

第23回 N M R 討 論 会

日 本 化 学 会・日 本 分 析 化 学 会
日 本 薬 学 会・日 本 生 化 学 会
日 本 農 芸 化 学 会・日 本 生 物 物 理 学 会
日 本 分 光 学 会 東 北 支 部

日 時 昭 和 59 年 11 月 26 日 (月)・27 日 (火)・28 日 (水)・29 日 (木)

会 場 鳴 子 ビ ュ ー ホ テ ル (宮 城 県 玉 造 郡 鳴 子 町)

11 月 26 日 (月)

9:00~10:20

1. マトリックスシム—新型磁場補正コイル
(日本電子) 石川彦成 1
2. Solid Echo および MAS 法による ^1H - 固体高分解能 NMR
(日本電子) ○藤戸輝昭, 出口健三, 松浦俊雄 5
3. COSY-NOESY-RELAY 法
(日本電子) ○藤井直行, 栗原範明, 永山国昭 9
4. JR パルス法による軽水溶液の測定について
(日本女子大, CMU*) ○高橋征三, C・ホー* 13

10:40~12:00

5. プロトンエンハンス 2 次元 J 分解法による $^2J_{\text{CONH}}$
(日本電子) ○実宝敏代, 鴨 修, 永山国昭 17
6. 擬似フィルター II
(日本電子) ○永山国昭, 百名一男, 鴨 修, 栗原範明 21
7. Applications of Phase Sensitive, Pure Absorption Mode 2D-FT Methods
(G. E. Co., ニコレジャパン*) ○LeRoy F. Johnson, 川口哲朗* 25
8. 2 量子 Coherence-Echo 相関 2 次元 NMR
(北大理) ○引地邦男, 伊倉光彦 29

13:00~15:00

9. 2D-FT 法による 4 級炭素の長距離相関の観測
(サントリー生物研) ○岩下 孝, 直木秀夫 33
10. 異種核間 NOE 相関 2 次元 NMR
(理 研) ○鶴沢 洵, 柴田俊之 37

-
11. 多量子 NMR の Quadrature Detection 法
(北大理, 日本電子*) ○大内宗城*, 伊倉光彦, 引地邦男, 細野政美*,
穴井孝弘*, 鴨 修* 41
12. 液晶 NMR 法による分子構造と分子配向の研究における多量子 NMR の応用
(阪大薬, 名工大*) ○藤原英明, 清水尚人, 佐々木喜男, 高橋憲助* 45
13. Switching-Angle Sample Spinning (SASS) NMR Spectroscopy
—¹³C 化学シフト異方性の分離測定
(京大理) ○寺尾武彦, 三浦 等, 小野寺 尚, 藤井 拓, 雑賀重幌 49
14. 固体中の直接及び間接スピンスピン相互作用の測定
(京大理) 寺尾武彦, ○三浦 等, 小野寺 尚, 藤井 拓, 雑賀重幌 53

15:20~16:40

15. NMR 1 次元投影法による気体—液体密度の同時直接測定
(北大工) ○下川繁三, 山田英二 57
16. 液体—超臨界トルエンのプロトン緩和
(北大工) 下川繁三 60
17. ¹³C-NMR の新しい測定法. Long Range-J- 変調差スペクトルについて
(東大応微研, 日本電子*) ○降旗一夫, 瀬戸治男, 大内宗城*, 大岳 望 64
18. 高圧下での ¹⁴N-核 NMR. 溶媒和分子の交換反応研究への応用
(和洋女子大, 筑波大*, 日本電子**) ○矢野良子, 上島晃智*, 清水章三** 68

11月27日(火)

8:30~10:30

19. スピンロッキング法による蛋白水和水の自己拡散定数の測定
(北大低温研) 花房尚史 72
20. 結晶中のメチルアンモニウムイオンの自己拡散
(名大理) 石田祐之, ○池田龍一, 中村大雄 76
21. イオンに水和した水分子の緩和時間の測定及びその運動の異方性について
(北見工大) ○三浦宏一, 橋本君雄, 福井洋之 80
22. 重水素置換アニソールのスピン格子緩和時間
(名工大) ○吉野明広, 吉田忠義, 高橋憲助 84
23. 溶媒効果と分子間力との関連について
(阪大薬) ○廉貞録, 高木達也, 藤原英明, 佐々木喜男 88
24. アセトアミドフッ素間の分子間水素交換の動的NMRによる解析
(国際基督教大) 梅本公子 92

10:50~12:10

25. 酸・塩基二成分系のNMRによる研究
(国際基督教大, 東北大非水研*) ○吉田信行, 滝沢美恵子, 松田恵子,
高橋 詢, 池上恒男* 96
26. ピコリル型カルバニオンのNMR研究(9). メチル置換ピリミジンとブチル
リチウムとの反応から生成するアニオン
(三重工技セ, 名工大*) ○小西和頼, 高橋憲助* 100
27. 鎖式飽和炭化水素の¹H NMR
(化技研) ○早水紀久子, 柳沢 勝, 松村和紀, 山本 修 104
28. 化技研スペクトルデータベースにおける¹H NMRスペクトルの検索法
(化技研) ○山本 修, 柳沢 勝, 早水紀久子 108

13:10~14:00

〔特別講演〕

New NMR Data Processing Methods and Their Application in Chemistry,
Biophysics and Medicine

(シラキョース大) George C. Levy 319

14:00~16:00

29. 水溶液中で安定なキラルランタニドシフト試薬
(東北大教養, 東北大理*) ○甲 国信, 佐々木陽一* 112
30. 置換 2-チオフェンカルボン酸メチルの ^{13}C NMR スペクトル
(神奈川工試) 里中 初 116
31. 3-メチルおよび3,6-ジメチルピリダジンの ^{13}C - ^{15}N , ^{15}N - ^{15}N スピン結合定数の
符号決定と INDO-MO 計算
(京大薬, 京都薬科大*, 日本電子**) ○黒田義弘, 藤原靖弘*, 松下和弘** .. 120
32. アルカロイド類の立体化学における ^1H T₁ 及び NOE の利用
(神戸女子薬大) ○杉浦真喜子, 岩佐衣子, 高尾檜雄 124
33. エチルおよびエチニレンシラン類の NMR
(東北大理) ○中平靖弘, 小山剛司, 桜井英樹 128
34. 有機ゲルマニウム化合物の NMR(6). メチルゲルマシクロヘキサンの
 Ge-73 NMR スペクトル
(東大教養) ○竹内敬人, 下田昌克, 田中克己, 友田修司 132

16:20~18:20

35. ポリオレフィンの ^{13}C -NMR 立体規則性. 化学シフトの起源と
そのコンホメーション
(農工大工, 東工大工*, 東工大資源研**) ○朝倉哲郎, 中條利一郎*,
土肥義治** 136
36. 各種 NMR 手法による芳香族アミノ酸とシクロデキストリンとの相互作用
(味の素中研) ○高橋真一郎, 鈴木栄一郎, 尾上弘美, 永島伸也 140
37. ^{13}C -NMR によるシクロデキストリン包接複合体の構造
(東工大工) ○星 肇, 井上義夫, 桜井 実, 中條利一郎 144
38. 高出力 ^2H -NMR. 重メタノールをゲストとする固体シクロデキストリン包接
化合物の動的挙動
(国立がんセンター) ○斉藤 肇, 多部田涼子 148
39. ソホロオリゴ糖の ^1H -, ^{13}C -NMR
(阪大産研) ○高井嘉雄, 沢田正実, 雨村明倫 152
40. *Nocardia rubra* 細胞壁のアラビノガラクトサンの構造
(藤沢薬品物性研) ○信貴政孝, 幸田繁孝, 森本行洋 156

11月28日(水)

8:40~10:20

41. ゼオライトの細孔中のテトラメチルアンモニウムイオンの ^{13}C CP/MAS NMR スペクトル
(化技研) ○林 繁信, 鈴木邦夫, 新 重光, 早水紀久子, 山本 修 160
42. ポルフィリン-Ln(III) 錯体による常磁性シフト
(茨城大理, 茨城工専*, 日立那珂**) ○平山昌甫, 堀江克之, 蝦名不二夫*, 池辺義紀** 164
43. 錯体化学を基礎にした ^{113}Cd NMR (I), ^{113}Cd 固体 NMR
(近畿大理工, 日本電子*) 宗像 恵, 北川 進, 八木富士夫, ○出口健三*, 藤戸輝昭* 168
44. 錯体化学を基礎にした ^{113}Cd NMR (II). 配位子の塩基性, 溶媒及び対アニオンの効果
(近畿大理工) ○宗像 恵, 北川 進, 八木富士夫 172
45. 常磁性および反強磁性銅(II) 錯体の NMR スペクトル
(近畿大理工) ○北川 進, 宗像 恵, 鶴見通昭 176

10:40~12:00

46. 金属錯体の金属 NMR Chemical Shielding に関する簡略化した解釈
(三菱製紙 感材研, 京大工*) ○遠藤一央, 山本京之介, 中辻 博* 180
47. ハロゲン化第一銅の混晶の ^{63}Cu MAS-NMR および X線回折
(三菱製紙 感材研, 日本電子*) ○山本京之介, 遠藤一央, 井口恵介, 出口健三*, 松下和弘*, 藤戸輝昭* 184
48. クロロフィル, ポルフィリン類の ^{13}C CP/MAS NMR
(東北大非水研・帝京大薬*) ○野澤庸則, 西村充司, 太田 克, 篠野昌弘, 佐藤三男* 188
49. 常磁性ポルフィリン金属錯体及びヘムタンパク質の ^2H -NMR
(京大工) ○城 宜嗣, 原田治幸, 森島 績 192

13:00~15:00

50. L-アラニン単結晶の二次元 NMR による研究. 局所双極子場の分離と交換 2D NMR 法による¹⁴N スピン格子緩和機構の考察
(京大理, オックスフォード大*, プリティシュコロンビア大**) ○内藤 晶,
P. B. バーカー*, C. A. マクダウエル** 196
51. アスパラジン-水和物単結晶における¹⁴N 四重極子結合テンソルと¹³C 化学シフト
テンソルの決定
(京大理, プリティシュコロンビア大*) ○内藤 晶, C. A. マクダウエル* ... 200
52. NMR 法によるフロリジンとシクロデキストリンの相互作用の研究
(化技研) 石塚靖子, 名川吉信, ○中西洋志, 山本 修 204
53. ¹H-NMR によるヌクレオシド環状ケイ素誘導体のコンホメーション解析
(織高研) ○曾良達生, 古沢清孝, 上野勝彦, 坂井 士, 津田圭四郎 208
54. 高配向 DNA の動的構造. ³¹P 固体高分解能 NMR の線形解析
(阪大蛋白研, 東京薬大*) ○藤原敏道, 神藤平三郎*, 阿久津秀雄, 京極好正 · 212
55. H₂O 中における DNA オリゴマーイミノプロトンの検出とその dynamics
(阪大蛋白研, 阪大薬*) ○李 尚鍾, 阿久津秀雄, 京極好正, 大塚栄子*,
池原森男* 216

15:20~17:00

56. λフェージ中に折りたたまれた DNA の動的性質
(阪大蛋白研) ○阿久津秀雄, 京極好正 220
57. 光 CIDNP 法によるリゾチームの研究—インヒビター結合に伴う構造変化
(阪大蛋白研) ○林 文晶, 小林祐次, 京極好正 224
58. t RNA によるコドン認識の分子機構—アンチコドン 1 字目の修飾ウリジンの役割
(東大理) 横山茂之, 渡辺達夫, ○宮沢辰雄 228
59. プロトン緩和によるアミノ酸側鎖の存在状態. SSI の環状アミノ酸
(京大理, 生理研*, 都立大理**, 味の素中研***, 阪大蛋白研****) ○井上智子,
赤坂一之, 亘 弘*, 阿部公恵**, 甲斐荘正恒**, 辻 尚志***, 京極好正**** 232
80. Topical Application of Stable Isotopes in NMR Fields
(フランス原子力庁) Jean Rozenberg 236

11月29日(木)

8:40~10:40

60. カルモデュリンフラグメントの二次元 NMR. COSY, NOESY, RCT, DECSY の応用
(北大理) ○伊倉光彦, 引地邦男 239
61. 蛋白性プロテアーゼインヒビター SSI の¹³C-NMR スペクトルによる構造研究
(都立大理) ○甲斐荘正恒, 長尾洋昌, 今村有紀子, 中村好邦, 朝長典子, 内田健一 243
62. 免疫グロブリンの高次構造. ¹H NMR による研究の Strategy
(東大理) 遠藤聡史, 岩澤律夫, 伊藤 渉, ○荒田洋治 247
63. CP-MAS ¹³C NMR. 生理活性ペプチドの固体および溶液構造の比較
(国立がんセンター) ○斉藤 肇, 多部田涼子 251
64. リン脂質ミセルに埋めこまれた生理活性ペプチドの構造と活性相関
(東レリサーチセンター) ○稲垣冬彦, 寺沢 功 255
65. 蛍光性分子を取り込んだレシチンベシクル中のスピン拡散と膜の運動性との関係について
(京大薬) ○黒田義弘, 松崎勝巳, 半田哲郎, 中垣正幸 259

11:00~12:00

66. マルチプルエコーを用いた高速ケミカルシフトイメージング
(日立中研) ○松井 茂, 関原謙介, 塩野英己, 河野秀樹 263
67. スピンエコー・フーリエ法によるケミカルシフトイメージングの基礎的検討
(東芝総研) ○佐藤幸三, 巨瀬勝美, 井上多門 267
68. NMR 映像法による流れのイメージング
(東芝総研) ○巨瀬勝美, 佐藤幸三, 井上多門 271

13:00~13:40

69. 中止 275
70. NMR 顕微鏡
(電総研) ○亀井裕孟, 片山義朗 279

-
71. サーフフェイスコイルによる局部測定法の評価
(日本電子) ○梅田雅宏, 江口恵二, 小川秀次郎, 永井壮市 282

14:00~15:20

72. 時間依存性 NOE による水-高分子間交差緩和速度の検討
(富山医薬大医) ○麻生正邦, 亀井哲也, 日原敏彦, 柿下正雄 286
73. ^{31}P NMR による筋収縮におけるエネルギー利用の高時間分解能測定
— ATP の収縮後分解とその解析
(大分医大) ○山田和廣, 田之倉 優 290
74. ^{31}P -, ^1H -NMR 法を用いた嫌氣的筋収縮時エネルギー代謝の研究
(京都府立医大) ○瀬尾芳輝, 吉崎和男, 西川弘恭, 森本武利 294
75. ^2H -NMR によるリン脂質人工膜と *n*-Alkane の相互作用の研究
(理研) ○柴田俊之, 宮地貴子, 鶴沢 洵, 大沢富彦, 池上 明 298

15:40~17:00

76. ^{23}Na -NMR による神経組織内 Na^+ イオンの動態解析
(京都府立医大) ○西川弘恭, 瀬尾芳輝 302
77. ^1H -と ^{23}Na -NMR 緩和時間によるグリコサミノグリカンと水および Na^+ の
相互作用に関する研究
(京都府立医大) ○日下義章, 三船哲郎, 西川弘恭, 瀬尾芳輝, 山下文治,
榊田喜三郎 306
78. NMR による病態解析 (V) — ヒト軟部腫瘍の解析
(熊本大医) 山崎政城 310
79. 脳病理変化解析のための試料の標準化—凍結損傷モデルについて
(京大医) ○安里令人, 上田 徹, 半田 肇 314

第 1 日

11 月 26 日 (月)

(日本電子) 石川彦成 木田惇 野中洋次

1. はじめに

一般に高分解NMR装置において最高分解能での使用を計るとき、現状ではその調整は人間の勘と経験を頼りとしたスペクトルの目視による場合がほとんどである。スペクトルの目視による調整を完全にではなくとも定量化し、より少ない労力と熟練度で最高分解能が得られるよう調整方法と室温シムの改良を行なった。また、より高い磁場均一度を得る為、5,6次項の軸上シムを新たに追加した。問題点は正確な磁場の測定、解析と、これを補正する磁場を、5,6次項を含め精度良く発生することである。実験では、NMR信号による磁場測定法と最小二乗法を用い、複数の円環コイルの電流の比例制御による補正磁場出力を行なう室温シム(この室温シムをマトリックスシムと呼ぶ)を作成し、270MHZ、400MHZの超伝導磁石(SCM)の磁場均一化を、スペクトルの目視による磁場均一化に代えて試みた。その結果SCMの中心軸上のみではあるが、5,6次項の補正も含め $\pm 15\mu\text{m}$ の範囲において 2×10^{-8} 以上の均一磁場を生成でき、また、この状態をもととして、現状のスペクトルの目視による分解能調整を行なった場合に容易に高度の分解能を達成した。

2. マトリックスシムの概要とその特徴

サンプルの存在する部分にSCMが作るZ軸方向磁場 $B_z(Z)$ は、中心軸上(Z軸)のみを考える場合、超伝導シムによる磁場も含め

$$B_z(Z) = B_0 + B_1 Z + B_2 Z^2 + \dots \quad (1)$$

B_n :係数 Z:位置(原点はシムの中心)

と表現できる。第一項はSCMの主磁場で、第2項以下が1,2,3,...次の不均一項である。次数が高くなるに従い分解能を悪化させる度合は低くなり、5,6次項はNMR信号でのいわゆる盛り上

表-1 室温シムの2つの方式

項目	従来型シム	マトリックスシム
1 結線	直列	並列
2 各コイルの電流	一定	比例配分
3 補正磁場と電源数	1対1	N対N
4 発生磁場の修正	難	易
5 コイル位置	特定位置	任意
6 高次項の発生	難	易
7 磁場補正範囲	狭	広
8 巻線精度	低	高
9 計算値との一致	不良	良
10 コスト	安	高

いしかわひろしげ きだじゅん のなかようじ

がりや裾の部分に影響を与えると考えている。磁場の均一化のためには、第二項以下の不均一項と逆符号を持つ磁場を室温シムにより発生させ(1)式の磁場に加れば良い。以下の2つの方法がこの補正磁場の発生する方法として考えられる。

第一の方法は、円環コイルを特定の位置に配置し直列に結線して同一の電流を流す事で、(1)式の一つの項に対応する磁場を一組みのコイルで発生させる方法である(図1-1)。第二の方法は、複数の円環コイルの組に一定の比率で並列に電流を流すことで、(1)式の一つの項に対応する磁場を発生させる方法で、重ね合わせによりN個のコイルでN個の磁場項を制御でき、コイル位置は任意に選択できる。このシムをマトリクスシムと呼ぶ。各コイルに流す電流は、ダイバイダと呼ぶユニットが発生させる補正

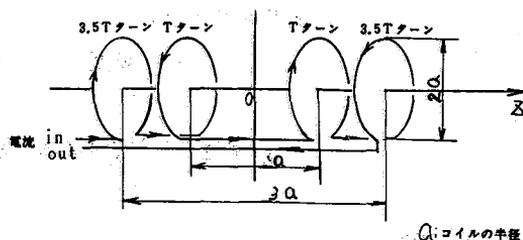


図1-1 従来型シムの3次項巻線

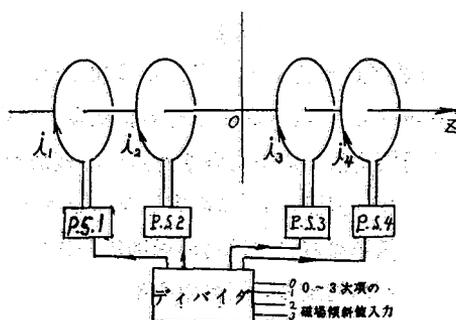


図1-2 マトリクスシムの0~3次項巻線

磁場値の入力を受け演算し決定する(図1-2)。2つの方式の特徴を比較したものが表-1である。

円環コイルの中心がシムの中心より離れるに従ってコイルの発生する高次項(5,6次項)が急激に減少するという性質により、コイルを中心より遠く離さねばならない場合には高次項を現実的に発生することが不可能となる。第二の方法で、重要な点は、コイルの位置を自由に選べることにより、その状態を避け、コイルの中心位置をシムの中心近くに配置することで、比較的容易に、高次項を発生できる点、電流比の適当な制御によりSCMと室温シムのカップルや巻線誤差を修正でき、純粋な各項磁場を発生できる点である。

上記の利点を活かし0~6次の補正磁場を発生するマトリクスシムを設計し、純粋項を得るため各項磁場を個々に発生、測定、修正を行なった。尚、非純粋項の発生とは、4次項のみを発生させようとした時に2次項も同時に発生してしまう様なことをさす。

3. 実験と結果

直径1mm以下のサンプルを作りZ軸上を移動させ、¹H核のNMR信号のピーク値をCW法により測定することで磁場を求めた。測定はサンプルとNMRプローブを取り外し、磁場測定プローブを代わりに挿入して行なった。解析は最小二乗法を用い、補正した磁場

はZ軸上のみである。シムによる発生磁場の測定を従来型シム、マトリックスシムに対して行ない、磁場の測定、解析による均一化と、その状態を用いたスペクトルの目視による分解能調整をマトリックスシムで、総てをスペクトルの目視で行なう分解能調整を従来型のシムで行なった。

1). マトリックスシムの発生する磁場

二つの方法で発生した0次項磁場を比較のため図2-1に示す。マトリックスシムの発生する磁場は ± 15 mmの範囲で均一なものであるが、従来型のシムは明らかに2, 4次等の不均一項を含む。マトリックスシムの発生磁場の純粋性が理解できる。他の磁場傾斜項でも同様の結果が得られる。従来型のシムは0次項磁場に非純粋項を含むが修正を行わない場合にはマトリックスシムでも同様の結果を与える。シム出力の修正を測定により行なわない限りはこのような傾向が有るようだ。図2-2に6次項磁場を示す。

2). 磁場の補正

磁場を測定、解析し、それを補正する磁場をマトリックスシムに発生させるという作業で磁場均一化する。但し、一回の作業では完全な補正は不可能なのでこの作業を繰り返す。この方法で補正した磁場と従来型シムを用いたスペクトルの目視による補正磁場とを図3に示す。この例では軸上磁場の均一度に関し従来より優れた結果を得た。実験に用いたSCMは2.70 MHzであり、約4 Hzの5次項と約1.5 Hzの大きな6次項を含む磁場分布を持つ。スペクトルの目視で行なう場合は4次項までの補正でもかなりの熟練を要するのであり、この様な高次項補正は殆ど不可能と考える。マトリックスシムを用いた場合には

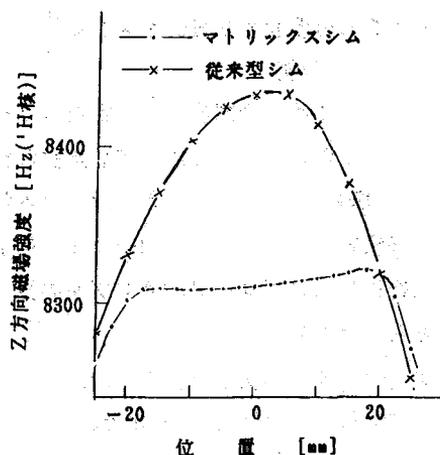


図2-1 マトリックスシムと従来型シムの0次項比較

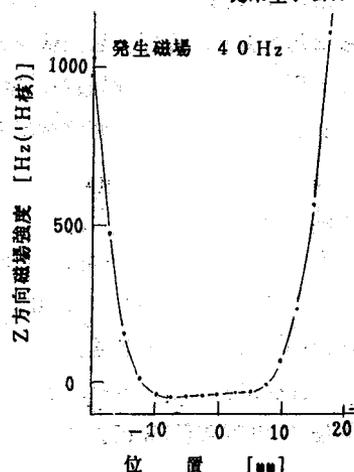


図2-2 マトリックスシムの6次項

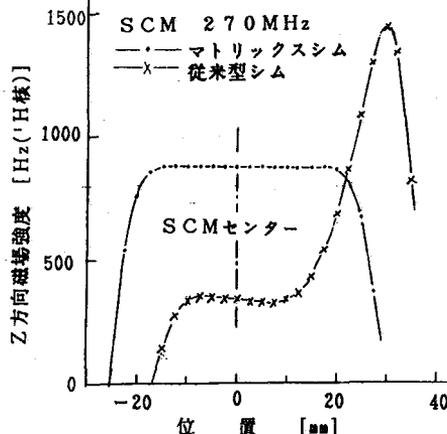


図3 マトリックスシムと従来型シムの磁場補正比較

$\pm 15\text{ mm}$ の範囲で 5 Hz (2×10^{-8})の均一度を達成している。

3). 分解能調整

磁場均一化後に分解能調整を行なった場合には比較的容易に高い分解能を達成し、磁場分布の良くないSCMに於いても良好な線形性能を得た。一般にSCMの均一度とその他の性能(磁場強度等)の確保とは矛盾する傾向が有り、マトリックスシムはそのような場合での解決策となる。磁場の均一化後に軸上磁場も含めた分解能調整を必要とするのは、均一化後にNMRプローブ、サンプルの挿入により多少ではあるが磁場分布の変化が起きることなどによる。

以上により、高次項を含めた純粋な補正磁場をシムにより出力し、完全ではないものの、測定、解析による磁場の均一化で、今まで経験に拠っていた分解能調整を定量的に行うことに成功し、NMR装置の性能向上に寄与したと考えている。

尚、大口径SCM(主コイル径 1 m)では、測定、解析による調整を $7.6 \times 10^{-6}/300\text{ mm}$ の精度で行なった例があり、今回、超伝導シムに対してもいわゆるNO-SPIN項も含め全シムに対して測定、解析による調整が、室温シムより1~2桁低い精度で適用でき、この場合はスペクトルの目視による調整が不要であることを実験により確認した。

4. 参考文献

- (1) M. W. Garrett, J. Appl. Phys., 22, 1091(1951).
- (2) M. D. Sauzade and S. K. Kan, Advance in Electronics and Electron Physics, 34, 1(1973).
- (3) I. Zupancic, J. Sci. Instrum, 39, 621(1962).
- (4) 山本俊二, 山田忠利, 守田正夫, 松田哲也, 岩本雅民, NMR医学 4, 86(1984).

(日本電子) 藤戸輝昭, 出口健三, 松浦俊雄

I. 序

これまで固体の¹H-NMRによる研究法は、スピネコー法およびブロードライン法が多く、高分解能NMRを用いた研究例は少なかった。これは固体状態では、プロトン間の強い双極子相互作用により線幅のブロードニングが起るため、高分解能NMRシグナルを得るには、多重パルス法という特殊な測定法を用いなければならなかったからである。さらにこの方法には横軸が縮小されるという欠点があった。(スケールレング)しかし最近、高磁場NMRおよびMAS(Magic Angle Spinning)-NMRの発達により、多重パルスを用いなくとも通常の高磁場NMR装置を用いて、¹H-MAS NMR法の測定例¹⁾が報告されるようになり、その測定容易さ、および高感度、高分解能性のため、固体物性に対する¹H-MAS NMRの有効性が見直されてきている。

今回筆者らは、広幅NMR(スピネコー法およびブロードライン法)と高分解能NMR(通常FT-NMR法)との接点である¹H-MAS NMRの有効性とその限界を明らかにするため、High PowerによるSolid Echo法を用い、広域観測幅での¹H-MASスペクトルを測定し、各種サンプルにおけるMASによるナローイングについて考察するとともに、これを応用し、無機物中の結晶水や吸着水およびGrossサンプル中のプロトンについての¹H-MAS NMRスペクトルと構造との対応について知見を得たので、ここに報告する。

II. 実験

¹H-MAS NMR測定は、JEOL GX270 FT-NMRにGSH-27MU多核固体高分解能NMR装置を付けて行った。なお、プロトンの測定周波数は270.2MHzで、 $\pi/2$ パルス幅は4.5~5 μ sec(約12Gauss)、MAS回転数は3.5~4.0KHzであり、照射側200Wのパワーアンプを使用し、照射ホーンで¹H観測を行った。またスピネコー法による測定には、図1のようなSOLID ECHOパルス列を使用した。

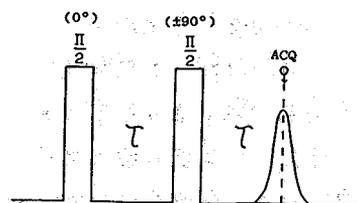


図1. SOLID ECHOパルス列

このパルス列は、2回ごとにパルス列の位相をキャンセルして、 τ を短くすることが出来るため、遅い減衰の、即ちブロードなだけのスペクトルを正確に測定することを可能としている。本実験では、 $\tau = 4\mu$ secの条件を用いた。

試料としては、線幅の異なる高分子(ゴムとポリエチレンフィルム)及びヘキサメチルベンゼン、ヘキサエチルベンゼンを用い、応用例としては、Gross(米、大豆、きな粉)サンプルと、 α, β -セッコウを使用した。

ふじとてるあき、でぐちけんぞう、まつうらとしお。

III. 結果および考察

原理 一般に、プロトンでは CSA (Chemical Shift Anisotropy) が小さいことから、 ^1H -MASスペクトル及びその線幅は、双極子ハミルトニアンの \mathcal{H}_D によって記述され、その時間変化は次式で表わせる。²⁾ (β : H_0 と回転軸とのなす角)

$$\mathcal{H}_D(t) = \sum_{i < j} \frac{1}{2} \gamma_i \gamma_j \frac{\hbar^2}{r_{ij}^3} (I_i I_j - 3 I_{iz} I_{jz}) \left[\frac{1}{2} (3 \cos^2 \beta - 1) (3 \cos^2 \beta'_{ij} - 1) + \frac{3}{2} \sin^2 \beta \sin^2 \beta'_{ij} \cos(\omega_r t + \phi_0) + \frac{3}{2} \sin^2 \beta \sin^2 \beta'_{ij} \cos 2(\omega_r t + \phi_0) \right]$$

r_{ij} : 核スピン I_i と I_j とを結ぶベクトル, β'_{ij} : r_{ij} と回転軸とのなす角

マジックアングル ($\beta = 54.7^\circ$) の時、カッコ内第 1 項は消える。他の ω_r (回転数) の整数倍で振動する項は残るが、 ω_r が十分大きければ、時間平均されてこれも消え、その結果は次のように分類される。 $\Delta\nu_s$ は静止状態の線幅を表わす。

(A) $\omega_r \gg \Delta\nu_s$. 分子の高速運動のため、双極子幅のナローイングが著しい系。線幅は十分回転数よりも小さいので、ナローイングされサイドバンドも小さい。残りの線幅は、プロトン間の結合による分裂がかさなってブロードニングを起していると考えられる。(丁は MAS によってナローイングされない。)

(B) $\omega_r \leq \Delta\nu_s$. ある程度運動しており、ナローイングはするがサイドバンドがかなり大きくなる系。

(C) $\omega_r \ll \Delta\nu_s$. 不動格子の場合で、線幅が大きすぎて、回転の効果を与えない。これは、双極子相互作用でプロトンが自然反転する時間 ($\sim 1/\Delta\nu_s$) の方が MAS で一回転する時間 $2\pi/\omega_r$ よりもずっと短いためである。

結果 上記に従って実験結果を分類すると、表 1 のようになる。各線幅は実測スペクトルを波形分離して求めた。

<表 1>

分類	サンプル	$\Delta\nu_s$ (静止線幅)	$\Delta\nu_m$ (MAS線幅)	$\Delta\nu_m/\Delta\nu_s$ (ナローイング比)
A	加硫ゴム	890 Hz	120 Hz	1/8.3
	米	810 Hz	90 Hz	1/9
	大豆	810 Hz	100 Hz	1/8
	キナ粉	890 Hz	41 Hz	1/22
B	ポリエチレンフィルム	4.3 kHz	540 Hz	1/8
	ヘキサメチルベンゼン	11 kHz	1.3 kHz	1/8.25
C	ヘキサメチルベンゼン	32 kHz	32 kHz	1

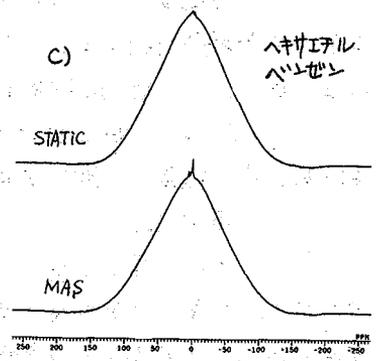
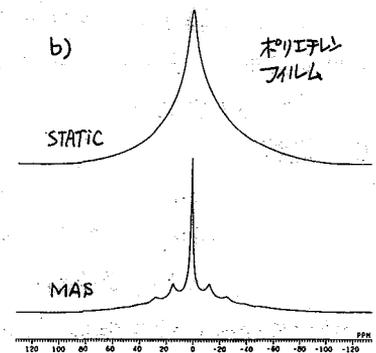
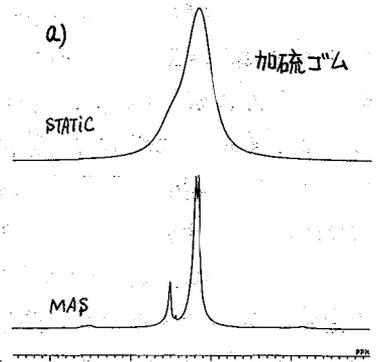


図 2. 3種の ^1H -固体 NMR スペクトル

各分類中の代表的なスペクトルを前頁の図2 a)~c) に示した。各サンプルの特徴は、下記のとおりである。

加硫ゴム： Aに相当し、静止状態のスペクトルは、溶液状態での¹Hのケミカルシフトの範囲におさまっており、静止状態の線幅はシフト幅よりも小さい。ナローイング比は、1/8程度で、サイドバンドも非常に小さい。

ポリエチレンフィルム： Bのケースで静止状態の線幅が数kHzで、回転数はこれよりも小さい。ナローイング比は、Aと同程度であるが、線幅の絶対値は大きく、サイドバンドも大きくなっている。

ヘキサエチルベンゼン： Cであり、静止状態及びMASでの線幅が共に数10kHzのもの。ナローイングも起らずサイドバンドも出ない。

Cの結果と、磁場増大に伴う静止線幅の増大が見られなかったことより、固体の¹H-NMR線幅は、ケミカルシフトの異方性によるものではなく、プロトン間の双極子相互作用に起因する Homogeneous Broadening であることが確かめられた。

スペクトルの解釈 また、2-a), b)各スペクトルについては、MASによる分解能の向上により、次のようにその構造を解析することが出来る。

a)の加硫ゴムは、¹³C-MASより、イソプレレン構造を持つことが分っており、¹H-MASのピークは、高磁場から、 $-CH_3$ 、 $-CH_2-$ 、 $=CH$ のプロトンにアサインすることが出来る。

b)のポリエチレンフィルムは、MASによりナローイングする成分と、ブロードなまま残る成分が含まれていることが分るが、一斉に¹³C-CPMASの測定から、このポリエチレンフィルムには、非晶成分と、結晶成分が含まれていることが分っており、¹H-MASにおけるシャープな成分とブロードな成分が、それぞれに対応していることが分る。

以上のことから、¹H-MASによって、溶液状態と同程度にスペクトルアサインが可能なのは、Aに帰属される様なサンプル系であると結論出来る。

応用例 Aの場合の応用例として、大豆とキナ粉のスペクトルを図3-a), b)に示す。この場合にもMASによって、

著しいナローイングが起り、そのスペクトルアサインが可能である。大豆およびキナコの主成分は、水、油脂(リノール酸etc)と糖などがあるが、これらのうち、水と油脂については表2のようにアサインされる。(なお油脂は一般にトリグリセリドの形をすることが多い。)

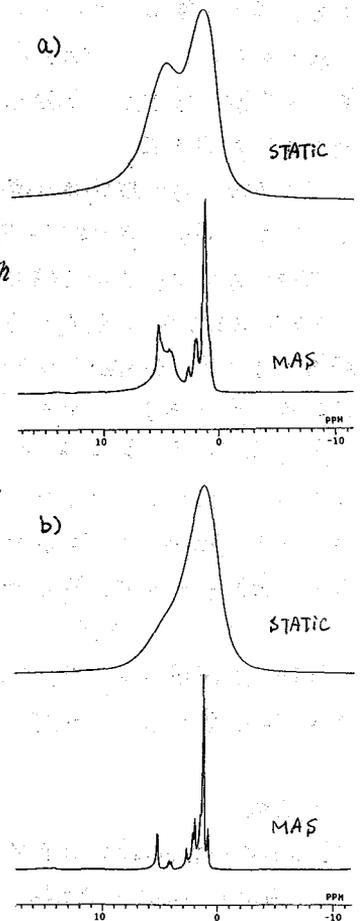


図3. a)大豆及びb)キナ粉の¹H-NMRスペクトル

<表 2 >

$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-OCO-R}' \\ \\ \text{CH-OCO-R}'' \\ \\ \text{CH}_2\text{-OCO-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{-(CH=CH)-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH}_3 \end{array} $	トリグリセリド	(ppm)	5.24	4.16	2.67	1.22	0.81
		=CH- /H ₂ O	⑤	④	③	②	①

また、大豆とこれを加熱、粉碎したキナ粉で、ナローインゲ比に顕著な差が生じていることについては、次のように解釈される。すなわち、加熱粉碎することにより、大豆細胞中にとりにまかれた油脂が、分離し自由になるため運動性が増し、MASの効果により大きく受け双極子幅が減少して、線幅の著しいナローイングが起きたものと思われる。

以上のように、¹H-MASによる分解能の向上により、大豆-キナ粉の系では、有効なスペクトルアサインメントを行うことが出来た。

¹H-MASの無機物中の結晶水、吸着水への応用として、α-セツコウ、β-セツコウについて実験を行い、図4-a), b)のスペクトルを得た。α, β-セツコウは共に

CaSO₄·0.5H₂Oの組成をもつが、物性上の相異点は、結晶セツコウ(CaSO₄·2H₂O)からの焼成過程から生ずる含水量の差であり、これが、両セツコウの強度差となって表われている。図4-b)のスペクトルから、β-セツコウでは、MASによってナローイングされる1.2 Hzに4.3 ppmのピークが観測され、これがβ-セツコウを特徴づけるものと考えられるが、詳細については現在検討中である。

なお、本研究にあたり、α, β-セツコウを提供していただきました小野田セメント(株) 岡田能彦氏に感謝いたします。

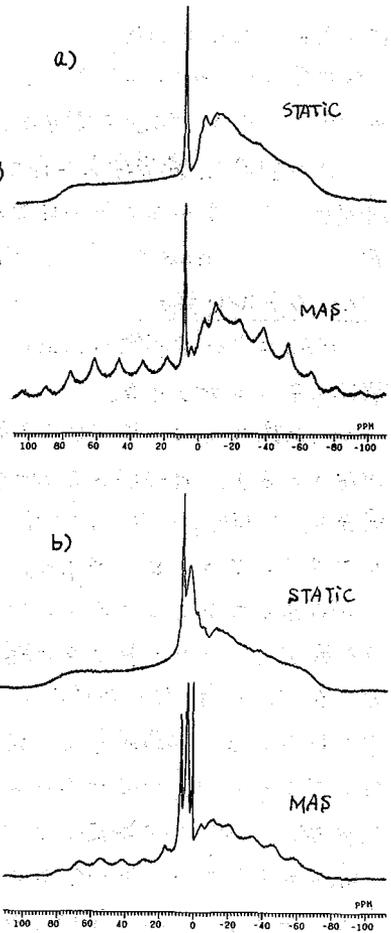


図4. a) α-セツコウ 及び b) β-セツコウの¹H-NMRスペクトル

文献

- 1) K.F.M. G.J. Scholle, A.P.M. Kentgens, W.S. Veeman, P. Frenken, and G.P.M. Vonder Velden : J. phys. chem. **88**, 5 (1984)
- 2) E.R. Andrew: Magic Angle Spinning, Internat. Rev. in Phys. chem **1** 95 (1981)

日本電子(株) °藤井直之, 栗原範明, 永山国昭

【はじめに】 二次元NMR法は有用な情報を簡明に表示するすぐれた方法であるが、大きな弱点も持っている。それは測定に時間がかかること、言い換えれば測定感度が悪いことである。もちろん1次元NMRとの比較では、単に一回の測定時間の比較ではなく、二次元法で一度に得られる大量の情報の量を考慮しなければならない。しかしこの得られる情報の量による正規化を図ってもまだ二次元NMRがコストのかかる測定法であることは多くの場合確かなようである。これを解決するための1つの方向を示すのが本研究の目的である。ここでは測定時間の短縮ではなく、更に大量の情報を1度に取り込むことでコストを下げることを考える。

【二次元法の体系的利用】 二次元NMRを用いた研究では、通常いくつかの二次元NMRを組み合わせ問題の解決を図る。今まで提案された二次元法についてその実験スキームを分類したのが図1である。ここでは同種核についてのみのパルス列を示したが、各測定法の異種核への拡張も容易でありすでに完了している。これらの中で

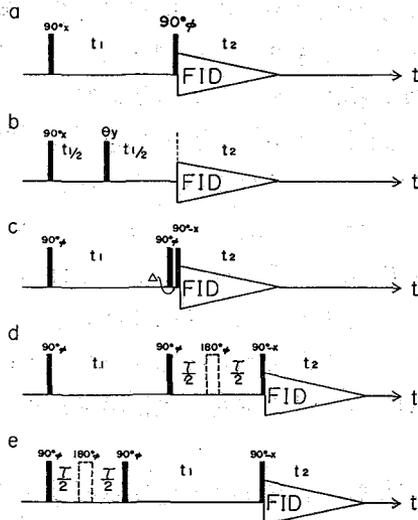
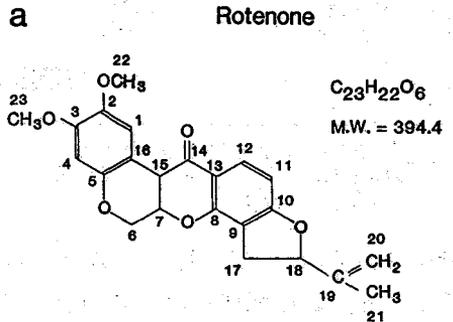


図1. 各種二次元NMR法(同種核)
a: COSY, b: J-resolved(2DJ), SECSY,
c: MQT filter, d: NOESY, RELAY,
e: MQT coherence

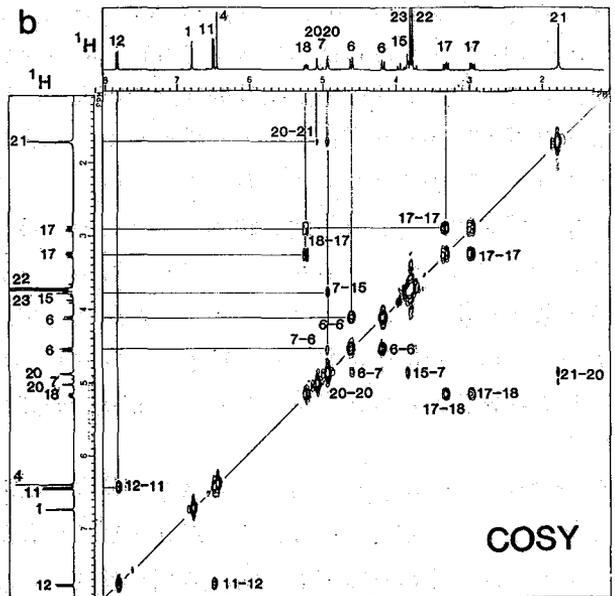


図2. ロテノンの構造式(a)とロテノンのCOSYスペクトル。GX400, データ(2kx256)

ふじい なおゆき, くりはら のりあき, ながやま くにあき

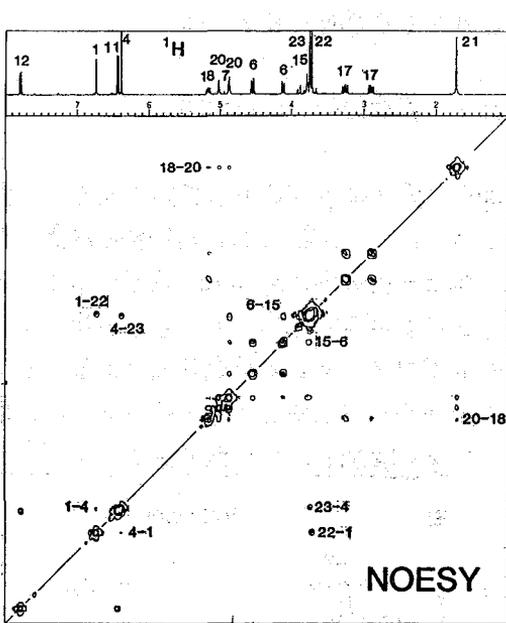


図3. ロテインのNOESYスペクトル.
mixing time $\tau = 800$ ms. GTX 400,
データ(2k x 256).

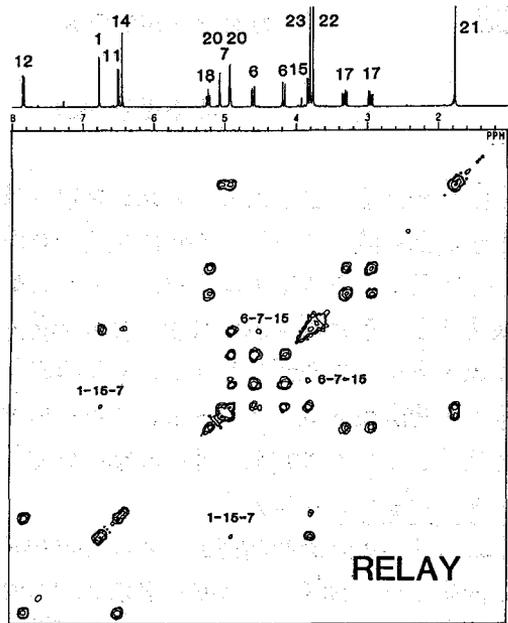


図4. ロテインのRELAYスペクトル
mixing time $\tau = 72$ ms. GTX 400,
データ(1k x 256).

特にZDJ (resolved), COSY, NOESYの組み合わせがよく用いられる。又最近では図1のc, dに掲げたMQT filter, RELAY法も応用されるようになった。ここで後に述べるCOSY-NOESY-RELAY combined法との比較のため、中程度の分子量の化合物ロテインのCOSY, NOESY, RELAYスペクトルをそれぞれ図2, 3, 4に載せた。COSYについては比較的J結合の大きい ^1H 核間の相関が示されている。帰属したピーク間の相関を図中に2つの番号の対として表した。図2aのロテインの構造式と比較して妥当な相関スペクトルであることが分る。NOESYについてはCOSYに現われていない空間的に近い ^1H 核間の相関ピークのみを番号で示した。RELAY法はNOESY法と同じパルス列であるが、 180° パルスもmixing期(τ 期)にさしはさむことと位相の組み合わせが異なる。この2次元法はCOSYを2回連結したもので、例えば図3のように1-15に移った磁化が更に7に移ると言うリレーを行う。この3者の2次元スペクトルはそれぞれ独自のNMR情報を持っているが、全部を観測するには大変長い測定時間と必要とする。

【COSY-NOESY-RELAY法】最近この長い測定時間を短縮する方法が提案された^{2,2)}。図1のaとdを見ると2パルスまでの実験スキームは同じである。従ってdのパルス列において待ち時間 τ の間に観測(検出)がなされれば、aとdすなわちCOSYとNOESYの実験を別々に行う必要はない。確かにこれが可能であることが示され²⁾、COSY-NOESY(COCONOSY)と呼ばれる。実験上の変更は、 τ 期に検出を可能とし、かつ独立の2つのデータ(FID)をしまう2つの2次元データのファイルを用意すること

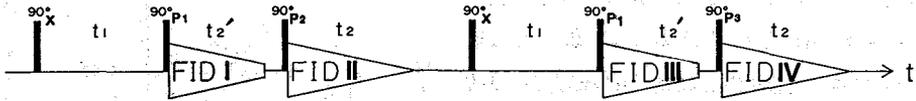


図5. COSY-NOESY-RELAY法 (CONORY) の実験スキーム. FID I ~ FID IV はそれぞれ別のデータファイルに貯えられる。測定完了後ファイル間の線形結合を行い、I+II → COSY, II+IV → NOESY, II-IV → RELAYとなる。位相は以下を用いた。P1: 0°, 90°, 180°, 270°, P2: 0°, 90°, 180°, 270°, P3: 180°, 270°, 0°, 90°。

である。このいくつかの二次元NMRの有機的結合を更に押し進めることが可能であろうか。これを調べるために3パルス入力の各時期、時期と最後の検出期で得られる二次元応答を分類してみよう。3つのパルスの位相の組み合わせに伴う出力の位相を示したのが下表である。

	入力パルスの位相			時期		検出期					
	1パルス	2パルス	3パルス	axial	SQT (COSY)	axial	ZQT (COSY)	SQT (COSY)	DQT (COSY)	RELAY	NOE
1	0°	0°	0°	+	+	+	+	+	+	+	+
2	0°	0°	180°	+	+	-	-	+	-	+	-
3	0°	180°	0°	-	+	+	-	+	-	+	-
4	0°	180°	180°	-	+	-	+	+	+	+	+

表のように出力信号が位相の組み合わせに対し異なる符号を示すことが分る。従って従来のようにこれらと同じファイルにしまわず、異なるデータファイルとして保管できれば、最後にこれらのファイルの結合から各々異なる二次元NMR出力が行われることが理解できよう。

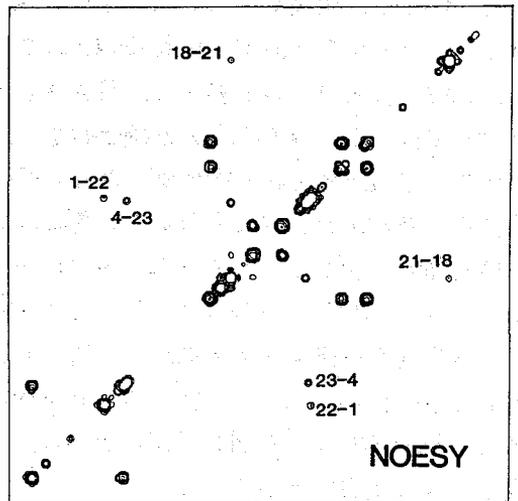
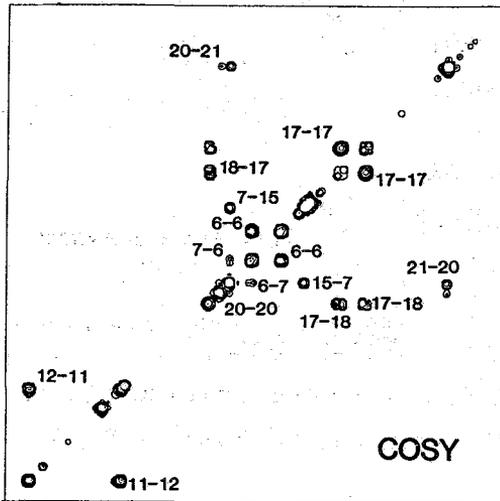
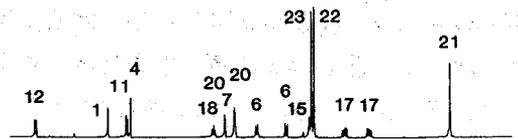
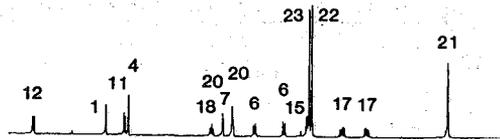


図6. CONORY法で得たロテインのCOSY. 図6~8は図5に示すパルス列の同一実験で得られた。

図7. CONORY法で得たロテインのNOESY. t_2 (mixing time) は130msが設定された。

まずて期の二つの応答は $1+2+3+4 \rightarrow \text{COSY}$,
 $1+2-3-4 \rightarrow \text{axial}$ として区別される。又検出
 期では $1+2+3+4 \rightarrow (\text{SQT-COSY, RELAY}), 1-2-3+4$
 $\rightarrow (\text{ZQT-COSY, DQT-COSY, NOE})$ として必要なら
 $1-2+3-4 \rightarrow \text{axial}$ としてそれぞれの応答が区別
 され独立に取り出される。90°, 180°位相を用いれ
 ば更に検出期の ZQT-COSYとDQT-COSYが区別
 される。しかし我々の実験ではて期にCOSYス
 ペクトルが得られ、スペクトルの比較から何が
 COSY由来か分るので敢えてこれらと更に分け
 る必要はないであろう。以上のアイデアを基
 礎に更に実験上の要求制約を考慮してまとめた
 のが図5に示す実験スキームである。90°, 270°
 の位相が入ったのは、縦軸(ω_1 方向)の周波数の
 符号を区別するためであり、ZQTとDQTE区
 別するためではない。又データファイルもつ独立
 に作る必要から図のように4つのFID E 区別し

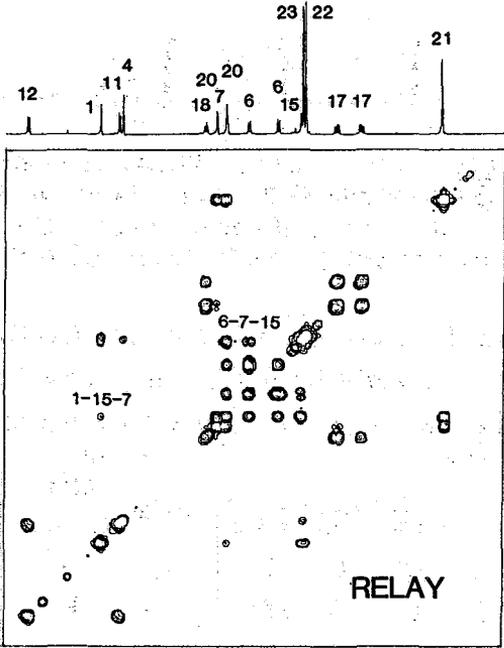


図8. CONORY法によるロチンのRELAY
 スペクトル。図6~8依に、データ(512x256)。

た。本来FIDIとFID IIIは同一ファイルに保管さ
 れるべきものである。ロチンについてCOSY, NOESY,
 RELAYの結果を図6, 7, 8に示した。別々に実験して得
 たスペクトル図2~4と比較して満足いく分離が得ら
 れていることが分る。又RELAYスペクトルの1-15-7,
 6-7-15が確かに通常のCOSY法で見られぬりレー
 ピークであることを示すため図9に長距離J(小さいJ)を強調
 したCOSYスペクトルを載せた。図4, 8と比較された。
 COSY法はて期に得られるので問題はないとしても
 NOESYとRELAYは同一検出期の出力を単に異なる線
 形結合で区別しただけである。この考えは更に拡張さ
 れ得る新しい概念を含んでいる。すなわち3パルスに
 おいて異なる位相の組み合わせに対しそれぞれデータフ
 ィイルを用意し最後にその線形結合を行う (multifile
 linear combination)。この方法はそれぞれの2次元法に対し best conditionが設定できな
 い制約が残るが(例えばて期は図3で800ms, 図4で72ms, CONORYで130ms) 2次元法のコ
 ストを下る有力な方法であろう。

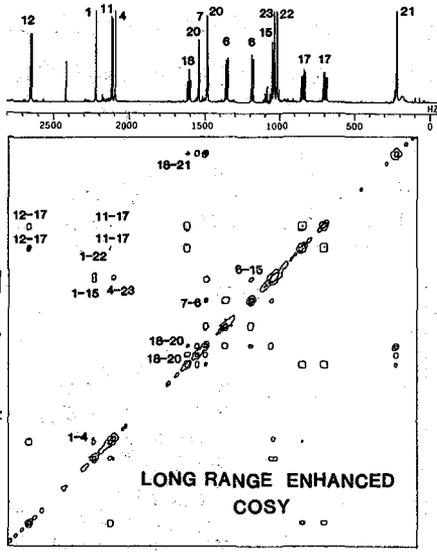


図9. 62msの初期待ち時間と
 長距離J強調したCOSY。

<文献> 1) C.A.G. Haasnoot et al. J. Magn. Reson. 56, 343(1984). 2) A. Z. Gurevich
 et al. J. Magn. Reson. 56, 471(1984).

○高橋 征三, C・ホー
日女大・家政, CMU

軽水中で生体高分子の¹H-NMRを測定すると、特異的な exchangeable proton のシグナルが縮小されることがあり、構造研究における貴重な情報源となりうる。しかし軽水中での測定はなかなか難しい点があって、現状では必ずしも何処でも出来るという訳にはいかないようである。その理由を考えると、

(1) 軽水中のNMR測定法として、NMR相関法⁽¹⁾とRedfieldの2-1-4パルス法⁽²⁾が一般に普及しているが、これらは市販のパルスFT-NMR装置に特別の付属装置をつける必要がある。しかしその装置を備えている所は少ない。

(2) かりに装置があったとしても、その調整が十分でないし、期待したスペクトルが得られないことが多い。このことは軽水中のスペクトルを扱う機会が少ないところでは決して見過すことのできない問題である。

(3) 測定パラメータの設定が普通の測定よりかなり面倒である。等々が挙げられる。ところが数年前から上記の方法に代るものとして、nonselective high power pulse を使う方法が幾つか提案されている。これらの方法はいずれも2つ以上のパルスを適当な待時間をおいて組み合わせ、溶液のH₂Oを励起しないように工夫したもので、適当なパルスプログラマーがついているものならば、市販の装置に付属装置を買いだす必要がない、という利点がある。

著者は、我国でこれらの方法を実際に試し評価したという報告を聞かないので、ハモグロビンを対象にPlateau, GuéronのJR(Jump and Return)パルス法⁽³⁾を使用した経験について報告する次第である。

実験

装置はCMUに設置されているBruker WH-300を使った。これは16ビットA/Dコンバータを使っていること以外特記することはない。試料はdeoxy Hb Aを5φのNMR試料管に入れ、ロック用に重水を1滴加えた後、窒素置換して密封した。濃度は約2 mMである。

結果

(1) JR (Jump and Return) パルス法

JRパルスの特徴は90°-τ-90°の2パルス系からなり、

(a) nonselective high power pulse だけか

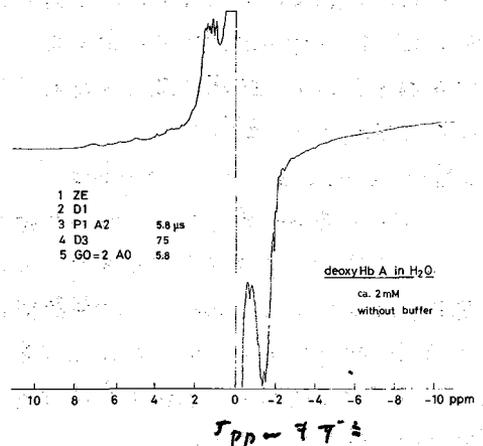


図1 JRパルスによる軽水中の deoxy Hb A のスペクトル

構成される。

- (b) 0° と 180° の位相 2 つだけを使う
- (c) パルス を H_2O の周波数に合わせる
- (d) スペクトルの位相合わせが簡単

なことである。図 1 はその結果で、パルスの性質上、スペクトルの左右で上下逆符号になる。図 2 はその左側半分の拡大図で、 H_2O シグナルの裾による成分を取り去るために、ベースライン補正をした。待時間 $75 \mu\text{sec}$ 、約 2 分間の積算で十分な S/N 比の hyperfine shifted resonances が測定

できた。receiver の飽和を避けるために、gain は重水中の約 $1/10$ である。そのために重水中のスペクトルに比べて S/N 比が約 $1/3$ に低下している。装置が違うので比較は適切でないが、同程度のスペクトルを得るのに NM R 相関法で約 20 分、Redfield パルス法で 1 時間以上かかった経験がある。ただしこれ以上 S/N 比を上げる目的で積算を増しても、 H_2O シグナルが大き過ぎるため、余り効果がなかった。つまり試料濃度の低下に伴って急激な低 S/N 比の低下が予想される。

(2) SJR (Set Jump and Return) パルス法

SJR パルスは 4 パルス系からなり、 H_2O シグナルの抑制効果は JR パルス法より大きい。Plateau, Guéron の提唱したものと方法は、

$$5.7^\circ_y - 10^\circ_x - 5.7^\circ_y - 90^\circ_x - \tau - 90^\circ_x$$

であるが、安定なパルスが作れる下限が $0.4 \mu\text{sec}$ だったので 6.2° パルスになった。また 90° 位相を変えても効果に違いを見出さなかったため結局もっと単純な

$$6.2^\circ_x - 10^\circ_x - 6.2^\circ_x - 90^\circ_x - \tau - 90^\circ_x$$

というパルス系で実験した。10 τ の待時間を 5 τ に、 90° パルスを 45° パルスにしても差は認められなかった。 H_2O の抑制効果は JR パルス法の約 1.5 倍あったが、receiver の set は同一条件だったので、S/N 比に差は認められなかった。図 3 から明らかのように、 H_2O シグナルが図 1 と反対位相になるので、スペクトルの位相合わせやベースラインの補正がや、難かしくなる。

(3) 混合パルス (2x SJR + 3x JR) 法

図 1 と図 3 の H_2O シグナルが互に逆位相なので、スペクトル和をとって H_2O シグナル

deoxy Hb A in H_2O

ca. 2 mM without buffer
NS=400 (-2 min)

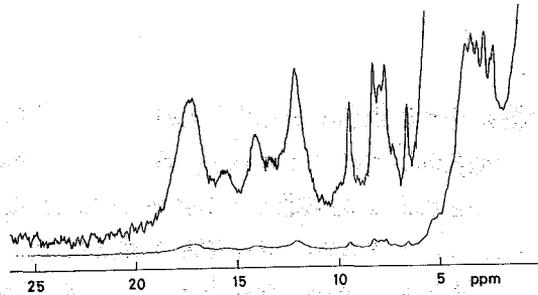


図 2 JR パルスによる重水中の deoxy Hb A のスペクトル (常磁シフト領域)

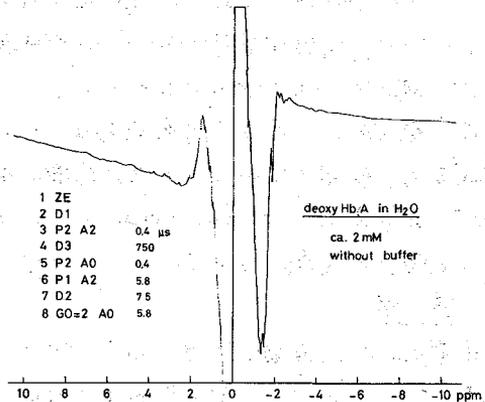


図 3 SJR パルスによる重水中の deoxy Hb A のスペクトル

の寄与を消そうとしたが、磁場のドリフトのためか、うまくいかなかった。従って real time で FID の和をとった。図4にその結果を示すが、右半分を上下逆にし、普通のスペクトルと同じになるようプロットした。図4も明らかのように、 H_2O シグナルから約 0.3 ppm 離れたタンパク質のシグナルが明瞭に観測できた。これは図3、図4の結果よりも2~3倍改善されたことになる。さらに H_2O シグナルの裾の寄与もほとんど消えたので、位相合わせやベースライン補正が容易になった。

混合パルス法の最大の利点は、コンピュータ語長の制限にもとずく、限界 S/N 比の問題が大幅に軽減されたことである。混合パルスを使えば、重水中で測定できる試料はほとんど軽水中でも測定できるようになると期待される。

欠点は測定のための sequence が複雑になったこと、 H_2O シグナルの抑制効果が JR パルスと SJR パルスとで違うので、多少ベースラインがうねっていることである。

考察

H_2O シグナルを抑えるために、いろいろなパルス法が報告されているが、著者はそれらを実際に比較検討した経験がないので、どの方法が秀れているかを判断できる立場にない。JR パルスは確かに単発ということ以外特に秀れている訳ではない。複雑なパルス系を使えば、それだけ H_2O シグナルの抑制効果は上がるだろうが、今度は機械の調整とか、パラメータの選択に時間がかかることになる。そういう意味で著者は 1-2-1 パルス⁽⁴⁾を使って測定している現場を見たが、JR パルスより格段に秀れているとは思わなかった。個人的意見としては、JR パルス法より 10 倍程度 H_2O シグナルを抑制するパルス法があれば別だが、簡便な点を言えば、JR パルス法は実用的な方法としてまあまあ妥協できる方法の一つではなかろうかと思う。

今回の JR パルス法の特徴をまとめると、
 1) 特別な付属装置はいらない。
 2) パルス系列が単発である。
 3) 測定条件の設定が簡単である。
 4) 装置の調整に神経質にならなくともよい。
 5) S/N 比が比較的よい。
 6) 等々である。

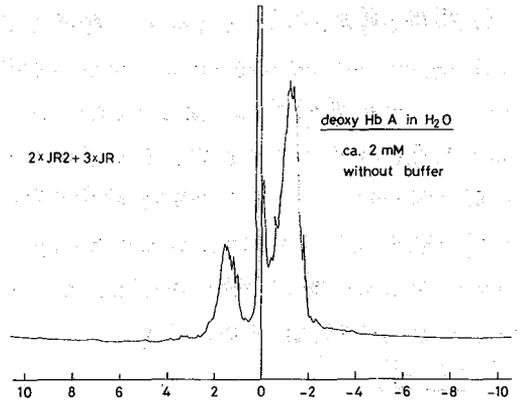


図4 混合パルス (2xSJR + 3xJR) による軽水中の deoxy Hb A のスペクトル

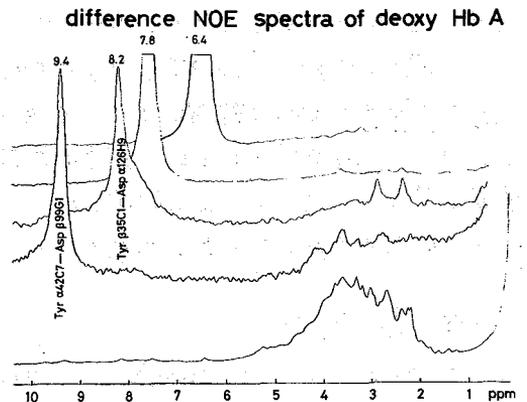


図5 deoxy Hb A の差 NOE スペクトル

今回の結果は論文よりもH₂Oシグナルの抑制効果が小さいが、以下のような理由によるものと考えられる。

- (A) deoxy Hb Aは常磁性タンパク質なので、H₂Oシグナルの抑制には不利な条件にある。
- (b) 磁場の特性が思わしくなく、補正できていない。
- (c) hyperfine shifted proton signalを完全にカバーするため待時間が75 μsecと短い。
- (d) 2回目のパルスで必ずしもH₂OプロトンがZ軸に戻っていない。つまり位相の調整をやっていないので、必ずしも0°と180°になってなかったり、radiation damping等の影響で必ずしも2つのパルスが等しくない可能性がある。

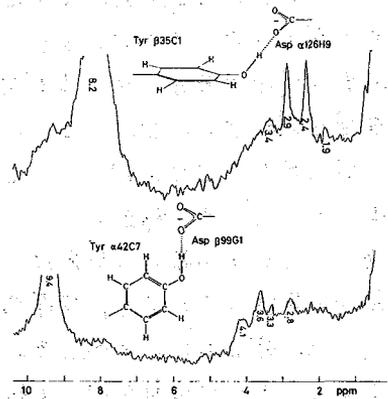


図6 deoxy Hb Aの差NOEスペクトル

応用

Hb Aは数本の特徴的なexchangeable proton resonanceが観測される。そのうちH₂Oが5.78 ppm, 8.2 ppmのシグナルはligandに依存なく常に観測されるが、6.4 ppm, 9.4 ppmのシグナルはdeoxy状態の時だけ観測される。8.2 ppm, 9.4 ppmのシグナルは明確に帰属されていて、それぞれβ35, α42のチロシンOHプロトンであるとされている。

これらのプロトンの差NOEスペクトルはJRパルス法で容易に測定できる(図5)。図6は図5の拡大図であるが、β35とα42のチロシンではその存在状態が違っている。差NOEスペクトルの結果は、Tyr α42 C7のベンゼン環とOH基はほぼ同一面内に位置し、Asp β99 G1のCO₂と水素結合しているが、Tyr β35 C1のOH基はベンゼン環のほぼ垂直位置にあり、Asp α126 H9と水素結合していると解釈される。

7.8 ppmのシグナルは帰属されていないが、αサブユニットの近位ヒスチジンのNHプロトンを照射した時の差NOEスペクトルで、このシグナルが明確に観測されること(図7)および7.8 ppmを照射した時、芳香族領域に数本の差NOEスペクトルが観測されることから、候補は大分しぼられたことになる。

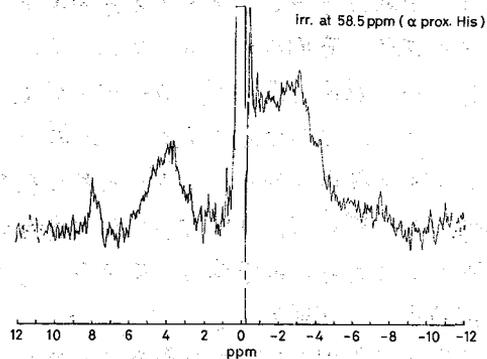


図7 deoxy Hb Aの差NOEスペクトル

参考文献

- (1) J. Dádok and R. F. Sprecher J. Mag. Res. 13, 243 (1974)
- (2) A. G. Redfield et. al. J. Mag. Res. 19, 114 (1975)
- (3) P. Plateau and M. Guéron J. Am. Chem. Soc. 104, 7310 (1982)
- (4) V. Sklenář and Z. Starčuk J. Mag. Res. 50, 495 (1982)

プロトンエンハンス二次元J分解法(2D INEPT)による J_{CH}

日本電子(株) 実室敏代, 鴨修, 永山国昭

【はじめに】 $^{13}C-H$ のJ結合を測定する二次元NMRは従来から図1に示すようなJ分解法が用いられていた²⁾。これはスピンエコー法の拡張であり, 励起, 検出供に ^{13}C に対して行われる。従って測定感度, 測定の繰返し時間の両者の制約のため, そのS/N比は極めて悪い。我々が測定したいのは J_{CH} であり, 常に結合相手として 1H 核が存在している。従って 1H 核の磁化を J_{CH} の情報を保持したまま ^{13}C 核に移すことができれば, S/N比の向上が図れるであろう。この目的のために考えられたのがここで詳述する2D INEPT法である。INEPT法²⁾の利点は, 1H 核と同じ感度で, かつ 1H 核の T_1 で決まる ^{13}C より早い繰返し時間で ^{13}C 核の測定ができることであった。これは 1H 核で励起し, ^{13}C 核で検出することによる改善である。この考えは, 即2D NMRに拡張できる。

【非選択的2D INEPT】

図2に2D INEPT法とその結果のスペクトルを示した。INEPT法では, t_1 期は変数とはならず $1/4J \sim 1/2J$ の値に固定される。2D INEPTと通常法の特徴を見るために図1, 2のロテノンの2Dスペクトルについてその内容を検討しよう。まず通常法について説明すると, 21, 22, 23のメチル基の quartet, 6, 17, 20の triplet, 多くの doublet 及び4級炭素の 2J , 3J の結合(2, 3, 5, 8, 9, 10, 13, 14, 19)が見えている。また76 ppm

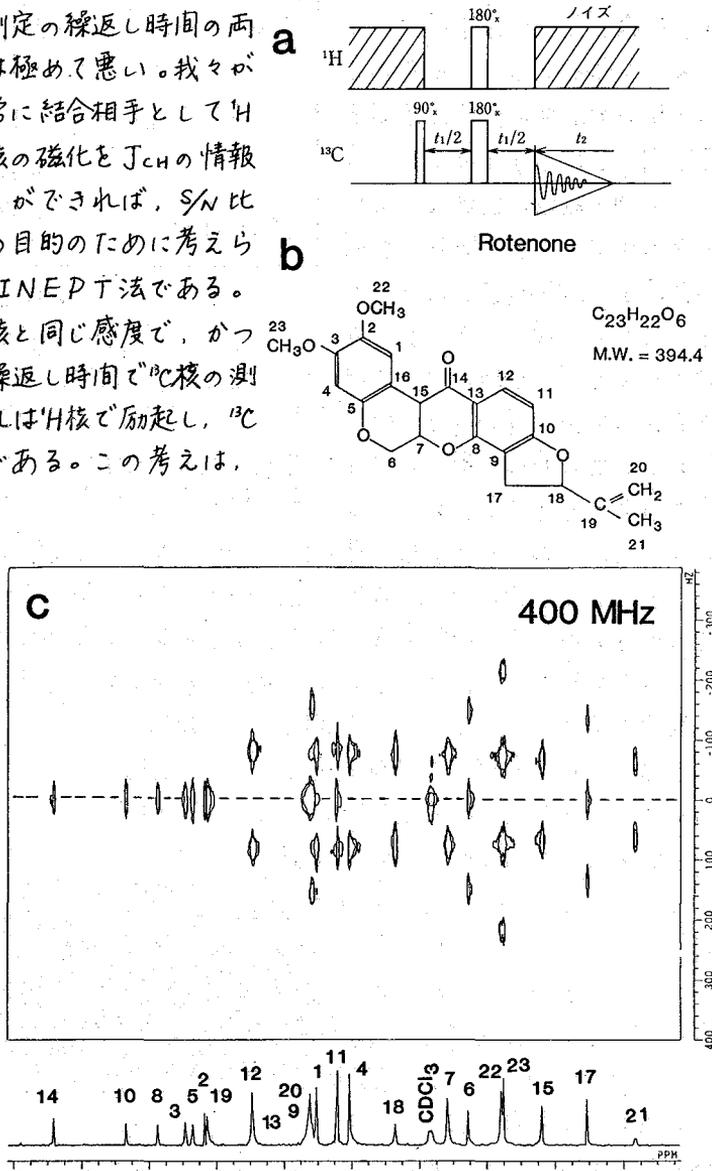


図1. ロテノンの二次元 J_{CH} 分解スペクトル(通常法) a:通常法のパルス列, b:ロテノンの構造, c:スペクトル

が見える。これに比べて、2D INEPTスペクトル
 図2bには全て doublet 的 (0 Hz 付近も実は
 doublet) スペクトルが見えている。これはどう解
 釈されるのであろうか。まず INEPT 法が、本来
¹H 核の磁化をみる測定法であること、これが理解の

キーポイントである。すなわち、
¹³C に結合した ¹H 核のその NMR
 スペクトルが 2D INEPT で
 は各 ¹³C の周波数の位置に展開す
 る。図2bに示すスペクトルの
 2つの周波数軸の意味は、横軸
 が ¹³C の化学シフト、縦軸が ¹H 核
 の J による微細構造スペクトル
 ということになる。2次元 J 分
 解ではあるが、分解されるスペ
 クトルは ¹H 核に現われる J 結合
 である。図2bには図1Cに見
 られる全ての ¹³C 核が見えていな

い。例えばいくつかの4級炭素(2,3,5,9以外の)など。これはこれらのスピン系では
 J_{CH} が小さく、磁化移動の効率が悪いためである。従って $^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ の結合を見るには、
 この効率を高める実験設定をしなくてはならない。そのために t_1 期にあらかじめ 20ms の
 待ち時間を置き、また Δ を 20ms に設定して効率向上を図った。

結果を図3に示した。この長距離 J_{CH} を強調した 2D INEPT には、確かに4級炭素
 例えば2,3などのピークが強く見えて
 いる。これらの2次元ピークを詳しく見
 ると例えば、15のように $^1J_{CH} \sim 150\text{Hz}$
 と $^2J_{CH} \sim 10\text{Hz}$ の2つの ¹H の微細構
 造が同一 ¹³C 化学シフトに重なっ
 ているのが分る。また17のよ
 うに $^1J_{CH}$ で割れた ¹³C が更
 に quartet に割れている
 のが見える。前者は長距
 離の J_{CH} を取り込もうと
 すると必ず現われる問題
 である。この事情を図4
 で説明する。2D INEPT

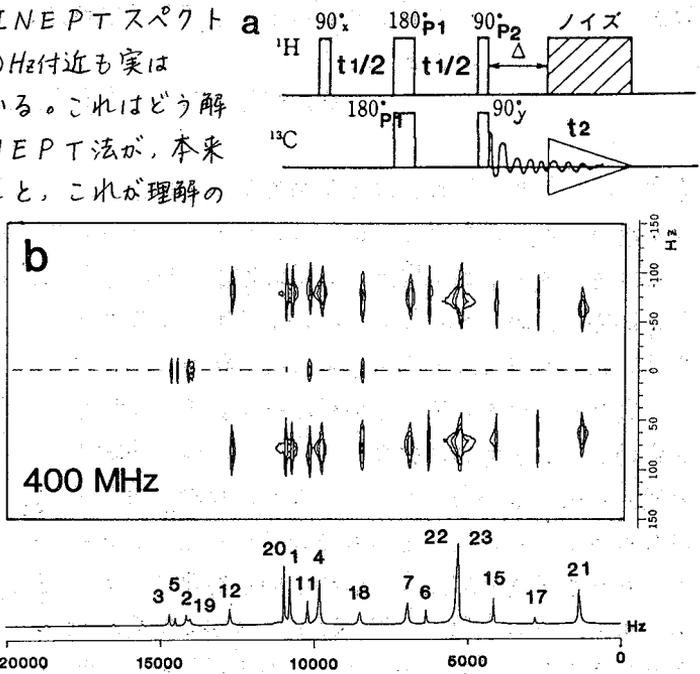


図2. 2D INEPT法 a: 実験スキーム, b: ロチンの
 2D INEPT スペクトル。

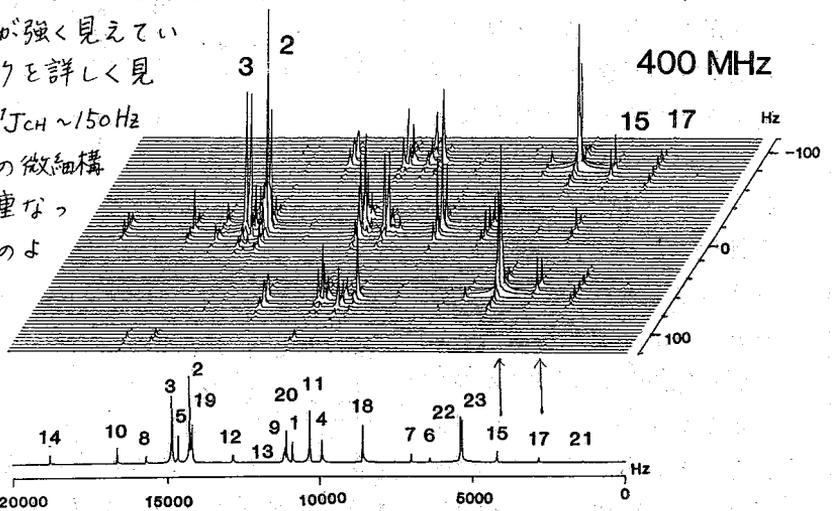


図3. 2D INEPT スペクトル。t1の初期待ち時間とΔは20ms。

では見ている核は例えば図4中の1つの ^{13}C である。 ^1J の他に ^2J , ^3J まで取り込もうとすると、当然多くの ^1H 核の磁化が ^{13}C に流れ込む。これにより ^{13}C のトータルの強度は通常のエンハンスメント(4)を超えるが、他方 ^1H 核の分裂が折り重なって出る煩しさと分離の困難さがつきまとう。図5aのcross-sectionを見ればこの問題が更にはっきりする。図5では15, 7, 4, 11, 1, 20は直接結合 $^1\text{J}_{\text{CH}}$ と長距離結合 $^n\text{J}_{\text{CH}}$ の重なったものであり、また9, 13, 8, 10, 14はいくつかの長距離 $^n\text{J}_{\text{CH}}$ が重なったものであることを示している。

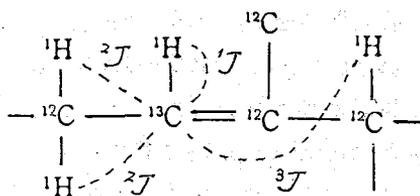


図4. J_{CH} 結合の種類と ^{13}C に移される ^1H 核の磁化の種類

もう1つの問題は J_{CH} で割れた ^{13}C 核の2Dピークが更に J_{HH} で分裂することである。これは図5aの17に端的に示されており、その他15, 11の外側の $^1\text{J}_{\text{CH}}$ 分裂ピークにもみられる。

2D INEPTは ^1H 核の分裂がそのまま ^{13}C 核へ移される。従って、もとの ^1H NMRスペクトルに J_{HH} による分裂があれば当然これは2D INEPTにも反映される。このことを見るため、図5bにロテインの ^1H NMRスペクトルを載せた。17の ^1H は確かにquartetであり、15, 11の ^1H はdoubletになっているのが分る。いずれにせよ $^1\text{J}_{\text{CH}}$ と $^2\text{J}_{\text{CH}}$, $^3\text{J}_{\text{CH}}$ の重なり、 J_{CH} と J_{HH} の重なりは本来の目的である J_{CH} の精度良い測定には不都合である。これは次の方法で同時に除かれる。

【選択的2D INEPT】図6aに示す 180° パルスと $1/2\text{J}$ の時間間隔を置いて 90° パルスでサンディッチする方法は、Baxにより通常の2次元J分解法に応用された³⁾。これにより ^1J , ^2J

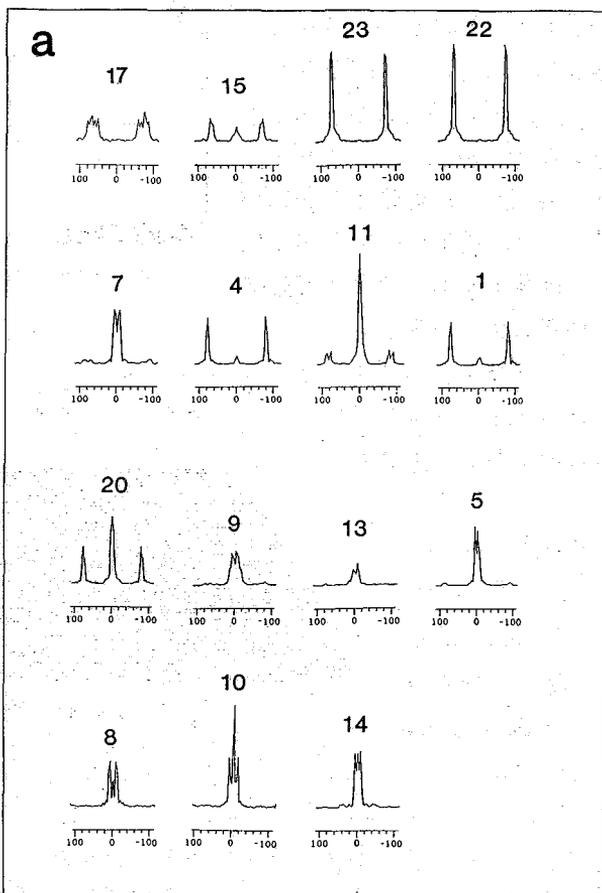


図5. 2D INEPTの縦軸断面図

a: 図3のスペクトルの微細構造を各峰について示す。

b: 対応する ^1H NMRスペクトル。

またはJが区別される。図7aは図2bに示したZDINEPTと同じ条件で¹Hの180°パルスをもJ-selective pulseに置きかえてとったものである。0Hz付近のJ_{CH}由来の分裂がすべて消えている。図7aでは仔細に見ると更にスペクトルの簡易化が行われているのが分る。例えば15, 18を見ると各ピークの縦方向が縮み突はJ_{HH}による分裂が消えている。これはJ-selective pulseのオアの働きで、broad band ¹H decoupling の効果である^{4,5)}。図7bにはもう一方の90°φパルスの組合せで長距離J_{CH}をのみ選択した例を示した。少々雑音が多く、位相の組合せに改良の余地がある。

完全選択ZDINEPTについては載せるスペースがないが講演中で詳しく述べたい。

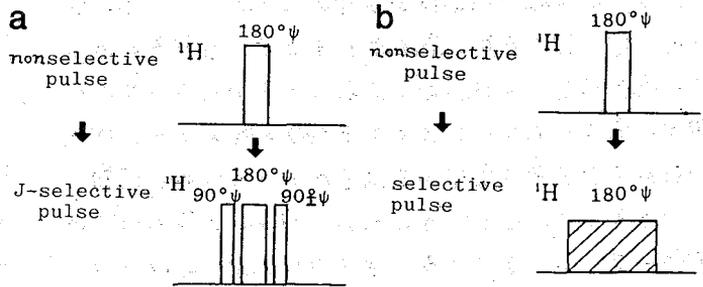


図6. 選択的ZDINEPT法。180°パルスと置きかえる

a: 半選択法, 90°φ: ¹J_{CH}選択, 90°φ: ²J_{CH}選択

b: 完全選択

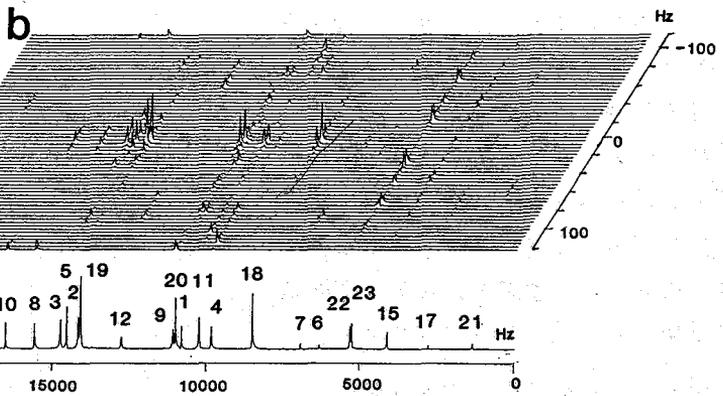
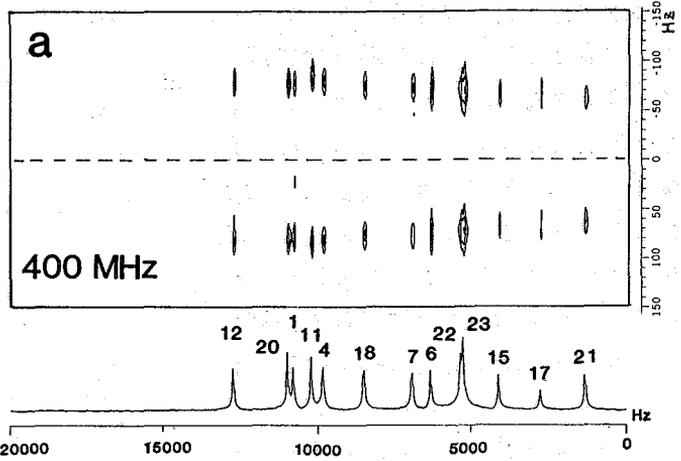


図7. 半選択的ZDINEPT。a: ¹J_{CH}選択ZDINEPT (図2b参照)

b: ²J_{CH}選択ZDINEPT (図3参照)

<文献>

1) W. P. Ave et al.

J. Chem. Phys.

64, 4226 (1976),

G. Bodenhausen

et al.,

J. Magn. Reson.

24, 291 (1976).

2) G. A. Morris

et al. J. Am.

Chem. Soc. 101, 760 (1979).

3) A. Bax, J. Magn. Reson.

53, 517 (1983).

4) A. Bax,

J. Magn. Reson.

52, 330 (1983).

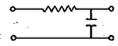
5) V. Rutar, J. Magn. Reson.

58, 132 (1984).

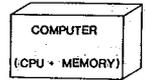
(日本電子) ° 永山国昭, 百名一男, 鴨修, 栗原範明

2次元NMRにおいて、 $\omega_1 (f_1)$ 方向には周波数カットフィルターが通常かかっていない。擬似フィルターは ω_1 方向で不必要な周波数域をカットするために考えられた方法である¹⁾。この方法は2次元NMRに限定されることのない、極めて一般的応用可能性を持つもので、図1のようにR、C、Lなどのハードで構成された実フィルターと、電算機の数値処理によるデジタルフィルターの中間的性質を持つ。すなわちオンラインで処理されるが、データを積算するためのメモリー(accumulator)が必要である。昨年はこの積算器だけを持つ pseudofilter I型を用いた結果を発表したが、今回は積算器の他に減衰器(attenuator)をつけてフィルター特性の向上を図った、pseudofilter II型について報告する。

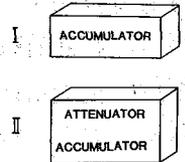
Real filter
(on-line)



Digital filter
(off-line)



Pseudofilter
(on-line)



次にフィルター特性が減衰器で向上する理由について述べよう。擬似フィルターの考えは、積算信号の時間原点の jitter(ふらつき) に伴う、意図せざる低周波フィルターにその原型が見られる。図2でそれを説明しよう。aに2つの正弦波を示した。この正弦波を繰返し積算する時、時間原点 t_0 を少しずつずらせる。すると高い周波数ではその和(7点)が0、低い周波数では非0となる。すなわちこの時間原点をふらつかせた積算(図2b, jittered accumulation)は低周波フィルターの性質を持つ。数学的にはこの過程を式(1)~(3)のように表す。すなわち t_0 の最小 jitter量 Δt の逆数の周波数で繰返す、sinc関数がフィルター特性を表す。sinc関数が出てくるのは、各積算においてその信号強度を一定としていること。(2)式で言えば、ある時間内の一様強度関数、箱型

図1. 擬似フィルターと既存フィルターの概念図

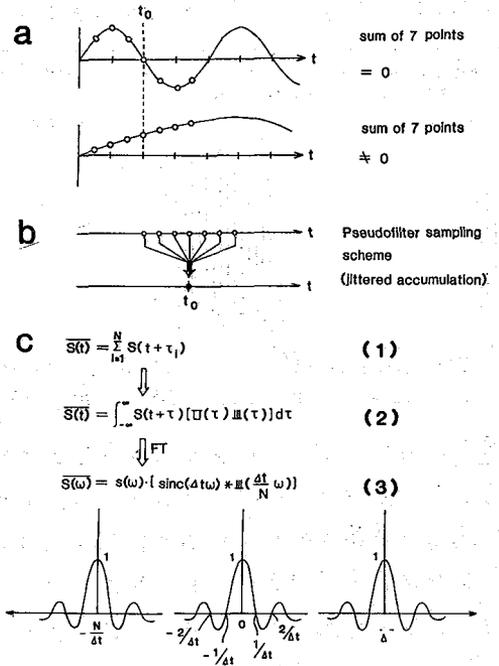


図2. 擬似フィルターの原理(説明本文)

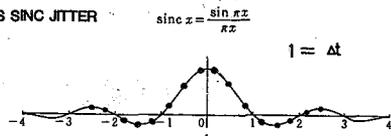
ながやま くにあき, ひゃくな かずお, かも おさむ, くりはら のりあき

関数 $\Pi(\tau)$ を用いており、そのフーリエ変換に対応する。sinc関数は0クロス点 $1/\Delta t$ より先に長い $1/x$ のtailを引くためフィルター特性が悪い。フィルター特性を向上させるにはこのtailを押える必要がある。このためには各積算毎の τ_0 シフトに対応して信号の出力を制御すればよい。pseudofilter IIではこの制御を減衰器で行う。

我々が用いた具体的フィルター関数を図3に示した。 α は τ_0 シフトに伴う信号強度の重み関数であり、sinc関数に擬した。

図3. 16点sinc jitterと擬似フィルター特性
但し、積算回数を16の n 倍に限定したので、重みの強度は図に示す各点(16点)とした。無限に続くsinc関数の連続関数としてのフーリエ変換は箱型関数であり、フィルター特性としてはいわゆる理想フィルターである。しかし有限点でこれを近似した場合種々の劣化が起こる。図2bにフィルター特性を示した。同じ関数が繰返しているのは、有限点近似による。又箱型関数が波を打っているのはsinc関数の近似を有限時間($\pm 2.54\tau_0$)で打ち切ったためである。16点sinc jitterが計算通りのフィルター特性を出すかどうか調べるために、図4に1次元NMRによるテスト結果を示した。H₂Oのみを含むサンプル

a 16 POINTS SINC JITTER



b FILTER FUNCTION

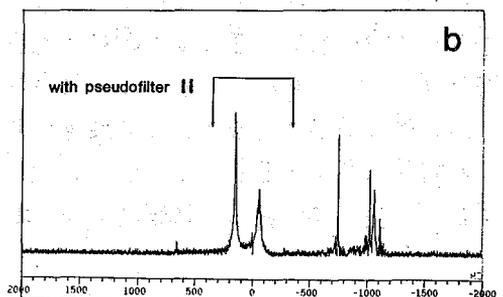
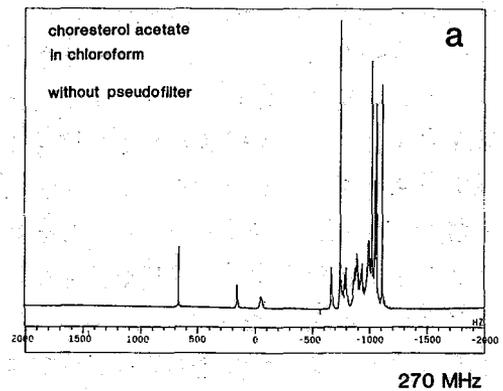
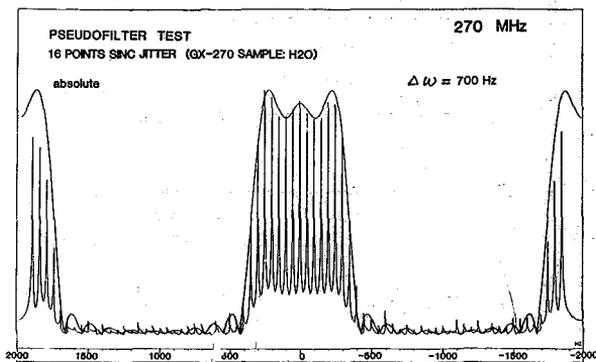
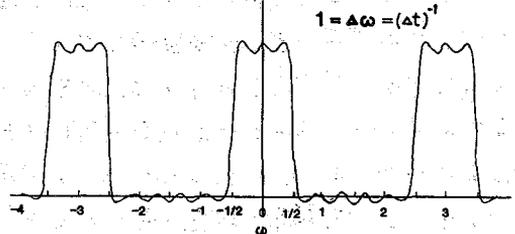


図4. H₂O ペークにオフセットをかけながら行った 擬似フィルターテスト。オフセットは50Hz毎に増減させた。出力は位相まわりを押さえるため、絶対値スペクトルを示した。

図5. 1次元擬似フィルターによる強大ピークの矮小化。a: 通常スペクトルでフィルター幅は2kHz, b: ± 350 Hzの擬似フィルターをかけたスペクトル。

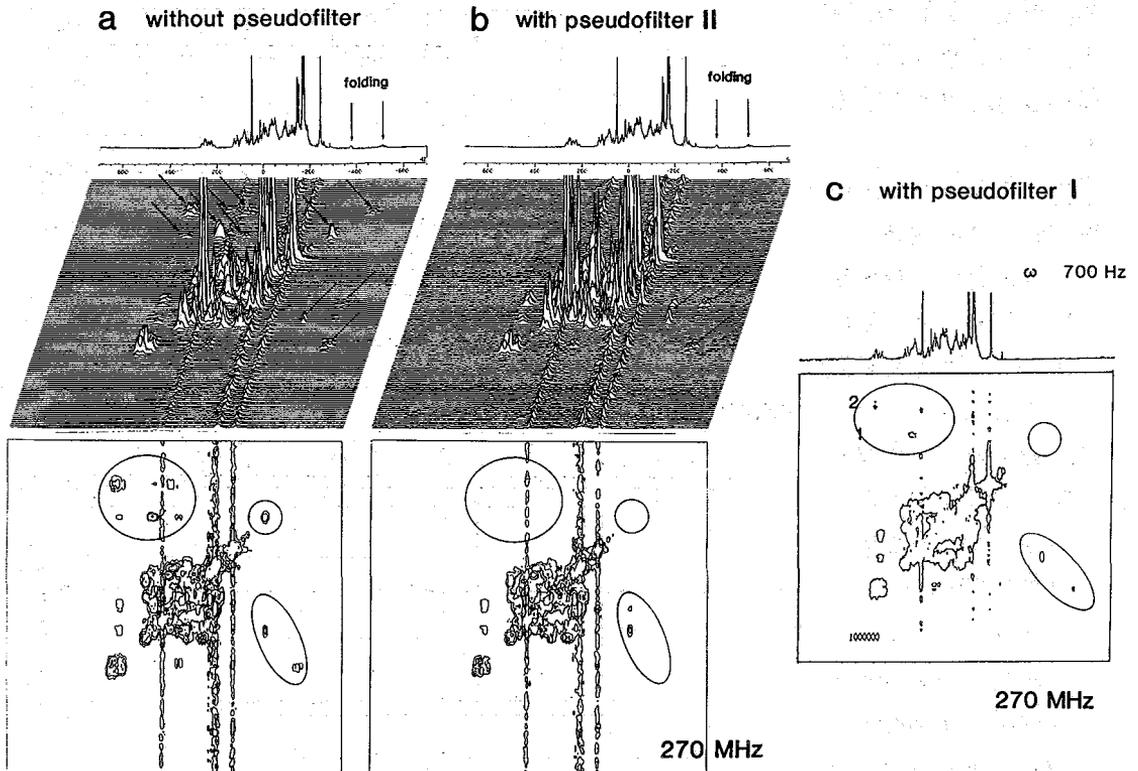
で $16 \times n$ の積算を、オフセット周波数を 50 Hz ずつ変えてとったものを全て同一メモリー上に重ね、フーリエ変換したものである。実線の数値計算出力のフィルター特性と良く一致することがわかる。± 350 Hz の外の信号のものは 5% 未満であることが図から読み取れる。図5は cholesterol acetate に同じ 700 Hz のフィルターをかけた一次元 NMR の結果である。 0 Hz 付近の弱いピークのみが強調され、 1000 Hz 近傍の強いピークはかなり抑えられている。実フィルターではこの特性は得られない。

ここで擬似フィルターの持つ短所を述べる。一般に雑音はどのような重みをかけようと常に加算的に積算される。一方信号は負の重みをかければ積算時に減算され、その強度を失う。 16 点 sinc jitter では出力信号に負の重みをつける場合もあるので ($1 < t < 2$, $-2 < t < -1$) この場合 S/N 比は劣化する。重み関数がある場合の S/N 比の劣化は次式で表わされる。

$$S/N = (S/N)_0 \frac{\sum_{i=1}^N w_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^N w_i^2}}, \quad w_i: \text{重み関数} \quad (1)$$

ここで $(S/N)_0$ は積算前のももとの S/N 比である。 $w_i = 1$ (pseudofilter I 型) であれば、 S/N 比は積算回数のルートを向上する。これは当然であるが、 16 点 sinc 関数ではこの \sqrt{n} の S/N 比向上は得られず、 44% の劣化が起こる。

16 点 sinc jitter による、極めて clear-cut な二次元擬似フィルターの例を図6に
図6. 二次元 NMR (COSY) における pseudofilter I と II の比較



のせた。aには擬似フィルターなしの場合、設定スペクトル範囲が狭いことによる領域外ピークの ω_1 軸の折り返しが見られている(太い矢印及び、等高線表示の内側)。bのpseudo filter IIではこの折り返しピークが擬似フィルターによりほぼ完璧に消えている。細い矢印の折り返しピークは、 ω_2 軸方向の折り返し、すなわち実フィルターで充分カットできなかったピークの折り返しであり、擬似フィルターの特性が実フィルターよりすぐれていることをbは示している。cのpseudo filter Iではこの ω_1 方向の折り返しが充分押さえられておらず、ほぼ実フィルター並みの残存折り返しピークが見えている(階内)。a, bの3次元プロットのS/N比を比較した場合、確かにbのpseudo filter IIのスペクトルの雑音強度がaのスペクトルより大きいのが見てとれる。これは先に述べた44%のS/N比劣化による。

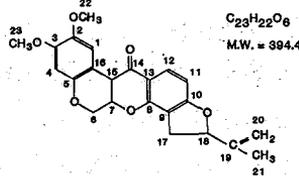
pseudo filter Iの応用として昨年発表した4級炭素と水素の長距離J結合のみを取り出す $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ シフト相関(remote coupling H-C COSY²⁾)

の例を最後に紹介する。図7に示すロテニンについて、H-C COSY法³⁾を図のパルス列のように、最後の待ち時間 t_2 を積算(実際には4回)中に分けてやれば、直接結合 J_{CH} は全て消える。

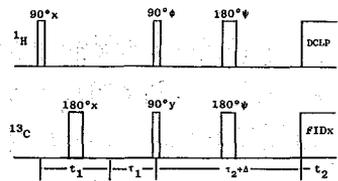
図7. 長距離結合選択 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ シフト相関

1. 永山国昭, 梅田雅宏, 百名一男; 第22回NMR討論会要旨集 10頁(1983).
2. 永山国昭, 栗原範明, 鴨修; 第22回NMR討論会予稿集, 14頁(1983).
3. A. Bax, et al., J.A.C.S. 102, 4849 (1980); J. Magn. Reson. 43, 478(1981).

