

(日立・那珂) 津田 宗孝・武田 政昭・横川 浩

1) 初めに

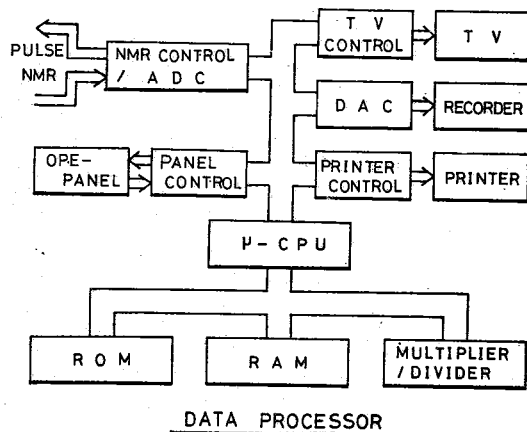
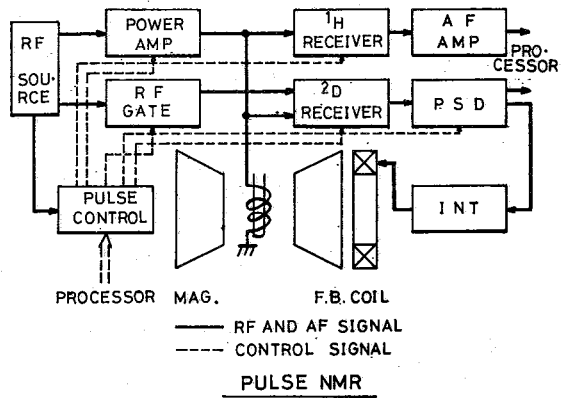
近年マイクロプロセッサ(以下μ-CPU)の普及がめざましく、分析機器の分野においても適用が有効であるばかりでなく現実に導入されはじめている。μ-CPUをミニコンピュータ(以下ミニコン)と比較した場合の利点の一つは、処理能力と価格の比が大きいことである。さらにミニコンにも共通するが応用測定技術を機能別にユニット化し次々と拡張できる機動性である。以下実際の経験を踏まえμ-CPUのFT-NMR適用上の問題点と発展性を考察する。

2) 適用例

高分解能パルスNMRとμ-CPU及びそのインターフェースから成る本システムのブロック図を図1に示す。本例ではμ-CPUの機能の大半をパルスNMRのデータ処理に当てた。以下各ユニット毎にその分担機能をソフトウェアによるサポートを混じえて報告する。

① サンプルングユニット

パルスNMR制御信号発生部とA/D変換器より成る。制御信号には $\pi \cdot \pi / 2$ パルス, 増幅器のゲート信号, デカップラーの制御信号が含まれる。A/D変換器にはデータ格納用のICメモリ(RAM)を有効に使用するため、信号平均化の指定回数に応じてその出力語長を自動的に切り換える方式を採用した。この方式によると24ビットのデータ語長の場合、6ビットの出力語長では13万回, 8ビットでは3万回までの信号平均化が可能である。また ^{13}C のようにスペクトル帯域が広く高速サンプリングを要する場合にはこのユニットを交換するようにした。



つだ 宗孝・たけだ まさあき・よこかわ 浩 図1. システムブロック図

②乗除演算ユニット

一般に乗除算命令を持たない μ -CPUが多いが、この演算をソフトウェアで代行させると1ミリ秒程度も処理時間を要するため、高速フーリエ変換に要する時間が非常に長くなってしまう。この点は専用の乗除算ユニットを製作することで克服した。このユニットによるとソフトウェアで消費する時間を考慮に入れても高々数十マイクロ秒で乗算を終了させることができた。

③TV表示ユニット

スペクトルを鮮明かつ静止状態でモニターするためTVブラウン管を採用した。画面上スペクトルとその積分パターンを個別あるいは同時に映し出せる工夫を施した。またこれらに重ねて横軸の目盛とカーソルも映すことができるようにした。カーソルは画面の縦方向に走っており次の用途を持たせた。

1. 横軸方向の拡大基準点の指定
2. ケミカルシフトの基準ピーク(TMS)の指定
3. デジタル面積積分の場合のピーク始点と終点の指定
4. カーソル長さを可変してピーク判定閾値の指定

スペクトルのモニタリングを担当するこのユニットは、FT-NMRの操作性と密接に係わっているためこのユニットを動かせるソフトウェアへは十分注意を払った。例えばカーソルの移動に速度変化をもたせたり、カーソル位置のケミカルシフトをその移動に伴って常にLED表示器に表示するようにしたが、いずれも操作性の向上に非常に効果的であった。

④レコーダ出カユニット

2チャンネルのD/A変換器から成り立っている。レコーダ上へはスペクトルとその積分パターンを1つの指令で書かせることができるようにした。FT法ではソフトウェアの工夫でベースライン部分を早く信号部分を遅く描く事により記録時間の短縮をはかることができた。

⑤プリンタ駆動ユニット

デジタル記録を行うためのプリンターでは信号ピークのケミカルシフトとピーク面積値(又はピーク高さ)を表の形で印字する。

⑥ROMユニット

このユニットにはROMチップが搭載されその中にはプログラムが格納される。簡単な操作でスペクトルを測定できることが特にルーチン測定の場合有効であるが、この非破壊メモリ中に予め測定条件を格納しておき、指令と同時にこのメモリから読み

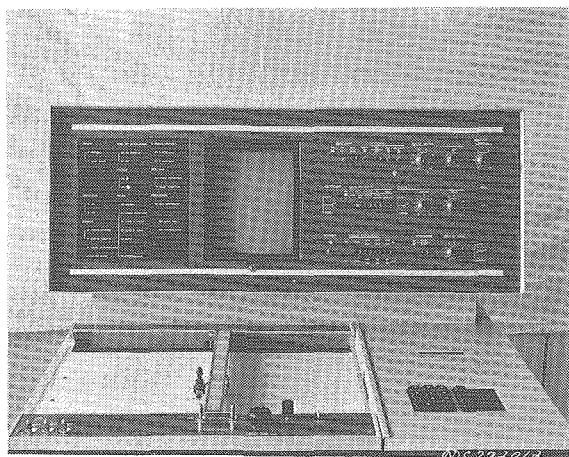


図2. 操作パネルの外観写真

出して設定することによって実現した。測定条件の中に窓関数形を盛り込み、 S/N 比を重視した少数回の信号平均化モードや分解能を重視した多数回の信号平均化モードなどを用意した。

⑦操作パネル

操作部と表示部から成る。測定条件の初期設定は数字キーを並べたキーボードを用いておこない、その設定状態をスクリーン上に表示し現在の状態が一目で判るようにした。また最適スペクトルを得るための位相補正や観測領域の変更はモニターTVを見ながら操作部のつまみを操作しておこなうようにした。図2に操作パネルの外観を示す。

⑧外部補助メモリ

FT-NMRの応用測定技術の増加に伴い大容量の外部補助メモリの必要性が大きくなっている。代表的なものとして小型ディスク、ディスクレット、カセットMTが挙げられるが本システムでは拡張機構として考えている。夜間を利用した多目的測定や2次元FT-NMRの手法の場合はこれらを欠かすことができない。

3)性能の検討

次にFT-NMRのデータ処理システムとして本システムの性能についていくつか検討する。

①データ語長と信号平均化回数

前に述べたようにA/D変換器の出力語長は平均化回数の指定値をもとに自動的に切換える方式を採用した。データ語長は24ビット、但し ^1H 核測定のうち少数回の測定で適正なスペクトルが得られる場合には16ビットを用意することにした。24ビット長の場合6ビットのA/D変換器出力語長で約13万回、16ビット長の場合6ビット語長で1024回の信号平均化が可能である。

②サンプリング周期

^1H 核で10PPMの領域を観測する場合(共鳴周波数を60MHzとする)600Hzの観測部分に加えて、照射部除去とTMS合わせのための余裕を設け全体で800Hzの周波数領域が解析できるようにサンプリング周期は625マイクロ秒に設定する。しかし ^{13}C 核の広帯域測定の場合などは50マイクロ秒程度のサンプリング周期を必要とする。この場合にはソフトウェアの実行サイクルでサンプリングの周期を計時する方法で高速サンプリングをおこなうようにした。

③分解能

前に挙げた ^1H 核の800Hzの周波数領域を8K点で観測すると0.2Hz点の分解能となり、微細構造まで十分観測できた。さらに分解能を上げる手法としてはQD法が効果的である。QD法を用いない場合観測領域を2つに分けると分解能は倍加する。

4)結果と考察

今回FT-NMRの殆どどのシステムで用いられてきたミニコンに代えて $\mu\text{-CPU}$ の適用を試みたが、最大の利点は処理能力と価格の比の向上である。 $\mu\text{-CPU}$ は現在演算速度の点ではミニコンに比べ平均3~4倍遅い。しかし命令数やアドレッシングの形態の

面では充実しており遜色はない。そのうえ μ -CPUチップは一般のデジタル素子と考
えてよい程度の価格で入手できる。利点のもう一つはCPUの制御信号が比較的単純化さ
れ、またCPU周辺のドライバー、バッファのチップ化が進んでいる(チップ化はミニコン
に関しても言える)ことから機能別ユニットが製作しやすい点である。処理速度に関して
は将来向上が予想されるが、ソフトウェアの工夫で演算効率を上げることも必要である。本
システムでは命令実行の間に挿入されるTV表示データ作成のための処理を不要時には行
わないなど細かく配慮した。

次に μ -CPUの役割について検討する。一般にCPUを分析機器の中へ組み込んだ場
合の役割として3つの役割が考えられる。先ず第1に分析機器の各部へ情報を設定するこ
とである。照射パルス列を規定するパルスプログラマー、トランスミッターにおける照射
周波数・照射エネルギーの制御、スピンドカプラーにおける照射周波数・照射エネルギ
ーの制御などがその代表例である。次に分析機器の状態を検出してその適否を判断した後
、状態を最適に設定しなおすフィードバック制御の役割である。この例として自動分解能
調整が挙げられる。最後に収集したデータを最良の質で得るためのデータ処理である。以
上の多くの役割を殆んど備えた大きなシステムを構成していく場合には、ミニコンと μ -
CPUが混在したり2個以上の μ -CPUを組み込んだ形のシステムも考えられる。

An Application of μ -processor to FT-NMR

Naka Works, HITACHI LTD.

Munetaka Tsuda, Masaaki Takeda, Hiroshi Yokokawa

The introduction of μ -processor to analytical instruments is considered
to be very useful and becoming into a practice nowadays. In comparison
to a conventional mini-computer, the capabilities of a μ -processor becomes to
be nearly equivalent to those of a mini-computer. Yet the hard ware price
is low. Also the expandability of various functional units is a feature
of today's processors, including mini-computers.

We have discussed few practical problems and possibilities of a μ -pro-
cessor FT-NMR system from our experiment.

(東大・理, 阪大医*) 荒田洋治, 清水章*, 藤原鎮男, 山村雄一*

(序) 本研究は抗体分子の構造と機能を核磁気共鳴(NMR)により明らかにすることを目的とする。今回はその第一報として三種の入型 Bence Jones タンパク (Sh, Ko, Ak) を用い入鎖 C 領域および V 領域のヒスチジン残基(His)による ^1H NMR シグナル帰属を行った結果を中心に報告する。用いたタンパクは表 1 に示すように His が C 領域にいずれのタンパクにも共通に 2 個 (His-189, His-198)* 存在するほか、V 領域に Sh が 2 個、Ko が 1 個の His 残基をもつ。Ak には V 領域の His は存在しない。なお、Sh については全一次構造が決定されている¹⁾

表 1. 実験に用いた入型 Bence Jones タンパクのヒスチジン残基の数

	C 領域	V 領域
Sh	2	2
Ko	2	1
Ak	2	0

Sh, Ak の His の C2-H プロトンの NMR スペクトルを比較すると、C 領域と V 領域の His を区別することができる。更に、成田、松尾によるトリチウム化法²⁾の変法である重水素ラベル法により、Ak の C 領域の 2 個の His の ^1H -NMR シ

グナルの帰属を行った。重水素をトリチウムの代わりに用いる重水素ラベル法は松尾寿之博士(阪大医)の助言により行ったものであるが、本報告で示すように結果は甚だよく、高線量のトリチウムを扱うことなく実験できる大きな利点を考えると少くとも His の帰属に関しては今後広く使えるものと思う。これらの結果をもとにして抗体分子のコンホメーション、変性によるコンホメーションの変化について論じる。

(実験) ミエローマ患者尿より入型 Bence Jones タンパク (Sh, Ak, Ko) を硫酸塩析により分離 DEAE セルロースによるクロマトグラフィ-(0.01 M リン酸緩衝液, pH 8.4)、つづいて Sephadex G-200 によるゲル濾過 (0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 8.0) により精製した。試料の純度はホリアクリルアミド電気泳動および免疫電気泳動により確認した。NMR の測定にはゲル濾過で dimer の位置に溶出する部分を用いた。測定には約 10 mg のタンパクを重水 (0.2 M NaCl) 0.3 ml に溶解し、pH は 0.3 ~ 1 M DCl, NaOD を加えて調節し pH メーターの読みをそのまま記載した。グアニジン変性の実験においては、種々の濃度のグアニジン塩酸塩重水溶液に試料を溶解し、48 時間室温に放置後、測定に供した。重水素化ラベル法によるヒスチジン残基の帰属には Ak 90 mg を 5 ml の重水に溶解し、37°C, pH 8.5 で 14 時間処理、過ギ酸酸化の後、1% NH_4HCO_3 (37°C, pH 8.5) 中、2 時間トリプシン消化を行った。つづいて高圧電気泳動 (pH 3.7)、ペーパークロマトグラフィ-(ブタノール:酢酸:ピリジン:水, 10:15:3:12) により C 領域の 2 個の His 残基のそれぞれを含有する二つのペプチドを分離し、濾紙より抽出後 NMR の測定に用いた。NMR スペクトルの測定には Bruker HXS-360 (360 MHz, パルス FT 法) および JEOL PS-100 (100 MHz, 相関法) を用い、化学シフトは外部基準 (DSS (5% D_2O 溶液)) を用いて表示した。

(結果と考察) 以下、C 領域の His を His(C)、V 領域の His を His(V) と略記する。表 1

に示したようにShは2個のHis(C), 2個のHis(V)をもつ。これに対しAkは2個のHis(C)のみでV領域にHisはない。図1にスペクトルの例, 図2にこれをもとにして作製したAkおよびShのヒスチジン領域のプロトンの滴定曲線を示す。この結果からH1, H4がAk, ShのHis(C)のC2-Hに特有のピークであることがわかる。このことは更に、Sh

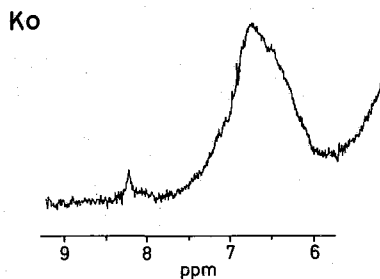
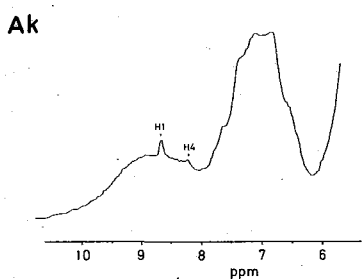
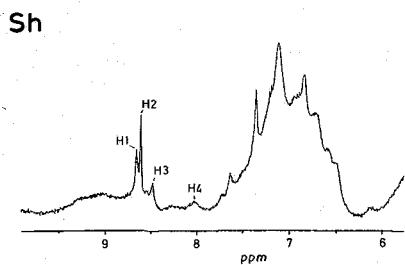


図1

入型 Bence Jones タンパクの ^1H NMR スペクトル

Sh: pH 5.0 (360MHz), Ak: pH 4.6 (100MHz)

Ko: pH 4.0 (360MHz)

測定温度 Sh, Ak は 32° , Ko は 24°

のようになる。この結果から明らかのように、

His-189 の C2-H は約 50% が重水素交換している

のに対し、His-198 では全く重水素のとりこみが起っていない。一方、Ak を重水中 ($\text{pH} 8.5, 37^\circ\text{C}$) で処理したのち pH を下げて ^1H NMR スペクトルを測定すると図4のように H4 が著しく強度を減じていることがわかる。この結果から

H1 \rightarrow His 189, H4 \rightarrow His 198

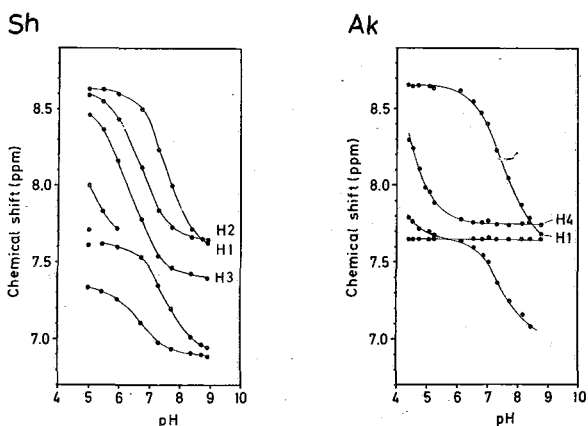


図2 入型 Bence Jones タンパク Sh, Ak のヒスチジンプロトンの滴定曲線 ($32^\circ, \mu=0.2$)

における H2, H3 が His(V) によることを示している。

図2の滴定曲線から求めた His 残基の pKa 値を表2に示す。

表2 Ak および Sh の His の pKa ($32^\circ\text{C}, \mu=0.2$)

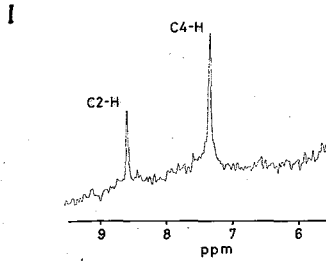
	H1	H2	H3	H4	
Sh	7.5	6.7	6.4	*	* スペクトルの重なりにより、測定点の数が少ないため pKa を決定できない。
Ko	7.5	-	-	4.9	

H4 は線幅が非常に広く、この His(C) が分子内に埋れていることを示唆している。C領域の2個のHisの帰属を行うために重水素化ラベル法による実験を行った。Ak を重水中 $\text{pH} 8.5, 37^\circ\text{C}$ で14時間処理したのち、ヒスチジンペプチド I, II を分離。この ^1H NMR スペクトルを測定

I : Ser-His¹⁸⁹-Arg

II : Ser-Tyr-Ser-Cys-Glu-Val-Thr-His¹⁹⁸-Glu-Gly-Ser-Thr-Val-Glu-Lys

すると図3



Ak: 重水溶液 (pH 8.5, 37°)

← 図 3

Ak (90 mg) を 14 時間 incubation, トリプシン消化後分離したペプチド I, II (それぞれ約半量を 0.15 ml 重水に溶解) の ¹H NMR スペクトル (100 MHz, 32°, 1000 回積算)

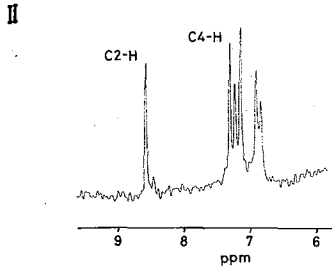
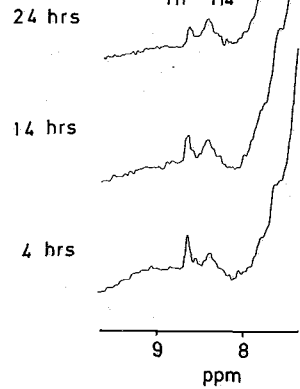


図 4 →

incubation (4, 14, 24 時間) 後, 5 mg / 0.15 ml 重水溶液 (pH 4.3) として ¹H NMR スペクトルを測定 (100 MHz, 32°, 2000 回積算)



であることが確認された。入型 Bence Jones タンパク Mcg の X 線解析³⁾によると、図 5 に示すように His-198 を含む 3 本の β 鎖が Sheet を形成している。His-198 は Ser-202 と水素結合しているのに対し

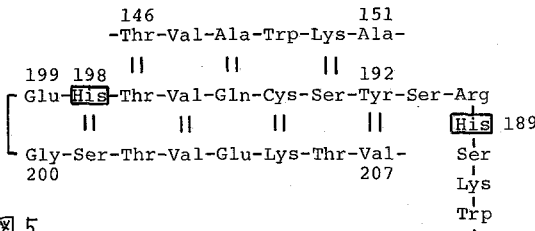


図 5

て、His-189 は 2 本の β 鎖を結ぶ loop にあり、分子表面に露出しているものと考えられる。His-189 の重水素交換が非常に速いこと、His-198 のシグナルの線幅が広いことと考え合せると、X 線解析による構造に近いコンホメーションが溶液中でも保たれていることが推定される。しかし、

X 線解析によると 2 本の monomer chain における C 領域、V 領域の接合部のまがり方に相当大きな差がある。NMR による以上の実験は、dimer の同一 sequence からできている 2 つの C 領域、あるいは V 領域のコンホメーションには大きな差がないことを示している点で甚だ興味深い。

これまでに調べられたなかでもっとも重水素のとりこみの速いのは卵白リゾチーム His-15 である。(今回の実験と同様の条件で半減期約 20 時間) His-189 は更にこれよりも重水素のとりこみが速い。これが、偶々近傍に存在する他のアミノ酸残基 (たとえば Arg) によるものか、あるいは Bence Jones タンパクの C 領域の一般的性質によるものかは今後の課題である。Sh タンパク V 領域の His-67 は His-189 と同様、β-Sheet 中の類似の環境に存在する。今後、Sh を用いて、Ak と類似の実験を行い、各 domain のコンホメーションについて更に考究する計画である。

Ko は His(V) 1 個、His(C) 2 個をもつが、図 1 に示すように Sh, Ak にみられる His(C) に特有なピークはなく、一本の His(V) のみが観測される。このピークは化学シフト、グアニジン変性に対するふるまいが Sh の H2 と極めて類似しているが、スペクトルの線

幅が Ak, Sh に比べて全体に著しく広いのが特徴である。Ko の場合、2 個の His(C) は線幅の拡がりのために観測ができず、また His(V) も線幅が著しく広いことは、NMR の測定条件において凝集が起きていることを示唆している。Ko と似た性質をもつ試料は多いと考えられここで示した Ko のスペクトルのパターンは免疫グロブリンの NMR による研究に基本的に重要な情報であろう。

グアニジン塩酸塩を加えると、His のピークは強度を減じながら、低磁場にシフトする。native なコンホメーションに対応する H1 ~ H4 のピークは Sh, Ak, Ko いずれの場合にもグアニジン濃度 1M で完全に消失する。この結果、① Sh(H1~H4), Ak(H1, H4), Ko(H2) ないしはその近傍に関する限り、3 種の 2 鎖のグアニジンによる unfolding の起こり方は極めて類似していること、② Sh の場合、グアニジン濃度 1M において、いずれのピークもほぼ同時に消失することから C 領域と V 領域の unfolding は平行して起っていることが推論される。CD スペクトルの測定⁴⁾、トリプシン消化過程の追跡による実験⁵⁾により、C 領域は V 領域にさきがけてグアニジンにより unfolding を受けることが示唆されている。この点は、種々の異なる方法による実験結果の比較の意味でも興味があり、更に詳細に検討したい。今後実験を重ねこれまで研究の行われて来た分子量 10000 ~ 15000 の酵素タンパク質よりひとまわり大きい対象に対して、高分解能 NMR により更に接近をはかり、同時に Bence Jones タンパクの domain の高次構造の詳細な比較・検討をもとにして、免疫グロブリン(whole molecule)の構造と機能へ研究を進めたい。

(謝辞) 重水素ラベル法による His の帰属の実験を示唆していただき、また多くの極めて有用、かつ適切な助言をいただいた枚尾寿之博士(阪大医)に厚くお礼申し上げます。金沢大癌研・右田俊介教授、都立大・篠田友孝助教授、米インディアナ大・Putnam 教授に試料の提供を受けた。記して感謝の意を表す。360 MHz における NMR スペクトルは Stanford Magnetic Resonance Lab. (NSF#GP23633, NIH#RR00711) において測定を行った。便宜をはかっていただいた同研究施設長 Oleg Jardetzky 教授にお礼申し上げます。

* numbering は全一次構造が決定されている Sh による。

1. K. Titani, M. Wikler, T. Shinoda, and F.W. Putnam, J. Biol. Chem. 245, 2171 (1970).
2. H. Matsuo, M. Ohe, F. Sakiyama, and K. Narita, J. Biochem. 72, 1057 (1972).
3. M. Schiffer, R. L. Girling, K. R. Ely, and A. B. Edmundson, Biochemistry 12, 4620 (1973).
4. T. Azuma, K. Hamaguchi, and S. Migita, J. Biochem. 72, 1457 (1972).
5. B.-K. Seon, O. A. Roholt, and D. Pressman, J. Biol. Chem. 247, 2151 (1972).

Proton Magnetic Resonance Study of Λ -Type Bence Jones Protein

Y. Arata, A. Shimizu,* S. Fujiwara, and Y. Yamamura*

(Department of Chemistry, University of Tokyo and Osaka University School of Medicine)

Proton magnetic resonance study of Λ -type Bence Jones proteins is reported. A deuterium labeling technique, a less hazardous, and more convenient version of Matsuo-Narita's method using tritium, has been successfully used to make assignments of the histidine residues in the constant half of the Bence Jones dimer. On the basis of the assignments, conformation of the native protein and changes of it in the presence of varying concentrations of guanidine hydrochloride have been discussed.

(東大・理) ○今井登・寺田春郎・荒田洋治・藤原鎮男

フェリチンは水酸化リン酸鉄から成る数千個の鉄のかたまり(鉄核)を中心にもつタンパク質である。その鉄核の構造・形状は主にX線回折や電子顕微鏡によって研究されてきた。ESRとNMRで固体状態のフェリチンを測定した実験がそれぞれ一例報告されているが、他に磁気共鳴による研究例はない。核磁気共鳴はタンパク部分に対してはその磁気的性質および特に表面状態の知見を与えることが期待される。フェリチンは6万という分子量と多量に存在する常磁性の鉄のため、溶媒の水のシグナル以外にはなにも観測されない。従ってフェリチンに関する情報を引き出すためには、低分子をプローブとして用いるか、あるいは何らかの手段によってフェリチンを低分子量のものに誘導することが必須である。

今回は次の二点に重点をおいて研究を行った。1) フェリチンの鉄核に多量に含まれるリン(重量比で全体の1~2%)については、従来分子レベルでの研究手段がほとんどなかったが、本研究においてテトラグリシンおよびテトラメチルアンモニウム塩をプローブとして用いる事により、 pK_a など鉄核表面のリン酸基に関する重要な情報を得ることができた。2) フェリチン分子のタンパク部分については、そのサブユニットへの解離結合過程を定量的に追跡することが可能となった。

[実験] フェリチンはNBS社のもの(2回再結晶, Col free)を用い、必要に応じて透析した。鉄ポリマーはSpiroの方法²⁾によって合成したクエン酸第二鉄ポリマーと、加熱合成した硝酸鉄ポリマーを用いた。鉄は原子吸光で、タンパク質はローリー法で、またリンはモリブデン酸アンモニウム4-アスコルビン酸を用いる方法で分析を行なった。原子吸光はSEIKO-720, NMRはJEOL PS 100(100MHz)を用いて測定した。

[結果と考察] 1. 低分子プローブを用いる、鉄核特にその表面に存在するリン酸残基の研究。

フェリチン水溶液の水のスペクトルには次の特徴がある。1) 純水の水のピークよりも高磁場側にシフトするが、これは多量の常磁性の鉄の存在により溶液の磁化率が変化するためである。鉄の濃度と化学シフトの値からフェリチン鉄の磁化率を求めると3.8/4gとなり、すでに磁化率の測定により求められている値と一致した。2) 観測した濃度範囲では(鉄として0.2M以下)常磁性シフトは全くない。3) フェリチンの水の水のピークの線幅は同濃度のアコ錯体($Fe(Ox)_3/2NH_4Ox$)の水のピークの線幅の1/40である。一方鉄ポリマー(磁化率3.5/4g)を含有する水の水のスペクトルはフェリチンの場合と類似している。三者の比較を図1に示した。従ってフェリチンの鉄はアコ錯体の鉄とは全く異なり、鉄ポリマーとよく類似していることが明らかとなった。

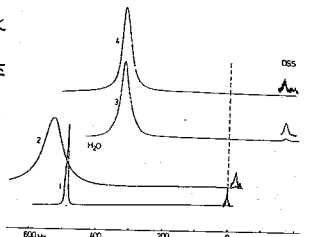


図1 水のNMRスペクトル
 1. ref. と12の水
 2. $Fe(Ox)_3/2NH_4Ox$ Fe濃度 0.01M/l
 3. フェリチン Fe濃度 0.11M/l
 4. 鉄ポリマー Fe濃度 0.12M/l

フェリチンの鉄核とアコ鉄との存在状態の違いを明確にするために低分子のペプチドでいまいのぼる・まらた はるお・まらた ようじ・ふじから しずお

あるテトラグリシン(Gly₄)をプローブとして用いた。Gly₄は重水中では4個のメチレンに対応する4本のピークが観測され、分子各部分の情報も独立して得ることが出来る。Gly₄水溶液にアコ鉄、フェリチン、鉄ポリマーを加えると、スペクトルは図2に示すようになる。比較のためト図の上方にGly₄のみのスペクトルを示してある。アコ鉄を加えて行くとA1, A2のようにC末端側から常磁性シフトを起しなから線幅が広がってゆく。これに対してフェリチンを加えた時はBに示すように各ピークの常磁性シフトは全くなく、どのピークも一様に幅が広がる。

Fe(OH)₃またはフェリチンの鉄としての濃度を横軸に、線幅を縦軸にとってプロットすると直線が得られ、この直線の傾き(表1)はFe(OH)₃またはフェリチンを加えていった時の線幅の増加率を表し、両者とGly₄との間の結合定数に対応する。アコ鉄に対してはC末端の値が非常に大きく、常磁性シフトを起すということからも、アコ鉄とGly₄はC末端で錯形成していることがわかる。フェリチンでは各ピークが均等に

ぶれるが、C末端よりN末端側の傾きの値が大きくなっている。これは鉄核の表面に存在するリン酸のマイナス電荷とGly₄が相互作用しているためではないかと考えて、対照としてリンを全く含まない鉄ポリマーおよびリン含量の低いフェリチンを用いて同様の実験を行った。鉄ポリマーの場合Gly₄の共存下では濃度を生じてしまうが、少なくとも定性的には図2Cに示すようにN末端が先に幅が広がるという事は正しいと確認される。更にリン含量の低いフェリチンについても同様の実験を行ったが、表1の下の段のようにN, C末端の傾きはリン含量の多い時と比べて小さくなるという結果が得られた。以上の事から、Gly₄のNH₃⁺基が鉄核の表面上のリン酸のマイナス電荷と相互作用することによって、Gly₄の各ピークの線幅が広がってゆくという事が明らかとなった。

Gly₄と鉄核の相互作用のpH依存性 Gly₄が鉄核のリン酸基のマイナス電荷と相互作用しているならば、それにはpH依存性があるはずである。別に測定したGly₄のpH滴定曲線から、Gly₄はpD 6.5以上ではアミノ基が正電荷を失うので、リン酸のマイナス電荷との相互作用は減少することが期待される。そこでプラス電荷が全pH領域にわたってまったく変化しないテトラメチルアンモニウム塩(TMA)を用いて実験した。Gly₄については図3に、TMAについては図4に結果を示す。リン酸はpHが7.20で一個のアニオンから二個のアニオンに解離する。いま、濃度C mM(鉄に1%)のフェリチンについて考える。一個のアニオンのみの時に生ずる線幅をΔH_{mono}、二個のアニオンのみの時の線幅をΔH_{di}とする。リン酸が二個になるとGly₄, TMAとの静電的な相互作用が大きくなり、それらの分子が鉄核に衝突する確率が大きくなり、従ってΔH_{di}の方がΔH_{mono}より大きいと考えられる。二個のアニオンの分率をx、従って一個のアニオン

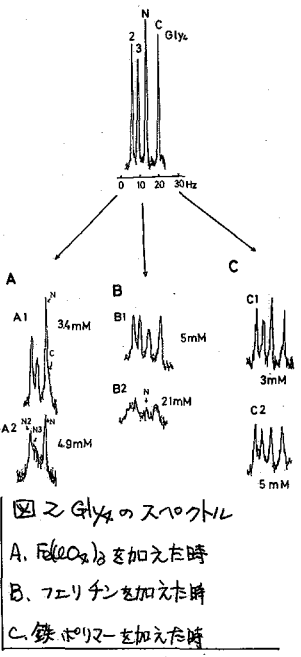


図2 Gly₄のスペクトル

表1 Gly₄ 線幅/フェリチン濃度の値 Hz/mM

	C	N3	N2	N
Fe(OH) ₃	2.00	1.17	1.30	0.62
フェリチン P/Fe 0.10	0.32	0.42	0.36	0.27
鉄ポリ P/Fe 0.08	0.08	—	—	0.11

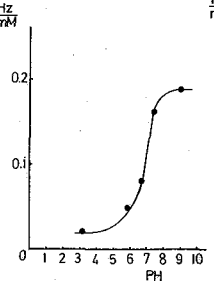


図3. TMA

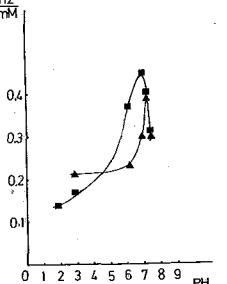


図4 Gly₄ ■ N末端 ▲ C末端

の分率を(1-x)とすると、濃度Cの時に観測される線幅 ΔH_{obs} は

$$\Delta H_{obs} = \Delta H_{mono} (1-x) + \Delta H_{di} \cdot x \quad (1)$$

となる。今変数として $x = \Delta H / C$ をグラフの

縦軸にしたので、(1)の両辺をCで割ると

$$k_{obs} = k_{mono} (1-x) + k_{di} \cdot x$$

$$= k_{mono} + (k_{di} - k_{mono}) \cdot x \quad (2)$$

となる。従って k_{obs} をpHに対してプロットすれば

リン酸の解離状態に比例したプロットが得られ、これからリン酸のpKaが求まる。図6のTMAについてのプロットからフェリチンのリン酸のpKaを求めると 7.0 ± 0.2 となる。一方Glyxについては図5に示す結果を得た。pD 6.5まではTMAと同様に k の値は増加していき、それ以上のpHでアミノ基が正電荷を失っていき、 k は急激に最大値をもつプロットが得られた。即ちGlyxとリン酸との相互作用はpH 6~7の間に最も大きい。N末端よりもC末端の値がこの付近でのみかなり小さい。この事実は狭いpH範囲(pH 6~7)でのみアミノ基が強く鉄核のリン酸と相互作用することを示す点で甚だ興味ある事実である。

2. サブユニットへの解離・会合

a. 鉄核の溶解過程

フェリチン水溶液のpHを下げてゆくと、pH 2.0以下でNMRスペクトルの水の線幅が急激に増大する。これはフェリチンの中心にある常磁性の鉄核が溶解してからはらになつてアコ鉄が生じ、これによって水と常磁性の鉄との接触面積が急激に大きくなるためである。水の線幅は鉄核の溶解とともに非常に大きくなるから、NMRにより高度よくこの過程を追うことができる。水の線幅から求めた鉄核の溶解曲線を図6に示す。鉄核の溶解はpH 1.8付近から始まりpH 1.0で完了する。この過程はUVスペクトルを用いて同様に追跡できる。この結果をあるせて示したが、NMRの結果とよく一致している。

b. サブユニットへの解離

フェリチンおよびアポフェリチンについてpHを3.0以下にするとタンパク質の 1H NMRが観測されるようになる。これは 45000 という大きな分子量のタンパク殻がpH 3.0においてサブユニット(分子量 18500)に分解したことによる。0.7ppmにあるピーク(Leu, Ileuのメチル基と考えられる)の高さを測定してサブユニットへの解離の分率を決定した。図5はアポフェリチン、図6はフェリチンの実験結果である。フェ

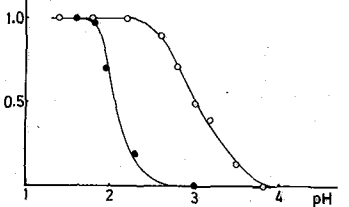


図5 アポフェリチン 解離・会合曲線

● 解離曲線 ○ 再会合曲線

リチンにおいてはタンパク殻部分はpH 3.5から解離しはじめ、pH 1.8で完全に解離するが、鉄核はpH 1.8付近から溶解が始まる。以上の実験結果はpH 1.8付近のごく狭いpH範囲においては、タンパク部分はサブユニットに完全に解離しているが、鉄核はintactの状態が存在していることを示している点で甚だ興味深い。

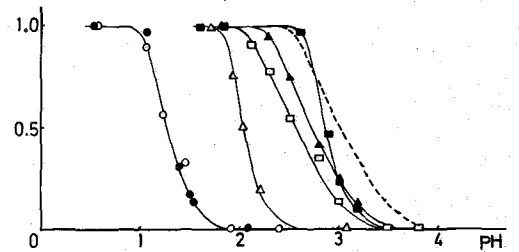


図6 フェリチン ○ OD470より求めた鉄核の溶解曲線 ● NMRの水の線幅から求めた溶解曲線

△ サブユニットの解離曲線

□ PH 1.8

▲ 1.7 からpHを上げた時の再会合曲線

■ 1.6 比較のための図7のアポフェリチンの再会合曲線

c. 再会合 一たんサブユニットに解離させたフェリチン、アポフェリチンの溶液のpHを上昇させるとタンパク質のNMRシグナルが再び消失す

る。これはサブユニットが集合して再集合し、フェリチン、アポフェリチンが再構成されてゆく事に対応していると考えられる。解離の時と同様にして再集合の分率を求めた。アポフェリチンについての結果を図5に示す。フェリチンについてはpH 1.8までは鉄核はほとんど損傷を受けず、それ以下のpHで溶解することを考え、pH 1.8からもどいたものと、pH 1.7、1.6からもどいた場合の比較を行なった。鉄/タンパク比の測定からpH 1.6、1.7では鉄核が約10%溶出した状態にあり、従って鉄核の表面はかなり傷んだ状態にあると考えられる。この三種類のフェリチン溶液のpHを上昇させた結果、得られる再集合曲線を図5に示す。点線はアポフェリチンの再集合曲線を示したか、pH 1.8からもどいた時はこのアポフェリチンの曲線から大きくはずれ、非常に早い段階で再集合が起こるものと考えられる。pH 1.7からもどすと1.8の時の曲線より少しだけ再集合がおくれるような曲線が得られる。これは鉄核の損傷が再集合に影響していることを示している。pH 1.6の場合は凍結するため条件が異なるが、アポフェリチンの再集合曲線により近づいた曲線が得られた。以上のことからサブユニットの集合は鉄核により大きな影響を受けており、従って鉄核はタンパク部分の構造の維持、変化に何らかの意味のある役割を果していることを示唆している。表2にフェリチン、アポフェリチンの解離、再集合、鉄核の溶解の pK_a をまとめる。甘味ディスク電気泳動(ポリアクリルアミドゲル)を行なったところ、pH 1.8から再構成した場合にはフェリチンの明確なバンドが得られることが確かめられた。

	解離	再集合 1.8	1.7	1.6	鉄核溶解
アポフェリチン	2.1	2.0	/	/	1.3
フェリチン	2.0	2.6	2.7	2.9	/

1. R.R.Crichton, Structure and Bonding 14, 67 (1973).
2. T.G.Spiro and P.Saltman, J.Amer.Chem.Soc. 88, 2721 (1966).
3. S.Granick and P.F.Hahn, J.Biol.Chem. 155, 561 (1944).

Proton Magnetic Resonance Study of Ferritin. Phosphate Group on the Surface of the Iron Core and the Quaternary Structure of Ferritin.

N.Imai, H.Terada, Y.Arata, and S.Fujiwara
(Department of Chemistry, University of Tokyo, Hongo, Tokyo 113)

Tetraglycine and tetramethylammonium chloride have been used as H-1 NMR probes to study the surface of the iron core of ferritin. The pK_a of the phosphate group on the surface of the iron core has been estimated at 7.0 ± 0.2 . Dissociation and recombination of the ferritin molecule have been discussed in detail by following in the pH range 1.6 - 4.0 H-1 NMR peaks due to the subunit of ferritin produced at lower pH.

^{13}C NMRスペクトルが溶液中における合成高分子や生体高分子の構造研究に有用な研究手段であることはいままでもないが、最近では種々の高分子物質からなるゲルや半固体(semi-solid)についてもその応用範囲に入りつつある。これらの、一見固体にみえる系では完全な溶液中での構造と異なり、分子間に、ある秩序が生じるために、自由且つランダムな運動がある程度制限され、従って線中は著しく広がる場合が多い。しかしながらポリブタジエンやポリイソプレン(生ゴム)の鋭い ^{13}C NMRスペクトルで良く知られるように局所運動のみが可能な系においても、高分解能のスペクトルを生じる場合もある。理論的には線中の変化は連続的であり、完全な固体のもつ線中から数Hz程度の鋭い線中までの、局所的ゆらぎの“大きさ”と“速さ”次第で如何なる線中もとりうる。逆にいえば、 ^{13}C NMRスペクトルの線中からそれらの ^{13}C 核のまわりの局所運動の状態についての知見が得られることになる。通常の高分解能NMRにおいては ^{13}C - ^1H のスカラー結合のみをデカップルすることができるので、観測される ^{13}C NMRの線中は局所的運動による双極子結合の平均化の程度になる。

本報においては水に親和性があるが不溶なイオン交換樹脂や、不溶化した蛋白質、水を含ませた蛋白結晶等の ^{13}C NMRスペクトルを測定し、これらの高分子鎖における局所運動の不均一性について検討した。

I イオン交換樹脂の ^{13}C NMR

図1に三菱化成K.K.のポリスチレン-ジビニルベンゼン系陰イオン交換樹脂、ダイヤイオンPA 306, PA 312, PA 320を2%重水に懸濁させて得られた ^{13}C NMRスペクトルを示す。この3種の樹脂は膨潤しやすいポーラス型で架橋度のみがそれぞれ異なるものである。

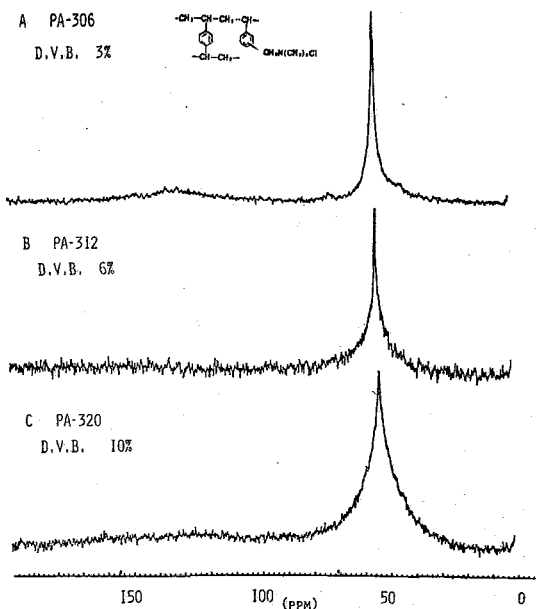


Figure 1. ^{13}C nmr spectra (25.2 MHz) of anion exchange resins with different degree of cross-linkages. 4000 transients were accumulated for each samples, which were suspended in 2% D_2O in 18 ϕ sample tubes.

あじさかかつみ かいのしょうまさつね

図1で注目すべき点は2つある。まず点1点はいずれのスペクトルにおいてもN-メチル基に帰属されるシグナルが50~60 ppm付近にあるのみで、他の炭素核によるシグナルは幅広すぎて見えていない。また点2点としては架橋度が大きくなるほど、即ち橋かけの数が多くて主鎖同士が堅く結び合っているほど、N-メチル基のシグナルは幅広くなっているという点である。この現象については次のように解釈することができる。即ちイオン交換樹脂の中に水が浸透してゆき、樹脂は膨潤するわけであるが、そのようにして膨潤した樹脂の極性基は水とよく接触して局部的に運動が速くなり dipolar coupling が平均化されるために極性基及びその近傍の炭素核のシグナルは鋭くなる。またその際、架橋度が小さい程、即ち主鎖同士のつながりがゆるいほど極性基は束縛されないため動き易くなり、より鋭いシグナルを与えるものと考えられる。

次にアンバーライ
トIRCというメタ
クリル酸系の弱酸性
陽イオン交換樹脂の
スペクトルを図2に
示す。この場合には
架橋剤のジビニルベ
ンゼンに由来する炭
素核のシグナルは、
全く観測されなかつ
たが、主鎖を形成し
ているメタクリル酸
に由来する部分につ
いては、比較的鋭い
シグナルが観測され
た。このように極性
基が主鎖に直接結合

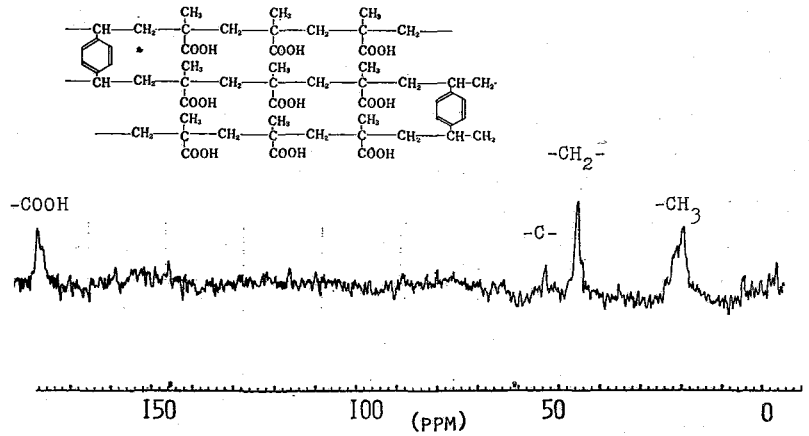


Figure 2. ^{13}C nmr spectrum of the suspension of Amberlite IRC-50 in 2% D_2O .

していれば、主鎖でもある程度動き易くなり、鋭いシグナルを与えるものと思われる。

以上のイオン交換樹脂のように、水に全く溶けない物質であっても、その分子の中に極性基があればその極性基のみが水とよくなじみ、運動性が高まるために、その極性基及び近傍の炭素核は鋭い ^{13}C シグナルを与えることが示された。

II 水分量を制限した状態での蛋白の ^{13}C NMRスペクトル

蛋白はペプチド主鎖に種々の親水基あるいは疎水基がぶらさがった構造をしており、それは丁度イオン交換樹脂における極性基とよく類似しているといえよう。従ってもし水に不溶の蛋白を水に懸濁させれば、イオン交換樹脂の場合と同様に親水性の側鎖のみが水と接触して動き易く鋭いシグナルを与えるものと予想される。そこで熱変性して水に不溶に

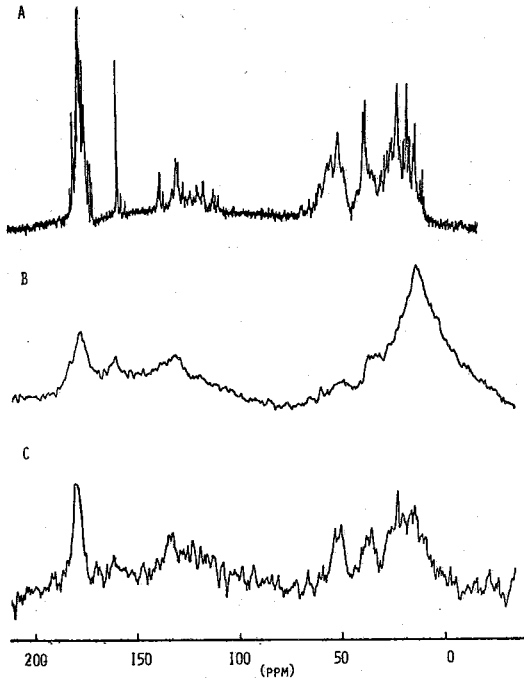


Figure 3. ^{13}C nmr spectra of HEW Lysozyme. A: 15 mM of lysozyme in 2% D_2O (0.1 M NaCl, pH 3.0), B: 2% D_2O suspension of the heat denatured lysozyme measured at room temperature, C: same as B but measured at 80°C .

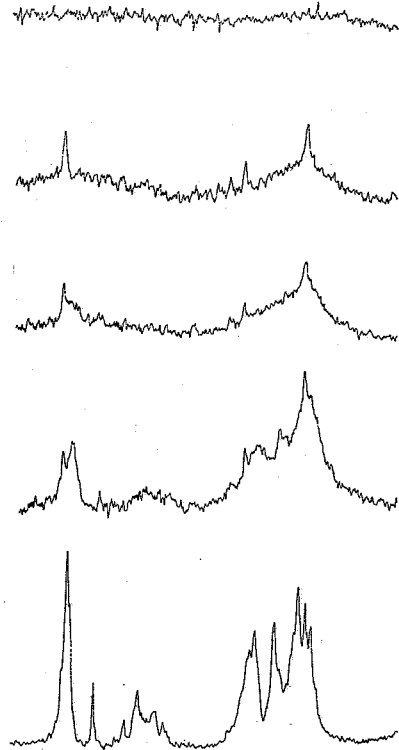


Figure 4. ^{13}C nmr spectra the moistured HEW Lysozyme crystals. Each sample was prepared by kneading the freeze-dried enzyme powder with the respective amount of water.

なった卵白リゾチームを水に懸濁させて、その ^{13}C NMRスペクトルを測定してみた。その結果を図3に示す。図3Bの懸濁液のスペクトルは図3Aの未変性リゾチーム水溶液のスペクトルと比較して、蛋白主鎖のアミノ酸の α 炭素に帰属される部分のシグナルが幅広く見えなくなっている。その懸濁液を 80°C で測定すると図3Cに示すように α 炭素部分のシグナルも鋭くなってきている。このことは不溶性蛋白ではイオン交換樹脂の主鎖部分と同じく、蛋白主鎖に含まれる α 炭素は運動が遅くなっており、鋭いシグナルとして見えないが、 80°C にすると運動がやや自由になり α 炭素シグナルも観測されるようになったものと解釈できる。図4に示したスペクトルは、未変性リゾチーム粉末に水分を少しずつ添加して測定した ^{13}C NMRスペクトルである。この一連のスペクトルの中には興味ある点が

いくつか見い出される。まず第1点は、例えば脂肪族炭素に注目してみると、水分量5%程度の状態でもすでにシグナルが見えている。また第2点としては、水分量30~40%におけるスペクトルでは炭素部分のシグナルは極めて小さい。このような現象の解釈は次のように考えた。第1点目については、水を少量加えた状態では、疎水基自身が *hydrophobic region* を形成し、疎水基自身がその *hydrophobic region* の中で動き易い状態になり、幅広いながらも観測しうるシグナルを与えたものと考えられる。また第2点目の炭素の問題については、水がやや制限された状態では、図3の変性蛋白の場合と同様に、水は親水基の近傍により多く集まる為親水基は動き易くなり鋭いシグナルを与えているものと思われる。

以上見てきたように、変性して水に不溶の蛋白あるいは水分量を制限した状態の蛋白の¹³C NMR は水と蛋白との接触の状態をよく反映しており、その状態における蛋白の構造に関する情報を与えることが明らかになった。従来、水に不溶な蛋白質の表面状態を知る実験的手法はなかったので、本報で示した¹³C NMR を用いるアプローチは、今後の蛋白質の構造研究に有用な方法となることが期待される。

¹³C nmr study on solid proteins and ion exchange resins. Differential segmental mobility of the polymer chains.

Katsumi Ajisaka and Masatsune Kainosho
Central Research Laboratories, Ajinomoto Co. Ltd.

(ABSTRACT) ¹³C nmr spectra of some ion exchange resins have been obtained at room temperatures. Only the hydrophilic groups in the resin gave sharp resonance lines, indicating that the segmental motions of the polar groups were rapid. The suspension of insoluble crystalline lysozyme in the presence of the limited amount of water also showed narrow ¹³C nmr signals which could be assigned to the specific regions of the molecules.

110 (C4) ヒト赤血球ゴースト膜の ^{31}P -NMRによる研究

(京府医大) °西川 弘恭, 山田 誠二, 吉崎 和男, 亘 弘

[序] NMR法は人工膜や生体膜の構造と機能について直接的な情報をもたらす非常に有効な手段である。モデル膜の polar head group と terminal methyl group の ^1H -および ^{31}P -NMRは BERDEN ら(1), CULLIS ら(2), KOHLER ら(3) など多数報告されている。一方生体膜へのNMRの適用として, CHAPMAN ら(4)による赤血球膜に対する ^1H -NMR, DAVIS ら(5)によるウサギの sarcoplasmic reticulum 膜に対する ^{31}P -NMRおよび ^1H -NMR, KRUIJFF ら(6)による *Acholeplasma laidlawii* の細胞膜に対する ^{31}P -NMRなどがあげられる。それらの報告では膜構成リン脂質の polar head group と terminal methyl group の ^1H および ^{31}P -NMRスペクトルのピークの同定と mobility の解析を行っている。ヒト赤血球膜は脂質, 蛋白質, 糖で構成され, その膜構造については種々のモデルが提出されており, これら構成成分の相互作用が色々な物理的方法で検索されている。ヒト赤血球膜における脂質の割合は乾燥重量の約30%であり, 主な成分はリン脂質とコレステロールで, それぞれ全脂質の約67%, 約28%を占めている。リン脂質の組成は phosphatidylcholine 1.2 ($\frac{\mu\text{mole} \times 10^{10}}{\text{cell}}$), sphingomyelin 1.0 ($\frac{\mu\text{mole} \times 10^{10}}{\text{cell}}$), phosphatidylethanolamine 1.1 ($\frac{\mu\text{mole} \times 10^{10}}{\text{cell}}$), phosphatidylserine 0.6 ($\frac{\mu\text{mole} \times 10^{10}}{\text{cell}}$) である。今回, 赤血球膜リン脂質のリンについて ^{31}P -NMR測定を行い, ^{31}P -NMRスペクトルのピークと各リン脂質との同定と超音波処理および Ca^{2+} イオン添加によるスペクトルの変化を観察し, これら処理による膜リン脂質の polar head group への影響を検討したので報告する。

[方法] ヒト赤血球は保存血を用い, 赤血球ゴーストは DODGE ら(7)の方法で調製した。全血を 154 mM NaCl (5 mM Tris-HCl, pH=7.4) 溶液で3回洗浄し, 5 mM NaCl (5 mM Tris-HCl, pH=7.4) 溶液 20 容と赤血球浮遊液 1 容とを混合し, 30分間攪拌し, 溶血させに後 25,000 G で遠心し, さらにこの沈渣 1 容に対し前記低張溶液 10 容で混合し, 25,000 G で遠心し, 沈渣としてゴーストを得た。このゴーストを resealing のためゴースト浮遊液 1 容と前記等張溶液 20 容を混合し, 30分間攪拌した後, 25,000 G で遠心し, 沈渣を試料とした。この一部は超音波処理を加えずに, 超遠心器により 100,000 G で, 60分間遠心し, 沈渣を試料として ^{31}P -NMR測定を行った。一方前記の resealed ゴーストを超音波発生装置により 60W, 0℃で, 60秒間破砕し, これを超遠心器により 100,000 G で 60分間遠心し, 沈渣を ^{31}P -NMR測定した。さらに Ca^{2+} イオンの膜リン脂質への影響を観察するため, この超音波処理した沈渣に種々の Ca^{2+} イオン濃度を含んだ NaCl 等張溶液を沈渣の10倍容量加え, 30分間攪拌した後上記同一条件にて超遠心器により遠心し, 沈渣を ^{31}P -NMR測定した。これらの過程は 0℃~4℃で行われ, 試料の量は乾燥重量で求めた。スペクトルの膜構成リン脂質への帰属は Sigma の L- α -phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, sphingomyelin と L- α -phosphatidylcholine 各々 50mg を 154 mM NaCl (5 mM Tris-HCl, pH=7.4) 溶液 2ml とよく混合し, ^{31}P -NMR測定を行い, 決定した。NMR装置は JNM-PFT-100 (JEOL, Tokyo, Japan) を 40.3 MHz, 24,000 ガウスで使用した。磁場のロックは 10 mm 径の NMR 試料管に同軸状に入れ 1 mm 管に重水を充填して行った。

にしかわ ひろやす, やまぐち せいじ, よしざき かずお, わたり ひろし

測定温度は24℃で行った。全ての測定でproton noise decouplingを使用し、化学シフトの外部基準は85% H_3PO_4 を用いた。

[結果] (1) 全血を0.9% NaCl (5mM Tris-HCl, pH7.4) 溶液で3回洗浄したヒト赤血球浮遊液の ^{31}P -NMRスペクトルをFig. 1に示した。スペクトルは2,000Hzの範囲を示し、2,000回積算された。スペクトルには低磁場側から3.1

と-2.3 ppmに2,3-diphosphoglycerate, -1.9 ppmにinorganic phosphate, 外部基準の85% H_3PO_4 , +5.9, +10.9, +19.5 ppmにATPとADPのピークがみられた。ところが超音波処理と超遠心をせ

ずresealingしたヒト赤血球ゴーストを赤血球と同じ条件で ^{31}P -NMR測定したスペクトルでは、外部基準の85% H_3PO_4 以外のピークはみられなかった。このことは赤血球をゴーストにまで処理する過程で可溶性の線中の狭いスペクトルを示す上記成分は取り去られることを示している。(2) 超音波処理を加え, resealingしたヒト赤血球ゴーストの超遠心による沈渣のスペクトルを10kHzの範囲で観察した。Fig. 2Aに示したように高磁場側の+2.8 ppmの位置にピークがみられ, +2 ppmの位置に肩がみられた。高磁場側のピークをもつスペクトルの線中は約10 ppmである。Fig. 2にはresealingしたゴーストを超音波処理した後のスペクトルを示した。10.4 ppmと0.6 ppmにピークがみられる。両スペクトルの線中は高磁場側のものに対し, 低磁場側のものが広い。Fig. 2A, 2Bに示したスペクトルは線中と化学シフトの位置から考えて可溶性の赤血球中のリン化合物ではなく, 赤血球膜を構成するリン脂質のpolar head groupのリンによるものである。Fig. 2Cに赤血球膜を構成する主たるリン脂質4種類について測定した化学シフトの位置を示した。

phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylcholine, sphingomyelinは各々0, +0.3, +10.9, +21 ppmの化学シフトをもち, 各線中は20, 10, 560, 700 Hzであった。これら化学シフトからFig. 2AとBにおける低磁場側の各々肩と吸収ピークはphosphatidylethanolamineとphosphatidylserine, 高磁場側の吸収ピークはphosphatidylcholineとsphingomyelinによるといえる。またFig. 2Bの両スペクトルの面積はこれらリン脂質の赤血球膜中の存在比に大体一致している。(3) 超音波処理をしたresealedゴーストにおける Ca^{++} イオンの影響をFig. 3A-Dに示した。用いた Ca^{++} イオン濃度は0, 0.5, 5, 10 mMであった。0.5 mM Ca^{++} イオン濃度ではほとんどスペクトルに変化はみられなかった。5 mM Ca^{++} イオン濃度では低磁場側のピーク即ちphosphatidylethanolamine, phosphatidylserineによるピークは肩を示すように

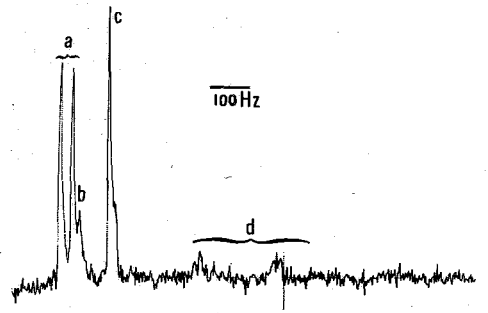


Fig. 1. ^{31}P -NMR spectrum of human erythrocyte. a: DPG, b: inorganic phosphate, c: 85% phosphoric acid, d: ATP and ADP.

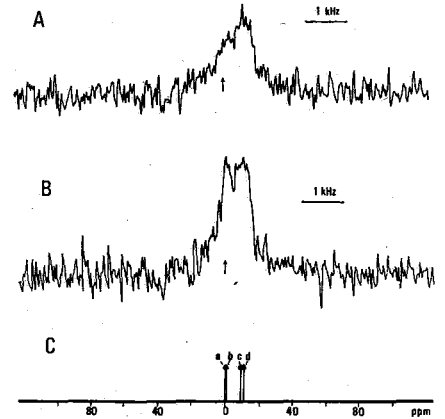


Fig. 2. A: ^{31}P -NMR spectrum of unsonicated and resealed ghosts. B: ^{31}P -NMR spectrum of sonicated and resealed ghosts. C: The positions of resonances of pure phospholipids mixed with 154 mM NaCl solution at pH 7.4. a, b, c, and d show the positions of resonances of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylcholine and sphingomyelin respectively.

なり, 10mM Ca^{++} イオン濃度では両ピークは一つの中のないスペクトルとして見られるようになった。しかし Ca^{++} イオン濃度変化による化学シフトは見られなかった。

考察 (1). ヒト赤血球には水に可溶性の 3,3-diphosphoglycerate, inorganic phosphate, ATP, ADP 及びリン化合物として存在し, Fig. 1 で示したように線中の狭いスペクトルが得られる。

一方水に不溶性で膜構成成分としてのリン脂質も存在する。これらは膜構造に組込まれており, その動きは制約を受けるため線中の広いスペクトルを示すと予期される。それゆえ水に可溶性リン脂質を取り除いたゴーストでは線中の狭いスペクトルをもつ赤血球を観察すると同じ NMR 測定条件では線中の広い構成リン脂質のスペクトルは得られない。そこで単位体積当りの膜の量を多くするため, 超音波処理により 100,000 倍でゴーストの沈渣を得て, 試料とし, NMR 観察は 10,000 Hz の範囲で, 69,000 回の積算を行った。この結果得られたスペクトル (Fig. 2A) は線中と化学シフトから水に可溶性のリン化合物によるものではなく, Fig. 2C に示した膜構成リン脂質によるものといえる。(2). 超音波処理によるスペクトルの変化は Fig. 2B に見られる。超音波処理により明らかになる二つのピークがみられる。この原因として, (a) はゴースト粒子が小さくなり, 粒子が動きやすくなるための narrowing。(b) 超音波処理によるリン脂質-蛋白質, リン脂質-リン脂質間の相互作用が弱くなることによる narrowing が考えられる。特に phosphatidylethanolamine と phosphatidylserine による吸収部分の変化が大きいのは, これらリン脂質は通常膜の inner layer に主として分布することから超音波処理により, inner layer と相互作用している蛋白質がはぶれることによることと考えられる。(3). Ca^{++} イオンによるスペクトルへの影響は Fig. 3A-D に示したように, 二つのピークのうち低磁場側のピークが 5 mM Ca^{++} 濃度で肩になり, 10 mM Ca^{++} イオン濃度では中の広い一つのスペクトルのごとくなる。これは (a) リン脂質の polar head group と Ca^{++} イオンの相互作用により polar head group の動きが制約されるため。(b) Ca^{++} イオンと膜蛋白質の相互作用により蛋白質の動きが制約され間接的にリン脂質の polar head group の動きが制約されるため。と考えられる。Fig. 3A-D で negative charge をもつ phosphatidylserine による低磁場側の吸収スペクトルの broadening が 5 mM Ca^{++} イオン濃度で見られることから, Ca^{++} イオンとリン脂質の polar head group の直接的な相互作用による polar head group の動きの減少が主として考えられる。

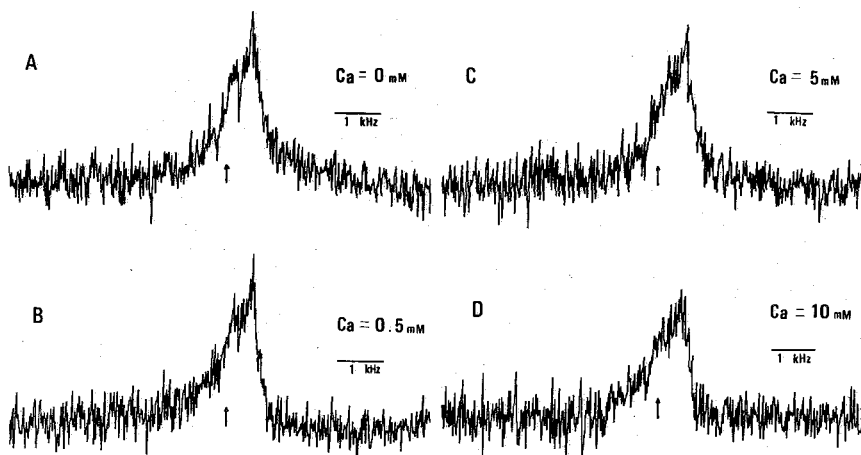


Fig. 3. ^{31}P -NMR spectra of sonicated and resealed ghosts which were incubated in various concentrations of Ca^{++} ion. The arrow denoted the resonance frequency of 85% phosphoric acid.

[文献]

1. J.A. BERDEN, R.W. BARKER and G.K. RADDA, *Biochim. Biophys. Acta*, 375, 186 (1975)
2. P.R. CULLIS and B. DE KRUYFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 436, 523 (1976)
3. S.J. KOHLER and M.P. KLEIN, *Biochemistry*, 15, 967 (1976)
4. D. CHAPMAN, V.B. KAMAT, J. DE GIER and S.A. PENKETT, *J. Mol. Biol.*, 31, 101 (1968)
5. D.G. DAVIS and G. INESI, *Biochim. Biophys. Acta*, 282, 180 (1972)
6. B. DE KRUIJFF, P.R. CULLIS, G.K. RADDA and R.E. RICHARDS, 419, 411 (1976)
7. J.T. DODGE, C. MITCHELL and D.J. HANAHAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119 (1963)

³¹P-NMR Studies on Ghost Membranes of Human Erythrocytes.

Department of Physiology
Kyoto Prefectural University of Medicine
Kyoto, Japan, 602

Hiroyasu Nishikawa, Seiji Yamada, Kazuo Yoshizaki and Hiroshi Watari

³¹P-NMR spectrum of human erythrocytes washed three times with physiological saline solution showed narrow absorption lines of diphosphoglycerate at -3.1 and -2.3 ppm, inorganic phosphate at -1.9 ppm, and ATP and ADP at +5.9, +10.9 and +19.5 ppm. But ³¹P-NMR spectrum of unsonicated and resealed ghost did not show any narrow line because the phosphorus compounds dissolved in the solution and removed during the preparation of the ghosts.

When unsonicated and resealed ghosts were centrifuged down at 100,000 g, ³¹P-NMR spectrum of the ghosts showed a broad absorption line with a peak at +11.8 ppm and a shoulder at +2.0 ppm upfield of the reference frequency of 85 % phosphoric acid. The half width of the absorption line at higher field was about 10 ppm.

When the ghosts were treated with sonication, ³¹P-NMR spectrum showed two absorption lines at +10.4 and +0.6 ppm. Their half widths became slightly narrower than that of unsonicated and resealed ghosts. These absorption lines were assigned by chemical shifts of pure phospholipids which are found in human erythrocyte membrane: The absorption line in lower field was due to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, and that in higher field was due to phosphatidylcholine and sphingomyelin. The area under the absorption lines were in proportion to the numbers of these phospholipids.

When the sonicated and resealed ghosts were incubated in the solution contained calcium ions of various concentrations, the broadening of absorption line at lower field was observed at 5 mM of Ca⁺⁺ ion, and that of both absorption lines at lower and higher fields were observed at 10 mM of Ca⁺⁺ ion.

These facts suggest that polar head groups of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine which reside in the inner half of the bilayer of the erythrocyte membrane tend to bind with calcium ion and decrease their mobilities.

(京府医大) ° 吉崎知男, 西川弘恭, 山田誠二, 亘 弘

〔序〕最近, 生細胞のリン化合物の ^{31}P -NMRスペクトルが赤血球や癌細胞および心筋等につき報告された¹⁻³⁾。また筋細胞についてはHoult et al.⁴⁾やBurt et al.⁵⁾がラットおよびカエルの筋肉を用い, 嫌氣的条件下でのクレアチンリン酸(C~P)の経時的減少や, ATPの化学シフトおよび結合定数より $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ であること, さらに無機リン酸(P_i)の化学シフトより細胞内pHの測定可能なことが報告された。本研究はカエル筋肉を用いこれを検討するとともに好氣的条件下の測定を行ない, 静止筋および筋収縮に伴うエネルギー代謝を解析し, さらに他の生体組織のリンの検出感度を検討した。

〔方法〕試料は食用ガエルの大腿二頭筋でリンゲル液とともに試料管に入れ, 灌流できるようにした。さらに4%正リン酸と重水を封入した毛細管を入れて外部基準とした。装置はJEOL PFT-100 NMR (^{31}P , $\omega_0 = 40.29\text{MHz}$)で, フリスタル・フィルターを用いた。通常, 測定は室温(24°C)で, 30°パルスを1000回積算(約30分)してスペクトル(2KHz)を得た。

〔結果および考察〕食用ガエル大腿二頭筋のリンのスペクトルの経時変化をFig. 1に

示す。左の低磁場側より3つの大きなピークは無機リン酸(P_i), 外部基準の4%正リン酸, クレアチンリン酸(C~P)に, その右側の3つの小さなピークはATPの γ , α , β 位のリンに対応する^{4, 5)}。嫌氣的条件下におけるC~Pの減少と P_i の増加と若干の高磁場側へのシフトが認められ解糖系による乳酸産生により細胞内pHの酸性化を示している。

なおC~Pの存在する間, ATPはほぼ一定であり, これはLohmann反応 $\text{C}\sim\text{P} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{C} + \text{ATP} \dots (1)$

よしざき かずお, にしかわ ひろやす, やまだ せいじ, わたり ひろし

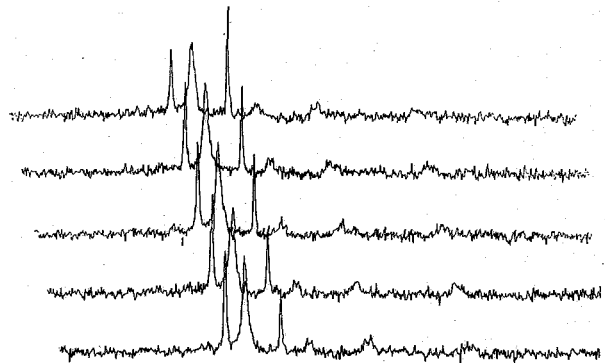


Fig.1. Time course of resting muscle under anaerobic conditions. Each spectrum was taken at time intervals 0,2,3,4.5,5.5 hours at 4 °C.

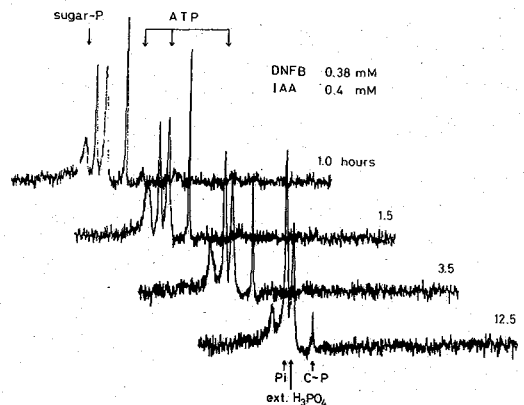


Fig.2. Time course of poisoned muscle with DNFB and IAA under anaerobic conditions.

によりATPが消費されても、直ちにC~Pにより補われることを示している。この反応の平衡が細胞内で成立していると仮定し、もしC~PとATPのγ位のリンの交換が充分遅ければ両者は単一のピークとなるが、実際には約100 Hz離れたピークとなっている為、両者の交換は10 msecより遅いことがわかる。このLohmann 反応を0.38 mM dinitrofluorobenzene (DNFB) で抑制し、さらに解糖系を0.4 mM monoiodoacetate (IAA) で抑制するとATPの消失がC~Pの減少より先に認められた(Fig. 2)。この時、解糖系のsugar-Pの著明な増加が認められ、さらにATPのα位のリンが若干認められ、これはATP以外のNAD⁺等を示しているものと思われる。ATPの消失後C~Pの漸減がみられC~Pの不安定性を示している。

好氣的条件下でブドウ糖を含むリンガー液で灌流し測定を行なうとC~Pの漸増およびPiの減少がみられた(Fig. 3)。Spinning は行なっていない。

以上の結果より、静止筋におけるエネルギー消費、たとえば能動輸送などによるエネルギー消費に対し、嫌氣的解糖によるエネルギー産生では不足であるが、好氣的条件下にすると、酸化リン酸化が働き十分なエネルギー産生の行なわれることが明らかとなった。

次に筋収縮によるエネルギー消費とエネルギー産生について検討した。嫌氣的条件下における連続した4つのスペクトルをFig. 4に示す。途中で1分間の強縮刺激を行ない、C

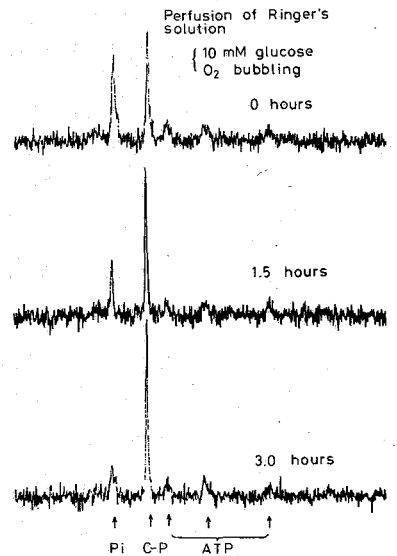


Fig. 3. Time course of resting muscle under aerobic conditions.

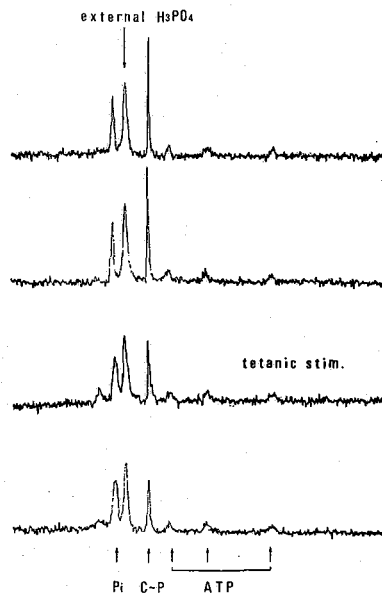


Fig. 4. Effect of tetanic stimulation under anaerobic conditions.

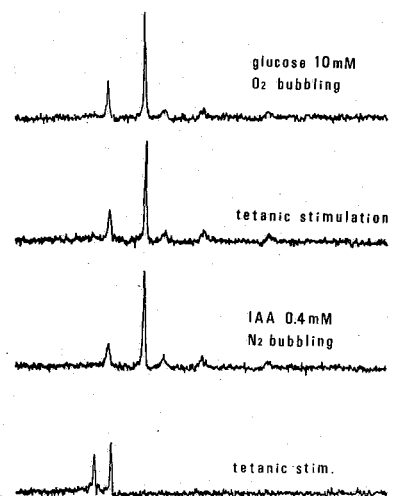


Fig. 5. Effect of tetanic stimulation under aerobic conditions and under the suppression of the energy-yielding reactions.

~Pの著明な減少とPiの中の増加ならびにsugar-Pの一過性の増加がみられた。一方、好氣的条件下では、Fig. 5の上の2つのスペクトルに示す如く、強縮刺激にもかかわらずほとんどスペクトルの変化は認められず、0.4mM IAAで解糖系を抑え、奎素で酸化のリン酸化を抑えるとFig. 5の下2つのスペクトルに示す如く、強縮刺激により、ATPおよびC~Pの消失とPiおよびsugar-Pの増加が認められた。

以上の結果より、1分間の強縮刺激を与えると、エネルギー産生系を抑制した場合には完全な細胞内エネルギー貯蔵の消費が生じる。嫌氣的解糖によるエネルギー産生を許すと急速なATPおよびC~Pの回復が生じるが元の濃度レベルに達せず、細胞内pHの酸性化と一過性の解糖系の促進が生じる。一方、好氣的条件下では、酸化のリン酸化によるエネルギー産生により、ほぼ元の濃度レベルまでの回復が認められ、この時、一過性の解糖系の促進は認められなかった。

なお、カエル筋肉においてBurt et al.⁶⁾の報告したglycerol-3-phosphocholineは検出できなかったが、Fig. 6に示す如く、カエル心筋、胃の平滑筋および肝臓では、これに相当すると思われるピークが認められた。また、他の生体組織につき、ラットの筋、心、胃、肝、腎、脾、精巣、脳について約30分の測定にて検出可能なリンのスペクトルをFig. 7に示す。

(文献)

- 1) Henderson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2487 (1974)
- 2) Navon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 87 (1977)
- 3) Jacobus et al. Nature, 265, 756 (1977)
- 4) Hoult et al. Nature 252, 285 (1974)
- 5) Burt et al. J. Biol. Chem. 251, 2584 (1976)
- 6) Burt et al. Biochemistry 15, 4850 (1976)

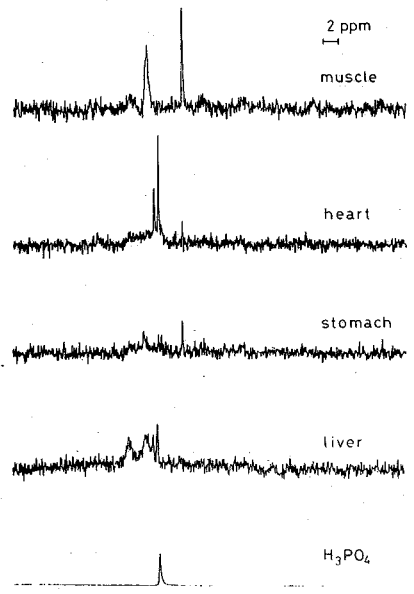


Fig. 6. The spectra of bullfrog organs.

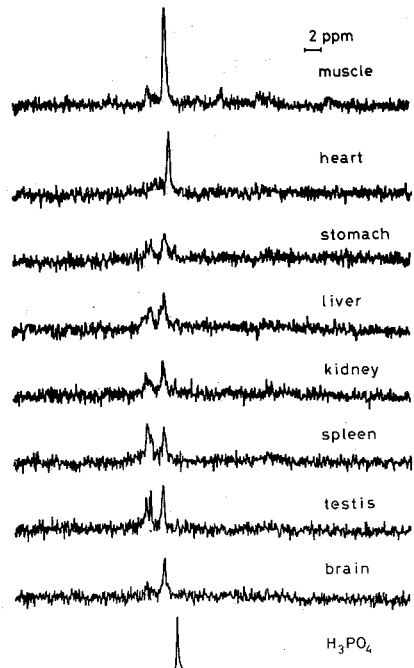


Fig. 7. The spectra of several organs of rats.

³¹P-NMR study of phosphorus metabolites in living tissues.

Department of Physiology,
Kyoto Prefectural University of Medicine
Kyoto, Japan, 602

Kazuo Yoshizaki, Hiroyasu Nishikawa, Seiji Yamada, Hiroshi Watari

³¹P-nuclear magnetic resonance was applied to the measurements on ATP, creatine phosphate, inorganic phosphate in living muscles of bullfrog. The amount of creatine phosphate decreased on the resting muscle under anaerobic conditions, accompanied with the intracellular acidosis due to lactate production, but ATP remained constant. Hereby anaerobic glycolysis seemed not to be produce the sufficient energy to maintain the level of intracellular energy store as creatine phosphate and ATP. With the use of 2,4-dinitro-1-fluorbenzene and iodoacetate early breakdown of ATP was observed. By the perfusion with oxygen saturated glucose-Ringer solution on the resting muscle, the amount of creatine phosphate increased slowly. This fact can be explained as that oxidative phosphorylation provided the rate of the sufficient energy production to overcome the rate of the energy consumption rate and to reach the steady level of intracellular energy store. Then the effect of tetanic stimulation for 1 minute on living muscle under anaerobic and aerobic conditions were compared. Under the suppression of glycolysis by iodoacetate and that of oxidative phosphorylation by nitrogen gas, the intracellular energy store was depleted by this tetanic contraction. Under anerobic conditions glycolysis provided the rapid recovery of the energy store level, however, it was not sufficient to reach the initial level and remained a new steady level of energy store below the initial level. On the other hand, aerobic oxidative phosphorylation provided the sufficient energy production to reach the initial level but did not exceed the level suggesting the regulating mechanism of recovery metabolism.

(東工大, 京府医大) 藤井博匡, 河合 徹, 西川弘恭, 巨 弘

(緒言)

生体内で行なわれる種々の反応は、脂質膜や球状タンパク質の表面や内部で行なわれ、反応物の取り込み過程や反応場のモデルとして、従来、界面活性剤分子による通常ミセルが用いられて研究されてきた。しかしながら、界面活性剤分子の極性基の特性と、水和等の水分子からの効果と関連させて論じようとするならば通常ミセルは不向きであり、逆ミセル系を用いた方がモデルとしてはすぐれていると思える。逆ミセルとはアルコールあるいはベンゼン等の有機溶媒に、水、界面活性剤を加えた三成分系において形成される分子集合体で、この集合体の極性基は通常とは逆に、内側に向いており内部に水を保つ構造をとっており、*Ekwall*¹⁾によって逆ミセルと名付けられている。

我々は、カプリル酸ナトリウム ($C_7H_{15}CO_2Na$)、水、 n -ヘキサ)ール系逆ミセル中において種々の p -ニトロフェニルエステルの加水分解反応を行なったところ反応は著しく加速され、エステル分子の n -ヘキサ)ールから水への分配能と、内部 *water core* 中の水の運動性が加水分解速度に影響することを見出した。²⁾

逆ミセルの内部 *water core* に位置している CO_2Na 基と水分子との相互作用が水の運動性に影響を及ぼし、極性基の効果が反応場に対して重要な要素となってきたので、水分子、カプリル酸ナトリウムのカルボニル炭素、 Na^+ イオン、 n -ヘキサ)ールの運動性および化学環境と、 1H , ^{13}C , ^{23}Na -NMR を用いて解析し、極性基界面の特性を調べた。

(実験)

カプリル酸ナトリウムは、カプリル酸と水酸化ナトリウムにより調整し、 n -ヘキサ)ールは市販特級品を用い、水は $1 \mu S$ 以下の水を使用して三成分により逆ミセルを調整した。 1H -NMR は、JNM-PS 100 MHz Spectrometer を用い、 ^{13}C -NMR 測定は、上記の装置に、PFT 100 pulse programmer を用い 253 回積算を行なった。

1H , ^{13}C -NMR 共に、TMS 外部基準法により化学シフトを求めた。

^{23}Na -NMR は、上記の装置で、磁場を $21304 Gauss$ に下げ $24 MHz$ で 200 回積算して測定し、化学シフトは $NaCl$ 水溶液を外部基準として求めた。

(結果と考察)

エステル加水分解反応と、逆ミセル極性基界面の効果との関連を見るために反応時と同じ組成を持つ一連の試料の 1H -NMR 測定を行なった。界面の効果と関連付けるために、水のモル数とカプリル酸ナトリウムモル数との比、 R -値に対して、溶媒である n -ヘキ

ふいひるただ、かわいともる、にしかわひるやき、わたりひるし

カ) -ル末端メチル基プロトン及びメチレン基プロトンの化学シフトと水プロトンの化学シフトおよび半値幅を Table 1 に示した。	R-value	CH ₃ (n-Hex.)	-CH ₂ -OH(n-Hex.)	H ₂ O	(H ₂ O) (Hz)
1	18.6	1.24	3.90	5.18	6.61
2	11.6	1.25	3.90	5.24	6.31
3	10.3	1.27	3.90	5.24	6.01
4 *1	9.28	1.28	3.90	5.26	4.95
5 *2	9.28	1.28	3.90	5.27	4.95

Table 1 Chemical Shifts of n-Hexanol and Water and Half-Width of Water as a function of R-value *1 ; 1.13 m/l *2 ; 1.29 m/l

カ) -ルの化学シフトはほとんど変化がなかつた。水プロトンの化学シフトと半値幅がR値に対して変化している。水プロトンの半値幅はR値が小さくなるにつれてつまり、カプリル酸ナトリウム1モルに対して水分子のモル数が少ないとき程一小さくなっている。この現象は単に水和の効果だけからは説明することのできなかつた逆の結果である。この現象を他面から見るために、IR測定を行なってみると、この逆ミセル系には三状態の水—まぎへキサ) -ル中に分散している水と、自由水と束縛されている水とが検出され面積比よりNMRの結果と一致していることがわかった。カプリル酸ナトリウムのナトリウムはNaイオンとして本当に解離しているのかという疑問が湧き、²³Na-NMR並びに¹³C-NMR測定をし、Naイオンとカルボニル炭素の化学シフトと半値幅を¹H-NMRの結果との対応をTable 2にまとめた。カルボニル炭素の化学シフトはR値が小さくなるにつれて高磁場側に移動し、カプリル酸ナトリウムの通常ミセルでのカルボニル炭素の化学シフトは、

トは、185、29 ppmで逆ミセル系よりさらに低磁場側である。	¹ H-NMR			¹³ C-NMR		²³ Na-NMR	
	R-value	half-width (Hz)	chemical shift *1	half-width (Hz)	chemical shift *2	half-width (Hz)	chemical shift *2
185	18.6	6.61	5.18	38.43	183.4	49.8	5.4
29	11.6	6.31	5.24			66.9	7.3
	9.28	4.95	5.27	42.70	182.6	71.3	9.8

Table 2 Chemical Shifts and Half-width of Water, Carbonyl group and Na⁺ ion as a function of R-value *1; ppm from TMS *2; Hz from NaCl aqueous solution

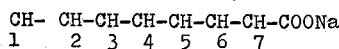
トはR値が小さくなるにつれて低磁場側に移動し、NaCl水溶液中の解離したNa⁺イオンの化学環境から変化してきていることを示している。これらの結果から、カプリル酸ナトリウムのナトリウムは完全解離しておらず、R値が変化することによってNa⁺イオンの解離状態も異なり、この解離状態の差が水プロトンの運動性に影響をあたえているものと思われる。R値が小さくなるとNa⁺イオンの解離がおさえられ、カプリル酸ナトリウムのカルボニル炭素の半値幅が大きくなって運動性が減少するが、水プロトンの半値幅は小さくなり運動性が増加するが、一方、R値が大きくなると逆の現象が表われている。水プロトンの運動性についてはNa⁺イオンの水和現象として説明できるが、R値が小さくなるにつれて、なぜNa⁺イオンの解離がR値の大きい場合に比べておさえられるのかはまだ明らか

	R-value	chemical shift (Hz)	half-width (Hz)
1	18.6	49.8	5.4
2	11.6	66.9	7.3
3	10.3	68.9	11.2
4	9.28 *1	78.6	10.7
5	9.28 *2	71.3	9.8

Table 3 Chemical shifts and half-width of Na⁺ ions as a function of R-value
*1; 1.13 *2; 1.29 M/l

	1 *1	4 *1	A *2
C-4	31.31	31.37	30.35
C-5	30.69	30.69	29.88
C-6	27.77	27.98	27.37
C-7	39.66	39.59	39.59

Table 4 C-13 chemical shifts of Na caprylate
*1; reversed micelle *2; normal micelle



ではないが、この点をより明らかにする為に、R値の変化に対するNa⁺イオンの化学シフトと半値幅をTable 3に示した。Na⁺イオンの線幅は単に増加してゆくのではなく、4の試料において極大となり、又、半値幅も化学シフト同様、3, 4の試料付近で極大値を取っている。Table 3に示した一連の試料の電気伝導度測定を行なったところ、1~3の試料については伝導度は単調に増加するが、4の試料の伝導度は3の場合とほぼ同値を取るかその後伝導度は再び増加するという結果を得、4の試料の伝導度は変曲点のようであった。この伝導度測定の結果から、一連の逆ミセル系は単一の相ではなく、4の試料を境にして一種の構造変化をおこしているのではないかと思える。つまりR値の大きな領域では界面活性剤分子のナトリウムは解離しているが、濃度が増加するにつれて界面活性剤極性基間の静電氣的反発によって構造を保つことが不可能となる為、この構造を保つ為にNa⁺イオンの解離が濃度の増加とともにおこされてゆくと思える。

次に、水分子がカプリル酸ナトリウムの極性基部分のどの位置まで深く入り込むかを考える為に逆ミセル系と通常ミセル系においてカプリル酸ナトリウムの¹³C-NMR測定を行なった結果をTable 4に示した。(ヘキサ)ールの吸収によりC-1~C-3までの吸収は見られないがC-4~C-5の吸収は分離されて観測でき、逆ミセル系のC-6, C-7の化学シフトは通常ミセル系の化学シフトと比較的近似しているが、C-5, C-4と進むにつれて化学シフト差は大きくなってゆく。通常ミセル系において水分子は、極性基から2~4番目のメチレン基付近にまで存在していると考えられているが³⁾、このカプリル酸ナトリウム通常ミセル系でも同様に、2番目のメチレン基付近にまで水分子が存在し得ることは十分考えられ、これより逆ミセル系においても水分子は単に極性基部分にのみ存在するのではなく疎水性部分にも存在すると思える。

本研究において¹³C-NMR測定をしていただきました東工大 朝倉哲郎博士に深く感謝いたします。

- 文献 1) Per Ekwall, J. Colloid Interface Sci 29, 16 (1969)
2) 藤井博匡 河合 徹 第26回高分子討論会予稿集 7, 1434 (1977)
3) N. Muller Reaction Kinetics in Micelles (1973)

NMR studies on Polar head groups of surfactant in the (Water-
Sodium Caprylate-n-hexanol) Reversed Micelle system

H. Fujii^{*1}, T. Kawai^{*1}, H. Nishikawa^{*2} and H. Watari^{*2}

^{*1}; Tokyo Institute of Technology, Tokyo

^{*2}; Department of Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto

The properties of polar head groups of surfactants and water molecules in the reversed micelles, containing of sodium caprylate, n-hexanol and water, have been studied by means of ¹H, ¹³C and ²³Na-NMR.

It was found that the half-width of water proton decreased with decreasing the molar ratio of water to sodium caprylate ($R\text{-value} = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{Na Cap}]$).

This result shows that the free water increased with the decreasing R-value and this increment in mobility of water depends on the ability of hydration by Na⁺ ion.

²³Na-NMR showed that the chemical shift and half-width of Na⁺ ion didn't increase monotonously, but showed a maximum at the concentration of 1.13M/l.

Though the conductivity of this sample increased linearly with the concentration in the range from 0.569 to 1.02M/l, at the concentration of 1.13M/l it showed abnormally, which was almost the same as the value of 1.02M/l.

These results may suggest that the change in the structure of the reversed micelle or the phase transition occur at the concentration of 1.13M/l.

113 (C7)

アスパラギン酸アミノ基転移酵素活性域の
ミクロ環境について

(蕪大・医, 京大・理, 東大・理)

山崎政城, 松垣強, 赤坂一之,
森野能昌, 宮沢辰雄

NMRを用いて蛋白質を直接観測する場合, その対象が比較的 low molecular weight の蛋白質に限られる。しかし, "生体内で高次の機能をもち高分子量の蛋白質についてどの程度までくわしい情報が得られるのか" は非常に興味ある問題である。

NMR の対象例として選んだアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (L-Aspartate: 2 Oxo-glutarate Aminotransferase, E.C. 2.6.1.1., GOT) は細胞内局在を異にする2種のアイソザイム, すなわち細胞上清分画に局在する GOT (s-GOT, 分子量 93,250 (2量体) 一次構造既知¹⁾, 8 His 残基/単量体) とミトコンドリア分画に局在する GOT (m-GOT, 分子量 89,262 (2量体), 一次構造既知²⁾, 10 His 残基/単量体) が存在する。両者は同一反応 ($\text{Aspartate} + \text{d-ketoglutarate} \rightleftharpoons \text{Oxaloacetate} + \text{Glutamate}$) を触媒するが, 物理化学的, 反応動力学的, 免疫化学的に関与が異なる。両アイソザイムの活性域周辺の構造を明らかにすることは酵素の構造と機能とを明らかにする興味ある問題を提示している。

今回, 270 MHz ¹H-NMR を用いて両酵素の活性域周辺の構造を明らかにし, さらに 270 MHz ¹H-NMR の有用性について検討した。

(実験方法)

s-GOT, m-GOT は既報の方法³⁾によりブタ心筋より精製結晶化した。NMR 測定のための酵素溶液は凍結乾燥法により重水素置換した。酵素濃度を 2.2 mM (25 mM ピロリン酸カリ緩衝液) に調整し, 希塩性イオンの影響を避けるため 0.2 mM EDTA を共存させた。

NMR の測定は BRUKER WH-270 NMR 分光器により, 5 mm φ 試料管を用い, 測定温度 23° ± 1024 回の積算を行った。各 pH は pH 6.9-7.0 のよみに記載し, 化学シフトの基準は試料中に含まれる H₂O を用いた。

(実験結果 および考察)

1) s-GOT の His 領域の NMR スペクトル

s-GOT の His 領域に 4 個のピーク (低磁場側からピーク 1, 2, 3, 4 と名づける) が認められ, それぞれ peak 1 が, 基質の ω カルボキシル基結合部位と一致の必須 His 残基に由来するピークであることを明らかにした。^{4,5)} したがって, 100 MHz NMR を用いて必須 His 残基

をさきまき, かがきつよ, あがさか せつゆき, もりの よしよ, ひやぎわ たつお

由来する peak 1 の詳細な挙動を明らかにすることは、① pH 6.0 以下の領域では S-GOT の溶解性が著しく低下し、さうして peak 2 と重なり合うため、また ② pH 9.0 以上の領域では peak 1 の線巾の広がりのため、非常に困難である。

今回、270 MHz NMR を用いることにより、S-GOT のくわりの滴定曲線を得ることが成功した (図 1)。peak 1 については、① pH 9.0-10.2 までの線巾の広がりをもとにしては、8 ㎐ 程度高磁場側へシフトすること。② pH 10.2 以上で再び鋭いピークが認められること。③ pH 5.0 より低い領域でも 8-10 ㎐ 程度高磁場側へシフトすること。などの結果から必須 His 残基に由来する peak 1 は pH 依存性を有すること。およびかなり高い pKa 値 (9.0~10.2) をもち、pH 9.0 付近での protonated form で存在することを明らかにした。peak 3 については、① ペリドキサルリン酸の 4'-ホルミル基とアポ酵素の Lys 258 残基の ε-NH₂ 基とで形成される aldimine 結合を NaBH₄ で還元して安定型酵素で peak 3 の消失が認められること。② 270 MHz NMR スペクトルからあうく pH 4.95, 5.70 ㎐ 鋭いピークが認められ、pH 5.0-6.8 での peak 3 と連続的につながりをもつと予想される吸収曲線が、S-GOT (ペリドキサルリン型) の aldimine 結合における pKa 値 (6.0~6.7) と一致することが期待されること。したがって、peak 3 は aldimine 結合の C-H をも含めた補酵素分子内水素に由来するものと考えられる。さうして peak 2 については、非常に高い pKa 値 (9.15) をもち異常な環境にあることを明らかにした。

(2) S-GOT の His 領域の各ピークの線巾について

蛋白質の His 残基イミダジール環 C(2)-H および α peptide proton と他の核があるスピンの双極子-双極子相互作用から (1), (2) 式を用いて $\frac{1}{T_2}$ を求めた。

$$\frac{1}{T_2} = \gamma^2 \hbar^2 I(I+1) \left\{ \frac{3}{8} J^{(2)}(2\omega_I) + \frac{15}{4} J^{(0)}(\omega_I) + \frac{3}{8} J^{(0)}(0) \right\} \dots (1) \quad \text{同種スピンの結合している場合}$$

$$\frac{1}{T_2} = \gamma^2 \hbar^2 I S(S+1) \left\{ \frac{1}{8} J^{(0)}(0) + \frac{1}{24} J^{(0)}(\omega_I - \omega_S) + \frac{3}{4} J^{(2)}(\omega_I) + \frac{3}{2} J^{(0)}(\omega_S) + \frac{3}{8} J^{(2)}(\omega_I + \omega_S) \right\} \dots (2) \quad \text{異種スピンの結合している場合}$$

その結果、 4.30×10^{-8} sec 程度の T_2 をもつ酵素 (GOT) では His 残基および α peptide proton の $\Delta\omega$ は 1.74 ㎐ および 28.5 ㎐ より大きく付ることを導き、S-GOT および m-GOT の His 領域のピークが peptide proton 由来のものではないことを明らかにした。

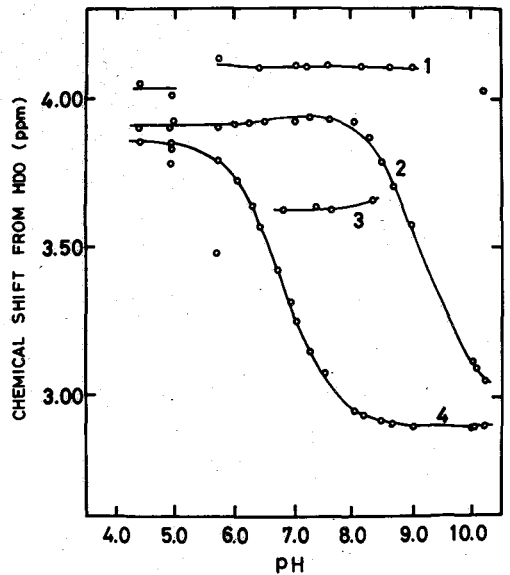


Fig. 1. pH dependence of the chemical shift of resonances in the histidine region of the 270 MHz PMR spectrum of cytosolic aspartate aminotransferase. Resonances are numbered from lowfield. pH values are uncorrected pH meter reading.