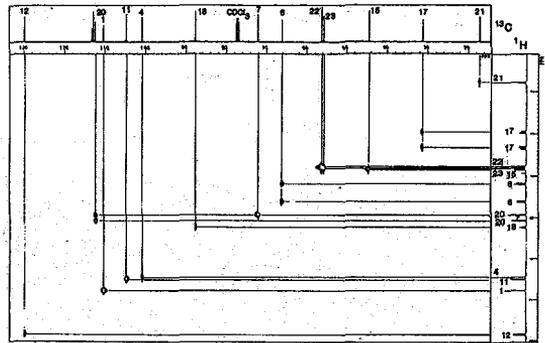
Rotenone



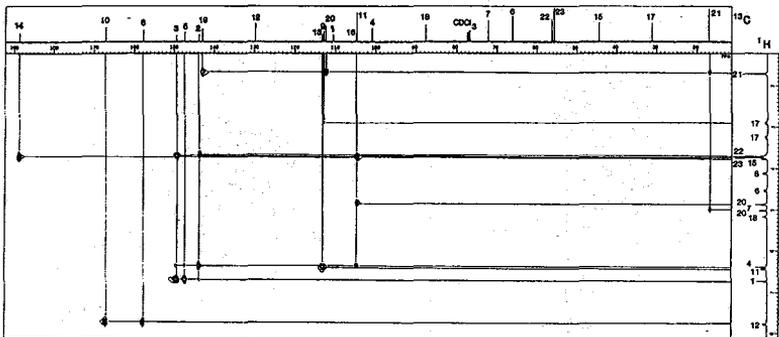
Pulse sequence



H-C COSY



REMOTE COUPLING H-C COSY



Jerry L. Dallas and LeRoy F. Johnson

General Electric Company - NMR Instruments

Fremont, CA 94539

Two dimensional NMR methods have proven quite valuable in the observation of nuclear Overhauser and chemical exchange phenomena (1-3) primarily because of the ability to resolve many individual correlations in rather complex spectra. Historically, results have been presented in the absolute value mode (4) although both positive and negative responses may be anticipated (5). Furthermore, rather severe modes of apodization are frequently applied to the time domain data which results in distorted resonance intensities and linewidths. These factors lead to unnecessary overlap of resonances in two-dimensional spectra as well as the inability to distinguish between positive and negative resonances.

States et al., (6) have described a technique for phasing two-dimensional NOE spectra based on the use of separate quadrature in the two time periods t_1 and t_2 . The basic two-dimensional NMR pulse sequence is described in Figure 1. By accumulating the real and imaginary parts of

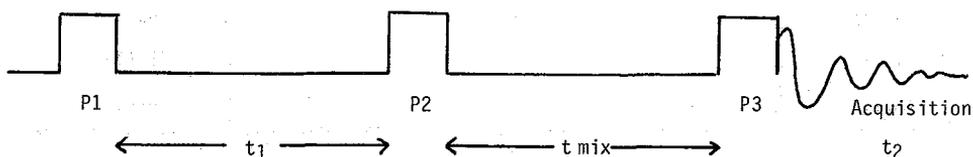


Figure 1. The pulse sequence used in two-dimensional correlation spectroscopy. P1 and P2 are two 90° pulses used to label spins in the t_1 dimension. The spins are allowed to mix and a final detection pulse P3 is applied to excite a free induction decay during t_2 .

each time dimension separately it is possible to calculate the mathematical product of the real Fourier 2D integral in the t_1 dimension and the real Fourier 2D integral in the t_2 dimension. This product function is linear in peak amplitude and it is an absorption phase Lorentzian in both dimensions. Hence, the name pure absorption phase spectroscopy.

The basic pure absorption phase experiment begins with the pulse sequence of Figure 1. The real part of the t_1 dimension is obtained by taking the difference of the free-induction decays with the phase of P2 at 0 and π with respect to P1:

	P1	P2	P3	Acquisition	
Phase	0°	0°	0°	+	} real t_1 sum
	0°	180°	0°	-	

The imaginary portion of the t_1 dimension is the difference of the free-induction decays accumulated with P2 at $+\pi/2$ and $-\pi/2$ with respect to P1.

	P1	P2	P3	Acquisition
Phase	0°	90°	0°	+ } imaginary t_1 sum
	0°	-90°	0°	- }

These sums of free-induction decays (a pair for each t_1) are stored in separate locations and Fourier-transformed separately. They are all phase-corrected using the zero and first order phase corrections which are appropriate for $t_1 = 0$. After Fourier-transforming in the t_2 dimension, the complex time domain data in the t_1 dimension is assembled from the extracted real parts of the two spectra for each value of t_1 (Figure 2). This complex matrix is transposed and Fourier-transformed to obtain the final phased two-dimensional spectrum. Small phase corrections after the second Fourier-transformation are normal.

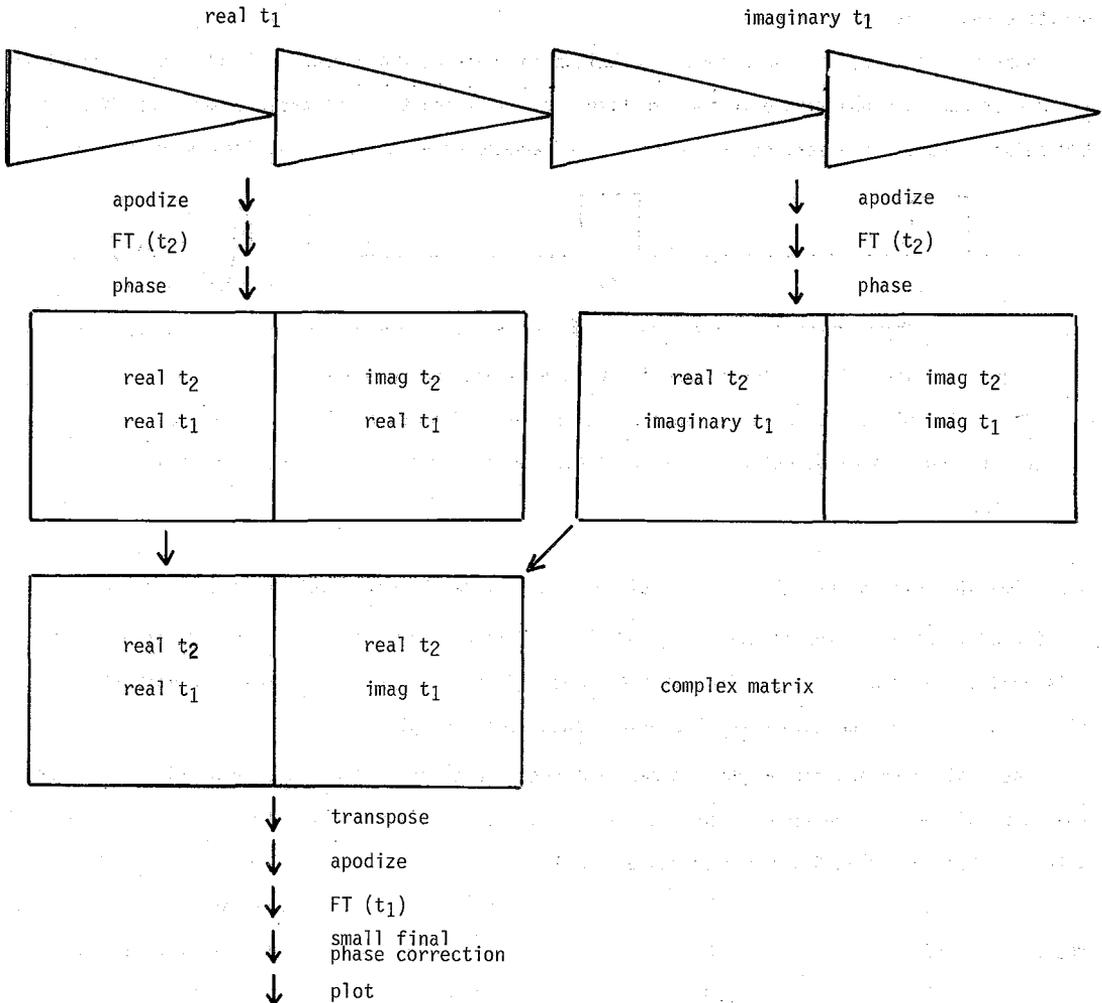


Figure 2.

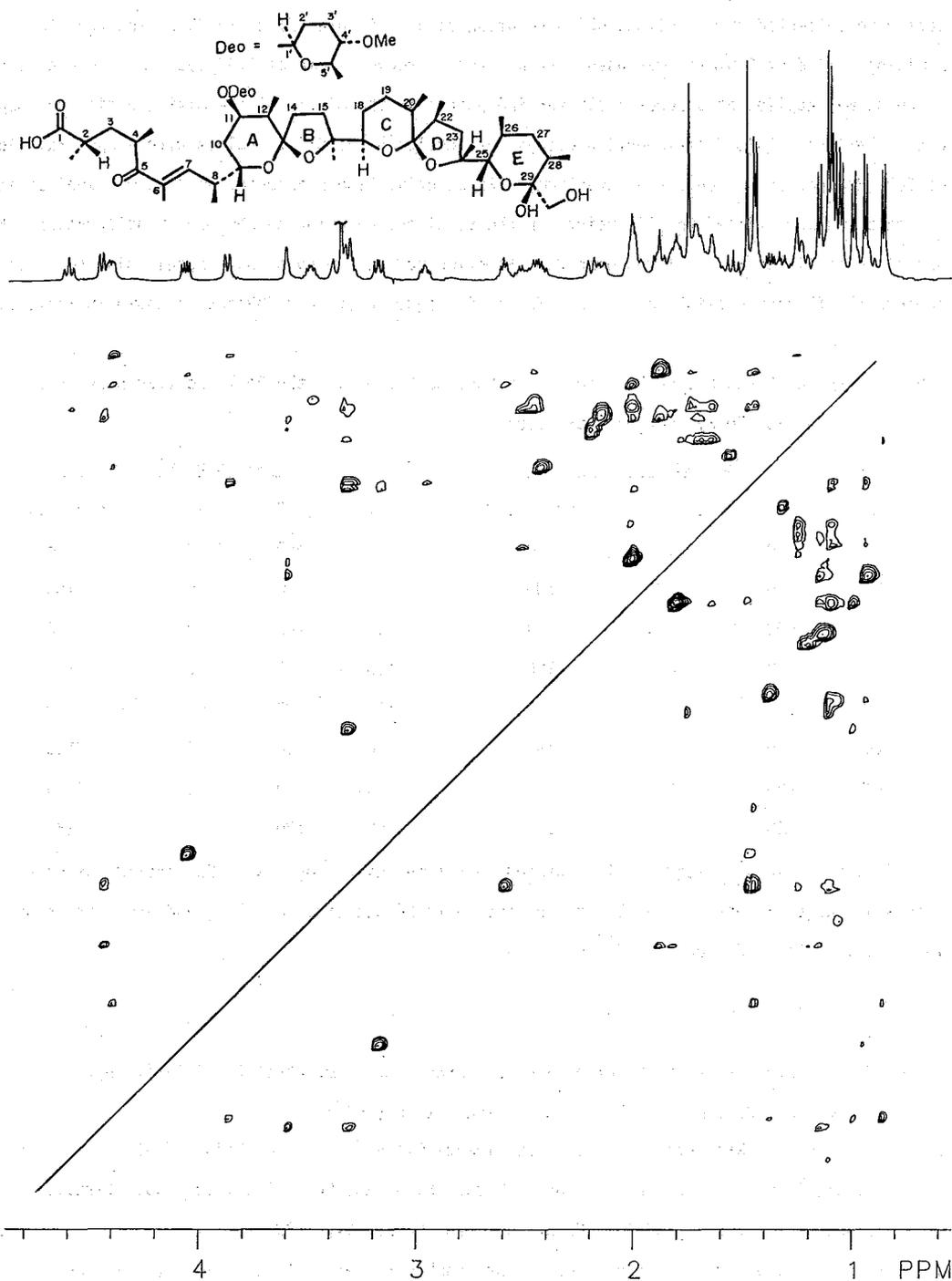


Figure 3. 500 MHz pure absorption phase 2D NOE spectrum of the polyether antibiotic A-130A (partial spectrum).

Figure 3 illustrates the application of this experiment to the polyether antibiotic A-130A(6). Data were collected from a dilute CDCl_3 solution using a General Electric GN500 spectrometer. A mixing period of 600 msec was used with an overall recycle time of 1.65 sec. A non-selective π pulse was applied at progressively varying points in the middle of the mixing period to suppress J correlations. 2048 free-induction decays were collected at 512 t_1 values with a spectral width of 6800 Hz (carrier at center of spectrum). Exponential line broadening of 7 Hz was applied and the data was zero filled to 1024 points in the t_1 dimension prior to Fourier transformation. A Bessel audio filter was employed with due attention to the timing of data acquisition so as to achieve the flattest possible baseline. The basic sequence of pulse phases is shown in Table 1.

Table 1. Pulse Phases and Acquisition Modes Used to Accumulate the Real and Imaginary Free-Induction Decays for each t_1 Value

Real t_1				Imaginary t_1			
P1	P2	P3	Acquisition	P1	P2	P3	Acquisition
0	0	0	0	0	+90	0	0
0	180	0	180	0	-90	0	180
+90	+90	0	0	+90	180	0	0
+90	-90	0	180	+90	0	0	180
180	180	0	0	180	-90	0	0
180	0	0	180	180	+90	0	180
-90	-90	0	0	-90	0	0	0
-90	+90	0	180	-90	180	0	180

This basic 16 step sequence is repeated four times with progressive 90° increments of all phases and acquisitions to cancel coherence effects between the labelling and acquisition pulses and to eliminate quadrature artifacts.

1. J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachman, and R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **71**, 4546 (1979).
2. R. Freeman and G.A. Morris, *Bull Magn. Reson.*, **1**, 5 (1979).
3. K. Wuthrich, K. Nagayama and R.R. Ernst, *Trends Biochem. Sci.*, **4**, N178 (1979).
4. A. Kumar, G. Wagner, R.R. Ernst, and K. Wuthrich, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3651 (1981).
5. W.P. Aue, E. Bartholdi and R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, **64**, 2229 (1976).
6. Sample supplied through the courtesy of Dr. Yoshihiro Terui of the Shionog; Research Laboratory in Osaka.

(北海道大学理学部) 引地 邦男, 伊倉光彦

《はじめに》 COSY, NOESY等の2次元NMRが、複雑な分子の構造解析に極めて有益であることが広く認められ、測定法もルーチン化して一般に普及し拓めている。2次元NMRに次いで、最近では多量子遷移NMRに関心が向けられている。そのなかで、2量子coherenceを利用したINADEQUATE⁽¹⁻⁴⁾は炭素原子のつながりを知るのに非常に有効である。INADEQUATEはもともと¹³C NMRのものであるが、最近では¹H NMRにも応用されている⁽¹⁰⁻¹⁶⁾。我々は¹H NMRの2量子遷移NMRの測定法について考察したので報告する。

《原理》 簡単のためにAX 2スピン系を考える。Fig. 1にAX 2スピン系のエネルギー準位を示す。 $\alpha\alpha \leftrightarrow \alpha\beta$ 等は1量子遷移で、 $\alpha\beta \leftrightarrow \beta\alpha$ は0量子、 $\alpha\alpha \leftrightarrow \beta\beta$ は2量子遷移であるが、0, 2量子遷移は $\Delta m = \pm 1$ の選択則に従わないので、fidとしては観測されない。併し、2量子離れた $\alpha\alpha$ と $\beta\beta$ 間にはcoherenceを作ることができる。coherenceとは密度行列の非対角要素が0でないことをいうが、このことは2つの状態の波動関数がある一定の位相関係を持つことを意味する。例えば、Fig. 2(a)に示すパルスシーケンスを用いて、 $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ 間を選択的に 90° パルスで励起し、 $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ 間=1量子coherenceを作り、次に $\alpha\beta$, $\beta\beta$ 間を選択的に 180° パルスで励起し状態を逆転すると、 $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ 間に2量子coherenceが作られる。

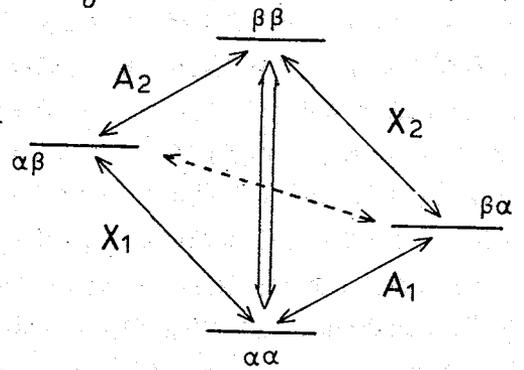


Fig. 1 AX 2スピン系のエネルギー準位

最も一般的な多量子coherenceの生成法はErnstらの有名な2次元NMRの論文に述べられている2つの非選択的 90° パルスを用いる方法である(Fig. 2(b))。coherenceの生成は時間間隔 τ について $\sin(\pi J\tau)$ の依存性を持つが、offset周波数にも依存する欠点がある。Fig. 2(c)では2つの 90° パルスの中間に、re-

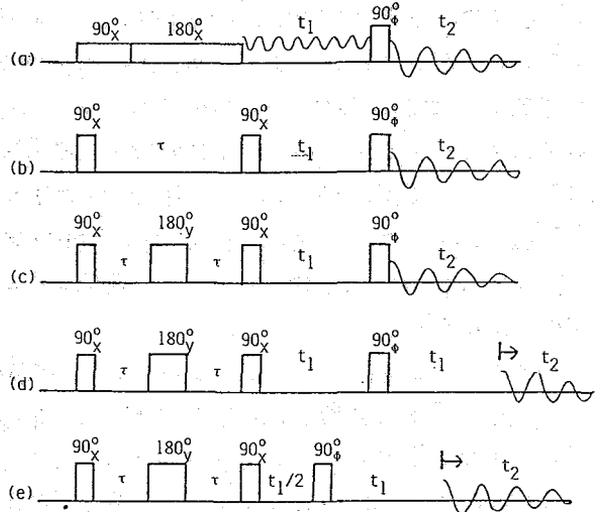


Fig. 2 多量子coherence 2次元NMRの色反パルスシーケンス

ひきくにお、くらみつひこ

focussing 180°, パルスをいれ, offset Γ Table 1. スピン系と多量子遷移の数

周波数は依存しないようにしている。この場合, $\tau = 1/4J$ に設定し, 最も効率よく多量子 coherence が生成される。Fig 2(c) の位相では偶数次のみの coherence が作られ, 2スピン系では2量子 coherence のみが励起される。オミガパルスの位相 ϵ, γ にオミガと奇数次のみとなる。

Spin system	Number of spins	Number of transitions				
		ZQT	1QT	2QT	3QT	4QT
AB	2	1	4	1		
ABC	3	6	15	6	1	
A ₂ B	3	2	9	4	1	
ABCD	4	27	56	28	8	1

このようにして作られた2量子 coherence は t_1 の間発展する。最後の mixing pulse の 90° パルスで2量子 coherence を1量子 coherence の fid に変換して観測する。この fid は t_1 の間に得た2量子 coherence の位相情報を持っているので t_1, t_2 について2重フーリエ変換すると, t_1 に対する周波数軸 F1 に2量子遷移が現われる。

Table 2. 2量子遷移の位相

ϕ	LM	1QT	2QT	ψ
+x	-y	+x	+x	+x
+y	+x	+y	-y	-y
-x	+y	+x	-x	-x
-y	-x	+y	+y	+y

¹⁹⁾ HNMR の場合には, 色々のスピン系が混在しているので, 色々の coherence が作られる。Table 1 は Wokamun によって与えられている色々のスピン系の多量子遷移の数と示したもので2スピン系以上では2量子遷移が少なくとも1つは存在する。mixing pulse の位相と1量子, 2量子等の coherence の位相関係がそれぞれ異なることを利用して, 2量子 coherence のみを選択的に検出することができ²⁰⁾。Table 2 に mixing pulse の位相中と磁化 LM, 1量子(1QT), 2量子(2QT) の位相を示す。積算の位相 ψ が 2QT に合えば2量子 coherence のみが検出できる。

Table 3. DECSY の位相

1st	2nd	3rd	4th	Acq.
0°	90°	0°	0°	0°
0°	90°	0°	90°	270°
0°	90°	0°	180°	180°
0°	90°	0°	270°	90°
45°	135°	45°	90°	180°
45°	135°	45°	180°	90°
45°	135°	45°	270°	0°
45°	135°	45°	0°	270°

《実験》 測定は JEOL GX-500 で行った。Fig 2(c) - (e) のパルスシーケンスを用いた。F1 軸の周波数の正負を区別するに, 90° 位相が異なる成分を必要とする。これは2量子 coherence では 45° の位相シフトに相当するので, 45° ステップの phase shifter を用いた。測定位相まわしを Table 3 に示す。

《結果》 Fig 2(c) のパルスシーケンスで測定したアセチルスクロースの2量子2次元スペクトルを Fig. 3 に示す。2つの1量子遷移 f_i と f_j の ¹H が結合しているとき, $(f_i, f_i + f_j)$ と $(f_j, f_i + f_j)$ の $n = 3$ は2量子遷移が現われる。 f_i, f_j は励起周波数からの offset 周波数である。これらのペアの中点を結び勾配 2 の直線になる。A, B, ... P は 2

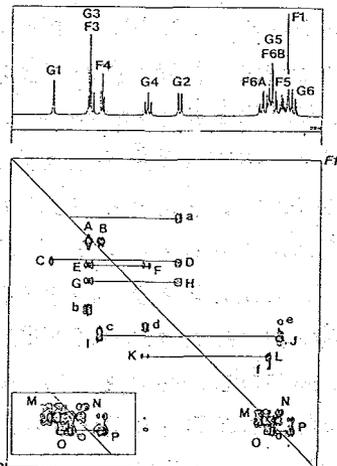


Fig. 3 アセチルスクロースの¹H 2量子遷移2次元NMRスペクトル。

量子遷移の信号である。その他に a, b 等の 2 量子遷移が現われている。これらの信号は remote connectivity を表わす信号で、模式的に Fig. 4 の左に示した。線形の AMX 3 スピン系で $J_{AX} = 0$ の場合、 $(f_M, f_A + f_X)$ の $\omega = 3$ に信号が現われる。これは A と X が直接の結合はないが、M を介して結合しているという意味で remote connectivity と呼ばれる。relayed coherence transfer COSY に相当する。a から水平に引いた直線が勾配 2 の直線と交わった点は、a と結合している 2 つの H の信号の中点に存在していることに注意すると、F3, G3 のように信号が重なる時、つながり $C-D=H-G=A-B$ ではなく、 $C-D=H-G=E-F$ であることがわかる。このような remote connectivity の外に等価な H の信号が現われる。例えば、 A_2X スピン系では $(f_X, 2f_A)$ に Fig. 4 右のように現われる。これは等価な H の存在を知らせてくれ、スペクトルの解析に利用できる。

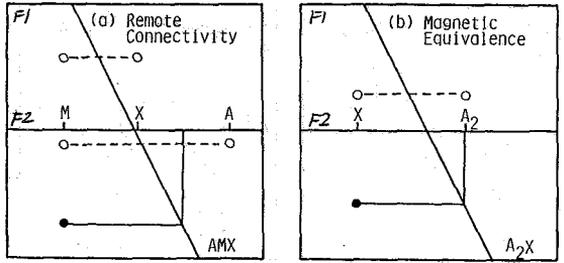


Fig. 4 Fig. 2 (c) の remote connectivity と magnetic equivalence

Fig. 2 (d) のように echo の $\omega = 3$ から anti echo mode でデータを取得すると、2 量子 coherence は $f_i + f_j$ の周波数で発展し、一方、1 量子 f_i は F1 軸に対して $-f_i$ 、F2 軸に対して f_i で発展するので $[f_i, (f_i + f_j) - f_i] = (f_i, f_j)$ の $\omega = 3$ に信号が現われる。この方法で測定したグルタマムはスペクトルを Fig. 5 に示す。測定は SECSY に似てはいるが、スペクトルは COSY に似ており、しかも dia peaks が現われている。Fig. 6 に remote connectivity と magnetic equivalence の信号の様子を示す。

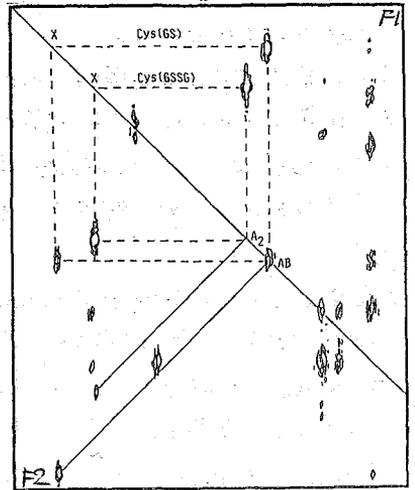


Fig. 5 グルタマムの 2 量子遷移 NMR

Fig. 7 (c) は Fig. 2 (e) のパルスシーケンスで測定したアセチルスクロースの 2 量子コヒーレンス 2 次元スペクトルである。最初の evolution period を $t_1/2$ にしてあるので、この部分からの F1 の寄与は $(f_i + f_j)/2$ になる。後の evolution period t_1 から寄与は $-f_j$ になる。信号は $[f_i, (f_i + f_j)/2 - f_j] = (f_i, (f_i - f_j)/2)$ に現われ、SECSY 型のスペクトルが得られる。この方法を改めれば DECSY (Double Quantum Coherence Echo Correlated Spectroscopy) と呼ぶ²¹⁾。remote connectivity や、magnetic equivalence の信号の様子を Fig. 8 に示す。

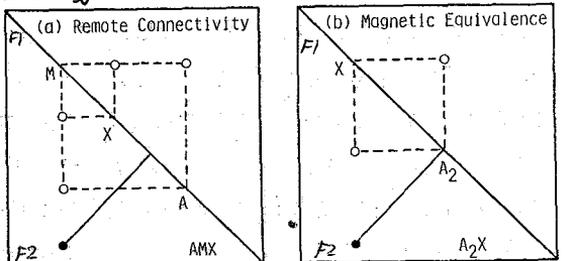


Fig. 6 Fig. 2 (d) の remote connectivity と magnetic equivalence

Fig. 7 (c) は Fig. 2 (e) のパルスシーケンスで測定したアセチルスクロースの 2 量子コヒーレンス 2 次元スペクトルである。最初の evolution period を $t_1/2$ にしてあるので、この部分からの F1 の寄与は $(f_i + f_j)/2$ になる。後の evolution period t_1 から寄与は $-f_j$ になる。信号は $[f_i, (f_i + f_j)/2 - f_j] = (f_i, (f_i - f_j)/2)$ に現われ、SECSY 型のスペクトルが得られる。この方法を改めれば DECSY (Double Quantum Coherence Echo Correlated Spectroscopy) と呼ぶ²¹⁾。remote connectivity や、magnetic equivalence の信号の様子を Fig. 8 に示す。Fig. 7 (a) は mixing pulse を 135° に

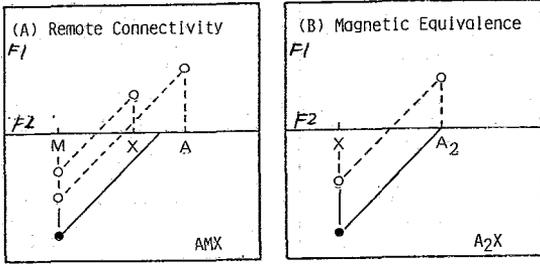


Fig. 8. DECSY (90°) remote connectivity and magnetic equivalence.

また、remote connectivity や magnetic equivalence の信号は消えていゝ。Fig. 7 B は従来、SECSYスペクトルで、DECSY (135°) では dia peak が無いので、化学シフトの近いもの同士の結合をみるのに都合がよい。

《結論》 DECSYスペクトルの利点を以下に列挙する。

(1) 従来の2量子コヒーレンス2次元スペクトルにくらべてF1軸の帯域を狭くすることができ、digital resolutionを上げる事ができる。

(2) SECSYと同じ情報をよみとる外、dia peakがないので、化学シフトの近いもの同士の結合もわかる。

(3) remote connectivity や magnetic equivalence の信号が現われ、これを利用するとスペクトルの解析が容易になる。

《文献》 (1) A. Bax, R. Freeman, S. P. Kempell, JACS 102, 4849 (80). (2) R. Freeman, T. Frenkiel, M. B. Rubin, JACS 104, 5545 (82). (3) A. Bax, R. Freeman, S. P. Kempell, JMR 44, 349 (80). (4) A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, M. H. Levitt, JMR 43, 478 (81). (5) D. L. Turner, JMR 49, 175 (82). (6) D. L. Turner, Mol. Phys. 44, 1051 (81). (7) R. Richarz, W. Amman, T. Wirthlin, JMR 45, 270 (81). (8) T. H. Mareci, R. Freeman, JMR 48, 158 (82). (9) A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, JACS 103, 2102 (81). (10) P. J. Hore, E. R. P. Zuiderweg, K. Nicolay, K. Dijkstra, R. Kaptein, JACS 104, 4286 (82). (11) P. J. Hore, R. M. Scheek, A. Volbeda, R. Kaptein, JMR 52, 328 (82). (12) J. Boyd, C. M. Dobson, C. Redfield, JMR 55, 170 (83). (13) G. Wagner, E. R. P. Zuiderweg, B. RC 113, 854 (83). (14) C. C. Hanstock, J. V. Lown, JMR 58, 167 (84). (15) T. H. Mareci, R. Freeman, JMR 51, 531 (83). (16) L. Braunschweiler, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, Mol. Phys. 48, 535 (83). (17) A. Bax "Two-Dimensional..." Delft Univ. Press (82). (18) W. P. Liu et al. JCP 64, 2229 (1976) JACS 106, 4275 (84). (19) A. Wokaun et al. Mol. Phys. 36, 317 (78). (20) A. Wokaun et al. C. Platt 52, 407 (77).

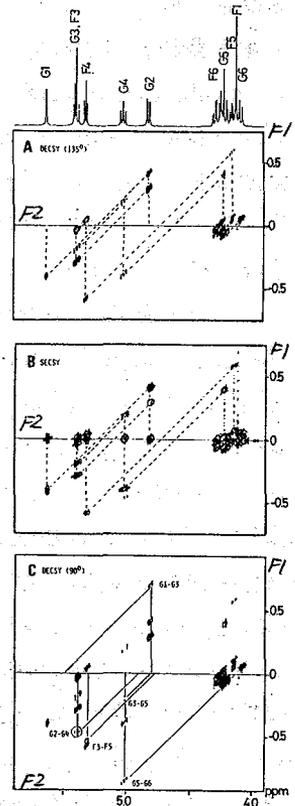


Fig. 7. アセトン-d₆のDECSY (90°), SECSY, DECSY (135°).

(財)サントリー-生物有機科学研) ○岩下 考, 直木 秀夫

【はじめに】

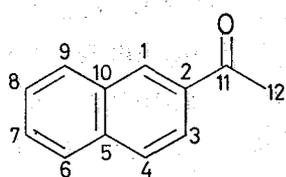
これまで、二次元フーリエ変換法により各種の相関を見るための実験法が開発され¹⁾、天然有機化合物の構造解析等に利用されている。中でも、炭素-炭素核間を2量子遷移周波数によって関係づける2D-INADEQUATE法は、有機化合物を構築している炭素骨格のつながりが直接的に読めるところから、構造解析の面では非常に魅力的な方法である。しかし、現在の炭素核用プローブの感度等から考えると、あまり一般的ではない。一方、水素-炭素核間のケミカルシフト相関法は、炭素骨格とそれに結合している水素についての直接的な情報が得られるため、構造解析にはきわめて有効な方法である。しかしながら通常用いられている水素-炭素間ケミカルシフト相関法では、水素からの磁化移動が、水素-炭素間の強い結合を通して伝わるため、水素と直接的に結合していない4級炭素のシグナルは消失してしまう。即ち、4級炭素のところで結合関係の情報が断切れてしまう。また、長距離結合に対応する小さな結合定数を仮定すると、混合期の遅延時間を長く設定する必要があり、T₂による感度低下が無視できなくなる。そこで、演者らは積極的に4級炭素の長距離結合の情報を簡便な方法で得ることによって有機化合物の構造解析を行なおうと考え、実験を行なった。

演者らは、Ernstらによって最初に提案された最も基本的なパルスシーケンス²⁾をもとに、各パルスを種々のソフトパルスに置き換えることによって、長距離相関を観測することを試みた。

1) Ad Bax "Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids" Delft U.P. 1982
永山, 栗原, 鴨 第22回NMR討論会講演要旨集 p14~17

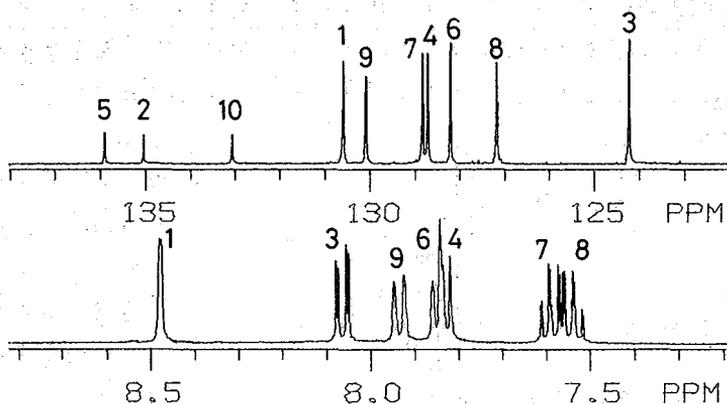
【実験・結果】

測定にはニコレー (GE/NMR) NT-360を用い、標準的な試料としては2-Acetonaphthoneの重アセトン溶液を用いた。2-Acetonaphthoneの水素および炭素NMRシグナルの帰属は図-1のとおりである。



2-Acetonaphthone
(番号は便宜的につけたものである。)

図-1



○いわした たかし, 有あき ひでお

(I) 通常のデカップル条件における水素-炭素ケミカルシフト相関

(II)以下に述べる方法との比較のため、通常の水素-炭素ケミカルシフト相関のスペクトルを図-3,4に示す。パルス・シーケンスは図-2に示すものを用いている。

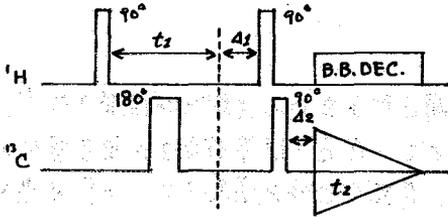


図-2 水素-炭素ケミカルシフト相関
(パルスの位相回りはN-typeを用いる)

直接結合している水素-炭素間の相関を見る場合、 Δ_1, Δ_2 はそれぞれ3.3ms, 2.0msに設定している。これは $J_{CH} = 150 \text{ Hz}$ 位を仮定しているわけだ。この場合、当然のことながら136-133ppmにある3本の4級炭素に関する相関ピークは見えない。そこで、 $\Delta_1 = \Delta_2 = 50 \text{ ms}$ とし、約10Hzの結合定数に対する相関を出すと図-4に示すような

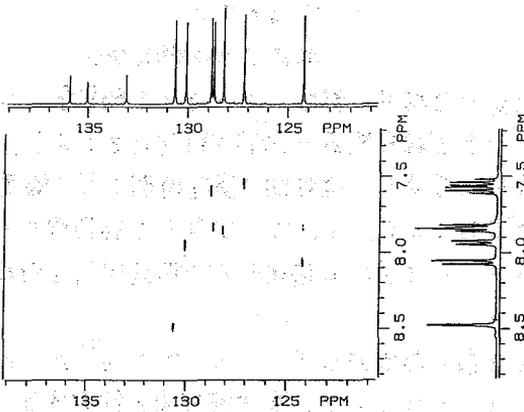


図-3 水素-炭素ケミカルシフト相関
(直接結合による) $\Delta_1 = 3.3 \text{ ms}, \Delta_2 = 2.0 \text{ ms}$

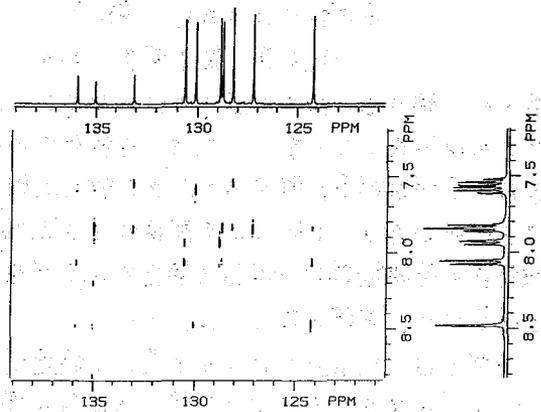


図-4 長距離結合による相関
 $\Delta_1 = \Delta_2 = 50 \text{ ms}$

スペクトルが得られる。

(II) 基本的パルス・シーケンス (水素, 炭素両次元ともデカップルしない場合)

演者が用いたパルス・シーケンスは図-5に示す最も基本的なもの²⁾であり、Evolution period ではプロトンデカップラーより2つの90°パルスを出して水素側の周波数をラベルする。

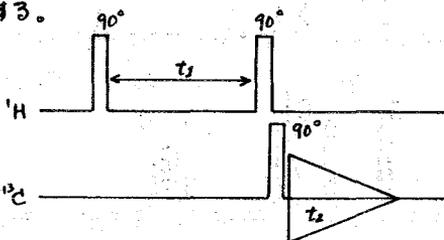


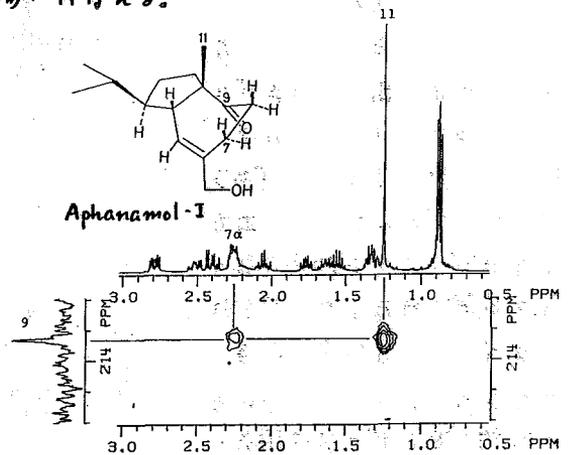
図-5 基本パルス・シーケンス

Mixing periodで90°の観測パルスを出した後、データをとり込む。各パルスおよびDetection periodの位相回りはN-typeとなるようにして実験を行なった。カルボニル基等のかなり低磁場(160-210ppm)側にある4級炭素は、観測領域を制限して部分的なスペクトルを測定する場合、通常の測定条件での90°パルス(高出カパルス)を用

2) R.R. Ernst et al. J. Mag. Reson. 28, 471 (1977)

いても、他のシグナルとかなり離れているため、フィルターの効果によって折り返しシグナルは消失してしまふ。従つて観測用に高出カパルスを用いても問題なく測定が行なへ、長距離相関によるカルボニル基の帰属は容易に行なえる。

実例を図-6に示す。この化合物では11位のメチル基と7位のプロトンからの長距離結合がカルボニル基に見られることから、その位置が9位であることが実験的に明らかとなった。この方法は、非常に簡便であるにもかかわらず、このように炭素骨格内でのカルボニル基の位置を明確にすることや、多数のカルボニル基がある場合のシグナルの帰属に役立つものと考えられる。



(Ⅲ)観測パルスにソフトパルスを用いる 場合. 図-6

4級炭素のすぐ近くにメチレンやメチン等のプロトンの結合した炭素がある場合、(Ⅱ)の方法を用いるとシグナルの折り返しが問題となる。そこで、観測パルスに低出力パルス中の長いソフトパルスを用い、

必要なシグナルのみ部分的に励起することを試みた。パルスシーケンスは図-5と同じものを用い、トランスミッターを低出力モードとし、パルスの長さを2.7msで90°パルスとなるように調整して実験を行なった。得られたスペクトルを図-7に示す。特に5位の炭素が1位の水素とまた、2位の炭素が4位の水素と長距離結合している様子が強い相関ピークによって示されている。図-7の中で米印をつけたピークは12位のメチル基の折

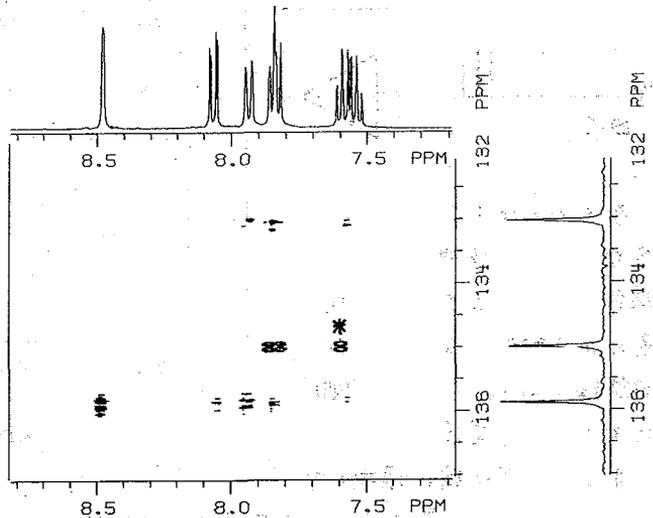


図-7 2-Acetonaphthone (Ⅲ)のスペクトル

返しシグナルである。水素核側の次元はフィルターがかかからないため、このように強い折り返しシグナルが出現する。

(Ⅳ)デカップラーよりのパルスおよび観測パルス両方にソフトパルスを用いる場合

(Ⅲ)の図-7に示したように水素核側の次元にはフィルターがかかからないため、部分的な

スペクトルをとると折り返しシグナルが出現する可能性がある。このような折り返しシグナルを除くためには、デカップラーより出してあるパルスもソフトパルスを用いて、部分的に励起する必要がある。そこで、デカップラーの出力を下げパルス中を約14倍長くして実験を行なった。得られたスペクトルを図-8に示す。このスペクトルでは図-7にあった折り返しピークは消失し、他の相関ピークは出ている。

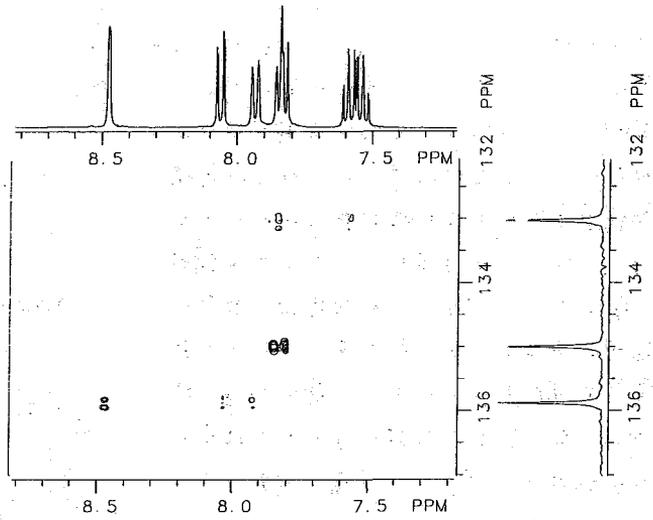
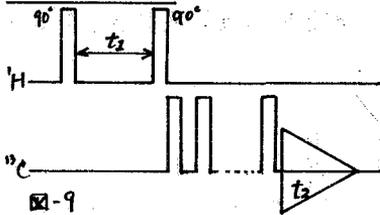


図-8 2-Acetonaphthone (IV) のスペクトル

(V) 観測パルスとして DANTE

を用いる場合



多くのメチレンやメチン炭素がある中に4級炭素がある場合を想定すると、1個の炭素のみを励起する必要がある可能性がある。そこで観測パルスとして多重パルス(DANTE)にまつて非常に狭い領域のみを励起することを試みた。パルス・シーケンスは図-9に示す。多重パルスは5μsのパルスを1.5/ms 間隔で50回繰り返すことにより発生させた。得られたスペクトルを図-10に示す。133ppmの炭素(10位)についてきれいに相関スペクトルが得られており、他の炭素はうまく励起されていない様子が分かる。

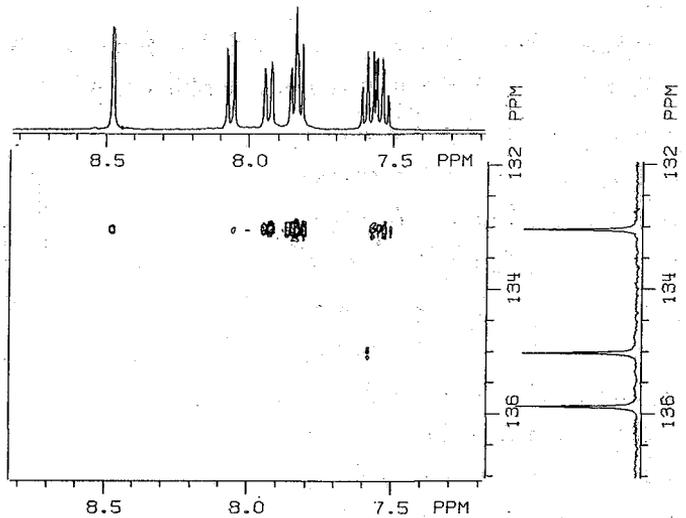


図-10 2-Acetonaphthone (V) のスペクトル

【考察】 以上(II)-(V)の方法によって4級炭素に関する長距離相関スペクトルが得られることが分かった。またこの方法はパルス・シーケンスを構成しているパルスの数が少なく簡便であるため、使いやすいためと考えられる。

(理研) ○ 鷗 沢 洵、柴田 俊之

1 序

N O E 相関二次元 N M R は $^1\text{H}-^1\text{H}$ においてはすでに多くの応用例が報告されているが、異核種間では2報しかない。最初の報告は P. L. Rinaldi が neat の 2-bromobutane で直接結合した $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 間の N O E を観測した¹⁾。続いて Chin Yu と G. C. Levy が ATP (0.5 mol 85% $\text{H}_2\text{O}+15\%$ D_2O 中) で $^{31}\text{P}-^1\text{H}$ 間の N O E を観測した²⁾。この2つの報告はいずれも濃厚溶液で測定している。

演者らは選択的 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ N O E の手法を確立し、1976年の本討論会で報告した³⁾。その後、いくつかの天然物の構造決定に応用してきた⁴⁾。また、1978年~1980年にはこの手法を $^{31}\text{P}-^1\text{H}$ 間に応用し、リン脂質の構造と運動について研究し本討論会を中心に報告してきた⁵⁾。

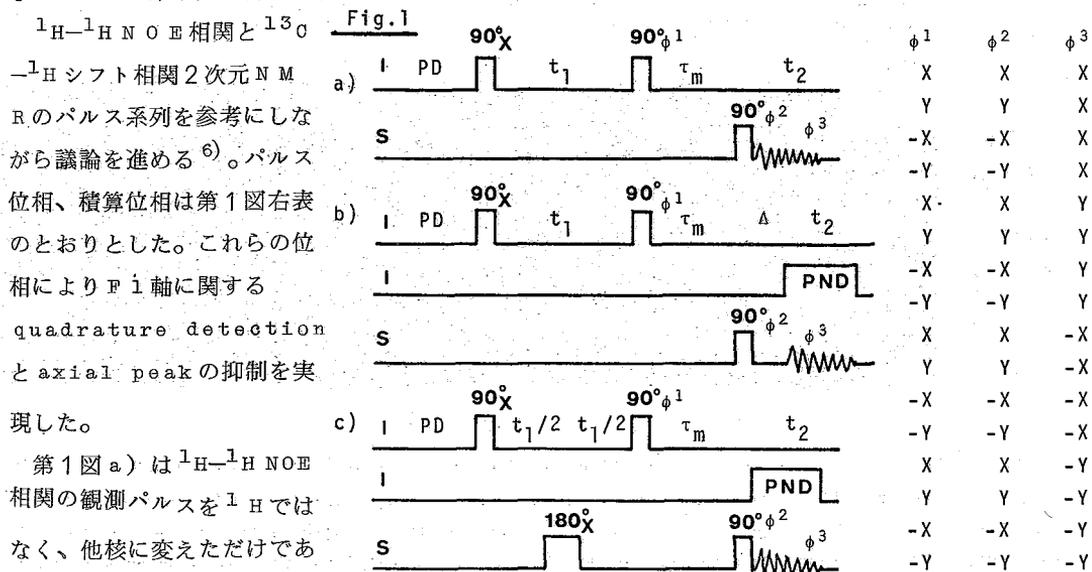
2次元 N M R の様々な手法が普及するにつれて、演者らも N O E 相関が異核種間に応用できれば有益な情報が得られるであろうと予想していた。本報告で演者らは異核種間 N O E 相関二次元 N M R のいくつかの測定例からその利点を明らかにすると共に、問題点も明らかにする。

2 実 験

N M R 装置は日本電子製 F X - 1 0 0 に P G - 2 0 0 パルスプログラマー、多核種観測装置、さらにプロトンノイズデカップリング (P N D) を行うため三重共鳴ユニットを接続させて使用した。

試料は以下による。鷗の卵黄より Singleton らの方法により抽出した phosphatidylcholine (egg P O) に重水を添加後重クロロホルムに溶解させ、極性基の運動が速い状態のミセルを形成させて 10°C で測定した。カルボニル炭素への N O E を観測するため、acetophenone C-13 カルボニルラベル 0.5g を重クロロホルム 1ml 中で測定した。

3 パルス系列と得られるスペクトルの特徴



第1図 a) は $^1\text{H}-^1\text{H}$ N O E 相関の観測パルスを ^1H ではなく、他核に変えただけであ

うざわじゅん、しばたとしゆき

る。このパルス系列では ^1H - ^1H の場合と同様に、J結合している ^1H との相関ピークが出てくる。この信号は ^1H デカップリングをしていないのでF2軸に広がるばかりでなく、F1軸にもJの大きさに広がる。2スピン系では4本のピークが出る。J結合によるpolarization transferとNOEによるそれぞれの信号の大きさをくらべると、 τ_m が小さいときは前者が圧倒的に大きい。NOE相関として使うには不向きだが、J結合によるシフト相関を ^1J ~ ^3J を同時に測定したい場合には使えるかもしれない。

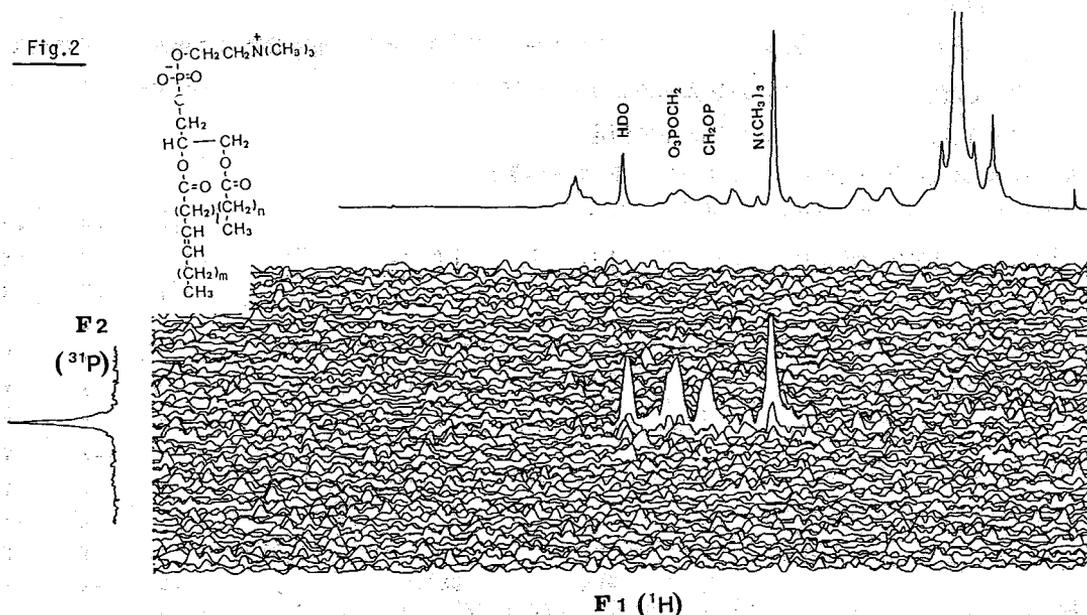
b) は $\Delta=1/4$ ^1J ~ ^3J のときはシフト相関がJによりF1軸上に分裂して観測される。 Δ を小さくすればNOEによる信号がF1軸に分裂して観測される。このパルス系列は実用的には意味がない。

c) は展開時間の真中に観測核に対して 180° パルスを入れる。これにより、F1軸の広がりを集束させる。0-Hシフト相関とちがって展開時間が t_1 のみである。既報のいずれもこの系列を使った。このパルス系列ではJによる選択的なpolarization transferは起さず、NOEによる増加分のみが観測される。 t_2 期の ^1H デカップリングは、FX-100の場合、三重共鳴ユニットを使った。

4 リン脂質の構造と運動の研究への応用

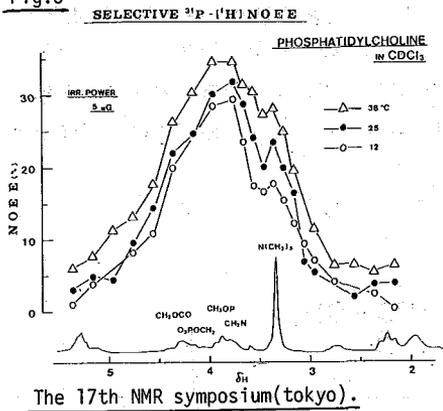
リン脂質の構造と運動についてNOEを使った研究がされている。一次元のNOEは照射位置の選択性はあまり良くない。選択性をあげるため、照射パワーを弱くするとselective population transferによる信号強度の増加とNOEによる増加の区別ができなくなる。これらの欠点を克服できるのが2次元法である。

e.g.g PCミセルの ^{31}P - ^1H NOE相関2次元NMRスペクトルを第2図に示す。



Stacked plot of ^{31}P - ^1H 2D-NOE spectrum of egg phosphatidylcholine 180mg in CDCl_3 1g at 10°C ; 256 data points, 400Hz sweep width in the F2 dimension, 0.32s acquisition time, 0.8s mixing time, 1.0s preparation time; 128 spectra (256 scan each) were accumulated with t_1 incremented to provide the equivalent of a 1000Hz sweep width in the F1 dimension. Zero-filling was executed once (to 256) along the F1 dimension.

Fig.3



パルス系列は第1図C)を使った。コリンメチルとHDOからはJ結合を経ないNOEによる信号であり、コリンメチレンとグリセロールメチレンからの信号もJ結合を徐いたNOEである。それぞれがはっきりと分離し同時に観測されることは興味深い。このスペクトルを得るための測定、計算処理、スタックプロットの合計時間は24時間程度である。

比較のために、演者らがすでに報告した1次元選択的NOEの結果を第3図に示す。コリンメチルがようやく分離できる程度であり、2次元の利点は一目でわかる。

GX-400(V-1)を使って同様の実験を行ったが、6時間程度でコンタープロットを得た。

5 τ_m の設定基準

NOE 相関2次元NMRにとって混合時間 τ_m をどのように選ぶかは非常に重要な問題である。e.g.g PCが有機溶媒中で形成するミセルの運動とそれぞれの分子の運動に分けて、2スピン系を仮定し、NOE増加量と τ_m の関係を考察した。ミセル全体の運動とbilayer表面の法線とPHベクトルとのなす角度は今まで得られているデータを挿入した。 ^{31}P と ^1H のそれぞれに緩和の“逃げ”をどの程度見積るか、分子の相関時間をどの位とするか、P-H間の距離をどの位と仮定するか等によって τ_m の最適値は変る。

- (1) P-H間の距離が短い程NOEの最大値は大きくなり、 τ_m の小さい方で最大値となる。
- (2) “逃げ”を大きくすると最大値は小さくなり、 τ_m の小さい方で最大値となる。
- (3) 分子の相関時間が小さい程最大値は大きくなり、 τ_m の大きい方で最大値となる。

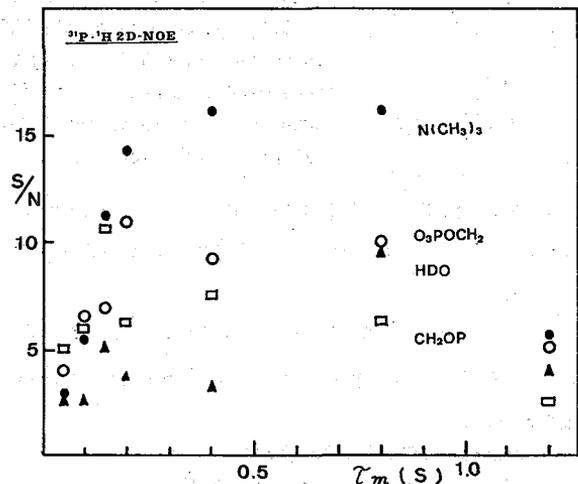
第4図はegg PCを10°Cで τ_m を変化させながら、他の条件を変えずに測定したときの各ピークのS/N比の変化である。2本のメチレン共多くのJ結合により幅が広がっており、NOEによるピークも広がるため、S/Nは悪くなり、バラツキが大きい。それぞれの ^1H の T_1 の大きさはメチレン<コリンメチル<HDOの順に短いが、最大値をとる τ_m の値もこの順にならんでいる。

実際に測定するときの目安として

$$T_1(^1\text{H}) \leq \tau_m < T_1(^{31}\text{P})$$

にとれば良いのではないかと考えている。

Fig.4



Intensities of cross peaks with $\text{N}(\text{CH}_3)_3$, gly- CH_2OP , choline CH_2OP and HOD signals of egg PC micelles as a function of the mixing times.

6 ^{13}C - ^1H NOE 相関 2 次元 NMR の問題点

演者らがかって選択的 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NOE を確立し、応用したときの経験と前記の P-H 間の距離と NOE 量のシュミレーションの結果から、直接 ^1H の結合した ^{13}C は他の ^1H からの NOE は無いとみて良い。実際に種々応用する場合も ^1H が直接結合しない ^{13}C に対して、すなわち、カルボニルを含む 4 級炭素とプロトンとの空間的構造を知りたいために必要である。Rinaldi の得たのは直接結合した ^{13}C - ^1H 間のスペクトルである。

演者らが 90% ethyl benzene や rotenone を測定した結果も同様であった。

このようなスペクトルはシフト相関 2 次元で得られるし、感度はシフト相関が数倍良い。

第 5 図はカルボニル炭素への NOE 相関 2 次元スペクトルを得るため acetophenone carbonyl- ^{13}C ラベルを試料とし第 1 図の脉冲系列で測定して得られたスペクトルである。

メチル基とフェニル基からの NOE が観測された。くりかえし時間

間を短くすると ^1H スペクトルの真中に大きな artifact が出る。例えば、preparation time を 2 秒としたとき、メチルからのピークの 1.5 倍であった。

7 結論

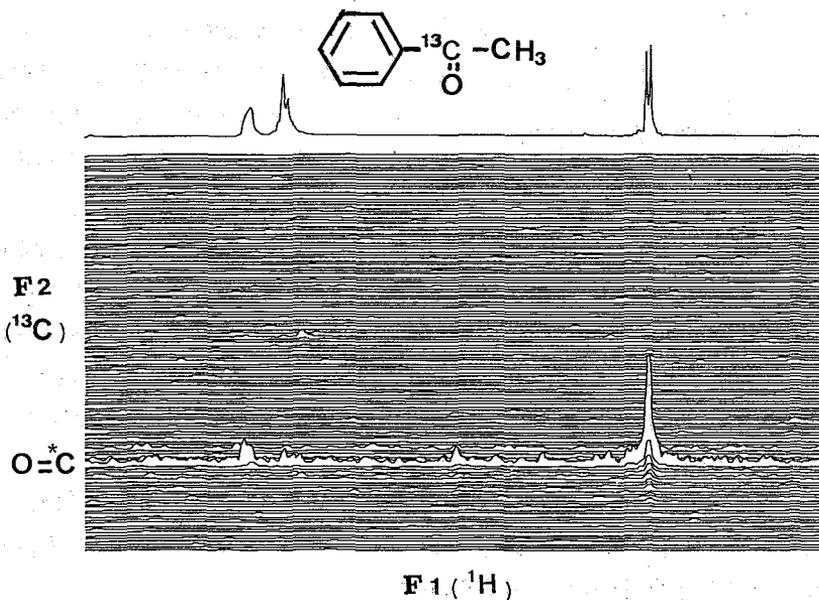
P-H 間については現行の水準でも他のリン脂質や混合状態での構造と運動についても知見が得られることが予想される。演者らも検討と準備を進めている。C-H 間については感度不足である。

Reference :

- 1) P.L.Rinaldi, JACS, 105, 5167 (1983).
- 2) Chin Yu, G.C. Levy, ibid, 105, 6994 (1983).
- 3) 瀧沢 洵、竹内節男、第 15 回 NMR 討論会、30 (1976) 東京。
- 4) H.Seto et al., Tetrahedron Letter, 923 (1978).
- 5) 瀧沢 洵、柴田俊之、第 17 回 NMR 討論会、97 (1978) 東京。
- 6) Ad Bax, "two dimensional nuclear magnetic resonance in liquid", D.Reidel Publishing Co., Holland (1982), P.50, p.94.

Fig.5

^{13}C - ^1H 2D-NOE



Stacked plot of ^{13}C - ^1H 2D NOE spectrum of acetophenone(carbonyl- ^{13}C)0.5g in CDCl_3 1g; 256 data points, 500Hz sweep width in the F2 dimension, 0.256s acquisition time, 3.5s mixing time, 18s preparation time; 128 spectra (16 scan each) were accumulated with t_1 incremented to provide the equivalent of a 1000Hz sweep width in the F1 dimension. Zero-filling was executed once (to 256) along the F1 dimension.

北大(理) 大内 宗城 伊倉 光彦 引地 邦男
日本電子 細野 政美 穴井 孝弘 鴨 修

最近のNMR測定法の進歩の一つとして、多量子NMRがあげられる。この多量子NMRは、複雑なスペクトルの単純化に有力な手段となる。¹⁾

通常、NMR現象は、 $\Delta m = \pm 1$ の遷移を観測しているが $\Delta m = \pm 1$ 以外の遷移を直接観測することは非常に困難である。多量子NMRは、禁制準位間にコヒーレンスを作り、 $\Delta m = \pm n$ の n 量子遷移を双極子項やスカラー項などのCouplingを通し、観測可能な $\Delta m = \pm 1$ の遷移に移行させ、間接的に測定する手法である。従来、多量子NMRの観測は、一つのレーザーを使用したSingle phase detection法を使用して行われていた。²⁾一方、現在のNMR装置には一般に二つのレーザーを使用したQuadrature phase detection法が採用されている。多量子NMRをそのままQuadrature detectionのレーザーで観測すると、スペクトルの中心点に対して対称にシグナルが現れ解析が不可能となる。

我々はパルスシーケンスの改良及び、 30° 、 45° 、 60° のPhase shiftを使用することにより、多量子NMRをQuadrature phase detection法を用いて観測することを可能にした。今回は、1)この方法による観測手法を中心に、2)2量子コヒーレンスおよび3量子コヒーレンス、3)ある量子数以下を取り除く量子フィルタなどについて報告する。また、従来2次元NMRは、パワースペクトルで表示されていたため、シグナルの裾がブロードとなること、J-couplingの相対符号、NOEの符号が不明になるなどの欠点を持っていたが、この欠点を取り除く、4)Phase sensitiveな表示方式も同時に報告する。

〈実験〉NMR測定は、図1のようなPhase shifterを付加したGX270、GX400を用い、試料は市販ロテノン CDC13

に溶解し、5mmφ Tubeに入れ用いた。スペクトル観測に使用したパルス系列は、量子コヒーレンスで ($90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau - 90^\circ - t1 - 90^\circ - t2$) および、量子フィルタで ($90^\circ - t1 - 90^\circ - (\tau) - 90^\circ - t2$) である。また、このときの各パルスの位相は後述する。

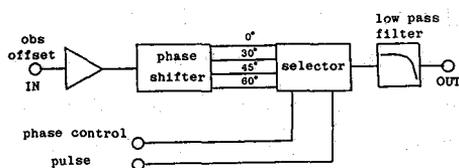


図1 phase shifter ブロック図

おおうち むねき いくら みつひこ ひきち くにお
ほその まさみ あない たかひろ かも おさむ

<方法および結果>

§ 1 多量子コヒーレンス

多量子コヒーレンス測定には、図 2-a、2-b、に示す 2 つのシーケンスが、使用できるが、今回の実験には周波数 Offset に依存しない、図 2-b のシーケンスを使用した。Mareci らによると、³⁾ 図 2-b のパルス系列の最後の Read パルスを、 90°

パルスで測定を行うと、図 3 のように Echo 成分と Antiecho 成分が含まれ、Quadrature detection 法では、二つの成分が分離できなくなる。そのため彼らは、最後の Read パルスを 90° のかわりに 135° パルスを使用している。しかし、この方法は Carbon のように、シグナルの強度差が小さい場合には、良い方法であるが、Proton のようにシグナルの強度差が大きい場合には、残存する Antiecho 成分がスペクトルを複雑にする。

さらに、Flip angle を 135° 以上にし、Echo 成分の割り合いを大きくできるが S/N は低下する。 135° パルスを使用する方法は Echo シグナルの最大点近くに設定しているため、Carbon のような感度の低い核では、S/N の良いスペクトルが得られる。

しかし、この Flip angle を使用すれば “Remote connectivity” と “Magnetic equivalence” の情報が消えてしまう。²⁾

もう一つの方法として、A・Bax らの報告のように、⁴⁾ “Z pulse” を使用する方法がある。しかし、二量子コヒーレンスでは簡単であるが、三量子コヒーレンス等になるとパルス系列が長くなり複雑となる。

我々は “Z pulse” を使用するかわりに、 0° 、 90° 、 180° 、 270° の Phase shift に、 30° 、 45° 、 60° の Phase shift を付加したシーケンスを使用した。このパルスシーケンスについて、 $\alpha = 90^\circ$ のときの二量子コヒーレンスを例にとり、簡単な図解とともに説明する。⁵⁾

まず Table 1 に示す位相で二量子コヒーレンスを測定すると図 4 のように 2 成分が含まれてしまう。この位相で、観測された信号 M1 は Mareci らによると、

$$M1 = (1/2) B \sin \alpha [(1 + \cos \alpha) \{ \cos(\phi + \theta) + i \sin(\phi + \theta) \} + (1 - \cos \alpha) \{ \cos(\phi - \theta) + i \sin(\phi - \theta) \}] \dots \textcircled{1}$$

と表される (B は定数、 ϕ は $\omega_{13}t_2$ 、 θ は $\omega_{14}t_1$ 、 α は Read パルスの flip angle)。

ここで、 45° phase shift して、観測された信号 M2 は、

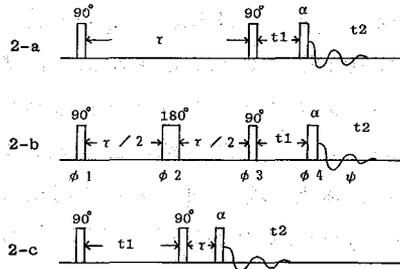


図 2 多量子コヒーレンスパルス系列

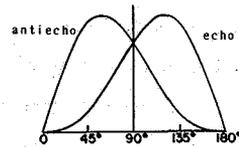


図 3 antiecho 成分と echo 成分のフリップアングルとの相関図

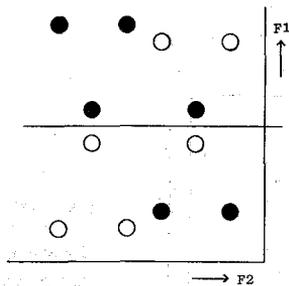


図4 二量子コヒーレンスの模式図

○ antiecho成分
● echo成分

$$M2 = (1/2) B \sin \alpha [(1 + \cos \alpha) \{ \cos(\phi + \theta) + i \sin(\phi + \theta) \} - (1 - \cos \alpha) \{ \cos(\phi - \theta) + i \sin(\phi - \theta) \}] \dots \textcircled{2}$$

となる。従って、例えば、 $\textcircled{1} - \textcircled{2}$ の信号Mは

$$M = B \sin \alpha (1 - \cos \alpha) \{ \cos(\phi - \theta) + i \sin(\phi - \theta) \} \dots \textcircled{3}$$

となりEcho成分のみ残る。90°パルスの時

$$M = B \{ \cos(\phi - \theta) + i \sin(\phi - \theta) \} \dots \textcircled{4}$$

となる。同様に $\textcircled{1} + \textcircled{2}$ とするとAntiecho成分のみ残る。従ってQuadrature detection法による測定が可能になる。

この結果を用いて、ロテノンの二量子コヒーレンスのecho成分のスペクトルは図5のように得られる。さらにD.J.Statesらの方法⁶⁾を加味して使用すればPure absorption modeのスペクトルが得られ、Antiecho成分(90°の時

$M = B \{ \cos(\phi + \theta) + i \sin(\phi + \theta) \}$ の拡大図を図6に示す。

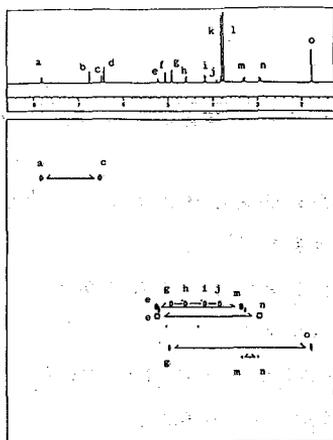


図5 ロテノンの二量子コヒーレンススペクトル

b) Contour plot表示

白；正のシグナル
黒；負のシグナル

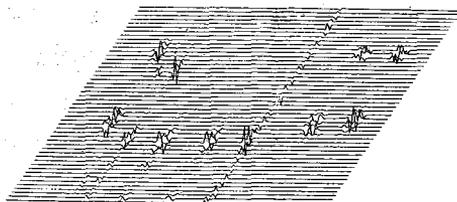
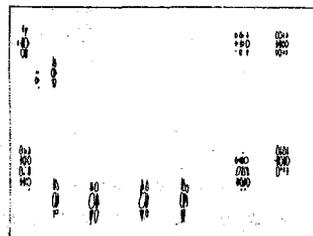


図6 Phase sensitive スペクトル

a) Stack plot表示

このQuadrature detection法は、三量子コヒーレンスにも応用できる。

三量子コヒーレンス観測の位相については、L.Braunschweilerらは、Table 2のように報告しているがこれに、30° phase shiftして観測した信号を追加すれ

ば図7のような結果が得られる。

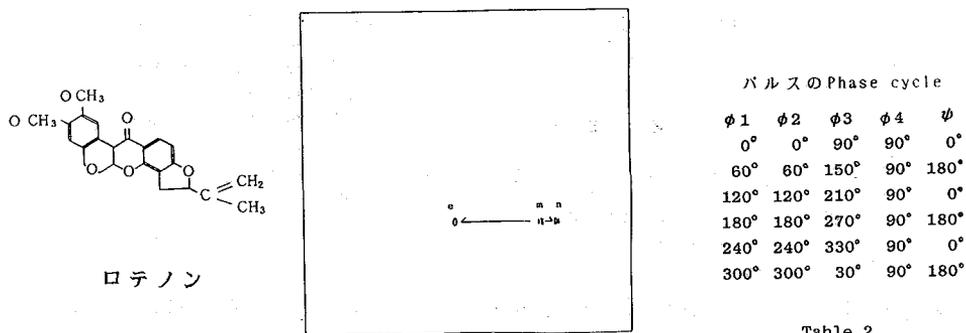


図7 ロテノンの三量子コヒーレンススペクトル

§2 多量子フィルタ

Piantiniらが報告している⁷⁾多量子フィルタにも同じように Quadrature detection 法が応用できる。二量子、三量子フィルタには、図2-Cのシーケンスを使用した結果を図8、図9に示す。多量子コヒーレンスと同様に、Pure absorption mode の表示も可能である。

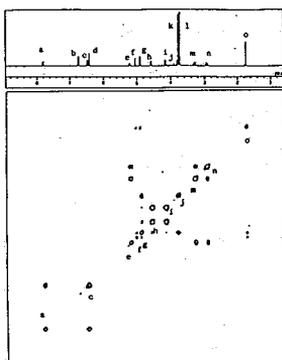


図8 二量子フィルタのスペクトル

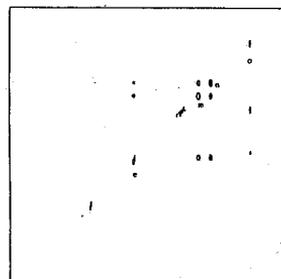


図9 三量子フィルタのスペクトル

多量子コヒーレンスおよび多量子フィルタの結果が得られたので、今後、応用測定、およびオペレーションの単純化を計ってゆきたい。

文献 1、例えば a 第22回 NMR 討論会、講演要旨集、P 26 藤原
b 日本電子ニュース vol 24 引地ら

2、例えば L. Braunschweiler et al Mol. Phys. 48 535 (1983)

3、T. H. Mareci et al J. Magn. Reson 48 158 (1982)

4、A. Bax et al J. Magn. Reson 43 478 (1981)

5、M. Ikura et al J. Am. chem. Soc. 106 4275 (1984)

6、D. J. States J. Magn. Reson 48 286 (1982)

7、Piantini et al J. Am. chem. Soc. 104 6800 (1982)

序. 液晶に分子を溶解して直接結合定数を測定することにより, 化学構造が正確に決定され, 分子の配向性とシフトの相関関係よりシフトの異方性が見積られることが知られている。このような特徴を持つ液晶NMR法は, 前者の場合は配向性環境が生体膜構造と類似することから, 薬物の構造活性追究の手段となることを示唆し, あるいは, ネマティック相のように等方相に近い液晶では, 固体と比べて「みずみ」の少ない最安定構造に近い分子構造の情報を与える。後者の場合, 従来のやり方では種々の実験誤差のため正確な異方性が得られない欠点があるが, 今後の改良により, これは化学構造の考察に有用性を発揮することが期待される。直接結合定数 (D_{ij}) を含むスペクトルの解析は通常のスペクトルの場合より複雑となるが, 多量子NMRの応用により簡単となり得ることを昨年の本討論会で述べた。¹⁾ 我々は最近, BHC (Benzene Hexachloride) 異性体に液晶NMR法を適用し, 化学構造と分子配向を調べているが,²⁾ その中で多量子NMRの応用を検討し, 2,3の知見を得たので報告する。 δ -BHC (図1) は C_s 対称であり, 3つの配向パラメータ (S_{zz}, S_{xx}, S_{xz}) が独立可変である。シフトは四種類, D_{ij} としては9個が未知数となる。構造パラメータの概略値が既知であるとしても, シフトと S_{ij} で6個 (シフトの場合は主に相対値が内題となる) の独立可変パラメータがあるので, スピン数が少ないにも拘らず, 通常の (一量子) スペクトルの解析は非常に面倒となる。

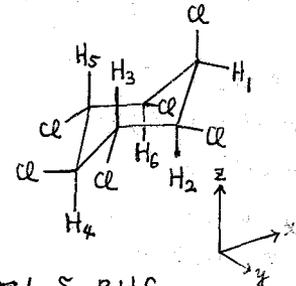


図1. δ -BHC.

方法と特徴.

多量子NMRには全ての次数を同時に観察する非選択的な実験と, 特定 (又は唯一) の次数のみを取り出す選択的な実験がある。ここでは両者を検討した。非選択的な実験はパルス系列図2a) により照射 γ 周波数をスペクトル幅の約1.5倍離す offset 法により行なった。選択的な実験はCTEF法により行なった。実験はパリアンXL200により行なり, パルスプログラムMQPUL を作製した。 t_1, t_2 に関する二次元測定の後, 常法通りにフーリエ変換等の処理を行ない, 最後に t_1 軸へ投影 (Projection) してスペクトルを得た。 $t_2 = 0$ の点のみのフーリエ

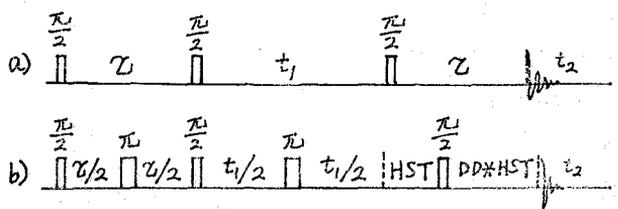


図2. 用いたパルス系列.

ふじわS ひであき, しみず なおと, ささき よしお, たかはし けんすけ

変換（一次元測定）よりも投影した方が S/N 比が向上する。³⁾

結果と考察。

多量子 NMR を最も簡単に観察するためには、図 2 a) に示したように、3つの 90° パルスを利用する方法がある。この offset 法による δ -BHC のスペクトルを図 3 に示す。

予備計算の段階では、特に配向パラメータの概略値を知るためには、5量子スペクトルのようにピーク数の少ないスペクトルを比較した方が有利である。図 3 のスペクトルはデジタル分解能が 50 Hz/点 と粗いため、Iteration の計算には適さない。Drobny の文献では³⁾ 横軸が 16 k 点まで取ってあるが、それでも 15 Hz/点の分解能であり十分とは言えない。このため、Iteration を行うためには特定次数のみを取り出す CTEF 法の利用が推奨される。図 3 の場合は通常の（一量子）スペクトルについての Iteration が先に完成したので、その結果を用いて計算した多量子スペクトルを比較のため実験スペクトルの下に記した。信号強度は offset 周波数により敏感に変化することを考慮して、実験と計算の対応は良好と言える。なお計算にはプログラム SPEC⁴⁾ を利用し、シフト値を入力してある。

CTEF 法には磁場勾配をパルス的に印加する方法と静磁場に含めてしまう方法とがある。

図 3.

δ -BHC の ¹H 多量子スペクトル。

図 2 a) のパルス系列を利用。Z = 36 msec.

offset = 2950 Hz.

90° パルスの長さは

8.5 μ sec, 位相は

順番に $\pi - \pi - \pi$.

縦軸は：スペクトル

幅 = 9 kHz, 点数 = 108

(128 \times 2 Zero Filling).

横軸は：スペクトル

幅 = 40 kHz, 1024 点.

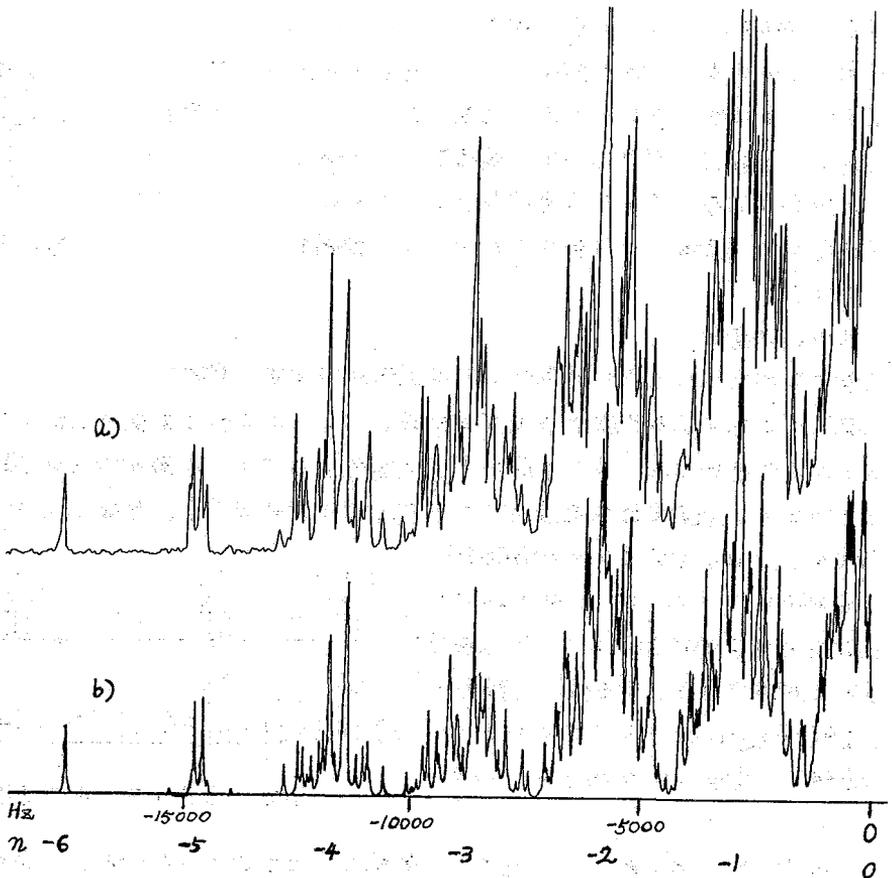
待時間 1.7 秒で 16 回積算。

溶媒：ZLI 1167.

濃度：8 wt%

温度：34.1 °C

a). 実験. b) 計算.



ここでは市販装置で簡単に実行できる後者を選んだ。パルス系列は図2b)の通りである。これは Weitekamp⁵⁾により推奨されているが、応用例は見当たらない。特色は evolution 区間の中央に π パルスが入っているため、不均一磁場の影響は t_1 の時点では消去されることである。不均一磁場は失調周波数に $\Delta\omega$ の差を生ずるが evolution区間内の n 量子コヒーレンスには $n\Delta\omega$ の効果を与える。したがって $t_1/2$ までの間に $\exp(i n \Delta\omega t_1/2)$ の位相の進展があるが、 π パルスにより n 量子コヒーレンスは $-n$ 量子コヒーレンスに変換され、残りの $t_1/2$ の間に $\exp(-i n \Delta\omega t_1/2)$ の位相変化を受け、結局 t_1 の時点では $\Delta\omega$ の影響はなくなる。この時、密度行列への演算子は

$$\rho_e = \exp((-i\mathcal{H} + \omega_2 I_z) t_1/2) \exp(i\pi I_x) \exp((-i\mathcal{H} + \omega_2 I_z) t_1/2)$$

で表される(π パルスは πI_x とする)。 $\mathcal{H}' = \exp(-i\pi I_x) \mathcal{H} \exp(i\pi I_x)$ と置くと、

$$\exp(-i\mathcal{H} t_1) = \exp(-i\pi I_x) \exp(-i\mathcal{H} t_1/2) \exp(i\pi I_x) \exp(-i\mathcal{H} t_1/2)$$

$$\rho_e = \exp(i\pi I_x) \exp(-i\mathcal{H}' t_1/2) \exp(-i\mathcal{H} t_1/2)$$

となる。 \mathcal{H}' は \mathcal{H} に π パルスを印加した結果であるので、ゼーマン項(I_z の項)の符号が反転している。ここで、 \mathcal{H}' と \mathcal{H} が可換であるならば ρ_e は、 I_x の項を除いて、 $\mathcal{H}_1 = (\mathcal{H} + \mathcal{H}')/2$ により表され、ゼーマン項が消去される。即ち $\Delta\omega$ の影響が無くなる、同時にシフト項も消滅する。シフトと D (あるいは J)が同程度であり \mathcal{H}' と \mathcal{H} が可換でないときは、通常の(一量子)スペクトルのエコー法⁶⁾と同様に、 π パルスの無い場合に観察される周波数の差に相当する信号が現われ、スペクトルは、ずれて複雑となる。Preparationの中央に π パルスを加えれば同様の効果でシフト差が除かれるのでこの点で有利である。結局CTEF法としては図2b)のパルス系列となる。

4量子スペクトルの測定例を図4に掲げる。evolutionの中央に π パルスがありエコー法で観察しているのでスペクトルは左右対称(周波数について)となる。図3では各次数内で見れば、周波数は対称になっていない。図4にはSPECにより、全てのシフトをゼロとして計算した乙平均のスペクトルも掲げた。色々の乙について平均すれば合計33本のピークが見られるはずであるが、図4の乙=60 msecの場合は11本が確認できる。これは特定の乙に対しては限られたコヒーレンスのみが励起されるためである。evolutionの中央に π パルスを含めたプログラムSPECHO⁴⁾で乙=60 msecのスペクトルを計算しても強度が実測と一致しない。強度が乙により大きく変化するため正確な乙を計算に用いる必要があること、その他、パルスの(特に π パルスの)不完全さ、Preparationの π パルスの影響などがこの原因と考えられる。乙=30, 50, 60 msecでの測定を併せて、33本のピークのうち25本を確認することができた。最終的には数個の乙についての平均化(averaging)により全てのピークが確認されS/N比も改善されよう。

CTEF法の特徴は任意の特定次数のみを観察することにあるが、これに併せて、ダイナミックレンジの改善とデジタル分解能の向上が計られる。前者の利点はoffset法による測定と比較すれば明白であるが、余分の次数のエコー信号が不均一磁場により消滅することによる。後者はIterationのように精密な計算には不可欠でありコンピュータ

図4.

δ -BHCの4量子スペクトル.

図2 b) のパルス系列による。 $\tau = 60 \text{ msec}$,
 $\text{HST} = 10 \text{ msec}$, $\text{DD} = 4$.
スピニング無し, 待時間
1.5 sec で 24 回積算.

f_2 軸は:

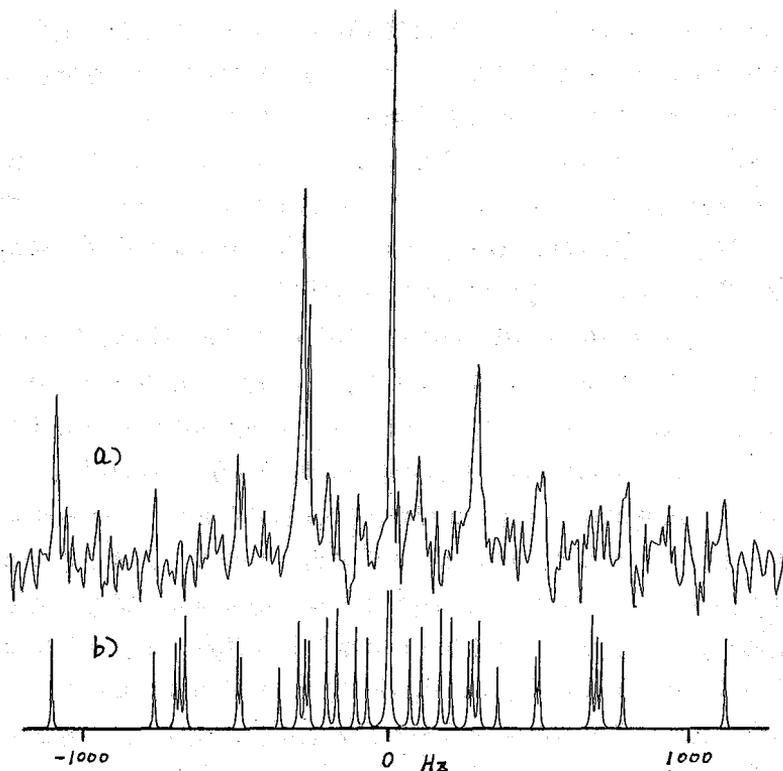
スペクトル幅 = 5 kHz,
点数 = 100 (128 まで
zero Filling).

f_1 軸は:

スペクトル幅 = 5 kHz,
点数 = 512.

a). 実測 ($\tau = 60 \text{ msec}$)

b). 計算 (τ 平均).



\times メモリの節約と測定時間の短縮につながる。この他, シフト項が消去できることも大きな特徴である。特に対称性の低い一般の化合物ではシフトのパラメータ数が増えるのでこれは大きな利点となる。もちろん, シフトに関する情報は得られないので, そのためには通常スペクトルを解析する必要も考えられるが, TSCTES (Total Spin Coherence Transfer Echo Spectroscopy) 法によりシフト項を含めたままでもスペクトルを単純化する方法が適切であろう。

文献

- 1) 藤原英明, 第22回NMR討論会, 要旨集 p26 (1983).
- 2) 清水, 藤原, 高木, 佐々木, 分子構造総合討論会, 要旨集 p590 (1984).
- 3) G. Drobny, Chem. Phys. Lett., 109, 132 (1984).
- 4) J. B. Murdoch, Ph. D. Thesis, University of California, Berkeley (1982).
- 5) D. P. Weitekamp, Ph. D. Thesis (同上) (1982). Adv. Mag. Reson., 11, 111 (1983).
- 6) A. Kumar, J. Magn. Reson., 30, 227 (1978) および G. Bodenhausen, R. Freeman, G. A. Morris, and D. L. Turnur, J. Magn. Reson., 31, 75 (1978).

パルスプログラムの作製に当り種々の御助言を戴いたパリアン社の楠本氏, 黒田氏(大阪), 串田氏(東京)に感謝します。

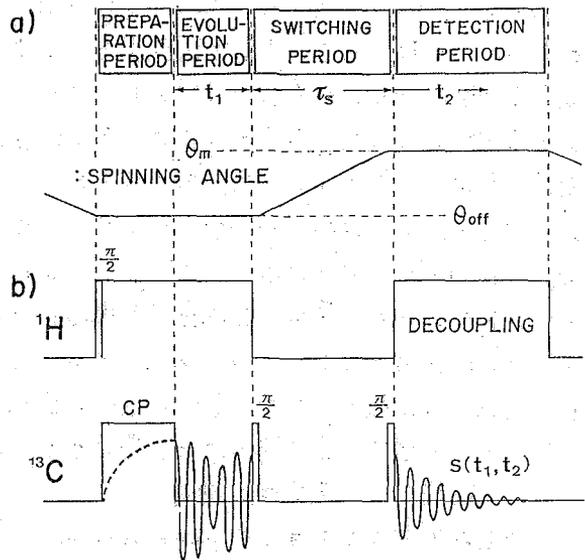
(京大理) 〇寺尾武彦・三浦等・小野寺尚・藤井拓・雑賀亜暁

< 序 論 >

粉末試料での高分解能NMRスペクトルをとるために用いられるCPMAS法では、通常、線幅を狭くするために heteronuclear decoupling と magic-angle sample-spinning を同時に行うので、双極子相互作用や化学シフト異方性などの有益な情報を失ってしまう。前回我々は、化学シフトの異方性による powder pattern を分離測定するための二次元NMRの方法(SASS — Switching-Angle Sample-Spinning Spectroscopy)を開発したことを報告した¹⁾。今回は Spinning system の大幅な改善による測定精度の向上と、試料回転速度に比べて異方性が大きい場合を含むSASS法の一般化²⁾について述べる。精度については、3,4-ジメトキシベンズアルデヒドにおける粉末パターンのシミュレーション²⁾およびβキノールメタノール包接化合物における単結晶データとの比較から化学シフトテンソルの主値が最大2ppmの誤差で決定できることが分かった。またSASS法の一般化により、化学シフトの等方値の異なる核すなわち通常のCPMAS法で分離することのできる核の異方性相互作用(化学シフト・双極子相互作用・四重極相互作用)はすべて分離して測定することが可能となった。双極子相互作用の分離測定に関しては別に発表する³⁾。

< SASS法の原理 >

我々が開発した二次元 sample-spinning spectroscopy の一般的な timing block を図1 a)に示す。まず、preparation period でつくられた横磁化が、evolution period の t_1 秒の間時間推進する。この period では試料の回転軸が静磁場となす角度 θ は magic-angle からずらして θ_{off} としておくので、スピン系のハミルトニアンは $S_0 = P_2(\cos \theta_{\text{off}}) = \frac{1}{2}(3\cos^2 \theta_{\text{off}} - 1)$ なる scaling factor で縮小され、またこのときに照射される rf pulse sequence によってはさらに scaling factor S_{rf} で縮小される。しかし $S_0 \cdot S_{\text{rf}}$ キロであ



(図1) SASSの timing block.

てらおたけひこ・みうらひとし・おのでらたかし・ふじいたく・さいかあぽろ

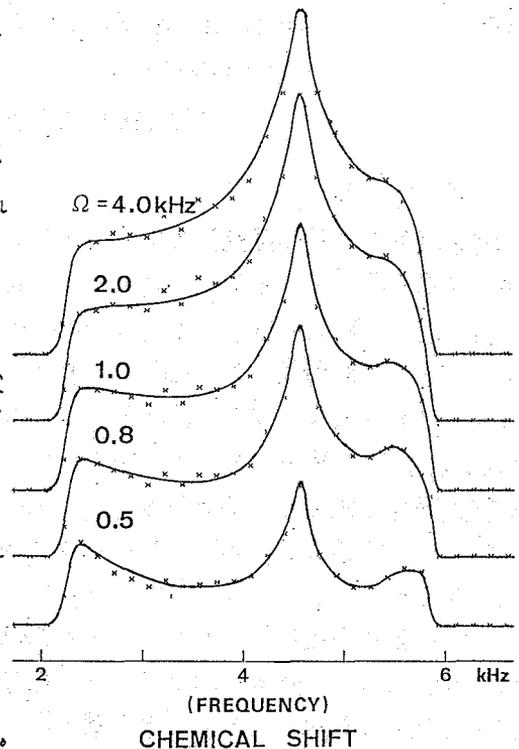
る限り、異方性は生き残る。最後の detection period では dipolar decoupling と magic-angle spinning を行うので、磁化は化学シフトの等方成分のみのもとで時間推進し、それが観測される。evolution period と detection period との間には、回転軸の方向を切換えるために switching period T_s が挿入され、その間横磁化は rf pulse を用いて静磁場方向に store しておく。 t_1 の値を少しずつ変えて実験を行って 1 回ごとのデータを取り、得られたデータ $s(t_1, t_2)$ を二次元フーリエ変換することにより二次元周波数スペクトル $S(\omega_1, \omega_2)$ を得る。このスペクトルにおいては、 ω_2 dimension では化学シフトの等方値によって分離しており、その各々に対応して ω_1 dimension では scaling factor $S_0 \cdot S_{rf}$ で縮小された異方性相互作用による powder pattern が現われる。

測定される異方性の大きさ（周波数単位）よりも回転周波数 Ω の方が小さい場合は、 ω_1 dimension に種々の形をもつ "spinning side pattern" が現われる。これを避けるためには $t_1/2$ を回転周期 $1/\Omega$ の整数倍に設定し、さらに sample spinning による scaling factor S_0 を調整して縮尺された異方性の大きさが Ω よりも小さくなるようにする必要がある。測定する核の化学シフトの異方性の大きさよりも Ω の方が小さい場合には、 ω_2 dimension に spinning side band が現われるが、このときは、TOSS あるいは chemical-shift scaling の方法によってそれらを center band に集めることができる。しかしながら、化学シフトの異方性を測定する場合について我々が計算した結果、図2に示すように、 Ω が相当小さくても ω_2 dimension の center band のみから構成される ω_1 dimension の powder pattern (center pattern) は形は大きく変わるが、異方性相互作用テンソルの主値を与える特異点の位置は不変である。

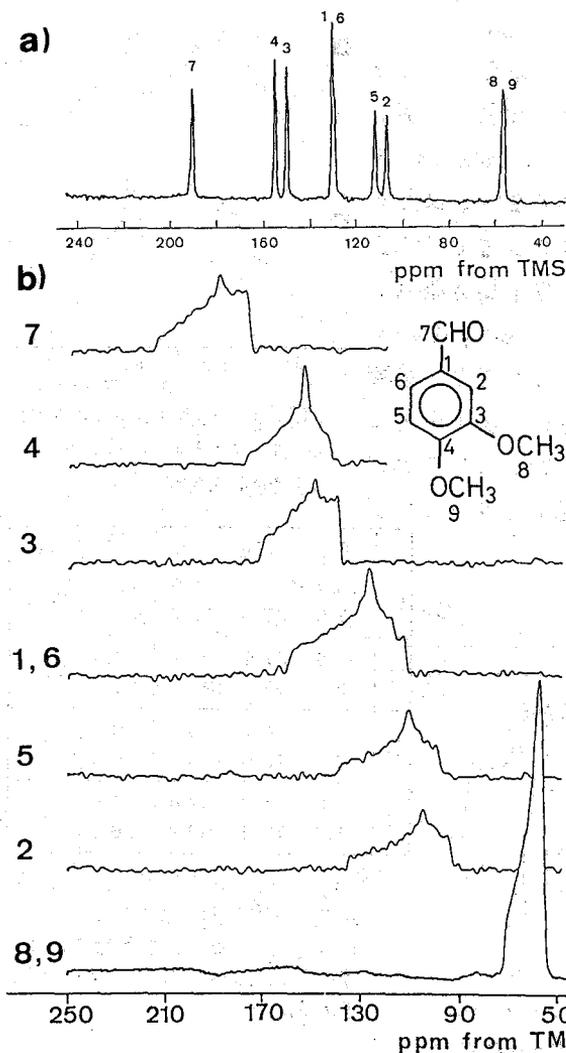
< 化学シフト異方性の測定 >

この目的で我々が使用した pulse sequence^{1,2)} を図1bに示す。本質的にこれと同じ方法を A. Bax⁴⁾ が独立に発表している。この sequence で得られる信号を実部とし、¹³C に照射する2つの $\pi/2$ pulse のうちの最初の方のみの位相を 90° 変えた sequence で得られる信号を虚部とすると、 ω_1 dimension での QPD が可能となる。

図4に3,4-ジメトキシベンズアルデヒドのスペクトルを示す。bのSASSスペクト



(図2) SASS法で得られる化学シフト異方性の powder pattern の Ω 依存性の計算スペクトル。



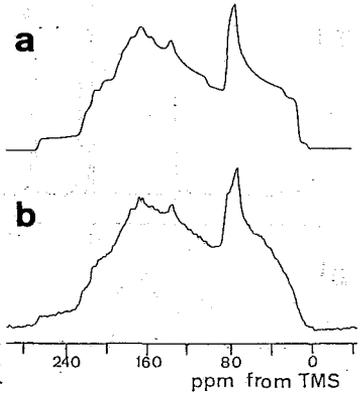
	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}	$\bar{\sigma}^a$	δ_0^b
C ₁	203.7	162.7	26.0	130.8	131.2
C ₂	184.4	135.2	3.1	107.6	107.7
C ₃	211.9	166.3	74.3	150.9	151.1
C ₄	220.2	174.6	73.5	156.1	156.3
C ₅	189.7	135.9	12.0	112.6	112.9
C ₆	222.7	154.4	13.1	130.1	131.2
C ₇	264.3	211.4	101.2	192.3	192.3
C _{8,9}	82.2	74.0	13.0	56.4	57.0

(表1) SASS法で得られた 3,4-ジメトキシベンズアルデヒドの¹³C化学シフトテンソルの主値及び等方平均値 $\bar{\sigma}$ 。
 a) $\bar{\sigma}$ は $\bar{\sigma} = \frac{1}{3}(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})$ として得た。
 b) δ_0 はCPMASで得られた化学シフト。

(図3) 3,4-ジメトキシベンズアルデヒドの¹³Cスペクトル。a) CPMAS スペクトル。b) SASS法による化学シフト powder pattern。scaling factor $S_0 = -0.23\%$ 。メトキシ基は下がり短くなるので炭素8,9の信号だけをsaturation recovery法で観測した。また τ_1 は100 μ secずつ変えた。

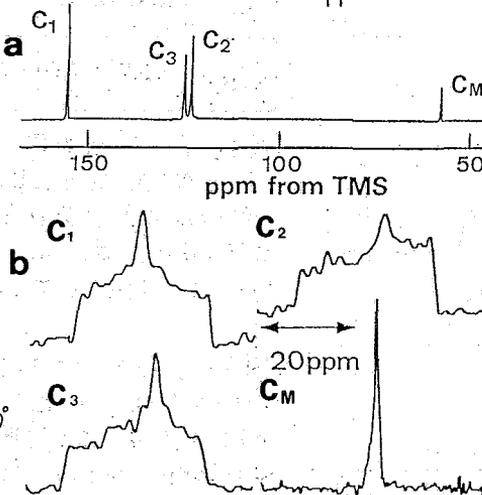
ルは $\theta = 65.24^\circ$ とし、 τ_1 を100 μ secで変化させてとったものである。この化合物でのSASS法による¹³C化学シフト powder patternは前回の本討論会においてすでに発表したが、今回のスペクトルは前回に比べて精度が飛躍的に向上している。これは、spinning systemをBullet-typeのローターからダブルベアリング支持の円筒型のローター³⁾に変えたことによる。後者では前者に比べて、spinning angle θ についてのローターの個体差がなく高精度で制御でき、回転が非常に安定でローターの寿命が長く、 θ のswitchingに要する時間も非常に短かくでき、また、その際の試料の重心の位置の変化も最小になるように設計されている。このspinning systemの改良により、非常に精度の高い結果が得られるようになり実験時間も短縮された。図3では1と6の炭素の信号が重なっているが、炭素1はnonprotonated carbon、炭素6はprotonated carbon であるので、powder pattern

を分離することは可能である。すなわち θ_{off} で観測した non-protonated carbon 1, 3, 4 のみのスペクトルから炭素 3 と 4 の信号を引けば炭素 1 の powder pattern が得られ、炭素 1 と 6 の重なったスペクトルから炭素 1 の powder pattern を引けば炭素 6 の powder pattern を得ることが出来る。以上の結果から得た化学シフトテンソルの主値を表 2 にまとめた。主値の平均値は CPMAS で得られた化学シフト等方値 δ_0 と非常によく一致している。これらの値から powder pattern を構成し直しすべて加え合せると図 4 a のようになり、実験で得られる静止 powder pattern b と非常によい一致を示すことから、SASS 法で得られる結果の精度が高いことがわかる。誤差は両スペクトルの比較から最大 2 ppm であることがわかった。



(図 4) a) 表 1 の値から再構成した powder pattern. b) 静止スペクトル。

図 5 に示すのは β キノールメタロール包接化合物の ^{13}C スペクトルである。a は CPMAS スペクトル、b は SASS 法において $\theta_{off} = 62.00^\circ$ とし、 t_s を 500 μ sec ステップで変えて得られた化学シフト powder



(図 5) β キノールメタロール包接化合物の ^{13}C スペクトル。a) CPMAS。b) SASS 法による化学シフト powder pattern。

	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}	$\bar{\sigma}$	δ_0
C_1	-16.4 -17.5	-107.8 -107.8	61.6 62.7	20.9 -20.9	-20.7
C_2	-4.2 -3.5	-67.9 -68.3	106.7 106.1	11.5 11.4	11.5
C_3	-6.7 -6.2	-71.2 -70.9	106.4 105.7	9.5 9.5	9.7
C_M	71.3 71.0	71.3 70.3	87.4 88.9	76.6 76.7	76.9

(表 2) β キノールメタロール包接化合物の ^{13}C 化学シフトテンソル。上は SASS 法、下は単結晶の実験による。 δ_0 は CPMAS による結果である。

pattern である。 t_s ステップはサンプリング定理を無視して荒く選んだ。それでももし $1/t_s$ dimension で QPD を行い、縮小された異方性が $1/t_s$ よりも小さければ data point の cyclic permutation により正確な powder pattern が得られ、測定時間を大幅に短縮することができる。表 2 にはこの実験で得られたテンソルの主値と単結晶の測定で得られたもの⁵⁾を示す。これらの値は 1 ppm 程度以内で一致し、SASS 法の精度の良さがわかる。

< 文 献 >

- 1) 寺尾武彦・小野寺尚・藤井拓・雑賀亜暎, 第 22 回 NMR 討論会 p.22.
- 2) T. Terao, T. Fujii, T. Onodera, and A. Saika, Chem. Phys. Lett. **107**, 145 (1984).
- 3) 本討論会, 講演番号 14.
- 4) A. Bax, N. M. Szeverenyi and G. E. Maciel, J. Magn. Reson. **55**, 494 (1983).
- 5) S. Matsui, T. Terao, and A. Saika, J. Chem. Phys. **77**, 1788 (1982).