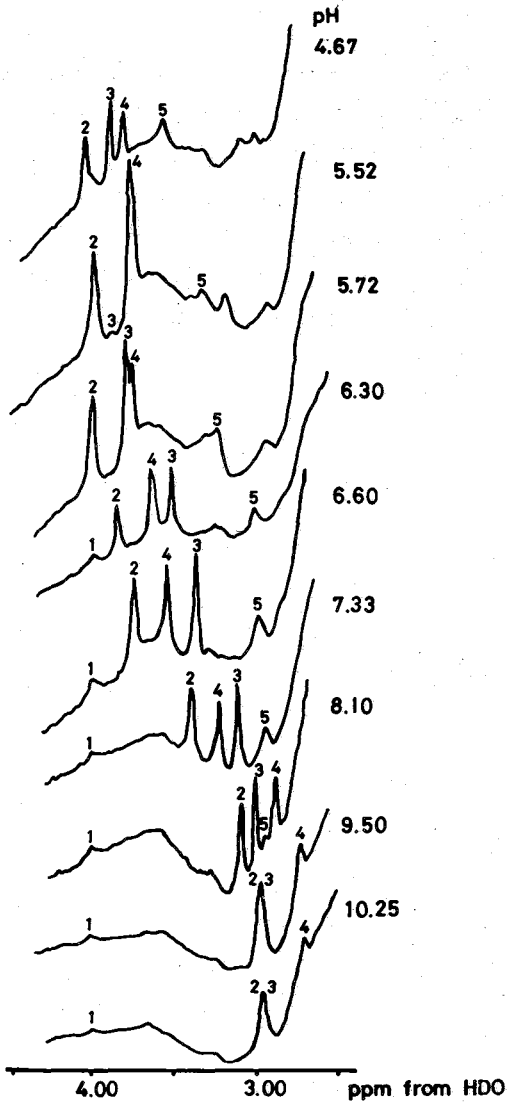


Fig. 2. Aromatic region of the 270 MHz PMR spectrum of mitochondrial aspartate aminotransferase. Peaks are numbered from downfield.

は変化が認められなかったが、直接酵素の触媒活性に関与している His 残基に由来する peak 4 が複合体形成とともに低磁場側へシフトすることを認められた。

(4) m-GOT の His 領域の NMR スペクトル

m-GOT の His 領域に 5 個のヒスチジン (低磁場側からヒスチジン 1, 2, 3, 4, 5 と名づける) を直接観測することに成功した (図 2)。この 5 His 残基の化学シフトの pH 依存性から図 3 に示すように滴定曲線が得られ、各ヒスチジンの pKa 値を求めた。

peak 2, 3, 4 は 85~100 Hz のシフトを示し、pKa 値はそれぞれ 7.01, 6.50, 7.20 である。正常な His 残基の挙動を示す。一方 peak 5 は 56 Hz のシフトで pKa =

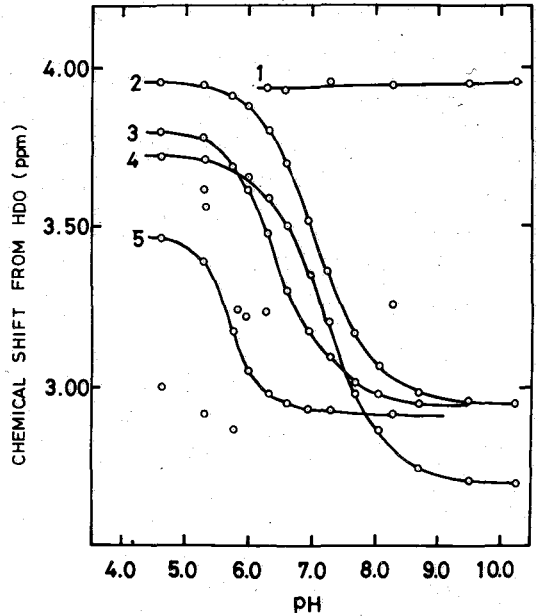


Fig. 3. pH dependence of the chemical shift of resonances in the histidine region of the 270 MHz PMR spectrum of mitochondrial aspartate aminotransferase. The numbering scheme corresponds to those of Fig. 2.

(3) s-GOT と基質アナログとの相互作用

基質アナログである L-α-メチルアスパラギン酸は s-GOT と結合し、イミド基転移の段階で安定な複合体を形成する⁶⁾。基質の ω 炭素キレチル基結合部位と近接する必須 His 残基 (peak 1) は複合体形成により高磁場側へシフト (pH 6.8 で 0.28 ppm 高磁場側へシフト, Δν_{1/2} = 10 Hz) し、同時に必須 His 残基の pKa 値の低下を認められた。一方、酵素-基質複合体の pH 依存性から得られた滴定曲線では、peak 2 かつ 3 は}

5.70 とかなり低い値を示した。このピークが異常な環境にある His 残基に由来するの、あるいは aldimine 結合に由来する補酵素分子内水素の吸収であるのかは今後の課題である。peak 1 は pH 6.3 ~ 10.25 の測定範囲では pH 依存性は認められず、pH 6.3 より低い pH 領域では peak 2 との重なりのため、かなり pH 依存性を求めることは困難である。しかし、peak 1 の移動が S-GOT で基質の結合部位と似てはるらく必須 His 残基に著しく類似すること。および吸収の $\Delta\nu$ も 2.5 Hz 以下であることなどから m-GOT においても peak 1 が必須 His 残基であることを強く示唆している。

REFERENCES

1. Ovchinnikov, Yu. A. et al., FEBS Lett., 29, 31 (1973).
2. Kagamiyama, H. et al., J. Biochem., 82, 291 (1977).
3. Morino, Y. et al., J. Biochem., 82, 847 (1977).
4. Yamasaki, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 652 (1975).
5. Yamasaki, M. et al., in preparation.
6. Fasella, P. et al., Biochemistry, 5, 197 (1966).

PROTON MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPIC STUDIES OF THE HISTIDINE RESIDUES OF ASPARTATE AMINOTRANSFERASES

Masaki Yamasaki, Tsuyoshi Higaki, Kazuyuki Akasaka,*
Yoshimasa Morino, and Tatsuo Miyazawa**

Department of Biochemistry, Medical school, Kumamoto University,

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University, and

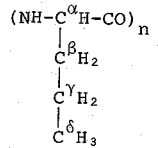
**Department of Biochemistry, Faculty of Science, Tokyo University.

NMR titration curves of several resonances observed in the histidine region of the 270 MHz spectra of cytosolic and mitochondrial aspartate aminotransferase were completed. And the essential histidyl residue in the active site of each isozyme was identified on the spectra using an instrument at 270 MHz.

poly(L-norvaline)

(東工大・工) 鈴木保之, 井上義夫, 中條利一郎

[序] これまで、我々は、側鎖にエステル結合を持つ一種のポリペプチド [poly(γ -benzyl-L-glutamate)¹⁾, poly(β -benzyl-L-aspartate)²⁾] のヘリックス-コイル転移に伴う nmr スペクトルの変化を取扱ってきた。これらのポリペプチドのトリフルオロ酢酸 (F₃AcOH)/重クロロホルム (CDCl₃) あるいは、ジメチルスルホキシド/重クロロホルム中でのヘリックス-コイル転移によって生ずる ¹³C-nmr 化学シフト差は、主鎖については、溶媒効果、コンホーメーション、そして側鎖からの誘起シフト、そして側鎖については、溶媒効果、コンホーメーション、そして主鎖からの誘起シフトがその原因として考えられる。これらの側鎖に官能基を持つポリペプチドでは、上述のような原因が重複してより簡単に解釈することはおぼろしい。そこで、側鎖に官能基を持たないキムとして側鎖アルキルのポリペプチドについて検討することにした。ロイシン、イソロイシン、バリンなどのアミノ酸は、poly(γ -benzyl-L-glutamate) などと比較し誘起シフトを見る場合には、枝分かれが存在するのみで適当でなく、直鎖アルキルを側鎖に持つアミノ酸、アラニン、 α -アミノノ-*n*-酪酸、ノルバリン、ノルロイシンがこの目的としては適当である。ところで、ベンジルブチレートなどの化合物において末端のメチル基の誘起シフトに異常性が見られるので、³⁾ これらのアミノ酸のうち、アラニンは適当でない。そこで、



poly(L-norvaline)

残る種のアミノ酸のうち今回はノルバリンを選び、poly(L-norvaline) のヘリックス-コイル転移に伴ない主鎖、側鎖に生ずる化学シフト差、および、コンホーメーションについて ¹H-nmr, ¹³C-nmr および ORD を用いて検討した。

[実験] 試料として用いた poly(L-norvaline) は、Fluka AG 社製の L-norvaline を本スゲンガスによつて NCA (A) 化し、ジオキサンを溶媒としてトリエチルアミン (I) を開始剤として、A/I = 100 で重合を行なった。トリフルオロ酢酸は東京化成、重クロロホルム (99.8%) は CEA 社より購入したキムをそのまま用いた。¹H-nmr の測定は、JEO L-100 型分光器を用い 100 MHz で、テトラメチルシランを内部基準として内部ロックによつて化学シフトを得た。¹³C-nmr の測定は、同じ装置に PFT-100 パルスプログラマーを用い、日本電子製 EC-6 電子計算機によつて積算した。ORD の測定は、日本分光 J-20 型を用い 600~300 nm の波長範囲で、1mm 円筒セルを用いて行なった。測定条件は、ポリマー濃度 2.5 (wt)%, 測定温度は室温である。

[結果と考察] α -CH, NH プロトンを除く他のプロトンの化学シフトは、溶媒組成変化に対し殆んど変化を示さなかつたので、 α -CH, NH プロトンの化学シフトの溶媒組成依存性のみを図 1 に示した。poly(γ -benzyl-L-glutamate), poly(β -benzyl-L-aspartate) とは異なる化学シフトの挙動が観測された。 α -CH プロトンは、ヘリックス領域および

すずき やすゆき, いのうえ よしお, ちゅうじょう りいちろう.

コイル領域で F_3AcOH の増加に伴ってほぼ直線的に低磁場シフトを示し、転移領域は F_3AcOH 15~30%、転移中点は F_3AcOH 22% 付近である。-オ、NHプロトンはコイル領域である F_3AcOH 40%以上では α -CHプロトンと同様であり、ハリックス領域である F_3AcOH 5~15%では大きく高磁場シフトしている。

各炭素の化学シフトの溶媒組成依存性を図2に示した。poly(γ -benzyl-L-glutamate)などとは異なって、すべての炭素がハリックス、コイル領域で F_3AcOH の増加に伴ってほぼ直線的に低磁場シフトしており、転移領域は F_3AcOH 15~30%、転移中点は22%付近である。ハリックス、コイル領域で各炭素の化学シフトが変化してオリプラターが存在しないので、転移に伴う化学シフト差を直接求めることができない。そこで、ハリックス、コイル領域での各炭素の化学シフト変化を直線と見なし、さらに転移中点を F_3AcOH 22.5%として2つの直線の F_3AcOH 22.5%における差を、ハリックス-コイル転移に伴う化学シフト差とした。そして、これを表に示した。C α 、C β 、C γ 間で符号の交替が見られ、その大きさはC δ を含めて主鎖から離れるに従って小さくなっている。poly(γ -benzyl-L-glutamate)と比較して、その符号については一致している。転移に伴って主鎖に生じた化学シフト差が、 γ あるいは δ 位の炭素にまで影響を与えることを示している。

次に、ORDの測定を行ない、Moffit-Yanのb $_0$ 値の溶媒組成依存性を図3に示した。 F_3AcOH 15~30%ではb $_0$ の大きな増加が見られ、 F_3AcOH 5~15%ではb $_0$ はほぼ一定と見なすことができる。L体のハリックスに対して一般に用いられているb $_0$ 値(-630)を用いると、ハリックス含量は最大でも約60%である。

ここで、上のnmrとORDの結果を比較してみよう。各炭素および α -CHプロトンの化学シフトより得られる転移領域とORDのb $_0$ 値より得られる転移領域はほぼ一致する。従って、これらはまさにハリックスからコイルへの構造の変化によるものと考えられる。また、NHプロトンの F_3AcOH 5~15%での F_3AcOH の増加に伴う大きな高磁場シフトはこの領域でb $_0$ の変化のないことより、ハリックス構造を維持した状態でのミクロな環境の変化によるものと考えざるを得ない。このような環境の変化としては、 F_3AcOH の溶媒和(プロトン-シオン、水素結合)、分子内水素結合が破壊される、の2つが考えられ

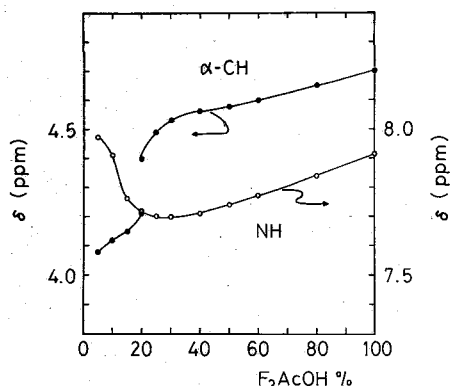


Figure 1. Chemical shifts of NH and α -CH protons of poly(L-norvaline) in ppm downfield from internal Me $_4$ Si vs the volume ratio of F_3AcOH in the $F_3AcOH/CDCl_3$ mixtures.

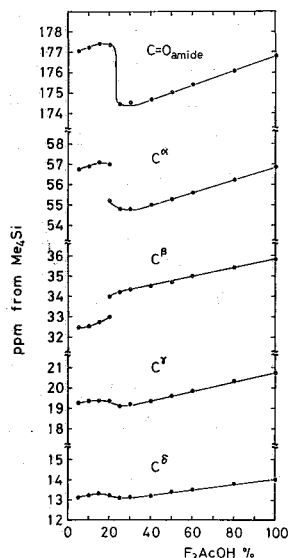


Figure 2. Chemical shifts of all of carbons of poly(L-norvaline) in ppm downfield from internal Me $_4$ Si vs the volume ratio of F_3AcOH in the $F_3AcOH/CDCl_3$ mixtures.

原因と結果と考へれば本質的に同じことと考へられる。Bradbury⁴⁾は、poly(D,α-amino-n-butyric acid)のF₃AcOH/CDCl₃中でのヘリックス-コイル転移において、b₀の溶媒組成依存性を報告している。彼々が測定した溶媒組成範囲では、同様な結果を示しており、F₃AcOHのより低濃度においてはb₀が600、すなわち100%ヘリックスになることを報告している。従って、同じような側鎖を持つpoly(L-norvaline)については、本質的には100%ヘリックスとなるものと見なすことができる。また、最近Bradbury⁵⁾は、poly(L-alanine)についてirの測定からヘリックス状態にある主鎖に対してF₃AcOHが水素結合していると報告している。F₃AcOH 5~15%でNHプロトンに観測される高磁場シフトも、ヘリックスへのF₃AcOHの溶媒和を示しているものと考えられる。

ところで、ヘリックス状態にある主鎖ペプチドに対する溶媒和が生じているとすれば、NHと対になっているC=Oの化学シフトにも当然同様な挙動が期待される。また、α-CHにも何らかの変化があらはれるのである。α-CHプロトンの転移に伴う化学シフト変化の原因としては、磁気遮蔽性のヘリックスとコイルとの相異、溶媒和の相異がある。ヘリックス含量がほぼ一定であり主鎖の大きな構造変化がないので、磁気遮蔽性の変化は考えづらい。また、ヘリックス状態が保たれているために、溶媒和の影響は殆んど受けないものと思われる。一否、C=Oについては、F₃AcOH分子が配位することによって、分子内水素結合が破壊されることにより生ずる化学シフト変化と、F₃AcOHの溶媒和によって生ずる化学シフト変化が相殺しているか、あるいは、後者が小さいものと考えられる。一否、主鎖に対する溶媒和により、NHは分子内水素結合が弱められ高磁場シフトを示すものと解釈される。

次に、ヘリックス、コイル領域で観測されるほぼ直線的な低磁場シフトは、同じ溶媒中でF₃AcOH高濃度領域においてアミドあるいはベンジルエステルの化学シフトがほぼ直線的に低磁場シフトすることと類似しており、電場効果によるものと推測される。

〔結論〕 poly(L-norvaline)は、F₃AcOH/CDCl₃中においてヘリックス状態に対するF₃AcOHの溶媒和を生じている。いままで対象にしてきたポリマーすべてで、ヘリックスコイル転移によって主鎖に誘起された化学シフトは、γあるいはδ位の側鎖炭素まで影響を与える。

Chemical shift difference $\Delta_{\text{helix/coil}}$ of poly(L-norvaline) in F₃AcOH/CDCl₃ mixtures

	$\Delta_{\text{helix/coil}}$
C=O	-3.6
C ^α	-2.9
C ^β	1.5
C ^γ	-0.7
C ^δ	-0.4

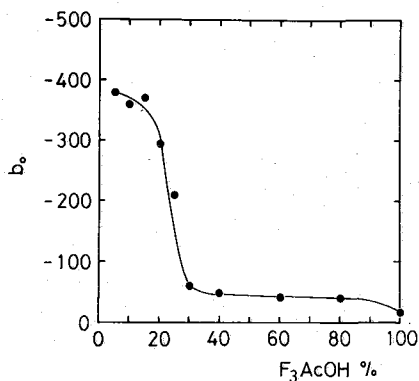


Figure 3. b₀ value of poly(L-norvaline) vs the volume ratio of F₃AcOH in the F₃AcOH/CDCl₃ mixtures.

文献 1) Y. Suzuki et al. (1975) Biopolymers 14, 1223

2) S. Sase et al. (1977) Biopolymers 16, 95

3) Y. Suzuki et al. (1976) 高分子討論会 1105

4) E.M. Bradbury et al. (1973) Pure Appl. Chem. 36, 53.

5) E.M. Bradbury et al. (1976) Polymer 17, 563

Helix-coil transition of the polypeptide having linear alkyl side chain, poly(L-norvaline)

Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology

Yasuyuki Suzuki, Yoshio Inoue & Riichiro Chujo

In our previous studies, we have dealt with the change of nmr spectra in polypeptides such as poly(γ -benzyl-L-glutamate) and poly(β -benzyl-L-aspartate) accompanied by their helix-coil transition. These polypeptides have an ester group at the side chain. They have some regularity in the sign and the magnitude of the chemical shift differences. Several mechanisms can be considered to induce the chemical shift differences; interaction between the solvent and the peptide group of backbone or the ester group of side chain, conformational change and the inductive effect. It is not easy to perfectly interpret the chemical shift differences accompanied by the transition if polypeptides contain different kinds of functional group. Therefore, poly(L-norvaline) was chosen in order to obtain the information to interpret the chemical shift differences more clearly and has also investigated the conformation by means of ^1H -nmr, ^{13}C -nmr and ORD.

The transition region was found at 15-30%(v/v) F_3AcOH in the $\text{F}_3\text{AcOH}/\text{CDCl}_3$ mixtures from the chemical shifts of α -CH proton and of all of carbons, and b_0 values. In the coiled region, α -CH and NH protons, and all carbons demonstrate almost linearly downfield shift and in the helical region the dependence of the chemical shifts on the solvent composition is much the same as the former except NH proton. As the region which demonstrates a drastic change in chemical shift is almost the same as the region obtained from ORD measurement, this region is exactly derived from the helix-coil transition.

NH proton demonstrates a large upfield shift at the region of 5-15%(v/v) F_3AcOH . Recently, E.M. Bradbury et al. reported the evidence of the hydrogen bonding between F_3AcOH and the peptide group of helical poly(L-alanine). The behavior of the chemical shift of NH proton also suggests the occurrence of the solvation to the backbone of helical polymer. Linearly downfield shift found in the helical region and the coiled region may be derived from the electric field effect.

The chemical shift differences accompanied by the helix-coil transition have some regularity similar to the previous results:

1. The signs of the chemical shift differences alternate along the side chain, C^α , C^β and C^γ .
2. The magnitudes of the chemical shift differences gradually decrease along bonds from C^α to C^δ .

From this result, conformational changes (including the breakdown of the intrahydrogen bonding) and the interaction between F_3AcOH and the peptide group accompanied by the helix-coil transition affect even the chemical shift difference up to C^γ or C^δ .

^{13}C NMRによるポリペプチドのコンフォメーション(その1)
塩基性ポリペプチドの Salt-induced Helix-Coil 転移

(国立がんセンター研) 齊藤 肇, 大木豊和, 児玉昌考, 永田親義

(1) はじめに

ポリペプチドのヘリックス・コイル転移は, (1)側鎖のイオン化状態の変化にもとづく転移, (2)溶媒組成の変化によるもの, (3)測定温度変化によるもの, (4)中性塩の存在によって誘起されるもの, などがある。ヒストンなどのたん白のコンフォメーション変化が中性塩の存在によって誘起されることを考えると, たん白モデルとしてのヘリックス・コイル転移の研究は(4)の場合がもっとも実際の系に近いことが明かである。さらに, (1), (2)の場合, コンフォメーション変化にもとづく ^{13}C NMRピークの変化は, イオン化状態, 溶媒効果にもとづく変化を分離しにくい^{1,2)}ために, たん白質への適用には十分注意を払う必要がある。本研究のねらいは, (1)ヘリックス構造の ^{13}C 化学シフトの決定, (2)aggregationの存在しない条件での, 主鎖および側鎖の動的構造, に関するデータを得ることにある。このため, $(\text{Lys})_n$, $(\text{Arg})_n$, $(\text{Orn})_n$ の salt-induced ヘリックスコイル転移の研究を ^{13}C NMRを用いて行った。

(2) 実験方法

用いた塩基性ポリペプチドはいずれもシグマ製で, $(\text{Lys})_n$: M.W. 22,000, $(\text{Arg})_n$: M.W. 60,000, $(\text{Orn})_n$: M.W. 44,000である。中性塩 NaClO_4 , KSCN , NaCl を 100 mg/ml 重水溶液に適宜加えていた。 ^{13}C NMRの測定はJEOL PFT-100 スペクトロメーターによった。

(3) 実験結果と考察

A. ヘリックス構造の ^{13}C 化学シフト

図1に示すように, $(\text{Lys})_n$ に NaClO_4 , KSCN を添加してゆくと, $\text{C}\alpha$, $\text{C}=\text{O}$ の ^{13}C シフトは低磁場側に移行し, $\text{C}\beta$ は高磁場側にずれる。これらのピークの挙動は添加するイオンの種類によって異なるものの, 高イオン濃度で一定の値に近づくことがわかる。このときのコンフォメーションは, ORD, IR, ラマンスペクトルの³⁾研究から, α ヘリックスであることが報告されている。中性状態で α ヘリックスへの転移があるのは, ClO_4^- , SCN^- イオンが ϵ -アミノ基の正電荷と部分的にシヤヘイするために, 静電発散をランダムコイルとするのをさまたげるからである。後述の通り

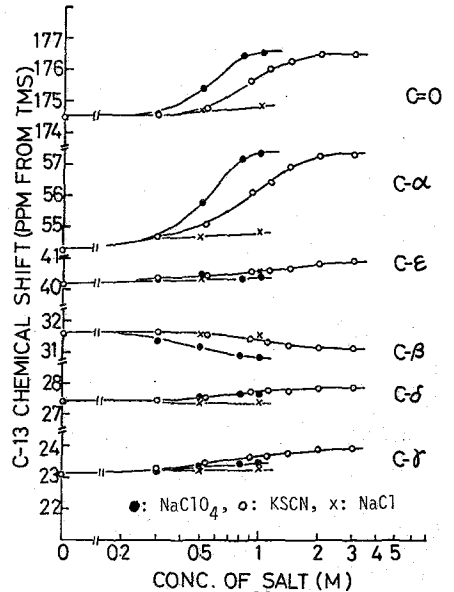


Figure 1. Variation of the ^{13}C chemical shifts of $(\text{Lys})_n$ against the concentration of salts.

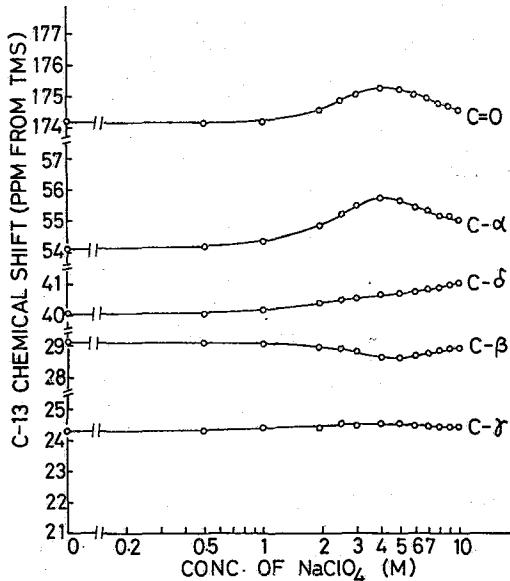


Figure 2. Variation of the ^{13}C chemical shifts of $(\text{Orn})_n$ against the concentration of NaClO_4 .

うに、 ^{13}C シフトの変化に対応して、 T_2 , N の E 値の減少がみられることから、コンフォメーション転移が支持される。なお、モノマーに全く前述の ^{13}C シフトの変化がみられない。(Arg) $_n$ の場合も全く同様の変化がみられるが、 0.5M NaClO_4 で完全に α -ヘリックスに転換する。しかしこの時には (Lys) $_n$ と違って、aggregation がみられ、沈殿が生じてくる。図2は (Orn) $_n$ の ^{13}C NMR ピークの NaClO_4 濃度との関係を示したものであるが、(Lys) $_n$, (Arg) $_n$ とは違って、 4M NaClO_4 で最大の変化がみられるものの、シフトの変化は高いイオン濃度で逆もどりしてしまう。これは (Orn) $_n$ の α -ヘリックスが安定でなく、高いイオン濃度でヘリックス構造が壊れるためである。この挙動はすでに、ORD でも認められている。表1にランダムコイル状態および最大のヘリックス含有量をもつ状態の ^{13}C NMR ピークおよびそのシフト差をまとめた。100% α -ヘリックスに転換する (Lys) $_n$, (Arg) $_n$ の ^{13}C ピーク変化は、 $C_\alpha: -3.1$, $C_\beta: 0.6$, $C=O: -2.0-2.4$ PPM と側鎖の種類、塩の種類と向わず一定の値を示している。このことは、少なくとも C_α , $C=O$ の ^{13}C シフトの変化からヘリックス含有量が推定できると示す。

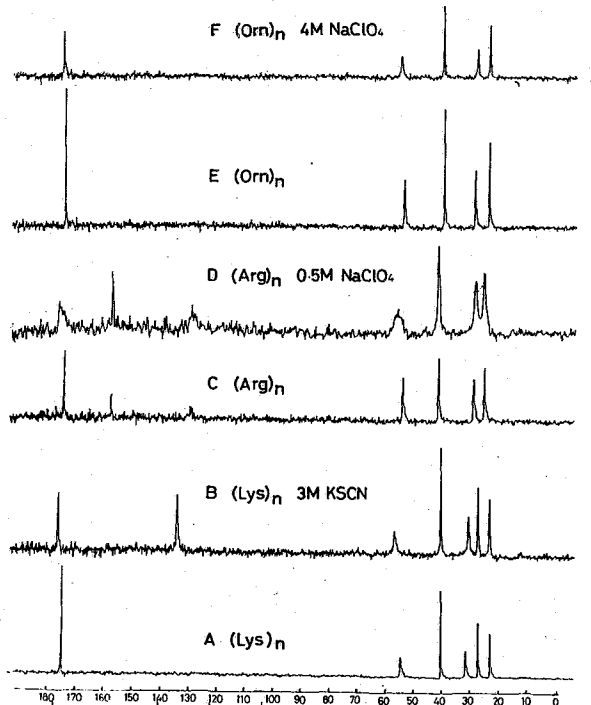


Figure 3. ^{13}C NMR spectra of basic polypeptides both in the helix and random-coil conformation (pD 7). A, C and E: random-coil. B, D and F: helix form.

Table I. ^{13}C chemical shifts of salt-induced helix-coil transition (ppm from TMS)

	$(\text{Lys})_n$			$(\text{Arg})_{nn}$		$(\text{Orn})_n$	
	Random coil (No salt)	Helix 1 M NaClO_4	Helix 3 M KSCN	Random coil (No salt)	Helix 0.5 M NaClO_4	Random coil (No salt)	Helix ^a 4 M NaClO_4
C- α	54.3	57.4(-3.1)	57.4(-3.1)	54.3	57.1(-2.8)	54.1	55.7(-1.6)
C- β	31.5	29.9(+0.6)	31.2(+0.5)	29.4	28.9(+0.6)	29.1	28.6(+0.6)
C- γ	23.1	23.4(-0.3)	23.9(-0.8)	25.5	25.9(-0.4)	24.3	24.5(-0.2)
C- δ	27.4	27.6(-0.2)	27.9(-0.5)	41.7	42.0(-0.3)	40.0	40.6(-0.6)
C- ϵ	40.2	40.4(-0.2)	40.9(-0.7)	157.7	157.9(-0.2)		
C=O	174.5	176.5(-2.0)	176.5(-2.0)	174.4	176.8(-2.4)	174.2	175.3(-1.1)

^a Helical content estimated 50%. ^b Difference of the ^{13}C chemical shifts between the random-coil and helix forms.

峻している。C α , C=Oの上記のシフト変化を Δ , ヘリックス含有量を f , 任意の濃度での化シフトの変化 δ の間には, $\delta = f \cdot \Delta$ の関係が成立することは明かである。この関係式から (Orn)_n の最大ヘリックス含有量を計算すると, 4M NaClO₄ で約50%になり, ORDの結果と一致する。

B. ヘリックスにおける主鎖側鎖の動的構造

図3に示すように, (Arg)_n以外のヘリックス状態の線中はきわめてシャープであり, アルカリ領域で生成するヘリックスの場合と異なって, aggregationの影響がきわめて小さいことがわかる。実際, 図4のT₁と塩濃度の関係を見ると, 化シフトの変化(図1)に対応してT₁の減少が見られるものの, pH変化から見たT₁の減少にくらべて変化がきわめてゆるやかである。特にその差異は側鎖の末端部分(C ϵ , C δ)に著しいことがわかる。これは, KSCN, NaClO₄存在下で生成する α ヘリックスの場合, 側鎖の末端にあるアミノ基の正電荷が, これらのアミノ基は十中中和され, 静電効果は α ヘリックス同士のaggregationを促進するためと解釈できる。T₁, T₂, NOEから求めた主鎖および側鎖の等方的回転運動としての相関時間と長さに与えた。ここで, τ_s , τ_b をそれぞれ側鎖, 主鎖の相関時間として,

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_s} + \frac{1}{\tau_b}$$

の関係から両者と分離した。 α ヘリックスとランダムコイルの間には主鎖の相関時間に著しい差があるものの, aggregationが存在しない状態の側鎖にはそれほど差がみられず, α ヘリックスにおける側鎖は自由回転運動がゆるぎされていることがわかった。(Arg)_nのヘリックスは図3Dからわかるようにステップがナロードで, 側鎖向のaggregationが起っており, 中性塩存在下でも側鎖の運動により全合率効が異なることはいうまでもない。

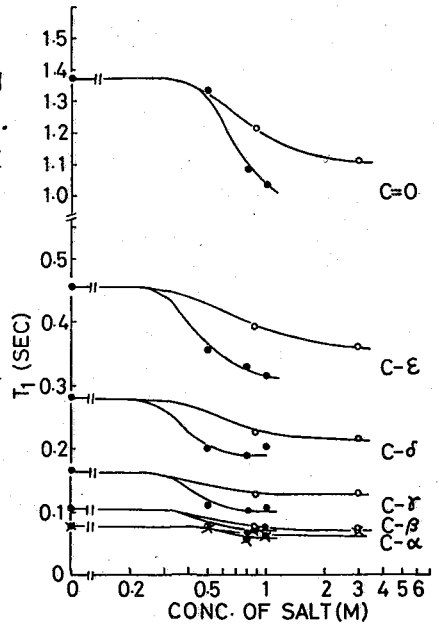


Figure 4. Variation of the spin-lattice relaxation times of (Lys)_n against the concentration of neutral salts. ● C β -C ϵ , ■ C α : NaClO₄, ○ C β -C ϵ , ✖ C α : KSCN.⁴

Table 2. Calculated correlation times of the motion of backbone and side-chain in (Lys)_n (nsec)

Backbone		Random-coil	Helix	
			3 M KSCN	1 M NaClO ₄
C α	from T ₁	0.66 (22) ^d	17 (0.9) ^b	16 (1) ^{b, 4}
	from T ₂	0.5	12	24
	from NOE	0.9	-	3.6
Side-chain (from T ₁)				
C β		0.33	0.32	0.32
C γ		0.18	0.19	0.23
C δ		0.095	0.11	0.12
C ϵ		0.054	0.064	0.073

^a Low-temperature side ^b High-temperature side

(1) H. Saitô and I. C. P. Smith, Arch. Biochem. Biophys., **158**, 154 (1973)

(2) H. Saitô and I. C. P. Smith, ibid., **163**, 699 (1974)

(3) J. M. Rifkind, Biopolymers, **8**, 685 (1969)

(4) P. C. Painter and J. L. Koenig, ibid., **15**, 229 (1976)

A ^{13}C NMR Study of Conformation of Polypeptides. Part I. Salt-Induced Helix
Coil Transition of Basic Polypeptides

Hazime Saitô, Toyokazu Ohki, Masahiko Kodama and Chikayoshi Nagata
Biophysics Division, National Cancer Center Research Institute, Tsukiji
5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104

A ^{13}C NMR study of the salt-induced helix-coil transition of the basic polypeptides, poly-L-lysine, poly-L-arginine and poly-L-ornithine, was performed to serve for a reference of the helical portion of histones and other proteins. As is the case of pH-induced helix-coil transition, the downfield displacement of the $\text{C}\alpha$ and carbonyl carbon signals is observed in the helical state. The upfield shift of the $\text{C}\beta$ signals, on the other hand, is noted in the salt-induced transition. Regardless of the varieties of the side-chains and also the salt used, very similar helix-induced chemical shifts are obtained for $(\text{Lys})_n$ and $(\text{Arg})_n$. However, the displacement of the $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ and carbonyl carbons of $(\text{Orn})_n$ in the presence of 4M. NaClO_4 is found to be almost half of those of $(\text{Lys})_n$ and $(\text{Arg})_n$. This is explained by the fact that the maximum helical content is about 50%, consistent with the result by the optical rotary dispersion. Further, the motion of the backbone and side-chains of the helical form was estimated by measuring the spin-lattice relaxation time (T_1), nuclear Overhauser enhancement (NOE) and line-width. In the case of $(\text{Lys})_n$, the motion of the side-chain is very little changed in comparison with that of the random-coil conformation, indicating that the aggregation of the salt-induced helix is small in contrast to that of the pH-induced helix. For $(\text{Arg})_n$, however, the precipitate of the helical polymers occurs, mainly due to the aggregation.

^{13}C NMRによるポリペプチドのコンフォメーション(その2)。アミノ酸共重合体 $(\text{Lys}^{50}\text{Tyr}^{50})_n$, $(\text{Lys}^{50}\text{Phe}^{50})_n$ の中性塩存在下における aggregation 挙動

(国立がんセンター研) 斎藤 尊, 大木豊和, 児玉昌彦, 永田親義

(1) はじめに

その1で, 中性塩の存在下でのヘリックス生成により, $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$, $\text{C}=\text{O}$ ピークの変化と, 主鎖, 側鎖の T_1 , T_2 , NOE 変化をくわしく述べた。実際のたん白, とくにヒストンの folding)には側鎖の荷電の中性塩による Shielding の他に, 塩基性残基以外の残基間の水素結合, 疎水結合が重要な役割をはたしていることはいままでのまじない。特に, 疎水的な残基間の相互作用一帯にこれらの残基がヘリックス構成にある場合一が分子間の aggregate に関与するであろうからである。ここでは, このような状態の最も簡単なモデル系として, リジンとチロシン, リジンとフェニルアラニンの 1:1 ランダム共重合体, それぞれ $(\text{Lys}^{50}\text{Tyr}^{50})_n$, $(\text{Lys}^{50}\text{Phe}^{50})_n$ のコンフォメーションと中性塩添加による影響を調べた結果を報告する。NaCl, NaClO₄ を添加したことで, ^{13}C NMR ピーク強度が変化し, 特に Tyr, Phe 残基によるピーク強度が著しく減少することがわかった。これらの共重合体は, 中性塩添加によってヘリックス含有量が増加することが, CD スペクトルの測定からすでに報告されており¹⁾, ^{13}C ピークの減少は明らかに Phe, Tyr 残基間の疎水的な相互作用によることが結論される。

(2) 実験方法

アミノ酸共重合体 $(\text{Lys}^{50}\text{Tyr}^{50})_n$, $(\text{Lys}^{50}\text{Phe}^{50})_n$ は Miles-Yeda 製品をそのまま用いた。 ^{13}C 測定濃度は, 通常 40 mg/ml であった。 ^{13}C および ^1H NMR の測定には, 日本電子 PFT-100 スペクトロメーターを用い, 化学シフトは TMS 基準で表わした。

(3) 実験結果と考察

図1に, 10 mg/ml の濃度で測定した共重合体の ^1H NMR スペクトルの NaCl 濃度依存性を示す。NaCl が存在しないときの各ピークの面積強度は, 仕込み量から期待される値に一致している。NaCl 量と上げると, Tyr,

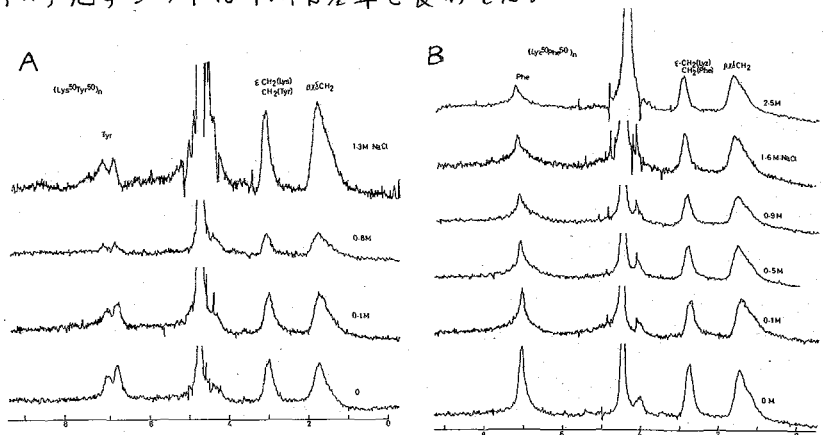
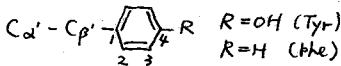


Figure 1. NaCl-induced Change of ^1H NMR spectra of $(\text{Lys}^{50}\text{Tyr}^{50})_n$ (A), and $(\text{Lys}^{50}\text{Phe}^{50})_n$ (B), 10 mg/ml

および Phe プロトンシグナル強度が著しく減少することがわかる。Tyr, Phe の芳香族ビークは, Lys の β, δ, ϵ -CH₂ ビークを基準にして, $(Lys^{50}Tyr^{50})_n$: 76% (0.1M NaCl), 46% (0.8M NaCl), $(Lys^{50}Phe^{50})_n$: 87% (1.6M NaCl), 52% (2.5M NaCl), のように変化している。これは明らかに, Tyr, Phe 残基が α ヘリックスを介してセグメントに分布し, これらのセグメント側鎖の珠水の相互作用によって, 一種の "cross-link" を作るために, セグメントの分子運動が妨げられてビーク強度が減少するものと解釈される。上記の事を確認するために, NaCl, NaClO₄ 存在下での ¹³C NMR の測定を行った。

図2, 図3はそれぞれ, $(Lys^{50}Tyr^{50})_n$, $(Lys^{50}Phe^{50})_n$ の ¹³C NMR スペクトルで, NaCl 添加の場合を示している。NaClO₄ の場合も定性的にはスペクトルパターンの変化は同じであるが, ビーク強度の変化はほぼ完全に塩濃度で起こる。¹³C NMR は, Lys, Tyr, Phe 残基について分離がよく, 帰属はキヤート上に可通りである。Tyr, Phe の C α , C β はそれぞれ, α' , β' で表わし, 芳香族部位は



として示す。表1に各ビークの T₁, NOE 値を与えてある。表1の NOE 値を考慮して, 図2, 図3の $\alpha, \alpha', \beta, \beta'$ ビーク強度と比較すると, $(Lys^{50}Tyr^{50})_n$ の 50%, $(Lys^{50}Phe^{50})_n$ の 30% 程度のビークが中性塩が存在しない時でもすでに消滅していることがわかる。イオン強度上昇とともに, α', β' ビークが完全に消滅して(図2, 図3)。もちろん, これにともなって, 芳香族ビーク強度も減少するのが見られるが, NaCl に関しては $(Lys^{50}Phe^{50})_n$ はその程度があまり著

Table I. Spin-lattice relaxation times (T₁'s) and Nuclear Overhauser Enhancements of $(Lys^{50}Tyr^{50})_n$ and $(Lys^{50}Phe^{50})_n$

	NT ₁	$(Lys^{50}Tyr^{50})_n$			$(Lys^{50}Phe^{50})_n$	
		No Salt		0.1 M NaCl	0.8 M NaCl	No Salt
		NOE	NOE	NOE	NOE	NOE
Lys	α	109	2.1	2.3	-	2.1
	β	220	1.9	2.1	1.9	2.3
	δ	376	2.4	2.4	2.7	2.6
	ϵ	584	2.4	2.3	3.0	2.5
	ϵ	922	2.5	2.9	3.0	2.5
Tyr	α'	78	1.4	1.2	-	1.9
	β'	76	1.4	-	-	1.4
	3	125	2.1	2.2	2.5	1.8
	2	127	1.7	1.9	1.8	2.1
	1	564	1.5	1.7	-	1.4
	4	880	1.3	1.7	-	1.5
C=O	878	1.3	1.4	1.4	1.5	

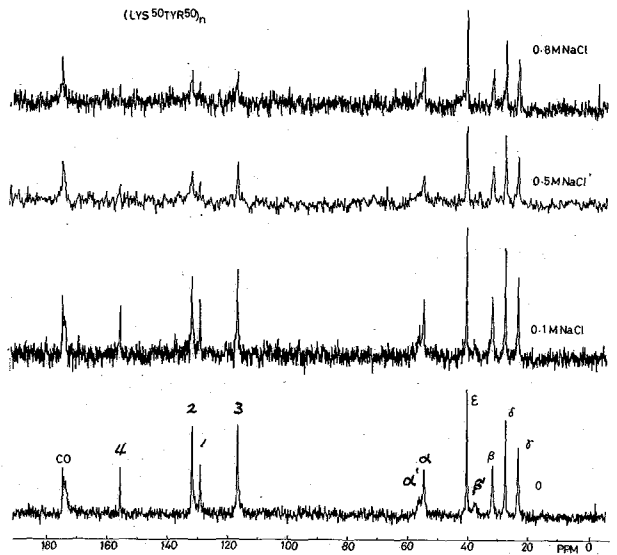


Figure 2 ¹³C NMR Spectra of $(Lys^{50}Tyr^{50})_n$

るしくない。その上で明らかにしたように、 α ヘリックスが生成されると、 $C\alpha$, $C\beta$, $C=O$ それぞれ、 -3.1 , $+0.6$, -2.0 ppm のシグナルのずれが認められるはずであるが、図2, 図3ではいずれのピーク位置もイオン強度0の場合の値に一致する。このことは、ヘリックス由来のピークが全く消滅していることを示している。実際、表1のNOE値はLys残基に因する限りイオン強度にかかわらずランダムコイル状態の値を示している。したがって、 ^{13}C NMRピークの消滅挙動は、 α ヘリックス生成にともなった aggregation に係ることができよう。その上で述べたま

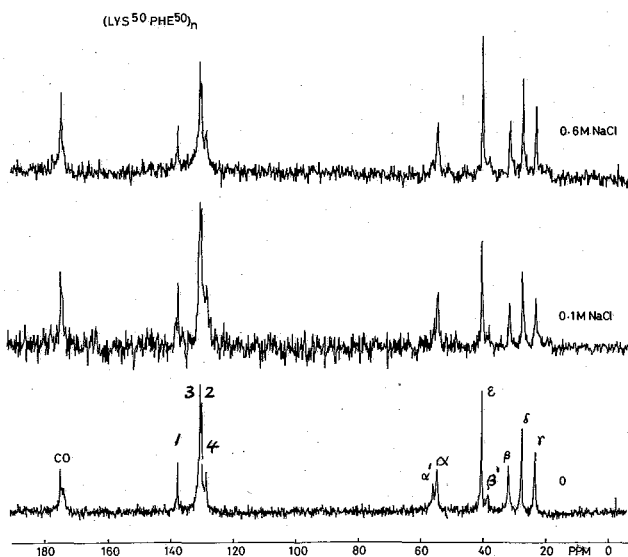


Figure 3 ^{13}C NMR Spectra of $(Lys^{50}Phe^{50})_n$

うに、中性塩添加にともなうヘリックスは、側鎖の正電荷が十分にしゃへいされているため、静電反発効果で aggregation がみられにくい。しかしながら、Tyr, Phe を 50% 近く共重合体では、これらの残基向のたとえはスタッキングのような疎水の相互作用でヘリックス構造の安定化-aggregation がみられるのである。

(図4)。このような分子間の aggregation の存在は、試料濃度に依存するであろうことは想像に難くなく、実際 10 mg/ml で測定を行なった 1H NMR では塩濃度ゼロの条件でピークロスが全くなく、40 mg/ml の ^{13}C NMR では $(Lys^{50}Tyr^{50})_n$ で 50%、 $(Lys^{50}Phe^{50})_n$ で 30% のそれぞれ Tyr, Phe 残基のピークロスがみられている。さらに、 $C=O$ ピークとくわしく見ると、Lys-Lys, Lys-Tyr(Phe), Tyr-Tyr (Phe-Phe) のシーケンスのうち、イオン強度を上げたときに影響をうけやすいのは Lys-Lys であることから上記の考えが支持される。

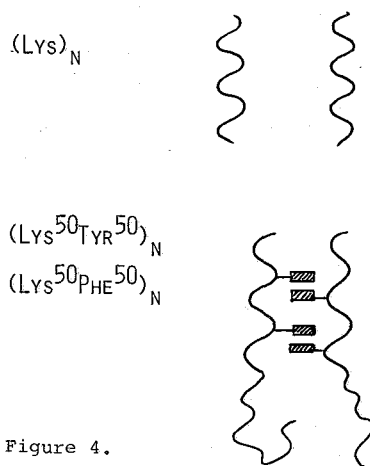


Figure 4.

Aggregation of $(Lys^{50}Tyr^{50})_n$ and $(Lys^{50}Phe^{50})_n$

その上で述べたホモポリペプチドの場合、NaCl, NaClO₄ でヘリックスの安定性に著しい差がみられたが、疎水の残基と多量にふくむ共重合体では、安定性に程度の差はあるものの、同様のしゃへい効果がみられると考えてよいことがわかった。

(1) R. M. Santella and H. J. Li, Biopolymers, 13, 1909-1926 (1974)

(2) G. Seipke, H.-A. Arfmann and K. G. Wagner, *ibid.*, 13, 1621-1633 (1974)

A ^{13}C NMR Study of Conformation of Polypeptides. Part II. Aggregation of Copolymers, $(\text{Lys}^{50}\text{Tyr}^{50})_n$ and $(\text{Lys}^{50}\text{Phe}^{50})_n$, in the Presence of Neutral Salts

Hazime Saitô, Toyokazu Ohki, Masahiko Kodama and Chikayoshi Nagata

Biophysics Division, National Cancer Center Research Institute, Tsukiji 5-chome
Chuo-ku, Tokyo 104

As a simple model of the aggregation of histones in the presence of neutral salts, a ^{13}C NMR study of copolymers involving hydrophobic segments, $(\text{Lys}^{50}\text{Tyr}^{50})_n$ and $(\text{Lys}^{50}\text{Phe}^{50})_n$ was performed. It is observed that signal amplitude of Tyr and Phe residues decreases with increasing concentration of neutral salts, NaClO_4 or NaCl . It is already pointed out that the helical content increases with the salt-concentration. Therefore, it is concluded that the change of peak-height with concentration of salts is caused by the aggregation of the helical segments through hydrophobic interaction between side-chains. This situation is quite contrasting to the case of $(\text{Lys})_n$ in the presence of the neutral salt, in which the displacement of the ^{13}C signals is clearly seen as a result of random-coil to helix transition (see Part I). It is likely that the molecular motion at the "cross-links" due to the hydrophobic interaction such as stacking interaction between aromatic residues at the side-chains is too slow to afford the high-resolution ^{13}C resonances. In the present case, NMR-visible portion is clearly ascribed to the random-coil conformation, since no displacement of the ^{13}C resonance is noted in the presence of salts.

(東工大工) 朝倉祐 神尾優 長谷川隆 西岡篤夫

I. 緒言

従来、ポリ-L-アラニンの α -CH プロトン化学シフトが、 CDCl_3 -TFA 溶媒系でヘリックス-コイル転移に伴ない、0.4 ppm 程低磁場にシフトすることが観測されてきたが、著者らはヘリックス-コイルの二状態について分子内シマヘイ効果のみを考慮してその化学シフトを理論的に評価した結果、シフト差は殆んど生じないことから、この観測されたシフト変化は、主にコイル状態のポリマー鎖が、TFA 分子から強い溶媒効果をうけることに起因すると示唆してきた。¹⁾

その溶媒効果を実験的に検討するために、化学シフトの理論的計算の際に、ポリ-L-アラニンのコイルモデルとして用いた *N*-アセチル-L-アラニンメチルアミド (Ac-Ala-NHMe) 分子の NMR スペクトルを種々の溶媒中で測定することを試みた。前回、 CDCl_3 及び DMSO 中でこの分子の ^1H 及び ^{13}C -NMR スペクトルを測定し、主にこの分子の分子間会合について検討してきた。²⁾ 今回は、ポリ-L-アラニンのヘリックス-コイル溶媒である CDCl_3 -TFA 溶媒中で Ac-Ala-NHMe の ^1H 及び ^{13}C -NMR を測定し、特にペプチド単位と TFA 分子との溶媒効果について検討した。

II. 実験

Ac-Ala-NHMe 及び *N*-アセチル-L-アラニンメチルエステル (Ac-Ala-OMe) は、前回、合成した試料であり²⁾、 CDCl_3 、TFA 及び TFA- d (^{13}C -NMR の場合の溶媒) は、市販のものを用いた。測定は、JEOL PS-100 及び JEOL PMX-60 を用いて行ない、 ^1H 及び ^{13}C -FT の場合、PS-100 に各々 ^1H 及び ^{13}C -FT ユニットをつけて行なった。NMR 化学シフトは、体積磁化率の補正を行なった後、TMS から低磁場に ppm で表わした。

III. 結果と議論

Ac-Ala-NHMe を含む CDCl_3 -TFA 溶媒中において、TFA 酸プロトンのピークは、酸濃度が増加するにつれて、最初低磁場にシフトするが、更に増加すると、逆に高磁場にシフトする。そしてアミドと TFA のモル比が、約 1:2 の所 (例えば試料濃度が 5%)

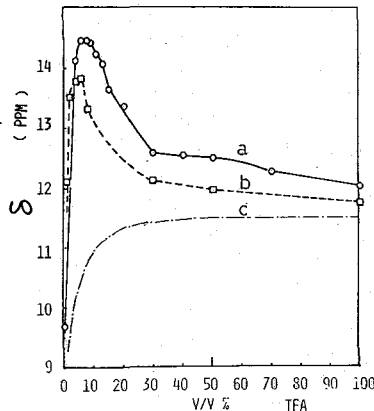


Fig. 1 ^1H chemical shift of the acid proton as a function of TFA concentrations in Ac-Ala-NHMe-TFA- CDCl_3 mixtures.

- a) 10% Amide-TFA- CDCl_3
 b) 5% Amide-TFA- CDCl_3
 c) TFA- CDCl_3 ³⁾

あさくらてつお かみおまさる はせたわたかし にしおがあつお

の場合、TFA組成は約5%の所)で、その化学シフトの値は最大となる (Fig. 1)。アミドを含まない $CDCl_3$ -TFA 溶液中では、酸プロトンのピークは、酸濃度が増加するにつれて初め低磁場シフトするが、その後一定になるので、(Fig. 1 c³)、Ac-Ala-NHMe を含む系における酸プロトンの挙動は、このアミドとTFA分子が、1:2のモル比で強い相互作用をしていることを示唆している⁴⁾。この時、酸プロトンの半値中は酸濃度が増加するにつれて急激に減少するが、このアミドとTFA分子が1:2のモル比の近傍で若干増加し、その後一定になる傾向がある(試料濃度が10%の場合、その傾向は若干異なる) (Fig. 2)。

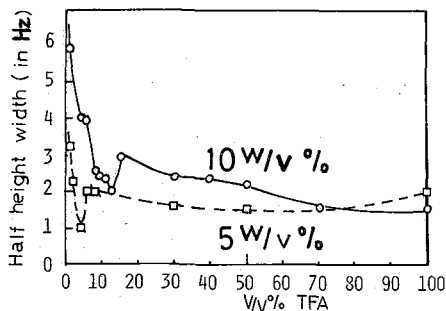


Fig. 2 Half height width (in Hz) of the acid proton in Ac-Ala-NHMe-TFA- $CDCl_3$ mixtures.

次に Ac-Ala-NHMe の α の NH プロトンの化学シフトの酸濃度依存性を検討する。(Fig. 3) NH- CH_3 基の NH プロトンは、酸濃度の増加につれて、初め低磁場シフト、次に高磁場シフト、更に再度、低磁場シフトする。一方、Alanyl NH プロトンは、アミドとTFA分子のモル比が1:2の近傍で若干フラットになる傾向はあるが、概ね、低磁場にシフトする。この結果は、アミド分子とTFA分子が溶媒和を形成することにより、その分子間会合 (NH- CH_3 基の NH プロトンが会合に関与)²⁾ が切れていく過程を反映していると考えられる。NH プロトンの場合と同様に、二種類の C=O カーボンの化学シフトの酸濃度依存性もお互いに著しく異なっている。(Fig. 4) すなわち、Acetyl C=O のピークは、酸濃度の増加につれて、初め若干低磁場にシフトするが、その後一定となる。一方、Alanyl C=O のピークは、全酸濃度範囲で一様に著しく低磁場シフトする。従って、Alanyl C=O は、TFA 分子による溶媒効果を強くうけていることがわかる。更に、Ac-Ala-OMe 分子についても同様に $CDCl_3$ -TFA 溶媒系でその NMR スペクトルを測定した結果、

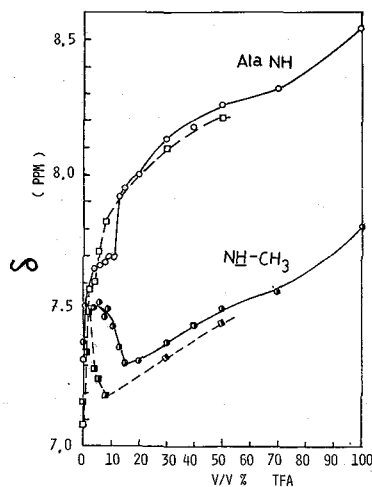


Fig. 3 1H chemical shift of two kinds of NH protons in Ac-Ala-NHMe at 10 w/v% (O or \circ) and at 5 w/v% (\square or \square), respectively as a function of TFA concentrations in Ac-Ala-NHMe-TFA- $CDCl_3$ mixtures.

Alanyl 基の個々のプロトン及びカーボンの化学シフトは、Ac-Ala-NHMe の Alanyl 基の場合と同様の酸濃度依存性を示した。Ac-Ala-OMe では、アミドの NH- CH_3 基の NH グループが O 原子にかわっているので、Ac-Ala-NHMe とは異なる形態の分子間会合を形成するが²⁾、中央の Alanyl 残基の NMR 化学シフトの酸濃度依存性が概ねかわらないことは、アミド-アミド間の分子間会合の相互作用は、TFA 分子と Alanyl 残基の相互作用に比

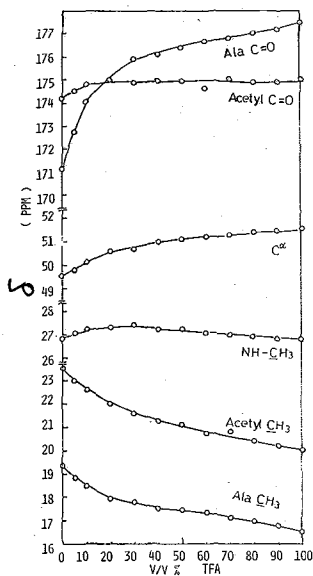


Fig. 4 ^{13}C chemical shift of AC-Ala-NHMe at 10 w/v% as a function of TFA concentrations in Ac-Ala-NHMe-TFA(d)- CDCl_3 mixtures.

較して弱く、度々Alanyl残基のNHとC=O基がTFAとの水素結合に主に関与することを示唆している。

以上の結果を総合して、二量化したTFA分子が、Ac-Ala-NHMe分子のAlanyl NHとC=O基を通して、溶媒和したモデルを提出した。(Fig. 5)

更に、この分子のC=Oカーボンの緩和時間を、TFA- CDCl_3 溶媒系で測定したところ、二種類のC=Oカーボンの値は、実験誤差内でお互いに差がなく、TFA濃度が10%の所まで急激に減少するが、それ以上の酸濃度の所ではゆるやかに減少するという結果を得た。(Fig. 6) これは、化学シフトの情報から得られたAc-Ala-NHMe分子とTFA

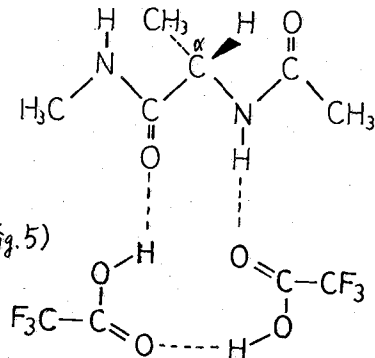


Fig. 5 The "solvation" model

分子が1:2のモル比で強く相互作用しているという示唆を、動的な緩和時間の情報から支持したと言える。

以上のように、ポリペプチド鎖は、 $\begin{matrix} \text{C}^\alpha \\ | \\ \text{C} \\ || \\ \text{O} \\ | \\ \text{H} \end{matrix} \text{N}$ を

基本単位としてTFA分子から溶媒効果をうけている

可能性を示唆している。しかしながら、このアミドの化学シフトの挙動を、TFA- CDCl_3 溶媒系におけるポリ-L-アラニンの化学シフトの挙動と比較すると、NH及び $\alpha\text{-CH}_2$ プロトンの挙動に異なる点もあり、度々より高次のオリゴマーについて、今後、同様の研究を進める必要がある。

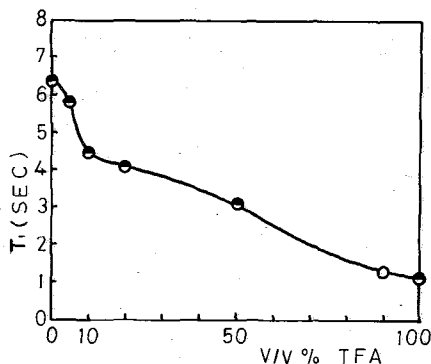


Fig. 6 Spin-lattice relaxation time of two kinds of C=O carbons in Ac-Ala-NHMe at 10 w/v% as a function of TFA concentrations in Ac-Ala-NHMe-TFA(d)- CDCl_3 mixtures.

References

- 1). T. Asakura, I. Ando and A. Nishioka, Makromol. Chem., **178**, 1111 (1977), *ibid.*, **178**, 1521 (1977).
- 2). 朝倉, 神尾, 西周, 日本化学会第36春季年会講演要旨集 R489 (1977)
- 3). E. Brosio, M. Delfini, A. De paolis, M. Paci and F. Conti, Biopolymers, **13**, 745 (1974).
- 4). a). W. E. Stewart, L. Mandelkern and R. E. Glick, Biochemistry, **6**, 150 (1967).
b). J. W. O. Tam and I. M. Klotz, Spectrochim. Acta, **29A**, 633 (1973).

Solvent Effect on the NMR Spectra of N-acetyl-L-alanine methylamide
as the Model Compound for Poly(L-alanine)

Tetsuo Asakura, Masaru Kamio, Takashi Hasegawa and Atsuo Nishioka
Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology,
12-1 Ookayama, 2-Chome, Meguro-ku, Tokyo, JAPAN

Abstract ;

^1H and ^{13}C -NMR spectra of N-acetyl-L-alanine methylamide (Ac-Ala-NHMe) are measured in solvent mixtures trifluoroacetic acid / deuteriochloroform (TFA / CDCl_3) to discuss aspects of the peptide unit-solvent interaction uncomplicated by polypeptide chain effect.

The maximum displacement in the acid proton peak of TFA occurs at very nearly an acid / Ac-Ala-NHMe molar ratio of 2 and this strongly suggests a 1 : 2 amide-acid interaction. As the active sites of Ac-Ala-NHMe hydrogen bonded with TFA molecules, a pair of C=O and NH groups of the alanyl residue is considered on the basis of the spectral behaviors of two kinds of NH protons and also, those of two kinds of C=O carbons. Moreover, the ^1H and ^{13}C -NMR peaks of the corresponding alanyl residue of N-acetyl-L-alanine methylester behave in the same manner as those of Ac-Ala-NHMe as the TFA composition is changed, although the configurations of the associated states of these molecules are different from each other. This means that the interaction between the alanyl residue and TFA is far stronger than that of the amide-amide interaction. On the basis of these results, the "solvation" model that the dimerized TFA molecules hydrogen bond with a pair of C=O and NH groups of the peptide unit is proposed. Other spectral data supporting this suggestion are given from the variations of the half height width of the acid proton and also, of the spin-lattice relaxation time of two kinds of C=O carbons of Ac-Ala-NHMe with solvent composition.

出光興産中研 佐藤和夫

1 序論

生体関連物質と水との相互作用および生体組織内における水分子の構造、および動的特性は生体内での水の役割と各組織の機能発現と関連して近年注目をあびており、その解明は一つの重要な課題となっている。組織そのものを研究の対象とすることは望ましくその方向の研究も増大しているが、系が複雑であって明確な知見を得ることの困難なことも少なくない。本研究ではオリゴペプチドおよびタンパク質の単純な系を用い、水溶液中での水とペプチドとの相互作用、水の動的挙動を、 T_1 、 T_2 および自己拡散係数の測定から検討した。オリゴペプチドとしては酸化型および還元型のグルタマオン (Glu) を、タンパク質としては牛血清アルブミンを用いた。

またアルブミンの熱変性にともなう水の動的挙動の変化についても検討した。

2 実験

用いた装置はブルツカ-P-2C (H: 20MHz) パルスNMR スペクトロメータである。 T_1 の測定は 180° - T - 90° 法、 T_2 は Carr-purcell-Meiboom-Gill 法による。 90° パルス中は約 $5 \mu\text{sec}$ であり、AUTO T_1 エニットおよび Box Car Integrator を用いて相積波によって検出した。自己拡散係数 D_e は Hahn の スピンエコー法によって求めた。磁場勾配 G は、 25°C で得られた Hazlewood¹⁾ の値 $2.51 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$ を用いて逆算し、 150mg/cm^3 と決定した。得られた G を用いて各温度で測定した水の D_e の値を示す。() 内の値は Hazlewood の結果である。 35°C - 3.3 (3.2), 45°C - 3.7 (3.4), 56°C - 5.5 (5.3) $\times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$ 。本装置によって決定した D_e の値には十分信頼があると考えられる。なおダイオード検波による FID の形がバツセル周波数型であることから測定試料の範囲内で勾配は linear であると言える。

用いたグルタマオン (Glu) およびアルブミン (Alb) はそれぞれ東京化成工業、シグマ社製のものである。水溶液の pH は中性である。

3 結果と考察

3-1 濃度依存性

図1に Alb 水溶液の水プロトンの T_1 , T_2 , D_e の濃度依存性を示す。いずれも濃度とともに変化し、Alb との相互作用で水分子の運動が束縛されていることを示すものである。 T_2 と T_1 は高分子溶液に一般的に結果であり、巨大分子との相互作用により水分子の相関時間の分布が変化し大きな束縛を受けた成分が存在するためと考えられる。

さとうかずお

水分子の T_1 は一般に次式のように表現できる。

$$\begin{aligned} (T_1^{-1})_{obs} &= (T_1^{-1})_{intra} + (T_1^{-1})_{inter} \\ &= \frac{3}{2} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r_0^6} \tau_c + \frac{N \pi \gamma^4 \hbar^2}{5 a D_t} \left[1 + 0.233 \left(\frac{b}{a} \right)^2 \right. \\ &\quad \left. + 0.15 \left(\frac{b}{a} \right)^4 + \dots \right] \quad (1) \end{aligned}$$

各パラメータは図12は講演E-2を参照されたい。(1)式を用いれば、 D_t の値から $(T_1)_{inter}$ を求め、 $(T_1)_{obs}$ から差引くことにより $(T_1)_{intra}$ を計算することができる。さらに $(T_1)_{intra}$ から回転の相関時間 τ_c 、拡散係数 D_r ($\tau_c = 1/6 D_r$) を決定できることになる。

図又はこのようにして分離した水の D_t と D_r の値および G_r の存在による低下を示したものである。

図(a), (b) の比較から明らかになることは、並進運動にくらべ回転運動の束縛がきわめて大きいことである。

このことは *bound* 状態と *free* 状態間で水分子の交換速度と運動の相関時間(観測時間)の大小関係によるものと考えられる。つまり交換速度と観測時間が同程度の場合には、相互作用の効果は観測量に大きく現われてこない²⁾。水分子の回転運動の相関時間は $\tau_c \sim 10^{-11} \sim 10^{-12} \text{ sec}^{-1}$ 、並進の相関時間は $\tau_c \sim 10^{-10} \sim 10^{-11} \text{ sec}^{-1}$ であるため並進運動 D_t に対する効果が小さいものと結論できよう。

図又から D_t, D_r の場合も分子量の大きい順に低下、つまり運動の束縛の程度は大きい。*bound* 状態にある水の分子を p とすれば、観測される相関時間 $(T)_{obs} (\propto T_1^{-1})$ は、本実験のような束縛の条件下では次のように表わせる。

$$(T)_{obs} = (1-p) \tau_f + p \tau_b \quad (2)$$

(たがって p が同一であれば τ_b が大きい(被結合体の運動性が低い)方が $(T)_{obs}$ は大きくなり、拡散係数の低下は大きくなる。図又の結果は τ_b の差によるものと考えられ

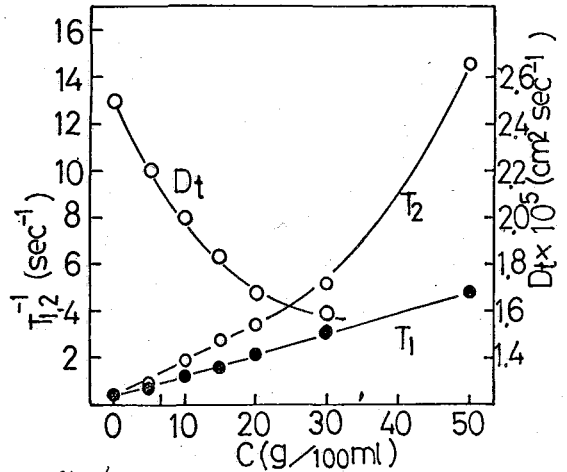


fig. 1
Concentration dependence of T_1 , T_2 , and self-diffusion constant of water protons in albumin solutions.

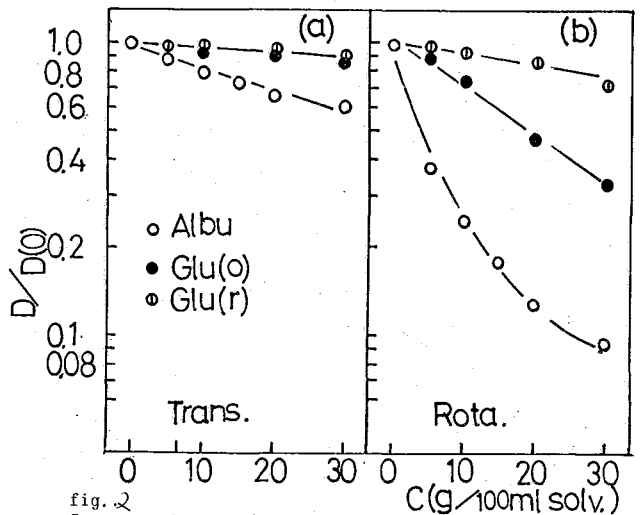


fig. 2
Concentration dependence of self- and rotational diffusion constants of water molecules.
○ - albumin solution, ● - glutathione solution(oxidized)
◐ - glutathione solution(reduced form)

る。ちなみに Kuntz³⁾ のデータから水和数 (溶質 1g あたり水の水和水の分子数) を求めると、 $G_L = 0.59$, $A_L = 6.445$ と A_L の方が小さい値が得られる。なお James⁴⁾ は、拡散係数の測定から次式によって算出された水の分子数 X_i を見積ることから得たとしている。

$$X_i = \frac{1 - D/D_0}{1 - D_i/D_0} \approx 1 - D/D_0 \quad (3)$$

しかしながら観測される D の値には、状態間の交換速度、 τ_b (D_b) が影響を及ぼすため、十分な注意が必要と考えられる。

3-2 熱変性の効果

図3に65°Cにおいて変性させた5% Al 水溶液の水プロトンの T_1 , T_2 , D_t の時間変化を示す。熱変性にともなつて水の量も変化し、つまり系のゲル化にともなつて水の運動性の低下がわかる。 T_1/T_2 が増大することは分子運動の変化と同時に、ゲル化による系の不均一化によるものと考えられる。図3からわかることは、水の NMR 測定からタンパク質の変性過程の追跡が可能である点である。 T_1 , T_2 の時間変化から変性過程を検討すると、 $\ln \frac{a}{a-x} \sim t$ の関係は直線となり、一次反応に従うことが見出された。速度定数として $k = 3.8 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ が得られた。

図5は Al 水溶液を25°Cから昇温し、変性させた後降温した時の水の T_1 , T_2 の変化である。 T_2 の降温での極小は、bound した水の T_{2b} と寿命が同程度になつたためと考えられる。同様な結果は Oakes⁵⁾ によつても得られている。図4は(1)式を用いて D_t と D_r を分離した結果であ

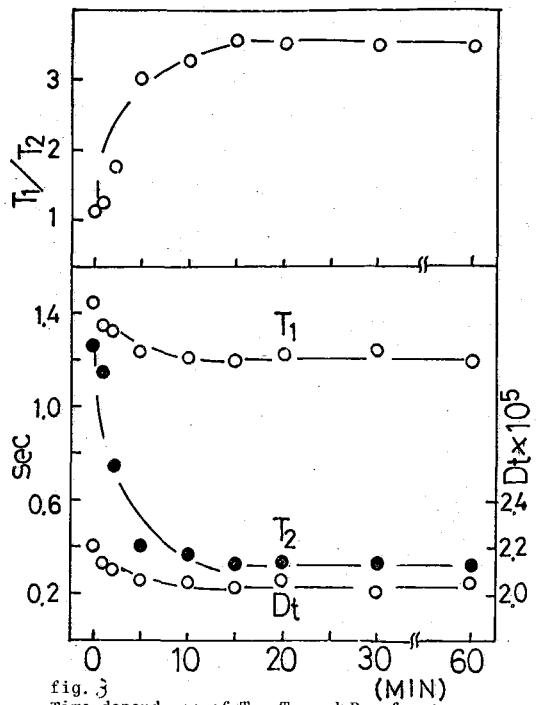


fig. 3 Time dependence of T_1 , T_2 and D_t of water protons in 5% albumin solution at 65°C.

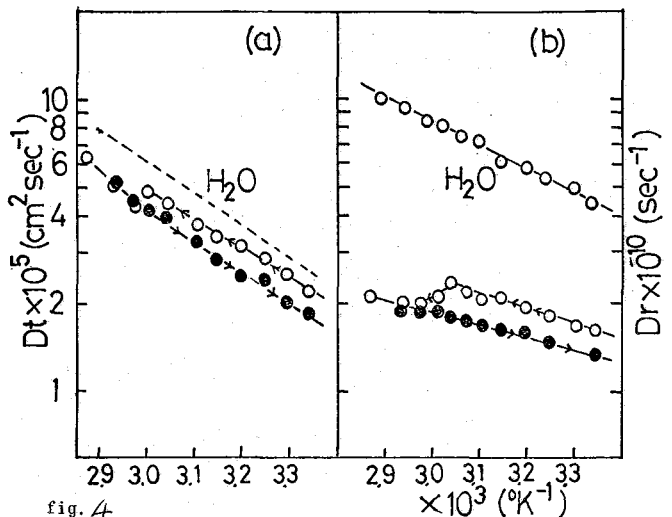


fig. 4 Temperature dependence of self- and rotational diffusion constants D_t , D_r of water molecules in 5% albumin solution. Open and closed circles denote heating and cooling experimental results, respectively. Figs. include also D_t , D_r of pure water.

り、並進、回転運動ともに、 A の変性過程の影響を受ける。また変性した中、 α 牙の水の運動の束縛は大きい。 $Cakes$ によれば、 A の水の水和の変性させた方が 12-15% 小さいことが見出されている。したがって上記の実験結果は、水和水の変化では説明できない。むしろ (2) 式の T_2 が変性 A の場合の方が大きいと考えられる。つまり変性によって細目が生じ、凝集することによって分子鎖全体の運動性が大きく低下したためである。

15% までの変性 A 水溶液において、水分子の並進拡散には、細胞系号ご (ば) ば観測される restricted diffusion は観測されなかった。したがって分子間の架橋によって形成された $Cavity$ の大きさを a は、次式を満たすことになる。

$$\gamma G a^3 / D t \geq 1 \quad (4)$$

(4) 式から a^3 を見積ると、 $a^3 \geq 2.5 \times 10^{-7} \text{ cm}^3$ となる。これは隣原からの自由運動空間に比べて小さい。したがって変性 A 中の α 牙の束縛が大きいことは空間の効果ではない。

4 文献, 1) G. F. Hazlewood et al. Ann. N. Y. Acad. Sci.

204, 434 (1973)

2) A. G. Marshall,

J. Chem. Phys. 52, 2527 (1970).

3) I. D. Kurtz, J. Amer. Chem. Soc. 93, 514 (1971)

4) T. L. James, K. T. Gillen, Biochim. Biophys. Acta. 286, 10. (1972).

5) J. Cakes, J. Chem. Soc. Faraday, Trans. I, 22, 228 (1976)

Nuclear Magnetic Relaxation of Water molecules in Peptide and Bovine serum albumin Solutions

Kazuo SATO

Central Research Laboratory, Idemitsu Kosan Co. Ltd.,
Sodegaura-cho, Kimistu-gun, Chiba 292-01

We have measured the self-diffusion constant D_s and T_1 of water protons in glutathione (oxidized and reduced form) and bovine serum albumin solutions. From the values of D_s and T_1 , we have calculated the $(T_1)_{\text{intra}}$ and the rotational diffusion constant by using the well-known relaxation theory. It is found out that the rotational motion is more restricted than the translational one in the presence of peptide and protein. This is discussed in terms of the correlation times of motions and the exchanging times between various sites.

The effects of thermal denaturation of the protein on the motional behaviors of water molecules are also discussed. In the thermal denatured gel state, the restricted diffusion of water molecules could not be observed.

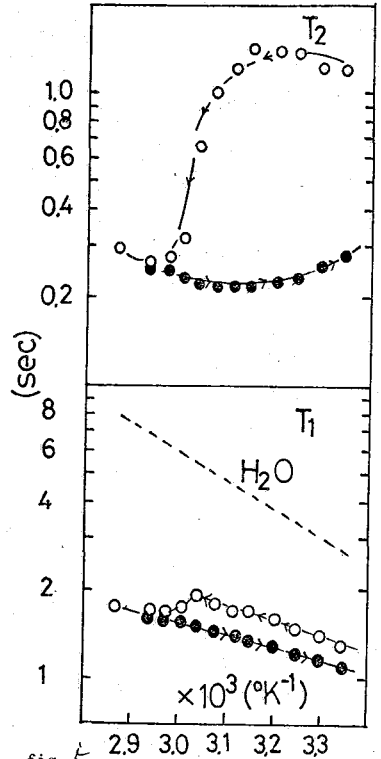


fig. 5
Temperature dependence of T_1 , T_2 of water protons in 5% albumin solution. Open and closed circles, heating and cooling experimental results, respectively.

第 2 日

11 月 15 日 (火)

(日本電子) 木田 惇 ○今成 司

§1 序

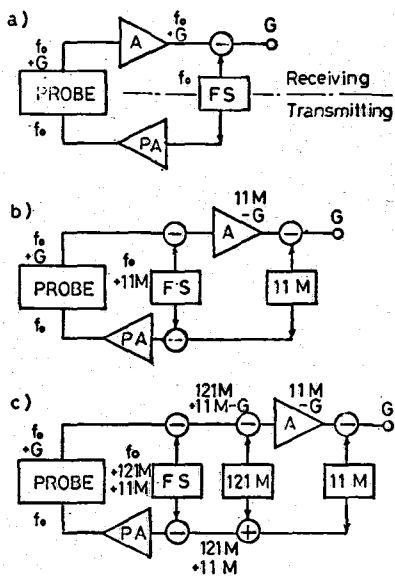
FT-NMRの普及に伴ない、相対感度の低い核を含め、多数の核種が観測対象となつてきている。種々の核を観測する場合、目的の核に合わせた検出器(Probe)と水晶発振器を準備することが、単純で確実な方法であらうか、観測核が増すと多くの費用がかかるうちに、検出器交換に伴う再調整等の手間は非常にものとなる。そこで単一の検出器あるいは発振器を用いて多くの核を観測する事が要求される。一つの検出器で複数の核を観測する方法としては、磁場を変換する方法と周波数を変換する方法が考へられる。前者の場合には検出器を最高のS/Nに合わせる事ができるが、ロック及び他核照射の周波数を変へなければならず、しかも磁場を変へる事に伴うような再調整等の問題がある。周波数可変の検出器(Wide Band Probe)を用いれば、このような問題はなくなり、S/Nは落ちる事なく、しかも容易な操作で周波数が変へられるプロブができるかと言う問題がある。Trafficante等はこの様なWide Band Probeの作成を試み、その結果について報告している。我々も独自の方法でこの様な検出器を試作し良好な結果を得たので、その分設計システムをも含め報告する。

§2 Wide Band 周波数ソース

周波数ソースとしては、目的とする核に応じていくつかの水晶発振器と用意して置き、切り換えて使う事もできるが、より一般的には単一の水晶発振器から任意の周波数を合成できる様にした云々の周波数シンセサイザ(FS)が使われる。MRフルス電力増中巻としては可変同調のみでも良いが、核種の切り換えに伴う調整の手間が省けると言う点では広帯域型の電力増中巻(PA)を用いるのが便利である。周波数シンセサイザと広帯域パワーアンプを用いた観測系の具体的な構成図をFig.1に示す。a)は最も簡便の方法であるがFSの発振周波数がNMR信号周波数に近接している為この干渉をさける事が電氣的に難しく、一般にフーリエ変換装置では用いられない。b)の方法は11MHzの中間周波数を設ける事によりFSの発振周波数を11MHzだけオフセットする様にしたもので、一般に使用されている方法である。この方法ではFS周波数との直接的な干渉は除けるが、反面ミキサ部分が不変に事によりビート雑音を観測周波数帯へ混入して行く恐れも増す。一般に二周波数 f_1, f_2 とミキサを通る事により望みの周波数 $f_1 \pm f_2$ の他に mf_1, nm_2 なる多数のスパリアス周波数を生ずる事が知られており、これら周波数が観測帯域へ入ってくるとフーリエ変換過程を通してスローク状のスパリアスソフトラムを与え、NMR信号とすずらわしいものとなるので、非常にやっかいである。固定周波数の場合には観測周波数帯を限定されており、何らかのフィルタ操作で除去できるが、可変周波数にするにはより根本的な解決が必要である。Fig.1のc)は今回採用した方法で観測周波数帯より充分に高いホニの中間周波数(図で12MHz)を設ける事によりこの様なビート雑音を

完全に除去する様にしたものである。

Fig. 1. Block diagram of multi-nuclear observation system.

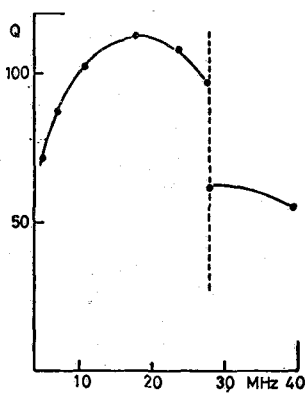


§3 Wide Band: Probe と 検出コイル

NMR 信号の S/N は検出コイルの形状によって大きく左右される事が良く知られている。最良の検出コイルはサンペル管径、溶媒された令解能、観測核等の状態に応じてそのつど変わるため、単一のコイルで多種類の核種を扱う場合にはどこかにポイントを定め、他はある程度妥協するとする方針をとるを得ない。一般にコイルは限界近くまで(系の分布容量で決定された共振周波数が所望の観測周波数近くにあり、感度をかせぐ方法がとられている。多くの他核の周波数は、プロトン 100 MHz の磁場で 5 MHz ~ 41 MHz に集中しており従って多核同時観測用コイルとして使用可能なものは、上限周波数 (P 核) 用に巻かれたものとなり、Trafficante らは実際に P 核用以外のコイルを使用している。今回我々がえらんだのは P 用のコイルである。

これにより、最も使用価値のある P 核周波数においては固定周波数プロブとほぼ同等の S/N が期待できる。その反面、これでは 25 MHz 以上に同調させる事ができないので我々は受信コイルに並列に附加コイルを入れ、合成インダクタンスを落して同調可能にしている。Fig. 2 にこのコイルの Q 値と周波数に対してプロットしたものを示す。附加コイルを入れた事により 25 MHz 以上では回路の有効な Q 値が不連続に落ちこんでいる。P 核のところでスタンダードな検出器に比べて S/N の低下は、Q 値の平方根に比例しており、約 40% になると予測されるが、実際には P 核用プロブに比べてコイル巻数が多い (約 2 倍) からそれほど S/N の低下はみこらない。

Fig. 2 Circuit Q vs frequency for wide band insert.



次に Wide Band Probe として重要な点は、コイルを含む検出回路と送信機が受信増中器の内のインピーダンス整合である。送信側のインピーダンス整合は、電力増中器からの電力をいかに有効に試料の励起に使用できるかの問題であり、又受信側との整合はコイルに発生する NMR 信号といかに有効に増中できるかの問題である。固定周波数検出器では Fig. 3 a) に示される整合回路が一般的である。しかしこの回路は周波数の変化によって整合のしやすさが大きく、可変同調にはしづらい。b) の回路は今回送信側に採用した回路でこの様子の特性が大きく改善される。Fig. 4

に回路分析器で測定した電力効率を示す。測定は12 MHz を中心にして行つたもので、b)回路では図示の全周波数範囲で50%以上の効率を得られるが、a)回路では特性が良くない。

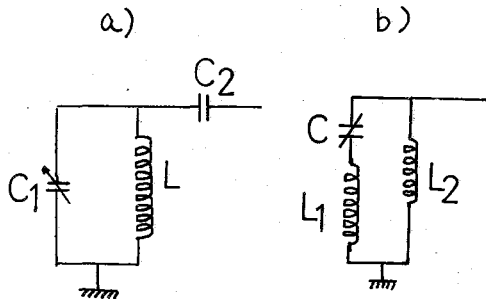


Fig. 3 Receiver circuit

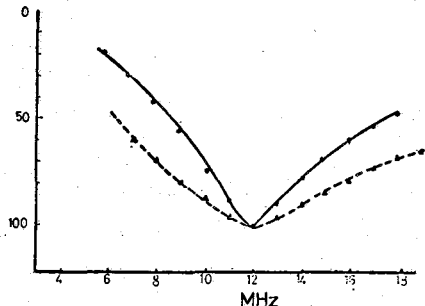


Fig. 4 Return loss of circuit a) (rigid line) and circuit b) (dotted line).

次にNMRロックの方法としては通常検出部回調回路を複回調とすることでロック核の同時検出を行つているが、可変回調とした場合ニツの回調周波数的一方を固定し、一方のみを動かすことになり、ロックチャンネルの調整が枝種の切り換えに伴なつて必要になる。今回の wide band probe ではこのわずらわしさを除くためにロック用のコイルを別に設け、これを信号部コイルと直角に配置することで観測—ロックチャンネル間の電氣的な干渉を除いている。この様な方法により、ロックチャンネルもまた可変周波数とすることができ、例えば切替観測時にロック核をL₂に切り換えることなどの可能性もでてくる。

スプロクトル例。
最後にこの wide band probe を使用した¹⁵N (10 MHz), ¹³C (25 MHz), ³¹P (40 MHz) のスプロクトルを固定周波数プローブで得られた結果と対比して示します。

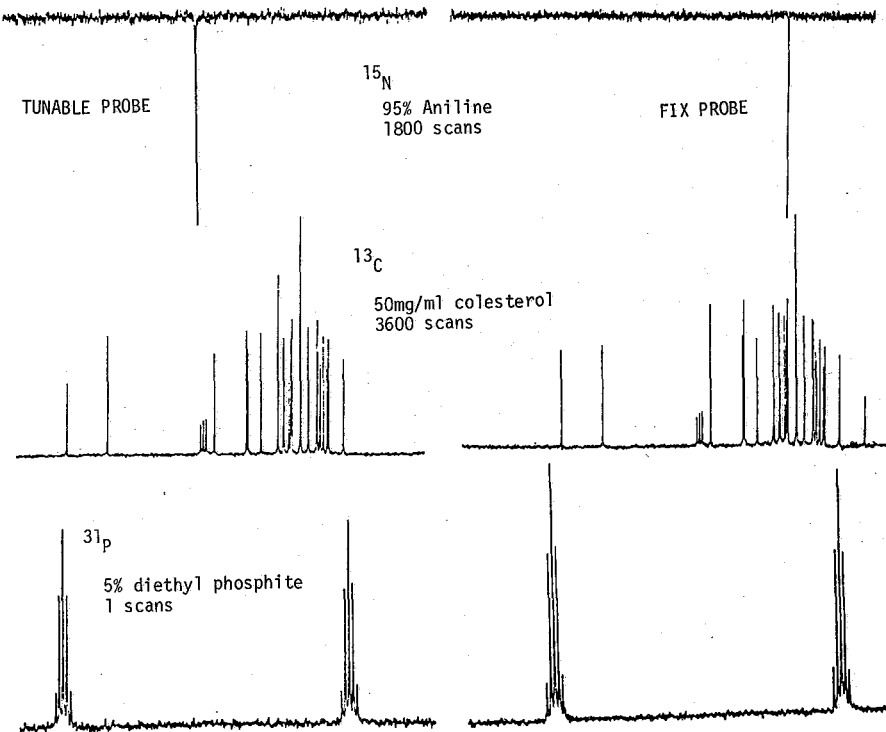


Fig. 5 These data are obtained with the wide band probe and the fixed probe at same observation conditions.

文献
V. D. Trafficante, J. A. Simms; J. Magn. Resonance, 15, 484 (1974).

Wide Band Probe and Multinuclear Observation System

J.Kida and M.Imanari

JEOL Ltd. Nakagami 1418, Akishima, Tokyo 196 Japan

Multinuclear observation capability using a wide band probe is discussed and compared with other methods. The wide band probe is designed for observing nuclei over the range of 5.5MHz -- 41MHz which is covered by several frequency channels without insert change. The impedance matching between the tuned receiver circuit and both the preamplifier and the transmitter is accomplished by a capacitor and an inductor for each channel.

In the lock channel, both deuterium and lithium internal locks are employed. The lock coil is placed on the perpendicular axis for the receiver coil, in order to reduce the interaction between the tuned receiver circuit and the lock circuit.

Several spectra are shown, which demonstrate very little loss in sensitivity as compared with conventional fixed probes.

東大 理学部 ○林孝知佳 和田昭允

序 高分解能NMRの近年の進歩にはめざましいものがある。高磁場化は高分解能、高精度化をもたらした。また種々のパルステクニックを駆使したFT法はS/N比の向上に大いに役立っただけでなく、 T_1 、 $T_{1\rho}$ などの測定、二次元NMR等新しい測定法を開いた。化学修飾、シフト剤などは分解能を増すほか多くの目的に用いられた。以上の手段は定常系の測定に特に有効であるが、一方非定常系の測定には Stopped Flow 法が試みられた。

生体高分子は外部条件によって構造変化を示すが、いろいろな中間構造をもっている場合が多い。このような系では、多重相関測定により、分子の各部分の局所的構造変化の相関を知り構造変化の詳細な画も出すことができる。

方法 コンピューター制御のもとで外部パラメーター（pH、温度、基質濃度など）を連続的に変化させながらスペクトルを取り込み、ピーク位置などの内部パラメーターを実時間で求め、測定終了後各パラメーター間の相関を求めた。pH等の溶液条件を変えるために、試料攪拌槽、フロー型pH電極、フロー型NMRセルからなるフローシステムを用い、マイクロインジェクターで酸等を攪拌槽に注入した。インジェクターはパルスモーター駆動であり、任意のプログラムに従って注入することが可能である（ $0.05\mu\text{l}/1$ ステップ）。また試料の循環にはパリスタポンプを用い、循環時間は約3分、必要試料量は約7mlである。

NMRの測定はCW（連続波）法、PN（擬似雑音）法で行なった。下表で、各測定法を比較し、特長をかかげる。

		測定時間	処理時間	Wiggling	Homo Lock
FT	CW	長	短	有	可
	PN	短	長	無	困難
	Pulse	短	中	無	困難
	Rapid Scan	中	長	無	可

相関測定のためには、測定時間が短かく、処理時間も短かい方が好ましい。また Wiggling の存在は線形をゆがめるだけでなく、擬ピークを生ずるので、できるだけ除くべきである。

ピークの検出法は下の各方法を試みた。

	処理時間	スペクトルの平滑化処理	生成ピークの検出	重なったピーク分離
ハード : ピークロック	不要	—	不可	不可
ソフト {	極大（傾斜）	短	可	困難
	最小二乗法	長	不要	不可

ピークロックによる方法は、NMRロックの原理を利用して、照射周波数が共鳴周波数と等しくなるように、V/F変換器に負帰還をかける。その時帰還量がピーク位置を表わす。これは簡便な方法であるが、ロックできるピークは一つに限られる。極大（傾斜）を検出はやしひでちか めだあきよし

する方法は、シグナルとノイズを区別する手段がないので、S/N比が悪いスペクトル、あるいはWiggleが大きいスペクトルに適用する場合には注意が必要である。最後の方法では、最小二乗法を用いてスペクトルをローレンチアンの重ね合わせでフィットする。各ローレンチアンの位置、線巾、強度およびベースラインの位置、傾きを可変パラメーターとしてとったが、線巾一定、あるいは相対強度一定の条件を付加することにより、パラメーター数を減らし、計算時間を短縮できる。核スピン結合によりピークが分裂している場合には、ピーク位置、相対強度をケミカルシフトとスピン結合定数で表現することができる。その際、スピン結合がAB, AB₂, AB₃, ABXなどで代表される場合には、ピーク位置、相対強度が、ケミカルシフトとスピン結合定数で解析的に表わせるので、その関係式から変換マトリクスを作った。ところで各パラメーターは剰余に非線形の形ではいってくるので、与えられた初期値の近傍で展開する必要がある。したがって、ある精度（位置は線巾の範囲内）で初期値を与えなくてはならない。二回目以後は、直前に求めた値を初期値として用いた。

得られたパラメーターは主メモリー、紙テープ、フロッピーディスクなどに記録した。多重相関を求めるために、任意のパラメーターを2種ずつ選らび、それぞれをX成分、Y成分にもつ点の軌跡をX-Yレコーダー上にプロットした。pHをX成分にとれば、連続測定によるTitration Curveを与える。一方、内部パラメーター同士の相関から、構造変化のステップ数、微細構造を知ることができる。

結果 図1、図2に最小二乗法によるカーブフィットの例を示す。図1はCW法で得たPheのβCH₂スペクトルとそれを独立な4つのローレンチアンの重ね合わせでフィットしたものである。βCH₂はγCHとABXタイプのスピン結合をしているので、8ピークに分裂する。大きい4ピークに関してはカーブフィットが容易であるが、小さい4ピークはS/N比が悪く、またWiggleと重なるピークもあり、かなり困難になっている。

図2はPN法で得たスペクトルとカーブフィットである。βCH₂とγCHとの結合をJ_A, J_B, J_{Ax}, J_{Bx}, J_{AB}のパラメーターで表わしフィットさせた。小さいピークもよくフィットしている。ところが、厳密にはβCH₂とγCHはABKタイプであるので各ピークの面積強度に誤差が見られる。

図1

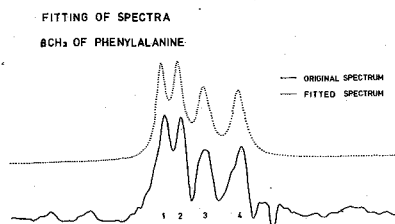
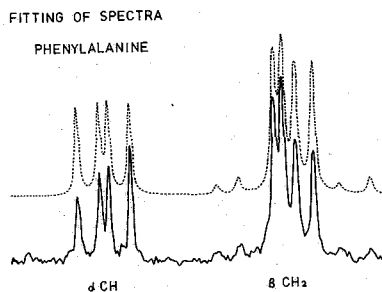


図2



NH_2 の βCH_2 は αCH とABXタイプのスピン結合をしているので、8ピークに分裂するが、大きい2ピークがほとんど重なり合い、小さい2ピークは非常に小さくなっているため、パラメーターの評価誤差が大きくなる。このような場合は異なった磁場強度で測定することが有効である。ここではそのまま60MHzで測定した NH_2 の多重相関曲線を図4に示す。

NH_2 は溶液条件がアルカリ性→酸性に変わることによって、 $-ND_2$, インドール環, $-COO^-$ の順で D^+ イオンを結合する。 D^+ イオンの結合は依磁場シフトを起こすので、三段階の結合に対応した三本の折れ線が存在する。折れ線の各部分は曲がっていないことから D^+ イオンの結合はそれぞれ独立に起こっており、それらの間に相互作用が存在していないということが出来る。また各プロトンは D^+ が結合しているか、していないかだけを反映している。

図5はAla-PheのpH Titrationを示す。さらに図6は図5から得られた多重相関図である。 $-ND_2$, $-COO^-$ に D^+ が結合するのに対応した2本の折れ線になっている。 NH_2 の例と同様、各プロトンは、 D^+ の結合、解離を直接反映している。
考察 pHおよび温度制御は不連続であるが、十分細かい(500~1000ポイント)ので、連続的な変化とみなすことができる。またCW法によるスペクトルの取り込み時間は100Hzを5Hz/secで掃引すると20秒であるから、最初と最後では同時とはいえない。しかしこの間に外部パラメーターはほとんど変化しないので、同時と考えてもよい。PN法では一周期が一秒前後であるので同時性には問題がない。この場合、数回〜数十回の積算してS/N比を改善した。

最小二乗法によって求められたパラメーターの精度は計算により評価することが可能であるが、計算時間を短縮するために省き、かわりに得られたパラメーターの値のばらつきから誤差を評価した。ケミカルシフト、スピン結合定数の精度はスペクトルの良否によるが、通常 <0.1 Hzである。ピークが重なり合った場合、感度が

図3

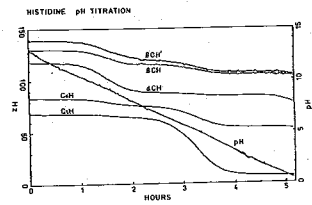


図4

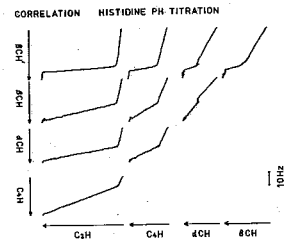


図5

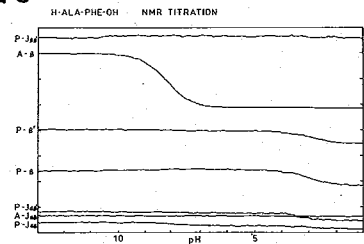
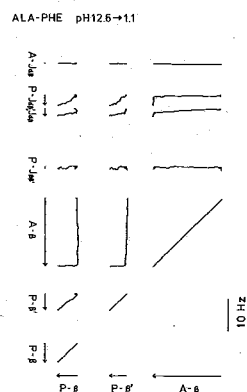


図6



悪い場合 (エチレンの J_{gem} を直接求めることはできない)、ローカルミニマムが近傍に存在する場合などには、精度が悪くなり、時には誤った値を与えることもあるので注意を要する。

NMRの実験では、pH、温度を正確に設定することが非常に難しい点が欠点であるが、相関を求めることによってそれらが消去されるので、不確定な要素のない厳密な関係が得られ、精密な議論を行うことができる。

ABSTRACT

Automatic Tracking of NMR Spectral Changes
and Analysis of their Multiple Correlation

Hidechika HAYASHI Akiyoshi WADA

Department of Physics, Faculty of Science
University of Tokyo, Tokyo, Japan

In recent years a great progress has been made in several aspects of NMR study :

- a) Achievement of high resolution and high precision measurements by use of a high magnetic field;
- b) Introduction of pulse techniques, which has improved signal-to-noise ratio a great deal and also made possible the measurements of T_1 and $T_{1\rho}$, and 2-dimensional NMR; and
- c) Wide application of chemical modification and shift reagents to probe the local conformation of sample molecules.

The present study on a precise measurement of multiple correlation among resonance peaks whose positions and shapes are changing during a programmed change of external parameters, is aimed at adding a different sort of information especially on the details of conformation changes in biological macromolecules.

A programmed change of pH is performed by a sample flow device where the sample solution circulates continuously through the following flow system in about three minutes.

mixing room → pH electrode → NMR flow cell

A micro injector which is controlled by a mini-computer YHP 2108A is used to change the pH of the solution within an accuracy of 0.5 1/10 steps. A simultaneous tracking of peaks to calculate correlations among their changes has been made by Varian NV-14 NMR spectrometer on-lined to the YHP 2108A. A least square fitting of each of resonance peaks with a Lorentzian function of three parameters (line position, line width, and intensity) are made by real time computation.

Multiple correlation among resonance peaks of amino acids and dipeptides were obtained and detailed steps of their conformation change were studied.

(電総研) 亀井 裕孟

はじめに 生体における血液の流れを研究することは、医学的にも、生体工学的にも重要な問題である。生体における血流の測定は、非破壊的で行われなければならない。NMR法は非破壊的に流速を測定する優れた方法の一つであり、既に工業計測、あるいは生体における血流測定への応用が多数試みられている。測定法としても種々のものが試みられているが、スピン・エコー法を除けば、何れも1ヶ所で何らかの擾動を加え、一定距離隔った点においてその影響を検出し、距離と時間の関数として、流速を求めている。”こゝではオーのCoilでrfパルス(90°パルス相当)を印加し、そこからある距離離れたところにあるオのCoilに誘導される自由誘導減衰信号(FID)の変化から、距離と時間の関数として流速を求める方法を試みた。

測定法について 実際の生体ではより複雑であるが、こゝでは、流体が変形しない円管中を流れ、その流速 $v(r, t)$ は管径と時間のみに依存すると仮定する。Fig. 1. に示すようなCoil構成で、トランスミッタCoil(TCoil)にrfパルス(90°相当)を印加したとき、レシーバCoil(RCoil)に誘起されるFID(Fig. 2.)の信号強度は次式で示される。

$$M_{av}(t) = A \int_a^b \int_0^1 M(x, \rho, t) T(x) R(x) \rho d\rho dx \quad (1)$$

$$\rho = r/r_0$$

こゝで、 $T(x)$ 、 $R(x)$ はそれぞれTCoil、RCoilの特性関数、 r_0 は管の半径である。

RCoilに信号が誘起されるためには、つぎの条件が満足されなければならない。

i) TCoilに達するまでに、流体はそのスピン緩和時間 T_1 よりも長い時間静磁場 H_0 中に滞在すること。

ii) $l' / v(r, t) < T_2^*$
 l' はTおよびRCoil間の実効距離、 T_2^* はみかけの線幅の逆数である。

これらの条件は容易に満足される。成人の動脈中の血液の最大流速は約30 cm/secといわれ、 $T_1 \sim 0.4$ secであるか

かめい ひろにけ

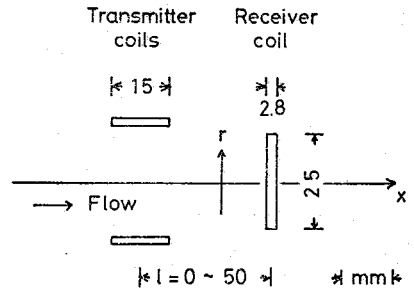


Fig. 1. Coil assembly of the pulsed NMR flowmeter.

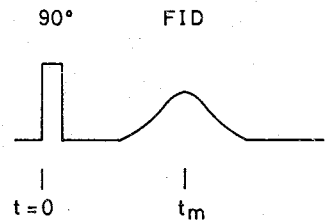


Fig. 2. Illustration of the FID signal in flowing fluids.

ら、測定対象物が 15~20 cm にわたって H_0 中に存在すればよい。また $l' = 1 \text{ cm}$ とすると、 $T_2^* > 0.03 \text{ sec}$ であり、この程度の H_0 の均一度は容易に実現可能である。

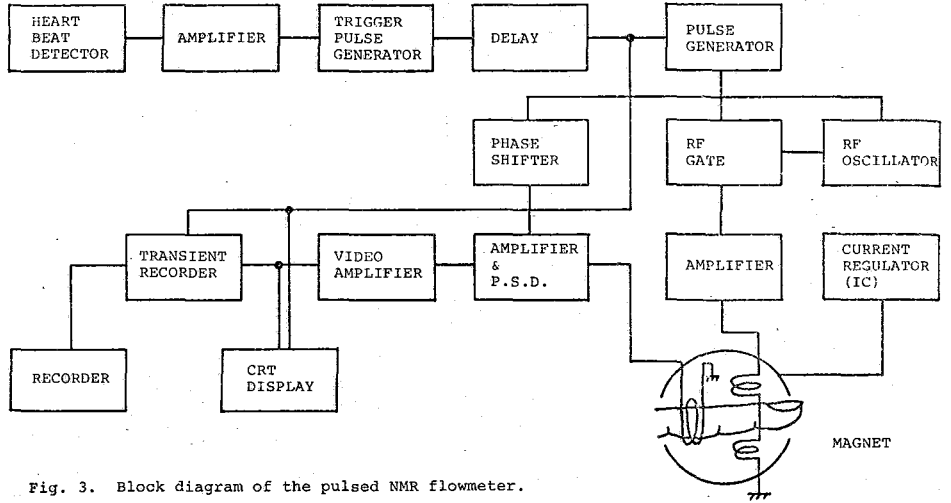


Fig. 3. Block diagram of the pulsed NMR flowmeter.

これらの条件

が満足されるとき、平均流速 v_{av} は

$$v_{av} = l' / t_m$$

で与えられる。 t_m は $t = 0$ で rf パルスを印加したとき、FID が最大値を示す時間である (Fig. 2)。つまり、T コイルでパルスによって倒された磁化が R コイルまで達するのに要する時間である。

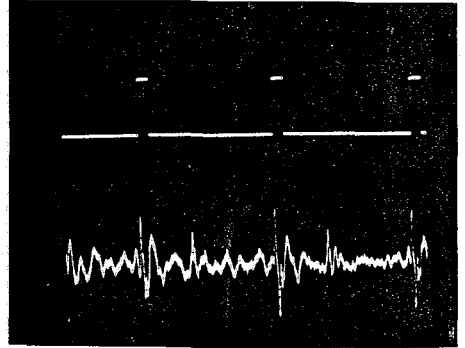


Fig. 4. Pulses triggered to the heart beat.

装置の構成 装置のブロック図を Fig. 3. に示す。血流の測定は心臓の搏動に同期させて行う必要がある。音響、電気変換素子を用いて、心臓の搏動を検出し、これを増幅した後、トリガパルス発生器で、これに同期したトリガパルスを発生させる。Fig. 4. に心搏信号とこれに同期したトリガパルスを示す。目的に応じてトリガパルスを必要の時間だけ遅らせて、パルス発生器に加え、DC パルスを発

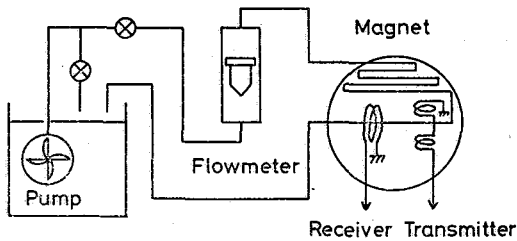


Fig. 5. Schematic diagram of the pulsed NMR flowmeter for flow measurements in water.

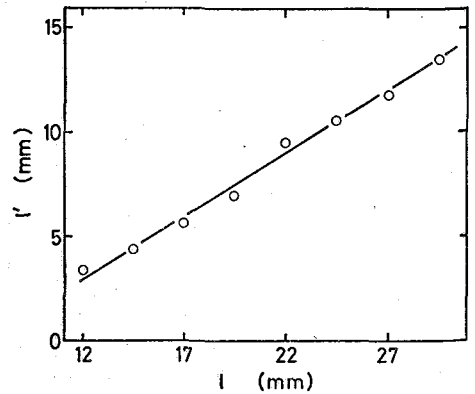


Fig. 6. Plot of l' vs. l .

生させる。rf ゲートおよび電力増幅器を通して、rf パルス (4.3 MHz, $H_1 \sim 3G$) を発生させ、プローブ内の T コイルに印加する。T, R コイル間隔 l はマグネットの外に置かれた微動装置によって 0~50 mm にわたって微細に変化させることができる。R コイルに検出された FID は検波増幅され、オシロスコーフ上に、あるいはトランジエントレコーダを介して、記録紙上に表示される。電磁石の電流制御は IC を使用した定電流回路によって行った。

結果

i) 試験測定 装置の特性を知るために流速既知の水について測定した。装置の構成を Fig. 5. に示す。T コイルまでの H_0 中の管の長さは 72.5 cm である。本実験での v_{av} の最大値は約 30 cm/sec であり、使用した水の τ は約 0.6 sec であるから流水は T コイルに達するまでに十分に磁化されている。T コイルの照射領域, R コイルの検出領域の空間的分布によって、実際に流速を求めるときのコイル間距離 l' はコイル間の幾何学的寸法 l とは異なる。 l' をコイル形状から計算によって求めることは容易でないので、ここでは v_{av} 既知の水流での測定から求めた。

l と l' との関係は Fig. 6. に示す。測定結果の例として、 l 一定のときの FID の v_{av} による変化の様子を Fig. 7. に示す。磁場が共振点よりずれているので、ビート信号になっている。流速 0 のとき、 $\tau = 0$ から FID がみられるが、これはコイル形状からくるもので、 l が十分に大きいときには消滅する。

ii) 生体系への応用 生物の血液の流速測定を試みた。ヒトの人差指の血流の最大流速のときの FID を Fig. 8. に示す。これから血流の平均流速 (管径方向での分布に打ちする平均値) の最大値として、 $v_{av} = 35.5$ cm/sec が得られる。つまり、 l' と t_m との間には直線関係が成立している

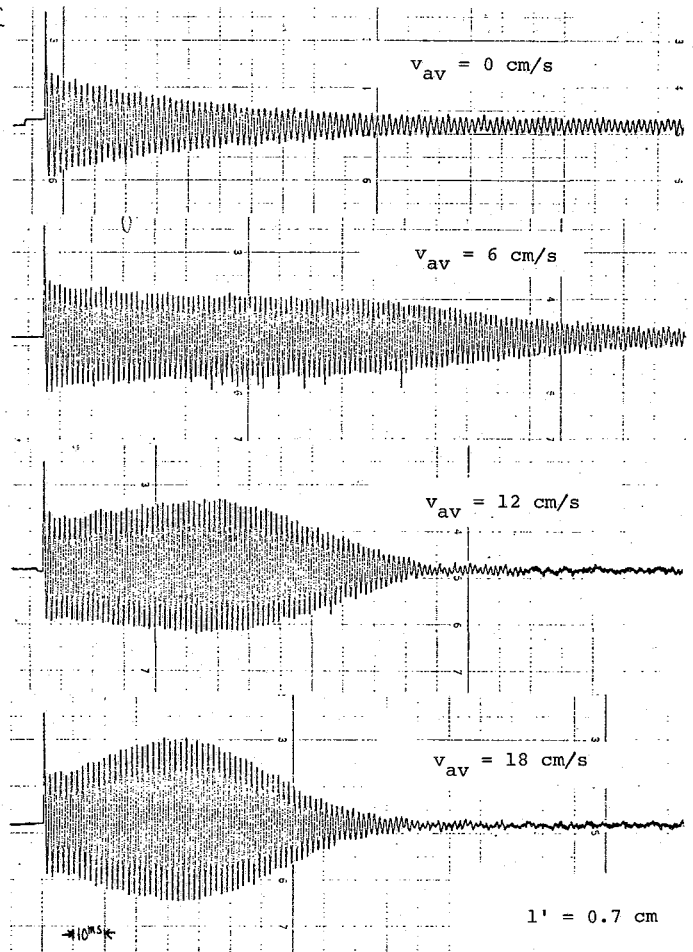


Fig. 7. FID signals at different velocities.

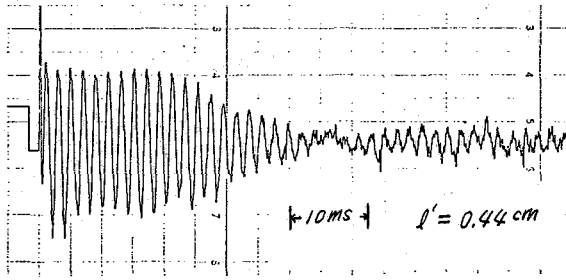


Fig. 8. FID signal of protons in intact finger.

が、この様子エドジョウにおける実験で示す。ドジョウの腹部より尾部にかけての測定結果をFig. 9. に示す。 l' と t_m との間にはより直線関係が成っており、装置が満足すべき状態で動作していることを示している。 $v_{av} = 42 \text{ cm/sec}$ となる。

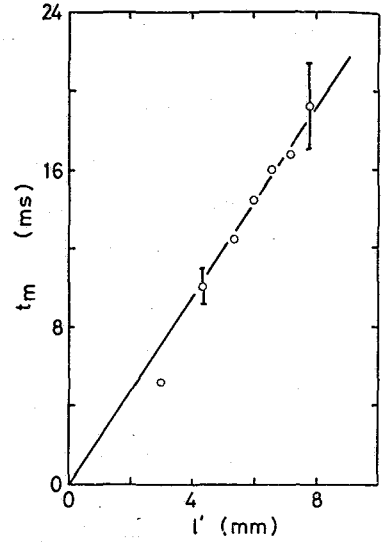


Fig. 9. Plot of t_m vs. l' . (*Miegurnus anguillicaudatus*).^m

今回試作した装置に関して、満足すべき結果を得ることかでき、種々の生体系への応用を考慮して、大型プローブの開発を準備している。

参考文献 ¹⁾ D. W. Jones and T. F. Child; in 'Advances in Magnetic Resonance' (J. S. Waugh ed.) Vol.8, p.123, Academic Press, New York, 1976.

Pulsed NMR Blood Flowmeter

Hirotake KAMEI

Electrotechnical Laboratory, Tanashi, Tokyo 188

Pulsed NMR techniques have been applied to the measurement of blood flow in intact living systems. The probe has two separated coils. Protons in flowing fluids are flipped in one coil by 90° pulse, and the second coil detects the arrival of flipped protons. Characteristics of the apparatus and *in vivo* results are presented.

204 (C13) チトクロームC'酸化型のスピン状態とアポ蛋白質構造の変化

(阪大蛋白質研) ○阿久津秀雄, 京極好正, 堀尾武一

1) はじめに

チトクロームC'は紅色光合成細菌や脱窒菌に見い出されるチトクロームで、C型へムを持つが、チトクロームCとは違つて、ミオグロビン型の電子吸収スペクトルを示す。Rhodospirillum rubrum と Alcaligenes SP. については既に全アミノ酸配列が決定されており、分子量は約28,000(2量体)である。本研究においては、このうちもっぱら Rhodospirillum rubrum のチトクロームC'を扱う。今井ら⁽¹⁾は電子吸収スペクトルの研究より、R. rubrum のチトクロームC'はPHを変えていくと還元型では2つの、酸化型では3つの異なる状態が見い出されることを示した。彼等によれば、PH 7以下ではI型、PH 8~12付近ではII型、PH 12以上ではIII型をとる。一方、Maltempoら⁽²⁾は低温におけるESRの測定から酸化型では9つの磁氣的に異なる状態が存在すると出張したが、北川、尾崎ら⁽³⁾の共鳴ラマン及び Rawlings らの⁽⁴⁾MCDの結果はそれを否定している。ただしMCDではPH 12付近のごく限られた領域に上記の三つの状態とは別の状態を見い出している。これらのうち、III型の可視スペクトルは407nmに極大を持つ典型的な低スピンのタイプである。又、II型は最も大きな磁化率を持ち、高スピンタイプと考えられている。これに対しI型は高スピンとも低スピンとも違う性質を示し、Maltempoら⁽²⁾はESR、Xスバウアー、磁化率の結果などを基に、これは高スピン($S=5/2$)と中間スピン($S=3/2$)の量子力学的混合体であるとした。しかし、上記の共鳴ラマン及びMCDの結果はいずれもこれに打して否定的なものであった。

われわれは、このような状態変化がNMR的にどうみられるか、それがアポたん白質の変化とどう結びついているかを調べた。又、このチトクロームC'は膜への結合型が存在することが知られており、その場合には低スピン状態にあるとされている。そこで、それとの関連を考慮して、この蛋白質と界面活性剤SDSとの相互作用についても調べた。装置はJEOL-FX-100。試料は、R. rubrum のチトクロームC'であり、全210mMリン酸緩衝液(重水)中で測定した。試料濃度は4mMから0.1mMである。内部基準としては Sodium tetradeutero (trimethylsilyl)-propionate を用いた。

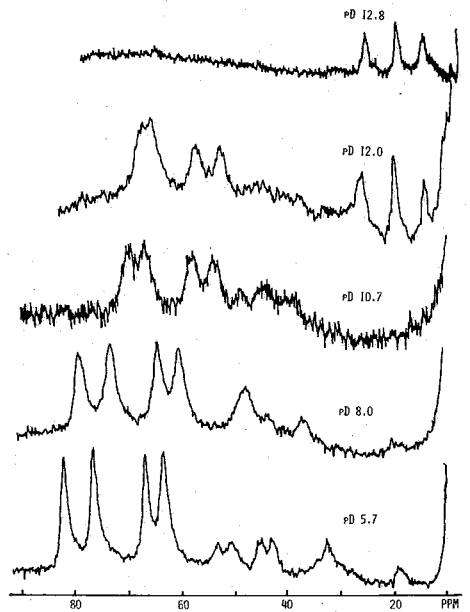


Fig. 1 100 MHz NMR spectra of the heme region.

あかつ ひでお, きょうごく よしまさ, ほりお たけかず

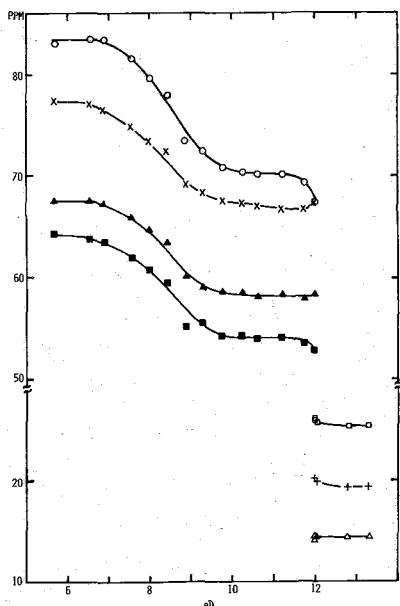


Fig. 2 pD dependences of chemical shifts of heme CH_3 protons.

2) α 領域のスペクトルのPD変化

Fig. 1 は4-クロムC'酸化型の100 MHz プロトン NMR スペクトルである。PD 5.7 から 60 ppm 付近にわたって現われている4本の大きなシグナルは α 領域のメチルプロトンによると思われる。これはPD π を過ぎると動き始め、PD 10.0 付近にかけ再び一定となり図の PD 10.7 に対応するシグナルを与える。PD 12 付近で高磁場 10~20 ppm 付近に新たにシグナルが現われ、PD 12.8 からは低磁場側のシグナルは完全に消えてしまう。これらのシグナルについて、その化学シフトをPD に対しプロットしたのが Fig. 2 である。このようにI型、II型、III型はNMR的にむしろ異なるスピンドensity状態として観測される。特徴的なことはI型からII型への変化はNMR的に見ると速い時間で起っているが、II型からIII型への変化は遅いことである。このことはI

からIIへの変化は α 領域の配位子の交換を含まないものであり、IIからIIIへの変化は配位子の交換を含むものであることを示唆している。IからIIへの転移の中心はPD 8.5 であり、IIからIIIへはPD 12.0 で急激な転移を起す。転移点の値は共鳴ラマン、MCDの結果とよく一致している。PD 12.0 前後で高スピン側から低スピン側へも化学シフトは少しずつ変化しているが、Rawlingsの主張する第4の状態が存在する積極的証拠は見い出されなかった。I型の常磁性シフトは最も大きく、酸化型高スピンとして知られているものに近い。II型が高スピンであるとするれば、かなり大きな変化がない限り、II型よりもポルフィリンのスピンドensityの高いI型が高スピンと中間スピンの混りを表わしているとは考えにくい。Fig. 2の結果から配位子交換はないと思われ、そのような大きな変化は期待できないのでI型は基本的に高スピン状態であると結論できる。このことは、北川ら、Rawlingsらの主張を支持する。北川らは共鳴ラマンにおいて、 α 領域のメチンブリッジのC-C伸縮振動に対応するラマン線が他の高スピン α ヘム蛋白質の場合よりも高くなっていることから、I型では Fe^{III} の α 面からのずれが小さくなっていると推論している。これは鉄とポルフィリンの軌道の重なりを大きくするのはNMRでも常磁性シフトが大きくなることを期待される。I型の結果はこれとよく一致しており、この考えを支持するものである。

3) 蛋白質領域のスペクトルのPD変化

Fig. 3 は 0~10 ppm 領域の100 MHz プロトン NMR スペクトルである。全体の特徴としてはI型に対応するPD領域ではスペクトルが全体的に broad であるが、II型III型と変化していくに従い、スペクトルは鋭くなっていく。従ってIII型の蛋白質部分の構造はI型に比べると著しく自由度の大きなものとなっていると推定できる。分離して観測されるシグナルがいくつかあり、それについて以下のように帰属した。PD 6.7 から 8.7 ppm に

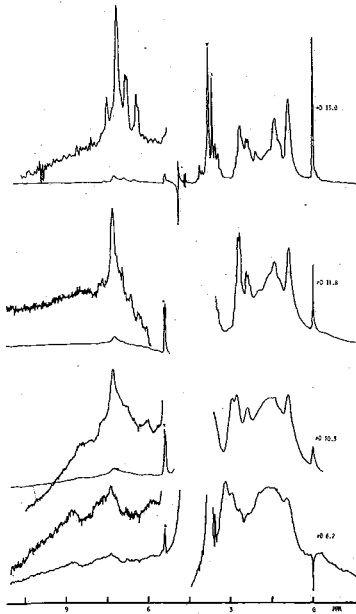


Fig. 3 NMR spectra of the apoprotein region.

見られる broad なシグナルは PD 変化に対して Fig. 4 のような変化をし、7.66 ppm のシグナルはアルカリにおいておくと、シグナルは D と交換して消えるので His C-2 プロトンと帰属した。PD 6.7 付近に見られるシグナルは PD 11 ぐらいから大きく高磁場にシフトし、最終的には 2.67 ppm に落ちつく。従って、このシグナルは主には Lys の ϵ -CH₂ によると帰属した。この蛋白質は単量体あたり 2 つの His 残基を持っている。他の物理化学的手段や、アミノ酸配列から、そのうちの 1 つは (His 120) 第 5 配位子として π に配位していると推定されている。一種類の His のシグナルのみが現れ配位した His のシグナルは観測されないと思われるから NMR 的にもこのことは支持される。残った 1 つの His の Titration による挙動も異常である。I 型から II 型への変化の影響によるシフト値の変化が PD 8.5 付近に見られるが、イミダゾールのプロトンの脱離は PD 12 付近で急激に起こることを示している。

従ってこの His 41 残基は I 型 II 型では π 領域変化の影響を受けやすい部分にあつて、他の基とかなり強く相互作用していることがわかる。Lys はこの蛋白質の単量体あたり 15 個あるので、全体的なことしかわからない。これは I 型においてはかなり広いシフト値をもっているが III 型はほとんどが似たようなシフト値をもつようになっており、アミノ基の脱プロトンにより、他の残基との相互作用が著しく弱まっていることを示す。PD 12 における急激な変化は Lys の脱プロトン化による構造的なゆらぎが、His 41 の脱プロトン化を誘起することによるとも考えられる。いずれにしてもこのような大きな構造的変化が、 π の配位子の変換を引き起こす原因になっているのであろう。

4) SDS による低スピン化

北川、尾崎らは共鳴ラマンによる研究において、*R. rubrum* のチトクローム C がアニオン界面活性剤である SDS と特異的に相互作用して I 型から PH 不変のまま、直接 III 型に変わることを見出した。われわれはこの現象を NMR で調べてみた。Fig. 5 は蛋白濃度 1 mM の SDS 濃度を変えて測ったときの 10~80 ppm 領域のスペクトルである。SDS 濃度 0.15% の高磁場側にわづかにシグナルが現われ、0.4

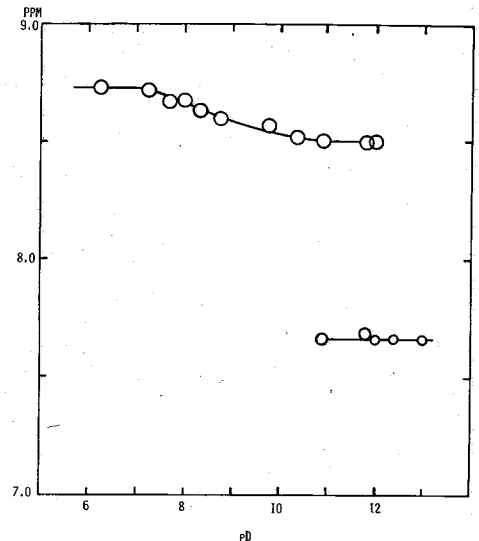


Fig. 4 pD dependence of the chemical shift of His C-2 proton.

%がほとんど完全に高磁場側だけのシグナルになってしまう。これは明らかに低スピンの変化を示しているが、Ⅲ型とは異なったスペクトルである。アポ蛋白部分にもSDSとの相互作用に伴う大きな変化は見られないので、Ⅲ型とは異なった低スピン状態であると考えられる。これがSDSのCMC(0.2% (w/v) 20℃)を越えたことによる変化でないことを確認するため、蛋白濃度0.1mM, SDS 0.05%のスペクトルをとったが同じ結果が得られた。I型からSDS型への変化も時間的に遅い変化である。SDSが蛋白とどのような型を相互作用しているかまだ断定できない。しかしチトクロームCが負電荷を持つ界面活性剤と特異的に相互作用して低スピン状態に変わるとは、膜が全体として負に帯電している脂質二重膜を持つことを考えると、この蛋白が膜に結合して低スピンになることと何らかの関連があることを期待させる。

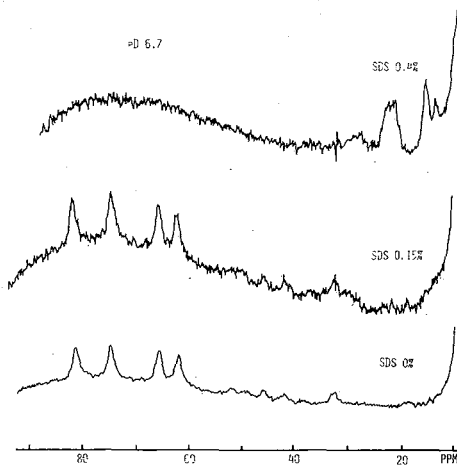


Fig. 5 NMR spectra of the heme region in the presence of SDS.

本研究にあたり、有益な御教示と討論をおしまれなかつた本研究所の比川禎三博士、角野 雷三郎博士、尾崎幸洋氏に深く感謝します。 References: (1) Y. Imai, K. Imai, R. Sato & T. Horio, *J. Biochem.* 65 (1969)

225. (2) M. M. Maltempo, *Biochim. Biophys. Acta* 379 (1975) 95 (3) T. Kitagawa, Y. Ozaki, Y. Kyogoku and T. Horio, *Biochim. Biophys. Acta* in press (4) J. Rawlings, P. J. Stephens, L. A. Nottic and M. D. Kamen, *Biochemistry* 16 (1977) 1921.

Spin States and Apoprotein Structures of Oxidized Cytochrome c'

Hideo AKUTSU, Yoshimasa KYOGOKU and Takekazu HORIO

Institute for Protein Research, Osaka University Yamadakami, Suita, Osaka 565

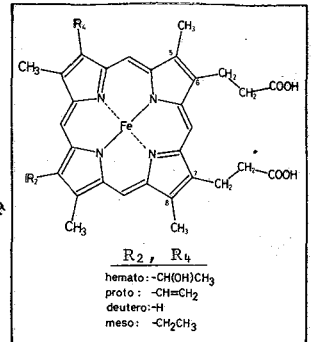
100 MHz NMR spectra were observed for oxidized cytochrome c' from *Rhodospirillum rubrum*. Molecular weight of this protein in dimer is 28,000, and whole amino acid sequence is known. Imai et al. indicated the existence of three types of spin states (I, II and III) from the pH dependency of electronic absorption spectra. Types I and II are typical high and low spin states respectively, while the type III is somewhat unusual one. In NMR spectra we found four signals due to the methylprotons of the heme group in the region from 60ppm to 80ppm and 50-70 ppm for the type I and II respectively, and three signals due to the same origin in the region 10-25 ppm for the type III. The change in chemical shifts from types I to II is continuous, but that from II to III is discontinuous. The transition points from I to II and from II to III are at pD 8.5 and pD 12.0 respectively, which are in good agreement with the values from Resonance Raman (Kitagawa et al.) and MCD (Rawlings et al.) studies. Present results suggest that the interconversion between I and II is a rapid process and that between II and III is a slow process in NMR time scale. The latter process may contain the replacement of the sixth heme ligand. The largest paramagnetic shifts of the methyl protons of heme in the type I indicate that type I is in high spin state. The spectra of the apoprotein region (0-10 ppm) were also obtained. Their pD-dependence indicates that the structures of the apoprotein in type I and II are more rigid than that of type III. The structural change between I and II is not so remarkable. Signals due to the C-2 proton of His and ϵ -CH₂ proton of Lys could be assigned. A titration curve of the C-2 proton of His shows that in types I and II His 41 locates near the heme moiety and strongly interacts with other groups. Chemical shifts of ϵ -CH₂ of Lys (15 residues in a monomer) ranged in a wide frequency region in types I and II, but concentrate in a narrow region in type III. Further, the interaction of cytochrome c' with SDS was examined and the conversion from type I to a low spin state was observed. The low spin state, however, differs from type III in the pattern of spectra of heme and apoprotein regions.

205 (C14) 標識化合物を利用した¹⁵N NMRによるヘム蛋白質ならびに
その関連モデル錯体の研究.

(京大.工) 森島 績,⁰ 犬伏 俊郎, 米沢 貞次郎.

[序] ヘム蛋白質におけるヘム周辺の環境, 並びにヘム鉄の電子状態に関する知見を得る
目的で, ¹⁵Nを標識したC¹⁵N⁻, イミダゾール-¹⁵N₂を配位子として用い, ヘム鉄に結合した配
位子の¹⁵N NMR常磁性シフトを観測した。殊にCN⁻イオンは広範な酸化型ヘム蛋白質のヘ
ム鉄に強力な阻害剤として配位し, 低スピン(S=1/2)型錯体を与えよという一般性を持つと
共に, ポルフィリン鉄錯体とも反応し, CN⁻を配位子に持つ種々のモデル錯体を与える為,
両者の常磁性シフトが直接比較でき, 情報を総合し得る利点を有する。さらに, ¹⁵N, ⁵⁷Fe
を標識したX^γ-テトラフェニルポルフィリンを用いて還元型低スピン(S=0)錯体の¹⁵N化学シフト,
⁵⁷Feの観測に成功し, ポルフィリン環とFe原子間の結合様式についても併せて報告し
た。

[実験] KC¹⁵N (Prochem, 96.7% ¹⁵N atom), イミダゾール-¹⁵N₂
(Isocommerz, 95% ¹⁵N atom) は市販品を用いた。種々のポルフィリ
ン錯体は合成品, 及び一部市販品を用い, ヘム蛋白質は精製し,
重水素化緩衝液にて調製した。¹⁵N NMR測定には日本電子社製,
PFT-100 (一部, FX-100) (10.14 MHz) を用い, スペクトル巾 10 kHz
8K データポイント, 90°パルス(25 μsec), 繰り返し時間 0.42
sec で測定した(常磁性化合物の場合)。¹⁵N化学シフトは¹⁵NO₃⁻を内
部基準(一部, H¹⁵NO₃を外部基準)に算出した。



[結果と考察]

1. ヘム鉄に配位したC¹⁵N⁻の常磁性シフト。

Fig. 1 にはプロトヘミン錯体及びメソグロ
ビンのシアノ誘導体の¹⁵N NMRスペクトルを
示す。ヘム鉄に配位したC¹⁵Nシグナルはfree
C¹⁵Nとは別に, 500~1100 ppm 低磁場側にシ
フトして観測され, 両者間の交換速度はNMR
の時間スケールに比して十分に遅いことが分
かる。また, このC¹⁵NシグナルはCurie則に従
った温度依存性を示すこと, 及びC¹⁴N⁻(¹⁵N
の天然存在比, 0.37%)を用いた同様な実験
では, この様なシグナルを与えないことから,
常磁性ヘム鉄に配位したC¹⁵N⁻のシグナルに帰
属できる。このC¹⁵Nシフトは, 既報の[Fe(C¹⁵N)]³⁺

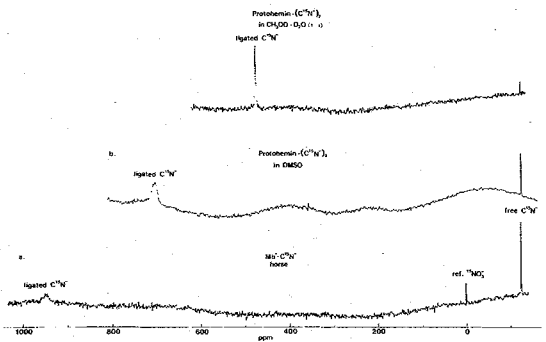
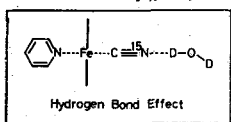


Fig. 1. ¹⁵N NMR spectra of cyano metmyoglobin
and cyano protohemin complexes using ¹⁵N-
enriched KCN. (a) Horse metmyoglobin cyanide
in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.3 at 25°C.
[Mb]=20 mM, 100,000 transients were collected.
(b) (c) Protohemin dicyanide complexes in DMSO
and in CH₃OD+D₂O(1:1). [Hemin]=32 mM, 5,000
transients were collected.

もりしま いさあ, いぬぶし としろう, よねざわ ていじろう.

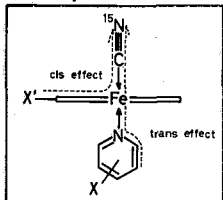
の ^{15}N 常磁性シフト, +770 ppm (25°C)とも良い一致を示す。また異方性磁化率, 錯体構造のデータ等に基づき, 擬コンタクトシフトを算出すると, 約100 ppmの低磁場シフトが得られ, これらへム鉄に配位した C^{15}N シフトには, 400~1000 ppm程度の低磁場コンタクトシフトが含まれるものと考えられる。

種々のへム蛋白質に配位した C^{15}N シフトの議論に先き立ち, モデル化合物, ビス及びモノシアノ錯体で得られた C^{15}N 常磁性シフトの解析結果を以下に要約する。i) 配位



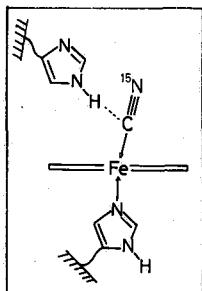
子 C^{15}N は溶媒, CH_3OD , D_2O 等との水素結合により, へム鉄に對する σ -donor性が低下し, その結果常

磁性シフトは減少する。一例としてモノシアノピリジン錯体における C^{15}N シフトの D_2O 添加効果をFig. 2に示した。¹⁾²⁾ ii) モノシアノ錯体において C^{15}N に對しトランス位の配位基(ピリジン, イミダゾール各誘導体の pK_a 値が大きくなる程 C^{15}N シフトは増加する。



(トランス効果)(Fig. 3a)。iii) へム側鎖置換基によるシス効果は小さく, X^{Z} , デューテロ, プロト, ハマト等の錯体で有意な差を与えない(Fig. 3b)。¹⁾

一方, 種々のへム蛋白質に配位した C^{15}N シフト(Fig. 4)は, 面芽ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(556 ppm) < サトウカローム C (Cyt. c)(842 ppm) < ミオグロビン(Mb)(948 ppm) < ヘモグロビン(Hb)(975 ppm; α , 1047 ppm; β)の順に大きくなる。³⁾ この傾向は, 上述のモデル化合物で得られた C^{15}N シフトの性質が



ら, 一義的にはこの順にチチ配位子(His)-Fe間の結合が強くなる(トランス効果)とヒトネオもヒト解釈された。また, これら C^{15}N シフトはそれぞれ蛋白質に固有な pD 依存性を示し, へム近傍の解離性アミノ酸残

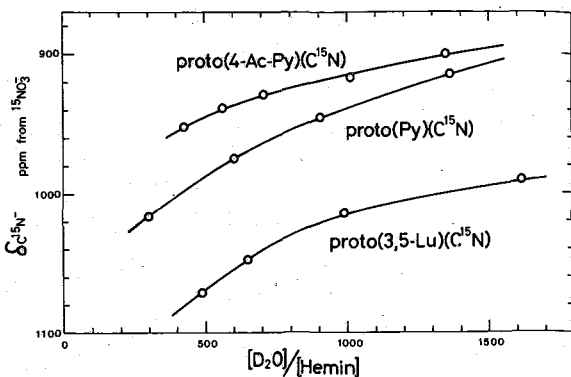


Fig. 2. The effect of D_2O content on the iron-bound C^{15}N shifts for various pyridine-cyano-protohemim complexes. Abbreviations: 4-Ac-Py, 4-acetylpyridine; Py, pyridine; 3,5-Lu, 3,5-lutidine. [Hemin] = ~20 mM, 50,000 scans were collected.

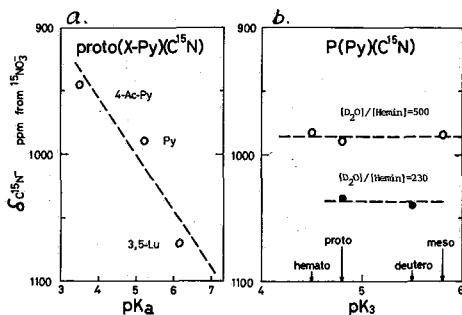


Fig. 3. *trans* and *cis* effects on the iron-bound C^{15}N shifts for pyridine-cyano-hemin complexes. The pK_a values reflect the basicities of porphyrins.

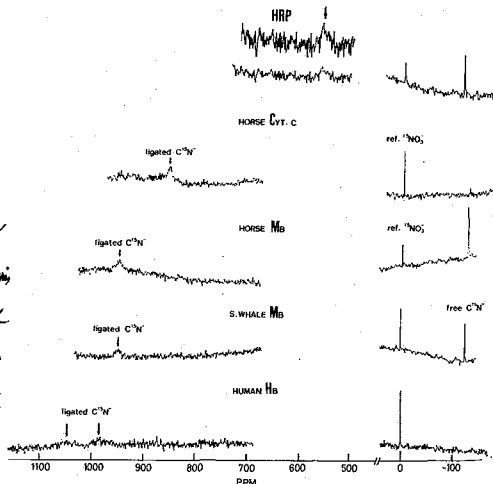


Fig. 4. ^{15}N NMR spectra of various C^{15}N bound hemoproteins. From the top, horse radish peroxidase (HRP), cytochrome c, horse myoglobin, sperm whale myoglobin, and human adult hemoglobin, respectively

基, 殊に Mb の場合は, 遠位 His と軸配位子 C¹⁵N 間の水素結合の存在についての知見を与えた。さらに, intact な赤血球中の Hb に配位した C¹⁵N シフトも観測でき, この方法は生理的条件下での研究にも有用であろう。

2. ヘム鉄に配位したイミダゾール-¹⁵N₂ の常磁性シフト. 一例として, ヘミン錯体と Mb に配位したイミダゾール-¹⁵N₂ の ¹⁵N NMR スペクトルを Fig. 5 に示す。ビスイミダゾール錯体の ¹⁵N シフトは顕著な溶媒効果を示した。また, Mb・Im-¹⁵N₂ では特徴的な pD 依存性を示し, ヘム鉄に配位したイミダゾールの pK 値, ~10 を与えた。これら常磁性シフトの解析については, 発表当日に触れたい。

3. 還元型低スピン-[¹⁵N₄, ⁵⁷Fe]-テトラフェニルポルフィリンビス(アミン)錯体の ¹⁵N 化学シフトと ¹⁵N-⁵⁷Fe スピン結合定数. 種々のビスアミン [¹⁵N₄, ⁵⁷Fe]-TPP は, 7~8 Å の間隔を持つ doublet の ¹⁵N シグナルを与え, これは ⁵⁷Fe を標識していない [¹⁴N₄, ⁵⁶Fe]-TPP で singlet のシグナルを示すことから, 明らかに ¹⁵N-⁵⁷Fe のスピン結合に由来することが分かる。これらの ¹⁵N 化学シフト, 及び ¹⁵N-⁵⁷Fe から, ヘム鉄の電子状態, 並びにポルフィリン鉄の結合状態について議論した。

最後に, ¹⁵N NMR の測定に便宜を計って頂いた, 今成, 松下, 大内の名氏(日本電子), ¹⁵N, ⁵⁷Fe で標識した TPP を合成して頂いた佐藤氏(帝京大薬)に深謝致します。

—文献—

1. I. Morishima, T. Imbushu and T. Yonogawa, *J. Amer. Chem. Soc.*, in press.
2. I. Morishima and T. Imbushu, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, in press.
3. I. Morishima, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, in press.
4. I. Morishima and T. Imbushu, *FEBS. Lett.*, in press.
5. I. Morishima, T. Imbushu and S. Kitagawa, *J. C.S., Chem. Comm.* 投稿中
6. I. Morishima, T. Imbushu and M. Sato, *ibid.*, 投稿中.

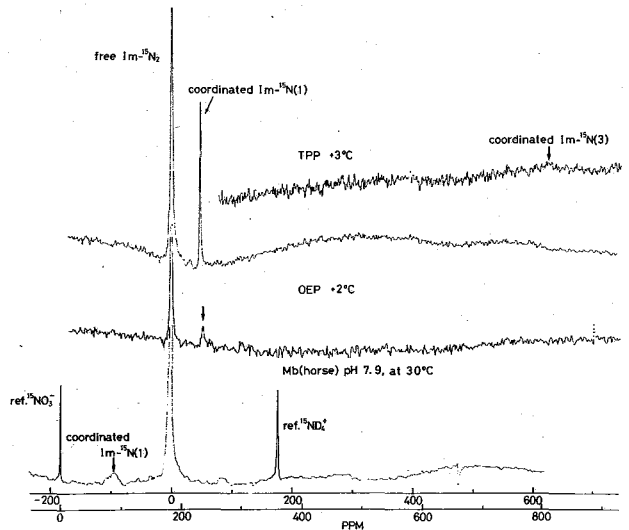


Fig. 5. ¹⁵N NMR spectra of iron-bound ¹⁵N-enriched imidazole for porphyrin- and myoglobin-imidazole complexes. From the top, TPP (Im-¹⁵N₂), OEP (Im-¹⁵N₂) and Mb (Im-¹⁵N₂). In the spectrum of Mb, the ¹⁵N resonance located at 90 ppm from the free imidazole resonance is due to natural abundant peptide ¹⁵N nitrogens of myoglobin.

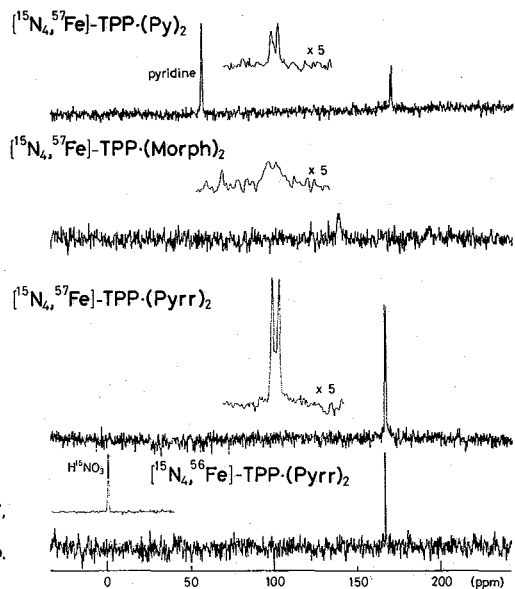


Fig. 6. ¹⁵N NMR spectra of various ferrous bis(amine) complexes of [¹⁵N₄, ⁵⁷Fe]- and [¹⁵N₄, ⁵⁶Fe]-meso-tetraarylporphyrins. From the top, bis(pyridine), bis(morpholine) and bis(pyrrolidine) complexes of [¹⁵N₄, ⁵⁷Fe]-TPP and bis(pyrrolidine) complex of [¹⁵N₄]-TPP.

¹⁵N NMR Studies of Hemoproteins and Their Model Compounds.

Utility of ¹⁵N-Labeled Ligands and Porphyrin

Isao Morishima, Toshiro Inubushi and Teijiyo Yonezawa

Department of Hydrocarbon Chemistry, Faculty of Engineering,

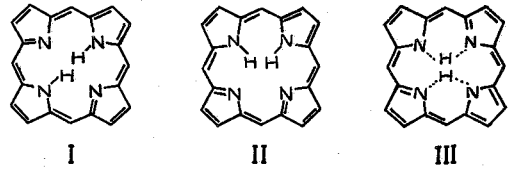
Kyoto University, Kyoto 606, Japan

The studies on the ¹⁵N paramagnetic shifts of the iron-bound C¹⁵N⁻ and imidazole-¹⁵N₂ in various low spin ferric hemoproteins and porphyrin complexes, and the ¹⁵N chemical shifts and ¹J_{15N-57Fe} coupling constants of ferrous low spin bis(amine) complexes of [¹⁵N₄, ⁵⁷Fe]-meso-tetraphenylporphyrin are reported. The cyanide ¹⁵N resonances of C¹⁵N coordinated to the heme-iron atom can be separately detected from the bulk resonance of C¹⁵N⁻, and the chemical shifts for various hemins and hemoproteins are ranged from +450 to +1070 ppm with respect to internal ¹⁵NO₃⁻. The cis and trans ligand effects on the C¹⁵N shifts for di-cyano, mono-cyano-pyridine and mono-cyano-imidazole complexes of proto-, deuterio-, meso-, hemato- and octaethylporphyrins are also investigated. The trans effect induced by a change in the axial ligand is much more pronounced than the cis effect caused by substitution of the porphyrin peripheral groups. Substantial difference in the iron-bound cyanide ¹⁵N shifts in the cyanide complexes of various hemoproteins, the C¹⁵N shifts increasing in the order of horseradish peroxidase(HRP) (+556 ppm) < cytochrome c (+842 ppm) < myoglobin (+948 ppm) < hemoglobin (+975 and +1047 ppm), was interpreted in terms of this trans effect, namely, the larger the heme-bound C¹⁵N shift, the stronger the coordination of proximal histidine (the fifth ligand) to the heme-iron atom. Especially, the characteristic ¹⁵N resonances at +975 and +1047 ppm were found for human adult hemoglobin, which are assigned to the α and β subunits of hemoglobin, respectively. The ¹⁵N isotropic shifts for cyano hemin complexes are also shown to be very sensitive to solvent. Proton donor solvents were most effective to cause upfield bias of the C¹⁵N shift. The sizable ¹⁵N shift induced by pH variation for cyano myoglobin was interpreted in relation to possible involvement of hydrogen bonding between distal histidine and heme-bound cyanide. Furthermore, the heme-bound C¹⁵N resonances of erythrocyte hemoglobins from various species (e.g., rat, rabbit, dog and human) were observed, and these ¹⁵N shifts are also discussed in terms of the Fe-CN binding nature and the electronic structure of heme-iron atom.

The ¹⁵N paramagnetically shifted resonances of the iron-bound imidazole -¹⁵N₂ were observed for ferric low spin complexes of various porphyrin derivatives and myoglobin. These results are shown to serve as a sensitive structural probe of the Fe-ligand binding in hemoproteins and model compounds.

The ¹⁵N chemical shifts and ¹J_{15N-57Fe} coupling constants were observed for ferrous low spin bis(amine) complexes of [¹⁵N₄, ⁵⁷Fe]-meso-tetraphenylporphyrin, and these data are discussed in relation to the effect of axial ligand and the Fe-porphyrin binding profiles.

今世紀の初頭にポルフィリンの基本構造が提出されてから現在まで、様々な方法によってNH水素の位置の固定が試みられてきた。基本的には右記の三種の構造が考えられるが、Iが正しいという説が有力である。メソ位や3位の水素の¹H NMRからは、対称性を考慮することによりIIは排除されるが、IとIIIのどちらであるかを決定することはできない。更に¹Hおよび¹³C NMRスペクトルの温度変化から高温では2個のNHプロトンは速い交換をしていると考えられている。



先に、我々は¹⁵N置換オクタエチルポルフィリン(OEP)の¹⁵N NMRと¹H NMRから、これらの問題に関して直接情報が得られることを示した¹⁾。ここでは更にOEPのモノメチルおよびジメチル誘導体(OEPMeH, OEPMe₂H⁺)にもこの方法を適用した結果を報告する。

(実験) フリーベースのOEP(OEPH₂)は前報¹⁾で述べた方法により¹⁵Nを導入した。OEPMeH, OEPMe₂H⁺の合成は文献²⁾による。¹⁵N NMRの測定にはJEOL-PFT-100を、¹H NMRにはJEOL-FX-100を用いた。

(結果と考察) Fig. 1に示すように、70 Kポルホルム中ではOEPH₂の低温での¹⁵N NMRスペクトルには2本の共鳴線が見られる。高磁場のシグナルはHの結合したNに、低磁場のシグナルはHの結合していないNに帰属される。この事実からIIIの構造は否定され、メシンプロトンが等価であることからIIも否定される。結局、低温ではIの構造をしていることが明らかである。温度を上げていくと¹⁵N NMRの2本線は1本になる。これはイミノプロトンの交換が速くなるためと考えられる。一方、¹H NMRスペクトルにおいては、低温では¹⁵Nとのスピンの結合によりダブルットで現われるが、常温ではクインテットになる。後者のスピン結合定数は前者の1/4である。このことは、イミノプロト

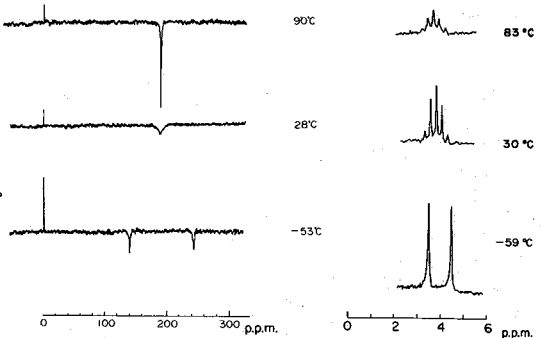


Fig. 1. ¹⁵N (left) and ¹H (NH protons, right) NMR spectra of [¹⁵N₄]-OEPH₂ and its tautomeric structures at and above room temperatures.

かわのけいいち・おさきゆきひろ・きょうごくよしまさ・おごしひさのぶ・すぎのひとひろ
し・よしだせんいち

ンが分子内で4個の ^{15}N とスピンの結合し、時間平均によって結合定数が半になるという考えで説明される。逆に ^1H とカップルした状態で ^{15}N NMRを観測すると、高温でスピンの結合定数が低温の場合の半のトリプレットとなり、上記の考えが支持される。TFA溶液中は ^{15}N NMRスペクトルには常温で高磁場に1本の共鳴線が現われる (Table 1)。これはOEPH₂に更に2個のプロトンが入ってOEPH₄²⁺になり、全2のNにHが結合して等価になるためと考えられる。

OEPのモノメチル誘導体では、低温と常温で3本の ^{15}N シグナルが現われ、高磁場側から $>\text{N}-\text{CH}_3$ 、 $>\text{N}-\text{H}$ 、 $>\text{N}$ にそれぞれ帰属される。(Fig. 2)。 ^1H NMRスペクトルにおいては、低温で鋭いダブルレット、常温でも巾広いダブルレットを与える。これらの事実は、低温、常温を通じてイミノプロトンが $\text{N}-\text{CH}_3$ の向かい側のNに結合していることを示している。高温では ^1H 、 ^{15}N NMRの両スペクトルが巾広くなるが、 $[\text{N}_4]$ -OEPH₂のイミノプロトンも高温ではブロードであることからこれは分子内イミノプロトンが交換するためと考えられる。TFA溶液中では3本の ^{15}N シグナルが高磁場に現われ $>\text{N}-\text{CH}_3$ とその両隣の $>\text{N}-\text{H}$ 、向かい側の $>\text{N}-\text{H}$ に各々帰属される (Table 1)。

OEPのジメチル誘導体では、2本の ^{15}N シグナルが現われる (Fig. 3)。高磁場側はOEPMeHの $>\text{N}-\text{CH}_3$ の位置であるが、低磁場側は $>\text{N}-\text{H}$ と $>\text{N}$ のまん中の位置である。これから直ちにOEPMe₂H⁺のイミノプロトンは高温でも低温でも速い交換をしていることが考えられる。イミノプロトンの ^1H NMRスペクトルは常温と低温で通常の半のJをもつトリプレットであり、交換が分子内の2つの ^{15}N の間で行なわれていることを示している。高温での巾広化は分子間の交換によるものであろう。 ^1H とカップルした状態で ^{15}N を観測すると、常温で半のJをもつダブルレットになり上の考えを支持する。TFA溶液中では高磁場に2本の ^{15}N シグナルが現われ、やはり $>\text{N}-\text{H}$ と $>\text{N}-\text{CH}_3$ に帰属される (Table 1)。

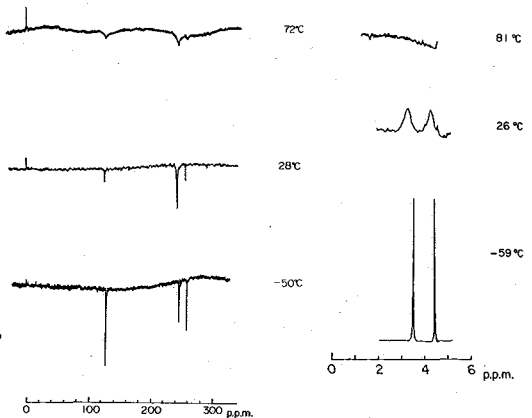


Fig. 2. ^{15}N and ^1H NMR spectra of $[\text{N}_4]$ -OEPMeH and its tautomeric structure.

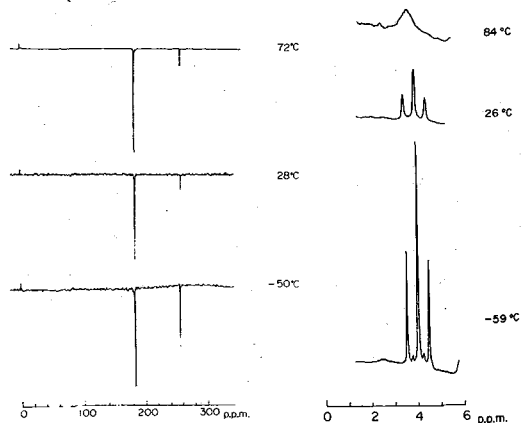


Fig. 3. ^{15}N and ^1H NMR spectra of $[\text{N}_4]$ -OEPMe₂H⁺ and its tautomeric structures.

以上のようにOEPH₂とそのメチル誘導体では互変異性の状態が異なっている。このことは、メチル基の立体障害やメチル基導入によるポルフィリン面の平面からのずれ、更にOEPMe₂H⁺の場合にはモノカチオンであることが影響しているであろう。

OEPの数種の反磁性金属錯体についても¹⁵N NMRを測定した(Table 2)。Ni錯体で大きく高磁場シフトしていることが顕著である。¹³C NMRにおいてもNi錯体は他の錯体と異なりα炭素が大きく高磁場シフトしている。

OEPの金属錯体に関しては、メチンプロトンの¹H NMRスペクトルに微細構造が観測される。Fig. 4. に示すように、フリーのOEPでは、メチンプロトンはvicinal 2個の¹⁵Nとスピンの結合してトリプレットであるが、ZnとCdの錯体では7本組になり、Ni錯体にも別の微細構造が出ている。更に、Mg錯体では肩のあるトリプレットになり、Fe(II)錯体ではあまり微細構造は観測されなかった。これらの微細構造は中心金属を経由したN-N間のスピンの結合による。いわゆる virtual coupling とみられる。

(謝辞) 実験の一部に協力していただいた徳島大・教養の吉川研一氏に感謝します。

(文献)

- 1) 河野, 尾崎, 京極, 生越, 杉本, 吉田, 日化春季年会 '77 大阪

K. Kawano, Y. Ozaki, Y. Kyogoku, H. Ojoshi, H. Sugimoto, Z. Yoshida, J.C.S. Chem. Comm., 226 (1977)

- 2) R. Grigg, G. Shelton, A. Sweeney, and A. W. Johnson, J.C.S. Perkin I, 1789 (1972)

Table 1. ¹⁵N Chemical Shifts and J(¹⁵N, ¹H) of OEP-¹⁵N₄ Derivatives

Compounds	Solvent	Temp.	Chemical Shifts* (ppm)	Assignments	J(¹⁵ N, ¹ H) (Hz)
OEPH ₂ - ¹⁵ N ₄	CDCl ₃	28° -53°	191.0	N ≠ NH	24
			139.7	N	97
			243.3	NH	
OEPH ₄ ²⁺ - ¹⁵ N ₄	TFA	r.t.	253.7	NH	93
OEPMeH- ¹⁵ N ₄	CDCl ₃	r.t.	125.8	N	100
			243.3	NH	
			256.0	N-CH ₃	
OEPMeH ₃ ²⁺ - ¹⁵ N ₄	TFA	r.t.	251.3	NH	92
			252.9	N-CH ₃	
			259.0		
OEPMe ₂ H ⁺ - ¹⁵ N ₄	CDCl ₃	r.t.	183.5	N ≠ NH ⁺	48
			256.3	N-CH ₃	
OEPMe ₂ H ₂ ²⁺ - ¹⁵ N ₄	TFA	r.t.	254.5	NH	
			260.8	N-CH ₃	

*Shifts are relative to external NH₄⁺¹⁵NO₃ in DMSO-d₆.

Table 2. ¹⁵N-Chemical Shifts of Metal Complexes of OEP-¹⁵N₄

Compounds	Solvent	Chemical Shifts (ppm)*
Mg(OEP)- ¹⁵ N ₄	CDCl ₃	180.4
Fe ²⁺ (OEP)(Py) ₂ - ¹⁵ N ₄	Py-d ₅	187.9
Ni(OEP)- ¹⁵ N ₄	CDCl ₃	257.0
Zn(OEP)- ¹⁵ N ₄	CDCl ₃ + Py	179.2
Cd(OEP)- ¹⁵ N ₄	Py-d ₅	173.1

*Shifts are relative to external NH₄⁺¹⁵NO₃ in DMSO-d₆.

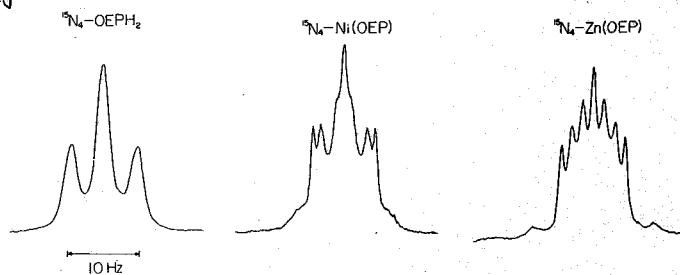


Fig. 4. ¹H NMR spectra of the methine protons in the metal complexes of [¹⁵N₄]-OEP

Nuclear Magnetic Resonance Spectra of ^{15}N -Enriched Octaethylporphyrin and its Derivatives

K. Kawano, Y. Ozaki, and Y. Kyogoku

(Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Osaka 565)
and H. Ogoshi, H. Sugimoto, and Z. Yoshida

(Department of Synthetic Chemistry, Kyoto University, Yoshida,
Sakyo-ku, Kyoto 606)

97% ^{15}N enriched octaethylporphyrin, [$^{15}\text{N}_4$]-OEPH₂, and its mono and di N-methyl derivatives were synthesized by the use of Na $^{15}\text{NO}_2$ as a starting material. ^{15}N NMR at 10.09 MHz and ^1H NMR at 100 MHz were obtained for the compounds and the complexes of [$^{15}\text{N}_4$]-OEP with Mg, Zn, Cd, Ni, and Fe(II).

In the ^{15}N NMR spectrum of [$^{15}\text{N}_4$]-OEPH₂ in CDCl_3 two distinct resonances appear at lower temperatures, and only a signal is seen just at the central position of the two resonances at and above room temperatures. The resonance of the central protons splits to a doublet due to coupling to a ^{15}N nucleus at lower temperatures, and to a quintet arising from coupling to four ^{15}N nuclei at and above room temperatures. These evidences indicate that two central hydrogens move around on the four nitrogen atoms rapidly enough to maintain four fold symmetry on the NMR time scale at higher temperatures, but they are fixed on two nitrogen atoms at lower temperatures (Fig.1).

The temperature dependence of the ^{15}N and ^1H NMR spectra of mono and di N-methyl derivatives of [$^{15}\text{N}_4$]-OEPH₂, [$^{15}\text{N}_4$]-OEPMeH and [$^{15}\text{N}_4$]-OEPMe₂H⁺, were also measured in a similar manner. From the results it is concluded that the hydrogen of OEPMeH is fixed on the nitrogen located opposite to N-Me, while that of OEPMe₂H⁺ exchanges rapidly between two nitrogens at and below room temperatures. (Fig. 2,3)

The ^{15}N resonance of the nickel complexes of [$^{15}\text{N}_4$]-OEP is distinct from the other diamagnetic metal complexes and located remarkably high field (Table 2). Similar anomalous shift is observed for the ^{13}C resonance of the C_α carbon of the Ni-complex.

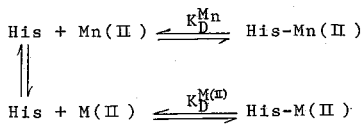
The proton spectrum of the methine proton of [$^{15}\text{N}_4$]-OEPH₂ is shown to be coupled to two ^{15}N nuclei leading to a triplet. In the spectra of the metal complexes, however, more complicated patterns are shown in Fig.4. The fine structures are due to the "virtual coupling" between ^{15}N nuclei via the central metal ion. The extent of the coupling remarkably depends on the metal ions (Fig.4).

207 (C16) アセテートキナーゼと2価金属イオン(Mg, Ca, Mn, Hg)との特異的相互作用

埼玉大・工 飯田武揚・谷久司・三田村孝

1.はじめに アセテートキナーゼはATPを使って酢酸あるいはプロピオン酸をリン酸化する酵素であり、この反応を進行させるのにMg(II)あるいはMn(II)イオンを必要とする。一方Hg(II)はこの酵素の強力な阻害剤で $5 \times 10^{-6} M$ 存在すると90%の反応が阻止されることが知られている。これまでのESRと水のHの緩和速度の研究から酵素の活性中心で金属イオンを配位させているのはヒスタジンのイミダゾール環と α -アミノ酸のカルボキシル基の可能性が強いことが示唆されてきた。また ^{13}C , ^{31}P の緩和速度からもアセテートキナーゼの反応の過程に反応中間体と考えられる錯合体のコンフォメーションについても研究を行ってきた。今回の報告ではより基本にもどって酵素-金属間のbinary complexにおいて、2価金属イオンが酵素の活性中心とどのように相互作用し、酵素とどのような特異性をもって結合しているのかについてESRを中心に研究を進めた。最初にMn(II)をプロブとしてL-ヒスタジンと2価金属イオンとの解離平衡定数(K_D)とそのpH変化についての研究をおこない、これを土台にして酵素と2価金属イオンとの相互作用を検討した。

$MnCl_2$ をTris-Clの緩衝液に溶かしてESRスペクトルを取ると $g=2.0$ に6本のhfsが観測されるが、この6本のhfsの高さはfree Mn(II)の量に比例する。そこで $[Mn(II)]_{free}$ の検量線を作り、それを基にしてMn(II)-histidineのbinary complexの K_D とそのpH変化を調べることができ、 $Mg(II)$, $Ca(II)$, $Hg(II)$ は直接ESRにかからないので、Mn(II)と競合させて K_D とそのpH変化を次のようにして決定した。すなわちMn(II)と2価金属イオンM(II)と競合させた左のような平衡系を考えると



(1), (2)より[His]を消去すると

$$K_D^{\text{Mn}} = \frac{[\text{His}][\text{Mn}]}{[\text{His-Mn}]} \quad (1) \quad K_D^{\text{M}} = \frac{[\text{His}][\text{M}]}{[\text{His-M}]} \quad (2)$$

The competitive equilibrium between histidine and the two divalent cations.

$$K_D^{\text{M(II)}} = K_D^{\text{Mn}} \frac{[\text{His-Mn}]}{[\text{Mn}]} \cdot \frac{[\text{M}]}{[\text{His-M}]} \quad (3)$$

式(3)において[Mn]は実測されるし、 $[\text{His-Mn}] = [\text{Mn}]_{total} - [\text{Mn}]$, および $[\text{His}]_{total} = [\text{His}] + [\text{His-M}] + [\text{His-Mn}]$ の関係と[His]は(1)より既知の K_D^{Mn} を使い、 $[\text{M}] = [\text{M}]_{total} - [\text{His-M}]$ より $K_D^{\text{M(II)}}$ が決定できる。

2.実験方法 acetate kinaseはE. Coliより抽出精製されてSigma Chem. Co.より市販され、活性が $180 \pm 10 / \text{mg}$ of proteinのものである。L-ヒスタジン, ATPは和光純薬より購入した。用いた試薬はすべて試薬特級のものである。測定に用いた溶液はTris-Cl 30mM, pH 7.4, KCl 0.1M, 酵素 50~70 μ M, $MnCl_2$ 50~60 μ Mの組成をもつもので、2価金属はすべて塩化物を用い、5~80 μ Mと変化させた。ESRスペクトルの測定は60 μ lの溶液を内径0.5mmの石英キャピラリー-試料管に入れ、Varian E-line EPR spectrometer

いいだ たけあき・たに ひさし・みたむら たかし

で X-バンドで行った。測定条件は mod. width 8 gauss, 出力 5 mW, 周波数 9.54 GHz, 磁場は 2900-3700 gauss 掃引した。試料温度は $22 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。

3. 結果 L-ヒスタジンは Mn(II) の K_D の pH 変化を Fig. 1 に示す。Fig. 1 からわかるようにヒスタジンのイミダゾール環の NH 基の解離は pH 7.0 あたりにあるので、このあたりから K_D が急激に減少し始めるのは Histidine-Mn(II) complex の形成を示唆している。これから計算される K_D^{Mn} の値は $1.58 \times 10^{-2} \text{ M}$ となる。一方 Mg(II) と Mn(II) と競合させる前述の方法で Histidine-Mg(II) の K_D^{Mg} を求めると $1.39 \times 10^{-1} \text{ M}$ という値を得、 Mn(II) のそれよりも一桁大きくなっている。acetate-Mn(II) complex の K_D は $1.10 \times 10^{-1} \text{ M}$ であることは前に報告したが、 Mg(II) とヒスタジンの相互作用は弱いものである。しかし一方 Hg(II) はヒスタジンに強く結合し、Table 1 にあるように K_D^{Hg} は $2.70 \times 10^{-3} \text{ M}$ である。しかも Hg(II) をヒスタジンに加えてゆくと白沈を生じ、溶解度積 5.33 の比較的難溶性の complex を形成する。 Ca(II) はヒスタジンとほとんど相互作用しておらず、 K_D^{Ca} もこの方法では決定できないほど弱い結合をしているという結果を得た。

アセテートキナーゼ (以下 AK と略す) と Mn(II) との平衡系において Hughes-Klotz plot から binding site (n) を求めた結果、 $n = 1.0 \pm 0.1$ という結果を得、AK の分子量が 46,000 と比較的分子量の大きくない酵素であると考えると AK は 1 分子に 1 個の binding site をもつ酵素であると考えられる。Fig. 2 には AK-Mn(II) complex の K_D^{Mn} の pH 変化を示した。これからわかるように K_D^{Mn} は pH の増加とともに減少してゆき、変化の曲線の傾斜は pH 7.0 と 7.8 で K_D^{Mn} 一定の点線と交差する。このフラットな部分の K_D^{Mn} は $1.17 \times 10^{-4} \text{ M}$ であり、 K_D^{Mn} のこのような pH 変化は酵素に結合した Mn(II) の ligand が 2 種類存在していることを示唆している。AK に対して Mg(II) は Table 2 に示したように $K_D^{\text{Mg}} = 1.52 \times 10^{-3} \text{ M}$ と Mn(II) に比べて一桁大きくなっており Mg(II) の方が Mn(II) にくらべて酵素活性力が大きいことを考えると興味深い結果と考えられる。 Hg(II) の解離定数は $1.08 \times 10^{-3} \text{ M}$ ときわめて小さくなり、AK と強く結合していることがわかる。 Ca(II) については K_D の値を一応求めらるるが、酵素の活性中心にたいして結合するので問題を残している。

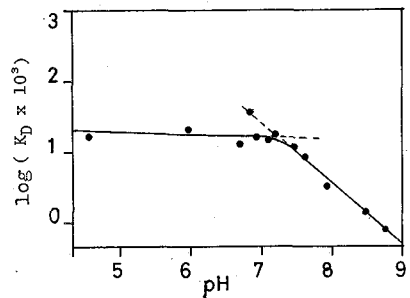


Fig. 1 Variation of K_D of the manganese-histidine complex with pH, at 22°C . The dissociation constant starts to decrease at pH 7.0, suggesting the formation of the manganese-histidine complex.

Table 1: Comparison of the Dissociation Constants (K_D) for Various Complexes Derived by ESR measurements

Complex	K_D (M)
Histidine-Mn(II)	1.58×10^{-2}
Histidine-Mg(II)	1.39×10^{-1}
Histidine-Hg(II)	2.70×10^{-3}

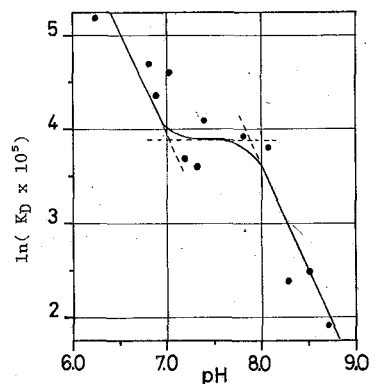


Fig. 2 Variation of K_D of the manganese-acetate kinase complex with pH, at 20°C . The titration curve intersects tangents of zero at pH 7.0 and 7.8.

4. 考察

acetate kinase と 2 価金属イオンとの相互作用を Mn(II) の ESR スペクトルの hfs エローブとして研究した。AK の活性中心の金属配位子の一つと考えられるイミダゾール環をもつ L-ヒスタジンは Mn(II) と $K_D^{Mn} = 1.58 \times 10^{-2} M$ という解離定数をもつ His-Mn(II) binary complex を形成する。ところがこれが AK との binary complex になると $K_D^{Mn} = 1.17 \times 10^{-4} M$ と二桁の安定化が見られる。これは Mn(II) が酵素の活性中心で単にイミダゾール環に結合しているばかりではなく、Fig.3 に示すような少なくとももう一つの配位子 Y にも結合してより安定な錯体を形成していることを示唆している。事実 Fig.2 の K_D^{Mn} の pH 変化から見て $pK_a = 7.0$ のところのイミダゾール環の NH 基の他に $pK_a = 7.8$ のところの変化は他のもう一つの配位子が関与していることを示唆している。この配位子 Y は現在のところ α-アミノ酸のカルボキシル基か Sulfhydryl group の可能性があり、今後の研究を待たねばならない。Mg(II) の K_D は上記の方法で決定する限り His-Mg(II) で $1.39 \times 10^{-1} M$, acetate kinase-Mg(II) で $1.52 \times 10^{-3} M$ といわずとも Mn(II) complex より一桁程度高い K_D をもっている。kinetics の結果からは Mg(II) は Mn(II) と同じ site に結合することから分っているのだから、Mn(II) との競合によって測定された K_D は一応信頼すべきものと思われる。

一方 Hg(II) は L-ヒスタジンとかなり安定な complex を作り、多量に Hg(II) を加えると白沈が生じること述べたが、この His-Hg(II) complex の $K_D^{Hg} = 2.7 \times 10^{-3} M$ で、AK-Hg(II) では $1.08 \times 10^{-5} M$ と小さい。この事実は Hg(II) が Mn(II) の site (Fig.3) を competitive に占めてしまうということと考えれば一応の説明がつくが、この問題は結論を出せるまでにいたっていない。なぜなら His-Hg(II) の binary complex においてもイミダゾール環の NH 基と結合する可能性の他にヒスタジンのカルボキシル基と結合して錯体形成をする可能性もあり、さらに研究の必要がある。AK の配位子として Y が SH 基の可能性も持っていることを示唆したが、そうすれば SH 基と Hg(II) との結合はかなり強力なものとなり、Hg(II) の強い阻害剤としての機能が説明できる。Hg(II) が Mn(II) と競合していることは実験より明らかである。Ca(II) は AK とは相互作用していることは明らかだが、必ずしも Mn(II) site と競合しているかどうかは証明されていない。Table 3 には 2 価金属イオンの電気陰性度とイオン半径を示してある。 K_D はこれらの値と何らかの関係があることは確かだと思われる。

Table 2 : Comparison of the Dissociation Constants (K_D) for Acetate Kinase-Metal(II) Binary Complexes

Complex	K_D (M)
Acetate Kinase-Mg(II)	1.52×10^{-3}
Acetate Kinase-Mn(II)	1.17×10^{-4}
Acetate Kinase-Hg(II)	1.08×10^{-5}
Acetate Kinase-Ca(II)	

一方 Hg(II) は L-ヒスタジンとかなり安定な complex を作り、多量に Hg(II) を加えると白沈が生じること述べたが、この His-Hg(II) complex の $K_D^{Hg} = 2.7 \times 10^{-3} M$ で、AK-Hg(II) では $1.08 \times 10^{-5} M$ と小さい。この事実は Hg(II) が Mn(II) の site (Fig.3) を competitive に占めてしまうということと考えれば一

応の説明がつくが、この問題は結論を出せるまでにいたっていない。なぜなら His-Hg(II) の binary complex においてもイミダゾール環の NH 基と結合する可能性の他にヒスタジンのカルボキシル基と結合して錯体形成をする可能性もあり、さらに研究の必要がある。AK の配位子として Y が SH 基の可能性も持っていることを示唆したが、そうすれば SH 基と Hg(II) との結合はかなり強力なものとなり、Hg(II) の強い阻害剤としての機能が説明できる。Hg(II) が Mn(II) と競合していることは実験より明らかである。Ca(II) は AK とは相互作用していることは明らかだが、必ずしも Mn(II) site と競合しているかどうかは証明されていない。Table 3 には 2 価金属イオンの電気陰性度とイオン半径を示してある。 K_D はこれらの値と何らかの関係があることは確かだと思われる。

BINARY COMPLEX

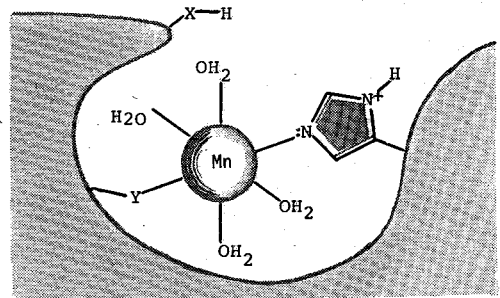


Fig. 3 The proposed structure of the binary complex in the active site of acetate kinase.

Table 3 : Comparison of the Electronegativity and the Ion Radius of Divalent Cations

Ion	Electronegativity	Ion Radius (Å)
Ca(II)	1.0	0.99
Mg(II)	1.2	0.65
Mn(II)	1.5	0.80
Hg(II)	1.9	1.10

Magnetic Resonance Studies on Specific Interactions
of Divalent Metal-Ions with Acetate Kinase

Takeaki A. Iida, Hisashi Tani and Takashi Mitamura

Department of Applied Chemistry, Saitama University,
Shimo-okubo, Urawa, Saitama-ken, 338

The specific interaction of histidine with Mn(II) has been initially examined by measurements of electron paramagnetic resonance (EPR) spectra. The dissociation constant (K_D) of the histidine-Mn(II) complex decreases at pH 7.0 with an increase in pH, suggesting the formation of the His-Mn(II) binary complex (Fig.1). The dissociation constants of the histidine-Mg(II) and histidine-Hg(II) complexes were determined from competitive binding studies with manganese. The results were summarized in Table 1. It has also been shown by direct binding experiments with EPR that acetate kinase (from E.Coli) binds one manganese ion per mol with a dissociation constant of $1.17 \times 10^{-4} M$ at 22°C. The change in the dissociation constant of the acetate kinase-Mn(II) complex with pH reveals two pK_a values, 7.0 and 7.8, possibly assigned to an imidazole group and to an α -amino group or a sulfhydryl group, respectively. The dissociation constant for the acetate kinase-Mg(II) was found to be $1.52 \times 10^{-3} M$. The addition of $1.1 \times 10^{-5} M$ of $HgCl_2$ inhibits 90% of the over-all reaction. Binding studies revealed that mercury binds to the manganese-binding site with K_D equal to $1.08 \times 10^{-5} M$. The dissociation constants of the acetate kinase-metal(II) binary complexes were summarized in Table 2. The relation between the K_D s of various metal complexes and the electronegativity of the divalent cations was discussed.

References

- M.Cohn, J.Townsend, *Nature*, 173, 1090 (1954)
A.S.Mildvan, M.Cohn, *J. Biol. Chem.*, 240, 238 (1965)
R.S.Anthony, L.B.Spector, *J. Biol. Chem.*, 245, 6739 (1970)
R.S.Anthony, L.B.Spector, *ibid* 246, 6129 (1971)
R.S.Anthony, L.B.Spector, *ibid* 247, 2120 (1972)
A.S.Mildvan, T.Nowak, C.H.Fung, *Annal. New York Acad. Sci.* 222, 192 (1973)

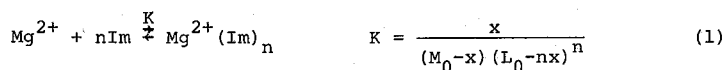
The imidazole-metal ion interactions are of prime biological importance in that the principal sites on the protein molecule responsible for metal binding are the imidazole groups.¹ Some imidazole-metal interactions have been reported with Cu²⁺,² Hg²⁺,³ Zn²⁺,^{4,5} Co²⁺,⁵⁻⁷ Fe²⁺,⁷ and Ni²⁺.⁷

We would like to report evidence concerning the existence of a 1:2 Mg²⁺-imidazole complex, to our knowledge the first example of an alkaline earth metal-imidazole interaction.

Comparison of the proton magnetic resonance spectrum (taken on a Hitachi R-20A, permanent magnet 60 MHz) of imidazole in acetone with similar solutions to which varying amounts of Mg(ClO₄)₂ have been added indicates a gradual downfield shift in the 2-CH and 4,5-CH resonances of imidazole. No 1-NH signal was observed for the imidazole concentration used (approximately 0.1 M). Because of the rapid exchange of the 1-N proton, 4-H and 5-H are magnetically equivalent. All ¹H NMR shifts were measured at 34 °C.

The coordination number, n, the equilibrium constant, K, and the limiting shift, Δ_C, were determined by simulating the ¹H NMR chemical shifts of both 2-H and 4,5-H at constant imidazole concentration varying the Mg(ClO₄)₂ concentration.

Following Wang and Li⁴ for a 1:n Mg²⁺-imidazole complex



where x is the concentration of complex and M₀ and L₀ are initial concentrations of Mg(ClO₄)₂ and imidazole, respectively. For the observed chemical shift ν_{obsd}

$$\nu_{\text{obsd}} = \nu_f + nx(\nu_c - \nu_f)/L_0 \quad (2)$$

where ν_f and ν_c are the uncomplexed and complexed resonances, respectively. Equation 2 can be rewritten in terms of Δ=(ν_{obsd}-ν_f) and Δ_C=(ν_c-ν_f) as

$$\Delta = (nx/L_0)\Delta_C \quad (3)$$

Plots of Δ vs. M₀ at constant L₀ are shown in Figure 1 with the calculated curves. In order to determine n, K, and Δ_C from the observed shift, the computer simulation was used. A computer program calculates for given M₀ and L₀ and for initial values for n, K, and Δ_C a value for Δ which fulfills eq 1 and 3. This is repeated for all the metal ion concentrations, and the calculated shifts are compared with the experimental results.

みうら こういち, ふくい ひろゆき, さとうしゅういす

The program then changes in a systematic way the values of n , K , and Δ_C and repeats the above process until a best fit (in a least-squares sense) between the calculated and experimental data is obtained.⁸ The results are given in Table I. From the results

Table I. Best fitted values for parameters, n , K , and Δ_C ^a

	2-H	4,5-H
n	1.993	1.798
$\log K$	4.32	3.67
Δ_C (ppm) ^b	-0.50	-0.23
σ (ppm) ^c	0.003	0.002

^a Measured at 34 °C. $M_0=0.0990$ M, for varying $Mg(ClO_4)_2$. ^b The negative sign indicates a down field shift of the complexed imidazole with respect to metal free solution. ^c The standard deviation between the calculated and experimental Δ $\sigma = [\sum_i^N (\Delta_{i,obsd} - \Delta_{i,calcd})^2 / N]^{1/2}$.

listed in Table I, the coordination number, n , seems to be 2. In order to confirm this, the best fitted $\log K$ and Δ_C and the standard deviation, σ , between the calculated and experimental Δ were calculated varying the coordination number from one to six. The results are given in Table II. It is evident that the coordination number is two. The theoretical shifts for 2-H and 4,5-H were calculated using the best fitted K and Δ_C in Table II corresponding to a 1:2 complex formation. The theoretical curves are shown in Figure 1, indicating excellent fitting between the calculated and experimental shifts.

Table II. Best fitted values for K and Δ_C , for varying n

n	2-H			4,5-H		
	$\log K$	Δ_C (ppm)	σ (ppm)	$\log K$	Δ_C (ppm)	σ (ppm)
1	∞^a	-0.51	0.070	∞^a	-0.22	0.025
2	4.32	-0.50	0.003	3.65	-0.23	0.004
3	4.41	-0.59	0.020	4.02	-0.28	0.010
4	5.23	-0.67	0.024	4.82	-0.33	0.012
5	6.14	-0.74	0.026	5.70	-0.37	0.013
6	7.09	-0.81	0.027	6.61	-0.41	0.013

^a $\log K$ is greater than 30.

The same equilibrium constant must be obtained for 2-H and 4,5-H. However in our results, the logarithms of K are 4.32 and 3.65 for 2-H and 4,5-H, respectively. This difference is due to the experimental error. It is reasonable to assume that $\log K = 4.0 \pm 0.4$ as the mean of the two results.

We do not have any immediate suggestions concerning the biochemical significance of such a highly specific complex between imidazole and Mg^{2+} . One may note that the diamagnetic ions (Mg^{2+} , Ca^{2+}) were found not to interact with the adenine ring of ATP.⁹ However, recently Glassman et al.¹⁰ predicted by using the generalized perturbation theory that the Mg^{2+} and Ca^{2+} ions may interact with the ring nitrogens of ATP. Recent ¹H NMR study by Granot and Fiat¹¹ implied that the diamagnetic ions interact with the ATP ring. We are planning the ¹H NMR study of (Mg^{2+} , Ca^{2+})-adenine systems.

All the computations were performed using an OKITAC-4500 computer.

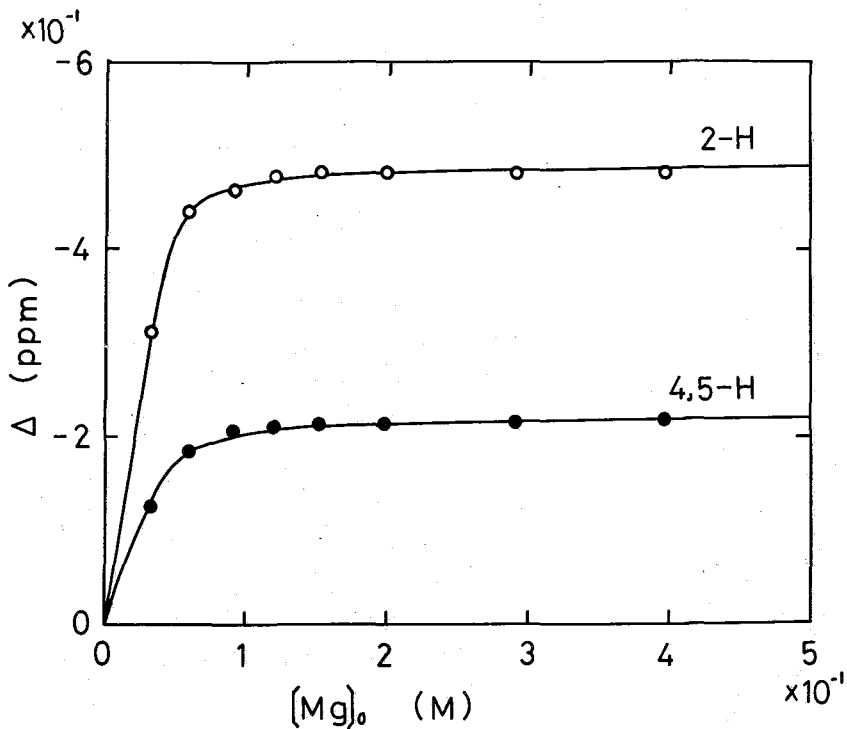


Figure 1. Measured and calculated proton shifts for 2-H (o) and 4,5-H (●) in the Mg^{2+} -imidazole system at $[Im]_0 = 0.0990$ M with varying $[Mg]_0$. The data were best fitted for a 1:2 Mg^{2+} -imidazole complex formation by means of the least-squares method described in the text.

References and Notes

1. C. Tanford, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 211 (1952).
2. W. L. Koltun, M. Fried, and F. R. N. Gurd, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 233 (1960).
3. P. Brooks and N. Davidson, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 2118 (1960).
4. S. M. Wang and N. C. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 4592 (1966).
5. L. S. Kan and N. C. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 281 (1970).
6. A. Fratiello, R. E. Schuster, and G. Bartolini, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 2304 (1970).
7. M. Wicholas, R. Mustacich, B. Johnson, T. Smedley, and J. May, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 2113 (1975).
8. S. Shimokawa, H. Fukui, J. Sohma, and K. Hotta, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 1777 (1973).
9. J. A. Happe and M. Morales, *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 2077 (1966).
10. T. A. Glassman, G. Klopman, and C. Cooper, *Biochemistry*, 12, 5013 (1971).
11. J. Granot and D. Fiat, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 70 (1977).

Evidence for a Imidazole-Magnesium(II)

Complex by ^1H NMR

K. Miura*, H. Fukui, and S. Sato
Kitami Institute of Technology,
165 Koencho, Kitami 090, Japan

Abstract: The ^1H NMR chemical shifts in the Mg^{2+} -Imidazole system have been investigated. The formation of a 1:2 Mg^{2+} -imidazole complex was established. The equilibrium constant and the limiting shift were calculated for 2-H and 4,5-H by the least-squares method. As the reasonable equilibrium constant, K , $\log K=4.0\pm 0.4$ was obtained.

NOEをランタニドプローブ法と組み合わせた新しい構造解析法
—水溶液中のNMNのConformation—

○老田 哲也, 稲垣 冬彦, 宮沢 辰雄 (東大・理・生化)

目的

生体分子の水溶液中における構造を調べる方法としてNMRは有効な手段であるが、われわれは今までにいくつかのヌクレオチドの構造解析を行なうために、ランタニドイオンによる分子構造の情報をスピ結合定数と組み合わせた、ランタニドプローブ法を適用してきた。ランタニドプローブ法は、リボース環のpuckeringやexocyclicの部分についての異性体の構造や存在比を、互いに相関のついた形で決める事のできる有力な方法の一つである。しかし、ヌクレオチドのbaseの向きに関わるN-glycosyl結合まわりについての異性体の構造やその存在比を求めるためには定量性に欠け、満足な結果が得られない事があった。そこで今回はランタニドプローブ法から得られるデータとは異なった種類の、分子構造に関する情報を得るためにNuclear Overhauser Effect (NOE)の実験と解析を併せて行ないbaseのsyn-anti平衡までも含むヌクレオチドの全体構造を定量的に決定する事を試みた。

分子構造を反映するデータとしては

- ①スピ結合定数
- ②ランタニドイオン[Pr(III), Eu(III)]によるシフト
- ③ランタニドイオン[Gd(III)]による緩和速度の増加
- ④NOE

の4種があるが、このうち①、④は分子の局所構造に、②、③は分子の全体構造に依存するものである。ここで扱ったヌクレオチドのひとつNicotinamide Mononucleotide (NMN) はいくつかのConformerが相互変換しているflexibleな分子であるため、①～③だけのデータでは定量的にその全体構造を決めるには不十分である。また④のNOEだけでも定量性をもち結果を得る事は不可能である。したがって①～④のすべてを用いた分子構造解析を行なう事が必要である。

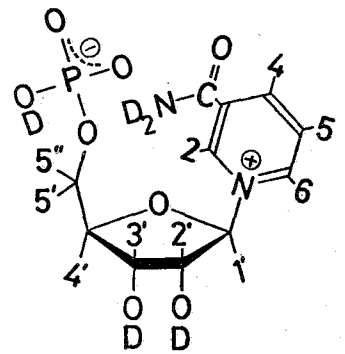


Fig.1 The structure of NMN

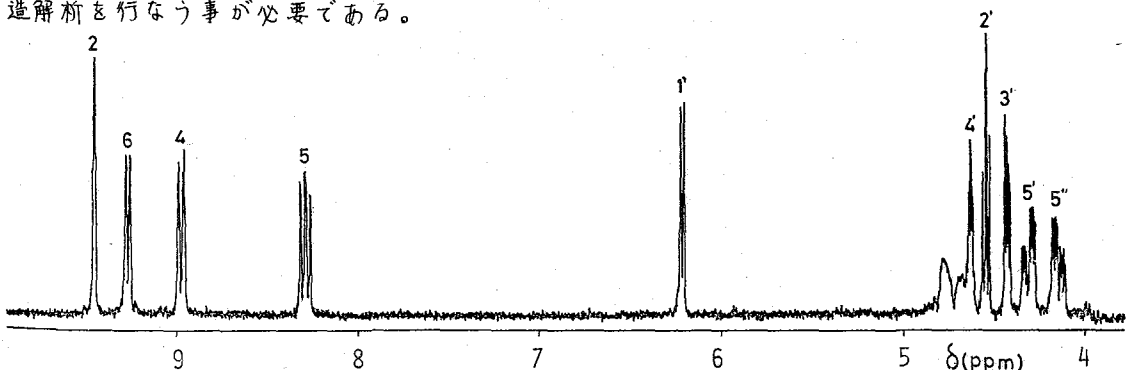


Fig.2 ¹H-NMR spectrum of NMN

おいだてつや・いながぎふゆひこ・みやざわ たつお

実験

NMNは協和醜酵より購入したものをを用いた。各実験でNMN濃度は0.1 M以下、pHは2前後で温度は23℃である。NMRの装置はBruker WH-270を使用した。なお化学シフトは t -BuOHを内部基準とした。(Fig. 2のスペクトルはDSS基準に換算してある)

スピン結合定数はスペクトルのシミュレーション及びホモデカップリングにより求め、La(III)共存下でもその値が変わらない事を確認した。

ランタニドプローブ法の実験は、ランタニドの硝酸塩を用いて、常法にしたがいPr(III)とEu(III)を使いシフト比を、Gd(III)を使って緩和比を求めた。これらの比はいずれも5プロトン(C5'に付いたプロトンでシグナルが高磁場側にある方)を1とした。

NOEの実験では試料濃度50 mM位でChelate剤等によって常磁性イオンを除いた後脱気して封管したものをを用いた。測定はパルスFTモードでHomonuclear Gated Decouplingにより行ない、線幅が変わらない事を確認した後、シグナルのピークの高さの変化を測った。

なお全実験を通じて2つの5プロトンを分離して観察できた。

解析

Karplus typeの式によってスピン結合定数の二面角依存性が表わされるが、NMNの場合他のヌクレオチドと異なり、 $J_{12} + J_{34} \approx 10 \text{ Hz}$ とはならず必ずしも完全に定量的なデータとして採用できない。Karplus式の係数($A = 9.8, B = -0.9, C = 0$ とした)には若干の問題があるが、局所構造を決めるためある程度有用であるので、やや重みを落した形でデータとして採用した。

この実験では、Conformer間の交換速度 k が $T_1 \ll k \ll T_2$ という領域に入っているためスピンスを飽和させた時のスピンドのNOE $f_d(s)$ は次式のように表わされる。

$$f_d(s) = \frac{1}{2} \gamma_H^2 \hbar^2 \tau_c T_{2d} (\langle r_{ds}^{-6} \rangle - \sum_n f_n(s) \cdot \langle r_{dn}^{-6} \rangle)$$

ここで n は d, s 以外のスピン、 $\langle r_{dn}^{-6} \rangle$ はスピン i とスピン j の距離の-6乗の平均値である。上式を計算するための T_{2d} の値は、いわゆるCross Relaxationの影響を除いて得られる T_2 でなければならない。そのためにはたとえば、強い相互作用をしながら緩和し合うプロトンの組についてはその相互作用している相手のシグナルを飽和させながら T_1 を測定する方法が考えられる。また τ_c の値は ^1H や ^{13}C の緩和時間、NOEから見積る事ができる。この分子の場合、 ^1H - ^1H 間のNOEのデータから求めるならば、baseの4位と5位の距離が固定している事が利用できる。つまり4位のプロトンの双極子相互作用は大部分5位のプロトンによるものと仮定すれば、5位を飽和させた時の4位のNOEの値から τ_c を次の式で評価できるわけである。

$$\tau_c = \frac{2 f_s(s) r_{ds}^6}{\delta_H^2 \hbar^2 T_{1s}}$$

この場合は単に T_1 の値だけから求める場合と異なり、緩和機構のすべてを双極子相互作用に帰するという仮定をしないため、 ^1H スペクトルだけで求める方法として有利であろう。

実際の計算には、ランタニドプローブ法で用いるプログラムPCS2にNOEに関する部分をつけ加えたものを使い、スピン結合定数やランタニドイオンによるデータの他に、NOEについてもその計算値が実測値とより良く一致するように、各Conformerの構造及びその存在率を変えてfittingを行なった。今までのNOEデータの解析は主にGlycosyl結合まわりの二面角 α との関係にとどまっていたが、定量的に解析するためにはリボース環のpuckeringまでも考慮する必要がある。そのためには、この解析のように、スピン結合定数も含むランタニドプローブ法と併用するのも有効な方法であろう。なお解析のためにConformerは下図のものを出発点とした。

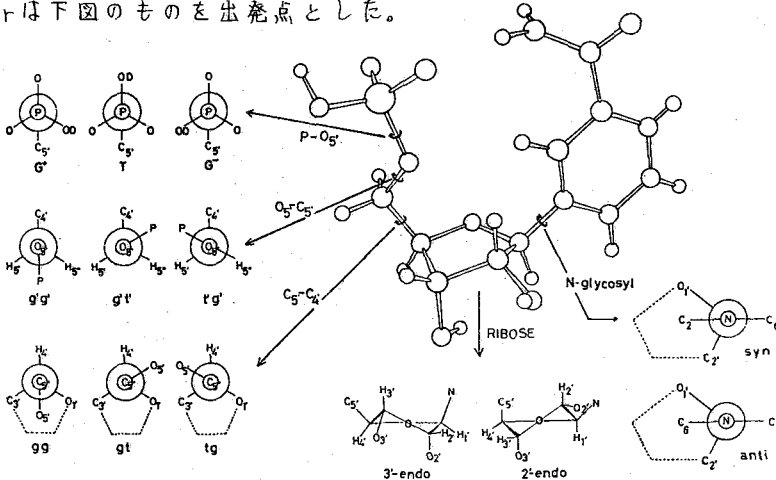


Fig.3 Conformers of NMN

結果

Table 1, 2 にそれぞれランタニドプローブ法とNOEについての結果を示す。Table 1ではスピン結合定数を除き実測値と計算値は比較的良く合っているが、Table 2のNOEはまだ完全に合っているとは言い難い。しかしこれは T_{id} や c を実験的に精度良く求めているためであり、たとえばスピンド以外のすべてのシグナルを飽和させながらdの緩和を測るなどの方法により理想的な T_{id} を求める事は可能である。また現在の段階でもbaseの向き、つまりsyn-anti平衡に関しての情報も十分に得られていると言えよう。

Table 3にはTable 1, 2の計算値を与えるConformerの割合が示してある。NMNではこの表から分かるように他のヌクレオチドに比べてggが多く、74%を占め、またbaseがsynの向きをとるものが41%存在する。この時のsyn, antiの二面角 α は3'-endoについては 198° , 49° , 2'-endoについては 226° , 36° となり他のヌクレオチドの結晶データ(NMNは結晶化されていない)と比較してもそれ程大きくはずれていない。NMNがこのようにgg, synの構造をとり易いのはbaseのアミノ基とリン酸基の間に何らかの相互作用が働いているためと考えられる。NMNに限らずflexibleな分子の構造解析を行なうときには超高磁場NMRによりNOEのデータを求め、ランタニドプローブ法と組み合わせる事によって、相補的に構造解析における定量性を高める事が可能であろう。

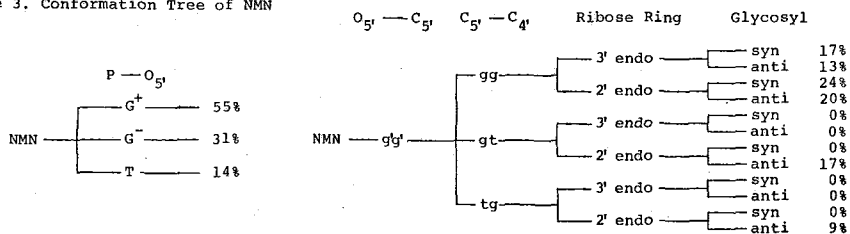
Table 1. NMN Data by Lanthanide Probe Method

Coupling Constants (Hz)			Shift Ratio		Relax Ratio		
3J	Obs.	Calc.	1H	Obs.	Calc.	Obs.	Calc.
$J_{1' 2'}$	5.5	7.8	5"	1.00	1.00	1.00	1.00
$J_{2' 3'}$	5.2	5.5	5'	1.00	0.97	0.83	0.81
$J_{3' 4'}$	2.6	3.4	4'	0.27	0.34	0.15	0.15
$J_{4' 5'}$	2.6	3.4	3'	0.37	0.34	0.33	0.33
$J_{4' 5^*}$	2.0	2.6	2'	0.31	0.27	0.18	0.22
			1'	0.08	0.12	0.03	0.05
			2	0.18	0.15	0.60	0.60
			4	-0.12	-0.11	0.10	0.07
			5	-0.05	-0.02	0.13	0.14
			6	0.20	0.31	0.19	0.20

Table 2. NMN Data by NOE

Saturated 1H		Observed 1H				
		H_2	H_6	$H_{1'}$	$H_{2'}$	$H_{3'}$
H_2	Obs.		0.00	0.19	0.07	0.00
	Calc.	*	-0.02	0.13	0.05	0.00
H_6	Obs.	0.00	*	0.15	0.06	0.00
	Calc.	-0.03		0.19	0.06	0.03
$H_{1'}$	Obs.	0.22	0.12	*	0.04	0.00
	Calc.	0.16	0.17		0.03	0.00
$H_{2'}$	Obs.	0.07	0.06	0.07	*	—
	Calc.	0.07	0.07	0.04		0.16
$H_{3'}$	Obs.	0.04	0.04	0.03	—	*
	Calc.	0.00	0.04	0.00	0.20	

Table 3. Conformation Tree of NMN



New Conformation Analysis by the Combination
of Lanthanide-Ion Probe Method and NOE Analysis

Department of Biophysics and Biochemistry, Faculty of Science, The University of Tokyo
Tetsuya Oida, Fuyuhiko Inagaki, and Tatsuo Miyazawa

The conformation of NMN (nicotinamide mononucleotide) in aqueous solution is quantitatively studied by a new combination of lanthanide-ion probe method and NOE analysis, and the populations of major conformers are determined. The *syn-anti* equilibrium of NMN is discussed.