(京大理) 寺尾武彦・○三浦淳・小野寺尚・藤井拓・雑賀臣暢

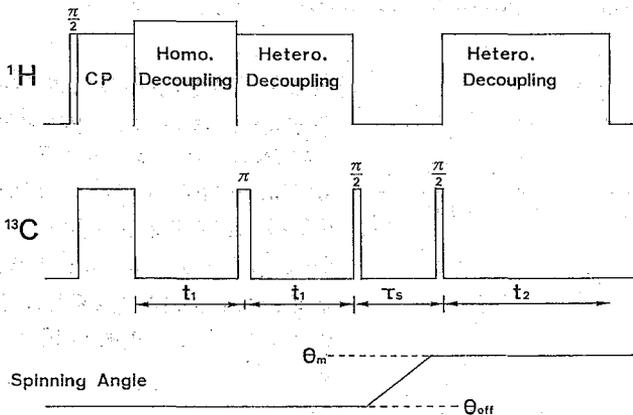
〈序論〉

固体中での核スピンの相互作用を測定することにより、分子の電子状態、分子構造、運動状態等に関する幅広い知見を得ることができるとともに、信号の帰属等に役立つものと期待されるが、固体高分解能NMRの手法として利用されているCPMAS法においては、heteronuclear decouplingの併用により、重要な情報である異種核スピンの相互作用(双極子相互作用及び間接スピンスピン結合)を消去してしまっている。この研究では、最近我々が開発したSASS (Switching-Angle Sample-Spinning Spectroscopy) 法¹⁾の一変形を用いることにより、粉末試料中の abundant spin (I) と rare spin (S) との間の双極子相互作用 H_{dIS} 及び間接スピンスピン結合 H_{jIS} を同時に測定することが可能となりスピンスピン結合定数 J の符号も決定できることを報告する。この方法では化学的に異なる核の双極子相互作用を分離して測定することが可能であるのみならず、特別な場合として試料の回転軸を切換えずに magic-angle に保つたままで行うと、二次元 J 分解スペクトルを得ることが出来る。後者は我々による固体 J 分離 NMR²⁾ の発展である。

今回我々は、SASSを用いて、I S間の直接的な相互作用である双極子相互作用 H_{dIS} と、電子を介しての間接スピンスピン結合 H_{jIS} を測定する方法について報告し、ギ酸カルシウム及びβキノールメタノール包接化合物へ応用した結果を示す。

〈原理〉

粉末試料での ^1H (I) ^{13}C (S) 間の相互作用 H_{dIS} 及び H_{jIS} を測定するSASS法の pulse sequence を図1に示す。この sequence は次の4つの period から成る。i) まず、



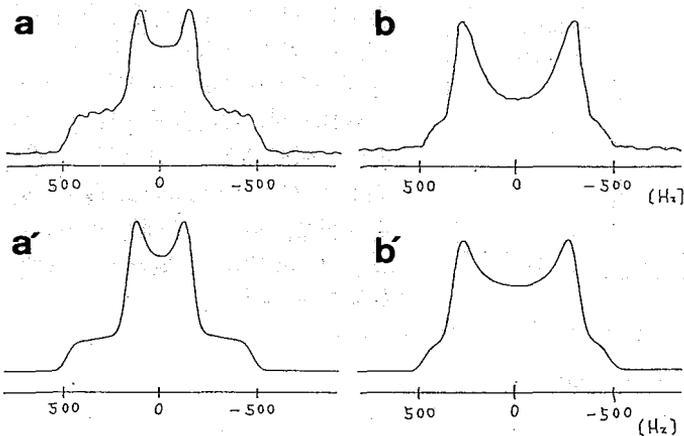
(図1) ^1H - ^{13}C 間の相互作用を測定するための pulse sequence. CP でつくられた横磁化は t_1 秒の間双極子間の相互作用ハミルトニアンのもとで時間推進する。この間の化学シフトによる分は π パルス照射後の t_1 秒間で回復される。 T_s の間 spinning-angle を switch する。最後に t_2 の間 data をとりこむ。

てらおたけひこ・みうらひとし・おのうたかし・ふじいたく・さいかあぽろ

preparation period では CP によって ^{13}C の横磁化がつけられる。ii) evolution period t_1 の間 ^{13}C 磁化は IS 間の相互作用ハミルトニアンのもとで時間推進する。化学シフトハミルトニアンによる時間推進についてはこの後の π パルスによって回復されるので考えなくてもよい。また evolution period では試料の回転軸が静磁場となる角度 θ は magic-angle からずらして θ_{off} としておくので、異方性をもち H_{dip} は試料回転による scaling factor $S_0 = P_2(\cos\theta_{\text{off}}) = \frac{1}{2}(3\cos^2\theta_{\text{off}} - 1)$ で縮小される。 H_{JIS} の異方性は H_{dip} に比べて小さいため無視する。さらに、 ^1H 間の homonuclear decoupling のために照射される multiple pulse により H_{JIS} , H_{dip} とともに scaling factor S_{rf} で縮小されるので、この period でのスピンのハミルトニアンは $S_{\text{rf}}\{H_{\text{JIS}} + S_0 H_{\text{dip}}\}$ となる。iii) switching period T_s の間に試料の回転軸の方向を θ_{off} から θ_m に切り換える。この period では ^{13}C 磁化を rf パルスを用いて静磁場方向に store しておく。iv) detection period t_2 の間 ^{13}C 磁化を観測する。この period では CPMAS と同じく heteronuclear decoupling を併用するので ^{13}C 磁化は化学シフトの等方値のみで時間推進する。したがってこの sequence でえられるデータ (t_1, t_2) を二次元フーリエ変換して得られるスペクトル $S(\omega_1, \omega_2)$ は ω_2 dimension では CPMAS と同様に化学シフトの等方値で分離しており、その各々が ω_1 dimension では縮小された直接及び間接スピンスピン相互作用による powder pattern を示す。 evolution period におけるスピンのハミルトニアンの表式から明らかのように、 $\theta_{\text{off}} = \theta_m$ として実験を行えば、 $S_0 = 0$ となることから H_{JIS} のみが測定にかかる。また、 H_{dip} によるスペクトルは 2 つの対称な powder pattern の重ね合わせであるが、それらの相対的なシフトから結合定数 J の符号を決定することができる。

〈 双極子相互作用及び間接スピンスピン結合の測定 〉

我々は SASS 法を用いてギ酸カルシウム $\text{Ca}(\text{COO})_2$ 及び β キノールメタノール包接化合物における ^{13}C - ^1H 間の H_{dip} 及び H_{JIS} を測定した。まず図 2 a, b に示すのはギ酸カルシウムのスペクトルで、それぞれ $P_2(\cos\theta_{\text{off}}) = -0.0382, +0.0496$ としたものである。 homonuclear decoupling には MREV 8 pulse cycle を用いており、アダマントンを

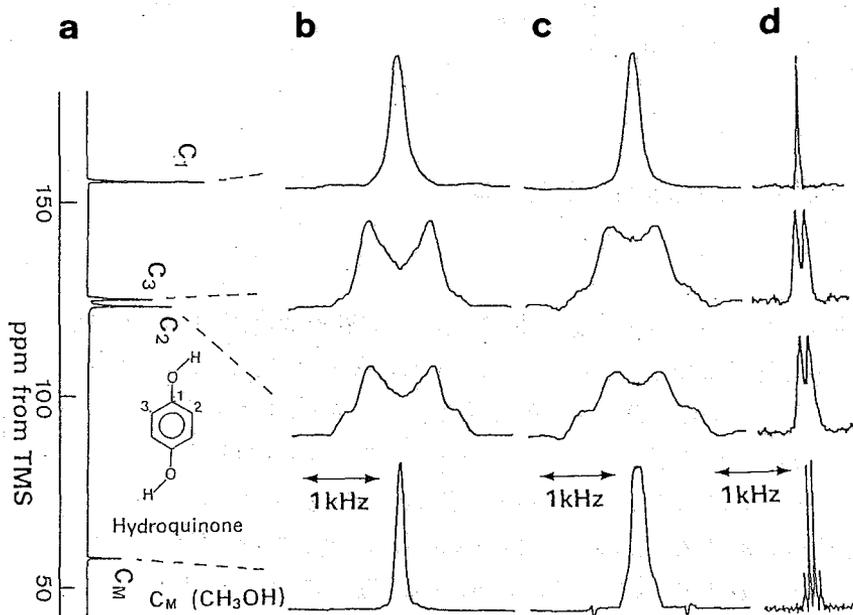


(図 2) ギ酸カルシウムの双極子結合 (H_{dip} , H_{JIS}) の powder pattern (a: $S_0 = -0.032$, b: $S_0 = +0.0496$). とともに $S_{\text{rf}} = 0.45$, 及び それらのシミュレーション (a', b'). a と b とで形状が著しく変わるのは、 J の符号が不変である一方 D の符号が変わるからである。

reference として測定したところ $S_{\text{ref}} = 0.45$ であった。a, b はそれぞれ a, b のシミュレーションである。I スピン, S スピンの磁気回転比をそれぞれ γ_I, γ_S とし、核間距離を r とすると双極子相互作用の大きさ D は、 $D = \frac{\hbar \gamma_I \gamma_S}{4\pi r^3}$ と書くことができる。測定結果及びシミュレーションから $D = 20.0 \pm 0.2 \text{ kHz}$ となり、その結果 $r = 1.15 \text{ \AA}$ という値が得られた。スペクトル a, b の形状が著しく異なっているのは magic angle の前後で双極子相互作用の符号は変わるが、丁の符号は不変であることによる。このことから丁の符号を知ることができるが、今の場合 $J > 0$ であることが明確にわかる。ここで得られた r の値は典型的な CH 結合の核間距離 1.09 \AA よりも大きいのが、これは何らかの分子運動のために D が小さくなっているからであると考えられる。

図3に示すのは β キノールメタノール包接化合物の ^{13}C スペクトルである。a は通常の CP MAS スペクトルであり、b, c は SASS 法によって分離測定したスピンスピン相互作用のスペクトルで、それぞれ $\theta_{\text{off}} = 58.24^\circ$ ($P_2(\cos\theta_{\text{off}}) = -0.0831$), $\theta_{\text{off}} = 51.38^\circ$ ($P_2(\cos\theta_{\text{off}}) = +0.0843$) として測定したものである。d は $\theta_{\text{off}} = \theta_m$ として得た J スペクトルで、b, c, d ではすべて homonuclear decoupling に MREV 8 パルスサイクル (1 cycle 36 μsec) を使用した。b と c との差異は間接スピンスピン結合 J の存在によるものであり、これにより炭素 $\text{C}_2, \text{C}_3, \text{C}_m$ の隣接する H との間 J はすべて正であることもわかる。炭素 C_2, C_3 のスペクトルは明確に異なっているが、これは遠く離れた H からの影響によるものである。 C_m のスペクトルから、トラップされているメタノール分子が回転運動をしていることが示唆され、このことは、以前我々が行った単結晶の研究結果³⁾ とよく合致する。

以上、SASS 法による双極子間の相互作用の測定例を示したが、今後は、試料回転の

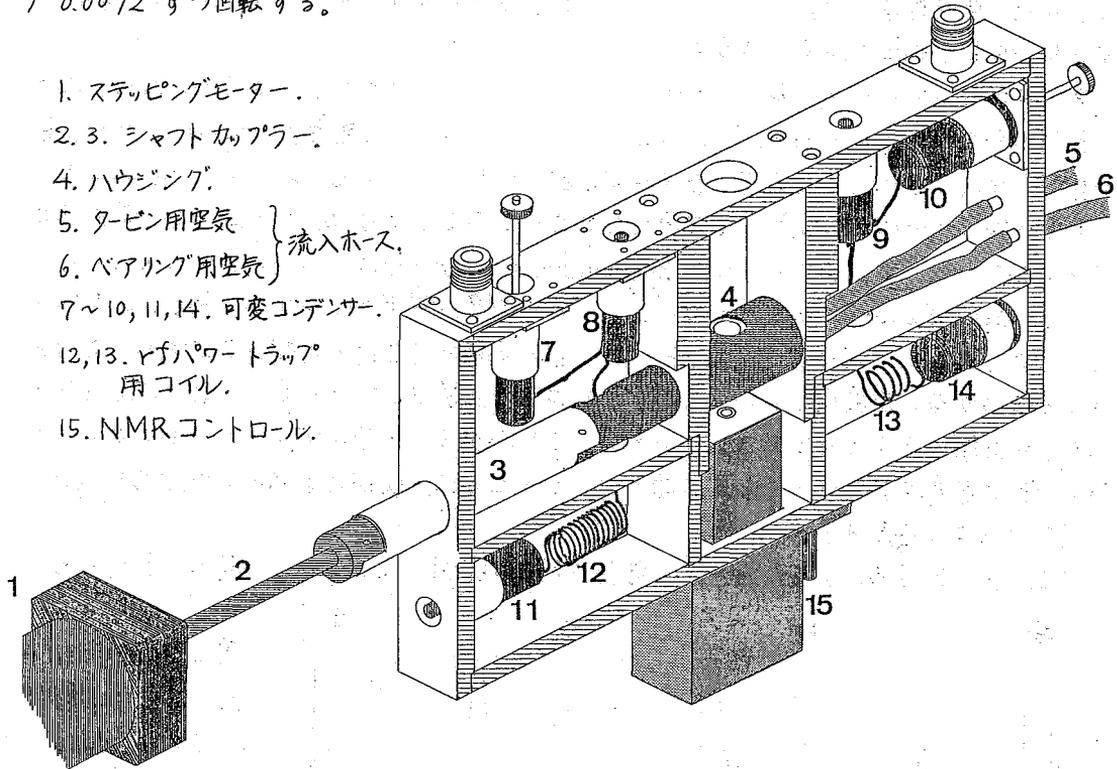


(図3) β キノールメタノール包接化合物の ^{13}C スペクトル。
 a: CP MAS.
 b, c, d: SASS による双極子結合の powder pattern.
 いずれも $J > 0$ で、
 b では $S_0 \cdot D < 0$,
 c では $S_0 \cdot D > 0$,
 d では $S_0 \cdot D = 0$.

周波数の安定化, w_1 dimension での QPD の実現等により, さらに高精度の結果が得られるようになることが期待され, 目下準備中である。最後に本研究に使用した NMR プロブ及び spinning system について簡単に触れる。

< NMR プロブ及び Spinning system >

図4に NMR プロブの内部を示す。中央部のハウジング内に試料コイルを巻いたステータが入り, その中で円筒型のローターが回転する。ローターの回転軸は左手前側のステッピングモーターによって高速で正確に切換えられる。ステッピングモーターは1ステップ 0.0072° ずつ回転する。



- 1. ステッピングモーター.
- 2, 3. シャフトカプラー.
- 4. ハウジング.
- 5. タービン用空気
- 6. ベアリング用空気 } 流入ホース.
- 7~10, 11, 14. 可変コンデンサー.
- 12, 13. 変圧パワートランス用コイル.
- 15. NMRコントロール.

(図4) SASS用 NMR プロブ

< 参考文献 >

- 1. a) 寺尾武彦, 小野寺尚, 藤井拓, 雑賀亜幌. 第22回 NMR 討論会講演要旨集 P22. (1983).
- b) T. Terao, T. Fujii, T. Onodera, and A. Saika, Chem. Phys. Lett. 107, 145 (1984).
- c) 寺尾武彦, 三浦 尊, 小野寺尚, 藤井拓, 雑賀亜幌, 本討論会講演番号 13.
- 2. a) T. Terao, H. Miura, and A. Saika, J. Chem. Phys. 75, 1573 (1981).
- b) T. Terao, H. Miura, and A. Saika, J. Magn. Reson. 49, 365 (1982).
- c) T. Terao, H. Miura, and A. Saika, J. Am. Chem. Soc. 104, 5228 (1982).
- 3. S. Matsui, T. Terao, and A. Saika, J. Chem. Phys. 77, 1788 (1982).

序 密度等の物理量を測ることは物性や構造の研究に極めて重要な課題である。しかし高温高圧下での分光学的研究において密度の正確な値を同時に得ることは作業上困難である。高温高圧用の液体や気体を測る装置は静止型、流動型の種々の検出法が提案されているがそれらの装置を別個に作らなければならない。今回我々は *in situ* で気体と液体の密度を測定する方法を考えてみた。この方法を用いてシクロペンタンの密度をオートクレブ型のNMRプローブを用いてテストしてみたのでその結果を報告する。

方法 基本原理の一つはよく知られたプロトンのスペクトル(強度)はスピン密度に比例すること、第二は一次元の投影法を用いることである。最近の発展した投影の手法は不均一系を対象としていてすべて生物を目標としており均一系への適用は無いに等しい。プロトンのNMRは感度が高いからガスの検出も容易であろう。投影法は二次元、三次のイメージングを行うため投影図の再構成を計算機に行はせる必要がある。一次元の投影では今の処何ら装置に特別な工夫を必要としない。いま円筒状の試料セルに1~1.2 ρ_c 程度になる様に試料を入れ均一度の良い静磁場 B_0 中におく。核スピンは B_0 に従つて分極する。この B_0 に直交した y 軸にそつて試料の全域をカバーする様な磁場勾配 G_y を加える。この場合の共鳴条件は $\omega = \gamma(B_0 + G_y z)$ となる。この条件を満足する即ち試料の全域をカバーする様な rfパルス $\gamma B_1 t_w = \pi/2$ を印加してスピン束を $\theta = \pi/2$ だけ回転させる。一様磁場勾配によつて周波数と変位との線形な関係からその時間応答は $s(t) = \int \rho(r) e^{i(\omega_0 + \gamma G_y z) t} dr$ となりその逆フーリエ変換からスピン密度と変位の位置を含む投影スペクトルが得られる。スペクトルの縦方向はその位置でのスピン密度の分布をあらはし、横方向は試料の存在する位置を示すことになる。円筒状セルの中にある均一な液体は一様なスピン分布を持つ。このことは磁場勾配の中で rfパルスでスピンを励起することは丁度物体に等色光をあててその影を見ることに等しい。上述の理由から仕込量が判ると一次元投影により各温度での液体の体積変化が観測されこれから密度が求められる。ガスについても同様である。液体ガスの相は臨界点までは明白で密度の差が観測されるはずである。通常のNMRの観測は同一コイル内の液とガスは圧倒的に液体のみを見る。緩和測定の場合も緩和時間 T_1 の値が液とガスで異なり且その濃度も異なるから一方のみ観測される。液体と気体は空間的に異なる位置にある、投影法では試料セルのすべての位置を見ているから液とガスが観測される。臨界域附近になると液とガスの区別がつかない同じ ρ_c になる。 ρ_c 以上では単一の投影スペクトルを示すことになる。その範囲は容器全体に及ぶはずである。

実験 内径5 mm長さ15.1 mm (0.298 ml) の耐熱ガラス製円筒セルの中にシクロペンタン C_5H_{10} を0.101 g封入した。一次元投影スペクトルから得られる密度は液体と気体

しもかわ しげさう やまた えいじ

をそれぞれ ρ, g とすると次の様に表はせる。

$$\rho_{C_5H_{10}}^{(g)} = \frac{1}{m A \pi d^2} \delta \frac{S^{(g)}(T)}{L^{(g)}(T)} \quad [\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}] \quad (1)$$

ここで $\delta = \frac{\rho^{(g)}}{\rho^{(l)}}$ それ室温と臨界温度の値から決める。SとLはそれぞれ投影スペクトルの面積と長さを示す。これから

$$\rho_{C_5H_{10}}^l(T) = 2.10 \times 10^{-3} \frac{S^l(T)}{L^l(T)}, \quad \rho_{C_5H_{10}}^g(T) = 2.06 \times 10^{-3} \frac{S^g(T)}{L^g(T)}$$

これより各温度におけるSとLの比求めると直ちに密度が得られる。

第一図は試料セルに線形磁場勾配を加えたときのラジオ波の一様散乱の影を模図として示したものである。スピン密度分布の面積Sと投影の変位Lに注目したい。これは液体部分とガスの部分に分けられる。

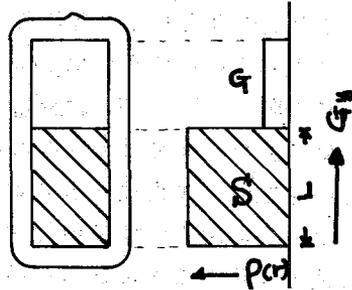


Fig. 1. Projection of cylindrical homogeneous spin distribution in a uniform G_y .

第二図はオートクレープ中の試料の一様分散の投影スペクトルである。室温では液体のみのパターンを示しているが昇温と共に左側部分のベースラインにガスの信号が徐々に出現して来るのがよく判る。420Kで早くもガスの信号が見られる。509Kではガスの強度も十分増加している。臨界温度は511K附近であるが本実験では図に示す様に532Kで液とガスの信号が合一した。臨界密度附近ではスペクトルの上面のプラトな部分がひずみ正しい一致点を見出しにくい

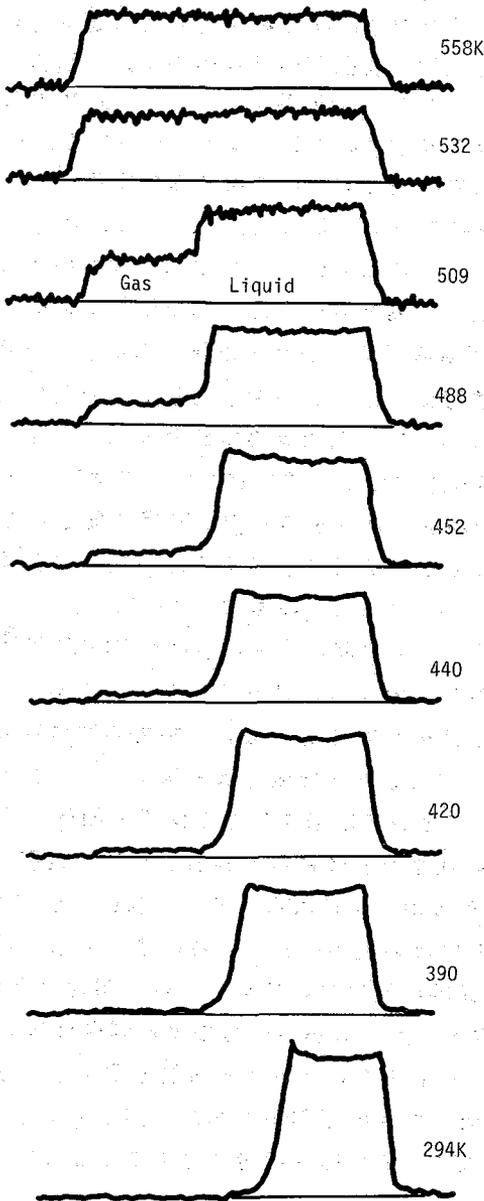


Fig. 2. Temperature dependence of one dimensional proton projection spectra of cyclopentane in a uniform vertical magnetic field gradient.

又当然のことであるが温度の上昇とともに分極したスピンのボルツマン分布は減少し信号のS/Nが低下する。故に高温になる程観測は難かしくなる。第三図は実測から得られた面積比をもとに(1)式より求めた密度を温度に対してプロットしたものである。液とガスの密度が極わだつて変化して行く様子が示されている。

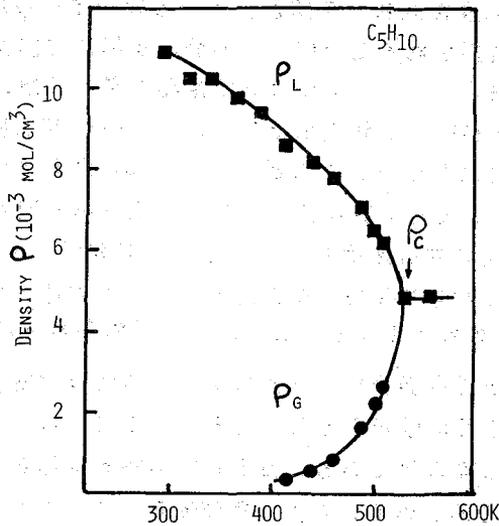


Fig. 3. Gas-liquid densities of cyclopentane versus temperature.

結論としてNMRを用いた密度測定法は *in situ*で且 *direct*に高温高圧下の分子性液体の密度を測ることが出来る。液体と気体を同時に測定出来る。高温におけるS/Nの低下を補うためには高磁場での観測が望ましい。単一吸収線の投影図は液ガスの対応が容易であつた。

謝辞

本研究の遂行にあつて適切な意見と助力を頂いた理学部化学科の下川健二君に感謝致します。

序 液体分子のプロトンの緩和機構の研究はこの20年来多くの研究者により試みられてきた。しかしながらプロトンのスピン格子緩和に含まれる分子間と分子内の双極子—双極子相互作用の寄与の程度が同じ位の大きさで観測されるために、その分離が極めて困難となる。このため研究の手段は、同位体希釈法、同位体置換による四重極効果の利用、炭素核の観測等による分子内緩和のみの抽出などが行なわれて来た。プロトンのNMRは検出感度をもつともすぐれ、多くの応用が期待されながらことスピン格子緩和に関しては上述の理由によつてその進展が阻まれているといえる。我々は数年前より高分解能型の高温高圧NMRを試作しこれを用いて臨界域前後の有機液体の T_1 やDを調べて来た。ベンゼン系の有機液体の緩和過程を追跡した処極めて重要な知見を得たのでまとめて報告する。その一つは臨界温度(T_c)附近の T_1 とDの値の変化から分子間と分子内の寄与が分けることが出来ることであり、二番目は超臨界有機流体(トルエン)の異常な溶解性の理由をプロトンの緩和機構から説明が出来る可能性があることである。ここで我々の立場は、液体近似でありトルエン分子の運動は等方的であると仮定して議論を進める。

実験法 NMR装置に関してはすでに報告してあるのでここでは省略する。トルエンは分光用のものを0.162gを0.358mlの耐熱ガラス容器に脱気封入した。室温における T_1 の値は文献値とよい一致を示した。 T_1 の測定は通常の180°- τ -90°法を用いPRFT法で行い環とメチルの両方の T_1 を得た。自己拡散係数DはHahnのスピンエコーに定常磁場勾配を加える方法で行なつた。磁場勾配の大きさは0.05~0.9G/cmである。この磁場勾配を発生させるためのコイルはオートクレーブを冷却するアルミ製のプローブユニットの両側面にとりつけてある。本装置のスペクトル分解能は試料の回転なしで 9×10^{-8} である。磁場の安定化のために ^{19}F ロックも使用している。スペクトルの積算はしていない。密度の測定は前報の様にin situで同じ試料を測つた。y軸方向にシムコイルから定常磁場勾配を印加しながらrfパルスによる一様散乱のFIDをFTして投影スペクトルを得た。液体の密度変化のみに注目した。この場合の測定誤差は10%前後であつた。トルエンでは化学シフトにより通常投影スペクトルは乱れる。このため投影パターンの非一様性が測定誤差を大きくする。我々は何ら補正をしていない。

Fig. 1. PRFT spectra of supercritical toluene, at 713K and 10MPa.

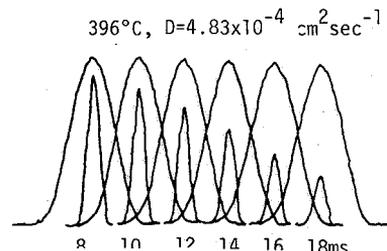
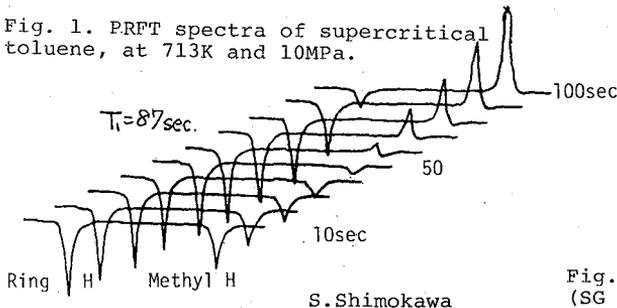


Fig. 2. Spin-echo trains; narrow echos (SG on), broad echos (SG off).

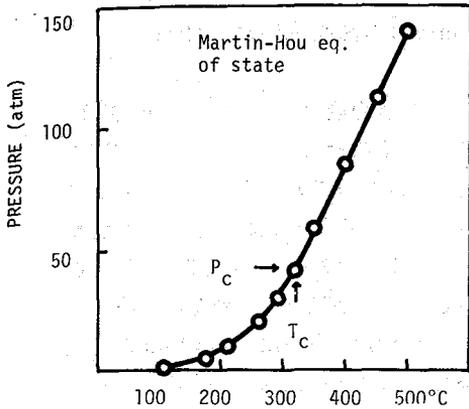


Fig. 3. Pressure vs. Temperature.

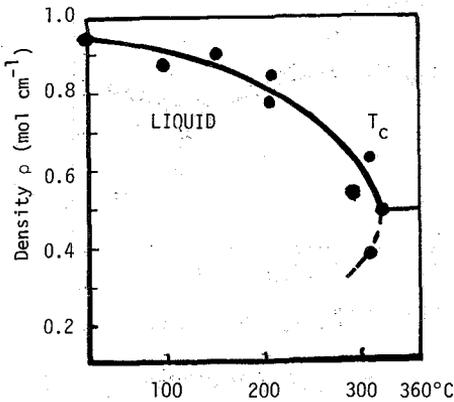


Fig. 4 Density vs. Temperature.

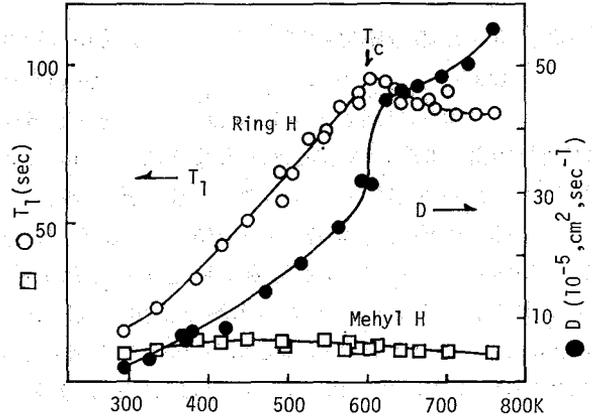


Fig. 5 Experimental T_1 and D vs. Temperature.

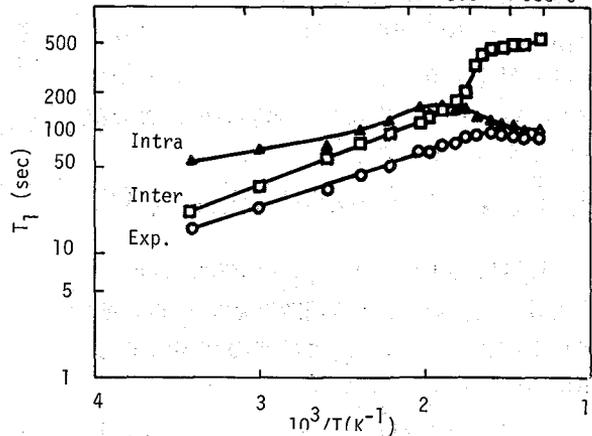


Fig. 6. Intra and Inter T_1 vs. $1/T$

結果 図の1,2,3にそれぞれトルエンのPRFTスペクトル, 拡散係数測定のためのスピネコ列, 及びP-T曲線を示した。その温度での圧力は T_c まではその蒸気圧から又 T_c 以上ではMartin-Houの状態方程式から求めた。図の4は一次元投影法により求めた密度を示す。ここでは液体の密度のみを示してある。図の5は実測された T_1 と D を同じグラフに示したものである。 T_1 の値は T_c 付近で最大となり他方 D の値は T_c で大きくジャンプする様子が明白に示される。 T_1 の最大値は95secであつた。臨界域を越えると徐々にその値は減少し700Kでおおよそ78secになつた。他方メチルプロトンはほぼ一様で380-580^Kで幅の広いブロードな最大値13secとなり、この値は従来の報告と一致した。次にトルエンの自己拡散係数を見ると600K附近で D の値は 3×10^{-4} から 4×10^{-4} と大きくその値が増加する。これは極めて興味深い事実をものがたつている。即ち液体トルエンが気体状態に相転移したことを示している。分子間相互作用に激的変化があつたことを物語つているといえる。拡散係数 D を求めることは粘度の測定から言及することよりも直接的である。

考察 液体分子のプロトンのスピン-格子緩和は次の様にはあらはされる。

$$(1/T_1)_{\text{exp}} = (1/T_1)_{\text{inter}} + (1/T_1)_{\text{intra}}^d + (1/T_1)_{\text{intra}}^{\text{sr}} \quad (1)$$

温度が比較的に高い場合も含めると分子内の緩和にスピン-回転相互作用を考慮しなければならない。

分子間相互作用の分離には我々はTorry-Kruger及びHarmonらの方法を用いた。即ち

$$(1/T_1)_{inter} = (2/5) (\pi \gamma_H^4 \hbar^2 n_H / dD) (1+5\alpha) \quad (2)$$

ここで n_H は単位体積当たりのスピンの数、 d は相異なる分子間の最近接距離、 α は $k^2 r^2 / 12d \langle r^2 \rangle$ は平均飛行距離、 D と n_H は本実験から得られる。 d は実験から求めることは出来ない。 d をどのようにして求めるかが問題であつた。(2)式を各温度で計算するために d の値は次の様にして決めた。即ち室温と T_c の処での d の値は、室温 $\sim 120^\circ C$ はJonasらが希釈法により得た T_1 の値を用いて決定した。 T_c では D が急劇に変化することから分子間と分子内の寄与の大きさが、ここで反転する。つまり T_c 附近で(計算上は少し前)同じ値をとると仮定した。次にその途中では線形に変化すると考えられるから、予想される d をbest fitさせて決めた。図の6はこの様にして得た d を用いて(2)式から分離して得た緩和時間をプロットしたものを示す。 α を $1/12$ として計算した。分子間の相関時間 τ_{inter}

は次の関係を用いて計算した。

$$\tau_{inter} = (d^2/5D) (1+5\alpha) \quad (3)$$

分子の衝突によつて生ずる分子内緩和の一つスピン-回転相互作用の寄与はHubbardにより次の様に与えられている。

$$(1/T_1)_{intra}^{sr} = (2/3) (I_0 kT / \hbar^2) C_{eff}^2 \tau_{sr} \quad (4)$$

ここで I_0 は慣性モーメント、 C_{eff} は有効スピン-回転定数、 τ_{sr} は角速度の相関関数である。拡散モデルに従うと τ_d と τ_{sr} とは次の関係にあることが示されている。即ち

$$\tau_d \cdot \tau_{sr} = I_0 / 6kT \quad (5)$$

ここで C は温度に依存しない。我々は T_c 附近で $(1/T_1)_{intra}^{sr}$ の最大値を得た。それ故 $T_1^d = T_1^{sr} = 2T_1^{max}$ で且 $C = 4 (T_{lexp max})^2$ である。図の8はこれから得られた $(1/T_1)_{intra}^{sr}$ と $(1/T_1)_{intra}^{sr}$ をプロットしたものである。我々はメチルHについても観測したが、すでにこれは十分解析されているので言及しない。ここではトルエン環(分子)の運動についてのみ考える。これから判る様に T_c より上の領域ではスピン回転相互作用が重要となつて来るこの結果は拡散係数の急劇な変化とよく対応している。 τ^d と τ^{sr} のプロットを図の9に示した。 I_0 と C_{eff} の値はそれぞれ $480 \times 10^{-45} \text{Kgm}$ 、 2.41KHz である。Spiessらは ^{13}C のNMRでトルエンの分子運動を調べたが333Kまでの温度で行なつた。彼等は T_1^d と T_1^{sr} を分けるために等しくなる温度を予想した。その温度(T_c)は我々の観測した温度に一致している。図の9は本研究で得られた最近接分子間距離 d と分子容から見積つた半径 R を温度に対してプロットしたものである。非常に興味あることは d と R は温度依存性が逆になつてゐる。低温側では d が 4.5\AA に対して R は 3.4\AA であり他方 T_c では d が 3.0\AA に対して R は 4.2\AA である。この事実は次のことを強く示唆している。即ち分子間最近接距離 d の減少は(温度の上昇に対する)単位セルにあるトルエン分子の運動が長軸(C-CH₃軸)周りの回転運動の活発化によつて引き起される

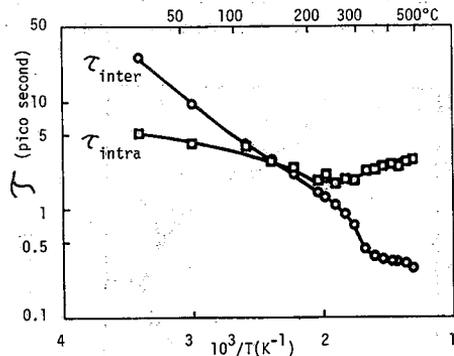


Fig. 7 τ_{inter} vs. $1/T$.

(4)と(5)式から次の関係がすぐ出

$$(T_1)^d (T_1)^{sr} = \text{Const.} \quad (6)$$

て来る。

のであろう。おそらく分子はペアの形で存在していると考えられる。これに対してRは温度の増加とともに単純に平均分子間距離が増加していることが判る。以上の事実はベンゼン系分子液体に共通のものであるかどうか。極めて近い内に結論を出せると考える。

スピン-回転相互作用の寄与が超臨界域で優勢になることから超臨界有機流体（ここではトルエン）の異常な溶解能の原因の一つに $\tau^{sr} > \tau^d$ のガスの性質が大きく関与していると思はれる。

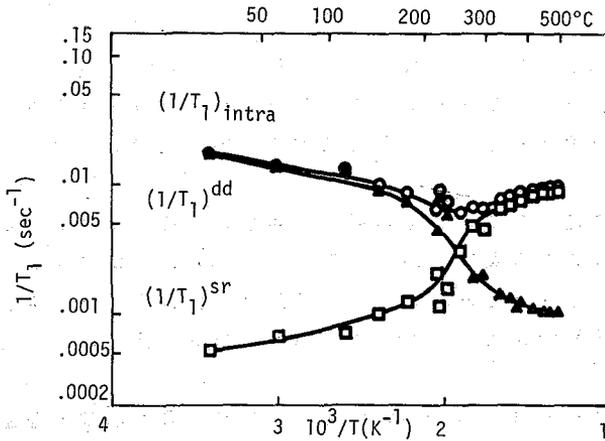


Fig. 8. Dipolar and spin-rotational relaxation rate for toluene.

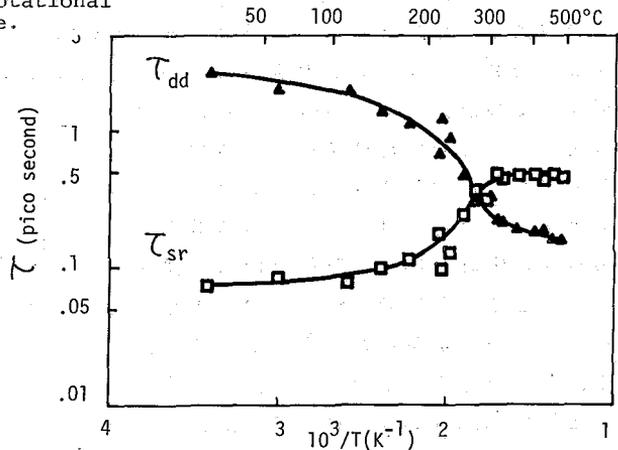


Fig. 9. Effective correlation times; spin-rotation (τ_{sr}) and reorientation (τ_d) for toluene.

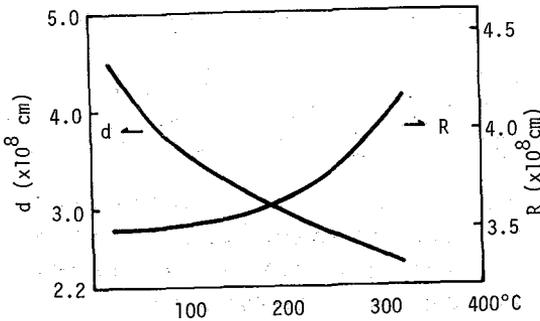


Fig. 10. The relation between the distance of closest approach (d) and molecular radius (R) vs temperature.

謝辞

本研究を行うあたり実験に協力して頂いた当研究室の山田英二君理学部化学科の下川健二君に感謝致します。

(東大応微研、日本電子*)[○]降旗一夫、瀬戸治男、大内宗城*、大岳望

はじめに

NMRによって複雑な天然物の構造解析を行なう場合の一つの問題点は、4級炭素やヘテロ原子の存在によって切断されたプロトンのスピン系を如何にして結合させていくかということであろう。

この問題は ^1H -NMRのNOE実験や ^{13}C -NMRによる long range selective proton decoupling (LSPD)¹⁾法によって解決されて来た。しかしLSPD法はプロトンの数が多い系ではシグナルが複雑に分裂するために、殆ど威力を発揮出来ないという欠点があった。

例えば図1のp-エチルフェノールの3位のプロトンを照射した場合、1位のフェノール炭素については三重線から一重線への変化が容易に認められるが(図1b)、7位のメチレン炭素では裾野に僅かな変化が認められるだけである。一般に天然有機化合物では入手し得る試料の量が限られ十分なS/Nと分解能が得られないことが多いので、図1bのような変化を識別することは殆ど不可能となる。

Baxによって発表された long range ^{13}C - ^1H J resolved 2D (LRJR)²⁾法は、任意のプロトンと炭素間の long range coupling のみを観測するもので、この問題を解決するための有力な手段である。図1cはH3(H5)とのスピン結合を観測したもので、C1とC7がスピン結合していることが容易にわかる。我々はこの方法を oxirapentyn の構造解析に適用し、その有効性を明らかにした。³⁾しかし、LRJR法では数Hz程度のスピン結合定数を観測するので展開時間を長く取らなければならないが、横緩和時間(T2)の速い分子量の大きな化合物では、シグナルの減衰のため観測が困難ないし不可能となる(図3参照)。さらに2次元展開を行なうために測定時間が長くかかるという欠点もある。この問題に対処するために、LRJR法よりも簡便な long range ^{13}C - ^1H J変調差スペクトル(LRJM D)法を考案した(図2)。

Long range ^{13}C - ^1H J M D法

原理はJ分解法と同じであるが、2次元展開をせずに展開時間を任意の値に固定して、照射磁場の on, off を交互に繰り返して、差を取りながら積算する。この場合照射したプロトンと遠距離スピン結合した炭

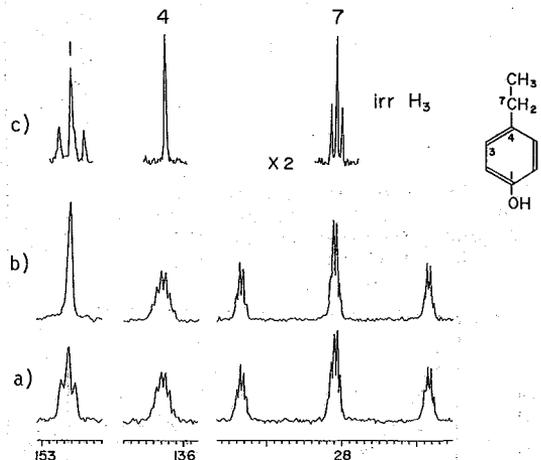


図1. p-エチルフェノールの ^{13}C -NMRスペクトル。
 (a) プロトン非照射、(b) LSPDスペクトル(H3を照射)、(c) LRJRスペクトル(H3を照射、スペクトルの横幅は2倍に拡大してある。)

ふりはた かずお、せと はるお、おおうち むねき、おおたけ のぼる

素のみがJ変調を受けるため、選択的に観測されるようになる。図4にp-エチルフェノールについての実験例を示す。

(a)は完全デカップルスベクトル、(b)はH3(H5)のみを照射したものであり、遠距離スピン結合をしているC1, C2, C6, C7のシグナルのみが選択的に観測される。

本方法に於いては、展開時間と照射出力が重要なパラメーターとなる。図5はメチン、メチレン、メチルのプロトンとの遠距離スピン結合のある炭素シグナルの展開時間による挙動の変化を示したものである。gate decoupling法を使用した場合、展開時間を1/Jに設定すると照射したプロトンとスピン結合している炭素シグナルは、それ以外の炭素シグナルに対し位相が180°反転し、T2によるシグナルの減衰を無視すると変化量が最大となる。LRJMDスペクトルを測定する場合、J変調によるシグナル強度の曲線を考慮すると、展開時間が100 msecの時は、スピン結合定数3Hz以上、200 msecの時は1.5Hz以上のシグナルが観測されると思われる。

このように遠距離スピン結合定数の小さなシグナルを観測するには、展開時間を長く設定すれば良いことになるが、実験的にはT2によるシグナルの減衰が無視出来ないで、適当な時点で妥協をはからねばならない。

つぎに照射磁場の強さの影響を検討したところ、LRJMD法は出力をLSPD法の数分の1に下げる事が可能であり、その結果、選択性がかなり高まる事が判明した。以上の結果を踏まえ、モネンシンについて実験を行なった(図6)。

展開時間はT2が短いことを考慮し、スピン結合定数が8Hzの場合に最大となる条件に設定した。H17を照射した場合、C18, C18-C H3にくわえてC15, C16のシグナルが観測され、C17-C18の系とC15が4級炭素によ

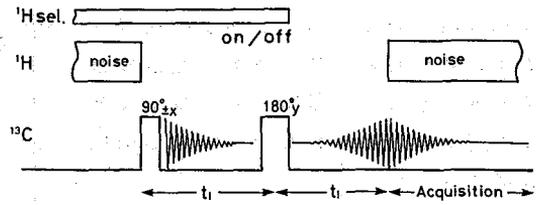


図2。LRJMD法のパルス系列。

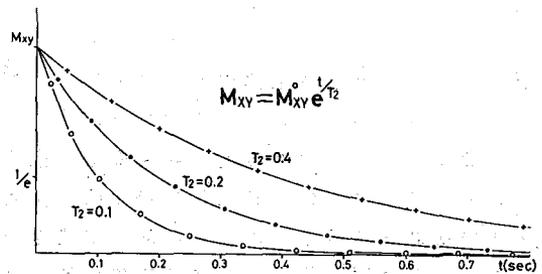


図3。T2によるXY面内の磁化成分の減衰。

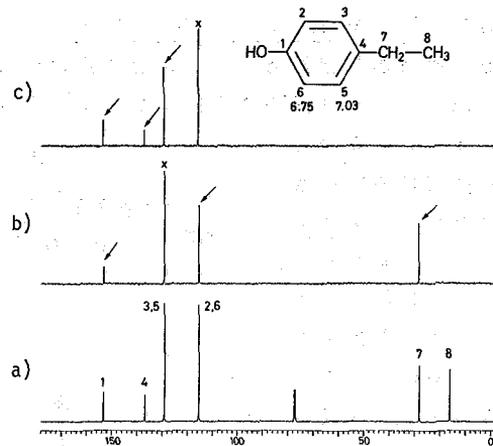


図4。p-エチルフェノールのLRJMDスペクトル。

(a)完全デカップル、(b)H3(H5)照射したものの、(c)H2(H6)を照射したものの、Xは照射したプロトンと直接結合している炭素によるシグナル。
t = 250 msecに設定した。

り結合していることが判明した。この場合 C 16 に結合しているエチル基の炭素シグナルには変化が認められず、完全な情報が得られたわけではないが、少なくとも 4 級炭素をばさんだ C 15, C 17 の関係が証明されている。

INEPT-LRJMD法

天然物を NMR によって構造研究する場合、試料の量が限られていることが多く、なるべく感度を高めて測定することが肝要である。そこで上記の方法に INEPT を組み合わせることを検討した。

この場合 INEPT の性質上、4 級炭素の観測は不可能となる。しかし、例えば上記モネンシンで述べたように、H 17 と C 15 の関係が明確になれば構造解析上必ずしも 4 級炭素シグナルが観測される必要はなく、従って感度向上を図るためには、ある種の情報を犠牲にしても有用な情報を能率よく得る実験条件の設定を考慮すべきであろう。図 7 にそのパルス系列を示す。

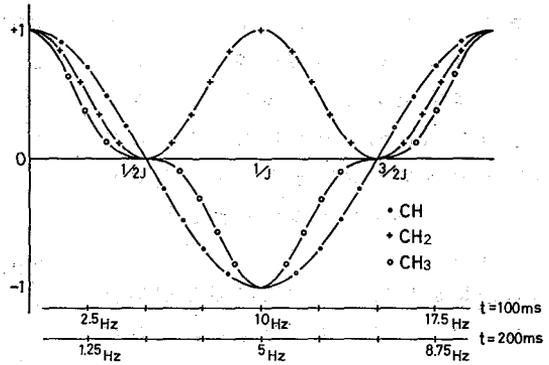


図 5. メチン、メチレン、メチルプロトンとスピン結合した炭素の展開時間によるシグナル強度の変化。

選択的プロトンデカップリングへの応用

上述の実験例は遠距離スピン結合を選択的にデカップリングしたものであるが、この方法は direct な C-H 間の選択的プロトンデカップリングにも応用可能である (Selective-JMD 法)。この場合

照射出力は通常を選択的デカップリングで必要とされるレベルの半分くらいに調節すればよい。また選択性を高めるために、FID の取得の間ノイズ照射に代えて選択的デカップリングを行なう。メチン又はメチルプロトンを照射するときは図 7 の t を $1/J$ に設定する。C-H 間の直接スピン結合定数は 125-160 Hz 程度であり、従って $t=6.25-8$ msec

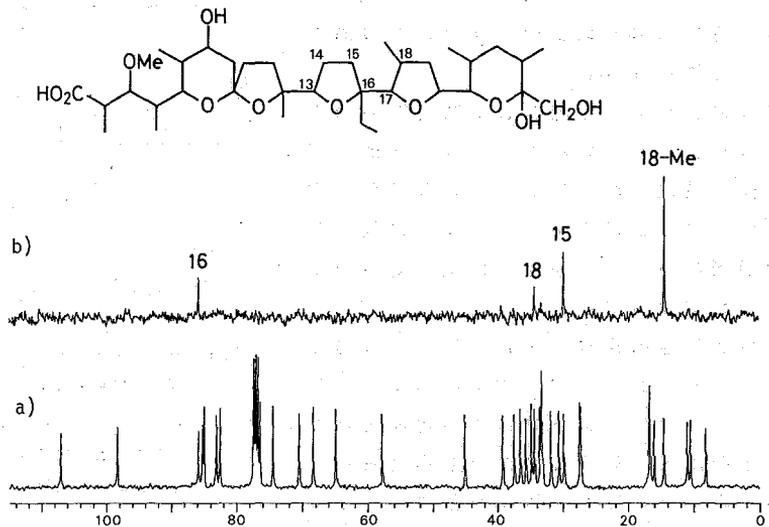


図 6. モネンシンの ^{13}C -NMR。(a) 完全デカップル (500 回積算)、(b) H 17 を照射した LRJMD スペクトル (7000 回、 $t=125$ msec に設定)。

となるからT2によるシグナルの減衰をほぼ無視できるので最適の条件の設定が可能となる。

プロトンシグナルの分離が良い場合、照射したプロトンと結合した炭素のみが一重線として観測されるから識別が極めて容易であり、通常の選択的デカップリング法よりも優れていることがわかる。さらにこの方法では照射出力をかなり下げることが可能であり、プロトンの分離が悪い場合にも良い結果が得られる(図8、4級炭素、溶媒シグナルが消失していることに注意)。

まとめ

以上説明したように、LRJMD法はヘテロ原子や4級炭素で切断されたプロトンのスピン系を結びつけることが出来る点で、更に非常に複雑なスピン系の化合物に対しても適用が可能であると言う点で優れた方法と見えよう。しかも測定

は簡単であり、データの解析も容易であるため、天然物の構造解析をすすめるにあたってきわめて実用的な方法になり得ると考えられる。ただし応用するにあたっては、サンプルのT2による測定の限界を考慮しなければならない。INEPTを併用したSelective JMD (SJMD)法は、微量の試料に対しての応用を意図して考案したものでありINEPTによる感度の向上、四級炭素や溶媒のシグナルの消失、更に照射磁場が及んだシグナルのみが観測されるためシグナルの帰属が非常に簡単になる、という点で従来のselective proton decoupling法よりも優れた方法と考えられる。

(1) H.Seto, T.Sasaki, H.Yonehara, J.Uzawa : Tetrahedron Lett. 1978, 923

(2) A.Bax, R.Freeman : J. Amer. Chem. Soc. 104, 1099 (1982)

(3) H.Seto, K.Furihata, N.Otake, S.Takahashi, M.Ohuchi : Tetrahedron Lett. 25, 337 (1984)

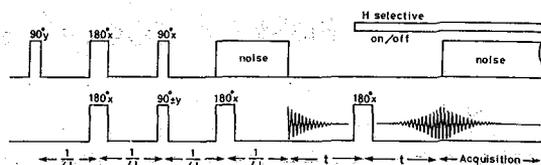


図7. INEPTとLRJMD法を組み合わせたパルス系列。Selective - JMD法はFIDの取得の間、選択的デカップリングを行なう。

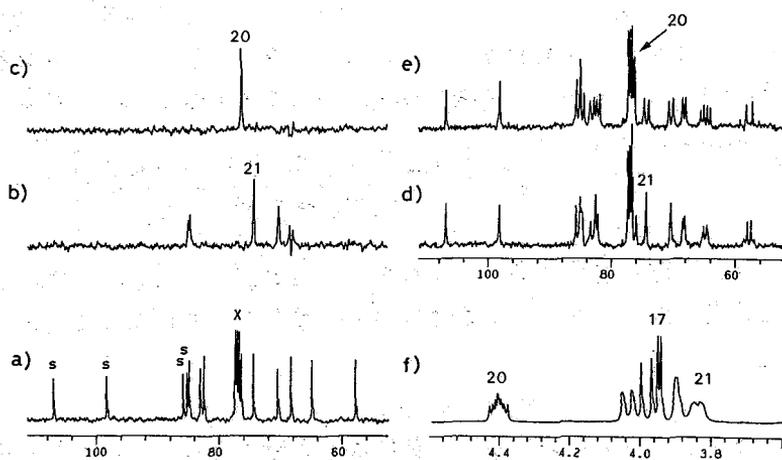


図8. モネンシンの¹³C-NMRスペクトル。(a)完全デカップル(Xは溶媒、Sは4級炭素によるシグナル)、(b) selective - JMD法、H21を照射、(c) H20を照射、(d) 選択的プロトンデカップリング、H21を照射、(e) H20を照射、(f) 400 MHz プロトンスペクトル。なお(b) - (e)の積算回数は同一である。

(和洋女子大・筑波大化*・日本電子)** ○矢野良子・上島晶智*・清水章三**

1. 序

常磁性イオンに溶媒和(配位)した溶媒分子がバルク溶媒と交換しているような系において溶媒分子のNMRを観測する時、常磁性イオンの存在に起因する緩和時間、 T_{2p} 、は次のように定義することができる¹⁾

$$T_{2p}^{-1} = P_m^{-1} (T_2^{-1} - T_1^{-1}) (1 - P_m) \quad (1)$$

ここで、溶液の半値幅を W 、純溶媒の半値幅を W_0 とすると、 $T_2 = (\pi W)^{-1}$ 、 $T_1 = (\pi W_0)^{-1}$ である。 P_m は溶媒和している溶媒分子のモル分率である。交換の過程において溶媒分子が常磁性イオン上にとどまっている時間を τ_m 、その状態における緩和時間を T_{2m} 、その状態における化学シフト(純溶媒を基準とする)を $\Delta\omega_m$ 、で表せば、 T_{2p} との間に次の関係がある¹⁾

$$T_{2p}^{-1} = \tau_m^{-1} \left[\frac{T_{2m}^{-2} + (T_{2m} \tau_m)^{-1} + \Delta\omega_m^2}{(T_{2m}^{-1} + \tau_m^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2} \right] \quad (2)$$

従って、交換が十分に遅い、すなわち、 $\Delta\omega_m^2 \gg T_{2m}^{-2}$ 、 τ_m^{-2} 、が成立するというような温度領域(ただし、 τ_m^{-2} 配位圏²⁾を考慮しなければならないほど)には交換は遅くない)では、

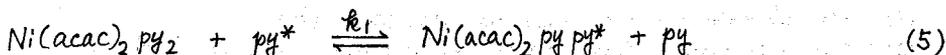
$$T_{2p}^{-1} = \tau_m^{-1} = k_1 \quad (3)$$

とみなすことができる。 k_1 は交換速度定数である。このような温度領域において、加圧下でのNMRを観測することにより k_1 の圧力効果を知ることができる。反応速度の圧力効果は遷移状態理論によって説明されるため、活性化体積、 ΔV^* 、が速度論的パラメータとして導入され次式が成立つ。(Pは圧力、Tは絶対温度)

$$(\partial \ln k_1 / \partial P)_T = -\Delta V^* / RT \quad (4)$$

ΔV^* は、原系と遷移状態との間での部分モル体積の差であって、正、負、どちらの値をもとることができる。すなわち、 $\Delta V^* < 0$ なら加圧により反応は加速され、 $\Delta V^* > 0$ なら減速されることを示す。

はじめに述べたような常磁性イオンに溶媒和した分子の交換反応研究のため高圧下でのNMRを観測した例はすでにかなりある^{2,3)} 同じ目的のもとに、渡者らは昨年の本討論会において、容易、かつ、安価に自作できる耐圧プローブについて報告した⁴⁾が、今回は感度を飛躍的に改善するための改良をして好結果を得たので、実際に¹⁴N-NMRにより、次の反応式で示されるピリジン分子の交換について応用した結果を併せて報告をする。



やのよしこ・うえじまあきのり・しみずしょうぞう

反応(5)において, $acac$ はアセチルアセトネートを, py はピリジンをあらわしている。

2. 実験

〔装置〕 JEOL FX-90Q FT-NMR装置の多核用チューナブルインサートと可換である銅-ベリリウム合金製耐圧インサートの基本構造は, すでに報告したもの⁴⁾と同じである。主な相違点のみを列挙すると次の通りである。

i) 内径を10 mmにした。(旧: 6 mm.) これは当初試料量の増大による感度の改善を意図したので, 実験可能な最大圧力を犠牲にして行った変更である。銅-ベリリウムのひっぱり強さを文献値(123 kg/mm²)の1/2以下(50 kg/mm²)と見つかった時, 計算上約1800気圧までの耐圧性能をもつ。

ii) コイルと耐圧容器内壁との間隙(Δr)を2.6 mmとした。(旧: 0.4 mm.) これにより, コイルから金属製耐圧容器への放電によるラジオ波のパワー低下を防ぐことができた。なお, 予め種々の径のコイルを用いて90パルスおよび S/N 比の比較を行った。(表1.)

iii) コイルからの導線を外部へ導く高圧シールド部ダブルコーンの材料をガラスファイバー入りポリイミド樹脂(三井石油化学キネル樹脂)に変更した。1650気圧, 30時間の試験に対し, ダブルコーンの破砕やひびわれはなく, 約30気圧の圧力低下が認められたのみであった。

この新しいインサートを用いた時の¹⁴N-NMR測定条件は図1中に示した。標準的な4000回の積算時間は約10分である。ロックは外部²D核を利用した。試料管は外径4.0 mm, 内径3.2 mmのピレックスガラス管である。この耐圧インサートのコイルの性能(インダクタンス: 1.35 μH / 1 MHz)はJEOLの多核用チューナブルインサートと類似であるので, ¹⁴N核以外のNMRの測定にも利用できる。

〔試料溶液の調製〕 ピリジンは予め水酸化カリウムで数日間乾燥したものを酸化バリウム共存下から2回, または3回蒸留して精製した。ビスアセチルアセトナトニッケル(II)錯体, $Ni(acac)_2$, は, 2水和物, $Ni(acac)_2(H_2O)_2$ を真空下, 100°Cで7時間乾燥して得た。窒素気流中で $Ni(acac)_2$ を精製ピリジンに溶解したのち, 脱気封管して保存し, 実験の毎に新たに開封して用いた。錯体濃度は0.0182 mol/lであった。

3. 結果と考察

表1を見ると, 耐圧容器内壁面からコイルまでの間隙が耐圧プローブの感度の改善へと

表1. コイルと耐圧容器内壁との間隙(Δr)の¹⁴N-NMR感度への影響(²⁵°C, ¹⁴Nピリジン)

コイル No.	コイル外径 (mm)	Δr (mm)	90パルス (μs)	S/N ^{*b} / vol.
1 ^{*a}	13	—	45	1
2	3.6	3.4	14	1.6
3	4.8	2.6	18	2
4	5.4	2.3	20	2
5	5.6	2.2	25	1
6	6.6	1.7	130	0.2
7 ^{*c}	5.4	0.4	350	0.1

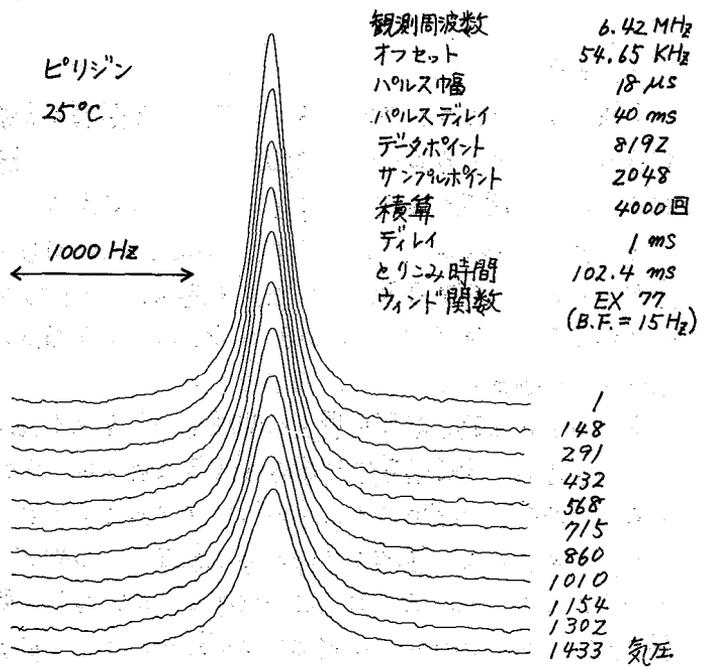
*a 90Q用通常多核インサート

*b 単位体積当り S/N 比の相対値

*c 旧耐圧プローブ

って重要な因子であることがよくわかる。しかし、 ΔV は一定程度以上の値であればそれ以上大きくする（コイル径を小さくする）必要はないので、あとはコイル内に納めることの可能な試料量をも勘案して最適値が定まったわけである。今回の耐圧インサートを用いて加圧下で得られた純ピリジンの ^{14}N -NMRスペクトルを図1に示した。ピリジンの $T_1 (= \pi^{-1} \omega_0^{-1})$ の圧力依存性は図2のようになった。61°Cと25°Cの結果はよく一致している。(6)式が成立²⁾ので、ピリジンの回転拡散の活性化体積、 ΔV^* 、が圧かに依存

図1. 高圧下での ^{14}N -NMR



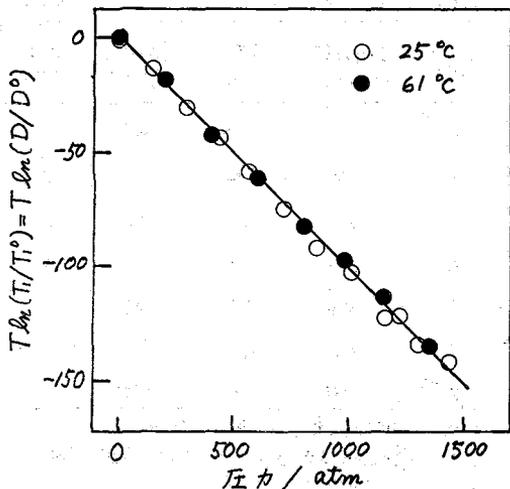
していないと仮定すると、図2の直線の傾きより ΔV^* を求めることができる。

$$(\partial \ln T_1 / \partial P)_T = (\partial \ln D / \partial P)_T = -\Delta V^* / RT \quad (6)$$

ここで、 D は回転拡散係数、 T_1^0 、および、 D^0 はそれぞれ圧力0における T_1 、および、 D である。ピリジンの回転拡散の ΔV^* については旧装置を用いてすでに約 $9 \text{ cm}^3/\text{mol}$ という値を報告したが、今回の結果からは、 $(8.2 \pm 0.4) \text{ cm}^3/\text{mol}$ となり値は精査された。

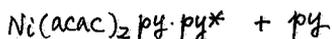
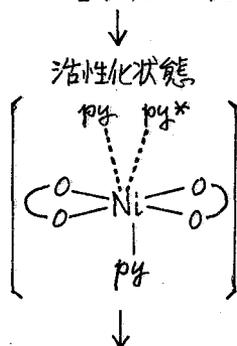
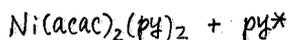
溶媒交換反応(5)の系の T_{2p} の圧力依存性を25°Cで観測した結果、 $\ln \kappa_1$ は圧力 P

図2. 純ピリジンの T_1 の圧力効果



の次式であらわされることがわかった。すなわち、実験を行った圧力範囲において、(4)式の ΔV^* は圧かに依存しない定数となった。なお、25°Cにおいて(3)式が成立していることは、常圧における T_{2p} の温度依存性の実験で確認されている⁵⁾。補外により圧力0における κ_1 を求めてそれを κ_1^0 とおくと、圧力 P に対する $T \ln(\kappa_1 / \kappa_1^0)$ のプロットは図3で示され、この直線の傾きから配位ピリジンの交換反応の ΔV^* として、 $+12.3 \text{ cm}^3/\text{mol}$ の値が求められた。 ΔV^* が、正の比較的大きい値をとったことは、ビスアセチルアセトナトニッケル(II)に付加配位して(

るピリジンは、明らかに解離的な活性化状態を経てバルクのピリジンと交換してゆくことを示している。その様子を模式的にあらわしてみると



となる。活性化状態では2つの Ni.....py 結合は、結合と呼べないほど弱い相互作用でしかなく、実質上配位していた py の解離とみなせれば活性化状態での部分モル体積は原系より増加することが説明される。解離的な活性化状態を経て反応(5)の交換がおきていることは、常圧における¹⁴N-NMR線幅の温度依存性の実験によりすでに示唆された結果と一致する。

この研究をすすめるにあたり、多くの実験上の便宜を計って下さった筑波大学化学系長 島34三教授に深謝いたします。

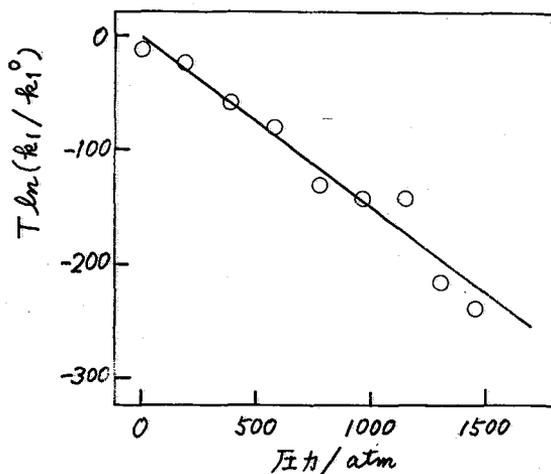
- 1) T.J. Swift, R.E. Connick: *J. Chem. Phys.*, **37**, 307(1962); **41**, 2553(1964)
- 2) Y. Yano, M.T. Fairhurst, T.W. Swaddle: *Inorg. Chem.*, **19**, 3267(1980)
- 3) M.J. Sisley, Y. Yano, T.W. Swaddle: *Inorg. Chem.* **21**, 1141(1982)
- A.E. Merbach: *Pure Appl. Chem.*, **54**, 1479(1983)

福富博他: 昭和58年度錯塩討論会(大阪) など

4) 矢野良子・伊藤聖子・上島晶智: 第22回NMR討論会(1983, 京都); 和洋女子大学紀要, **1983**

5) S. Ito, Y. Yano: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **57**(10), 印刷中(1984)

図3. 溶媒和ピリジンの交換速度の圧力効果



第 2 日

11 月 27 日 (火)

北大 低温科学研究所 花房尚史

はじめに：蛋白質の水和構造と、蛋白の構造、機能との関連が古くから種々論議されている。NMRによる水和構造の dynamics の研究には、色々な条件下での水和量の変動、 T_1 , $T_{1\rho}$ 等の緩和時間からの回転の分子相関時間 τ_c の測定と共に、蛋白分子表面に沿っての並進運動、即ち自己拡散係数の測定が必要となる。一般に溶液系でのDの測定には、パルス磁場勾配法が用いられるが、非常に拘束されてDの小さい系の場合、GやHを大きくするのは技術的に非常に困難である。一方、Dの小さい系でスピニング法により、ロッキングパワー $1H$ を変えて測定できる事が知られている。(1)

今回、いくつかの結晶状蛋白の水和水、蛋白溶液の不凍水、その他参考データとして、粘土鉱物の monomolinite について、スピニング法でDを測定した結果について報告する。

材料と方法：材料としては、2回結晶の各種蛋白、1% ovalbumin 水溶液、粘土鉱物の monomolinite を用いた。

$T_{1\rho}$ の測定は、JEOL FX100 FTNMR (スピニングユニット、温度可変装置付) を用いた。試料管は5mm, $\pi/2$ 幅は4 μ sec, ロッキングパワー $1H$ は0.1~10 gauss を用いた。

$$\ln\{A(G)/A(0)\} = \delta^2 \delta^2 G^2 D (\Delta - \delta/3) \quad (1)$$

$$\therefore D = -\ln\{A(G)/A(0)\} / \delta^2 \delta^2 G^2 (\Delta - 1/3 \delta) \quad (1')$$

$$d(1/T_{1\rho})/d(w_1^{1/2}) = -(\sqrt{2} \delta^4 h^2 N) / 80\pi D^{3/2} \quad (2)$$

$$\therefore D = (-\sqrt{2} \delta^4 h^2 N / 80\pi \alpha)^{2/3} \quad (2')$$

$$\text{rel. } \alpha = d(1/T_{1\rho})/d(w_1^{1/2})$$

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = \frac{3}{20} \frac{\delta^4 h^2}{r^6} \frac{3\tau_c}{1+4w_1^2\tau_c^2} \quad (3)$$

$$\therefore T_{1\rho} = \frac{4}{A} \tau_c w_1^2 + \frac{1}{A\tau_c^2} \quad (3')$$

$$\text{rel. } A = \frac{9\delta^4 h^2}{20 r^6}$$

同時に $T_{1\rho}$ の測定値から、(3) 式により、直接その温度での τ_c の値をもとめることができる。

結果と論議：図1は結晶卵アルブミンの表面の水和水の、 $1/T_{1\rho}$ の $w_1^{1/2}$ に対するプロットで、 $T_{1\rho}$ が長い成分と短い成分の2成分がえられるので、それに対応してDも2成分が得られる。この2成分間に大きい差はないが、いずれも 10^{-11} cm²/s ほどなふさなおふみ

のオーダーで、表1に示すように、水などの溶液系のDに比べると、結晶蛋白表面の水和水の並進運動は著しく拘束されている。

結晶状蛋白に対して、蛋白の溶液系の場合、卵アルブミン 1%溶液の、0℃以下でbulkの水を凍結させ、-5、-20、-35、-50℃の各温度について、不凍水のDを測定した。このなかで-20~-40℃の温度領域はよく知られるように、水和量が一定で、ほぼ一層水和に相当する水和量を示す領域である。

図2はこの-35℃での結果を示す。T1ρが3個の成分に分れるので、それに対応してDの値も3個得られる。-5℃では4個、-20℃で3個、-50℃では1個のDの値が求められる。このうち、-5℃、-20℃では多層水和で、-50℃では、一層水和の水和構造ですらも破壊されてゆく過程と考えられる(2)。-5℃-20℃では、Dの大きい成分はいずれも10⁻¹⁰のオーダーで、卵アルブミンのそれよりやや大きい値だが、-35、-50℃では、Dは10⁻¹¹のオーダーでこの温度では結晶状態の表面の水和水より更に拘束されていることが判る。

図3は、このDの測定と同時に得られる分子相関時間τcの値の、Arrhenius Plotである。D、τc共に、多層水和から一層水和に移る-20~-35℃の領域で非常に大きく変化する。このことは、一層目の水和構造と二層目以上のそれとで水分子の拘束の程度が非常に異なることを示している。しかし、分子相関時間の活性化エネルギーはこの領域で大きく変化するが、Dのそれは変らない。

図4は、これらの生体試料の対照として、粘土鉱物のmonmorillonite(含水率15%)について測定した結果である。T1ρに関しては一種類だが、W^{1/2}に対してプロットすると、明らかに2個の変曲点が在し、3個のDの成分があることがわかる。この鉱物は多層構造をもち、表面の結合水とともに、層間に、いはゆる層間水を持つことが知られている。この3個のDの値が、どの構造と対応しているのかは今後に残された問題である。この結合水のDの値は、結晶状蛋白より小さく、-35℃の蛋白溶液の水和水のそれとほぼ同じオーダーである。

表1は、これらの他、各種結晶蛋白についての測定結果と共に、溶液系について、パルス磁場勾配法で測定した結果をまとめて示す。doped waterというのは水和量の測定に用いる、24% LiCl + 0.001M MnCl₂である。

Dとτcが、数個の成分からなる場合は大きい成分についてだけ挙げてある。

勿論、溶液系に比べ、結晶状蛋白の水和水、蛋白溶液の不凍水、粘土鉱物の結合水などの並進運動は著しく束縛されているが、結晶蛋白の種類によるDの違いが、蛋白の安定性とどう関連するかが今後の問題である。

一般に、このようにrigidに束縛された系のDの測定では、パルス磁場勾配法はほとんど無力であり、例えば、多重パルスの応用でeffectiveな磁場強度Gを上げる方法が報告されているが、spoilingパルス幅を短くするのは技術的に非常に困難である。(3)又、このように一本のシグナルが多成分系からなるときは、磁場勾配

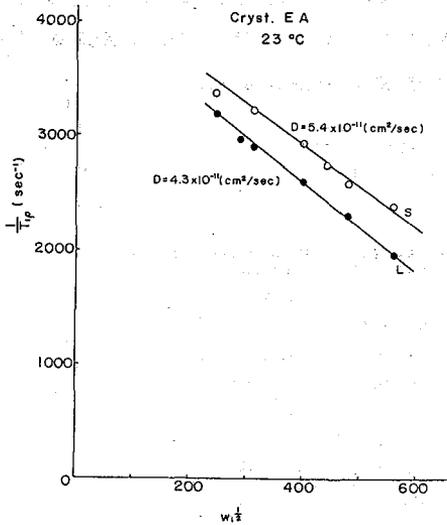


FIG. 1: 結晶 ovalbumin の自己拡散係数 室温

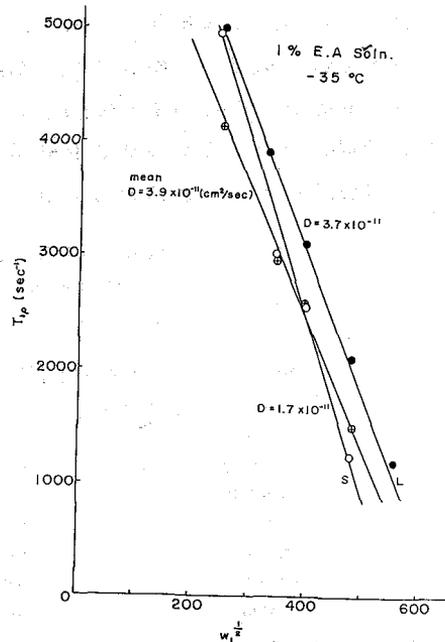


FIG. 2: 1% ovalbumin 溶液の不凍水の自己拡散係数 -35 °C

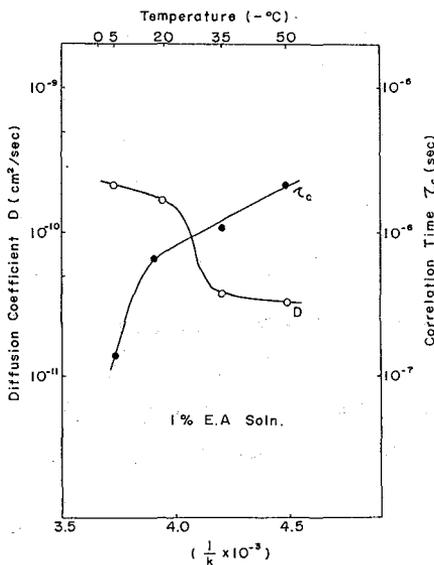


FIG. 3: 1% ovalbumin 不凍水の自己拡散係数 D と分子 相関時間 τ_c の温度による変化

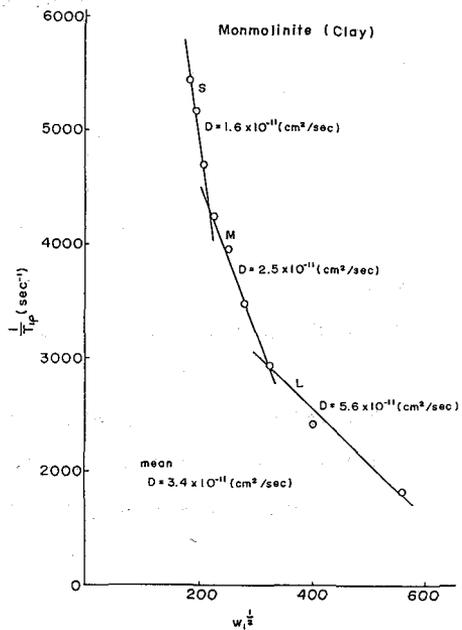


FIG. 4: 粘土鉱物 monomilinite の自己拡散係数 室温

法では、平均値として測定されるにすぎないが、スピロック法により、各々の成分について分離、測定が可能である。勿論、(3)式に見るように、この方法では、 $W_0 * \tau_c \gg 0$ という条件が必要なので、Dの大きな、溶液に近い系では誤差が大きいことと時間と手間がかかるという欠点はあるが、Dの非常に地裁い系では、スピン間距離Aと分子相関時間 τ_c が同時に求められるという点でも有効な方法である。

Diffusion Coefficient and some other Parameters of Hydration Water
of Some Proteins obtained by Spin Locking Method

Materials	Temperature(°C)	Spin-Spin distance(A)	T_2 (sec)	correlation time τ_c (sec)	diffusion Coefficient D (cm ² /sec)
H ₂ O*	R.T (23.2°C)	1.66	2.55	7×10^{-12}	2.45×10^{-5}
doped water*	"	"	1.9×10^{-3}	3.0×10^{-8}	4.0×10^{-6}
1% E-A soln*	"	1.70	2.46	8.1×10^{-11}	8.6×10^{-6}
Monomolinite(clay)	"	2.21	2.4×10^{-6}	1.9×10^{-6}	3.4×10^{-11}
cryst Mb	"	2.34	5.3×10^{-4}	1.2×10^{-6}	1.0×10^{-10}
cryst Hb	"	2.08	3.5×10^{-4}	8.9×10^{-7}	8.2×10^{-11}
cryst RNase	"	2.19	4.8×10^{-4}	8.8×10^{-7}	1.1×10^{-10}
cryst Lysozyme	"	1.94	1.9×10^{-4}	1.1×10^{-6}	4.2×10^{-11}
cryst EA	"	2.08	3.4×10^{-4}	9.4×10^{-7}	1.4×10^{-10}
1% E-A solun	-5	2.02	1.9×10^{-3}	1.6×10^{-7}	2.2×10^{-10}
	-20	2.24	7.0×10^{-4}	7.0×10^{-7}	1.8×10^{-10}
	-35	2.07	2.9×10^{-4}	1.1×10^{-6}	3.9×10^{-11}
	-50	2.18	1.7×10^{-4}	2.4×10^{-6}	3.5×10^{-11}

※文献記載値又はpulse-gradient method で測定

文献

- (1) Burnett, L. J. J. Chem. phys., 57, 1293, (1972)
- (2) 花房尚史 第2回 NMR 討論会予稿集 (1983)
- (3) Crawford, M. S. et al, J. Amer. oc., 80, 3728 (1980)

(名大理) 石田 祐之, ○池田 龍一, 中村 大雄

序

メチルアミンの硝酸塩, ヨウ化水素酸塩, 過塩素酸塩の結晶は室温以上で相転移(転移温度はそれぞれ352, 414, 451 K)を起して, 新しい結晶相に移ることは既に報告した。¹⁾この相についての¹H広幅NMRの測定結果から, 結晶中のメチルアンモニウム(MA)イオンは全体回転のほか自己拡散していることがわかった。このことから, この相はNMRのtime scaleでは, 液体とみなしうる興味ある状態になっていることが期待される。このように多原子からなるイオンが比較的低温で自己拡散する化合物はひじょうに少なく, その性質が比較的詳しく調べられている例は NH_4NO_3 のみである。²⁾これらのイオン結晶相は, 球状分子の結晶において時々見い出される柔軟性結晶相によく似ているが, 全体回転や自己拡散のような運動は, 分子やイオンが置かれている結晶場の影響を強く受けるためイオン性結晶と分子性結晶では違いがあることが予想される。本研究では, この新しい結晶相の性質を明らかにするために, MANO_3 について¹H NMRのほか示差熱分析(DTA), 走査カロリメトリー(DSC), X線構造解析, 電気伝導度測定を行なった。

実験

¹H広幅NMRは日本電子JNM-MW-40S分光器を用いて40 MHzで測定した。T₁の測定は自家製およびMatec社の送信機・受信機を用いて組み立てた分光器を使い16~42 MHzで測定した。180°-90°パルス法によりT₁を定めた。T₂測定にはHahnコスピネコー法を用いた。相転移温度の決定は自家製のDTA装置を用いて行なった。DSCの実験にはParkin-Elmer DSC-1B型熱量計を用いて転移のエンタルピー変化を測定した。校正には金属インジウムの融解熱を用いた。電気伝導度はHewlett-Packard 4261 LCRメーターを用い1 kHzで, 3端子法により測定した。粉末試料をディスク状に固めて銀ペーストで電極に密着させた。粉末法X線回折は理学電機製のワイゼンベルグカメラを用いて, 高温相で測定した。

試料はメチルアミンと硝酸の中和反応で合成し, エタノールから2回再結晶を行なった。部分重水素化合物 $\text{CH}_3\text{ND}_3\text{NO}_3$ ($\text{MANO}_3\text{-d}_3$)は MANO_3 を重水から再結晶を繰り返すことにより作成した。試料は強い吸湿性を示したので, 精製した試料は常に窒素ガス雰囲気に取り扱った。

結果

<DTA, DSC> 室温以上でのDTA測定によって, 2ヶ所の熱異常が検出された(表1)。低温側の異常は固相相転移, 高温側は融解である。DSCの実験によって求めた転移と融解のエンタルピー, エントロピー変化(ΔH , ΔS)を表1に示した。

いしだ ひろゆき, いけだ りゅういち, なかむら だいゆう

<粉末法X線回折> 高温相で測定した回折角度(2θ)を表2に示す。測定結果はCsCl型のbcc格子($a_0=4.91\text{\AA}$)で説明できた。この格子定数を用いて計算した2θ値とMiller指数を表2に示した。

<H NMR> 室温以上で測定した MANO_3 と $\text{MANO}_3\text{-d}_3$ の T_1 および高温相での T_2 を図1と図2に示す。室温以下での T_1 の温度変化は既に報告した³⁾ので省略した。DTAで求められた転移温度(T_{tr})、融解温度(T_m)において T_1 の不連続変化が観測された。広幅NMRの二次能率(M_2)は T_{tr} 以下で約 8G^2 であったが、 T_{tr} 以上では急に減少し 0.05G^2 以下となった。同様に T_2 も50ms以下の値が T_{tr} 以上で4.8msに増大した。

<電気伝導度> MANO_3 について測定した伝導度 σ の温度変化を図3に示す。 T_{tr} 直下で $\sigma=4\times 10^{-4}\text{Sm}^{-1}$ であったが、転移後は $5\times 10^{-2}\text{Sm}^{-1}$ まで増大した。

考 察

<高温相の構造> MANO_3 の高温相がCsCl型であるということから、陽イオン・陰イオンはともに動的に無秩序な配向を取っており、平均構造が球状であることが予測される。このことは、球状と仮定したときの陽・陰イオンの半径(それぞれ 2.4 と 1.89\AA)の和が格子定数から求めたイオン間距離 4.25\AA によく一致することによっても支持される。

固相転移のエントロピー変化 ΔS_{tr} は融解のエントロピー変化 ΔS_m に較べてむしろ大きくなった。この ΔS_m はハロゲン化アルカリや硝酸ナトリウムの ΔS_m 値($20\sim 30\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)よりかなり小さくなっている。このことから、 MANO_3 においては、両イオンは運動の自由度の大部分をこの転移で獲得するこがわかる。よく似た転移が NH_4NO_3 について報告されている。一般に柔靱性結晶においては、 ΔS_m が $20\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ 以下になるといわれており、これらの硝酸塩の高温相は分子性結晶の柔靱性結晶と同様な状態になっていると考えられる。

Table 1 Thermal Parameters of MANO_3

Trans. temp.	$\Delta H/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
352	9.9	28
384 (melting)	4.7	12

Table 2. Observed and calculated 2θ values of X-ray powder patterns at ca. 370K for MANO_3 having CsCl-type cubic structure.

2θ/degree		
h k l	Obsd	Calcd
1 0 0	18.0	18.1
1 1 0	25.7	25.7
2 0 0	36.5	36.5
2 1 1	45.0	45.3
3 1 0	59.8	59.7

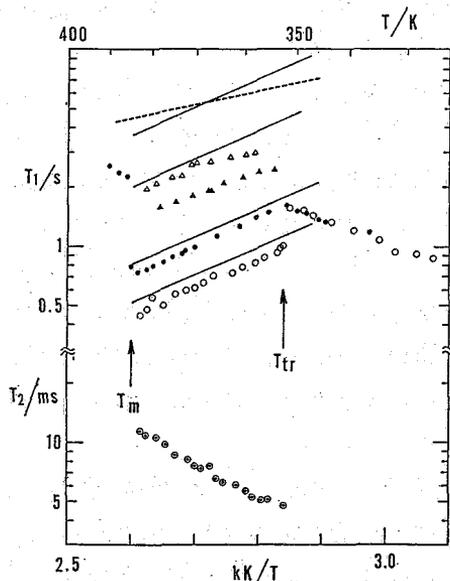


図1. MANO_3 の T_1 , T_2 の温度変化
 T_1 : \circ 16, \bullet 20, \blacktriangle 31.5, \square 42.7 MHz;
 T_2 : \circ 16 MHz; — T_{1a} --- T_{1b} .

<¹H NMR と分子運動> T_m以下での分子運動は、室温相での T₁ の温度変化および M₂ の測定値値 (8°) から考えて、MA⁺イオンの C-N 軸まわりの再配向運動のみである。T_m以上で M₂ が 0.05° 以下になることことから、高温相では陽イオンの等方的回転と併進拡散が起きていることは明らかで、上述の結晶構造についての考察と矛盾はない。高温相では log T₁ は T₁⁻¹ に対し直線的に減少している。また、T₁ (20MHz) / T₁ (16MHz) が一定 (=1.57 ± 0.02) で ω₀ の比の二乗に一致していることから、高温相の緩和機構は単一の運動による磁気双極子相互作用の平均化に帰属できる。また slow motional limit ω₀T ≫ 1 が成り立っていることを考慮すると、この運動を陽イオンの自己拡散と考えるのが妥当である。しかし高周波数 (31.5 と 42.7 MHz) で測定した T₁ については、16 MHz での T₁ との比が上述の関係を満足していない。このことは、他の緩和機構の存在を示唆している。そこで二種類の機構 a, b の存在を仮定して、a は ω₀ に依存し、b は依存しないとすると、T₁⁻¹ = T_{1a}⁻¹ + T_{1b}⁻¹ と近似的に書くことができる。実測の T₁ をこの式で分離して求めた T_{1a} と T_{1b} を図 1 に示した。得られた T_{1a} は陽イオンの拡散に帰属できる。一方 T_{1b} は温度上昇とともに減少する傾向を示した。T_{1b} の緩和機構としてはスピン回転緩和が考えられる。高温相での log T_{1a} と log T₂ の温度変化は符号が反対だがほぼ同じ傾きを示した。また同一温度での T_{1a} と T₂ の積は高温相全体にわたり一定値となった。BPP 理論

によると、自己拡散の相関時間を τ_D とすると、ω₀τ_D ≫ 1 のとき T_{1a} ∝ ω₀²τ_D, T₂ ∝ τ_D⁻¹ となるから、得られた T_{1a} と T₂ が同一緩和機構に起因していることがわかる。

自己拡散の最も単純化したモデルとして monovacancy 機構を考えることにする。Torrey の理論を発展させた Sholl の理論によると、⁴⁾ ω₀τ_D ≫ 1 の場合

$$T_{1a}^{-1} = 4\alpha\gamma^{-1}(S_0 - S_1/Z) \quad (1)$$

$$T_2^{-1} = 3\alpha\gamma g(0) \quad (2)$$

$$\therefore \alpha = \frac{1}{3} \gamma^2 h^2 a_0^{-3} \omega_0^{-1} I(I+1) C \quad (3)$$

$$\gamma = \frac{1}{2} \tau_D \omega_0 \quad (4)$$

(a₀: 格子定数, C: 陽イオンが占める単位副格子内の共鳴¹H核の数と格子点の数の比)

我々のモデルでは S₀ = 8.4019, S₁ = 11.5739, Z = 6, g(0) = 17.94, C = 6 であるから

$$T_{1a}^{-1} = 1.8944 \times 10^9 \omega_0^2 \tau_D^{-1} \quad (5)$$

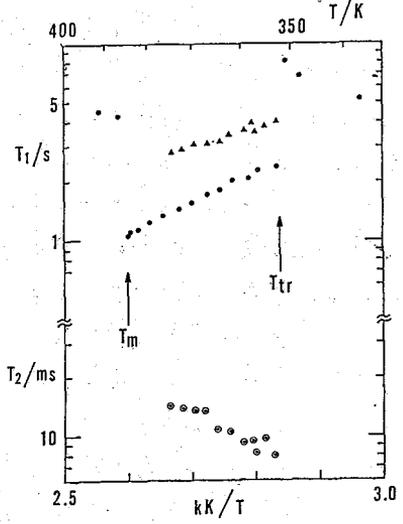


図 2. MANO₃-d₃ の T₁, T₂
T₁: ● 20MHz, ▲ 31.5MHz, ○ T₂

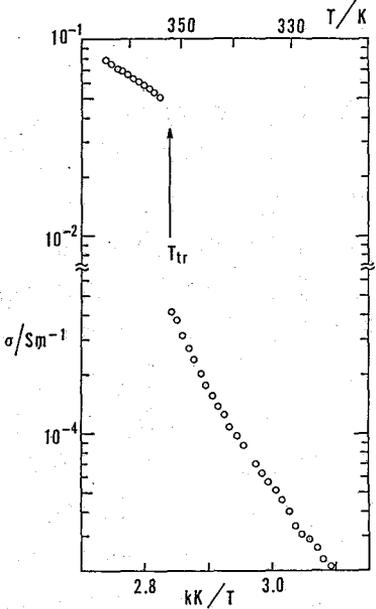


図 3. 電気伝導度の温度変化

$$\tau_2^{-1} = 9.8446 \times 10^8 \tau_D \quad (6)$$

となる。 $\omega_0 = 16 \text{ MHz}$ とすると (5), (6) 式より $(\tau_1 \tau_2)^{-1} = 185 \text{ s}^{-2}$ となり、同一周波数での実測値 $(\tau_1 \tau_2)^{-1} = 180 \pm 15 \text{ s}^{-2}$ とよく一致した。この拡散が Arrhenius 型の過程とすると

$$\tau_D = \tau_{D0} \exp(E_{AN}/RT) \quad (7)$$

実測の τ_1 から求めた拡散の活性化エネルギー E_{AN} は MANO_3 , $\text{MANO}_3\text{-d}_3$ をともに $29 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$ となった。この値は、 NH_4NO_3 の対応する結晶相において測定された NH_4^+ イオンの $E_{AN} = 51 \text{ kJ mol}^{-1}$ に比べてかなり小さい。この差は格子定数の違いによって説明できる。

(5) 式から求めた陽イオンの平均の併進 jump 時間 τ_D は τ_1 で $2.1 \times 10^{-7} \text{ s}$, τ_2 において $9.7 \times 10^{-8} \text{ s}$ となり、通常の液体と比較すると拡散はかなり遅い。Boden は分子性の柔粘性結晶について、融点での τ_D が化合物によらず大抵一定値を示すことを報告している。⁵⁾ 即ち bcc 結晶では $\tau_D = 1 \times 10^{-7} \text{ s}$, fcc では $5 \times 10^{-7} \text{ s}$ となっている。今回はイオン結晶であるが、分子性 bcc 結晶の値とよく一致しているのは興味ある結果である。

<電気伝導度> 高温相で測定された高い電気伝導度 (σ) はイオン伝導によるものと考えられる。結晶中を移動するイオンの拡散定数 D_σ は Nernst-Einstein の式で与えられる。

$$D_\sigma = kT\lambda\sigma / ze^2 N \quad (7)$$

(ze : 拡散イオンの電荷, N : 単位体積当りのイオン数, λ : 空間相関因子)

monovacancy 機構を仮定すると、高温相では $\lambda = 0.65311$ となる。測定した伝導度を (7) 式に代入し、求めた D_σ を図4に示す。

NMR から求めた τ_D から次式に従って拡散定数 D_N が得られる。

$$D_N = \langle r^2 \rangle / 6\tau_D \quad (8)$$

$\langle r^2 \rangle$ は平均二乗 jump 距離で、我々のモデルでは $\langle r^2 \rangle = a_0^2$ と近似できる。(8) 式を用いて求めた D_N も図4に直線を示した。

D_σ と D_N には数倍の違いがあるが、解析に用いた近似の荒さ、 σ の測定誤差も考慮すると、絶対値の詳しい比較は困難である。一方、温度勾配から求めた活性化エネルギーと比較すると $E_{AN} = 29 \text{ kJ mol}^{-1}$ に対し、 $E_{D_\sigma} = 45 \text{ kJ mol}^{-1}$ となり、大きく異なる。 NH_4NO_3 についても同様の差 ($E_{AN} = 51 \text{ kJ mol}^{-1}$, $E_{D_\sigma} = 67 \text{ kJ mol}^{-1}$) が報告されている。この不一致の原因としては、i) 陰イオンの拡散が無視できない、ii) monovacancy 機構のみでは、説明できない、などが予想される。

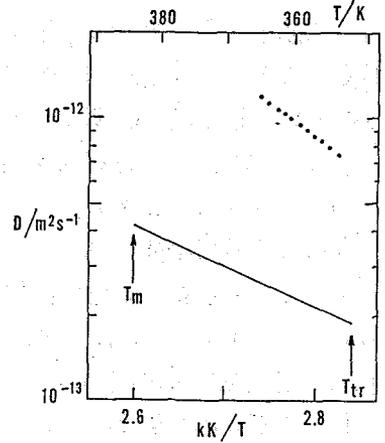


図4 拡散定数の温度変化
• D_σ , — D_N

(1) Chem. Lett., 1982, 1943; Phys. Stat. Sol., 90, K151 (1982), (2) Proc. Roy. Soc., A266, 329 (1962); Mol. Cryst., L, 377 (1966); J. Chem. Phys., 56, 2911 (1972) etc.
(3) Bull. Chem. Soc. Japan, 55, 3116 (1982), (4) J. Phys., 7, 3378 (1974); 8, 1737 (1975); 9, 43 (1976), (5) Chem. Phys. Lett., 46, 141 (1977).