(京工織大・工学・化学) 泉 邦彦

ランタニドシフト試薬と各種有機化合物の間の親和性は、これまでトリス(ジピバロイルメタナト)-ユーロピウム($\text{Eu}(\text{dpm})_3$)と RCH_2X 型化合物(Xは各種の官能基)の間に生成する錯体について調べられ、その安定度が官能基の違いによって一般に下記の順位で減少すること
 $-\text{NH}_2 > -\text{OH} > -\text{COR}' > -\text{OR}' > -\text{COOR}' > -\text{CN}$

と知られている。¹⁾この順位は主として官能基のルイス塩基性度の相違にもとずくとみられるが、このほかにリガンド分子の立体構造による制約が錯体の安定性に大きく影響することが知られており、上記の順位にしたがわない例も数多く報告されている。²⁾演者はこれまでアミノ糖と中性糖を含む各種の糖のアセチル化誘導体についてシフト試薬の存在下におけるプロトンNMRスペクトルの特徴を調べ、分子内の特定のアセトアミド基をアセトキシ基がより安定な錯体の生成に参与することを指摘した。³⁾今回はさらにこれらの糖誘導体の様々な組み合わせの混合系についてトリス(2,2-ジメチル-6,6,7,7,8,8,8-ヘptaフルオロ-3,5-オクタジオナト)-ユーロピウム($\text{Eu}(\text{fod})_3$)の存在下におけるプロトンNMRスペクトルを解析することにより、糖とシフト試薬の間の親和性が糖の分子構造の相違によって分子間でどのように異なるかを総合的に調べた結果を報告する。

〔方法〕

スペクトロメーターはJNM-4H-100(100MHz)を使用し、磁場周波数掃引法によった。糖試料は市販品または常法にしたがってあらたに調製したものを、0.2-0.5M CDCl_3 溶液として20°Cにおけるスペクトルを測定した。アセチル化は無水酢酸とピリジンを用いる方法(70°Cで2-24時間加熱)によって行ない、反応後0.1M Na_2CO_3 と0.1N HCl による洗浄をくりかえしてこれらの試薬の完全除去に十分に留意した。 $\text{Eu}(\text{fod})_3$ は市販品を P_2O_5 上で十分に乾燥した後使用した。標準物質は内部基準としてヘキサメチルジシロキサン($\text{Si}0.05$)を2%の濃度で用い、シグナルの帰属は面積比とスピン結合による分裂のパターンを総合的に解析して行なった。

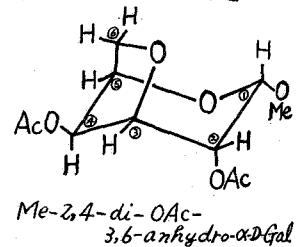
各種の糖とシフト試薬の間の親和性の比較は、2種の糖の等モル混合溶液について $\text{Eu}(\text{fod})_3$ 添加による各プロトン(メタンおよびメチレン)の化学シフトの変化量($\Delta\delta$)を測定し、これを各糖試料が同じ濃度条件で単独の溶液として存在するときの $\Delta\delta$ に対する割合(%)として表わすことにより行なった。この方法はHartら⁴⁾によって単官能基化合物について用いられ、2種の化合物に関するこの値の比は $KS+1$ (Kは錯体生成の平衡定数、Sは化合物の濃度)の比を示すことが知られている。⁵⁾等モル混合系の場合にはSは2種の化合物について等しく、また $\text{Eu}(\text{fod})_3$ による錯体生成においては $K \gg 1$ の場合が多いので、⁶⁾この比は近似的には平衡定数そのものの比を示すと考えることができる。糖のアセチル化誘導体の場合には多官能基化合物であるが、シフト試薬に対するリガンド分子の全体としての親和性が各官能基
 いずみ くにひこ

に関する平衡定数の和によって表わされるとすれば、先述の比がこの和の比を近似的に示すことになるので、親和性を比較するのにこの方法はやはり有効であると考えられる。

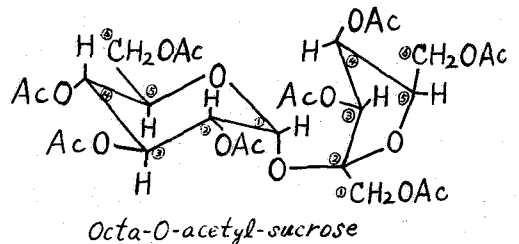
〔結果と考察〕

1. ヘキソースとペントース——Table 1に、17種の完全アセチル化単糖および二糖から調製した種々の組み合わせの混合溶液について、すべてのメチンおよびメチレンプロトンの $\Delta\delta$ を単独溶液の場合の値に対する割合(%)として示す。括弧内の数字は $\Delta\delta$ そのものをppmで表わしたものである。この表から同一化合物の分子内の比較では、プロトン間で $\Delta\delta$ が異なっても上記の割合には大差がないことが分る。これはEu(fod)₃への配位によって生成する錯体の総量に変化しても分子内の各官能基による配位の比率は単独溶液でも混合溶液でもほぼ同じであることを意味する。そこでまずヘキソース誘導体に関するExpt. 1-3のデータを見ると、マンノース(Man)誘導体がやや大きな親和性をもつ以外は、 α -D-グルコース(α -D-Glc)、 β -D-グルコース、 α -D-ガラクトース(α -D-Gal)の各誘導体について親和性はほとんど変わらないことが分る。次にExpt. 4-6のデータはペントース誘導体とヘキソース誘導体の混合系に関するものであるが、ここでは α -D-キシロース(α -D-Xyl)誘導体の親和性が α -D-グルコース誘導体のそれとほぼ同じであるにもかかわらず β -D-キシロース誘導体の親和性は β -D-グルコース誘導体のそれよりかなり大であることが注目される。これは β -D-キシロース誘導体では他と異なり3位のアセトキシ基へのEuの配位が優先することに原因があると推定される。

2. 3,6-アンヒドロ糖——Expt. 7-10のデータは、紅藻多糖のみに特徴的に分布する3,6-アンヒドロ- α -D-ガラクトース誘導体とヘキソースまたはペントースの誘導体の混合系に関するものであるが、前者は明らかに後者よりも大きい(1.5-3倍)親和性をもつことが分る。また、メチル-3,6-アンヒドロ- α -D-ガラクトシド誘導体(右図)に比して、ピラノイド環が崩裂したジメチルアセチル誘導体の方がより親和性に富むことから、上記の差は3,6-アンヒドロフラノイド環そのものに基因していると考えられる。



3. アミノ糖——Expt. 11-17のデータはアミノ糖を含む混合系に関するものである。これらのデータから、アミノ糖どうし(N-アセチル- α -D-グルコサミン(α -D-GNAc)、N-アセチル- β -D-グルコサミンおよびN-アセチル- β -D-ガラクトサミン(β -D-GalNAc)の各誘導体)では親和性はほぼ同じであるが、3,6-アンヒドロ糖をも含む中性糖との比較ではこれらは格段に大きい(4倍以上)親和性を示すことが分る。これは明らかにアセトアミド基がアセトキシ基に比してEuとの間により安定な配位結合を形成し得ることを意味する。



4. 二糖——Expt. 18-22のデータは二糖、すなわち α , α -トレハロース(α -D-グルコシル- α -D-グルコシド)とシュクロース(α -D-グルコシル- β -D-フルクトシド)(右図)の誘導体を含む混合系に関

Table 1. The lanthanide($0.1M \text{Eu}(\text{fod})_3$)-induced downfield shifts of the signals of methine and methylene protons in mixtures of several peracetylated sugars in CDCl_3 .

Expt. No.	Mixture of per-acetylated sugars	Concn. (M)	Downfield shift expressed as % of the one measured in the single sugar experiment of the same concentrations ***						
			H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
1	Me- α -D-G	0.4	59(0.67)	53(0.91)	51(0.76)	53(0.78)	53(0.48)	53(0.96)	56(0.94)
	Me- β -D-G	0.4	53(0.41)	49(0.82)	47(0.70)	53(0.60)	57(0.52)	58(0.93)	57(0.90)
2	Me- α -D-G	0.4	61(0.70)	58(1.00)	52(0.77)	53(0.78)	54(0.49)	55(1.00)	56(0.94)
	Me- α -D-Gal	0.4	58(0.53)	53(0.73)	54(0.64)	51(0.66)	61(0.45)	55(0.59)	55(0.59)
3	Me- α -D-G	0.4	58(0.66)	54(0.93)	53(0.78)	52(0.76)	53(0.48)	54(0.97)	54(0.92)
	Me- α -D-Man	0.4	64(0.36)	58(0.76)	61(0.69)	61(0.67)	62(0.40)	60(0.80)	62(0.74)
4	Me- α -D-Xyl	0.3	58(0.93)	57(1.55)	54(1.39)	58(1.51)	57(0.67), 57(0.84)	—	—
	Me- α -D-G	0.3	61(0.92)	61(1.40)	57(1.12)	58(1.14)	59(0.71)	60(1.44)	60(1.35)
5	Me- β -D-Xyl	0.3	60(0.71)	59(1.74)	58(1.94)	61(1.51)	64(0.67), 64(0.70)	—	—
	Me- β -D-G	0.3	50(0.51)	48(1.07)	48(0.83)	43(0.66)	49(0.60)	50(1.07)	48(1.01)
6	Ph- β -D-Xyl	0.3	66(0.70)	69(1.69)	70(2.43)	71(1.85)	68(0.73), 70(0.79)	—	—
	Ph- β -D-G	0.3	44(0.40)	45(0.78)	45(0.78)	45(0.78)	40(0.46)	45(1.07)	45(1.00)
7	Me-3,6-A- α -D-Gal	0.47	95(1.04)	93(1.40)	91(1.27)	93(1.02)	95(0.55)	93(0.67)	94(0.72)
	Me- α -D-Gal	0.47	63(0.58)	62(0.85)	63(0.78)	64(0.84)	63(0.50)	65(0.73)	65(0.73)
8	Me-3,6-A- α -D-Gal	0.3	88(1.52)	80(1.86)	75(1.61)	76(1.31)	73(0.65)	77(0.85)	75(0.89)
	Me- α -D-Xyl	0.3	48(0.77)	47(1.28)	47(1.19)	47(1.22)	48(0.53), 48(0.58)	—	—
9	Me-3,6-A- α -D-Gal	0.47	78(0.86)	79(1.19)	78(1.09)	77(0.85)	81(0.47)	79(0.57)	78(0.60)
	β -D-Gal	0.47	43(0.40)	37(0.38)	42(0.48)	36(0.56)	46(0.45)	41(0.54)	41(0.54)
10	3,6-A-D-Gal-DA	0.47	94(1.00)	91(1.74)	93(0.93)	91(1.39)	95(0.79)	93(0.51)	86(0.30)
	β -D-Gal	0.47	28(0.26)	22(0.22)	27(0.31)	22(0.34)	31(0.30)	26(0.35)	26(0.35)
11	Me- α -D-GNac	0.4	56(0.92)	51(1.98)	54(0.79)	54(0.38)	50(0.27)	73(0.25)	51(0.21)
	Me- β -D-GNac	0.4	52(0.64)	56(1.30)	51(0.96)	57(0.36)	73(0.32)	45(0.14)	60(0.18)
12**	Me- β -D-GNac	0.2	54(0.55)	51(1.05)	50(0.87)	53(0.29)	52(0.15)	52(0.12)	55(0.11)
	Me- β -D-GalNac	0.2	49(0.51)	53(0.92)	47(1.06)	51(0.33)	50(0.23)	54(0.14)	54(0.14)
13	Me- β -D-GNac	0.4	84(1.03)	87(2.01)	87(1.65)	89(0.56)	77(0.34)	90(0.28)	77(0.23)
	Me- α -D-G	0.4	16(0.18)	11(0.19)	13(0.19)	10(0.15)	9(0.11)	11(0.20)	10(0.17)
14	Me- β -D-GNac	0.4	84(1.03)	89(2.06)	84(1.59)	87(0.55)	77(0.34)	90(0.28)	77(0.23)
	Me- α -D-Gal	0.4	13(0.12)	11(0.15)	12(0.14)	12(0.15)	14(0.10)	17(0.18)	17(0.18)
15	Me- β -D-GNac	0.4	94(1.15)	95(2.20)	91(1.72)	92(0.58)	91(0.40)	100(0.31)	90(0.27)
	Me- α -D-Man	0.4	20(0.11)	15(0.20)	13(0.15)	17(0.19)	23(0.15)	15(0.20)	16(0.19)
16	Me- β -D-GNac	0.3	92(1.50)	91(2.80)	91(2.29)	89(0.75)	90(0.53)	90(0.37)	90(0.36)
	Me- β -D-Xyl	0.3	10(0.12)	8(0.24)	8(0.25)	11(0.28)	12(0.3), 16(0.7)	—	—
17	Me- β -D-GNac	0.3	82(1.33)	83(2.56)	83(2.09)	83(0.70)	80(0.47)	80(0.33)	77(0.31)
	Me-3,6-A- α -D-Gal	0.3	15(0.25)	16(0.36)	19(0.41)	15(0.26)	21(0.19)	23(0.26)	25(0.30)
18	α, α -Trehalose	0.2	47(0.61)	46(0.54)	43(0.90)	45(0.66)	46(0.75)	54(0.95)	52(0.82)
	Me- α -D-G	0.4	58(0.66)	60(1.04)	56(0.83)	56(0.82)	58(0.52)	60(1.08)	60(1.02)
19	α, α -Trehalose	0.2	44(0.57)	47(0.55)	46(0.96)	47(0.68)	50(0.81)	53(0.94)	52(0.83)
	α -D-G	0.4	58(0.81)	50(0.59)	56(0.61)	55(0.69)	54(0.46)	60(0.97)	59(0.94)
20**	Sucrose { - α -D-G	0.2	65(0.80)	56(0.44)	64(0.82)	65(0.49)	66(0.92)	71(1.00)	70(0.95)
	{ - β -D-Fru	0.2	67(0.56), 74(0.52)	—	67(0.47)	67(0.67)	71(0.47)	70(0.60)	68(0.66)
	α -D-G	0.2	18(0.22)	18(0.19)	18(0.17)	19(0.21)	17(0.13)	24(0.34)	23(0.32)
21**	Sucrose { - α -D-G	0.2	16(0.20)	21(0.16)	14(0.18)	21(0.16)	16(0.22)	15(0.21)	14(0.20)
	{ - β -D-Fru	0.2	20(0.17), 21(0.15)	—	24(0.17)	16(0.16)	20(0.13)	15(0.13)	15(0.14)
	Me- β -D-GNac	0.2	83(0.85)	88(1.80)	85(1.49)	85(0.47)	79(0.23)	78(0.18)	75(0.15)
22**	Sucrose { - α -D-G	0.2	61(0.75)	56(0.44)	59(0.76)	60(0.45)	61(0.86)	66(0.93)	67(0.91)
	{ - β -D-Fru	0.2	60(0.50), 64(0.45)	—	58(0.41)	64(0.64)	68(0.45)	64(0.55)	63(0.61)
	α, α -Trehalose	0.1	20(0.25)	22(0.24)	24(0.45)	20(0.29)	20(0.31)	23(0.39)	22(0.33)

* The abbreviations used are as follows:

Expt., Experiment; Concn., Concentration; A, anhydro; DA, dimethyl acetal; Me, methyl; Ph, phenyl; G, glucopyranose or glucopyranoside; Gal, galactopyranose or galactopyranoside; Man, mannopyranoside; Xyl, xylopyranoside; GNac, 2-acetamido-2-deoxy-glucopyranoside; GalNac, 2-acetamido-2-deoxy-galactopyranoside; Fru, fructofuranoside.

** The concentration of $\text{Eu}(\text{fod})_3$ was 0.05M.

*** Numericals in parentheses are the induced changes in chemical shift given in ppm.

するものである。単糖残基がたがいに対称な二糖である α 、 α -トレハロースの誘導体についてはモル比1:2の混合系に関するデータを示し、単糖残基としての親和性を比較した。これらのデータから、 α 、 α -トレハロース誘導体は α -D-グルコース誘導体などの中性単糖に比してやや小さい親和性を示すのにひきかえ、シュクロース誘導体は逆に中性単糖よりもはるかに大きい親和性をもつことが分る。両者の分子構造を比較すれば、この親和性の差がシュクロース誘導体中のフルクトフラノシド残基に基因することが容易に推定される。なお、シュクロース誘導体もアミノ糖との比較においては親和性は劣る。

5. まとめ—Table 1に含まれている化合物のうち、Expt. 6のフェニルグリコシドを除く15種について親和性のデータを各プロトン間で平均し、メチル- α -D-グルコシド誘導体のそれを1として相対値で示したものがTable 2である。この表から、アミノ糖がいずれの中性糖よりも格段に大きい親和性をもつこと、および中性糖の中ではフラノイド環を含む3,6-アンヒドロ糖やシュクロース誘導体がピラノイド環のみを含むものよりも大きい親和性をもつことをあらためて結論として示すことができる。アミノ糖と中性糖の間の親和性の相違は含まれる官能基の塩基性度の違いによると思われるが、フラノイド環とピラノイド環の間のこの相違は錯体生成に対する立体障害の大小に原因があると推定される。——終わりにスペクトルを測定していただいた鈴木みづ子氏および森盛蔵氏に深謝する。

〔文献〕

1) J.K.M. Sanders et al. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 641 (1971); 2) K.C. Ramey et al. "Annual Reports on NMR Spectroscopy" Vol. 6A, p.147 (1975); 3) K. Izumi, *J. Biochem.* **76**, 535 (1974), K. Izumi, *J. Biochem.* **81**, 1605 (1977); 4) H. Hart et al. *Tetrahedron Lett.*, 625 (1971); 5) J.K.M. Sanders et al. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 5325 (1972); 6) B. C. Mayo, *Chem. Soc. Rev.* **2**, 49 (1973), A. Arduini et al. *Carbohydr. Res.*, **31**, 255 (1973)

Table 2. Relative affinity of peracetylated sugars for Eu(fod)₃.

Peracetylated sugar	Relative affinity
β -D-Gal	0.79
α , α -Trehalose	0.82
α -D-G	0.95
Me- α -D-Xyl	0.97
Me- β -D-G	0.99
Me- α -D-Gal	0.99
Me- α -D-G	1.00
Me- α -D-Man	1.13
Me- β -D-Xyl	1.26
Me-3,6-A- α -D-Gal	1.52
Sucrose	2.36
3,6-A-D-Gal-DA	2.79
Me- β -D-GalNAc	7.22
Me- α -D-GNac	7.31
Me- β -D-GNac	7.40

Affinities of Peracetylated Sugars for an Europium Shift Reagent

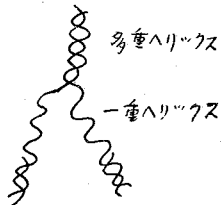
Kunihiko Izumi (Department of Chemistry, Kyoto Technical University)

Proton NMR spectra of equimolar mixtures composed of two kinds of several peracetylated sugars were measured at 100 MHz in the presence of Eu(fod)₃. The induced changes in chemical shifts for all the methine and methylene protons expressed as per cent of the ones measured in the single sugar experiments of the same concentrations were compared between the two sugars in the mixtures. Peracetylated derivatives of hexosamines were found to have a markedly stronger affinity for Eu(fod)₃ than the derivatives of any neutral sugars, probably because of a higher Lewis basicity of their acetamido group in comparison with the acetoxo groups. The affinities of furanoid ring-containing sugars such as 3,6-anhydro-D-galactose and sucrose derivatives were also observed to be somewhat stronger than those of other derivatives of neutral sugars. The acetoxy groups attached to a furanoid ring are supposed to be capable of binding to the europium with less steric hindrance than the ones attached to a pyranoid ring.

(国立がんセンター研) 齊藤 肇, 宮田 栄一, 佐々木 琢磨

(1) はじめに

ゲルは分子鎖が化学的あるいは物理的に架橋されて作られた三次元ネットワークに希釈剤が入り込み膨潤したものである。このような例は自然界に多くみられ、結合組織や細胞表皮など生物学的に重要な役割をはたしていることが多い。われわれは、すでに¹³C NMR法がゲル状態の分析に有用であることと明らかにし、次のような結論を得た。(1)良好な希釈剤による膨潤によって高分解能NMRと与えるに十分な分子運動 ($T_c < 10^{-8}$ sec) を獲得するようになったが、架橋点およびその近傍のセグメントはスペクトルと与えない。(2)架橋度によって線巾、ピーク強度が変化する。(3)ランダムコイルからなるゲルは化学シフト値が溶液状態にくらべて変化しないのに対し、ヘリックスからなる多糖ゲルの¹³Cシフトは、ヘリックス構造にもとづく低磁場シフトが存在する。本報でとりあつかう多糖ゲルの架橋は、二重または多重ヘリックスの生成によるもので、その構造と模式的に書くと下図のようになる。なお、ファイバー状態のX線回折によれば、三重



ヘリックスが安定形として存在する。ここぞ問題にするのは(1)ヘリックス構造ととりあつかう最短の分子鎖の確認、(2)ヘリックス

スピークの線巾と重合度の関係について調べ、ゲル構造の解析の一助とする。

(2) 実験方法

直鎖 β-(1→3)グルカンは、*Alcaligenes faecalis* 変異株の作る細胞外多糖⁷⁾ PS 13140 と呼ばれるものである。低重合物は、PS 13140 を希酸または硫酸で加水分解したものを、セファデックスGゲルロ過み及びエタノールを用いて分画したものである。試料はいずれも武田薬品中研より提供を受けた。¹³C NMRの測定はJEOL PFT-100スペクトロメータによる。

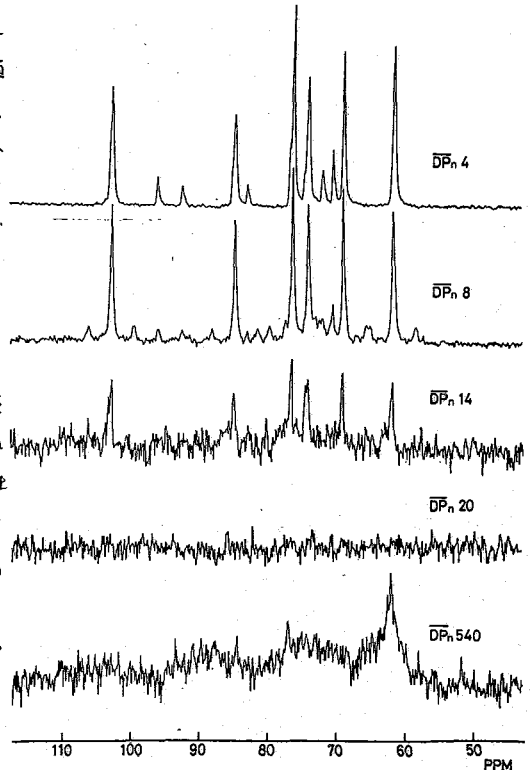


Figure 1. ¹³C NMR spectra of acid-degraded fractions of PS 13140 80 mg/ml, pD=7

(3) 実験結果と考察

A. ¹³C NMR スペクトルの分子量依存性

図1は中性水溶液またはサスペンションの ^{13}C NMRを示す。水に可溶のフラクション $\overline{\text{DP}}_n 4$, 14はランダムコイル特有のシャープなピークと与えている。 $\overline{\text{DP}}_n 4$ は還元末端由来のピークも存在している。 $\overline{\text{DP}}_n 14$ 以上のフラクションは、水に不溶で、 $\overline{\text{DP}}_n 14$ 試料に弱いピークがみられる。他は、全くスワフトルが観測されない。上記の弱いピークはいうまでもなく $\overline{\text{DP}}_n 14$ 以下の可溶性フラクションにもとづくものである。ここで用いた $\overline{\text{DP}}_n 14 \sim \overline{\text{DP}}_n 131$ の試料は、 $\overline{\text{DP}}_n 540$ のPS 13140試料と異なり、 55°C 以上の加熱によるゲル生成は全く見られなかった。 $\overline{\text{DP}}_n 540$ の試料は室温でも部分的に膨潤がみられ、図1下段のようなヘリックス由来ピークが観測されている。

アルカリを加えると、図2のように水不溶性フラクションでも他ピークが出現してくる。0.06 M NaOHでは、C-1, C-3ピークの線巾、ピーク位置が $\overline{\text{DP}}_n 14$ と $\overline{\text{DP}}_n > 49$ と著しく異なることがわかる。ピーク位置から、 $\overline{\text{DP}}_n 14$ はランダムコイルをとり、 $\overline{\text{DP}}_n > 49$ ではヘリックス構造をとることが明らかになった。

これらの試料は加熱によってゲルを作らないものの、本質的にはゲルと同じ前ページに示したような内部構造をとることがこれから結論できる。分子鎖が短くなればそれだけ架橋点の数が減少するはずで、そのために $\overline{\text{DP}}_n 49 \sim \overline{\text{DP}}_n 102$ のC-1, C-3ピークの線巾が30~50 Hzと、 $\overline{\text{DP}}_n 540$ の場合の160 Hzにくらべてきわめて小さいことが理解できる。T₁値は、 $\overline{\text{DP}}_n 540$ と全く変わらない。したがって、線巾の変化はセグメント運動の相関時間の分布が、架橋点の数に応じて変化することと意味してあ

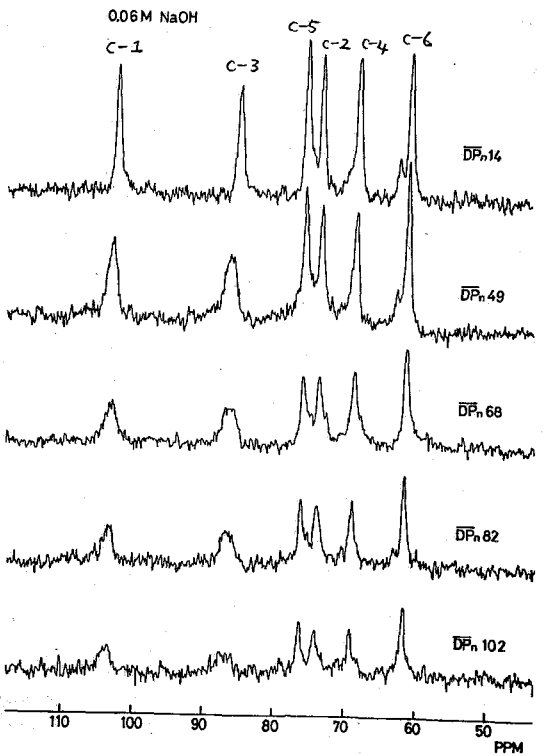


Figure 2 ^{13}C NMR of acid-degraded fractions in 0.06 M NaOH solution.

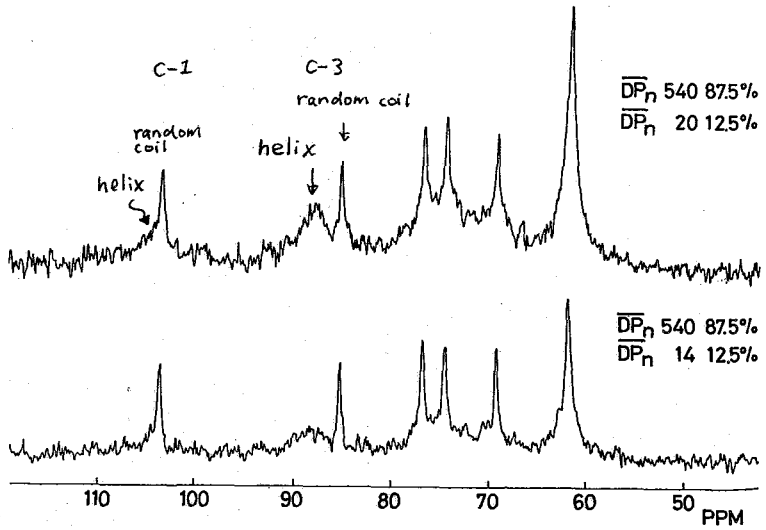


Figure 3 ^{13}C NMR spectra of gels consisting of PS 13140 ($\overline{\text{DP}}_n 540$) and low-molecular-weight fractions.

り、きわめて妥当な結果である。

ヘリックス構造をとり得る最短の鎖長に関しての予がかりをさらに得るために、 \overline{DP}_n 540 と低分子量フラクションの混合ゲルを 60°C, 5 分間の加熱によって調製した。いうまでもなく水溶性フラクションはランダムコイルをとり、ゲルのネットワークにこりこまれることなく、そのすき間に単にトラップされるにすぎない。ここでは主として水不溶性フラクションの挙動を調べることとする。図3にこのようにして得た混合ゲルのNMRスペクトルを示す。シヤープなシグナルはネットワークのすき間にはけこんだランダムコイルを、ブロードなシグナルはゲルネットワーク中の一重ヘリックス部分をあらわしている。特に C-2, C-3 シグナルはヘリックスとランダムコイルで化学シフトが異なるため、容易に識別することができる。図1と異なり、 \overline{DP}_n 20 の試料でもランダムコイルピークが見られる。しかし、 \overline{DP}_n 49 の場合は全くランダムコイルピークが見られなかった。図1, 図3の試料濃度は前者が 80 mg/ml に対して、後者は低分子量フラクションが 10 mg/ml しかない。それにもかかわらず、このように高強度のランダムコイルに由来するピークが出現したのは、 \overline{DP}_n 540 の試料の共存のもとに \overline{DP}_n 14, \overline{DP}_n 20 試料の膨潤があること、一部はゲルネットワークに、一部は単に溶存する状態になったものと考えられる。したがって、ゲルネットワークを作り最短鎖長は \overline{DP}_n 20 周辺であることが結論できる。

B. コイル-ヘリックス転換の NaCl の影響

小川らは、0.24M NaOH のランダムコイル状態に NaCl を添加すると ordered 状態にもとることと認めている。⁹⁾ この

コンホメーション変化を NMR で追跡すると、図4の結果が得られた。下段は 0.38M NaOH で完全にランダムコイルであるが、上段のように 1M NaCl を加えると、図2に示すようなヘリックス状態のスペクトルに転移する。この試料は \overline{DP}_n 540 であるにもかかわらず、ヘリックスピークの線中はむしろ狭い。これはいうまでもなく架橋度の違いを反映しており、上にのべた結果と比較して興味深い。

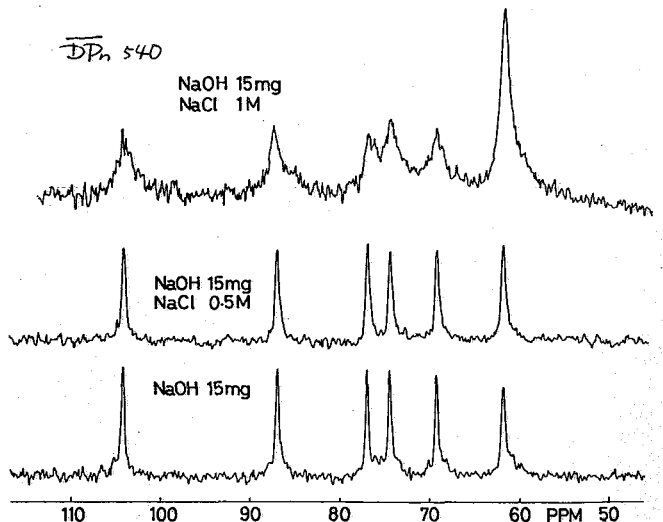


Figure 4 NaCl-induced transition from the random-coil to helical forms.

- (1) H. Saitô, T. Ohki and T. Sasaki, *Biochemistry*, **16**, 908(1977) (2) H. Saitô, T. Ohki, Y. Yoshioka and F. Fukuoka, *FEBS Lett.*, **68**, 15(1976) (3) H. Saitô, T. Ohki, N. Takasuka and T. Sasaki, *Carbohydr. Res.*, **58**, in press. (1977) (4) Y. Yokota, A. Abe, S. Hosaka, I. Sakai and H. Saitô, *Macromolecules*, in press (1978) (5) H. Saitô, T. Ohki and T. Sasaki, Abstract of XV NMR Symposium, Tokyo, 1976, p. 178 (6) R.H. Marchessault, Y. Deslandes, K. Ogawa and P.R. Sundararajan, *Can. J. Chem.*, **55**, 300(1977) (7) T. Harada, Extracellular Microbial Polysaccharides, ACS symposium series No. 45, 265 (1977) (8) K. Ogawa, J. Tsurugi and T. Watanabe, *Carbohydr. Res.*, **29**, 397(1973) (9) K. Ogawa, J. Tsurugi and T. Watanabe, *Chem. Lett.*, 1973, 95.

A ^{13}C NMR Study of Polysaccharide Gel. Molecular-Weight Dependence of Architecture of Gel of a Linear (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan

Hazime Saito^{^*}, Eiichi Miyata^{*} and Takuma Sasaki^{**}

Biophysics Division^{*} and Chemotherapy Division,^{**} National Cancer Center Research Institute, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104

Previously we have demonstrated that ^{13}C NMR is very powerful tool to analyze composition, conformation and molecular architecture of polysaccharide and synthetic gels. Here we show ^{13}C NMR study of acid-degraded fractions of a linear (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from Alcaligenes faecalis var. myxogenes IFO 13140, in order to gain better understanding of the effect of the degree of cross-linking to the ^{13}C line-width, the shortest chain-length to participate in the gel network and also conformation of the molecular chain. It is shown that water-soluble fractions, $\overline{\text{DP}}_n$ 4 and 8, give rise to very sharp ^{13}C NMR signals, whereas other fractions, $\overline{\text{DP}}_n > 20$, afford no NMR signals, under the condition of neutral aqueous solution or suspension. This is in contrast to the original glucan with DP_n 540 in which partial swelling occurs to give weak ^{13}C NMR signals. In the presence of 0.06 M NaOH, it is found that those water-insoluble fractions, $\overline{\text{DP}}_n$ 20 - $\overline{\text{DP}}_n$ 102, are able to give ^{13}C resonances ascribable to single helical portion of the gel network. The line-width of these signals is dependent on the degree of the polymerization. Furthermore, it is observed that the fraction $\overline{\text{DP}}_n$ 20 produces very sharp ^{13}C NMR signals ascribable to random-coil conformation in the gel prepared from mixture of fraction $\overline{\text{DP}}_n$ 20 and original glucan (10 mg: 70 mg). This result clearly shows that the shortest chain-length to participate in the network of gel is around $\overline{\text{DP}}_n$ 20. Finally, the effect of NaCl to the random-coil to helix conversion of PS13140 sample in the presence of 15 mg NaOH.

^{13}C NMR のグルコシド化シフト。
 2級水酸基の絶対配位の決定への応用

(塩野義研) O高山陽子・妹尾修次郎・富田裕・通和夫

天然植物配糖体の ^{13}C NMR スペクトルの研究途上、配糖体の ^{13}C 化学シフトとそのアグリコンおよび糖のシフトの間に、そのグリコシド結合付近の化学構造に基づくある種の規則性が存在することを発見した。それらの ^{13}C 化学シフト差をグリコシド化シフトと呼ぶ。その一般化により、種々の配糖体の ^{13}C NMR 法による構造決定をより容易にすることができよう。その一環として、種々の光学活性2級アルコールのグルコシド化シフトを検討し、その規則性を見出し、2級水酸基の絶対配位を決定できることがわかったので報告する。

Koenigs-Knorr法により、種々の2級アルコールグルコピラノシドを作り、その ^{13}C NMR スペクトルをピリジン- d_5 中測定し、メチルグルコピラノシドと相当するアルコールの ^{13}C スペクトルと比較し、グルコシド化シフト値〔糖部分; $\Delta\delta_S = \delta(\text{アルコールグルコシド}) - \delta(\text{メチルグルコシド})$, アグリコン部分; $\Delta\delta_A = \delta(\text{アルコールグルコシド}) - \delta(\text{アルコール})$] を求め、これらを Table I にまとめた。

2級アルコールが2つの $\beta\text{-CH}_2$ をもつ場合には、グルコシド結合付近は立体障害が少なく、そのもっとも安定な平均立体配座 (Fig. 1 参照) において、グルコース (Glc) の環酸素の *anti* 位の $\beta\text{-CH}_2$ シグナルが約 -4 ppm の大きなグルコシド化シフト値 $\Delta\delta_A(\text{C-}\beta)$ を示し、*syn* 位の $\beta\text{-CH}_2$ シグナルは約 -2 ppm の小さな $\Delta\delta_A(\text{C-}\beta)$ 値を示す。2級アルコールの $\text{C}\alpha\text{-H}$ 結合を紙面の下方に向け、 $\text{O-C}\alpha$ 結合軸より 向って右側にある β -炭素を $\beta\text{-}(M)\text{-C}$ 、左側にある β -炭素を $\beta\text{-}(H)\text{-C}$ とすると、 $\beta\text{-D-}$ または $\alpha\text{-L-Glc}$ を用いると、 $\Delta\delta_A[\text{C-}\beta\text{-}(M)]$ が約 -4 ppm, $\Delta\delta_A[\text{C-}\beta\text{-}(H)]$ が約 -2 ppm を示し、 $\alpha\text{-D-}$ または $\beta\text{-L-Glc}$ を用いると、右値はこの逆となるので、2つの $\beta\text{-CH}_2$ の $\Delta\delta_A(\text{C-}\beta)$ 値が求まれば、2級水酸基の絶対配位が判明する。

2級アルコールの *syn*- β -炭素に置換基があると (*sterically hindered case I*), 立体障害が少ない方へと、 $\text{O-C}\alpha$ 結合に関して時計まわりと反対方向に、アルコール残基が回転し、グルコシド化シフトはすべて高磁場よりになる (Table I)。 *anti*- β -炭素に置換基があると (*sterically hindered case II*), アルコール残基は逆方向に回転し、グルコシド化シフトは低磁場よりになる。この場合、 $\Delta\delta_S(\text{C-}1')$ と $\Delta\delta_A(\text{C-}d)$ が大きく変化するものが特徴的である。ここで、直鎖アルコールが *sterically hindered case I* または *II* に属するのは注意すべきである。

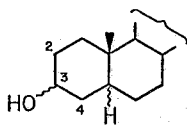
以上の結果、2級水酸基の絶対配位の決定方法をまとめてみると、(1) まず、アルコールのピリジン- d_5 中の ^{13}C NMR スペクトルを測定し、(2) その $\beta\text{-D-}$ グルコシドを合成し、(3) そのグルコシドのスペクトルを測定し、(4) グルコシド化シフト値を求め、(5) Table II にまとめたシフト則を用いてその絶対配位を決定する。結果が不明瞭のときは、副成する $\alpha\text{-D-}$ グルコシドも検討すれば明瞭になる。

たかやまようこ・せおしゅうじろう・とみにゆにか・とおりがずお

Table I. Glucosidation Shifts in Pyridine ($\Delta\delta_C$ in ppm)^a

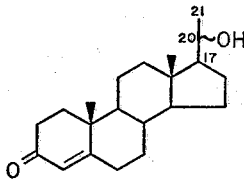
Sugar	Alcohol	$\Delta\delta_S$ (C-1')	$\Delta\delta_A$ (C- α)	$\Delta\delta_A$ [C- β -(H)]	$\Delta\delta_A$ [C- β -(M)]	Lit.
Achiral <u>sec</u> -alcoholic glucosides						
α -D-Glc	iso-Propanol	-2.9	+6.5	-4.4	-2.4	2
β -D-Glc	iso-Propanol	-3.0	+7.6	-2.2	-4.0	1,2
β -D-Glc	Cyclopentanol	-2.4	+7.3	-2.4	-3.6	f
β -D-Glc	Cyclohexanol	-3.0	+7.1	-2.3	-4.2	2
β -D-Glc	Cyclooctanol ^b	-2.6	+7.6	-2.0	-4.3	f
Chiral <u>sec</u> -alcoholic glucosides						
Sterically unhindered case						
α -D-Glc	5 α -Cholestan-3 α -ol (1)	-2.5	+7.3(C-3)	-3.3(C-4)	-1.8(C-2)	f
α -D-Glc	5 α -Cholestan-3 β -ol (2)	-2.7	+6.7(C-3)	-4.0(C-2)	-2.4(C-4)	f
β -L-Glc	5 α -Cholestan-3 β -ol (2)	-3.1	+7.2(C-3)	-4.1(C-2)	-2.7(C-4)	1
α -D-Glc	Smilagenin (3)	-2.5	+7.3(C-3) ^c	-3.9(C-2) ^c	-1.9(C-4) ^c	2
β -D-Glc	5 α -Cholestan-3 α -ol (1)	-2.7	+7.9(C-3) ^c	-1.9(C-4) ^c	-3.9(C-2) ^c	1,2
β -D-Glc	5 α -Cholestan-3 β -ol (2)	-3.0	+7.2(C-3) ^c	-2.3(C-2)	-4.0(C-4) ^c	1,2
β -D-Glc	Smilagenin (3)	-2.3	+7.6(C-3) ^c	-1.7(C-2) ^c	-3.7(C-4) ^c	2
Sterically hindered case I						
β -D-Glc	(2R)-Pentanol	-3.4	+7.0(C-2)	-2.5(C-3)	-4.4(C-1)	f
β -D-Glc	(2R)-Methyl-(1R)-cyclohexanol	-3.9	+5.8(C-1)	-2.6(C-2, CH)	-5.0(C-6, CH ₂)	f
β -D-Glc	1-Menthol (R)	-4.0	+6.4(C-1)	-2.1(C-2, CH)	-4.9(C-6, CH ₂)	1
β -D-Glc	20 β -Hydroxypregn-4-en-3-one (R) (5)	-4.5	+5.3(C-20)	-2.0(C-17, CH)	-5.1(C-21, Me)	f
β -D-Glc	3-Epidammaranediol (R) (6)	-3.3	+6.8(C-3)	-0.6(C-4, C)	-3.7(C-2, CH ₂)	1
β -L-Glc	Dammarenediol-I (S) (7)	-3.2	+6.9(C-3)	-4.2(C-2, CH ₂)	-0.8(C-4, C)	1
α -D-Glc	Methyl oleanolate (S) (8)	-3.8	+6.0(C-3) ^c	-4.6(C-2, CH ₂) ^c	0.0(C-4, C) ^c	2
β -D-Glc	Compound 10, av. ^d { major conformer ^e { minor conformer ^e	-2.5 -2.0 -2.4	+7.7(C-6) +8.6 +8.1	-0.1(C-7, CH) -0.5 -0.1	-4.3(C-5, CH ₂) -4.3 -4.3	f
Sterically hindered case II						
β -D-Glc	(2S)-Pentanol	-1.5	+9.1(C-2)	-2.2(C-1, Me)	-3.1(C-3, CH ₂)	f
β -D-Glc	(2S)-Methyl-(1S)-cyclohexanol	+0.6	+9.9(C-1)	-1.8(C-6, CH ₂)	-1.6(C-2, CH)	f
β -D-Glc	d-Menthol (S)	+0.4	+10.5(C-1)	-1.1(C-6, CH ₂)	-1.8(C-2, CH)	1
β -D-Glc	20 α -Hydroxypregn-4-en-3-one (S) (4)	-0.1	+11.8(C-20)	-1.6(C-21, Me)	-1.0(C-17, CH)	f
β -D-Glc	Dammarenediol-I (S) (7)	+1.4	+10.8(C-3) ^c	-1.2(C-2, CH ₂)	+0.3(C-4, C)	1
β -D-Glc	Methyl oleanolate (S) (8)	+0.9	+10.5(C-3) ^c	-1.9(C-2, CH ₂) ^c	-0.1(C-4, C) ^c	2
β -D-Glc	Liguloxidol (S) (11)	+1.8	+8.6(C-9)	-0.4(C-8, CH ₂)	-0.4(C-10, CH)	f

^a ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian NV-14 FT NMR spectrometer at 15.087 MHz using TMS as an internal reference (δ_C 0); accuracies of δ_C are ± 0.1 . Plus sign denotes a downfield shift. ^b Chemical shift nonequivalence was found even in C- ϵ . ^c Data were revised from the reported values. ^d At 100°C. ^e At -30°C. ^f This work.

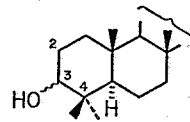


Partial structure

- 1: 3 α -OH, 5 α -H
- 2: 3 β -OH, 5 α -H
- 3: 3 β -OH, 5 β -H



- 4: 20 α -OH
- 5: 20 β -OH

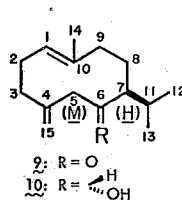


Partial structure

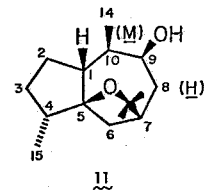
- 6: 3 α -OH
- 7: 3 β -OH
- 8: 3 β -OH

この方法の応用として、アルコール 10 と 11 について検討した。ブレイソカラメンジオール(9)の LiAlH_4 還元生成物である2級アルコール 10 の水酸基の配位は β であると報告されているが、この β -D-グルコシド化シフトは Table I の *sterically hindered case I* に示

すように、C- β -(M)はC-7ではなくC-5であり、 α -(R)であることがわかった。リグロキシドール(11)の β -D-グルコシド化シフトは *sterically hindered case II* に相当し、この水酸基の報告されている立体配位は正しいことがわかった。両者の場合、 $\Delta\delta$ 値が少し異常なのは、グルコシド結合付近の立体障害が大きいからであると思われる。このように立体障害が大きき場合には、Table II のシフト則を使う場合注意しなければならない。



- 9: R = O
- 10: R = H / OH



11

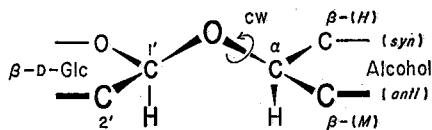


Fig. 1. Conformation around the glucosidic linkages. The same is valid for α -L-Glc, but the positions of ring-O and 2'-C together with the indications of *syn* and *anti* are exchanged when α -D- or β -L-Glc is used.

以上、結論として、この方法は光学活性2級アルコールの2級水酸基の立体配位の決定に対し、(1) 2つのエピマーの両者を必要とせず、(2) 直鎖、5員環、中、大員環アルコールなどのように、 δ 値が利用できないときに有効であり、また、(3) これまでによく知られている決定方法では結果が不明瞭なときに応用すれば、偉力を発揮するであろう。

Table II. β -D-Glucosidation Shift Rules for sec-Alcohols in Pyridine ($\Delta\delta_C +1$ ppm)^a

	$\Delta\delta_S$ (C-1')	$\Delta\delta_A$ (C- α)	$\Delta\delta_A$ [C- β -(<u>H</u>)1]	$\Delta\delta_A$ [C- β -(<u>M</u>)1]
Sterically unhindered case	-2.7	+7.2	-2.2(CH ₂)	-4.0(CH ₂)
Sterically hindered case I	-3.5	+6.3	{ -2.0(CH) -0.5(C)	-4.5(CH)
Sterically hindered case II	0(+1.5)	+10(+1.5)	-1.5(CH ₂)	{ -1.5(CH) 0(C)

^a This rule is also valid for α -L-glucosides, but the (H)- and (M)-carbons are exchanged when α -D- or β -L-glucosides are used.

Determination of the Absolute Configuration of a Secondary Hydroxyl Group
in a Chiral Secondary Alcohol Using Glucosidation Shifts
in Carbon-13 NMR Spectroscopy
Yohko Yoshimura, Shujiro Seo, Yutaka Tomita, and Kazuo Tori
(Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd., Fukushima-ku, Osaka 553)

A new method has been proposed for determining the absolute configuration of a secondary hydroxyl group in a chiral secondary alcohol using glucosidation shifts^{1,2} in ¹³C NMR spectroscopy. The ¹³C FT NMR spectra of a number of secondary alcoholic glucopyranosides in pyridine were compared with those of methyl glucosides and the corresponding parent alcohols to obtain the glucosidation shifts; $\Delta\delta_S = \delta(\text{alcoholic glucoside}) - \delta(\text{methyl glucoside})$ for sugar moieties and $\Delta\delta_A = \delta(\text{alcoholic glucoside}) - \delta(\text{alcohol})$ for aglycone moieties (see Table I).^{1,2} The $\Delta\delta_S(\text{C-1}')$, $\Delta\delta_A(\text{C-}\alpha)$, and $\Delta\delta_A(\text{C-}\beta)$ values obtained (see Fig. 1) were characteristic of the kind of secondary alcohols and summarized as a few rules for determining the absolute configuration of the hydroxyl (see Table II).

In the case of sec-alcohols having two $\beta\text{-CH}_2$ (the sterically unhindered case), the $\Delta\delta_A(\text{C-}\beta)$ value for the $\beta\text{-CH}_2$ anti to the pyranose-ring oxygen is always larger (ca. -4 ppm) than that for the $\beta\text{-CH}_2$ syn to the oxygen (ca. -2 ppm) in the most stable conformation when averaged around the glycosidic linkage (see Fig. 1).³ Here, we absolutely designated as the (H)- and the (M)-carbon, the two β -carbons at the left and the right side, respectively, from the sec-alcoholic O-C_α bond, when the $\text{C}_\alpha\text{-H}$ bond is directed downwards from the paper plane (see Fig. 1). According to this designation, the $\Delta\delta_A[\text{C-}\beta\text{-(M)}]$ value is larger than that for $\text{C-}\beta\text{-(H)}$ when $\beta\text{-D-}$ or $\alpha\text{-L-}$ glucose (Glc) is used, but the values for $\text{C-}\beta\text{-(M)}$ and $\text{C-}\beta\text{-(H)}$ are reversed when Glc is $\alpha\text{-D-}$ or $\beta\text{-L-}$. The absolute configuration of the sec-OH can thus be determined from the two observed $\Delta\delta_A(\text{C-}\beta)$ values in this case. When one or two substituent are located at the syn- β -carbon in a sec-alcohol, the glucosidation shifts are changed to slightly higher fields, because the conformation around the glycosidic linkage in its glucoside changes as the alcohol moiety rotates counterclockwise (see Fig. 1) around the O-C_α bond to avoid steric non-bonded interactions³ (sterically hindered case I). When one or two substituents are located at the anti- β -carbon, the glucosidation shifts move to considerably lower fields, because here the conformational change around the glycosidic bond is caused by the alcohol moiety rotating clockwise around the O-C_α bond to avoid the interactions³ (sterically hindered case II). Marked changes of $\Delta\delta_S(\text{C-1}')$ and $\Delta\delta_A(\text{C-}\alpha)$ values should particularly be emphasized in this case II.

A strategy and some caution for using the method will also be presented.

- (1) R. Kasai, M. Suzuo, J. Asakawa, and O. Tanaka, Tetrahedron Lett., 175 (1977).
- (2) K. Tori, S. Seo, Y. Yoshimura, H. Arita, and Y. Tomita, Ibid., 179 (1977).
- (3) R. U. Lemieux and S. Koto, Tetrahedron, 30, 1933 (1974).

○岩橋秀夫, 京極好正
大阪大学蛋白質研究所

核酸塩基間の特異的相互作用は、遺伝情報伝達の基礎である。アデニンとウラシル, グアニンとシトシンの間に存在する特異的水素結合を通して、デオキシリボ核酸上に存在する遺伝情報が子孫に伝達されてゆく。この特異的相互作用が少しでも乱されると、その情報伝達の誤りの確率が増加することが予想できる。このように遺伝情報伝達の信頼性は、その相補塩基対形成時における構造上のゆらぎによって減少させられると予想できる。故に塩基対形成に伴う構造上の変化をその対形成を行なっていない状態と比較できれば有意義であろう。我々は ^{13}C NMRのケミカルシフトを用いて、フリーな状態と二量体形成時の差からウラシルのC-2カルボニルとC-4カルボニルをそれぞれ用いた二量体が混在していることを見出した。⁽¹⁾ このように対形成における構造上のゆらぎが存在することがわかったが、ここでもっと動的な面でのゆらぎについての情報を得るために、 ^{13}C および ^1H の T_1 を測定し、その対形成前後の差を較べた。また照射と 180° - τ - 90° のパルスを組み合わせることで、塩基対間に存在するプロトンの交換の検出とその交換速度の決定を行ない同時にその温度変化より、交換の活性化エネルギーを求めた。

[実験及び試料]

9-エチルアデニン(A), 1-シクロヘキシルウラシル(U), 1-シクロヘキシルチミン(T) 1-シクロヘキシル-5-プロモウラシル(BU)はそれぞれサイクロケミカル社より購入した。9-エチルアデニンはリロホルムと四塩化炭素より再結晶して用い、他のサンプルは購入したものをそのまま用いた。 T_1 測定は脱気して封管したものをを用いた。 ^1H および ^{13}C NMRスペクトルは、それぞれ100 MHzと25 MHzで、日本電子PFT-100およびFX-100パルスフーリエ変換核磁気共鳴装置を用いて行なった。 T_1 測定は 180° - τ - 90° パルスを用いて行ない、交換速度の決定は、Mannの方法⁽²⁾を用いて行なった。また温度較正はメタノールのチューブを用いて行なった。

[結果及び考察]

(1) ^{13}C 及び ^1H の T_1 の結果

BUの ^{13}C の T_1 の値をAと混合したときとフリーの時と較べてみると、各位置の炭素の T_1 は対形成をすと減少している。(Table 1) ここで問題にしているような小さな分子では、共鳴周波数 ω と分子の回転相関時間の積は1に比べて十分に小さいので次の式が成立する。

い わ は し ひ で お きょうごく よし ま さ

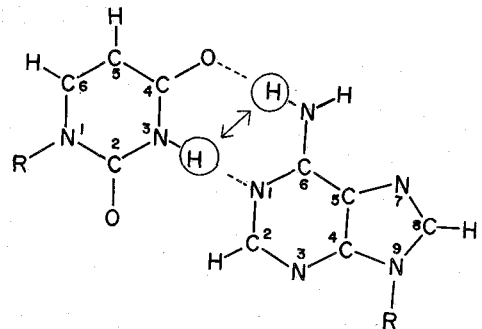
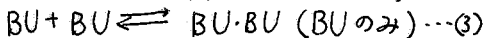
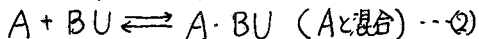


Fig. 1 Structure of A-U pair

$$1/T_1 = (h^2 \gamma_c^2 \gamma_p^2 / 4 \pi^2 r^6) \tau_r \dots (1)$$

ここで γ_c , γ_p は i 核及び j 核の磁気回転比であり、 r は二つの核の間の距離、 τ_r は回転相関時間である。プロトンが直接付いている炭素の T_1 は直接結合しているプロトンとの間の双極子結合による緩和によつてほとんど決定される。そこで炭素とその結合している水素の距離を 1.08×10^{-8} cm とし、測定された T_1 の値から回転相関時間を得ることができる。(Table 1) 回転相関時間は対形成を行なうと長くなつてゐることがわかる。A-BU 間の会合している寿命は分子がその方向を1回転する時間より長い (~ 100 nsec D. Pörschke 私信)。故に会合した分子は、分子の回転という面からみると、みかけ上分子半径が増加したとみることができ、BU に対して溶液中では次の平衡が成立している。



(2), (3) の平衡式の平衡定数⁽³⁾ を用い会合

した分子は $A \cdot BU$ でも $BU \cdot BU$ でもみかけの分子半径は2倍とりるとすると、BUのみが存在するときと比べて、Aも共存するとき、そのみかけの分子半径の増加率は1.23である。

分子半径と回転相関時間の間には次の式が成立する。 $\tau_r = 4\pi\eta a^3 / 3kT \dots (4)$

この関係を利用すると回転相関時間は1.9倍となるべきであり、実験的に得た2.1倍とよい一致を示し、今考へたモデルの妥当性を示している。シクロヘキシルの炭素についても今述べたのと同じ説明ができる。 1H の T_1 の値 (Table 2) においても、BU の6位のプロトンに対して対形成に伴う T_1 の減少がみられる。A の2位および8位のプロトンに対しては、その変化がみられないのは、それらのプロトンの緩和はメチル基のプロトンとの間の双極子相互作用が主にきいていて、メチル基の内部回転の相関時間は対を作つて

Table 1. T_1 of ^{13}C Nuclei in 1-Cyclohexyl-5-bromouracil

Position	Free		Complex with A	
	NT_1 (sec)	τ_r (10^{-11} sec)	NT_1	τ_r
C-2	16.4		9.7	
C-4	18.4		16.0	
C-5	9.5		7.9	
C-6	1.1	4.1	0.51	8.4
C-1'	1.5	3.0	0.71	6.0
C-2'	1.6	2.8	0.78	5.4
C-3'	1.6	2.8	0.72	6.0
C-4	1.3	3.5	0.58	7.4

Table 2. 1H Spin-lattice Relaxation Times of Base Pairs

Compounds	Concentration (M)	A-C2H (sec)	A-C8H (sec)	U-C6H (sec)
9-ethyladenine	0.15	2.42	3.87	
1-cyclohexyl-uracil	0.15			2.27
9-ethyladenine + 1-cyclohexyl-uracil	0.15	2.60	3.42	1.14
1-cyclohexyl-uracil	0.2			2.46
9-ethyladenine + 1-cyclohexyl-uracil	0.2	2.43	3.43	1.06

も変化がないためと思われる。

(2) 核酸塩基間のプロトンの交換

すでに今年の春の化学会で報告したように⁽⁵⁾ AのアミノプロトンとUのイミノプロトンの間にプロトンの交換が存在する。ここではそのプロトンの交換速度を、Forsen⁽⁴⁾らの方法を改良した、Mannの方法を用いて求めた。まずその理論を簡単に説明する。今AとBの環境の異なる位置を可逆的に交換している核があるとする。B核を照射することによって飽和させた時の運動方程式は次のようになる。

$$\frac{dM_z^A}{dt} = -\frac{(M_z^A - M_0^A)}{T_{1A}} - \frac{M_z^A}{\tau_A} \quad \dots (5)$$

ここで M_0^A はB核を照射していないときのA核の磁化、 T_{1A} はAの位置の固有の T_1 、 τ_A は、Aの位置に核が滞在している時間である。この微分方程式の解は次のようになる。

$$M_z^A(t) = \frac{1}{\tau} \left\{ M_0^A - 2M_0^A \exp\left(-\frac{t}{T_{1A}}\right) \right\} \quad \dots (6)$$

Table 3. Proton Exchange Rates between 9-Ethyladenine and 1-Cyclohexyluracil.

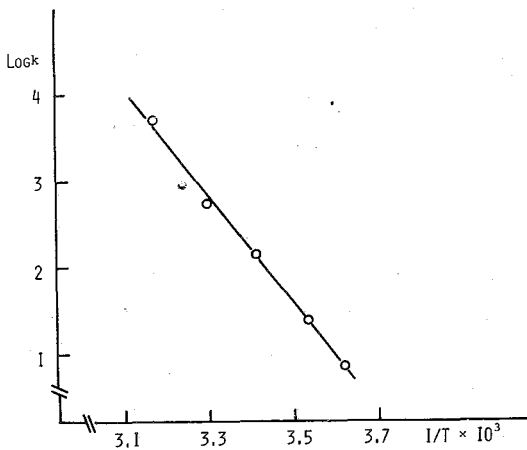
Temperature (°C)	Ratio of decrease $\frac{M_z^A(\infty)}{M_0^A} = 1/\tau$	T_{app}	T_{1a} (sec)	k (sec ⁻¹)
-5	0.855	0.12	0.14	2.41
4	0.786	0.12	0.15	3.64
15	0.611	0.12	0.20	6.45
26	0.437	0.10	0.23	11.1
43.5	0.257	0.06	0.23	25.0

ここで τ は次のように定義されている。

$$1 + T_{1A}/\tau_A = \tau \quad \dots (7)$$

ここで M_0^A/τ はBのプロトンを照射した状態のピーク強度であるので 180° - t - 90° パルスを用いて T_1 測定を行なうと、 T_1 として T_{1a} (T_{app})が得られる。

Fig. 2 Arrhenius plot for BU-A proton exchange



またでは次のForsen⁽⁴⁾が導いた式より得ることかできる。 $M_0^A = \tau M_z^A(\infty) \dots (8)$
 $M_z^A(\infty)$ はB位置を十分長い間照射した後のA位置の核磁化である。(7)式の関係から τ が得られる。この方法を用いて、BU-A, U-A, T-Aに対してそのプロトンの交換速度(k)とその温度変化を求めた。室温付近では交換速度は 10 sec^{-1} 程度である。(Table 3) k の温度変化より交換の活性化エネルギーを求めた。結果はBU-A (7.9 kcal/mol), U-A (12.7 kcal/mol), T-A (13.6 kcal/mol)である。我々はG-C間のプロトン交換はGのイミノプロトンとCのアミノプロト

ンの間でのみ起き、Gのアミノプロトンは他のプロトンとの間に交換は生じないというこ
とから、互変異性を介してのプロトンの交換のメカニズムを考えてきた。というのはGの
アミノプロトンは構造上互変異性を考えにくいためである。ここで得られた活性化エネル
ギーの順序、すなわちBUが低い活性化エネルギーを示すということは、その交換のメカ
ニズムを支持する結果である、すなわちBUは他の塩基に較べてよりエノール型をとりやす
いことが他の実験から示されているからである⁽⁶⁾。

[参考文献]

- 1) 岩橋秀夫, 京極好正, 第3回核酸シンポジウム予稿集, 954, 札幌 (1975),
- 2) B. E. Mann, *J. Magn. Resonance* 25, 91 (1977).
- 3) Y. Kyogoku, R. C. Lord and A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57, 250 (1967).
- 4) S. Forsén and R. A. Hoffman, *J. Chem. Phys.* 39, 2892 (1963).
- 5) 岩橋秀夫, 京極好正, 日化第36春季年会講演予稿集 7491.
- 6) A. R. Katritzky and A. J. Waring, *J. Am. Soc.*, 1540 (1961).

A NMR STUDY OF DYNAMIC PROCESS IN THE PAIRING OF NUCLEIC ACID BASES

by

Hideo Iwahashi and Yoshimasa Kyogoku

Institute for Protein Research, Osaka University
Suita, Osaka 565 JAPAN

Abstract

Spin-lattice relaxation times of ^1H and ^{13}C nuclei in 9-ethyladenine(A) and 1-cyclohexyl-5-bromouracil(BU) were measured in their separate and 1:1 mixture solutions. The relaxation times of ^{13}C nuclei become shorter on the formation of base pairing. Rotational correlation times of the protonated C-6 carbon of BU, which is dominantly relaxed by the dipole-dipole interaction with the attached 6H proton, were calculated. The value changes from 4.1×10^{-11} sec to 8.4×10^{-11} sec by mixing with equimolar A. It is proper to assume that BU molecules exchange rapidly between the associated and monomer states and the life time of the associated dimer is longer than the rotational correlation time. The above assumption allows us to estimate the ratio of the increase of rotational correlation time on the formation of base pairing by considering the association constant between complementary bases and the self-association constant. If the radius of the associated molecule can be assumed to be twice of the free base, we can obtain the value 1.9 for the ratio of increase of rotational correlation time, which agrees well with 2.1 determined experimentally.

In the A and BU mixture system, the amino proton of A was saturated by irradiation. At that condition, we observed disappearance of the imino proton signal of BU. This phenomenon is called "saturation transfer", and indicates the reversible exchange of the irradiated protons between these two sites. A similar observation was done between the imino proton of 9-ethylguanine(G) and the amino proton of 1-methylcytosine(C), but not between the amino proton of G and other protons. The exchange rates were calculated by the method of Forsén et al and Mann for the mixture solvents of A with some U derivatives, i.e., BU, 1-cyclohexyluracil(U) and 1-cyclohexylthymine(T). The exchange time of the proton in the BU and A system in chloroform is about 10^{-1} sec at 25 °C. It means that the proton exchanges ten times in a second. The activation energy of the exchange was also obtained. The values increase in the following order; BU, U, and T and are 7.8 kcal/mol, 12.7 kcal/mol and 13.6 kcal/mol for BU, U and T, respectively. The tendency, especially the value of BU, reveals us the mechanism of the proton exchange by using keto-enol tautomerism, since BU can most easily take the enol structure among these bases.

京大理 寺尾武彦, 松井茂, 赤坂一之

核酸の試料における ^{31}P の化学シフトの異方性は、液体状態では、二、三の試みがなされてきているが²⁾⁻³⁾ 直接固体で測定した例はない。我々は proton-enhanced NMR法⁴⁾ を用いて mononucleotide (4種類), その Na塩 (3種類), cyclic mononucleotide (1種類, 塩), 及び polynucleotide (DNA, tRNA を含む6種類, 全て塩) 以上の核酸系の試料、及び比較のための DL- α -dipalmitoyllecithin (DPL) 内の ^{31}P の粉末スペクトルも測定し、その化学シフトテンソルの主値を決定した。

実験は、自作の装置⁵⁾ を用いて 290 K で行った。NMR 周波数は ^{31}P , ^1H 各々に対して 24.112 及び 59.526 MHz である。

表 1 に各々の試料について得られた、85% H_3PO_4 に対する化学シフトパラメータを示す。固体状態の化学シフトテンソルの等方平均値 $\bar{\sigma} = \frac{1}{3}(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})$ と、溶液状態から得られた化学シフト σ_{soln} は実験誤差内で一致している。しかしながら、全試料を通じて $\bar{\sigma}$, σ_{soln} はほとんど変化を示さないのに対し、化学シフトテンソルの主値 σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} は大きく変化している。つまり磷酸基のまわりの化学的環境、あるいは立体配座に対して ^{31}P 化学シフトテンソルの異方成分は、その等方成分に比べ非常に鋭敏であることがわかる。

mononucleotide の化学シフトテンソルは、表から明らかのように、塩の場合には軸対称であるが、free acid の場合には軸対称でない。2つの場合に対する典型的なスペクトルを、5'-AMP を例にとって各々、図 1 a), b) に示す。tRNA, DNA を含む全ての polynucleotide は、軸対称でないスペクトルを示し、かなり大きな異方性を示す。DNA を例にとって図 1 c) に示す。測定した全ての polynucleotide の化学シフトテンソルは、実験誤差内でほぼ一致しており、塩やリボースの種類、あるいは二重らせんか一重らせんかにもよらない。polynucleotide と同じように磷酸ニエステル結合をしている 3',5'-cyclic AMP と

Table I. Principal Values of the Chemical Shift Tensor for ^{31}P in Some Nucleic Acids^a

Ester	Nucleic acid	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}	$\bar{\sigma}^b$	σ_{soln}^c
Monoester (salt)	5'-AMP(Na ₂)	-78	29	29	-7	-4.1
	5'-GMP(Na ₂)	-63	25	25	-4	-4.1
	5'-UMP(Na ₂)	-67	27	27	-4	-4.0
	3'-UMP(Na ₂)	-66	27	27	-4	-4.1
Monoester (free acid)	5'AMP	-77	-8	83	-1	-0.3
	3'AMP	-71	-11	90	3	
	3'-CMP	-67	-11	72	-2	
	5'-dCMP	-77	-1	87	3	
Diester	poly A(K)	-89	-24	110	-1	1.0
	poly G(K)	-83	-24	112	2	1.1
	poly C(K)	-92	-25	114	-1	1.2
	poly U(K)	-85	-24	112	1	0.7
	tRNA ^{yeast}	-86	-30	107	-3	0~2
	DNA(salmon) (Na)	-83	-23	110	2	~1
	3',5'-cAMP	-88	-38	124	-1	1.6
DPL	-103	-35	131	-2		

^a All values are in parts per million relative to 85% H_3PO_4 , taking upfield as positive. Principal values are determined by differentiation of powder spectra and believed to be accurate to ± 5 ppm. ^b $\bar{\sigma} = (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})/3$. ^c Chemical shift values in aqueous solutions.

たらおたけひく, ちついしげる, あかまかかずゆき

DL- α -dipalmitoyllecithinは、polynucleotideと同じようなスペクトルを示すが、少し大きな異方性を示している。

これらの結果から我々は次のように結論した。核酸系の ^{31}P 化学シフトテンソルは、まずリン酸基がmonoester結合型であるか diester結合型であるかで決定され、monoester結合型である場合は、更にそれがfree acidであるか塩であるかによって決定づけられる。すなわち、 ^{31}P 化学シフトテンソルは、リン酸基のエステル化、プロトン化、イオン化に特に敏感であると結論される。

Kohlert & Klein⁶⁾によつて、リン酸基がmono-ester結合型である phosphorylethanolamine の ^{31}P 化学シフトテンソルにおけるエステル化とプロトン化の効果について、経験的議論がなされている。彼らは、リン原子のまわりの基底状態の電子分布と関連づけて、最も電子密度の低い方向が最も低磁場のテンソル成分の方向であるとし、 ^{31}P の化学シフトテンソルの主軸方向を見い出している。彼らはこのような関連性から、いくつかの有機リン酸mono-あるいはdiesterの粉末スペクトルを定性的に議論している。

mononucleotideの塩の粉末スペクトルは、彼らと同様に議論が可能である。P-O(R)結合以外の全てのP-O結合の電子密度は、

P-O(H)結合のイオン化によりほぼ同等となるであろう。その際、P-O(R)結合が最も電子密度の低い方向であろう。このように

考えると、高磁場にピークを持ち、P-O(R)結合方向の対称軸をもつ、 π 軸対称な粉末スペクトルが期待される。P-O(R)結合が最も低い電子密度を有するという予想は、実際、結晶中のmonosodium 5'-IMPの分子構造において、P-O(R)結合が最も長く(1.62 Å)残りの3つのP-O結合は等しくそれより短い(1.53 Å)⁷⁾ことから支持される。実際に観測されたmonoesterのNa塩の粉末スペクトルは、高磁場にピークを持つ軸対称なスペクトルである。(図1 a) 無論、主軸方向は単結晶のデータを待たなければ決定されないが、以上の議論から、対称軸はP-O(R)結合にほぼ平行であろうと考えられる。

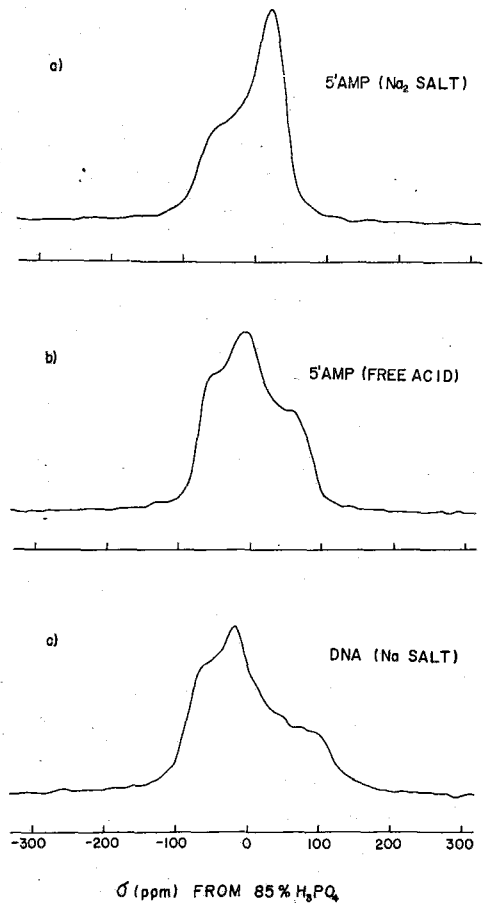


Figure 1. Typical ^{31}P NMR spectra in powder-line nucleic acids; (a) adenosine 5'-monophosphate (disodium salt); (b) adenosine 5'-monophosphate (free acid); (c) deoxyribonucleic acid (from salmon, sodium salt). These spectra were taken at 290K by proton-enhanced NMR. The static magnetic field increases to the right.

mononucleotide (free acid) の化学シフトテンソルの主値が, phosphorylethanolamine⁶⁾ の主値に非常によく似ていることから, phosphorylethanolamine と同様に, 磷酸基中の1つの酸素がプロトン化されていると思われる。実際このことは, 5-AMP (free acid) のX線解析においても正当化される。^{8), 9)} また diester (3',5'-cyclic AMP と全ての polynucleotide) の粉末スペクトルは, monoester (free acid) のものに似ている。しかしながら, 前者の異方性は後者のものより大きい。このことは, 電子密度に対するエステル化による振動とプロトン化による振動とが定性的にはよく似ているが, その強度は, エステル化の方が大きいことを示していると考えられる。

また, 例えば diester の中でも cyclic AMP とか DL- α -dipalmitoyllecithin は, 明らかに他の polynucleotide より大きな異方性を示しているように, monoester の塩, monoester の free acid, diester の各々の中においても, 明らかに実験誤差を超えて異方性の大きさの異なるものがある。このことは, 隣の部分, すなわち O-P-O 結合角とか, P-O 結合のまわりの回転角のような立体配座の変化が, ³¹P の化学シフトテンソルにより反映され得ることを示している。そのような可能性は, 溶液における核酸の磷酸 diester の立体配座に対する σ soln の依存性の理論計算^{10), 11)} 及び実験¹²⁾ から十分期待されるものである。

* T. Terao, S. Matsui, and K. Akasaka, J. Am. Chem. Soc., 99, 6136 (1977).

1) M. Gueron and R. G. Shulman, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 72, 3482 (1975).

2) F. Hayashi, K. Akasaka, and H. Hatano, Biopolymers, 16, 655 (1977).

3) K. Akasaka, A. Yamada, and H. Hatano, Bull. Chem. Soc. Japan, in press.

4) A. Pines, M. G. Gibby, and J. S. Waugh, J. Chem. Phys., 56, 1776 (1972).

5) T. Terao, unpublished work.

6) S. J. Kohler and M. P. Klein, Biochemistry, 15, 967 (1976).

7) S. T. Rao and M. Sundaralingam, J. Am. Chem. Soc., 91, 1210 (1969).

8) J. Kraut and L. H. Jensen, Acta Crystallogr., 16, 79 (1963).

9) S. Neidle, W. Kuhlbrandt, and A. Achari, Acta Crystallogr., Sect. B, 32, 1850 (1976).

10) D. G. Gorenstein and D. Kar, Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 1073 (1975).

11) D. G. Gorenstein, D. Kar, B. A. Luxon, and R. K. Momii, J. Am. Chem. Soc., 98, 1668 (1976).

12) D. G. Gorenstein, J. B. Findlay, R. K. Momii, B. A. Luxon, and D. Kar, Biochemistry, 15, 3796 (1976).

^{31}P Chemical Shift Anisotropy in Solid Nucleic Acids

Takehiko Terao, Shigeru Matsui, and Takehiko Terao

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606

Principal values of ^{31}P chemical shift tensors of nucleoside monophosphates (both in salt form and in free acid form), a cyclic mononucleotide, homopolyribonucleotides, tRNA, and DNA were determined in their powderline states by proton-enhanced NMR. The experiments were done at 290 K on a home-built spectrometer operating at 24.112 MHz for ^{31}P and 59.526 MHz for ^1H . The Hartmann-Hahn condition was satisfied with rotating fields of 50 G for ^{31}P and 20 G for ^1H . In order to shorten the recycle time, the proton magnetization was brought back to the direction of static field by a 90° pulse immediately after decoupling. One third of the trace of the chemical shift tensor in solids coincides with the chemical shift in solutions within the experimental error. The chemical shift tensors of mononucleotides are axially symmetric in sodium salts but nonaxial in free acid forms. All polynucleotides (including tRNA and DNA) exhibit nonaxial patterns with considerably larger anisotropy. All the chemical shift tensors of the polynucleotides studied are almost identical within the experimental error. 3',5'-cyclic AMP and DL- α -dipalmitoyllecithin which have phosphodiester bonds like polynucleotides, exhibit resonance patterns similar to those of polynucleotides, but the anisotropy is slightly larger. From these results we conclude the following. The ^{31}P chemical shift tensor of a nucleic acid is primarily determined by whether the phosphate group exists in a monoester form or in a diester form and when in the monoester form, by whether it exists in a free acid form or in a salt form. Namely, it critically depends on esterification, protonation, and ionization states of the phosphate group. Kohler and Klein understand qualitatively powder spectra of several organophosphate mono- and diesters correlating the principal axes of the ^{31}P chemical shift tensor with the ground-state electronic distribution around the phosphorus atom, with the most down field tensor component along the direction of the lowest electron density. Our results are well understood by using their correlation. It was found that even within the same types of the phosphate group the anisotropy varies beyond the experimental error, this result suggests that the ^{31}P chemical shift tensor can also reflect the conformational variation in the phosphorus moiety.

215 (C24) 有機基を持つ重金属化合物とクラウンエーテルとの相互作用の研究

(阪大・工) ○北野隆一郎 川崎吉包 大河原六郎

クラウンエーテルは、その有用性から、多くの方面で利用され、又研究されている。溶液中で、クラウンエーテルとカチオン種との錯体形成の速度あるいは活性化エネルギーについての知見を得る事は、大切な事と考えられる。

我々は、有機金属錯体の研究の一環として、クラウンエーテルとの錯体合成及び、錯形成反応についての研究を、おこなった。有機金属化合物として、 $(CH_3)_2TlY$ ($Y = \text{picrate}, \text{hfa}$ ($CF_3COCHCOCF_3$), BF_4) と $(CH_3)_2PbX_2(H_2O)$ ($X = \text{picrate}, \text{hfa}$) とを選人だ

これ等、ジメチルタリウム、ジメチル鉛化合物は、DMSO, ピリジンなどの極性溶媒に強い親和力がある事が報告されているので、クラウンエーテルとの間にも、同様の効果も期待される。又、ジメチルタリウム、ジメチル鉛化合物は、そのメチル基とタリウム、あるいは鉛とのスピンスピンカップリングが、NMRで観測できるので、クラウンエーテルと錯体形成をした場合、その錯体の構造、電子状態を知るためにも便利である。一オ、 Tl^+ , Pb^{2+} などの無機イオンと 18-crown-6 との安定度定数は、 K^+ , Na^+ と 18-crown-6 とのそれらに比べて、はるかに大きい値である事が報告されている。

従って、有機基導入により、錯形成が、どの様に変化するかも知る事は、非常に興味のある事と考えられる。

$[(CH_3)_2Tl(DBC)]^+ Y^-$ ($Y = \text{picrate}, \text{hfa}, BF_4$) の合成と構造

$(CH_3)_2Tl \text{ picrate}$ と DBC と、モル比 1:1 でイソプロパノール中、約2時間 reflux させた後、反応溶液を室温まで冷却し、得られた黄色沈殿をろ過し、アセトン、石油エーテルから再結晶した。

picrate 以外の錯体の場合にも同様な条件下で反応を行なった後溶媒をとばして得られた固体を、アセトン石油エーテルから再結晶をおこなった。

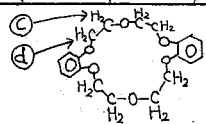
これらの化合物の NMR スペクトル及び CH 分析の結果から錯体の組成は予想通り、 $(CH_3)_2TlY/DBC = 1$ である事がわかった。NMR スペクトルのデータを Table I に示す。Table I からわかる様に、 $J(Tl-CH_3)$ 値は錯体形成しても大きな変化は認められなかった。

Table I

	$J(Tl-CH_3)$ Hz	$\delta(Tl-CH_3)$ PPM	$\delta(-CH_2-O-)$ PPM ^①	$\delta(-CH_2-O-)$ PPM ^②	$\delta(\text{aromatic})$ PPM
DBC	a. —	—	3.67	3.93	6.64
	b. —	—	4.04	4.30	6.92
$Me_2Tl \text{ picrate}$	411	1.25	—	—	—
$(Me_2Tl(DBC)) \text{ picrate}$	417	0.98	4.26	4.35	7.17
$Me_2Tl \text{ hfa}$	414	1.13	—	—	—
$(Me_2Tl(DBC)) \text{ hfa}$	420	0.97	4.18	4.43	7.14
$Me_2Tl BF_4$	400	0.97	—	—	—
$(Me_2Tl(DBC)) BF_4$	399	0.87	3.84	4.08	6.79
$Me_2Tl BF_4$	411	1.31	—	—	—
$(Me_2Tl(DBC)) BF_4$	401	0.96	4.17	4.30	7.05

a. Observed in CH_3CN

b. Observed in $(CD_3)_2CO$



きたの りゅういちろう かわさき よしかね おおかわら 3く3う

しかし $\delta(\text{Ti-CH}_3)$ 値は、錯体では 0.1~0.3 ppm ほど高磁場にあられた。錯体の DBC においては、メチレンプロトン及びベンゼン環のプロトンは free な DBC に比べて約 0.15 ppm 低磁場へシフトした。錯体のベンゼン環のプロトンは、アセトニトリル中では、シグ

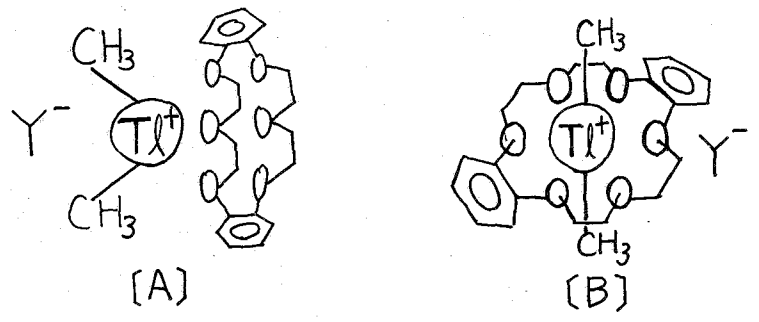
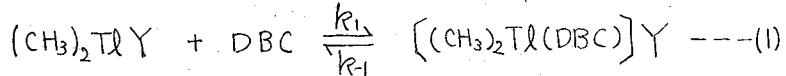


Figure 1

レットの NMR スペクトルで観測されるが、アセトン中ではマルチレットであった。DBC の錯体形成による、この等プロトンの低磁場シフトは、酸素原子の電気陰性度が増したからであり、つまり酸素原子は錯体では、タリウム原子に幾分か配位している事を示している。Fig 1 に示した様に錯体における DBC の酸素原子の配位には、(A)、(B) の 2 通り考えられる。(A) はクラウンエーテルとメチル基の立体的反発で $(\text{C-Ti-C})^+$ の直線構造がくずれた場合である。(B) は、クラウンエーテルの中央に $(\text{C-Ti-C})^+$ が直線構造を保持したまま入った場合である。 $(\text{CH}_3)_2\text{Ti}^+$ の I.R. スペクトルの研究では直線構造の $(\text{C-Ti-C})^+$ を取った場合の $\nu_{\text{asym}}(\text{Ti-O}_2)$ の値は、550~560 cm^{-1} であると報告されている。クラウンエーテルとの錯体の場合も $\nu_{\text{asym}}(\text{Ti-O}_2)$ の値は、550 cm^{-1} 以上にあつたため、この結果を適応すると、(B) が支持される。又、 $\rho(\text{CH}_3)$ 値が、800 cm^{-1} 付近に非常に弱く出ている事から、クラウンエーテルのメチレン基あるいはベンゼン環との相互作用の結果、メチル基の撓りゆがみがおさえていられると思われる。NMR スペクトルの研究では $J(\text{Ti-CH}_3)$ 値は $(\text{C-Ti-C})^+$ の直線構造がくずれると 355~391 Hz である事が報告されている。又、直線構造をとる場合の $J(\text{Ti-CH}_3)$ 値は 400 Hz 以上である事も報告されており、Table I からわかる様に錯体は 400 Hz 以上の $J(\text{Ti-CH}_3)$ 値であるので、(B) が支持される。

$(\text{CH}_3)_2\text{TiY}$ (Y = picrate, hfa) と DBC との反応。

クラウンエーテルとジメチルタリウムとの錯体合成において、その速度が比較的遅い事からわかったので、(1) 式に示す反応の速度を、NMR スペクトルより求めた。



錯体形成の反応速度の測定は、アセトニトリル中で、NMR で DBC の aromatic protons のシグナルの面積の時間変化を追跡する事により速度定数を求めた。錯体形成反応は、 $(\text{CH}_3)_2\text{TiY}$ と DBC の濃度にそれぞれについて一次で、二次式 (2) で直線にのった。

$$\frac{d}{dt} \left\{ [(\text{CH}_3)_2\text{Ti}(\text{DBC})\text{Y}] \right\} = k_1 [\text{DBC}] [(\text{CH}_3)_2\text{TiY}] \quad \text{---(2)}$$

Figure 2 に Y = pic, hfa の 40°C における、 $\ln \left(\frac{[(\text{CH}_3)_2\text{TiY}]}{[\text{DBC}]} \right)$ を t に対してプロットしたものを示した。この傾きから速度定数を求めた。

23°C, 49°C, 170°C の場合も同様にして速度定数を求めた。その結果を Table II に示す。錯体 E 60°C で長時間おいても NMR スペクトルで free の DBC のシグナルは見られなかった事から、(1) 式の k_{-1} は非常に小さく、平衡はほとんど錯体生成系へ寄っていると推測される。得られた速度定数 k_1 を使って Fig. 3 に Arrhenius プロットを示した。直線の傾きから (1) 式の反応の活性化エネルギーを求めた。この値を Table II に示したが、picrate の場合 22 kcal/mol, hfa の場合 21 kcal/mol と、アニオンが変わっても、あまり変わらなかった。Na⁺ と DBC の錯形成の活性化エネルギーは $E_a = 12.6 \pm 0.6$ kcal/mol である事が報告されており、これに比べ (CH₃)₂TR Y と DBC の錯形成の E_a の方がかなり大きい。

Table II

	$k_1, \text{L mole}^{-1} \text{min}^{-1}$				E_a kcal/mol
	(23°C)	(40°C)	(49°C)	(170°C)	
(CH ₃) ₂ TR picrate	2.4×10^{-2}	8.6×10^{-2}	5.2×10^{-1}	2.1	22
(CH ₃) ₂ TR hfa	5.8×10^{-3}	4.9×10^{-2}	1.0×10^{-1}	4.0×10^{-1}	21

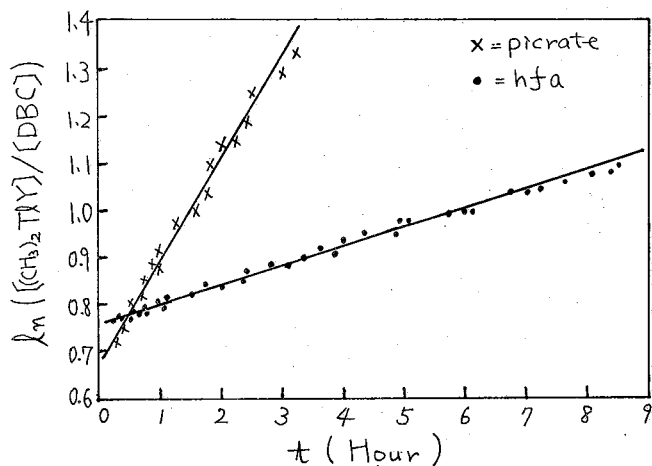


Figure 2

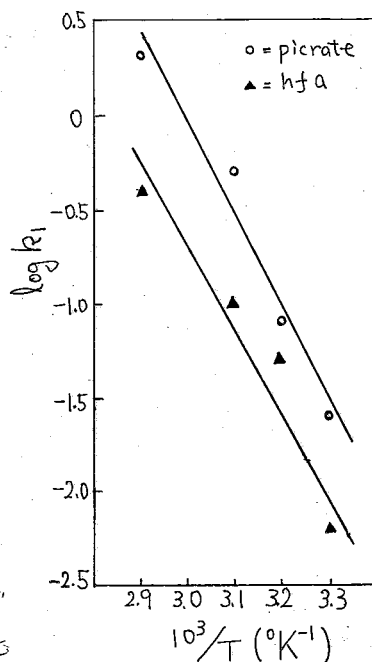


Figure 3

15-crown-5 と (CH₃)₂TR Y との反応 NMR チューブ中に (CH₃)₂TR Y と 15-crown-5 を封入し数日置いたが全く変化はなかった。15-crown-5 ではその hole が少し小さかった様である。サンドイッチ構造は、2つのメチル基がその形成を阻止するのであろう。

DBC と (CH₃)₂Pb(H₂O)Y₂ (Y = picrate, hfa) との反応 Pb²⁺ と DBC との安定度定数は D⁺ のそれよりもはるかに大きく錯体形成の期待はあったが (CH₃)₂Pb(H₂O)Y₂ は熱で分解する不利な点もあり錯体の単離はできなかった。

15-crown-5 と (CH₃)₂Pb(H₂O)Y₂ との反応 NMR tube 内での反応の観測の結果錯形成は見えず、(CH₃)₂Pb(H₂O)Y₂ の (CH₃)₂Pb Y への分解が促進されている事がわかった。

Interactions Between The Dimethylmetal(Tl,Pb) Compounds and Crown Ethers

RyuichiroKITANO, Yoshikane KAWASAKI and Rokuro OKAWARA

Department of Petroleum Chemistry, Osaka University, Suita, Osaka 565

The complexes of the type $[(CH_3)_2Tl(DBC)]Y$ (Y =picrate, hfa($CF_3COCHCOCF_3$), BF_4^- ; DBC=dibenzo-18-crown-6) were prepared from $(CH_3)_2TlY$ and DBC by heating at reflux for 2 hr. One of probable structures of the complexes is shown in Fig. 1, in which a linear C-Tl-C moiety is situated in the center of DBC. In the NMR spectra both the aromatic and the polyether ring protons of DBC are shifted to downfield by about 0.15 ppm by complex formation. These signals are not affected by an addition of free DBC at 70°C. This fact indicates that the exchange between free DBC and that in the complex is slow. $\delta(Tl-CH_3)$ values show an upfield shift of 0.3 - 0.1 ppm but $J(Tl-CH_3)$ values change only a small extent by complex formation.

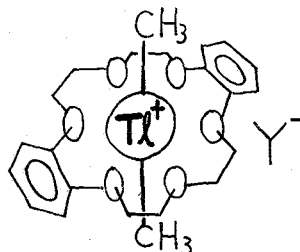
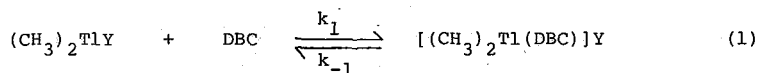


Figure 1

The rate constants of complex formation shown in equation (1) were obtained by measuring the change of the proton signals of the aromatic rings of DBC. The linear relations are obtained for the plots of t vs. $\ln[(CH_3)_2TlY]/[DBC]$. The values of the second order rate constant of equation (2)



$$d[(CH_3)_2Tl(DBC)]Y/dt = k_1[(CH_3)_2TlY][DBC] \quad (2)$$

were calculated from the slopes of these plots. These values at several temperatures are

Table I The rate constants and activation energies for complex formation of eq.(1).

	k_1 (1/mol.min)				E_a (Kcal/mol)
	23°	40°	49°	70°	
$(CH_3)_2Tl$ (picrate)	2.4×10^{-2}	8.6×10^{-2}	5.2×10^{-1}	2.1	22
$(CH_3)_2Tl$ (hfa)	5.8×10^{-3}	4.9×10^{-2}	1.0×10^{-1}	4.0×10^{-1}	21

shown in Table I. The activation energies of complex formation reaction were obtained from the Arrhenius plots. The values obtained are shown in Table I. These values are rather larger than that of the $[Na \cdot DBC]^+$ complex ($E_a=12.6$ kcal/mol).

15-crown-5 and $(CH_3)_2TlY$ did not react. $(CH_3)_2Pb(H_2O)_2Y$ (Y =picrate,hfa) did not form the complex with DBC and 15-crown-5, but decomposed into $(CH_3)_3PbY$ when 15-crown-5 was added.

(東大理) 荒田洋治

高分解能NMRの応用分野のうちで、生体系の研究は常に望みうる最高の感度と分解能加えて実験法の最大限の多様性を要求して来た。この意味において過去数年にわたり、高分解能NMRの測定技術の発展と生体系を志向する研究とは互に原因であると同時に結果でもあったということができよう。したがって、NMRの最近の主要な進歩は生体系を対象とする研究のなかにすべておりこまれていたといっても過言ではない。本講演においてはこの点を考慮しつつ、NMRの実験法と応用分野の最近の動向、問題点をまとめ、Bセッションの序としたい。

I. 検出系

a. 検出系の感度とダイナミックレンジ： これまでに提案されたマルチチャンネル検出法のうちパルスフーリエ変換法および相関NMR法はルーチン化して実験室に定着、それぞれの特徴を生かして微弱信号の検出に広く用いられている。相関NMRは希薄水溶液の ^1H NMRのように広いダイナミックレンジを必要とする場合に極めて有効である。対象が低分子であれば、水信号から ~ 150 Hz以上はなれた信号の検出は ~ 0.1 mM程度の濃度で良好なスペクトルを容易に得ることができる。パルスフーリエ変換法の場合にも、saturation transferの起きない系では水信号の飽和によってダイナミックレンジを広げることができる。ほかに、弱いパルスを用いる方法などを用いているグループもある。試料の絶対量の少ない場合、何らかの理由により試料を希薄な状態に保つ必要がある場合、試料は無尽蔵にある場合など、種々の条件に合わせて、最適の検出感度を得るべく $1\sim 25$ mm用のプローブが用いられている。この結果、 ^1H は勿論のこと、 ^2H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P などが極めて広い応用分野において多彩に用いられることとなった。 ^{15}N は通常のアлкаロイド程度のもので現在 100 mg以上の試料を必要とする。今後のNMRの更に大きな発展のためには、何らかの方法により検出感度をなお一層向上させる必要がある。その有用さからいっても ^{15}N NMRの感度向上はNMRの今後をうらなう重要な試金石となろう。

b. 分離能： ^1H NMRの場合、情報を増す一つの方向はより高い磁場によるシグナル分離の改善である。すでに $400\sim 600$ MHz級の分光計の建設がいくつかの研究室(Carnegie Mellon, UCLA, Oxford)で開始されているが、磁石、プローブを中心とするエレクトロニクス系とも 360 MHzの壁は特に ^1H NMRの場合、予想以上に厚いと大きく、演者の経験では $270\sim 360$ MHz級の分光計はリボスクレアーズ、リゾチームなど分子量 15000 程度以下の場合には非常な威力を発揮し、 100 MHz分光計に比べ情報量の差は歴然としている。しかし、分子量が更に大きくなり、たとえばBence Jones dimer(分子量 5 万)になると、 360 MHz程度では 100 MHzにおける測定結果と比較して情報の質的な向上は期待をはるかに下まわっている。この点からいえば、生体系の構造化学的側面の研究に限っていても、磁場を高める努力のほか、研究法自体の質的な転換もまた必要と思われる。

C. 多様化: 多核種測定用のプローブが導入されつつあり、これによりNMRは「広い意味の無機化学」の将来に大きな影響を与えるものと思われる。多核種用の実験法は個々の核種についていうと、多かれ少かれ妥協を意味する。生体系を対象とするきびしい実験条件のもとでは、多様性(経済性)対最適条件の選択を常にせまられる。この点からいえば ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , などは最適条件が優先することが多くなるであろう。

II. デジタル技術

a. 実験の多様化による応用分野の拡大

デジタル回路の導入により分光計の安定性、性能は歴史的に向上した。また種々のパルス系列を組合せて、 T_1 , T_2 , $T_{1\rho}$ などの動力学的情報が広く一般に研究室で得られることになって来た。さらに Zeugmatography, 二次元フーリエ変換法などもデジタル技術抜きにしては考えられない。このようにデジタル技術の導入によりNMRの応用分野は量、質とも著しく拡大した。

b. データ処理技術の進歩と情報の選択的収集

フーリエ変換、たたみこみなどにもとづく種々の巧妙な技法の導入によるデータ処理技術の進歩はNMRの世界にも普及し、得られたスペクトルから有用な情報を必要に応じて効果的に選びだすうえで大きな貢献をしている。

c. デジタル化による数値処理の限界

16~20ビット固定長で行うフーリエ変換を中心とする数値処理の精度は予想(期待?)外に悪く、これは積算によって得られるS/N比に密接に関連している点で微弱信号の検出にとっては甚だ重要な問題である。同じ理由でスペクトルの強度の定量的な取扱いについては、データ処理の立場だけからいっても、今後検討すべき点が少ない。

III. 応用分野

ランタニドプローブ法による生体関連物質のコンホメーションの研究、ラジカルを用いる水素結合系の研究、 ^2H , ^{13}C NMRによる生合成過程の追跡など、我国においてもNMRの生体系への応用法が広く研究されている。同位体(トリチウム, 重水素)ラベルによるタンパク質中のヒスチジン残基の帰属も我国で生れた研究法の一つである。この研究はまた分野の異なる研究者の協力が今後益々必要であることを示している。そのほか、I, IIで述べた進歩は様々な形でそれぞれの研究室で活発に用いられている。生体系を対象とする研究についてみるならば、つぎの二つのアプローチにわかれNMRの応用分野は急激に発展しつつある。

a. 生体高分子の構造化学的研究

単離、精製した試料を用いる伝統的な分析法の流れに沿いNMRが縦横に用いられている。我国でもリボヌクレアーゼA, T_1 , エラクトキシン, アスパラギン酸アミノ基転移酵素, Bence Jones タンパク, 各種ヘムタンパクなど、また転移リボ核酸, 種々の糖類, 膜関連物質など対象の大きさに応じてNMRの特徴を生かした多くの研究が発表されている。

b. 生体系の非破壊分析

化学的にみれば不均一であるが故に意味のある「生体系」そのものを志向する研究は過

去一、二年急速に盛んになって来た。我国においては古く電通大NMRグループが、ヨーカー、トーフ、カイコ、まゆなどの非破壊分析を試み、状態分析の一例とした。近年は測定技術の飛躍的進歩により筋肉、臓器さらに進んで生物一個体を対象に ^{13}C 、 ^{31}P NMRを用いる研究が盛んに行われて顕著な結果が得られている。我国においても植物種子から鳥の卵にいたる広い分野の厚みのある研究が展開されつつある。

IV. 結び

高分解能NMRはほかの分光法では得がたい独特の精緻な情報をもたらす。反面、近年測定技術が飛躍的に進歩したとはいえ、その他の多くの機器分析法(それも感度向上のための特別な努力を払っていないごく普通の方法)に比べてその検出感度は依然としてあまりにも劣っている。ゼーマンエネルギーの小ささにもとずく宿命と割り切ってしまうにはNMRのもたらす情報はあまりにも質が高い。今後とも検出感度向上を中心課題の一つとして、NMR測定技術改善のためのなお一層の努力が必要であろう。

1. はじめに

前回(第14回)¹⁾に引き続き, 今回は 2D -decouplerの試作に成功したので, この装置を使って表題にかゝげた実測と解析を行ったので報告する。Fig. 1は前回における結果の一部を再録したもので同一分子内では J_{H-D} の値はHとDとを連結する化学結合の数に無関係な一定値を示し, 分岐された吸収図型のピークの数もD核の総スピン量子数($\sum I$)の値に依存し, $(2\sum I + 1)$ 本の線として表はれ, またそれぞれの線の相対的強度は純理論値とほぼ一致する。この(a), (b), (c)各の J_{H-D} の値はHz単位でFig. 1およびTable 1の左側に示してあるが, これらの値はこれからの ^{13}C -satelliteを通じての J_{H-D} の値とは本質的に全く異なる性格のものであると見なければならぬ。

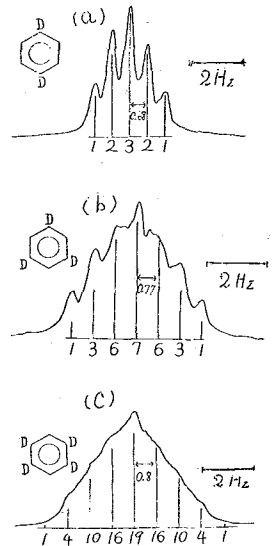


Fig. 1.