〈序〉 金属イオンを含む水溶液中におけるイオンと水分子との相互作用について研究する時、溶液中で水分子がどのような運動を行っているかを知ることが重要である。現在までこの問題に関してNMRを用いた種々の研究が行われている。¹ 水分子の運動には、並進、回転、振動の各運動が考えられるが、この中でNMRの研究対象となるのは、並進と回転の運動である。一般に金属イオンを含む水溶液の多くに対して、溶液中で水和した水分子の回転拡散速度は、O-M軸(M:金属イオン)の回りの回転の方が、O-M軸自身の回転よりも速いとされている。² しかし、Alイオンに関してHertz等³は室温におけるAlCl₃水溶液を用いた¹Hのスピン-格子緩和時間、T₁の測定からAlイオンに水和した水分子の回転運動においては、これら二つの回転拡散速度はほとんど等しく、水和した水分子は等方的な回転運動を行っている結論している。ところでHertz等のT₁測定は25℃で行われているが、この条件下では水の¹Hシグナルはイオンに水和した水とFreeな水とが平均化されている上に、測定されたT₁は並進と回転の両方の運動の寄与を含んでいる。そのため彼等の結論はある程度のあいまいさを含んでいると思われる。

ところで、Alイオンを含む濃厚水溶液を低温にした時、水の¹H NMRシグナルはAlイオンに水和した成分と水和していない成分とに分離することが知られている。⁴ この現象は低い温度条件下ではAlイオンに水和した水分子とFreeな水分子の交換速度が遅くなるという理由から起こる。この条件下では水分子の並進運動速度は非常に遅くなるため、並進運動はスピン-格子緩和には寄与しない。その上分離したシグナルから、水和した水とFreeな水の緩和時間を個々に得ることが可能である。従ってこの低温という条件下で分離した2種類の水のシグナルのT₁を測定することによって、Al³⁺に水和した水分子とFreeな水分子の回転運動に関するより正確な情報を得ることができる。そこで我々はAl(ClO₄)₃水溶液を使い低温において水のT₁を測定し、水分子の回転運動について調べてみた。

〈実験〉 本実験に用いたAl(ClO₄)₃・6H₂Oは、市販の特級AlCl₃・6H₂Oから合成し、エタノールを溶媒として再結晶法によりFe(II)イオンが検出限界以下(5 ppm)になるまで精製した。我々はAlイオン濃度の異なる5種類の水溶液を用いてT₁の測定を行った。試料のAl濃度はキレート滴定により算出した。各試料におけるモル比[H₂O/Al]は16.1, 19.6, 23.5, 26.1, 31.5である。¹H NMRスペクトルは温度可変装置を付属したJEOL FX-200 FT NMR(¹H 200 MHz)を使用し、+10~-65℃

みうら こういち, はしもと きみお, ふくい ひろゆき

の温度範囲で5 mmφの試料管を用いて測定した。スピン-格子緩和時間, T_1 , は通常の Inversion Recovery 法により求めた。

(結果及び考察)

(A) 水和した水と水和していない水のプロトンのスピン-格子緩和時間の測定

既に述べたようにAl³⁺イオンを含む水溶液の温度を下げてゆくと, Al³⁺イオンに水和した水分子と水和していない水分子の間の交換速度が遅くなるために, その¹H NMR シグナルは2本に分離して観測される。この分離したシグナルの積分強度の比から, Al³⁺の水和数は6であることがわかった。この結果は Fratiello等⁴の低温における¹H NMR測定によるAl³⁺イオンの第一水和殻中の水和数と一致している。

我々はAl濃度の異なる5種類の水溶液を用いて, 水和した水とFreeな水の T_1 を温度を変えて測定した。Fig. 1は最もAl³⁺濃度の高い溶液と最も低い溶液の温度による T_1 の変化を表している。Fig. 1を見ると比較的高い温度においては, 水和した方とされていない方の T_1 は等しいことがわかる。しかし-20℃以下の温度領域では両者の T_1 の間に差が生じている。他の3種類の溶液についても同様の傾向が見られた。また両者の T_1 の差は低い温度において現れ, 特にAl³⁺濃度の低い試料程その差が大きくなった。これらの結果は, Al³⁺に水和している水分子の運動が低温において変化することを反映している。そこで我々は, 水和した水分子が異方的な回転運動を行うと仮定して, T_1 の測定結果の解析を試みた。

(B) 水和した水分子の異方性回転運動

水和した水分子と水和していない水分子の間の交換速度がラーモアの歳差速度に比べて非常に遅いという理由から, 本実験で求めた緩和速度, $1/T_1$, には, 並進運動の寄与は含まれていないと考えられる。また, 異なった水分子に属するプロトン間の距離は, 分子内のプロトン間の距離に比べて大きいから, 分子間の相互作用による T_1 への寄与は無視することができる。さらに, プロトン-カチオン (Al³⁺) やプロトン-アニオン (ClO₄⁻) の磁気双極子-双極子相互作用による寄与も無視することができる。従

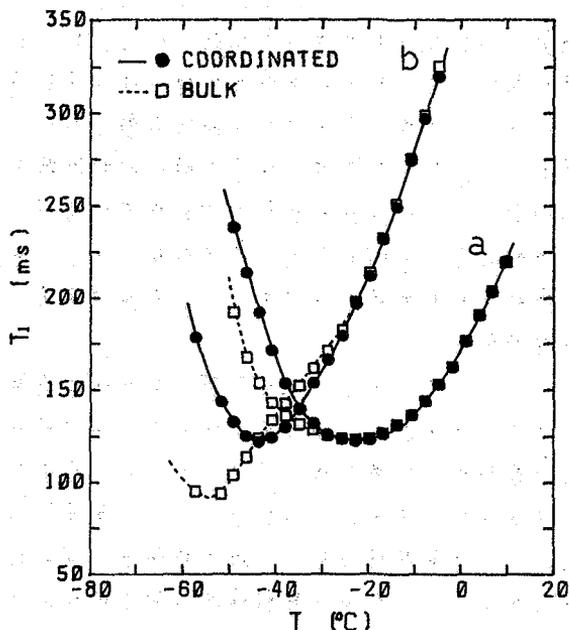


Figure 1. The ¹H-spin-lattice relaxation times, T_1 , as a function of temperature, T , at the highest (a) and lowest (b) aluminium concentrations. (a) The mole ratio of H₂O to Al is 16.1:1. (b) The mole ratio of H₂O to Al is 31.5:1.

って、我々が測定した条件下におけるプロトンの緩和速度は、回転運動を行っている単一の水分子のプロトン-プロトン双極子相互作用のみによって決まるであろう。

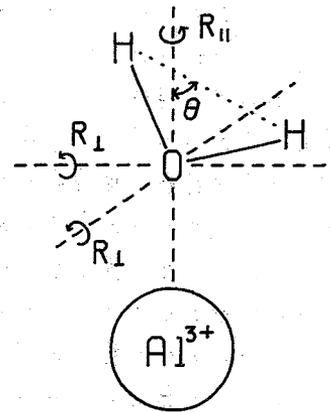
我々は、水和した水とFreeな水の T_1 の相違について説明するために次の4つの仮定を行った。

(i) 水和していないFreeな水分子の回転運動は等方的である。すなわち、Freeな水分子の運動は単一の回転拡散係数、 R 、で表すことのできる球対称的な回転運動として説明される。他方、水和した水分子の回転運動は異方的であり、この場合回転運動は2つの回転拡散係数で表すことのできる軸対称的な運動として説明される。ここで、対称軸の回りの回転拡散係数を R_{\parallel} 、そして対称軸に垂直な2つの軸の回りの拡散係数を R_{\perp} とし、この R_{\perp} と R_{\parallel} の比を回転の異方性を表すパラメーター、 σ 、と定義する。すなわち $\sigma = R_{\perp} / R_{\parallel}$ 。

(ii) R_{\parallel} は R に等しい。さらに、 $R_{\perp} \leq R_{\parallel}$ 、すなわち $\sigma \leq 1$ とする。

(iii) σ は温度と濃度の関数である。

(iv) 水和した水分子の回転対称軸とこの水分子のH-Hベクトルとのなす角度は常に一定である。この角度をFig. 2に示されているように θ で表す。また水和した水分子の回転対称軸は、 Al^{3+} と酸素原子を結ぶ結合軸と一致しているものとする。



この4つの仮定をもとに、我々は Al^{3+} に水和した水分子の回転運動を、Woessner⁵の楕円体回転における T_1 の式を用いて解析をしてみた。

Figure 2. The model used for the motion of the water molecules coordinated to the Al^{3+} ion.

Woessnerの理論によれば、異方的な回転運動を行っている分子中において相互作用している2つのプロトンに対するスピン-格子緩和時間、 T_1 (aniso), は R 、 σ 、 θ の関数として表される。ここで我々は解析のために、 T_1 の実験値から定まる $[T_1$ (coordinated) / T_1 (bulk)]として定義される coordination effect, すなわちC.E.というパラメーターを導入する。仮定(i)と仮定(ii)から $C.E. = T_1$ (aniso) / T_1 (iso)となる。従ってC.E.は2つの無次元パラメーター $x (= \omega_H / R_{\parallel})$ と σ 、そして角度 θ によって決定される。我々は温度と濃度の関数として T_1 を測定し、その結果をコンピュータシミュレーション法を用いて解析した。

まず最初に、水和していない水の T_1 の値から、すべての濃度と温度に対して x の値を求めた。次に我々は、角度 θ を決定した。我々の実験結果は、水和した水分子の運動は溶液の温度が下がったときに異方的になることを示している。この傾向は低い Al 濃度の場合に特に顕著である。さらに、低濃度、低温度において、 x の値に対してプロットされたC.E.の実測値は、 $\theta = 55^\circ$ 、 $\sigma = 0$ (完全な異方性運動)と仮定して計算され

たC.E.の理論曲線によってよく再現されることがわかった。この様子はFig. 3に示してある。従って我々は角度 θ として 55° を使用することにする。最後に各試料について測定されたC.E.と σ を変化させて計算されたC.E.とが一致するように異方性パラメーター、 σ 、を決定した。

各試料の温度に対する水和した水の σ の変化をFig. 4に示す。Fig. 4から、低いAl濃度においては、水和した水分子の σ の値は温度の低下に伴い急激に1(等方的回転)から0(完全に異方的な回転)に減少することがわかる。一方、高い濃度においては回転運動の異方性の度合はより緩やかに変化することがわかった。これらの結果は、塩濃度が高くなるにつれてその水和殻の構造がゆるくなることを示している。このことは、隣接する水和イオンの存在が水和殻の構造を乱すことから考えると考えられる。この水和殻構造の変化がAl-O軸自身の回転に対するポテンシャル障壁の高さを減らすことになるであろう。

References

- (1) H. G. Hertz, "Water", edited by F. Franks; Plenum Press: New York, 1973; Chap. 7.
- (2) H. G. Hertz, R. Tutsch, N. S. Bowman, J. Phys. Chem. **80**, 417 (1976).
- (3) H. G. Hertz, R. Tutsch, H. Versmold, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **75**, 1177 (1971).
- (4) A. Fratiello, R. E. Lee, V. M. Nishida, R. E. Schuster, J. Chem. Phys. **48**, 3705 (1968).
- (5) D. E. Woessner, J. Chem. Phys. **37**, 647 (1962).

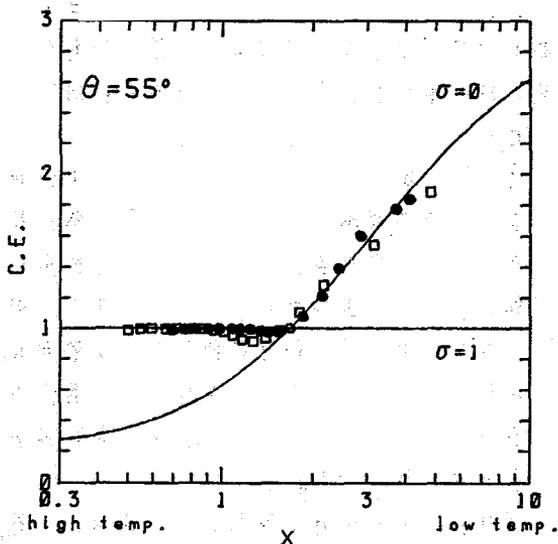


Figure 3. The observed C.E. values plotted against x at the low aluminium concentrations and the theoretical curves of C.E. vs. x calculated for $\sigma=0$ (completely anisotropic) and $\sigma=1$ (isotropic) in the condition of $\theta=55^\circ$. The molar ratios, H_2O/Al , are 26.1 (●) and 31.5 (□).

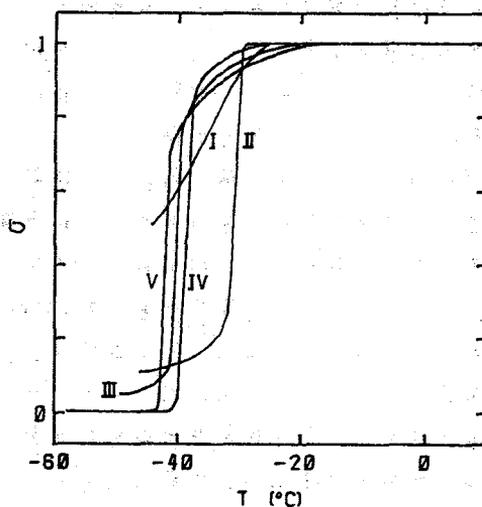


Figure 4. The variation of the anisotropy parameter, σ , as a function of temperature, T , at the various aluminium concentrations. The numbers from I to V represent the five different molar ratios, H_2O/Al ; I: 16.1, II: 19.6, III: 23.5, IV: 26.1, and V: 31.5.

(名工大) ○吉野明広, 吉田忠義, 高橋憲助

1. はじめに.

スピン格子緩和時間は、分子運動に対する種々の情報を与える。特に相関時間 τ_c は、分子運動の速度と直接表現しており、非常に興味深いものである。

相関時間には、自己拡散、回転、回転角運動量に関するものがあり、種々の実験によって分離することが可能である。¹⁾しかし、重水素核のように、スピンの $1/2$ より大きな核には、一つの利点がある。それは、核四極子相互作用による緩和機構のみが支配的であり、それによって、回転相関時間で τ_c が決定できることである。即ち、重水素核を例にとれば、スピンは 1 であり、磁気回転比が水素核に比して小さいため、 $^1\text{H}-^2\text{H}$ の双極子-双極子相互作用は、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ の約24分の1にしかならず、分子間相互作用は、ほとんど無視してもよい。

したがって、緩和機構は、以下のように記述される。²⁾

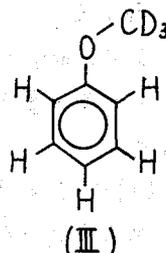
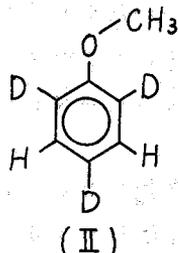
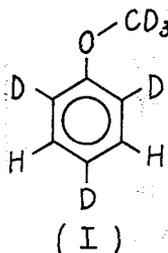
$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{\text{EXP}} = \frac{3}{8} \cdot \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) \cdot \left(\frac{e^2 q Q}{\hbar}\right)^2 \cdot \tau_c \text{-----}(1)$$

ここで、 $(e^2 q Q / \hbar)$ は、四極子結合定数を2 π 倍したものを表わし、 η は、非対称パラメータ、そして、 τ_c は、回転相関時間を表わしている。 $(e^2 q Q / \hbar)$ は、 NQR 、マイクロ波、液晶中における NMR の解析により求められるので、(1)式にその値を代入することにより、相関時間 τ_c が決定される。

一方、スピン格子緩和時間が、アレニウス型の温度依存性を示すと仮定し、以下の式に当てはめると、活性化エネルギー E_a が決定され、それは、(1)式によれば、そのまま τ_c の活性化エネルギーを表わすこととなる。

$$\ln T_1 = C - \frac{E_a}{RT} \text{-----}(2)$$

本研究では、(I)~(III)の重水素置換アニソールを合成し、その重水素核スピン-格子緩和時間(T_1)の温度依存性について、測定を行った。求められた τ_c については、前に報告した $^1\text{H}-NMR$ による測定結果とも比較検討する。³⁾



よしの あきひろ, よしだ ただよし, たかはし けんすけ

2. 実験

a) 重水素置換アニソールの合成

重水素置換アニソールは、予めフェニールの重水素置換をしておき、それを、ウィリアムソン法によりメチル化を行なって得た。重水素置換フェニールは、アルカリ共存下で、高温にて、水素-重水素交換を行なった。この操作は、重水素の割合が、99%程度になるまで行なった。この際、メタ位の水素は、重水素置換されないうまま残った。

メチル化には、ヨウ化メチルを使用した。(I)及び(II)の場合には、市販の CD_3I (重水素化率 99.5%)を使用した。これらの純度や、不純物の有無は、 1H , 2H , ^{13}C -NMRにて確認した。また蒸留は、常圧にて2回行なった。

b) 試料の調整と測定

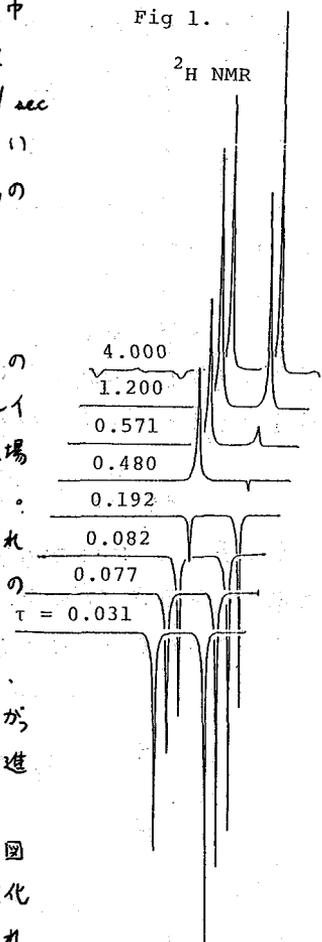
合成した試料は、さらに、真空中 (10^{-5} Torr) にて5回の凍結-脱気-融解を行ない、測定管に蒸留したのち、熔封した。

重水素核スピン格子緩和時間は、Varian XL-200分光計を、30.71 MHzにて操作し、 $180^\circ - \tau - 90^\circ$ の反転回復法によって、測定した。スペクトル中 500 Hz, データ点 2000点, アクジションタイム 2.0 sec, 積算回数 4回とした。また、デレイタイムは、測定する T_1 に応じて、2~11 sec ($\approx 5T_1$)とし、とも、8点以上を T_1 に応じて選んだ。 T_1 についての誤差は、 $\pm 2\%$ であった。温度可変装置は、分光計に付属のものを使用し、誤差は、 $\pm 0.1^\circ C$ であった。

3. 実験結果と考察

Fig 1 は、(I)の $30^\circ C$ における 2H -NMR チャートである。この場合には、 τ は、8点で行ない、 90° パルスは、 $24.2 \mu sec$, デレイタイムは、4.0 secとした。図の高磁場側は、メトキシ基、低磁場側は、フェニル基であり、オルソ位とパラ位は、重なっている。しかし、この緩和過程を見る限りでは、二種類の吸収は観測されず、 T_1 は単一の指数関数であるとして解析を行なった。この時の T_1 の値は、メトキシ、フェニルに対して、それぞれ、 $0.765 sec$, $0.393 sec$ であった。フェニル基を二種類とすることについて、 1H の場合にと、Cutnell⁵は、同様のことを述べている。⁴⁾したがって、今後は、メトキシ基とフェニル基の二種類として、議論を進めることにする。

Fig 2 は、(I)の T_1 の温度依存性を調べたものである。この図より、(2)式が成立することがわかる。(2)式により、求めた活性化エネルギー (E_a) は、メトキシ基、フェニル基に対して、それぞれ、



$13.7 \pm 0.2 \text{ KJ mol}^{-1}$, $13.5 \pm 0.2 \text{ KJ mol}^{-1}$ を与える。

^1H の場合, Cutnell は, フェニル基の二種類 (メタとオルト・パラ) に対し, 13 ± 1 , $15 \pm 1 \text{ KJ mol}^{-1}$ を提出している。⁴⁾ これらは, 実験誤差以内で一致している。

また, アニソールの粘度に対する温度依存性は, 以下の式で与えられている。⁵⁾

$$\log \eta' = -4.139 + \frac{636.8}{T} \quad (3)$$

ここで, η' は粘度を示す。これより, 活性化エネルギーを求めると, 12.2 KJ mol^{-1} となる。この値は, 水素核, 重水素核の T_1 の温度依存性に対して求めた値に近い。活性化エネルギーが近いということより, アニソールの場合, 粘度の温度依存性と, NMR より求めた相関時間の温度依存性とは, 同一の溶液内分子運動に基づく機構によるものと結論される。

次に, (1) 式より, 四極子結合定数に変化がないとすれば, τ_c は, $(1/T_1)_{\text{EXP}}$ と, 全くの比例関係にあることになる。いま, $\eta \approx 0$ と仮定し, (e^2qQ/h) を, 194 KHz (ベンゼンの値)⁶⁾ とすれば, τ_c は, 計算することができ, (1) 式より,

$$(\tau_c) = 1.79 \times 10^{-12} \cdot \left(\frac{1}{T_1} \right)_{\text{EXP}} \quad (4)$$

(4) 式より, 31.5°C における τ_c を計算すれば, メトキシ基及びフェニル基に対して, それぞれ, $2.40 \times 10^{-12} \text{ sec}$, $4.63 \times 10^{-12} \text{ sec}$ となる。

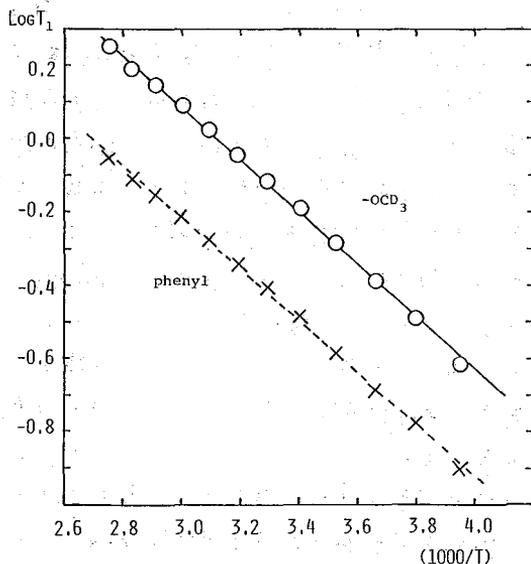
以前, 我々は, アニソールの ^1H -NMR の研究において, メチル基の回転相関時間を, $2.79 \times 10^{-12} \text{ sec}$ (31.5°C) と求めており, よく一致している。³⁾

また, Cutnell は, 分子の over-all の回転相関時間を, 10.9×10^{-12} (40°C)⁴⁾ としており, さらに, 誘電緩和による相関時間 9.4×10^{-12} (40°C) と比較している。この差については, 正確な, 四極子結合定数が必要となるので詳細な議論はできない。なぜならば, (e^2qQ/h) を, 165 KHz (トルエンのメチル基の値)⁷⁾ とすれば, 40°C の τ_c は, それぞれ, 2.80×10^{-12} , 5.54×10^{-12} へと, 変化してしまうからである。したがって, 現在のところは, オブザーブの一致を確認するのみである。しかし, 液晶中に溶かした (I)~(IV) の, NMR 解析は現在, 進行中であり, 正確な四極子結合定数は, 求められる予定である。

以上, 相関係数の値より, メトキシ基の運動は, フェニル基に対して, 二倍程度速いという結果が導き出され, これは, 定性的に, 納得できる値である。

加えて, (2) 式と, (4) 式より,

Fig 2. Deuteron relaxation times in [I]

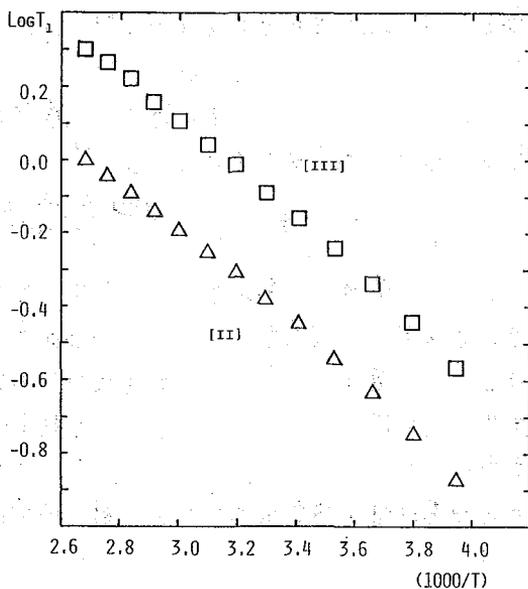


$$\ln(\tau_c) = C' + \frac{E_a}{RT} \text{-----(5)}$$

ここで、(2)式の E_a と、(4)式の E_a は、全く同一のものである。

Fig 3は、[II]及び[III]の T_1 の温度依存性を調べたものである。この図より、(2)式が成立することがわかる。(2)式により、求めた活性化エネルギー(E_a)は、[II],[III]に対して、それぞれ、 13.4 ± 0.3 , 13.2 ± 0.2 KJ mol^{-1} となる。しかし、[II],[III]は、[I]に比して、やや湾曲している。これは、分子内双極子-双極子相互作用が、わずかに寄与しているためと考えられる。特に、[II]の湾曲のほうが大きいのは、オルソ位に対して、メタ位とメキシコ位両方から寄与があるためである。しかし、これらの定量的な考察は、今後の課題として、ここでは、 E_a が、[I]のそれぞれの基にほぼ等しい値を出していることのみ述べておく。

Fig 3. Deuteron relaxation times in [II] and [III]



4. まとめ

- 重水素核を用いると、回転相関時間を求めることができる。
- 求めた回転相関時間は、 $^1\text{H-NMR}$ における分子内寄与による相関時間に一致する。
- 重水素核の T_1 の温度依存性は、アレニウス型となり活性化エネルギーを求めることができる。
- 求めた活性化エネルギーは、 $^1\text{H-NMR}$ における T_1 の活性化エネルギーに一致する。
- アニソールの場合、 T_1 の温度依存性は、粘度の温度依存性と一致する。

文献

- H. S. Sandhu, *J. Magn. Reson.* 34, 141, (1979)
- H. H. Mantsh, H. Saito, and I. C. P. Smith, *Progress in NMR Spectroscopy* 11, (4), 211, (1977).
- 第18回 NMR 討論会要旨集 p9-12, (1979), 吉野, 上野, 高橋.
- J. D. Cutnell, S. B. W. Roeder, S. L. Tignor, and R. S. Smith, *J. Chem. Phys.* 62, 879, (1975).
- Pechalin, L. I. and G. M. Panchenkov, *Zh. Fiz. khim.* 40, 1140 (1966); *C.A.* 65, 6328 (1966).
- W. J. Caspary, F. Millett, M. Reichbach and B. P. Darley, *J. Chem. Phys.* 51, 623 (1969).
- J. C. Rowell, W. D. Phillips, L. R. Melby and M. Panar, *J. Chem. Phys.* 43, 3442 (1965).

(阪大薬) 〇廉 貞祿, 高木 達也, 藤原 英明, 佐々木 嘉男

〔序〕 一般に溶媒効果は(1)式に示す各因子の和として表わすことができる。¹⁾

$$\sigma = \sigma_0 + \sigma_b + \sigma_a + \sigma_E + \sigma_w \quad (1)$$

ここに σ_0 は溶質の気相における化学シフトであり、 σ_b は体積磁化率の項、 σ_a は溶媒の異方性による寄与、又、 σ_E は極性の効果によるシフトであり、 σ_w は van der Waals 力による寄与を示す。演者らは溶媒シフトにおける van der Waals 効果を明らかにすることにより van der Waals 力は勿論他の因子による寄与をも解明する事が可能になると期待した。今回 Lennard-Jones ポテンシャルに準拠して溶媒効果の評価を試み、興味ある知見を得たので報告する。

〔方法〕 メタンのような等方性かつ無極性分子の溶媒効果の評価においては極性効果及び近接している溶媒による磁気異方性の効果は無視できるくらい小さい。²⁾このような場合溶媒シフトはほとんど σ_w に依存するものとして扱うことができる。

さて σ_w 、つまり van der Waals 力による効果は分散力による E_{dis} 、誘起力による E_{ind} 、及び配向力による E_{ori} に大別される。

E_{dis} は分子の極性の有無によらず London の式(2)で示される。

$$E_{dis} = -\frac{3}{2} \cdot \frac{\alpha_A \cdot \alpha_B}{r_{AB}^6} \cdot \frac{I_A \cdot I_B}{I_A + I_B} \quad (2)$$

又、 E_{ind} 、 E_{ori} は(3)、(4)式で示すことができる。

$$E_{ind} = -\frac{\alpha_A \cdot \mu_B^2 + \alpha_B \cdot \mu_A^2}{r_{AB}^6} \quad (3)$$

$$E_{ori} = -\frac{2}{3} \cdot \frac{\mu_A^2 \cdot \mu_B^2}{r_{AB}^6} \cdot \frac{1}{kT} \quad (4)$$

ただし(2)、(3)、(4)式のような取扱いは、反撥ポテンシャルの取扱いが容易ではない。こうした事情にかんがみ、演者らは溶液の計算機実験等で広く用いられている Lennard-Jones (6, 12) ポテンシャルによる扱いを検討した。

Lennard-Jones (6, 12) ポテンシャル中は(5)式で表現される。³⁾

$$\phi = 4\epsilon[(\sigma/r)^{12} - (\sigma/r)^6] \quad (5)$$

ここで ϵ は最安定状態のポテンシャル、 σ は分子の有効直径を表わし、 r は分子間距離である。 ϵ のときの r は $r = 2^{1/6} \sigma$ の関係になる。(5)式では無極性分子の相互作用時の $-4\epsilon(\sigma/r)^6$ が E_{dis} に相当し、又、この(5)式を有極性化合物にも適用するため修正式(6)が提出されている。Unlike pair の場合は E_{AB} は幾何平均を σ_{AB} は算術平均を

ヨウ ジョウロク、たかぎ たつや、ぶじわら ひてあぎ、ささき よしお

取ってそれぞれの値を求める。²⁾

$$\phi = 4\varepsilon^\circ [(\sigma^\circ/\gamma)^{12} - (\sigma^\circ/\gamma)^6] - \frac{1}{r^6} \frac{\mu_A^2 \cdot \mu_B^2}{3kT} + \alpha_B \mu_A^2 + \alpha_A \mu_B^2 \quad (6)$$

(6) 式で ε° , σ° はそれぞれ無極性成分にあたるものであり, 同一の式の中に Eori 及び Emd の各項を包含していることになる。

かつて F. H. A. Rummens⁵⁾ は溶媒シフトの解析に際し, Raynes et al²⁾ が提唱した統計力学的方法は広範囲にわたる溶質-溶媒系にかなり正確な溶媒シフトを予測することが可能ではあるが Lennard-Jones (6,12) ポテンシアルのパラメーターである溶質及び溶媒の σ 及び ε/k を測定あるいは推算するのが困難だと指摘している。

漢者らはこれまで測定された多数の σ 及び ε/k ^{3,4)} を検討した結果, これらはたしかに数値的変動がはげしいため信頼度に大きな危険を含むことを知ったが, ε/k 及び σ の測定値のうち 2nd virial 係数に Viscosity を加味したものと, 上記 (6) 式により求めた ε/k , σ° はいづれも熱力学第三法則エントロピー $S_{298}^\circ(g)$ と良好な相関関係を示すことを見出した。⁶⁾ (Fig. 1, Tab. I. 参照)。

$$\varepsilon/k = 7.136 \cdot S_{298}^\circ - 152.797 \quad (7)$$

(±0.735) (±53.155)

$$r=0.9374 \quad n=15 \quad SD=41.40 \quad F=94.26$$

$$\sigma^\circ = 1.831 \cdot S_{298}^\circ - 2.600 \quad (8)$$

(±0.243) (±1.005)

$$r=0.9018 \quad n=15 \quad SD=0.271 \quad F=56.59$$

これらの回帰式 (7) 及び (8) を用いて未決定の重要な有機溶媒の ε/k 又は σ を推算することが可能になる。その一例を Tab. II. に示す。

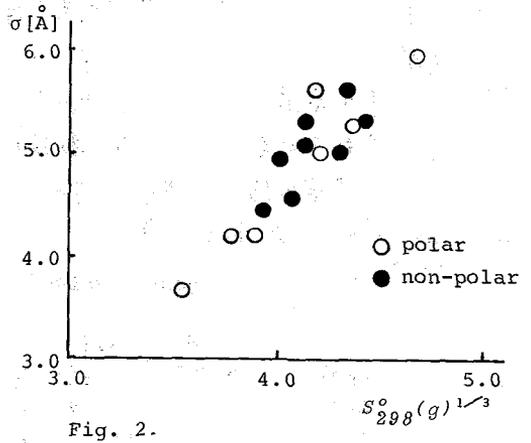
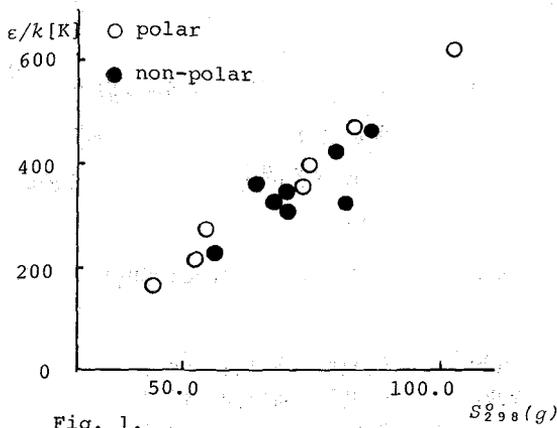
Tab. I.

	$\varepsilon/k^* [K]$	$\sigma^* [Å]$	S_{298}°		$\varepsilon^\circ/k [K]$	$\sigma^\circ [Å]$	S_{298}°
CH ₄	166.78	3.678	44.52	CHCl ₃	344.3	5.355	70.66
C ₂ H ₄	219.01	4.200	52.45	Et ₂ O	320.42	5.660	81.90
C ₂ H ₆	274.48	4.221	54.85	CH ₂ Cl ₂	362.3	4.921	64.59
CMe ₄	357.13	5.638	73.23	EtOH	327.8	4.575	67.54
n-C ₄ H ₁₀	398.92	5.003	74.12	MeCO ₂ Me	422.1	5.026	79.8
n-C ₅ H ₁₂	474.15	5.282	83.40	MeCO ₂ Et	463.7	5.314	86.70
n-C ₇ H ₁₆	621.23	5.715	102.27	MeCl	228.2	4.449	56.04
				Me ₂ CO	310.4	5.085	70.49

* Viscosity and 2nd virial coefficient

Tab. II. Estimated ε/k and σ by the Regression.

	ε/k	σ		ε/k	σ		ε/k	σ
C ₃ H ₈	307.55	4.745	MeOH	256.02	4.460	PhF	363.35	5.031
i-C ₄ H ₁₀	349.72	4.963	MeNO ₂	316.25	4.791	PhMe	394.11	5.179
n-C ₆ H ₁₄	509.64	5.693	MeCN	262.45	4.497	PhCl	381.83	5.121
n-C ₈ H ₁₈	643.22	6.216	MeBr	266.37	4.520	PhNO ₂	460.90	5.484
n-C ₉ H ₂₀	709.66	6.455	MeI	280.43	4.598	PhMe ₃	504.36	5.671



〔結果〕 Tab. I. 及び II. に記載した ϵ/k と σ を用いてまず無極性基質, 例えば CH_4 , $\text{cyclo-C}_6\text{H}_{12}$ のときの van der Waals 力の効果について検討を行ったところ, 1) E_{dis} は E_{ind} にくらべはるかに大きな値をとる。 CH_4 系で E_{dis} は 500 cal/mol 以上である。 2) E_{ind} は μ が大きいほど増大するが 100 cal/mol を超えない。しかし有極性の基質のときは溶媒の μ が大きいと E_{ori} は E_{dis} とほぼ同等の大きさに達することがわかった。又, 基質の有極性, 無極性を問わず E_{dis} は $S_{298}^{\circ}(g)$ に対し増加型, E_{ind} と E_{ori} は共に減少型の曲線を形成することがわかった。

〔考察〕

1) $\text{cyclo-C}_6\text{H}_{12}$ に対する溶媒効果の解析

上述の結果を参考として演者らは $\text{cyclo-C}_6\text{H}_{12}$ を基質にえらんだときの溶媒効果を取扱った。実験データは R. H. A. Rummens のものを用いた。 $\text{cyclo-C}_6\text{H}_{12}$ に対する E_{dis} の値は Tab. III. に示した。 Fig. 3 は溶媒シフトとの関係を plot したのである。

Tab. III.

	$-\sigma_m$	E_{dis}	E_{ind}
CHCl_3	0.250	1391.6	4.6
CCl_4	0.277	1454.5	0
CS_2	0.398	1192.3	0
CMe_4	0.187	1417.3	0
$\sigma\text{-C}_6\text{H}_{12}$	0.192	1414.7	0
$n\text{-C}_5\text{H}_{12}$	0.156	1633.0	0
$n\text{-C}_6\text{H}_{14}$	0.162	1693.0	0
$n\text{-C}_7\text{H}_{16}$	0.174	1869.2	0
$n\text{-C}_8\text{H}_{18}$	0.182	1902.0	0
Me_2CO	0.090	1321.3	39.8
MeNO_2	0.075	1333.7	69.1
MeCN	0.285	1215.0	109.2

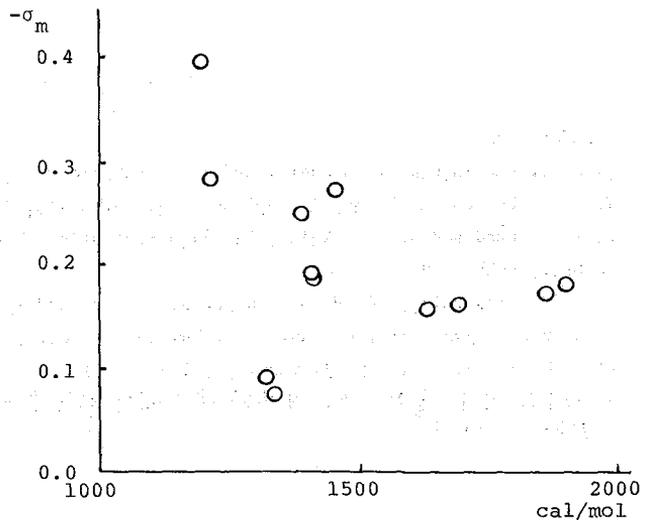


Fig. 3. Plot of $-\sigma_m$ vs. E_{dis}

Tab. III.において E_{dis} の値が大きくなるにもかかわらず $-\sigma_m$ への影響が小さい。

2) CH_4 に対する溶媒効果の解析

CH_4 に対する溶媒効果は古く Buckingham らによって実験データが得られており¹⁾ 文献に整理されている。⁵⁾ これらの実験値は有極性溶媒が多いことから E_{ind} の補正の必要なのは 1) の場合と同様である。Tab. IV. は前述の ϵ/k と σ を用いて計算した E_{dis} 及び E_{ind} と溶媒シフト値である。

Tab. IV. 1H gas-to-solvent Shift and E_{dis}, E_{ind} . (solute: CH_4)

	$-\sigma_m$	E_{dis}	E_{ind}		$-\sigma_m$	E_{dis}	E_{ind}
CMe_4	0.307	970.2	0	MeCN	0.416	831.7	64.7
$o-C_5H_{10}$	0.259	956.0	0	MeBr	0.355	816.2	12.7
$o-C_6H_{12}$	0.270	968.5	0	MeI	0.505	837.9	9.6
$n-C_6H_{14}$	0.275	1159.0	0	CH_2Cl_2	0.398	977.2	7.1
Et_2O	0.267	919.0	2.4	CH_2Br_2	0.523	956.8	6.0
Et_3N	0.290	1191.6	1.1	CH_2I_2	0.769	993.4	3.2
$MeCO_2Et$	0.254	1054.8	8.1	CH_2ClBr	0.486	942.9	8.3
Me_2CO	0.209	904.5	22.0	$CHCl_3$	0.407	952.7	2.5
$MeNO_2$	0.241	913.0	39.2	$CHBr_3$	0.646	1041.1	0.8
$EtNO_2$	0.213	1007.6	33.5				

〔結論〕 演者らの今回の溶媒シフトの評価はいづれも Lennard-Jones (6,12) ポテンシャルの修正により得られたパラメーターによるものであるが、1) 無極性基質のときは分散力による E_{dis} が圧倒的に大きいし、誘起力による E_{ind} はあまり重要ではない。2) 有極性の基質のときは分散力による E_{dis} が大きい、双極子モーメントの大きい基質のときは配向力による E_{ori} が大きくなり、 E_{dis} に匹敵する程度にまで増大する。但しこのことは双極子モーメントの大きい置換基群 — $NO_2, CN, COMe$ 等 — にかざられることがわかった。

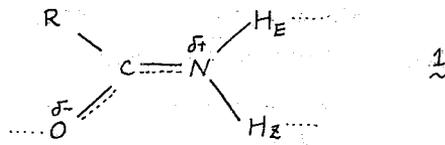
References

- 1) A. D. Buckingham, T. Schaefer and W. G. Schneider, J. Chem. Phys. **32**, 1227 (1960).
- 2) W. T. Raynes, A. D. Buckingham and H. J. Bernstein, J. Chem. Phys. **36**, 3481 (1962).
- 3) T. M. Read and K. F. Gubbins, "Applied Statistical Mechanics," McGraw-Hill Kogakusha, Ltd., Tokyo, 1973.
- 4) J. O. Hirshfelder, C. F. Curtis and R. B. Bird, "Molecular Theory of Gases and Liquids," John Wiley & Sons, Inc., New York, 1964.
- 5) F. H. A. Rummens, Can. J. Chem. **54**, 254 (1976).
- 6) 佐々木, 高木, 藤原, 第15回中部化学関係学協会支部連合秋季大会要旨集, P378 (1984).

アセトアミド-フッ素間の分子間水素交換の
NMRによる解析
(国際基督教大学) 梅本公子

アミド類は、ペプチドやタンパク質などの分子構造との関連から、NMRの分野でも多くの研究がなされている。特にアミドのN-Hプロトンは、酸や塩基の存在で交換を起すことはよく知られている。

一方、アミド類はそのC-N結合が二重結合性を持っていることから、そのまわりの内部回転のエネルギー障壁が高く、回転速度が丁度NMRによる測定に適した範囲にある為、動的NMRでもよくとり上げられてきた。その際、チー、又はチニアミドでは、N-Hプロトンが溶媒などと水素結合することにより、極性の大きな平面構造¹



が安定化することから、極性溶媒中、あるいは塩基の存在下で内部回転障壁が高くなる傾向が見られる。¹⁾ 実際、Et₄NBrとして臭素イオンをアセトアミドのDMSO溶液に添加すると、回転の活性化エネルギーが数KJmol⁻¹増加するのが観測された。²⁾ その際、わずかにではあるが、H_Zに較べH_Eが低磁場にシフトし、H_Eプロトンが優先的にBr⁻と水素結合を形成して、極性構造が安定化していることが窺える。

更に、ab initio計算によれば、アミド分子とF⁻イオンの間には非常に強い水素結合が形成されるという結果が発表されている。³⁾ 特に、ホルムアミドやアセトアミドなどチーアミド-フッ素間の水素結合は、[H-F...H]⁻に次いで二番目に大きなエネルギー、147~148 KJmol⁻¹を持つことが予想されている。この様に強い水素結合が形成された場合、分子内部回転障壁にどの程度の効果が見られるか。Emsleyらは、¹⁴N-ホルムアミドのN-HプロトンNMRのプロードな二重線が、F⁻の添加により一重線になったのを観測し、これをC-N結合の二重性が低下して自由回転が始まった為と解釈した。³⁾ しかしこの解釈では、水素結合による分子の構造の安定化という考え方に矛盾する。演者は¹⁵N-アセトアミドを用いて測定を行なったところ、アセトアミド...F⁻は安定な水素結合による会合体として存在せず、F⁻を融媒として分子間水素交換を行なっていると考えられる結果を得たので報告する。

(実験)

フッ素塩としては、四エチルアンモニウムフロライド水和物を、乾燥アセトニトリル中から再結晶をくり返し、最後に真空乾燥したものを用いた。しかし、水和物でも動的にははるめときみに

同様の効果を与える。溶媒としては、常法で精製したDMSO-d₆とアセトトリルを用いた。TMSを添加し、溶液の粘性の効果や磁場不均一性をアエックとした。¹⁵N-アミドは減圧下で乾燥して用いた。

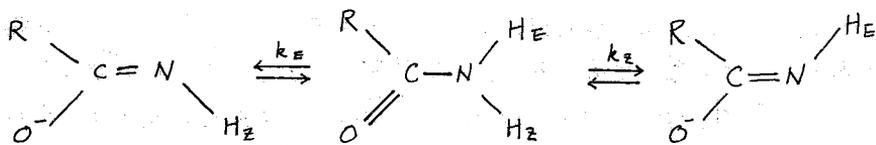
NMR測定は主として日立-R42(90MHz)を用いた。分子内回転によるアミドN-Hプロトンのスペクトル線型解析は、Birschiら⁶⁾によるDNMR3を用いた。シミュレーションにはE.C.U計算センターのVAX-11を用いて行った。

(結果と考察)

¹⁵N-アミド溶液に、四エチルアンモニウムフロライドを極く少量添加するだけでFig.1のように2組の多重線、特にHEがブロードとなり、更に添加すると¹⁵N核とのカップリングが消えて、1本のブロードな山となる。その際全体にわがかに高磁場シフトするのが見られる。

もしこの変化がC-N結合のまわりの分子内回転によるならば、回転が速くなるとHEとH₂のシフト差は消えても、¹⁵N-H間のカップリング(約88Hz)は残るから、可変の二重線になるはずである。この様に分子内回転ではこのスペクトル変化を説明できず、分子間水素交換の起きていると考へなければならぬ。

Perrinら⁴⁾は、アミド類のプロトン交換を、水やエチレングリコールを溶媒とし、pHを変えて、saturation-transfer法や、NMR線型解析で測定している。触媒が酸である場合は、N-protonation, イミド型酸、あるいはその双方を含むメカニズムが想定されているのに対し、塩基触媒によるイミドのアミドの交換では、イミドアニオンを生成するSchemeが考へられている。



Perrinらは、プロトン受容体として溶媒が交換に関与し、アミドの濃度による差異は見られなかったとしている。本研究の場合、Fは水やエチレングリコールよりも強い塩基であり、またFの濃度による変化(Fの濃度が低い領域で)が大きいことが見て、Fがプロトン受容体の役目を果たしていることが考へられる。もしFのみが塩基として働くと考えると、反応速度としては、試算の段階ではあるが、10²~5x10⁴sec⁻¹位が必要となる。しかし、フッ素イオンが周囲の溶媒分子のプロトンを引きつけて極性化し、あるいはイミドアニオン自身が強力な塩基として働くことも考へられる。

フッ素の作用はイミドアニオンを介したプロトン交換にとどまらず、高温では(60℃以上)アミドに不可逆的な反応が起ることを観測した。反応は、系に水が含まれている場合には比較的軽二りにくいことから、この様な系ではフッ素は水合イオンとして存在し、アミドに対する塩基としての力が緩和されているものと思われる。

Et₄NF/アセトアミドモル比

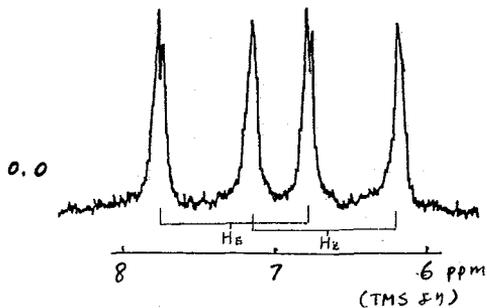
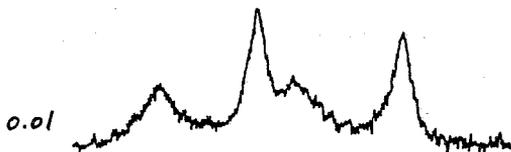
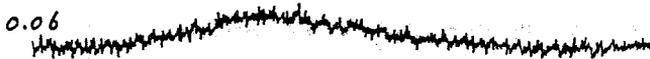
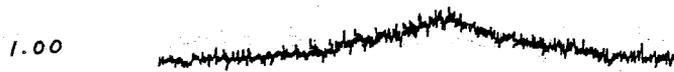
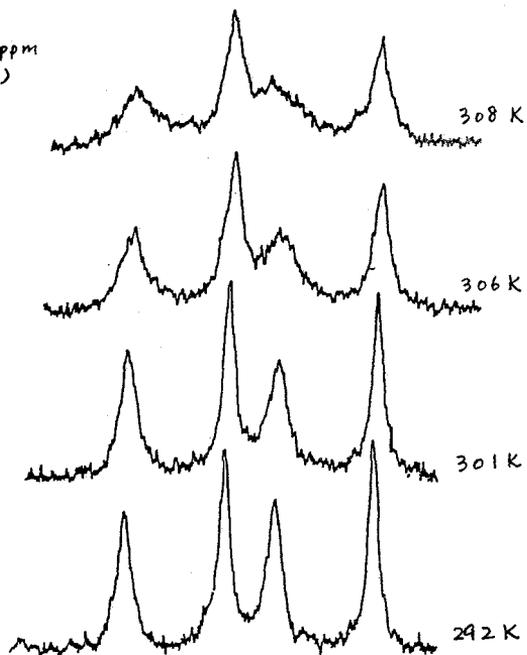


Fig. I フッ素イオン濃度によるスペクトル変化.
(アセトアミド濃度は DMSO-d₆中 0.76 M)

Fig. II 温度によるスペクトル変化 (低温部)



一般にアセトアミドの場合、HEの方がH₂よりも酸性の性質が強く、k_Eはk_Hに軽べ、
7.9倍(溶媒H₂O)から2.6倍(溶媒エタレングリコール)速いことが報告されている。⁴⁾⁵⁾
Fig. IおよびIIにおいて、HEのセークが「ブロード」に広まっている。線中から計算では
k_E/k_Hは2.2倍と推定されている(DMSO中)。

(文献)

- 1) K. Umemoto and K. Ouchi, *Org. Magn. Reson.* 15 13 (1981)
- 2) T. Isaseri and K. Umemoto, unpublished results
- 3) J. Emsley et al., *J. Am. Chem. Soc.* 103 24 (1981)
- 4) C. L. Perrin et al., *J. Am. Chem. Soc.* 103 4691 (1981)
- 5) M. Nee et al., *Org. Magn. Reson.* 18 125 (1982)
- 6) D. A. Kleier and G. Binsch, *QCPE* 165 (1970)

国際基督教大⁰ 吉田信行, 滝沢美恵子, 松田恵子, 高橋詢
東北大非水研 池上恒男

酸・塩基二成分系における酸や塩基の状態を¹H NMRスペクトルから観察する試みは数多く行なわれており、特にカルボン酸と有機溶媒の組み合わせについては、1950年代から70年代にかけて報告が殆んど出尽してしまっただけである。しかしながら、初期の頃のカルボン酸の水酸基プロトンの希釈シフト曲線には、周知のとおり、溶媒に含まれている不純物としての水の影響を受けて、十分に乾燥した溶媒系において測定された希釈シフト曲線のパターンとは著しく異なるパターンを示しているものが多い。図1に十分に乾燥した酢酸といろいろな有機溶媒との二成分系における水酸基プロトンの希釈シフト曲線を示した¹。これらの希釈シフト曲線のパターンは定性的には、酢酸の中、高濃度領域では、酢酸の Polymer が希釈によりこわされて、cyclic dimer, monomer が生ずる過程及び monomer や polymer の末端にある free の OH と溶媒との水素結合による complex 生成の割合が希釈によって変化している様子を反映している、酢酸の低濃度領域においては、希釈により、酢酸の monomer 化及び monomer と溶媒との水素結合 complex の形成が進行している様子を反映していると説明される。

定量的にはいくつかのモデルが提唱されているが、図1に示した全てのパターンを満足に再現できるモデルは現在のところ完成していない。図1の酢酸・シクロヘキサン系のようなパターンは次のようなモデル計算によって化学平衡論的に再現できる。この二成分系中での酢酸の存在状態を

monomer, cyclic dimer, linear polymer (n>1) であると仮定すると、次の平衡式を考えることができる。linear trimer 以上

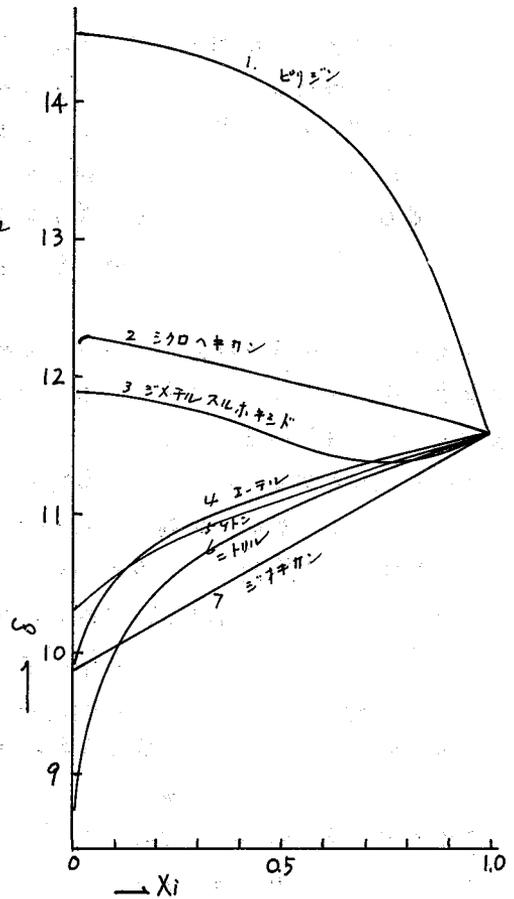
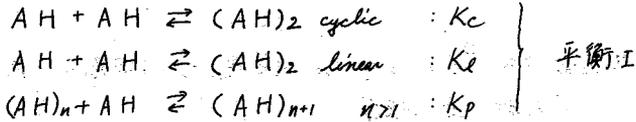


図1. 酢酸のOHプロトンの有機溶媒による希釈シフト曲線のパターン¹.

よしたのひゆき、たまごめ、みよこ、まつだけりこ、たかはしまこと、ひけのうえつねお

の polymer の生成する平衡の平衡定数は一定であると仮定する。



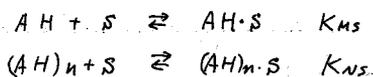
一方水酸基プロトンは monomer, linear polymer の終端にある free のプロトン (E), cyclic dimer を形成しているプロトン (C); linear polymer の水素結合ブリッジを形成しているプロトン (I) の3種類に分類し、それぞれが固有の chemical shift の値 ($\delta_E, \delta_C, \delta_I$) をもつものとする。そうすると、各平衡定数と $\delta_E, \delta_I, \delta_C$ を最小二乗法によって計算し、実測曲線とよく再現する計算曲線を得られる。

比較的強い塩基との二成分系において現われる図1の1のパターンについては、上の平衡に酸分子のうち終端に free の OH をもつ分子種と溶媒が水素結合 Complex を形成する平衡を加えたモデルによって、かなりよく実測曲線と再現する計算曲線を得ることが出来る。3~6のパターンに於いては、上述のモデルではなく、Complex を作っている酸は dimer として存在し、溶媒とは2:1 又は1:1の Complex を形成するという、より単純なモデルを用いて実測曲線と再現している。7のパターンについては検討中である。

このようにいろいろなパターンに対していろいろなモデルを用いて実験結果を再現できるのであるが、どのようなモデルを考えても、純酢酸、 $X_i = 1$ のところでは、いろいろな溶媒系に対して計算された平衡定数、分子種の chemical shift の値は一致しなければならぬ。

本研究では、3~6のパターンに対して有効であったモデルが、1,2のパターンにはよい結果を与えないことから、パターン2に対して有効であったモデルを4のパターンに対してあてはめ、その有効性を検討した。

このパターンを二成分系の代表例として酢酸-ジエチルエーテル、酢酸-ジ n-ブチルエーテル系について検討した。OH プロトンの希釈シフト曲線は図2に示した。仮定した分子種は、上述のものに monomer 及び polymer の終端の free OH にエーテルが水素結合した Complex 2種を加えた。従って、平衡Iに、次の平衡式を加えたものが全体の平衡式になる。



ここで $\delta_{MS} = \delta_{NS}$ と仮定する。 $K_c, K_e, K_p, \delta_E, \delta_I, \delta_C$ はニプロロヘキサン系の測定データから得られた値を用い、 $K_{MS}, K_{NS}, \delta_{MS}$ を最小二乗法により決定した。計算結果の曲線は図2の実線で示した。このモデルは、パターン4に対しても非常に有効であることがわかる。

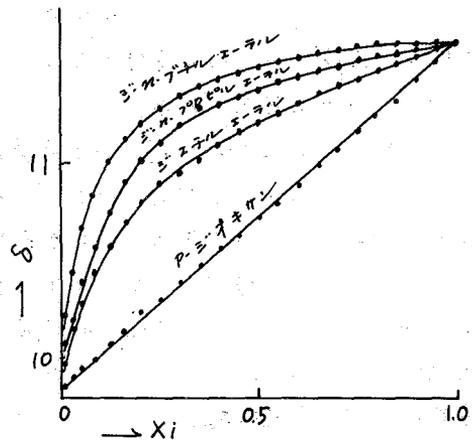


図2 酢酸-エーテル系の希釈曲線

表1に得られたパラメータを示した。図3にこれらのパラメータによって計算した各分子種の濃度と初期濃度との関係を示した。このモデルによれば、酢酸の linear Polymer としては pentamer 位までを考慮しなければならない。

表1

溶媒	Kp	KL	Kc	KMs	KMS	δE	δI	δC	δMS
ジエチルエーテル	100	9300	17700	92	3.2	7.5	11.39	14.11	9.71
ジオロピルエーテル	100	9300	17700	51	1.6	7.5	11.39	14.11	9.58

図1のいろいろな溶媒系での観測データは、酸・塩基の相互作用の強いと考えられる二成分系ほど、希釈シフト曲線と酢酸濃度を0へ外挿したときの chemical shift の値(δ^0)は低磁場にあることを示している。したがって、酢酸・エーテル二成分系においても δ^0 の値はジエチルエーテル<ジオロピルエーテル<ジブチルエーテルの順になることが予想される。また同じエーテル中で酸を変えた場合には、酢酸<プロピオン酸<イソ酪酸の順になることが予想される。しかしながら、図2に示した酢酸と3種類のエーテルとの二成分系における δ^0 の値は誤差範囲内で殆んど一致している。かなり構造の異なるジオキサンを溶媒とした場合の δ^0 もほぼ同じである。同一のエーテルに対して酸を変えてこの傾向について調べてみた結果を図4に示した。ジエチルエーテル中での酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸の δ^0 の値は、ほぼ同じになる。表1の δMS の値は予測される値とは逆になっているが、この差を誤差範囲とみなせば、エーテルのR- α -Rの水素結合した酢酸およびそのメチル置換体の水酸基プロトンの chemical shift の値は、エーテルのR及び α 置換するメチル基の数に依らず、ほぼ一定の値をとると考えられる。このことは、これらの二成分系においては、酸・塩基の水素結合相互作用の強さにはほとんど差がないことを意味する。

図2において、酸の中、低濃度領域における chemical shift の差は、エーテルのアルキル基が長くなる程、低磁場シフトすることによって生じている。これは、この濃度範囲で cyclic dimer のモル分率が、エーテルのアルキル基が大きくなる程、大きくなることと対応している。それ故、この領域において、OH proton の chemical shift の

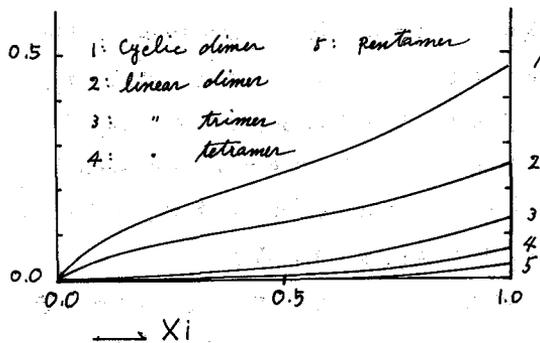


図3-a 酸 polymer のモル分率

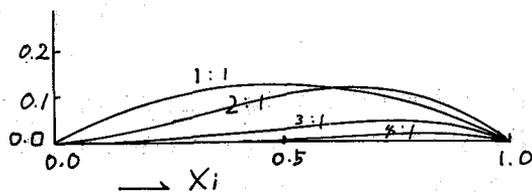


図3-b. Complex のモル分率

値がエーテルによって異なるのは、水素結合相互作用によるのではなく、疎水的相互作用によるものと考えられる。つまり、エーテルのアルキル基が大きくなる程、酸分子は終端に free の OH を保つるより、Cyclic dimer として、存在する方がより安定になると考えられる。

溶媒が少ない領域、すなわち、酸の濃度のところでは、溶媒が疎水的相互作用によって排除されてしまうため、酢酸-n-ブチルエーテル系にみられるように、 $X_i = 0$ の付近まで、OH proton の chemical shift の値は Neat の酸の値から変じない、ということも起っている。

以上のように、カルボン酸-エーテル系のように弱い水素結合系に対しても、不活性溶媒系やカルボン酸-ピリジン系のようにやや強い水素結合相互作用系に用いられ

たモデルが満足に適用できることがわかった。また、カルボン酸-エーテル系のような、弱い水素結合相互作用系では、酸あるいはエーテルの違いによって希釈シフト曲線の形に異が生ずるのは、水素結合相互作用の強さの差によるのではなく、疎水的相互作用の差によるものであると考えられる。

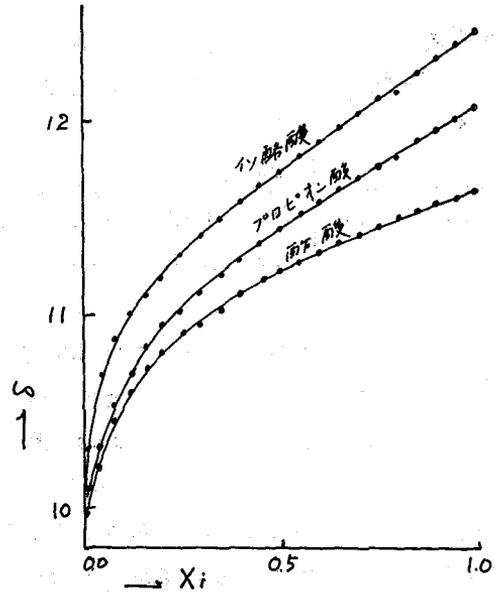


図4. ジエチルエーテル-酢酸二成分系の希釈シフト

文献

1. a. 池上, 吉田, 藤原他, 才9回~才13回, NMR討論会要旨集
- b. Fujiwara, Yoshida, Ikenoue, Bull. Chem. Soc. Japan, 1975, 48, 1970
- c. Yoshida, J. Phys. Chem., 1982, 86, 1785
- d. Muller, Rae, J. Phys. Chem., 1965, 69, 2564.

ピコリル型カルバニオンのNMR(9)¹⁾
 メチル置換ピリミジンとブチルリチウムとの反応から
 生成するアニオン
 (三重工技セ) 〇小西和頼 (名工大) 高橋憲助

1. はじめに

先に、メチル、エチル及びイソプロピルピリジンの各々3個の異性体(2-, 3-及び4-置換体)とブチルリチウムとの反応から生成するアニオンについて報告した。¹⁾ それらの¹³C及び¹H NMRスペクトルの観測から、側鎖の α -位のプロトンとリチウム金属との交換、またピリジン骨格へのブチルリチウムの付加等による2種類のアニオンが生成し、前者の反応は環窒素の隣の位置に結合した置換基で、また後者は環窒素の隣の置換基のない位置で起こりやすいことがわかった。そこで、今回は3-位にもう1個の環窒素を持つピリミジンのメチル置換体から生成するアニオンの構造について、それらのNMRスペクトルにより検討する。

2. 実験

アニオンの合成は、すべて高真空下にておこなった。5°C付近で、出発物質(ピリミジン及びメチル置換ピリミジン)-ヘキサン溶液中へ出発物質とほぼ等モルのブチルリチウムを徐々に注いでいくと、反応開始と同時にあざやかな黄~橙色の沈殿物が生成した。反応終了後、反応容器内のすべての揮発性物質を系外へ放出して新しくテトラヒドロフラン(THF)を容器内に注入すると、沈殿物は溶解して赤茶色の溶液となった。この溶液をNMR試料管に封入して測定用とした。

¹³C及び¹H NMRスペクトルの測定には、バリアンXL-200、日立R-20B(以上名工大)及びR-24Bの装置を使用した。化学シフトは、これまでと同様で使用した溶媒のピークを内部標準とする方法により求めた。²⁾ また、電子密度の算出には、以前に報告した、 σ -included ω -HMO法の π -電子密度の計算において着目する原子の π -AOに関するクーロン積分に、隣及び隣の隣からの「Through Space 効果」と呼べる2つの項を新しく加えた方法を用いた。³⁾

3. 結果と考察

図1(a)及び図2に2-メチルピリミジンから生成するアニオンの¹H及び¹³C NMRスペクトルをそれぞれ示す。これらのスペクトルから、付加型のアニオン1の生成は確認できるが、予想していた交換型のアニオン2は生成していないように見える。図1(a)における δ 6.16のダブレットは1の β -Hに、 δ 4.05のシグナル(200 MHz, ¹Hスペクトルにより確認)は γ -Hに、また図2においては2本の大きな溶媒のピークを除いて、低磁場側

こにし かずより、 たかはし けんすけ

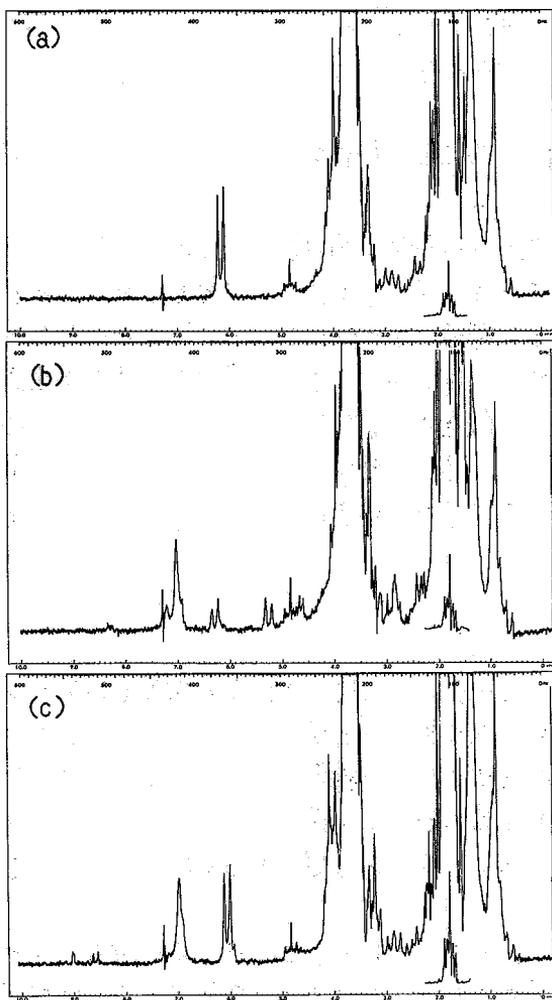


図1. アニオンの¹Hスペクトル (60MHz)
 (a) 1, (b) 3, 4 及び 5,
 (c) 6 及び 7.

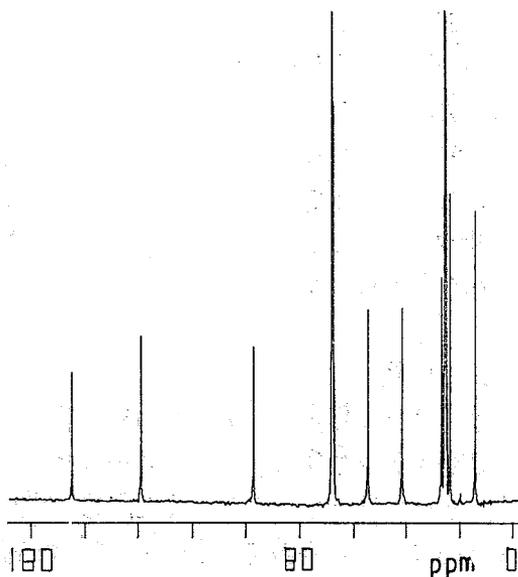


図2. 1の¹³Cスペクトル
 (50.3 MHz)

表1. アニオン(及びその水処理物)の¹³C化学シフト, in ppm^{a)}

Anion	Assignment				CH ₂		CH ₃		
	2-C	4-C	5-C	6-C					
<u>1</u>	164.9	54.9	97.4	139.3	42.4	27.7	24.3	b)	14.9
<u>3</u>	159.4	55.4	95.3	144.2	42.9	27.7	24.4	23.7	14.9
<u>4</u>	156.4	162.3	110.8	142.5	72.4				
<u>5</u> ^{c)}	(75.8)		91.9			30.0			
<u>6</u>	159.5	54.2	98.7	138.8	42.7	27.5	24.3		14.9
<u>8</u>	147.5	52.1	105.0	129.1	40.2	27.4	23.7		14.6
<u>9</u> ^{d)}	161.7	58.4	103.4	135.5					
<u>10</u> ^{d)}	156.7	62.5	98.0	140.5					

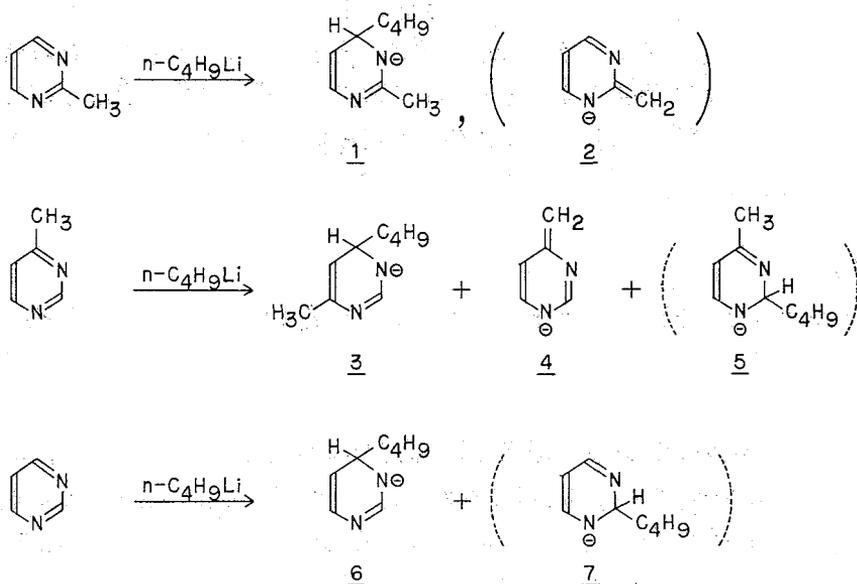
a) Errors are estimated to be within ± 0.3 ppm. b) Overlapping of the large solvent peak.

c) Assignment uncertain. d) From Ref. 4.

から2-, 6-, 5-C……の順に9本のピーク(うち1本は溶媒のピークと重なっている)が上の各炭素にそれぞれ帰属される。次に、図1(b)に4-メチルピリジンから生成するアニオンの¹Hスペクトルを示す。付加型のアニオン3が最も多く生成し、続いて交換型の生で、さらには付加型の5らしきものも生成しているように見える。δ 2.84及び3.14のシグナル(200 MHz, ¹Hスペクトルにより確認)は、4-メチレン基の2個のプロトンにそれぞれ帰属される。これら2個のプロトンの磁気的不等価に基づくシグナルの分裂は、これまでの報告においても述べた通りで、このメチレン炭素が本質的にsp²混成の構造をとっていることを意味しており、このことが交換型のアニオン(ピコリル型カルバニオン)の特徴の一つでもある。³⁾最後に、付加型のアニオン6及び7の生成が予想されるピリジンに関する¹Hスペクトルを図1(c)に示す。7らしきものはほんの一部で、圧倒的大部分6が生成している。

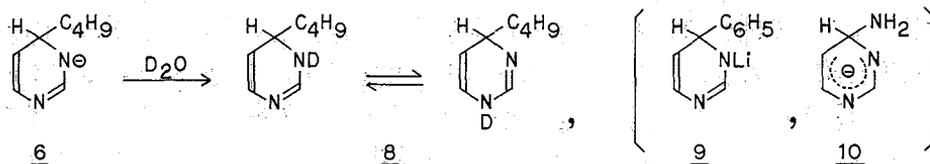
これらの実験事実からいえることは、交換及び付加反応が共に2-位よりも4-位で起こりやすいということである。このことは、生成するアニオンの構造の安定性を考えれば説明できる。つまり、求核試薬により4-位(側鎖ある、いは骨格)が攻撃を受けた場合の共鳴構造は環窒素に余剰の負電荷のあるp-キイド構造をとることができるが、2-位が攻撃されてもo-キイド構造しかとることができないためである。2-位が2個の環窒素の間において電子密度が最も小さくなっていること、また2-メチルピリジンの場合生成するアニオンは圧倒的に交換型であることなどから、2-位は求核試薬の攻撃をもっと受けやすいはずであるが、今回のメチル置換ピリジンに関してはアニオンの構造の安定性が重要であることを示している。そこで、交換型のアニオンと同様付加型においても余剰電荷が非局在化しているといえるかどうかを調べるために、代表として6を取り上げD₂Oで処理して6に対する中性物質8をつくり、非局在化の指標となる両者の5-Cの化

図式1.



字シフト(表1)を比べると、アニオンの方が6.3ppm 高磁場へシフト(電子密度が増加する方向)することがわかった。この値とエーテル中におけるイオン性の小さい9(高磁場シフト1ppm)及び液アン中で完全にイオン化され余剰電荷が非局在化している10(10ppm)

図式2.



と比べて、⁴⁾6は後者の状態に近いといえる。

図3に2種類のアニオン、交換型の4と付加型の6の¹³C化学シフト(6のπ-電子を持っていない5個の炭素を除く)に対して既に述べた方法により算出した全電子密度をプロットしたものを示す。両者の間の相関を調べると、相関係数 $r = -0.979$ となり良い相関を示す。また、4のメチレン基と結合している4-Cも除外すると $r = -0.998$ となり非常によくなる。メチレン基と結合している環炭素が大きくずれる傾向は、2-メチルピリジンから生成する交換型のアニオンにおいてもみられる。^{2,3)}従って、両者の間に直線関

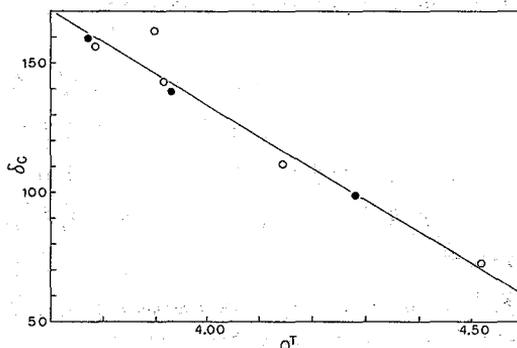


図3. ¹³C化学シフトと全電子密度との関係
(○: 4, ●: 6)

係が成立しているといつて文しつかえない。このことは、2種類のアニオンを同じ尺度でそれらの¹³C化学シフトから全電子密度が評価できることを意味している。両アニオンの環炭素の化学シフトをみると、それらのδC値は共に5-, 6-及び2-Cの順に増加して、全電子密度が同一順序で減少することを示しており、生成の過程は異なるが全電子(σ-π電子)系における電荷分布のパターンは明らかに類似している。これらのことは、両者のイオン対の構造が本質的に同じであることを示唆している。

〔謝辞〕

本研究にあたって、快く2-メチルピリミジンを提供していただいた広栄化学工業(株)に謝意を表します。

〔文献〕

- 1) Part VIII in this series: K. Konishi and K. Takahashi, Preprint presented at the 30th Symposium on Organometallic Chemistry, Kyoto, November 1983, 4.
- 2) K. Konishi and K. Takahashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 2512 (1977).
- 3) K. Konishi and K. Takahashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 1612 (1983).
- 4) R. E. van der Stoep and H. C. van der Plas, *J. Royal Netherlands Chem. Soc.*, **97**, 116 (1978).

(化技研) ○早水純久子・柳沢 勝・松村和紀・山本 修

鎖式飽和炭化水素の¹H NMRスペクトルでは、1.8~0.6 ppmの範囲に集中してシグナルが現われ、しかもそのスペクトルパターンは複雑で解析は困難とされてきた。一方¹³C NMRでは¹³C効果が大きく、枝分れによりかなり広い範囲にシグナルを示すことから、鎖式飽和炭化水素は主に¹³C NMRで研究が行なわれ、置換基数の算出も試みられている。最近になって高磁場NMRの装置が市販・普及するにつれて、従来はスペクトルの解析が困難であった化合物も研究対象にできるようになった。我々は鎖式飽和炭化水素の400 MHz¹H NMRの測定を行ない、NMRパラメータの抽出をした。この時、必要に応じて¹H-¹H=次元NMR (COSY) 及び¹³C-¹H相関=次元NMRの測定をしてスペクトル線の帰属に用いた。¹H化学シフトと枝分れ構造について整理をした。

実験 試薬はすべて市販品である。炭素数が5~12の間にあり鎖式飽和炭化水素は約45種類市販されているが、そのうち約40%の¹H NMRを測定した。現在45種類の化合物の解析が完了しているので、ここではその結果をまとめた。CDCl₃に濃度8~20%で溶解してサンプルングを行なった。測定はJEOL-GX-400型NMR装置で行なった。

結果 鎖式飽和炭化水素は400 MHzの¹H NMRでも完全な一次のスペクトルを示す化合物は数が少なく、ほとんどの場合にシグナルは重なり合っている。またスペクトルパターンは単純な形にならなりので、確認のためにはLAOCOONによる解析計算を行った場合もある。この場合にもCOSYは非常に有力で、帰属に役立てた。また¹³C NMRでは分離したスペクトル線をほとんどの場合に示すので、¹³C-¹H NMRの相関から¹H NMRの重なり合った線を分離して¹H NMRのシフト値を求めた化合物もある。CH相関=次元NMRでは、¹³C NMRの帰属も決定できた例があった。ここでは例として3,4-dimethylhexaneを取り上げる。

3,4-dimethylhexaneは図1に示すように対称的な化合物であって、二個の対称的な不斉炭素を含んでいる。>HC-CHK軸のまわりの投影図を軸回してみると互いに分るが立体配座の異なる異性体が二種類存在する。各々の異性体には対称性があるために、スペクトルパターンとしては $\begin{matrix} \text{CH}_3 & \text{CH}_2 & \text{CH} \\ & & | \\ & & \text{CH}_3 \end{matrix}$ のみとなる。即ち、二種類の $\begin{matrix} \text{CH}_3 & \text{CH}_2 & \text{CH} \\ & & | \\ & & \text{CH}_3 \end{matrix}$ の重畳合わせになることが予想され、メチル基のシグナルには、はっきりとその積子が現われてはいるがその他の領域では明らかでない。また二つの異性体にもどのように帰属できるかも明確には

はわかりにくく、やはりまとめざる。まとめらざるのみ、やまとあて

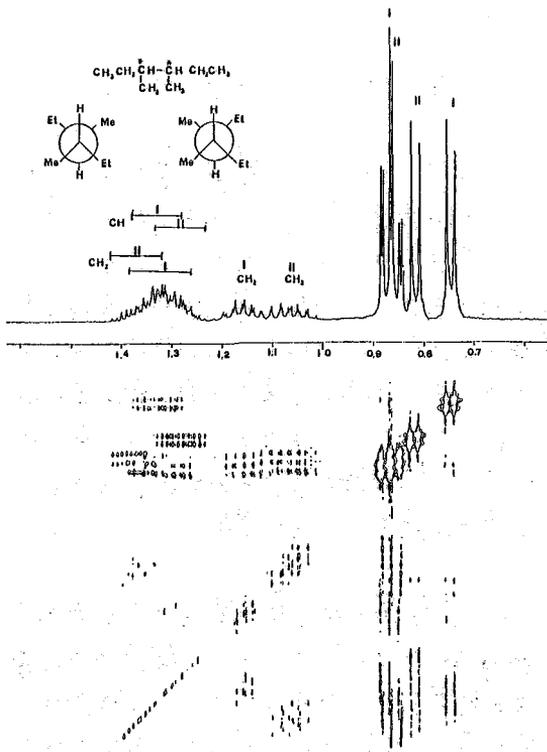


図1. 3,4-ジメチルヘキサンの¹H NMRとCOSY

SDBS NO. 8255. CODE: CDS-05-434
 3,4-DIMETHYLHEXANE
 0.5ML 1.5M IN CDCl3
 AT 25.160 MHz
 FLIP ANGLE 22.5 DEG
 REPT. TIME 0.600 SEC

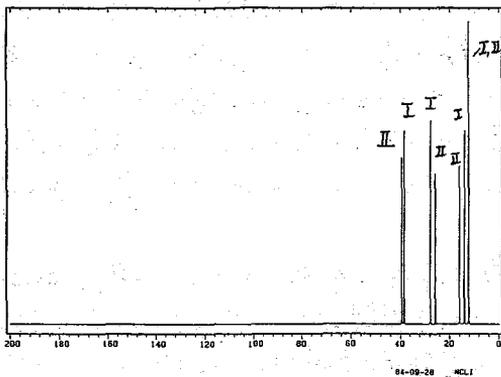
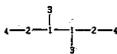


図2. 3,4-ジメチルヘキサンの¹³C NMR. 化学研の
 スペクトルデータベースシステム(SDBS)から出力。

い。そこでCOSYの測定を行ない。図1の
 下側に示す。この二次元NMRを解析する
 事によって、Jスピン結合で結合してゐる
 H間を結びつける事ができる。二つの異性
 体と分離するのは容易であり、I, IIとして
 区別したように帰属できる。倒鎖として
 CH₃基が枝分れた場合には、その隣りの
 CH₂の二個のプロトンは等価にならな
 事はよく知られてゐるが、3,4-ジメチル
 ヘキサンの場合にも、異性体Iでは0.16
 ppm, 異性体IIでは0.31 ppm分離して
 CH₂のプロトンがシグナルを示す。
 さらにこの化合物の¹³C NMRを測定する
 と、図2に示したように、-CH₂CH₃のメチル
 炭素以外はすべて二本づつシグナルを示す。
 図2は化学研データベースから出
 力したものであすが、従来の¹³C NMRの
 知識から得られた帰属に基づいたものであ
 る。¹H NMRで二つの異性体が分離できた

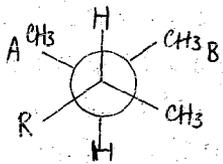
C₈H₁₈

ので、その結果と今回新たに測定
 した¹³C-¹H相関二次元NMRから、
 図1に示したように、IとII
 との異性体の帰属ができた。¹³C
 NMRの方からより明確にわかる
 が、異性体Iの方がIIにより多
 量存在することがわかる。¹H NMR
 ではそれ程明らかではな
 詳細に定めておくと、同じ値向
 がみられる。このように二つの二
 次元NMRを組み合せると、¹H
 NMR, ¹³C NMRの帰属とシフト
 値の抽出を行なった。またよく分
 離してゐるスペクトルのある時は
 スピン結合定数をおぼえることがで

NO.	SHIFT	INT.	ASSIGN.
1	36.44	639	1
2	27.72	679	2
3	25.73	438	2
4	18.00	532	3
5	14.03	536	3
6	12.24	1000	4

きた。今回は¹H化学シフト値を中心にして整理して、図表としてまとめた。図3, 4,
 5に各々CH₃, CH₂, CHのシフトの範囲と枝分れ構造とを示した。

一般にメチルプロトン(他のプロトンとは分離した位置にシグナルを示すので、ほぼ一次のスペクトルを示し、解析は容易である。triplet, doublet, singlet)が、帰属が比較的容易である。たとえば $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH} \end{matrix} > \text{CH} -$ のタイプのメチル基で、枝分れした CH_3 が結合すると、二つのメチル基は等価でなくなり、異なるシグナルを示す。β位で CH_3 が枝分れするかγ位で枝分れするかで、分離の大きさは異なるが、立体配座を右下図に示した。この時に



NMRの時間尺度から、C-C軸まわりで9分る内回転は存在するとしなげればならず、**最も安全な立体配座**を示した。 $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH} \end{matrix} > \text{CH} -$ の二つのメチル基は等価にならず、A, Bと書いて示した。他の化合物の類推から、Bの方が立体的に込め合っており、高磁場側(シグナル

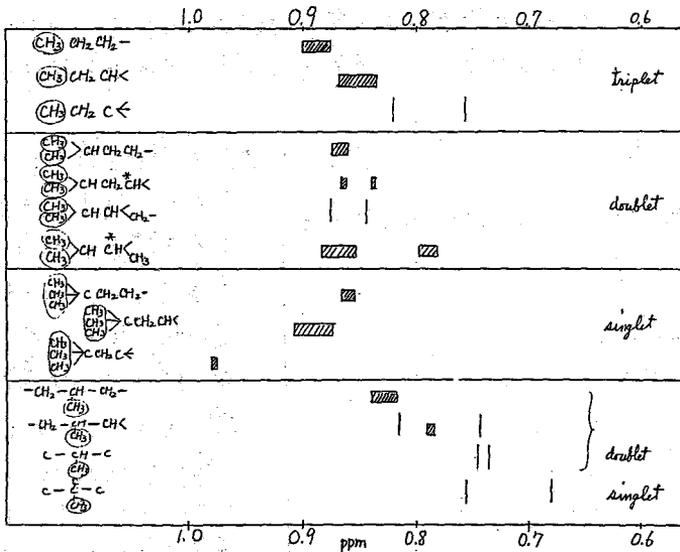


図3. メチルプロトンの化学シフト範囲

を示す。 ^{13}C NMRにおいても同様に二本の異なるメチル炭素のシグナルを示す。CH相関NMRから、帰属が可能である。Et基や *iso* Pr基のメチルプロトンは枝分れがあつて込め合つてくると高磁場シフトを示すが、*t*Bu基のメチルプロトンは逆に低磁場シフトを示す傾向にある。

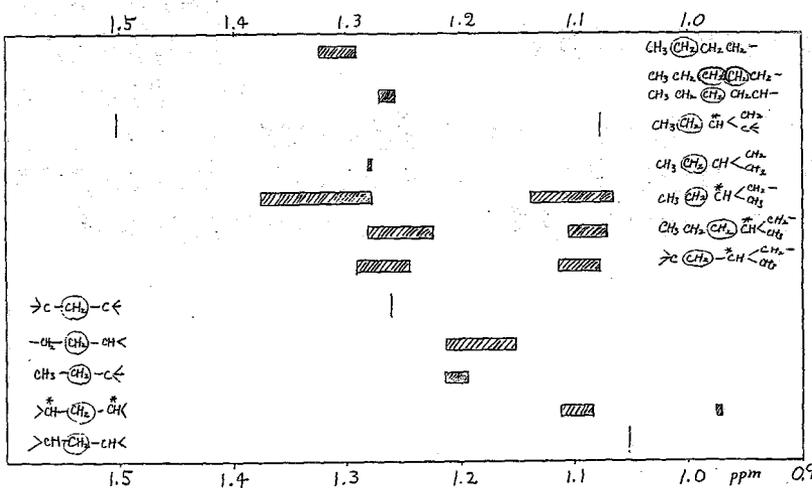
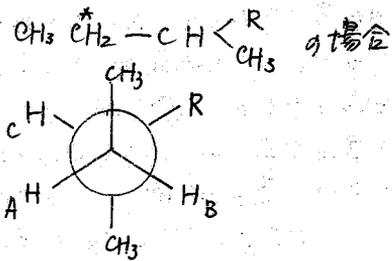


図4. メチレンプロトンの ^1H 化学シフト範囲

メチレンプロトンは一般に重なり合うことが多いのでシフト値の推定は少しの場合が多い。特に直鎖の CH_2 はほぼ同じ化学シフト値を示す。例で示したように、 CH_2 は隣の炭素に CH_3 の枝分れがあると等価にならなくなり、非常に複雑なスペクトルパターンとなる。二つの CH_2 のプロトン間には、通常13 ~

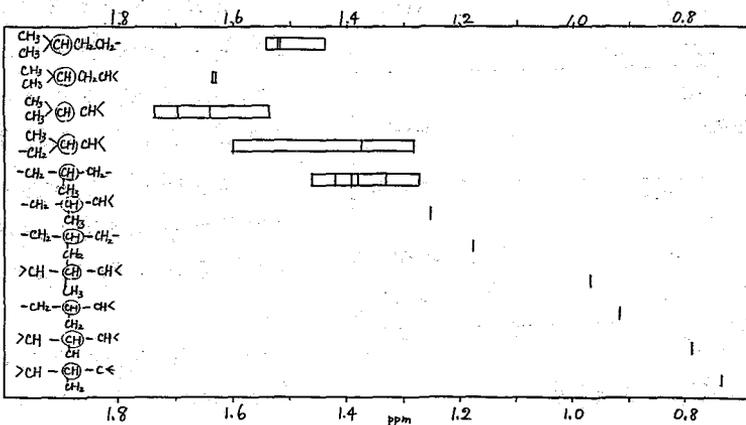
-14.5 Hz の 2J スピン結合が存在する。また隣接する CH との スピン結合定数を抽出できる化合物については求めてみると、高磁場側の CH₂ の γ プロトンは $^3J = 7 \sim 7.5$ Hz であり、低磁場側では $^3J = 5 \sim 5.5$ Hz (CH₃ が枝分かれしていない時)、または γ プロトンは 3.0 Hz (E 体等の場合) になる。C-C 結合のまわりで分子内回転が存在する



が安定構造を仮定して、左図に示した。CH₂ の二つの γ プロトン A, B が等価でなく存在することは直に分かるが C γ プロトンとの 3J を考えれば、B γ プロトンの方が大きく存在等である。この場合にも、1 γ プロトンはメチルプロトンと同様に、立体的に適合した位置にある方が高磁場シフトを起していることがわかる。このことはメチルプロトン全体に

してもいえる。

メチルプロトンの化学シフトを図5に示した。メチルプロトンは広範囲に分布している



ことがわかる。枝分かれできる程度 γ プロトンであるためであり、bulky なアルキル基がつけばつく程高磁場側へシフトしてゆく。一般に対称的なパターンを示す事が多いので帰属は容易なことが多い。

図5. メチルプロトンの ^1H 化学シフト範囲。

本要旨集では、化学シフト値を従来通りの方法で図表化して示し

た。しかしながら化学シフトデータベースでは、構造式と帰属を入力することによって、構造置換定数を抽出して推定値を算出するシステムがある。HNMR の置換基パラメータを決定すると同時に ^{13}C NMR の置換基パラメータとの比較を行なう予定である。

検索法

(化技研) 岡山 本 修、柳沢 勝、早水 紀久子

核磁気解析法の発展とともに同時に同じくして、スペクトルファイルを利用する同定検索の方法が考案されて来た。その代表的なものには赤外スペクトルであろう。この場合、初期の段階においてスペクトルファイルはいわゆるデータ集と云わゆるスペクトルシートを集りであり、未知スペクトルから又は他の何等かの方法で測定された化合物のスペクトルとスペクトルシートから探し出し、これと未知スペクトルとを比較する。これにより同定が行われ、現在でもこのように原始的ではあるが極めて便利の方法は多用されている。このような要望に応じたために Sadtler 社 IRDC を中心としてデータ集が刊行され、今日に到っていることは周知のことである。

その後電子計算機の発展に伴い、スペクトルファイルと電算機の中につくり、ファイルとめくく仕事を電算機に行わせる方法が発展して来た。この場合には電算機のコンピュータの図像から、スペクトルをもつてファイル化する。これはせず、同定検索に必要な情報のみをスペクトルから抽出し、未知スペクトルもそれに対応してデータを並びおしして比較が行われる。このような抽出された情報としては普通スペクトルのピークの位置(振幅、化学シフト値など)が用いられ、それにピーク強度が補助的に使用され、電算機を利用するこのような同定検索の方法は主として赤外スペクトルの分野において発展して来た。赤外の後で¹H NMRが核磁気解析法の主流を占めるようになったから、電算機による同定検索の試みは二三行われたが、赤外ほどは熱心には研究が行われてはいないように思われる。その理由の一つとしては¹H NMRに比べ圧倒的に多数のデータの蓄積が赤外スペクトルには存在することから挙げられるが、その他にも次のような理由が考えられる。

1. もともと NMR スペクトルの特徴として、化合物内の部分構造とスペクトルとの対応が他のスペクトルに比べはるかにつけ易く、一応の熟練とすれば NMR スペクトルを「解読」することになり、構造決定までは同定が行えるという利点があるため、やみくもに機械でファイルとめくくするのを考える人が少なかった。

2. ¹H スペクトルのパターンは赤外スペクトルのようにコード化すること難しい。上記のように普通のコード化データとしてはピークの位置と強度(高さ)が使用されるが、赤外スペクトルの場合と同じように¹H スペクトルをコード化しようとすれば多くの困難に遭遇する。

上記二つについては、スペクトルの数が増加すれば個人的能力にも限度があり、熟練を要しなくても簡単に同定ができることは非常に望ましいことであるから、¹H NMR スペクトルのファイル化と挙げれば極端な要因はあらず、今までの努力がなされたとしてもただであるのであまり問題にはならぬ。次に2つについて少し詳しく考えてみよう。

良く知られているように、¹H NMRのパターンは化学シフトとスピン結合定数によって決定される。スピン系が複雑な場合には一見簡単なシグナルが実は多数の線の集合である場合が非常に多い。例えば図1はトルエンのメチルシグナルの拡大図であるが、リングのプロトンとの遠隔スピン結合のために図のように分裂している。これは脱ガスもしないうちに分解能を上げることせず、普通に測定した場合であるが、脱ガスをして非常に注意して分解能を上げればもっとシャープな線の集合から成るスペクトルが得られる。これは良く知られている。

一方赤外スペクトルのように比較的ブロードなピークの集合の場合、スペクトルのファイル化(検索のため二次情報として)はピークの高さをファイルすることにより従来から行われてきた。普通考えられる検索法に於いてはこれが最も簡単な方法だからである。しかし¹Hスペクトルの場合には非常に細かい線の集合から成るため、このような方法ではうまくいかなかった。ファイル化する場合にどこまで細かく線とせよか、その場合のピークの高さをどのように定義するかが問題になる。トルエンのメチルシグナルは普通に常識では単一線として扱われるが、遠隔スピン結合のために全体がブロードになるため、遠隔スピン結合をもたないメチル基のシグナルに比べ高さが付く。このようなことは検索ノイズの原因になりかねない。

¹Hスペクトルをファイル化する場合に試みられた一つの手法としては、化学シフト値とそのシグナルの多重度をコード化して入力する方法がある。例えばエチル基のシグナルは多重度が4のシグナルから成っているという方法である。この方法は一見非常に良い方法のように思われるが、実際問題としては形がくずれたシグナルが多く、多重度そのものの決定が多分に主観的な要素をもちて来て、実用的にはない。

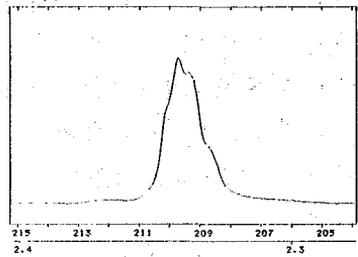


図1. トルエンのメチルシグナル (90 MHz)

化技研スペクトルデータベースシステムにおいては上記の欠点を改良する一つの試みとして積分強度を使用することとを考えたので、その結果について報告する。

現在のNMRスペクトロメータには必ず積分操作ができるようになっており、スペクトルシートからその結果と読取りは非常に簡単である。一方多数の線のどれを選択して入力するかは、実際にユーザー側からおぼせ送ることが多い。従ってむしろ入力値はピークの高さをせず、範囲指定としての便利であり、その場合にはピーク強度は高さはなく、積分強度(面積強度)をとらざるを得ない。このようにおぼせユーザーはどのピークを選択するかにはとらわれない、スペクトル全体と任意の範囲に区切り、その範囲の積分強度を入力するだけでよいので非常に便利であろう。勿論あまり粗い範囲指定を行なうと、当然検索ノイズは多くなる。これに対応するため、ファイル側としては次のような基準で検索ファイルを作成した。

先ず実測スペクトルに1Hzの窓をつけてブロードニングを行ない、その範囲内で最大ピーク

一つと、そのピークの面積強度とをファイル化する。その際でピークが重なり合っている場合には、変曲点で基線と下して分割する。この方法は非常に簡単であるが、実用的にはこれで十分であろう。次に検索結果の一例を示す。

	SHIFT	INTENSITY
1	7.5:7.1	0.85
2	5.1:4.4	1.7
3	2.9:2.2	1.7
4	1.95:1.5	1.8
5	1.5:1.	9.7
6	1.:0.65	2.2

入力データ

```

* INPUT DATA OK ? => Y
* ENTER MARGIN FOR PEAK AND INTENSITY => 0.8
* PRESENT ITEMS = 5
NMRS-H1) OUT NAME

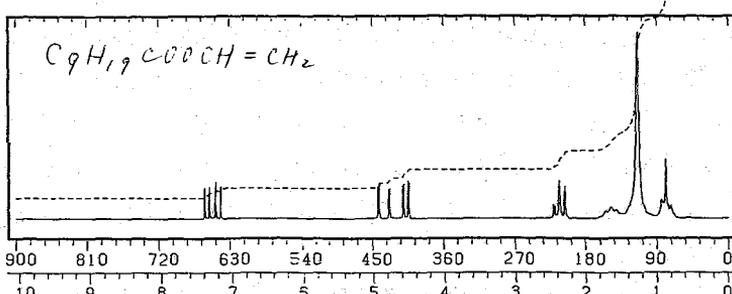
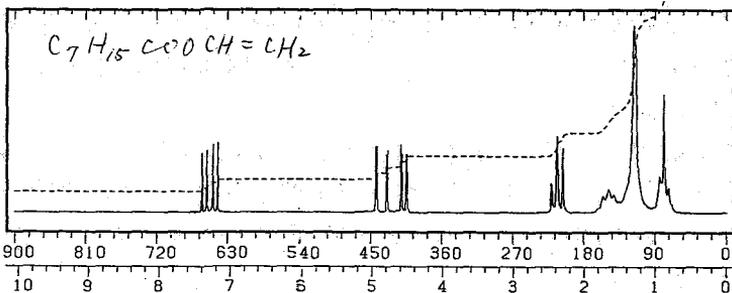
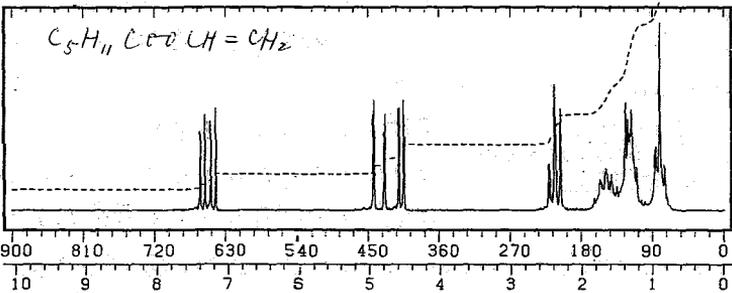
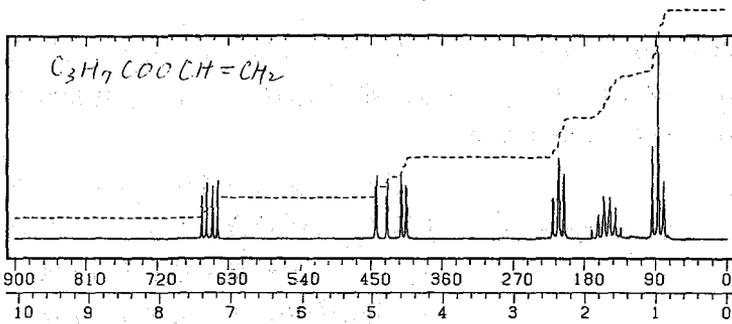
***** LIST OF NAME INFORMATION *****
1 HSP-00-525 C6 H10 O2 VINYL BUTYRATE
2 HSP-01-233 C12 H22 O2 VINYL DECANOATE
3 HSP-01-486 C10 H15 N O2 S N-N-BUTYLBENZENSULFONAMIDE
4 HSP-01-762 C8 H14 O2 VINYL HEXANOATE
5 HSP-01-740 C10 H18 O2 VINYL N-OCTANOATE
    
```

データ入力は左図のようにシフト値 (ppm) と強度とを対にして行なう。これにより範囲の指定が行われている。勿論範囲指定は必ずしも必要では無い。その場合には後で適当なマーゼンを指定する。左図において強度に対するマーゼン@は強度データを使用しないことを意味する。従ってその下方に出力されたヒットした化合物名は強度データと考慮しない。

場合のものである。次に上記データ¹³最後に ELSE N E フリ加えると①,②,④,⑤のみがヒットして、③は落ちる。ELSE N E はデータとして与えられたシフト範囲以外にはシグナルが存在しないという指定である。ここでヒットした化合物はリネール直鎖カルボン酸のビニルエステルである。そのスペクトルを図2に示す。図からも明らかのようにこの4種を区別するにはシフト細かく指定が必要であろう。ここで①のピーク値を細かく指定すれば、直ちに分離できたことが想像できるが、他の3種は困難であろう。そこで強度データを使用することにし、強度のマーゼンと0.8 (即ち強度データに80%までの誤差を許容する) とすると、②と⑤がヒットし、マーゼンをそれ以下に下げると④のみがヒットしてくる。これが正解である。

現在 SDBS には約3000件のスペクトルが格納されているが、強度データを使用することにより、上記のようになかなか難しい指定で正解が得られる。この際積分強度と使用したことにより、ユーザーは複雑に分離したピークの数もよくかきこくことには注意が必要である。またこのシステムはスペクトル表示システムに直接つながっており、ヒットした化合物が得られたら、直ちに図2のようなスペクトルを見ることが出来る。従ってマーゼンを少し甘くして、眼でスペクトルを確認しながら検索を行なうのも一つの方法であろう。

¹H スペクトルの検索の場合、常に問題になるのは観測周波数と相異によるパターンの変化である。良く知られているように、化学シフトは周波数依存性をもつが、スピン結合定数にはそれがないからである。SDBS においてはすべて周波数でファイル化を行なうことは不可能であるから、代表的なものとして 90 MHz, 200 MHz, 400 MHz の3種に分類してファイル化が行われている。従って問題は例えば 80 MHz または 100 MHz で測定されたスペクトルが 90 MHz のファイルで検索可能かどうかということである。各ピーク位置は ppm 単位でファイルに格納されているため、スピン結合で分裂したシグナルの位置



は周波数の変化で微妙な変化を示し、また1本1本のシグナルの強度も変化する。従って各シグナルにフリエッ細かい入力はあまり意味もたなく、シグナル・ブロックとして情報を総合的に比較する方がより効果的であると思われる。このような事情に対しては本報告で述べたようなシフト範囲と積分強度による検索方法はかなりフレキシブルに対応することになり、ゆとりをもった検索方法ではあるかと考えられる。実際に簡単なテストを行なった結果、100 MHz 及び 80 MHz の測定スペクトルは 90 MHz のファイルで十分対応できることがわかった。このことは測定周波数にほぼ 10% の許容度があることを示しており、360 MHz のスペクトルは 400 MHz のファイルで対応できることも思われる。

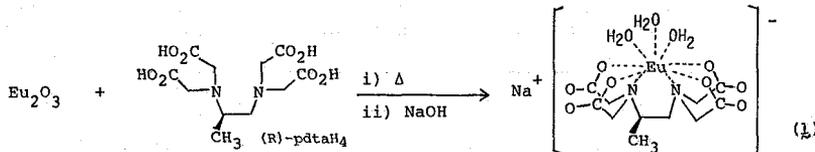
図2 直鎖脂肪酸ビニルエステルの 1H NMRスペクトル (90 MHz)

以上簡単に積分強度を使用する 1H スペクトルの検索法について述べた。この方法の特徴はユーザーの利用が簡単であること、また検索ファイルの作成がデータの入力後自動的に実行できることである。しかし現在の格納形式は3000程度で未だ少なく、さらに多数のデータを入力した場合には生じる問題はこれから検討課題であろう。

1 序 キラルなランタニドシフト試薬として, 現在カンファ-誘導体を配位子とするものが市販され, 不斉合成や天然物化学の分野でエナンチオマー純度(%ee)の決定に広く用いられている。これらのシフト試薬は1,3-ジケトナート型の配位子を持ち, 有機溶媒中では安定であるが水に対しては不安定である。生体関連物質にはキラルなものが多く, それらに対して多くの場合水が最も良い溶媒である。そこで水溶液中で用いることのできるキラルなシフト試薬の開発が試みられたが, まだ実用には至っていない。^{1,2}

我々は水溶液中で安定な錯体として, EDTA型配位子を有するものを利用することとし, (R)-プロピレンジアミン四酢酸イオン(R-pdta)を配位子とするEu(III)錯体, $\text{Na}[\text{Eu}(\text{R-pdta})(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)を合成し, 1の水溶性キラルシフト試薬としての可能性を検討した。その結果1は, アミノ酸, ヒドロキシ酸, カルボン酸等のエナンチオマーを区別することを見出した。³

2 実験・結果 1の合成: Eu_2O_3 とR-pdtaH₄(1:2)を水に懸濁し, 加熱溶解後水酸化ナトリウムで中和することにより1を容易に得ることができた。1は水によく溶け



るが有機溶媒にはほとんど溶けない。元素分析から5分子の水を有し, 構造既知のLa(edta)錯体⁴からの類推で, うち3分子は配位水, 2分子は結晶水と考えられる。1の¹Hnmr(D₂O)は δ 7.0, 5.4, 3.1, 1.0, -2~-5.5 ppmにブロードで小さなシグナルを持つ。

アミノ酸への適用: まず, 1のキラルシフト試薬としての可能性をアミノ酸について検討した。1の存在下, バリンのスペクトルには顕著なpH依存性がみられた。酸性~中性では各エナンチオマーのシグナルの分離はみられなかったが, アルカリ性側(pH 9~12)でC α -Hとイソプロピル基のメチルシグナルに分離がみられた。エナンチオマーのシグナルの分離($\Delta\delta$)は, 溶液中の基質の濃度にも依存し, 1の基質に対するモル比が同じ場合, 基質濃度の高い方が大きい。図1にpH 10での0.4Mバリン重水溶液のスペクトルを示した。1のモル比0.02([1]=0.08M)でC α -Hシグナルの十分な分離がみられる。更に1を加えると $\Delta\delta$ は増加するが線中のひろがりかひどくなくなった。他に酸性アミノ酸, 塩基性アミノ酸を含む7種のアミノ酸について測定した。結果を表1に示す。いずれのアミノ酸でもC α -Hシグナルは高磁場側にシフトし, バリン, イソロイシン, トレオニン, セリン(表1; 2~5)についてはシグナルの分離は良好であったが, フェニルアラ

かぶと くにのぶ・ささき よういち

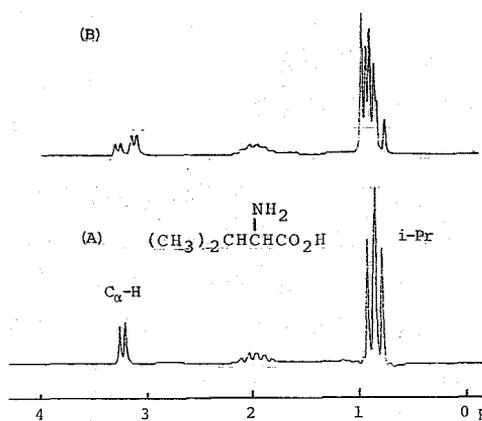


図1. バリンの¹H NMR スペクトル(90MHz, D₂O中)
0.4M, pH 10.0, R:S = 1:2
モル比(1:バリン) (A) 0, (B) 0.02

ニン, グルタミン酸, リジン(表1: 6, 7, 8)では完全な分離はみられなかった。

興味深いのは各アミノ酸のエナンチオマーの絶対配置とC_α-Hの誘起シフトの間に一定の相関が成り立つことである。1の添加によりC_α-Hシグナルは高磁場側にシフトするが, (S)-アミノ酸のシグナルが対応する(R)-体のそれよりも大きく移動し, その結果(S)-体由来のシグナルが常に高磁場側にあらわれている。この規則性は, アミノ酸に, 水酸基, カルボキシル基, アミノ基などの官能基が存在しても変わらない(表1: 4, 5, 7, 8)。このことは1を用いて, α-アミノ酸の絶対配置の決定が可能であることを

示している。従来のNMRを用いるアミノ酸の絶対配置決定法では, アミノ酸を誘導体に変換することが必要であるが, 本法ではその必要のないことが特徴である。

表1. 1によるエナンチオマーシグナルの分離(90MHz, D₂O中)

Compound	Molar ratio [1:substrate]	Signal observed	ΔΔδ (ppm)	Enantiomer with higher field signal
1 <chem>CC(N)C(=O)O</chem>	0.12	Me CH	0.13 0.32	R S
2 <chem>CC(C)C(N)C(=O)O</chem>	0.02	CH	0.16	S
3 <chem>CCC(N)C(=O)O</chem>	0.04	CH	0.09	S
4 <chem>OC(N)C(=O)O</chem>	0.03	CH	0.20	S
5 <chem>CC(O)C(N)C(=O)O</chem>	0.05	Me CH	0.14 0.29	R S
6 <chem>C1=CC=C(C=C1)CN(C)C(=O)O</chem>	0.04	CH	0.16	S
7 <chem>OC(O)CC(N)C(=O)O</chem>	0.05	CH	0.19	S
8 <chem>CN(C)CC(N)C(=O)O</chem>	0.06	CH	0.13	S
9 <chem>CC(O)C(=O)O</chem>	0.11	Me CH	0.19 0.30	R S
10 <chem>C1=CC=C(C=C1)C(O)C(=O)O</chem>	0.04	CH	0.12	S
11 <chem>CC(C)(O)C(=O)O</chem>	0.09	Me	0.11	S
12 <chem>CC(N)C(=O)O</chem>	0.20	Me CH	0.03 0	S -
13 <chem>CC(C)C(=O)O</chem>	0.13	Me	0.03	-

アミノ酸: 濃度 0.4~0.5M (1,2), 0.1~0.2M (3,4), 0.06~0.08M (5~8); pH 9~11; R:S=1:2~1:3. ヒドロキシ酸, カルボン酸: 濃度 0.4~0.6M; pH 3.8~5.2; R:S=1:2 (9,10), 21% ee (R) (11), 30% ee (R) (12).

ヒドロキシ酸、カルボン酸への適用： 1 は α -ヒドロキシ酸のエナンチオマーも区別する。図2に 1 存在下 pH 3.8 における乳酸のスペクトルを示した。乳酸の場合も顕著な pH 依存性がみられた。アミノ酸の場合と異なり、pH ~ 1 でも Ca-H , CH_3 シグナルに分離がみられる。pH ~ 4 が最適条件で、 ~ 9 ではいく分線中のひろがりが見られ ~ 12 になると顕著なひろがりにより Ca-H のシグナルは消失した。乳酸の他、マンデル酸、アトロラクチン酸の各エナンチオマーのシグナルも、1 により分離して観測された(表1. 10, 11)。

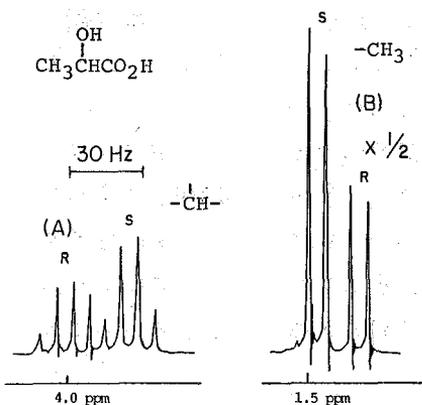


図2. 1 による乳酸エナンチオマーシグナルの分離
0.6M, pH 3.8, R:S = 1:2
モル比(1:乳酸) 0.11

1 はさらにカルボン酸のエナンチオマーのシグナルも分離した。 $\Delta\Delta\delta$ はアミノ酸やヒドロキシ酸にくらべて小さいが、2-フェニルプロピオン酸は CH_3 シグナルが分離し、 Ca-H に明瞭な分離はみとめられなかった。またエナンチオマーの区別だけでなく、イソ酪酸のエナンチオトピックな CH_3 基のシグナルにも分離がみられた。

キラルなシフト試薬によりカルボン酸のエナンチオマーあるいはエナンチオトピックな置換基のシグナルが分離したのは、これがはじめての例である。

3. 考察 1 は水溶液中でキラルシフト試薬としての能力を有することが明らかとなったが、この能力は、広い pH 範囲にわたっての 1 の高い安定性に負うところが大きいと考えられる。1 の安定定数は他のランタニド-edta 錯体と同程度として $10^{15} \sim 10^{20} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ と思われる。in situ でつくった 1 についての CD⁵ あるいはケイ光 CD⁶ の研究から、R-pdta は pH 1.5 \sim 13.0 の範囲で配位圏に保持されていることがわかっている。

基質の配位： 基質はおそらく、通常水や水酸イオンが占めているサイトと相互作用し、そこで基質交換がおこると考えられる。1,2-プロパンジオールや 1,2-ジアミノプロパンのシグナルが 1 の存在下で変化しないことから、1 への基質の配位にはカルボキシル基の存在が必要であることがわかる。一方アミノ酸やヒドロキシ酸の Ca-H の誘起シフトが、アミノ基あるいは水酸基を持たないカルボン酸にくらべて数倍大きいことは、これらの基が 2 の配位基としてはたらき、1 との錯形成を有利にしていることを示唆している(図3)。

1 がアミノ酸に対して中性あるいは酸性で有効でないのは、アミノ基にプロトン化がおき、生じた $-\text{NH}_3^+$ と中心金属イオンとの反撥により錯形成が不利になるためであろう。プロトン化のおこらない水酸基を持つヒドロキシ酸(乳酸)は、酸性側でも錯形成が可能でシグナルの分離がおこる。一方高い pH 領域(>11)では、乳酸のシグナルに極端な線中のひろがりが見られた。これはカルボキシル基の α 位の水酸基が、高い pH でプロトンを失い、生じたアニオンが中心金属イ

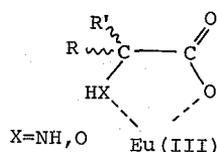


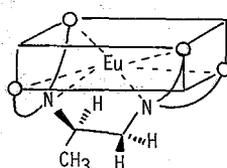
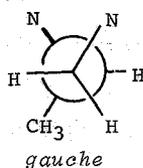
図3

の反撥により錯形成が不利になるためであろう。プロトン化のおこらない水酸基を持つヒドロキシ酸(乳酸)は、酸性側でも錯形成が可能でシグナルの分離がおこる。一方高い pH 領域(>11)では、乳酸のシグナルに極端な線中のひろがりが見られた。これはカルボキシル基の α 位の水酸基が、高い pH でプロトンを失い、生じたアニオンが中心金属イ

オンに強く配位し、基質の交換速度が遅くなっておきたものと考えられる。

エナンチオマー区別の機構: EDTA型配位子を持つランタニド錯体では, $\text{La}(\text{edta})$ 錯体の構造がX線解析により知られていて, $\mathbf{1}$ はこのものと類似の構造を持つと考えられる。基質は配位している水と交換して配位するであろうから, 中心金属の反対側に位置している pdta の不斉中心の影響を直接受けるとは考えにくい。 $\mathbf{1}$ がどのようにしてエナンチオマーを区別するかについては現在つぎのように考えている。

$\text{La}(\text{edta})$ 錯体においては, エチレンジアミン部分の二つの C-N結合は *eclipse* となっていて, 四つのカルボキシル基は同一平面上にある。一方 pdta 錯体 $\mathbf{1}$ においては, CH_3 基が存在するために *eclipse* 配座がとれず *gauche* 配座となる。その結果四つのカルボキシル基は同一平面からずれ, 平均平面の上下に互いちがいに存在することになる(図4)。そしてこの非平面性が, エナンチオマーを区別する原因になっているものと思わ



O = COO⁻

図4

る。なお pdta 配位子の四つのカルボキシル基が同一平面上に存在しない例は, Mo^{V} の複核錯体で知られている。⁷

以上述べてきたように, $\mathbf{1}$ は水溶性キラルシフト試薬として有望であることがわかったが, $\mathbf{1}$ 自身のシグナルが小さいながら通常の測定領域にあらわれる, また線中のひろがりや大きいなどの欠点もある。現在さらに異なった化合物群への $\mathbf{1}$ の適用を検討するとともに, 上記欠点の克服とめざして新しい試薬の開発を試みている。

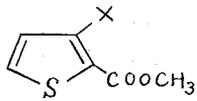
文献

1. J. Reuben, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1979, 68; J. Am. Chem. Soc., 1980, 102, 2232.
2. J. A. Peters, C. A. M. Vijverberg, A. P. G. Kieboom, and H. van Bekkum, Tetrahedron Lett., 1983, 24, 3141.
3. K. Kabuto and Y. Sasaki, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1984, 316.
4. M. D. Linde, B. Lee, and J. L. Hoard, J. Am. Chem. Soc., 1965, 87, 1611, 1612.
5. S. Misumi, T. Isobe, and H. Furuta, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1974, 47, 421.
6. H. G. Brittain and K. H. Pearson, Inorg. Chem., 1983, 22, 78.
7. K. Z. Suzuki, Y. Sasaki, S. Ooi, and K. Saito, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 1288.

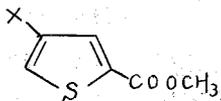
(神奈川県) 里中 初

1. 緒言

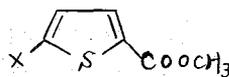
2-チオフェンカルボン酸メチルの3-、4-、および5-位にメトキシル、メチル、塩素、臭素、ヨウ素、ホルミル、アセチル、メトキシカルボニル、ニトロの原子又は基をもった化合物(I~III)を合成し、それらの¹³C-NMRを測定した。それらの化学シフトや¹³C-¹Hカップリング定数を2-置換チオフェン(IV)や3-置換チオフェン(V)のものと比較し、相関性をしらべた。



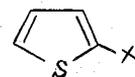
(I)



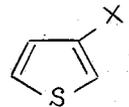
(II)



(III)



(IV)



(V)

また、(I)、(II)、(III)の化合物について¹³C化学シフトと¹H化学シフトとの関係についても報告する。

2. 実験

今回の研究に用いた化合物は文献に発表されている方法又はそれらを改良した方法で合成した。¹³C-NMRは試料濃度を約1 mol/l (溶媒: CDCl₃, 内部標準物質:TMS)に調整してJEOL FX-90Q型で測定した。FT条件は次の通りである。COMモード: スペクトル幅5000 Hz, サンプリング時間0.9 sec, パルス角約30°, 使用データ点8192, 積算回数1000。NOEモード: スペクトル幅450 Hz, サンプリング時間9.1 sec, パルス角約30°, 使用データ点16384, 積算回数1000~2000。

3. 結果および考察

化合物(I)~(III)の測定結果が表1~3に示される。3つの化合物系とも置換基による化学シフトの変化は置換基の結合している炭素の化学シフト(δ_{C_x})がもっとも変化している。(I)では $\delta_{C_2} > \delta_{C_4} > \delta_{C_5}$ の順に変化している。特にC₅の変化は非常に小さい。 $\delta_{C=O}$ はわずかではあるが置換基の効果をうけている、メチル体は低磁場側へ、ニトロ体は高磁場側へシフトしている。 δ_{CH_3} においては置換基による変化は更に減少している。しかしメトキシ体やメチル体は高磁場側へ、カルボニル誘導体やニトロ体は低磁場へシフトしているハメット定数と関係ありそうな傾向を示している。(II)は $\delta_{C_5} > \delta_{C_3} > \delta_{C_2}$ の順に変化している。 δ_{C_2} の変化は非常に小さい。 $\delta_{C=O}$ や δ_{CH_3} の変化は(I)よりも更に小さくなっている。興味深いのは $\Delta\delta_{C_x}(II) > \Delta\delta_{C_x}(I)$, $\Delta\delta_{C_5}(II) > \delta_{C_2}(I)$ であるのに対し、 $\Delta\delta_{C_3}(II) < \Delta\delta_{C_4}(I)$ であることである。化合物(I)はオルト化合物であり、XとCOOCH₃

さとなか はじめ

表 1. 5-⁴ X-³ COOCH₃ の δ (ppm) と J (Hz)

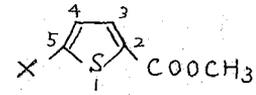
X	δ_{C_2}	δ_{C_3}	δ_{C_4}	δ_{C_5}	$\delta_{C=O}$	δ_{CH_3}	$^1J_{C_4H_4}$	$^1J_{C_5H_5}$	$^2J_{C_4H_5}$	$^2J_{C_5H_4}$	
H	133.8	133.4	127.4	132.4	162.6	52.0	170.3	185.9	3.8	7.0	
OCH ₃	109.6	162.1	116.4	130.6	162.1	51.4	^{OCH₃} 59.0	170.4	187.2	3.9	4.3
CH ₃	126.7	146.1	131.6	129.9	163.1	51.5	^{CH₃} 15.8	167.6	185.0	3.7	6.8
Cl	125.9	131.6	130.2	130.4	161.0	52.1		175.9	188.3	3.9	5.8
Br	127.5	117.0	133.0	131.2	161.0	52.1		176.5	188.2	3.8	6.0
I	130.5	86.1	138.6	132.7	161.2	52.1		176.1	187.5	4.1	6.5
CHO	138.5	144.6	127.7	130.6	161.5	52.7	^{CHO} 186.3	173.9	187.8	4.0	6.8
COCH ₃	131.2	147.3	128.0	130.9	161.7	52.5	^{COCH₃} 148.4 ^{COCH₃} 30.7	172.0	187.5	4.1	6.5
COOCH ₃	134.0	137.2	128.7	130.5	161.5	52.5	^{COOCH₃} 164.4 ^{COOCH₃} 52.6	173.3	188.1	4.1	6.5
NO ₂	129.5	148.6	124.1	129.3	159.7	53.3		179.4	192.2	4.1	5.4

表 2. 5-⁴ X-³ COOCH₃ の δ (ppm) と J (Hz)

X	δ_{C_2}	δ_{C_3}	δ_{C_4}	δ_{C_5}	$\delta_{C=O}$	δ_{CH_3}	$^1J_{C_3H_3}$	$^1J_{C_5H_5}$	$^3J_{C_3H_5}$	$^3J_{C_5H_3}$	
OCH ₃	132.0	124.3	158.3	105.1	162.4	52.0	^{OCH₃} 57.6	172.0	184.0	6.6	7.7
CH ₃	133.4	135.3	138.4	128.1	162.6	51.9	^{CH₃} 15.4	167.9	182.4	8.4	10.2
Cl	134.0	133.0	126.2	126.7	161.5	52.3		176.8	190.3	6.9	8.2
Br	134.6	135.4	110.6	129.5	161.3	52.4		177.3	191.3	7.2	8.7
I	135.4	140.2	77.5	135.2	160.9	52.3		177.2	191.4	7.8	9.6
CHO	135.8	131.2	142.9	140.4	161.7	52.5	^{CHO} 184.3	174.1	186.5	7.9	9.5
COCH ₃	134.9	132.5	142.8	137.2	161.9	52.4	^{COCH₃} 191.3 ^{COCH₃} 27.4	173.0	185.9	7.7	9.0
COOCH ₃	134.6	133.5	134.1	138.0	161.8	52.3	^{COOCH₃} 162.3 ^{COOCH₃} 52.0	174.9	188.8	7.6	9.2
NO ₂	134.9	127.3	148.4	132.1	160.9	52.9		180.8	193.9	6.0	7.4

との相互作用がいろいろ考えられる。(Ⅲ)では $\delta_{C_4} > \delta_{C_2} > \delta_{C_3}$ の順に変化している。
 δ_{C_3} の変化は非常に小さい。 $\delta_{C=O}$ や δ_{CH_3} の変化は非常に小さいが (I) と同じ傾向を示している。

カップリング定数は $^1J_{C_4H_4}$ が 167.6 ~ 180.8 Hz, $^1J_{C_5H_5}$ が 185.0 ~ 193.9 Hz の間に観測された。置換基による変化は (I) では $\Delta ^1J_{C_4H_4} > \Delta ^1J_{C_5H_5}$, (Ⅱ) では $\Delta ^1J_{C_3H_3} > \Delta ^1J_{C_5H_5}$, (Ⅲ) では $\Delta ^1J_{C_4H_4} > \Delta ^1J_{C_3H_3}$ である。また $^3J_{C_3H_4}$, $^3J_{C_5H_3} > ^2J_{C_4H_5}$, $^2J_{C_5H_4}$, $^2J_{C_3H_4}$, $^2J_{C_4H_3}$ が観測された。

表 3.  の δ (ppm) と J (Hz)

X	δ_{C_2}	δ_{C_3}	δ_{C_4}	δ_{C_5}	$\delta_{C=O}$	δ_{CH_3}	$^1J_{C_2H_3}$	$^1J_{C_4H_4}$	$^2J_{C_3H_4}$	$^2J_{C_4H_3}$	
OCH ₃	118.8	133.2	105.6	172.5	162.8	51.7	^{OCH₃} 60.4	170.3	169.8	4.0	5.4
CH ₃	131.2	133.9	126.4	147.9	162.6	51.8	^{CH₃} 15.6	170.0	167.8	5.2	4.8
Cl	132.0	133.0	127.3	137.4	161.5	52.2		173.3	174.6	4.3	5.0
Br	134.9	133.6	130.9	120.2	161.4	52.2		173.1	175.0	4.5	5.1
I	139.3	134.3	137.7	82.6	161.1	52.2		172.7	174.7	5.1	5.2
CHO	141.0	133.4	135.0	148.0	161.9	52.7	^{CHO} 183.2	173.8	170.7	4.6	4.6
COCH ₃	139.7	133.4	131.6	148.9	162.0	52.5	^{COCH₃} 190.5 ^{C=O} 24.9	173.1	170.2	4.5	5.1
COOCH ₃	139.0	133.0	133.0	139.0	162.0	52.5	^{COOCH₃} 162.0 ^{C=O} 52.5	173.0	173.0	4.9	4.9
NO ₂	138.5	131.7	128.0	155.5	161.0	53.0		176.7	178.1	3.6	4.8

置換 2-チオフェンカルボン酸メチルと置換チオフェンの相当する¹³C化学シフトとの関係、¹³C-¹Hカップリング定数の相関性、置換 2-チオフェンカルボン酸メチルの¹³C化学シフトと¹H化学シフトの相関性を最小二乗法で求めた結果が表 4 に示される。4-置換 2-チオフェンカルボン酸メチル(II)と 3-置換チオフェン(V)の¹³C化学シフトの相関関係は 4つの環炭素とも非常に良好な関係が得られた。0.9以上の相関係数と 0.9~1.1のこう配は(V)の化学シフトから(II)の化学シフトを正確に予測出来ることを示している。5-置換 2-チオフェンカルボン酸メチル(III)と 2-置換チオフェン(IV)の関係は δ_{C_3} (III)~ δ_{C_4} (IV)の関係を除いて 0.99以上の相関係数と約 0.93のこう配を示し良好な直線関係が得られている。(III)の 3-位や(IV)の 4-位は、いわゆるメタ位に相当するため置換基の影響をわずかに受けにくいところである。そのため X と COOCH₃ の共鳴系への関与などの相互作用によって化学シフトがわずかに変化しても相関関係に大きくひびくことが考えられる。3-置換 2-チオフェンカルボン酸メチル(I)と 3-置換チオフェン(V)の関係は δ_{C_5} (I)~ δ_{C_5} (V)の関係を除き、いずれも良好な相関係数が得られている、しかし標準偏差が大きくなり、こう配が δ_{C_4} (I)~ δ_{C_4} (V)では 1.4 になり、逆に δ_{C_2} (I)~ δ_{C_2} (V)では 0.68 になっている。この理由は X と COOCH₃ の立体障害などによるコンホメーションの変化、共鳴系への影響などが考えられる。

置換 2-チオフェンカルボン酸メチルと置換チオフェンのカップリング定数($^1J_{CH}$)の相関関係はいずれも良好であった。

¹³C化学シフトと¹H化学シフトの関係では δ_{C_5} (II)~ δ_{H_5} (II)、 δ_{C_4} (III)~ δ_{H_4} (III)の相関性はかなり良好であったが、他は相関性を示さなかった。チオフェンの $\delta_{C\alpha}$ と $\delta_{C\beta}$ の順序が $\delta_{H\alpha}$ と $\delta_{H\beta}$ では入れかわるように、置換 2-チオフェンカルボン酸メチルのいくつかの化合物で同じような結果が得られている。このような結果が相関関係を悪くしている。

表4. 置換2-チオフェンカルボン酸メチルと置換チオフェンの
NMRデータの相関性

	cc	slop	intercept	sd
\sim	0.967	0.677	44.6	1.86
\sim	0.995	0.902	17.7	2.07
\sim	0.982	1.39	-47.4	1.02
\sim	0.023	0.026	128.8	1.60
\sim	0.917	-1.09	-3.12	0.40
\sim	0.993	1.06	-2.00	0.46
\sim	1.000	0.981	2.65	0.62
\sim	0.996	0.898	18.9	0.84
\sim	0.991	0.931	16.0	0.85
\sim	0.257	0.154	113.8	0.63
\sim	0.995	0.934	8.83	0.81
\sim	0.998	0.937	14.6	1.46
\sim	0.991	0.903	18.6	0.46
\sim	0.975	1.04	-8.26	0.44
\sim	0.996	0.958	9.74	0.36
\sim	0.999	0.973	4.99	0.19
\sim	0.990	0.854	27.5	0.30
\sim	0.994	0.899	19.6	0.30
\sim	0.037	0.764	123.0	5.50
\sim	0.098	0.814	124.7	0.99
\sim	-0.065	-0.959	140.2	4.16
\sim	0.847	13.6	25.9	5.02
\sim	-0.361	-1.87	147.7	0.61
\sim	0.746	12.5	37.8	5.55

3-メチルおよび3,6-ジメチルピリダジンの ^{13}C - ^{15}N , ^{15}N - ^{15}N
 スピン結合定数の符号決定とINDO-MO計算
 (京大薬, 京都薬科大*, 日本電子**)
 ○黒田義弘 藤原靖弘* 松下和弘**

1. ^{13}C - ^{15}N スピン結合定数, $^n\text{J}(\text{C}-\text{N})$, はその大きさおよび符号が ^{15}N 核の混成状態および lone pair の配向に大きく依存することが知られており興味深い。先に我々は cis-アゾベンゼンおよびベンゾ[C]シニリンのように, $-\text{N}=\text{N}-$ 結合の lone-pair が cis に配置しているとき $^n\text{J}(\text{C}-\text{N})$ が \oplus 符号で絶対値が相当大きくなることを報告した。¹⁾ 本研究においてはこの事をさらに確認するために cis 形の $-\text{N}=\text{N}-$ 結合を持ったより単純な化合物としてピリダジンを選り, そのモノおよびジメチル置換体の ^{15}N エンリッチした試料を合成し $^n\text{J}(\text{C}-\text{N})$ の符号を決めた。またモノメチル体については $^n\text{J}(\text{N}-\text{N})$ も観測した。さらに $^n\text{J}(\text{C}-\text{N})$, $^1\text{J}(\text{N}-\text{N})$ の IND0-M0 計算も行った。

2. 3-メチルおよび3,6-ジメチルピリダジン- $^{15}\text{N}_2$ は硫酸ヒドラジン- $^{15}\text{N}_2$ を ^{15}N 源として用い合成した。 ^{13}C (50MHz) および ^{15}N (20MHz)-NMR スペクトルは JEOL FX-200 にて測定した。また比較のために 20MHz における $^n\text{J}(\text{C}-\text{N})$ の測定も Varian CF T-20 にて行った。試料は重クロロホルム溶液とした。 ^{13}C - ^{15}N スピン結合の分裂相手 (N1 or N2) および N1 , N2 の帰属は ^{13}C - $\{^1\text{H}(\text{noise}), ^{15}\text{N}(\text{selective})\}$ といったタイプの三重共鳴実験により決定した。

3. $^n\text{J}(\text{C}-\text{N})$ の符号は 3-メチル体と 3,6-ジメチル体の ^{13}C シグナルの分裂幅を比較することにより決定した。すなわち 3,6-ジメチル体の ^{13}C -NMR スペクトルのスピニ系は $\text{AA}'\text{X}$ (AA' : ^{15}N 窒素, X : natural abundance ^{13}C) と考えられるから $\frac{1}{2}(\text{J}_{\text{AX}} + \text{J}_{\text{A}'\text{X}})$ の分裂幅を符, た triplet として各々のシグナルは出現するはずである。一方 3-メチル体は近似的に J_{AX} , $\text{J}_{\text{A}'\text{X}}$ の絶対値を与えるであろうから, J_{AX} と $\text{J}_{\text{A}'\text{X}}$ との間の相対符号が得られる。図1に 3,6-ジメチル体(図1a) 及び 3-メチル体(図1b) の C_4 C_5 に関しての ^{13}C - ^1H NMR スペクトル

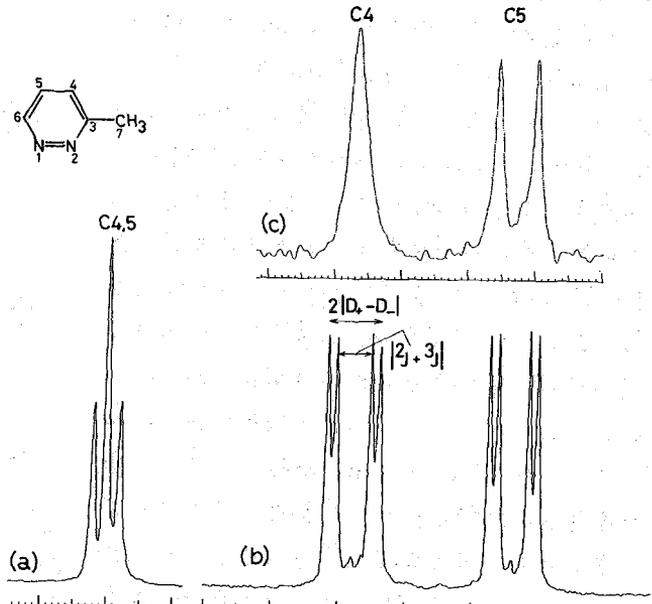


図1 (a) 3,6-ジメチルピリダジンの C_4 C_5 の ^{13}C - ^1H スペクトル。 (b) 3-メチルピリダジンの C_4 と C_5 の ^{13}C - ^1H スペクトル。 (c) 同上の ^{13}C - $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴スペクトル, N1 を照射。

くすだよしひろ おじあらずすひろ まつしたかずひろ

を示す。また $N1$ を *selective* に照射した場合の三重共鳴実験例を図1c に示す。スペクトル(図1b, c)から明らかのように $C4, C5$ 共に小さい方の分裂(1.3Hz)は 2J , 大きい方(6~6.5Hz)は 3J によるものであることがわかる。また三重共鳴実験は、このようにスピン結合の相手を決めるために重要であるばかりでなく、 $N1, N2$ の帰属の確認にも有効であった。すなわちメチル基 $C7$ は 9.6 Hz の大きな分裂を示すが、これが $N2$ とのスピン結合によるものであることは $C7$ が $N2$ の lone-pair と *cis* の関係にあることより明らかであり $^{13}C-^{1}H$ 実験より $N2$ を特定することができた。表1に ^{13}C 化学シフト及び観測された $^{13}C-^{15}N$ スピン結合による分裂幅をまとめて示す。 $C4, C5$ の場合 3, 6-ジメチル体での分裂幅は 4 Hz であるので 2J と 3J は異符号と決定でき、 $C3, C6$ については共に $^1J, ^2J$ は同符号であることがわかった。さらに絶対符号としてはアゾベンゼン、ベンゾ[C]シニリンの $^1J(C-N)$ が \oplus であることよりの類推から 3-メチル体のこれもやはり \oplus であることに間違いないと考えられるが、念のためさらに 1J の符号を決める別の方法である Jakobsen 等の方法²⁾を試みた。この方法によれば $^1J(C6-N1)$ の符号を $^2J(H6-N1)$ に対する相対符号として決めることが出来る。ここでこの $^2J(H6-N1)$ は $H6$ が $N1$ の lone-pair と *cis* の関係にあることより \oplus であることは明らかであるので、結果として $^1J(C6-N1)$ の絶対符号が得られる。実験例を図2に示す。(a)は通常の $^{13}C-^{1}H$ スペクトルであり($^1J = 6.4\text{ Hz}$, $^2J = 4.8\text{ Hz}$)、(b)は $H6$ の化学シフト位置において *selective* に照射 ($^{1}H/2\pi \sim 1350\text{ Hz}$) したものである。この照射位置を高磁場側(c), 低磁場側(d)に 10 Hz ずらすと、(c)の場合 $f_1 f_2$ の、(d)の場合 $f_3 f_4$ の位置においてシグナルが良く伸びる($^2J(C6-H6)$ が効果的に減少している)ことから $^1J(C6-N1)$ と $^2J(H6-N1)$ は異符号、つまり $^1J(C6-N1)$ は先の類推どおり \oplus 符号であることがわかる。以上のようにして決めた 3-メチルピリダジンの $^2J(C-N)$ の相対符号、さらには類似化合物との比較からの絶対符号、もしくは図2のようにして決めた絶対符号を表1に示した。ここで 3-メチルピリダジンの $^2J(C-N)$ の大きさについて注意しなくてはならないことは $N1, N2$ のスピン系が AB 型(^{13}C も含めれば ABX, $\Delta\nu = 68.4\text{ Hz}$, $^1J(N-N) = 22.1\text{ Hz}$) であるため

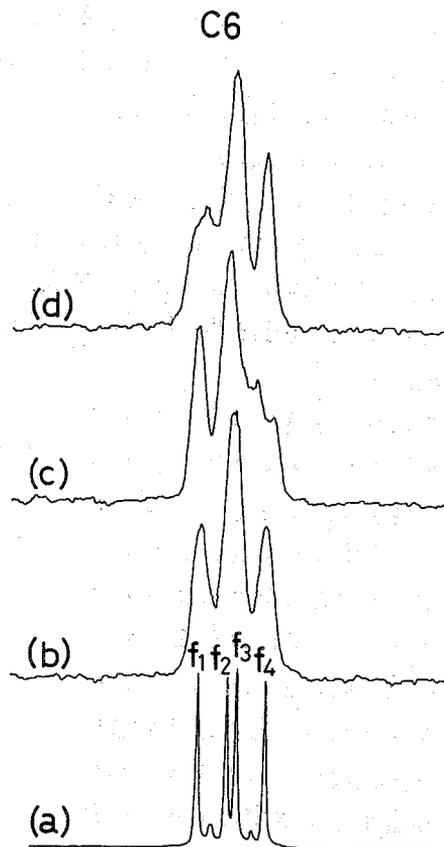


図2. 3-メチルピリダジンの $C6$ の ^{13}C スペクトル (a) $^{13}C-^1H$, (b) $H6$ の共鳴周波数位置を *selective* に照射, (c) $H6$ の共鳴周波数から高磁場側へ 10 Hz ずらして照射, (d) 逆に低磁場側へ 10 Hz ずらして照射。

Table I: Observed ^{13}C - ^{15}N Splittings, ^{13}C Chemical Shifts, ^{15}N Chemical Shifts and the ^{15}N - ^{15}N Spin-Spin Coupling Constant of 3,6-dimethylpyridazine- $^{15}\text{N}_2$ and 3-methylpyridazine- $^{15}\text{N}_2$ in CDCl_3

carbon/ nitrogen	chemical shifts ^a		n	3,6-dimethyl		3-methyl		$2 D_+ - D_- $ ^e	
	3,6- dimethyl	3- methyl		$ ^nJ_{\text{C}} + ^{n+1}J_{\text{N}} $ ^b	nJ_{C}	$^{n+1}J_{\text{N}}$	$ \Delta $ ^d	calc (d)	obsd
C3	157.6	160.2	1	10.3	+6.0(5.9)	+4.8(4.9)	0.5	1.1	1.2
C4	126.8	126.9	2	4.0	+1.3(0.7)	-6.5(5.9)	1.2	7.4	7.8
C5	126.8	126.4	2	4.0	+1.3(0.7)	-6.0(5.3)	0.7	7.0	7.3
C6	157.6	149.4	1	10.3	+6.4(6.3)	+4.8(5.0)	0.9	1.5	1.6
C7	21.9	22.3	2	11.5	-9.6(8.9)	-1.8(2.4)	0.1	7.4	7.8
N1	16.7	22.2	1		(-)22.1				
N2	16.7	18.9	1		(-)22.1				

^aIn ppm from Me_4Si for ^{13}C and from NO_3^- for ^{15}N , ± 0.1 ppm.

^bSeparations between the outer lines of a triplet observed in 3,6-dimethylpyridazine- $^{15}\text{N}_2$. In Hz, ± 0.1 Hz.

^c ^{13}C - ^{15}N splittings observed in 3-methylpyridazine- $^{15}\text{N}_2$ at 50.2 MHz; the values in parentheses are those at 20.0 MHz. In Hz, ± 0.1 Hz. For nitrogen atoms, $^1J_{\text{N-N}}$ is shown here and its sign was estimated from INDO-MO calculations.

^dDifferences between $|^nJ_{\text{C}} + ^{n+1}J_{\text{N}}|$ of 3,6-dimethylpyridazine- $^{15}\text{N}_2$ and that of 3-methylpyridazine- $^{15}\text{N}_2$.

^eSeparations between inner lines of a double-doublet for C3, C6, and C7, and those between outer lines for C4 and C5 in 3-methylpyridazine- $^{15}\text{N}_2$; D_+ and D_- have their usual meanings. In Hz, ± 0.1 Hz for observed values.

図1bや図2dにおいて見られる分裂幅は真の $^nJ_{\text{C-N}}$ の大きさではなく図1bに示した double-doublet の間隔は $2|D_+ - D_-|$ もしくは、分裂に関与している2種のJの和に相当する。しかるに、これらの分裂幅を検討した結果、近似的には first-order で解釈してもよいことがわかった。表1の結果をまとめると次のような特徴がピリダジンの $^nJ_{\text{C-N}}$ についてわかった。

(1) $^1J_{\text{C-N}}$ は ⊕ 符号であり、絶対値は one-bond lone-pair 効果³⁾ を考慮して予想されるもの(つまり0に近い値)よりはるかに大きい。たとえばピリジンでは $^1J_{\text{C-N}} = +0.6$ Hz。

(2) ピリダジン環内において $^2J_{\text{C-N-N}}$ (+4.8 Hz) は $^2J_{\text{C-C-N}}$ (+1.3 Hz) より大きい。

(3) $^3J_{\text{C-N}}$ (-6 ~ -6.5 Hz) は絶対値においてピリジンの $^3J_{\text{C-N}}$ (-3.9 Hz) より大きい。

(4) この $^3J_{\text{C-N}}$ はメチル基炭素の $^3J_{\text{C7-N1}}$ (-1.8 Hz) よりやはり絶対値は大きい。

また $^1J_{\text{N-N}}$ については(5) $^{15}\text{N-NMR}$ から観測された $^1J_{\text{N-N}}$ の絶対値 22.1 Hz はこれまでに報告されたなかで最も大きい値である。

これらの特徴のうち
 (1)(2)(3)(5)は二つの隣
 接した *cis* 配置 lone-
 pair の存在のためと
 考えられる。また(4)
 はスピニ結合の経路
 の geometry のちがい
 によるものと考えら
 れ、同様の結果が
 Braun 等⁴⁾によつて
 も報告されている。
 次にこのような特徴
 が理論的計算によ
 ても再現出来るかど
 うか調べるために、
 3-メチルピリダジン
 およびピリジンにつ
 いて EINDO-MO
 法によるスピニ結合
 定数の計算⁵⁾を行
 った(表2)。その結果
 上記の特徴(1)~(4)は
 全て理論的にも再現
 することが出来、さ
 らには絶対値そのも
 のも非常に良く再現することが出来た。

Table II: Calculated and Experimental Coupling Constants(Hz)

	FC ^a	OB ^a	SD ^a	J(total)	J(exptl)
3-methylpyridazine					
¹ J(C3-N2)	4.9	3.4	-1.0	7.3	+6.0
¹ J(C6-N1)	3.6	3.5	-1.1	6.0	+6.4
² J(C3-N1)	4.1	-0.0	1.0	5.1	+4.8
² J(C6-N2)	4.6	0.0	1.1	5.7	+4.8
² J(C4-N2)	3.5	-0.7	1.1	3.9	+1.3
² J(C5-N1)	3.4	-0.7	1.1	3.8	+1.3
² J(C7-N2)	-2.9	-0.1	0.0	-3.0	-9.6
³ J(C4-N1)	-6.7	-0.5	-1.6	-8.8	-6.5
³ J(C5-N2)	-6.5	-0.5	-1.6	-8.6	-6.0
³ J(C7-N1)	-1.0	-0.0	-0.1	-1.1	-1.8
¹ J(N1-N2)	-17.9	-4.0	0.7	-21.2	-22.1
pyridine					
¹ J(C2-N)	-1.4	3.4	-0.7	1.3	+0.6 ^b
² J(C3-N)	3.2	-0.2	0.5	3.5	+2.5 ^b
³ J(C4-N)	-3.7	-0.2	-0.9	-4.8	-3.9 ^b

^aFC=Fermi contact term; OB=orbital-dipole term; SD=spin-dipole term. The parameters employed were $S_N^2(0)=5.246$, $S_C^2(0)=3.012$, $\langle r^{-3} \rangle_N=2.472$, and $\langle r^{-3} \rangle_C=1.430$.⁶

^bTaken from ref 7

[文献]

- 1) 黒田, 藤原. 第21回 NMR 討論会(1982)要旨集 P. 181 ; Kuroda, Y.; Fujiwara, Y. J. Phys. Chem. 1982, 86, 4913-8.
- 2) Jakobsen, H. J.; Bundgaard, T.; Hansen, R. S. Mol. Phys. 1972, 23, 197-201.
- 3) Schulman, J. M.; Venanzi, T. J. Am. Chem. Soc. 1976, 98, 4701-5.
- 4) Braun, S. Org. Magn. Reson. 1976, 8, 273-4.
- 5) Blizzard, A. C.; Santry, D. P. J. Chem. Phys. 1971, 55, 950-63; 1973, 58, 4714.
- 6) Towl, A. D. C.; Schaumburg, K. Mol. Phys. 1971, 22, 49-66.
- 7) Bundgaard, T.; Jakobsen, H. J. Tetrahedron Lett. 1974, 1621-4.

アルカロイド類の立体化学における ¹H T₁ 及び NOE の利用

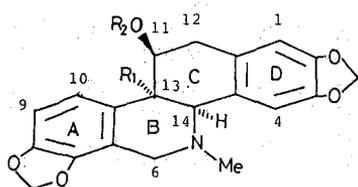
(神戸女子薬大) ○杉浦 真穂子 岩佐 衣子 高尾 樹雄

[はじめに]

アルカロイドの立体化学、特に窒素の反転、環の反転を含む Conformation は、その生理活性、生合成などとの関係から大きな興味を帯びている。その溶液中での立体化学は、古くから IR、NMR を駆使して多くの研究がなされて来たが、近年は、¹³C 化学シフトの利用、高磁場 ¹H NMR による詳細な結合定数の検討などによる研究が多く行われている。

今回、演者らは、イソキリリアルカロイドの一つである Benzophenanthridine 型アルカロイドを取り上げ、その Conformation を ¹H T₁ (nonselective 及び selective)、NOE を使って決定する試みを行った。これは、この分野ではこれまであまり多く利用されていなかった ¹H T₁、NOE が、これらの Conformation の解明にどの程度利用出来るかを検討し、それらと従来の主として結合定数などを用いて行われて来た方法とを比較することを目的としている。

今回実験に用いたのは、Chelidonium (1)、Corynoline (2) 及びそれらの Ac 体 (3, 4) など四つの Benzophenanthridine 型アルカロイドである。これらは、B/C 環結合 cis、-OR の配位 β であることは、以前から知られていたが、二つの cis 型 (Type I, II) の内どちらをとるか、N-Me 基の配位、C 環の型など、議論の対象になっている。



R ₁	R ₂	
H	H	Chelidonium (1)
H	AC	Acetylchelidonium (2)
Me	H	Corynoline (3)
Me	AC	Acetylcorynoline (4)

[実験]

それぞれのアルカロイドを約 0.03M の濃度で CDCl₃ に溶解し、脱ガスして測定サンプルとした。

測定は Varian XL-200 (200.06 MHz) を使い、Nonselective T₁ は IR 法、Selective T₁ は、

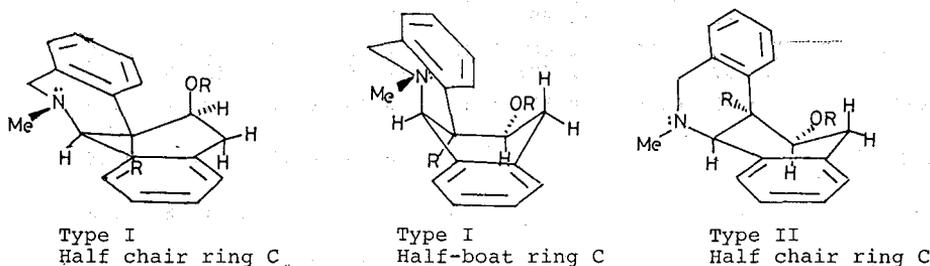


Figure 1. Some conformational possibilities.

すぎうら まきこ、 いゆさ きぬこ、 たかあ けらあ

デカッポラーによる選択的180°パルスを用いたIR法によった。定量的NOEは、差スペクトルを用いてその値をもとめた。いすれの場合も二又は三回の実験を行い、その平均値を実験値とした。

計算は、おびに報告した方法¹⁾、おびめち決定した conformation によって必要はすべてのH-H間距離を求め、それらを入力して、Nonselective T_1 , Selective T_1 , NOE それぞれについて別個に、実験値と計算値が一層よく一致するようは相関時間 τ_c を求める方法を行った。実際には、先に T_1 によって τ_c を求め、それを用いて NOE の値を計算し、実験値と比較検討して、最適は conformation を決定した。

〔結果と考察〕

実験によって得られた、それぞれの化合物の名プロトンの Nonselective T_1 (T_1^{ns})、

Table I The nonselective and selective $^1\text{H } T_1$'s for 1, 2, 3 and 4. (sec.)

	1		2		3		4	
	T_1^{ns}	T_1^s	T_1^{ns}	T_1^s	T_1^{ns}	T_1^s	T_1^{ns}	T_1^s
H-1	3.58 (3.25)	5.13	3.61 (3.37)	4.86	3.50 (3.35)	4.91	3.87 (3.42)	5.16
H-4	2.16 (1.39)	2.98	3.28 (3.15)	4.65	2.13 (1.41)	2.94	2.44 (2.59)	3.50
H-6 α	0.62 (0.50)	1.01	0.57 (0.62)	0.79	0.61 (0.50)	0.86	0.60 (0.54)	0.94
H-6 β	0.67 (0.58)	0.96	0.60 (0.61)	0.89	0.64 (0.59)	0.98	0.64 (0.60)	0.90
H-9	--- ^a	--- ^a	3.95 (4.13)	6.27	3.39 (3.83)	4.88	3.98 (4.25)	5.73
H-10	--- ^a	--- ^a	2.27 (2.09)	3.33	1.34 (1.37)	1.67	1.51 (1.59)	1.94
H-11	1.22 (1.22)	1.52	1.34 (1.44)	1.96	1.25 (1.33)	1.46	1.42 (1.39)	1.96
H-12 α	0.62 (0.48)	0.65	0.53 (0.54)	0.62	0.64 (0.47)	0.67	0.57 (0.50)	0.57
H-12 β	0.67 (0.55)	0.65	0.55 (0.59)	0.81	0.64 (0.55)	0.67	0.59 (0.62)	0.68
H-13	1.46 (1.29)	2.13	1.09 (0.99)	1.42				
H-14	1.45 (1.07)	1.95	1.00 (1.48)	1.46	1.26 (1.18)	1.75	1.21 (1.19)	1.60
N-Me	0.43	0.46	0.53	0.55	0.43	0.45	0.72	0.76
13-Me					0.70	0.75	0.55	0.55
Ac-Me			1.47	1.40			1.46	1.38
-OCH ₂ O-	1.56	1.59	1.17	1.19	1.58	1.58	1.44	1.49

Values in brackets represent the calculated T_1^{ns} 's.

a undetectable because of a overlap of the signals,

Table II. The NOE values for 1, 2, 3 and 4. (%)

Compound 1 Sat'd	Observed									
	H-1	H-4	H-14	H-6 α	H-6 β	H-10	H-13	H-11	H-12 α	H-12 β
H-1,4			14.8 (14.9)						2.3 (2.7)	4.5 (2.5)
H-14		19.1 (18.9)		--- ^a (6.1)			10.0 (15.9)			
N-Me		17.9 (27.5)	4.2 (3.3)	5.3 (4.2)	8.5 (2.3)					
H-6 α			--- ^a (11.4)		27.9 (44.4)					
H-6 β				28.7 (38.4)						
H-9,10						10.8 (13.3)	3.5 (7.6)			
H-13		8.6 (13.2)			14.7 (15.6)		8.2 (11.5)			
H-11				8.3 (9.9)	9.1 (12.4)			7.4 (7.2)	3.1 (0.3)	
H-12 α	16.1 (15.5)						17.2 (15.9)		--- ^a (40.8)	
H-12 β	22.6 (13.0)							--- ^a (36.3)		
Compound 2										
H-1								2.8 (0.6)	4.7 (5.0)	
H-4,10		6.5 (5.3)			6.0 (6.7)					
H-14		11.1 (12.5)				14.6 (11.2)	12.2 (11.0)			
N-Me		3.3 (2.0)		7.6 (6.7)		12.4 (22.0)				
H-6 α					30.6 (42.4)					
H-6 β	21.1 (29.0)			24.3 (42.3)						
H-13			11.6 (16.9)			7.4 (9.5)	12.3 (10.1)			
H-11			10.7 (11.3)			3.6 (2.2)	10.3 (6.9)		6.4 (7.0)	
H-12 α	32.9 (26.4)						17.5 (16.2)		--- ^a (39.7)	
H-12 β					10.6 (12.7)			--- ^a (36.8)		

Compound 3 Sat'd	Observed								
	H-1	H-4	H-14	H-6 α	H-6 β	H-10	H-11	H-12 α	H-12 β
H-1,4		15.1 (15.9)							3.4 (2.6)
H-14		19.9 (18.9)		2.1 (6.1)					
N-Me		22.0 (27.3)	4.1 (3.6)	5.1 (4.2)	10.7 (2.4)				
H-6 α			--- ^a (12.1)		24.6 (44.5)				
H-6 β				20.2 (38.3)					
13-Me			10.7 (10.3)			21.0 (21.1)			3.0 (3.1)
H-12	39.0 (46.9)							20.5 (28.3)	
Compound 4									
H-1									4.4 (6.0)
H-4			10.1 (15.1)						
H-14,6 α		19.7 (33.7)		--- ^a (43.2)					
N-Me		12.7 (9.1)	4.8 (6.2)	3.7 (3.3)	4.8 (4.5)				
H-6 β				--- ^a (38.6)					
H-10								7.4 (6.3)	
13-Me			12.7 (11.7)			17.4 (22.9)	13.8 (14.0)		
H-11						6.5 (7.2)		6.0 (8.9)	
H-12 α	33.5 (34.3)						17.3 (20.7)	--- ^a (43.0)	
H-12 β								--- ^a (35.9)	

Values in brackets represent the calculated NOE's.

a The NOE is undetectable because the observed signal is close to the saturated signal.

Selective T_1 (T_1^S) を Table I に示した。いずれの化合物でも、Me 基及び化学シフトの接近したメチレンプロトン以外では、 T_1^S と T_1^{ns} の関係が成り立っており、これは ω に $\ll 1$ で、しかも Me 基以外では、双極子緩和によっていることを示すものである。従って、この条件のもとでは、 T_1^{ns} 、 T_1^S どちらで計算を行っても結果的に同じ計算をすることになるので、今回は、データの多い T_1^{ns} を用いて計算を行い、 T_1^S は参考程度にとどめた。一方、Table II に NOE の値を示してある。

それぞれの Conformation は、すでに報告、議論されているものを参考に、B/C cis の二つのタイプ、C 環の型、N-Me 基の配座などについて、いくつかの可能性の高い Conformation を仮定して計算を行った。得られた最適な Conformation と τ_C を Table III に、その時の T_1^{ns} 及び NOE の計算値を Table I と Table II に () で示してある。

と、よについては、C 環: Half chair 又、N-Me: eq. \Rightarrow ax. 付について検討したが、得られた Conformation の方が、必ずしも R-factor が小さかった。しかし、それらの中間の型など、もう少し検討する余地があるように思われる。先については、H 化学シフトを根拠にして、N-Me: eq. \Rightarrow ax. の平衡にあるといわれているが、この実験からはむしろ等、側へ出していることが示唆される。

得られた分子の回転相関時間 τ_C は、よと先がそれぞれほとんど等しい値になっている。このことは、13 位の Me 基の有無が分子の運動には何ら影響を与えていないことを示している。又 Ac 体むねが τ_C が小さくなっているのは、-OH 及び -OAc の型の方が、CDCl₃ 中ではより運動しやすい状態にあると考えられる。

Table III The optimum conformations and correlation times (τ_C) for 1, 2, 3 and 4.

Compound	Conformation			τ_C ($\times 10^{-11}$)	R-factor (%)	
	Type of cis	ring C	N-Me		T_1^{ns}	NOE
1 ~	I	Twist half chair	eq.	6.3	30.1	40.1
2 ~	II	Half chair	ax.	5.7	8.9	45.0
3 ~	I	Twist half chair	eq.	6.2	15.1	44.3
4 ~	I	Twist half boat	eq.	5.8	8.6	33.9

[文献]

- 1) M. Sugiura, H. Beierbeck, P. C. Belanger, and G. Kotovych, J. Am. Chem. Soc., 106 4021 (1984), 才 22 回 NMR 討論会講演要集 P106 (1983)

(東北大理) ○中平靖弘 小山剛司 櫻井英樹

ケイ素は地表における存在量が酸素について大きい元素でケイ酸塩として無機化学の世界に属していた。しかし、E. G. Rochow によるメチルクロロシランの“直接合成法”の出現によって、有機化学および高分子化学の世界でも重要な地位を占めるようになった。

一方、FTNMRの出現とその測定法の飛躍的進歩によって、NMR分光が対象とできる核種は大いに増大した。このような状況の中で、 ^{29}Si NMRが多種多様な有機ケイ素化合物について測定されるようになって、これが有機ケイ素化学研究における有力な手段の一つになりつつある。¹⁾ ケイ素は炭素の同族元素、すなわちともにIVB族元素である。したがって、 ^{29}Si NMRと ^{13}C NMRの間には類似性が期待されるが、実際、3員環化合物、シラシクロプロパンの ^{29}Si NMRシグナルおよびシクロプロパンの ^{13}C NMRシグナルはともに高磁場に位置していて、一般に飽和化合物(sp^3)、不飽和化合物(sp^2)に移行するにつれて両シグナルは低磁場シフトする。しかし、ケイ素は五および六配位化合物を形成することが可能であり、これによって ^{29}Si NMRシグナルは大きく高磁場にシフトすると云ったケイ素原子の特徴も ^{29}Si NMRに現れる。最近、我々は遷移金属と直接結合したケイ素化合物の ^{29}Si NMRシグナルおよびシラニルボルナジエン誘導体の ^{29}Si NMRシグナルが対応する ^{13}C NMRシグナルと異なり大きく低磁場に位置することを見出し報告した。²⁾ 今回、一連のエチニルおよびエチレニシラン類の ^{29}Si および ^{13}C NMRを測定したところ、エチニル基とケイ素基との相互作用に基づくと考えられる化学シフトの異常性を見出したので報告する。

NMRパラメーターと分子構造パラメーターとの相関関係が幾つか見出されている。その一つに化学シフトと電気陰性度との関係がある。 $\text{H}_{4-n}\text{C}_n\text{X}_n$ 型化合物においては置換基Xの電気陰性度の増加とともに、またnの増加とともに、 ^{13}C NMR化学シフトは低磁場に移行し、化学シフトとnの間には直線関係が見出されている。しかしながら、対応する有機ケイ素化合物 $\text{Me}_{4-n}\text{Si}_n\text{X}_n$ では興味深いことに ^{29}Si NMR化学シフトとnの間には直線関係は認められず、nの増加で一度低磁場に、さうしてnが増加すると逆に高磁場に移行するという傾向が見出されている。この ^{29}Si NMRにおける“異常性”はまず電気陰性置換基による低磁場シフトに加えてケイ素核上に $p\pi-d\pi$ 相互作用による高磁場シフトが加わりかつ後者の効果がn=2以上になると前者にまさるためであるとして説明された。その後、Engelhardt等はこの変化を単一の因子で、すなわちd軌道を考慮することなくケイ素の結合部分の電荷密度 q の変化で説明できることを示した。³⁾

化学シフト(あるいは遮蔽率)は2つの項、反磁性遮蔽項と常磁性遮蔽項 σ_p に分離でき、木素以外の原子では反磁性項は一般に無視できるとされている。

なかだいろやすひろ こやまたけし さくろいひでみ

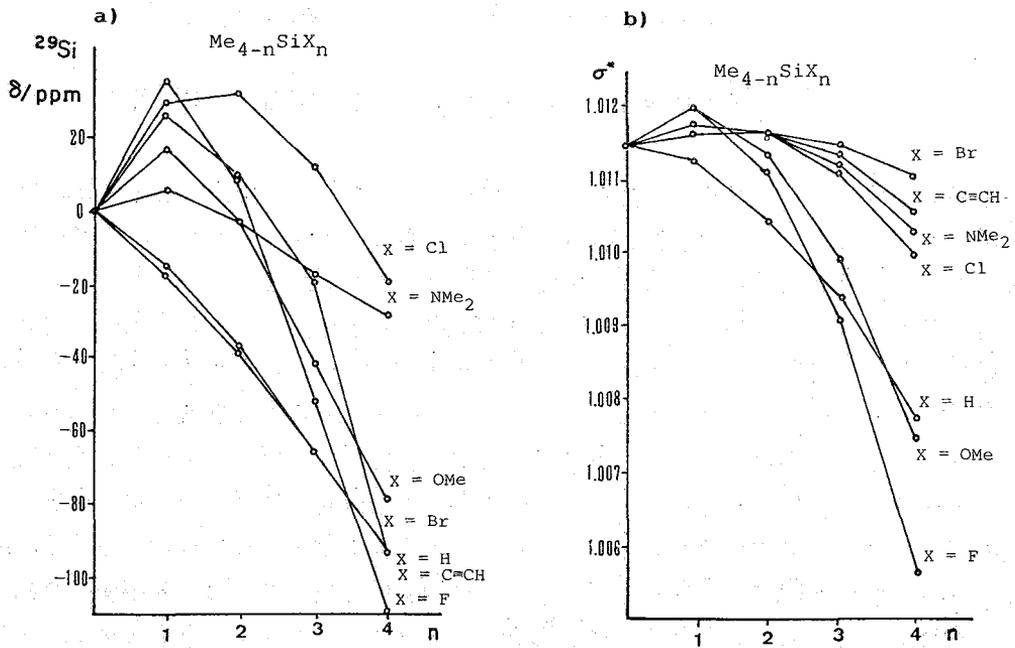


図1 a) $Me_{4-n}SiX_n$ 型化合物の ^{29}Si NMR化学シフトと置換基Xの数nとの関係³⁾
 b) $Me_{4-n}SiX_n$ 型化合物の相対遮蔽定数 σ^* と置換基Xの数nとの関係³⁾(但しX = C≡CHは本実験値)

$$\sigma = \sigma_p = \frac{2e^2\hbar^2}{3\Delta E m^2 C^2} [\langle r^{-3} \rangle_p P_u + \langle r^{-3} \rangle_d D_u] \quad (1)$$

ここで、 ΔE は平均励起エネルギー、 $\langle r^{-3} \rangle_p$ および $\langle r^{-3} \rangle_d$ はそれぞれpおよびd軌道半径の3乗の逆数の平均値、 P_u および D_u はそれぞれp軌道およびd軌道の結合次数-電子密度

Engelhardt等³⁾はケイ素の化学シフトを説明するためにd軌道の寄与を無視して、平均励起エネルギーを一定と仮定して、さらに理想的な無極性原子を仮定し、その遮蔽率数値を基準にとり置換基によって分極を受けた原子の遮蔽率数の変化、すなわち相対遮蔽率数 σ^* を以下のように定義した。

$$\sigma^* = \frac{P_u \langle r^{-3} \rangle_p}{P_u^0 \langle r^{-3} \rangle_p} \cdot \frac{P_u}{P_u^0} = P_u^* R_p^* \quad (2)$$

ここで、 0 印は無極性原子に関するものであることを示す。 P_u^* と R_p^* は置換基の分極率およびケイ素上の電荷によって変化する。計算される相対遮蔽率数は図1に示すように、種々の型のケイ素化合物(エタニルシラン類を除く)で化学シフトの変化とほぼ対応していることがわかる。相関のよくないものでは分散効果、平均励起エネルギーあるいは結合角などが考慮され補正されている。

表 1. $\text{Me}_{4-n}\text{Si}(\text{C}\equiv\text{CH})_n$ の ^{13}C および ^{29}Si NMR 化学シフトおよび $\text{Me}_{4-n}\text{SiH}_n$ の ^{29}Si NMR 化学シフト a)

n	$\text{Me}_{4-n}\text{Si}(\text{C}_1\equiv\text{C}_2\text{H})_n$		$\text{Me}_{4-n}\text{SiH}_n^b$	
	^{13}C C ₁	^{13}C C ₂	^{29}Si Si	^{29}Si Si
0			0	0
1	89.49	93.87	-17.19	-15.5
2	85.94	94.52	-38.91	-37.3
3	83.03	96.67	-64.61	-65.2
4	80.10	96.20	-94.00	-93.1

a) All chemical shift data were in δ value and obtained in CDCl_3

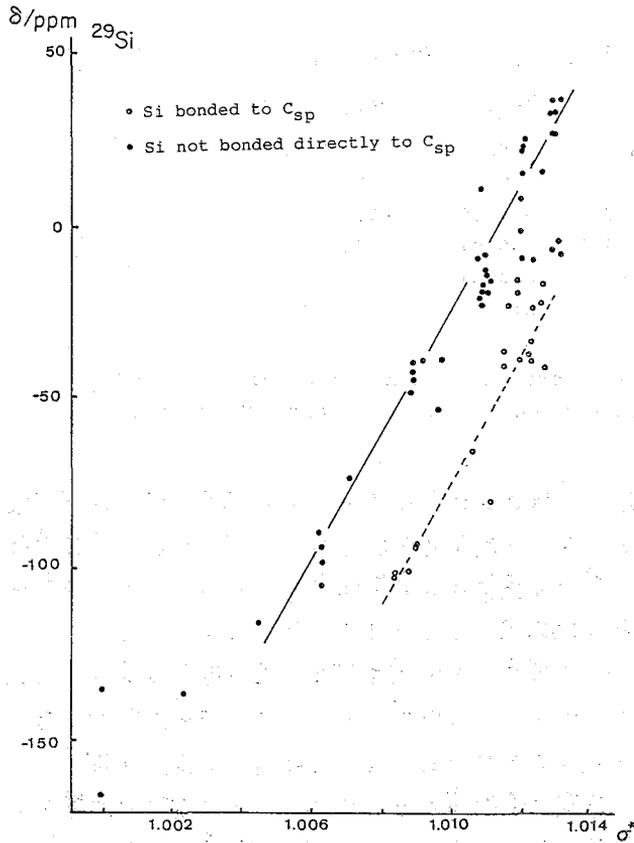
b) V. R. Lower, M. Vongehr and H. C. Marsmann, Chem. Zeit., 99, 33(1975).

エケニルシラン $\text{Me}_{4-n}\text{Si}(\text{C}\equiv\text{CH})_n$ の ^{29}Si および ^{13}C 化学シフト値および $\text{Me}_{4-n}\text{SiH}_n$ の ^{29}Si 化学シフト値を表 1 に示した。エケニル炭素の ^{13}C NMR シグナルはケイ素置換基により大きく低磁場シフトしている。⁴⁾ ケイ素原子に直接結合しているエケニル炭素は n の増加により高磁場に、末端炭素は逆に低磁場にシフトしていることがわかる。

^{29}Si NMR ではケイ素上にアセチレン置換基が 1 個増すごとにその吸収位置は約 20 ppm 程その化学シフトは高磁場側に移動している。興味深いことにこれは最も単純と考える $\text{Me}_{4-n}\text{SiH}_n$ の挙動と極めて類似していることに気付く。この $\text{Me}_{4-n}\text{SiH}_n$ に関しては相対遮蔽定数 σ_A^* が n が増加にともなって単調に高磁場シフトすることが定性的に再現されている。³⁾ そこで、エケニル基の電気陰性度を 0.29 として σ_A^* も計算したところ、⁵⁾ ここでは n の増加につれて一度増大し、次いで減少するとの結果が得られたが、これは実験と一致しない。これはエケニル基に対する電気陰性度の評価が適切でなかったことが原因ではないと思われる。そこで適切な補正因子の導入が必要である。臭素およびヨウ素に対する分散効果、フッ素およびメトキシ基に対する結合ひずみ効果はここでは適当でないと考えられる。そこで、ここで新しい補正項としてケイ素とエケニル基間の軌道相互作用による効果、 $\sigma_{\text{Si-C}}$ を導入してみることにする。これによって、エケニルシラン類の真の遮蔽定数 σ_A^* は (3) のように示されるものと仮定する。

$$\sigma_A^* = \sigma^* + \sigma_{\text{Si-C}} \quad (3)$$

つぎに、今回測定した種々のエケニルおよびエケニルポリシラン類の ^{29}Si NMR データ(表 2) を $\sigma_{\text{Si-C}}$ を導入して整理してみる。ポリシラン化合物について相対遮蔽定数 σ_A^* を用いて、その化学シフトの傾向が再現されているが、⁶⁾ エケニルおよびエケニルポリシラン類では化学シフトと σ_A^* との相関は図 2 に示すようにあまり良くない。しかし、sp 炭素に直接結合したケイ素 (○印) の化学シフトは sp 炭素に直接結合していないケイ素 (●) の値より一様に高磁場シフトしている。しかも、それぞれについて直線関



Chemical Structure	$\delta^{29}\text{Si}/\text{ppm}$
$\text{Me}_2\text{SiMe}_2\text{SiC}=\text{CPh}$ (1)	-36.69
$\text{Me}_2\text{SiMe}_2\text{SiC}=\text{CPh}$ (2)	-18.76
$\text{Me}_3\text{SiMe}_2\text{SiMe}_2\text{SiC}=\text{CH}_2$ (1)	-34.12
$\text{Me}_3\text{SiMe}_2\text{SiMe}_2\text{SiC}=\text{CH}_2$ (2)	-47.26
$\text{Me}_3\text{SiMe}_2\text{SiMe}_2\text{SiC}=\text{CH}_2$ (3)	-15.70
$\text{PhMe}_2\text{SiC}=\text{CH}$	-20.98
$\text{Me}_3\text{SiC}=\text{CPh}$	-17.76
$\text{Me}_3\text{SiSiSiMe}_2\text{MeC}=\text{CPh}$ (1)	-40.65
$\text{Me}_3\text{SiSiSiMe}_2\text{MeC}=\text{CPh}$ (2)	-18.26
$(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{SiC}=\text{CSi}(\text{SiMe}_3)_3$ (1)	-100.9
$(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{SiC}=\text{CSi}(\text{SiMe}_3)_3$ (2)	-11.65
$\text{HSiMe}_2\text{C}=\text{CSiMe}_2\text{H}$	-38.75
$(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{SiMeC}=\text{CPh}$ (1)	-79.15
$(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{SiMeC}=\text{CPh}$ (2)	-14.95
$(\text{PhC}=\text{C})_2\text{SiMe}_2$	-39.24
$\text{Me}_3\text{SiC}=\text{CSiMe}_3$	-19.57
$\text{Me}_3\text{SiMe}_2\text{SiC}=\text{CSiMe}_3$ (1)	-19.58
$\text{Me}_3\text{SiMe}_2\text{SiC}=\text{CSiMe}_3$ (2)	-37.59
$\text{Me}_3\text{SiMe}_2\text{SiC}=\text{CSiMe}_3$ (3)	-19.25
$\text{Me}_3\text{SiMe}_2\text{SiC}=\text{CSiMe}_2\text{SiMe}_3$ (1)	-19.17
$\text{Me}_3\text{SiMe}_2\text{SiC}=\text{CSiMe}_2\text{SiMe}_3$ (2)	-38.09
$\text{PhMe}_2\text{SiC}=\text{CSiMe}_3$ (1)	-18.59
$\text{PhMe}_2\text{SiC}=\text{CSiMe}_3$ (2)	-22.80
$\text{PhMe}_2\text{SiC}=\text{CSiMe}_2\text{Ph}$	-22.31
$(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{SiC}=\text{CPh}$ (1)	-100.3
$(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{SiC}=\text{CPh}$ (2)	-11.40

図2 エチニルおよびエチレンポリシランの ^{29}Si NMR化学シフトと相対遮蔽定数 σ^* の関係

表2 エチニルおよびエチレンポリシランの ^{29}Si NMR化学シフト

係が成立し、かつそれらの直線がほぼ平行になっていることに気付く。これより、補正値 $\delta_{\text{Si-C}}$ をsp炭素を1個有するケイ素に対して、 -0.0013 、またsp炭素2個以上有するケイ素に対して -0.0025 を与えるといふ直線関係が得られることがわかった。

References

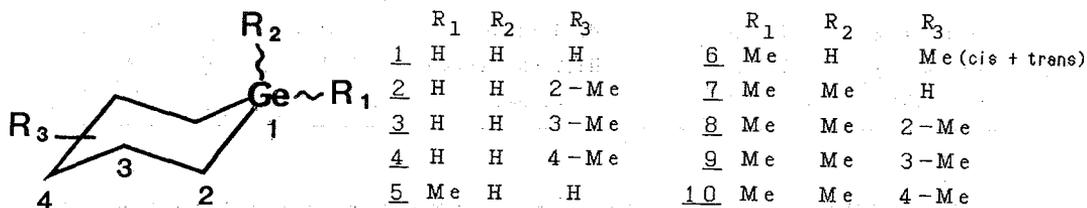
- 1) G. C. Levy, and J. S. Cargioli, "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Nuclei Other Than Protons", Ed., T. Axenrod, and G. A. Weld, John Wiley & Sons, New York, p. 251 (1974).
- 2) H. Sakurai, Y. Kamiyama, A. Mikoda, T. Kobayashi, K. Sasaki, and Y. Nakadaira, J. Organometal. Chem., 201, C14(1980); H. Sakurai, Y. Nakadaira, T. Koyama, and H. Sakaba, Chem. Lett., 213(1983).
- 3) G. Engelhardt, R. Radeglia, H. Jancke, E. Lippmaa and M. Magi, Org. Mag. Reson., 5, 561(1973).
- 4) G. C. Levy, and G. L. Nelson, "Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists", Wiley-Interscience, New York, p. 72(1972).
- 5) P. E. Wells, Prog. Phys. Org. Chem., 6, 111(1968).
- 6) G. Engelhardt, and R. Radeglia, H. Kelling and R. Stendel, J. Organometal. Chem., 212, 51(1981).

(東大教養) ○竹内敬人 下田昌克 田中克巳 友田修司

[序論]

Ge 同位体の中でNMR核として用いられているGe-73は四極核であるため($I = 9/2$)、そのNMRの測定は他の4B族元素(いずれも $I = 1/2$)のNMR測定にはない困難がある。それは四極核には避けられない線幅の問題である。その上Ge-73は、天然存在比も磁気回転比も共に小さいという問題を持つ。

最近我々の研究室では種々の有機ゲルマニウム化合物を合成し、その物性データとくにNMRデータの集積を開始し、そのいくつかを報告してきた。^{1,2)} 今回は日化第49春季年会で予報³⁾したゲルマシクロヘキサン(1)および一連のメチル置換ゲルマシクロヘキサン(2)~(10)のGe-73 NMRスペクトルの測定を試み、併せてGe-73 NMR測定にかかわる諸問題を検討した。



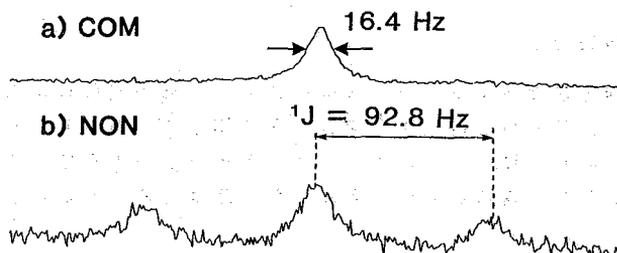
[測定]

Ge-73の共鳴周波数は3.41MHz (^1H 100MHzに換算)と低いため、通常他核測定ユニットの測定範囲の外にある。典型的な測定条件を表に示す。

表1 Ge-73 NMRスペクトルの測定条件

装置	J E O L	F X - 9 0 Q (低周波用インサート	N M - I T	1 0 L F 使用)	
F Q	3. 1 0 M H z	S W	2 0 0 0 H z	P W	9 0 μ s (4 5 °)
D P	4 0 9 6	P D	1 0 0 m s	Ext. Ref	Ge Me ₄ (0. 0)
N T	濃度および線幅に著しく依存する。				

図1 ゲルマシクロヘキサンのGe-73 NMRスペクトル
a)デカップル条件 b)非デカップル条件



○たけうちよしと・しもだまさかつ・たなかかつみ・ともだしゅうじ

[INEPT]

感度向上の手段として、また off-resonance decoupling に代わる方法として、INEPT 内至 DEPT の使用は C-13 NMR ではすっかりルーチン化している。他核 NMR への応用も $I = 1/2$ の核に対しては試みられているが、四極核への応用例は少ない。最近 Mackay⁴⁾ は GeH_4 、 $GeMe_4$ などの Ge-73 シグナルを INEPT 法で観測している。我々もゲルマシクロヘキサンに INEPT 法を適用してみたが、線幅の関係もあり、必ずしも予期通りの感度向上は得られなかった。

[線幅]

四極核の場合、電場の対称性が線幅を支配する。 $GeCl_4$ 、 $GeMe_4$ などの対称性のよい Ge 核の線幅は 1 Hz 程度である。しかし、対称性がくずれると線幅は増大する。代表的ゲルマンの線幅を表 2 に示す。

表 2 Ge-73 シグナルの線幅 (Hz) (* 文献値)

$GeMe_4$	1.3	$Me_3Ge-t-Bu$	20*	<u>1</u>	16.4
$GeCl_4$	1.2	$Me_3GeCH_2CH_2COOH$	54	<u>5</u>	22.3
$Ge(OMe)_4$	17.7*	Me_3GeCH_2Cl	152*	<u>7</u>	15.6

Ge-73 NMR をゲルマニウム化合物の化学交換の研究に利用できるか否かを検討した。(7) は常温ではやい反転をしているが、Ge-73 核自身はシクロヘキサンの環炭素と同様、磁気的環境に変化はない。しかし、その線幅は著しい温度依存性を示し、化学シフトもまた温度によってかなり動く(表 3)。このため、Ge-73 NMR シグナルを動的過程のプローブとして用いるのには問題がある。

表 3 1,1-ジメチル-1-ゲルマシクロヘキサンの線幅と化学シフト*

温度 (K)	163	203	223	248	273	300	323	348
線幅 ($\Delta \nu_{1/2}$)	~160	86	44	22	16	14	11	9.5
化学シフト (δ)	-8.7	-9.3	-9.7	-10.3	-11.3	-11.3	-11.6	-11.9
* in THF- d_6 :CS ₂ = 1:1								

[緩和時間]

四極核である Ge-73 核のスピン-格子緩和はほとんど四極緩和機構を通じて起こることが、 T_1 の温度変化¹⁾ や NOE の測定^{1,4)} から確かめられている。測定条件とくに濃度を同一にした場合、ゲルマシクロヘキサン 1 ~ 10 はいずれも 15-25 ms の範囲の T_1 を示したが、構造とのはっきりした対応は認められなかった。

[化学シフト]

ゲルマシクロヘキサンの Ge-73 化学シフトを表にまとめた。一般に Ge-73 化学シフトは Si-29、Sn-119 化学シフト、特に後者とよい対応をなすことが知られている。最近の Mackay⁵⁾ の報告によると、 MR_4 、 MX_4 ($M = Sn, Ge$; $X = C$

図2 ゲルマシクロ
ヘキサンのGe-73
反転回復スペクトル

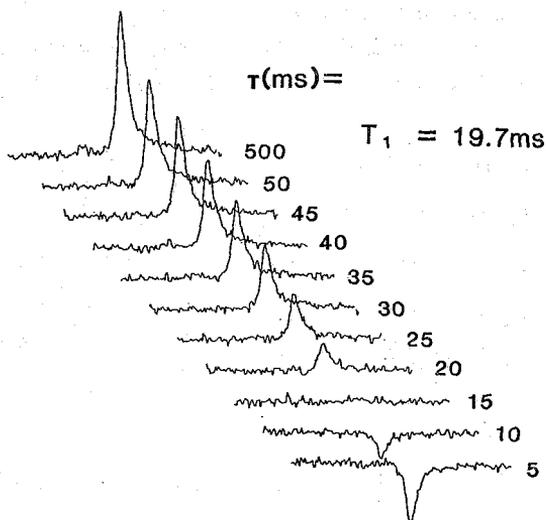


表4 メチルゲルマシクロヘキサンのGe-73化学シフト (δ (Ge)) *

化合物	δ (Ge)	化合物	δ (Ge)
<u>1</u>	-131.2	<u>6</u>	-61.5, -73.4
<u>2</u>		<u>7</u>	-13.7
<u>3</u>	-131.2	<u>8</u>	-5.0
<u>4</u>	-134.3	<u>9</u>	-12.2
<u>5</u>	-65.3	<u>10</u>	-17.7

* relative to GeMe_4 ($\delta = 0$); in CDCl_3

1, Br, I) では

$$\delta(\text{Sn}) = 1.568(\text{Ge}) - 87.4; r = 0.991$$

の関係がある。1, 1-ジメチル-1-スタナシクロヘキサンの異常低磁場シフト ($\delta(\text{Sn}) = -42$) は、ゲルマシクロヘキサン (7) ではあまり認められないため、7はこのプロットからかなりずれる。

一方メチルゲルマシクロヘキサンのGe-73シフトと対応するメチルシクロヘキサンのC-13シフトとを比較してみると、ゲルマシクロヘキサンでは2つのメチル基がいずれも低磁場シフトを生じているが、第二のメチル基の効果は小さい。これに対してシクロヘキサンでは第二のメチル基は高磁場シフトを示している。メチルゲルマシクロヘキサンでは、この立体シフトは小さいか、あるいは認められないかのいずれかである。この立体シフトの大きさは、ゲルマニウムの導入による環の変形を示すと考えられる。

[分子力場計算とGe-73立体シフト]

NMRデータを理解するための情報を得る目的で、最近我々はAllingerのMM2プログラムを用いて、ゲルマシクロヘキサンの最安定構造の分子力場計算を行なった。環はGe

のところはかなり平たく、4位のところで鋭くなっている(図3)。Ge-73およびC-13 NMRで小さな立体シフトしか観測されないことはMM計算の妥当性を示すものといえる。分子力場計算で得られた興味ある結果の一つは、1-メチルゲルマシクロヘキサン(5)

r_1 0.1947nm
 θ_1 101.6°
 $\omega_{1,2}$ 47.8°
 $\omega_{2,3}$ 58.2°
 $\omega_{3,4}$ 66.4°

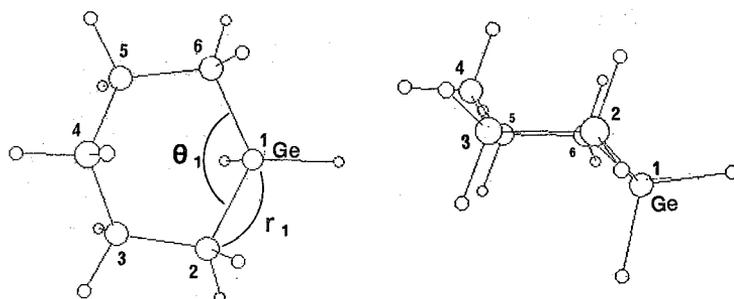


図3 ゲルマシクロヘキサンの分子力場計算結果

では僅かに(~ 0.2 kcal/mol)アキシアル配座が安定という結果である。言うまでもなく、これはメチルシクロヘキサンの配座と好対照をなす。このため、1,4-ジメチル-1-ゲルマシクロヘキサン(6)のトランス体ではGe上のMeがアキシアル、同シス体ではエクワトリアル異性体が優先的に存在していると考えられる。

(6)のシス・トランス混合物は2本のシグナルを示す。4位のMe基がGe-73シフトにほとんど影響を与えないとすると、トランス体:シス体=60:40(分子力場計算の結果による)と見積られるので、高磁場ピークがシス体すなわちGe上のMeがアキシアルの異性体と帰属される。化学シフト差(ca. 12 ppm)はGe-73における"立体シフト"と解することができる。これはGe-73における立体シフトの最初の実例であろう。

参考文献

- 1) Y. Takeuchi, T. Harazono and N. Kakimoto, Inorg. Chem., in press.
- 2) Y. Takeuchi, S. Tomoda and N. Kakimoto, Org. Magn. Reson., in press.
- 3) 下田、竹内、友田 日化第49春季年会予稿集(1984)
- 4) K. M. Mackay, P. J. Watkinson and A. L. Wilkins, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 133 (1984)
- 5) P. J. Watkinson and K. M. Mackay, J. Organometal. Chem., in press.
- 6) 竹内、下田、田中、友田、小川、鈴木 第17回構造有機化学討論会予稿集(1984)

ポリオレフィンの¹³C-NMR立体規則性化学シフトの
起源とそのコンホメーション

(農工大工, 東工大工*, 東工大資源研**)

○朝倉花郎, 中條利一郎*, 土肥義治**

1. 緒言

ポリオレフィンの立体規則性は, その物性を支配する重要な構造因子の一つであり, ¹³C NMR法は, その立体規則性の情報を得る手段として最も有力である。実際, 典型的なポリオレフィンであるポリプロピレン, PP, の¹³C NMR立体規則性ピークの帰属は, 重合条件の異なる試料間ならびにモデル化合物のスペクトルとの比較に基づいて, 精力的に行なわれ, その結果は, Tonelli¹⁾, Sambelli²⁾のグループによる効果に着目した化学シフトの理論的計算からも支持されてきた。しかしながら, 側鎖がエチル基, すなわち, ポリ-1-ブテン, AB, より長いポリオレフィンについては, 重合条件の異なる試料(特に, シンジオタクチック試料)が容易に得られないこと, 立体規則性の出現の様子が, PPと著しく異なる部分があるために, 必ずしもPPの帰属をそのまま適用できないこともあって, 帰属の試みが行なわれた唯一の例であるPBの場合であっても, その帰属結果は, 極めて不十分であった。^{5,6}

我々は, PB以上のポリオレフィンの立体規則性によるピークの分裂も, その構造上の特徴を考慮すれば, 効果に基づく理論的計算で説明できるはずであると考へ, PBのすべての炭素について, ¹³C NMR立体規則性化学シフトの理論的計算を行なった。その結果, すべての炭素について, その立体規則性に基づく詳細な帰属を行なうことができた。このことは, 逆に, この¹³C NMR立体規則性化学シフトから, 主鎖ならびに側鎖の優位コンホメーションならびにその分率の決定を通じて, 従来の末端間距離, 双極子モーメント等の平均値では不十分である, ランダムコイル状態にあるポリマー鎖の局所的コンホメーションを, 明確にキャラクタライズできることを示している。

2. 実験

PPからポリ-1-ネンまでの一連のポリオレフィン(7種類)の¹³C NMR E, JEOL FX-200を用い, 50 MHzにて測定した。溶媒はODClB, 温度は100°Cである。⁶

3. 計算

PBモデル化合物として, 2,4,6,8,10,12,14,16,18-ナエチルノナデカン(NEND)を造り, 主鎖C_(n)H₂(nキサッド), 主鎖C_(n)H, 側鎖C_(n)H₂, C_(n)H₃(各々, ペンタッド)について, その¹³C NMR化学シフトを評価した(Fig. 1)。

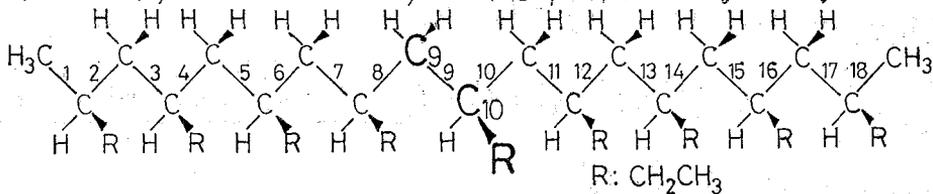


Fig.1 Planar zigzag structure of isotactic 2,4,6,8,10,12,14,16,18-nonaethyl nonadecane (NEND)

同様の計算を、側鎖エチルをメチルにおきかえたNMND(PPモデル化合物)について行ない、PPとPBの炭素スペクトルの相違を、理論的に明らかにすることを試みた。

3-1. コンホメーションの確率

NMNDについて、 $C^\alpha H$ 炭素ならびに主鎖 CH_2 炭素をはさんだZ結合のまわりの回転無性状態マトリックス、を R 、 U ならびに U_m 又は U_r は、以下の如く表現できる?

$$U = \begin{bmatrix} \tau^* & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad U_m = \begin{bmatrix} 0 & \eta w^* & 0 & \eta & 0 \\ \eta w^* & 0 & 0 & 0 & \tau w^* \\ 0 & 0 & 0 & w^* & \tau w^* \\ \eta & 0 & w^* & 0 & 0 \\ 0 & \tau w^* & \tau w^* & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad U_r = \begin{bmatrix} \eta^2 & 0 & \eta w^* & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & w^* & \tau w^* \\ \eta w^* & 0 & 0 & 0 & \tau w^* \\ 0 & w^* & 0 & 1 & 0 \\ 0 & \tau w^* & \tau w^* & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

ここで、 $\eta = 1.0 \exp(-60/RT)$ 、 $\tau = 0.4 \exp(-500/RT)$ 、 $w^* = 0.9 \exp(-1600/RT)$ 、 R は気体定数、 T は絶対温度、ここでは373°K(100°C)とした。更に、 $\tau^* = 0.6$ は、 $C^\alpha H$ をはさんだZ結合が、各 R 、 t 、 t^* 状態の時、主鎖 CH と側鎖 CH_3 間の立体障害(ω 相互作用)のために、側鎖 CH_3 は、隣接するZの主鎖 CH_2 とゴーシ位置をとることにになり、コンホメーションは不安定に存することを考慮して導入した。これらのマトリックスを用いて、分配関数、又は以下の如く、表現される。

$$Z = J U_1^2 \left(\prod_{k=2}^{x-2} U_R \right) U_{x-1}^2 J^*$$

ここで、 $J = (10000)$ 、 $J^* = {}^t(11111)$ 、 t は転置マトリックス、である。更に、 i 番目の結合のコンホメーションの確率、 f^i は、

$$f_{R:\beta}^i = Z^{-1} J \left(\prod_{k=1}^{i-1} U_{k:\beta} \right) (U_{i:\beta}) \left(\prod_{k=i+1}^{x-1} U_{k:\beta} \right) J^* \quad \text{となる。}$$

ここで、 U_{β} は、 U マトリックスの β カラム以外の要素を0に置きかえたマトリックスである。以上のようにして、結合7, 8, 9, 10, 11のまわりの t 、 t^* 、 β 、 β 、 β の確率を計算した。確率計算が、Z結合に及ぶ場合、例えば $f_{(t,t)}^{7,8}$ も同様に計算を行なった。

3-2. 化学シフト

着目した炭素と他の炭素がゴーシ位置をとるコンホメーションの確率を計算し、各炭素毎にその効果の値をかけた、以下の式で求めた。

$$\sum_{\text{backbone}} \delta_{C(10)H} = -5.3 \times (f_t^8 + f_\beta^8 + 2f_\beta^9 + f_t^{10} + f_\beta^{10} + 2f_\beta^{11})$$

$$\sum_{\text{side chain}} \delta_{C(10)H_2} = -5.3 \times (f_t^9 + f_\beta^9 + f_t^{10} + f_\beta^{10})$$

$$\sum_{\text{backbone}} \delta_{C(9)H_2} = -3.7 \times (f_\beta^7 + f_\beta^7 + f_\beta^{10} + f_\beta^{10} + \underline{f_t^7 + 0.5 \times f_{(t,t)}^{7,8} + f_t^{10} + 0.5 \times f_{(t,t)}^{9,10}})$$

$$\sum_{\text{side chain}} \delta_{C(10)H_3} = -3.7 \times \underline{f_t^9 \times f_t^{10}}$$

ここで、例えば f_{τ}^{δ} は、結合 δ が τ 状態の確率、 $f_{(\tau, \tau)}^{\delta}$ は、結合 τ と δ が同時に、 τ 状態以外をとる時の確率である。特に、 $\int_{\text{back bone}} \delta C(9)H_2$ 及び $\int_{\text{side chain}} \delta C(10)H_3$ の立体規則性による分裂は、主鎖の炭素からの γ 効果のみでは説明できず、主鎖-側鎖間の γ 効果の寄与と側鎖の結合のまわりの回転異性状態を考慮して評価し、加えることにより説明できた(斎藤部)。

4. 結果と議論

4-1. 側鎖 $C(9)H_2$ 及び主鎖 $C(10)H$

PB 及び PP の各々、側鎖 $C(9)H_2$ 及び $C(10)H_3$ 部の実測スペクトルとモデル化合物のペンタッドシーケンスについての計算結果(棒スペクトル)を mmmmm ピークを基準として Fig. 2 に示した。実測と計算結果との比較から、容易にペンタッドレベルで、帰属することが出来る。ピークの出現の順序は、PP と PB 間で同一であるが、分裂の幅は、後者の方が小さく、これは $\tau^* = 0.6$ とすることで、計算から再現される。この τ^* 値は、エネルギー差、 $\Delta E_{\tau^*} = 1680 \text{ J mol}^{-1}$ に対応するが、モデル化合物の値、 $\Delta E_{\tau^*} = 2100 \text{ J mol}^{-1}$ より若干小さい値がある。Fig. 3 は、 $C(10)H$ の実測と計算結果であり、PB で観測される二本に分裂したピークは、mm と $mr+rr$ に帰

Tab. I ^{13}C chemical shifts calculated for the C_9 Methylene Backbone Carbons of NEND and observed for the Methylene Backbone Carbons of isotactic PB at 100°C . (in ppm relative to the chemical shift of mmmmm)

Stereoisomer	NEND			cald. ^d (tetrad)	PB obsd.
	cald. ^a	cald. ^b	cald. ^c		
1	m(mrr)m	0.004	0.190	0.194	0.187
	r(mrr)m	0.321	-0.152	0.169	
	m(mrr)r	-0.200	0.376	0.176	
	r(mrr)r	0.007	0.148	0.155	
2	m(rrr)m	0.726	-0.699	0.027	0.125
	m(rrr)r	0.658	-0.500	0.158	
	r(rrr)r	0.344	-0.194	0.150	
3	m(mrm)m	-0.764	0.895	0.131	0.112
	r(mrm)m	-0.437	0.583	0.146	
	r(mrm)r	-0.357	0.376	0.029	
4	m(mzm)m	1.018	-0.984	0.034	0.017
	m(mzm)r	0.808	-0.811	-0.003	
	r(mzm)r	0.681	-0.699	-0.018	
5	m(mmm)m	0.0	0.0	0.0	0.0
	m(mmm)r	0.123	-0.139	-0.016	
	r(mmm)r	0.324	-0.348	-0.036	
6	m(mmr)m	0.509	-0.542	-0.033	-0.017
	r(mmr)r	0.464	-0.494	-0.030	
	r(mmr)m	0.651	-0.670	-0.019	
	m(mmr)r	0.319	-0.355	-0.036	

- a: Contribution of the γ interactions between the methylene and methine carbons of the backbone of NEND to the methylene chemical shift.
- b: Contribution of the γ interactions between the methylene carbons of the backbone and methyl carbon of NEND to the methylene chemical shift.
- c: a sum of both contributions, a+b
- d: The tetrad chemical shifts were obtained by averaging over the hexad peaks.

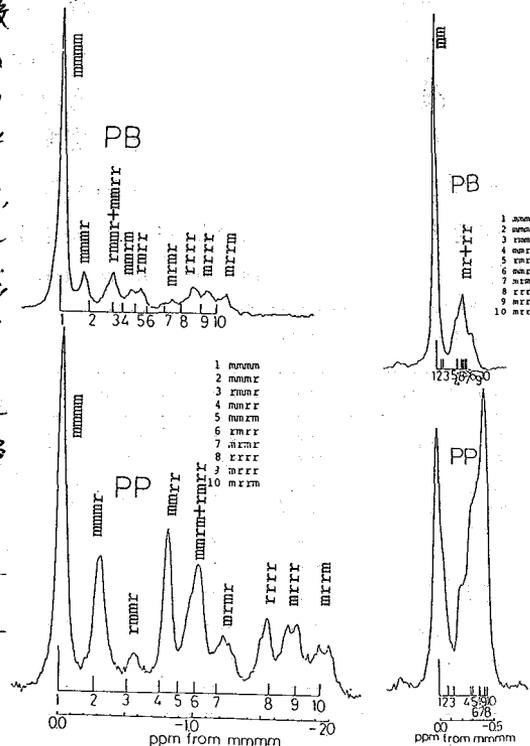


Fig. 2 Side chain CH_2 and CH spectra Fig. 3 CH spectra (PB) (PP) 属される。更に、後者は一部、ペンタッドで分裂している。

4-2. 主鎖 $C(9)H_2$ 及び側鎖 $C(10)H_3$

Fig. 4 に示したように、PP と PB の主鎖 $C(9)H_2$ 部の実測スペクトルは、著しく異なる。すなわち、PP では立体規則性起因する分裂は、約 2.5 ppm に及ぶが、PB では、たかだか 0.2 ppm 以下である。NEND の $C(9)H_2$ 化学シフトのヘキサッドレベルでの計算結果を Tab. I にまとめた

が、主鎖からの δ 効果のみ、 cald.^a では、出現の順序はPPの場合と類似しており、実験結果を説明できない。しかしながら、側鎖 C-CH_3 と主鎖 C-CH_2 間の δ 効果の寄与、 cald.^b を新たに計算し、加之すると、実験と極めて良く一致した計算結果を得ることができた(cald.^c 又は cald.^d)。すなわち、主鎖と側鎖からの δ 効果の寄与が見事にキャンセルされ、立体規則性による分裂幅が、極めて小さくなったわけである。更に、側鎖 C-CH_3 化学シフトは、逆に、主鎖 C-CH_2 炭素からの δ 効果をうけるはずであり、その寄与を計算すると、実験結果とのペンタッドレベルでのよい一致をみることができた(Fig.5)。以上のようにして

Tab.2 Relative intensities of Methyl Pentad and Methylene Pentad (Side Chain) Resonances for isotactic Poly(1-butene) at 100°C.