The central main PMR spectra of symmetrically deuterated benzenes.

2. 測定装置

今回の測定に使用した装置の大略をFig. 2に示す。

この図の中で, 太線の矢で示されている経路が今回新たに追加した spin decouplerの部分である。日立R-229PA型 spin decouplerの周波数源として, 安立電気MG-417A型 synthesizerをえらび, これを日立R-203型 Probe Balanceを通じて九産大既設のNMRスペクトロメータ日立R-22に付設した。

今回のこの装置の試作ははじめての試みであり, 研究費の都合もあって 2D -decouplerの付設だけに止どめたのであるが, 予想以上の好性能を示している。実例はFig. 3の上中の2段とFig. 4の右側の列を見ていただきたい。

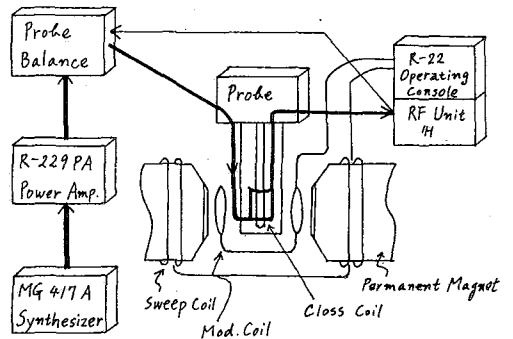


Fig. 2. Block diagram of the equipment.

今回の装置試作により, 満足な精度の測定ができた原因は, 安立-MG 417 Aの周波数安定度が勝っており, また出力も十分安定

はざと げんじろう, いけのうえ つねお, よねみつ ただし, そえじま やすひろ, あおきのぶひこ, ふじえた くにみ

化されているためと思われる。また当初から懸念されていた *spurious* 成分による像の干渉妨害率に全く認められなかった。なお synthesizer の設定周波数が 200 Hz から 30 MHz まであることから、適倍を行うことなく、 ^1H , ^{19}F , ^{31}P 等一部の核種をのぞき、殆んど全核種を対象とする実験にまで拡張することが可能であり、そのために必要な装置の追加は比較的僅少で事足りるわけである。今回のこの ^2D -decoupler の試作に要した経費は専ら文部省科研費(昭.51年度-52年度)に依ったものである。

3. 結果と考察

1,3,5- d_3 benzene (Fig.1(b)), これについての *signal chart* の代表的なものを Fig.3 に示した。図の中段の *signal* は上段のものを ^2D -decouple しただけのものであるが、中段では 1 対の *outer satellite (triplets)* と、これに関連した *inner satellite (doublets)* が鮮明に浮き彫りされていることは注目に価い。このパターンは AM_2X 型 ($\text{X} = ^{13}\text{C}$) に属するもので Freeman²⁾ による 1,3,5-trichlorobenzene の測定結果と全く同型のものである。今回のこの *triplet* と *doublet* の拡大図から $^1\text{J}_{\text{H-H}} = 1.40 \text{ Hz}$, 更らに中央の *main peak* に跨がる両 *doublet* 間の距離から直に $\text{J}_{^{13}\text{C-C-C-H}} = 8.0 \text{ Hz}$ (table 1) を直読することができる。一オ Fig.4 の中段の *signal* は $20 \text{ Hz}/100 \text{ sec}$ の歩みでの *single scan* で得たものであるが、適当に横中をなげ、歩みを遅くすると Fig.3 の下部のパターンを得 (*quintet*)。この吸収線の相対的強度は、decouple されて生じたプロトンの *triplet* から出発し、この際環プロトン 1 に対し、これに最近隣接する 2 の D だけが couple するとキウ条件 ($I=1, n=2$ で単位強度比 = $1:2:3:2:1$) を入れることにより $1:4:8:10:8:4:1$ となり、実像とよく一致する。Fig.3 下の作図はこの結果を具体的に示し、これから $^3\text{J}_{\text{H-D}} = 1.38 \text{ Hz}$ を得るが、この値は p-位に相当する $^5\text{J}_{\text{H-D}}$ の値を無視してのことである。

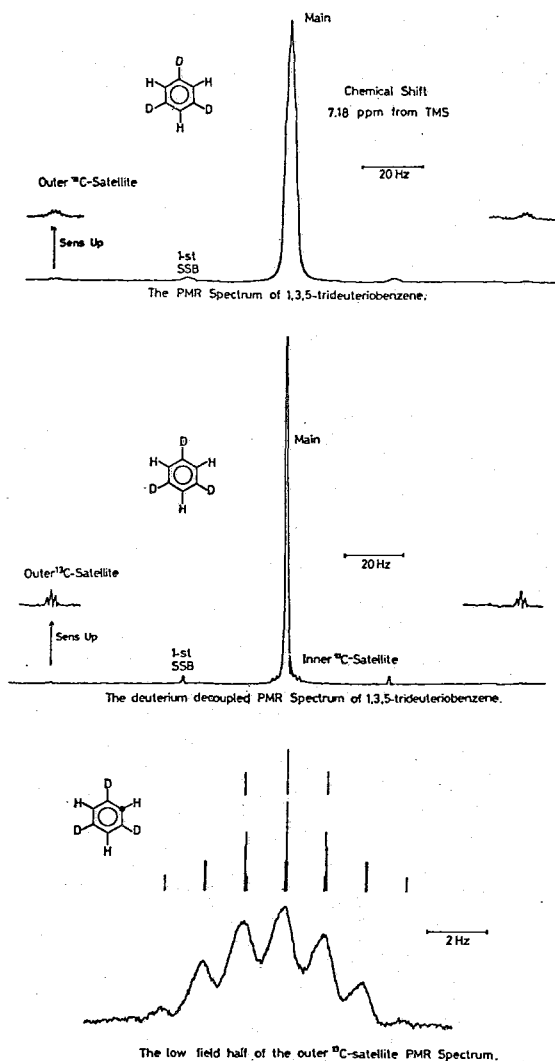
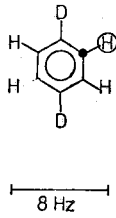


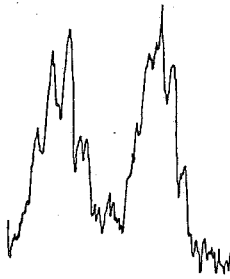
Fig.3. ^{13}C -satellite PMR spectra of 1,3,5- d_3 benzene.

1,2,4,5-d₂ benzene (Fig.1(a))

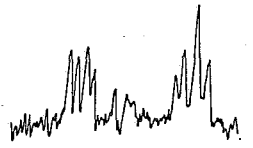
この場合, decouple され = outer satellite の ¹H-signal は最も単純な doublet で (Fig.4 下), J の値は 0.69 Hz (勿論符号は不明) である. decouple されない signal は餘りにもブロードなので, その意味で ³J_{H-D}, ⁴J_{H-D} はいずれもその値は不確定である. Table 1 の () で括った値はこれらの不確定性を示す.



¹³C-Satellite-¹H Spectrum



¹³C-Satellite-(²D)¹H Spectrum



1,4-d₂ benzene, このものの main PMR スペクトルは三者の中で一番単純できれいな quintet を示すが (Fig.1), outer-satellite の signal は重水素核を decouple しても相当複雑な型を示している (Fig.4 上段右側). しかし, この signal の型は 1,4-dichlorobenzene のそれと酷似しており,³⁾ 本質的に両者は同一系統のスピニン系—ABCD 及 5スピニン系—とみてよい. 今回われわれは Wiberg⁴⁾ による NMR spectra programs を九大大型 computer FACOM 230-75 に適合させることができたので, このプログラミングに従って

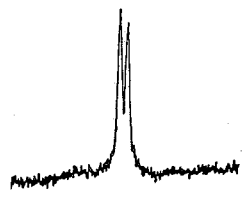
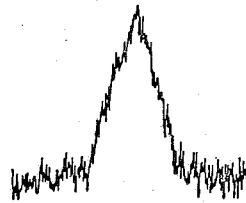
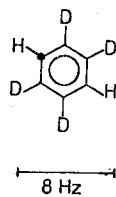
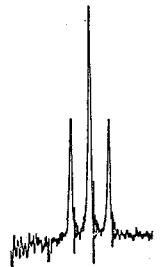
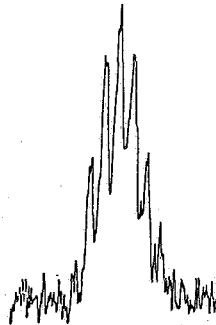
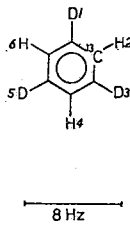


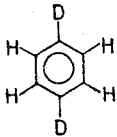
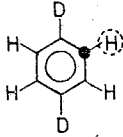
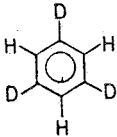
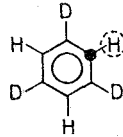
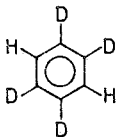
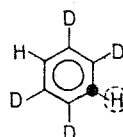
Fig.4. The outer low field halves of the ¹³C-satellite PMR spectrum of symmetrically deuterated benzenes.

て実測に最も近いスペクトルを与える J の値の吟味を行っている. 今のところ Table 1 の (a) 段にかられた4種の J の値が, (a) に属する outer satellite の signal の再現に最もよく適合する.

然しながら (a) に属する J_{H-C} の値, 並びに ⁴J_{H-H} および ⁵J_{H-H} はいずれも (a) グループに特有な値ではなく, またこの ³J_{H-H} の値は従来のベンゼンの satellite から来る ortho 間の J_{H-H} の値⁵⁾ の平均値を示していることから, 一般に, 対称的なベンゼンの D-置換体では ⁶C を伸立ちとする J_{H-H} の値は, もとのベンゼンそのものの値と大差ない値を示すと見えようである.

今後残されている問題の一つとして, ベンゼンの非対称的な D-置換体では main および ¹³C-satellite におけるそれぞれの J の値がどのような影響を受けるかに注目する必要がある. 現状では main における J_{H-D} の値はひどく影響される結果を得ている.

Table 1. Coupling Constants of 1,4-dideuteriobenzene, 1,3,5-trideuteriobenzene, and 1,2,4,5-tetra-deuteriobenzene (in Hz)

Main structure (Main PMR)	^{13}C -isotopomer (Deuterium decoupled outer ^{13}C -satellite PMR)
 $^3J_{\text{H-D}} = ^4J_{\text{H-D}} = 0.68$ (a)	$^1J_{\text{H-C}} = 158.29$ $^3J_{\text{H-H}} = 7.60$ $^4J_{\text{H-H}} = 1.40$ $^5J_{\text{H-H}} = 0.69$ 
 $^3J_{\text{H-D}} = ^5J_{\text{H-D}} = 0.77$ (b)	$^1J_{\text{H-C}} = 158.34$ $^3J_{\text{H-C}} = 8.00^*$ $^4J_{\text{H-H}} = 1.40$ $(^3J_{\text{H-D}} = 1.10 - 1.40)$ $(^5J_{\text{H-D}} < 0.15)$ 
 $^3J_{\text{H-D}} = ^4J_{\text{H-D}} = 0.80$ (c)	$^1J_{\text{H-C}} = 157.30$ $^5J_{\text{H-H}} = 0.69$ $(^3J_{\text{H-D}} = 1.10 - 1.40)$ $(^4J_{\text{H-D}} = 0.20 - 0.22)$ 

* This value was obtained from the inner ^{13}C -satellite PMR spectrum

文献: 1) 第14回NMR討論会要旨集, 1A07 (1975), 10月16日,

- 2) R. Freeman, *J. Chem. Phys.*, **43**, 3087 (1965). 3) J.M. Read, Jr., R.W. Crecely, J. H. Goldstein, *J. Mol. Spectry.* **25**, 107 (1968). 4) K.B. Wiberg, "Computer Programming for Chemists", W.A. Benjamin Inc., N. Y. (1965). 5) J.M. Read, Jr., R.E. Mayo, J.H. Goldstein, *J. Mol. Spectry.* **22**, 419 (1967). 6) S. Castellano, et al. *JACS*, **88**, 4741 (1966).

PMR Study of Symmetrical Deuteriobenzenes

The normal and deuterium decoupled PMR spectra of 1,4-dideuteriobenzene, 1,3,5-trideuteriobenzene, 1,2,4,5-tetra-deuteriobenzene are measured. H-H and H-D coupling constants obtained from the spectral analyses of non- ^{13}C -structures are different from those of the outer ^{13}C -satellite PMR spectra. These results are compared with ^{13}C -satellite PMR and ^{13}C CMR data of the common benzene.

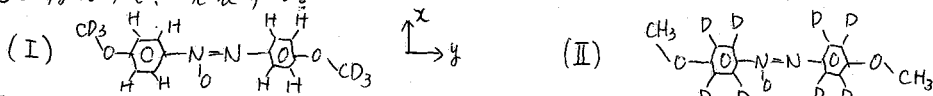
Genjiro Hazato, Tsuneo Ikenoue,* Tadashi Yonemitsu,
Yasuhiro Soejima, Nobuhiko Aoki,** Kunimi Fujieda**

Kyushu Sangyo Univ.
* Tohoku Univ.
** Naka Works, Hitachi Ltd.

選択的に重水素化したPAAの液晶状態における高分解能NMRスペクトル
(東工試) ° 早水紀久子, 山本 修

緒言: 分子構造は固体におけるX線解析, 気体におけるマイクロ波・電子線解析によって決定できることはよく知られている。またこの10年間に、液晶中に小さな分子を配向させて、NMR法から分子構造に関する知見を得た例も数多く報告されてきている。しかしながら、液晶物質そのものの分子構造に関しては、固体におけるX線解析の結果は知られているが、興味のある液晶状態においてはまだ知られていない。一般に液晶のNMRスペクトルは双極子結合による分裂が複雑なために、全体として幅広い線になってしまう。

我々はネマティック液晶PAA (p,p'-azoxyanisole) を選択的に重水素化したPAA-d₆ (I) とPAA-d₈ (II) を合成し、プロトンγ₂の測定と解析から、液晶状態と純液体状態における液晶分子の運動性について論じてきたが²⁾、これらの化合物の²D共鳴のスペクトルには微細構造がみられることがわかった。その解析から液晶状態における分子構造および配向性について知見を得るので、発表する。



実験: 選択的に重水素化したPAA-d₆ およびPAA-d₈は我々の研究室で合成した。スペクトルの測定にはVarian XL-100を用い、¹H共鳴の測定ではC₁₃法, ²D共鳴の測定ではFT法によった。スペクトル領域は18kHzにおよぶ場合があること。測定には種々の工夫が必要であった。PAAは117°-135°の範囲でネマティック相を示すので、測定は118°-134°の角でくりかえし行った。

スペクトルの解析 2つの磁気的核i, jと結合軸に關するオータ-パラメータS_{ij}は次のように定義されている。

$$S_{ij} = (3\cos^2\theta_{ij} - 1)/2 \quad (1)$$

ここでθ_{ij}はベクトルr_{ij}と外部磁場がなす角度である。核ij間のdirect dipolar coupling constant D_{ij}は

$$D_{ij} = (\gamma_i\gamma_j h/4\pi) (1/r_{ij}^3) \cdot S_{ij} = K_{ij} (1/r_{ij}^3) S_{ij} \quad (2)$$

であり、K_{HH} = 120180(H₃A³), K_{HD} = 18,438(H₃A³)、K_{DD} = 2,831(H₃A³)である。また²D核は四極子モーメントを有するので、液晶中ではe₂Qによりスペクトル線は2本に分かれる。その分離幅Δν_{e₂Q}は

$$\Delta\nu_{e_2Q} = \frac{3}{2} (e^2qQ/h) S_{CD} \quad (3)$$

となり、S_{CD}は²D核の主軸、通常はC-D軸のオータ-パラメータである。ここでは非対称因子は無視する。

PAAは相異なるベンゼン環とメチル基を各々2個有するが、この2つのベンゼン環間のスピン相互作用を無視すると、PAA-d₆はAA'BB'X₃スピン系(I_A=I_B= $\frac{1}{2}$, I_X=1)であり、PAA-d₈もまたAA'BB'X₃スピン系(I_A=I_B=1, I_X= $\frac{1}{2}$)となる。PAA-d₆の場合の1³C-²DとしてD_{AA'}(=D_{BB'}), D_{AB}(=D_{A'B'}), D_{AB''}(=D_{AB}), D_{AX}, D_{BX}, D_{XX}および $(e^2qQ/h)CD_3$ を考慮し、PAA-d₈の場合にはD_{AB}(=D_{A'B'}), D_{AX}, D_{BX}, D_{XX}および $(e^2qQ/h)nu_{D}$ のみを考慮した。このような系を取扱う一般的方法としてゴロウクらは¹⁾の通り、適宜にスピン図表を作成してエネルギー値を求め、

はやみすきこ、ちまもとあさむ

スペクトルを計算した。計算スペクトルは Fig 1~Fig 4 に示されているが、実測スペクトルとの一致は満足すべきものと思われる。なお PAA の 2 つのベンゼン環およびメチル基は相互に異なる配向を有するので、実測スペクトルは 2 つの AA'BB'X₃ スピコン系の重ね合わせになっている。今ここでは配向の異なる 2 つの環、いかに之れは "S_{yy} の大きい環と A 環、小さい方は B 環とよぶことにする。また D_{AX} の検討から、S_{yy} の大きい環に結合しているメチル基の 3 回対称軸のオーターパーメータ S₃₃ (真値を取る) の絶対値は小さい方である。

結果と考察:

(a) PAA-d₈ Fig 1 の環の重水素のスペクトルは e²qQ によって分裂した高磁場側のものが示されている。H デテックアップしたスペクトル (c) より、D-D による分裂を求め、これより S_{yy} を求めて Fig. 5 に示した。図から明らかのように、S_{yy} の温度依存性は、よく見られるパターンを示している。また、 $\frac{e^2qQ}{h} = 180 \text{ KHz}$ と仮定して SCD を求めた。オルト軸と CD 軸との角度を θ とすると、

$$S_{CD} = S_{XX} + (S_{yy} - S_{XX}) \sin^2 \theta$$

である。一つのベンゼン環に対し 2 つの SCD 値が求まっているので、OCH₃ 側の $\theta = 60^\circ$ と仮定して計算した S_{yy} の温度依存性が Fig. 5 に示されている。2 つの環の S_{XX} がほぼ等しいことから、2 つのベンゼン環は相互に平面になっていることが判る。この時、N-側の θ は $59^\circ 10'$ と $58^\circ 44'$ になっている。

Fig 2 の CH₃ のスペクトルを解析して求めた、メチル基の 3 回対称軸のオーターパーメータ S₃₃ の温度依存性を Fig 6 に示す。今 $\angle \text{COC} = \alpha$ とすると、

$$S_{33} = S_{yy} \left(\frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{2} \right)$$

の関係があるから、 α を求めると、 $120^\circ 56'$ と $121^\circ 54'$ になり、温度に対して一定である。

(b) PAA-d₆ Fig. 3 に CD₃ のスペクトルを示す。H デテックアップしたスペクトルから明らかのように、e²qQ によ

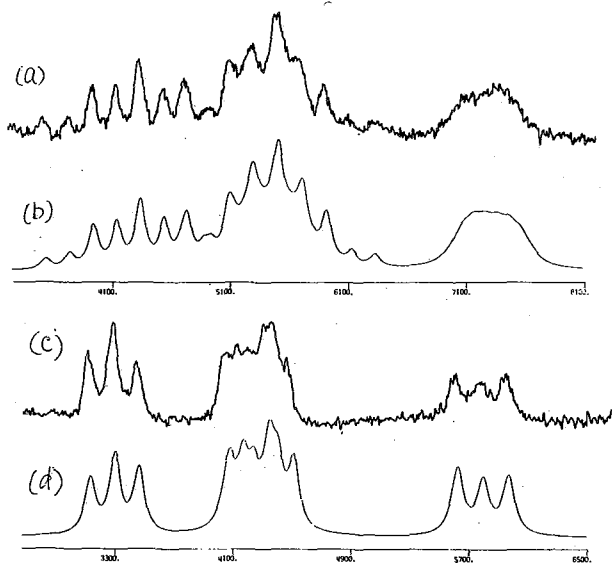


Fig.1. The upper half spectra of ²D resonance for the ring deuterons of PAA-d₈ (a) observed at 121.6°C, and (b) calculated, and its ¹H decoupled ²D spectra (c) observed at 130.6°C and (d) calculated.

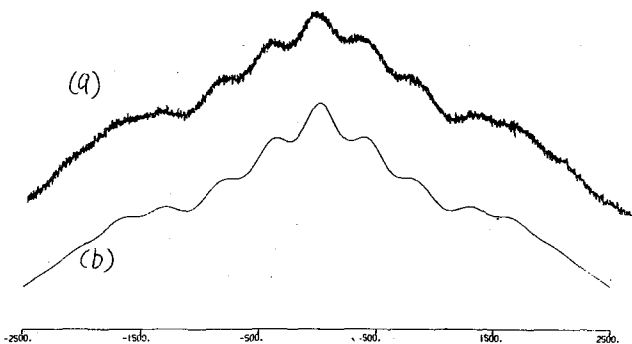


Fig.2. The ¹H resonance spectra of the methyl protons of PAA-d₈ (a) observed at 123.6°C and (b) calculated.

て分裂した2組のスペクトル線である。(3)式を用い、 $(e^2q/k) = 150 \text{ KH}_3$ と仮定して求めた S_{33} と Fig. 6 に示す。PAA-d₈の S_{33} より、かなり絶対値が大きくなっていく。Fig. 4 の環プロトンのスペクトル解析から求めた S_{xx} と S_{yy} と Fig. 5 に示す。明らかに PAA-d₈ の S_{xx} と S_{yy} とはかなり異なった値を取る上に、2つの環の間の相異も顕著である。 S_{33} と S_{yy} から求めた $\angle \text{COC}$ は $121^\circ 41'$ と $123^\circ 13'$ で、かなり大きくなっていく。

一般に、重水素置換を行なうことは、分子構造を変化させることなしに、測定パラメータを増加することとして取り扱われている。しかし液晶状態においては、配向の度合と決めるオーダーパラメータが変化するのはばかりでなく、分子構造まで変化することがわかった。また固体状態の分子構造と比較すると、分子全体が細長くなって、液晶中に配向している傾向がある。

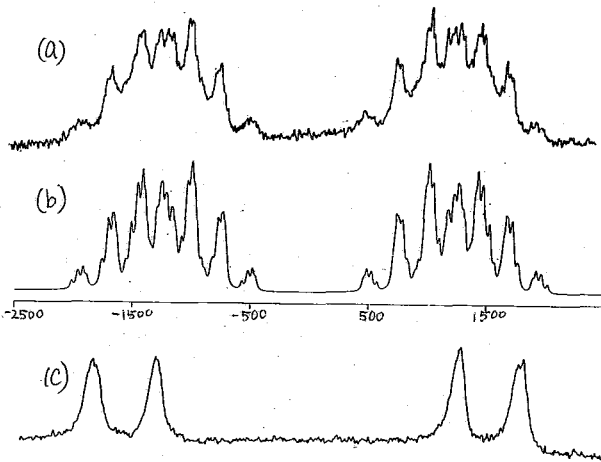


Fig. 3. The ^2D resonance spectra of the methyl deuterons of PAA-d₆ (a) observed at 118.3°C and (b) calculated, and (c) its ^1H decoupled ^2D spectrum observed at 120.2°C .

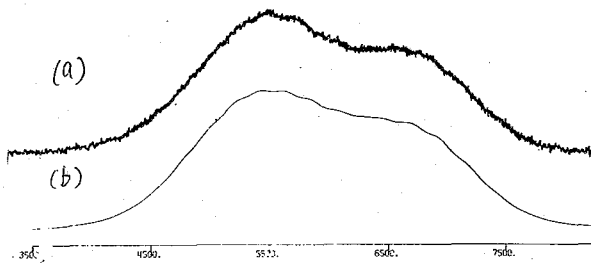


Fig. 4. ^1H resonance spectra of the ring protons of PAA-d₆ (a) observed at 125.7°C and (b) calculated.

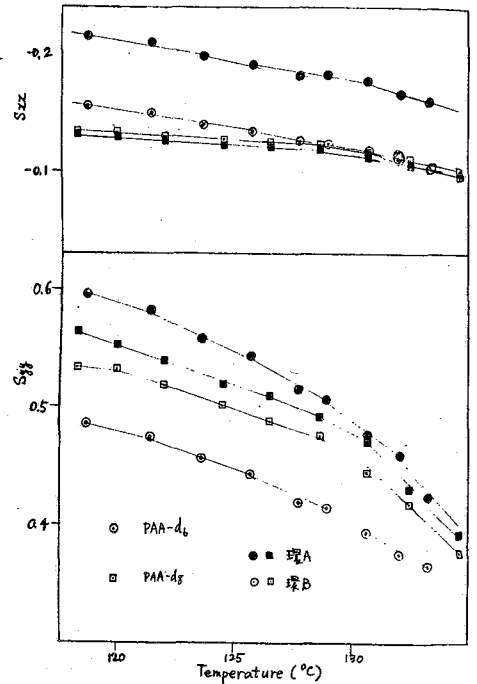


Fig. 5. The temperature dependences of the order parameters S_{xx} and S_{yy} for PAA-d₆ (○ ●), and PAA-d₈ (□ ■).

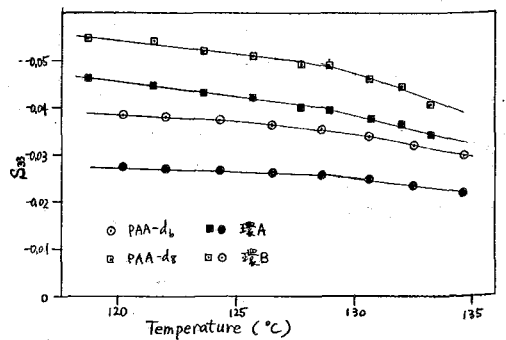


Fig. 6. The temperature dependences of S_{33} for PAA-d₆ (○ ●) and PAA-d₈ (□ ■).

High Resolution ^1H and ^2D Resonance Spectra of Selectively Deuterated PAA's

National Chemical Laboratory for Industry

Kikuko HAYAMIZU and Osamu YAMAMOTO

The nematic compound p,p'-azoxyanisole (PAA) has been studied from various points of view. We have been studied its selectively deuterated compounds PAA-d₆ (the methyl protons are deuterated) and PAA-d₈ (the ring protons are deuterated) by measuring proton T₁'s in the nematic and isotropic liquid states,¹ and also in the solid state.² Here high-resolution ^1H and ^2D spectra for these compounds are observed in the nematic state, and their spectral analyses are carried out to obtain the order parameters, which define the alignment of a molecule in the mesophase, and to determine the molecular structure, which is expected to be different from that in the solid state.

Figs. 1 and 3 are ^2D resonance spectra for the ring deuterons of PAA-d₈ and for the methyl deuterons of PAA-d₆, respectively. In these figures, ^1H decoupled spectra and calculated ones are also included. Figs. 2 and 4 are ^1H resonance spectra for the methyl protons of PAA-d₈ and for the ring protons of PAA-d₆, and the calculated spectra are also shown. The spectrum of PAA-d₈ is calculated as an AA'BB'X₃ (I_A=I_B=1, I_X=1/2) spin system and that of PAA-d₆ are assumed as an AA'BB'X₃ (I_A=I_B=1/2, I_X=1) spin system. Since the alignment of the two benzene rings are a little different from each other, the spectrum consists of the superposed patterns. The agreement between the observed and calculated spectra is satisfactory. Assuming that $(e^2qQ/h)_{\text{CD}_3} = 150\text{KHz}$, $(e^2qQ/h)_{\text{RingD}} = 180\text{KHz}$, and that the distances between the protons are the same in the solid state,³ the order parameters S_{XX}, S_{YY}, and S₃₃ are calculated, and their temperature dependences are plotted in Figs. 5 and 6. Here the order parameter S_{YY} defines the alignment of two ortho protons or deuterons, which is nearly parallel to the molecular axis, S_{XX} is the order parameter for the ring plane and S₃₃ is the order parameter for the threefold symmetry axis of the methyl groups.

Usually the deuteron substitution is carried out for the purpose of increasing the parameters under the assumption that the molecular structure does not change. But in the nematic state, the order parameters for PAA-d₆ and PAA-d₈ are quite different, and the molecular structure is also different. For example, angles COC are 121°41' and 123°13' for PAA-d₆, and 120°56' and 121°54" for PAA-d₈, which are different from the angles determined in the solid state (118.7° and 118.1°).³ In the nematic state the molecule is elongated compared with that in the solid state.

1. K. Hayamizu and O. Yamamoto, J. Chem. Phys., **66**, 1720 (1977).

2. K. Hayamizu and O. Yamamoto, The 36th annual meeting of the Chemical Society of Japan (April, 1977).

3. W.R. Krigbaum, Y. Chatani, and P. Barber, Acta Cryst. **B26**, 97 (1970).

(神大・理) 山田博昭[○] 西谷新一 藤野和彦 世良明

溶媒-溶質分子間相互作用については、高分解能NMR法を用いた数多くの研究例が報告されているが、高圧下におけるそれらの相互作用をNMR的に追跡した例はほとんどないようである。以前、われわれは独自に開発した高圧・高分解能NMR法を用い、クロロホルムプロトンが芳香族溶媒中で高磁場側に圧力シフトすることを見出した²⁾。クロロホルムと溶媒分子によるπコンプレックス形成の度合いが高圧力下で強められ、環による磁気異方性効果が増大するためと解釈される。今回は表題の化合物を種々のπ塩基溶媒中で、1500気圧附近まで追跡した。フェニルアセチレンを溶媒とした場合、エチニル基およびフェニル基の二つのπ電子系がプロトン受容体となり得る。この二種のπ電子系の磁気異方性は配位したプロトンに対して互いに逆方向の溶媒シフトをもたらすので、溶媒効果の圧力依存性に興味を持たれた。また芳香族溶媒中での圧力シフトと比較するため、π電子系としてエチニル基しか持たない脂肪族アセチレン中でも同様な追跡を試みた。


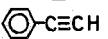
[測定]

プロトン化学シフトの測定は、100MHz (JNM-PS-100)で行ない、常圧での通常の測定と同様、サイドバンド法により決定した。10-15回のくりかえし測定におけるシフトの平均誤差は±0.05Hzであった。試料には表題の化合物を内部基準のシクロヘキサンと共に溶かし込み、溶質の濃度が10 mol% 以下になるように調整したものをを用いた。経験上、この程度の濃度であれば、圧力シフトへの濃度効果は無視し得ると見積もられる。なお、試料の温度は測定中 34.6-35.0°Cであった。

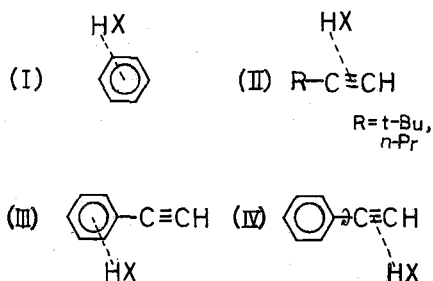
[結果と考察]

溶媒-溶質分子間相互作用の圧力効果について議論する前に、まず常圧における相互作用の強さを知る目的で、外部基準法により、n-ヘキサン溶媒から種々のπ塩基溶媒中への溶媒シフト(Δs)を測定した。結果(体積磁化率補正済み)を表1に示す。

Table 1. Solvent Shifts* (Δs) in Hz, ν₀=100MHz

solvent	CHCl ₃	⊙-C≡CH	C ₆ H ₁₂ (cyclohexane)
	+128	+44	+44
	+62	+13	+47
t-Bu-C≡CH	-29	-25	-1
n-Pr-C≡CH	-32	-30	-1

*δⁱ(in a given solvent) - δⁱ(in n-hexane)
, corrected for the bulk susceptibility effect.


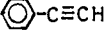
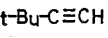
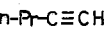


やまだひろあき・にしにしんじ・ふじのかずひこ・せらあきら

まず、溶媒を *n*-ヘキサンからフェニルアセチレンにかえた場合について、 $\text{PhC}\equiv\text{CH}$ の ΔS と C_6H_{12} の ΔS を比べてみると、前者の高磁場シフトがあきらかに小さい。フェニルアセチレンでは(III)よりも(IV)のタイプの自己会合が ΔS に寄与していると考えられる。これに対し、 HCCL_3 は C_6H_{12} よりも高磁場シフトが大きい。模型的な考察から、 $-\text{CCl}_3$ 原子団のかさばりによって(IV)の相互作用が困難なため(III)が比較的多くなっていることに起因すると解釈される。 HCCL_3 と $\text{PhC}\equiv\text{CH}$ を *n*-ヘキサン中から脂肪族アセチレン中へかえた場合、その ΔS は両者ともほぼ等しいので、見かけ上(II)の型の相互作用の強さが常圧では同程度であると見なすことができる。

次に、 HCCL_3 および $\text{PhC}\equiv\text{CH}$ の化学シフトを種々の元塩基溶媒中、 $1500 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ まで追跡した際の測定結果を表2.にまとめる。数値は常圧から $1500 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ への昇圧に伴う、各々の化学シフトの圧力変化(但し、内部基準 C_6H_{12} から見た相対値)の大きさと方向を表わしている。ところで内部基準シクロヘキサン自身も、仮想的な1気圧の外都基準から見れば圧力

Table 2. Pressure Shifts* in Hz

solvent	HCCL_3	C_6H_{12}
	+ 5.2	- 3.5
	+ 0.2	- 9.0
	- 4.0	-14.5
	- 2.7	-11.4

* Pressure shifts relative to the internal cyclohexane caused by the compression of the sample up to $1500 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$

効果を受け、昇圧に伴って、どちらかにシフトしているはずである。常圧での溶媒シフト(ΔS)と圧力シフトを組み合わせて、化学シフトへの圧力効果を考察してゆく上で、できれば圧力シフトについてもその絶対値がわかれれば理想的である。そこで今回は、シクロヘキサンの絶対圧力シフトと呼ばれるべきもの(以後 Δp とする)を、近似的に評価した。ベンゼン中におけるシクロヘキサンの希薄溶液を考えよう。ベンゼンの圧縮率から、この溶液の体積は1気圧から1500気圧まで圧縮すると、ほぼ10%減少すると計算される。これはベンゼンの分子間距離の約3%の短縮に相当するが、ベンゼン-シクロヘキサン分子間距離についても同様のことと言えるであろう。ところでシクロヘキサンを *n*-ヘキサンからベンゼンに溶かしかえた場合の溶媒シフト(ΔS)は $+44 \text{ Hz}$ ($\nu_0 = 100 \text{ MHz}$)であり、これは大部分ベンゼンの磁気異方性効果によるものと考えてさしつかえない。そこで加圧に伴う体積収縮によって、常圧におけるこの磁気異方性効果、 $+44 \text{ Hz}$ がどの程度増加するかを見積もった。まず(a)ベンゼン分子の $\Delta\chi$ に対する圧力効果を無視し、更に(b)ベンゼン、シクロヘキサンが無極性であり、分子の形状も球状に近いことから、加圧によって分子間距離の等方的な圧縮のみが起こると仮定した。このような前提のもとでは、シクロヘキサンの圧力シフトは磁気異方性効果の幾何因子

$$\frac{1}{R^3} (1 - 3\cos^2\theta)$$

のうち、主として R (ベンゼン-シクロヘキサンの分子間距離)の減少のみによって誘起されると近似できよう。ここで R の短縮率として先に述べた3%を見積ると、ベンゼン中

シクロヘキサンの、常圧から $1500 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ までの加圧に伴う絶対圧カシフト (Δp) として、 $+4.4 \text{ Hz}$ の値が得られる。フェニルアセチレン中、シクロヘキサンの Δp はベンゼン中の場合とほぼ等しい (Δs が互いにほぼ等しい約) と近似し、 $+4.4 \text{ Hz}$ と見積った。脂肪族アセチレン溶媒の場合、シクロヘキサンの溶媒シフト (Δs) 自体が非常に小さく ($+1 \text{ Hz}$)、従って溶媒の圧縮率に無関係に、 $\Delta p \approx 0$ とした。表 3. に以上の結果をまとめ、合わせて溶媒シフトに対する絶対圧カシフトの比 $\Delta p/\Delta s$ も示した。フェニルアセチレンの自己会合およびクロ

Table 3. Ratio of estimated absolute pressure shift Δp , to solvent shift, Δs , in various solvents.

solvent	HCCl_3		C_6H_6		C_6H_{12}	
	Δp	$\Delta p/\Delta s$	Δp	$\Delta p/\Delta s$	Δp	$\Delta p/\Delta s$
C_6H_6	+9.6	0.08	+0.9	0.02	+4.4	0.10
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-C}\equiv\text{CH}$	+4.6	0.07	-4.6	-0.35	+4.4	0.09
t-Bu-C \equiv CH	-4.0	0.14	-14.5	0.58	0	0
n-Pr-C \equiv CH	-2.7	0.08	-11.4	0.38	0	0

ロホルム-フェニルアセチレンの会合については(III) \rightleftharpoons (IV)の速い平衡を考えるのが妥当であろうが、化学シフトに対する圧力効果と考察してゆく上で、まず①圧力の増大に伴って、溶媒-溶質分子間距離の単なる等方的な圧縮がもたらは起り、(III) \rightleftharpoons (IV)の平衡定数は不変であると仮定しよう。このような場合、換言すれば観測の対象となるプロトンは高圧においても常圧における溶媒和形態を維持して、ただ溶媒との距離だけが短

縮するのだから、溶媒シフトに対する絶対圧カシフトの比 ($\Delta p/\Delta s$) は、それぞれの溶媒中で一定の値をとるはずである。フェニルアセチレン中 HCCl_3 と C_6H_{12} については似かよった値をとるが、 $\text{PhC}\equiv\text{CH}$ は -0.35 と大きく食い違ふ。そこで②(III) \rightleftharpoons (IV)の平衡定数に対する圧力効果も考慮に入れ、エチニルプロトンは高圧下では(IV)が増え、溶媒の $\Delta\chi_{\text{C}\equiv\text{C}}$ による低磁場シフトが余分に付加されたと考え、この圧カシフトの異常をうまく説明できようである。模型的な考察からも、エチニルプロトンは、棒状の $\text{C}\equiv\text{C}$ 結合の先端に位置するので高圧下では溶媒であるフェニルアセチレン分子の「スキマ」とも言うべき $\text{C}\equiv\text{C}$ 結合上に集まりやすく、高圧では密な充填形式をとりやすい方向に平衡が移動すると言える。このことはターナルアセチレン中における $\text{PhC}\equiv\text{CH}$ の挙動についても同様に言え、 $\Delta p/\Delta s = 0.58$ という正の大きな値となって反映されている。反対にクロロホルムはかさばりの高い $-\text{CCl}_3$ 原子団を有しており、分子の形状が偏平なゆえにそういった傾向を示さず、 $\Delta p/\Delta s$ の値は C_6H_{12} の場合と似かよったものとなっている。以上の説明は、熱力学的な考察から得られる筈とよく調和し、分子間相互作用に対する圧力効果に分子の形状やかさ高さが大きなかわりを持っていることが高分解能 NMR の立場から明らかになった。

1) H. Yamada, Rev. Sci. Instrum., 45, 640 (1974).

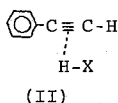
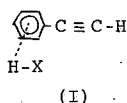
2) H. Yamada, T. Ishihara, and T. Kinugasa, J. Am. Chem. Soc., 96, 1935 (1974).

HIGH-PRESSURE HIGH-RESOLUTION NMR. PRESSURE DEPENDENCE OF THE PROTON CHEMICAL SHIFT
OF PHENYLACETYLENE AND CHLOROFORM.

Hiroaki Yamada, Shinji Nishitani, Kazuhiko Fujino, and Akira Sera

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University, Nada-ku, Kobe

In connection with the earlier report¹⁾ on the pressure dependence of chloroform proton resonance in aromatic solvents, chemical shifts of phenylacetylenes and chloroform have been measured in dilute solutions of phenylacetylenes, alkylacetylenes, and benzene at 35°C by means of 100 MHz high pressure NMR.²⁾ It seemed of interest to us to examine the nature of the pressure effect on the weak interaction between slightly acidic hydrogen and the solvent molecule which contains a dual proton accepting site:



H-X = H-CCl₃, R-C≡C-H

One notable feature of the present observations is that the chemical shift of the acetylenic proton of phenylacetylene is largely displaced to lower field (-9.0 Hz relative to the internal cyclohexane) with increased pressure up to 1500 kg/cm², while the chemical shift of chloroform proton in phenylacetylene remains nearly unaffected (+0.2 Hz relative to the internal cyclohexane). The shape and size of the molecules should govern the mode of association. Hence, the marked difference observed under pressure is thought to be caused from molecular characteristics of chloroform and phenylacetylene. The acetylenic proton would be expected to approach the triple bond more closely than the chloroform proton so that the association of the type (II) allows the molecules to pack together more tightly than that of (I). Thus, for the self association of phenylacetylene at high pressure, the structure (II) is expected to prefer thermodynamically over (I). Because of the strong magnetic anisotropic effect associated with the triple bond, the proximity of the acetylenic proton to the triple bond at high pressure might be reflected as a increased deshielding of that proton. The data for the pressure dependence of the proton chemical shifts in the other solvents support this tentative interpretation.

1) H. Yamada, T. Ishihara, and T. Kinugasa, J. Am. Chem. Soc., 96, 1935 (1974).

2) H. Yamada, Rev. Sci. Instrum., 45, 640 (1974).

アセチレンを架橋団とする新型白金二核錯体の³¹P NMRスペクトル

(東大・生産研) ○ 鯉江泰行 篠田純雄 斎藤泰和

1. はじめに

中心金属が核スピン½をもつ錯体の核磁気共鳴スペクトルは、核スピン結合定数と化学シフトの二つの知見をもとに、配位子との結合性格を検討することができる。エチレン⁽¹⁾ あるいはカルボニル⁽²⁾ を配位子とする白金(IV)錯体およびアルキル配位子をもつ水銀(II)錯体⁽³⁾ のCMRやPMRスペクトルから、これらのπ配位、η配位あるいは、σ配位結合に関しては、配位子からの電子供与が重要であるため、結合性に関する核スピン結合定数が重要な指標となることが明らかになった。そこで本研究においては、トリフェニルホスフィンとアセチレンを配位子とする白金(II)錯体について、³¹P NMRスペクトルの検討を通して、中心金属から配位子への逆供与が重要となる場合、配位結合性格あるいは錯体の安定性がどのように特徴付けられるかを明らかにしようと試みた。

2. 実験

[Pt(PPh₃)₂(ROCO(≡C(COOR)))] (R=Me, Et) に一酸化炭素を室温、1気圧で、3時間反応せると、淡黄緑色の結晶が収率85%で生成した。しかしながら、π配位アセチレンが、

Ph(≡C)Ph, CF₃C≡C-

-CF₃, Ph(≡C)COOMeの

上記錯体を反応させ

ても、新しい錯体は

得られなかった。

³¹P NMR, ¹³C NMR

の測定は、日本電子

製 FX-100,

PFT-100分光計

によった。

3. 結果と考察

新たに得られた

錯体は、元素分析と

分子量測定により、

[Pt(CO)(PPh₃)₂(ROCO-

(≡C(COOR))₂ (1)

とする二量体構造を

とすることがわか

った。

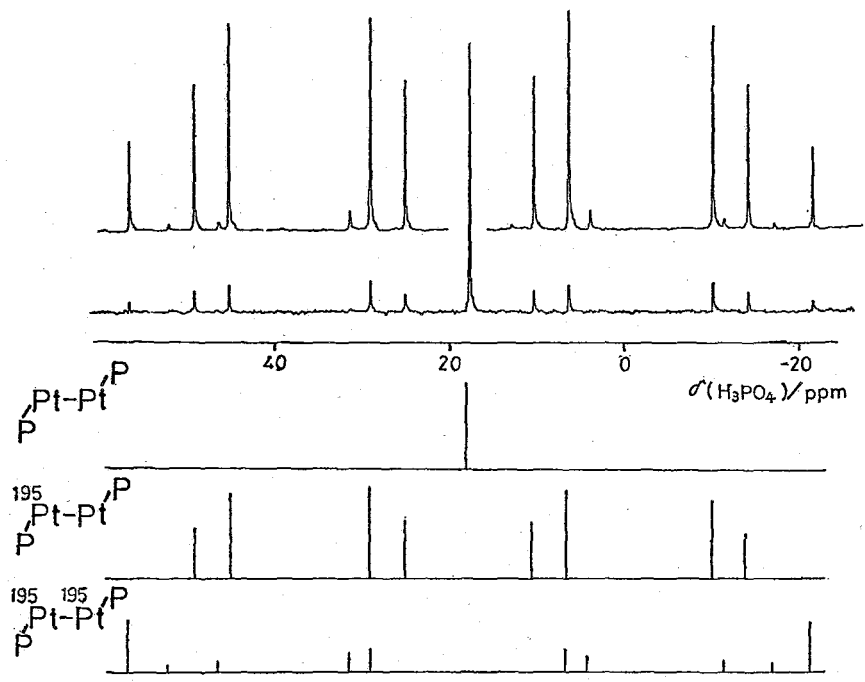
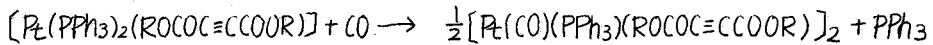


Fig. 1 ³¹P NMR Spectrum of [Pt(CO)(PPh₃)(MeOCOC≡CCOOMe)] and its Analysis based on the Superposition of the three kinds of Spin Systems.

こいえやすゆき・しのだすみお・さいとうやすかず

これを反応式で表わすと、



カルボニルが末端配位であることは、 $\nu(CO)$: 2060 cm^{-1} のほか、 1H NMRで、 $\delta(CO)$: 192.3 ppm, $^1J(Pt-CO)$: 1226 Hz の値から結論された。また (R=Me) の 31P NMR スペクトルを 図1 に示す。本スペクトルのパターンは 次のように解析されるので、 31P NMR スペクトルを 図1 に示す。本スペクトルのパターンは 次のように解析されるので、 31P NMR スペクトルを 図1 に示す。本スペクトルのパターンは 次のように解析されるので、 31P NMR スペクトルを 図1 に示す。

まず、核スピンの ^{195}Pt (自然存在率 33.8%) を一つも含まない錯体は、44.8% の寄与で単一ピークを与える。2個の白金原子のうち一つが ^{195}Pt であるものは、43.8% の寄与で、ABX スピン系の AB 部分に対応する 8本のピークを与える。2個とも ^{195}Pt である錯体は、11.4% の寄与で、 $AA'XX'$ スピン系の AA'部分に対応する 10本のピークを与える。

常法に従って、解析し、各々の寄与率を考慮に入れてピーク高さとその位置を 図1 に併せ示した。それらを加え合わせると、測定された 31P NMR スペクトルをよく再現することがわかる。また (R=Et) の結果および関連する白金二核錯体の核スピンの結合定数をあわせ、表1にまとめた。

Table 1 Nuclear Spin Coupling Constants of Some Platinum Dinuclear Complexes.

	$^1J_{Pt-P}$	$^3J_{Pt-P}$	$^1J_{Pt-Pt}$	$^2J_{Pt-Pt}$	$^4J_{P-P}$ (Hz)	ref
1	Me 2409	783		786	163	this work
	Et 2421	782		785	163	
2		3528	26.0	380	51	a
3				5355		b

a) J.P. Visser, et al., J.C.S. Dalton, 1311 (1975)

b) M. Green, et al., J.C.S., Chem. Comm., 451 (1975)

錯体1の遠距離核スピンの結合定数 $^3J_{Pt-Pt}$, $^3J_{Pt-P}$, $^4J_{P-P}$ を類似の構造をもつヨウ素架橋白金二核錯体3と比較すると、それぞれ本錯体の方がはるかに大きいので、アセチレンが架橋団となる場合二核錯体としての電子の非局在化は著しいものと考えられる。しかしながら、白金原子間に直接結合のある錯体3の $^1J_{Pt-Pt}$: 5355 Hz と、本錯体の $^3J_{Pt-Pt}$: 786 Hz が遠く及ばないこともまた妥当であろう。なお、本錯体の二つのホスフィン配位子は、それぞれ別の白金原子に配位している。したがってその $^1J_{P-P}$ が通常の cis $^1J_{Pt-P-P}$ の領域³⁾ 20~40 Hz に入らないのは当然である。

一連の $[Pt(PPh_3)_2(R\equiv C(R'))]$ 錯体の 31P NMR シフトと、 $Pt-P$ 核スピンの結合定数を表2にまとめた。また表2には、アセチレン置換基の ρ および、その電子吸引能をあらわす Hammett 定数

(ρ と σ)が付記してある。
 よく知られているように、
 カルボン酸エステル基の π 、
 およびの電子吸引能はともに
 大きく、それと比べると、
 フェニル基はともに小さいが
 一方トリフルオロメチル基の
 場合、 π 電子吸引能は著しく
 大きいのに、 σ 電子吸引能は
 さほど大きくないという特徴
 がある。表2とみるように、
 ρ と σ の値はそれぞれ
 ρ と σ の間には、それぞれ関連性
 が認められる。

配位トリフェニルホスフィ
 ンの σ 化学シフトは、主として

白金原子の空いた $5d$ 軌道と 白金原子の満ちた $5d$ 軌道との 逆供与型 π 電子相互作用
 によって支配される。そのため、 π 配位アセチレンの π 電子吸引能に影響されるものと
 考えられる。それに対して $R-P$ 核スピン結合定数は、配位リン原子と白金原子との σ 電子
 相互作用によって支配される。したがって、 π 配位アセチレンからは、その σ 電子吸引能
 の影響を受けるはずである。故に、表2とみられた関連性は、照合事例に少々ないけれど
 妥当なものと思われる。

安定な白金2核錯体を生ずるのが、表2に掲げた錯体のうち、 ρ 値の大きいカルボ
 ン酸エステル基をもつアセチレンの錯体に限られることは興味深い。錯体 ρ と σ の
 J_{P-P} 値は大きいので、白金-ホスフィン結合は強いはずであるが、反面、その反対側で
 はアセチレンから白金への電子供与型配位結合が弱く、活性化を受け易いと考えられる。

有機金属錯体のNMR定数から配位結合性弱を知り、さらに、それと反応性との関係を
 明らかにすることは、新しい錯体触媒系を開発する上に良い手掛りを与えるものと期待さ
 れる。

Table 2 Phosphine Chemical Shifts and Platinum-Phosphine Spin
 Coupling Constants in a Series of $[Pt(PPh_3)_2(RC\equiv CR')]_2$ Complexes,
 together with the π and σ Hammett Constants of the Substituents.

	$Pt(PPh_3)_2(RC\equiv CR')$	δP (ppm)	J_{P-P} (Hz)	ρ _Z ^{b)}	σ _Z ^{b)}
4	Et C≡CEt ^{a)}	29.8	3430		
5	Ph C≡CPh	27.1	3452	-0.090	0.11
6	Ph C≡CCOOMe	26.3	3536		
		24.5	3608		
7	EtOCOC≡CCOOEt	24.5	3722		
8	MeOCOC≡CCOOMe	23.9	3722	0.233	0.219
9	CF ₃ C≡CCF ₃	21.0	3595	0.341	0.143

a) B.L.Shaw, et al., J.C.S.(A), 2667(1971)
 b) Y.Tsuno, Riron Yūki Kagaku, Chap.4, p.93, Kagaku
 Dojin, Kyoto (1973)

References

- 1) T.Iwayanagi and Y.Saito, Inorg. Nucl. Chem. Letters, 11, 459 (1975).
- 2) T.Iwayanagi and Y.Saito, Chem. Letters, 1193 (1976).
- 3) T.Iwayanagi, T.Ibusuki and Y.Saito, J. Organometal. Chem., 128, 145 (1977).
- 4) B.E.Mann, B.L.Shaw and N.I.Tucker, J. Chem. Soc.(A), 2667 (1971).

^{31}P NMR Spectra of New Platinum Dinuclear Complexes containing
Acetylene as the Bridging Ligands

Institute of Industrial Science, University of Tokyo
22-1 Roppongi 7-Chome, Minato-ku, Tokyo 106

Yasuyuki Koie, Sumio Shinoda, Yasukazu Saito

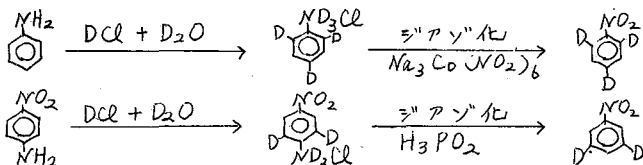
An analysis of ^{31}P NMR spectra of new phosphine complex, yielded by the reaction of $[\text{Pt}(\text{PPh}_3)_2(\text{RC}\equiv\text{CR})]$ (1) ($\text{R}=\text{COOMe}$, COOEt) with CO , has revealed that it contains two equivalent platinum atoms, each of which is coordinated with a phosphine ligand. The long-range nuclear spin coupling constants of the new complex, $[\text{Pt}(\text{PPh}_3)(\text{CO})(\text{ROCOC}\equiv\text{CCOOR})]_2$ (2), were much larger than those of an iodine-bridged dinuclear complex, $[\text{Pt}(\text{PPh}_3)\text{I}_2]_2$, suggesting an efficient electron delocalization due to the acetylene bridge in (2). Phosphine chemical shifts and platinum-phosphine spin coupling constants in a series of 1 were correlated with the Hammett constants of the substituents, σ_π and σ_i respectively. It is to be noted that the stable 2 complex can be obtained only from 1, having large values of $^1J_{\text{Pt-P}}$.

(阪大来) 〇藤原英明, 高場紀和, 山崎浩, 佐々木喜男

序 我々は今春の化学会年会で, 双極性分子間結合の K , ΔH , ΔS の決定および溶媒の影響等について報告した。¹⁾ 今回は, 種々の芳香族および脂肪族ニトロ化合物をとりあげ, HMPA (ハキサメチルリン酸アミド) との結合の K , ΔH , ΔS 等をより詳細に検討することを目的とした。さきにHMPAの代わりにTMU (テトラメチル尿素) についても実験を行った。

実験 NMRの測定は日立 R-22 (90 MHz) により, 温度可変実験は常法にしたがった。試料温度は校正済みの熱電対により校正したエチレングリコール (高温) あるいはメタノール (低温) を用いた。シフトの測定精度は ± 0.1 Hz, 測定中の試料温度は $\pm 1^\circ\text{C}$ 以下で一定と推定される。シフトの基準はTMS (一部溶媒) の内部基準によった。

K , ΔH , ΔS の決定は前回¹⁾と同様の方法にて行った。溶媒にはメチルシクロヘキサノールを用いたが市販品にはトルエンが混入しているのを, 混酸で処理し, 中和・乾燥・蒸留の後, モレキュラーシーブ4A上に保存した。他の試薬類も市販品を再結晶, 蒸留等により精製し, デリケート中あるいはモレキュラーシーブ上に保存した。ニトロベンゼンの重水素置換体は次の方法²⁾で合成した。



最終的なDの置換率は95%以上である。

結果 ニトロ化合物の濃度を約0.03 M に一定とし, HMPAの濃度を0~0.7 M程度まで変化させ, 得られる希釈シフト曲線を $A + B = AB$ 型の Collision Complex 形成を仮定して解析した。測定されるシフトの変化量が10~30 Hz と小さいため, 測定誤差をできる限り小さくするよう注意が必要であった。今回の実験では, 同一試料について少なくとも2回の実験を行い, 同様の結果が得られることを確かめた。一部データのバラツキが大きいものについては再実験中である。殆んど全ての場合, 計算により得られる K (平衡定数) と Δ_{AB} (錯体形成シフト) は, 根平均二乗偏差が0.2 Hz 以下で実験値を再現した。 K と Δ_{AB} の誤差は, それぞれ $\pm 5\%$ および ± 1 Hz 程度である。

錯体の組成比を確かめる意味で連続変化法を行ってみると, 全ての系について図1の例のように1:1の濃度比において $\Delta \cdot R$ が最大値を示し, 組成比が1:1であることを裏付けた。ここで Δ はシフトの測定値と free な分子のシフトの差, R は濃度分率である。

ふじわら ひであき, たかば としかず, やまざき ゆたか, ささき よしお

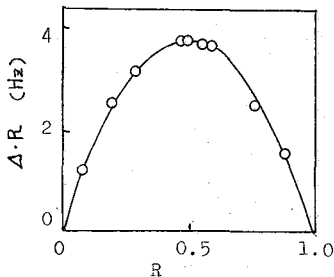


Fig. 1 Job plot for the p-nitroanisole + HMPA system in methylcyclohexane

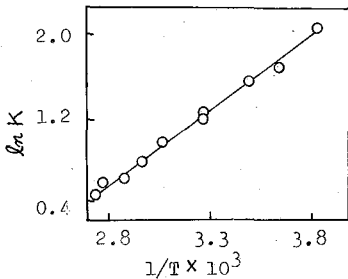


Fig. 2 $\ln K$ vs. $1/T$ for the p-nitroanisole + HMPA system in methylcyclohexane

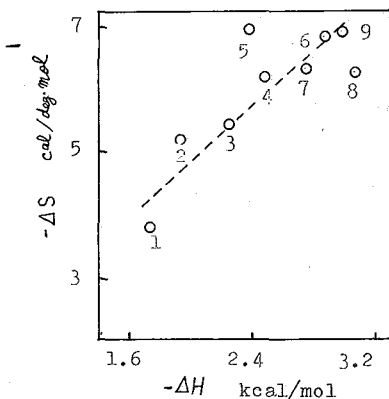


Fig. 3 Correlation between ΔH and ΔS

- 1: N,N-dimethyl-p-amino-nitrobenzene
- 2: 2,4,6- d_3 -nitrobenzene
- 3: p-chloronitrobenzene
- 4: p-nitrophenyl acetate
- 5: p-nitrotoluene
- 6: p-nitroanisole
- 7: acetonitrile
- 8: nitromethane
- 9: nitroethane

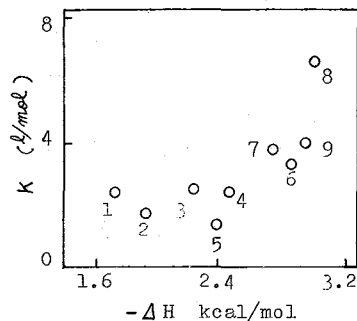


Fig. 4 Correlation between K and ΔH

The numbering corresponds to nitro compounds in Fig. 3.

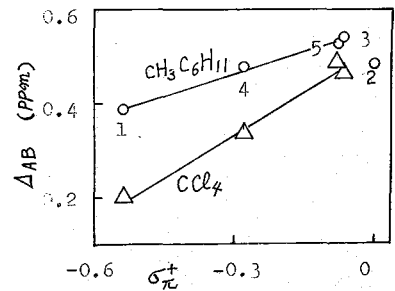


Fig. 5 Δ_{AB} vs. σ^+

The numbering corresponds to nitrobenzenes in Fig. 3.

K の温度依存性より ΔH , ΔS を決定した一例を図 2 に示す。 Δ_{AB} は $1 \text{ Hz}/10 \text{ degree}$ 程度の温度依存性を示し、したがって *vanit Hoff* プロットを利用しない³⁾ ΔH , ΔS を求める簡便な方法は³⁾ 通用できないことがわかる。

ニトロベンゼン誘導体では、ニトロ基のメタ位プロトンがシフトの大きな濃度依存性を示し、オルト位については変化量は $0 \sim 5 \text{ Hz}$ 程度であった。したがって今回の計算は全てメタ位に關してのものである。p-クロルニトロベンゼンでは例外的にオルト位がメタ位の 60% 程度の变化を示した。このプロトンについて求めた K の値はメタ位の値より 30% ほど大きく、その原因は明らかではない。さらにこのオルト位のシフトは HMPA を含まない試料についても $2 \text{ Hz}/70 \text{ degree}$ 程度の温度依存性を有し他の例と異なる誘導性を示した。

熱力学パラメーター、錯体形成シフトの比較検討

電荷移動錯体、水素結合錯体については、正確に決定された場合、 ΔH と ΔS の間には直線あるいはそれに近い関係のあることが知られている。双極性分子間の会合についてここで得られた ΔH , ΔS は、図 3 に掲げるように直線関係にあることが認められる。 K (34°C) と ΔH の間にも相関性が見られる (図 4)。

錯体形成シフト Δ_{AB} と置換基定数 σ^+ との関係は、四塩化炭素溶媒中と同様、メチルシクロヘキサン中においても直線関係にあることが見出された (図 5)。2,4,6- d_3 -ニトロベンゼンでは、その直線からズレるが同位体効果に

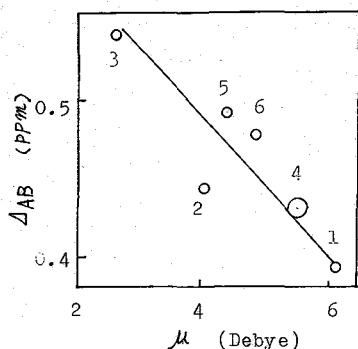


Fig. 6 Δ_{AB} vs. μ

The numbering corresponds to nitrobenzenes in Fig. 3.

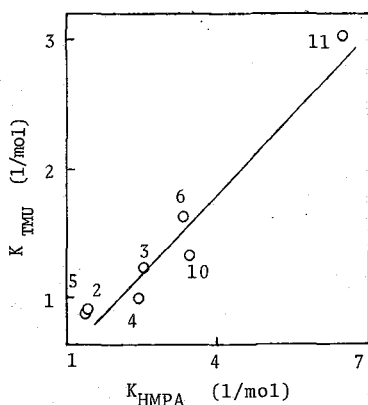


Fig. 7 Plots of K_{TMU} (K for association with TMU) against K_{HMPA}

- 10: 1-nitropropane
- 11: p-dinitrobenzene

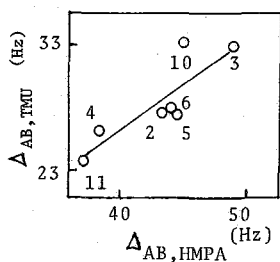


Fig. 8 Plots of $\Delta_{AB, TMU}$ (Δ_{AB} for association with TMU) against $\Delta_{AB, HMPA}$

1では大きすぎると思われる検討中である。 Δ_{AB} と双極子モーメント μ との関係は図6のように直線状である。パラニトロフェニルアセテート(図の4番)の μ は文献値がないので二つの置換基の加成性より計算した。これらことから Δ_{AB} (結合場シフト)は置換基のπ電子供与性が大きく、 μ が大きいものほど小さくなる結論できる。以上の相関性と対照的に、 K (34°C), ΔH , ΔS と σ^+ あるいは μ との間には、特に相関性は見られなかった。

テトラメチル尿素との会合

HMPAの代わりにTMUを用いた場合、観察されるシフトの変化量は約半分に減少される。両化合物に対する K (34°C)と Δ_{AB} (34°C)は図7, 8に示すようにほぼ比例関係にある。双極子能率は5.37D(HMPA)と3.47D(TMU)であり、 μ の大きいHMPAの方が K , Δ_{AB} ともに大きくおよそ次の関係が成立する。

$$K_{TMU} = 0.4 K_{HMPA}$$

$$\Delta_{AB, TMU} = 0.7 \Delta_{AB, HMPA}$$

自己会合の影響について

我々の実験ではニトロ化合物の濃度は約0.03Mであり十分希薄であるので問題ないが、HMPAあるいはTMUは0~0.7M程度まで変化するのでそれらの自己会合の影響がどの程度となるか興味を持たれる。HMPAの場合は四級化炭素、シクロヘキサゴン等で希釈しても 1H , ^{13}C のシフトは殆んど変化せず、自己会合が無いが 1H , ^{13}C のシフトでは検知できないかのいずれかである。しかしニトロエタンの場合は 1H NMRにより自己会合を追跡することができる。ニトロエタンとシクロヘキサゴンの二成分系の希釈シフト曲線は図9のようになる。 $B + B \xrightleftharpoons{K} B_2$ 型の平衡でこの曲線を解析した結果を下表に掲げる。計算に用いる濃度範

Table Variation of K and σ with the concentration range used for calculation

max. conc.	0.5 M	1 M	2.5 M	4 M	8 M	14 M
K (l/mol)	0.21	0.21	0.17	0.17	0.16	0.12
σ^a	0.12	0.11	0.11	0.11	0.20	0.69

^a: root mean square deviation, in unit of Hz

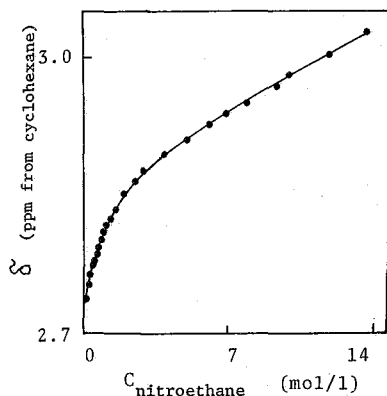
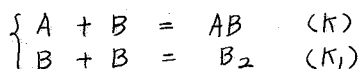


Fig.9 Dilution shifts of $-\text{CH}_2\text{NO}_2$ proton for the nitroethane + cyclohexane mixture

図を濃厚領域へ広げるにしたがい K_1 は小さくなる。ニトロエタンの濃度が 4M 以上ではシフトの計算値と実測値の偏差の最大値が大きくなるため上のモデルはそれ以下の濃度で適用性があると考えられる。

P-ニトロアニソールとニトロエタンの会合を、



の平衡モデルで解析すると、 K は 0.2 だけ小さくなる。

P-ニトロトルエンと HMPA の系についても同様に、 $K_1 = 0.2$ L/mol として計算すると K は 0.2 程度小さくなる。

これらの事実より、自己会合の影響は、 K が 1~2 L/mol 程度に大きい場合には問題とならないと結論できよう。

文献

- 1) 藤原.高場.佐々木, 日本化学会第36春季年会 要旨集 I, P 494 (1977).
- 2) Y.Sasaki, A.Takahata, M.Yoritaka, H.Kawaki, and Y. Okazaki, Chem.Pharm.Bull., 22, 50 (1974).
- 3) R. Foster, "Organic-charge transfer complexes", Academic Press, London (1969), p174.

Dipole Association as Studied by NMR Method

Hideaki FUJIWARA, Toshikazu TAKABA, Yutaka YAMAZAKI, and Yoshio SASAKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

133-1 Yamada-kami, Suita, Osaka

Abstract: Association of HMPA(hexamethyl phosphoramidate) with p-substituted nitrobenzenes and some aliphatic nitro compounds have been studied by means of nmr in methylcyclohexane as a solvent. Thermodynamic parameters have also been determined from the variable temperature experiments. A near-linear relation was observed between ΔH and ΔS , though a few compounds deviated from it, and K (equilibrium constant) was loosely correlated with ΔH . Furthermore Δ_{AB} (complex formation shift) was linearly dependent on σ^+ and dipole moment of nitrobenzenes. However, it was not probable that dipole-dipole interaction is a single factor governing the association treated here, since no regular relation was observed between dipole moment and K or ΔH .

京大 理 〇松井 茂, 前田史郎, 寺尾武彦

溶液における NMR では、分子運動により化学シフトテンソルの等方平均値しか観測されないが、固体における高分解能 NMR 法を用いて、化学シフトテンソルを決定することにより、固体内の興味ある知見が得られる。その一例として CH_3OH 分子を guest として trap した β -キノールの単結晶における ^{13}C の化学シフトテンソルを、Pines らによる、proton-enhanced NMR²¹⁾ の方法を改良して²²⁾ 測定した結果を報告する。

測定は、常温で、自作の装置を用いて行った。測定周波数は、 ^{13}C , ^1H 各々に対して、14.972 MHz, 59.526 MHz である。図 1 に典型的なスペクトルを示す。 β -キノール結晶は、三方晶系に属し、空間群は $R\bar{3}$ である。図 2 は直交する結晶軸である c 軸, a 軸及び、この 2 軸に直交する a' 軸の各々の軸のまわりで静磁場 H_0 に対して、 $0^\circ \sim 180^\circ$ まで 6° ずつ角度を変えて測定することにより得られた化学シフトの角度変化を示したものである。曲線はコンピューターにより測定点に最小自乗 fit をさせた理論曲線である。この曲線を解析して、表 1 に示すような各テンソルの主値及び主軸方向が決定された。

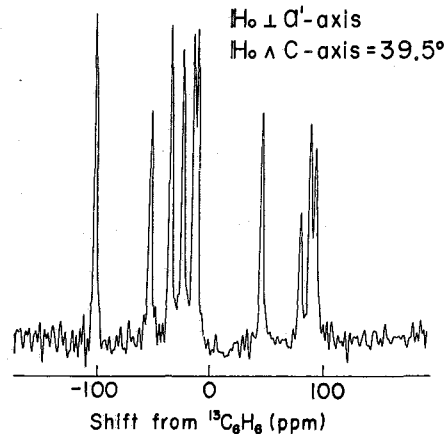
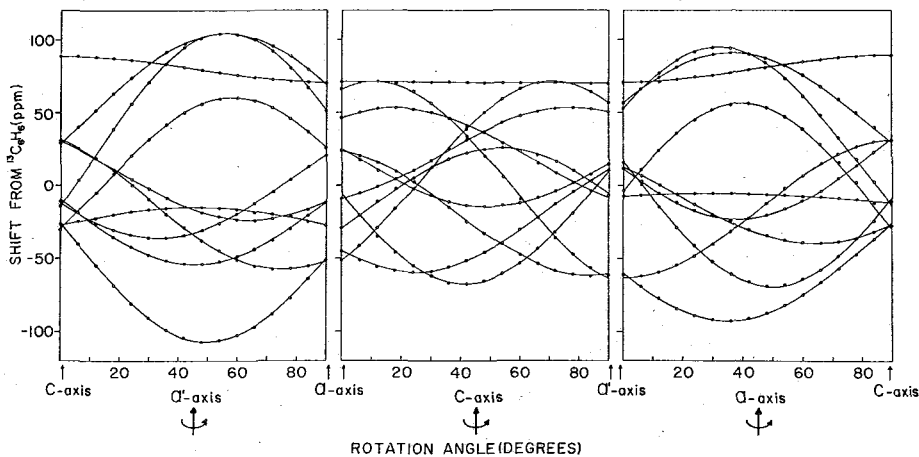


FIG. 1. Proton-Enhanced ^{13}C Spectrum in Single Crystal $[\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2]_3\text{CH}_3\text{OH}$

FIG. 2. ROTATION PATTERN OF SINGLE CRYSTAL $[\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2]_3\text{CH}_3\text{OH}$



まっいしげる, まえだしろ, てらおたけひこ

表中 A, B は OH 基のついていない環炭素を示し、O は OH 基のついた環炭素を示しており、M がメタノールの炭素である。A₁, A₂, A₃ 等は、A の種類の炭素を単位格子中、3 回回反軸の対称操作により、等価な炭素を示している。また、方向余弦を示した各主軸方向は、メタノールを除き、結晶系に関するものではなく、図 3 に示すように各ハイドロキノン分子に対して、新しく定義した座標系 {LMN} に関するものである。

TABLE 1. ¹³C Shielding Tensors of [C₆H₄(OH)₂]₃CH₃OH

Carbon	Eigenvectors (Direction cosines)			Eigenvalues			Tr(σ)/3 σ _{iso}	
	cos α	cos β	cos γ	σ ₁₁	σ ₂₂	σ ₃₃	(¹³ C ₆ H ₆)	
				(Shift in ppm from				
A ₁	-0.5873	0.8093	0.0080	-6.3	-70.8	105.3	9.4	11.7
	-0.8089	-0.5873	0.0225					
	0.0252	0.0099	0.9997					
A ₂	-0.6032	0.7974	0.0161	-5.7	-70.9	106.2	9.9	11.7
	-0.7972	-0.6035	0.0215					
	0.0269	0.0002	0.9996					
A ₃	-0.5931	0.8051	0.0129	-6.7	-71.1	105.7	9.4	11.7
	-0.8048	-0.5932	0.0219					
	0.0253	0.0026	0.9997					
B ₁	0.4799	0.8771	-0.0124	-3.1	-69.0	105.3	11.1	11.7
	-0.8770	0.4802	0.0139					
	0.0205	0.0074	0.9998					
B ₂	0.4869	0.8735	-0.0106	-3.6	-67.0	106.6	11.9	11.7
	-0.8792	0.4870	0.0172					
	0.0202	0.0009	0.9998					
B ₃	0.4868	0.8735	-0.0143	-3.7	-68.9	106.4	11.2	11.7
	-0.8793	0.4870	0.0150					
	0.0201	0.0051	0.9998					
O ₁	0.9976	0.0675	0.0189	-17.6	-107.1	62.7	-20.7	-22.2
	0.0673	-0.9976	0.0088					
	-0.0172	0.0107	0.9998					
O ₂	0.9978	0.0649	0.0122	-16.9	-107.8	62.9	-20.6	-22.2
	0.0648	-0.9979	0.0042					
	-0.0124	0.0034	0.9999					
O ₃	0.9978	0.0642	0.0145	-18.0	-108.5	62.6	-21.3	-22.2
	0.0641	-0.9980	0.0047					
	-0.0148	0.0037	0.9999					
M	0.9906	0.1369	-0.0078	71.0	70.3	88.9	76.7	78.6
	0.1339	-0.9909	0.0155					
	0.0112	0.0108	0.9999					

Eigenvectors are referred to the molecular coordinate system {LMN} of FIG. 3 except for carbon M. σ_{iso} is the chemical shift in solution. Carbons are represented as following; A and B are the ring carbons without OH groups, O is the ring carbon with OH group, and M is the carbon of methanol. In the ring carbon A, for example, A₁, A₂ and A₃ are crystallographically equivalent for $\bar{3}$ operation.

表1の結果をモデル的に示したのが図3で、これはハイドロキノン分子の平面及び側面図であり、各環炭素の位置に示した楕円体は、各炭素の3つの主値を、 $^{13}\text{C}_6\text{H}_6$ より140 ppm 低磁場を基準として求め直し、その主軸方向に楕円体の3軸をとり、各々の主値を軸の長さで示したものである。したがって、この図から主軸方向、更にどの主軸方向が最も高磁場にあるかなどを、簡単に知ることができる。

各々の炭素について、結晶成長の母液の測定から得られた化学シフト値 (σ_{iso}) と化学シフトテンソルの等方平均値 ($\text{Tr}(\sigma)/3$) は、約2 ppm以内で一致している。環炭素について、最も高磁場の主値を持つ主軸方向は、分子面に垂直であり、最も低磁場の主値を持つ主軸方向は、C-H (A, B) あるいはC-OH (O) 結合方向である。液体ベンゼンに対する化学シフトテンソルの主値 (ppm) は、OH基を持つ環炭素Oについては $\{-17.5, -107.8, 62.7\}$ である。また、残りのOH基を持たない環炭素A, Bは、溶液中では、同じ化学シフト値を示すが、 β -キノール結晶中では、A; $\{-6.2, -70.9, 105.7\}$, B; $\{-3.5, -68.3, 106.1\}$ のような異なった主値が得られた。この結果は、結晶中のまわりのハイドロキノン分子による環電流の効果であると解釈している。

Guest分子であるメタノールの ^{13}C 化学シフトテンソルは、結晶主軸であるC軸について軸対称であり、その化学シフト異方性 $\Delta\sigma = \sigma_{33} - \frac{1}{2}(\sigma_{11} + \sigma_{22})$ は、粉末スペクトルから得られた固体メタノールの異方性の約0.29倍に減少している。これらの結果から、常温では guestメタノール分子が、その分子軸をC軸から約 43° 傾けて、C軸のまわりに等方回転的な運動をしていると結論される。

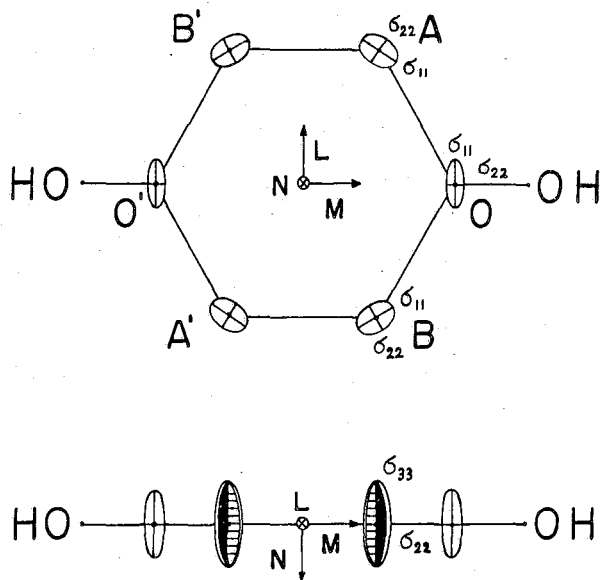


FIG. 3. ^{13}C chemical shift tensors deduced for Hydroquinone. The ellipsoids, shown in two projections, are such that the diameter in any direction is linear in the chemical shift for the applied field H_0 in that direction. The origin of chemical shifts is chosen arbitrarily.

- 文献 1) A. Pines, M. G. Gibby and J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **56**, 1776 (1972)
 2) 松井茂, 前田史郎, 寺尾武彦, 「固体の弱共鳴核に対する高分解能NMR法の改良」 第16回NMR討論会講演要旨集, 104(A3) (1977)

^{13}C Chemical-Shift Tensors in Single Crystal $[\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2]_3\text{CH}_3\text{OH}$

Shigeru Matsui, Shiro Maeda, and Takehiko Terao

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606

The ^{13}C chemical-shift tensors in a single crystal of β -quinol clathrate with trapped CH_3OH have been studied by the proton-enhanced NMR. The experiments were performed at room temperature on a home-built spectrometer operating at 14.972 MHz for ^{13}C and 59.526 MHz for ^1H . For each type of carbon one third of the trace of the chemical-shift tensors agrees with the isotropic shift obtained in solutions within about 2 ppm. In ring carbons the most upfield component is found perpendicular to the molecular plane, and the most down field component almost along the C-OH or C-H bond. The principal values, in ppm relative to liquid benzene, for the ring carbon with OH are -17.5, -107.8, and 62.7. Despite the fact that the other ring carbons show the same chemical-shift in solutions, two distinct sets of the principal values, (-6.2, -70.9, 105.7) and (-3.5, -68.3, 106.1) are obtained for them. This result is thought to be due to the effect of the ring current induced in the neighboring hydroquinone molecules. The ^{13}C chemical-shift tensor for the guest molecule CH_3OH is axially symmetric about the c crystallographic axis, and the principal values are 71.0, 70.3, and 88.9. The ^{13}C chemical-shift anisotropy $\Delta\sigma = \sigma_{33} - \frac{1}{2}(\sigma_{11} + \sigma_{22})$ for the guest methanol is about 0.29 times as large as that for solid methanol, which has been obtained from the powder spectrum. From these results, we conclude that a guest methanol-molecule precesses around the c axis in the host cavity, its molecular axis making an angle of 43 degrees with the c axis at room temperature.

東工大・工 近藤正広, 安藤 勲, 中條利一郎, 西岡篤夫
都立港工高 藤辺昌介

1) はじめに

核スピンカップリング定数が溶媒依存することはよく知られており, 多くの研究者によって定性的及び半定量的に説明する試みがなされてきた。¹⁾ しかし理論的に満足したものでなかった。最近 Popleらはスピンカップリング定数の計算に Finite Perturbation theory (FPT) 法を適用し, 種々の分子の実測値を説明するのに成功して来た。²⁾ そして Barfieldらはこの方法を用いて, いくつかの分子の J_{HH}, J_{HF} 及び J_{FF} の溶媒効果を定量的に説明するに試み, 部分的には満足した結果が得られた。³⁾ 著者ら⁴⁾ は化学シフトの溶媒効果を Klopman⁵⁾ が提出した 'solvaton' 理論を適用して計算し, 実測値の傾向を合理的に説明して来た。本研究ではこの 'solvaton' 理論と FPT 法を組み込んで, いくつかの分子 (アクリロニトリル, クロロホルム, ジクロルメタン) の J_{CH} の溶媒効果を定量的に説明することに試みた。

2) 理論的取扱

着目分子と周囲の溶媒分子の相互作用を評価するための 'solvaton' 理論について簡単に述べる。この理論では次のことが仮定されている。(i) aprotic な溶媒で無限希釈したとき溶媒中に電荷 ('solvaton' と呼ぶ) が生ずる。(ii) 一つの 'solvaton' は溶質分子の各々の原子に associate しており, その電荷 (Q_s) は associate している原子の電荷と同じ大きさで, その符号は逆である。(iii) 溶質-溶媒の相互作用の大きさは溶媒の極性, 即ち誘電率 ε, に依存し Born の式⁶⁾ により評価される。(iv) 'solvaton' 同士は相互作用しない。(v) 溶質-溶媒の相互作用の評価に必要な電子と 'solvaton' の距離 r_{si} 及び核と 'solvaton' の距離 r_{sk} は次のように近似する。

$$r_{si} \begin{cases} s \text{ と } i \text{ が同じ原子中心にあるとき} \cdots \cdots \text{ van der Waals 半径 } r_v \text{ を用いる。} \\ s \text{ と } i \text{ が異なる原子中心にあるとき} \cdots \cdots \text{ 原子間距離 } r_{Ri} \text{ とすると, } \sqrt{r_{Ri}^2 + r_{Rk}^2} \\ \text{で近似する。} \end{cases}$$

次に FPT 法によるスピンカップリング定数の計算について述べる。振動があるときのスピノン非制限 SCF の式は溶媒の相互作用を含めて次のように与えられる。

$$F_{\mu\nu}^{\alpha} = H_{\mu\nu}^{\text{core}} + \sum_{\lambda\sigma} [P_{\lambda\sigma}(\mu\nu|\lambda\sigma) - P_{\lambda\sigma}^{\alpha}(\mu\sigma|\lambda\nu)] + \frac{8}{3}\pi\beta\mu_B \int \phi_{\mu} \delta(r_B) \phi_{\nu} dr \\ + \frac{\epsilon-1}{\epsilon} \int \phi_{\mu} \left(\sum_s^N \frac{Q_s^{\alpha}}{r_{si}} \right) \phi_{\nu} d\tau_i$$

$$F_{\mu\nu}^{\beta} = H_{\mu\nu}^{\text{core}} + \sum_{\lambda\sigma} [P_{\lambda\sigma}(\mu\nu|\lambda\sigma) - P_{\lambda\sigma}^{\beta}(\mu\sigma|\lambda\nu)] - \frac{8}{3}\pi\beta\mu_B \int \phi_{\mu} \delta(r_B) \phi_{\nu} dr \\ + \frac{\epsilon-1}{\epsilon} \int \phi_{\mu} \left(\sum_s^N \frac{Q_s^{\beta}}{r_{si}} \right) \phi_{\nu} d\tau_i$$

こんどうまさひろ, あんどういさお, ちゅうじょうりいさろう, にしおかあつお,
わたなべはうすけ

ところで式の右辺のオ一項はコア・ハミルトニアン, オ二項は電子間相互作用, オ三項は Fermi contact 相互作用, オ四項は溶質-溶媒の相互作用である。添字 α, β は α 電子及び β 電子に対して用いられる。 μ_B はB核の磁気モーメント, β はBohr半径である。他の記号は一般的に用いられている意味をもっている。これらの式から核AとBの間のスピンカップリング定数の式は次のように導びかれる。

$$J_{AB} = \frac{16}{9} \gamma_A \gamma_B \beta^2 S_A^2(0) S_B^2(0) \left[\frac{\partial}{\partial r_B} \rho_{SA SA}^{spin}(r_B) \right]_{r_B=0}$$

$$\text{但し } r_B = \frac{8}{3} \pi \beta \mu_B S_B^2(0)$$

ところで, γ は核磁気回転比, $S_B^2(0)$ は原子Bのs電子軌道の核での電子密度, $\rho_{SA SA}^{spin}(r_B)$ は原子Aのs軌道のスピン密度マトリックスである。

本研究では, アクリロニトリルの場合MOとしてINDO法⁷⁾が用いられたが, 塩素についてのSlater-Condonパラメータの標準値が決定されていないのでクロロホルム及びジクロルメタンの場合にはCNDO/2法⁸⁾を用いた。また, 計算に必要な原子間距離はPople-Gordonの標準値を用いた。¹¹⁾

3) 実験

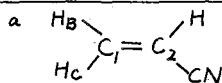
¹³C NMRスペクトルは室温でJEOL PS-100型パルスフーリエ変換NMR分光器(25.15 MHz)にて測定した。スピンカップリング定数の ϵ 依存性は誘電率の異なる溶媒を用いるが, 希釈を行なうことにより測定した。試薬は特級の市販品をそのまま用いた。

4) 結果及び考察

Table 1に ϵ の異なる溶媒中のアクリロニトリルの J_{CH} の測定値を示した。またTable 2には CCl_4 で希釈することにより得た ϵ の異なる系の J_{CH} の測定値を示した。 $J_{C_1H_B}$ と $J_{C_1H_C}$ に

Table 1 The observed solvent dependence of J_{CH}^{spin} spin coupling constants of acrylonitrile^a in various solvents.

Solvent	ϵ	observed (Hz) ($J_{C_1H_B} + J_{C_1H_C}$) ^b	J_{C_2H}
CCl_4	2.238	332.0	178.3
$CHCl_3$	4.806	333.0	179.0
THF	7.58	331.0	179.7
3-Pentanone	17.0	331.4	179.2
acrylonitrile	33.0	332.6	179.9
DMSO	46.68	331.6	180.9
N-methylacetamide	191.3	331.0	179.9



b estimated by the analysis of ABX system.

Table 2 The observed solvent dependence of J_{CH}^{spin} spin coupling constants of acrylonitrile in CCl_4 .

Volume fraction of acrylonitrile	ϵ^a	observed (Hz) ($J_{C_1H_B} + J_{C_1H_C}$)		J_{C_2H}
0.05	2.43	332.6	178.0	
0.1	2.65	332.0	178.7	
0.2	3.14	331.8	179.2	
0.333	3.99	331.8	179.4	
0.5	5.56	332.6	179.7	
1.0	33.0 ^b	332.6	179.9	

a estimated using $\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2} = \frac{\epsilon_1-1}{\epsilon_1+2} v_1 + \frac{\epsilon_2-1}{\epsilon_2+2} v_2$ (ϵ_1 and v_1 are dielectric constant and volume fraction of the component 1, respectively, in solution.)⁹⁾

b from ref.10.

ついては精度を考慮して, それらの和で議論することとした。これらのTableから J_{C_2H} は ϵ の

増加と共に増加してゐることがわかる。(J_{CHB}+J_{CHC})の測定値のε依存性は小さく、バラツキが大きいので実験誤差を考えるとε依存性はないと見られる(しかし正確なε依存性を得るためには精度の高い測定が必要である。) Table 3及び4にそれぞれクロホルム及びジクロルメタンのJ_{CH}のε依存性の測定結果を示した。J_{CH}はいづれもεの増加と共に増加してゐる。またクロホルムの場合の方がジクロルメタンに比べてJ_{CH}のε依存性が幾分大きい。 Table 5, 6及び7にアクリロニトリル, クロホルム及びジクロルメタンの

Table 3 The observed solvent dependence of ¹J_{CH} spin coupling constants of chloroform in N-methylacetamide.

Volume fraction of Chloroform	ε ^a	observed (Hz) J _{CH}
1.0	4.806 ^b	209.5
0.8	6.433	211.4
0.5	11.149	213.9
0.2	27.833	215.8
0.05	79.610	215.8

a estimated using $\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2} = \frac{\epsilon_1-1}{\epsilon_1+2} v_1 + \frac{\epsilon_2-1}{\epsilon_2+2} v_2$
 b from ref.10.

Table 4 The observed solvent dependence of ¹J_{CH} spin coupling constants of dichloromethane in N-methylacetamide.

Volume fraction of dichloromethane	ε ^a	observed (Hz) J _{CH}
1.0	8.93 ^b	178.0
0.8	11.71	178.5
0.5	18.90	179.0
0.2	42.58	180.7

a estimated using $\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2} = \frac{\epsilon_1-1}{\epsilon_1+2} v_1 + \frac{\epsilon_2-1}{\epsilon_2+2} v_2$
 b from ref.10.

J_{CH}のε依存性の計算結果を示した。いづれの場合もεの増加と共にJ_{CH}の値は増加しておりアクリロニトリルの(J_{CHB}+J_{CHC})を除いて実測の傾向と一致してゐる。(J_{CHB}+J_{CHC})については計算ではεの増加と共に増加してゐるが、観測の結果はバラツキがあるため厳密な議論は現在のデータでは出来ない。クロホルムとジクロルメタンのJ_{CH}の計算値のε依存性は前者の方が幾分大きく、これは実測の傾向と一致してゐる。以上のように計算と実測の全体の傾向は一致してゐるが、定量的には計算の方がε依存性が大きく見積られてゐる。これは'solvaton'理論の近似にも問題があると思われる、今後の検討が必要である。

Table 5 Dependence of calculated ¹J_{CH} spin coupling constants of acrylonitrile upon dielectric constant.

ε	Calculated (Hz)			
	J _{CHB}	J _{CHC}	J _{CHB} +J _{CHC}	J _{C2H}
1	143.7	164.8	308.5	193.4
2	162.3	185.6	347.9	221.6
4	175.4	199.3	374.7	237.7
10	187.0	209.9	396.9	249.2
20	191.4	213.7	405.1	253.1
50	194.2	216.1	410.3	255.4

Table 6 Dependence of calculated ¹J_{CH} spin coupling constants of chloroform upon dielectric constant.

ε	calculated (Hz)	
	J _{CHB}	J _{CHC}
1	117.4	
2	136.3	
4	148.5	
10	156.9	
20	160.0	
50	161.9	

Table 7 Dependence of calculated ¹J_{CH} spin coupling constants of dichloromethane upon dielectric constant.

ε	Calculated (Hz)	
	J _{CHB}	J _{CHC}
1	106.3	
2	120.8	
4	129.8	
10	135.9	
20	138.1	
50	139.5	

References:

- 1) S.L. Smith, Fortscher. Chem. Forsch., **27**, 117 (1972)
- 2) J. Kowalewski, Prog. NMR spectroscopy, **11**, 1 (1977)
- 3) J.A. Pople, J.W. McIver, N.S. Ostlund, J. Chem. Phys., **49**, 2965 (1968)
- 4) M.D. Johnston, M. Bonfield, J. Chem. Phys., **54**, 3083 (1971); Mol. Phys., **23**, 831 (1971)
- 5) I. Ando, A. Nishio, M. Kondo, J. Magn. Resonance, **21**, 429 (1976)
- 6) G. Klepman, Chem. Phys. Letters, **1**, 200 (1967); J. Amer. Chem. Soc., **90**, 223 (1968)
- 7) M. Born, Z. Phys., **1**, 45 (1920)
- 8) J.A. Pople, D.L. Beveridge, P.A. Dobosh, J. Chem. Phys., **42**, 2026 (1967)
- 9) J.A. Pople, G.A. Segal, J. Chem. Phys., **44**, 3289 (1966)
- 10) H.J. Hörig, W. Michel, Wiss. Z. Techn. Hochsch. Chem. Leuna-Merseburg, **25**, 149 (1974)
- 11) J.A. Riddick, W.B. Bunger, 'Organic Solvents', Wiley-Interscience, New York, 1970.
- 12) J.A. Pople, M. Gordon, J. Amer. Chem. Soc., **89**, 4253 (1967)

Dielectric Solvent Effect Study of $^1J_{CH}$ Spin Coupling Constants
using the Finite Perturbation Theory with the "Solvaton" Model

Masahiro Kondo, Isao Ando, Riichirô Chûjô, Atsuo Nishioka
and *Shosuke Watanabe

Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology,
Ookayama, Meguro-ku, Tokyo

*Minato High School of Technology,
Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo

Abstract:

A theoretical study is presented of the effects of solvent molecules on $^{13}C-H$ nuclear spin-spin coupling constants ($^1J_{CH}$) of some organic compounds (acrylonitrile, chloroform and dichloromethane). The solvent-solute interaction is estimated using the Klopman's "solvaton" theory which is based on the assumption that (i) upon addition of a solute at an infinite dilution to an aprotic solvent of dielectric constant, ϵ , a number of charges ("solvaton") are induced in the solvent, (ii) one "solvaton" is associated with each atom of the solute and its charge is equal in magnitude but in sign to that of the atom to which it is attached and (iii) there are no interactions between them. The interaction is included in the Fock matrices. Calculations of $^1J_{CH}$'s are performed by the Pople's finite perturbation theory in the INDO approximation for acrylonitrile and in the CNDO/2 approximation for chloroform and dichloromethane. Calculated results agree well with the observed solvent effects.