Methyl Pentad	Methylene (Side Chain) Pentad
mmmm) 0.64	mmmm 0.56
mmmr) 0.16	mmmr 0.08
mmrr) 0.11	mmrr 0.11
mrmm) 0.04	mrmm 0.04
mrmm) 0.05	mrmm 0.05
	mrmm 0.03
	mrmm 0.05
	mrmm 0.04
	mrmm 0.04

いて、実験スペクトルをよく再現でき、同様のペンタッドレベルの帰属を行なうことができた(例えば、ホリ-1-ペンテンでは $\delta = 0.4$ とした)。

尚、これらの結果は、現在、Macromolecules ならびに Polymer J. Vol.16, 717-726 に印刷中である。

参考文献

1. F.A. Bovey, "Chain Structure and Conformation of Macromolecules" Academic Press, 1982.
2. F.C. Schilling and A.E. Tonelli, Macromolecules, **13**, 270 (1980).
3. D.R. Ferro, A. Zambelli, P. Locatelli, A. Provasoli and E. Rignotti, Macromolecules, **13**, 179 (1980).
4. A. Zambelli, P. Locatelli, A. Provasoli and D.R. Ferro, Macromolecules, **13**, 267 (1980).
5. M. Mauzac, J.P. Vairon and P. Sigwalt, POLYMER, **18**, 1193 (1977).
6. T. Asakura and Y. Doi, Macromolecules, **16**, 786 (1983).
7. U.W. Suter and P.J. Flory, Macromolecules, **8**, 765 (1975).
8. T. Asakura, I. Ando and A. Nishioka, Makromol. Chem., **176**, 1151 (1975).

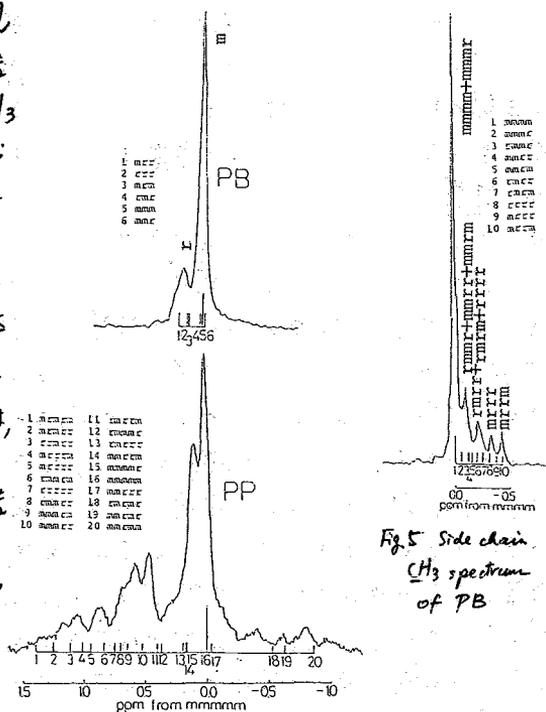


Fig.4 Backbone CH_2 spectra

Fig.5 Side chain CH_3 spectrum of PB

決定したペンタッドレベルの帰属の妥当性を検討するために、PBについて同じ側鎖の C-CH_2 と C-CH_3 炭素のペンタッドピークの相対強度を求めた。Tab.2に示したように、これらの値はよく一致することから、帰属の妥当性が支持された。又、ホリ-1-ペンテン以上のホリオレフィンについては、 δ の値をより小さくすることにより、主鎖 C-CH_2 部を除

(味の素・中研) °高橋真一郎 鈴木栄一郎 尾上弘美 永嶋伸也

1. はじめに

シクロデキストリン(CD, ミクロアミロース)は、適当な大きさの各種化合物をその空洞内に包接することが知られており、酵素の活性部位のモデルとして、また食品や医薬品分野では安定性・溶解性の向上等の目的で広く関心を集めている。またホスト-ゲスト相互作用の詳細な検討も、水溶液中⁽¹⁾⁻⁽²⁾及び固体⁽³⁾のNMRを用いてなされてきた。

今回我々は、芳香族アミノ酸(Phe, Tyr)とCDとの相互作用を水溶液中の¹H-NMRを用いて調べ、さらにゲストとしては比較的分子量の大きいジペプチドであるアスパルテーム(AP, L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル)とβ-CDとの包接現象を、水溶液中の¹H-NMR及び固体¹³C-NMRを用いて研究したので、その結果を報告する。

2. 実験

Phe, Tyr, CDは市販品を、APは当社製品を用いた。

水溶液中のNMR測定は、JEOL GX-400を用い、固体¹³C-NMR測定は日本電子応研にてGX-270を用いて行なった。

3. 結果及び考察

(a) 芳香族アミノ酸とCDとの相互作用

Phe, Tyrのみ及びCDを添加した時の重水溶液中でのθプロトンの化学シフト及びスピン結合定数をTable 1に示す。

Pheではα-CDを、Tyrではβ-CDを添加した場合により大きい化学シフト変化が観測され、より強い相互作用が示唆された。結合定数については大きな変化は見られず、α-β炭素間の回転

TABLE 1 ¹H CHEMICAL SHIFTS (PPM) FROM DSS AND VICINAL COUPLING CONSTANTS (Hz) OF PHENYLALANINE AND TYROSINE

	PHE			TYR		
	FREE	α-CD	β-CD	FREE	α-CD	β-CD
PH	6.91	6.93	7.00	1.97	2.00	2.04
δ A	3.28	3.29	3.28	3.27	3.27	3.25
δ B	3.11	3.14	3.14	3.15	3.15	3.17
JAX	5.1	4.9	5.2	5.5	5.3	5.8
JBX	8.0	7.9	7.7	7.6	7.8	7.4

$$[PHE] = [TYR] = 2.7 \times 10^{-3} M, [CD] = 13.5 \times 10^{-3} M$$

たかはししんいちろう すずきえいいちろう おのえひろみ ながしまのぶや

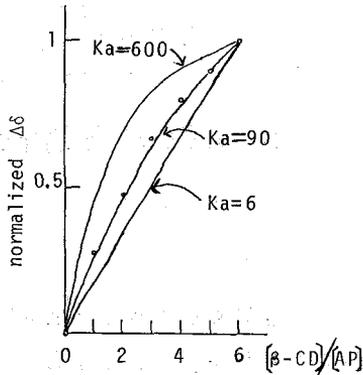


図1 AP,β-プロトンの化学シフト変化のβ-CD濃度依存性

$$[AP] = 1.7 \times 10^{-3} M$$

6倍モルの化学シフト変化を1に normalize

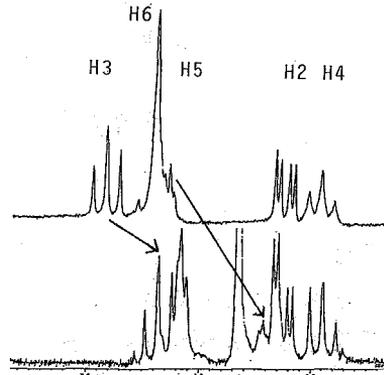


図2 重水中の400MHz 1H-NMR

上: β-CDのみ

下: 0.03 M AP + 0.0015 M β-CD

異性体の存在確率は余り変化がないと思われる。

(b) APとβ-CDの水溶液中での相互作用

APとβ-CDの包接体形成定数(Ka)を求める目的で、β-CD濃度を变化させた時のAPのPhe, Asp部分のβ-プロトンの化学シフト変化を観測した。4つのプロトンの変化はすべて同一曲線上にのる。(図1)

これよりKa=90と求まった。

一方AP20倍モル共存下のβ-CDの化学シフト変化を図2に示す。空洞の内側にあるβ-CDの3,5位のプロトンが著しく高磁場にシフトしている。

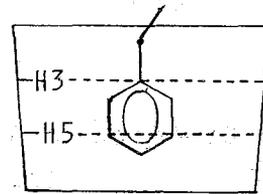


図3 β-CDによるAPのフェニル基の包接状態のモデル

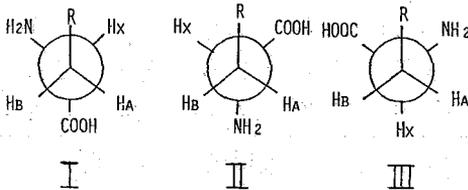


図4 アミノ酸 Cα-Cβ間の回転異性体

TABLE 2 VICINAL 1H-1H COUPLING CONSTANTS(Hz) AND ROTAMER FRACTIONAL POPULATIONS FOR AP AT pH 5.2

	FREE	COMPLEX
JAX	4,6	6,6
JBX	8,7	7,2
ASP PI	0,56	0,43
PII	0,19	0,36
PIII	0,25	0,21
JAX	5,6	8,0
JBX	9,0	7,8
PHE PI	0,59	0,47
PII	0,27	0,49
PIII	0,14	0,04

これはフェニル基の包接化によるリングカレントシフトと解釈でき、Ka及び小宮山らのモデルを用いてフェニル基の包接の深さを求めると、図3のようにフェニル基の中心がH₃を含む平面より下方1.7 Åに位置すると推定される。

またβ-CDを共存させるとAPのAsp, Phe部分のABXパターンの結合定数が変化し側鎖の回転異性体の存在確率の変化を示した。(図4)(Table 2) 図5にAsp部分のβ-プロトンの化学シフトのpH変化を示す。β-CD共存下でアミノ基のプロトン脱離のpK値が、8.0より8.4に変化した。これは、フェニル基の包接化によりAPのAsp部分も影響を受けることを示唆する。

次に Asp-Phe(¹⁵N)-OMe を合成し、重水及び軽水溶液中で、APの骨格構造(4, 中及びアミド結合のCis, Trans)(図6)がβ-CDへの包接化により変化するかを調べた。(Table 3)

酸性領域ではアミドプロトンの交換は、

NMRのタイムスケールに比して遅く、軽水溶液中でRedfieldの2-1-4パルスを用いてアミドプロトンを観測することができた。その結果、AP骨格の二面角を反映する3つの結合定数はβ-CDへの包接化によって変化せず、AP骨格は変化を受けていないと思われる。

またアミドプロトンの化学シフトが大きく低磁場にシフトしており、これよりアミドプロトンとβ-CDの二級水酸基との水素結合が示唆された。

(C) APとβ-CDの包接化合物の¹³C-NMR

APとβ-CDをモル比で1.2:1含む水溶液より、その包接化合物の結晶を析出させ、その固体¹³C-CPMAS-NMRを測定した。(図7) β-CDのC4, 6位に化学シフト変化

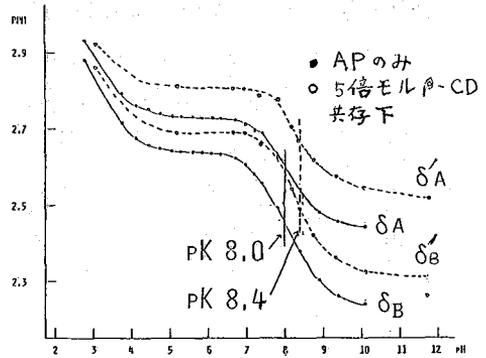


図5. AP, Asp部分β-プロトンの化学シフトのpH依存性, [AP] = 1.7 × 10⁻³ M

TABLE 3 ¹H COUPLING CONSTANTS(Hz) AND CHEMICAL SHIFT(PPM) FROM DSS FOR ASP-PHE(¹⁵N)-OME AT pH 4.3

	FREE	COMPLEX
J ¹⁵ NH	93.1	93.1
J _H ¹⁵ NCH	7.6	7.6
J ¹⁵ N ⁰ CCH	<0.2	<0.2
δ _{NH}	8.76	9.10

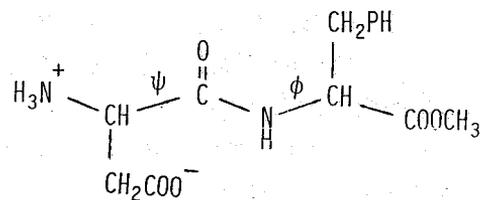


図6. AP ペプチド骨格の二面角

TABLE 4 ^{13}C -CHEMICAL SHIFTS OF β -CD (PPM) FROM TMS IN SOLID

	β -CD/H ₂ O	β -CD/AP
C1	103.6	103.6
C4	82.9	81.8
C6	61.8	61.2

が観測された。(Table 4)その理由としてはリングカレントシフトか又は β -CDの二面角(ψ, χ)の変化⁽³⁾が考えられるが、フェニル基と β -CDの炭素との距離とシフト差とを考慮すると、リングカレントの影響はないと考えてよく、二面角(ψ, χ)がわずかに変化したものと思われる。(図8)

またゲスト分子のシグナルは一樣に広幅化した。特にフェニル基のI位とPhe C β が著しかった。これがAP分子の運動性によるものかを確かめるために、せわらかい部分が強調されて観測されるGated Decoupling法の測定を行なった。(図9) その結果、フェニルリングは相対的に強度が増大しており、 β -CD空洞内である程度回転していることが示唆された。またPhe C β はこの手法でも観測されず、その理由としてAsp C β と重なっているか、フェニル基のI位からC β 位にかけて特に著しい化学シフトの分散が起きているかが考えられるが、そのどちらであるかは、現在の所未定であり、検討を要する。

文献

- 1) D.J.Wood, F.E.Hruska, and W.Saenger, J. Am. Chem. Soc., 99, 1735 (1977)
- 2) M.Komiyama, and H.Hirai, Chem. Lett., 1467 (1980)
- 3) 青藤榮他, 第21回NMR討論会要旨集 P.37 (1982)

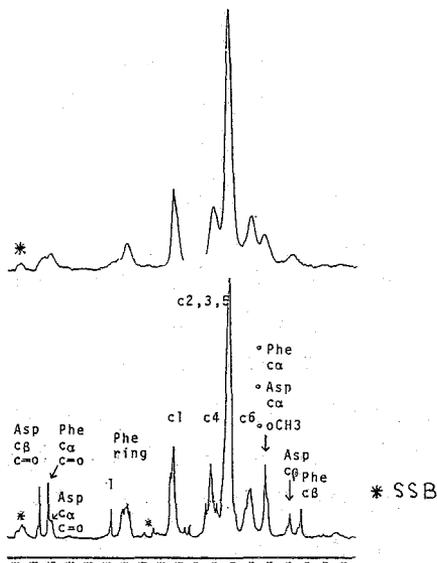


図7 67.8 MHz ^{13}C -CPMAS-NMR スペクトル
上: APと β -CDの包接化合物
下: APと β -CDモル比1:1の混合物

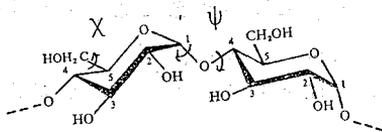


図8 シクロデキストリンの二面角

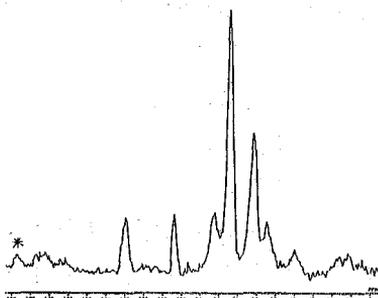
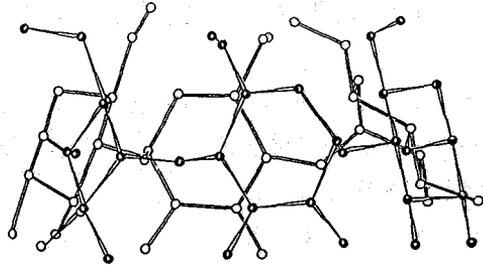


図9 APと β -CDの包接化合物の
67.8 MHz ^{13}C -Gated Decoupling-NMR スペクトル

東工大 工 ○星 肇・井上 義夫・桜井 実・中條 利一郎

1. はじめに

シクロデキストリン(CD)は、ドーナツ型の環状オリゴ糖で6個以上のD-(+)-グルコピラノース単位が α -1,4結合して構成されており、1分子に含まれるグルコース単位の数によりそれぞれ α (6単位)、 β (7単位)、 γ (8単位)-CDなどとよばれている。CD分子の構造はFig.1のようになっている。分子の中央には最も小さな α -CDの場合でも直径4.5-6.0Åにもなる空洞(キャビティ)がある。キャビティは幾つかの円環によって構成されている。すなわち、広い口の方にはC2, C3に結合した2級水酸基によって構成される環があり、反対の狭い口の方にはC6に結合した1級水酸基によって構成される環がある。一方、キャビティ内は、広い口の方からC3-H3で構成される環、グルコシド酸素による環、及びC5-H5による環が並んでいる。このため、水などと比較するとキャビティ内は疎水的であり、反対に外部表面は親水的であるといわれている。

Fig.1. Side view of an α -CD molecule

W. L. Hinze, Sep. Purif. Methods, 10, 159 (1981).

このように特異的な構造をもつCDは、種々の特異的性質を示す。なかでも、様々な分子やイオンと包接複合体を形成することは、特に興味をもたれている。包接によりゲスト分子の物理的、化学的性質は様々なに変化するが、置換ベンゼン誘導体の包接に伴う ^{13}C -NMR化学シフト変化は特徴のあるものである。すなわち、 α -CDに包接するとゲストのhead側の炭素(Fig.2でゲストの置換基Rの結合した炭素)は高磁場シフトし、tail側の炭素(Fig.2で置換基Xの結合した炭素)は低磁場シフトすることが知られている¹⁾。ここでは、ゲスト分子が親水的環境から疎水的環境に移ることによって誘起されるこの化学シフト変化を理論的に取り扱い、実験データとの比較から α -CD包接複合体の分子構造を推定した研究を報告する。

分子をとりまく環境によって化学シフトが変化するものとして、溶媒効果がよく知られている。安藤らによれば、化学シフトの溶媒効果は、溶媒を均一で連続的な誘電体とみなすKlopmanの solvationモデルを用いて解釈できる。²⁾このモデルに倣い、CDキャビティを誘電体とみなし、包接されたゲスト分子に対する疎水環境の影響が、溶媒効果のモデルで扱えるものと仮定した。ゲスト分子として、安息香酸(BA)、p-ヒドロキシ安息

ほしはじめ、いのうえよしお、さくらいみのる、ちゅうじょうりいちろう

香酸 (PHBA)、及び *p*-ニトロフェノール (PNP) を用いた。ここで、これらゲストの ^{13}C -NMR 化学シフトについて、実験的に溶媒効果を測定し、solvaton モデルによる計算を行い、計算方法について検討した。次に、solvaton モデルに不均一性を導入したモデル (2層モデル) によって化学シフト変化を計算し、実験結果との比較により α -CD 包接複合体の *geometry* を推定した。

2. 実験法

14 ~ 16 種の溶媒中でのゲスト分子の ^{13}C -NMR 化学シフトを、濃度 0.4 M, 30°C で測定した。 ^{13}C -NMR スペクトルは、JEOL-JNM-PS-100 スペクトルメータで得た。キャピラリーに封入したアセトン- d_6 の重水素をロックシグナルとして用い、アセトンに溶解した TMS (30% v/v) の信号を化学シフトの基準とした。

3. 計算法

solvaton モデルを Germer の方法³⁾ に従って、CNDO/2 法⁴⁾ に組み込み、化学シフトは、Pople らの平均励起エネルギー近似⁵⁾ で求めた。solvaton モデルでは、均一で連続的な誘電体を仮定している。

しかしながら、X 線回折、NMR などによると、パラ 2 置換ベンゼン誘導体は Fig. 2 のように包接する。このように不均一な状態を考慮するために、Fig. 3 のようなモデル

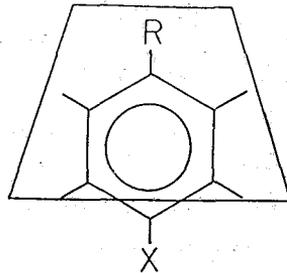


Fig. 2. CD-guest inclusion complex

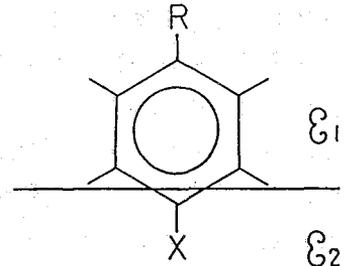


Fig. 3. Double-layer model

(2層モデル) を導入した。すなわち、疎水的環境と親水的環境は相異なる誘電率 ϵ_1 , ϵ_2 でそれぞれ表され、ゲスト分子を構成する原子と solvaton との相互作用は、原子近傍の環境を表す誘電率によって支配され、もとの solvaton モデルと同じく Born の式で評価できるものと仮定した。誘電率パラメータは $\epsilon_1 = 2$, $\epsilon_2 = 80$ と仮定した。 $\epsilon_1 = 2$ は、ジオキサソンの誘電率に相当する。これは、 α -CD-*p*-tert-ブチルフェノール複合体の UV スペクトルの吸収波長、吸光度がジオキサソンの *p*-tert-ブチルフェノールのものとほとんど同じになることから、 α -CD キャビティの環境はジオキサソンの環境に似ていると考えられる⁶⁾ ことに基づくものである。ただし、 ϵ_1 の値を 4 ~ 7 に変えても化学シフト変化の定性的な傾向は変わらなかった。分子の *geometry* は、Pople らの標準値⁴⁾ を用いた。

4. 結果と考察

4-1. 溶媒効果の実験と solvaton モデルによる解析

ゲスト分子の ^{13}C -NMR 化学シフトの溶媒効果の測定値と、solvaton モデルによる計算の例を Fig. 4 に示す。ゲスト分子の ^{13}C -NMR 化学シフトは、実験的にも solvaton モデルによる計算でも、誘電率 ϵ の関数で Born の式の相互作用の大きさを表す factor $(\epsilon - 1) / 2\epsilon$ に対してほぼ直線的に変化する。ゲスト分子が $\epsilon = 80$ から

$\epsilon = 2$ の媒質へ移動するときの化学シフト変化を、CD包接に伴う化学シフト変化と共に Table 1 に示す。solvation モデルによる溶媒効果の計算は、特に重要な変化をみせる包接軸上の炭素については、PNP の C4 head を除いて正しい傾向を与える。しかし、包接軸上にない炭素は必ずしも正しい傾向を示さない。そこで以下では、主として包接軸上の炭素に注目する。

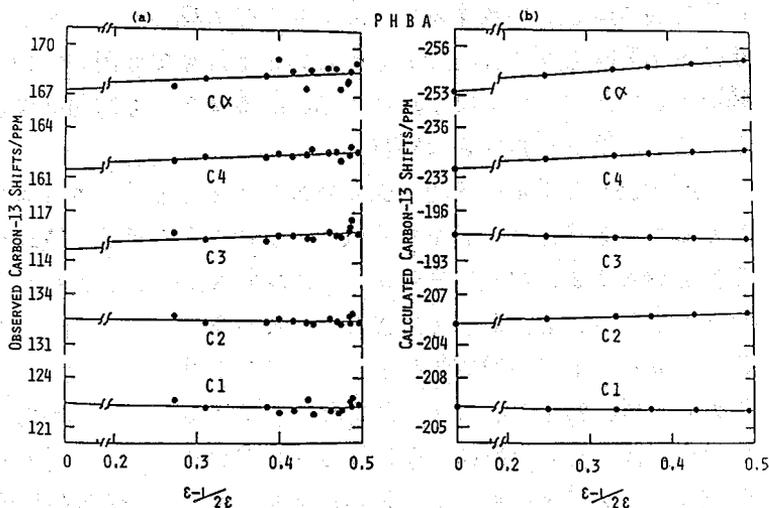
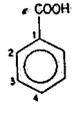
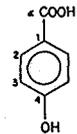
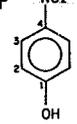


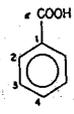
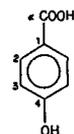
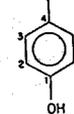
Fig. 4 Dependence of (a) observed and (b) calculated ^{13}C shifts of PHBA on dielectric constants of solvents.

Table 1. Chemical shift displacements ^{a)}

		Solvent effect ^{b)} in CD		
		Obsd	Calcd ^{c)}	Obsd ^{d)}
 BA	Cα	-0.86	-1.00	-1.70
	C1	-0.71	-0.02	-1.18
	C2	0.19	-0.27	1.59
	C3	-0.24	-0.03	-0.76
	C4	-0.40	-0.24	0.93
 PHBA	Cα	-0.59	-1.01	-1.65
	C1	0.09	0.11	-0.78
	C2	0.01	-0.36	1.70
	C3	-0.56	0.07	-0.85
	C4	-0.58	-0.64	0.72
 PNP	C4	0.68	-0.31	-1.21
	C3	-0.30	-0.54	0.87
	C2	-0.45	-0.07	0.23
	C1	-1.24	-0.85	1.88

- a) Chemical shifts are given in ppm.
Negative values indicate upfield shifts.
- b) Displacements induced by the transfer of guest molecules from $\epsilon=80$ to 2.
- c) Based on the solvation model.
- d) Gelb et al., J. Am. Chem. Soc., 103, 1750 (1981)

Table 2. Chemical shift Displacements ^{a)}

Guest		Double layers model	in CD
		Calcd	Obsd ^{b)}
 BA	Cα	-1.01	-1.70
	C1	-0.14	-1.18
	C2	-0.18	1.59
	C3	-0.43	-0.76
	C4	0.37	0.93
 PHBA	Cα	-1.02	-1.65
	C1	-0.07	-0.78
	C2	-0.21	1.70
	C3	-0.57	-0.85
	C4	0.45	0.72
 PNP	C4	-0.73	-1.21
	C3	-0.26	0.87
	C2	-1.35	0.23
	C1	1.15	1.88

- a) Chemical shifts are given in ppm.
Negative values indicate upfield shifts.
- b) Gelb et al., J. Am. Chem. Soc., 103, 1750 (1981)

CD包接の結果と比較すると、最も大きな高磁場シフトを示すカルボキシル基C α は、溶媒効果の実験及びsolvatonモデルによる計算でも同じ傾向が現れているが、その他の包接軸上の炭素については *head* も *tail* も必ずしも傾向は再現されなかった。

4-2. 2層モデルによる解析

solvatonモデルに不均一性を導入した2層モデルの計算では、ゲスト分子の包接の向きとして、X線回折などで知られている向き(正包接, 後述のFig.5の向き)のもの、それを逆転させた向き(逆包接)の二種類を調べた。包接の深さは、2層系の境界面のとり方を変えることによって評価した。その際、

CDキャビティは円筒対称性をもち、ゲスト分子のC₂対称軸とキャビティ対称軸は一致すると仮定した。CD包接に伴う化学シフト変化の実測値と、2層モデルによる計算値とを、特に包接軸上の炭素に着目して比較すると、3種のゲストはFig.5で表されるような *geometry* (深さ, 向き)をとる場合にのみ両者の傾向が一致することがわかった。このよ

うに推定された包接複合体の *geometry* は、水溶液中の¹H-NMR⁷⁾や、結晶のX線回折⁸⁾により決定された構造と良く一致し

ている。したがって、これらゲスト分子の化学シフト変化を環境の誘電率に基づくものと解釈して、*geometry* を定められることがわかった。

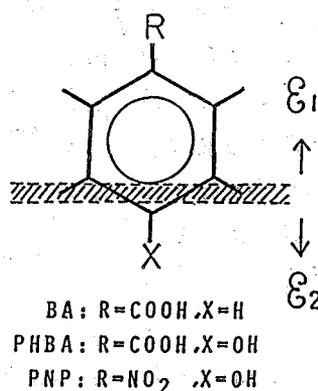


Fig.5. The position of the borderline (shaded region) dividing the surroundings into two layers with dielectric constants, ϵ_1 and ϵ_2 , where the characteristic ¹³C shift displacements are reproduced by the calculations

References

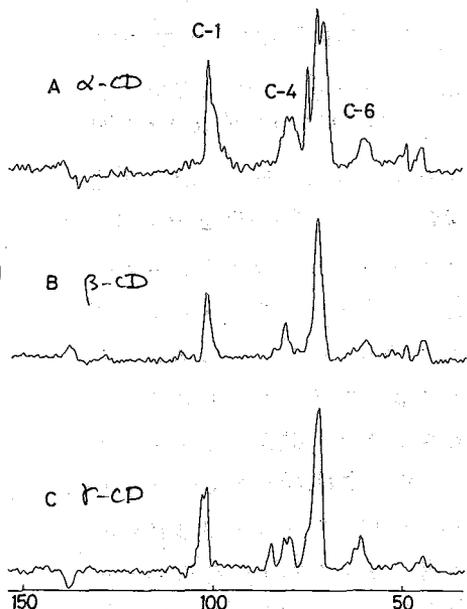
- 1) R. I. Gelb, L. M. Schwartz, B. Cardelino, H. S. Fuhrman, R. F. Johnson, and D. A. Laufer, J. Am. Chem. Soc., 103, 1750 (1981).
- 2) I. Ando and G. A. Webb, Org. Magn. Reson., 15, 111 (1981).
G. Klopman, Chem. Phys. Letters, 1, 200 (1967).
- 3) H. A. Germer, Theor. Chim. Acta, 34, 145 (1974).
- 4) J. A. Pople and D. L. Beveridge, "Approximate Molecular Orbital Theory", McGraw-Hill, New York, 1970.
- 5) M. Karplus and J. A. Pople, J. Chem. Phys., 38, 2803 (1963).
- 6) R. L. VanEtten, J. F. Sebastian, G. A. Clowes, and M. L. Bender, J. Am. Chem. Soc., 89, 3242 (1967).
- 7) Y. Inoue, T. Okuda, Y. Miyata, and R. Chûjô, Carbohydr. Res., 125, 65 (1984).
- 8) K. Harata, Bull. Chem. Soc. Jpn., 50, 1416 (1977).

(国立がんセンター研) 齋藤 肇, 多田涼子

シクロデキストリンは, α -(1 \rightarrow 4) 結合のグルコースが環状に α -7-, β - 残基結合したものの総称で, 適當のサイズの化合物とキタ空間に包接する。この包接体は, 酵素の活性中心モデル, あるいは薬物の安定化と目的としたドラッグデリバリーシステムとして各方面からの関心をいっている。しかしこれまでに, ゲスト分子と包接したシクロデキストリン環のマクロサイクリックコンホメーション変化が, 従来 CP-MAS NMR スペクトルにより簡便に検出できなかった^{1,4)}。また, ゲスト分子の運動性が向接的に, NMRピークの減小過程から推測することができたことを示した。

ゲスト分子の内部運動の存在は, コンスレックスの構造を理解する上で重要であるにもかかわらず, X線回折, ¹³C CP-MAS NMR による検出は肉眼的であり, 詳細な情報を得ることが困難である。ゲスト分子として, 揮発性化合物を用い, その¹H NMR スペクトルの核四重極分裂パターンの変化, あるいは T₁ 変化を詳細に検出する方法, より直接的であることは言うまでもない。本報告では, ゲスト分子として重メタールを用い, 包接体の動的挙動を¹H NMR スペクトルから調べた結果を報告する。

実験方法 包接化合物の調製は常法にしたがった。図1の¹³C CP-MAS NMR スペクトルから明らかにように, 重メタールの存在によりマクロサイクリックコンホメーション変化がみられている。¹H NMR の測定は, Bruker CXP-300 スペクトロメーターを用い, 90°- τ -90°- τ -echo のパルスシーケンスにより, echo の後半部をフーリエ変換した。90°パルスは4MSである。 τ は通常30~50MSを選んだ。スピン-格子緩和時間以上記のパルスシーケンスに, 180°- τ -90°パルスを組みあわせて測定した。



結果と考察

A. 核四重極分裂の温度変化

図2-4に, それぞれ重メタールを包接したシクロデキストリンの¹H NMR スペクトルを示す。 α -, β -シクロデキストリンの場合, -70°C にさうとうはじめ, たべた・りょうこ

図1 CD₃OD を包接したシクロデキストリンの 75.45 MHz ¹³C CP-MAS スペクトル

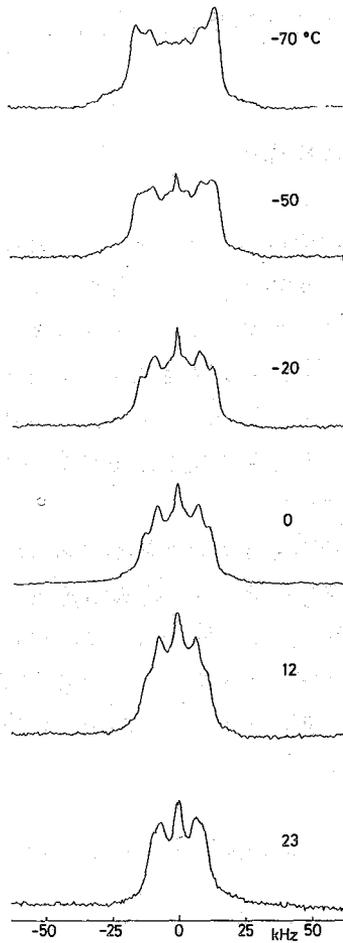


図2. 重メタノールを包接した α -CDの ^2H NMRスペクトル

おいて、32 kHzの核四重複分裂をもとに、軸対称型のスペクトルパターンを与える。これに併せて、 γ -シクロデキストリンの場合、 -60°C においても、このようなダブルレットパターンを与える。温度を上げていくと、核四重複分裂の値は減少し、やがて、その割合が $\beta > \alpha$ の順になっており、空腔内の重メタノール分子の存在の自由度と関連していることは明らか

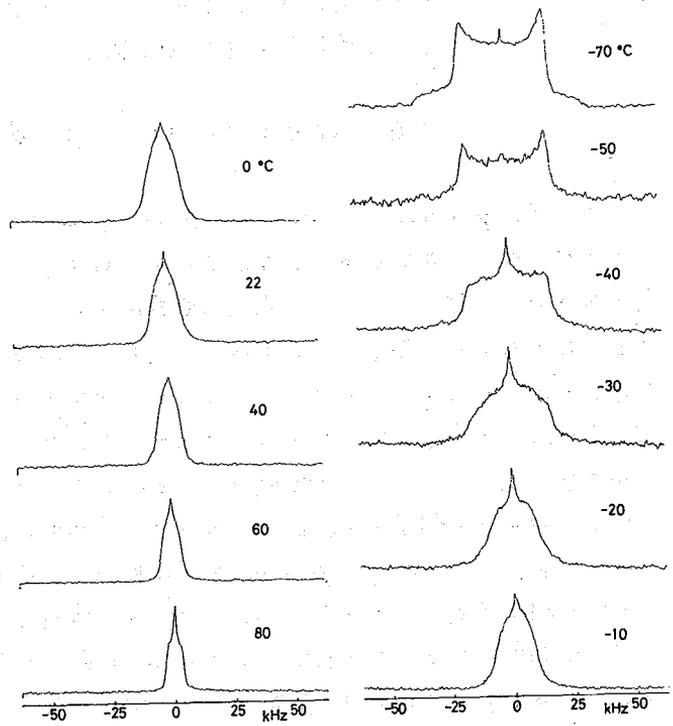


図3. 重メタノールを包接した β -CDの ^2H NMRスペクトル

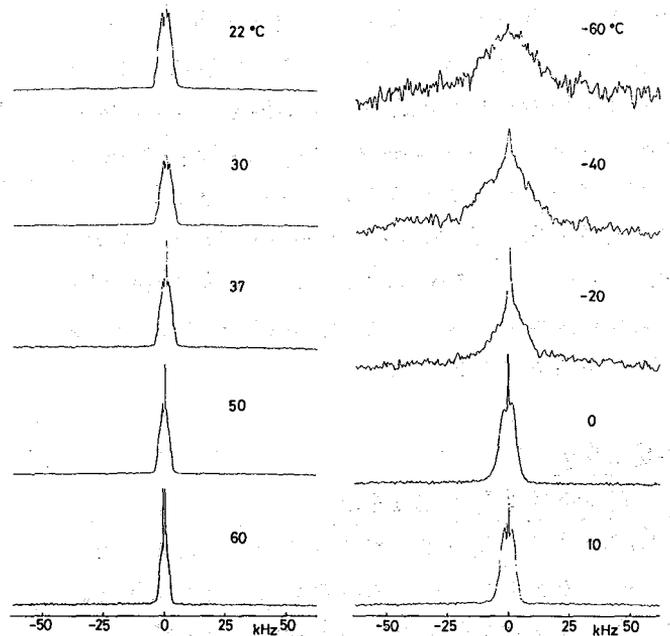


図4. 重メタノールを包接した γ -シクロデキストリンの ^2H NMR

である。

図2の重メタノール- α -CDコンプレックスでは、核四重分裂後の値に2種類知られる。SaengerのX線回折によれば、メタノールは各50%の確率で以下の2ヶ所の位置を占める。一つは、 α -CDのO(6)近傍で、メタノールC-O結合は α -CDトroid軸に垂直にある。もう一つは、 α -CDキャビティーの中心にあり、 α -CD分子軸に平行にある。いずれも、常温では運動状態にある。したがって、 ^2H NMR核四重分裂が二種類知られることは、メタノールの存在状態に二種類あることに矛盾しない。L α L, β -, γ -CDに包接されたメタノールは、NMRスペクトルで43限り一つのサイト(たぶん、 -20°C より以上では多数のサイトがあるとしても、その平均状態を仮定する)と考えてよい。

核四重分裂 $\Delta\nu_Q$ は

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \left(\frac{e^2qQ}{h} \right) \left[\left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right) + \frac{\eta \sin^2\theta \cos 2\phi}{2} \right] \quad (1)$$

で表わされる。ここで $\frac{e^2qQ}{h}$ は核四重分裂結合定数、 θ , ϕ は核の位置は下二つの軸と外部磁場 H_0 との、それぞれ傾角、方位角である。 η は(2)式で与えられる

$$\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}} \quad (2)$$

($V_{zz} = eQ$: 主軸) の asymmetry factor と呼ばれる。 -70°C にあたる重メタノールの運動状態は、 C_3 軸を中心とした回転のみであり、スペクトルパターンも $\eta = 0$ の典型的な粉末スペクトルと見做す。 C_3 回転が存在しない場合は、(1)式のみから θ の値からの寄与の割合、 $\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \left(\frac{e^2qQ}{h} \right) = 128 \text{ kHz}$ に至る ($\frac{e^2qQ}{h} = 170 \text{ kHz}$)。 C_3 回転がある場合、 $\Delta\nu_Q' = \Delta\nu_Q \times \frac{3\cos^2\theta - 1}{2}$ とおり、 $\theta = 70.5^\circ$ とすると $\Delta\nu_Q'$ は 42.7 kHz とする。実際は、 $O-CH_3$ 軸の libration のがあり、多くの場合 35 kHz が観測されてあり、今回の低温 (-70°C) の観測値と一致している。

温度上昇にともなって、核四重分裂後の値が減少していくことは上で述べたが、それと同時にスペクトルパ

ターンは $\eta \neq 0$ の様相を示してくる。これは、二つのサイト間の jump diffusion が起る場合に、電荷テンソルの非対称性が生じたためである。

高温部での核四重分裂後の値は $\sim 10 \text{ kHz}$ ほど減少している。簡単なために、

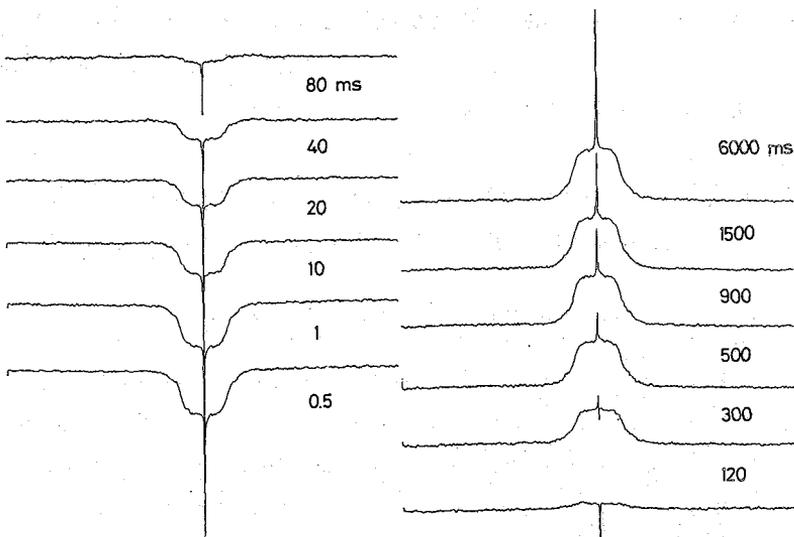


図5. 重メタノール包接 β -CD の 18°C にあたる inversion-recovery スペクトル

CD₃-Oベクトルがθ'のコーンの範囲で運動するモデルを考へると、

$$\Delta \nu_{\alpha}'' = 42 \times \frac{3 \cos^2 \theta' - 1}{2}$$

の分散が期待される。したがってθ'の範囲は1と45°が得られる。

スピン-格子緩和時間

図5に、Inversion-Recoveryパルスシーケンスに於てスベクトルビーグの代表例を示す。固体のT₁は一般に、外部磁場に対する取方向に於て異方向性を示す。ここでは、90°のエッジに対する値のみを示した故、いずれも、右に於いてsingle exponential decayを示した。図6に、このようにして得られたT₁値と測定温度の逆数に対するプロットを示す。得られるT₁値は、α > β > γ 順で減少し、特にγ-CDに包接した

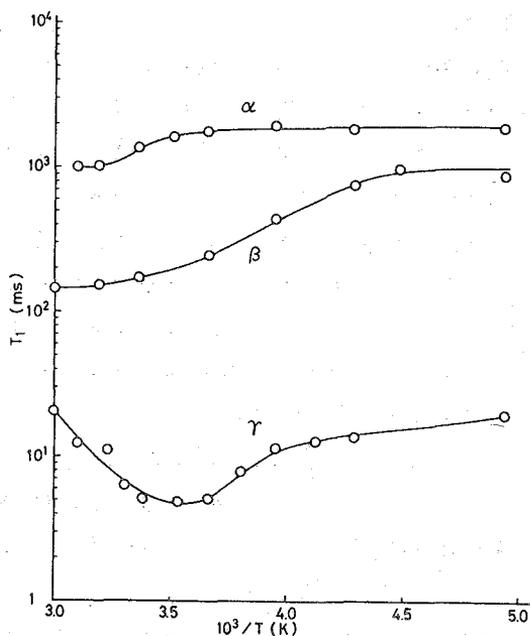


図6. スピン-格子緩和時間T₁の温度変化

α順序で減少し、特にγ-CDに包接した場合は、20°C付近にT₁最小値がみられた。この場合、20°C以上では1/Tに対して正線関係が見られ(高温側)、その活性化エネルギーは12.9 kJ/moleとなり、固体POC-L-Ala-L-[3,3,3-³H₂]Ala OMe⁶⁾、あるいは側鎖D化アミノ酸標識のpurple membrane anion⁷⁾に近しい。また最小値4.8 m秒は、isotropic motionと仮定したときの46 MHzでのT₁最小値3 msに近い。それゆへ、γ-CDに包接されたメチルールの高温領域では、メチルールの換置割合が認められていたものの、溶液状態の値に近くなることかわかる。しかし、α-β-γ-CDでは、T₁値は低温側で高温付近に於いてその運動状態に大きく差をばくかみることかわかる。

結論: 3H標識ゲスト分子を用いると、³H NMRスベクトルの解析により、ホスト-ゲスト相互作用、特にその運動状態に対する有用な知見を得ることが出来る。

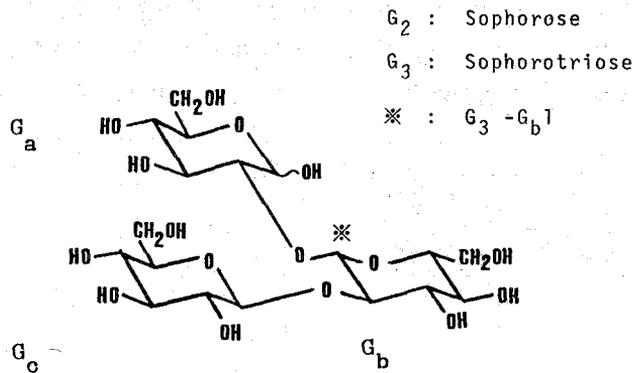
1. H. Saito and R. Tabeta, Chem. Lett., 713 (1981).
2. H. Saito, G. Izumi, T. Mamizuka, S. Suzuki, and R. Tabeta, J. C. S. Chem. Commun., 1386 (1982).
3. K. Uekama, F. Hirayama, A. Fujise, M. Otagiri, K. Inaba, and H. Saito, J. Pharm. Sci., 73, 382 (1984).
4. H. Saito, G. Izumi and R. Tabeta, Proceedings of the 21st Symposium on NMR, Nagoya, 41-44 (1982).
5. B. Hingerty and W. Saenger, J. Am. Chem. Soc., 98, 3357 (1976).
6. L. S. Batchelder, C. H. Niu, and D. A. Torchia, J. Am. Chem. Soc., 105, 2228 (1983).
7. M. A. Keniry, A. Kintanar, R. L. Smith, H. S. Gutowsky and E. Oldfield, Biochemistry, 23, 288 (1984).

(阪大産研)・高井嘉雄 沢田正実
雨村明倫

1. はじめに

多糖類や糖タンパク、糖脂質などの一次構造、立体構造の解析は単糖の種類や配列、結合様式の複雑さに加え、多くの水酸基による糖ユニット間の独特の水素結合などの相互作用があるため、NMR解析は誤まりを引き起こしやすく、容易ではない。これらの研究におけるNMRの利用は古くは新しいものと思える。実際、以前 ^1H NMRによるこれらの研究は、スペクトルが複雑なため主としてアノメリックプロトンをProbeとしてなされてきた。また、 ^{13}C NMRによる研究は、 ^1H NMRに比較して、スペクトルが簡単であるために多に利用され、数々の帰属法が確立されている。中でも水酸基プロトンの重水素化による同位体シフトの利用はすぐれた方法の一つである。

今回、我々は *Agrobacterium* が細胞外生産する *Cyclic- β -(1 \rightarrow 2)glucan* (17~23個のグルコースが β -1 \rightarrow 2グリコシド結合した環状化合物) の構造解析の一貫として基礎的データを確立するため、下記ソホロオリゴ糖(重合度2~9)についての ^1H 、 ^{13}C NMRスペクトル解析を行った。 ^1H 、 ^{13}C NMRスペクトルの帰属には近年発展してきた2次元NMR手法を用いた。



2. 実験

ソホロオリゴ糖は *Cyclic- β -(1 \rightarrow 2)glucan* (17~23) を酸加水分解することにより得られた。各重合度 (G = 2~9) のオリゴ糖はパーパークロマト分離により分離した。NMR装置には Bruker AM360 超伝導NMR装置を用い、測定は ^1H 360、132 MHz、 ^{13}C 90.56 MHz下、温度40°Cで行った。測定試料は十数mgのオリゴ糖を0.5mlの D_2O に溶解し、さわらび管に詰め、あめむらあきのり

重水に溶かし、凡溶解を用いた。各種2次元NMRの測定条件は、デジタル分解能と出来るだけ上げるため、スペクトル中、データポイントなどについて十分に考慮したものを利用した。

3. ¹H NMR

ソロオリゴ糖 G₂ ~ G₅ の1次元NMRスペクトルを図1に示した。スペクトルは4.7 ppmの溶媒H₂Oをほぼ中心に低磁場側にアノメリックプロトン G_{a1}, G_{b1} など、高磁場側に残リプロトン類が複雑に重なり合っている。これでは超伝導NMRにおいて十分な帰属が容易でない。さらに複雑化の原因としての還元末端のα-β平衡によるα, β体両者のスペクトルも含まれている。

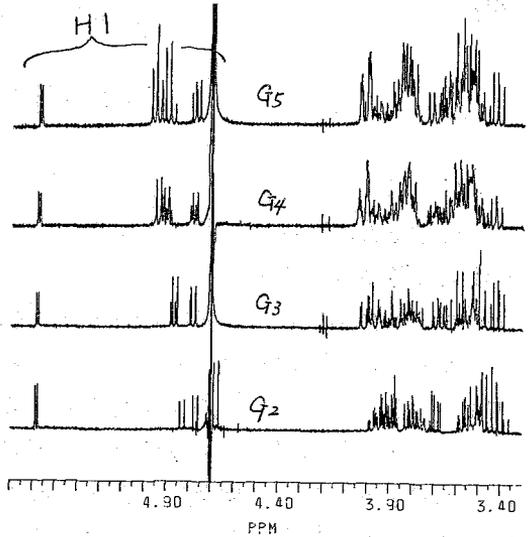


図1 オリゴ糖の¹H NMRスペクトル

高磁場側プロトン類の帰属は、¹H-¹Hシフト相関(COSY)による通常の方法と、Long Range Coupling をもつプロトン間が相関するような delay time (450 msec) を含めた COSY法とによって行った。結果の一部として、G₃体のコンタープロットを図2(COSY)、図3(Long Range COSY)を示す。図2の実線、点線で示された渦巻状の曲線から、G₃体のα, β体の各々のグルコースユニット内の¹Hスピン系に対しこの帰属が得られる。一方、図3では図2と比較してLong Range Couplingから生ずる新規のクロスピーク類が明らかに認められる。最も低磁場側プロトンα G_{a1}では同じグルコースユニット内の3

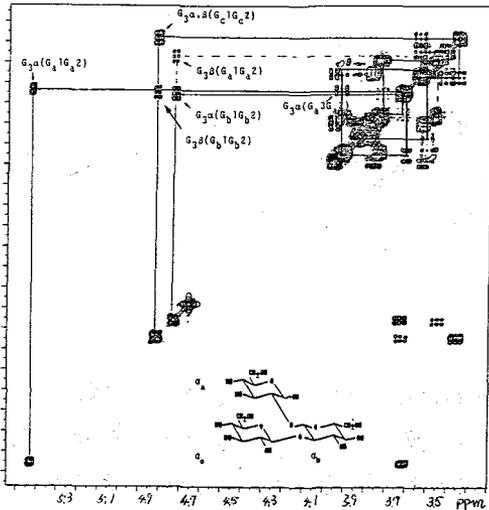


図-2 ¹H-Shift Correlation of Sophorotriose (τ=10msec)

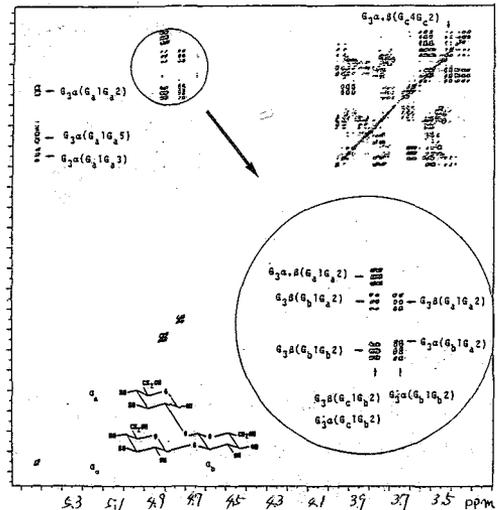


図-3 ¹H-Shift Correlation of Sophorotriose (τ=450msec)

、5位プロトンに由来するクロスピークが見られる。しかし、特長的なことには、 α -Gal以外のG1プロトン類では、5位プロトンに由来する(ユニット内)クロスピークが見られず、グリコシド結合をばさんだ $^3J_{HH}$ のLong Rangeによるユニット間クロスピークが現われている。従って、ここでの他のクロスピーク類もなわら 3J を通じたものが現われていないことから、ここでの 1H - 1H シフト相関は β 1 \rightarrow 2グリコシド結合だけでなく、もっと一般的にグリコシド結合様式の決定法として非常に有効に使用出来るものと思われる。ここでは図3に示したソホロオリゴ糖の帰属が可能になった。

4. ^{13}C NMR

ソホロオリゴ糖 $G_2 \sim G_8$ の1次元 ^{13}C NMRスペクトルC1, C2炭素部のみを図5に示した。各々のピークの帰属は ^{13}C - 1H シフト相関, Relayed Coherence Transfer 2Dにより行った。後者の実験は 1H - 1H シフト相関のパルス系列に ^{13}C - 1H シフト相関のパルス系列が加わった複雑なパルス系列を行った。実際には ^{13}C - 1H 磁化移動時に 1H - 1H 磁化移動が加わり、得られるスペクトルから横軸に ^{13}C - ^{13}C 結合、縦軸に 1H - 1H 結合の情報が得られる。図4はこの測定による93体のコンタープロットを示す。この図のクロスピーク面を 13C シフト軸方向、 1H シフト軸方向に線と引くと四角の箱が出来、そこで示されるピーク間の連結から ^{13}C - ^{13}C 結合及びその炭素鎖結合のそれぞれの炭素に結合した 1H - 1H が決定される。多くの箱間の連結から容易にグルコースユニット内の ^{13}C NMRピークの帰属が可能である。このコンタープロットで箱が書かれていないものは、92ppmの還元末端C1炭素及び約61ppm付近のC6炭素類であり、クロスピークが現われなかったのはおそらく対応プロトンの $^3J_{HH}$ が小さいためと思われる。このようにして帰属された結果の一部を表1に示

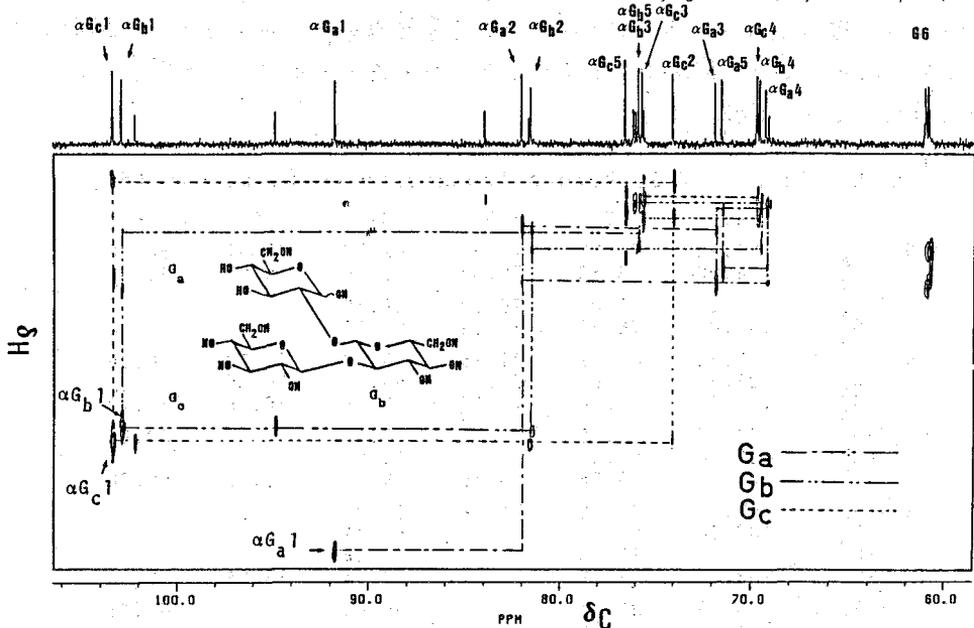


図-4 Relayed Coherence Transfer of Sophorotriose

した。

5. 重合度と¹³C NMRシフトの関係

図5、表1の¹³C NMRシフトには、(1)グリコシド結合による結合部位炭素のおおよそ10 ppmの低磁場シフト、(2)重合度とともに(両末端グルコース炭素は別にし)約1 ppmほどの高磁場シフト、(3)C2炭素の特長的な変化が見られる。(3)のC2炭素シフトについて結果を詳しく見るとソホロースに1つグルコースがβ-(1→2)結合したG3β体の環元末端ユニットC2のシフト値は、対応するG3β体のそれに比べて大きく約2 ppm 低磁場シフトしていることがわかる。一方G3α体ではその効果は約半分の1 ppmである。G4β体について上と同様に環元末端を見るとその効果はなく、環元末端から次のグルコースユニットG6部のC2において同様に低磁場シフトが見られる。これらの効果は環元末端部がαかβにかかわらず、β(1→2)結合した場合の特長であるように思われる。このことは環元末端がαのG4α体の環元末端ユニットC2には見られず、そのG6C2炭素に低磁場シフトがあることからわかる。

一般に、ソホロースの立体構造を考慮してこのβ体はα体に比べて立体的に込みあっており、両グルコースの面が一平面をとると考えられている。G3β体ではその平面性がβ(1→2)グリコシド結合によって壊され、その結果により低磁場シフトを生じたと考えられる。この特長は、さらに¹H NMRの検討によって議論される。

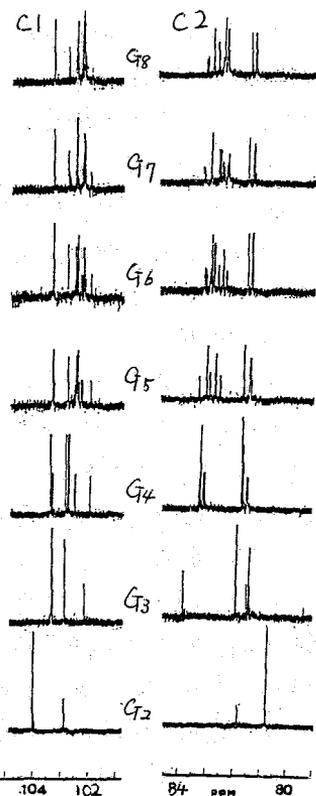


図-5 ソホロリ糖の¹³C NMR スペクトル

表-1 ¹³C NMR Shifts of Sophoro-oligosaccharides(external TMS)

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
G ₂ α-G _a	91.98	80.82	71.95	69.72	71.37	60.88
-G _b	104.00	73.53	75.83	69.76	75.97	60.82
G ₂ β-G _a	94.81	81.88	76.03	69.76		
-G _b	102.87	76.24	76.24	69.84		
G ₃ α-G _a	91.72	82.02	71.85	69.22	71.50	60.96
-G _b	102.87	81.54	75.84	69.52	75.86	
-G _c	103.34	74.06	75.66	69.68	76.56	60.78
G ₃ β-G _a	94.82	83.95		69.62		60.96
-G _b	102.16	81.54		69.05		
-G _c	103.32	74.06	75.59	69.72	76.57	60.78
G ₄ α-G _a	91.77	81.90	71.88	69.20	71.53	61.03
-G _b	102.84	83.41		69.44		
-G _c	102.73	81.85		68.88		
-G _d	103.40	74.12	75.61	69.66	76.64	60.80
G ₄ β-G _a	94.79	83.41		69.66		61.03
-G _b	101.95	83.26		69.11		
-G _c	102.49	81.67		69.03		
-G _d	103.32	74.12	75.61	69.53	76.64	60.80

1. 緒言

抗酸性菌に属する Mycobacteria, Nocardia 及び Corynebacteria は、細胞壁に多糖分画を有している。この多糖分画はアラビノース及びガラクトースを主成分とする事からアラビノガラクトランと呼ばれている。Mycobacteria, Nocardia 及び Corynebacteria から単離されたこれ等のアラビノガラクトランは、共に類似の生物活性を示す事から、その構造も互によく似ていると推定されてきた。しかしながらこれ等のアラビノガラクトランの構造において、たとえば Mycobacteria アラビノガラクトラン主鎖中のガラクトースの構造は、ピラノース型であるのかフラノース型であるのか未だ確定しておらず、図1のごとく二種の構造式が提案されている。^{1,2)} 今回 Nocardia より得られた Nocardia rubra アラビノガラクトランについて検討を行い、アラビノースとガラクトースの構造について検討を行った。

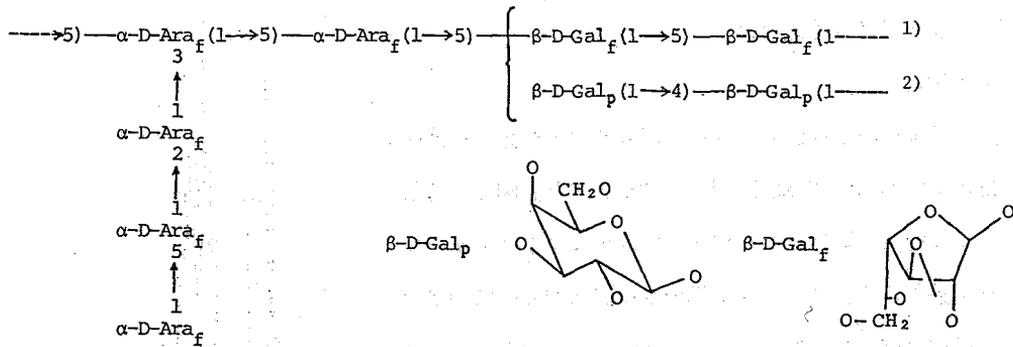


図1 ミコバクテリア由来アラビノガラクトランの推定構造

2. 実験及び考察

三崎等による Mycobacteria 菌体より細胞壁の多糖分画を単離する方法 (図2) を準用し、Nocardia rubra の細胞壁骨格成分から糖分画 Nocardia rubra アラビノガラクトランを単離した。本糖分画はアラビノース、ガラクトース及びラムノースから成りその構成成分比は約 2.5 : 1 : 0.07 (モル比) であった。更に GPC 法による分子量分布測定の結果 Nocardia rubra アラビノガラクトランは、4万、8千、3千及び3千未満の分子量分画の成分を含む事がわかった。Nocardia rubra アラビノガラクトラン中に低分子量成分が存在する事から、Nocardia rubra アラビノガラクトランは、こうだしげたか もりもとゆきよし

タン中に還元性末端の存在する事がわかる。

^1H NMR 解析

Nocardia rubra アラビノガラクトタンを重水中で ^1H NMR 測定し (WEFT法) 図3のスペクトルを得た。Dutton等によれば、 β ガラクトピラノシル結合しているガラクトースのアノメリックプロトンは、 $\delta 4.42 \sim \delta 4.62$ の領域に観測される事が報告されている³⁾。*Nocardia rubra* アラビノガラクトタンのアノマー水素が $\delta 5.10 \sim \delta 5.25$ に観測され、 $\delta 4.42 \sim \delta 4.62$ 付近に観測されない事は、*Nocardia rubra* アラビノガラクトタンのガラクトースが β ガラクトピラノシル構造では存在していない事を示している。従って、アラビノガラクトタン中のガラクトースのとり得べき二つの構造のうち β ガラクトピラノシル構造は否定できる。

^{13}C NMR 解析

Nocardia rubra アラビノガラクトタンの重水溶液を ^{13}C NMR 測定し (67.8 MHz) 図4の結果を得た。図4の 101 ppm から 109 ppm 付近に、アラビノース、ガラクトース及びラムノース残基のアノメリック炭素由来の記号が6本観測される。(低磁場側より信号 A, B, C, D, E 及び F と呼ぶ。図

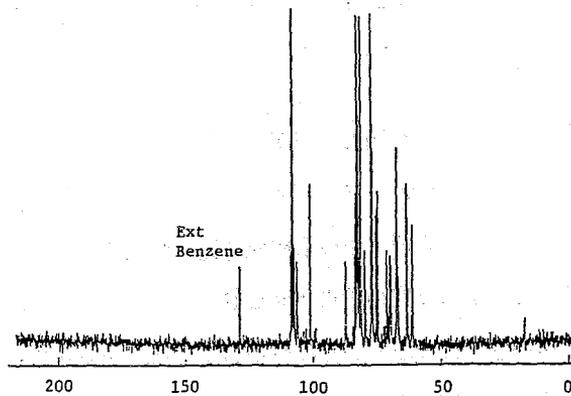


図4 *Nocardia rubra* アラビノガラクトタンの ^{13}C NMR スペクトル

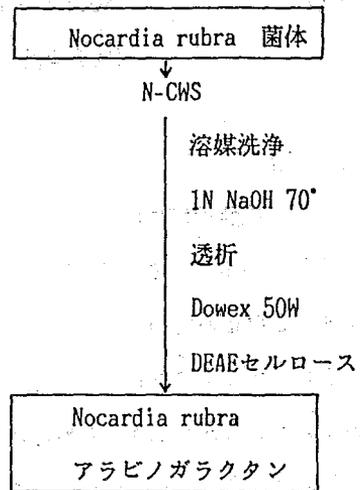


図2 *Nocardia rubra* アラビノガラクトタンの調製

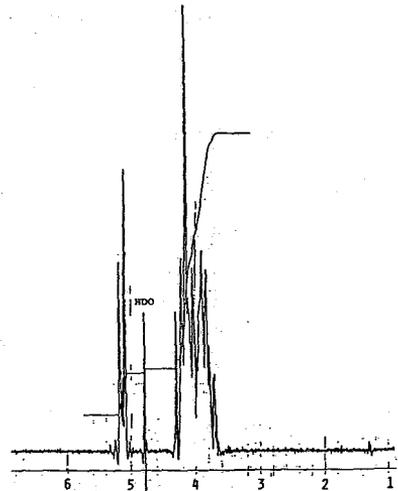


図3 *Nocardia rubra* アラビノガラクトタンの ^1H NMR スペクトル

表1 アノメリック炭素の縦緩和時間

signal	δ	T_1
A	108.7 ppm	242 m sec
B	108.0	252
C	107.7	211
D	107.5	239
E	106.3	337
F	101.2	383

6参照) *Nocardia rubra* アラビノガラクトランの結合様式を解析するには、これ等6本の信号から末端アノマー炭素に由来する信号を除いて解析する必要がある。末端アノマー炭素を明らかにする目的で信号 A~F の縦緩和時間を測定した。結果を図5、表1に示す。

図5、表1の結果より信号 A~D の縦緩和時間 211~252 m sec は、信号 Fの縦緩和時間383m secに比較して明らかに短い。この事は信号 A~D を与える糖残基のアノマー炭素は *Nocardia rubra* アラビノガラクトランの主鎖に由来する事がわかる。また信号E を与える糖残基は主鎖と末端部位の境界付近と推定される。そこで¹³C NMR 信号の解析を、まず信号 A、B、C 及び Dについて行った。なおラムノースについてはその含量の少ない事より今回の解析からは除いた。

Barreto-Berger等はガラクトースオリゴマーのアノマー炭素の¹³C NMR ケミカルシフトの解析より、結合ガラクトースのアノマー炭素のケミカルシフトとその結合様式とは良く対応している事を報告している。図6に各種結合構造とアノマー炭素のケミカルシフト領域を示す。図6の結果より明かなごとく、信号 A~D の出現位置はすべてβ f型ガラクトースの位置に一致している。この事実から *Nocardia rubra* アラビノガラクトラン主鎖中の信号 A~D を与えるガラクトースの構造はβ p型、α p型及びα f型構造のいずれでもなくβ f型構造である事がわかる。この結果は先の¹H NMRの解析結果ともよく一致する。また主鎖と末端部位の境界付近の信号E をあたえるガラクトース残基はその¹³C NMR スペクトルのケミカルシフトより、β f型あるいはβ p型の二種の可能性が考えられる。一方¹H NMRの解析結果より *Nocardia rubra* アラビノガラクトランのガラクトースはβ p型ではない事が判明している。したがって信号E を与えるガラクトースはβ f型

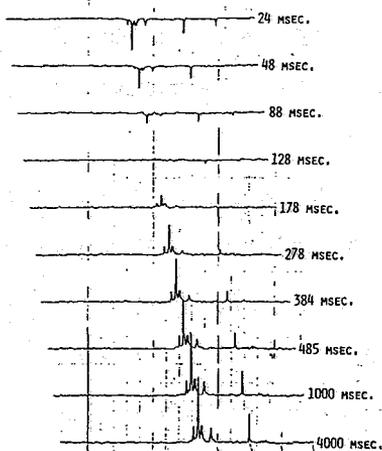
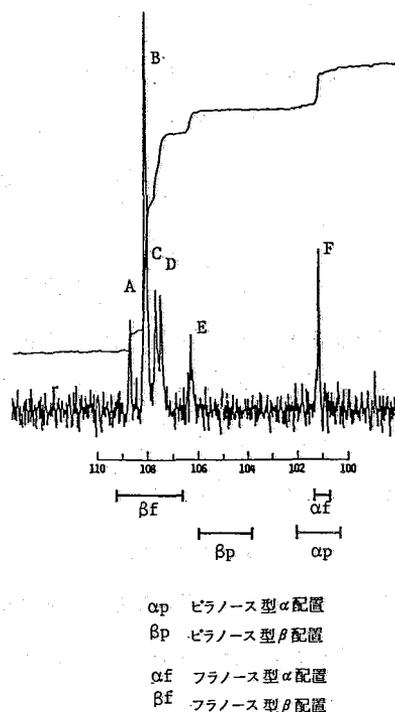


図5 *Nocardia rubra* アラビノガラクトランの¹³C NMR シグナルの縦緩和時間測定



Nocardia rubra アラビノガラクトランの
図6 部分¹³C NMR スペクトルとガラクトラン
アノマー炭素のケミカルシフト領域

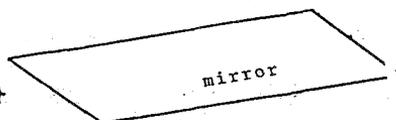
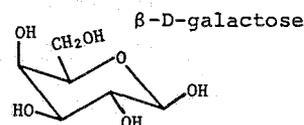
構造を有している事がわかる。

すなわち, *Nocardia rubra* アラビノガラクトン主鎖中に存在するガラクトース残基は, すべて β f型構造である事がわかる。

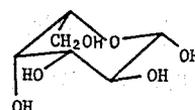
次に *Nocardia rubra* アラビノガラクトン中のアラビノースの結合構造について解析を行った

図7に *Nocardia rubra* アラビノガラクトン中の主構成成分であるDアラビノースとDガラクトースの立体構造を示す。

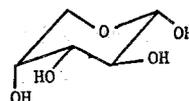
(ピラノース構造で例示した) 図7に示したごとく β -D-ガラクトースは α -L-5ヒドロキシメチルアラビノースである。ヒドロキシメチル基の位置はアノマー炭素の γ 位に相当する事から, ヒドロキシメチル基の存在の有無はアノマー炭素のケミカルシフトに大きく影響しないと判断できる。この事はガラクトース残基において成立したアノマー炭素とその結合構造との関係はアラビノースにおいても同様に成立すると判断できる。ただし図7より明かなごとくガラクトースとアラビノースにおける α と β の関係は逆転する。以上のアラビノースとガラクトースとの関係をもとに, 図6の結果を解析すると, *Nocardia rubra* アラビノガラクトン主鎖中のアラビノースは α f型構造である事がわかる。



β -L-galactose



α -D-arabinose



β Dアラビノースと
図7 β Dガラクトースの
立体構造

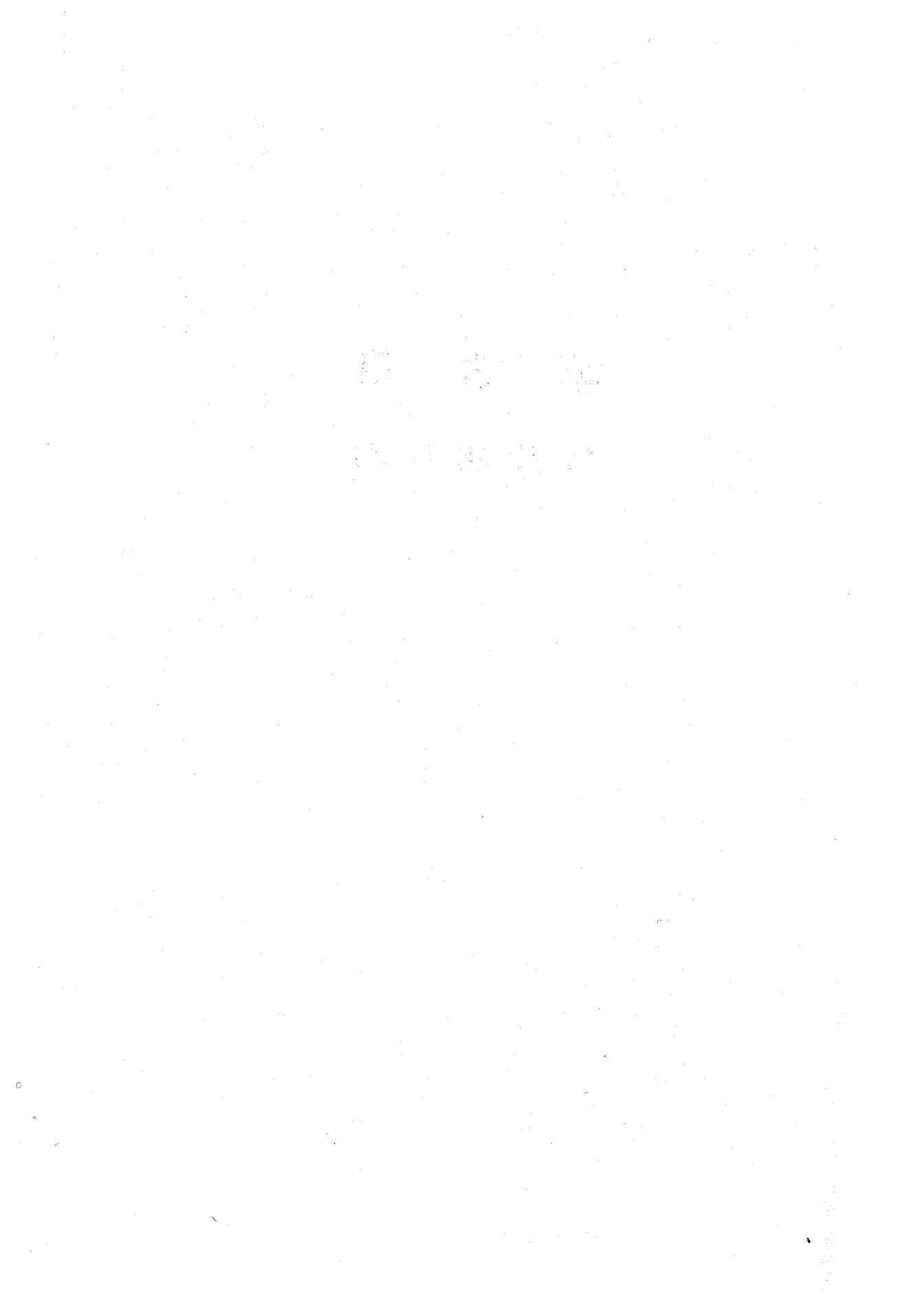
3. まとめ

Nocardia rubra アラビノガラクトン主鎖中のガラクトースの構造は, β フラノシド構造でありアラビノースの構造は, α フラノシド構造である事がわかった。また多糖の構造解析に ^1H 及び ^{13}C NMR 法が有効であるといえる。

- 1) E.Vilkas, C.Amar, J.Markovitz, J.F.G.Vliegenthrt, and J.P.Kamerling, *Biochem. Biophys. Acta*, 297, 423 (1973).
- 2) A.Misaki, N.Seto, and I.Azuma, *J.Biochem.*, 76, 15 (1974).
- 3) L.D.Fabio, and G.G.S.Dutton, *Carbohydr. Res.*, 99, 41 (1982).
- 4) E.M.Barreto-Bergter L.R.Travasaos, and P.A.J.Gorin, *Carbohydr. Res.*, 86, 273 (1980).

第 3 日

11 月 28 日 (水)



ゼオライトを合成する際有機塩基が用いられることが多い。この有機塩基はゼオライトの生成過程において“テンプレート”の役割を果たすと考えられているが、まだその機構はよくは解明されていない。このため、ゼオライトの生成時に網目構造の中にとらえられた有機塩基の位置と構造を調べることは結晶化過程を明らかにするうえで非常に重要である。 ^{13}C 核の固体高分解能NMRは非常に有力な手段であり、まずZSM-5およびZSM-11型のゼオライト中に閉じ込められたテトラプロピルアンモニウムイオン、テトラブチルアンモニウムイオン、テトラブチルホスホニウムイオンの ^{13}C CP/MAS スペクトルが測定されその有用性が示された^{1~2)}。A型やソーダライト型のゼオライト中のテトラメチルアンモニウム(TMA)イオンについても測定がなされ、2種類のサイトをイオンが占めていることが見いだされた³⁾。しかし、それ以外の研究はまだ行なわれておらず、有機塩基の役割は明らかではない。また、Si, Al, O原子から成る“かご”の中に閉じ込められた有機分子の挙動は興味深い。

我々は、TMAイオンを含む種々のゼオライトを合成し、その ^{13}C CP/MAS スペクトルの測定を行なった。その結果、細孔中のTMAイオンの ^{13}C シグナルの化学シフトが“かご”の大きさと密接に関連していることを見いだしたので報告する。

<実験> TMAイオンを含むゼオライトを文献に従って合成した。また、TMAの水溶液に含浸することによって表面にTMAイオンを吸着させた試料も調製した。 ^{13}C CP/MAS スペクトルの測定は日本電子製FX-200を用いて行なった。 ^{13}C と ^1H の共鳴周波数はそれぞれ50, 200 MHzであり、接触時間を5 msec, 繰返し時間を10 secとした。ローターはKel-F製を用い、約3.5 kHzで回転させた。化学シフト値の二次標準としてアダマンタンを用い、シフト値はテトラメチルシラン(TMS)基準で示した。

<結果および考察> 図1に種々のゼオライト内に閉じ込められたり吸着したりしたTMAイオンの ^{13}C スペクトルを示した。TMAイオンのメチル炭素の化学シフト値がゼオライトの構造によりいろいろと変化していることが図からわかる。図2にゼオライトの骨格を構成する種々の“かご”を示した。

TMAイオンを含むフォージャサイトのスペクトルには2本の共鳴線が観測された(図1a)。化学シフト値は58.69, 56.65 ppmであった。一方、フォージャサイトに吸着したTMAイオンは56.21 ppmに共鳴線を示した(図1e)。シリカゲルに吸着したTMAイオン

はやしげのぶ, すずきくにお, しんしげみつ, はやみずきくこ, やまむとおさむ

は 56.31 ppm に共鳴線を示すが、シリカゲルにはゼオライト構造のような“かご”が無いと考えられるため 56.31 ppm の共鳴線は外表面に吸着した TMA イオンに帰属される。シリカゲルとの類推からフォージャサイトの 56.21 ppm の共鳴線も外表面に吸着した TMA イオンに帰属される。このことから、図 1 a の 2 本の共鳴線はゼオライト骨格内の TMA イオンによるものであると結論される。

フォージャサイトはソーダライトケージとそれによって囲まれるスーパーケージ(αケージと呼ぶことにする)から成り立っている。ソーダライトケージから成り立っているソーダライトに閉じ込められた TMA イオンが 58.84 ppm に共鳴線を示すこと³⁾との類推から、フォージャサイトで観測された 58.69 ppm の共鳴線はソーダライトケージ中の TMA イオンに帰属される。一方、56.65 ppm に観測された共鳴線はαケージの TMA イオンに帰属される。

A 型のゼオライトでは 3 本の共鳴線が観測され、化学シフト値は 58.69, 56.94, 55.97 ppm であった(図 1 b)。A 型ゼオライトは 2 種類のケージから成り立っている。則ち、ソーダライトケージが 2 重の 4 員環で連なり、αケージを包んでいる。フォージャサイトとの類推で考えると、58.69 ppm はソーダライトケージ、56.94 ppm はαケージ、55.97 ppm は外表面の TMA イオンにそれぞれ帰属される。

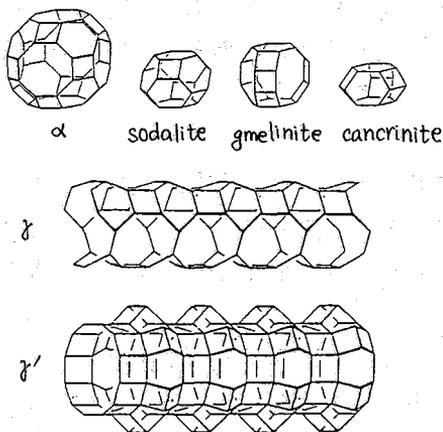


図 2. ゼオライト骨格を構成する種々の“かご”(ケージ)。

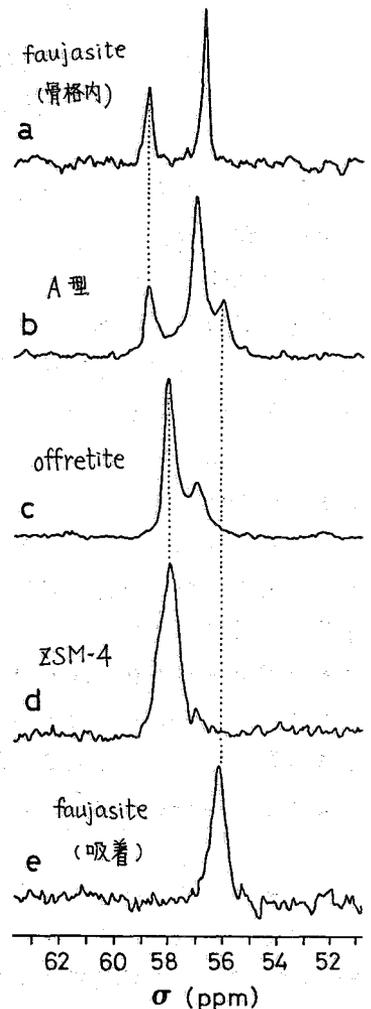


図 1. 種々のゼオライト内の TMA イオンの ^{13}C CP/MAS スペクトル。

オフレタイトでは 2 本の共鳴線が観測され、化学シフト値は 58.01, 56.99 ppm であった。オフレタイトの骨格は、グメリナイトケージ、カンクリナイトケージ、管状のスーパーケージ(βケージと呼ぶことにする)の 3 種類のケージで構成されている。カンクリナイトケージは小さすぎて TMA イオンを収容できない。ケージの大きさの小さい方が低磁場側にシフトする傾向があることから、58.01 ppm がグメリナイトケージ、56.99 ppm がβケージの TMA イオンに帰属される。

アルミニウム原子をガリウム原子で完全に置き換えたオフレタイトについても ^{13}C スペクトルの測定を行なったところ、57.96 ppmと57.08 ppmとに共鳴線が観測された。2本の共鳴線はそれぞれ、ゲメリナイトケージと γ ケージのTMAイオンに帰属される。この結果から、アルミニウムをガリウムで置換しても化学シフト値にはほとんど影響しないことがわかった。

ZSM-4では57.96 ppmに強い共鳴線が現われ、56.98 ppmに弱い共鳴線が現われた(図1d)。また、 Ω 型ゼオライトでは57.96 ppmにのみ共鳴線が観測された。ZSM-4と Ω は共にマザイト構造をとり、ゲメリナイトケージと管状のスーパーケージ(γ ケージと呼ぶことにする)から構成されている。オフレタイトの結果と考え合わせると、57.96 ppmの共鳴線はゲメリナイトケージのTMAイオンに帰属される。従って、56.98 ppmの共鳴線は γ ケージ内のTMAイオンに帰属される。

さらに、水溶液中のTMAイオンについても ^{13}C スペクトルの測定を行なった。D₂Oを溶媒として用い、前述したゼオライト中のTMAイオンの平均密度と同程度の濃度になるように調製したところ、55.98~56.17 ppmの範囲内に単一の共鳴線が観測された。TMAイオンの濃度の増加につれて共鳴線が低磁場側にシフトする傾向が見られた。水溶液中のシフト値は外表面に吸着したTMAイオンのシフト値とほぼ一致している。

TMAイオンの化学シフト値をサイトごとに分類して表1に示した。表1の結果から、化学シフト値がケージの大きさと関連していると考えられる。TMAイオンが球形に近いことから、ケージの大きさをそのケージが収容できる最大の球の直径で表わすことが妥当と考えられる。そこで、ゼオライト構造の模型を作り、原子半径を無視して球の直径を大ざっぱに見積もったところ次のような値を得た。カンクリナイトケージ 4.6 Å, ソーダライトケージ 6.8 Å, ゲメリナイトケージ 7.6 Å, γ ケージ 8.7 Å, γ' ケージ 10.5 Å, α ケージ 11.1 Å, α' ケージ 13.6 Å。

表1. TMAイオンの ^{13}C 化学シフト値 [ppm, TMS基準]

Samples	Sites of TMA ions							
	sodalite (β) cage	gmelinite cage	γ	γ'	α	α'	outer- surface	in D ₂ O
sodalite ^{a)}	58.84							
faujasite (I)	58.69					56.65		
Linde A	58.69				56.94		55.97	
ZK4 ^{a)}	58.84				56.94			
	~58.92				~56.97			
offretite		58.01	56.99					
Ga offretite		57.96	57.08					
ZSM-4		57.96		56.98				
Ω		57.96						
faujasite (II)							56.21	
silica gel							56.31	
D ₂ O ^{b)}								55.98 ^{c)}
								56.10 ^{d)}
								56.17 ^{e)}

(a) 文献3)より引用。 (b) ジオキサンを内部標準として用いた。
(c) 0.029g, (d) 0.093g, (e) 0.434gの $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Cl}$ を1gの D_2O に溶解した。

の大きさに対してプロットした。図を見てわかるように、 ^{13}C 化学シフト値はケージの大きさとよく対応しており、ケージの大きさが小さくなるほど低磁場側にシフトする傾向がある。ケージの大きさがTMAイオンの大きさに近づくと急激に低磁場側へシフトする。

同じ型のケージに対する化学シフト値は実験誤差内で一致している。文献3)から引用したソーダライトケージの値が少しずれているようにも感じられるが、測定条件などを考慮すると実験誤差内で一致していると考えられる。以上のことから、化学シフト値がケージの大きさでほとんど決まっていると結論できる。一方、TMAイオンを含むケージの外の構造、カリウムによるアルミニウムの置換、骨格のSi/Al比、ケージ内のTMAイオンの密度は化学シフト値にほとんど影響を与えないと考えられる。

TMAイオンのメチル炭素の共鳴線の線幅は図1を見てわかるようにゼオライトによって変化する。図1aに示したフォージャサイト内に関じ込められたTMAイオンのスペクトルは他のスペクトルに比べて線幅が非常に狭い。一方、ZSM-4(図1d)および Ω 内のTMAイオンのスペクトルの57.96 ppmの共鳴線は半値全幅が約0.6 ppmあり、他の共鳴線より広い線幅を示す。線幅の原因としては、化学シフトの分散と ^{14}N スピンの結合の2つが考えられ、化学シフトと同様線幅からもケージ内に関じ込められたTMAイオンの構造と位置に関する情報が得られると期待される。線幅の狭い場合は、すべてのTMAイオンがケージ内の同じようなサイトに存在しているか、もしくは、TMAイオンの構造が周囲の“かご”によって歪んでいないことを意味すると考えられる。

結論として、ゼオライト中のTMAイオンのサイトは固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトルを測定することによって決めることができる。さらに、たとえ構造がわかっていない場合でも、メチル炭素の ^{13}C 化学シフト値からTMAイオンを関じ込めているケージの大きさを図3から見積もることができる。

TMAイオンによるケージの占有の割合、および、TMAイオンがゼオライトの結晶化過程において果たす役割については現在検討中である。

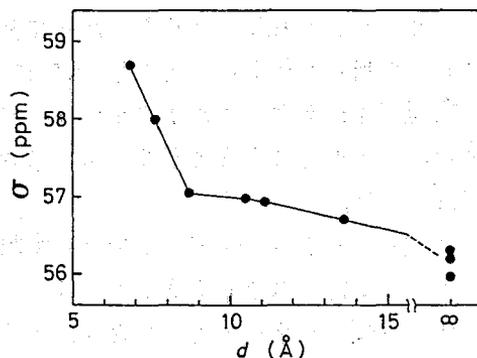


図3. TMAイオンの ^{13}C 化学シフト値とケージの大きさの関係。

文献 1) G. Boxhoorn, R.A. van Santen, W. A. van Erp, G.R. Hays, R. Huis, and D. Clague, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1982, 264.

2) J. B. Nagy, Z. Gabelica, and E. G. Derouane, *Zeolites*, 3, 43 (1983).

3) R.H. Jarman and M.T. Melchior, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1984, 414.

(茨城大・理, 茨城工専*, 日立那珂**) ○平山昌南, 堀江克之
 蝦名不二夫*, 池田義記**

[序] 強いアルカリ性 (pH ~ 10) 下でも使える水溶性シフト試薬として, EDTA-Lnキレート¹⁾が知られているが, これはシフト能が小さいため更に水溶性ポリフィン環のLnキレートである tetra-*p*-sulfonato phenylporphyrin-Ln(III) [LnTPPS] が Horrocks 等²⁾により開発され, いくつかの基質についてテストされている。その結果 TmTPPS がなかの少し割にシフト能が大きいこと最も有望視されている。

しかし水溶液中での LnTPPS (L) の Aggregation のため基質との固のアダクトの化学量論的考察がなされておらず, 従って厳密な contact (CS) と pseudo contact shift (PCS) への分離も不可能であった。今回, 我々はこの試薬の特性についていくつかの基質を用いて検討する。

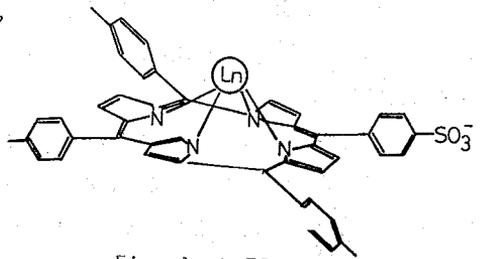


Fig. 1. LnTPPS

[実験] LnTPPS (L) (Ln = Tb, Ho, Er, Tm, Yb, Lu) は文献³⁾の方法により合成し, カラムクロマト (Al_2O_3) で精製し, UVスペクトルにより確認した。基質 (S) にはアニリン, α -ピコリンを用い, S の D_2O 溶液 (pH ~ 10) に L を $[L]/[S] = p$ が 0.3 位まで連続的に加えながら TSP-dq を外部基準として 1H -NMR を測定した。体積磁化率の差 ($\Delta\chi$) によるシフトの補正は, LnTPPS の代わりに free Ln^{III} 水溶液中での $(CH_3)_4N^+$ のシフトを用いて行った。装置は日立 R-250 (250 MHz), 試料温度は 26°C である。

[結果と考察]

(1) アニリン 代表例として, 最も大きな lanthanoid-induced shifts (LIS) (δ) を与える TbTPPS によるシフトを Fig. 2 に, δ vs p

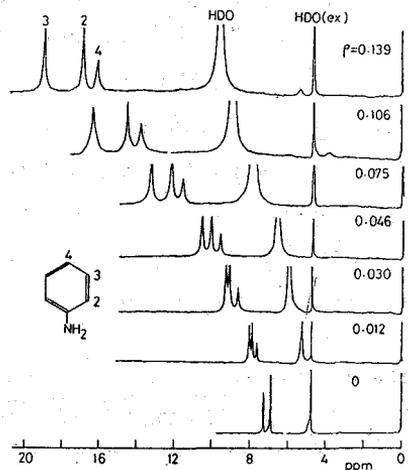


Fig. 2. Effect of increasing concentrations of TbTPPS on the 250 MHz 1H NMR of aniline (0.391 M) in D_2O (pH 10)

プロットを Fig. 3 ($\Delta\chi$ によるシフトの補正をしてある) に示す。ポリフィン環の π - π 相互作用による水溶液中での LnTPPS の Aggregation のため, LIS の固の常磁性アダクトには化学量論関係の不明な多種のものが予想されるので, 一般, $p=0.3$ における δ' (錯形成シフト cfs) として LnTPPS によるシフトを用い, 補正してある) 値をアダクトの限界シフトの大きさを目安として Table 1 に上げる。まず, 反磁性 LuTPPS によりすべてのプロ

$$\delta' = \delta - \delta_{cfs}$$

ひらがま まさとし, ほりえ かつゆき, えびな ふじお, いけべ よしゆり

トンが高磁場へシフトしており (Fig. 4) = れは従来の La-, あるいは Lu(dpm), Lu(fod) の試薬では見られなかったポリリン環による環電流効果によるものであり、もし他の cfs 効果の寄与がなく、 δ' がいずれかのアダクトの真の固有シフトであれば、Johnson-Bovey の式を用い fitting analysis によりア=リン分子のポリリン環に対する相対位置とある程度の精度がおめられはすである。一方 TbTPPS ~ YbTPPS では、分子内シフト比は大きくばらつき一定値に近づかない。もし δ' が単純な 1 分子種の固有シフトを表現しているならばかなり大きな CS の寄与があると結論されるのであるが、念のためこの可能性を見つため、この仮想的アダクトに対して effective な軸対称と、Tb~Yb に渡り、ア=リンの各プロトンの hfs 定数 (A) と、アダクトの形状 (各プロトンの geometric factor, G) が不変であるとする一般に lanthanide series に用いられている仮定を適用して、

$$\delta' = c_2 + p c_3 = A \langle S_z \rangle + G \cdot D$$

$$\delta' / \langle S_z \rangle = A + G \cdot D / \langle S_z \rangle$$

における $\delta' / \langle S_z \rangle$ vs. $D / \langle S_z \rangle$ のプロットを試みた。= = = $\langle S_z \rangle$ ³⁾, D ⁴⁾ はそれぞれ Goldring による total S 値の正成分の平均値、Bleaney 等による pcs の計算値である。

Fig. 5 に示す様に直線性は極めて悪し、図の上では H_0 が大きくなるように見える。しかし Lu(fod) の試薬の場合、上で述べた lanthanide series に対する仮定のうち一つでも不適当なものをもち系であれば、一般にこの直線からずらいつまは極めて悪しかり、これにしろべければ、またいじりかいい様に見受けられる。いずれにしてもこの曲線が原点からかなり大きくはなれており、 δ' の固有シ

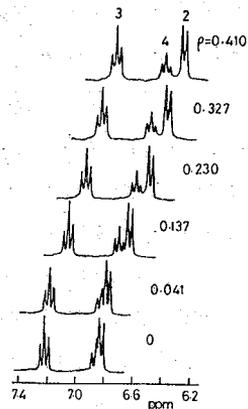


Fig. 4. Effect of increasing concentrations of LuTPPS on the 250 MHz ¹H NMR of aniline (0.178 M) in D₂O (pH 10)

LnTPPS	Isotropic shifts (ppm)		
	2	3	4
Tb ^{b)}	16.01	20.86	14.82
	1.08	1.41	1.00
Ho	6.33	5.41	5.14
	1.23	1.05	1.00
Er	2.31	4.11	4.47
	0.52	0.92	1.00
Tm	-2.59	-0.79	-0.27
	-9.59	-2.93	-1.00
Yb	-1.01	-0.98	-1.00
	-1.01	-0.98	-1.00

- a) Corrected for the bulk susceptibility shifts and for the diamagnetic shift taken to be that of LuTPPS ($H_2, -0.41; H_3, -0.36; H_4, -0.32$). The values in the second line are those normalized to that of H_4 .
- b) The values obtained from extrapolation of those at $p=0 \sim 0.14$ to $p=0.3$

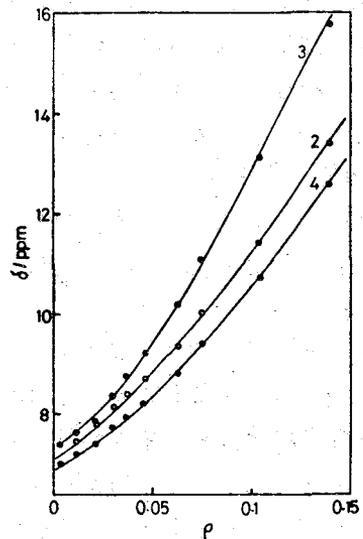


Fig. 3. δ vs p plots for the aniline-TbTPPS system

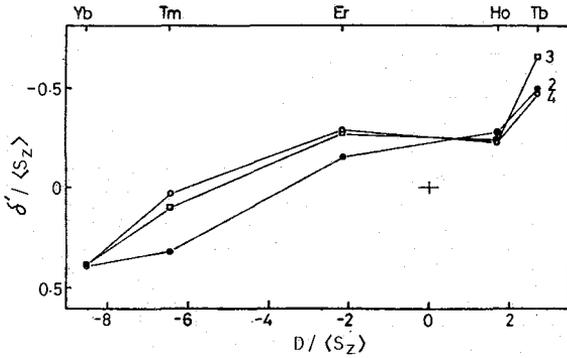


Fig. 5. $\delta/\langle S_z \rangle$ vs $D/\langle S_z \rangle$ plots for the aniline-LnTPPS system

フトとして不確かさがあるとしても、従来の $\text{Ln}(\text{fod})_3 \sim \text{aniline}$ 系⁵⁾とは異なり大きな A 値が存在し、H_oes 項の存在の可能性が考えられる。=9=とは、LnTPPS は $\text{Ln}(\text{fod})_3$ に比べて (Fig. 1 に示した様に) Ln の位相がかなり基底と相互作用しやすい状態になつており (実際はイミダゾール 2 分子が配位して 11) 又、アニリンとポルフィリン環との直接の $\pi-\pi$ 相互作用の寄与もあって、covalency が強まつてくることの予想を裏づけるものがある。

現在、もっとも単純な Aggregation である L₂ のみを考慮して、 $\delta \sim \rho$ プロットに於いて、



fitting analysis を試みていたがあまり思わしくないのだ、L の depolymerization 剤として適当な極性溶媒を加えて測定を試みる予定である。実際、95% DMF d₇ ~ 5% D₂O 中には LnTPPS はほぼ monomer として assign. され、H スペクトルに突込みが、この条件下ではシフト能が極端に減少して (7)。

(2) α -ピコリン。アニリンの場合とほぼ類似の結果が得られる。Fig. 6 ~ Fig. 9. 固有シフトの見極めの精度がよければ、LnTPPS-induced shifts (Fig. 8) も、前と同様に S の配位状態がわかるものと思われる。一方 Horrocks 等により、 β -ピコリン-LnTPPS 系の測定が行われている。安息香酸誘導体等と比べてシフトが全般的に大きいことから、 β -ピコリンの N の大きな配位力と、L の depolymerization が、 $\delta \sim \rho$ プロットの

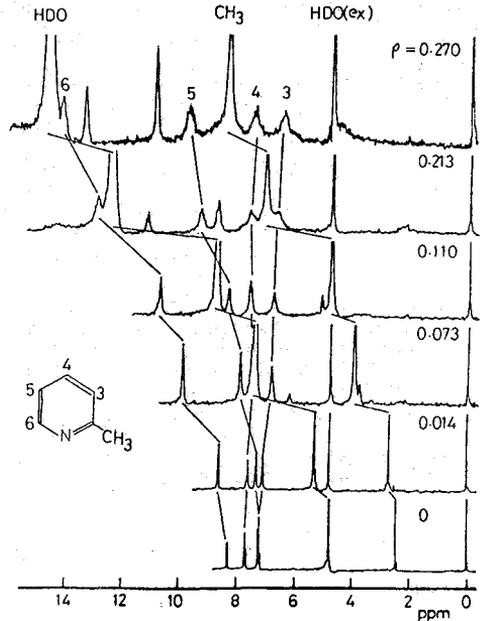


Fig. 6. Effect of increasing concentrations of ErTPPS on the 250 MHz ^1H NMR of α -picoline (0.240 M) in D_2O (pH 10)

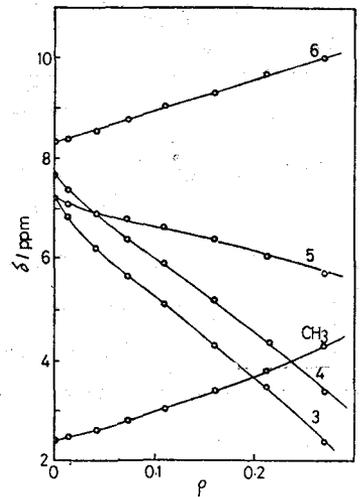


Fig. 7. δ vs ρ plots for the α -picoline-ErTPPS system

Table 2 Isotropic shifts of α -picoline induced by LnTPPS ($\rho=0.3$) at 26°C^{a)}

LnTPPS	Isotropic shifts(ppm)				
	3	4	5	6	CH ₃
Tb ^{b)}	13.30	18.92	9.10	18.75	7.44
	0.70	1.00	0.48	0.99	0.39
Ho	8.31	7.94	6.85	5.26	6.15
	1.05	1.00	0.86	0.66	0.77
Er	-4.36	-3.75	-0.92	2.40	2.69
	-1.16	-1.00	-0.25	0.64	0.72
Tm	-3.45	-2.80	-4.35	-1.08	-1.11
	-1.23	-1.00	-1.55	-0.39	-0.40
Yb	-0.58	-0.67	-0.87	-0.80	-0.70
	-0.87	-1.00	-1.30	-1.12	-1.04

- a) Corrected for the bulk susceptibility shifts and for the diamagnetic shift taken to be that of LuTPPS (H₃, -0.90; H₄, -0.95; H₅, -0.70; H₆, -0.52; H_{CH₃}, -0.54). The values in the second line are those normalized to that of H₄.
- b) The values obtained from extrapolation of those at $\rho=0 \sim 0.1$ to $\rho=0.3$

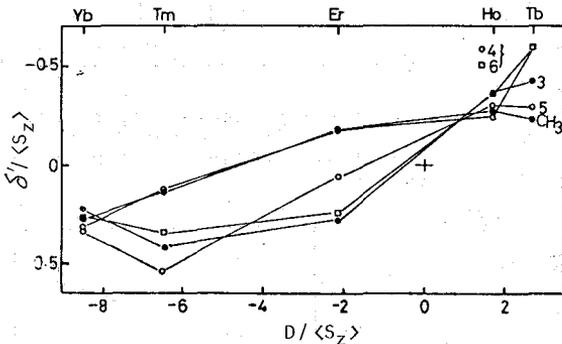


Fig. 9. $\delta / \langle S_z \rangle$ vs $D / \langle S_z \rangle$ plots for the α -picoline-LnTPPS system

$\rho=0.3$ が大半であり、 α - ρ プロットには $\rho=0$ の値が示され、 $\rho=0.3$ の値は $\rho=0$ の値から推定される。しかし、Tb は $\rho=0.3$ の値が $\rho=0$ の値と異なる。Yb, Ho, Er の値が $\rho=0$ の値と異なる。これは、 $\rho=0.3$ の値が $\rho=0$ の値と異なる。ortho位 CH₃ の立体障害が原因と見られる。明確な化学量論比が得られず、結果は図 9 に示される。今のところ、Fig. 9 に示される結果は、 $\rho=0.3$ の値が $\rho=0$ の値と異なる。

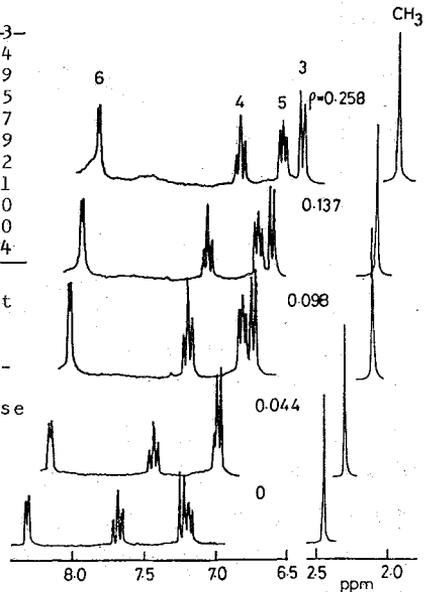


Fig. 8. Effect of increasing concentrations of LuTPPS on the 250 MHz ¹H NMR of α -picoline (0.252 M) in D₂O (pH 10)

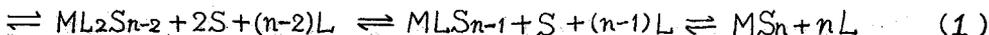
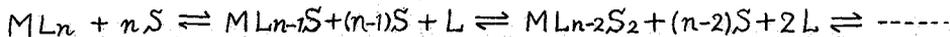
初期均配 (近似的に $\rho \sim 0.3$ の値) の比がほぼ 1:1 ずつに対応して、 $\delta / \langle S_z \rangle$ vs. $D / \langle S_z \rangle$ プロットの Yb を除いた部分の直線性が β -, CH₃ プロットには

- 1) C.-Y. Lee and M. Raszka, J. Magn. Reson., 17, 151 (1975); C. M. Dobson, R. J. P. Williams, and A. V. Xavier, J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1762 (1974); J. Reuben, J. Am. Chem. Soc., 98, 3762 (1976); J. Reuben, J. Am. Chem. Soc., 98, 4755 (1976).
- 2) W. DeW. Horrocks, Jr., and E. G. Hove, J. Am. Chem. Soc., 100, 4386 (1978).
- 3) R. M. Golding and M. P. Halton, Aust. J. Chem., 25, 2577 (1972).
- 4) B. Bleaney, C. M. Dobson, B. A. Levine, R. B. Martin, R. J. P. Williams, and A. V. Xavier, J. C. S., Chem. Commun., 1972, 791.
- 5) M. Hirayama, M. Sato, M. Takeuchi, and M. Saito, Bull. Chem. Soc. Jpn., 48, 2690 (1975).