昨年の研究会で著者は、核スピノースピン結合の計算に於て、Modified Hartree-Fock operator を使つて求めた Virtual Orbital を使用することによつて、中間励起状態における C.I. を非常に小さくすることが出来ることを示した (C.I.: Configuration Interaction)。従つて近似計算に於ては、中間励起状態における C.I. を無視することが出来る。更に、基底状態における C.I. の中でも重要な、各軌道に 2 コブツ電子のつまった配位のみを残すと、核スピノースピン \$I_N\$ と \$I_{N'}\$ 間の相互作用エネルギー、\$E_{NN'}\$ は次の式であらわせる。

$$E_{NN'} = -\sum_{r \neq 0} \sum_{j,k=0}^{m-1} \frac{(\psi_j^0 | \mathbf{q}_N | \psi_k^r) \cdot (\psi_k^r | \mathbf{q}_{N'} | \psi_j^0)}{\epsilon_k^r - \epsilon_j^0} \left\{ 1 + \frac{(\psi_j^0 | \psi_k^r | \psi_j^0 | \psi_k^r)}{\epsilon_k^r - \epsilon_j^0} \right\} \quad \begin{array}{l} \psi_j^0: \text{occupied MO} \\ \psi_k^r: \text{virtual MO} \end{array} \quad (1)$$

$$\mathbf{q}_N(\nu) = \frac{16\pi\beta\hbar}{3} \gamma_N \delta(\mathbf{r}_{\nu N}) \mathbf{I}_N \quad (\text{Fermi 相互作用}) \quad (2)$$

又は

$$\mathbf{q}_N(\nu) = 2\beta\hbar \gamma_N \{ 3\mathbf{r}_{\nu N} (\mathbf{I}_N \cdot \mathbf{r}_{\nu N}) r_{\nu N}^{-5} - \mathbf{I}_N r_{\nu N}^{-3} \} \quad (\text{Dipole 相互作用}) \quad (3)$$

分子が \$n\$ 本の等しい化学結合から成り立っている時には、\$\psi_j^r\$ は \$n\$ 本の equivalent orbital (bond localized orbital) \$\phi_\alpha^r\$ に分解出来る。

$$\psi_k^r = \sum_{\alpha=0}^{m-1} C_{k\alpha} \phi_\alpha^r \quad (r=0,1,2,\dots) \quad (4)$$

又、\$n\$ 本の化学結合につけた番号である。(4)式を使つと

$$(\psi_j^0 | \mathbf{q}_N | \psi_k^r) = \sum_{\alpha, \alpha'=0}^{m-1} C_{j\alpha'} C_{k\alpha} (\phi_{\alpha'}^0 | \mathbf{q}_N | \phi_\alpha^r) \quad (5)$$

\$\mathbf{q}_N\$ は、核 \$N\$ と電子との間の非常に短距離型の相互作用であるから、(5)式の右辺の \$\alpha', \alpha''\$ が共に核 \$N\$ の属する化学結合 (\$\alpha\$ とする) の番号に等しくない時は無視出来る。

$$(\psi_j^0 | \mathbf{q}_N | \psi_k^r) = C_{j\alpha} C_{k\alpha} (\phi_\alpha^0 | \mathbf{q}_N | \phi_\alpha^r) \quad (6)$$

これを(1)式に代入すると、

$$E_{NN'} = \sum_{r \neq 0} \{ E_{NN'}^r(0) + E_{NN'}^r(S) \} \quad (7)$$

ひるいサ えいこ

$$E_{NN'}^{\gamma}(X) = -(\phi_{\alpha}^{\circ} | \rho_N | \phi_{\alpha}^{\gamma}) \cdot (\phi_{\beta}^{\gamma} | \rho_N | \phi_{\beta}^{\circ}) \sum_{j,k=0}^{m-1} \frac{C_{j\alpha} C_{j\beta} C_{k\alpha} C_{k\beta}}{\varepsilon_k^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ}} \Gamma_X(\gamma; j, k) \quad (8)$$

但し、 $\Gamma_X(\gamma; j, k) = 1$ ($X=0$ の時) 又は、 $\Gamma_X(\gamma; j, k) = \frac{(\psi_j^{\circ} \psi_k^{\gamma} | \psi_j^{\circ} \psi_k^{\gamma})}{\varepsilon_k^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ}}$ ($X=S$ の時)

である。 ϕ_{α}^{γ} と ϕ_{β}^{γ} の直交性から、

$$\sum_{k=0}^{m-1} C_{k\alpha} C_{k\beta} = 0 \quad (9)$$

$$\varepsilon_j^{\gamma} \sim \varepsilon_k^{\gamma} \ll \varepsilon_k^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ} \quad (10)$$

であるので、 $(\varepsilon_k^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ})^{-1}$ を ε_k^{γ} の平均 ε^{γ} のまわりに展開すると ($\Delta_k^{\gamma} \equiv \varepsilon_k^{\gamma} - \varepsilon^{\gamma}$),

$$(\varepsilon_k^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ})^{-1} = (\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ})^{-1} \left\{ 1 - \Delta_k^{\gamma} (\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ})^{-1} + \dots \right\} \quad (11)$$

従って、(10)式を使うと $\sum_{k=0}^{m-1} \frac{C_{k\alpha} C_{k\beta}}{\varepsilon_k^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ}} \approx - \frac{1}{(\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ})^2} \sum_{k=0}^{m-1} C_{k\alpha} C_{k\beta} \Delta_k^{\gamma}$ (12)

さらに $(\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ})^{-2}$ を ε_j° の平均 ε° のまわりに展開すると ($\Delta_j^{\circ} \equiv \varepsilon_j^{\circ} - \varepsilon^{\circ}$),

$$(\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ})^{-2} = (\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon^{\circ})^{-2} \left\{ 1 + 2\Delta_j^{\circ} (\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon^{\circ})^{-1} + \dots \right\} \quad (13)$$

(10), (13) 式から、

$$\sum_{j=0}^{m-1} \frac{C_{j\alpha} C_{j\beta}}{(\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ})^2} \approx \frac{2 \sum_{j=0}^{m-1} C_{j\alpha} C_{j\beta} \Delta_j^{\circ}}{(\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon^{\circ})^3} \quad (14)$$

(12) と (14) 式を組合せると、 $X=0$ の場合の (8) 式の右辺は、

$$E_{NN'}^{\gamma}(0) \approx 2(\phi_{\alpha}^{\circ} | \rho_N | \phi_{\alpha}^{\gamma}) \cdot (\phi_{\beta}^{\gamma} | \rho_N | \phi_{\beta}^{\circ}) (\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon^{\circ})^{-3} \sum_{j=0}^{m-1} C_{j\alpha} C_{j\beta} \Delta_j^{\circ} \sum_{k=0}^{m-1} C_{k\alpha} C_{k\beta} \Delta_k^{\gamma} \quad (15)$$

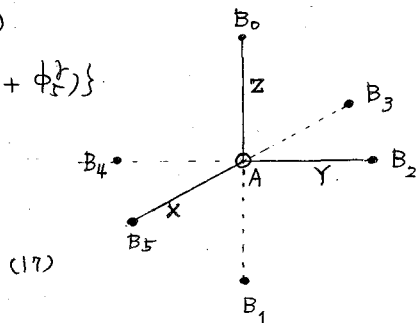
$|\Delta_j^{\circ}|/(\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon^{\circ})$, $|\Delta_k^{\gamma}|/(\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon^{\circ})$ は両方とも 1 よりかなり小さいので $|\Delta_j^{\circ} \Delta_k^{\gamma}|/(\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon^{\circ})^2$ は 1 より非常に小さい。従って (15) 式の右辺は、 $X=0$ の場合の (9) 式の右辺が各項が ~~相殺~~ 相殺して非常に小さくなることを示している。一方、 $X=S$ の場合には、 $\Gamma_S(\gamma; j, k) = (\psi_j^{\circ} \psi_k^{\gamma} | \psi_j^{\circ} \psi_k^{\gamma}) / (\varepsilon_k^{\gamma} - \varepsilon_j^{\circ})$ が、 ψ_j° と ψ_k^{γ} の空間対称性に強く 의존しているので、 $X=0$ の場合の様な相殺はおこらない。従って、 $\Gamma_S(\gamma; j, k)$ が $\Gamma_0(\gamma; j, k)$ に比べてかなり小さいにもかかわらず、 $E_{NN'}^{\gamma}(S)$ は $E_{NN'}^{\gamma}(0)$ に比べて小さくならない。Direct Coupling の場合には、 $E_{NN'}^{\gamma}(X)$ は単一の項

$$E_{NN'}^{\gamma}(X) = -(\phi_{\alpha}^{\circ} | \rho_N | \phi_{\alpha}^{\gamma}) \cdot (\phi_{\alpha}^{\gamma} | \rho_N | \phi_{\alpha}^{\circ}) \Gamma_X(\gamma; 0, 0) / (\varepsilon^{\gamma} - \varepsilon^{\circ}) \quad (16)$$

から成るので、Geminal (結合の場合の様な相殺は起こらない。従つて $E_{NN'}^{\sigma}(S)$ は、 $E_{NN'}^{\sigma}(0)$ に比べてかなり小さい。

以上の式を AB_5 型分子のリガンド核間の相互作用に適用してみる。点群 O_h の a_{1g} , e_g , t_{1u} 表現に属する MO を夫々 $\{\phi_0^{\sigma}\}$, $\{\psi_1^{\sigma}, \psi_2^{\sigma}\}$, $\{\psi_3^{\sigma}, \psi_4^{\sigma}, \psi_5^{\sigma}\}$ とすると、6本の equivalent orbital ϕ_{α}^{σ} は、

$$\begin{aligned}\psi_0^{\sigma} &= \frac{1}{\sqrt{6}} (\phi_0^{\sigma} + \phi_1^{\sigma} + \phi_2^{\sigma} + \phi_3^{\sigma} + \phi_4^{\sigma} + \phi_5^{\sigma}) \\ \psi_1^{\sigma} &= \frac{1}{\sqrt{3}} \{ (\phi_0^{\sigma} + \phi_1^{\sigma}) - \frac{1}{2} (\phi_2^{\sigma} + \phi_3^{\sigma} + \phi_4^{\sigma} + \phi_5^{\sigma}) \} \\ \psi_2^{\sigma} &= \frac{1}{2} (\phi_3^{\sigma} + \phi_5^{\sigma} - \phi_2^{\sigma} - \phi_4^{\sigma}) \\ \psi_3^{\sigma} &= \frac{1}{\sqrt{2}} (\phi_0^{\sigma} - \phi_1^{\sigma}) \\ \psi_4^{\sigma} &= \frac{1}{\sqrt{2}} (\phi_2^{\sigma} - \phi_4^{\sigma}) \\ \psi_5^{\sigma} &= \frac{1}{\sqrt{2}} (\phi_3^{\sigma} - \phi_5^{\sigma})\end{aligned}$$



回転による分子の方向についての平均を行つると、

$$\langle (\phi_0^{\sigma} | \mathbf{q}_0 | \phi_0^{\sigma}) \cdot (\phi_{\alpha}^{\sigma} | \mathbf{q}_{\alpha} | \phi_{\alpha}^{\sigma}) \rangle_{av.} = \left\{ \frac{16\pi\beta\hbar\gamma_B}{3} \phi_0^{\sigma}(B_0) \phi_0^{\sigma}(B_0) \right\}^2 (\mathbf{I}_0 \cdot \mathbf{I}_{\alpha}) \quad (18)$$

(Fermi 相互作用)

$$\langle (\phi_0^{\sigma} | \mathbf{q}_0 | \phi_0^{\sigma}) \cdot (\phi_{\alpha}^{\sigma} | \mathbf{q}_{\alpha} | \phi_{\alpha}^{\sigma}) \rangle_{av.} = \frac{(-)^{\alpha-1}}{2\alpha} \left\{ 2\beta\hbar\gamma_B \left(\phi_0^{\sigma} \left| \frac{r_0^2 - 3z_0^2}{r_0^5} \right| \phi_0^{\sigma} \right) \right\}^2 (\mathbf{I}_0 \cdot \mathbf{I}_{\alpha}) \quad (19)$$

$$(\alpha = 0 \text{ or } 1) \quad (\text{Dipole 相互作用})$$

であるから、(7) 式より、結合定数 $J_{NN'}$ は、

$$J_{0\alpha} = \sum_{\gamma \neq 0} \{ J_{0\alpha}^{\sigma}(0) + J_{0\alpha}^{\sigma}(S) \} \quad (20)$$

$$J_{0\alpha}^{\sigma}(X) = - \left\{ F^{\sigma} + \frac{(-)^{\alpha-1}}{2\alpha} D^{\sigma} \right\} \Lambda_{0\alpha}^{\sigma}(X) \quad (21)$$

$$F^{\sigma} = \frac{1}{\hbar} \frac{1}{36} \left\{ \frac{16}{3} \pi\beta\hbar\gamma_B \phi_0^{\sigma}(B_0) \phi_0^{\sigma}(B_0) \right\}^2 \quad (22)$$

$$D^{\sigma} = \frac{1}{\hbar} \frac{1}{36} \left\{ 2\beta\hbar\gamma_B \left(\phi_0^{\sigma} \left| \frac{r_0^2 - 3z_0^2}{r_0^5} \right| \phi_0^{\sigma} \right) \right\}^2 \quad (23)$$

$$\Lambda_{0\alpha}^{\sigma}(X) = \sum_{j,k=0}^{m-1} d_{j0} d_{j\alpha} d_{k0} d_{k\alpha} \frac{\tilde{\Gamma}_X(r; k, j)}{\epsilon_k^{\sigma} - \epsilon_j^{\sigma}} \quad (24)$$

$$d_{j\alpha} \equiv \sqrt{6} C_{j\alpha}$$

(17) 式より求めた $d_{j0} d_{j\alpha}$ の数値を (24) 式に入れると、

$$\begin{aligned}\Lambda_{01}^{\sigma}(X) &= \tilde{\Gamma}_X(r; 0, 0) + 2\tilde{\Gamma}_X(r; 1, 0) + 2\tilde{\Gamma}_X(r; 0, 1) + 4\tilde{\Gamma}_X(r; 1, 1) + 9\tilde{\Gamma}_X(r; 3, 3) \\ &\quad - 3\tilde{\Gamma}_X(r; 3, 0) - 3\tilde{\Gamma}_X(r; 0, 3) - 6\tilde{\Gamma}_X(r; 3, 1) - 6\tilde{\Gamma}_X(r; 1, 3)\end{aligned} \quad (25)$$

$$\Lambda_{02}^{\gamma}(X) = \tilde{P}_X(\gamma; 0, 0) + \tilde{P}_X(\gamma; 1, 1) - \tilde{P}_X(\gamma; 1, 0) - \tilde{P}_X(\gamma; 0, 1) \quad (26)$$

但し、 $\tilde{P}_X(\gamma; \beta, k) \equiv P_X(\gamma; \beta, k) / (\epsilon_k^{\gamma} - \epsilon_0^{\gamma})$ である。

こゝで、すべての γ に対して、

$$|\Lambda_{0\alpha}^{\gamma}(S)| > |\Lambda_{0\alpha}^{\gamma}(0)| \quad (27)$$

であると假定する。即ち、 $J_{0\alpha}^{\gamma}$ の符号は、 $J_{0\alpha}^{\gamma}(S)$ によつてきまるものとする。 $\Lambda_{02}^{\gamma}(S)$ はいつも正であると考えられるから ($S-S, p_z-p_z$ 間の交換積分は $S-p_z$ 間の交換積分より大きい) J_{02}^{γ} は、 ϕ_0^{γ} が B_0 の近くで S -character ならば負、 p -character ならば正である。 $\langle S | \delta(\tau_{01}) | S \rangle$ は $\langle p | \tau_{01}^{-3} | p \rangle$ より 10 倍程大きいので、 ϕ_0^{γ} が B_0 の近くでほんのわずかな S -character を含んだ p 関数としてあらわされる時には、 J_{02}^{γ} は非常に小さくなる。

J_{01}^{γ} の符号は、 ϕ_0^{γ} の軌道の $s \sim p$ -character の配分によらずにつねに $\Lambda_{01}^{\gamma}(S)$ によつてきまる。実験で J_{01} が正であるらしいという結果がえられているが、このことが正しいとすると $\Lambda_{01}^{\gamma}(S)$ が負でなければならなくなる。 $S-p_z, S-d_{z^2}$ 間の交換積分は $S-S, p_z-p_z$ 間の交換積分より小さいと考えられるが、 $p_z-d_{z^2}$ 間の交換積分は $p_z-p_z, d_{z^2}-d_{z^2}$ 間の交換積分に比べて必ずしも小さいとはいえない。Occupied MO を $nS, nP_z, (n-1)d_{z^2}$ とすると未励起 virtual orbital は $(n+1)S, (n+1)P_z, nd_{z^2}$ であるから、 $k < 1$ の場合の $\tilde{P}_S(\gamma; \beta, 1)$ は、 nP_z と nd_{z^2} の交換積分から成るのでかなり大きくなると思われる。これらの、 $p_z-d_{z^2}$ 間の交換積分が $\Lambda_{01}^{\gamma}(X)$ に対して重要な寄与をするならば、 $\Lambda_{01}^{\gamma}(S)$ は負となり、理論上でも、 J_{01} に対して正の値がえられることが期待出来る。

Geminal nuclear spin-spin couplings in AB_n -type of molecular systems

Eiko Hiroike

Department of Chemistry, Faculty of Science,
Tohoku University, Sendai, Japan

An approximate formula for the second-order perturbation energy previously obtained by the author is applied to the calculation of geminal nuclear spin-spin couplings in the AB_n -type of molecular systems. It is shown that why the electron correlation is unusually important in the geminal couplings. The signs of cis and trans geminal couplings are discussed for the AB_6 -type of molecular systems.

(北見工大) O福井洋え, 三浦宏一, 北村祐子

In the presence of a uniform electric field \vec{E} , the magnetic shielding constant σ of a proton in an X-H bond is changed. For fields that are not too large:

$$\Delta\sigma = -AE_z, \quad (1)$$

where A is a parameter dependent upon the nature of X and the positive z direction is taken from X to H. Since the original work by Buckingham [1], the magnitude of A has been determined for X equal to C, H, N, O, F, and Cl, both theoretically [1-7] and experimentally [8-16]. Buckingham [1] and Musher [2] have been able to explain A for a C-H bond as representing the electric-field dependence of the local diamagnetic shielding on the proton. Thus an electric field in the C-H direction causes electrons to flow from the proton to the carbon atom and the loss of electron density on the proton can be related to the observed A. Raynes and Chadburn [7], on the other hand, calculated the proton shielding change for HCl not only by the diamagnetic shielding at the proton but also by a shielding mechanism arising from paramagnetic currents on the chlorine atom. Recently Riley and Raynes [4] have calculated the parameter A for H₂ by an ab initio SCF perturbation theory. Furthermore, a similar calculation has been carried out for HF by Day and Buckingham [6]. The ab initio method has a merit in that it permits a determination of A without depending upon an arbitrary choice of empirical parameters. However, the computation is so involved that it will be confined to calculations for diatomics.

In contrast to the experimental work there have been very few theoretical calculations of A for N-H and O-H bonds. In the present paper we report semi-empirical calculations of the A parameter of X-H bonds for X equal to C, H, B, N, O and F using the theoretical approach adopted by Musher [2]. This report extends similar work by Musher to a larger number of bonds. It is the aim of this investigation to show the relationship between the A parameter of an X-H bond and the electronegativity of X atom.

The method has been described in detail in the Musher's paper and will only be sketched here. Consider the molecular orbital for each electron in an X-H bond to be

$$\psi = N(|\sigma\rangle + \lambda|h\rangle), \quad (2)$$

with $|h\rangle$ the hydrogen 1s atomic orbital, $|\sigma\rangle$ the appropriate X atom orbital hybridized from its 2s and 2p atomic orbitals, and N is the normalization constant. Then for A we have

ふくい ひろゆき, みうら こういち, きたむら ゆうこ

$$A = -71.0 \times 10^{-6} \zeta_H \lambda (1 + \lambda S) (1 + \lambda^2 + 2\lambda S)^{-2} (\partial \lambda / \partial E_z)_{E_z=0} \quad (3)$$

where ζ_H is the orbital exponent of the hydrogen 1s atomic orbital and S , the overlap integral $\langle \sigma | h \rangle$ is evaluated at a standard bond length [17]. λ can be determined by performing a Hückel-type calculation, minimizing the molecular energy where

$$H = H^{(0)} + e \sum_i z_i E_z \quad (4)$$

with $H^{(0)}$ the one-electron spinless hamiltonian for the X-H bond in the absence of an electric field and the origin of z was placed at the centre of the bond*. The matrix elements of $H^{(0)}$ are

$$\left. \begin{aligned} H_{\mu\mu}^{(0)} &= -\frac{1}{2} (I_\mu + A_\mu) \quad (\mu = \sigma, h), \\ H_{\sigma h}^{(0)} &= \frac{1}{2} S (H_{\sigma\sigma}^{(0)} + H_{hh}^{(0)}), \end{aligned} \right\} \quad (5)$$

where $(I_\mu + A_\mu)/2$ is the average of the first ionization potential and the electron affinity. For the s-p hybrid orbitals σ , $(I_\mu + A_\mu)/2$ values are obtained from a weighted mean of s and p values [18] (1:3 weight for sp^3 , 1:2 for sp^2 , 1:1 for sp). The matrix elements of z in equation (4) were calculated using Slater-type orbitals with 1.2 as the exponent in the hydrogen orbital. The molecular orbitals are obtained by the diagonalization of the matrix H . In this calculation the derivative $(\partial \lambda / \partial E_z)_{E_z=0}$ was evaluated using the method of finite differences described in detail in reference [19]. Then

$$\left(\frac{\partial \lambda}{\partial E_z} \right)_{E_z=0} = \frac{\lambda(E_z) - \lambda(-E_z)}{2E_z} \quad (6)$$

where E_z was set equal to $3 \times 10^8 \text{ Vm}^{-1}$ in this calculation.

* More precisely the origin of coordinates should be at the centroid of electronic charge in the X-H bond.

The A's calculated by us and taken from the literature are given in the table. It is concluded from our results in the table that the A's tend to have smaller values as the electronegativity of the atom bonded to hydrogen increases. Buckingham's derivation of the linear field dependence of the shielding [1] treats the covalently bound hydrogen as a hydrogen atom, perturbed by a point charge q_e at a distance $R \text{ \AA}$. The coefficient A is

then

$$A = (q/R^2) \times 2.4 \times 10^{-16} \text{ mV}^{-1}. \quad (7)$$

The effective q , and thus A should increase with increasing electronegativity of the atom to which the hydrogen is bonded. This is inconsistent with our results. This inconsistency seems to indicate that the Buckingham's model is over-simplified. The following consideration convinces us that the proton bound to an electronegative atom will have a small A value. The electronegative atom is strongly bound to the hydrogen atom and the electrons in the bond will have a small polarization in an electric field.

The calculations were performed on a FACOM 230-75 at the Hokkaido University Computing Center.

Values of the linear electric-field dependence parameter A , in units of 10^{-16} mV^{-1} , for X-H bonds.

Bond type	Type of σ	$-H_{\sigma\sigma}^{(0)}$ (eV)	A Our results	A Calculated by others
H-H	s	7.176	0.971	0.758(a), 1.09(b)
B-H	sp^2	5.865	0.749	
	sp^3	5.399	0.815	
C-H	sp	9.812	0.579	
	sp^2	8.398	0.732	} 0.67(c)
	sp^3	7.692	0.858	
N-H	sp^2	11.289	0.619	} 1.7(e)
	sp^3	10.285	0.742	
O-H	sp^3	13.181	0.589	
F-H	sp^3	16.378	0.433	1.50(f)

(a) Reference [3].

(b) Reference [4].

(c) Reference [1].

(d) Reference [2].

(e) Reference [5].

(f) Reference [6].

References

- [1] Buckingham, A. D., 1960, *Can. J. Chem.*, 38, 300.
- [2] Musher, J. I., 1962, *J. Chem. Phys.*, 37, 34.
- [3] Gruninger, J., and Hameka, H. F., 1968, *J. Chem. Phys.*, 48, 4878.
- [4] Riley, J. P., and Raynes, W. T., 1976, *Molec. Phys.*, 32, 569.
- [5] Laszlo, P., and Musher, J. I., 1964, *J. Chem. Phys.*, 41, 3906.
- [6] Day, B., and Buckingham, A. D., 1976, *Molec. Phys.*, 32, 343.
- [7] Raynes, W. T., and Chadburn, B. P., 1969, *Molec. Phys.*, 17, 543.
- [8] Diehl, P., and Freeman, R., 1961, *Molec. Phys.*, 4, 39.
- [9] Petrakis, L., and Bernstein, H. J., 1962, *J. Chem. Phys.*, 37, 2731.
- [10] Green, R. D., and Martin, J. S., 1968, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 3659.
- [11] Hamer, G. K., and Reynolds, W. F., 1968, *Can. J. Chem.*, 46, 3813.
- [12] Clague, A. D. H., Govil, G., and Bernstein, H. J., 1969, *Can. J. Chem.*, 47, 625.
- [13] Green, R. D., Martin, J. S., Cassie, W. B. M., and Hyne, J. B., 1969, *Can. J. Chem.*, 47, 1639.
- [14] Stockton, G. W., and Martin, J. S., 1972, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 6921.
- [15] Takahashi, A., 1973, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 35, 1346.
- [16] Raynes, W. T., Buckingham, A. D., and Bernstein, H. J., 1962, *J. Chem. Phys.*, 36, 3481.
- [17] Pople, J. A., and Beveridge, D. L., 1970, *Approximate Molecular Orbital Theory* (New York: McGraw-Hill Inc.), p. 111.
- [18] Pople, J. A., and Beveridge, D. L., reference [17], p. 77.
- [19] Pople, J. A., McIver, J. W. Jr., and Ostlund, N. S., 1968, *J. Chem. Phys.*, 49, 2960.

Linear electric field dependence of
the proton magnetic shielding
H. Fukui*, K. Miura, and Y. Kitamura
Kitami Institute of Technology
165 Koencho, Kitami 090, Japan

Abstract: Linear electric field dependence, A , of the proton magnetic shielding was evaluated by a Hückel-type calculation. It is concluded from our results that the A 's tend to have smaller values as the electronegativity of the atom bonded to hydrogen increases. This conclusion is inconsistent with the original Buckingham's model. The relationship between the A and the electronegativity of a bonded atom was discussed.

226 (F4) 複素芳香族ニトリルおよび芳香族ニトリル類の反応性と ^{13}C NMR.

エナミノケトン形成反応の新指標, K .

(塩野義研) ○照井瑞弘, 山川真透, 本摩恒利, 多田幸男, 通和夫

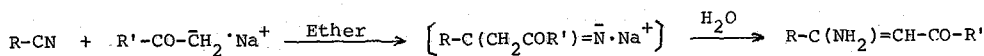
Scheme 1 に示すニトリルとエノレートアニオンの縮合によるエナミノケトン形成反応¹は、その生成物の種々の試薬との環化反応の多様性に照らしてみても、複素環合成の key step として注目される。この反応は、R 基により左右され、一般に、エノレートアニオン生成のための塩基の存在下で、R 部にも簡単に脱アロトン化が起り、アニオン型となるものでは進行しない。おれおれは、酸性プロトンと Me₃Li には PR₃ により置換した誘導体を含む、種々の複素芳香族および芳香族ニトリルを対象にして、反応性を検討してみたところ、環の差ニトリル置換位の差により大きな変化が見られた。当初、化学構造の部分的特異性と反応性との間に、ある程度の関連づけはできたが、満足すべきものではなかつた。新しい反応指標の導入が望まれた。そこで、一連のニトリル化合物の ^{13}C NMR スペクトルの測定を行い、反応性と NMR パラメーターとの間の相関関係の有無を検討したところ、興味深い関係が発見されたので報告する。

使用された化合物を Fig. 1 に、それらの ^{13}C シグナルの帰属の結果を Table に示す。Table 中の K は後述する反応指標であり、Reactivity grade は Table の脚注に示すように、反応進行の相対速度に基づく大小の分類である。

まず、ニトリル炭素に注目すると、極く大小には、その化学シフト値、 δ_{CN} 、の小さい方が、反応しやすい傾向にあるが、それだけでは指標としての使用に耐えられぬ。次に、ニトリル置換位の環炭素の化学シフト、 $\delta_{\text{C-CN}}$ 、に注目すると、面白いことに、 δ_{CN} の場合よりも良好な反応性との相関関係が見られる。ただし、今度はその値が大きい程、反応しやすいという傾向となる。また小さな δ_{CN} をもつ化合物が、いつも大きい $\delta_{\text{C-CN}}$ をもつとは限らず、 δ_{CN} と $\delta_{\text{C-CN}}$ の間には、明瞭な相関関係は見出せない。また、他の炭素の化学シフトと反応性の間には、特別な対応関係は見出せなかつた。これらの事実に基づき、 δ_{CN} と $\delta_{\text{C-CN}}$ を組合せることにより、より良好な相関関係を求め、 δ_{CN} と $\delta_{\text{C-CN}}$ を軸とする平面上に、対応する化合物の Reactivity grade を目盛つてみたところ、Fig. 2 に示すように、かなり有用性のある分類が可能となった。境界線 1, 2, 3 は、それぞれ式 1, 2, 3 で与えられる。従つて、 K に依つて、Fig. 2 の脚注に示した分類が可能となる。この経験則は、当初 30 数種の化合物により導かれたのであるが、後に、反応実験された約 10 種のものについても、ほぼ予想通りの結果を与えた上、ここに記されていない数種のものについても、その後の実験で妥当な結果を得ていたので、 K は当該反応に関する同系列の化合物についての、かなり良好な反応指標と見出すことができよう。

これら一連のニトリル化合物の中の代表的化合物に関する MO 計算の結果と結びつけて化学シフト、反応の主な支配因子、 K の持つ意味などについて考察を行う予定である。

てるいよしひろ, やまかわますみ, ほんまつねとし, ただゆきお, とおりかずお



Scheme 1. Enaminoketone formation reaction¹

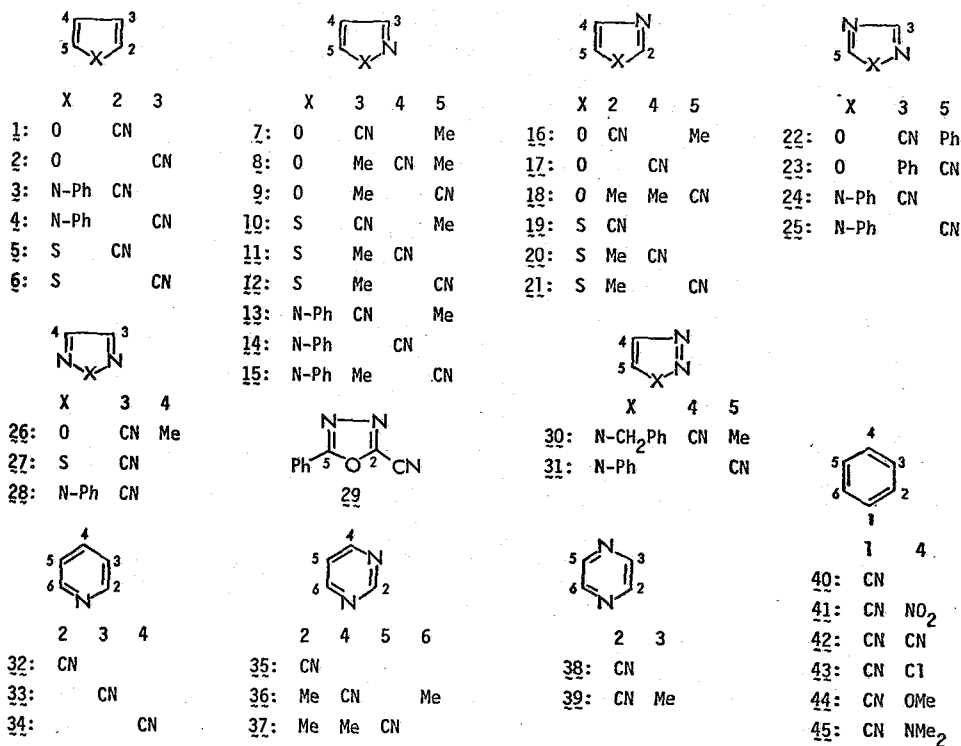


Figure 1. Structures of the compounds examined.

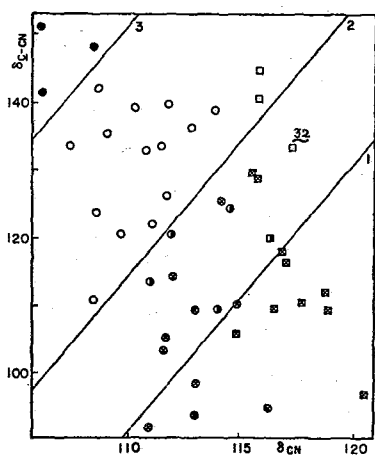


Figure 2. Diagram of correlation between ¹³C chemical shift and reactivity grade. 5-Membered ring system: ●, grade A; ○, grade B; ◐, grade C; and ◑, grade D. 6-Membered ring system: □, grade B; ◐, grade C; and ◑, grade D.

The region of each reactivity grade is divided by parallel linear lines 1, 2, and 3. These lines of distinction are given by the following equations 1, 2, and 3, respectively.

Defining the reactivity index, κ , with equation 4, we can classify the reactivity of molecules by their κ value as follows: $\kappa \geq 62$ (highly reactive); $24 \leq \kappa \leq 60$ (less reactive or inactive); and $\kappa \leq 0$ (completely inactive).

$$\delta_{\underline{C}-CN} = 4\delta_{CN} - 348 \quad (1)$$

$$\delta_{\underline{C}-CN} = 4\delta_{CN} - 324 \quad (2)$$

$$\delta_{\underline{C}-CN} = 4\delta_{CN} - 290 \quad (3)$$

$$\kappa = \delta_{\underline{C}-CN} - 4\delta_{CN} + 348 \quad (4)$$

Table. C-13 Chemical Shifts (δ_C),^a Reactivity Index, and Reactivity Grade

Compound No.	κ^b	R.G. ^c	CN	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	Other C
1	+27.6	B	111.7	-	126.4	122.2	111.7	147.5	-	-
2	-6.8	D	113.0	-	149.8	97.2	111.0	144.1	-	-
3	+5.4	D	111.6	-	103.8	121.9	110.5	126.8	-	Ph: 123.8, 128.0, 129.5, 138.0
4	-21.7	D	116.2	-	126.3	95.1	113.3	121.2	-	Ph: 121.2, 127.5, 129.9, 139.1
5	+1.7	C	114.0	-	109.7	132.3	127.4	137.3	-	-
6	-1.1	D	114.9	-	135.3	110.5	128.5	127.3	-	-
7	+46.3	B	110.3	-	-	139.5	104.2	172.9	-	Me: 12.1
8	-3.3	D	110.9	-	-	159.7	92.3	176.6	-	Me: 10.3, 12.3
9	+55.5	B	108.7	-	-	160.7	114.7	142.3	-	Me: 11.1
10	+31.5	B	113.9	-	-	139.1	126.6	166.9	-	Me: 12.8
11	+5.3	D	113.0	-	-	167.6	109.3	157.0	-	Me: 17.8
12	+38.0	B	110.8	-	-	167.4	131.5	133.2	-	Me: 18.7
13	+16.1	C	114.2	-	-	124.9	111.4	140.9	-	Me: 12.1, Ph: 124.9, 129.0, 129.3, 138.4
14	-9.9	D	113.0	-	-	142.9	94.1	131.9	-	Ph: 119.5, 127.9, 129.5, 138.5
15	+17.4	C	111.1	-	-	149.9	115.6	113.8	-	Me: 13.2, Ph: 122.4, 128.3, 129.3, 138.5
16	+47.2	B	109.1	-	135.6	-	126.0	154.5	-	Me: 11.2
17	+14.6	D	112.0	-	152.7	-	114.6	147.6	-	-
18	+30.1	B	109.7	-	164.5	-	149.4	120.9	-	Me: 12.2, 14.2
19	+33.2	B	112.8	-	136.4	-	145.2	125.6	-	-
20	+17.5	D	114.1	-	168.0	-	125.9	130.8	-	Me: 19.1
21	+6.6	D	111.7	-	171.8	-	151.8	105.4	-	Me: 19.4
22	+62.4	A	108.5	-	-	148.4	-	177.7	-	Ph: 122.1, 128.3, 129.5, 134.2
23	+75.0	A	106.1	-	-	169.2	-	151.4	-	Ph: 124.4, 127.5, 129.0, 132.3
24	+40.7	B	111.8	-	-	139.9	-	142.3	-	Ph: 120.3, 129.5, 129.9, 135.8
25	+39.5	B	109.3	-	-	152.7	-	128.7	-	Ph: 122.8, 129.9, 130.1, 135.6
26	+51.8	B	107.5	-	-	133.8	152.9	-	-	Me: 8.1
27	+35.8	B	111.5	-	-	133.8	152.7	-	-	-
28	+25.7	B	111.2	-	-	122.5	129.3	-	-	Ph: 119.4, 129.5, 138.7, 139.2
29	+64.7	A	106.2	-	141.5	-	-	166.5	-	Ph: 121.7, 127.6, 129.4, 133.3
30	+21.1	C	111.9	-	-	-	120.7	140.7	-	Me: 8.4, CH ₂ : 52.4, Ph: 127.4, 128.7, 129.1, 133.2
31	+25.0	B	108.5	-	-	-	140.3	111.0	-	Ph: 120.3, 129.7, 130.5, 134.8
32	+12.4	B	117.3	-	133.6	128.5	138.4	127.0	151.6	-
33	-10.1	D	117.0	-	152.9	109.9	140.5	123.6	152.2	-
34	+3.1	C	116.3	-	150.6	125.2	120.3	125.2	150.6	-
35	+29.8	B	115.8	-	145.0	-	158.2	124.1	158.2	-
36	+25.7	B	115.8	-	169.5	-	140.9	120.9	169.2	Me: 24.3, 25.9
37	-5.1	D	114.8	-	170.4	-	169.7	106.1	159.6	Me: 23.4, 26.4
38	+17.2	D	115.4	-	130.8	148.3 ^d	-	147.6	145.5	-
39	+16.0	D	115.5	-	130.0	157.8	-	146.4	142.7	Me: 21.7
40	-14.4	D	118.7	112.4	131.9	129.1	132.7	129.1	131.9	-
41	-0.5	D	116.7	118.3	133.4	124.2	150.1	124.2	133.4	-
42	-3.2	D	117.0	116.8	132.6	132.6	116.8	132.6	132.6	CN: 117.0
43	-11.9	D	117.7	110.9	133.3	129.6	139.3	129.6	133.3	-
44	-24.6	D	119.1	103.8	133.8	114.8	162.9	114.8	133.8	OMe: 55.5
45	-36.7	D	120.4	96.9	133.0	111.3	152.3	111.3	133.0	NMe: 39.7

^a ¹³C FT NMR spectra were measured with Varian NV-14 FT NMR spectrometer at 15.087 MHz. Samples were dissolved in CDCl₃ containing TMS as an internal reference; concentrations were ca. 1 mmol/cm³. Measurement conditions: spectral width, 3017 Hz; pulse width, 10 μ sec; acquisition time, 0.6 sec; number of data points, 3706; number of transients, 3000; and probe temperature, 30°. ¹³C signals were assigned using SFORD techniques,² δ_C values reported for analogous compounds,^{2,3} known substituent effects,² and indirect ¹³C, ¹H coupling features;^{2,4} in some cases, Eu(fod)₃ was applied in combination with SFORD.

^b Reactivity index (see Eq. 4). ^c The reactivity grade was roughly classified into grades A-D according to the relative rate of enaminketone formation. This classification was based on the result of reaction at 0° using nitrile, acetone and sodium amide, in a mole ratio of 1:2:2, and anhydrous ether as a solvent; to complete the reaction, compounds of grade A, B, or C require an extremely short time (within a couple of minutes), ca. 10-30 min, or over 1 hr, respectively, while compounds of grade D were inactive or slowly gave only by-products. ^d These assignments may be exchanged.

Carbon-13 NMR Studies of Heteroaromatic and Aromatic Nitriles.

A New Reactivity Index, κ , for the Enaminoketone Formation Reaction

Yoshihiro Terui,* Masumi Yamakawa, Tsunetoshi Honma, Yukio Tada, and Kazuo Tori

(Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd., Fukushima-ku, Osaka 553)

An interesting correlation between a function composed by ^{13}C NMR parameters and the reactivity of heteroaromatic and aromatic nitriles in forming the corresponding enamino-ketones through reaction with enolate anion of acetone will be presented.

The reaction illustrated in Scheme 1 is considered to be a key-step for synthesizing various heterocycles, because the product, enaminoketone, reacts with various reagents to give the corresponding heterocyclic compound.¹ The reactivity of nitrile in the present enaminoketone formation reaction was found to depend on R.

From the comparison of reactivity with ^{13}C NMR parameters of various nitriles shown in Fig. 1, we have found the interesting tendencies. First, roughly speaking, the compound having a smaller δ_{CN} value is more reactive. Secondly, with an increase in the $\delta_{\text{C-CN}}$ value, the reactivity of the compound increases. However, the compound whose δ_{CN} value is small does not always have a large $\delta_{\text{C-CN}}$ value; in other words, no clear relationship was found between δ_{CN} and $\delta_{\text{C-CN}}$. Further, we could not find any interesting correlation between the reactivity and chemical shift of other carbons. Based on above facts, we propose a new reactivity index, κ , for the present reaction, that is given by Equation 4. According to this κ -rule, we can fairly classify the reactivity of molecules, as shown in Fig. 2. It will also be possible to predict the reactivity of analogous molecules by their κ value.

The process deriving this conclusion will be shown. Discussion on the main factor controlling the reaction as well as scope and limitation of the present empirical rule will also be made by considering the terms important for the chemical shift and by referring the data on MO calculations of the representative molecules.

References

- (1) T. Honma and Y. Tada, the 7th Congress of Heterocyclic Chemistry of Japan, Chiba, Abstracts 2-6 (1974).
- (2) G. C. Levy and G. L. Nelson, "Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists," Wiley (1972).
- (3) T. J. Batterham, "NMR Spectra of Simple Heterocycles," Wiley (1973); F. W. Wehrli, J. W. deHaan, A. I. M. Keulemans, O. Exner, and W. Simon, *Helv. Chim. Acta*, **52**, 103 (1969); H. L. Retkofsky and R. A. Friedel, *J. Phys. Chem.*, **72**, 291 (1968); G. Miyajima, Y. Sasaki, and M. Suzuki, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 429 (1972); J. Brumilow and R. T. C. Brownlee, *Tetrahedron Lett.*, 2133 (1975); N. Inamoto, S. Masuda, K. Tokumaru, K. Tori, M. Yoshida, and Y. Yoshimura, *Ibid.*, 3707 (1976).
- (4) F. J. Weigert and J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 3543 (1968); R. Garner, R. Faure, A. Babadjamian, and A. J. Vincent, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1040 (1972); Y. Takeuchi and N. Dennis, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 3657 (1974).

(旭電化, 芝浦工大, 三井東庄, ライオン油脂, 国衛試, 東大農,
東大工) ○武捨 清, 永田親清, 香藤 純, 橋本 茂
叶多謙蔵, 戸田昭三, 田中誠元

1. はじめに

^{13}C -NMR法はその装置の改良, 普及により, ^1H -NMR法などと並ぶ重要な機器分析法の一つとなっているが, ^{13}C -NMRスペクトルの解析では, ^1H -NMRスペクトルの場合とは若干異なり, 解析に使用されるパラメータの中で化学シフトの占める割合が大きい。

^{13}C -NMRの化学シフトの予測は, 理論的計算や経験則によっても行なえるが, 対象とする化合物に関連したシフト図表を用いるのが一番便利である。このような観点から漢者らは, ^{13}C -NMRスペクトルを迅速かつ正確に解析するため, 多くの化学シフトデータを文献より収集し, また測定し, 分析化学的見地から有機化合物の細部にわたって解析できるようなシフト図表を作成してきた。¹⁾

今回, これらの図表を再編集し, 主としてシフト図表を有効に利用した一連のスペクトル解析法を検討した。シフト図表を巧みに利用すれば, 相当複雑な化合物にあってもかなり詳細な構造解析が可能である。

2. 図表化の方法

化学シフトのデータは, NMRに関する報文の多いと思われる学術雑誌約30誌を選び, 1960~1973年の報文から収集した。このとき, 硫酸のような特殊な溶媒を用いているデータは収録せず, シクロヘキサン, ベンゼン, クロロホルムなど一般有機溶媒中で測定されたデータのみ採用した。また図表化を行なっていく際, データの不足している部分は臆測して補った。基準物質はテトラメチルシラン(TMS)とし, 他の基準物質によるデータはTMS基準に換算して用いた。この換算や溶媒効果などによる影響は通常1 ppm以内であるので, 図表化の目的にはさしつかえないものと判断し, これらの点については考慮しないこととした。

図表は1) 有機官能基炭素全般, 2) メチル炭素, 3) メチレン, メチン, 四級炭素, 4) アルケン炭素, 5) 芳香族, 複素芳香族炭素, 6) アルキン炭素について作成した。 ^{13}C -NMRの化学シフトは, 近隣官能基によって大きな影響を受けること及び図表の利用性などを考え, まず着目している炭素核について隣接基(α 置換基)を考慮して図表化し, さらに炭素種によっては β 置換基以遠をも考慮した図表を作成した。置換基は高磁場側からシフト順に並ぶよう配慮し, メチル炭素などでは置換基を sp^3 炭素系, sp^2 炭素系, その他に分けるなどして図表の利用性を高めるよう工夫した。

むしやきよし, なかにちかきよ, さいとうじゅん, はしもとしげる, かのうにけんぞう,
とだしょうぞう, たなかしげゆき

3. 解析方法

解析に用いる情報は、原則として、化学シフト、不完全プロトン照射スペクトルから得られる各炭素に結合しているプロトン数並びにシグナル強度であるが、シグナル強度の持つ意味は、測定モードなどにより異なるので、その場合に応じて考慮する

まず、スペクトルを0~82 ppm (SP³炭素領域), 82~160 ppm (SP²炭素領域), 160~225 ppm (カルボニル炭素領域) 及び65~100 ppm (SP炭素領域) に分け、各シグナルがどの領域に入るか検討する。SP炭素領域や各領域の境界付近のシグナルは、両方のことを考えてみる必要がある。

1) SP³炭素領域

不完全プロトン照射スペクトルを用いて -CH₃, -CH₂-, -CH< 及び -C< の識別をする。

(a) メチル炭素

置換基の種類によつて分類したマスター図表のほか、置換基が -CH₂-, -C=C, -C=O, -NH-, -N< 及び -O- の場合は、β置換基以遠を考慮した図表も作成してある。従つて、マスター図表で置換基を決め、その種類によつてはβ置換基以遠も図表により推定できる。メチル炭素の各種置換基による化学シフト範囲は、他の炭素種のそれに比べて狭く重複も少ないので、メチル炭素の化学シフトから、かなり詳細な化学構造の推定が可能である。

(b) メチレン炭素

メチレン基をばさむ二つの置換基のうち一方を -CH₃, -CH₂-, -CH< 及び -C< に固定し、他方を高磁場側から配列した図表を用いて解析する。

(c) メチン及び四級炭素

図表が複雑化し、置換基の効果も

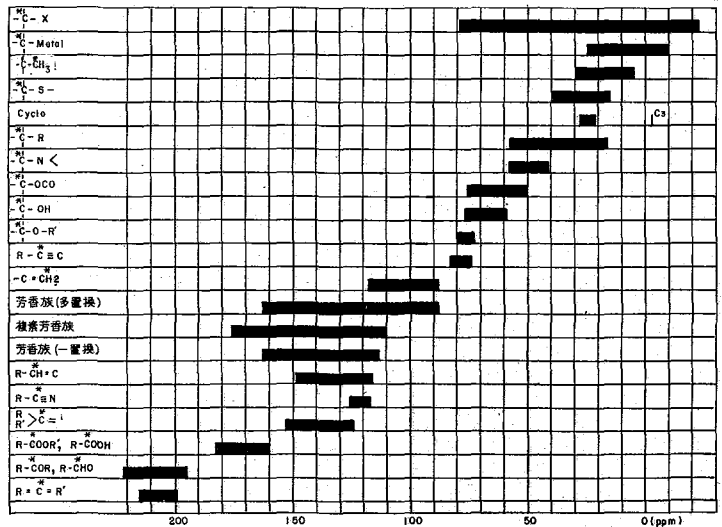


Fig. 1 ¹³C-NMR chemical shifts of organic carbons

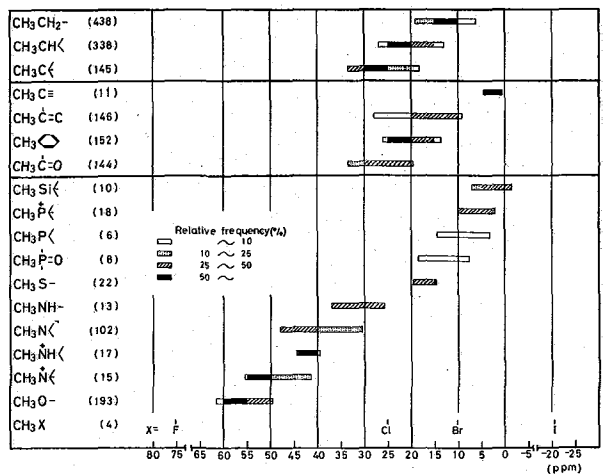


Fig. 2 ¹³C-NMR chemical shifts of methyl carbons

多様になるので、化学シフト範囲の重複が激しいが、 α 置換基に-N-や-O-が含まれているかどうかの判定は可能である。

2) sp^2 炭素領域

この領域にはアルケン、芳香族及び複素芳香族の各炭素が含まれるが、環電流シフトが非常に小さく、それぞれの間で化学シフト差はないので、化学シフトのみで識別することはできず、シグナル数、シグナル強度、スペクトルパターン、不完全プロトン照射スペクトルなどの情報を総合的に判断して決めることになる。

(a) アルケン炭素

不完全プロトン照射スペクトルにより ($CH_2=CH-X$, $CH_2=C\langle X$, $X-CH=CH-Y$, $X-CH=C\langle Y$, $\overset{W}{N}C=C\langle Z$) の五つの型のうちいずれであるかを決め、該当する図表を用いて置換基の種類を推定する。

(b) 芳香族炭素

主として不完全プロトン照射スペクトルを利用して置換基数を決定する。置換基の種類は置換基自身や環炭素のシグナル解析により推定、置換位置はスペクトルパターンや加成則、プロトン非照射スペクトルの間接スピン結合などを利用して決める。

3) カルボニル炭素領域

カルボニル炭素の化学シフトは(アミド、エステル、カルボン酸)、(アルデヒド)及び(ケトン)の三つの群に分類でき、この順に低磁場シフトをしている。アルデヒドと他のカルボニル炭素の識別は、不完全プロトン照射スペクトルにより容易に行なえる。また、ケトンは182 ppmより低磁場側で共鳴し、これより高磁場側で共鳴するアミド、エステル及びカルボン酸と識別できる。アミド、エステル及びカルボン酸は化学シフト範囲が重なるので、カルボニル炭素の化学シフトのみでの識別は困難であるが、アミドでは $\overset{\delta}{C}-N\overset{\delta}{C}-O$ のシグナルが26~60 ppmに、エステルでは $\overset{\delta}{C}-O\overset{\delta}{C}-$ のシグナルが50~80 ppmにそれぞれ出現するので、このことを利用すればある程度の識別は可能である。

以上の知見を十分検討し、最も妥当な構造を組み立てる。

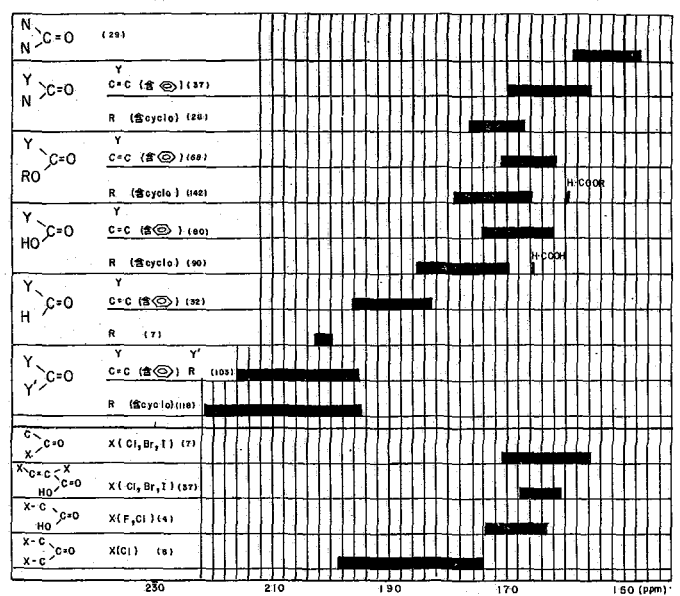


Fig. 3 ^{13}C -NMR chemical shifts of carbonyl carbons

文献1) 田中ら, 分析化学, 24, 484, 491, 553 (1975), 25, 592, 599 (1976)ほか

Identification of chemical structure in organic compounds using schemes of ^{13}C -NMR chemical shifts.

Kiyoshi MUSA^{*1}, Chikakiyo NAGATA^{*2}, Jun SAITO^{*3},
Shigeru HASHIMOTO^{*4}, Kenzoh KANOHTA^{*5}, Shozo TODA^{*6},
Shigeyuki TANAKA^{*7}.

(*¹Asahi Denka Co. Ltd., *²Department of Industrial Chemistry,
Shibaura Institute of Technology, *³Mitui Toatsu Chemicals, Inc.,
*⁴Lion Fats & Oil Co. Ltd., *⁵National Institute of Hygienic Science,
*⁶Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
University of Tokyo, *⁷Department of Industrial Chemistry,
Faculty of Engineering, University of Tokyo)

Recently, ^{13}C -NMR spectroscopy has been developed to a powerful analytical method for organic compounds as well as ^1H -NMR spectroscopy. The chemical shift of ^{13}C -NMR is one of the most important parameter to identify the various functional groups. As we reported previously, it is most convenient to use the figures of chemical shifts in order to analyse chemical structures rapidly.

In this paper, we have reedited those figures to thirteen and proposed a new system of structural analysis. The information used is chemical shifts, numbers of protons attached to the carbons (which is obtained by the off-resonance spectra), and signal intensities. The region of ^{13}C -NMR spectra can be divided into four—0~82ppm (SP^3 carbons), 82~160ppm (SP^2 carbons), 160~225ppm (Carbonyl carbons) and 65~100ppm (SP carbons). Then, the spectra obtained can be analysed by the corresponding figures.

(芝浦工大) ○永田親清・中山昌彦・長谷川隆
(東大工) 田中誠之

1) はじめに

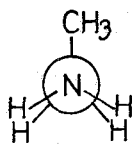
アミン類における α 位炭素の ^{15}N -NMR化学シフトは酸溶媒中では一般に高磁場シフトすること知られており、このことはアミノ基へのプロトン付加のためと考えられている。他方、カルボン酸におけるカルボキシル炭素及び α 位炭素の化学シフトは塩基溶媒中においては低磁場シフトするが、これはカルボキシル基のプロトン脱離のためと考えられている。このようにプロトンの付加及び脱離による ^{15}N 化学シフトの動向はアミノ酸の水溶液中でのpH変化による ^{15}N 化学シフト変化¹⁾とも関連して興味をもたれている。我々は、すなわち芳香族アミンのプロトン付加²⁾及び芳香族カルボン酸のプロトン脱離³⁾に関する ^{15}N 化学シフトの挙動について分子軌道法による電子密度の計算を行なって理論的解釈を試みてきた。今回は、脂肪族アミン及び脂肪族カルボン酸の α 位炭素が1級から4級までの化合物について、それぞれ ^{15}N 化学シフト変化を測定し、CND0/2 MO法による電子密度の計算を行なって、 ^{15}N 化学シフト変化と電子密度変化との関係について検討した。

2) 実験

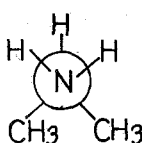
測定試料 測定に供した化合物は、脂肪族アミンとしてメチルアミン、エチルアミン、イソプロピルアミン及びtert-ブチルアミンの4種、脂肪族カルボン酸として酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸及びトリメチル酢酸の4種である。

^{15}N -NMRの測定 ^{15}N -NMRスペクトルはJEOL PFT/100型分光計及びPS-100型分光計を使用し、プロトン照射下、25.1 MHzで測定した。PFT法では29°Cで450~2084回の積算を行ない、CW法では24°Cで1~4回の積算を行なった。溶媒としてアミンについては D_2O 及び H_2SO_4 水溶液を使用し、2~10 mol%の濃度に調製、カルボン酸については DMSO 及び NaOH 水溶液を使用し、10~20 mol%の濃度に調製した。

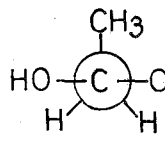
分子の座標計算 アミンについては中性分子、カチオン分子ともN原子が sp^3 混成をとるとして計算した。エチルアミン及びイソプロピルアミンでは、N-C間の回転に基づくコンホーメーションが考えられるが、それらのうち最もエネルギー的に安定と思われる構造を採用した。カルボン酸についてもプロピオン酸及びイソ酪酸では、考えられるコンホーメーションのうち、最も安定と思われる構造を採用して分子の座標計算を行なった(1~4)。



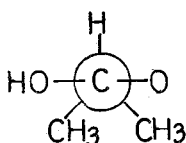
(1)



(2)



(3)



(4)

なかつちかさよ・なかやままさひこ・はせかわたかし・たなかしげゆき。

3) 結果及び考察

アミンのプロトン付加による ^{13}C シフト。脂肪族アミンの D_2O 溶液中の ^{13}C 化学シフト及びプロトン付加によるシフト変化を表1に示した。 $\text{C}-\alpha$ 炭素についてみると、メチルアミン(1級)及びエチルアミン(2級)では高磁場シフトするのに対して、イソプロピルアミン(3級)及びtert-ブチルアミン(4級)では逆に低磁場シフトし、特にtert-ブチルアミンの場合には約5 ppmと大きく低磁場シフトすることを知った。 $\text{C}-\beta$ 炭素では、エチルアミンからtert-ブチルアミンまで5~6 ppmの高磁場シフトがみられる。これらのシフト傾向はアニリンのプロトン付加における $\text{C}-1$ 炭素(アミノ基の結合した環炭素)の場合とは、その挙動が異なること知った。

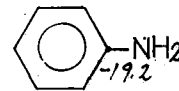
プロトン付加による電子密度の変化。プロトン付加による ^{13}C シフト変化と電子密度との関係を調べるために、各脂肪族アミンの中性分子及びプロトン付加したカチオン分子についてCNDO/2法による電子密度の計算を行なった。その結果を表2に示した。 $\text{C}-\alpha$ 炭素では、プロトン付加により電子密度は増加しており、アニリンの場合と同様な傾向であったこと知った。また、1級から4級になるにしたがって増加する割合が小さくなっている。以上のことから、脂肪族アミンでは芳香族アミンとはプロトン付加による ^{13}C シフトの挙動が異なり、電子密度のみでは説明できないこと知った。特にtert-ブチルアミン(4級)の大きな低磁場シフトはメチル基による立体的な込み合いのため、プロトン付加が起こり難いことなど、立体的効果を考慮する必要があると考えられる。

カルボン酸のプロトン脱離による ^{13}C シフト。脂肪族カルボン酸の DMSO 溶液及びプロトン脱離によるシフト変化を表3に示した。カルボキシル炭素をみると、すべてのカルボン酸において、約8~9 ppmの低磁場シフトがみられる。これは芳香族カルボン酸の場合とよく対応している。~~これは芳香族カルボン酸の場合とよく対応している。~~

Table 1 ^{13}C -NMR chemical shifts of amines and displacements of the ^{13}C shifts of amines due to protonation (in ppm)

Compds.	C - α	C - β
CH_3NH_2	27.9 -1.5	— —
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$	37.4 -0.9	19.0 -5.8
$(\text{CH}_3)_2\text{CHNH}_2$	43.9 +2.0	26.0 -4.7
$(\text{CH}_3)_3\text{CNH}_2$	48.3 +5.1	32.6 -5.1

The positive value denotes downfield shift.

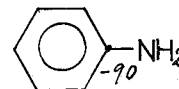


Displacement of the ^{13}C shift of C-1 of aniline.

Table 2 Total electron densities of amines and changes in charge densities ($\Delta Q \times 10^3$) of amines due to protonation calculated by CNDO/2 method.

Compds	C - α	C - β
CH_3NH_2	3.9231 -32.7	— —
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$	3.8992 -15.2	4.0290 -13.5
$(\text{CH}_3)_2\text{CHNH}_2$	3.8727 -14.2	4.0241 -18.6
$(\text{CH}_3)_3\text{CNH}_2$	3.8640 -6.0	4.0249 -14.6

The positive value is decreasing change in electron density.



Change in charge density ($\Delta Q \times 10^3$) at C-1 of aniline.

~~二酸の場合とよく対応している。~~ C- α 炭素では、2.2~3.5 ppmで酢酸(1級)からトリメチル酢酸(4級)まで同程度の依磁場シフトを示している。

プロトン脱離による電子密度の変化。プロトン脱離による δ シフト変化と電子密度との関連を調べるため、各脂肪酸カルボン酸の中性分子とカルボキシル基のプロトンが脱離したアニオン分子についてCNDO/2法による電子密度の計算を行なった。その結果を表4に示した。カルボキシル炭素では、すべてのカルボン酸において電子密度は増加している。C- α 炭素についてもゆがかなから増加しており、1級から4級炭素になるにしたがってその増加の割合が大きくなっている。これらのことは安息香酸におけるカルボキシル炭素及びC-1炭素(カルボキシル基の結合した環炭素)の場合と一致している。カルボン酸においては脂肪酸、芳香族共にその挙動が同じであり、したがって脂肪酸カルボン酸においても δ シフト変化を支配するのは電子密度の挙動ではなく、帯磁性項に寄与する他の効果及び電場効果などを考慮する必要があると考えられる。

以上のように、脂肪酸アミンが脂肪酸カルボン酸の場合とその挙動が異なるのは、プロトン付加がイソプロピルアミン及びtert-ブチルアミンではメチル基の立体的効果により妨害されるためと考えられる。

PFT-NMRの測定をして戴いた国立がんセンター研究所、宮田栄一氏に感謝します。

文献. 1) たとえば, W. F. Reynolds

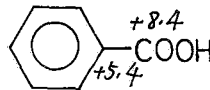
et al, Can. J. Chem., 51, 1857 (1972)など.

2) 永田親清, 浜田 修, 田中誠之, 日化誌, 1976, 1029.

3) 永田親清, 長谷川隆, 田中誠之, 日化誌, 1977, 1087.

Table 3 ^{13}C -NMR chemical shifts of carboxylic acids and displacements of ^{13}C shifts of carboxylic acids due to dissociation

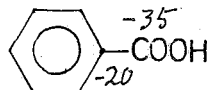
Compds.	CO	C- α	C- β
CH_3COOH	173.3 +8.9	22.4 +2.8	— —
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	176.5 +8.6	28.5 +3.5	10.6 +1.1
$(\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH}$	179.2 +8.2	34.7 +3.5	20.3 +1.2
$(\text{CH}_3)_3\text{CCOOH}$	180.8 +8.7	39.1 +2.2	28.6 +1.2



Displacements of ^{13}C shifts of benzoic acid.

Table 4 Total electron densities of carboxylic acids and changes in charge densities ($4Q \times 10^3$) of carboxylic acids due to dissociation calculated by CNDO/2 method.

Compds.	CO	C- α	C- β
CH_3COOH	3.6066 -62.5	4.0861 -6.4	— —
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	3.6124 -56.7	4.0471 -17.0	4.0020 +18.4
$(\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH}$	3.6103 -52.7	4.0080 -29.7	3.9976 +14.6
$(\text{CH}_3)_3\text{CCOOH}$	3.6137 -48.9	3.9893 -31.5	4.0002 +16.8



Changes in charge densities ($4Q \times 10^3$) of benzoic acid.

¹³C-NMR CHEMICAL SHIFTS OF SOME ALIPHATIC AMINES
AND CARBOXYLIC ACIDS

Chikakiyo NAGATA, Masahiko NAKAYAMA, Takashi HASEGAWA
and Shigeyuki TANAKA*

Department of Industrial Chemistry, Shibaura Institute
of Technology; Minato-ku, Tokyo 108

*Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,
University of Tokyo; Bunkyo-ku, Tokyo 113

¹³C-NMR spectra of some aliphatic amines and carboxylic acids were measured not only in neutral solvents but also in H₂SO₄ and NaOH aqueous solutions, respectively.

The ¹³C chemical shifts of the α-carbons of methyl- and ethylamines by protonation to amino group showed upfield shift by 1.5 and 0.9ppm, respectively, whereas the chemical shifts of the carbons of iso-propyl- and tert-butylamines exhibited downfield shift and the shift for tert-butylamine was especially large(5.1ppm). Due to dissociation, the ¹³C chemical shifts of the carboxyl and α-carbons of the carboxylic acids moved downfield by about 8~9ppm and 2.0~3.5ppm, respectively.

In order to analyze the cause of the ¹³C chemical shifts theoretically, electron densities for the neutral molecules and these monocations or monoanions were calculated by the CNDO/2 MO method. The ¹³C induced-shifts and the changes in electron densities due to the dissociation in carboxylic acids were similar to those of benzoic acid. On the other hand, for the amines, especially for iso-propyl- and tert-butylamines the behaviors of the ¹³C shift and the electron density due to protonation were different from those of aniline. These characteristic behaviors in the aliphatic amines are supposed to be caused by the steric effect of methyl groups.

第 3 日

11 月 16 日 (水)

(理 研) ○ 鷗 沢 洵、浦本昌和、竹内節男

1. はじめに

演者らは ^{13}C -NMR 測定の新しい手法として long-range selective proton decoupling (LSPD) と selective ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE について、すでに本会で報告した。¹⁾ これらの技術は ^1H 照射パワーを通常の場合より著しく下げて測定するところに特徴があり、4 級炭素の帰属が確実に行えること、2~3 bond はなれた炭素核と水素核の関係がわかること、 ^1H - ^1H 間 NOE では全く不可能な 4 級炭素と ^1H 核の関係がわかる等の利点がある。²⁾

最近、超電導磁石による 68 MHz (^{13}C) の装置を使って LSPD を行ったり、³⁾ Frequency Synthesizer を別にして gated noise decoupling と併用して LSPD を行う手法が報告された。⁴⁾ これらは低電力照射時特有の selective population inversion (SPI) をさけるためと ^1H 照射の選択性を良くするためである。一般の 100 MHz の装置を使って LSPD や selective ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE を行う場合には利用できる範囲は限られる。

今回、演者らはこれらの手法をヌクレオシド類に適用し、構造解析上の可能性について検討した。ヌクレオシド・ベースの炭素原子はプリン核、ピリミジン核共に 4 級炭素も多く含み、 ^1H -NMR から得られる情報は少ないが、LSPD を使えば、カルボニル基を含めて、4 級炭素周辺の情報を直接、正確に得ることができると考えた。いくつかの試料について実験した結果、構造に関する知見を得たので報告する。

2. 実験

FT-NMR 装置は JNM-FX-100 に low power irradiation unit を接続させ、auto-stacking program で動作させた。低電力照射にとって照射パワーの強度は重要であるが、本実験では Pachler の式によりこう正した値で表示した。⁵⁾

3. ^1H 低電力照射の技術

^{13}C -NMR を観測するとき、 ^1H 照射パワーを通常の場合より著しく弱くすると次の 3 つの現象があらわれる。第 1 に LSPD である。この方法では 4 級炭素の帰属を確実に行えるばかりでなく、照射パワーが弱いと、他の long-range coupling constant の情報を失わない。そのため、2~3 bond はなれた H-C 間の情報や立体的な情報も得ることができる。第 2 に selective population inversion (SPI) または selective population transfer (SPT) とよばれる手法であり、 ^1H を弱く照射する場合の研究としては最も多い。⁶⁾ これは coupling constant の符号の決定や signal の帰属に使われる。第 3 に selective ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE である。演者らは ^1H - ^1H 間の NOE と同様に C-H 間の立体的な情報を得るための実験を行ってきたが、ほぼ結論に達し、現在 OMR 誌に投稿中である。以上 3 つの手法を照射パワーについてまとめると次の表となる。

	H_2 (mgauss)	H_2 (Hz)	MODE
LSPD	2.5~3.5	10.5~15	CW
SPI	0.2~0.3	0.8~1.5	Gate
Sel. NOE	3.5~6	12~25	Gate or CW

Selective ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE は予想以上に強いパワーが必要であった。このため、 ^1H のシグナルが 1 ppm 以上はなれていないと、立体的に遠くても照射する ^1H のケミカルシフトに近い、立体的にも観測する ^{13}C 核に近い ^1H を同時に照射することに

なり NOE を生ずる。 ^1H - ^1H 間の NOE において、enhancement の加成則が見られたが、 ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE においては理論的に最大 2.98 までであることと ^1H -NMR では不可能な noise decoupling ができることから、より明瞭に観測される。

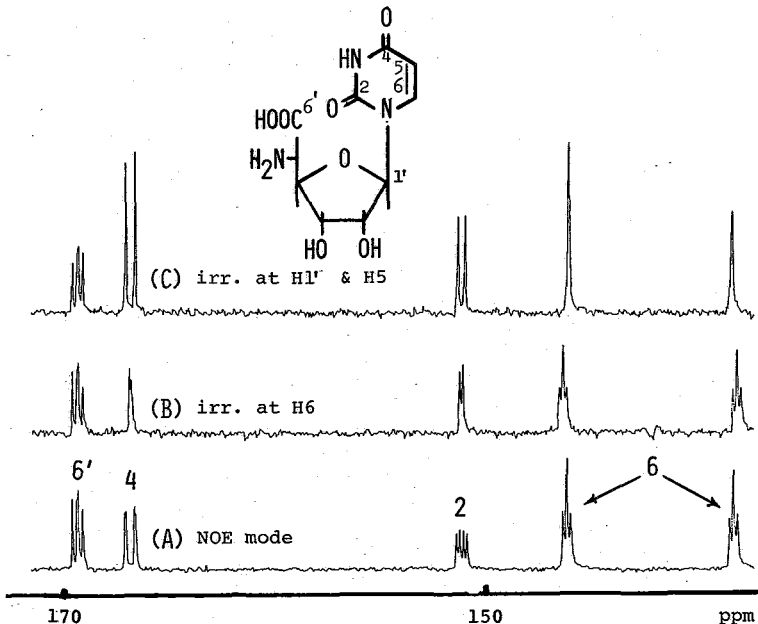
空間的に近い ^{13}C 核でも ^1H が直接結合していると NOE は観測されない。同様に、Br 核の結合した ^{13}C 核は Br 核とのスカラー相互作用により NOE は観測されない。

うざわ じゅん、うらもと まさかず、たけうち せつお

4. LSPD によるヌクレオシドの long-range coupling constant と構造について

第1図は、抗生物質ポリオキシン L の加水分解によって得られるヌクレオシド、ウラシルポリオキシン C (IV) の ^{13}C -NMR スペクトルの低磁場部を拡大したものである。(A) は gated decoupled スペクトルで、高磁場側から C-6 (doublet)、C-2、C-4、C-6'、のシグナルと帰属される。(B) は LSPD によって H-6 をデカップルしたスペクトルで、C-2 が $^3J_{\text{C2-H1}} = 3.9 \text{ Hz}$ の doublet に、C-4 が $^2J_{\text{C4-H5}} = 1.4 \text{ Hz}$ の doublet に

FIG. 1 THE ^{13}C -NMR SPECTRA* OF URACIL POLYOXIN C (IV)



* The spectra were taken with a JEOL FX-100 spectrometer at 25.05 MHz. Measurement conditions were as follows; conc.; 60 mg/0.3ml D_2O solution added small amount of DCl ; numbers of pulse, 10,000; flip angle, 45° .

(C) は H-1' および H-5 をデカップルしたスペクトルで、この場合 H-1' と H-5 のケミカルシフトが非常に接近しているために、同時にデカップルされたものであるが C-2 は $^3J_{\text{C2-H6}} = 7.8 \text{ Hz}$ の doublet に、C-4 は $^3J_{\text{C4-H6}} = 10.7 \text{ Hz}$ の doublet に、さらに C-6 は $^1J_{\text{C6-H6}} = 180.1 \text{ Hz}$ の doublet に変化している。

この結果を検討すれば、容易にウラシル部分の構造は導かれる。特に C-2、C-4 のカルボニル基の、他の炭素に対する相関関係が直接明らかにされることは他の物理化学的手法では得られない、有力な構造推定上の情報となっている。

このようにして、いくつかのピリミジン・ヌクレオシドにおける

long-range coupling constant を調べた結果を表 1 に示す。この表から、いくつかの共通した結論が導かれる。すなわち、anomeric-H からの $^3J_{\text{CNCH}}$ はすべて 5 Hz 以下で、通常のピリミジン・ベースでは 3~4 Hz である。また、ピリミジン環内の炭素に対する水素との 2J 、 3J の関係は aromatic な 6 員環の系で知られている関係と同様で、 $^2J < ^3J$ であり、 $^2J < 5 \text{ Hz}$ 、 $^3J > 5 \text{ Hz}$ であることが明らかである。しかし、6-aza-uridine (III) の場合はピリミジン環の 6 位の炭素が窒素におきかわっていて、この関係が適用されない。すなわち、 $^2J_{\text{C4-H5}} = 9.3 \text{ Hz}$ と大きな値を与える。-N-N-の系が環内にあるためと思われるが、(VII) の化合物の場合にも同様の系があり、 $^2J_{\text{C5-H7}} = 9.7 \text{ Hz}$ と大きい値である。

同様に、プリン・ヌクレオシドの場合の結果を表 2 に示す。この場合も anomeric-H からの 3J は 5 Hz 以下であることがわかる。プリン環内における炭素間の long-range coupling constant に関しては、6 員環にお

TABLE 1. LONG-RANGE JCH VALUES^a OF PYRIMIDINE NUCLEOSIDES AND THE ANALOGUES.

		(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)
C2	H1'	2.1	2.9	≈1	3.9	3.4
	H6	7.9	8.3	---	7.8	8.3
C4	H5	≈1	---	9.3	1.4	---
	H6	10.3	7.8	---	10.7	9.8
	H7	---	---	---	---	3.9
C5	H6	≈1.5	2.4	---	1.9	1.0
	H7	---	---	---	---	3.9
C6	H1'	3.7	4.2	---	4.4 ^b	3.5
	H5	3.7	---	---	3.9 ^b	---
	H7	---	---	---	---	5.8
C7	H6	---	---	---	---	4.4

a), The spectra were taken in D_2O added small amount of DCl with a JEOL FX-100 FT nmr spectrometer at 25.05 MHz. Measurement conditions were as follows: spectral width, 4000 Hz; data points, 8000. An experimental error is within $\pm 0.3 \text{ Hz}$.

b), The values may be interchanged.

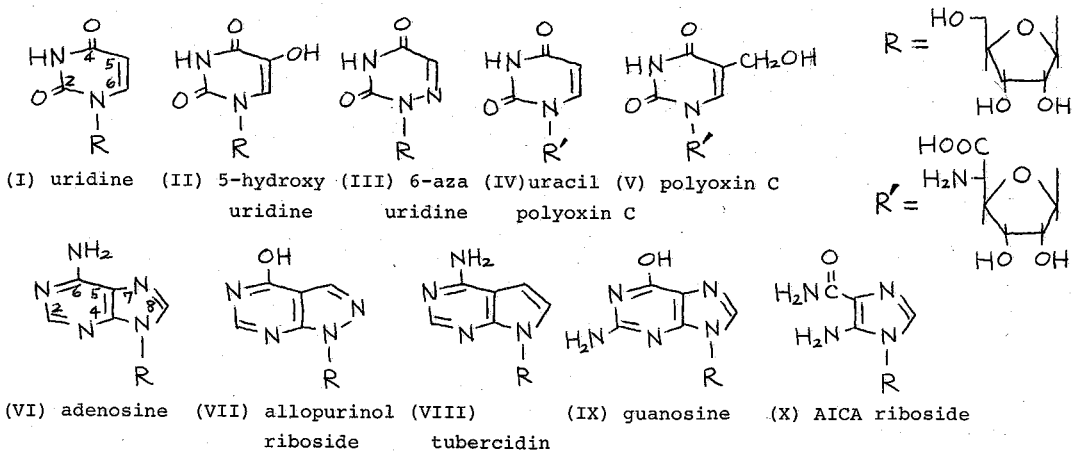


TABLE 2. LONG-RANGE JCH VALUES^a OF PURINE NUCLEOSIDES AND THE ANALOGUES.

		(VI)	(VII)	(VIII)	(IX)	(X) ^b
C4	H1'	2.9	1.5	2.9	2.2	2.4
	H2	12.8	13.6	12.1	---	---
	H7	---	3.9	7.7	---	---
	H8	5.5	---	5.1	6.6	5.8
C5	H7	---	9.7	8.4	---	---
	H8	11.7	---	4.0	7.0	5.8
C6	H2	7.7	6.8	7.3	---	---
	H7	---	<1	<1	---	---
C7	H8	---	---	6.6	---	---
C8	H1'	3.8	---	4.4	3.7	3.4
	H7	---	---	7.0	---	---

- a), The conditions in FT measurement were the same as shown in Table 1.
 b), The numbering of compound (X) was made according to that of five membered ring of purine nucleus in order to compare the J values. Actually, C4, C5 and C8 in Table 2 should be C5, C4 and C2, respectively.

ける $^3J_{\text{GNCH}}$ はすべて6 Hz以上の大きな値を示している。特に、 $^3J_{\text{C4-H2}}$ が12 Hz以上の値を有することが特徴的である。しかし、5員環部分の long-range coupling constant に関しては複雑な結果が得られた。

たとえば、(VI) における $^3J_{\text{C5-H8}}$ は11.7 Hzであるが (VIII) では $^3J_{\text{C5-H8}}$ は4.0 Hzと小さい値を与える。また、(VII)、(VIII) における $^3J_{\text{C6-H7}}$ 1 Hzであるが、 $^2J_{\text{C8-H7}} = 7.0$ Hzを示している。

5. むすび

以上の結果からわかるように、LSPD による知見を用いれば、天然からしばしば得られる異常塩基を有するヌクレオシドの構造決定に、直接的な情報を得ることができるであろう。また、核酸化学においても、たとえば、反応生成物のN-グリコシル化の位置、あるいは置換基導入部位などは容易に判定できる。

さらに、別に Frequency Synthesizer をつけ加え、3重共鳴についても検討中である。

6. 謝辞

tubercidin を御供与下さいました安斎謙太郎博士(理研)、polyoxin C を御供与下さいました磯野清博士(理研)に厚く感謝致します。また、本研究を推進するにあたり、終始御協力下さいました日本電子(株)の方々には感謝致します。

文献

- 1) 鶴沢、竹内、第15回NMR討論会 P-1-1 (1976)
- 2) S. Takeuchi et al., Tetra. Letters, 2943 (1977); K. Isono et al., FEBS Letters, 80, 53 (1977); K. Sakata et al., Org. Mag. Res., in press; J. Uzawa et al., Org. Mag. Res., to be published
- 3) K. Bock et al., Acta Chemica Scandinavia B 31 (1977) 354-358
- 4) K. Bock et al., J. Mag. Res., 25, 227 (1977)
- 5) K. G. B. Pachler, ibid, 7, 442 (1972)
- 6) H. J. Jakobson et al., ibid, 26, 183 (1977); A. A. Chalmers et al., Org. Mag. Res., 6, 445 (1974)
- 7) J. H. Noggle and R. E. Schirmer, The Nuclear Overhauser Effect, p-51, Academic Press, 1971

The Application of Low Power ^1H Irradiation Techniques in ^{13}C -NMR Spectroscopy to the Structural Analysis of Organic Molecules.

Jun Uzawa, Masakazu Uramoto and Setsuo Takeuchi
(Institute of Physical and Chemical Research)

We have previously reported long-range selective proton decoupling (LSPD) and selective ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE as new ^{13}C -nmr techniques.²⁾ The methods are characteristic of low power ^1H irradiation and are useful for the reliable assignments of quarternary carbon atoms which cannot be examined by ^1H - $\{^1\text{H}\}$ NOE and carbon atoms with two or three bond couplings to protons. For the purpose, a modification of a instrument has been made by replacing its terminal irradiation amplifier by a precision attenuator. The good results of the previous ^{13}C -nmr studies on citraconic anhydride and pentalenolactone by the techniques using the modified instrument suggested the applicability of the methods to structural elucidation of organic compounds.²⁾

Present report is concerned with the further extended studies on the structural analysis of some nucleosides and the analogues by the methods described above. Since nucleoside bases, purine and pyrimidine, have several quarternary carbons, only few informations can be obtained from ^1H -nmr spectra. On the other hand, the technique of LSPD in ^{13}C -nmr spectroscopy afforded the direct and accurate structural informations of the nucleoside bases for the quarternary carbons by the observation of long-range couplings.

In the purine and pyrimidine nucleosides, long-range coupling constants through C-N bond from anomeric proton ($^3J_{\text{CNCH}}$) were less than 5Hz. In pyrimidine nucleus 3J gave larger values than 2J ($^2J < 5\text{Hz}$ and $^3J > 5\text{Hz}$). In purine nucleus 3J values in the 6 membered ring system showed more than 6Hz. Especially, $^3J_{\text{C4-H2}}$ exhibited characteristic large coupling constants (more than 12Hz). However, in the 5 membered ring system of purine nucleus, the coupling constants did not show clear relationship between J values and the structures.

The ^{13}C -nmr techniques applied here may serve to extend further applicability for the structural elucidation of naturally occurring abnormal nucleosides and in the nucleic acid chemistry.

(東工試) ○山本 修, 柳沢 勝

我々は本年の日本化学会春季年会において、プロモタン類(臭化メチルは除く)の ¹³C 緩和曲線が nonexponential な挙動を示すこと、そしてその原因は Br の 2 種の異性体 ⁷⁹Br と ⁸¹Br とが略々等量で存在し、これらのプロモタン類においては、¹³C 緩和機構の大部分は ¹³C-Br 間のスカラー相互作用によることを示した。さらにこのように non-exponential な緩和曲線を解析することによって J_{C-Br} の値を求めたことから (1) 今回は臭化メチルについて同様の解析を試み、臭化メチルの場合には J_{C-Br} が他のプロモタンに比べて小さいために、スカラー緩和機構の寄与が小さく、またメチル基の回転に基づくスピン回転相互作用による緩和時間への寄与が大きいため、特殊な取り扱いは必要とした。

試料中には CD₃Br (MSD カナダ社) を用い、高真空系により 8mm 中の T₁ 測定用試料管に封入した。この試料は室温では気体 (b.p. = +4.5°C) であるが、試料管中に封入すると液体状態を保ち、室温まではそのまま測定が可能である。¹³C 緩和時間の測定は 25MHz (XL-100-15) と 15MHz (NV-14) で、^{2D} 緩和時間の測定は 15MHz (XL-100-15) により、180°-τ-90° のパルス法により行なわれた。non-exponential な緩和曲線、夫々の exponential 曲線への分離は非線形最小二乗法により行なわれた。¹³C に対する測定の際 25MHz においては ^{2D} のパルス法を行なうが、15MHz ではこれを省いた。

As shown in the previous paper,¹⁾ the ¹³C relaxation curve for a bromomethane with n substituted bromine atoms is given by

$$2 \left[\frac{I(\infty) - I(t)}{2I(\infty)} \right]^{1/n} = \exp(-t/T_1^S) + \exp(-t/T_1^L) \quad (1)$$

with $1/T_1^S = 1/T_1^0 + 1/T_1^{79}$ and $1/T_1^L = 1/T_1^0 + 1/T_1^{81}$

where T_1^{79} and T_1^{81} are the scalar relaxation times of ¹³C bonded to a ⁷⁹Br and a ⁸¹Br, respectively, and T_1^0 is the relaxation time of other sources. The scalar coupling constant between ¹³C and ^kBr (k = 79 or 81), A_k (= 2πJ_k), can be obtained by solving the following set of equations.

$$1/T_1^k = \frac{2}{3} A_k^2 S(S+1) \frac{T_k}{1 + \Delta\omega_k^2 T_k^2} \quad (2)$$

in which T_k is the relaxation time of ^kBr, $\Delta\omega_k = \omega_C - \omega_{kBr}$, and S is the spin of bromine (3/2).

T₁⁰ の中には C-D 間の双極子相互作用の寄与 (T_{1C⁰}), C-Br 間の双極子相互作用の寄与 (T_{1C^{0Br}}), スピン回転相互作用の寄与 (T_{1C^{0R}}), 分子間の双極子相互作用の寄与 (T_{1C^{inter}}) が含まれる。この中で T_{1C⁰} は ^{2D} の緩和時間の測定と合わせ、(e²Qq) の値を用いて計

算もよおす。 予稿をよめよ

算でき、また T_{IC}^{CDR} を (2)式から T_k が求められ k_{Br} の ($z=Qq$) の値から計算できる。但し両者共非常に小さい筈しかし無い。 T_{IC}^{inter} の寄与は非常に小さいものと見ておける。問題は T_{IC}^{SR} であって、 CD_3Br の場合室温で 40秒程度に過ぎないため、最終的に得られる J_{CDR} の値に大きな影響を及ぼすことが予想される。そこで T_{IC}^{SR} を更詳細な測定を避けるために次の二つの方法を用いた。

(1) 同じ温度において 15MHz と 25MHz との両方で測定を行なう。そのうち (2)式に相当する 4個の式を得られ、未知数は 3個 (A_{Jg} , T_{Jg} , T_{I0}) であるから、適当な精度で J_{Jg} が決定される。 (A_{Jg} , T_{Jg} は A_{Jg} , T_{Jg} から計算が出来る)。

(2) 2D の緩和時間を測定し、これを基にして McClung の extended diffusion theory⁽²⁾ を適用し、J-又は M-diffusion モデルを仮定して $T_0^{(2,0)}$ を求める。これから T_{Jg} または T_{Mg} を計算し (2)式から $A_k (=2\pi J_k)$ を求める。この方法は diffusion モデルの仮定が入り、測定のみから J_k を求めるという欠点があるが、使用した 15MHz の測定装置に D-デカップリングの標稱があるために測定に非常に長時間 (あるいは一つの温度での測定に数日必要) がかかるため、次善の策としてこの方法を用いた。その結果を次表にまとめる。

TABLE I

Temp (°C)	29.8 (15 MHz)	(25 MHz)	15.4	-0.5	-18.8	-40.8	-50.4	-60.6	-70.9
T_{IC}^S (sec)	5.85	6.64	7.60	8.88	9.39	12.2	14.0	14.2	16.2
T_{IC}^R (sec)	34.0	36.9	39.1	41.0	45.3	50.4	52.9	54.2	56.4
T_{ID} (sec)	7.79		7.24	6.42	5.51	4.43	3.97	3.50	3.04
(J-diffusion model assumed)									
J_{Jg} (Hertz)	41	41	40	38	40	38	37	39	39
T_{IC}^{SR} (sec)	40	41	44	47	55	66	73	81	93
(M-diffusion model assumed)									
J_{Jg} (Hertz)	51	48	47	46	49	48	48	51	53
T_{IC}^{SR} (sec)	47	43	47	51	63	83	98	131	195

以上の結果から J-diffusion モデルを仮定した場合に平均として $39 \pm 2 Hz$, M-diffusion モデルを仮定した場合に $49 \pm 4 Hz$ が得られ、どちらの方向より妥当であるかは不明で決定できない。

一 (1) の方法で 15MHz と 25MHz とでの測定結果から T_{Jg} と T_{I0} を求めておくことに致すようにして J_{Jg} を決定すると $J_{Jg} = 41.5 Hz$ が得られ、この時の T_{Jg} の値から J-diffusion モデルに非常に近い $T_0^{(2,0)}$ の値が得られる。また CD_3Br に非常に近い値性モメントをもつ CD_3CN について、extended diffusion theory により J-または M-diffusion モデルのうちどれに従うかというテストが行なわれていた⁽³⁾。その結果は J-diffusion モデルの可能性が極めて大きいと報告されている。従って CD_3Br の場合にも J-diffusion モデルを仮定することゝ毎當であり、温度変化の結果と併せて CD_3Br における J_{Jg} は $40 \pm 3 Hz$ とすれば先と同様いはなりであろう。

J_{Jg} の値と他のプロトン類の値と共に置換した Br 原子の数に対して図 1 にプロット

し。参考のために J_{C-F} の値についても図2にプロットしてある。他のプロトメタンの J_{F-F} の値の比へ CD_3Br の J_{F-F} の値が小さいようにも感じられたが、一応は妥当な値ではないかと考えられた。(J_{C-F} と J_{F-F} の同じ傾向を示すため)。

TABLE II

Temp (°C)	T_{IC}^{SR} (J-diffusion) (sec)	T_{IC}^{SR} (M-diffusion) (sec)
29.8	271	87
15.4	310	100
-0.5	362	117
-18.8	440	143
-40.8	572	188
-50.4	650	214
-60.6	750	248
-70.9	875	291

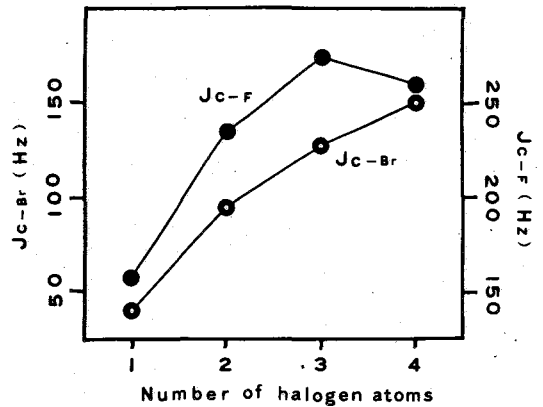


Fig. 1. $J(^{13}C-^{79}Br)$ and $J(^{13}C-^{19}F)$ in bromomethanes and fluoromethanes

次に J-又は M-diffusion モデルを

仮定して T_{IC}^{SR} を計算することにしてみた。計算には McClung の式⁽²⁾ を使用し、 CD_3Br のスピンの回転結合定数はメタンを基準とし、 CH_3Br の化学シフトの異方性 $-10 ppm$ を用いて定法により⁽⁴⁾ 見積りて得られた $C_x = C_y = -1 KHz$ 、 $C_z = -10 KHz$ を使用した。その結果を表 II にまとめた。 T_{IC}^{SR} の実測値(表 I 参照)は誤差が相当に大きく、また低温部の方では T_{IC}^{inter} の効果が含まれていないと考えられるが、表 I の実測値と表 II の計算値を比較すれば、J-および M-diffusion モデルのいずれも実測値を説明できることがわかる。しかしこのことは直ちに得られた J_{F-F} の値が妥当ではないということを意味しない。前記(1)の方法でも T_{IC}^{SR} は 29.8°C にあつて約 40 秒の値が得られ、(かも T_{IC}^{inter} の寄与が最も少ないと考えられるので、この T_{IC}^{SR} の値は略正しく思われる。この値を説明するために $C_x = C_y = -3 KHz$ 、 $C_z = -20 KHz$ が必要である。化学シフトからのスピンの回転結合定数の推定はかなりの粗い近似であるとしても、この値はとてま容認できる値である。さらに CD_3CN にあつて J-diffusion model に良く合ふことが報告されていると述べれば、 CD_3CN の T_{IC}^{SR} は室温にあつて約 30~40 秒であり、それを説明するために近似的な計算ではあるが $|C_x| = 4.5 KHz$ 、 $|C_z| = -39 KHz$ が必要ではないことが報告されている⁽⁵⁾。また CH_3I にあつても T_{IC}^{SR} は 20 秒程度という値がある。他方 T_{IC}^{SR} は他のプロトメタン類では一般に温度の低下と共に短くなる⁽²⁾が、 CD_3Br では長くなる。このことは $-50^\circ C \sim -70^\circ C$ 程度の低温にあつても SR の寄与がかなり大きいことを意味している。以上のことを総合すれば、McClung の式を含めて従来の T_{IC}^{SR} を支えた計算式は例としてベンゼンのような剛体分子にはよく適用できる⁽⁴⁾が、1種の内部回転(ていよ)をも思われる CD_3Br 、 CH_3I 、 CD_3CN のような分子のメチル基には適用できないのではないかとこのことを考へられた。これについては今後検討を行ないたい。

Spin-Spin Coupling Constant between Carbon-13 and Bromine in Methyl Bromide-d₃

Osamu Yamamoto and Masaru Yanagisawa

National Chemical Laboratory for Industry

The dominant relaxation mechanism of the ¹³C nucleus in bromomethanes is the scalar coupling interaction owing to the fact that the resonance frequency of ¹³C is close to that of bromine and that bromine has its relaxation mechanism by the quadrupole interaction. The ¹³C relaxation curves for bromomethanes show the non-exponential decay because of the presence of two bromine isotopes with the ratio of about 1:1. In a previous report,¹⁾ we have determined the spin-spin coupling constants between ¹³C and Br by analyzing the relaxation curves for CD₂Br₂, CDBr₃, and CBr₄. In the present work the coupling constant is obtained for CD₃Br. In this compound, unlike other bromomethanes, the spin-rotation interaction is expected to contribute appreciably to the ¹³C relaxation time (T_{1C}). Thus it is essential to estimate the SR relaxation time (T_{1C}^{SR}).

For determining the coupling constant as well as T_{1C}^{SR}, the following two procedures are carried out.

(1) The T_{1C} measurement is made at both 15 and 25 MHz at the same temperature, from which three unknown quantities, the coupling constant between ¹³C and ⁷⁹Br (J₇₉), the relaxation time of ⁷⁹Br (τ₇₉), and T_{1C}^{SR} are determined from four equations corresponding to eq. (2). At 29.8°C, the most probable value of J₇₉ is 41.4 Hz.

(2) According to McClung's extended diffusion theory,²⁾ the reorientational correlation time τ₀^(2,0) is determined from the ²D relaxation data assuming the J- or M-diffusion model. Then, from τ₀^(2,0), τ₇₉ is calculated, which is, in turn, used to give J₇₉ from eq. (2) obtained only at 25 MHz. The results obtained in this way at various temperatures are summarized in Table I. In average, we obtain J₇₉ = 39 ± 2 Hz when the J-diffusion model is assumed, and J₇₉ = 49 ± 4 Hz for the M-diffusion.

Comparing the results in (1) and (2), and considering the fact that the J-diffusion model is, in general, applicable to the molecular motion of similar molecules, e.g., CD₃CN,³⁾ we can conclude that the reasonable value of J₇₉ is 40 ± 3 Hz. J₇₉'s in bromomethanes obtained in the present and the previous works are plotted against the number of hydrogen atoms in Fig. 2, as well as the corresponding values for fluoromethanes as a comparison. As seen from the figure, the trend of the coupling constant is roughly similar for the two series of halomethanes.

There is a large discrepancy between T_{1C}^{SR} experimentally obtained (Table I) and those calculated by McClung's formula²⁾ (Table II). However this does not mean that the value of J₇₉ obtained in this work is not reasonable. In the calculation of T_{1C}^{SR}, the spin-rotational coupling constants of ¹³C in CD₃Br are estimated to be C_x = C_y = -1 KHz, and C_z = -10 KHz.⁴⁾ The spin-rotational coupling constants greater by a factor of 2 than these values are required to interpret the T_{1C}^{SR} at room temperature. Similar situations have been found in other molecules.⁵⁾ Further study of this problem is of interest.

1) O. Yamamoto and M. Yanagisawa, presented in the 36th annual meeting of the Chemical Society of Japan (April, 1977); J. Chem. Phys., 67 (1977) in press.

2) R. E. D. McClung, J. Chem. Phys., 57, 5478 (1972).

3) T. E. Bull, J. Chem. Phys., 62, 222 (1975).

4) For the method of estimation of the spin-rotational coupling constants, see Report No. 305 (E3) of this Text.

5) See, for example, E. von Goldammer, H. -D. Ludemann, and A. Müller, J. Chem. Phys., 60, 4590 (1974).

鎖状分子の ^{13}C 緩和 ^{13}C パルスFT NMRにおける
高分子モデル化合物の分岐測定の見直し

(昭和甲研) ○田中信義 榑引信男 南田泰憲

1 はじめに

直鎖状と言われるポリエチレンも使用上の物性を改良するために、少量の天重合成分を加えることがあり、従ってわずかながら分岐構造を帯びるものが多い。高密度ポリエチレンでは、主鎖の炭素数 1000 を対して、分岐構造の炭素数は数個と言われているが、その値を正しく求めることはかなり困難とされている。

^{13}C 核パルス・フーリエ変換 NMR によって、分岐の構造と、その炭素数を求めることは原理的に可能であるが、低分子化合物と比べて、その測定には次のような困難や問題がある。すなわち、1) スペクトルの S/N 比が小さい、2) 主鎖炭素のシグナルと分岐炭素シグナルのダイナミックレンジの大きさ、3) 主鎖炭素シグナル近傍の基線のよりエリの擾乱への影響、4) 分岐炭素の緩和時間が測定に難く、従ってパルス幅やパルス間隔の最適条件が次の難い、5) 核オーバーハウザー効果の擾乱への影響、6) 長時間の加熱換算中に溶質と溶媒とが相分離することがある、7) 磁場のインターナルロックを内部天存試料で行うと、高揮発の適当な試薬が乏しい、などである。

ポリエチレンの分岐構造について、 ^{13}C 核パルス・フーリエ変換 NMR による研究結果が、すでに多く報告¹⁾されているが、ここでは分岐のある低分子モデル化合物を用いて、スペクトルの S/N 比の改善、核オーバーハウザー効果の消去などを検討して考察し、ポリマーへの適用について考える。

2 実験

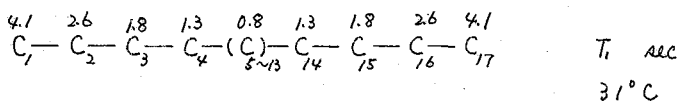
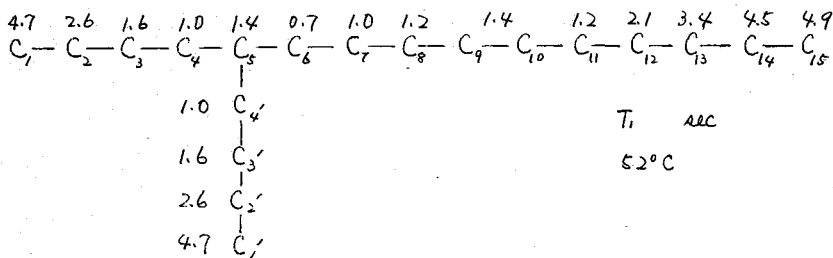
5-ブチルベンタテカンを凍結法で脱気して珪酸試料管に封じ、磁場のインターナルロック試薬としてニトロベンゼン- d_5 を入れた 10mm 径試料管に固定した。一部の試験は分岐のないモデル化合物として、 n -ペンタテカンを同様に行うて用いた。高分子試料は低密度および高密度ポリエチレンを 1, 2, 4-トリクロロベンゼンに溶解し、ベンゼン- d_6 と、化学シフト標準試料として少量のヘキサメチルジシロキサンを加えて脱気し、窒素を導入した後封着した。試料管は通常 10mm 径のもので、試料は必要に応じてあらかじめ安定剤を除いた。

装置は日本電子 FX-100 型、天鳴周波数は 25.05 MHz である。

天鳴周波数は、 ^{13}C 核の天鳴周波数、 ^{13}C 核の天鳴周波数

3 結果と考察

3.1 核緩和時間 5-ブチルベンゼンテカシ および n-ヘプタテカシの、プロトン雑音照射のもとで、 $180^\circ - 90^\circ$ パルス法により得られた ^{13}C 核の核緩和時間係数を示すのであつた。



また、ポリエチレンの T_1 は濃度 0.2g/ml 、温度 110°C で、試料により、主鎖で 1.1 乃至 2.2 秒、側鎖では 3 乃至 7 秒の間にあるが、正しく求めらるるに至つてゐない。

3.2 S/N 比と信号強度 静磁場の中で熱的平衡にある磁化 M_0 が、RF 照射を受ける状態とせられた後、Z 軸方向の磁化の回復は時刻 t によつて、

$$M(t) = M_0 [1 - (1 - \cos \alpha) \cdot \exp(-t/T_1)] \quad 1)$$

であらわされる。 α は RF パルスにより回転した磁化ベクトルの角度である。 $t = T$ で RF パルスがくり返して印加されると、磁化はある平衡状態に達する。 T によつて、上記モデル化合物の最大の核緩和時間 $T_{\text{max}} < T/5$ ならば、磁化の回復は測定誤差の範囲程度までなされている。ところで、受信コイルに誘起される信号強度 $S(t)$ は、 n 回の RF パルス印加直後

$$S(t)_n = \sum_1^n (M_{xy})_i \quad 2)$$

であらわされる。 K かつ M_{xy} は回転座標系における横磁化である。ここで、 $S(t)_n$ は α と T とに依存し、 xy 平面における最大の磁化を生ずる α の最適値 α_{opt} は

$$\alpha_{\text{opt}} = \arccos \frac{E_1 + E_2 (\cos \theta - E_2) / (1 - E_2 \cos \theta)}{1 + E_1 E_2 (\cos \theta - E_2) / (1 - E_2 \cos \theta)} \quad 3)$$

であらわされること $E_{\text{max}} t$ により示されている。ここで E_1 は時間 T の間 K 回転する磁化の角度、 $E_1 = \exp(-T/T_1)$ 、 $E_2 = \exp(-T/T_2)$ である。

図 1 の曲線 a) は 5-ブチルベンゼンテカシのメチル基信号を 52 回積算し

大と小の S/N 比と、パルスくり返し時間 T との關係で、 α_{opt} のもとで求めた。ここで、複線化時間は フーリエ変換スペクトルのウィンド波形処理を1分のときの半値幅と、プロトン照射のもとで求めた回転系の T₂ 緩和時間 T₂ とから、見かけの値を見つけて用いた。すなわち、観測する信号が共振周波数の直交位置にあり、オフセット周波数を小さくした。

S/N 比の改善効果は $T > 4T_1$, $\alpha > 70^\circ$ で著しい。図1の曲線 b) は S/N 比が単位時間改善される値を示し、このとき、パルス間隔は $T \leq T_1$, $\alpha \leq 40^\circ$ であることが判明した。この場合は T₁ の異なる信号について、スペクトル強度のむらを生じたり、互いの大きなカルボニル基炭素や、二重結合炭素は高分子試料では観測されないことがある。

FID の計算機への取り込め時間は、FID の取扱既定数に依りて設定し、不要な雑音成分のフーリエ変換を避けることでも S/N 比は向上する。高分子試料では溶媒の下加減のことが多く、溶媒の信号を除外すると、グライムック・レンジの制約を緩和できる点でも好ましい。周波数帯域フィルタの設定、ウィンド波形処理既定数の最適化なども合わせて考慮すると、通常行われている演算時間の短縮、S/N 比の向上ははかりなくなる。ポリエチレン分岐炭素の検出は S/N 比が 5 まで十分であるが、その定量にはいくとも S/N 比は 30 以上のスペクトルが必要と言えよう。

3.3 基線のうねり 巨大な信号の近くの微小信号を、Y 軸の利得を大きくして記録すると、基線が平坦にならないことがある。電位シム補正の不十分さ、磁場ロッキング回路と観測信号系との干渉、スピニング・エコー、複算では消去できない同相雑音、

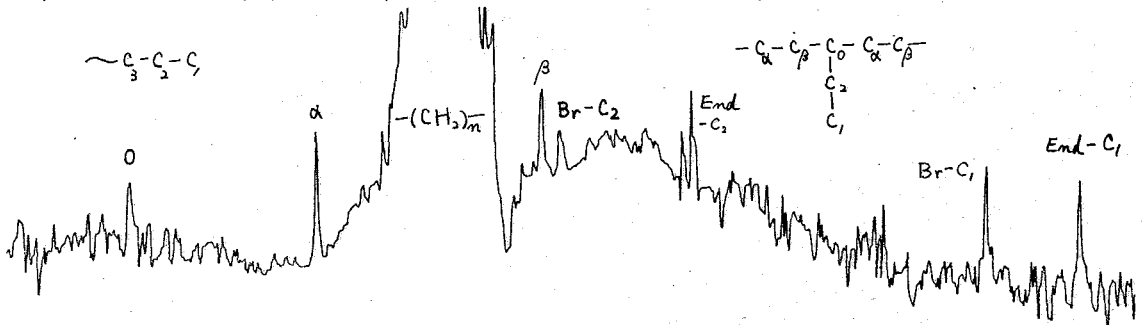


Fig. 2. A spectrum of polyethylene with distorted base line.

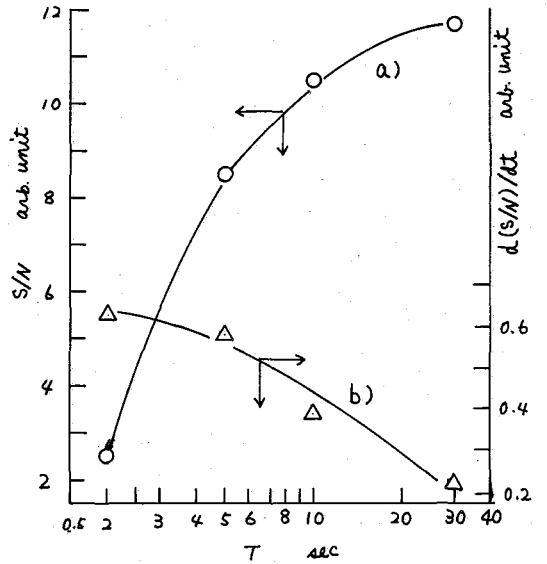


Fig. 1. Improvement of S/N ratio
 a) S/N vs. pulse repetition times.
 b) S/N improvement per unit time vs. pulse repetition times.

パルス間隔が $T \leq T_2'$ であるとその u -モード成分の混入, FIDの最初のA/D変換ポイントが正確でない, 共鳴周波数のオフセット, などが基線変動の原因になる。

図2は基線がうねりを生じたノリエケレン複算スペクトルの一例である。しかし、測定条件の適正化によって、フーリエ変換後の位相補正がほとんど必要でない程度に基線の平坦化ができる。

3.4 分岐炭素数の定量 前項まで述べた、測定上の条件を適正化し、プロトン雑音照射のもとで52回の複算を行い、炭素数の比と信号の高さから求めた。5-ブチルペンタデカンではおのれの炭素内で1.4至1.3%, n -ヘプタデカンでは C_1, C_2, C_3, C_4 の信号がそれぞれ2%, C_1 が約3%、メチレン連鎖 C_{5-13} がそれぞれ12%の誤差でそれぞれ一致した。

(しかし、ノリエケレンでは主鎖および分岐構造の ^{13}C 核および水素核のおのれの T_1 の違いが核オーバーハウザー効果、エンハンスメント・ファクターを変え、信号強度を変化させる。よって、これらの T_1 を正しく求めてエンハンスメント・ファクター補正による強度算出を行う必要がある。プロトン雑音照射を、FIDの計算機への取り込めし時間に行き、ゲーテッド・デカップリングの方法は、 S/N 比を低下させるために複算回数の着目の増加を要し、かつ、核オーバーハウザー効果の十分な消去が困難である。

- 1) Kとえは
F.A. Bovey, Structural Studies of Macromolecules
by Spectroscopic Methods. p181. John Wiley and Sons,
London (1976).

高分討論会予稿集 (1976). 竹田, 血藤, 三田, 藤利,
ibid., (1976). 加藤, 佐藤, 鈴木,

- 2) R.R. Ernst and W.A. Anderson, Rev. Sci. Instr., 37, 93 (1966).

Longitudinal Relaxation in Chain Molecules. V. Choice of
Experimental Condition for Accurate Analysis of Polyethylene in Pulsed
FT NMR Spectroscopy.

Nobuyoshi TANAKA, Nobuo KUSHIBIKI, and Yasunori HIRAKIDA
Central Research Lab. Showa Denko K.K. 24-60 2-Chome Tamagawa
Ohta-ku Tokyo

Optimum condition of C-13 NMR measurements for the detection of branches and the quantitative determination of branches are discussed by using n -heptadecane and 5-butyl pentadecane. Optimum conditions are also discussed with respect to polyethylene. The gated decoupling method is less accurate in the quantitative analysis than NOE enhancement obtained from relaxation times. The S/N ratio and phase anomaly are improved under the attentive consideration of flip angle, pulse delay times, frequency offset, pulse interval, etc.

出光興産中研 佐藤和夫

1 序論

水素結合形成による溶液中の分子間会合、分子運動性に関する知見は、熱力学的手段、種々の分光学的方法によって検討されている。NMRの緩和時間 T_1 , T_2 および拡散係数は局所的な分子レベルでの運動に関する情報を与えるという利点があり数年来積極的研究が行われている。本研究では、水-ジメチルスルホキシド(DMSO)、およびクロロホルム-アロトノ受溶性溶媒、アセトン、ベンゼン、DMSOの混合系において T_1 , T_2 、自己拡散係数 D_s を測定することによって分子間会合を検討した。これらの系は従来種々の方法で検討されているものであるが、どのような会合系を形成するか、あるいは会合体はどのような動的挙動をするかという点に制限がある。

2 実験

用いた装置はブルッカーp-20 (H:20MHz) パルスNMRスペクトロメータであり、測定はすべて25°Cで行った。測定の詳細に関しては講演C-12で述べた。水-DMSOの系において、水の T_1 , T_2 , D_s を測定する場合には水-DMSO- d_6 系を用い、DMSOの測定を行う場合には D_2O -DMSO- d_6 系を用いた。クロロホルム溶液についても同様である。

3 結果と考察

3-1 水-DMSO溶液

fig. 1 に水およびDMSOの D_s の組成依存性を示す。水の分率 $f_w=0.5$ における値はJamesの結果と一致する。図から明らかになるように $f_w \approx 0.6$ に D_s の極小が存在する。

以下に示す T_1 および回転拡散の結果からも明らかであるが、このことは水とDMSOが2:1の会合体を形成し、ほぼ会合体全体として運動していることを示すものである。2:1の会合体形成はラマンおよびESRセンサー法などで得られている。

ここで会合体の特性について考察したい。観測される拡散係数は、freeな成分の D_{sf} と会合した成分の D_{sb} の和として次式のように表わせる。

さとうかすお

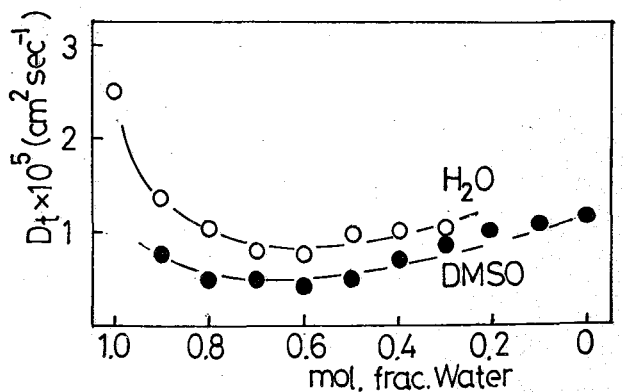


fig. 1 Self-diffusion constants of water and DMSO in binary mixtures.

$$D_t^w = x_f^w D_{ef}^w + (1 - x_f^w) D_{eb}^w \quad (1)$$

$$D_t^p = x_f^p D_{ef}^p + (1 - x_f^p) D_{eb}^p \quad (2)$$

x_f は free な成分の分率で、W, D はそれぞれ水と DMSO を表わす。なお x_f^w は total の分子に対する free な水分子の分率であり、 x_f^p も同様。ここで $D_{eb}^w = D_{eb}^p$ であり、2:1 の会合体を形成することから $x_f^p = x_f^w = 1/2$ が成立する ($f_w \approx 0.6$ において)。 D_{ef}^w, D_{ef}^p は純液体のものと同様であると仮定すると、それぞれ $2.51 \times 10^{-5}, 1.15 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ である。図から $D_t^w = 0.75 \times 10^{-5}, D_t^p = 0.45 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ であるから (1), (2) を解くことにより、 $x_f^w = 0.17, D_{eb}^w (= D_{eb}^p = D_{eb}^w) = 0.38 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ を得ることかできる。つまり 10 個の水分子のうち 8 分子が 4 分子の DMSO と会合体を形成しており、会合体は $0.38 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ の拡散係数を有することになる。

図 2 に T_1 の組成依存性を示す。D_t の場合と同様に $f_w \approx 0.6$ に T_1^{-1} の極大がみられる。同様な緩和時間の結果は Tokuhira によっても得られている。 $(T_1)_{intra}$ は次式を用いて計算した。つまり D_t の値から $(T_1)_{inter}$ を求め $(T_1)_{obs}$ から $(T_1)_{intra}$ を求めた。

$$\begin{aligned} (T_1^{-1})_{obs} &= (T_1^{-1})_{intra} + (T_1^{-1})_{inter} \\ &= \frac{3}{2} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \tau_c + \frac{N \gamma^4 \hbar^2 \pi}{5 a D_t} \left[1 + a^2 33 \left(\frac{b}{a} \right)^2 + 0.15 \left(\frac{b}{a} \right)^4 + \dots \right] \quad (3) \end{aligned}$$

ここで r (1.52 Å), a (1.74 Å), b (0.92 Å) はそれぞれプロトン間距離、分子半径および中心からプロトンまでの距離である。N はスピンの密度を表わし、その他は通常の量を表わす。

$(T_1)_{intra}$ から回転の相関時間 τ_c , さらに回転拡散係数 D_r ($\tau_c = 1/6 D_r$) を求めることができる。図 3 は、水と DMSO を混合することによる

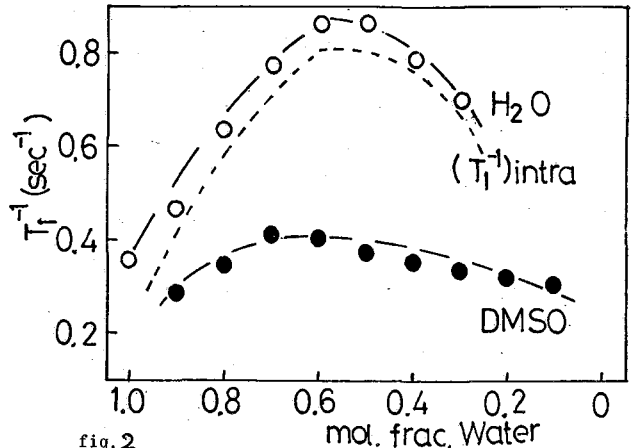


fig. 2 Spin-lattice relaxation rates of water and DMSO protons. $(T_1)_{intra}$ of water protons was calculated from T_1 and D_t^w using eq. (3).

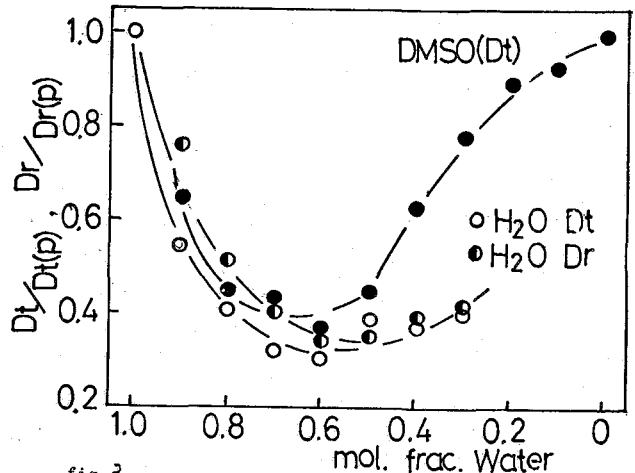


fig. 3 Ratios of diffusion constants. D_r, D_t represent rotational and self-diffusion constants of water-DMSO binary mixtures. $D_r(p), D_t(p)$, diffusion constants of pure liquids.

て並進および回転拡散係数などの程度低下することを組成に対して図示したものである。図から明らかになるようにこれらの運動も同程度の低下を受けることが理解できる。すなわち水とDMSO間の2:1の会合体は全等として運動し、会合体分子とfreeな分子間の交換速度は回転($\tau_c \approx 10^{-11} \sim 10^{-12} \text{ sec}^{-1}$)および並進の相関時間($\tau_t \approx 10^{-10} \sim 10^{-11} \text{ sec}^{-1}$) (観測時間)にくらべて充分にあつたと言えよう。

3-2 クロロホルム溶液

以前我々は同一の系において、クロロホルムの T_1 を測定し、DMSOおよびアセトン溶液では T_1 (および τ_c)がこれらの溶媒の存在によって低下する。つまりクロロホルムの並進運動が束縛されるが、ベンゼン溶液ではなんらの変化もないことを見出した³⁾。

本研究ではさらに D_t を測定することによってより詳細な検討を加えた。図4はクロロホルムの D_t の組成依存性を示したものである。図5はDMSOの D_t も同様に示した(●)。図からわかるようにこの系でも D_t はプロトン交換溶媒の存在によって低下する。すなわち分子会合の形成によって並進運動が束縛されていることが理解できる。 D_t とeffectiveな流体力学的分子径 a および溶液粘度 η との間には次式の関係が成立つ。

$$D_t = \frac{kT}{C\pi a \eta} \quad (4)$$

ここで C は定数である。図5に(4)式から求めた Ca の値を示す。アセトンおよびベンゼンとの会合形成によってクロロホルムの流体力学的な分子径が増大している。

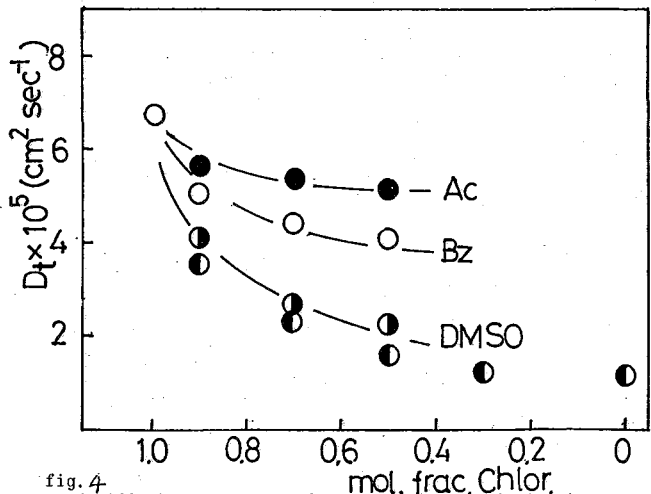


fig. 4
Self-diffusion constants of chloroform and DMSO in binary mixtures.
●: chloroform_acetone-d₆ ○: chloroform_benzene-d₆
○: chloroform_DMSO-d₆ ●: chloroform-d_DMSO-h₆

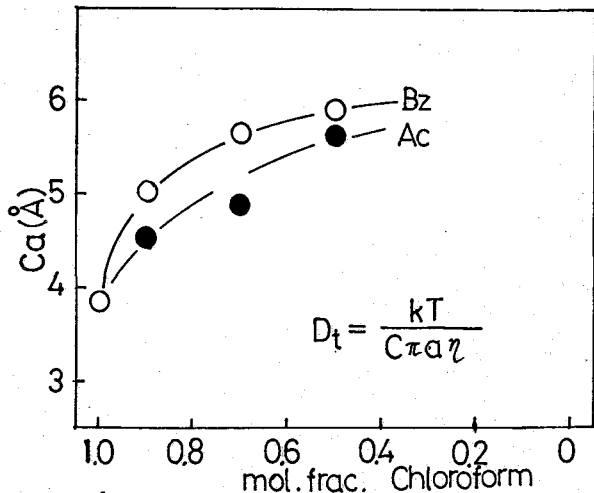


fig. 5
Hydrodynamic molecular radius Ca (C : constant) of chloroform calculated by eq.(4) in binary mixtures.

D_t と並進運動の相関時間 τ_t との間には一般に次式が与えられる。

$$\tau_t = \langle r^2 \rangle / 6D_t \quad (5)$$

ここで $\langle r^2 \rangle$ は分子の平均のジヤンプ距離である。したがって溶媒組成を変えた場合、 $\langle r^2 \rangle$ が常に同一で溶媒効果を受けないとすれば各系の τ_t を D_t^{-1} に対してプロットした場合 0でない傾きをもった直線が得られるはずである。

図6は各系についてのプロットである。DMSO, アセトンでは傾きをもった直線が得られ $\langle r^2 \rangle$ は全組成に依り一定である。しかしながらベンゼン溶媒では組成によって $\langle r^2 \rangle$ が変化することになる。ベンゼン溶媒で τ_t が変化しないにもかかわらず D_t が変化することの理由の一つとして上記のことを考えられる。このような分子運動の様式に対する溶媒効果について討論を行う。

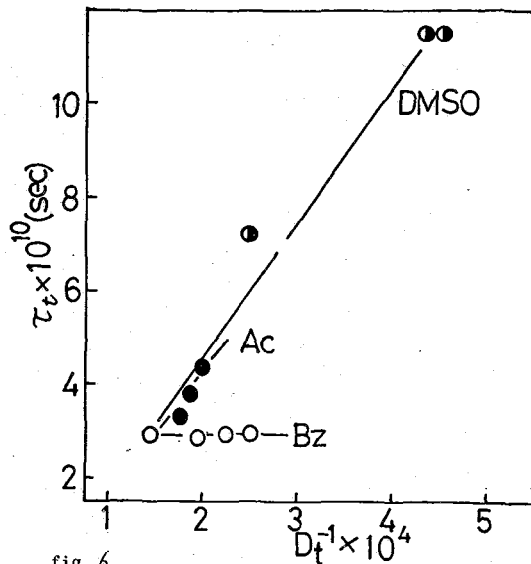


fig. 6
Relationship between translational correlation times and diffusion constants.

このような分子運動の様式に対する溶媒

4 文献

- 1) T. L. James and G. G. McDonald
J. Magn. Resonance 11, 58 (1973)
- 2) T. Tokuhiko et al., J. Chem. Phys. 61, 2275 (1974)
- 3) K. Sato and A. Nishioka.
Bull. Chem. Soc. Japan 44, 1506 (1971)

Intermolecular Interactions and Nuclear Magnetic Relaxation in Several Binary Mixtures

Kazuo SATO

Central Research Laboratory, Idemitsu Kosan Co. Ltd.,
Sodegaura-cho, Kimistd-gun, Chiba 292-01

The self-diffusion constant D_s of chloroform was measured in several binary mixtures consisting of chloroform and proton acceptor solvents, such as acetone, benzene and DMSO. From the measured values of D_s , we calculated the effective hydrodynamic radius a of chloroform, and found out that the values of a increase with increasing the fraction of proton acceptor solvents. This is resultant from the formation of intermolecular complex.

We have measured also the D_s and T_1 of water protons in water-DMSO system, and discuss the (water)₂-DMSO complex in terms of rotational and translational motions.

(東工詞) 〇山本 修、柳 次 勝

我々は昨年のNMR討論会においてベンゼン-d₆の¹³Cおよび²D緩和時間T_{1ρ}を測定し、その結果を発表し、C₆D₆の¹³C緩和においてスピン回転相互作用が重要な役割を演じていることを示した⁽¹⁾。本発表においては、これらの緩和データを説明するために、McClungのextended diffusion theory⁽²⁾を適用し、J-又はM-diffusion modelを適用できるかどうかを検討した。

前報⁽¹⁾において得られた結果を図1に示す。ここで²Dの緩和時間T_{1ρ}の温度依存性は

$$T_{1\rho} = 29.8 \exp(-1.79 \pm 0.09 \text{ Kcal mol}^{-1}/RT)$$

で与えられる。²Dの緩和機構は主として四極緩和であることと考慮して、この値を用いてC-D双極子相互作用による¹³C緩和時間T_{1c}への寄与T_{1c}^{DP}を見積ることにする。T_{1c}に用いられる緩和時間T_{1c}^{SR}は、¹³Cのスピン回転相互作用の寄与T_{1c}^{SR}は、

$$\frac{1}{T_{1c}^{SR}} = \frac{1}{T_{1c}} - \frac{1}{T_{1c}^{DP}} \quad (1)$$

により与えられる。このようにT_{1c}の分解関係を図1に示して示した。

extended diffusion theoryにおいては、reorientationの相関時間τ₀^(2,k)はその相関関数を通じて角運動量の相関時間τ_Jと関係づけられている。この時reorientationの相関関数は特定のJ-又はM-diffusionモデルに依存している。J-diffusionモデルにおいては分子の衝突の際に角運動量の大きさや方向を完全にrandomizeし、M-diffusionモデルにおいてはその方向のみをrandomizeされると仮定される。T_{1ρ}の測定により得られるτ_{0,eff}⁽²⁾はτ₀^(2,k)の各成分と次式により関係づけられている。

$$\tau_{0,eff}^{(2)} = \left[\frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \right]^2 \tau_0^{(2,0)} + 3 \sin^2 \theta \cos^2 \theta \tau_0^{(2,1)} + \frac{3}{4} \sin^4 \theta \tau_0^{(2,2)} \quad (2)$$

ここでθは分子(対稱コマ分子)の対称軸とC-D結合軸とのなす角度である。τ₀^(2,k)とτ_Jとの関係は複雑な式になるため省略するので文献を参照されたい。⁽²⁾ C₆D₆に対して両者の間の理論的關係を示したのが図2である。この場合温度Tと慣性モーメントのX成分I_Xとで規格化した次のような量を用いる。

$$\tau_0^{(2,k)*} = \tau_0^{(2,k)} \sqrt{k_B T / I_X}, \quad \tau_J^* = \tau_J \sqrt{k_B T / I_X} \quad (3)$$

ここでk_Bはボルツマン定数である。

Extended diffusion theoryにおいては、従来行われて来たrotational diffusion equationに基づくapproachと異なって大きな角度の回転が許される。また角運動量の相関時間τ_Jは唯一の値が存在せず、これをτ_J^Iとτ_J^{II}とに分けることはできない。すなわち対称軸およびそれに垂直な軸周りの、異なる角度変化も、互いに影響を及ぼしあうことでτ_Jに効果を及ぼすという立場がとられる。

次にMcClungによれば、T_{1c}^{SR}は次式により与えられる。

やまもと 不三、やまもと さゆり さん。

$$T_{IC}^{SR} = \frac{2\tau_J k_B T}{3\hbar^2} [(2I_x + I_z)C_0^2 + 4(I_z - I_x)C_0 \Delta C] + \frac{2\tau_J \Delta C^2}{3\hbar^2} \left(\frac{1+\xi}{2\pi}\right)^{1/2} (I_x k_B T)^{-3/2} \times \int_0^\infty dJ J^2 \int_0^\pi d\beta \sin\beta \exp[-J^2(1+\xi \cos^2\beta)/2I_x k_B T] \times J^2 [(3\cos^2\beta - 1)^2 + 9\cos^2\beta \sin^2\beta / (1+J^2\tau_J^2/I_x^2)] \quad (4)$$

こゝに $C_0 = \frac{1}{3}(C_x + C_y + C_z)$, $\Delta C = \frac{1}{3}[C_z - \frac{1}{2}(C_x + C_y)]$, $\xi = (I_x - I_z)/I_z$ である。

C_x, C_y, C_z は スピン-回転相互作用の主値であり、実験値を分子において注目している核が対称軸上にない限り一般には $C_x \neq C_y$ である。しかし C_6D_6 においては C が定性的な関係にある ^{13}C の磁気シフトテンソルは、 sp^2 混成のために、慣性モーメントの主値はほぼ同じ軸をもつておりと考えられるから $C_x = C_y$ と仮定することにできる。 C と I および磁気シフトテンソル σ の関係については次の関係がある。

$$\sigma_{gg} = A + 0.779 \sum C_{gg} I_{gg} \quad (5)$$

但し σ は ppm 単位、 C は KHz, I は $10^{-40} g^{-1} cm^2$ の単位であり、 A は定数である。 X の C は -15.94 KHz, X と Y の間の ^{13}C 化学シフト差は 130.8 ppm, Y と Z の ^{13}C 化学シフトの異方向性 $\sigma_{ZZ} - \sigma_{XX} = 180$ ppm であるという事実を使い、

$$C_x = C_y = -1.83 \text{ KHz}, \quad C_z = -0.27 \text{ KHz}$$

という値が得られた。

この値を用い、(1)式で得られた T_{IC}^{SR} の実験値に使用すると、(4)式から τ_J の値が得られる。計算には McClung から提供されたプログラムを用いた。こゝより得られた τ_J と、 T_{10} の測定から得られた $\tau_{0,eff}^{(2)}$ とを図2にプロットした (図印を参照)。図2から直ちに明らかになるように、 C_6D_6 の reorientation は J-diffusion モデルで極めて良く説明ができていくことがわかる。 Bull. によれば、同様に四枝軸の分子である 1,3,5-trifluoro-2,4,6-trideutero benzene において ^{19}F の緩和速度から結論された同分子の分子運動にも J-diffusion モデルが非常にうまく適用されたことが示されている。

次に J-diffusion モデルにおいては、rotational diffusion limit の条件

$$\tau_J \ll (I_x/k_B T)^{1/2}, \quad \tau_J \ll (I_z/k_B T)^{1/2} \quad (6)$$

が満足される場合、anisotropic rotational diffusion equation で得られた reorientation の rotational diffusion coefficient D_{\perp}, D_{\parallel} と $\tau_0^{(j,k)}$ の間には、次の関係が近似的に成立する。

$$\tau_0^{(j,k)} = \{ D_{\perp} \{ j(j+1) - k^2 \} D_{\parallel} (k^2) \}^{-1} \quad (7)$$

C_6D_6 では低温領域において $\tau_J / \{ (I_x, I_z) / k_B T \}^{1/2}$ の比は略 0.1 であり、(6)式の条件は略満足されると考えられる。よって $13.9^\circ C$ と $28.5^\circ C$ で D_{\perp} と D_{\parallel} の値を求めた次のようになる。

	D_{\perp}	D_{\parallel}	$\tau_J / (I_x/k_B T)^{1/2}$
$13.9^\circ C$	13.8	$7.5 \times 10^{10} sec^{-1}$	0.10
$28.5^\circ C$	16.0	8.9	0.12

すなわち $D_{\perp} > D_{\parallel}$ である。

C_6D_6 の reorientation に関しては、2, 3 のケル-フーによりラマン又は L-L-散乱の研究により研究が行われていた。それらの結果と本報告の結果とを比較すれば、Bartoli

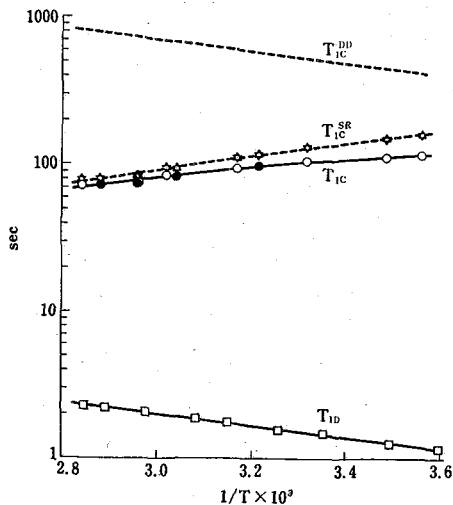


Fig. 1. Various relaxation times in C_6D_6 . 2D relaxation times T_{ID} \square . ^{13}C relaxation times T_{IC} \circ at 25.2 MHz and \bullet at 15.1 MHz. The contribution of the DD mechanism T_{IC}^{DD} and the SR mechanism T_{IC}^{SR} \star are calculated from the T_{ID} and T_{IC} .

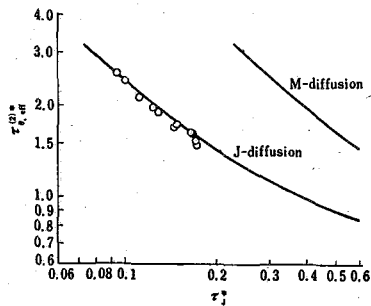


Fig. 2. The relationship between $\tau_{\theta,eff}^{(2)*}$ and τ_J^* in C_6D_6 according to McClung's extended diffusion theory. Experimental values are indicated by circles. Note that $\tau_{\theta,eff}^{(2)} = [(3\cos^2\theta - 1)/2]^2 \tau_{\theta}^{(2,0)} + 3\sin^2\theta \cos^2\theta \tau_{\theta}^{(2,1)} + \frac{3}{4} \sin^4\theta \tau_{\theta}^{(2,2)}$.

は θ の 6 回軸周りの運動の方がそれと垂直な軸周りの運動に比べて数倍速い異方的な運動としていたことが結論としていえる。

この結論の異の理由は恐らく次の二点によるところであろうと考之らる。 (1) rotational diffusion に角度の大きな step が含まれていられるため、anisotropic rotational diffusion equation の approach では取扱いが困難になるといふこと。 (2) Gillen の方法では D_{\perp} を ラマンのデータから求め、それと T_{ID} のデータとを組合せて D_{\parallel} を導き出しているが、このように方法論的に異なる値を組合せることに基く systematic error によるものではないかと考之らる。事実 Gillen は $140^{\circ}C$ のラマンから得た D_{\perp} は $4.4 \times 10^{10} sec^{-1}$ であるが、我々の結果より $1/3$ ほど小さい。しかしこれは全く異なった方法で得られたものとして良く合っていると考之らる。 D_{\perp} を知ると D_{\parallel} を導く場合、或いはその逆の場合の關係式は D_{\parallel} と D_{\perp} の相対的な大きさに敏感である、少しの差で両者の大きさが逆転を招く恐れがある。従って NMR のラマンのデータとを組合せて D_{\perp} と D_{\parallel} とを求めた方法には、いささか疑問の点が存在するといふべきである。

いかにせよ NMR のデータから結論された限り $D_{\parallel} \sim D_{\perp}$ である、ペンゼンの運動は異方的といふよりも等方的と考之る方が良さそうである。

この結果 (J. Chem. Phys. 51, 404 (1969))
 とは異なる一致がみられたか、Gillen
 の⁽³⁾ および Bauer の⁽⁴⁾ の結果とは
 反対になる。すなわち後者の研究では
 D_{\parallel} が D_{\perp} より数倍大きく、ペンゼン

Reorientation and Spin-Rotation Interaction in Liquid Perdeuterobenzene

National Chemical Laboratory for Industry

Osamu Yamamoto and Masaru Yanagisawa

The importance of the spin-rotation (SR) interaction in the ^{13}C spin-lattice relaxation mechanism for simple molecules has been indicated by many authors. In a previous report,¹⁾ we have studied ^{13}C and ^2D relaxation rates in liquid benzene- d_6 and showed that the SR mechanism plays an important role in the ^{13}C relaxation in C_6D_6 . The results obtained in the previous report are summarized in Fig. 1. In the present study, McClung's extended diffusion theory²⁾ is applied to interpret the relaxation data for C_6D_6 , and the applicability of the extended J- or M-diffusion model is examined.

In the extended diffusion theory, the reorientational correlation time $\tau_\theta^{(2,k)}$ can be related to the angular momentum correlation time τ_J through the reorientational correlation function, which depends on a particular J- or M-diffusion model. The theoretical relationship between $\tau_\theta^{(2,k)}$ and τ_J for C_6D_6 is plotted in Fig. 2 for both J- and M-diffusion models. For the plot, the reduced values of the correlation times are used such as $\tau_\theta^{(2,k)*} = \tau_\theta^{(2,k)} (k_B T / I_X)^{1/2}$, and $\tau_J^* = \tau_J (k_B T / I_X)^{1/2}$, where k_B is the Boltzmann constant. $\tau_\theta^{(2)*}$ can be obtained from ^2D relaxation rates, and τ_J^* can be obtained experimentally from T_1^{SR} values and the spin-rotational coupling constants (estimated to be -1.83 KHz for C_x and C_y , and -0.27 KHz for C_z). These experimental values are also plotted in Fig. 2 by circles. It can be seen that the experimental values excellently agree with the J-diffusion model.

In the J-diffusion model, the rotational diffusion coefficients D_\perp and D_\parallel can be approximately calculated from $\tau^{(2,k)}$ when the condition of rotational diffusion limit is fulfilled. In C_6D_6 this is the case in the lower temperature range. We obtain $D_\perp > D_\parallel$ (16.0 and $8.9 \times 10^{-10} \text{ sec}^{-1}$, respectively) at room temperature. This result is sharp contrast with previous works,^{3,4)} (D_\parallel is several times greater than D_\perp), in which the rotational diffusion coefficients were derived by combining the NMR relaxation data with the analysis of Raman line shape or depolarized Rayleigh scattering data. The discrepancy of the conclusions probably comes from (1) some inertial effect present in the reorientation in C_6D_6 which results in failure of the anisotropic diffusion equation approach, and (2) some systematic errors, whether instrumental or due to approximation in analysis, inherent of the different techniques (i.e., NMR and Raman) introduced to give a disagreement in absolute magnitude of the correlation time.

1) presented in the 15th Conference of NMR (Tokyo).

2) R.E.D. McClung, J. Chem. Phys. 57, 5478 (1972).

3) K.T. Gillen and J.G. Griffiths, Chem. Phys. Lett. 17, 359 (1972).

4) D.R. Bauer, G.R. Alms, J.I. Brauman and R. Pecora, J. Chem. Phys. 61, 2255 (1973).

306 (E4) リチウム金属-メチルアミン濃厚溶液の磁気緩和

(北大理^A、北大工^B) 中村義男^A 宮 哲夫^{A*} 下川繁三^B 下地光雄^A

1. はじめに

アルカリ金属は液体アンモニアあるいはアミン類に溶けて、興味ある溶液を作る。金属の濃度が低い領域 ($X_M < 0.001$, X_M : 金属のモル分率) では、金属の価電子が溶媒和していわゆる“溶媒和電子”を形成する。この領域の溶液は電解質溶液と類似の挙動を示す。一方、金属濃度の高い領域 (通常 $X_M > 0.1 \sim 0.2$) では、溶液の電気伝導度は液体金属とほぼ同程度の値となり、光学的性質、ホール係数などの測定結果も、この液体が“ほぼ自由な電子”を持った金属として振舞っていることを示している。溶液が“金属-非金属転移”を示す中間の濃度領域に対しては、溶液中の電子の状態に関する描像が未だ確立していない。

今回、われわれは金属リチウム-メチルアミンの組合せの溶液を取り上げた。この溶液の電気伝導度と熱電能については既に報告している¹⁾。図1, 2に示すように $X_{Li} \sim 0.15$ 付近で、電気伝導度 (σ) の値は急激に増加し、熱電能 (S) の絶対値は逆に急速に減小している。これらの結果は $X_{Li} \approx 0.15$ の濃度で溶媒和電子が非局在化し、溶液が金属的性質を帯びることを示唆している。この金属-非金属転移の前後の電子状態の変化をさらに直接的かつ微視的に調べることが目的として、本研究では中間および高金属濃度の $Li-CH_3NH_2$ 溶液の 7Li および 1H 核の Knight シフト (K_s) とスピン-格子緩和時間 (T_1) を金属濃度と温度を変えて測定した。なおこの濃度領域での金属核の磁気緩和の測定は、本研究が最初である (一部既報²⁾)。

2. 実験方法

NMRの測定はパルスFTスペクトロメーター (Bruker SXP4-100 FT) を用いて行った。磁石は 12 in. 高分解能用を用いた。 7Li に対しては 34.98 MHz, 1H に対しては 90.00 MHz で、Knight シフトは FID の共鳴点から求めた。シフトの基準として、 7Li には $LiNO_3$ の CH_3NH_2 溶液、 1H には純粋の CH_3NH_2 をとった。 T_1 の測定には $180^\circ - \tau - 90^\circ$

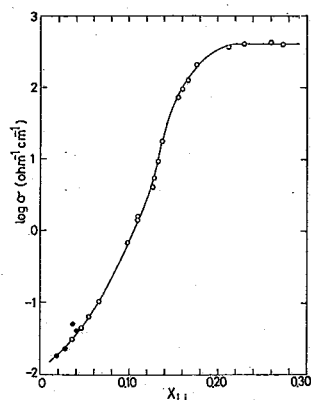


Fig. 1 Electrical conductivity of $Li-CH_3NH_2$ solutions at $-65^\circ C$

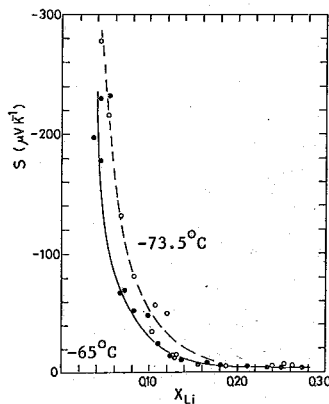
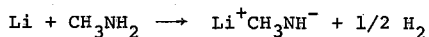


Fig. 2 Thermoelectric power of $Li-CH_3NH_2$ solutions at -73.5 and $-65^\circ C$

なかむらよしお とまつお* しもかわしげろう しもじみつお (*現富士フィルム足柄研)

パルス法を用いた。測定温度範囲は $-75^{\circ}\sim-55^{\circ}\text{C}$ で、温度制御の精度は $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ であった。

試料溶液は真空下で内径8mmの試料管へ導入した後、封管した。溶液の金属の濃度は、測定終了後溶媒を蒸発させ、残った金属を水に溶かしてLiOH溶液とし、HCl溶液を滴定して決めた。またLi- CH_3NH_2 溶液は、 NH_3 あるいは他のアミン溶液と同様、最終的には



の反応によって分解するため、測定は比較的短時間(3~4時間内)に行う必要があった。測定時間以外は、試料を液体窒素で固化して保存した。高金属濃度域では表皮効果のためシグナルの強度は急速に減じた。液体金属のNMRの測定では、一般に試料を表皮の厚さ程度の微粒子として油などの中に分散させるが、本実験の試料は上述のように不安定であるため、この方法はとれない。したがって水は、高金属濃度の試料についてはFIDシグナルを20~200回積算して測定を行った。

3. 実験結果および考察

3-1 Knightシフト

Knightシフト(K_S)は次式によって定義される。

$$K_S = \frac{H_r - H_s}{H_r} \equiv \frac{\omega_s - \omega_r}{\omega_r} \quad (1)$$

ここで r, s は各々基準物質および試料を表わす。 H は振動数一定の場合の共鳴磁場、 ω は磁場一定の場合の共鳴振動数で、本実験では後者を用いた。

^7Li の K_S の測定結果を -75° と -55°C の二つの温度について図3に示す。シフトの値は溶液の磁化率の値³⁾を用いて補正している。 K_S の値は正で $X_{\text{Li}} \sim 0.15$ 附近から急に増加している。また K_S の値は温度の上昇と共に増加し、その傾向は低金属側で著しい。この溶液は $X_{\text{Li}} \sim 0.22$ で飽和し、飽和溶解度の温度依存性は小さい。図4に ^1H に対する K_S の値を示す。 NH_2 基の ^1H のシフトが CH_3 基の ^1H のシフトより大きいことは、 CH_3NH_2 分子が NH_2 基を電子に向けて配向していることを示している。金属濃度、温度に対する依存性は ^7Li の場合と同様である。 ^1H の K_S の負の値は ^1H に対する負のスピン密度を意味するが、同様の値が $\text{NH}_3, \text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_2, \text{HMPA}$ 溶液などでも見出されている⁴⁾。

Knightシフトは次式で書き表わされる⁵⁾。

$$K_S = \frac{8\pi}{3} \langle |\psi(0)|^2 \rangle_F \cdot \frac{\chi_e^M}{N_A} \quad (2)$$

ここで $\langle |\psi(0)|^2 \rangle_F$ はフェルミ面近傍の電子の注目する核における確率密度の平均値で、

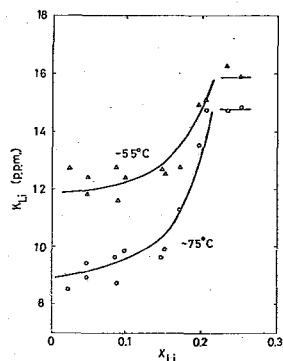


Fig.3 Knight shift of ^7Li in $\text{Li}-\text{CH}_3\text{NH}_2$ solutions at -75° and -55°C

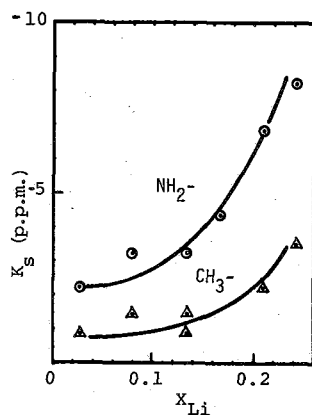


Fig.4 Knight shift of ^1H in $\text{Li}-\text{CH}_3\text{NH}_2$ solutions at -75°C

χ_M^e は電子のモル磁化率、 NA は Avogadro 数である。溶液の磁化率の測定値³⁾ から加算則によつて溶媒と Li^+ イオンの磁化率を差引いて χ_M^e を求め、これより $\langle |\psi(0)|^2 \rangle_F$ の値を計算した結果を図5に示した。 $\langle |\psi(0)|^2 \rangle_F$ の値は金属濃度と共にほぼ直線的に増加している。なお金属リチウムに対する値は 7.2×10^{23} である⁶⁾、 $X_{\text{Li}} = 0.2$ までの値はその1%である。

3-2 スピン格子緩和時間

^7Li および ^1H に対する緩和速度 (T_1^{-1}) の測定結果を図6に示す。 ^7Li に対しては -65° と -55°C の値を示した。 ^7Li , ^1H 核共に T_1^{-1} の値は $X_{\text{Li}} \sim 0.15$ 付近で急激に減少している。また低金属側では温度の上昇と共に T_1^{-1} の値が増加している。

中間および高濃度領域での ^7Li の緩和速度は次の三つの緩和機構の寄与の和で書き表わすことができる。

$$(1/T_1)_{\text{obs}} = (1/T_1)_{\text{d-d}} + (1/T_1)_Q + (1/T_1)_e \quad (3)$$

右辺はそれぞれ順に、双極子-双極子相互作用、四重極相互作用、および電子との接触相互作用による緩和機構の寄与を表わしている。溶媒として CH_3ND_2 を用いると $(1/T_1)_{\text{d-d}}$ の項が無視でき、また Li 塩の溶解では $(1/T_1)_e$ が存在しない。これらについての測定を組み合わせ、 $1/T_1$ の実験値から $(1/T_1)_e$ 値を見積ることができる。

電子との接触相互作用による寄与は、 $Z_e W_e \ll 1$ のとき

$$(1/T_1)_e = \frac{2}{3} A^2 s(s+1) \tau_e \quad (4)$$

で表わされる⁵⁾。ここで A は先に求めた $|\psi(0)|^2$ の値から

$$A = \frac{8\pi}{3} \gamma_e \gamma_{\text{Li}} \hbar |\psi(0)|^2 \quad (5)$$

を用いて計算できる。 S は電子のスピンである。得られた電子との接触相互作用の相関時間、 Z_e を金属濃度の関数として図7に示す。金属濃度の増加に伴い、 Z_e の値は $10^{-12} \sim 10^{-15} \text{ sec}$ と大きく変化している。非局在領域では相関時間は次式で表わされる⁷⁾

$$\tau_e \sim a/v_F \quad (6)$$

ここで a は最近接の Li-Li 間の距離、 v_F は Fermi 速度で

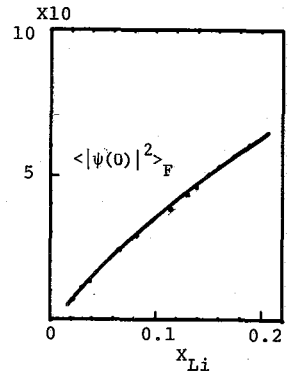


Fig.5 Electron probability density at the ^7Li nucleus

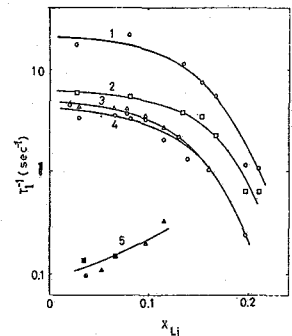


Fig.6 Spin-lattice relaxation rates of ^7Li and ^1H in the $\text{Li-CH}_3\text{NH}_2$ system (curves 1-4); curve 1: ^1H in NH_2 group at -65°C ; curve 2: ^1H in CH_3 group at -65°C ; curve 3: ^7Li at -55°C ; curve 4: ^7Li at -65°C . Curve 5: ^7Li in $\text{LiNO}_3\text{-CH}_3\text{NH}_2$ (Δ), $\text{LiCl-CH}_3\text{NH}_2$ (\bullet), and $\text{LiCl-CH}_3\text{ND}_2$ (\circ).

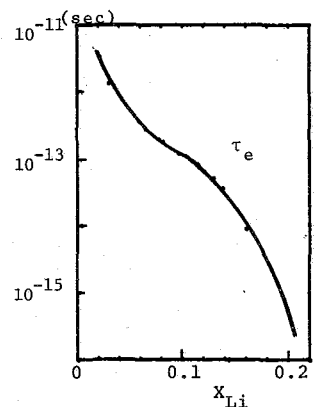


Fig.7 Correlation time of electron contact interaction at ^7Li

電子濃度から計算することができ。X_{Li}=0.20 では $a \sim 7 \times 10^{-8} \text{ cm}$, $v_F \sim 2.6 \times 10^8 \text{ cm/sec}$ であり, $\tau_c \sim 10^{-15} \text{ sec}$ となり、実験値と良く一致している。この非局在領域に Mott の提唱している pseudogap モデルを適用すると、Knight シフトと電気伝導度の間に

$$K_S^2 = \text{const} \times \sigma \quad (7)$$

の関係が期待されるが、高濃度領域を図 8 に示すようにこの関係が成立していることが認められた。

4. おわりに

金属-非金属転移を示す液体溶液中の金属核の Knight シフトおよび緩和時間の測定が、この溶液中の電子の状態についての有力な知見を与えることが解った。類似の系に測定を拡げて行くこと、緩和過程の磁場(円周数)依存性を調べること、系の微視的不均一性についての検証を行うことなどが今後の課題である。

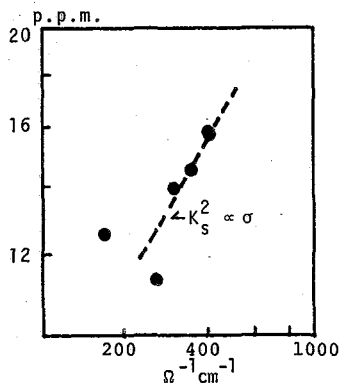


Fig.8 Relation between Knight shift and electrical conductivity

Nuclear Magnetic Relaxation in Concentrated Lithium-Methylamine Solutions

by Yoshio Nakamura, Tetsuo Toma, Shigezo Shimokawa* and Mitsuo Shimoji

Department of Chemistry, Faculty of Science and *NMR Research Laboratory, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo, 060, Japan.

Abstract

The Knight shift and the spin-lattice relaxation time in concentrated Li-CH₃NH₂ solutions have been measured for ⁷Li and ¹H nuclei as a function of metal concentration over the temperature range from -75° to -55°C. Both the shift and the relaxation time change significantly around 15 mole% metal, where the electrical conductivity and thermo-electric power data also indicate the delocalization of solvated electrons.

参考文献

- 1) T. Toma, Y. Nakamura and M. Shimoji, Phil. Mag., 33, 181 (1976)
- 2) Y. Nakamura, T. Toma, S. Shimokawa and M. Shimoji, Phys. Lett. A, 60, 373 (1977)
- 3) 菅中村, 未発表
- 4) R. Catteral, "Electron-Solvent and Anion-Solvent Interactions" p.45 (ed. Kevan and Webster, Elsevier, New York 1976)
- 5) A. Abragam, "The principles of Nuclear Magnetism" (Clarendon Press, Oxford, 1961)
- 6) W. Kohn, Phys. Rev., 96, 590 (1954)
- 7) W. W. Warren, Phys. Rev. B, 3, 3708 (1971)
- 8) N. F. Mott and E. A. Davis, "Electronic Process in Non-crystalline Materials" (Clarendon Press, Oxford, 1971)

307 (E5) 有機物固体の¹³Cの緩和時間測定 (T₁, T_{1ρ})

(日本電子) 藤戸輝昭, 大内京成, 平野治男, 細野政美, 今成 司

1.はじめに これまで我々はスピノロッキング法を使って、塩化物の溶液での¹³CのT_{1ρ}を測定し、そのパワー依存性より、直接測定出来ないC-Clの結合定数及びClのT₁を決定した。今回はこのT_{1ρ}法を固体サンプルに適用し、T₁とあわせて固体の分子運動の研究を行った。一般に固体の¹³C-NMRでは¹³Cの共鳴線はプロトンからの双極子場の影響をうけて線幅がブロードになり、さらにケミカルシフトの異方性によりスペクトルが分布するために、通常のNMR装置では各ラインを分離して緩和時間を測定することはできない。前者は High Power プロトン照射を行うことにより、後者は高速サンプル回転によって除去されるが、今回はその必要のない系、即ち分子運動が比較的速いため、双極子相互作用が適度に平均化されている系として、柔軟性結晶のアダマント、カンファおよび高分子のゴム(イソプレ)をとりあげ、T₁及びT_{1ρ}からこれらのサンプルにおける運動の違いを調べた。

Compound	J	T ₁ ^{Cl}
n-Butylchloride	10 Hz	46 msec
CH ₂ Cl ₂	19	45
CHCl ₃	25	44
CCl ₄	30	31

2.実験 測定には JEOL FX-100 NMR 装置及びスピノロッキングユニットを使用した。プロトンデカップルは¹³Cスピノロッキング時のみCWモードで行い、他はノイズデカップルを行った。また cross relaxation をさけるため、一部 Gated モードを使用し、サンプルング時のみデカップルする方法も併用した。¹³Cロッキングパワーは3ガウスから13.3ガウスまで変化させて測定し、サンプルは市販の粉末結晶を10mm中のサンプルチューブに約10mmつめて使用した。

3.理論的背景 一般に緩和時間は、H_Aからの双極子相互作用が主であり、ロッキング磁場をH₁、プロトンからの双極子場の大きさをH_Bとすると、H₁ ≫ H_BではBPP理論が成り立ち²⁾、T₁, T_{1ρ} は次のように表わせる。

$$\frac{1}{T_1} = K \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right) \quad (1)$$

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = \frac{1}{2} K \left(\frac{3\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{5\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right) \quad (2)$$

ここでω₀はラーマー周波数、ω₁はロッキング磁場の強さで、ω₁ = γH₁、τ_cは分子運動の相関時間である。固体の場合、運動がゆつくりでτ_cが長いから(2)式は第一項のみ残る。Douglassらはこれを次の形で表わした³⁾

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = \frac{3\gamma^2 \tau_c (1-g) H_B^2}{1 + 4\omega_1^2 \tau_c^2} \quad (3) \text{ (Weak Collision)}$$

ここでgは結晶構造と分子運動の形によって決まる定数である。T_{1ρ}測定ではロッキングパワーを変えることによってτ_cを求めることが出来る。このτ_cがアレニウス型の式

τ_c = τ₀ exp(E_a/RT) で表わされるとすれば、T₁ ∝ τ_c で近似出来る領域では ln T₁ 及び ln T_{1ρ} を 1/T でプロット (アレニウスプロット) すれば、その傾きから運動の活性化エネルギー E_a が求まる。さらに運動が遅いか、H₁ ≈ H_B の場合、(3)式の代りに(4)式が成り立ち、

ふじとておき、おうちおねき、ひらのはるお、ほそのまさみ、いまなりまおる

$H_1 \rightarrow 0$ の極限では (5) 式となる。³⁾ P は分子運動と結晶構造とで決まる定数である。

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = \frac{2(1-P)}{\tau_c} \frac{H_D^2}{H_1^2 + H_D^2} \quad (4), \quad \frac{1}{T_{1D}} = \frac{2(1-P)}{\tau_c} \quad (5) \quad (\text{Strong Collision})$$

4. 結果と考察

a) イソプレン: ミスホロイ イソプレンについて 30°C で T_1 及び $T_{1\rho}$ を測定した値が表 1 である。

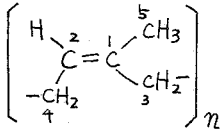


Table 1. T_1 & $T_{1\rho}$ of polyisoprene at 30°C

	1	2	3	4	5
T_1	640 ms	73	43	49	350
$T_{1\rho}$ (4 τ)	290 ms	64	30	42	220

T_1 の値は Shaefer⁴⁾ の値によく一致する。1 位, 5 位以外の ^{13}C の $T_{1\rho}$ 値は T_1 値に近く傾向も似ている。

1 位の炭素はプロトンがついていないため、また 5 位の炭素はメチル基の速い回転のため、 T_1 は他のものより長くなっていると考えられる。 $T_{1\rho}$ のロッキングパワー依存性は 5 位の炭素 (メチル基) でわずかに見られるが非常に小さい。このサンプルは、かなり線巾がマイクロでメチル基の速い回転運動の他に、主鎖のセグメント運動もはげしく (τ_c が短く)、 $T_1 \approx T_{1\rho}$ となっているため $T_{1\rho}$ 値に顕著なパワー依存性が見られないと考えられる。

b) アダマントラン: アダマントランの ^{13}C の T_1 は 30°C で CH_2 1.9 sec, CH 3.2 sec であった。

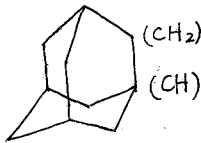
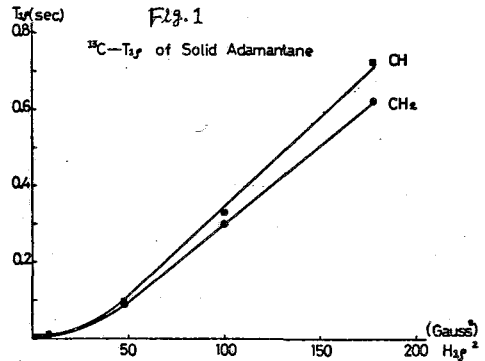
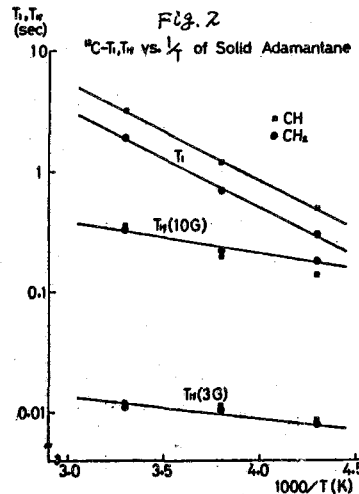


Fig. 1 は $T_{1\rho}$ のロッキングパワー依存性を示す。ロッキングパワー $H_{1\rho}$ が 17G 以上では $T_{1\rho} \propto H_{1\rho}^2$ なる関係が成り立つ。 17G 以下

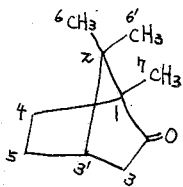


下では次第に直線からはずれ $H_{1\rho} \rightarrow 0$ の極限では一定値 T_{1D} ($\approx 10\text{msec}$) に近づく。先程の (5) 式及び計算値 $P = 0.2234$ ⁵⁾ を用いて τ_c を求めると、 $\tau_c \approx 1.55 \times 10^{-7} \text{sec}$ であった。この τ_c の値は速い分子運動を示唆している。

T_1 , $T_{1\rho}$ の温度変化を測定しアレニウスプロットしたのが Fig. 2 である。 T_1 , $T_{1\rho}$ とも温度が下がると短くなる傾向があるが、その傾きは異なる。 T_1 から活性化エネルギーを求めると約 4Kcal/mol となった。これは Resing⁶⁾ がプロトン T_1 測定から得た値 $E_a = 3.08 \text{Kcal/mol}$ に近く、速い分子全体の回転を反映している。一方 $T_{1\rho}$ のデータから得られた長い τ_c は分子全体の self-diffusion⁶⁾ を反映していると思われる。



c) カムファー: 30°C での d,l カムファーの T_1 及び $T_{1\rho}$ 値は表 8 のとおりである。 T_1 は、1 位の 4 級炭素が長く、他は比較的短い。一方 $T_{1\rho}$ は T_1 より 3 ケタも短くどの炭素も同じような値を示す。(液体ではこれと異なった

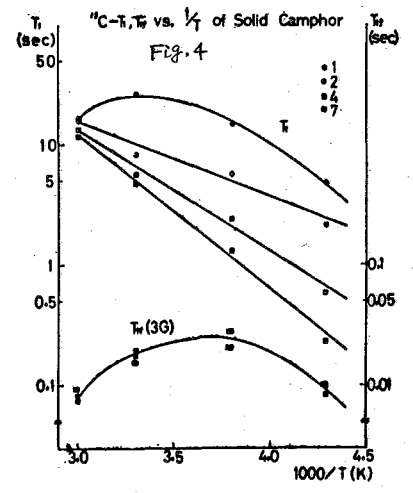
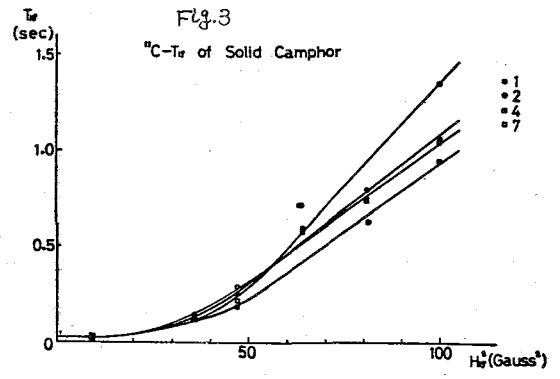


傾向を示す。) Fig.3 は固体カーブの $T_{1\rho}$ 値のロツキエカーブの依存性を示す。いずれの炭素も $H_{1\rho} \approx 6$ G以上では $T_{1\rho} \propto H_{1\rho}^2$ なる関係を示すが、 6 G以下では直線からはずれ、一定値 $T_{1D} (\approx 5 \text{ms})$ に近づく。(5)式と計算値) $P=0.266$ より T_C を求めると約 7.3×10^{-3} secとなる。このサンプルの T_1 及び $T_{1\rho}$ の温度依存性をプロットしたのが、Fig.4である。

	1	2	3	4	5	6	7
T_1	26.7 sec (59 sec)	8.3 (45)	7.5 (5.4)	7.7 (4.2)	4.3 (3.7)	4.8 (4.5)	5.1 (5.2)
$T_{1\rho}$ at 3 G	15.2 ms (9.3 sec)	15.9 (3.2 sec)	15.1 (7.1)	17.7 (4.7)	13.4 (4.1)	20.1 (4.2)	19.6 (2.9)

Table 2. T_1 & $T_{1\rho}$ of Camphor at 30°C (liquid value in parenthesis)

下値は1位の炭素以外は温度が下がるとともに単調減少するが1位の炭素のみは30°C付近に極大値を示す。一方 $T_{1\rho}$ 値はどの炭素も10°C付近に極大値をもつ。4位の炭素の示す直線から活性化エネルギーを求めると約6 kcal/molである。1位の4級炭素は4位のメチルの速い回転及び分子全体の比較的速い回転という2つの運動の影響をうけているために T_1 に極大値をもつと思われる。一方 $T_{1\rho}$ 値は plastic crystal 特有の速い self-diffusion を反映して極大値を示すのであろう。低温側の傾きは T_1 と同じ分子全体の回転によるものであり、高温側の傾きは、分子の self-diffusion によるものと考えられるが、今後これをうらづけるために、さらに高温側での測定及び T_{1D} 測定を行ってたしかめたい。



References

- 1) 大内, 藤, 今成, 国領, 荒川: 第15回NMR討議論要旨集 p14 (1976)
- 2) D.C. Douglass, G.P. Jones: J. Chem. Phys. 45 956 (1966)
- 3) D.C. Ailion: Advan. Magn. Resonance 5 177 (1971)
- 4) J. Shaefer: Macromolecules 5 427 (1972)
- 5) H.A. Resing, N.J. Cole, J.V. Sherwood: Phys. Rev. Lett. 20 1227 (1968)
- 6) H.A. Resing: Mol. Cryst. Liq. Cryst. 9 101 (1969)
- 7) G.P. Jones, D.C. Douglass, D.W. McCall: Rev. Sci. Instr. 36 1460 (1965)

Measurement of the Carbon-13 Relaxation Time on Solid Organic Compounds

T.Fujito, M.Ohuchi, H.Hirano, M.Hosono and M.Imanari.

JEOL LTD.1418 Nakagami Akishima Tokyo 196 Japan

The carbon-13 relaxation time(T_1 , $T_{1\rho}$) is measured for the study of molecular motion on solid organic compounds; adamantane, camphor and polyisoprene.

On the polyisoprene, $T_{1\rho}$ values are close to T_1 values. The $T_{1\rho}$ of methyl carbon is slightly depend on locking power at 30°C. T_1 values of CH_2 and CH of adamantane are 1.9 sec and 3.2 sec at 30°C, respectively. Activation energy is estimated to be approximately 4.0 Kcal/mol by T_1 process. The $T_{1\rho}$ values of adamantane depend on locking power with relation of $T_{1\rho} \propto H_1^2$ over the locking power range from 7 gauss to 13.3 gauss. The $T_{1\rho}$ data imply the existence of another molecular motion which is different from fast molecular motion obtained by T_1 data. $T_{1\rho}$ values of camphor are smaller than T_1 , and depend on locking power ($H_1\rho$) in the range of 7 - 13.3 gauss as same as the case of adamantane. The T_1 value of camphor increases as raising temperature except the $T_{1\rho}$ value of quaternary carbon. The $T_{1\rho}$ value, however, becomes maximum at 10°C in the same temperature range. Therefore, it could be considered that there are three different kinds of molecular motion in camphor. First case is the molecular rotation having activation energy of 6Kcal/mol estimated from $\ln T_1$ vs $1/T$ plot for skeleton carbons. Second case is the fast rotation of methyl group, which may causes the nonlinear temperature dependence of the T_1 value of quaternary carbon. The last is the slow motion such as diffusion, which is implied by the slope of $T_{1\rho}$ vs temperature plot in the high temperature region.

○遠藤 一夫・森島 績・小川 諭・米沢 貞次郎

序) 演者らは フリーラジカルを含んだ有機溶媒の動的挙動について研究を進展させてきた。^{文獻} 今回は 更に研究をひろめ、パルスNMR法を用いて常磁性物質(DTBNラジカルとヘムたんぱく(西洋わさびペルオキシダーゼ[HRP]))を含んだ溶媒のプロトンや¹³C素核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の注目する原子核の緩和機構や分子運動についてを明確にする。一例は、DTBNラジカルを含んだ六スル化ベンゼンの系と、他の一例は HRPを含んだ水の系である。

実験) 装置は、BrukerのSXP4~100(阪大桐山所)と日本電子のPS-100(京大理・化学教室)とを用いた。 T_1 は(80°C, 90°C)パルスシーケンス法で、 T_2 はCPMG法で測定した。HRPはシグマタイプVIを直接0.1M, pH 7.0 リン酸緩衝液にとがしたものをを用いた。その他の試料は精製して使用した。

結果及び考察

1. 理論的背景

ここで扱う溶媒分子と常磁性物質との相互作用は 次のように分類される。

- ① no chemical interaction
- ② a weak charge transfer interaction
- ③ formation of a labile complex

①は Hubbardによる拡散モデル^{文獻}で、溶媒分子の注目する原子核が球形と仮定した溶媒分子と常磁性物質とが衝突して並進拡散によって緩和される場合で、②は Hubbardによる sticking model^{文獻}で、並進的衝突をしながらか transient complexをつくる様な系で、具体的には注目する原子核の緩和速度は、並進拡散による双極子項とスピン相互作用によるスカラー項との和と考える。③は Solomon-Bloembergenのモデルで、弱い結合のコンプレックスを作って揺動運動(又は、回転運動)している時の緩和機構である。^{文獻}これら①, ②, ③の場合の緩和速度は、核スピン(N)と電子スピン(E)との双極子相互作用の及ぼす項と、スカラーカップリングによる項との和と考えられ、

つまり、

$$1/T_2 = (1/T_{2NE})_{\text{dip}} + (1/T_{2NE})_{\text{sc}}, \quad (1)$$

ただし、 $i=1, 2$ で それぞれ縦、横緩和速度に対応している。

2-2) DTBNラジカルを含んだ六スル化ベンゼンの系^{文獻}

表1には、DTBNラジカルを含んだ C_6F_6 の¹³C素核の T_1 , T_2 に対する周波数依存性(5~60MHz)を示した。 T_1 についての周波数依存性の結果は、①~③の相互作用の場合の理論値で別々に解析した。この系の支配的な結果が図1の○えんどうがづなが・モリシまいさお・おがわさとし・よねざわていじろう。

Table 1. Frequency dependences of T_1 , T_2 and T_1/T_2 of C_6F_6 molecule containing the DTBN radical^b at 19.0°C.

Quantity	Frequency (MHz)					
	5	10	20	30	40	60
T_1 (ms)	24.4	28.5	33.7	36.6	41.0	51.3
T_2 (ms)		25.7	27.0	26.9	28.5	30.0
T_1/T_2	1.11	1.25	1.26	1.43	1.70	

^a The probable error of T_1 is $\pm 3\%$ and that of T_2 is $\pm 5\%$.

^b The mole ratio of DTBN to C_6F_6 (N/N_0) is 0.039.

示されているが、この図からは、スルホ核の縦緩和時間 T_1 が Hubbard 理論の並進拡散による双極子相互作用で支配されていることが分かる。(6より④の場合が③の場合である) 表1での T_1/T_2 がより大きいと同時に、周波数の増加と共に 1.1 ~ 1.7 まで増しているの、緩和の速度式とから考え合せると、この系にはスカラー項も可成り寄与していると結論される。(ここまでの解析では、系は④の場合である)

既に演者らは、 C_6F_6 溶液に DTBN を滴加していくと、 C_6F_6 のスルホ核は、低磁場側のコンタクトシフトすることを観測していた(モル比 (DTBN/ C_6F_6) = 0.11 でのシフトは -2.10 ppm である)、そこでこの系が Hubbard の Sticking モデルであると考えた。

④の場合の厳密な Hubbard の緩和の式に戻してみると、この系では並進拡散による相関時間 $\tau_d \approx 4.0 \times 10^{-11}$ s であるから、ここでの測定領域では $(1/T_1)_{dip} \approx (1/T_2)_{dip}$ が満足される。(何故なら最大周波数 $\omega_F = 60$ MHz で理論値 $(1/T_1)_{dip} \approx 21$ rad/s, $(1/T_2)_{dip} \approx 23$ rad/s) 従って理論的に次式が得られる。

$$1/T_2 - 1/T_1 \approx (AF/2k)^2 \frac{nN}{N_0} \frac{\omega_s^2 \tau_c^3}{1 + \omega_s^2 \tau_c^2} \quad (2)$$

図2には、各周波数に対する $(1/T_2 - 1/T_1)$ の実測値を(2)式の理論値と比較したが

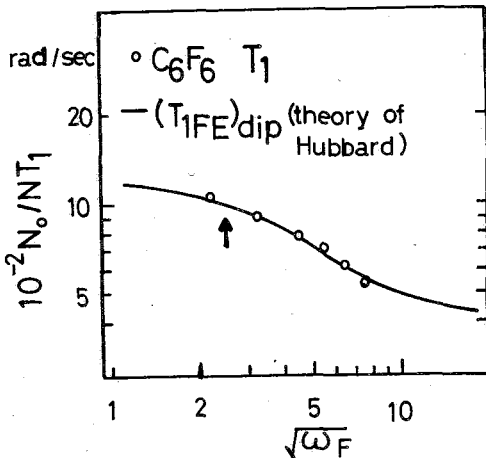


Figure 1. Frequency dependence of the fluorine T_1 's at 19.0°C

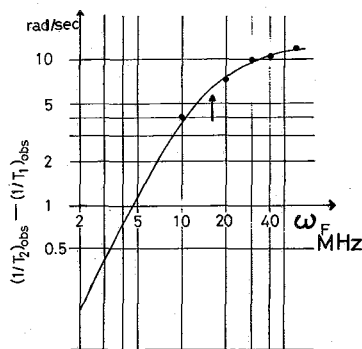


Figure 2. Frequency dependence of the fluorine $(1/T_2)_{obs} - (1/T_1)_{obs}$'s

Table 2. Correlation times, the closest distance that the fluorine approaches the electron spin, and the fluorine hyperfine coupling constant in C_6F_6 -DTBN charge transfer interaction system at 19.0°C.

τ_d	τ_c	d	AF
($\times 10^{-11}$ s)	(\AA)	(\AA)	(Hz)
$n=4$			
4.0 ± 0.6	1.5	2.2 ± 0.5	7×10^5

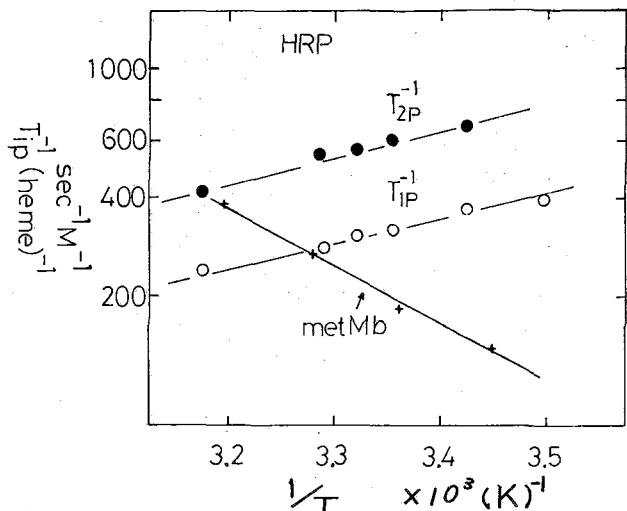


Figure 3 Temperature dependences of $T_{1p}(\text{heme})$ and $T_{2p}(\text{heme})$ at 100 MHz.

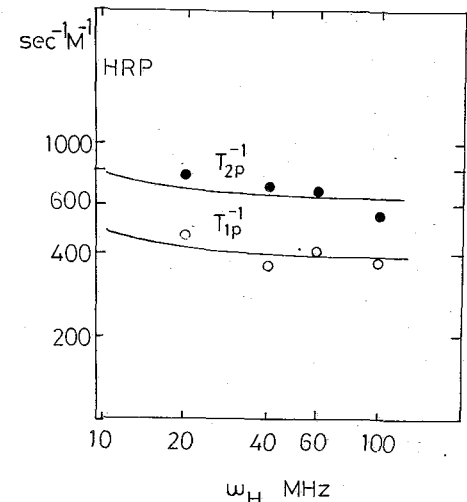


Figure 4. Frequency dependences of $T_{1p}(\text{heme})$ and $T_{2p}(\text{heme})$ at 19.0 °C.

良く一致している。だからこの系は ④ の weak charge transfer interaction の場合、つまり Hubbard sticking モデル であると指通できる。
 以上の緩和時間の解析から表 2 に まとめた様に「この系では C_6F_6 分子 とラジカルとが並進的な衝突を支配的 におこない、その飛行時間が 4×10^{-10} 秒で、 C_6F_6 の F 核と DTBN のラジカル中 心とが最近接距離 3.2 \AA までになり、 又この並進衝突をくぐりす間に 1.5×10^{-10} 秒の寿命の transient complex を作り この時ラジカル中心から F 核に近のスピ ン密度を誘起して $A_F \approx 7 \times 10^5 \text{ Hz}$ を与えている」

2-b) HRP を含んだ水の系 文献④

HRP を含んだ水のプロトンは並進拡散による相関時間 τ_c が $\sim 10^{-9}$ 秒とおるので Hubbard 理論による緩和の影響 はほとんどない。(Case ④, ⑤は考えられない)
 常磁性金属を含む水のプロトン緩和は次式に表わされる。

$$1/T_{1p} = f_{pr} / (T_{1M} + T_M) \quad (3)$$

(ここで T_{1M} : Solomon-Bloembergen による緩和時間, T_M : 回転換 速度)。図 3 の T_{1p} (ただし $T_{1p}^{-1} = T_{1HRP}^{-1} - T_{1HRP-CN}^{-1}$) の 温度依存性では昇温につれて緩和速度が減少して いる。従って $1/T_{1p} = f_{pr} / T_{1M}$ となり、この系が Solomon- Bloembergen の式で解析できる。(Case ①)

図 3, 4 の結果から酸素溶液の水のプロトン緩和が、 HRP μM 鉄の電子スピン緩和時間 τ_s によって支配されて いることが分かる。($\tau_s \approx \tau_e \approx \tau_s$) 図 3 の温度依存性か らは、 τ_s による拡散の活性化エネルギー (3.6 kcal/mol)

が又図 4 の周波数依存性からは近似的に τ_s , μM 鉄の電子スピンと水プロトンとの有効隔間距離 r_{HS} と $|A_H|$ とが求まる。このコンタクト結合定数 $|A_H|$ は緩和時間の比 $T_{1p}/T_{2p} \approx 1.8$ から概算される。 以上のことから「HRP を含んだ水の系では、水が μM ボケット内で μM 鉄と水が $r_{HS} \approx 3.9 \text{ \AA}$ で分子間 的に相互作用し、水プロトンは主に鉄の電子スピンの影響によって ($\tau_s \approx 10^{-9}$ s) 拡散されている。 さらに鉄の電子スピンから $|A_H| \approx 2.5 \text{ MHz}$ のスピンの誘起されている」

文献) ① Endo, Morishima & Oonogawa J. Chem. Phys. (in press) 1977.
 ② Hubbard Proc. R. Soc. A, 291, 537 (1966), ③ Endo et al. (to be published)
 ④ Morishima et al. (to be published), ⑤ Lanir et al. BBRC, 62, 199 (1975), etc.

Molecular Motion and Relaxation in Molecular Liquids Containing Paramagnetic Substances

Kazunaka Endo

Department of Physics, Faculty of Science, Kyoto University

Isao Morishima, Satoshi Ogawa and Teijiro Yonezawa

Department of Hydrocarbon Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University

Kyoto, Japan

Abstract

The pulsed NMR method has been used to investigate the nuclear spin relaxation for solvent molecules containing paramagnetic substances. Detailed measurements have been performed for hexafluorobenzene (HFB) involving the DTBN radical and for water molecule containing the horseradish peroxidase (HRP).

The study on the frequency dependence of the fluorine relaxation time affords the information on the dynamical aspects of the HFB-DTBN charge transfer interaction. The observed ^{19}F relaxation rate was analyzed on the basis of the Hubbard and Solomon-Bloembergen theories. The ^{19}F relaxation of the HFB molecule in the presence of DTBN is explained by the Hubbard sticking model. It is to be noticed that the hyperfine coupling constant for fluorine and the rate of chemical exchange for HFB-DTBN charge transfer interaction were evaluated as $A_{\text{F}} \simeq 7 \times 10^5 \text{ Hz}$ and $\tau_e \simeq 1.5 \times 10^{-11} \text{ s}$.

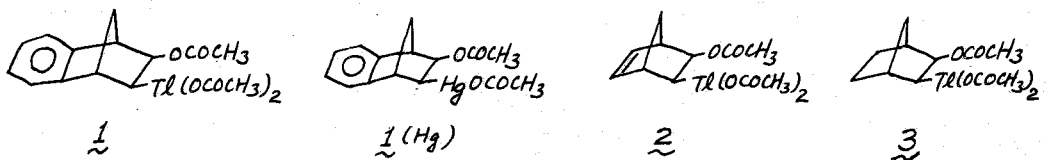
The proton relaxation rates of water molecule in the enzyme HRP solution were measured as a function of temperature and frequency. The molar paramagnetic relaxation rates of water protons $T_{i\text{P}}^{-1}(\text{heme})^{-1}$ ($i = 1, 2$) decreased monotonically with increasing temperature ($E_{\text{act}} = 3.6 \text{ kcal/mol}$) and T_1/T_2 ratios in the enzyme solution were found to be about 1.8 in the frequency and temperature ranges examined, indicating an appreciable hyperfine interaction between the water and the ferric heme iron. These results reveal that the enzyme has a water molecule at the sixth coordination position of the heme weakly bound to the ferric iron.

309 (E7) 安定ニトロキシドラジカルのデカップリング試薬としての利用

(京大工) 〇犬伏 俊郎・森島 績・米沢 貞次郎
 (京大化研) 植村 栄・三好 晴雄・岡野 正弥

我々はこれまでに、安定有機ラジカルと種々の有機分子、生体関連分子との相互作用によって誘起されるコンタクトシフト並びに緩和現象を追求し、これらがラジカルとの水素結合、電荷移動相互作用に基づくことを明らかにしてきた。¹⁾ さらにこれらの現象は有機分子、生体分子の分子構造や、水素結合の有無、位置、強さなどについて極めて有用な知見を与える。殊に、オリゴペプチドにおけるNH...O=C分子内水素結合の検出、また核磁気塩基モデル分子の相補的塩基対における水素結合の強さに関して、ニトロキシドラジカルによるNHプロトンシグナルの緩和現象が極めて鋭敏かつ有用であることを明らかにしてきた。²⁾ これらの現象は何れもX-H...O-Nなる水素結合に由来するものであり、従って水素結合に関与する現象を検索するのに有効である。本研究では、この様なラジカル分子の相互作用様式、並びにその利用法に加え、有機タリウム化合物とのルイス酸-塩基型相互作用に基づく¹³C-²⁰⁵Tl スピンデカップリング現象について報告する。一般に、有機タリウム化合物の¹³C NMR スペクトルは、例えば有機水銀化合物の様にJ¹³C-¹⁹⁹Hgが²⁰¹Hg (I=0) に由来する信号のサテライトとして容易に解析出来るのに対し、²⁰⁵Tl (70%), ²⁰³Tl (30%) 共にI=1/2の多重線となり、そのスペクトルの解析、殊に遠隔¹³C-²⁰⁵Tl スピン結合定数の決定は困難を極めた。今回は、ニトロキシドラジカルを利用した種々の有機タリウム化合物の¹³C NMR スペクトルの解析法と、得られた遠隔¹³C-²⁰⁵Tl スピン結合定数についての知見を報告したい。

〔実験〕 用いた安定有機ラジカルである di-tert-butyl nitroxide ラジカル (DTBN) は既報の方法に従って合成した。¹⁾ 有機タリウム化合物 (1-3) 並びにその水銀同族体 (1(Hg)) はそれぞれ対応するオレフィンと Tl(OAc)₃ 及び Hg(OAc)₂ の反応により合成した。¹³C NMR スペクトルの測定には日本電子社製 PFT-100 分光器を用い、通常 10 KHz のスペクトル巾、45 パルス (12 μsec)、繰り返し時間 1.0 sec、8 K データポイントを使用し、一部、測定精度を上げるため、5 KHz スペクトル巾でも測定を行った。



いぬよし としろう・もりしま いさお・よねさわ ていじろう・うえむら まかえ・
 みよし ほるお・おかの まさゆ

〔結果と考察〕

1. ニトロキシドラジカルによる¹³C-²⁰⁵Tlスピンの結合のデカップリング現象と、有機トリウム化合物の¹³C NMRスペクトルの解析法

Fig. 1b に有機トリウム化合物 1 の¹³C NMR スペクトルを示した。一般に有機トリウム化合物はこの様に複雑なスペクトルを与え、¹³C-²⁰⁵Tlスピンの結合による doublet の対を決めることがスペクトル解析の第一歩となる。Fig. 1b において、+186.1 ppm と -38.3 ppm 及び +185.1 ppm と -37.3 ppm に観測される二つの doublet シグナルは結合定数に²⁰⁵Tl と²⁰³Tl の同位体効果が認められること、並びにその結合定数が大きい

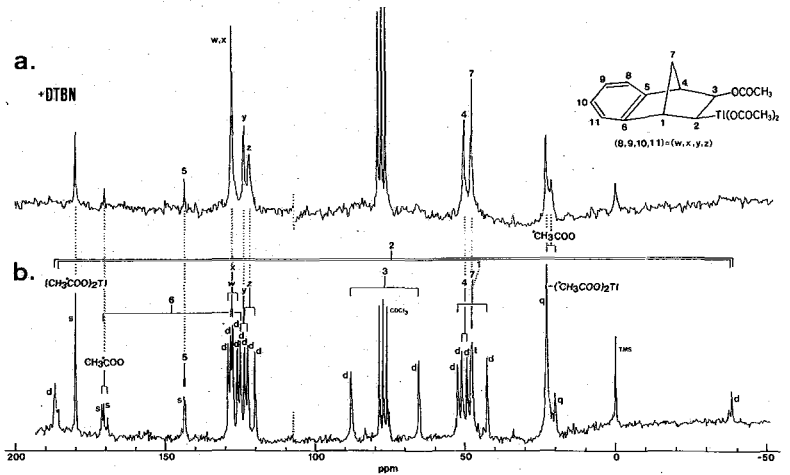


Figure 1

¹³C NMR spectra of 1 dissolved in CDCl₃ (150 mg/1 ml) in the absence (bottom) and presence (top) of ³DTBN (2 μl/1 ml). The signs of s, d, t, q in the bottom spectrum designate singlet, doublet, triplet, and quartet patterns in the proton nondecoupled spectrum respectively.

ことから C₂ に帰属する。即ち前者は $^1J^{13C-^{205}Tl} = 5645 \text{ Hz}$ であり、後者は $^1J^{13C-^{203}Tl} = 5593 \text{ Hz}$ に由来し、それぞれシグナル強度は同位体の天然存在比 7:3 に一致する。またその結合定数の比は 1.0093 となり、 $\delta^{205Tl} / \delta^{203Tl} = 1.0099$ と一致する。これ以外に Fig. 1b では Tl 原子の配位子 (OCOCH₃)₂ のみが帰属する。この試料に DTBN を添加 (2 μl/1 ml) すると Fig. 1a に示した様に¹³C NMR スペクトルは一部シグナルの消失を伴い単純化された。即ち、50.0 ppm と 47.5 ppm に観測された C₄, C₇ に由来する二つの doublet シグナルはデカップリングされ、それぞれ singlet の信号を与える。この DTBN 添加効果が最も著しいのは 120-130 ppm (Fig. 1b) の C₈, C₉, C₁₀, C₁₁ に基づくベンゼン環の 8 本の¹³C シグナルが Fig. 1a で 4 本 (うち 2 本は重なっている) に観測されることである。さらに、3 位 CH₃COO-基も、メチル炭素、カルボニル炭素共に²⁰⁵Tl との結合を持つことが分かる。また DTBN の添加によって消失したシグナル、即ち、C₁, C₂, C₃, C₆ (C₃は $^1J^{13C-^1H} = 162 \text{ Hz}$ で他のものより大きいことから帰属) はそれぞれ Tl 原子に近い骨格に位置し (換言すれば¹³C-²⁰⁵Tl 結合定数が比較的大きい炭素)、Tl 原子と DTBN の相互作用の結果伝播された電子スピンによる緩和によって広巾化し消失したものと考えられる。即ち、Tl と DTBN 間の相互作用が選択的であることを示している。これらのスピンドカップリング現象は、¹³C 核とのスピンの結合に与える²⁰⁵Tl 核のエネルギー準位が、有機ラジカルによる速い緩和によって乱された結果生じたものと考えられる。帰属した 1, 2, 3 の解析結果と 1 の Hg 同位体との比較を併せ Table 1

にまとめらる。

Table 1. ^{13}C Chemical Shifts^a and ^{13}C - ^{205}Tl and ^{13}C - ^{199}Hg Coupling Constants^b of

Compound	1, 2, 3, and 4(Hg) in CDCl_3											w	x	y	z ^c
	1	2	3	4	5	6	7	2- $^*\text{CH}_3\text{COO}$	3- $^*\text{CH}_3\text{COO}$	2-CO	3-CO				
<u>1</u>	47.3 (244)	73.9 (5645)	76.3 (569)	50.0 (45)	142.9 (11)	147.2 (1149)	47.5 (7)	22.8	21.4 (68)	179.1	169.7 (51)	127.3 (18)	127.0 (77)	123.2 (65)	121.3 (86)
	[5593]														
<u>1^d</u>	47.7 (215)	68.9 (6321)	77.1 (554)	50.8 (59)	144.1 (15)	148.9 (1101)	47.8 (5)	23.0	21.4 (56)	177.5	169.9 (46)	127.4 (17)	126.7 (71)	123.2 (59)	121.4 (78)
	[6262]														
<u>1(Hg)</u>	47.3 (43)	54.2 (1730)	78.1 (119)	50.1	142.5	149.0	48.2	23.4	21.6	177.2	170.1	126.8	126.3	122.9	120.5
<u>2</u>	45.7 (244)	72.9 (5471)	75.2 (420)	48.2 (<3)	135.5 (120)	140.3 (1057)	47.4 (17)	22.8	21.2 (49)	179.4	n.o. ^e				
	[n.o.] ^e														
<u>3</u>	40.5 (320)	76.4 (5750)	78.7 (681)	42.8 (27)	23.9 (64)	29.4 (1301)	35.7 (32)	22.6	20.8 (59)	179.1	169.2 (66)				
	[5696]														

^a Given in ppm downfield from internal TMS. ^b $J_{^{13}\text{C}-^{205}\text{Tl}}$ and $J_{^{13}\text{C}-^{199}\text{Hg}}$ are shown in () (Hz); $J_{^{13}\text{C}-^{203}\text{Tl}}$ in [] (Hz). ^c w, x, y, z are referred to as ^{13}C signals of benzene peripheral carbons (8, 9, 10, 11). ^d Measured in d_5 -pyridine. ^e Not observed.

2. 遠隔 ^{13}C - ^{205}Tl スピン結合定数の性質

上記 Table 1 に見られる $^3J_{^{13}\text{C}-^{205}\text{Tl}}$ はトリウム化合物の複体数が限られてはいるものの Karplus 型の二面角依存性を示す。即ち、 C_4 ($\theta = 120^\circ$, $J = < 59 \text{ Hz}$), C_6 ($\theta = 170^\circ$, $J = 1301 \text{ Hz}$), C_7 ($\theta = 85^\circ$, $J = 5-32 \text{ Hz}$) である。またノルボルナン、ノルボルネン骨格における僅かな構造変化を反映して、 C_3 , C_4 , C_5 , C_7 などの $J_{^{13}\text{C}-^{205}\text{Tl}}$ に顕著な差が認められる。これらの $J_{^{13}\text{C}-^{205}\text{Tl}}$ は Hg 同族体に見られる $J_{^{13}\text{C}-^{199}\text{Hg}}$ より 3-6 倍程大きく、 $\delta^{205}\text{Tl} / \delta^{199}\text{Hg} = 3.2$ によく一致し、そのスピンの結合のメカニズムが、水銀のそれと似ていることが示唆される。また、Tl 原子の配位子 (CH_3COO)₂ はそのイオンの結合のため ^{13}C - ^{205}Tl スピン結合を妨げるのに対し、3位の CH_3COO 基は 4~5 の結合を隔てているにも拘らずメチル炭素、カルボニル炭素共に大きな ^{13}C - ^{205}Tl 結合が観測されることは、空間的に Tl 原子に近接している為の through space 相互作用 (spin-dipolar, spin-orbit coupling) の存在が示唆される。さらに発表当日には、±~3 以外の有機トリウム化合物に関するデータを併せ、その溶媒効果などの議論も展開したい。

文献

- 1) I. Morishima, K. Ishihara, K. Tomishima, T. Inubushi, and T. Yonezawa, *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 2749 (1975) and references therein.
- 2) I. Morishima, T. Inubushi, T. Yonezawa, and Y. Kyogoku, *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 4299 (1977).

Stable Nitroxide Radical as a Nuclear Spin Decoupling Reagent. Application to
 ^{13}C NMR Studies of Organothallium Compounds

Toshiro Inubushi, Isao Morishima, and Teijiro Yonezawa

Department of Hydrocarbon Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University,
Kyoto 606, Japan

Sakae Uemura, Haruo Miyoshi, and Masaya Okano

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611, Japan

It is well established that thallium in organothallium compounds serves as a Lewis acid toward electron donating Lewis base such as pyridine and triphenylphosphine oxide. This may allow us to expect that nitroxide radical also forms weak complexes with organothallium compounds at the central metal atom, resulting in effective relaxation of thallium nuclei. We now report a first example of utility of di-tert-butyl nitroxide radical as a carbon-thallium nuclear spin decoupling reagent. The ^{13}C NMR spectra of organothallium compounds are very much complicated due to large ^{13}C -Tl couplings and long range couplings. These ^{13}C - ^{205}Tl couplings are readily decoupled to afford very simple spectra to be assigned easily by the addition of this nitroxide radical. This novel technique allowed us to analyze ^{13}C NMR spectra of benzonorbornadiene-Tl(OAc)₃ adduct (1), norbornadiene-Tl(OAc)₃ adduct, and norbornene-Tl(OAc)₃ adduct to obtain long range ^{13}C - ^{205}Tl coupling constants. In the case of (1), the coupling constants between Tl and C where thallium is attached were revealed to be $J_{^{13}\text{C}-^{205}\text{Tl}} = 5645\text{Hz}$ and $J_{^{13}\text{C}-^{203}\text{Tl}} = 5593\text{Hz}$ respectively, with relative intensity of 7/3, equal to those of ^{205}Tl and ^{203}Tl natural abundance. In order to further substantiate these ^{13}C signal assignments we have also measured ^{13}C NMR spectra of the corresponding mercury analogues which consist of normal and satellite signals arising from $^{201}\text{Hg}(I=0)$ - and $^{199}\text{Hg}(I=1/2)$ -containing species respectively. The analyzed ^{13}C - ^{205}Tl couplings were discussed in relation to conformational dependence, a Karplus-type of dihedral angle dependence being observed. This radical-induced decoupling may be universally useful for other organometallic compounds of which NMR spectra are too much complicated due to metal-carbon or metal-proton coupling.

(国立公害研)

○古田直紀 ・ 不破敏一郎

<序論>

環境中の重金属を分析するのに、原子吸光分析・発光分析・ケイ光X線分析が広く用いられている。原子吸光分析・発光分析では、試料を原子化する操作がはいる為、測定中に試料が破壊されてしまう。しかし定量という面においては、感度よくしかも精確度のあるデータを得ることができる。ケイ光X線分析では、感度の点では必ずしも満足の中けるものではないが、特に固体試料中の重金属を非破壊分析するのに便利である。このような分析手段の目覚しい発展により、微量金属の絶対量をppbレベルで測定することは、比較的容易になってきた。その次の段階として、それら微量金属がどのような環境のもとで、どのような運動をし、どのような役割りを果しているかという情報が必要となる。その情報を得る為にNMRを応用した。

環境問題にNMRを応用するにあたって一番問題になるのは感度である。2万の分子量をもつ生体高分子中の1個のカドミウム、水銀、鉛を直接 ^{113}Cd , ^{199}Hg , ^{209}Pb で測定しようとする、それぞれ750, 1600, 1760 ppmの高濃度の試料が必要になる。そこで情報としてはあいまいにはなるが、 ^{35}Cl をプローブとした間接的手段を用いられれば数ppmレベルの重金属の動態を研究しうる。 ^{35}Cl をプローブとして今まで報告されてきた例は、次のように大きく3つに分けることができる。

- (1) タンパク質のSH基に結合させた水銀に結合する塩素イオンの交換を観測する。
- (2) 基質に結合させた水銀に結合する塩素イオンの交換を観測する。
- (3) 金属酵素(特に亜鉛を含む酵素)の金属に結合する塩素イオンの交換を観測する。

今までの研究は、1種類の金属(主に水銀かまたは亜鉛)に結合する塩素イオンと、まわりに存在する自由な塩素イオンとの2つのサイトの交換を考えるのが普通であった。本研究では、その交換している系に別の金属を加えていった時の変化を、 ^{35}Cl をプローブとして追跡し重金属の状態分析を行った。

<測定条件>

NMR装置はブルッカー社製SXP4/100(90MHz)を使用した。共振周波数は8.817MHzで、パルス中10 μs 、くりかえり時間1sで測定した。スペクトル中600Hzのデータポイント4K(0.15Hz/ポイント間隔)でスペクトルを得た。温度は常に313Kに設定した。

<磁場の不均一性>

通常NMRの線中は、真の T_2 による線中($1/\pi T_2$)に主磁場の不均一性による線中($\pi\Delta H_0/2\pi$)が加わった見かけの線中($1/\pi T_2^*$)として観測される。Carr-Purcell-Meiboom-Gill法により、 ^{35}Cl の真の T_2 を求めた。 T_2 は21.9msであったので磁場の不均一度がない時には、線中は14.5Hzになるはずである。シムの調整を行うこ

とにより、あらかじめNaCl 3%水溶液の線巾が16 Hz以下であることを常に確認して実験を行った。

〈実験操作〉

Na_2HPO_4 1/15M, KH_2PO_4 1/15M NaCl 3%水溶液を作り、6:4の割合で混合しリン酸緩衝溶液(pH 6.50)とした。NaCl 3%水溶液, グルタチオン(還元型) 10^{-2} M NaCl 3%水溶液, 重金属(ZnCl_2 , $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10^{-2} M NaCl 3%水溶液を用意した。

実験 1 3% NaCl 水溶液 2 ml 中に重金属 NaCl 3% 水溶液 20 μl 加えて、 ^{35}Cl NMR を測定し、フリーな金属が ^{35}Cl NMR 線巾に及ぼす影響を調べた。

実験 2 リン酸緩衝溶液 2 ml にグルタチオン NaCl 3% 水溶液 20 μl 加えて、その溶液中に重金属 NaCl 3% 水溶液を 5 μl ずつ加え線巾の変化を追跡した。

実験 3 リン酸緩衝溶液 2 ml にグルタチオン NaCl 3% 水溶液 20 μl と重金属 (Cd, Zn, Cu) NaCl 3% 水溶液 20 μl を加え、その溶液中に $\text{HgCl}_2 \cdot \text{NaCl}$ 3% 水溶液を 5 μl ずつ加え線巾の変化を追跡した。

〈理論〉

$\omega\tau_c \ll 1$ の条件のもとで ^{35}Cl NMR の線巾は次式で求めることができる。

$$\Delta\nu = 2\pi/5 \cdot (e^2qQ)^2 \cdot \tau_c \quad (1)$$

e^2qQ : 四極子結合定数 τ_c : 相関時間

^{35}Cl のサイトが n 個存在し、それぞれが適度に交換している時、観測される ^{35}Cl NMR 線巾 $\Delta\nu_0$ は、それぞれのサイトに対する線巾 $\Delta\nu_i$ と、その存在確率 P_i の積の総和となる。

$$\Delta\nu_0 = \sum (\Delta\nu_i) \cdot P_i \quad (2)$$

今、 a と b の2つのサイトが存在し、 $[a] \gg [b]$ の時には、

$$\Delta\nu_0 = \Delta\nu_a + [b]/[a] \cdot (\Delta\nu_b) \quad (3)$$

となり、 $\Delta\nu_a$, $[a]$, $[b]$ を知っていれば、 $\Delta\nu_b$ を求めることができ、式(1)を使って相関時間 τ_c を算出することができる。

〈結果および考察〉

実験 1 NaCl 3% 水溶液、 Hg 20 μl , Cd 20 μl , Zn 20 μl , Cu 20 μl の線巾は、それぞれ 15.4, 20.7, 17.1, 15.5, 27.5 Hz であった。式(3)を使って、 $[\text{HgCl}_4]^{2-}$, $[\text{CdCl}_4]^{2-}$, $[\text{ZnCl}_4]^{2-}$ の $\Delta\nu_b$ の値を、6450, 2280, 90 Hz と求めた。銅の場合には、常磁性効果も加わり線巾がかなり広がって観測された。水銀の場合の四極子結合定数 40 MHz を使い、式(1)より $[\text{HgCl}_4]^{2-}$ の τ_c を 3.2×10^{-12} s と求めた。

実験 2 Fig. 1 a b c d に実験結果を示した。重金属 NaCl 3% 水溶液を 20 μl 加えた時の線巾より、式(3)を使って、 $[\text{GHgCl}]$, $[\text{GCdCl}]$, $[\text{GZnCl}]$ の $\Delta\nu_b$ の値を、67000, 4188, 2617 Hz と求めた。銅の場合には、グルタチ

オンのSH基以外の基による配位が強い為、Clが交換する部位が残されていなかったの
 であろう。Hg, Cd, Znの場合は、等モル量がグルタチオンのSH基に結合すると、
 それ以降は、 $[Hg_2Cl_4]^{2-}$, $[CdCl_4]^{2-}$, $[ZnCl_4]^{2-}$ として溶液中に存在している。
 図中に示した直線は、求めた $\Delta\nu_b$ の値より、式(2)を使って導いたものである。水銀の
 $\Delta\nu_b$ の値を使って $[GHgCl]$ の τ_c を 3.3×10^{-11} sと求めた。これは $[Hg_2Cl_4]^{2-}$ と比
 較すると約10倍程運動が束縛されていることを示している。 $[GCdCl]$ と $[GZnCl]$
 の τ_c が $[GHgCl]$ の τ_c と等しいとして、式(1)よりカドミウムと亜鉛の場合の
 四極子結合定数を10MHzと、8MHzと推定した。

実験 3 Fig 1 e f g に実験結果を示した。CdとZnの場合は、Hgを滴下してゆ
 く、グルタチオンの結合サイトがHgによりすべり置き換えられている。CdとZnの
 四極子結合定数がHgに比較して小さいので、Cd, Znによる ^{35}Cl NMR線中への影
 響は無視できる。Cuの場合、滴定曲線の傾きがFig 1 aのHgCl₂ 20 μ l以上加えた
 時の傾きにはほぼ等しくなっている。このことは、CuがHgよりも強くグルタチオンに結
 合している為、加えられた水銀は $[Hg_2Cl_4]^{2-}$ として存在していると考えられる。この結
 果より、グルタチオンと金属の結合力はCu > Hg > Cd, Znの順になっていることが
 明らかになった。

本実験の手法により、カドミウムや亜鉛を含む酵素に水銀を滴下してゆくことにより、
 まわりのClと交換可能な金属のサイトの数を知ることができ、線巾の変化より、相関時
 間 τ_c を求めることが可能である。

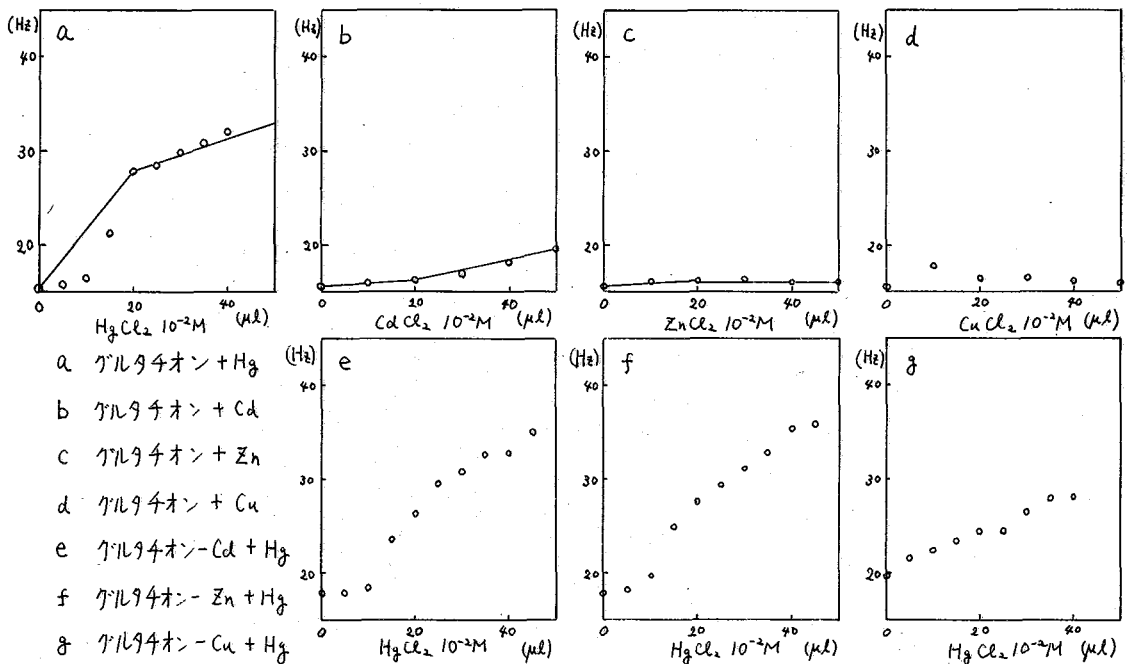


Fig. 1 グルタチオンに対する重金属の滴定とグルタチオン-重金属に対する水銀の滴定

STATE ANALYSIS USING CHLORINE-ION PROBE NMR TECHNIQUE

N. FURUTA and K. Fuwa

Department of Chemistry and Physics, National Institute for Environmental Studies,
Yatabe, Ibaraki 300-21, Japan.