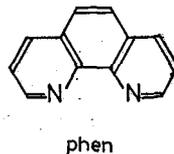
(近畿大・理工, 日本電子*) 宗像 恵・北川 進, ○出口 健三*

藤戸 輝昭*

1 はじめに 金属核(M)の溶液NMRの難点は配位子と溶媒との置換反応(1式)のため複数の化学種を生じ, しかも, 各化学種間の交換反応が速いためその帰属が困難なことである。



特にIB属のCu(I), Ag(I), Au(I)やIIB属のZn(II), Cd(II), Hg(II)などの d^{10} 金属, 及びアルカリ金属, アルカリ土類金属などの d^0 金属は配位子場の安定化エネルギーの寄与がないため, 交換反応がきわめて速く, 通常の試料・測定法では平均化された一本のNMRシグナルしか得られない。一方固体NMRではこのような化学交換反応がないため, 正確な化学シフトを知ることができるという利点をもつ。ここでは ^{113}Cd 固体高分解能NMRを錯体化学へ応用するために, 主に1, 10-フェナントリン及びその類縁化合物の錯体を用いて, その基礎的研究を行った。



2 実験 Cd(II)錯体は, アセトン溶媒中, N_2 雰囲気下

で $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ に配位子を3倍量加え合成した。 $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ は減圧下, 50°C , P_2O_5 で脱水したものをを用いた。固体高分解能 ^{113}Cd -CP/MAS NMR(59.9MHz)

は, Jeol GX270+GSH27MU装置を用いて測定した。マジック角(54.7°)でのHartman-Hahn条件の回転系磁場強度 H_1 (Rotating-frame Field)は ^1H , ^{113}Cd でそれぞれ12.54 Gaussであった。すべてのスペクトルは, コンタクトタイム(交差分極時間)6ms, パルス繰り返し時間5sec, 観測幅50kHzにて得た。マジック角の設定は, 検出系が多核観測用に設定されていることから, あらかじめ ^{13}C NMRでのHexamethylbenzeneの測定結果から決定した。使用した試料量は, 約300~350mgでマジック軸での

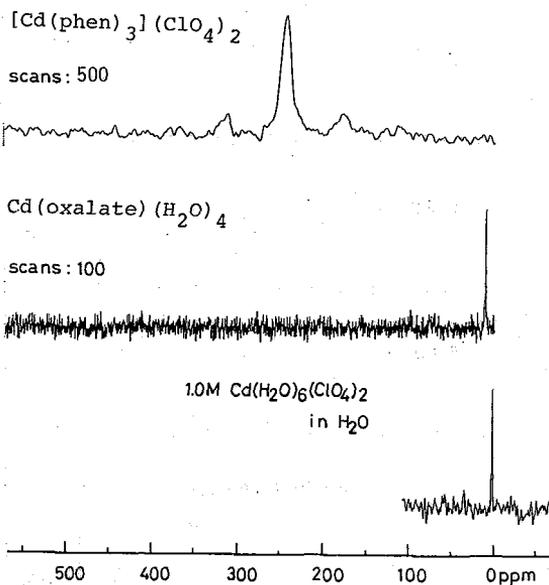


Fig. 1. ^{113}Cd solid NMR spectra of $\text{Cd}(\text{oxalate})(\text{H}_2\text{O})_4$ and $[\text{Cd}(\text{phen})_3](\text{ClO}_4)_2$

むなかためぐむ・きたがわすすむ・でぐちけんぞう・ふじとてるあき

試料回転数は 3.8 ~ 4.7 kHz であった。各化学シフト値は 1.0 M $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ の水溶液を固体試料管(セル)にあらかじめ挿入しておいた綿に浸み込ませたものを用い、Gated Decoupling 法によって得られた吸収線の位置を 0 ppm として表示した。

3 結果と考察 α. 感度と線幅 ^{113}Cd 核の場合は CP により S/N 比が単純計算で 4.5 倍向上することになると考えられる。ここで用いた Cd 錯体の場合、CP に寄与する ^1H 核は直接 Cd に配位している水もしくは配位子の最近接 H であろう。例えば、 $[\text{Cd}(\text{C}_2\text{O}_4)(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_2$ では 100 回の積算で極めて S/N 比のよいシグナルを与える。一方、 H_2O が全く配位していない $\text{Cd}(\text{phen})_3^{2+}$ では 500 回の積算でも S/N 比の悪いシグナルしか与えなかった (Fig. 1)。この CP の効果は、得られるシグナルの評価より Cd に水が配位しているかどうかや、配位子の立体的配置について定性的な情報を得ることに役立つ。得られたシグナルの半値幅は 100 ~ 500 Hz もあった。一般に線幅の広がりとしては、(1) dipole-dipole interaction (この場合 ^{17}O のような天然存在比の小さい核との相互作用は希薄状態として無視できる。)(2) Chemical Shift anisotropy (3) isotropic dispersion (4) paramagnetic 項が考えられ、この内、MAS により (2) は除外され ^1H Decoupling で ^1H の dipole 項は除外される。しかし (3) は物質そのものの構造に依存するため narrowing することなく、従って本研究における非結晶系では線幅の広がりが生じると期待される。(2) は反磁性のため除外しうる。本研究で用いた Cd 錯体は殆んど N を配位原子とした系であるため ^{14}N 核の効果も考えねばならない。この N の場合 (1) の項が考えられる。

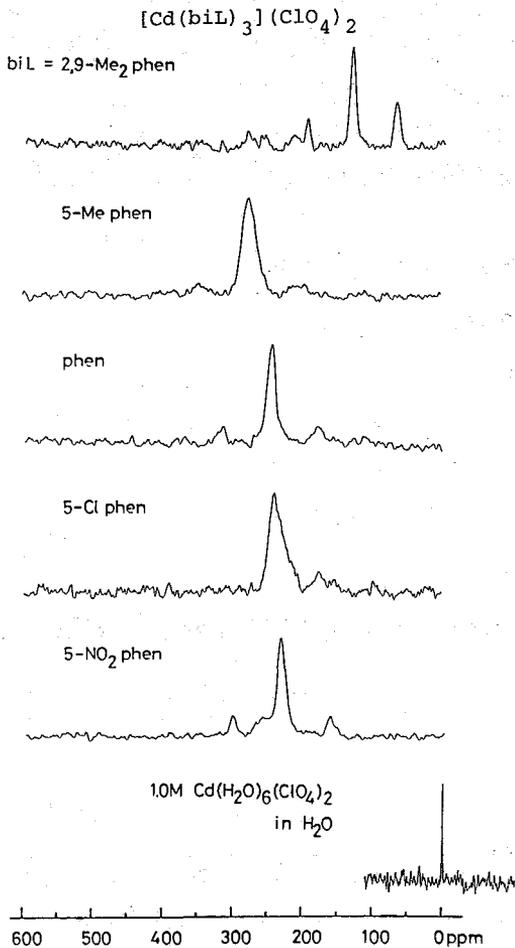


Fig. 2. ^{113}Cd solid NMR spectra of $[\text{Cd}(\text{biL})_3](\text{ClO}_4)_2$

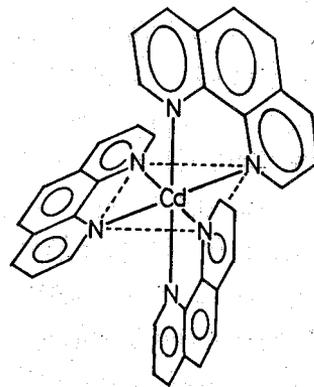


Fig. 3. $\text{Cd}(\text{phen})_3^{2+}$

6. 配位子の塩基性の効果 配位子の塩基性は錯体の平衡・構造・結合を支配する最も重要な因子の一つである。配位子(L)はルイス塩基であり H^+ と次のような平衡にある。

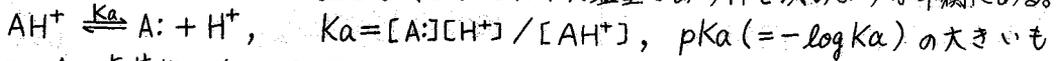


Fig. 2に $Cd(biL)_3(ClO_4)_2$ ($biL = phen, 5-NO_2phen, 5-Me phen, 2,9-Me_2phen$)のNMRスペクトルを示した。 $Cd(biL)_3$ の構造は六配位八面体構造(octahedral)である(Fig. 3)。 $Cd(biL)_3(ClO_4)_2$ の ^{113}Cd 化学シフトを biL の pK_a に対してプロットしたのがFig. 4である。 pK_a つまり biL の塩基性が增大するにつれて ^{113}Cd 核はdeshieldされるといってきわめて満足すべき結果を得た。 $2,9-Me_2phen$ はこの関係から著しくはずれている。 $2,9-Me_2phen$ は平面で二分子が金属に配位した場合は $2,9$ 位のメチル基はお互いに立体的に反撥するが、八面体構造ではこのような反撥はない。従ってこの場合、 $2,9$ 位のメチル基と Cd イオンとの立体反撥のため $Cd-N$ 間の距離が伸びているためこのようなずれが生じたものと考えられる(Fig. 5)。

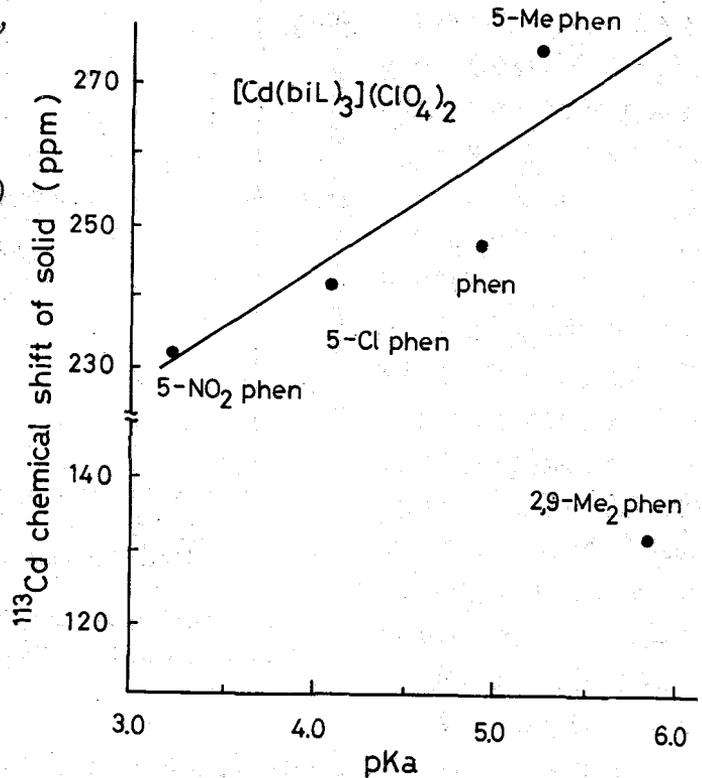


Fig. 4. A plot of ^{113}Cd chemical shift of $Cd(biL)_3(ClO_4)_2$ against the pK_a of biL

Table 1. ^{113}Cd NMR Chemical Shift for Tris(1,10-phenanthroline and the derivatives) $Cd(II)$ ($Cd(biL)_3^{2+}$)

biL	pK_a	Chemical Shift (ppm) ^a	Solid state CP/MAS NMR Chemical Shift
5- NO_2phen	3.22	246	232
5- $Clphen$	4.07	250	242
phen	4.93	257	247
5- $Me phen$	5.27	262	275
2,9- $Me_2 phen$	5.85	146	132
bpy	4.18	246	255
4,4- Me_2bpy	5.39	-	268

^a ppm with respect 1.0M $Cd(ClO_4)_2$ aqueous solution at 23°C.

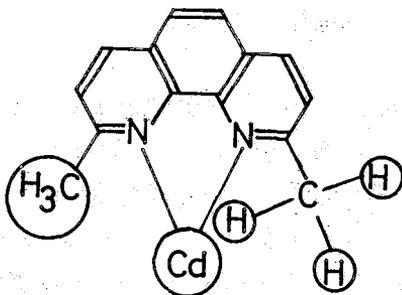


Fig. 5
Cd-2,9- Me_2phen bond

C. 溶液NMRと固体NMR

MRの比較 固体NMR

の最大の利点の一つは溶液状態のNMRと比較検討できる点にある。Table 1に $[\text{Cd}(\text{biL})_3](\text{ClO}_4)_2$ の溶液及び固体状態における ^{113}Cd 化学シフトをまとめた。

biLとしてはphen系の他に2,2'-ビピリジン(bpy)及び4,4'-ジメチルビピリジン(4,4'-Me₂bpy)を用いた。Fig. 6に固体に対して溶液の ^{113}Cd 化学シフトをプロットした。横軸の長さは線幅である。明らかに実験誤差内で一致していることを示している。特に立体障害を有する2,9-Me₂phenでも溶液、固体とも一致していることは注目される。こ

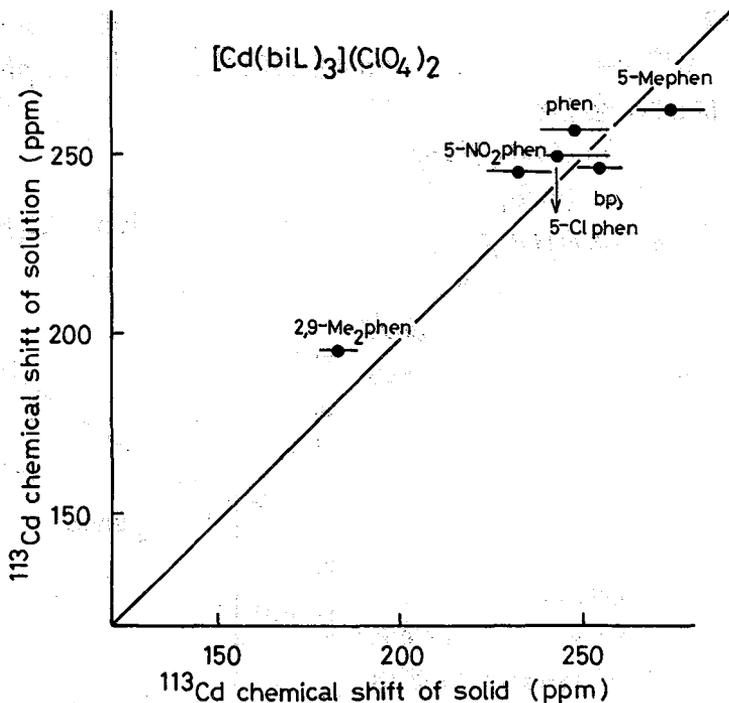


Fig. 6. The correlation between ^{113}Cd chemical shifts of solid $[\text{Cd}(\text{biL})_3](\text{ClO}_4)_2$ and those of the solution

のことはさらに $\text{Cd}(\text{biL})_3$ の溶液中の解離がほとんどないことを示している。事実 $\text{Cd}(\text{biL})_3$ の安定度定数は10できわめて大きく解離は無視される。この結果から次の二つの重要な結論が導かれる。①溶液中のCd錯体は6-α配位座が溶液中で置換又は解離しない限り固体の構造とほとんど同じである。②このような錯体では ^{113}Cd 化学シフトに対する溶媒効果は無視される。 $[\text{Cd}(\text{biL})_3](\text{ClO}_4)_2$ のX線結晶解析が行われていないので、 ^{113}Cd 固体NMRの結果と比較することはできなかつたが、これまでのべてきたデータからCd-N結合距離と ^{113}Cd 化学シフトは、よい相関関係があるものと確信している。

最近, Summers¹⁾は ^{113}Cd 化学シフト(δ)は $\delta = 75A + 51B + 31C$ で計算されると報告している。ここでA, B, CはそれぞれClに配位している第一級アミン, 第二級アミン, 第三級アミンの数である。しかしFig. 4に示したように第三級アミンで立体障害がない場合でもpKaによって39ppmから46ppm(√原子当り)に変化すること, さらに立体障害を有する2,9-Me₂phenでは著しく減少し2.1ppmになる。従ってこの式はきわめて特殊な系でのみ成立すると思えた方がよい。

1) M. F. Summers and L. G. Marzilli, Inorg. Chem. 1984, 23, 523.

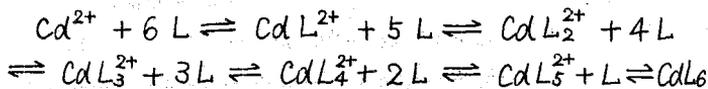
1. はじめに 5, 6年前から ^{113}Cd NMRは metalloenzyme の金属イオンの配位環境の研究手段として華々しく登場した。確かに一定の成果を上げたことは評価される。しかし、初期の大きな期待に答えつつあるとは言いがたい。これは $\text{Cd}(\text{II})$ 錯体の性質・構造と ^{113}Cd NMRとの関係についての基礎的知識があまりにも少ないことによる。このことはまた、金属NMRの最大の働き場所である錯体化学・有機金属化学・構造化学への応用が遅れている原因ともなっている。本研究では錯体化学に基づいた ^{113}Cd NMRの確立を目的として、錯体の平衡及び構造と化学シフトとの関係について検討した。

2. 実験 $\text{Cd}(\text{II})$ は $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を減圧下, 50°C , P_2O_5 で脱水したものをを用いた。 ^{113}Cd NMRの測定はJeol FX 200 NMRスペクトルメータを用いて, $14 \mu\text{s}$ (45°)パルス, 観測幅 40 kHz にて行った。試料温度は 23°C 又は -90°C とした。積算は $500 \sim 2000$ 回, パルス繰り返し時間 $0.5 \mu\text{s}$ で行った。シフト基準は $1.0 \text{ M Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の水溶液の ^{113}Cd NMRシグナル位置とした。

3. 結果と考察

a. 化学交換効果 最高六配位まで取り得る $\text{Cd}(\text{II})$ の錯体は溶液中では次のような平衡状態にある。

Scheme 1



Lは一価配位子である。 d^{10} の $\text{Cd}(\text{II})$ は labile であるため、配位したLと溶媒との化学交換反応はきわめて速く、溶液中で正確な化学シフトを得ることは困難である。Fig. 1に $0.5 \text{ M Cd}(\text{ClO}_4)_2$ と 1.5 M 4-メチルピリジン (4-Mepy) のエタノール溶液のNMRスペクトルを示した。 23°C から -90°C まで温度変化させると、一本の共鳴線(a)は線幅が広くなり(b), ついで二本に分裂し(c), -90°C では一定となる(d)。 -90°C では化学交換反応がNMRタイム・スケールより十分に遅くなったことを示している。この方法が化学交換反応を低下させるのにきわめて有用であることが理解される。

むなかためぐむ・きたがわすすむ・やぎふじお

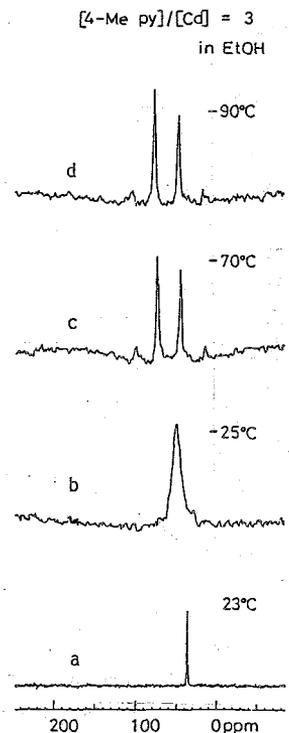


Fig. 1. ^{113}Cd NMR spectra of an ethanol solution of $0.5 \text{ M Cd}(\text{ClO}_4)_2$ and 1.5 M 4-methylpyridine.

B. 平衡状態にある化学種の帰属 Fig. 2

に $[4\text{-Mepy}]/[\text{Cd}]$ の比を 0 から 5 まで変化させたときの ^{113}Cd NMR スペクトルを示した。Scheme 1 及び $\text{Cd}-4\text{-Mepy}$ 錯体の逐次安定度定数 ($K_1=19.1, K_2=5.1, K_3=1.91$) から明らかのように, $[4\text{-Mepy}]/[\text{Cd}]$ の比が増大するにつれてより高次の錯体が生成する。Fig. 2 において, 共鳴シグナル A = Cd^{2+} , B = $\text{Cd}(4\text{-Mepy})^{2+}$, C = $\text{Cd}(4\text{-Mepy})_2^{2+}$, D = $\text{Cd}(4\text{-Mepy})_3^{2+}$, E = $\text{Cd}(4\text{-Mepy})_4^{2+}$ に帰属される。平衡状態にある 5 つの化学種が帰属された注目すべき例である。なお, $\text{Cd}(4\text{-Mepy})_5^{2+}$ と $\text{Cd}(4\text{-Mepy})_6^{2+}$ はモル比 5 でも観測されず, これらの高次錯体の生成が困難であることを示している。

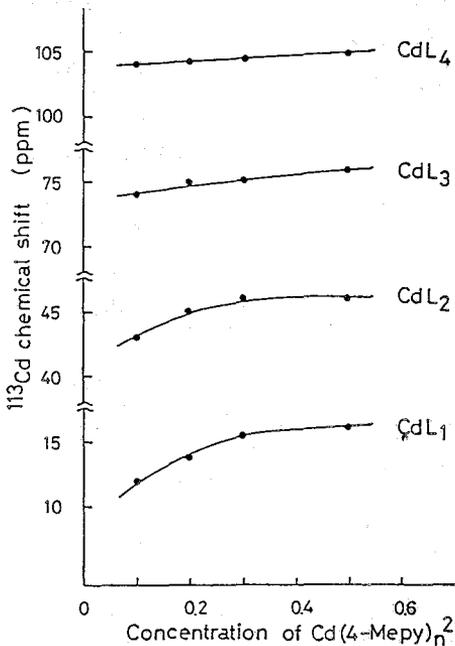


Fig. 3. ^{113}Cd chemical shift of $\text{Cd}(4\text{-Mepy})_n^{2+}$ in ethanol against the concentration at -90°C .

減されるといっても過言ではない。Fig. 3 に $\text{Cd}(4\text{-Mepy})_n$ ($n=1\sim 4$) の濃度依存性を示した。濃度が増加するにつれて低磁場シフトする。濃度依存性は高次錯体になるほど小さくなり, $\text{Cd}(4\text{-Mepy})_4^{2+}$ では実験誤差内で一定となる。この事実から興味を持たれるのは Cd の配位座がすべてキレート剤で満たされた錯体の濃度効果である。 $\text{Cd}(\text{en})_3^{2+}$

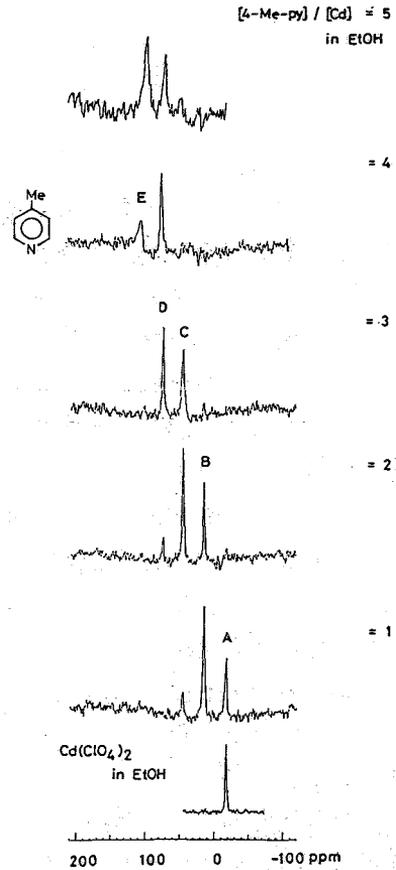


Fig. 2. ^{113}Cd NMR spectra of ethanol solution at -90°C . All solutions contain $0.5\text{M Cd}(\text{ClO}_4)_2$. Mole ratio of 4-methylpyridine of $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ were varied from 0 to 5.

C. Cd 濃度の効果 溶液中の Cd

化合物の ^{113}Cd NMR は Cd の濃度及び対アニオンによって著しく影響される。このことが ^{113}Cd 溶液 NMR の悩みとなっている。その原因が解明されない限り ^{113}Cd 溶液 NMR の値は半

(en=エチレンジアミン)の濃度効果を Table 1 に示した。0.05 M-1.0 Mの濃度変化でも化学シフト(350 ppm-352 ppm)は実験誤差内で一定であった。以上のことから¹¹³Cd NMRの濃度依存性はCdに配位した配位子の解離に起因していると結論される。

d. 対アニオンの効果 カドミウム塩, Cd(ClO₄)₂, Cd(NO₃)₂, CdSO₄, Cd(CH₃COO)₂, Cd(HCOO)₂, CdCl₂, CdBr₂, CdI₂の水溶液の化学シフトを Table 2 に示した。1.0 M Cd(CH₃COO)₂ と 1.0 M CdCl₂ の水溶液はそれぞれ最も高磁場シフト(-34 ppm)と低磁場シフト(135 ppm)を与え、アニオン効果によるシフト幅は実に170 ppmもある。¹¹³Cd 化学シフトは, CH₃COO⁻ < NO₃⁻ < HCOO⁻ < SO₄²⁻ < ClO₄⁻ < I⁻ < Br⁻ < Cl⁻ の順に低磁場シフトする。これらの塩は安定度定数が小さく水溶液中では一部又はほとんど解離している。濃硝酸(16 M)及び酢酸中(17M)ではそれぞれ-99 ppm, -72 ppm を与える。これはカドミウム塩のアニオンの配位が促進されるためである。一方, Cd(en)₃²⁺ はアニオンの影響をほとんど受けない。たとえば, [Cd(en)₃](NO₃)₂ は 349 ppm, [Cd(en)₃]Cl₂ は 350 ppm である。前記のべたように[Cd(en)₃]²⁺ は安定度定数(log β₃=27.17)がきわめて大きく、対アニオンのCdへの配位が不可能なためである。このことから明らかのように、配位力の大きいF⁻, CN⁻などのカドミウム塩を用いる時は十分に注意する必要がある。結論として、対アニオンの効果はアニオンのCdへの配位に起因していることが明らかとなった。

e. 配位子の塩基性(pKa)の効果

錯体の安定度定数において最も重要な関係の1

Table 1. ¹¹³Cd NMR Chemical Shifts for [Cd(en)₃]²⁺ at 23°C

[Cd(en) ₃]X ₂	Solvent	Concn. (M)	Chemical Shift (ppm) ^a
[Cd(en) ₃](ClO ₄) ₂	H ₂ O	0.5	350
		0.1	347
[Cd(en) ₃](ClO ₄) ₂	en	1.0	350
		0.5	351
		0.25	352
		0.1	351
[Cd(en) ₃](NO ₃) ₂	H ₂ O	0.5	349
		0.5	350
[Cd(en) ₃]SO ₄	H ₂ O	0.5	350
[Cd(en) ₃]Cl ₂	H ₂ O	0.5	350
[Cd(en) ₃]Br ₂	H ₂ O	0.5	349
[Cd(en) ₃]I ₂	H ₂ O	0.5	349

^a Ppm with respect to 1.0M Cd(ClO₄)₂ aqueous solution at 23°C.

Table 2. ¹¹³Cd NMR Chemical Shift of Cadmium Salts at 23°C

CdX ₂	Solvent	Concn. (M)	Chemical Shift (ppm) ^a
Cd(ClO ₄) ₂	H ₂ O	0.1	2
		1.0	0
		2.0	-4
		4.2	-6
Cd(NO ₃) ₂	H ₂ O	0.1	-4
		0.5	-25
		1.0	-31
		4.5	-52
		HNO ₃	1.0
CdSO ₄	H ₂ O	1.0	-2
Cd(CH ₃ COO) ₂	H ₂ O	1.0	-34
		CH ₃ COOH	1.0
Cd(HCOO) ₂	H ₂ O	1.0	-11
		HCOOH	1.0
CdCl ₂	H ₂ O	1.0	135
CdBr ₂	H ₂ O	1.0	103
CdI ₂	H ₂ O	1.0	60

^a Ppm with respect to 1.0M Cd(ClO₄)₂ aqueous solution at 23°C.

つは配位子の塩基性である。実際に pK_a と安定度定数との間に直線関係がしばしば見出される。しかし残念ながら、 ^{113}Cd 化学シフトと pK_a との関係についての研究は報告されていない。ピリジンの4位置換体のカドミウム錯体 ($\text{Cd}(\text{4-Rpy})_n$, $n=1\sim 4$) の ^{113}Cd 化学シフトを pK_a に対してプロットしたのが Fig. 4 である。 pK_a が大きくなるにつれて ^{113}Cd の共鳴線は低磁場シフトする。また、高次錯体になるほど pK_a の影響が大きくなる ($\text{CdL}_1 < \text{CdL}_2 < \text{CdL}_3 < \text{CdL}_4$)。 pK_a が大きくなるほど、つまり Cd -ligand の結合性が強くなるほど ^{113}Cd 核は deshield されるという注目すべき結果が得られた。 ^{113}Cd とは対照的に、 ^{63}Cu 核は σ 結合より π 結合に依存し、配位子の π 受容能が大きくなるほど deshield される。又、 ^{113}Cd の deshielding は

$\text{Cd}(\text{Cl}_4^{2-}) > \text{Cd}(\text{Br}_4^{2-}) > \text{Cd}(\text{I}_4^{2-})$ の順に減少するが、 ^{63}Cu は $\text{Cu}(\text{Br}) > \text{Cu}(\text{I}) > \text{Cu}(\text{Cl})$ の順に減少する。このような違いは驚くべきことではない。 $\text{Cd}(\text{II})$ と $\text{Cu}(\text{I})$ は同じ d^{10} 構造ではあるが、 $\text{Cu}(\text{I})$ は $\text{Cd}(\text{II})$ より soft な酸である。HSAB 則からも明らかのように、 $\text{Cu}(\text{I})$ は soft な配位子 (π 受容能大) と π 結合を生成するが、 $\text{Cd}(\text{II})$ は hard な塩基 (pK_a 大) との σ 結合が支配的となるためである。この結果は ^{113}Cd NMR が金属-配位子結合を解明する上できわめて有効な手段であることを示している。

f. 溶媒効果 金属核NMRの溶媒効果はきわめて複雑で、この方面への金属核NMRの応用についてはむしろ悲感的であった。演者らは溶媒の塩基性の尺度として Coordination power (CP) を提案した⁵⁾。CPは酸化還元電位、錯形成反応、安定度定数などに及ぼす溶媒効果をきわめてよく説明することを報告したが、溶媒のCPが大きくなるほど ^{113}Cd 核は deshield されるという満足すべき結果を得た。

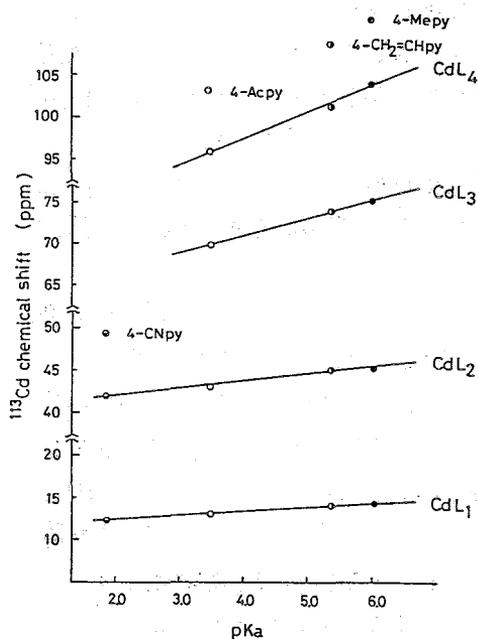


Fig. 4. ^{113}Cd chemical shifts of the cadmium complexes with 4-substituted pyridine(L) against pK_a values of the ligands.

References

- 1) See, I. M. Armitage and J. D. Otvos "Biological Magnetic Resonance" Vol.4, ed. Berlinger and Reuben, Plenum, New York, 1982, pp.79-144
- 2) G. E. Maciel et al., J. Phys. Chem. 1981, 85, 2087-2091.
- 3) O. Lutz, H. Oehker and P. Kroneck, Z. Naturforsch., 33a, 1021-1024.
- 4) S. Kitagawa and M. Munakata, Inorg. Chem., 1984, 23, No11. In press.
- 5) M. Munakata and S. Kitagawa, Inorg. Chem., 1984, 23 No12. In press.

(近畿大・理工) ○北川 進 宗像 恵 鶴見通昭

I. 二価の銅はd⁹電子配置を持ち、常磁性を示すことは良く知られている。この銅(II)イオンの電子スピン緩和時間は常磁性金属イオンの中でも比較的長く(~10⁻¹⁰s)、そのためこの金属錯体を研究する上でESR法が適しており、これまで二価銅錯体に関する仕事でESRを用いて数多く研究されている。ところでこの銅(II)錯体の中には銅(II)と銅(II)が直接もしくは架橋原子を介してつながることにより相互作用をして、特徴のないESRスペクトルを与えるか、もしくは全く検出できないような(ESR非検出: ESR non-detectable)銅(II)が存在する場合がある。この例として、天然では銅蛋白質のヘモシアニン、ラッカーゼ、セルロプラスミンなどの活性部位^①、低分子では触媒活性などの機能を持つ複核、多核銅(II)錯体^②があげられる。これらの系はd-d配位子場遷移を与えるが、Cu-Cu相互作用の程度や銅(II)のまわりの構造についての情報を与えるという点では乏しいと言わざるを得ない。Cu-Cu相互作用については、ぱら単離して磁化率を究明に測定し、このデータをもとに考察するという方法がとられている。単離が困難な系や溶液中における平衡、反応を追跡する場合、研究をすすめる手段が乏しくなり、このために溶液状態の銅(II)錯体を研究する有用な手段の開発が期待されている。本研究ではCu-Cu相互作用を有する複核銅(II)錯体、と

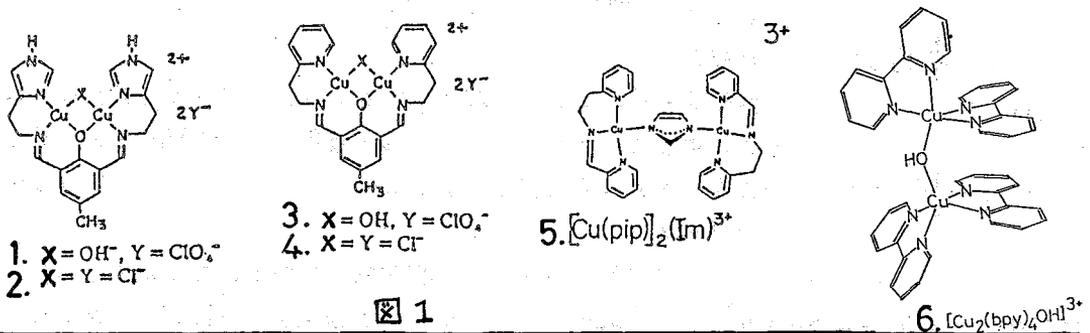


図 1

りわけ銅蛋白質およびそのモデルともなりうるイミダゾール、イミダゾレートが配位した銅(II)錯体を用いてNMR法から得られる情報を検討し、さらにCuに配位したイミダゾールのシグナルを発見することを目的とした。

II. (I)方法 常磁性系の化学シフトは電子スピンの寄与によりかなり大きなシフト値を持つ。そのシフト $\Delta\delta_{iso}$ は反磁性系のシフトを $\Delta\delta_{dia}$ とすれば、次のように表わされる^③。

$$\Delta\delta_{iso} = \Delta\delta_{obs} - \Delta\delta_{dia}$$

この $\Delta\delta_{iso}$ はよく知られているように(Dipolar 相互作用項省略)

$$\Delta\delta_{iso} = -\frac{A}{25} \frac{h}{h\nu} \frac{g\beta S(S+1)}{3kT} \quad (1)$$

と表わされるが、一方、複核銅(II)錯体のような反強磁性相互作用を持つ系 ($J = -2J_S, S_2$)

きたがわ すすむ おなかた めぐむ つるみ みちあき

では $S=0$ と $S=1$ の二つの状態の平衡があると考えられ、 $S=0$ は $\Delta\delta_{iso}$ に寄与しないが $S=1$ の状態が寄与するため、

$$\Delta\delta_{iso} = -\frac{g\beta}{3RT} \frac{1}{N} A [\exp(\frac{\Delta G}{RT}) + 1]^{-1} \quad (2)$$

のように表わされる。反強磁性相互作用の場合、 $J < 0$ であり $S=0$ が基底状態となるため^②

$$\text{singlet}(S=0) \xrightleftharpoons{K} \text{triplet}(S=1) \quad (3)$$

$$K = \frac{[T]}{[S]} = \exp(\frac{-\Delta G}{RT})$$

$\Delta G > 0$ であり、(2)式の $[\exp(\frac{\Delta G}{RT}) + 1]^{-1}$ は1より小さくなる。これは単核銅(II)錯体の $\Delta\delta_{iso}$ 値より小さくなることを表わしている。ところで磁化率 χ_M は同じように Bleaney-Bower の式から ($S=1$)^{④⑥}

$$\chi_M = \frac{2g^2\beta^2}{3RT} N [\exp(\frac{\Delta G}{RT}) + 1]^{-1} \quad (4)$$

となる。(2),(4)式を比べると $\chi_M \cdot \Delta\delta_{iso}$ はともに

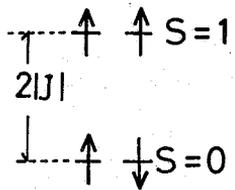


図3.

同じ温度依存性を持つ。これから観測される NMR シグナルの確認は、 χ_M (又は磁気モーメント μ_M) と $\Delta\delta_{iso}$ の温度依存性を調べることでなし得る。さらに χ_M の得られない系については $\Delta\delta_{iso}$ から求めうる可能性がある。

(2)合成 本研究で用いた複核銅(II)錯体を図1にまとめて示した。

合成は 1~4 は Urbach 5 の方法、5 は Lippard^④、6~8 は Hendrickson 5 の方法により合成した^{②⑥}。固体試料については元素分析を行い、確認した。測定には Jeol Fx 200 FT NMR スペクトロメータを用い、観測幅 10~40 kHz に設定し、くり返し時間 0.1~0.5 秒を 500~5000 回程度積算して観測した。溶媒は D₂O、メチン-d₆、メタノール-d₄ などを用い、内部基準には TMS 及び DSS を用いた。試料の濃度は 5~10 mM であった。

III. (1)イミダゾール又はピリジンが配位した複核銅(II)錯体

1~4 の ¹H NMR スペクトルの一例を図2に示した。共通骨格である  のそれぞれのプロトンシグナルは OH 架橋型で -2~20 ppm に、O 架橋型では -10~40 ppm の範囲内に現われた。かなり大きな低磁場シフトを示す幅広いシグナルはイミダゾール (Im) 又はピリジン (Py) のプロトンによるものと帰属した。もともと Im 又は Py の α 位 H については Cu に最も近いため、極めて広幅化していてこれ以外の H が観測されたと考えるのが妥当であろう。この 1~4

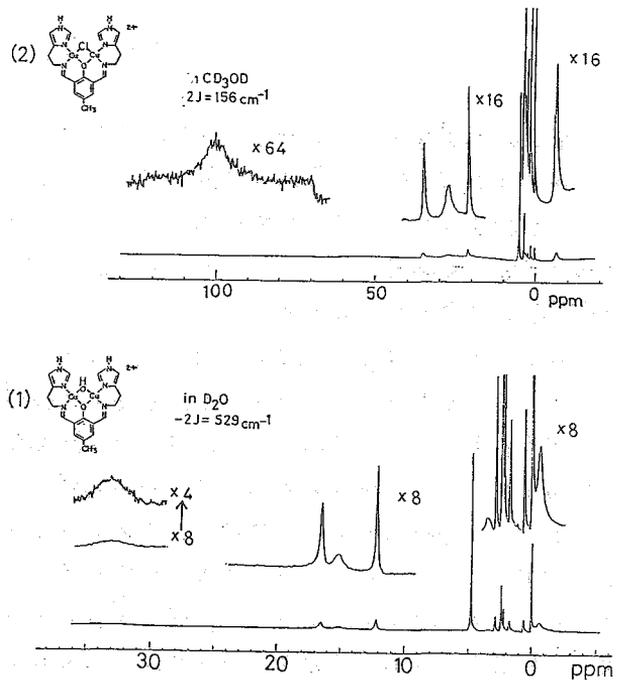


図2. イミダゾール基を有する複核銅(II)錯体の ¹H NMR スペクトル。23°C

の系で興味ある結果を得た。すなわち、相互作用の強さをあらわすJ値の大きい系ではシフトが小さく(図2,4のスペクトル(1)); OH架橋 $-2J = 529 \text{ cm}^{-1}$ (Im), 385 cm^{-1} (Py)), -オ、J値の小さい系(図2,4のスペクトル(2)); (架橋 $-2J = 156 \text{ cm}^{-1}$ (Im), 230 cm^{-1} (Py))では $S = 1$ 状態の寄与がより多いため、かなり大きなシフトを与えることである。この系に関してはJとシフトとの良好な相関関係が期待できる。もっともシフトへのJの寄与は(2)式にみけりように $[\exp(\frac{2J}{kT}) + 1]^{-1}$ の項にあらわれるため、もとのスピンの伝達にもとづく項が大きい場合もありうるから一般化してJのみで全ては議論しえない。しかしながら、imidazole-Cu(II)系のスピン伝達機構が顕著に変化すると考えらるため、J値が $200 \sim 600 \text{ cm}^{-1}$ では $30 \sim 100 \text{ ppm}$ のあたりにHのシグナルが観測されるものと期待される。

(2) イミダゾレートを架橋配位子とする複核銅(II)錯体

この複核錯体のHNMRスペクトルを測定したが、ピリジル基と帰属される 10.6 ppm , 19.0 ppm に2つのシグナルを与えたのみでイミダゾレートによるシグナルを観測することが出来なかつた。この原因として、これはCu-Cu相互作用がそれほど大きくないことと、さらにイミダゾレートの2,5位のいずれのプロトンも両端のCu(II)に近接しており、そのためかなり幅広いシグナルを与えることによるものと考えられる。

(3) 本研究で測定した錯体は6の型に代表される^① π 共役系を有する2,2'-ビピリジン(bpy)や1,10-フェナントリリン(phen)などのニ座配位子(biL)を持つ $[\text{Cu}_2(\text{biL})_2 \text{X}]^{2+}$ である。

$[\text{Cu}_2(\text{bpy})_2(\text{OH})]^{2+}$ (6), $[\text{Cu}_2(\text{bpy})_2(\text{Im})]^{2+}$ (7), $[\text{Cu}_2(\text{bpy})_2(\text{CN})]^{2+}$ (8), およびbpyをphenに置換した錯体(それぞれ6', 7', 8')は、いずれも $10 \sim 30 \text{ ppm}$ に環プロトンと帰属されるシグナルを与えた。この系の場合にはJとシフトについて1~4で得られた明らかな相関は得られなかつた。しかし、J値が小さい程、シグナルの半値幅は増大するという傾向を得た。これは1~4で得られた結果と良く一致する(表1)。これらの系がシフトとJとの間に良好な関係を与えなかつた原因として銅(II)のまわりの構造を考えると解釈しやすい。図5Aより明らかなように、6, 6'は三角両錐型構造のapical方向からOHが配位する錯体で、その

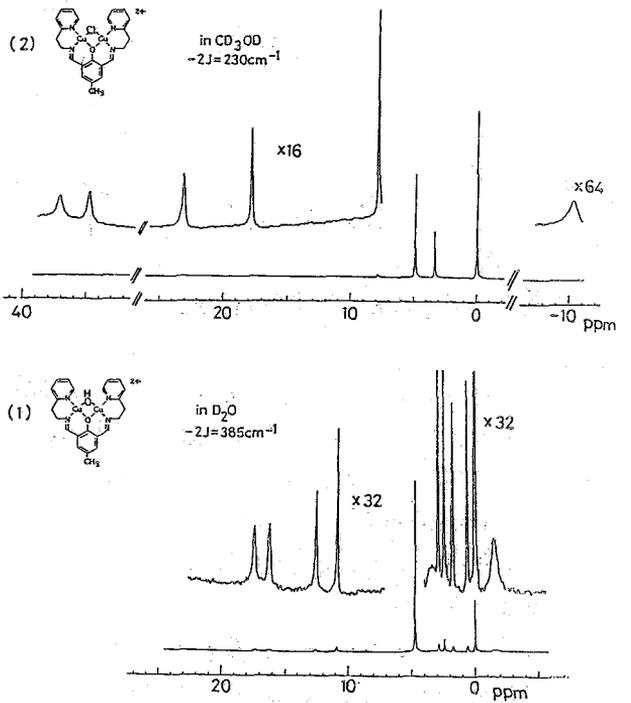


図4. ピリジル基を有する複核銅(II)錯体の¹H NMR スペクトル 23°C

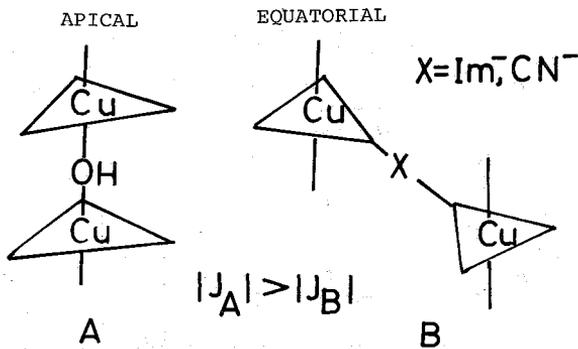


図5 $[Cu_2(biL)_4X]^{2+}$ の構造

ため銅(II)の d_{x^2} 軌道に不対電子スピ
ンが存在する。この場合強い反
強磁性相互作用を持つ ($-2J=322\sim$
 374 cm^{-1})。一方、7', 7'', 8, 8' では
三角両錐型の平面equatorial 方向
よりイミダゾレート, CN^- が配位
する構造を持っており、6, 6' とは
異った d 軌道に不対電子スピ
ンが存在する。この場合の反強磁性相
互作用は弱い ($-2J=18.6\sim 70\text{ cm}^{-1}$)。

bpy や phen は従ってスピン伝達に
関与する異なる銅(II)の軌道と相互作用し、(2)式に
おける反強磁性相互作用の関与する $(\exp(\frac{4g\mu_B}{kT})+1)^{-1}$
に加え A の値も変わり、た
たためにシフトと J との間に
顕著な相関がなかったと考
えられる。

反強磁性銅(II)錯体の 1H NMR
スペクトルは(1)比較的小さい線幅を持つシグナル
を与えるため観測が可能である。(2)構造が類似した系
ではシフト vs. J, 半値幅 vs. J との間に良い相関が
見い出された。(3)イミダゾレートの観測は Cu に近接
しているため困難であるが、末端配位のイミダゾール
のシグナルの検出は可能であり、本系では $30\sim 100$
ppm にあらわれた。今後、系統的な研究をすすめて
Cu-Cu 相互作用とシフト、線幅の関係を明らかに
したい。

Table 1. Observed 1H NMR Chemical Shift and Linewidth at Half Height of Binuclear Copper(II) Complexes

Complex	X	$\Delta\delta$ ppm ($\Delta\nu_{1/2}$ Hz)						
		5'-H	3-H	1-H	4-H	m-H	CH ₃	
	OH ⁻	33(532)	16.5(58)	15.2(172)	12.2(29)	3.5(~100)	-0.61(115)	
	Cl ⁻	103(1440)	35.1(125)	27.5(336)	21.0(96)		-6.65(192)	
		4'-H	3' or 5'-H	1-H	m-H	3-H	4-H	CH ₃
	OH ⁻	37.3(347)	34.7(579)	17.5(58)	16.4(58)	12.7(29)	11.0(20)	-1.6(1)
	Cl ⁻			36.8(113)	34.6(85)	23.2(51)	17.8(20)	-10.4(1)

References

(1) J.F. Boas, et al., "Biological Magnetic Resonance", Plenum Press, N.Y., 1978. Vol.1, P277.
 (2) J.D. Horrocks, Jr., J. Am. Chem. Soc., 87, 3779 (1965). G.N. LaMar, et al., eds., "NMR of Paramagnetic Molecules", Academic Press, N.Y., 1973. (3) F.L. Urbach, et al. Inorg. Chem., 17, 3078 (1978). (4) S.J. Lippard, et al. ibid., 20, 2933 (1981). (5) D.N. Hendrickson, et al. ibid., 17, 2622 (1978). (6) D.N. Hendrickson, et al. J. Am. Chem. Soc., 103, 384 (1981). (7) S. Kitagawa, et al. Jeol News, 19A, 17 (1983).

金属錯体の金属NMR Chemical Shieldingに関する簡略化した解釈
 (三菱製紙・感研研, 京天工*)
 ○遠藤一夫, 山本宗之介, 中辻博*

序) 演者らは、固体及び水溶液中の金属錯体の構造や電子状態と金属錯体の金属核のNMRシグナルとの対応関係に着目して、実験的には¹⁰⁹Ag及び⁶³CuのNMRを測定し^{1,2)}、又理論的にはMO法を用いてその解釈を行ってきた³⁾。今回は、金属核(Ib, IIb)のshieldingに関してphysical imageを出す為に、詳細な式から支配的な寄与を見出し、最終的には簡略化した式を導く。つまり金属錯体の金属核の化学シフトが、金属のd-hole (ligandへのback-donationによる)及びp電子のpopulation (又はdensity)に関連させて次式で定性的に説明される。

$$\sigma_{para}(M) \approx -\frac{2\alpha^2}{3} (\langle 1/r_{p0} \rangle_p P_T^e + \langle 1/r_{d0} \rangle_d \cdot 3D_T^h)$$

ただし P_T^e (p軌道のtotal population); D_T^h (d軌道のtotal hole)
 更に金属のハロゲン化物の金属核のシフトに及ぼす重原子効果⁴⁾のorder estimationも加える。

理論的背景)

1) 詳細な式

金属錯体が外部磁場下に置かれた時のN電子系(の)ハミルトニアンは

$$\mathcal{H} = \sum_{k=1}^N \{ (\frac{1}{2} m) \{ P_k - (e/c) A_k(r) \}^2 + V(r_k) \} \quad (1)$$

ここで $A_k(r)$ は電子kに作用するベクトルポテンシャルである。それは

$$A_k(r) = \frac{1}{2} H \times r_k + (\mu_A \times r_{kA}) / r_{kA}^3 \quad (2)$$

で、 H は一定磁場、 μ_A は金属核Aの核の磁気能率である。

金属核Aのshielding定数を二次までの摂動論を用いて表わすと

$$\sigma_A = \frac{\partial^2}{\partial \mu_A \partial H_A} \left\{ \langle 0 | \mathcal{H} | 0 \rangle - \sum_{n \neq 0} \frac{\langle 0 | \mathcal{H} | n \rangle \langle n | \mathcal{H} | 0 \rangle}{E_n - E_0} \right\}_{\mu=H=0} \quad (3)$$

この式中での電子状態に対応する波動関数は、Hartree-Fock MOから成っているとす。基底状態及び最低励起状態の全対称波動関数(simplet state)を次のように表わす⁵⁾

基底状態... ${}^1\Phi_0 = (\varphi_1\alpha)(\varphi_1\beta) \cdots (\varphi_n\alpha)(\varphi_n\beta), \quad (4)$

励起状態... ${}^1\Phi_{ij} = (\varphi_1\alpha)(\varphi_1\beta) \cdots (\varphi_{i-1}\beta)(1/\sqrt{2}) \{ (\varphi_i\alpha)(\varphi_j\beta) - (\varphi_j\alpha)(\varphi_i\beta) \} \cdots (\varphi_n\beta) \quad (5)$

ただし $\varphi(A)$ は次のHartree-Fock operator $h(A)$ の固有函数とする。
 つまり $h(A) \varphi_i(A) = \epsilon_i \varphi_i(A) \quad (6)$

えんどうがづなが・やまもと ぎうのすけ・ながつじひろし

(4), (5), (6) 式における M.O. は A.O. の線型結合として表わされる Kellier の中心は金属核とする。

$$\psi_i(k) = \sum_a C_{ai} \chi_a(k) \quad (7)$$

(3) 式右辺第二項の (1), (2), (4) を代入 (7) を用いれば、反磁気項の shielding 定数は

$$\sigma_{dia} = \frac{1}{3} \alpha^2 \sum_{i=1}^{occ} \sum_{a,b} C_{ai} C_{bi} \langle \chi_a(k) | \frac{1}{r_A} | \chi_b(k) \rangle \quad (8)$$

ここで金属核に原点を置き、ligand 軌道の電子の寄分は小さくから無視する。

同様に常磁気項についても (3) 式右辺第二項の (1), (2), (4), (5), (7) を代入して次式 σ_{para}^{MH} を得る。

$$\sigma_{para}^{MH} = -\alpha^2 Re \left[\sum_{abcd} \{ \langle \chi_a(k) | [r_A \times \nabla]_\mu | \chi_b(k) \rangle \langle \chi_c(k) | [r_A \times \nabla]_\nu | \chi_d(k) \rangle + \langle \chi_a(k) | [r_A \times \nabla]_\mu | \chi_b(k) \rangle \langle \chi_c(k) | [r_A \times \nabla]_\nu | \chi_d(k) \rangle \sum_{i,j}^{occ} (E_{ji} - E_0) C_{ai} C_{bj} C_{ci} C_{dj} \right] \quad (9)$$

$$E_{ji} - E_0 = E_j - E_i - J_{ij} + 2K_{ji} \quad (10)$$

これは ψ_i から ψ_j の singlet の励起エネルギーである。以上詳細には (8) 及び (9) を用いて金属核の shielding 定数が計算できる。この式中金属核が原点であるから r_A は r と同等になる。

(2) 変質的寄分

一般に、 σ_{dia} の値は大きいシフトへの寄分は小さく、シフトは主に σ_{para} に依存している。中比 5^2 の finite perturbation を用いた ab initio MO 計算では、金属核の shielding 定数に対する変質的寄分は、 σ_{para} で valence MO の寄分が大部分であると報告している。そこで以下表 1~4 に (4) 及び Cd 錯体の ab initio MO 計算から、 σ_{para} の

[表 1]

Ag(H ₂ O) ₆ ⁺				
eigenvectors				
	-0.632 (t _{1u})	eigenvalues (a.u.)		0.226 (t _{1u})
		(e _g)	(t _{2g})	
4d _{xx}	0.00 0.00 0.00	0.00 0.00 0.00	0.63-0.78, 0.00 0.00 0.00	
4d _{yy}			0.36 0.94	
4d _{zz}			-0.99-0.15	
4d _{xy}		0.76 0.49-0.46	0.00 0.00	
4d _{xz}		-0.62 0.77-0.20		
4d _{yz}		-0.26-0.44-0.88		
5s				
5p _x	-0.18 0.10 0.10			0.50 0.69-0.57
5p _y	-0.08-0.20 0.05			0.80-0.63 0.05
5p _z	-0.12-0.01-0.19			-0.38-0.42-0.85

	0.476 (e _g)	0.566 (a _{1g})	0.573 (t _{1u})	
4d _{xx}	-0.07 0.09	-0.06	0.00 0.00 0.00	
4d _{yy}	-0.04-0.10	-0.06		
4d _{zz}	0.11 0.02	-0.06		
4d _{xy}	0.00 0.00			
4d _{xz}				
4d _{yz}				
5s		-0.65		
5p _x		0.33-0.60 0.14		
5p _y		0.52 0.19-0.42		
5p _z		0.32 0.30 0.50		

[表 2]

Ca(H ₂ O) ₆ ²⁺				
eigenvectors				
	-0.852 (t _{1u})	eigenvalues (a.u.)		
		(e _g)	(t _{2g})	(t _{2g})
4d _{xx}	0.00 0.00 0.00	0.02-0.43	0.00 0.00 0.00	0.00 0.00 0.00
4d _{yy}		0.36 0.23		
4d _{zz}		-0.38 0.19		
4d _{xy}			0.15 0.05 0.29	-0.91-0.28-0.09
4d _{xz}			0.20 0.22-0.14	0.08 0.05-0.95
4d _{yz}			0.21-0.24-0.07	-0.28 0.91 0.02
5s				
5p _x	0.12 0.08 0.22			
5p _y	-0.06-0.23 0.11			
5p _z	0.22-0.10-0.08			

	-0.681 (e _g)	-0.051 (a _{1g})	0.008 (t _{1u})	0.367 (a _{1g})
4d _{xx}	-0.92 0.07 -0.12	0.00 0.00 0.00	0.10 0.00 0.00 0.00	
4d _{yy}	0.40-0.83 -0.12		0.10	
4d _{zz}	0.52 0.76 -0.12		0.10	
4d _{xy}				
4d _{xz}				
4d _{yz}				
5s		-0.98		0.53
5p _x		-0.35 0.21-0.99		-0.29-0.11-0.55
5p _y		0.84 0.64-0.16		1-0.05-0.61 0.14
5p _z		0.55-0.83-0.38		-0.56 0.11 0.27

[表 3]

eigenvectors		eigenvalues (a.u.)			
T_d	0.186 (t_2)	0.175 (t_2)	0.199 (e)	0.384 (e)	
$4d_{xx}$	0.00 0.00 0.00	0.00 0.00 0.00	0.22 0.09	-0.56 0.80	
$4d_{yy}$			-0.03-0.24	0.98 0.08	
$4d_{zz}$			-0.19 0.14	-0.41-0.89	
$4d_{xy}$	0.13-0.25 0.15	-0.08 0.03-0.02			
$4d_{xz}$	-0.17-0.21-0.17	-0.03-0.08-0.02			
$4d_{yz}$	-0.23 0.01 0.22	-0.03-0.01 0.08			
$5s$					
$5p_x$	0.12-0.01-0.11	-0.08-0.02 0.27			
$5p_y$	0.09 0.11 0.09	-0.09-0.26-0.05			
$5p_z$	-0.07 0.12-0.08	-0.25 0.10-0.07			
	0.451 (t_2)	0.892 (t_2)			
$4d_{xx}$	0.00 0.00 0.00	0.00 0.00 0.00			
$4d_{yy}$					
$4d_{zz}$					
$4d_{xy}$	-0.64 0.57 0.18	-0.09-0.08-0.34			
$4d_{xz}$	0.60 0.58 0.28	0.35-0.13-0.06			
$4d_{yz}$	-0.06-0.33 0.81	-0.11-0.35 0.10			
$5s$					
$5p_x$	0.03 0.16-0.40	-0.36-1.00 0.34			
$5p_y$	-0.29-0.29-0.14	1.00-0.42-0.18			
$5p_z$	0.32-0.28-0.09	-0.28-0.27-1.00			

[表 4]

eigenvectors		eigenvalues (a.u.)				
T_d	0.280 (t_2)	0.190 (e)	0.159 (t_2)	0.084 (t_2)	0.042 (e)	
$4d_{xx}$	0.00 0.00 0.00	-0.78-0.54	0.00 0.00 0.00	0.00 0.00 0.00	-0.26-0.22	
$4d_{yy}$		0.86-0.41			0.32-0.12	
$4d_{zz}$		-0.07 0.94			-0.06 0.33	
$4d_{xy}$	0.21-0.36 0.47		-0.31 0.40 0.10	0.05-0.04 0.05		
$4d_{xz}$	-0.54-0.33-0.01		0.36 0.20 0.30	0.05-0.02-0.06		
$4d_{yz}$	-0.25 0.40 0.42		-0.19-0.25 0.40	-0.05-0.06-0.01		
$5s$						
$5p_x$			0.05 0.07-0.12	0.16 0.23 0.04		
$5p_y$			-0.11-0.06-0.09	-0.16 0.07 0.21		
$5p_z$			0.09-0.12-0.03	-0.16 0.15-0.17		
	0.027 (t_2)	0.579 (t_2)	0.720 (e*)	0.851 (t_2)		
$4d_{xx}$	0.00 0.00 0.00	0.00 0.00 0.00	-0.08 0.09	0.00 0.00 0.00		
$4d_{yy}$			-0.04-0.12			
$4d_{zz}$			0.12 0.02			
$4d_{xy}$	-0.40-0.06 0.34	0.02-0.14-0.24		-0.04 0.01 0.06		
$4d_{xz}$	-0.30-0.20-0.39	-0.21-0.17 0.08		-0.01 0.01-0.01		
$4d_{yz}$	-0.17 0.49-0.11	-0.19 0.17-0.12		0.04 0.05 0.03		
$5s$						
$5p_x$	0.10-0.29 0.07	-0.61 0.57-0.41		0.55 0.67 0.34		
$5p_y$	0.17 0.12 0.23	-0.69-0.56 0.27		0.48-0.63 0.49		
$5p_z$	0.23 0.03-0.20	0.08-0.48-0.79		-0.58 0.11 0.72		

また d orbital については $\langle d_{zz} | d_{zz} \rangle = 1$ のとき $\langle d_{zz} | d_{xx} \rangle = 1/3$

寄与が大きい valence MO 及び virtual MO の係数及び固有値を選択してみた。
 O_x 原子に寄与する valence 及び virtual MO がかなり限られていることが分かる。
 従って (9) 式において $\langle 1/r^3 \rangle$ に関して金属原子内の電子の中心積分のみをとるとし、
 積分中の波数及び A.O. の係数の積の和を J_{ij} Jameson ら⁶⁾ の P_d 及び P_p に対応する
 と仮定すれば、次式が導かれる。

$$\sigma_{para} \approx -\frac{2}{3} \alpha^2 \sum_{ij} \left\{ \frac{\langle 1/r^3 \rangle_{oid} D_{ij}}{E_{ji} - E_0} + \frac{\langle 1/r^3 \rangle_{pp} P_{ij}}{E_{ji} - E_0} \right\} \quad (10)$$

ただし $D_{ij} \cdot P_{ij}$ は d, p 電子の 'unbalance' に対応する density 又は population の二次式で表わされる。

(3) 簡略化した式

(10) 式の $E_{ji} - E_0$ の最大励起エネルギーとして metal 原子のオービタルポテンシャルを ϵ_p と置き換える。又 D_{ij} 中の population を hole で $P_{zz,zz} = 2 - P_{zz,zz}$ と置き換える。一次近似で一次の対角項の population だけを取り出し、他は寄与が小さいから無視すれば、結局次式が得られる。Jameson らの式から導出される。

$$\sigma_{para} \approx -\frac{2}{3E} \langle 1/r^3 \rangle_{oid} 3D_T^h + \langle 1/r^3 \rangle_{pp} P_T^p \quad (11)$$

ここで D_T^h は金属原子の $(n-1)d$ 軌道の total hole、 P_T^p は同じ n 軌道の total population である。従って σ_{para} は d -hole と p -population によって結びつけられる。

〔表 5〕

Ag Shielding Constants					
	Ag(H ₂ O) ₆ ⁺	Ag(NH ₃) ₂ ⁺	AgCl ₂ ⁻	AgCl ₄ ³⁻	Ag(CN) ₄ ³⁻
D _T ^h	0	0.166	0.158	0.159	0.180
P _T ^e	0.36	0.16	0.409	0.738	0.786
d-contri.	0	1.83	1.74	1.75	1.98
p-contri.	0.50	0.22	0.56	1.03	1.09
-σ _{para}	63	262	294	354	393
exptl	(0	505			1283)

上表には、(11)式を用いて計算した結果を示している。
 O_{para}に対する d-hole と p-electron の寄与を見ると
 Ag錯体については d-hole が少し大きいのにに対し、Cd錯体
 については p-electron の方が大きい。これは中程度の
 結果集りに良く対応している。シフトの傾向について
 も、Eの見積りが大きいことを考えれば、ほぼ満足と云える。
 (金属錯体の金属核シフトに及ぼす重原子効果)
 概観論からの重原子効果⁽⁴⁾の近似式を用い、重原子が
 最高4個まで金属原子と結合した場合を考えると

$$\sigma_{LS}^{xx} = -\pi i \lambda \alpha^2 \frac{[S(O)]^2}{E^2} \{ 2P_{YBSA} P_{YBZB} P_{RBSA} - P_{YBSA}^2 P_{RZBZB} - P_{RBSA}^2 P_{YBZB} + P_{YBSA}^2 + P_{RBSA}^2 \} \quad (12)$$

ただし、i は重原子の数、他の記号は文献⁽⁴⁾による。E は金属原子のイオン化ポテンシャルとす。
 例として Cu, Ag 及び Cd のそれぞれが4個配位した場合の重原子効果を算出すると

$\sigma_{LS}(CuI_4^{2-}) \approx 50 \text{ ppm}$, $\sigma_{LS}(AgI_4^{2-}) \approx 104 \text{ ppm}$ 及び $\sigma_{LS}(CdI_4^{2-}) \approx 21 \text{ ppm}$ で
 CuI₄²⁻ 及び CdI₄²⁻ の実験値の高磁場シフトの傾向を示している。Ag⁺ に関しては低磁場シフト
 といつて σ_{LS} の寄与がないと思われる。(ここで population は M₀ の値を代入して近似)

(文献記)

- 1) Endo, Yamamoto, Matsushita, Deguchi, Kanda, & Nakatani (to be published).
- 2) Endo, Yamamoto, Deguchi, Matsushita & Fujita (to be published).
- 3) Nakatani, Kanda, Endo & Yamagawa, J. Am. Chem. Soc. in press.
- 4) Nakagawa, Shinada & Obinata, 6th NMR Symposium (Kyoto 1967).
 Nomura, Takeuchi & Nakagawa, Tetrahedron Lett. 8, 639 (1969).
 Moriokima, Endo & Yamagawa, J. Chem. Phys. 52, 3256 (1973).
 Chermisin & Schaefer, J. Mag. Resonance 40, 459 (1980).
- 5) Rootlaan, Rev. Mod. Phys. 23, 69 (1951).
- 6) Jamason & Gutowsky, J. Chem. Phys. 40, 1714 (1964).

〔表 6〕

Ca Shielding Constants				
	Ca(H ₂ O) ₆ ²⁺	CaCl ₂	CaCl ₄ ²⁻	Ca(CN) ₄ ²⁻
D _T ^h	0	0.048	0.030	0.087
P _T ^e	0.453	0.493	0.777	0.963
d-contri.	0	0.60	0.37	1.08
p-contri.	0.66	0.72	1.14	1.41
-σ _{para}	71	142	163	269
exptl	(0	98	490	510)

〔表 7〕 finite perturbation の結果
 から算出された O_{para} への
 p-AO, d-shell の寄与の大小

Metal complexes	Mechanism in the metal AO contribution
Cu	holes in (n-1)d shell ↓ electrons in np AO
Cd, Zn	electrons in np AO ↓ holes in (n-1)d shell
Ag	electrons in np AO ↑ holes in (n-1)d shell

ハロゲン化第一銅の混晶の ^{63}Cu MAS NMR および X線回折
 (三菱製紙感研、日本電子) 山本 京之介、遠藤 一夫、
 井口 志介、出口健三、松下 和弘、藤戸輝昭

1. 我々の固体及び溶液中の金属錯体の電子状態と、その金属原子と配位子間の化学結合の性質とを実験的・理論的に研究を行ってきた。^{1,2)} その中でハロゲン化第一銅は感応材料としても半導体材料としても良い例であり、ハロゲン化銀のかわりとなるNMRモデルであろう。最近、高分解能NMR法によりハロゲン化第一銅の固体及びKX過剰の水溶液から ^{63}Cu NMRスペクトルを得たことを報告した。³⁾ 今回はその応用としてハロゲン化第一銅の混晶をとり上げ、 ^{63}Cu MAS NMRとX線回折とを用いて、この混晶の構造を検討する。

2. $\text{CuCl}_x\text{Br}_{1-x}$ 及び $\text{CuBr}_y\text{I}_{1-y}$ の混晶は単結晶の溶解度の差を利用して作成する。つまり CuCl の水懸濁液に KBr 水溶液を徐々に加え (60°C)、数回デカンテーションした後 70°C で6hr、混晶を乾燥させる。混晶中の Cl/Br 比は蛍光X線により見極め、 $\text{CuBr}_y\text{I}_{1-y}$ の混晶も同様の方法で作成した。混晶のX線回折は Rigaku RAD-IIA で常法により測定した。また混晶の ^{63}Cu NMRスペクトルは JEOL FX-200 (SH 200 巻着) を用いて磁場強度 46.98kgauss ^{63}Cu 共鳴周波数 52.86MHz で測定した。尚 MAS のための Kel-F ロータリ約 4kHz で回転させた。

3. (1) Cu(I) bromochloride

CuCl の水懸濁液に KBr 水溶液を加えると、 CuCl と CuBr の溶解度積 (それぞれ 1.86×10^{-7} 、 5.25×10^{-9}) の違いから CuCl 単結晶の Cl は始めに加えた Br と完全に置換し混晶を形成する。加える KBr の量により混晶中の Cl/Br 比を変えることが出来る。Fig. 1 に Cl/Br 比の異なる CuClBr 混晶の X線回折データを示した。Br content の増加と共に回折ピークは CuCl 単結晶のものから CuBr 単結晶のものへとシフトする。ところで混晶の全率固溶体は通常溶融-冷却法により作られ、混晶中のハロゲン比と回折ピークより求められる混晶のユニットセルの大きさとの間には Vegard 則が成立するから⁴⁾、今回の実験に供した混晶は最大10%程度 Vegard 則からのズレを示したと考えられる。このことはこの置換法で作成した CuClBr の混晶は既に Cl と Br が互いに共存する全率固溶体に近いものであることがわかる。

次に上述の混晶の ^{63}Cu MAS NMRスペクトルを Fig. 2 に示した。いずれも 0ppm を中心とする先鋭のシグナルが現われ、これは CuCl 単結晶のものに一致した。これより高磁場側にやや中広のシグナルも現われた。ハロゲン化銅単結晶は内型鉛酸型で Cu 原子を中心としたハロゲン原子が四面体の頂点に位置している。混晶中ではこの四面体構造のハロゲン原子の種類が異なり、つまり $\text{Cu}-\text{Cl}_4$ 、 $\text{Cu}-\text{Cl}_3\text{Br}$ 、 $\text{Cu}-\text{Cl}_2\text{Br}_2$ 、 $\text{Cu}-\text{ClBr}_3$ 、 $\text{Cu}-\text{Br}_4$ やそれと異なるもの、などいろいろあり、それぞれが異なる化学環境にあり、それにより異なるシグナルが現われる。

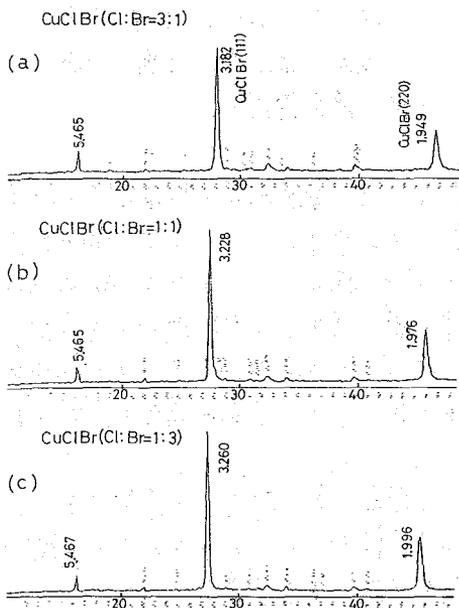


Fig.1 X-ray diffraction data of Cu(I)ClBr mixed crystals

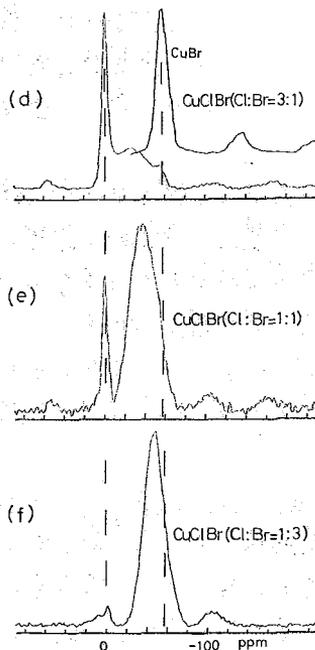


Fig.2 ^{63}Cu MAS NMR spectra of Cu(I)ClBr mixed crystals; ppm relative to CuCl crystal

の5通りが考えられる。スペクトル中の0ppmの鏡…ピークはCu-Cl₄によるものと推測できる。また高磁場側のブロードシグナルは残り4種類によるシグナルが重なり、そのものであろう。従って、スペクトルの全面積と0ppmのピーク面積との比から混晶中のCu-Cl₄の割合を推定出来る。25、50、75 Br mol%の混晶に対して、それぞれ3、11、48%と推定される。

ところで混晶中のClとBr原子がランダムに配置した場合にCu-Cl₄の割合は確率的に X_{Cu}^2 (X_{Cu} : 混晶中のCl content) で求められる。その値は0.4、0.6、0.32%と推定され、置換法により作成したCuClBrの混晶はCu-Cl₄の配置を取り易い (Bulkyではない) ことがわかる。(Fig. 3)。

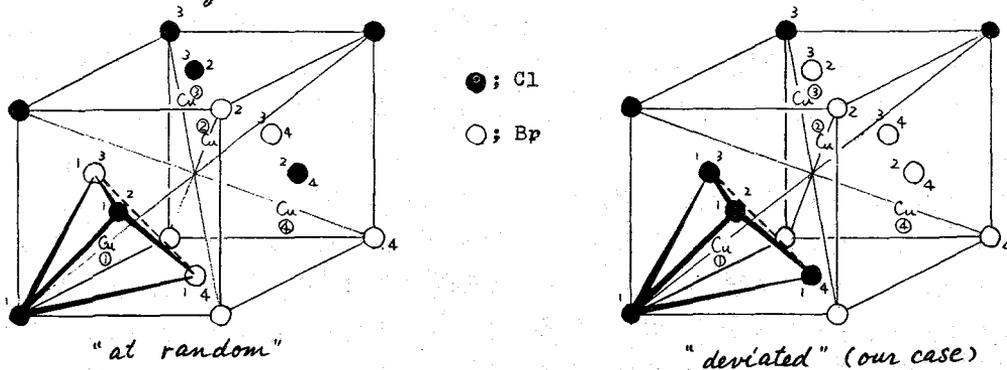


Fig.3 Typical configurational models of CuCl_{0.5}Br_{0.5} mixed crystal (unit cell)

(2) Cu(I) iodobromide

CuClBrの場合と同様 CuBr の水懸濁液に KI 水溶液を加え、CuBr と CuI の溶解度積 (それぞれ 5.25×10^{-9} 、 9.33×10^{-12}) の差を利用して置換法により混晶を作成した。

Fig. 4 の CuBrI の混晶の X 線回折データを示した。そこには 3 種の回折スポットが認められる。一つは CuI、一つは CuBr、そして残りのもう一つは CuBrI の Br/I 比が一定の混晶のものと思われる。混晶部の格子定数は 3.35 \AA で、Vegard 則よりこの混晶部は Br/I 比が約 $2/3$ と推定される。この 3 種の回折スポットは同一の結晶内に存在していることが電子線回折の結果から明らかになり、従って置換法により作成した CuBrI の混晶は Fig. 6 に示したようなコア-シェル構造になっており、コアとシェルの間には Br/I 比が一定の全率固溶体部が形成されていると考えられる。 ^{63}Cu MAS NMR スペクトル (Fig. 5) からはこのコア-シェル構造の明確な証拠は得られなかった。20 ppm の CuI 単結晶と同じシグナル及び、40 ppm の周辺には固溶体と CuBr 単結晶の重なり、と推定されるシグナルが得られ、このコア-シェル構造を示唆する。

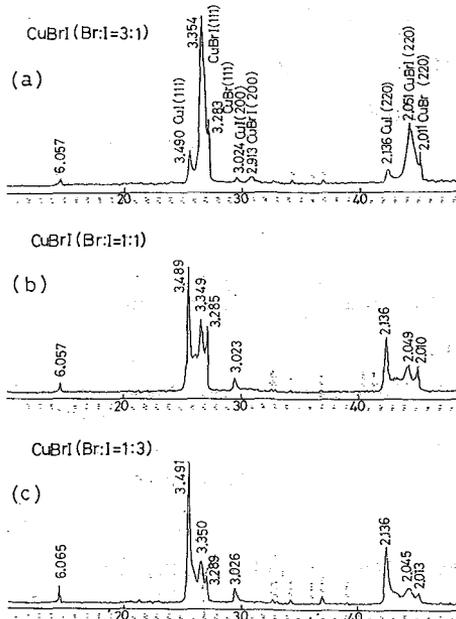


Fig. 4 X-ray diffraction data of Cu(I)BrI mixed crystals

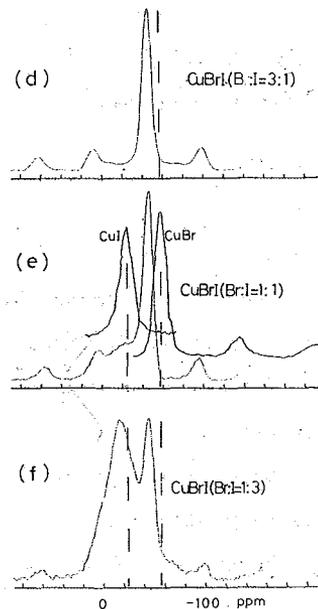
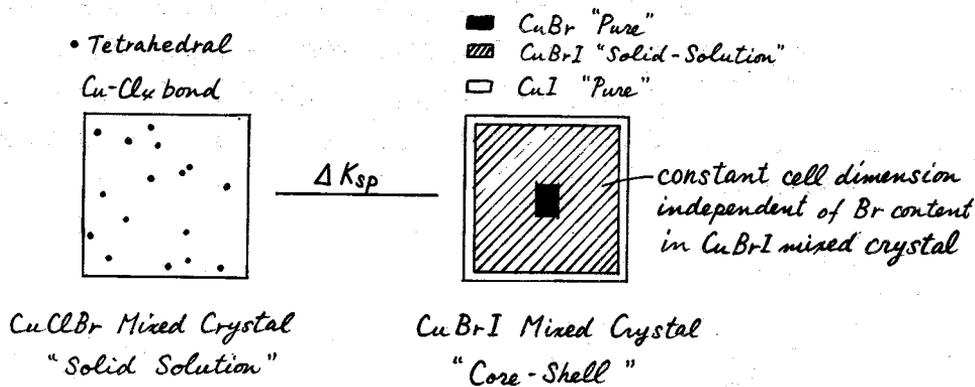


Fig. 5 ^{63}Cu MAS NMR spectra of Cu(I)BrI mixed crystals; ppm relative to CuI crystal

3. 溶解度積の差を利用して、非常に簡単にハロゲン化第一銅の混晶を得ることが出来たが、その溶解度の差の程度により内部構造が異なることが明らかになった。溶解度積の差が大きくなるにつれ、全率固溶体 → コア・シェル型 → 混晶が出来た。(CuClIは、CuClとCuIの溶解度積の差が大きく(それぞれ 1.86×10^{-7} , 9.33×10^{-13}) CuI単結晶のみが出来てしまうのである。)

またCuClBrの場合のように、X線からわかるが、この混晶中のCuのミクロ環境を、MAS-NMR法を用いることにより明らかになったことは、結晶構造の解析にNMR法が有効な手段となり得ることが示された。



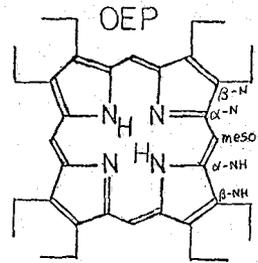
References

- (1). K. Endo, K. Yamamoto, K. Matsushita, K. Deguchi, K. Kanda and H. Nakatsuji, J. Phys. Chem. in press.
- (2). H. Nakatsuji, K. Kanda, K. Endo and T. Yonezawa, J. Am. Chem. Soc. in press.
- (3). K. Endo, K. Yamamoto, K. Deguchi, K. Matsushita and T. Fujito, to be published.
- (4). L. Vegard and G. Skoftealand, Arch. Math. Naturv., (1942), 45, 163.

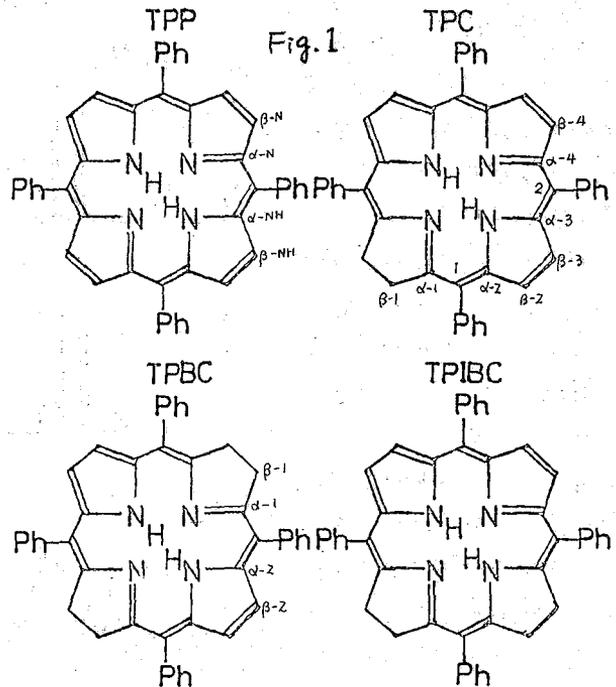
(東北大学水研・帝京大薬*) °野澤清則, 西村克司, 太田 克
 須野昌弘, 佐藤三男*

1) 序 CP/MAS 法は近年多くの系に適用され種々の新しい知見を与えているが、¹⁾クロロフィル, ポルフィリンを含む生体試料についての研究例はなかった。我々は昨年の本討論会において、バクテリオクロロフィルタンパク質ならびにそれを含む膜組織に ^{13}C CP/MAS 法を用いた結果について報告した。本発表においては生体色素のみを含む系についての基礎的実験結果を報告し、それを踏まえバクテリオクロロフィルタンパク質系の ^{13}C CP/MAS の結果について考察する。最近になつて、クロロフィル α とバクテリオクロロフィルの ^{13}C CP/MAS の結果があいついで報告された。^{2, 3)}

2) 実験 ^{13}C CP/MAS NMR は Bruker CXP-300 FTNMR 分光計に ZJ2PE/MAS プロブを用いて測定した。スピニングサイドバンドの除去には Dixon の TOSY 法⁴⁾を用いた。スピナーは BN₃ 製テフロンコーティングしたアンドリュウタイプのもを用いた。¹⁾H ならびに ^{13}C の ν 磁場はそれぞれ 15 G, 60 G で行った。回転数は 3300 Hz, 繰返し時間は 5 s ~ 10 s で、積算回数は 1000 ~ 3000 回であった。

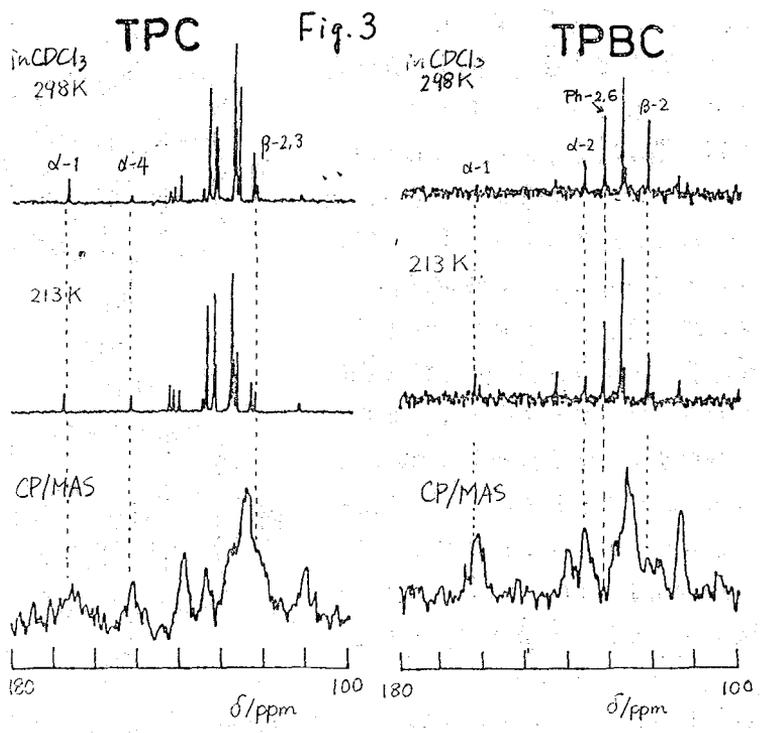
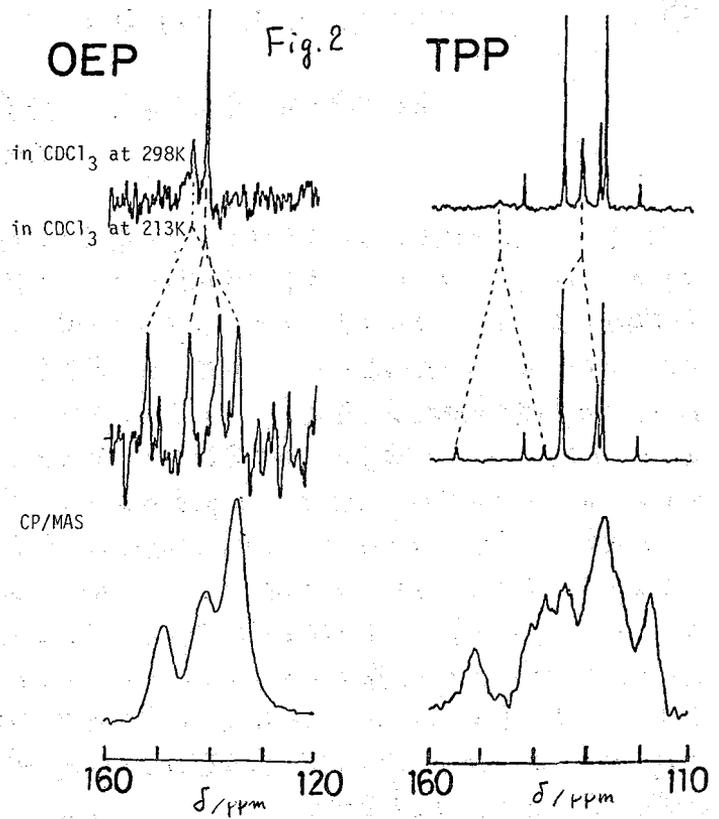


3) 結果と考察 図1に本研究で用いたポルフィリンおよびクロリン類の構造式を与えた。ポルフィリンの4つのピロール環のうち1つが飽和したものがクロリンであり、向い合った2つのピロール環が飽和したものがバクテリオクロリンである。隣りあった2つのピロール環の飽和したものはイソバクテリオクロリンと呼ばれる。図2にテトラフェニルポルフィリン(TPP), オクタエチルポルフィリン(OEP)の ^{13}C CP/MAS NMR と溶液 NMR の結果を与えた。溶液の NMR では



のざわつねのり, にしむらみつし, おおたまる, はたのまさひろ, さとうみつお

NH互変異性の速度が遅いためピロールの α 炭素、 β 炭素の共鳴線はそれぞれ1本であるが、低温になると互変異性の速度が遅くなり、それぞれ2本に分裂する。固体高分解能 ^{13}C NMRは溶液の低温の状態に対応する。図にはピロール環のNHについていない α 炭素の吸収線が認められる。OEPについてはOkajiki & McDowellの研究³⁾が最近発表され、固体高分解能 ^{13}C NMRはNH互変異性の凍結とホルフィン環の分子間環電流効果によって説明された。図3にはテトラフェニルクロリン(TPC), 及びテトラフェニルバクテリオクロリンの ^{13}C CP/MAS NMRと溶液 ^{13}C NMRの結果を示した。TPPの場合と異なり、TPC, TPBCは溶液の ^{13}C NMRで温度変化が観測されず、ピロールの α 炭素、 β 炭素のシグナルは固体高分解能 ^{13}C NMRとよく対応している。ホルフィンからクロリンへと対称性が変化すると図1に示したNH互変異性の構造がもう一方に比較し安定であることを示している。図3のTPBCにおいて、Ph環の2, 6炭素に帰属される



溶液¹³C NMRシグナルに対応する位置に固体高分解能NMRではシグナルが観測されていない。よって固体状態においてはPh基の内部回転が凍結されているため、6位の共鳴線が2本に分裂したと考えられた。表1 OEP, ZnOEP, TPP, TPCの T_{CH} と $T_{1\rho}^H$ の値

	Chemical Shift /ppm	T_{CH} /ms	$T_{1\rho}^H$ /ms	Assignment
OEP	18	0.15	200	CH ₂ CH ₃
	95	0.2	1000	meso
	137	0.5	500	Ca, CB
ZnOEP	19	0.25	200	CH ₂ CH ₃
	94	0.2	200	meso
	140	0.52	1000	Ca, CB
TPP	127	0.2	50	Ph-3,4,5 C β -NH
	152	2	10	Ca-N
TPC	125	0.2	50	Ph-3,4,5 C β -NH
	139	2	4	Ph-1

¹³C CP/MAS NMRの接触時間変化より求めたOEP, ZnOEP, TPP, TPCの T_{CH} (交差分極の時間定数)と $T_{1\rho}^H$ (回転系での T_1)の値を表1に示した。 T_{CH} の値は¹Hの結合している¹³C < ¹Hの結合していない¹³Cであり、¹Hに直接結合している¹³Cの方が磁化の弛豫がすみやかに起こると対応している。¹Hのついていない¹³Cと比較するとOEP, ZnOEP < TPP, TPCとなっているが、これは分子中の¹Hの数に対応している。一方、 $T_{1\rho}^H$ の値はOEP, ZnOEP > TPP, TPCである。TPP, TPCと比較すると¹Hのついていない¹³C > ¹Hのついていない¹³Cであり、¹Hのついていない¹³Cと比較するとTPP > TPCとなっている。

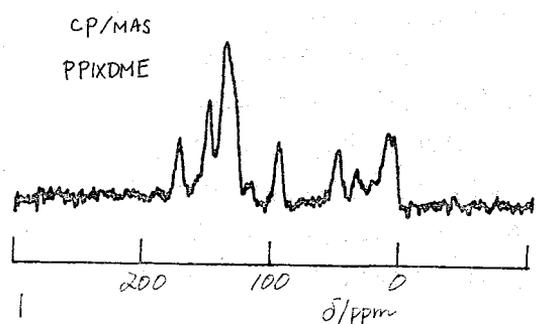
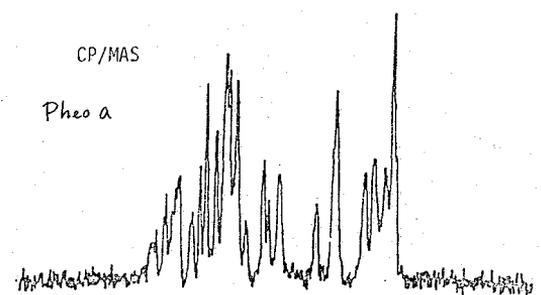
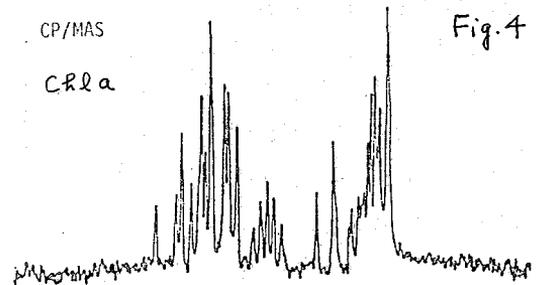
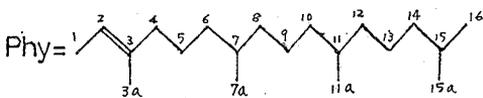
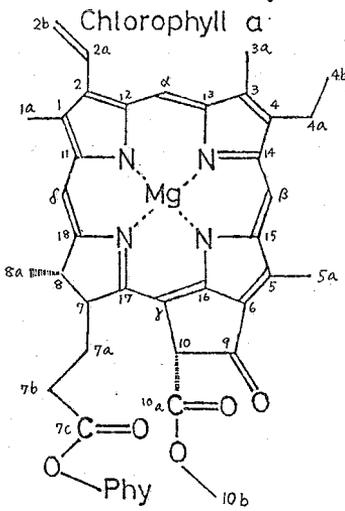


図4にはクロロフィルa (Chla), オキソクロロフィルa (Pheo a), プロトクロロフィルinジメチルエステル(PPIXDME)の¹³C CP/MAS NMRスペクトル。Chlaの固体



高分解能 NMR が、その複雑な構造にもかかわらず文字通り高分解能であり、溶液の ^{13}C NMR との対応もよい。PPIX DME の溶液の ^{13}C NMR では NH 互変異性によるピロールの α 炭素、 β 炭素の広幅化が観測され、固体高分解能 ^{13}C NMR では NH の互変異性の凍結を示す α 炭素の吸収が見られる。Chla, Pheoa の固体高分解能 ^{13}C NMR における化学シフトと接触時間変化により求めた T_{CH} と T_{IP}^{H} の値を表 2、表 3 に示した。 T_{CH} の値は ^1H のついていない ^{13}C 、 ^1H のついていない ^{13}C で比較すると Chla > Pheoa > PPIX DME となっている。一方、 T_{IP}^{H} の値は Chla (3~12ms) < Pheoa (< 7~22 ms) < PPIX/DME (7~100ms) の順であった。

これらのデータを踏まえ、光合成細菌のクロマトホア、光捕獲バクテリオクロソールタンパク質におけるクロソールの存在状態、分子構造について考察する。

(文献) 1) C. S. Yannoni, *Acc. Chem. Res.* **102**, 6885 (1980). 2) C. E. Brown et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **64**(1984), 3) M. Okazaki and C. A. McDowell, *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 2185 (1984), 4) W. T. Dixon, *J. Chem. Phys.* **27**, 1800 (1982).