In order to elucidate the state of the heavy metal in the environmental system, we tried to apply NMR spectroscopy. For measuring the heavy metal directly by NMR the sensitivity is not enough, then we used the chlorine-ion probe technique. Up to the present, some workers observed the exchange of the chlorine ion between one kind of metal (mainly mercury) and surrounding site. In this study we added gradually another kind of metal in the exchanging system, and measured the change of ^{35}Cl NMR linewidth.

In the case of cadmium and zinc, glutathione reacts with an equal mole of metal ion at the SH group. If a mercury ion is introduced into the system after the reaction, the mercury ion substituted with cadmium and zinc ions. But in the case of copper, a mercury ion cannot replace because the copper ion binds to glutathione strongly. From these facts it is clarified that the binding force between glutathione and metal ion is stronger in the order of Cu Hg Cd and Zn.

From the change of ^{35}Cl NMR linewidth, the correlation times of $[\text{HgCl}_4]^{2-}$ and [Glutathione-HgCl] can be obtained as 3.2×10^{-12} s and 3.3×10^{-11} s, respectively.

311 (E9)相転位を伴うリノール酸ナトリウム-水系の ^{23}Na -NMRによる研究

(京府医大) 西川 弘恭, 吉崎 和男, 山田 誠二, 亘 弘

[序] リノール酸ナトリウム-水系(リノール酸ナトリウム濃度あるいは温度に依存して六方晶構造をなしに液晶相あるいは等方的溶液相を示す。SHPORERら(1)は液晶相のリノール酸ナトリウム-水系において、ナトリウムの信号強度が対照として glycerol と水と NaOH の混合試料の信号強度に比し、34~39%しかないこと、また微分型スペクトルで central signal と2つの satellite signal を観察した。 ^{23}Na -NMRにおけるこのような現象は ^{23}Na の核スピンの量子数が2であるために、電場勾配の存在する系においては電気四重極効果が静磁場中でのゼーマンエネルギーのレベルと核磁気緩和に影響する。これらについて理論的に ABRAGAM(2), BULL(3), HUBBARD(4)らが論じている。今回リノール酸ナトリウム-水系について高分解能NMRにより得た Fourier transform スペクトルから、試料の相と ^{23}Na のスペクトル変化を対応させ脂質とNaイオンの相互作用を検討する。また、central signal と satellite signal の縦緩和時間と横緩和時間を求め、電気四重極効果の存在する系における核磁気緩和に関する理論と実験結果を対応させ ^{23}Na の緩和を検討する。

[方法] リノール酸 1.00g と NaOH 0.142g と蒸留水 2ml を十分に混合し(リノール酸とNaが等モルの試料を用いた。さらにこの試料に蒸留水を加え、2倍、4倍に希釈したものを試料として、NMR信号強度の対照としてリノール酸ナトリウム-水系試料と同じナトリウム量を含むNaCl溶液を用いた。NMR測定はパルスFT-NMR spectrometer (JNM-FT-100) を 24MHz, 21304 Gauss で用いた。磁場を安定させるために ^2D -external lock を用いた。データの積算および Fourier transform には FT-NMR data treatment computer system (EC-100) を用いた。試料の温度は JNM-VT-3C で $\pm 1^\circ\text{C}$ の範囲で制御された。信号強度は信号の高さと半値巾の積により表わされ、高さと半値巾は記録されたスペクトルより読みとった。縦緩和時間(T_1)の測定は 180° - 90° パルス系列を、横緩和時間(T_2)の測定は 90° - 180° パルス系列を用いた。

[結果] (1). リノール酸 1.00g, NaOH 0.142g, 蒸留水 2ml の割合で混合しに試料のナトリウムの Fourier transform スペクトルを得、Fig. 1(a) に示した。SHPORERら(1)が微分型スペクトルで報告したように一つの central signal と二つの satellite signal が観測され、各々の半値巾は 59.6Hz と 560Hz であった。一方この試料を $1/4$ に希釈したときのスペクトルを Fig. 1(b) に示した。この場合 satellite signal は見られず、central signal のみであり、その信号強度は対照の NaCl 溶液の信号強度に等しかった。(2). $1/2$ に希釈した試料で、測定温度を変えて得たスペクトルを Fig. 2 に示した。測定は 0, 10, 20, 30, 40, 45, 50, 60 $^\circ\text{C}$ でを行い、0 $^\circ\text{C}$ から 45 $^\circ\text{C}$ のスペクトルを示した。0 $^\circ\text{C}$ から 40 $^\circ\text{C}$ のスペクトルでは satellite signal が見られしたが 45 $^\circ\text{C}$ 以上ではみられなかった。(3). $1/2$ に希釈した試料のスペクトルの central signal の信号強度と対照の NaCl 溶液の信号強度の比を測定温度でプロットし、Fig. 3 に示した。この結果 0 $^\circ\text{C}$ から 40 $^\circ\text{C}$ では約 40%, 50 $^\circ\text{C}$ 以上では約 100% の信号強度が得られた。(4). Fig. 2 より quadrupole coupling constant を求め、測定温

にしかわ ひろやす, よしざき かずお, やまだ せいじ, わたり ひろし

度についてプロットし、Fig.4に示した。この結果 quadrupole coupling constant は温度の上昇に伴い増加していることがわかる。(5).

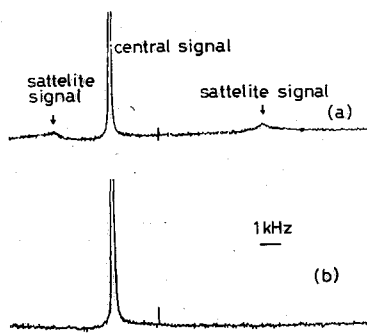


Fig.1. NMR spectra of sodium linoleate - water systems at 20°C in two different concentrations.

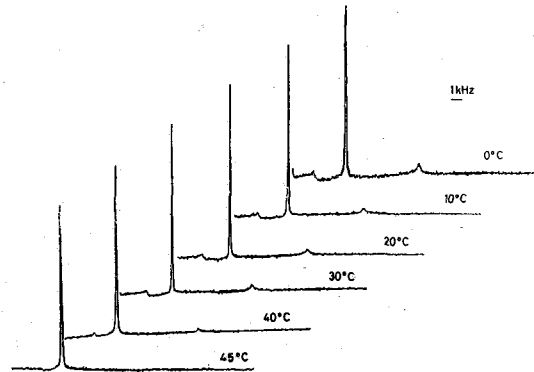


Fig.2. Temperature dependence of NMR spectra of sodium linoleate - water system.

Fig.2の central signal の半値巾を測定温度に対して

プロットし Fig.5 に示した。(6). 測定温度 20°C における satellite signal の緩和時間 (T_1) の測定結果を Fig.6 に、緩和時間 (T_2) の測定結果を Fig.7 に示した。これらより satellite signal の $T_1 = 6\text{msec}$, $T_2 = 0.9\text{msec}$ が得られた。central signal の T_1 および T_2 測定の結果は Fig.8, 9 に示した。これらより $T_1 = 8\text{msec}$, $T_2 = 7\text{msec}$ が得られた。

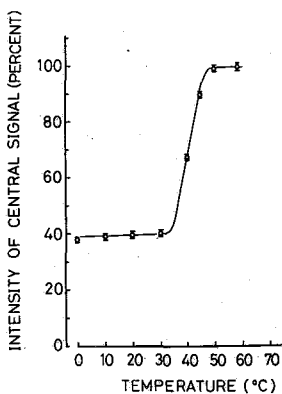


Fig.3. Temperature dependence of intensities of central signals.

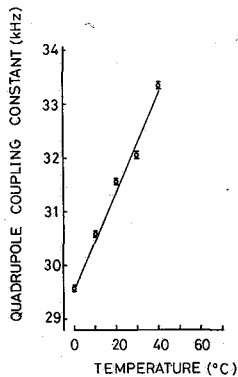


Fig.4. Quadrupole coupling constants at various temperatures.

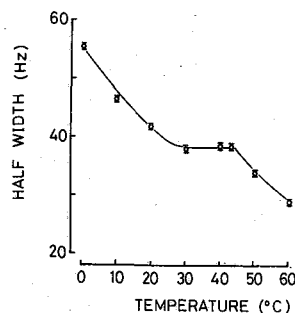


Fig.5. Temperature dependence of the width at half height of central signal.

[考察] (1). リノール酸ナトリウム-水系の相と NMR スペクトル: リノール酸ナトリウム-水系の液晶は極性基を外方にもった六方晶型の断面をもつ棒が規則正しく配列している。このような立体構造は温度の上昇またはリノール酸濃度の低下により等方性溶液となる相転位をもつ相図を示す。リノール酸ナトリウム-水系の立体構造の変化に対応して Fig.1a, b では濃度, Fig.2 では温度によりスペクトルの変化が観察される。すなわち central signal の信号強度と温度の間には 45°C 付近に相転位を示す変化がみられ、この相転位を示す温度以上では satellite signal が見られない。これら脂質と相互作用するはイオンから得られる NMR データより、液晶構造と脂質極性部位の動きの解析が可能である。quadrupole coupling constant は e^2qQ/h で、 eQ は電場勾配, eQ は電気四重極モーメント ($Q = 1.1 \times 10^{-25} \text{cm}^2$), h はプランク定数である。これらの e, Q, h は一定である故に変化する要素としては eQ である。したがって、Fig.4 に示したように温度の上昇につれて quadrupole coupling constant が増加しているのは eQ の増加による。これは ^{13}C 原子核の周囲の電場勾配 (空間電荷密度) が増加していることを示

している。この現象と液晶構造との関係は検討中である。

(2) リノール酸ナトリウム-水系におけるナトリウムの核磁気緩和:

HUBBARD(4)

BERENDSENら(5)

は核スピン $I=3/2$ をもつ場合縦緩和時間と横緩和時間は各々2つ存在するがNaCl溶液での ^{23}Na の緩和時間は $T_1=T_2=1/(\rho/\tau)$ で表わされ、各々1つしか存在しないことを理論的に報告している。リノール酸ナトリウム-水系の T_1 と T_2 はcentral signalの $T_1=8\text{msec}$, $T_2=7\text{msec}$, satellite signalの $T_1=6\text{msec}$, $T_2=0.9\text{msec}$ であった。両 T_1 はほとんど等しく、 T_2 はsatellite signalの方がcentral signalより小さく、明らかに2種の T_2 の存在を示している。また両 T_1 とcentral signalの T_2 はほとんど等しい値である。これらの結果はBERENDSENら(5)がmedium-Range Orderの系における緩和を示した理論に一致している。

[文献]

1. M. SHPORER and M.M. CIVAN, Biophys. J., 12, 114 (1972)
2. A. ABRAGAM, "Principles of Nuclear Magnetism", Clarendon Press, Oxford, 1956
3. T.E. BULL, J. Magn. Resonance, 8, 344 (1972)
4. P.S. HUBBARD, J.Chem. Phys., 53, 985 (1970)
5. H.J.C. BERENDSEN and H.T. EDZES, Ann. N.Y. Acad. Sci., 204, 459 (1973)

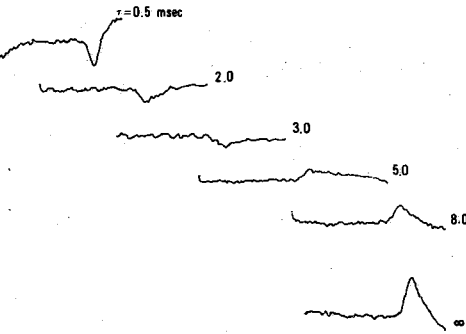


Fig.6. Use of the $180^\circ, \tau, 90^\circ$ pulse sequence and Fourier transformation of satellite signal to obtain T_1 for ^{23}Na in sodium linoleate - water system.

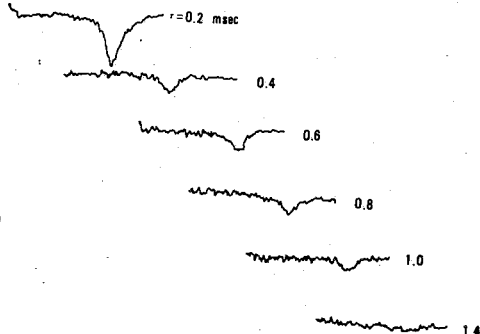


Fig.7. Use of the $90^\circ, \tau, 180^\circ$ pulse sequence and Fourier transformation of satellite signal to obtain T_2 for ^{23}Na in sodium linoleate - water system.

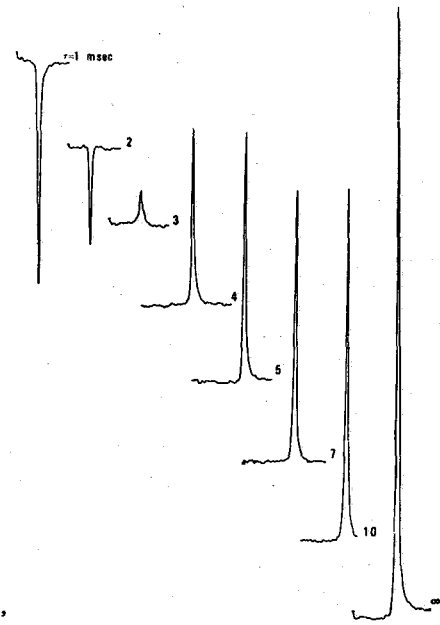


Fig.8. Use of the $180^\circ, \tau, 90^\circ$ pulse sequence and Fourier transformation of central signal to obtain T_1 for ^{23}Na in sodium linoleate - water system.

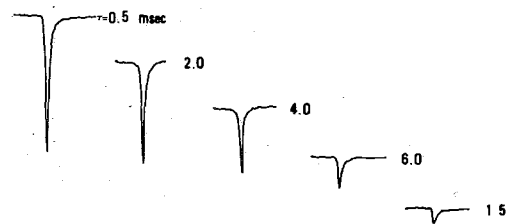


Fig.9. Use of the $90^\circ, \tau, 180^\circ$ pulse sequence and Fourier transformation of central signal to obtain T_2 for ^{23}Na in sodium linoleate - water system.

²³Na-NMR Studies on Linoleate Sodium - Water System with Phase Transition.

Department of Physiology
Kyoto Prefectural University of Medicine
Kyoto, Japan, 602

Hiroyasu Nishikawa, Kazuo Yoshizaki, Seiji Yamada and Hiroshi Watari

²³Na-NMR studies on linoleate sodium-water system were carried out at various concentrations and at different temperatures. In liquid crystal phase FT-NMR spectrum showed a central signal and two satellite signals, and the intensity of central signal was about 40 % of reference sodium chloride solution, whereas in the isotropic solution which was diluted to one-fourth, a central signal was observed with almost identical intensity with the reference sodium chloride solution. In sample diluted with distilled water of equal volume, satellite signals disappeared and the increase of the central signals were observed when the temperature of the solution was raised above 45 °C and the phase transition of linoleate sodium-water system was observed simultaneously. The quadrupole coupling constant increased as the temperature of determination was increased. The relation between the half width of central signal and the temperature of determination showed phase transition. These facts suggest that NMR measurements of sodium ion in this system will enable to analyze the interaction between sodium ion and polar group of lipid in various phases.

Longitudinal and transverse relaxation times of sodium in linoleate sodium-water system were measured at 20 °C. Longitudinal and transverse relaxation times of the central signal were 8 msec and 7 msec respectively. Those of satellite signal were 6 msec and 0.9 msec respectively. Longitudinal relaxation time of central signal was equal to that of satellite signal. Transverse relaxation of central signal was longer than that of satellite signal, and transverse relaxation time of central signal was nearly equal to longitudinal relaxation times of central and satellite signal. These facts coincide with the theory concerning the NMR relaxation of sodium in the system with medium-range order which was reported by Berendsen and Edzes.

312 (E10) ミトコンドリアの“エネルギー状態”とNMRスペクトル

(徳大教養)の吉川研一 (徳大薬)寺田 弘
(阪大蛋白研)京極好正

(序) ミトコンドリアは細胞内にある直径 $1\mu\text{m}$ 程度の顆粒であり、生物におけるエネルギー産生にあずかっている。そこでおこなわれている酸化リン酸化の反応機構については、数々の研究がなされてきている。しかしながら、ミトコンドリアの内区画(マトリックス部分)の水素イオン濃度や水の状態、更には、各エネルギー状態における膜の構造・運動性の変化などは、未だ余り明らかにされていない。これは、ミトコンドリア顆粒を破壊することなく、生理的に活性な状態を保ったままでの動的機能をミクロにとらえることのできる物理化学的手法が未だ確立されていないことが原因であると考えられる。今回、我々は、ミトコンドリアの各エネルギー状態に関する知見を得るために、NMR分光法の応用を試みた。

(実験)ミトコンドリアはラット肝臓から常法により分離した。(D.K. Myers & E.C. Slater, *Biochem. J.*, **67**, 558 (1957).) 測定に用いた *medium* の組成は、sucrose 200mM, MgCl_2 2mM, EDTA 1mM, リン酸緩衝液 15mM, pH 7.2 である。NMRは、日本電子製 FX-100分光器を使用し、 ^1H は100MHz, ^{13}C は25MHzにて測定した。 T_1 は $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ パルス(90° パルス: $15\mu\text{sec}$)により、カセットテープにFIDを記憶させ、その後フーリエ変換したもののシグナル強度から求めた。試料は、外径3mmのガラス管より自作した球形試料管を、5mm中のサンプル管に入れて、 T_1 測定を行なった。軽水試料の場合は、外管と内管の間に、NMR Lock 用に CDCl_3 を入れた。

(結果と考察)

^1H NMR Fig. 1に重水 *medium* 中のラット肝ミトコンドリアの ^1H NMRスペクトルを示した。a)では水と sucrose以外のシグナルは観測されていない。これに、基質(コハク酸)や、アンカップラー(SF-6847)、呼吸阻害剤(アンチマイシン)を加えても、スペクトルの変化はなかった。a)を室温(ca. 25°C)にて、約12時間放置後測定したものがb)である。 H_2O より、3.2~3.9ppm高磁場側に2つの線中の広いシグナルがみられる。Brownら(*J. Membrane Biol.*, **29**, 35 (1975).)は、イーストとラット肝ミトコンドリアの ^1H NMRを報告している。彼らは、イーストでは、

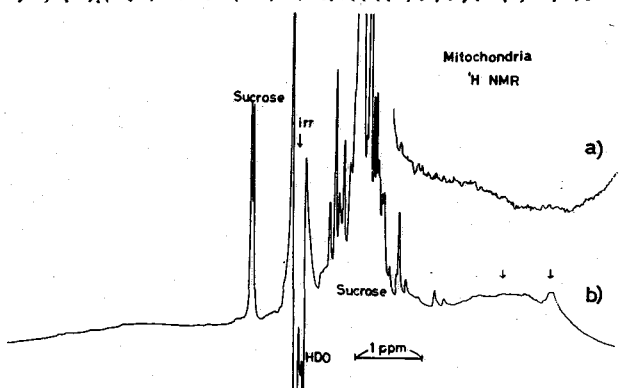


Fig. 1 ^1H NMR spectra of Mitochondria in sucrose- D_2O medium at 100 MHz. $^1\text{H}_2\text{O}$ was irradiated. a) "intact" mitochondria, b) on standing at room temperature for 12 hours.

○よしかわ けんいち, てらた ひろし, きょうごく よしまさ

脂質由来の高分解能のシグナルが得られ、ラット肝臓では、強度の弱く、非常に巾の広いシグナルしか得られないことを見出し、更に、後者の場合は、脂質ではなく、主としてタンパク質側鎖がみられていると推定している。しかし、彼らの実験条件では、イーストの場合には、外膜が既に破壊されているので、生理機能のある状態とは考えられない。ラット肝臓についても、我々の実験結果と比較すると、膜構造が一部破壊され、それによるシグナルが観測されていると考えらるゝが妥当であると思われる。

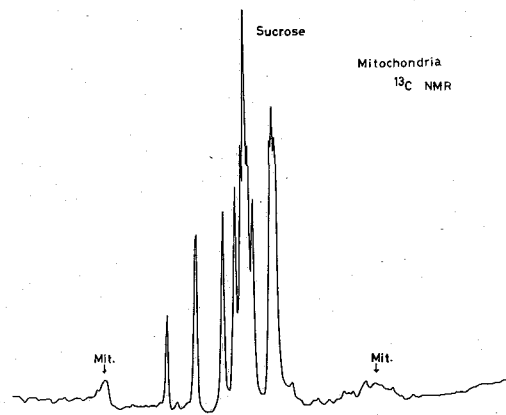


Fig. 2 ^{13}C NMR spectra of mitochondria in sucrose medium accumulated for 12 hours at 25 MHz.

^{13}C NMR Fig. 2は、ラット肝ミトコンドリアの ^{13}C NMRスペクトルである。

mediumのsucroseの大きいシグナルがあるが、それより高磁場側に、アリファティク炭素、より低磁場側には不飽和炭素によるシグナルがみられる。これについて、Kenoughら (Chem. Phys. Lipids, 10, 37 (1973))は、脂質由来であると推定している。しかし、 ^{13}C NMRでは、10時間程度の積算時間を必要とするので、この場合も生理的な状態を反映しているか否かについては疑問が残る。

水の状態 上述した様に、ミトコンドリアそのものの ^1H , ^{13}C NMRからは、現状では、その機能や構造を議論することは問題があると思われる。そこで次にミトコンドリア存在系での水の状態を調べた。

Fig. 3, 4, 5は、それぞれ、軽水mediumにミトコンドリアを入れたときの、 ^1H NMRの相対強度、線巾、 T_1 の温度変化をあらわしている。相対強度は、 CDCl_3 で希釈した CHCl_3 の面積強度を外部基準にして求めた。

Fig. 3で明らかなように試料は $-5\sim-10^\circ\text{C}$ で凍結するが、それから -20°C までの範囲では、凍結前の強度に比して数%の水のシグナルがみられる。また、 -20°C 以下にすると、更にその1/10程度のシグナルしか観測されなくなった。線巾については (Fig. 4)、 $-10\sim-20^\circ\text{C}$ では、 $200\sim500\text{ Hz}$ 程度であるが、それ以下の温度では、 $700\sim800\text{ Hz}$ になる。タンパク質の水溶液を -35°C にさげて凍結させても、 $600\sim900\text{ Hz}$ 程度の中の高い水のシグナルが観測されることはよく知られている。(I. D. Kuntz, Jr., et al., Science, 163, 1329 (1969).)

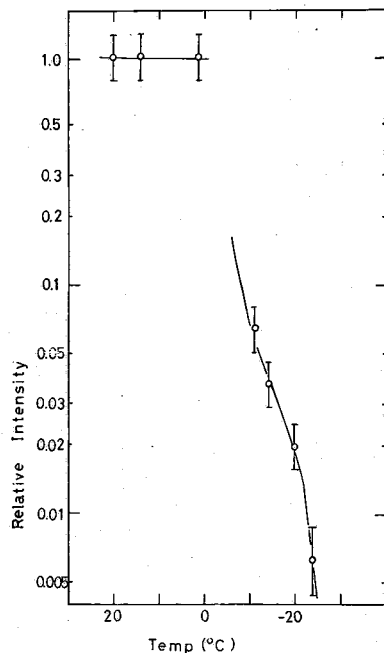


Fig. 3 Relative intensity of $^1\text{H}_2\text{O}$ as a function of temperature.

これは、タンパク質の結合水であると解釈されている。これと、本実験で -20°C 以下でも観測されるシグナルとは、よく対応することから、この温度領域ではミトコンドリアのタンパク質の結合水がみられていると推定される。次にミトコンドリア存在系での水の下を測定した。 180° -

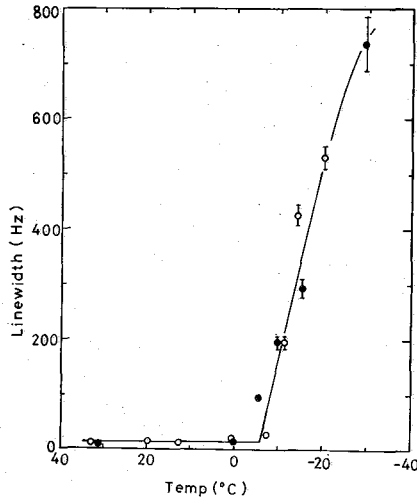


Fig. 4 Temperature dependence of $^1\text{H}_2\text{O}$ line width. Symbols (O, ●) indicate different samples.

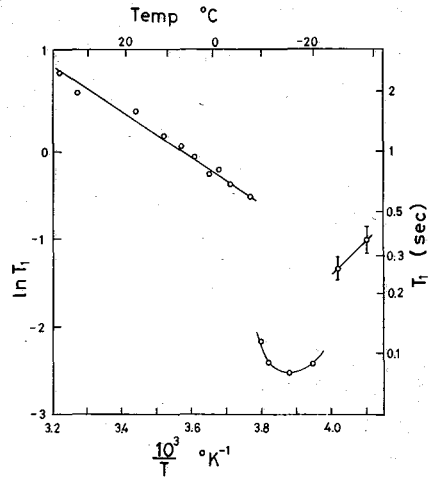


Fig. 5 Changes of T_1 for water with temperature.

$\tau = 90^{\circ}$ パルスにて測定したが、軽水・重水 medium いずれの場合も、単一の指数関数的変化を示した。Fig. 5は、軽水の下を自然対数を縦軸に、絶対温度の逆数 ($1/T$) を横軸にとりプロットしたものである。未凍結の状態 ($40 \sim -10^{\circ}\text{C}$) では、直線上に各点がのっている。 -10°C 以下では、0.1秒程度の下であるか、更に温度を下げると、 -20°C 付近で、不連続的に下が増大する。重水中に於ても、同様の結果が得られた。単一の相関時間 τ_c を仮定すると、水の下は次式であらわされる。

$$\frac{1}{T_1} = K \left\{ \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{8\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right\} \quad \tau_c = \tau_0 e^{\frac{E_a}{RT}}$$

凍っていない状態では、 $\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$ であることから、このときの活性化エネルギーは、

$E_a \approx 20 \text{ kJ/mol}$ となることかわかる。

$-10 \sim -20^{\circ}\text{C}$ で観測される水については、 T_1 の極小値をとる温度が -16°C 付近であるから、 $\tau_c \approx 1.0 \times 10^{-10} \text{ sec}$ と計算される。Powles (Mol. Phys., 4, 515 (1966)) は、細胞内の結合水の相関時間は $\tau_c \approx 1 \times 10^{-9} \text{ sec}$ 程度であると推定している。今の場合は、これより、10倍程度の速さの運動をしていると考えられる。これの結果より、 $-10 \sim -20^{\circ}\text{C}$ で観測される水は、ミトコンドリアのマトリックス中の水である可

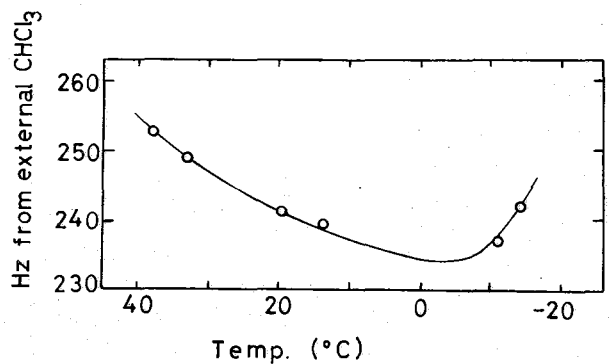


Fig. 6 $^1\text{H}_2\text{O}$ chemical shift from external chloroform as a function of temperature.

能性が示唆される。Fig. 6には、フロロホルムを外部基準としたときの、ミトコントリアを入れた軽水 medium 中の水の化学シフトの変化を示した。凍るまでは、低温になるに従い、低磁場シフトするが、凍結後は、それとは明白に異なった変化をする。このことは、 $-10 \sim -20^\circ\text{C}$ で観測される水の特殊性を示していると考えられる。しかしながら、測定点も少なく、その上、磁化率によるシフトも考慮する必要があり、詳しいことは更に検討中である。

エネルギー状態と水の T_1

表に、重水 medium に

ミトコントリアを入れて、各エネルギー状態で測定した水の T_1 を示した。

基質を加えていない場合

①, 呼吸阻害剤である

Antimycin を加えたとき

⑤と、それら以外の呼吸活性の大きな場合(②,③,④)

とでは T_1 は後者の方が長くなる傾向がある。 T_1

の変化は呼吸によりミトコントリアと水との相互作用が変化していることの反映である。

(結論) 1) 種々の条件におけるミトコントリアの ^1H NMR では、一般に凍結のもののシグナルは観測されなかったが、12 時間以上室温に放置したものでは、アリファティクの水素が中の広いシグナルとして得られるようになった。

2) ミトコントリア suspension 中では、 ^1H NMR スペクトルの温度変化から、大きく性格の異なる種類の水が存在することが明らかになった。これは、外部の自由水、マトリックース中の水と、タンパク質の結合水であると推定される。

3) ミトコントリア suspension 中の水の T_1 は、呼吸活性の大きい状態より長くなる。

^1H and ^{13}C NMR Studies on Rat-Liver Mitochondria

Kenichi YOSHIKAWA^{a)}, Hiroshi TERADA^{b)} and Yoshimasa KYOGOKU^{c)}

(College of General Education^{a)}, and Faculty of Pharmaceutical Sciences^{b)}, University of Tokushima, and Institute for Protein Research, Osaka University^{c)})

ABSTRACT: A) Though no protein or lipid proton signal was observed for "intact" mitochondria, broad and very weak bands appeared on standing mitochondria at room temperature for 12 hours.

B) The data of water proton T_1 for mitochondria between 40° and -30°C suggest the existence of three fractions of water; 1) bulk water, 2) loosely "bound" water, probably in the internal spaces of mitochondria, and 3) water strongly bound to mitochondrial protein.

C) The water proton T_1 for mitochondria in "energized" and in "uncoupled" states was about 10% longer than T_1 values for non-respiring mitochondria.

東大理 藤原 鎮男

Fourier Transform of Noise as a Criterion of Perturbation

Shizuo Fujiwara

Department of Chemistry, Faculty of Science, The University of
Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

(to appear in the Journal of Magnetic Resonance, Feb. 1978)

序 著者は数年来、各種機器の出力の変動(いわゆる雑音)から有意の知見を得る
研究を進めてきた。本報告はその一部である。

情報源としての雑音に期待される項目には、つぎのいくつかあげられる。

- 1) 測定系のシステム診断
- 2) 雑音にかくされた試料情報の検出
- 3) 構動的ない状態に対応すべき真の乱雑さ、真の雑音の研究

このうち、1)は測定系と試料と装置にかけ、雑音解析によって試料のゆらぎと装置のゆらぎとを判別し、試料の研究なり、装置の改良にすゝもうとするものである。2)は検出感度の向上の問題に帰着する。筆者らはすでにこれについて若干の研究を行なった。⁽¹⁾⁽²⁾ 3)は科学の基礎論として興味ある問題であり、実験的に⁽¹⁾緩和の研究に直接関係する。本報告は3)に關するもので、雑音の解析法として、従来にならぬ方法と提出する。

方法 NMR分光計 PS100, の出力の変動(雑音)と、共鳴外(Off resonance)、水の共鳴線(Bulk water)およびPVA架橋ゲル中であつて分子運動が束縛された状態にある水の共鳴線(Water in gel)の各、の一点について測定した。以下、便宜上各試料とそれぞれO, B, Gとよぶことにする。

雑音電流の測定の実際に當つては、分光計の条件と磁場以外はすべて同一、一定にし、一臈で0.0005秒(間隔)に1024点出力と測り時系列のデータを得た。これを、強度に關し規格化したのち、フーリエ変換しパワースペクトルに変えた。

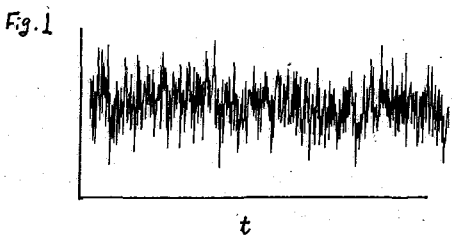
パワースペクトルは、それ以上の解析に進まぬのが従来の通例であるが、本研究においては、その振中 I_{ν} の統計分布とみることにし、しかもそれと、パワースペクトルと何分画かの狭い区画にわけ、その各 ν_2 について、統計分布と見ることとした。パワースペクトルの振中 α 分布 N_{α} と見ること、分画してしらべること、が本報の特長である。

さらに乱雑さの判定に一般に用いられる I の総和値の、平均との差の検討もあわせて行なつた。すなわち、 I_{ν} の平均値 \bar{I} に對し、 I_{ν} がより大なら $+$ 号、小なら $-$ 号と階比、 $+$ と $-$ のならび \pm 合としらべ、符号の変化が ϕ かこの関数、 ν と算定した。

他方、計算機により 1024 々の乱数をつくり、これを雑音の対系列と同じにとり、規格化、パワースペクトルへの変換、その振幅強度の分布 ($N_I - I$)、および t の算出を行なった。この作業を 1000 回くりかえし、結果を平均し ($N_I - I$)、 t_c を得た。これは、真の雑音に対応する標準となることを示す。よって、かくて得られた結果を、真の乱雑さの目安としうることを示した。 I_0 の乱数を n とすると、理論的期待値の t_c は、 $t_c = \frac{n}{2}$ である。合成した乱数の t_c はこの期待値に完全に一致した。

結果、突刺の雑音、O, B, G のパワースペクトルを検討した結果は、O, B, G でのかなりの違いがあるが、その中で、むしろ中間域のみ (250-500 Hz) の雑音 O, 真の雑音と同じパターン ($N_I - I$) 分布を示し、むしろ全く真の雑音の特性を示すことになることが知られた。さらに、O, B, G について比較検討を試みると、

- i) 中間周波数域に、無構造、真の雑音に相当する領域があること、および
 - ii) その領域のひろがり、O, B, G 各試料、で若干のちがいはあることなどが明らかになった。
- こゝに得られたことは、甚だ重要であり、その様相など今后さらに検討を進めたい。



Fourier transform

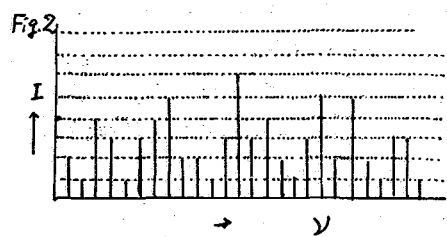


Fig. 3
($N_I - I$)
for O sample.
The pattern for the range of 250-500 Hz fits well with that of the real randomness.

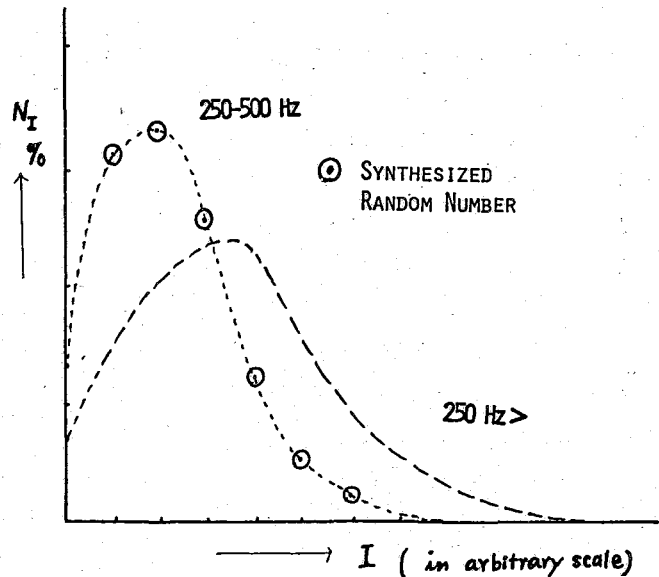


Fig. 4 NMR at 100 MHz

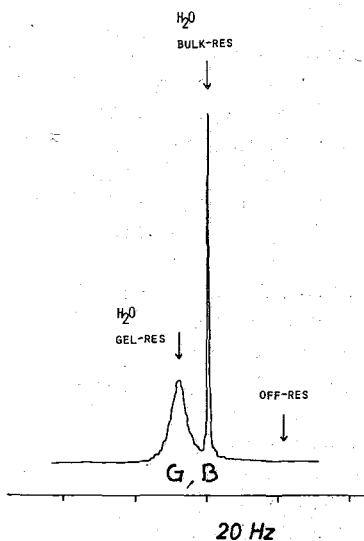


Fig. Difference of T_1 's of B and G.

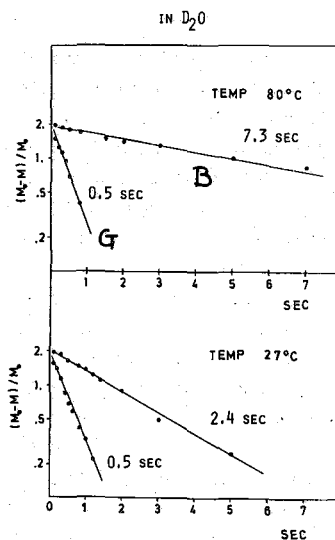


Table 1

I)

range	0 - 1000 Hz	expected value: 512
O	298 ± 56	
B	340 ± 105	
G	258 ± 55	
* (synth. random number)	512 ± 13	

II)

4 divisions		expected value : 65			
range	0 - 250	250 - 500	500 - 750	750 - 1000 Hz	
O	48 ± 5	61 ± 8	41 ± 8	27 ± 9	
B	59 ± 6	59 ± 8	50 ± 4	43 ± 15	
G	53 ± 7	61 ± 4	46 ± 9	33 ± 7	
*	65 ± 2	65 ± 4	64 ± 7	64 ± 3	

III)

8 divisions		expected value : 33							
range	0-125	125-250	250-375	375-500	500-625	625-750	750-875	875-1000 Hz	
O	23	28	32	31	26	20	16	14	
B	27	32	31	30	26	25	23	22	
G	23	30	32	31	25	20	16	15	

IV)

16 divisions		expected value: 17							
range	0-62.5	62.5-150	150-212.5	212.5-275	275-337.5	337.5-400	400-462.5	462.5-525	
O	11	13	14	15	15	17	16	14	
B	13	15	16	17	16	16	15	15	
G	10	13	15	16	16	16	17	16	

This paper concerns with the noise in spectroscopy. Usually what is meant by noise is taken as equivalent to the randomness. However, in practice, the noise is not always really random as it is assumed. For example, it often holds periodic signals of significance within it. In the latter case, the signals are apparently hidden and often detected by the Fourier transform technique.^{1,2)} The noise of the latter case may be classified as the signal and not as the noise in this paper. When no signal is present within the noise, the latter must be random, in principle, with respect to any aspect. However, it is not easy to tell whether the observed noise is really random or not. This is due to the fact that we do not have any reference for the real randomness. This paper proposes a conventional reference for the randomness which could be used for the evaluation of the noise. The essential point of the proposal is to count the statistical distribution of the intensity of the power spectrum of the noise. Although it has been a common procedure in spectroscopy to convert the observed

spectrum into the power spectrum, however, ^{so far} the intensity of the power has not been taken up for the further examination. In the present investigation, the statistical distribution of the intensities of the power was counted neglecting the contribution of the frequency terms. In the practice of this counting, the power spectrum was divided into small divisions, and the distribution of the power intensities was counted with respect to each of those divisions. The result of the counting was compared to the reference which had been prepared from the random numbers with the aid of computer. As the patterns of the intensities were compared to each other between the observed noise and the reference, it was found that the pattern of the intensities for the intermediate frequency range showed a remarkable fit to that of the reference. In other words, the real randomness was evidenced in the experimental noise. Comments will be given for the significance of the latter finding

- 1) T. Kugo, Y. Umezawa, and S. Fujiwara, J. Chem. Instrumentation, 2, 189 (1970)
- 2) S. Fujiwara, M. Hirota, K. Sawatari, H. Kojima, and Y. Umezawa, Bull. Chem. Soc. Japan, 47, 499 (1974)

○(東大計セ) 小澤 宏, (東大理) 荒田 洋治, 藤原 鎮男

我々はこれまでNMR測定装置PS-100 (JEOL) を改造して相関NMR分光システムを作成し, またデータ処理に関しいくつかの新しい方法を提案してきた. ここでは今回開発した高速周波数掃引のデジタル化および浮動小数点形式による高速掃引応答の積算の方法について述べ, あわせて通常行なっているように高速掃引応答をsingle phase detectionでサンプリングした場合特にデータ処理上注意すべき点を指摘したい.

1. デジタル高速周波数掃引

スピン系を高速周波数掃引し, そのときに得られる応答をサンプリングする過程で必要なパラメータは掃引すべき周波数範囲 F Hz, 掃引時間 T sec, およびサンプリング点の数 N 点の3つである. 掃引をデジタルに行なうとき, 与えられたこれらの条件を満たすためにはスピン系に T/N sec ごとに F/N Hz だけ値が変化するように周波数を与え, かつその各時点において応答をサンプリングすればよい. しかしこのようにすると N の値が小さいときはデジタル掃引の1ステップの周波数間隔が大きくなってしまふ. そこで本システムではデジタル掃引回路の装置上の条件で決まる最も小さな周波数ステップ間隔 Δf Hz が F/mN Hz に等しくなるように整数 m ($m \geq 1$) の値を決め, $\Delta t = T/mN$ sec ごとに Δf Hz だけ値が変化するように周波数を発生してデジタル掃引を行ない, サンプリングは周波数が m ステップだけ変化するたびに (T/N sec, F/N Hz ごとに) 1回ずつ行なうようにした.

本システムにおいては図1に示したようにデジタル掃引用の回路としては小型計算機980B (TI) の他, Frequency Controller FC-1 (自作), Frequency Synthesizer FS-221A (東亜電波), および Pulse Programmer DP-1 (JEOL) を使用している. ここで FC-1 は刻々変化する周波数の値をBCD (binary-coded decimal) コードとして出力する装置で, スイッチにより初期周波数の値 f_0 Hz, 周波数のステップ幅 (Δf に等しくとる), および周波数上昇下降の別が設定できるようになっており, FS-221AはこのBCDコードを受けて実際にその周波数を発生する. また DP-1 は周波数リセット用と掃引開始用の2個1組のトリガパルスが発生するために用いている.

デジタル掃引およびサンプリングの時間的関係は図2に示したとおりである. まず DP-1 から出た第1のトリガパルス (a) が FC-1 に入ると FC-1 は初期周波数として設定されている f_0 Hz に対応するBCDコードを出力し, FS-221A からこの周波数が発生して掃引周波数がリセットされる. なお FC-1 にはパルス a を受けてから一定時間 (可変) だけゲートを開じる回路があり, このゲートは homogeneity spoiling に用いられる. DP-1 から出る掃引開始用の第2パルス (b) は 980B および FC-1 に入る. 980B はこのパルスを受けるとプログラムによりセットされた値 Δt sec ごとに mN 個のクロックパルスを FC-1 に送るようになる. また FC-1 は DP-1 からパルス b を受けるとそれ以降 980B が

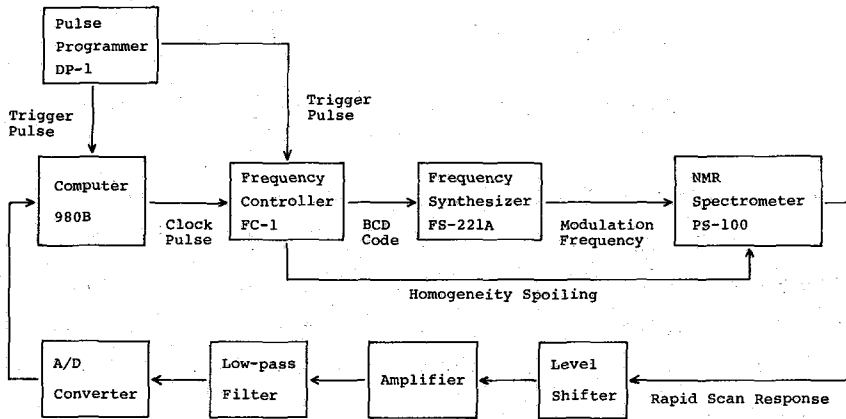


図1. デジタル周波数掃引を用いた相関NMR分光システムの構成

らのクロックパルスを1個受けるごとにスイッチで設定されたステップ幅 Δf Hz ずつ値が上昇(または下降)したBCDコードを出力し、FS-221Aはこれを受けて f_0 Hz から $f_0 + F$ Hz (または $f_0 - F$ Hz) までの周波数を T sec の間に階段状に出力してスピンの掃引を行なう。このようにして得られた高速掃引応答は前述のように980Bがクロックパルスを m 個発生するたびに1回ずつ同じ980Bでサンプリングされる。

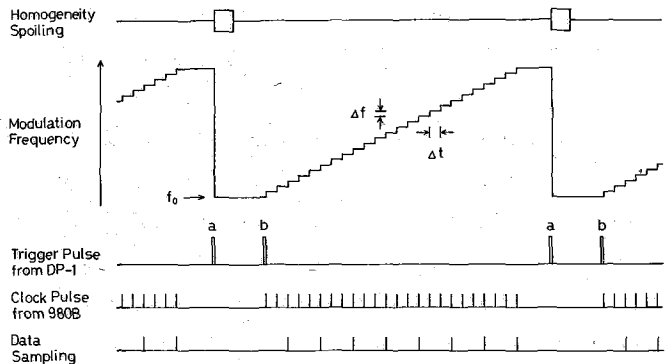


図2. デジタル周波数掃引とサンプリングの時間的な関係

FS-221Aは6桁のBCDコードを受けることができ、その周波数分解能は20kHzのレンジで0.1Hzである。よって今の場合FC-1に設定すべき Δf の値は0.1Hzであり、FS-221Aが出力する周波数もこの間隔で変化する。しかしFS-221Aが発生した周波数はPS-100の中で1/2に落ちるので、実際の掃引は0.05Hzきざみで行われ、この値は磁場の不均一度にくらべて十分小さい。また上に述べた理由により、掃引周波数の変調範囲は10kHz以下である。なお980Bのクロックパルスの間隔は十分よいので、このシステムでは周波数掃引の直線性はFS-221Aの周波数精度と同じ 5×10^{-6} で保障されており、また周波数の安定性は $2.5 \times 10^{-7} / \text{deg}$ である。高速周波数掃引をアナログ的に行なう場合には、掃引回路を計算機で制御することはできないため、計算機にはデータ処理に際し掃引速度の推定値をパラメータとして与える必要があり、その値には 10^{-4} の誤差があった。しかしデジタル掃引においては周波数掃引、サンプリング、およびデータ処理というすべ

ての過程が測定条件として与えられた F, T, N の3つの値をもとに計算機により統一的に制御されているので、アナログ掃引のときのような誤差が入り込む余地はない。

2. 浮動小数点形式による高速掃引応答の積算

本システムにおいてはデータのサンプリングには12ビットのA/D変換器を用いており、また計算機のメモリは1ワードが16ビットである。このためデータを16回以上積算すると積算結果は折りたたまれて(例えば $2^{14}+n$ は $-2^{14}+n$ として)メモリに蓄えられる可能性がある。これを避けるため、従来のパルスFT NMRのプログラムでは積算結果が折りたたまれる可能性が生じるたびに積算結果とサンプリングデータの値を1/2にして積算を続け、またデータ処理の過程で16ビットを越える可能性が生じたときも同様の処理をしてきた。この方法においては積算の効率が悪く、しかもフーリエ変換のように積和を含む計算を行なうと小さなシグナルに関する情報が失われる可能性が高い。我々はこれらの欠点を除くため従来積算結果が折りたたまれることを気にせずに積算を実行し、その後隣り合うサンプリング点の間では高々1回だけ折りたたまりがあるかもしれないと仮定してこのデータを元の値に戻しながら浮動小数点形式に変換し、実際のデータ処理はすべて浮動小数点形式で行なってきた。この方法は多くの場合きわめて有効であるが、狭いスペクトル線をもつシグナルの高速掃引応答のように急な傾きをもつデータを特に多数回積算すると、隣り合うサンプリング点の間で2回以上折りたたまりが生じ、元の値を再現できなくなってしまう。このような不都合はデータの積算も浮動小数点形式で行えば避けることができるが、浮動小数点形式での演算には時間がかかるため、1点サンプリングするごとにそれを浮動小数点形式に変換し積算したのでは間に合わない場合もある。そこで本システムではサンプリング結果はまず従来どおり固定小数点形式で積算し、次のサンプリング結果を加えるとデータに折りたたまりが生じる可能性が生じたときにそれまでの積算結果を一括して浮動小数点形式に変換して他の領域に加え込み、元の領域は0でクリアするという一種のメモリ内でのブロック積算方式を採用した。この方式においては、浮動小数点形式への変換はサンプリングの合間に行なわれるため一般に時間的余裕が十分あり、仮にサンプリング間隔が特に短い場合でも、浮動小数点形式での積算が完了しないよりは次のサンプリングが始まらないようにしてあるので、それ以降のサンプリングが1周期遅れるだけで正しく積算を続けることができる。

3. 高速掃引応答のデータ処理

相関NMRにおいては高速掃引応答(r_{sr})の逆フーリエ変換に $\exp(-ibt^2/2)$ (b は掃引速度)を乗じて掃引した領域に対応する自由誘導減衰(fid)を求め、これをフーリエ変換してスペクトルを求める。図3にこのデータ処理の流れを示す。方法Aに示したように r_{sr} を quadrature phase detection (QPD)で N 点ずつ求めた場合は、その逆フーリエ変換はうしろの $N/2-1$ 点の値が0の N 点ずつのデータとなる。fid ははじめの $N/2+1$ 点に $\exp(-ibt^2/2)$ を乗じることにより求められ、fidのうしろに $N/2-1$ 点の0を補ってフーリエ変換を行えば、2つの位相で N 点ずつの相関NMRスペクトルが得られる。この場合スペクトルの位相補正はこれら2つの位相のデータを混ぜ合わせるにより容易に

行なえる。また rsr を single phase detection (SPD) で N 点だけ求めた場合には、方法 C のようにこれを逆フーリエ分解して $N/2+1$ 点ずつのデータを求め、これから fid をつくり、さらに fid を逆フーリエ合成すれば N 点のスペクトルが求められる。しかしこの場合はスペクトルは 1 つの位相でのみ求まるため、スペクトルの位相を変化させた場合は 2 つの位相の fid を混ぜ合わせ、逆フーリエ合成をやりなおす必要がある。

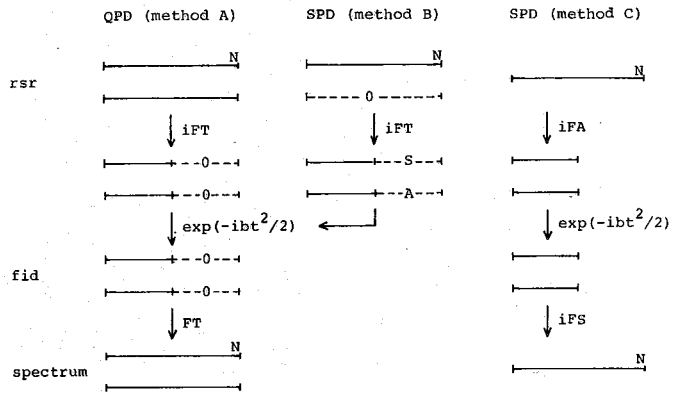


図 3. 相関 NMR 分光法におけるデータ処理の方法

通常 rsr のサンプリングは SPD により行なうが、その場合でもスペクトルの位相補正が容易にできるようにするため、我々は図に方法 B として示した方法を開発した。これは SPD で求めた N 点の rsr に値 0 をもつ N 点の虚部データを補い、これを方法 A と同様に処理する方法である。この場合 rsr の逆フーリエ変換は図に示したように $N/2+1$ 点目を中心として前後が対称・反対称なデータとなり、 fid はその前の部分 $N/2+1$ 点から作る。ここで特に注意しなければならないのは、方法 A で求めた rsr の逆フーリエ変換の前半 $N/2+1$ 点と方法 C で求めた rsr の逆フーリエ分解の間には 1 点目と $N/2+1$ 点目の値は等しいが 2 点目から $N/2$ 点目については前者の値は後者の値の 2 倍であり、方法 B で求めた rsr の逆フーリエ変換の前半 $N/2+1$ 点の値は方法 C のときの値と等しいということである。このため方法 B においては fid を求めるに先立ち 2 点目から $N/2$ 点目までの値を 2 倍にしないと正しいスペクトルを求めることができない。もしこの処理を行わないとスペクトルのベースラインレベルが rsr データの値に依存してしまうため 2 つのスペクトルのピークの高さを値で比較することができなくなり、さらにスペクトルの偶数番目の点と奇数番目の点のベースラインレベルが異なった値になってしまう。

Correlation NMR and its Application. VII. Improvement of System Performance by Digital Frequency Sweep and Discussion on Data Processing

Hiroshi Ozawa*, Yoji Arata**, and Shizuo Fujiwara**
(Computer Centre* and Department of Chemistry**, The University of Tokyo)

Digital technique has been introduced for the rapid frequency scan in correlation NMR spectroscopy to improve the linearity and stability of the sweep unit. A kind of block accumulation has been carried out in the memory of the computer in order to perform floating point accumulation of the rapid scan response. Methods of data processing which can be used when the rapid scan response is observed by single or quadrature phase detection have been considered in detail, and a new method to treat single phase detected rapid scan response has been proposed which gives the correlation NMR spectrum free from the artifacts observed so far.

315 (B5) ^1H 相関NMRによる大腸菌細胞内の嫌氣的代謝の研究

(東大理, 東大農)^{*} 荻野孝史, 荒田洋治, 藤原鎮男, 祥雲弘文^{*}

NMR測定技術の進歩により、抽出、分離、精製といった化学的処理を経ることなく、不均一な血液や筋肉あるいは生物個体そのものを直接NMRの測定対象とすることが可能になった。この種の実験においては、これまでの所化学シフトの分離のよい ^{13}C や ^{31}P NMRがもたらされ用いられて来た。我々は、既に適当な平均一系に対しては、 ^1H NMRも利用できることを報告した。 ^1H 核は、これらの核種に比べて格段に検出感度が良く、又事実上すべての生物物質に含まれている点で甚だ有利である。ここでは、水溶液系の高感度測定法として開発された相関NMRを用いて、*E. coli*によるグルコースの嫌氣的代謝過程を調べたので、得られた結果と共にその測定法についても議論する。尚、生物個体を直接測定対象とするこの方法の先駆的仕事は、日本において藤原によりカイロの成長過程に於けるESRによる研究として行なわれた⁽¹⁾。

実験 *E. coli* K12浮遊液は、 N_2 ガスを通した後、NMR管(20-30ml)内で嫌氣的にincubateした。NMR測定は、JEOL PS-100を基礎に開発した相関NMRシステムを用いた。

結果 図1は、0.1Mグルコースを含む寒天固体培地中で培養した*E. coli*の100MHz ^1H NMRスペクトルである。容易に帰属できるエタールの三重線や乳酸の二重線の他に1.91, 2.36, 2.39, 8.39 ppm付近にグルコース代謝物のシグナルが観測された。この場合には、0.7%の寒天ゲルを用いたが、より堅い寒天固体培地中でも良く分離してスペクトルを得ることができた。図2は、30°Cで48時間、M9培地に嫌氣的に培養した*E. coli*浮遊液の ^1H NMRのpH変化で、NMR試料管内の*E. coli*浮遊液にHClあるいはNaOHを加えて細胞外pHを変えた。この代謝物のpH依存性は、エタールの CH_2 シグナルを基準にして図3に示してある。代謝物の帰属は、このpH滴定の結果及び化学シフトに基づいて標準試料との比較及び既知試料を直接同じ培地に加えて行なった。エタール、乳酸に加えて高磁場側から酢酸、セルビン酸、コハク酸及びギ酸の各代謝物を同定することができた。これらの代謝物は、*E. coli*の混合有機酸発酵生成物として良く知られたものである。興味あることには、この状態ではセルビン酸のシグナルが著しく強くなる、このことである。通常の解糖系では、セルビン酸の定常濃度は数ppm以上低く、いまの測定条件ではNMRの検出にかからない。尚、ここに観測しているシグナルは、膜を通して細胞外に放出された代謝物であるが、菌数を増した場合、あるいは大口試料管を用いた場合には、細胞内の代謝物も同時に観測できるかも知れない。この場合には、これらの代謝物の化学シフトを用いて細胞内pHを推定することが出来る。特にpH変化の大きいコハク酸、酢酸の化学シフトを用いるのが有効である。図4は、0.1Mグルコースを含むM9培地に嫌氣的に培養した*E. coli*浮遊液の ^1H NMRスペクトルの時間変化である。各スペクトルは5分間積分し、約0.1mMの代謝物が検出された。乳酸のシグナルが一番後に観測された。この培養条件での各代謝物の時間変化は、図5に示してある。図6は、菌数 $1.6 \times 10^7/\text{ml}$ の*E. coli*浮遊液を用いた場合の代謝物の時間変化である。前培養に肉汁を用いた以外は、全く他の培養条件、測定条件は図4と同じである。注目すべき点のたし、あらたように、ふじわらしてあり、しうらんをさすみ

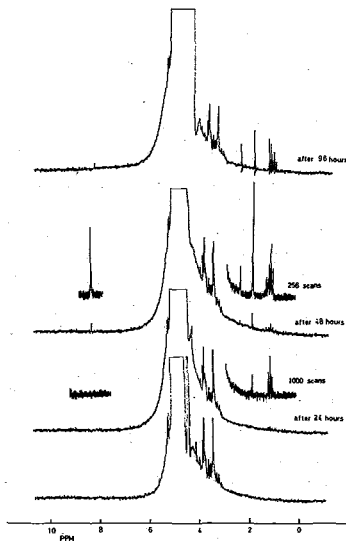


図1 寒天固体培地中の E. coli
100MHz ¹H NMR スペクトル

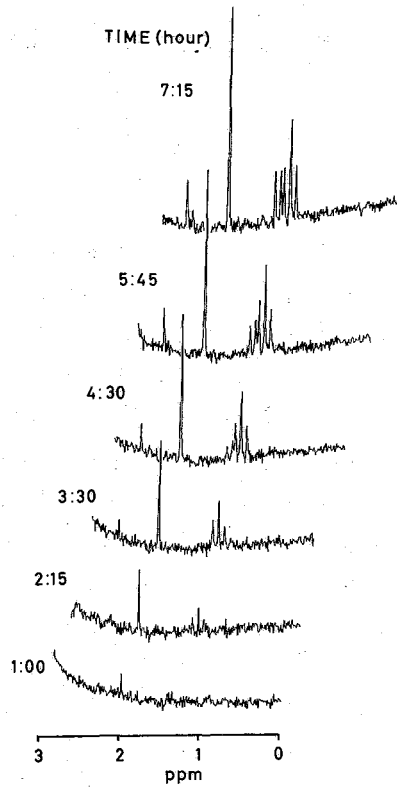


図4 E. coli 培養液の ¹H NMR
スペクトル E. coli 0.5×10^9 /ml,
7-12-2 0.1M, pH 7.2, 30°C

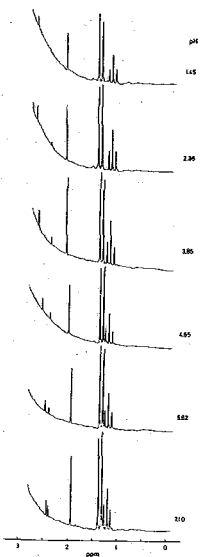


図2 E. coli 培養液の
¹H NMR スペクトルの pH
依存性

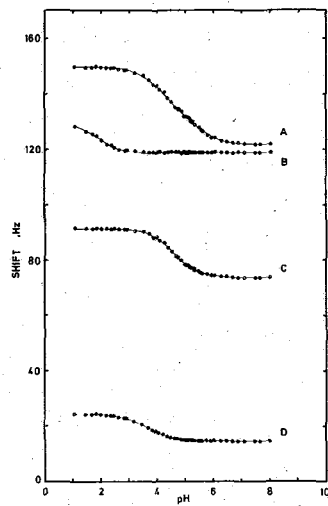


図3 E. coli 代謝物の
滴定曲線

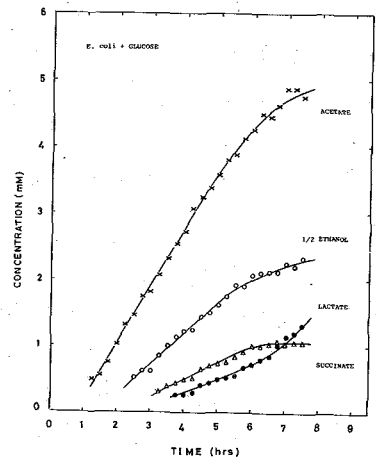


図5 E. coli 代謝物の時間変化
E. coli 0.5×10^9 /ml

すことは、エタール、酢酸及びコハク酸の代謝量の時間変化に段が見られることである。又この後々の代謝反応速度に著しい変化が見られる。乳酸の場合には、図5と同様に単調に増加し、段は観測されない。(図7)。菌数 $1.5 \sim 2.0 \times 10^9$ /ml の *E. coli* を用いた場合には、他の培養条件でも同様の段が観測された。しかし、同条件下で、550 mm の O.D. (光学密度) による *E. coli* の生育曲線と調べたが、細胞分裂に伴う同調培養は見られなかった。又測定時間内(約8時間)には、培養による菌数の減少も観測されなかった。

議論 *E. coli* を含む腸内細菌は、主として Embden-Meyerhof 経路によりグルコースがピルビン酸まで代謝し、2個の ATP 及び2個の NADH を生成する。ピルビン酸は、加リン酸分解によりアセチル-CoA 及びピルビン酸になる。通常、*E. coli* の場合、ピルビン酸は、2個の酵素からなる formic hydrogen-lyase 系により CO_2 及び H_2 に分解される。しかし、図1に見られるように、明らかに、ピルビン酸は蓄積している。これは、用いた培地の pH が、7.2 であり、この酵素系がアルカリ側では、不活性になるためであると思われ。生成したアセチル-CoA の半分は、アセチル磷酸を通り、酢酸になり、ATP 1個を生成する。他の半分は、トリアス磷酸の酸に反応して生成した2個の NADH を用いてエタールを生成する。図4,6に見られるように、代謝初期過程には、エタール及び酢酸の代謝量の時間変化が良く似ていることから、同じ代謝中間体から生成したものであることが解かる。又生成の割合は、この培養条件では、ほとんど1:1 である。乳酸及びコハク酸は、上述の加リン酸分解とは別の経路でピルビン酸から生成する。図4で、エタール、酢酸及びコハク酸の飽和が始まる時点で始めてピルビン酸のシグナルが観測される。従ってこの時には、少量の有機酸の生成に伴い代謝の調節機構が働いて、ピルビン酸の加リン酸分解及びコハク酸生成が抑えられるものと思われる。一方、乳酸生成は、酸性側で活性化されるので、このような飽和現象は、見られず単調に増加する。

水溶液中の痕跡成分の分析への NMR の応用についての議論

NMR を生体系へ応用する場合には、一般的に2つの測定上の問題点がある。即ち、分解能及び感度である。不均一

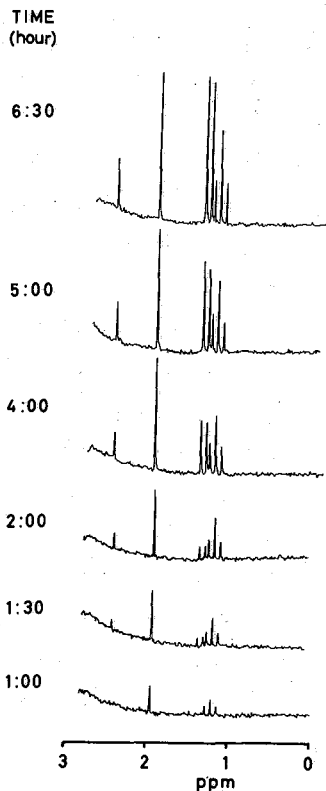


図6 *E. coli* 培養液の 1H NMR スペクトル *E. coli* 1.6×10^9 /ml 他条件は図4と同じ

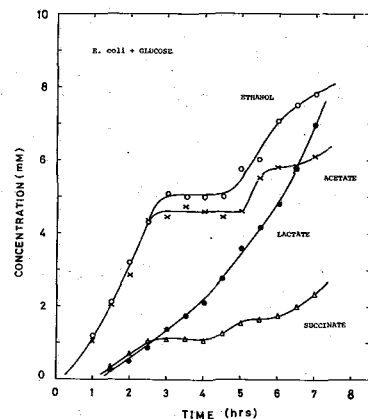


図7 *E. coli* 代謝物の時間変化 *E. coli* 1.6×10^9 /ml

系を測定対象とする場合には、化学シフトの分離のよい¹³Cや³¹P NMRが分解能がよくなく、一方、¹H NMRは、¹³Cや³¹P NMRに比べて格段に検出感度が良く、又事実上すべての生体物質に含まれていて微量成分の分析にはよく使われる。又、既に報告し、そして本報告でも明らかにした様に、適当な系に対しては¹H NMRも一部の生体系に適用できる。しかしながら、¹H核を用いて水溶液中の痕跡成分を分析する場合には、ADを操作のdynamic rangeの問題が生じ、10¹²以下NMRの感度を著しく制限する。この問題を克服するために既に種々の方法が開発されている。例えば、①弱¹H核を用いる方法、②synthesised excitation、③WET、④solvent saturation、及び⑤相関NMRがある。①-④は¹H核以下核の変形である。これらの中で⑤はpopulation transferが起こり、⑥は測定に時間がかかると。又⑥は原理的には良いが、装置開定の一般的で無い。従って、現在の所相関NMRが最も一般的である。この¹H相関NMRの利点は、その高感度を利用して、代謝初期過程の追跡が可能で、又短時間で%のよいスペクトルが得られることと、連続した時間変化を観測できること、生物のlife cycle (例えばE. coliで1時間以内) に合せた実験が可能で、そのために、本実験の測定条件では、128回積算により得られた0.1 mMの代謝物のスペクトルのS/Nは3.6であり、E. coli現在の¹H相関NMRシステムでは、感度及び性能向上のために幾つかの開発を行った。例えば高速周波数掃引のデジタル化により周波数掃引の直線性は、 5×10^{-6} 、周波数の安定性は、 $2.5 \times 10^{-7}/\text{deg}$ が保障されている。又中間周波回路にcrystal filterを組み込み、約50%のS/Nの向上を得た。更に掃引周波数リセットの後でHSP (homogeneity spoiling pulse) を加えて残存横磁化を消失し、位相をゼロにし、くり返し時間を短縮した。従って上述の測定データは1例であり、現在の本装置の検出感度の限界を示すものでは無い。現在、¹H相関NMRのin vivo生体系への応用をはじめ、蛋白質や核酸塩基のNHプロトンの検出や水溶液中の痕跡成分の分析への応用を行っている。

結論 E. coliによるグルコースの嫌氣的代謝過程を¹H NMRで調べ、6個の代謝物を検出し、同定した。代謝過程を非破壊的に直接連続測定することにより代謝の調節が分子上の現象を見出した。相関¹H NMRを用いるこの方法は、分離、精製の操作により、一般的にはその機能を失う生物を扱う医学、生物学領域での新しい方法論として、¹³Cや³¹P NMRと並んで今後広く適用されるものと思う。

(1) 藤原鎮男 化学 30, 981 (1974), Chem. Letters, (1974) 1419

¹H correlation NMR studies of anaerobic metabolism in Escherichia coli cells

Takashi Ogino, Yoji Arata, Shizuo Fujiwara and Hirofumi Shoun*

Department of Chemistry and Department of Agricultural Chemistry*,
The University of Tokyo, Hongo, Tokyo 113

¹H correlation NMR has successfully been applied to studies of anaerobic metabolism in E. coli cells suspended in an M9 medium with glucose. Six metabolites ethanol, lactate, acetate, pyruvate, succinate and formate have been identified, and the time course of these metabolites has been used to discuss the mixed-acid fermentation of glucose by E. coli.

(北大工)・下川繁三 山田英二

(序) 生物は多数の分子集合体によって形成され懸惑的な個体としてその生命活動を維持している。成長の過程や生体活動、或は運動の過程における、分子集合体の特徴は例えば筋肉運動や神経の興奮伝達に見るように極めて協同的に行なわれる。分子集合体は分子から成り、その様な協同運動はそれ等分子の運動の何らかの反映であるが未知なり。NMRではその分光スペクトルを構造パラメーター(化学シフト、スピン・スピン結合)や緩和パラメーター(T_1 , T_2 , など)を用いて解析される。もしも分子集合体、或は分子集団運動を反映するパラメーターが見出されれば、生物の組織や生きた生物そのそのまですら分子の言葉で解き起こして説明出来る可能性がある。本研究はその様な試みの一つとして生物体中に存在する分子集合体にかこまれた水分子(云はゆる組織内自由水、蛋白等に直接結合してはいない水)の運動を検出する方法について述べようと思う。ここで我々は生きたそのの高度に組織化された蛋白や脂質中に存在する水分子は水分子同子互に協同的に運動すると仮定する。

[実験の方法論] すでにAセッションに於て提案した。温度勾配法によって、温度降下に伴う、水の信号の強度変化量の勾配から水の集団運動についてこの応答については生体内組織、或は器官の温度応答、拒抗性、元気土、弱土、生と死についての判定の材料をNMRプロトンスペクトルで得ることが出来る。今回は特に焦点をこぼり冷血動物と温血動物との相違点について温度勾配NMR法による実験結果をのべることにする。

[実験装置] 生物を測る最終目標はヒトであるがとぼしい予算の関係でここでは哺乳動物としてマウス(二十日ネズミ)を用いることにした。此の目的のために我々はコイル直径が45%の大口径プローブヘッドを試作した。此の共振器は常温で40%温度可変で35%の飼料管を入れること出来る。温度の可変出来る範囲は $\pm 100^\circ$ とした。磁場の均一度は手まきのミムを用いて $6 \times 10^7 / 45 \text{mm}$ 程度迄にすることが出来た。プロトン36MHzで水のフーリエスペクトルから見ると半値巾はほぼ20Hzである。飼料のスピンは行なわれない。磁場の安定化にはFlux Stabilizerを用いた。ここで磁石について一言のべると、我々の用いた磁石は磁極間隔6cmでポールピースは普通の巾巾用である。オ1図は此のプローブによる水のフーリエスペクトルである。高分解能NMRの立場から見ると、此の様な分解能で一体何が測れるかと考えるであろう。幸いこの高解能NMRは一般に巾広くブロードである。だからスペクトルがオ1図の程度であるので、實際上生物体の測定は何ら支障がないことが判る。此の様な測定方法

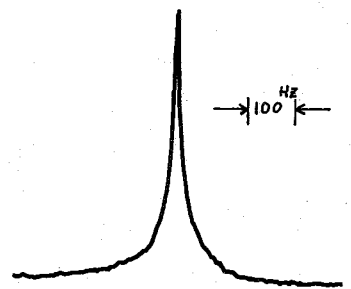


Fig.1 Proton spectrum of water in a 35mm sample tube without spinning operated at 36.54MHz with 45° pulse.

こもかわ しげぞう やまだ えいじ

を広くNMRに対応して狭域NMRと呼びこわした。大口至プローブの構造をFig. 2に示す。よく断熱された45%真空二重管の外側にはホルマル線を巻いて90°ピルスは最大20 μ s迄得られた。分光器はBrukerのSXPを用いて装置はNicoletのBNC-12を用いた。

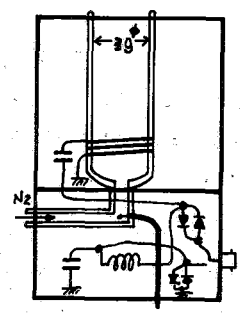


Fig. 2 Diagram of variable temperature probe head.

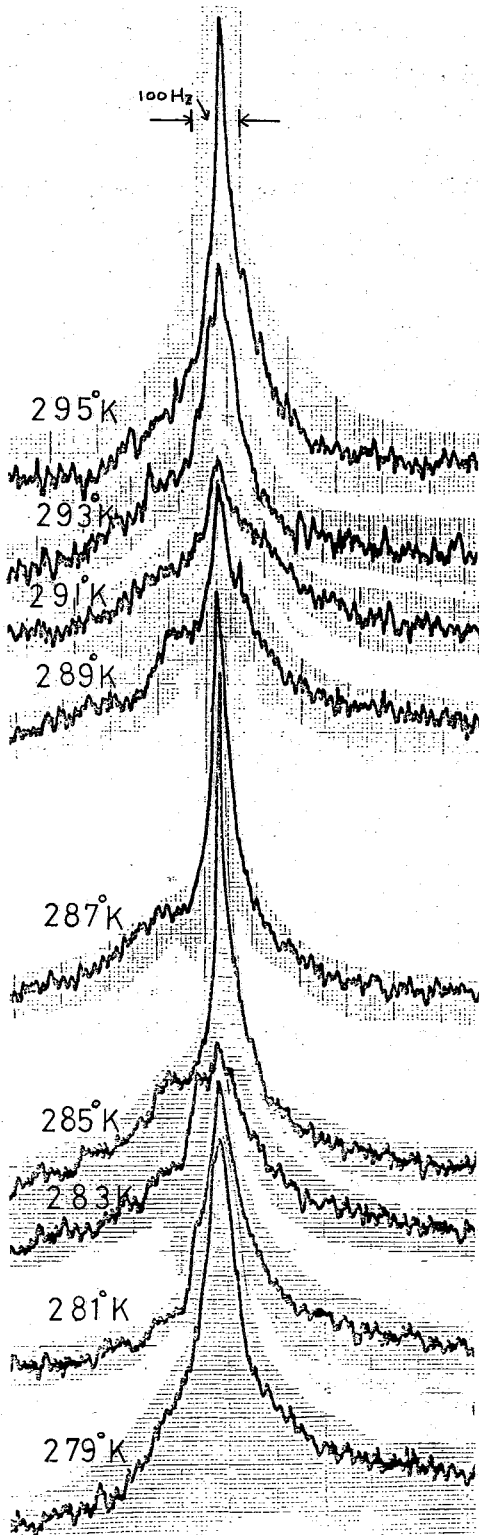
- 〔生物を計測するための諸問題〕 生物をそのまま計る場合には
- 1) 生物が入ることは当然のことであるが麻酔しない場合は興奮せよに自から容易に出入出来、且生活生存出来るものでなければならぬ。
 - 2) 計測中に生命体の生存に関する情報を外部より把握するモニターシステムを用意する必要がある。特にヒト以外の場合は重要である。
 - 3) 多重パルス法(積算)やP₁の観測に際してのデカプラーの照射効果とその生体に対する影響を調べなければならぬ。

我々の採用したプローブヘッドの一つは立型であるが一般に四足の動物は立型を好む。そこで積型のプローブヘッドを試作中なのでこれを用いた。実験も始める予定である。実験動物(マウス)を飼育中に試料管等をケージの中に入れて出入りさせ出来るかゴリ不安感をなくす様にした。又毎日2回手を回して試料管の中へ何匹かのマウスが入る練習をした。生後25日目位迄のマウスは35%層の中で身づくろいを行うことが出来る。

NMR測定中に試料管中の動物(マウス)がどんな状況にあるかを見る方法としてヘッドの上部に反射鏡をおき又麻酔した場合には心電図等により生存状態をモニターする様にした。又測定中は酸素を供給しておく様にした。

高周波パルスが生体を与える影響は特にP₁の観測の場合(この場合も)極めて重要である。積算を行う場合或はデカプラーの断(cw, パルスGate)即ち平均パワーによる水分子のジュール加熱が問題となるであろう。此の実験は特に磁石の中で行はさずとも実行可能である。我々は現在最大100W出力のデカプラーを製作調整中である。これを用いて下等生物と高等生物におけるデカプラー効果およびパワー依存性を検討する。

〔温度勾配法による線型の変化〕 温度勾配の測定の際注意しなければならぬことは、測定条件が各試料でいつも一定であること。コントロールとして純水について同じ条件での実験が必要である。フーリエスペクトルの線型は温度勾配に依存して線巾、線強度、面積、シフト、そして位相が変化する。線巾の変化は系統不均一であるので内部の相変化に依存する(ここには生体内の液晶部分と非晶部分についての分布量の差および液晶部分の転移の状態に対応する)面積と線強度は一般にその温度での Boltzmann 分布の差としてスペクトルに出現しパルス法では容易に温度 α 低下による線強度の増加が観測される。シフトは純水の場合以外即ち生体内の水については線巾が広く温度依存の液晶部の変化と重なって正しくは求まらないが一般に低磁場シフトすると考えよう。以上の諸条件はラジオ波パルスによる時間応答成分 FID, T₂ の解析でも行はえるが位相変化量 α は、周波数スペクトルとして見た場合は容易に考察出来る。本研究の場合、位相応答成分の



変化は強度変化と平行関係にあるので各温度での強度変化を観視すると直ちに判断がつく。又計算機による位相変化量の数値を打出させることでその値が求められる。分光器の検出系に関する特性については、すでにAセッションで述べたのでここではおこなわない。特に大事なのは、磁石が高安定であることと必要とする。

ここで位相の変化の原因は、温度勾配によって故意に得られた内部の部分構造の生成消滅を示すと考えられる。一種の不均系の分布の存在を示すものと考えられる。

我々は温度勾配の実験から位相変化量或は強度変化量の傾向を勾配の形ととして読みとることにする。すでに述べたように此の傾向へ変位量の大小から協同運動(水の)効果の減少又は増大を判定する重要な結論を引き出しうる。

【実験結果】 右の図は生後4日目の仔マウス5匹を35mm試料管にそのまま入れて温度勾配実験を行ったスペクトルである。仔マウスはまだ動かさずに動ける程度で自立的に自由行動は出来ない。温度勾配によるスペクトルの変化は外部よりの監視で見るとマウスの移動によるものでなく、5匹のマウスの体内の平均自由水の分布状態の転移に基づいて生じている。その広がりはやや広い線巾をもち成分があることを示している。温度が22℃より低下するとスペクトルは18℃でエッジBroadeningを生ずる。そして温度の低下に際して拒抗し水を体内の構造の場に保存しようとしている事を示している。温度低下が緩く12℃で再び鋭くなり10℃で又Broadeningが生ずる。6℃以下はスペクトルにエッジ変化は生じない。仔マウスは-10℃迄生存していることがこの実験に於てはわかる。さらに温度の低下とともに急速に凍死に至りスペクトルの強度は-45℃まで線型にエッジ変化は行かた。

← Fig. 3 Temperature gradient dependence spectra of water of 5 baby mice in a 35mm sample tube at 36MHz.

此の実験は哺乳動物は体毛によって温度変化が保護されているので仔マウスの様に体毛の無いほだかの時。しかもまだ母体に守られて体温を維持する状況にある時の温度勾配による実験である。此のスペクトルの強度変化から、仔マウスの生存適応限界が判明し10°C以下に長時間おくことは生命を危くすることを示している。

成長したマウス(生後25日目)を麻酔して同様の実験を試みた。中枢麻酔のために体温の低下と心拍数の減少があった。温度勾配の実験によれば種型の変化は極めて小さく此のことから非麻酔の場合のスペクトルの強度変化の大部分は哺乳動物では骨格筋等の随意筋からの寄与が大主事が判った。又前回報告した冷血動物の如く温度の低下に伴う劇的な種型の変化は認められぬ(麻酔した系)。これは恒温動物の場合、その体温維持機能が広い温度範囲で動作している事を示しており外部温度に対する適応性が優れていることを物語るものである。

Fig. 4図は今迄の結果をまとめて見た図でありスペクトルの強度変化(位相変化)のみを取って見ても生体内の水の性質についてこの描像を画くことが出来る。

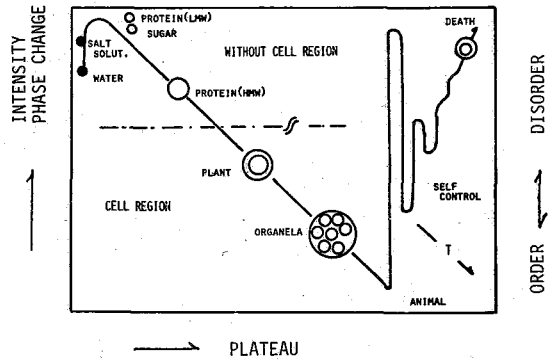


Fig. 4 Diagram of the nature of water in living cell and without cell systems.

Nuclear Magnetic Resonance Study of Mammalian Animals I
Preliminary Report

by Shigezo Shimokawa and Eigi Yamada

NMR Research Laboratory, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo, 060, Japan.

Abstract

A magnetic resonance probe with a large diameter has been developed in order to measure proton spectrum in mammalian animals.
The resolution of the apparatus with 35mm sample tube reached to about 20Hz in pure water.
From the results of the temperature gradient experiments of water in mice, it has concluded that the origin of the change of intensity and phase in the spectra was caused mainly from there movements of voluntary muscle.

(味の素・中研) 甲斐荘正恒 小西博子 鯨坂勝美

はじめに

高分解能NMRの最近の進歩の一つに、取り扱える——或は、取り扱うといった方がより正確かもしれないが——試料の状態が極めて多様になってきたことがあげられよう。最近まで、多くの高分解能NMRを用いる研究者の頭の中には、測定対象は完全な溶液でなくてはならないという考えが強く、人々が固体に興味を抱く場合も、実は、それらを除去して完全な溶液を得るにはどうしたらよいかを、思い悩むのがその内容であったりしたものである。従って、多くのNMR測定装置のカタログに、固体の生ゴムの素晴らしい高分解能 ^{13}C スペクトルが、“普通の装置”を用いて測定できることが示されていても、それらは極く“特殊な試料”でのみ起る現象として片付けられてきたとしても驚くには価しないだろう。一方において、本討論会でも示されるように、“完全な固体”の高分解能スペクトルの測定は、特殊なパルス列、*dipolar decoupling*, *magic angle spinning* 等を用いることにより既に広く行なわれていることは、良く知られている。問題は“溶液派”と“固体派”の相分離にあり、両者は実際のところ、全く互いに独立に発展してきたという良いであろう。我々が最近努力していることは、両派の間にまたがる“溝”をせばめることにあり、それももともと“溶液派”からのアプローチである。

固体と液体；そのどちらともいえない中間的状态；互に不溶な液体；又は膜で仕切られているために互いに混ざりあえない液体等々、不均一系試料には様々な形態がありうる。このような“不均一系”を、そのままの状態で一つまり分離操作を省略して——NMRを測定すると、通常の高分解能NMR装置によって観測できるスペクトルは、相の如何を問わず、局所的運動が速い成分に属するものだけである。得られたスペクトルのもたらす情報の一つは、従って、系における各成分の運動の不均一性に関するものであるが、更に *essential* な情報は、それが系から分離することによって失われてしまう性質のもの、或は系から分離が不可能な成分に関するものである。これらの情報は従来の化学的情報とは性格が異なるために、分離を伴わない不均一系の化学という意味で *gross chemistry* とでも呼ぶべきだろう。昨年の討論会等で我々は高分解能 ^{13}C , ^{31}P NMRスペクトル法が、不均一系の持つ、微妙な準安定状態を乱すことの少ない分光学であることを利用して、実際に生命活動を営んでいる生物そのものの中に含まれる物質についての、種々の性質を明らかにする新しいNMRの応用を発表してきた。単離した筋肉や臓器の ^{31}P NMRスペクトルが主として生理学的観点から盛んに研究されてきており¹⁾、又、結果は必ずしも満足のいくものではないがツメカエルの卵のふ化過程についても、 ^{31}P NMRによる先駆的研究が発表されていることもあり^{2), 3)}、一体NMRでどの位の複雑な生物の研究ができるのであろうか、誰でも興味のあることであらう。本報はその部分的な解答をわざわざしたものである。

かいのしょうまさつね こにしひろこ あじさかかつみ

蚕の ^{13}C 及び ^{31}P NMRスペクトル

生命活動を営んでいる系で、適当な大きさを持ち、又比較的短期間に大きな生理学的、形態学的変化を示す生物というとなれば蚕を考えつくであろう。我々は昨年来、蚕の種々のステージを材料として、生物をそのまま観測する上で起り得る様々な測定上の問題点について検討を続けている。特に重点を置いて検討している点は、(i) NMR測定の影響、(ii) 測定部位によるスペクトル変化、(iii) 個体及び雌雄によるスペクトル差等である。以下にこれらの情報がどのように得られるか簡単に紹介する。

5令の蚕幼虫は体長6cm程度のいわゆる“イモ虫”で、体内に液状の絹を持つ絹糸腺を有している。5令の一週間から10日後にはこの液状の絹を吐糸しマユを作り、その内で蛹に変化し、約10日後に成虫(蛾)となるための最大の変化に備えるわけである。このような過程が ^{13}C NMRのように ^1H -照射を必要とする、高分解能NMRとしては比較的きびしい条件によって影響されるかどうかの一つの興味であった。結論から言えば ^1H -照射パワーが10W程度では全く問題がなく、幼虫時に ^{13}C NMRを測定した蚕も正常な蛾となることが確かめられた。さて、図-1に示したスペクトルは、吐糸に伴ない絹糸の量的変化が見事に示されている他に、蚕の体内における血糖トレハロースや脂質等が鋭い吸収を与える一方、他の生体構成物である蛋白等は全くスペクトルを生じないことがわかる。このように極めて複雑な生体のスペクトルは意外に単純に見えるのが普通である。この原因は、一つには構成成分分子の局所的運動が容易なもの制限されているものとに極端に分れていること、更には前者に属する物質で多量に存在していて強い信号を与えるものが比較的数少ないことによる。この状況は植物組織そのもののスペクトルの測定においても同様である。⁵⁾

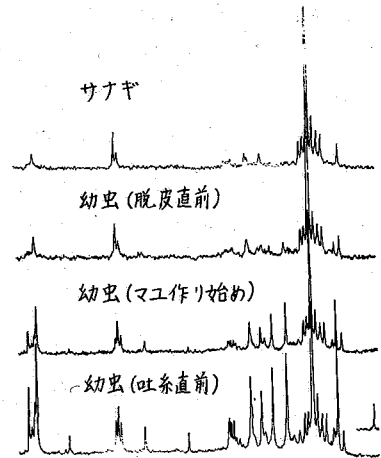
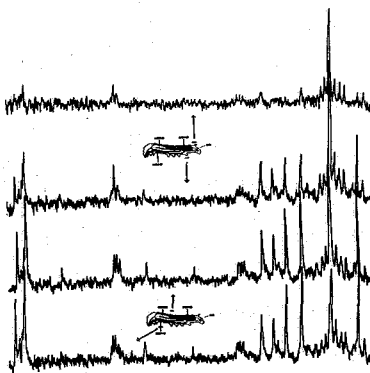


図-1. 絹化に伴なう蚕の ^{13}C NMR変化
25.2MHz (^1H -decoupled)。

図-2.
5令カイコの
 ^{13}C NMR スペクトルの測定部位による変化。



蚕に限らず一般に生物は体内に異なった器管を持ち、それぞれの器管が特有のスペクトルを示すことから、生物そのものを測定すると位置により異なったスペクトルを与える場合がある。図-2は5令カイコの測定部位を変えることによって、 ^{13}C NMRスペクトルが変化することを示している。このス

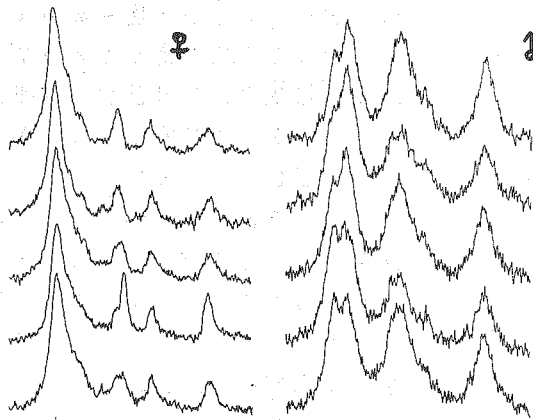


図-3. 蚕(サナギ)の脱皮直前の ^{31}P NMRスペクトル。
雌雄差、及び各5個体のスペクトル

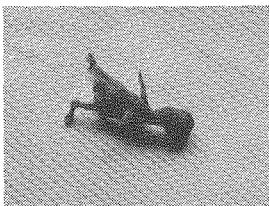
ペクトルは蚕の長軸方向の絹糸腺の分布を反映している。この様な種類の情報は *zeugmatography* によって得られる情報と類似している。

次に蚕の雌雄によるスペクトル差、及び個体差を示した実験を図-3に示す。これは蛹の脱皮前日の各5個体の ^{31}P NMRスペクトルである。パルスのくり返し時間が短いために各尖鳴線の相対的強度は実際の量を反映していないが、著しい雌雄差が明らかであるとともに、個体差も大きいことがわかる。一般に生物は

個体差が大きいことから、本報告で示すような、生物を個体ごとに損傷しないで分析する方法は極めて重要な意味を持つ。我々は当初、蚕の雌雄によるスペクトル差を重視しなかったために、結果の再現性が乏しく、蚕の変態過程の ^{31}P NMRスペクトル変化について非常に無駄な実験をくり返したことから敢えてこの重要性を指摘しておきたい。

鳥類の卵のふ化過程について

現在我々が測定対象として考えられる最も高等な生物で、最も複雑な生理学的変化を短時間に示すものは鳥類の卵のふ化過程であろう。我々の一種の挑戦という意味もあり、このデリケートな系を損なわずに、連続して一個の卵→鳥の過程を ^{31}P NMRスペクトルで追跡した。先ず問題は適当な大きさの受精卵(産卵日のわかった)の入手であり、そのために12mm insert用には十姉妹、18mm insert用にはセキセイインコの卵を得るべく鳥を飼うことからスタートし、首尾よく両者の卵を得た。多くの失敗の後、最終的には特別なビニール製ホルダーに卵をおさめ、 ^1H -decoupleなしに(NOEを無くすためと、中が広く全く効果がないこともあり)、むろんスピニングもせず、毎日ふ卵器から一定時間に取り出し、 ^{31}P NMRスペクトルを観測することに成功した。実験は極めて困難である。というのはこれらの鳥類の卵のふ化率は必ずしも高くなく、親鳥がかえしてもる割程度であること、NMR測定の際に卵を毎日動かす必要があること等から、ふ化数日前に死亡したり(機械的に卵がわれたりして)、成功率は高くない。左下の鳥はこのような苛酷な運命に



耐えて、NMR測定ホルダー中でふ化し、その直後につまづいてころんだインコのヒナの写真である。産卵直後の ^{31}P NMRスペクトルはリン蛋白の吸収がほとんどであり、良く知られているように、ホスボチンというリン蛋白がその主体であり、この吸収がincubation 8日位から急激に減少するとともに、ATPやクレアチンリン酸等が生じるのが観測される。全体の ^{31}P NMRの面積に対して、個々の吸収の面積の割合を出したも

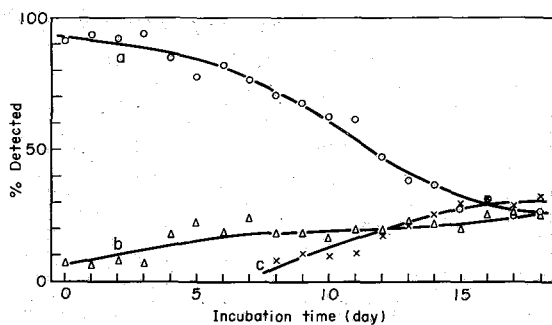


図-4. セキセイインコ卵のふ化過程の³¹P NMRによる追跡。18日目は鳥のスペクトル。a; リン蛋白質(ホスビチン等), b; 糖リン酸エステル, c; ATP等

生物学的、生理学的立場からは、卵の発生の諸ステージにおける特定の器管の発生と成分変化といった、より詳細な知識が必要となる。我々は、本報で述べた、生物全体の、いわば gross chemical な情報が、蚕の実験で述べたように、受信コイルの位置を変えたり、或は³¹P NMRのzeugmatographyを併用したりすることにより、更に有用なものに発展すると考えている。

文献

- 1) 甲斐荘, "ぶんせき" 472 (1977); 第15回NMR討論会(東京) 1976. 10. 25-27.
- 2) D.P. Hollis et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 1086 (1977)
- 3) C.T. Burt et al., *J. Biol. Chem.*, **251**, 2584 (1976)
- 4) A. Colman et al., *Eur. J. Biochem.*, **61**, 387 (1976)
- 5) 甲斐荘, 第13回植物化学シンポジウム(大阪) 1977. 1. 29., *Tetrahedron Lett.*, 4279, 4757 (1976)

SUMMARY

High resolution phosphorus-31 and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy was applied to study truly living systems, including silk worms and avian eggs. In the latter case, we have successfully observed the entire hatching process of a fertilized egg of budgerigar by daily phosphorus nmr measurements. We have proven that such nmr measurements were not maleficent to this extremely touchy physiological process.

のをプロットすると図-4のようにきれいなカーブを得ることができる。ふ化開始後4, 5日目から検卵器によりはっきりと見ることできる血管は8日目位から非常に密度が濃くなり、又それらの運動が観察される。講演において詳細を述べるが、この時点からの³¹P NMRの変化は極めて大きく、各種器管の発生に伴う盛んな内部の代謝活動を示している。このような体内のリン酸誘導体の動的変化を、個体を損なわずに、知ることができるとは従来の単離した臓器に関する研究に比べ、明らかに一つの進歩であろう。しかしながら、