表 2 Chla の固体高分解能 ^{13}C NMR における化学シフトと T_{CH} と T_{IP}^{H}

Chemical Shift /ppm	T_{CH}/ms	$T_{\text{IP}}^{\text{H}}/\text{ms}$	Assignment	()内は溶液の ^{13}C NMR における化学シフト値
10	0.3	5	C-1a, 5a	(12.6, 12.3), C-3a (11.0)
17	0.2	5	C-4b	(17.5), P-3a (16.2)
20	0.2	8	C-4a, P-7a, 11a	(19.7)
22	0.16	12	C-8a	(23.6), P15a, 16 (22.7)
24	0.12	5	P-5	(25.0), P-13 (24.8), P-9 (24.4)
27	0.06	8	C-7a	(30.9), C-7b (29.8), P-15 (28.0)
32	0.08	5	P-7, 11	(32.7, 32.8)
37	0.06	5	P-8, 10, 12	(37.4), P-6 (36.6)
39	0.08	5	P-4	(39.8), P-14 (39.4)
51	0.1	5	C-10b	(53.0), C-7 (50.4), C-8 (49.7)
64	0.06	6.4	C-10	(65.3), P-1 (61.5)
91	0.06	7	δ	(93.4)
97	0.1	10	α	(100.3)
101	1	3	γ	(105.8)
107	0.08	9	β	(108.2)
125	2	4	C-2b	(119.8), P-2 (118.9)
132	1.6	3	C-6	(130.9), C-2a (131.0)
135	0.8	7	C-1	(135.9), C-3 (134.2), C-5 (134.1), C-2 (139.5)
146	1	5	C-14	(146.6), C-4 (144.6), P-3 (142.2)
150	1.8	4	C-12	(148.9), C-15 (148.1)
154	1.4	3.2	C-17	(156.3), C-11 (155.4), C-13 (152.7)
161	2	4	C-16	(162.4)
169	1	3	C-10a	(170.7), C-18 (169.4)
173	1.6	3	C-7c	(173.1)
189	1.6	3	C-9	(190.0)

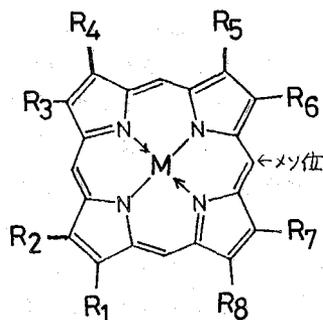
表 3 Pheoa の固体高分解能 ^{13}C NMR における化学シフトと T_{CH} と T_{IP}^{H}

Chemical Shift /ppm	T_{CH}/ms	$T_{\text{IP}}^{\text{H}}/\text{ms}$	Assignment	()内は溶液の ^{13}C NMR における化学シフト値
8	0.17	20	C-5a, 1a	(12.0), C-3a (11.1)
13	0.14	16	C-4a	(19.3), C-4b (17.3)
22	0.12	20	C-8a	(23.1)
28	0.06	20	C-7b	(31.1), C-7a (29.9)
50	0.1	16	C-10b	(52.8), C-7 (51.2), C-8 (50.2)
64	0.14	12	C-10	(64.8)
92	0.1	16	δ	(93.1)
100	0.12	20	α	(97.5)
104	0.6	16	γ	(105.3), β (104.3)
117	0.12	10		
124	0.6	12	C-2b	(122.6)
133	0.6	22	C-1	(131.8), C-5, 6, 2a (129.0)
140	0.5	21	C-11	(142.0), C-15 (137.8), C-2 (136.5), C-12, 3 (136.2)
148	0.8	16	C-16	(149.7), C-4 (145.1)
153	0.9	17	C-13	(155.6), C-14 (151.0)
160	0.9	7	C-17	(161.2)
172	0.6	12	C-18	(172.0), C-10 (169.6)
180	0.4	20	C-7c	(173.3 methylester)
190	1	10	C-9	(189.6)

(京大 工) ○城 宜嗣, 原田治幸, 森島 績

序 一般に, 常磁性分子の構造, 及び電子状態解明に, ^2H -NMRが有用である事はよく知られている。これは, ^2H -NMRシグナルの線幅が理論的には ^2H の磁気回転比 γ の二乗に比例すると考えられる事, つまり ^1H -NMRと比較して γ の比の二乗 ($\gamma_{2\text{H}}/\gamma_{1\text{H}}$)² 即ち $1/42$ の線幅の減少が予想され, 分解能は全体として ^1H -NMRの6.5倍になる事による¹。以上の点に注目して, ^2H -NMR法を常磁性の金属ポルフィリン錯体及びヘムタンパク質に応用した。

ヘムタンパク質の活性中心であるヘム鉄, 特に酸化型高スピン状態 ($S = 5/2$) の鉄の軸配位子の配位構造や, 又ヘムの酸化生成物であるポルフィリン π -カチオンラジカル ($\text{P}^{\text{o}+}$) の電子状態は, ポルフィリンのメソ位 (図1. 参照) の炭素上のスピン密度に, 鋭敏に反映されると示唆されてきた。しかし, 符号を含めたスピン密度の変化に敏感であると期待される ^1H -NMRスペクトルでは, メソプロトンシグナルは, 鉄やラジカルの常磁性の影響で広幅化して, 観測できる事は少ない。そこでメソプロトンを重水素化したポルフィリンを合成し, それを用いて ^2H -NMRスペクトルを測定することによりヘム鉄の軸配位子の配位構造やラジカルの電子状態を明らかにした。



- (a) $R_1=R_3=R_5=R_8 = -\text{CH}_3$,
 $R_2=R_4 = -\text{CH}=\text{CH}_2$, $M = \text{Fe}^{3+}$
 $R_6=R_7 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
- (b) $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7$
 $=R_8 = -\text{CH}_2\text{CH}_3$ $M = \text{Ru}^{2+-\text{CO}}$

図1. 金属ポルフィリン

実験 プロトポルフィリン (図1 a) のメソプロトンの重水素化は Kenner²らの方法に, 又オクタエチルポルフィ

リン (OEP; 図1 b) のメソプロトン重水素化は Bonnet³らの方法に従った。46MHz ^2H -NMRスペクトルは, NICOLET NT-300を用いて, 7.1Tの磁場で室温で測定した。10-20mMの試料溶液1mlを含む10mmφの試料管を用いた。化学シフトは水溶液では D_2O , 塩化メチレン溶媒では TMS (溶媒のシフトから逆算) を基準にした。

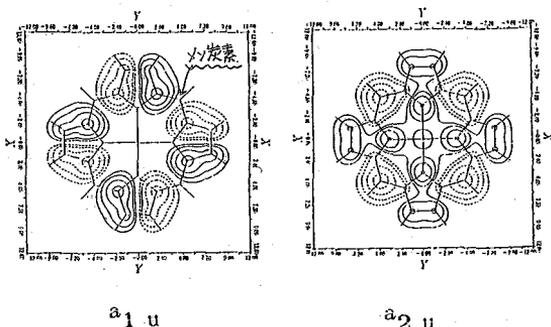


図2. ポルフィリンの最高被占軌道

○しろ よしつぐ, はらだ はるゆき, もりしま いさお

結果と考察

1. Ru(II)及びCo(III)ポルフィリンπ-カチオンラジカルの²H-NMRとそれによる基底電子状態の決定 4.5.

金属ポルフィリンの一電子酸化生成物であるポルフィリンπ-カチオンラジカル(Po⁺)はカタラーゼ・ペルオキシターゼの反応中間体としてよく知られている。Po⁺には²A_{1u}と²A_{2u}の二種類の基底電子状態があり、図2に示した様にそれぞれ特徴的なスピンの広がりを持っている。この二種類のPo⁺の基底電子状態の最も大きな違いは²A_{2u}Po⁺ではメソ炭素上に大きなスピン密度があるのに対して、²A_{2u}Po⁺ではほとんどスピン密度がない事である⁶。このことは、メソプロトンのNMRシグナルのシフト位置がPo⁺の基底電子状態を直接反映する事を意味している。しかし、¹H-NMRではシグナルがラジカルの電子スピンの影響で線幅が広がって観測が困難な事、たとえ観測出来てもシグナルの帰属がはっきりしない事などの難点がある。そこでメソプロトンを重水素化したd₄-OEP、Ru(II)、COとd₄-OEP、Co(III)のPo⁺の²H-NMRを測定し、その電子状態について検討した。

図3にd₄-OEP、Ru(II)、CO(1)とそのPo⁺の²H-NMRスペクトルを示した。酸化前ではRu、ポルフィリン共に反磁性の為に、そのメソ²H-NMRシグナルは11.8ppmに観測された。(1)は、臭素酸化によりPo⁺(2; [d₄-OEP、Ru、CO]⁺Br⁻)が生成し、メソ²Hシグナルは高磁場-33.8ppmに、さらにこれにAgClO₄を加えて対アニオンをBr⁻からClO₄⁻に変えると([d₄-OEP、Ru、CO]⁺ClO₄⁻; 3)低磁場30.4ppmに観測された。d₄-OEP、Coについても同様の測定を行い図4に示した。[d₄-OEP、Co]²⁺2Br⁻(4), [d₄-OEP、Co]²⁺2ClO₄⁻(5)のメソ²Hシグナルはそれぞれ-67.8ppmと22.6ppmに観測された。これらの値を基にMcConnellの式を用いて、それぞれのPo⁺のメソ炭素上のπスピン密度(ρ_{mesoC})を求めた。

$$(\Delta H / H)_{iso} = A^H (r_e / r_H) [g \beta S(S+1) / 3 k T]$$

$$A^H = Q \rho_{mesoC}$$

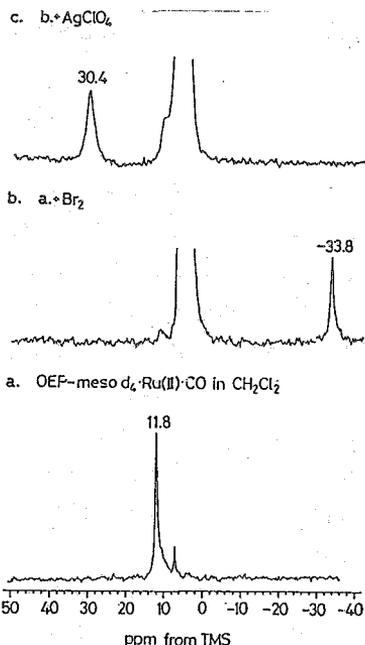


図3. d₄-OEP、Ru、COと、そのPo⁺の²H-NMRスペクトル

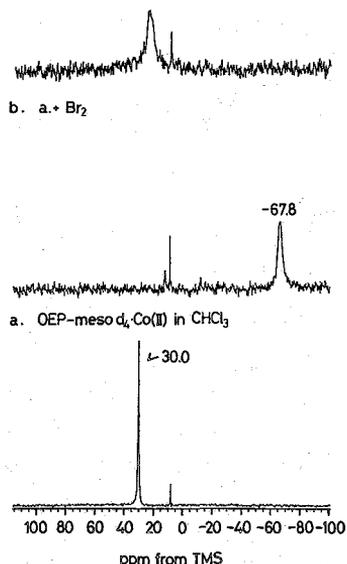


図4. d₄-OEP、Coと、そのPo⁺の²H-NMRスペクトル

表1に(2)-(5)の ρ_{mesoC} を, 典型的な ${}^2A_{1u}Po^{+\cdot}$ ($[OEP, Mg]^+ ClO_4^-$) と ${}^2A_{2u}Po^{+\cdot}$ ($[TMP, Zn]^+ ClO_4^-$)のそれと併に示した。これらを比較すると, (2)-(5)すべて ${}^2A_{1u}$ ${}^2A_{2u}$ それぞれ単一の電子状態ではなく, この両者の混ざり合った状態にある事が明らかにされた。従来 $Po^{+\cdot}$ の基底電子状態は吸収スペクトルの形を基に決定されてきており, それに従えば(2)(4)は ${}^2A_{1u}Po^{+\cdot}$; (3)(5)は ${}^2A_{2u}Po^{+\cdot}$ と帰属できた。しかし表1によれば, (2)(4)よりもむしろ(3)(5)の方に ${}^2A_{1u}$ の割合が多い事が注目される。以上の結果は, 従来吸収スペクトルによる $Po^{+\cdot}$ の電子状態の決定は正確ではなく, メソ 2H -NMRシグナルのシフト位置がメソ炭素上のスピン密度を直接に反映していることを考慮すると, NMR特に 2H -NMRによる決定が直接的かつ有用であることを示唆している。

表1. $Po^{+\cdot}$ の ρ_{mesoC} と電子状態

π -Cation Radicals	$(\Delta H/H)_{\text{iso}}$	ρ_{mesoC}	${}^2A_{1u}$ content	UV-visible (${}^2A_{1u}$ content)
$[OEP, Ru(II), CO]^+ Br^-$ (2)	-44	0.026	57.1%	${}^2A_{1u}$ (100%)
$[OEP, Ru(II), CO]^+ ClO_4^-$ (3)	+20	-0.012	75.0%	${}^2A_{2u}$ (0%)
$[OEP, Co(III)]^{2+} 2Br^-$ (4)	-78	0.046	48.1%	${}^2A_{1u}$ (100%)
$[OEP, Co(III)]^+ 2ClO_4^-$ (5)	+12	-0.007	72.9%	${}^2A_{2u}$ (0%)
$[OEP, Mg(II)]^+ ClO_4^-$	---	-0.066	100%	${}^2A_{1u}$ (100%)
$[TMP, Zn(II)]^+ ClO_4^-$	---	+0.15	0%	${}^2A_{2u}$ (0%)

2. 五配位及び六配位酸化型高スピンヘムタンパク質の 2H -NMRとスピン伝達機構⁷⁾

ヘムタンパク質のヘム鉄の第六配位座には, いくつかの外部配位子が配位することができる。特にヘム鉄が酸化型高スピン状態($S=5/2$)の時には, $metMb$ (ミオグロビン) や $metHb$ (ヘモグロビン) のように水分子が配位している場合(六配位型)と, HRP (西洋ワサビペルオキシターゼ) のように空の場合(五配位型)とがあり, この様な構造上の特徴は両者の反応性の相違, たとえば外部配位子との親和性や反応速度の違いと密接に関連している。今回我々は, メソプロトンを重水素化したヘムを含む $metMb$ 及びその誘導体の 2H -NMRスペクトルを測定し, その常磁性シフトが五配位型, 六配位型で大きく異なる事を見いだした。さらにこの結果を基に, 配位様式とスピン伝達機構の関係について検討した。

図5にメソ 2H 化ヘムを含む3種類の酸化型高スピンMbの 2H -NMRスペクトルを示した。第六配位座にフッ素及び水を有する六配位型のMb ($metMb \cdot F$ & $metMb \cdot H_2O$) では, メソ 2H -NMR

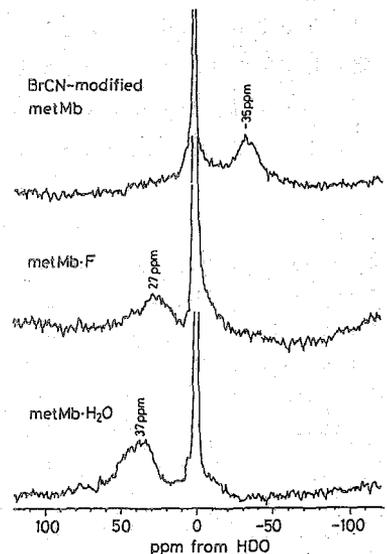


図5-d4 - $metMb$ 誘導体の 2H -NMRスペクトル

シグナルは低磁場 + 37 ppm, + 27 ppm にそれぞれ観測された。しかし臭化シアン (BrCN) を用いて遠位ヒスチジンを修飾し、それに伴って第六配位子の水が除かれた五配位型 Mb (BrCN-modified metMb)⁸ では、高磁場 - 35 ppm にメソ ²Hシグナルが観測された。以上の様に同じ酸化型高スピン Mb でも第六配位子の有無によってメソ ²Hの常磁性シフトが大きく異なることが明らかとなった。モデル化合物を用いた実験でも同様の結果が得られ、これらのことよりメソ ²Hシグナルはヘムタンパク質のヘム鉄の配位様式を決める良いプローブとなることが明らかにされた。

メソ ²Hシグナルがヘム鉄が六配位型では低磁場、五配位型では高磁場シフトする事は、メソ炭素上のスピン密度の符号がそれぞれ異なっていること、つまり鉄のスピンボルフィリン環への伝達の方法が両者で異なっている事を示している。スピンの伝達機構に大きな影響を及ぼす構造的要因は、鉄原子のボルフィリン面に対する相対的位置であり、この事は鉄原子の5つのd軌道の内ボルフィリンのピロール窒素方向へ広がる $d_{x^2-y^2}$ の寄与の大小に関係している。モデル化合物のx-線による解析では、六配位型のヘム鉄はボルフィリン面内に位置しているのに対して、五配位型のヘム鉄はボルフィリン面より約 0.5 Å 浮きでていることが知られている。鉄がボルフィリン面内にある六配位型の場合は $d_{x^2-y^2}$ 軌道の寄与が大きく、スピン非局在化機構によりスピンは $d_{x^2-y^2}$ 軌道からピロール窒素原子を経て σ 軌道によってボルフィリン環へ伝播される。一方五配位型の場合は、鉄はボルフィリン面から浮き出しているから $d_{x^2-y^2}$ 軌道の寄与は小さく、スピンは d_{yz} あるいは d_{zx} 軌道から $4e_g$ π 軌道を通してボルフィリン環へ伝わる。

以上の結果をふまえ、代表的な五配位の酸化型高スピンヘムタンパク質のHRPについても、同様の実験を行った。しかし、HRPの分子量(42000)がMb(17000)に比べて大きいことから、²H-NMRシグナルは四極子緩和の影響で大幅化して観測することができなかった。このメソ ²Hシグナル観測によるヘム鉄の配位構造の決定は、分子量が20000程度で、五配位型のヘムタンパク質例えばAplysia Mb, あるいは配位構造の知られていないヘムタンパク質への応用が期待できる。

REFERENCES

1. McGarvey, B. R.; Kurland, R. J. "NMR of Paramagnetic Molecules" (La Mar, G. N.; Horrocks Jr., W. D.; Holm, R. H. eds.) (1973) pp.555-593, Academic Press, New York.
2. Kenner, G. W.; Smith, K. M.; Sutton, M. J. Tetrahedron Lett. (1973) **16**, 1303-1306.
3. Bonnett, R.; Gale, I. A. D.; Stephanson, G. F. J. Chem. Soc. C (1967) 1168-1172.
4. Morishima, I.; Shiro, Y.; Takamuki, Y. J. Am. Chem. Soc. (1983) **105**, 6168-6170.
5. Morishima, I.; Takamuki, Y.; Shiro, Y. *ibid*, in Press.
6. Fajor, J.; Borg, D. C.; Forman, A.; Dolphin, D.; Felton, R. H. *ibid* (1970) **92**, 3451-3459.; Dolphin, D.; Forman, A.; Borg, D. C.; Fajor, J.; Felton, R. H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1971) **68**, 614-618.; Dolphin, D.; Felton, R. H. Acc. Chem. Res. (1974) **7**, 26-32.
7. Morishima, I.; Shiro, Y.; Wakino, T. J. Am. Chem. Soc. submitted for publication.
8. Shiro, Y.; Morishima, I. Biochemistry in Press.
9. Morishima, I.; Wakino, T.; Shiro, Y. in Preparation.

L-アラニン単結晶の二次元NMRによる研究, 局所双極子場の分離と
2D交換NMR法による¹⁴Nスピン格子緩和機構の考察
(京大理, オックスフォード大*, ブリテイッシュコロンビア大**)
○内藤 晶, P. B. バーカー*, C. A. マクダウェル**

1. 序

2D NMR法は溶液中の分子の構造解析及び動的的研究に幅広く応用されている。この2D NMR法は固体試料にも Cross-polarization を用いれば容易に応用する事ができる。幾種かの2D NMR法の中でも以下に述べる方法は特に固体試料に対して有用な情報を提供すると期待される。Wangh^{1,2)}及びVaughan³⁾によって導入された局所双極子場分離2D NMR(以下SLF 2Dと略す)は従来の1D NMRでは広幅な線幅の故に困難であった¹³Cの化学シフトと局所双極子場の分離を可能にした。Jeener等によって開発された2D交換NMR⁴⁾は分子の動的な情報を得るのに有効である事が認められている。この方法を固体に適用することにより固体中でのスピン交換, スピン拡散, 化学交換について詳しい知見を得ることが期待されている。⁵⁾

筆者等は以上に述べたSLF 2Dと2D交換NMR法を固体に応用した場合に得られる情報について検討した。試料にはL-アラニン単結晶を用い次の点について検討を行った。i) ¹³C_α-¹H双極子結合テンソルの決定とC_α-¹H結合距離の算出。ii) C_α炭素核に直接結合している¹⁴N核のスピン格子緩和機構の考察。

2. 実験

L-アラニン単結晶はL-アラニンの飽和水溶液を凍結して得られた。結晶は斜方晶系でP2₁2₁2₁なる空間群を持っている。結晶は精度の高いゴーニオメーターに接着し、これを二重共鳴用アローブに固定して結晶の角度回転を行なった。¹³C-NMR測定はブルーカー社製CXF200FT NMRスペクトロメーターを用い常温で行なった。データ処理はASPECT 2000コンピュータを使用した。FID行列のディメンションはSLF 2Dの場合(256×64), 2D交換NMRの場合は(65×65)を用いた。2Dスペクトルのデータ収集から処理に要した時間は約5時間である。

3. 理論

この章では¹⁴N核が直接結合している¹³C_α炭素のSLF 2D及び2D交換NMRスペクトルを説明することに焦点を絞って理論を展開する。

3-1. SLF 2D NMR

¹³Cスピン(S)がt₁時間(展開時間)ハミルトニアンH₁で振舞い引き続くt₂時間(検出時間)ハミルトニアンH₂で振舞う時Sスピンの横磁化S₊ = S_x + iS_y は式(1)で表わされる。

$$\langle S_+(t_1, t_2) \rangle = \sum_{ij} a_i a_j e^{-i(E_i - E_j^0)t_2} e^{-i(E_i - E_j)t_1} \langle j | S_+ | i \rangle \quad (1)$$

ないとう あせろ, P. B. バーカー, C. A. マクダウェル

ここで $|i\rangle$ と $|j\rangle$ は $\omega = 0$ のスピ
ン状態 $|0\rangle$ の成分である, 即ち $|0\rangle$
 $= \sum a_i |i\rangle$, E_i と E_i^0 はそれぞれ
 H_1 及び H_2 の固有値である。 H_1 は
proton decoupling のない状態, H_2 は
proton decoupling を当てた状態のハミル
トニアンである。 H_1 及び H_2 はそれ
ぞれ $H_1 = H_2^C + H_{CN}^D + H_{CH}^D$ 及び
 $H_2 = H_2^C + H_{CN}^D$ と表わせる。ここ
で H_2^C は ^{13}C Zeeman 相互作用を表わし,
 H_{CN}^D , H_{CH}^D は $^{13}C-^{14}N$ 及び $^{13}C-^1H$
双極子相互作用を表わすハミルトニアン
である。式(1)を2Dフーリエ変換
することにより2DNMRのピーク位置は式(2)で表わされる。

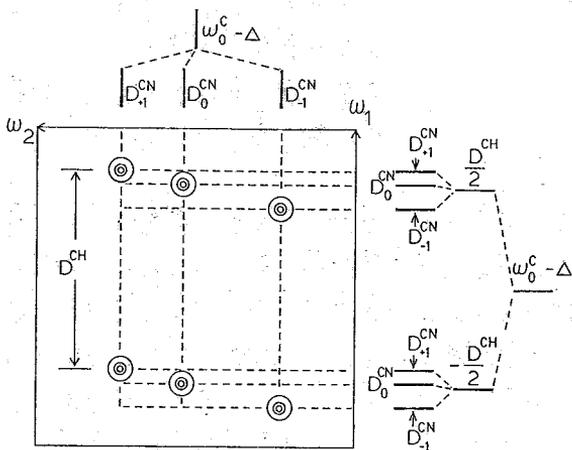


図1. S L F 2 D における理論ピーク位置

$$S(\omega_1, \omega_2) = \frac{1}{12} \sum_k \left\{ \delta\left[\omega_1 - (\omega_0^C - \Delta) - \frac{1}{2}D^{CH} + D_k^{CN}\right] + \delta\left[\omega_1 - (\omega_0^C - \Delta) + \frac{1}{2}D^{CH} + D_k^{CN}\right] \right\} \delta\left[\omega_2 - (\omega_0^C - \Delta) + D_k^{CN}\right] \quad k = -1, 0, +1 \quad (2)$$

ここで Δ は化学シフト値, D_k^{CN} 及び D^{CH} はそれぞれ $^{13}C-^{14}N$ 及び $^{13}C-^1H$ 双極子結合定数である。式(2)によつて予想される C_α 炭素の S L F 2 D ピーク位置を図1に図示する。

3-2. 2D 交換 NMR

Macura 等は 2D 交換 NMR のピーク $S(\omega_e, \omega_k)$ の積分強度は混合係数 $a_{k,e} = [\exp(L\tau_m)]_{k,e} \cdot M_e^0$ に比例する事を示した。⁶⁾

ここで τ_m は混合時間, M_e^0 はピーク e の熱平衡時の磁化, $[\exp(L\tau_m)]_{k,e}$ は微分方程式 $\dot{m} = Lm$ の解である。 m は各ピークの熱平衡時からの磁化の差を表わす。したがって L が目的のシステムについて決定できれば各ピークの相対強度を τ_m の関数として見積もることが可能である。 C_α 炭素の $^{13}C-NMR$ は $^{13}C-^{14}N$ 双極子相互作用のため3本に分裂している。この3本線はそれぞれ ^{14}N 核のスピン状態 $|-1\rangle$, $|0\rangle$, $|+1\rangle$ を反映している。この3種のスピン状態は ^{14}N スピン格子緩和により,

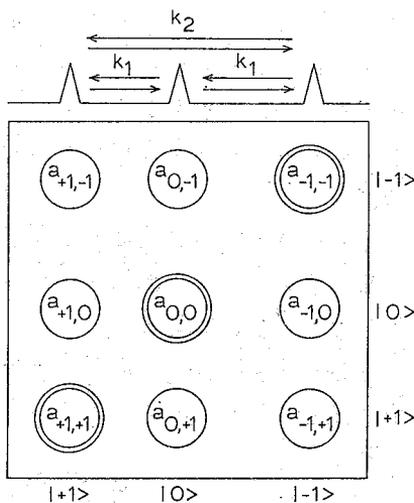


図2. 2D 交換 NMR スペクトルのピーク位置

$|+1\rangle \leftrightarrow |0\rangle$, $|0\rangle \leftrightarrow |-1\rangle$ (1量子交換), $|+1\rangle \leftrightarrow |-1\rangle$ (2量子交換)なる交換を起す。この交換により ^{13}C NMR線は互いに交換する。この交換の様子と各ピークの位置を図2に示す。1量子交換速度を k_1 , 2量子交換速度を k_2 とおき \mathcal{L} を式(3)で表わした。

$$\mathcal{L} = \begin{pmatrix} -(k_1 + k_2 + R) & k_1 & k_2 \\ k_1 & -(2k_1 + R) & k_1 \\ k_2 & k_1 & -(k_1 + k_2 + R) \end{pmatrix} \quad (3)$$

この \mathcal{L} を用いて混合係数を計算し次式の解を得た。

$$\begin{aligned} a_{\pm 1, \pm 1}(\tau_m) &= \frac{1}{6} e^{-R\tau_m} [2 + 3e^{-(k_1 + 2k_2)\tau_m} + e^{-3k_1\tau_m}] M_{\pm 1}^0 \\ a_{0,0}(\tau_m) &= \frac{1}{3} e^{-R\tau_m} [1 + 2e^{-3k_1\tau_m}] M_0^0, \quad a_{\pm 1,0}(\tau_m) = \frac{1}{3} [1 - e^{-3k_1\tau_m}] M_{\pm 1}^0 \\ a_{\pm 1, \mp 1}(\tau_m) &= \frac{1}{6} e^{-R\tau_m} [2 - 3e^{-(k_1 + 2k_2)\tau_m} + e^{-3k_1\tau_m}] M_{\mp 1}^0 \end{aligned} \quad (4)$$

ここで R は ^{13}C のスピン格子緩和時間の逆数である。1量子交換及び2量子交換によるピークを $a_{0,0}(\tau_m)$ で割った量をそれぞれ $r_1(\tau_m)$ 及び $r_2(\tau_m)$ とすると

$$r_1(\tau_m) = \frac{1 - e^{-3k_1\tau_m}}{2 + 2e^{-3k_1\tau_m}}, \quad r_2(\tau_m) = \frac{2 - 3e^{-(k_1 + 2k_2)\tau_m} + e^{-3k_1\tau_m}}{2(1 + 2e^{-3k_1\tau_m})} \quad (5)$$

が式(4)から得られる。式(5)

には R が含まれておらず、

r_1, r_2 の τ_m 依存性から k_1, k_2 を独立に求める事が可能である。

4. 結果と考察

図3はL-アラニン単結晶の ^{13}C SLF2D NMRスペクトルを示す。吸収線は低磁場側からそれぞれ COO^- , $\text{C}\alpha$, CH_3 炭素と同定された。 $\text{C}\alpha$ の2Dスペクトルは理論で予想された様に6本のピークが現われた。 F_1 軸方向の分裂は $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 双極子相互作用によるものであり、 F_2 軸方向の3重線は $^{13}\text{C}-^{14}\text{N}$ 双極子相互作用によるものである。SLF2Dで $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 双極子結合テ

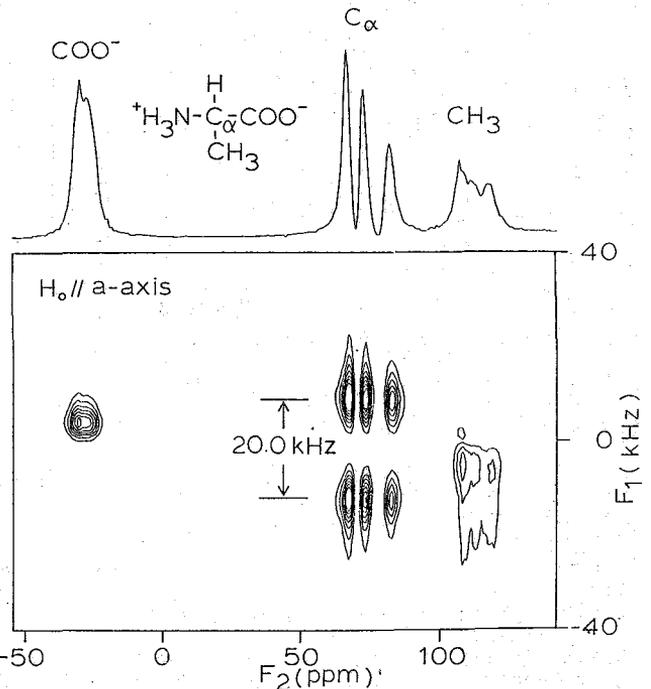


図3. L-アラニン単結晶のSLF2D NMRスペクトル

ンソルを決定した例はまだ報告されてい
ない。今回の実験ではS
L F 2 D の角度依存の実験を行な
いテンソルを決定した。このテ
ンソルから C α -H の結合間距離
を 1.073 Å と決定した。こ
の値は中性子回折から得られてい
る値, 1.091 Å と良く一致を
示す。

図4にL-アラニン単結晶のC α
炭素における2D交換NMRスペ
クトルを示す。混合時間が短い
時, 1量子交換によるピークが僅
かに成長しているが2量子交換に
よるピークはほとんど現われてい
ない。混合時間を長くした場合,
1量子交換によるピークだけ
でなく2量子交換によるピークも
成長している。定量的に k_1 ,
 k_2 を決定するため, 図5に示す
様に r_1 (τ_m), r_2 (τ_m) のプロット
を行った。これから $k_1 = 1.2 \text{ s}^{-1}$
 $k_2 = 0.1 \text{ s}^{-1}$ が求まった。この結
果は1量子交換が2量子交換よりもはる
かに速いことを示している。L-アラ
ニンのアミノ窒素のスピン格子緩和機構
として ^{14}N 核四極相互作用の揺動と ^{14}N
- ^1H 双極子相互作用の揺動が考えられる。
後者には ^{14}N の2量子交換の可能性はな
く, アミノ窒素の緩和は主に ^{14}N - ^1H 双
極子相互作用がさびていると考えられる。

<文献>

- 1) J.S. Waugh, Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 1394 (1976).
- 2) E.F. Rybaczewski, B.L. Neff, J.S. Waugh and J.S. Sherfinski, J. Chem. Phys. 67, 1231 (1977).
- 3) M.E. Stoll, A.J. Vega and R.W. Vaughan, J. Chem. Phys. 65, 4093 (1976).
- 4) J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann, and R.R. Ernst, J. Chem. Phys. 71, 4546 (1979).
- 5) N.M. Szevernyi, M.J. Sullivan, and G.E. Macial, J. Magn. Reson. 47, 462 (1982).
- 6) S. Macura and R.R. Ernst, Mol. Phys. 41, 95 (1980).

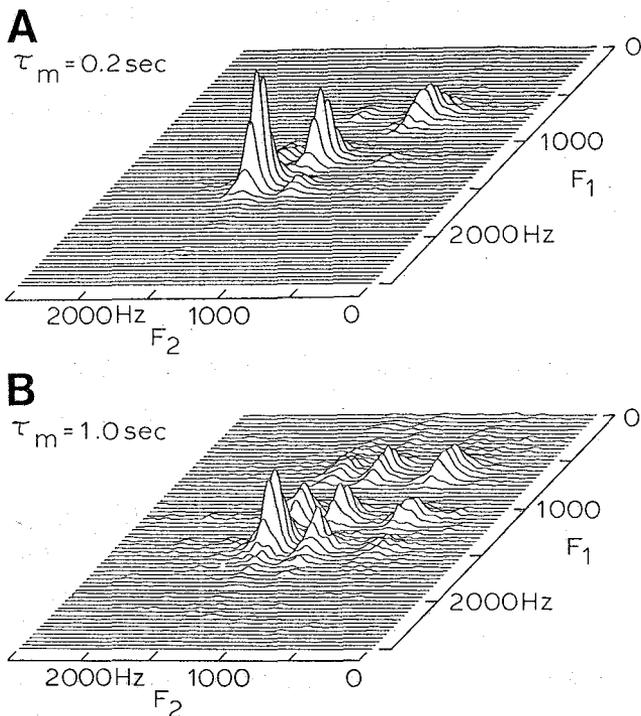


図4. L-アラニン単結晶のC α 炭素における2D
交換NMRスペクトル ($H_0 \parallel a$ 軸)

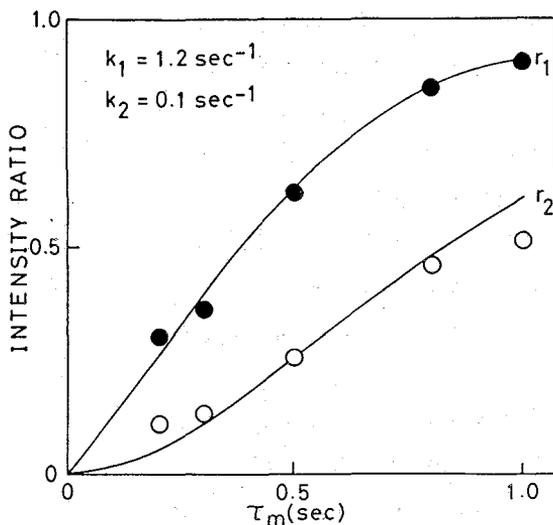


図5. r_1 , r_2 の τ_m 依存性

アスパラジン-水和物単結晶における ^{14}N 核四極結合テンソルと ^{13}C 化学シフトテンソルの決定

(京大理, プリティシュユロンビヤ大*)

○内藤 晶, C. A. マクダウエル*

1. 序

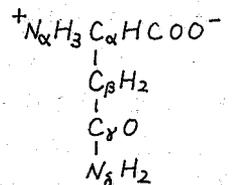
固体高分解能NMRがPines等¹⁾によって導入されて以来, 有機単結晶における ^{13}C 化学シフトテンソルの決定は固体高分解能NMRの直接の応用として数多く行なわれてきた。最近では生体関連物質の研究が盛んになり, 基本的な生体関連物質の化学シフトテンソルを決定する事は生化学的に重要な分子の構造及び動的挙動を研究する上で重要になってきている。この様な観点から, 筆者等はアミノ酸単結晶における ^{13}C 化学シフトテンソルの決定を試みてきた。^{2,3)} しかしながらアミノ酸など窒素を含む分子の場合炭化水素に比べて化学シフトテンソルの解析は多少複雑になる。その理由として, 第一に窒素核に直接結合している炭素の ^{13}C NMR線は ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用のため3本に分裂する。この ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用と化学シフトの異方性が同程度である場合, 角度回転のパターンは非常に複雑になる。第二に ^{14}N 核は ^{14}N Zeeman相互作用と比較できる程の核四極相互作用を持っている。このため ^{14}N スピンは静磁場の方向に量子化されず, ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用は擾動を受ける。したがって化学シフトの値を求めよるにこの核四極相互作用によるシフトを考慮しなければならぬ。第三にアミノ酸は自明の局所対称を持っていない炭素核を含んでいる。この場合求められた化学シフトテンソルを何々の分子に帰属することは困難となる。

この様な問題を克服して窒素を含む分子の ^{13}C 化学シフトテンソルを決定するために筆者等は ^{14}N 核の核四極結合テンソルを正確に実験により決定した。固体において ^{14}N -NMRの観測は比較的困難であり, 簡単なアミノ酸においても ^{14}N 核四極結合テンソルが主軸方向も含めて決定されている例は非常に少ない。筆者等は ^{14}N -NMRを観測するにはCross-polarizationを使うのが最適と考え ^{14}N 用二重共鳴プローブを用いて ^{14}N -NMRを観測した。このNMR線の角度依存のデータから ^{14}N 核四極結合テンソルを決定し最終的に ^{13}C 化学シフトテンソルを決定する方法が筆者等により確立された。²⁾

この報告では試料としてL-アスパラジン-水和物単結晶を選択した。L-アスパラジンは2種類の窒素を含んでおり, ^{13}C 化学シフトテンソル決定のために開発した方法を適用するのに興味の持たれる試料である。

2. 実験

L-アスパラジン-水和物の単結晶はL-アスパラジンの飽和水溶液から一定温度で水を自然蒸発させる事によって得られた。結晶は斜方晶系で, P2₁2₁2₁なる空間群を持っており単位格子に4分子含まれている。ないとう おさろ, C. A. マクダウエル



アスパラジン

^{14}N -NMR測定用二重共鳴プローブは次の点を特に留意して製作された。i) 低周波数の高出力パルスを高磁場で試料に照射した場合、しばしばアスタティック効果により検出コイルに大きな疑似シグナルが誘起される。この効果を最小にするため金属部分は最少量にとどめ、金属を使う場合でもコイルに近い部分はアルミニウム材質を使用しなかった。また照射、検出コイルには直径の小さい銅線を使用した。ii) ^{14}N -NMRの線幅はproton decouplingを用いた場合は約1kHzであるが、共鳴線の異方性は1~4MHz程度ある。異方性に対する線幅の比を分解能とするならば、 ^{14}N -NMRの分解能は ^{13}C -NMRの約100倍あることになる。このためテンソルを決定するために非常に精度の高いゴニオメーターを使用した。iii) ^{14}N -NMRの異方性が大きいことからプローブは少なくとも5MHz以上の周波数領域で同調可能にした。

^{14}N -及び ^{13}C -NMRの測定にはブルーカー社製CXPD200FTNMRスペクトロメーターを使用し通常使われているcross-polarizationのパルス系列を用いた。

3. 結果と考察

3-1. L-アスパラジン-水和物単結晶の ^{14}N -NMR

図1にL-アスパラジン-水和物単結晶のproton decoupled (C) 及びproton coupled (B) ^{14}N -NMRスペクトルを示す。スペクトルは静磁場がb軸から 30° bc面内で傾いた方向の時に測定された。この ^{14}N -NMRの線幅には方向依存性が観測された。一般に N_β 窒素の方が N_α 窒素の線幅よりも広がった。図1(B)に示す様に

proton decouplingパルスを使用しない場合には ^{14}N - ^1H 双極子相互作用による微細構造が現われた。この微細構造は異なる2つのサイトを区別するための情報を提供している。図1(A)ではこの2つのサイトの ^{14}N - ^1H 双極子結合定数を中性子回折で決定された原子座標を用いて計算し、この微細構造を棒線で図示した。図2に ^{14}N -NMR線の角度依存性をプロットした。図2から、 N_β 窒素の核四極結合定数は N_α 窒素よりも大きいことが吸収線の異方性から予想される。この ^{14}N -NMR線の角度依

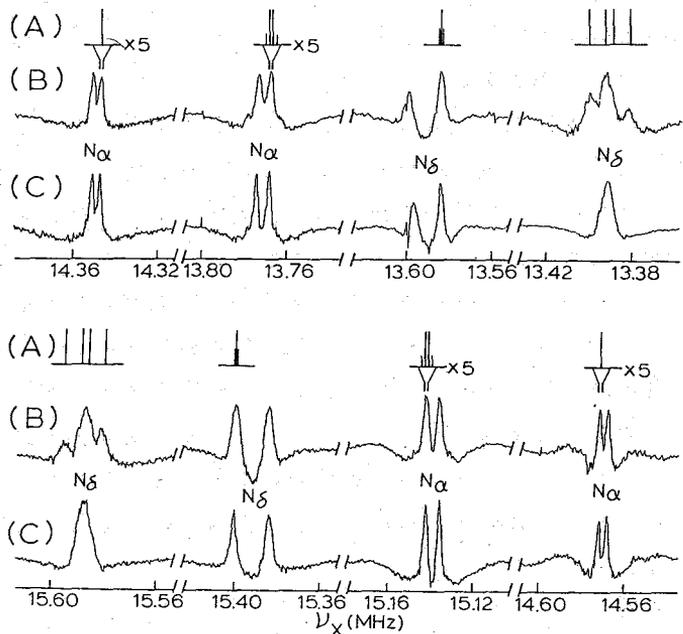


図1. L-アスパラジン-水和物単結晶の ^{14}N -NMR. (A) 計算による微細構造. (B) Without proton decoupling. (C) with proton decoupling.

存性のデータから、 ^{14}N 核四極結合テンソルが N_α 及び N_β 窒素について表1の様に決定された。ここで示してある結合定数の符号も実験により決定された。図3に ^{14}N 核四極結合テンソルの主軸の方向をORTEPプログラムを用いて図示した。

N_α 窒素において、 P_{11} (e^2Qq) は正であり、主軸の方向は $\text{C}_\alpha - \text{N}_\alpha$ 結合にはほぼ平行である。テンソルは近似的に軸対称である。

N_β 窒素の P_{11} の方向は $\text{H} - \text{N}_\beta - \text{H}$ 面に垂直であり符号は負であった。また P_{22} の方向は $\text{C}_\gamma - \text{N}_\beta$ 結合から 70° 傾いている。 $\text{C}_\gamma - \text{N}_\beta$ 方向からの僅かのずれは2つの $\text{N}_\beta - \text{H}$ 結合の強さの違いに帰因すると考えられる。実際中性子回折の研究において $\text{N}_\beta - \text{H}_1$ と $\text{N}_\beta - \text{H}_2$ の結合距離にかなりの違いがあることが報告されている。

3-2. L-アスパラジン-水和物単結晶の ^{13}C -NMR

図4に静磁場が結晶軸に平行な時のproton decoupled ^{13}C -NMRスペクトルを示す。

表1

^{14}N quadrupole coupling tensors			
	N_α	N_β	
P_{11} (e^2Qq/h)	1.152 (MHz)	-2.677	
P_{22}	-0.703	1.780	
P_{33}	-0.449	0.897	

^{13}C chemical shielding tensors				
	C_α	C_β	C_γ	COO^-
σ_{11}	56.7 (ppm)*	79.2	-117.7	-111.7
σ_{22}	75.0	85.1	-68.1	-51.2
σ_{33}	98.4	112.9	40.0	19.2

*外部標準としてベンゼンを使用。TMSはベンゼンより128.5 ppm 高磁場。

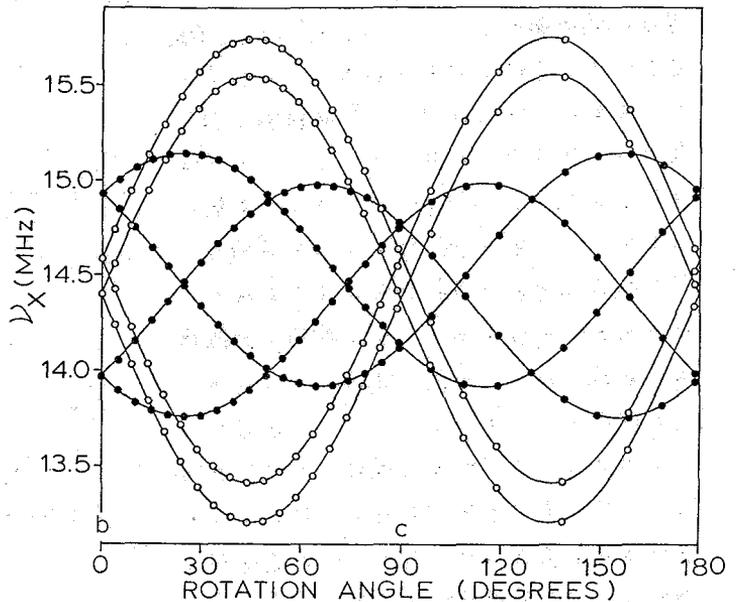


図2. ^{14}N -NMR線の角度依存
● N_α 窒素 ○ N_β 窒素

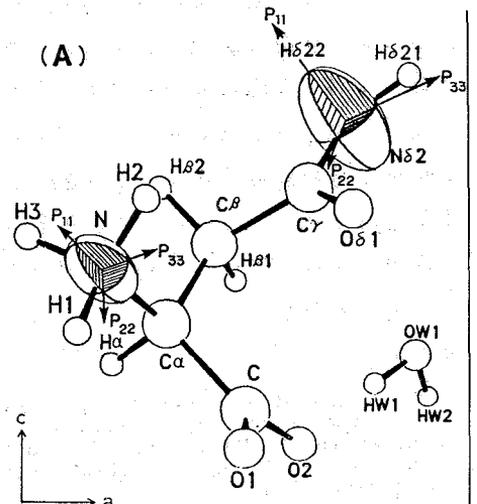


図3. ORTEPプログラムで書いた ^{14}N 核四極結合テンソル

静磁場がa軸に平行の時、それぞれの吸収線は低磁場側から、 C_γ , COO^- , C_α , C_β 炭素によるものと特定された。 C_α 及び C_γ 炭素の吸収線は $^{13}C-^{14}N$ 双極子相互作用により3本に分裂している。また3本線のパターンは非対称であることも観測された。3本線が非対称である原因は ^{14}N 核四極相互作用の存在によるもので、この相互作用はスペクトルの解析を複雑にする反面、新しい情報を提供してくれる。この研究では3本線のパターンを探索することにより、 ^{14}N 核四極結合テンソルの符号を決定することができた。 $^{13}C-NMR$ 線の角度依存性に $^{13}C-^{14}N$ 双極子相互作用及び ^{14}N 核四極相互作用を考慮することはより ^{13}C 化学シフトテンソルがオバテの炭素核について決定された。この ^{13}C 化学シフトテンソルの主値を表1に示し、主軸の方向を図5にORTEPプログラムを用いて図示した。 C_γ 及び COO^- 炭素の化学シフトは C_α 及び C_β 炭素核に比べて大きな異方性を持っている。 C_γ 及び COO^- 炭素の最大遮へい値の主軸の方向は sp^2 平面に垂直であった。また最小遮へい値の主軸の方向は COO^- 炭素では $C_\alpha-C$ 結合の方向であった。 C_α 炭素は明白な局所対称がないので主軸の方向にも対称性は見えない。 C_β 炭素の主軸の方向は CH_2 部位の C_{2v} 対称を反映していることが分かった。

<文献>

- 1) A. Pines, M.G. Gibby and J.S Waugh, J. Chem. Phys. 59, 567(1973).
- 2) A. Naito, S. Ganapathy, K. Akasaka and C.A. McDowell, J. Chem. Phys. 74, 3190(1981).
- 3) A. Naito, S. Ganapathy, P. Raghunathan and C.A. McDowell, J. Chem. Phys. 79, 4173(1983).

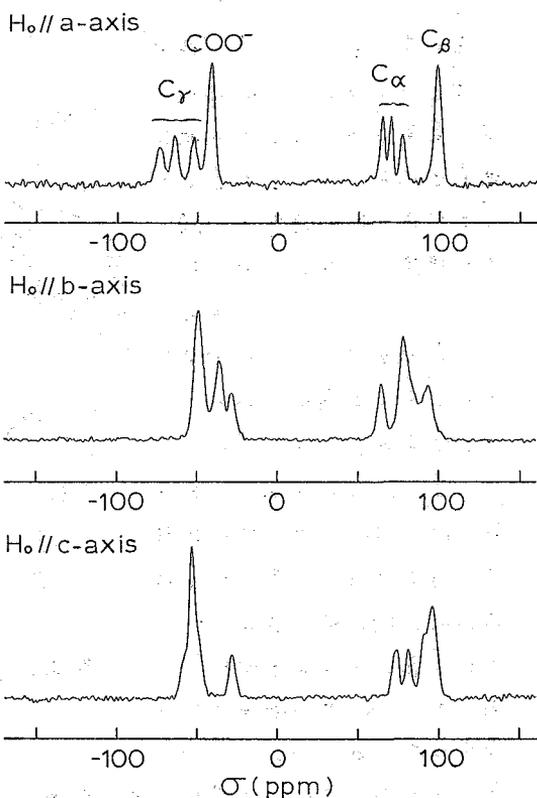


図4. L-アスパラジーン-水和物単結晶の $^{13}C-NMR$ スペクトル

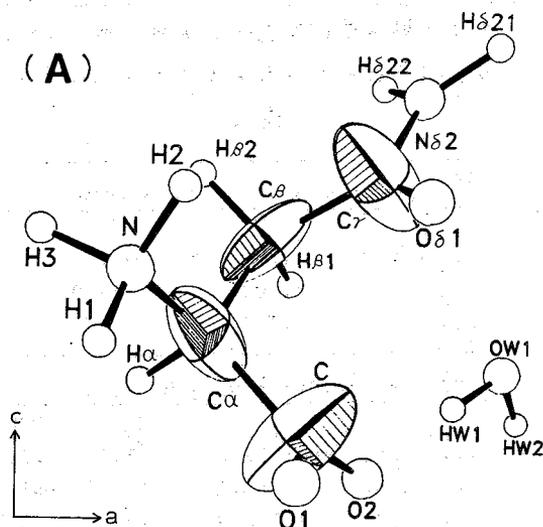
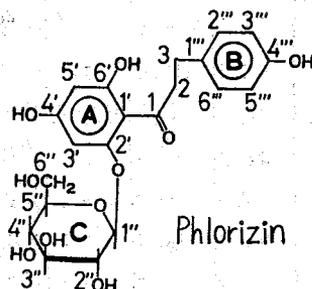


図5. ORTEPプログラムで書いた ^{13}C 化学シフトテンソル

(化技研) 石塚靖子, 名川吉信, 中西洋志, 山本修

1. 序 我々は、数年来腎炎惹起物質のNMR法による研究を行い、強力な腎炎惹起物質である Nephritogenoside の構造決定を行った。¹⁾ 今回は腎・糖尿病を惹起する物質である Phlorizine (Phz) について報告する。Phz は腎尿管表面で尿から血液へのグルコースの再吸収を阻害し、病気を惹起する。腎尿管刷子縁膜表面には糖フィラメントがあり、糖吸収に関与しているといわれている。



(Phz-糖フィラメント)系の構造と機能についての基礎的知見を得るために、単純化したモデルとして種々のシクロデキストリン(CD)を選び、PhzとCDとの相互作用について研究を行った。²⁾

2. 実験 フロリジン及びCDは、市販のものを測定に用いた。NMRスペクトルは、JEOL GX400 (99.65 MHz for ^1H)及びFX200 (50.10 MHz for ^{13}C)分光器を用いた。 ^1H NMRスペクトルは、溶媒に重水を用い、 ^{13}C NMRスペクトルは、重水又は、重水+重メタノール(3:1)を用いた。内部基準として $\text{Me}_3\text{SiCD}_2\text{CD}_2\text{CO}_2\text{Na}$ を用いた。試料濃度はそれぞれ15 mM 及び30 mMである。 ^{13}C 核のT₁は Inversion-recovery 法を用いて求めた。

3. 結果と考察 Phz + CD系の化学シフト α , β 及び γ -CDはグルコースが α -1,4結合でそれぞれ6,7及び3個結合した環状化合物である。比較のためにグルコースが α -1,4結合した直鎖ポリマーであるアミロースの測定も行った。 α -CDとPhzの1:1混合物の重水溶液の ^{13}C NMRスペクトルを測定し、その化学シフトをPhz又は α -CDのみの化学シフトと比較すると、主鎖のカルボニル及び2位のメチレンのシグナルがわずかに高磁場シフト(0.7 ppm)しただけで、他の炭素のシグナルは変化がなかった。同様にアミロースもカルボニルが変化しただけである。このことは、これらの系では、Phzのカルボニルと α -CD又はアミロースの水酸基が分子間水素結合していることを示している。一方、 β -CDとPhzの1:1混合物のシグナルは元の化合物のシグナルとかなり異なることが見いだされた(表1)。その化学シフト差を検討すると、A環の2,3,5位の炭素の化学シフト差はかなり大きく、1,4,6位のそれは非常に小さい。B環では、すべての炭素のシグナルが大きくshiftする。C環では、1'位の炭素のシグナルが大きく低磁場シフトし、他のシグナルの変化は小さい。主鎖では、2'位のメチレンがシフトするがカルボニルはほとんど変化しない。 β -CDでは、1,2,6位の炭素のシグナルがシフトしている。

いしづかやすこ, ながわよしお, ながにしひろし, やまもとおさむ

表1. Phz, β -CD 及びその1:1混合物の ^{13}C NMRの化学シフト

位置	δ A	δ B	$\delta(B-A)$
	Phzまたは β -CD	Phz + β -CD	
1	205.9	206.0	+ 0.1
2	45.2	45.5	+ 0.3
3	29.8	29.9	+ 0.1
1'	106.6	106.5	- 0.1
2'	159.7	160.3	+ 0.6
3'	94.8	96.0	+ 1.2
4'	163.3	163.2	- 0.1
5'	97.7	98.2	+ 0.5
6'	164.0	164.0	0
1''	133.3	132.7	- 0.6
2''	129.6	129.2	- 0.4
3'', 5''	115.4	114.8	- 0.6
4''	153.6	153.9	+ 0.3
1'''	99.5	101.5	+ 2.0
2'''	72.8	73.0	+ 0.2
3'''	76.4	76.4	0
4'''	69.3	69.3	0
5'''	76.1	76.3	+ 0.2
6'''	60.7	60.8	+ 0.1

δ (ppm from TMS)

増加している。この結果からは、Phz と1個の β -CD が包接を形成し、包接体と非包接体が平衡にあるのが、又は、Phz と2個の β -CD と包接体

これらの実験事実、フロリジンのA環又はB環が β -CD と相互作用していること、すなわち、 β -CD環の中に包接されていることを示唆している。 β -CD とPhzとの混合系の結果を合わせて図1に示す。 β -CD の場合には、 β -CD の場合と同様の化学シフトの変化を示すが、その程度は β -CD の場合より小さいことがわかった。この様な実験を ^1H NMRスペクトルでも行いその化学シフトの変化を図2に示す。 α -CD, アミロースでは変化は見られないが β -CD, γ -CD の場合には、大きなシフトが観測された。 β -CD の濃度変化の結果を図3に示す。Phz のほとんどの炭素のシグナルの変化は $[\beta\text{-CD}]/[\text{Phz}] = 2$ 附近で平衡に達するが、図4に示すように ^1H NMRシグナルの場合には、2附近まで連続的に

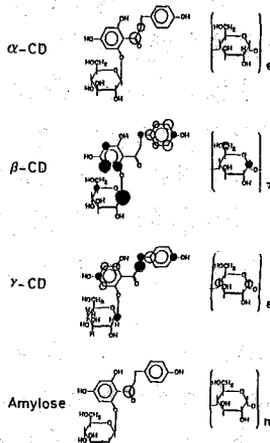


図1. Phz, CD 及びその混合系(1:1)の ^{13}C NMR化学シフト差

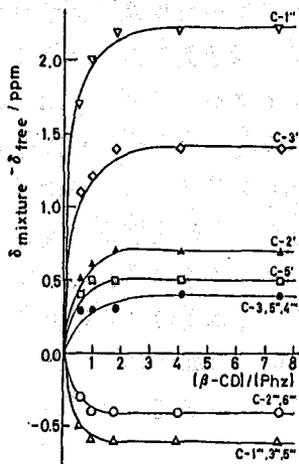
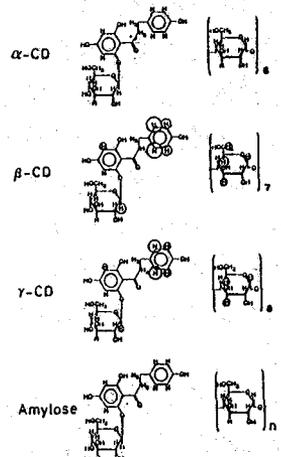


図3. (Phz+ β -CD)系の ^{13}C 化学シフトの β -CD濃度変化



○ 高磁場シフト
● 低磁場シフト
丸の大きさはシフトの大きさを示す。

図2. Phz, CD 及びその混合系(1:1)の ^1H NMR化学シフト差

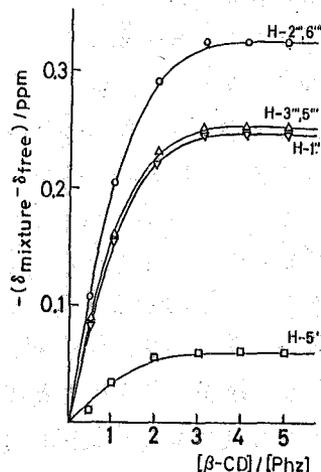


図4. (Phz+ β -CD)系の ^1H 化学シフトの β -CD濃度変化

を形成するのが現在のところ結論することができない。 γ -CDの濃度変化の $^1\text{H-NMR}$ 化学シフトに及ぼす影響も調べた。この場合は、 $[\gamma\text{-CD}]/[\text{Phz}]$ が4~5程度までシグナルが変化し続ける。この事実は、 γ -CDでも β -CDと同様の包接が起っているが、PhzのA環又はB環は γ -CDの内の大きな空間に入ったり、入ったりしていると考えれば説明できる。 β -CDでは、CD中の空間がやや小さく、Phzのベンゼン環がかかりtightに入っていると推定できる。これらのことは以下の回転阻害の事実によっても支持される。

包接体のメチレン鎖の回転の束縛

図5にPhzの主鎖のメチレンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。Phzの3位のメチレンは2.94 ppmにtripletを示す(A)。2-CH₂のシグナルはグルコースのシグナルと重なっている。ところがPhzと β -CDの1:1混合物では2-CH₂のスペクトルパターンは2個のquintet形に分裂することが見い出された(B)。2-CH₂シグナルも同様のシグナルパターンを示す(図5では片方のみが示されている)。この事実はPhzの主鎖の2つのメチレンの回転が束縛され、又、メチレンの2個の水素が非等価であることを示している。(Phz- γ -CD)系では、

2-CH₂はやや幅広いtriplet形を示した(D)。これは包接体内でのメチレン鎖の回転の束縛が弱いため又は、包接体と非包接体との速い平衡の為にシグナルが平均化している為と解釈できる。

図5のBの実測スペクトルをABCDスピン系としてLAOCOONプログラムで、コンピューター解析を行ったところ表2に示すNMRパラメーターが得られた。J_{AB}とJ_{CD}がかかり異なるのは興味深い。化学結合で環を形成している系だけでなく、単に水素結合をしている系でこのような2個のメチレン間のC_{sp3}-C_{sp3}結合の回転が止まっている例は非常に珍しい。

緩和時間T₁と相互作用

上述したようなPhzとCDとの相互作用について知見を得るために、これらの分子の炭素の緩和時間T₁を測定した。表3にCDのみ、及びCDとPhz 1:1の混合系のT₁を示す。CD系と(CD+Phz)系のT₁の比をとると、 α -CDではC₁~C₆で93~91%、 β -CDでは87~77%、 γ -CDで105~87%と計算される。大まかに、球状形を仮定

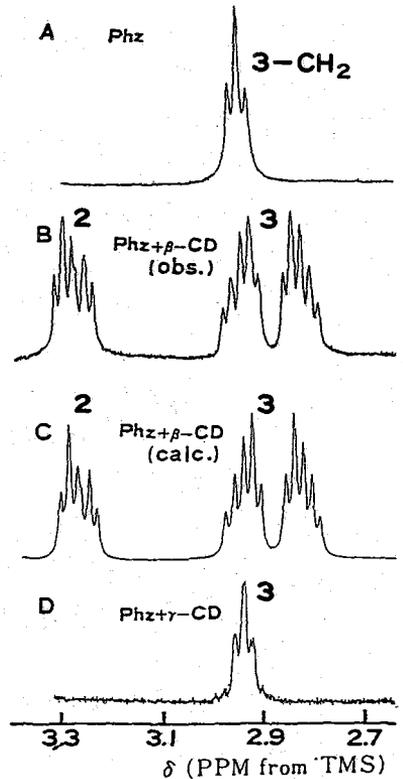


図5. Phz及び(Phz+CD)系の2-CH₂と3-CH₂の ^1H シグナルパターン

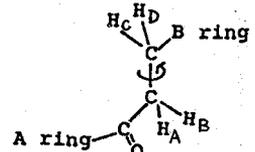


表2. Phz + β -CDのCH₂-CH₂基の $^1\text{H-NMR}$ パラメーター

δ (2A)	2.451 (ppm)
δ (2B)	2.267
δ (3C)	2.938
δ (3D)	2.827
J _{AB}	16.20 (Hz)
J _{AC}	7.01
J _{AD}	7.03
J _{BC}	6.60
J _{BD}	6.77
J _{CD}	13.83

表3. CD及び(CD+Phz)(1:1)の
13C NMRシグナルのT₁ (s)

位置	α-CD	Phz α-CD	β-CD	Phz β-CD	γ-CD	Phz γ-CD
1	0.20	0.18	0.18	0.14	0.18	0.16
2	0.21	0.19	0.19	0.15	0.19	0.20
3	0.21	0.19	0.18	0.15	0.19	0.17
4	0.21	0.19	0.18	0.14	0.19	0.18
5	0.21	0.19	0.18	0.15	0.19	0.17
6	0.13	0.12	0.11	0.085	0.12	0.11

表4. Phz及び(Phz+CD)(1:1)の
13C NMRシグナルのT₁ (s)

位置	Phz	Phz+ α-CD	Phz+ β-CD	Phz+ γ-CD
1	5.1	6.3	2.6	3.7
2	0.31	0.38	0.18	0.32
3	0.44	0.42	0.18	0.32
1'	9.3	10.1	5.0	7.1
2'	6.9	7.7	3.8	3.6
3'	0.43	0.37	0.22	0.32
4'	7.0	5.1	2.7	3.5
5'	0.35	0.39	0.23	0.36
6'	5.9	5.7	2.6	4.1
1'''	6.9	6.8	2.9	4.9
2'', 6'''	1.1	1.0	0.54	0.71
3'', 5'''	0.99	1.0	0.54	0.66
4'''	7.0	6.9	3.6	5.8
1''	0.40	0.44	0.26	0.41
2''	0.40	0.42	0.22	—
3''	0.46	0.44	0.25	0.46
4''	0.46	0.49	0.26	0.40
5''	0.46	0.44	0.26	0.43
6''	0.31	0.24	0.14	0.26

引用文献

- 1) 中西, 柴田, 蛋白質 核酸 酵素, 26, 16, (1981) 2) 石塚, 名川, 中西, 第56回日本生化学大会, 1983年9月
3) 石塚, 名川, 中西, 第2回シロキストリン国際会議, 1984年7月 4) 石塚, 名川, 中西, 第57回日本生化学大会, 1984年10月

し分子全体の tumbling motion を考慮すると一般に、分子量の大きい分子の T₁ は、分子量の小さい分子の T₁ に比べて小さい。Phz と CD の相互作用の可能性として、カルボニルと OH 基の間及び OH 基の間の水素結合 (I) と包接 (II) が考えられる。13C NMR の化学シフトから Phz の C=O と α-CD の分子間水素結合が存在することがわかっている。水素結合の場合には、水素結合している分子と、していない分子の平均化したものが T₁ に表われ、混合系では α-CD の時

より若干分子量が増えたような効果で T₁ が少し小さくなるのであろう。β-CD の場合にも Phz との分子間水素結合の可能性はあるわけであるが、混合系での大幅な T₁ の低下は、水素結合ではなく、他のもっと強い相互作用、すなわち、包接状態にあることを示唆している。この場合は、β-CD と Phz はあたかも一つの分子と考えることができる。1:1 の包接状態とすると分子量の比 β-CD / (β-CD + Phz) は 0.74 でありこれは T₁ の減小比に近い。γ-CD の場合は、C₁ ~ C₆ で値がややばらついているが、基本的には、α-CD と β-CD の場合の中間の値である。これは、γ-CD では、先に述べたように、包接の相互作用が β-CD より弱く、包接体と非包接体の平衡が存在するため、平均として得られる T₁ は、その中間の値になるのであろう。Phz の炭素の T₁ の値を表4に示す。大略として上述したような議論が可能であり、次の式が成立する。

$T_1(\text{Phz}) \approx T_1(\text{Phz} + \alpha\text{-CD}) > T_1(\text{Phz} + \gamma\text{-CD}) > T_1(\text{Phz} + \beta\text{-CD})$
表4に示したように、(Phz+β-CD)系で、2-CH₂, 3-CH₂ の T₁ の値が、Phz, (Phz+α-CD) 及び (Phz+γ-CD) 系の場合より、非常に小さくなっている。これは、包接により2個のメチレン間の結合の廻りの回転が束縛された為に T₁ が減少したと解釈できる。

(織高研) 〇曾良達生, 古沢清彦, 上野勝彦, 坂井士, 津田圭四郎

1. はじめに

我々は、ヌクレオシドケイ素誘導体の核酸合成への利用について検討してきているが、その過程で3',5'環状ヌクレオチドと類似の環構造をもつヌクレオシド環状ケイ素誘導体を新たに合成・単離しその化学構造を決定した。¹⁾ 3',5'-cAMPをはじめとする3',5'環状ヌクレオチドについては、その糖部分のコンホメーションが固定されていることがH-NMRの研究から既に明らかにされており、ヌクレオシド環状ケイ素誘導体についても同様なことが期待される。そこで、H-NMRによる糖部分のコンホメーション解析を行い、結果の一部は既に報告した。²⁾ 今回は、さらに2種のリボヌクレオシド誘導体についてH-NMRによる糖部分のコンホメーション解析を行った結果を合わせて報告する。

2. 実験

試料はデオキシチミジンより合成された、3',5'-O-(*tert*-ブチルシランジイル)2'-デオキシチミジン(DTBSdT)、3',5'-O-(テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)2'-デオキシチミジン(TIPSDt)ウリジンより合成された3',5'-O-(*tert*-ブチルシランジイル)ウリジン、および対応する構造をもつ(デオキシ)アデニン誘導体のDTBSdA, TIPSDA, DTBSAの6種である。図1にその化学構造を示したようにジシロキサン誘導体のTIPSDt, TIPSDAは3',5'部に8員環構造をもつものである。

NMR測定は、重クロロホルム溶液(濃度 $\sim 10 \text{ mg/ml}$)を用い、Nicolet NT-360にて室温(20 $^{\circ}\text{C}$)で行った。

シグナルの帰属は、COSY法により行い化学シフト、スピン結合定数はコンピュータシミュレーションにより求めた。用いたプログラムは、システム付属のITRCALである。

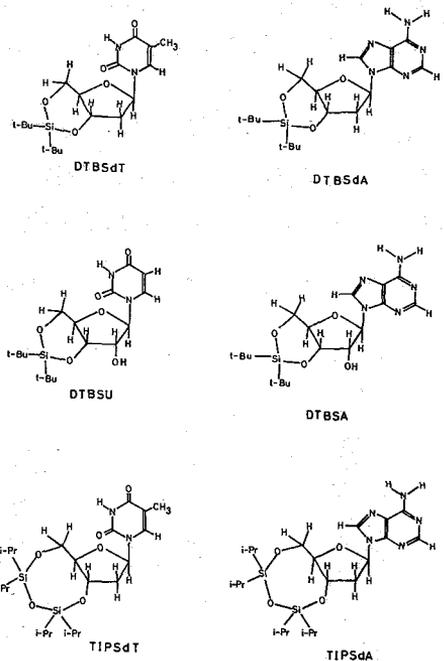


図1. ヌクレオシド環状ケイ素誘導体の化学構造

かつらたつお、ふるさわきよたか、うえのかつひこ、さかいつかさ、つだけいしろう

化学シフトは内部基準として加えたTMSよりppm単位で求めた。

3. 結果・考察

図2に6種のヌクレオシド環状ケイ素誘導体の糖部プロトン領域のNMRスペクトルをシグナルの帰属とともに示した。シグナルの帰属は、COSY法により比較的容易に行うことが出来た。(デオキシヌクレオシド誘導体の2'炭素に結合している2個のプロトンについては、解析の結果1'プロトンと大きなスピン結合定数を示す側をH_{2'}、他方をH_{1'}とし、また5'位の2個のプロトンについては低磁場側をH_B、高磁場側をH_Aとした。)

糖部プロトンのNMR定数は、スペクトルのコンピュータシミュレーションを行い

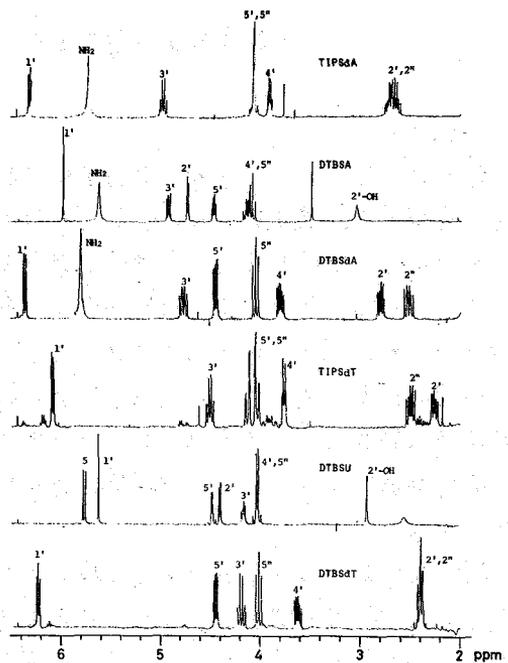
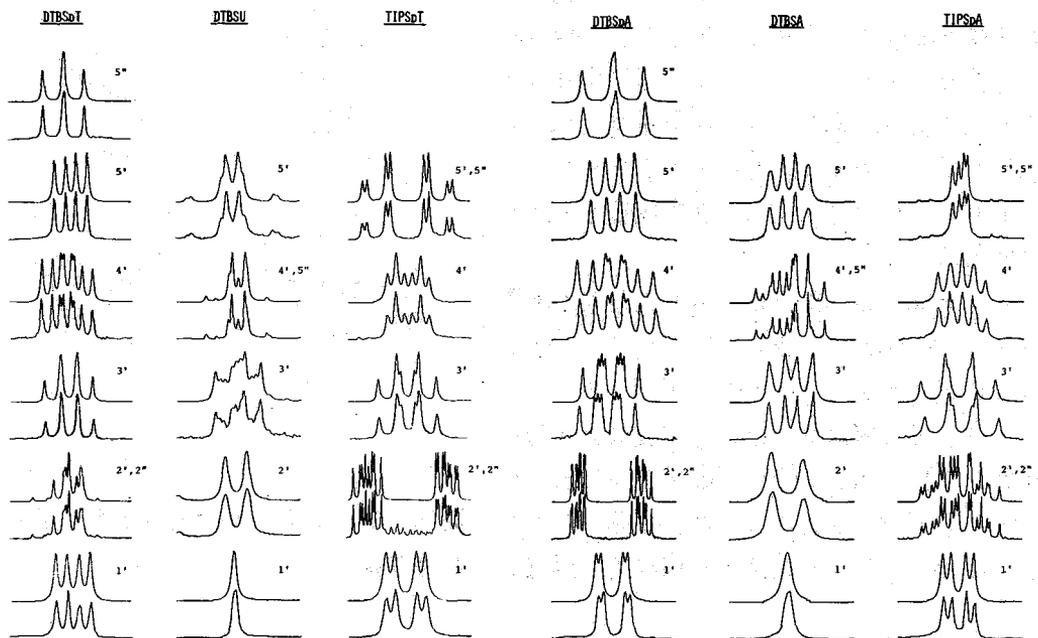


図2. ヌクレオシド環状ケイ素誘導体の¹H-NMRスペクトル(糖部プロトン領域)。

図3. ヌクレオシド環状ケイ素誘導体糖部プロトンの実測スペクトル(下側)とシミュレーションによるスペクトル(上側)。



決定した。

図3は、実測スペクトルとシミュレーションにより得られたスペクトルを各プロトンシグナルについて対にして表示したものである。

その結果得られた化学シフト値については、

TABLE 1. CHEMICAL SHIFTS (PPM FROM INT, TMS)

	DTBSdT	DTBSU	DTBSdA	DTBSA	TIPSdT	TIPSdA
V(1')	6.218	5.617	6.352	5.961	6.071	6.294
V(2')	2.373	4.396	2.796	4.712	2.252	2.717
V(2'')	2.402		2.520		2.491	2.645
V(3')	4.180	4.164	4.753	4.904	4.492	4.958
V(4')	3.615	4.029	3.797	4.127	3.753	3.897
V(5')	4.434	4.474	4.439	4.451	4.114	4.062
V(5'')	4.006	4.021	4.041	4.073	4.025	4.043

TABLE 1. にまたスピン

結合定数については、TABLE 2. に示したが、これらの値から次のような特徴を抽出することが出来る。

(1) DTBSdTとDTBSdAといったように、塩基以外は共通の構造をもつ化合物ごおしの化学シフト値を比較すると、ピリミジン塩基からプリン塩基の変化に伴い、H₃、H_{2'}のシグナルは大きく低磁場側に移動するが、H_{5'}、H_{5''}のシグナルはほとんど変化していない。

(2) H_{5'}とH_{5''}のシグナルの化学シフト差は、3', 5'部に6員環構造をもつDTBSdT、DTBSU、DTBSdA、DTBSAでは大きく(～0.4 ppm)、8員環構造のTIPSdT、TIPSdAでは小さい。

(3) ジェミナルのスピン結合定数であるJ(5', 5'')の値は6員環構造をもつ化合物では-9.3 Hz程度、8員環構造の化合物では-13 Hz程度と異っている。

TABLE 2. COUPLING CONSTANTS (Hz) AND CALCULATED DIHEDRAL ANGLES (°)*

	DTBSdT	DTBSU	DTBSdA	DTBSA	TIPSdT	TIPSdA
J(1', 2')	2.2 (114)	< 1	1.6 (109)	< 1	2.2 (114)	2.3 (115)
J(1', 2'')	8.9 (11)		8.5 (16)		7.5 (26)	7.6 (24)
J(2', 2'')	-13.6		-13.1		-13.5	-13.3
J(2', 3')	7.7 (24)	5.2 (40)	7.3 (27)	5.0 (41)	7.7 (24)	7.5 (26)
J(2'', 3')	10.4 (160)		10.6 (162)		9.7 (155)	8.9 (150)
J(3', 4')	8.9 (150)	9.2 (152)	9.0 (150)	9.2 (152)	8.0 (145)	7.5 (142)
J(4', 5')	5.0 (41)	5.2 (40)	5.0 (41)	5.1 (41)	2.6 (56)	4.5 (44)
J(4', 5'')	10.3 (160)	10.9 (164)	10.4 (160)	10.6 (162)	2.9 (54)	3.2 (52)
J(5', 5'')	-9.5	-9.3	-9.4	-9.1	-13.1	-12.7

* KARPLUS EQUATION (1) WAS USED.

$${}^3J(H,H) = 10.5 \cos^2\phi_{HH} - 1.2 \cos\phi_{HH} \dots\dots\dots (1)$$

(4) ビシナルプロトンのスピン結合定数については、DTBSdTとDTBSdA、DTBSUとDTBSAといったように塩基を除いては同一構造をもつ化合物どおしは、非常によく似た値をとっている。

(5) 6員環構造のリボヌクレオシド誘導体とデオキシリボヌクレオシド誘導体とでは、 $J(1',2')$ 、 $J(2',3')$ の値に差が見られる他は、非常に良く似たスピン結合定数を示す。

(6) 8員環構造のTIPSdT、TIPSdAの $J(4',5')$ の値は、それぞれ2.9 Hz、3.2 HzでありDTBSdTなどの6員環構造の化合物の $J(4',5')$ の値、 ~ 10.5 Hzとは大きく異っている。

(7) リボヌクレオシド誘導体のDTBSU、DTBSAにおける $J(1',2')$ の値は、1 Hz以下であり1'プロトンはブロードな一重線を与える。

以上(1)~(7)の特徴から今回報告したヌクレオシド環状ケイ素誘導体の糖部コンホメーションについて次のような結論を得ることが出来る。

(a) 3',5'部に6員環をもつ化合物と8員環をもつ化合物との差は、フラノース環では小さく、C(4')-C(5')まわりに大きくあらわれている。

(b) 糖部のコンホメーションは塩基にはよらない。

(c) 6員環構造のリボヌクレオシド誘導体とデオキシリボヌクレオシド誘導体とでは、2'炭素付近のコンホメーションに差がありそうである。

TABLE 2. には、Altona, Sundaralingam³⁾によるパラメータをもつKARPLUS式(1)を用いてビシナルスピン結合定数から算出した二面体角を()内に示してある。

ヌクレオシド、ヌクレオチドのX線結晶構造解析データをもとに得られたパラメータをもつKARPLUS式(1)を、今回のようなヌクレオシド環状ケイ素誘導体に適用するには議論のあるところである。実際、我々がDTBSdAについて行ったX線解析の結果と、KARPLUS式(1)により得られた二面体角とでは 20° 程度のくいちがいが見られる。特に $\Phi_{H2',H3'}$ と $\Phi_{H3',H4'}$ との大きさが逆転していることが問題である。TABLE 3.にX線解析により得られた二面体角を示す。

今後さらにX線解析データとNMRからのデータを比較検討していく必要があろう。

TABLE 3. X線解析によるDTBSdAの二面体角

$\Phi_{H1',H2'}$	$\Phi_{H1',H2''}$	$\Phi_{H2',H3'}$	$\Phi_{H2',H3''}$	$\Phi_{H3',H4'}$	$\Phi_{H4',H5'}$	$\Phi_{H4',H5''}$
129°	-8°	27°	152°	-164°	-61°	168°

1) 古沢清寿、坂井士、津田圭四郎 日本化学会才49春季年会講演予稿集

2) 曾良達生、古沢清寿、坂井士、津田圭四郎 日本化学会才49春季年会予稿集

3) C. Altona, M. Sundaralingam J. Amer. Chem. Soc., 95 (7), 2333, 1973

(阪大蛋白研, 東京薬大)* 藤原敏道, 神藤平三郎*, 阿久津秀雄
京極好正

〈序〉

DNA(デオキシリボ核酸)は、ヌクレオチドを構造単位とし、二重らせん構造を持つ棒状分子である。配向させたDNAは、相対湿度が増し生理的条件に近づくとき、分子運動のために、 ^{31}P の化学シフト異方性によるスペクトルは、大きく変化し始める。このスペクトルには、DNAの構造と運動についての情報が含まれている。構造についての詳しい情報の抽出は、分子運動を考慮した解析によって、はじめて可能になる。特に、スペクトル中の時定数を持つ振中の大きな運動については、多くの知見を与える。この研究の目的は、高配向試料という特性から得る多くのスペクトルパターンをもとに、DNAの分子運動と構造を明らかにすることである。これまで、高配向DNAの運動性について ^{31}P NMRの線形解析、緩和時間の解析で明らかになったことは、運動の様式として、速い局所的な内部運動、大きな単位でのヘリックス軸についての回転運動とその軸に垂直な軸についての制限回転運動が不可欠であり、構造については、DNA構造の多様性を考慮せねばならないことである。今回は、線形解析で、拡散定数を考慮したモデルなど、他のモデルについても検討し、それらのモデルで構造解析も行、たので報告する。

〈実験〉¹⁾

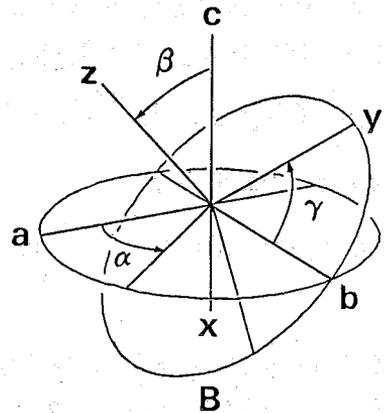
測定は、FX-200 (Jeol) 固体NMR装置を用い、クロスポラリゼーション法で行った。 ^{31}P の共鳴周波数は、80 MHzである。

〈理論〉

観測されるシフト値は、実験室座標系から化学シフト相互作用の主軸座標系へ次のような変換を行うことによって得られる。(図1)

$$\text{実験室座標系} \xrightarrow{\Omega_1} \text{配向座標系} \xrightarrow{\Omega_2} \text{分子運動座標系} \quad (1)$$

Ω_1 (β) 主軸座標系, Ω_2 オイラー角



(1) ヘリックス軸についての回転運動

この運動は、その振中がもっとも大きい運動モードであり、一般に、線形にも、もっとも大きい寄与をする。この運動の与える影響の特徴は、次のような考察から理解できる。 (1) の座標変換から、観測される化学シフト値

図1, x, y, z座標系が化学シフトの主軸座標系

$\sigma_{\text{obs}}(\phi, \alpha)$ は、ヘリックス軸についての回転角 ϕ と、ゴニオメータ角 α の関数として、

ふじわらとしみち, しんどうへいさぶろう, あくつひでお, きょうごくよしまさ

$$\sigma_{\text{obs}}(\phi, \alpha) = A \sin^2 \phi \cos(2\alpha - a) + B \sin 2\phi \cos(\alpha - b) + C \quad (2)$$

A, B, C, a, b は、定数

と表わされる。これより磁場に対し平行スペクトル($\phi=0^\circ$)では、 $\sigma_{\text{obs}}(0, \alpha) = \text{const.}$ となりリュングレットであり、垂直スペクトル($\phi=90^\circ$)では、ホ1項とホ3項が寄与する。また、 45° スペクトル($\phi=45^\circ$)では、すべての項が線形に寄与することがわかる。回転運動が速くなり、角 α の時間変化が激しくなると、まず α について周期 180° の項であるホ1項が平均化され0となり、次に周期 360° の項であるホ2項が0になる。従ってヘリックス軸について回転運動が起りはじめると、垂直と 45° スペクトルの中が同程度なら、まず垂直スペクトルが尖鋭化し、次に 90° スペクトルが尖鋭化することがわかる。実際のシュミレーションでは、次のような計算法で行った。

a) 回転拡散運動²⁾

スペクトルは、横磁化 $\langle I_x(t, \Omega) \rangle$ の集団平均をフーリエ変換することによって与えられ、

$$I(\omega) = \int_0^\infty e^{-i\omega t} \int_\Omega \langle I_x(t, \Omega) \rangle P_{\text{eq}}(\Omega) d\Omega dt \quad (3)$$

$P_{\text{eq}}(\Omega)$; 熱平衡状態の確率分布

横磁化は、次の確率的ライウビル方程式によって規定される密度行列 $\rho(\Omega, t)$ から求まる

$$\frac{\partial \rho(\Omega, t)}{\partial t} = -i[\mathcal{H}_0 + \mathcal{H}_1(\Omega), \rho(\Omega, t)] + D \frac{\partial^2 \rho(\Omega, t)}{\partial \Omega^2} \quad (4)$$

\mathcal{H}_0 ; Ω に依存しないハミルトニアニ。ゼーマン項と化学シフト項の一部

$\mathcal{H}_1(\Omega)$; Ω に依存するハミルトニアニ

D; 回転拡散定数

さらに、横磁化のフーリエ変換を $\frac{\partial}{\partial \Omega}$ の固有関数 $G_m(\Omega)$ で、次のように展開する。

$$\int_0^\infty \langle I_x(t, \Omega) \rangle e^{-i\omega t} dt = \sum_m G_m(\Omega) C_m(\omega) \quad (5)$$

(4)式のフーリエ変換より、

$$[(\omega - \omega') - iD(j-m)']^2 C_m(\omega) + \sum_m \int_\Omega G_m^*(\Omega) G_m(\Omega) [\mathcal{H}_1(\Omega) C_m(\omega)] d\Omega = -i\delta_{m0} \quad (6)$$

$$\omega' = \langle -i\mathcal{H}_0 \rangle - \langle +i\mathcal{H}_1 \rangle$$

$G_0(\Omega) = [P_{\text{eq}}(\Omega)]^{1/2}$ と(3)式と、 $G_m(\Omega)$ の直交性より、スペクトル強度 $I(\omega)$ は、 $\text{Re}[C_0(\omega)]$ に比例する。(6)式は、 $|m|, |m'| \leq j$ とすると、 $(2j+1)$ 個の $C_m(\omega)$ についての連立一次方程式となり、これをガウスの消去法で解いてスペクトル強度を得る。

b) 制限回転運動

このモデルを用いる時は、箱型ポテンシャルの内部を運動する時の拡散定数は、線中に比べて十分速いとする近似を用いた。運動できる範囲は、必要に応じて、その分布を考えた。

(2) ヘリックス軸から傾いた軸についての制限回転運動

これは、らせん方向の接線を軸とした運動で、骨格構造のねじれ運動を模したものであ

る。運動を表わす角を α 、運動できる範囲を $\Delta\alpha$ とすると、運動する速さが線巾に比べ十分大きいとして、 $1/2 < \Delta\alpha/2$ について平均をとり、観測する化学シフトとする。

〈結果と考察〉

(1) ヘリックス軸についての回転運動

図2,3は、相対湿度92%と98%のB型NaDNAのスペクトルである。ヘリックス軸についての回転運動から理論的に予測できることは、先に触れたように

- i) 45°スペクトルの線巾は、垂直、平行スペクトルより大きい。
- ii) 運動性(相対湿度)が増加する時、平行スペクトルより、垂直スペクトルに影響を与える。
- iii) 回転運動が激しくなる時、化学シフト相互作用は見かけ上軸対称になるので、リン酸エステルの構造の多様性による平行スペクトルの線巾は、垂直スペクトルの線巾の2倍になる。

以上の特徴は、実測スペクトル(図2,3)で、すべて観測されている。

次に、ヘリックス軸についての回転運動が、拡散運動と制限回転運動のいずれでよく記述できるかを述べる。相対湿度92%と98%についてフィッティングした値は、拡散運動について、それぞれ $D=1.5 \times 10^6 s^{-1}$ 、 $D=5 \times 10^6 s^{-1}$ であり、制限回転運動について自由に運動できる範囲 $\Delta\alpha$ は、それぞれ 130° と 220° であり、 $\Delta\alpha$ の分布の標準偏差は、 90° である。この二つのモデルの適合性について 今回の線形解析からだけでは区別できない。しかし、拡散モデルから得た拡散定数は、緩和時間の解析より得た値とよく一致すること。また、45°スペクトルについて、制限回転モデルからは、ある領域でダブルレットが観測されるはずであるが、A型DNAではそのようなことがない事などより、回転拡散モデルの方が適当

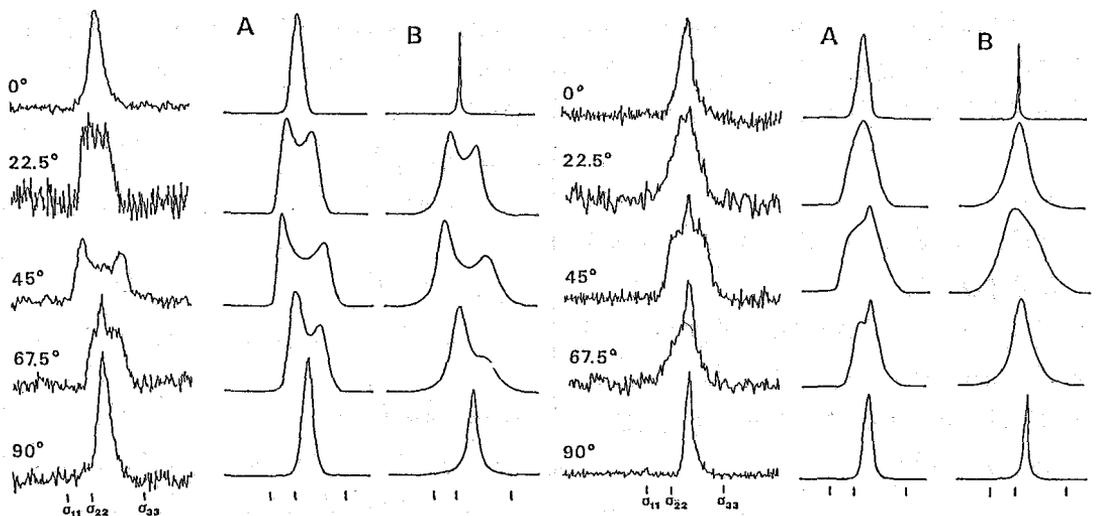


図2 相対湿度92% NaDNA スペクトルのゴニオメータ角依存性。左側は実測スペクトル A;制限回転モデル B;回転拡散モデル

図3 相対湿度98% NaDNA スペクトルのゴニオメータ角依存性。左側は実測スペクトル A;制限回転モデル B;回転拡散モデル

であると考えられる。また、この点について発表の際は、粘性流体中の弾性的な棒状分子のねじれ運動を一般化したランジュバール方程式で、粗視化するという理論的立場から議論する。

(2) コンフォメーションのゆらぎ

前回も触れたように、平行スペクトルの線中は、コンフォメーションの多様性による。相対湿度が増加するとこの線中は減少する。これは、コンフォメーションのゆらぎによると考えられる。

(3) 傾いた軸についての制限回転運動

この運動モードは、次の現象をよく説明する。垂直スペクトルは、相対湿度が87%, 89%で非対称的であり、相対湿度が上昇するにつれ高磁場側にシフトする。

以上のように配向DNAの分子運動について、 ^{31}P の線形解析と緩和時間の解析より、以下の運動の存在が示される。

- 1, ヘリックス軸についての回転拡散運動と、その軸自身のゆらぎ
- 2, コンフォメーションのゆらぎ
- 3, ヘリックス軸から傾いた軸での制限回転運動

poly(rA)·poly(dT)への応用

以上のように、明らかにあった運動を考慮し、最も大きな影響を与えるヘリックス軸についての回転拡散を考えて、相対湿度92%のpoly(rA)·poly(dT)のシミュレーションを行った。このハイブリッドのX線解析³⁾より、poly(rA)鎖はA型 poly(dT)鎖はB型の構造を持つと考えられている。図4に示すように、その構造は、実測スペクトルとよい一致を得た。このように分子運動を考慮することによって構造を精度よく決めることが出来る。

文献

- 1) 神藤, 松本, 藤原, 阿久津, 第22回NMR討論会予稿 ('83)
Shindo, et al J. Mol. Biol. 174 221 ('84)
- 2) Meirovitch et al J. Chem. Phys. 77 3915 ('82)
- 3) Zimmerman et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 78 ('81)

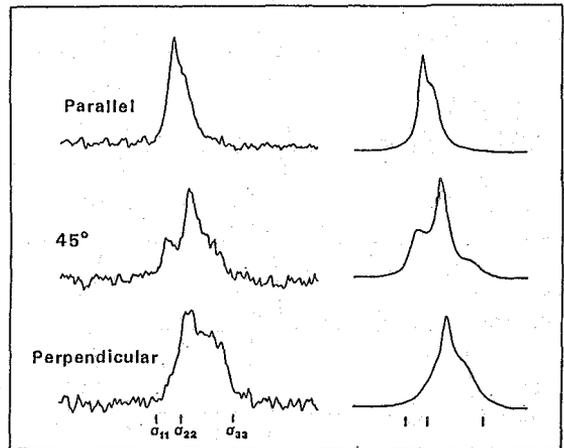


図4, poly(rA)·poly(dT)のスペクトル。
左側は実測, 右側は計算したスペクトル
 $D = 1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

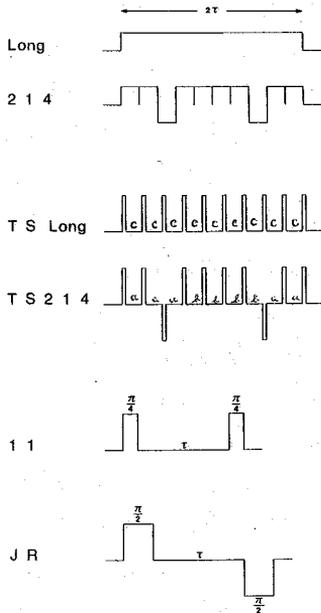
H₂O中におけるDNAオリゴマーイミノプロトンの検出と
そのDynamics.

(阪大蛋白研) 〇季 尚鐘、阿又津秀雄、京極好正
(阪大薬) 大塚栄子、池原森男

核酸鎖中のイミノプロトンは塩基対を形成した場合に溶媒との交換が抑えられていて、軽水中ではシグナルとして観測できるようにする(重水中で観測できる程は遅くはない)。このイミノプロトンシグナルは核磁場の(11~14 ppm)に現れ、他のプロトンシグナルと重ならないので核酸鎖の挙動を調べる指標として使いたい。

しかし、軽水中での他種プロトンのシグナルの検出はdynamic rangeの問題からパルスFT法では難しいとされ、CWや相関法に頼る。近頃は水のシグナルの影響を避ける各種パルス train が考案されている。

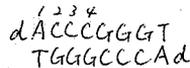
最近我々は塩基配列を識別する蛋白質とDNAの相互作用の機構をNMRを中心として



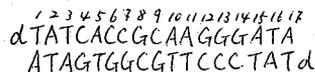
調べているが、その際用いた合成DNAを例にとり、軽水中でのイミノプロトンの検出の問題点と、そこから得られたいくつかの結果について報告する。

【実験】

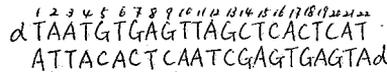
用いたDNAフラグメントは、トリエステル法で合成されたもので、下記の配列を持つ二本鎖である。測定には300 ODを用いている(1 OD ≒ 0.05 μg)。合成最終産物はトリエチルアミン塩にして、2倍の水に変え、Chelex処理をした。



制限酵素認識部位
T7ター



λオペレーター
CR3



CAP 蛋白 lac オペ
レーター結合部位

図1. 用いた各種 pulse train

- Long : soft pulse
- 214 : Redfield 214 pulse
- TS Long : time-shared long pulse
- TS 214 : time-shared 214 pulse
- 11 : one-one pulse
- JR : jump and return pulse

H-NMR測定には、JEOL GX500Sを用い、図1に示したパルス系列を基本とする各種パルス train をPG200パルスプログラムで組み立てに使用した。2τ (= √観測域の中心周波数 - 水の周波数) や a, b, c は 180°パルスに相当する時のFIIDが最小になるように調節してきめる。

リーさん、あつたて、きょうじくおし、あつたて、いけはらもり

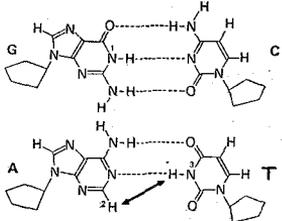


図2. Watson-Crick 型の塩基対

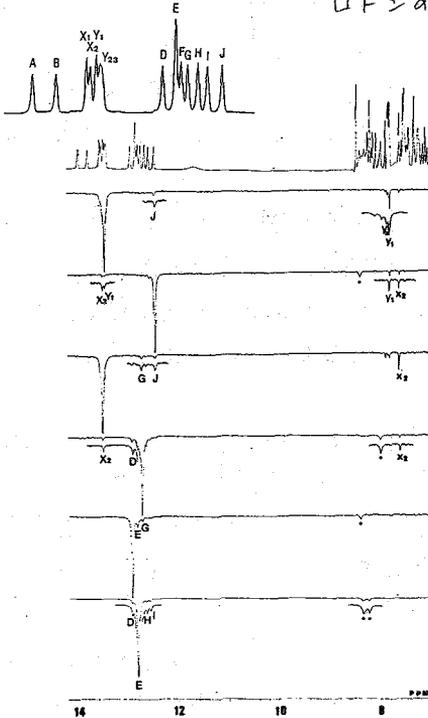


図3. OR3 の NOE 差 spectra

NOE	Imino-Imino NOE										Imino-Ade C2H NOE									
	A	B	X ₁	X ₂	Y ₁	Y ₂₃	D	E	F	G	H	I	J	X ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₁	X ₂	a	b
A	○																			
B	○	○																		
X ₁	○		○											○						
X ₂	○			○																
Y ₁	○				○															
Y ₂₃	○					○														
D	○						○													
E	○							○												
F	○								○											
G	○									○										
H	○										○									
I	○											○								
J	○												○							
	A	B	X ₁	X ₂	Y ₁	Y ₂₃	D	E	F	G	H	I	J	X ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₁	X ₂	a	b
	11	10	15	5	3	16	7	13	12	6	14	9	4	15	16	2	3	5	11	10

図4. OR3 の NOE connectivity と帰属

【結果と考察】

イミノ, アミノプロトンの検出: イミノプロトンは水のシグナルから7~9 ppmも離れているのでパルス系列を用いても測定は比較的容易であるが、その帰属には水のシグナルから2~3 ppmしか離れている(C²Hやアミノ)プロトンとのNOE測定が必要である。このアミノのシグナルの測定はパルスの種類によらず強度が著しく弱くなる。アミノプロトンの領域の強度を定量的に見る時はJ_Rが(11)パルスがよい。

NOE connectivity: 2本鎖が安定に形成されているれば、塩基対の数だけイミノプロトンのシグナルが検出される。各ピークと各塩基対に帰属するのはNOEのフタがわりで決められる場合が多い。AT対中のアミノプロトンを照射すると、強いNOEがAの2位の(C²)Hシグナルに観測され区別される。GC対はGイミノプロトンを照射してCのアミノプロトンシグナルにNOEが観測される(図2)。さらに二次的(弱い)NOEが重なりあ、(塩基対間のイミノ-イミノ、イミノ)-(C²)Hに観測されるので、AT対、GC対の区別、最近接塩基対の固定の順で、順次照射位置を変えて追跡して行けば、ひとりで塩基対配列が浮かび上がってくる(図3, 4)。

同じ配列の繰返しがある場合は帰属にあいまいさが生じる。アミノシグナルが近接しているを選択的に照射しても、隣のシグナルに照射が洩れて(spillover)、その影響でNOEが出ているのを区別することが難しい場合がある。そうした時は、照射パワーを変えたり、照射位置をずらしたりしてNOEの変化を見え推定している。

2D NOE: 上記のようにspilloverの心配のある時は、resolutionと感度の問題はあるが、2D-NOEを適用できれば、その

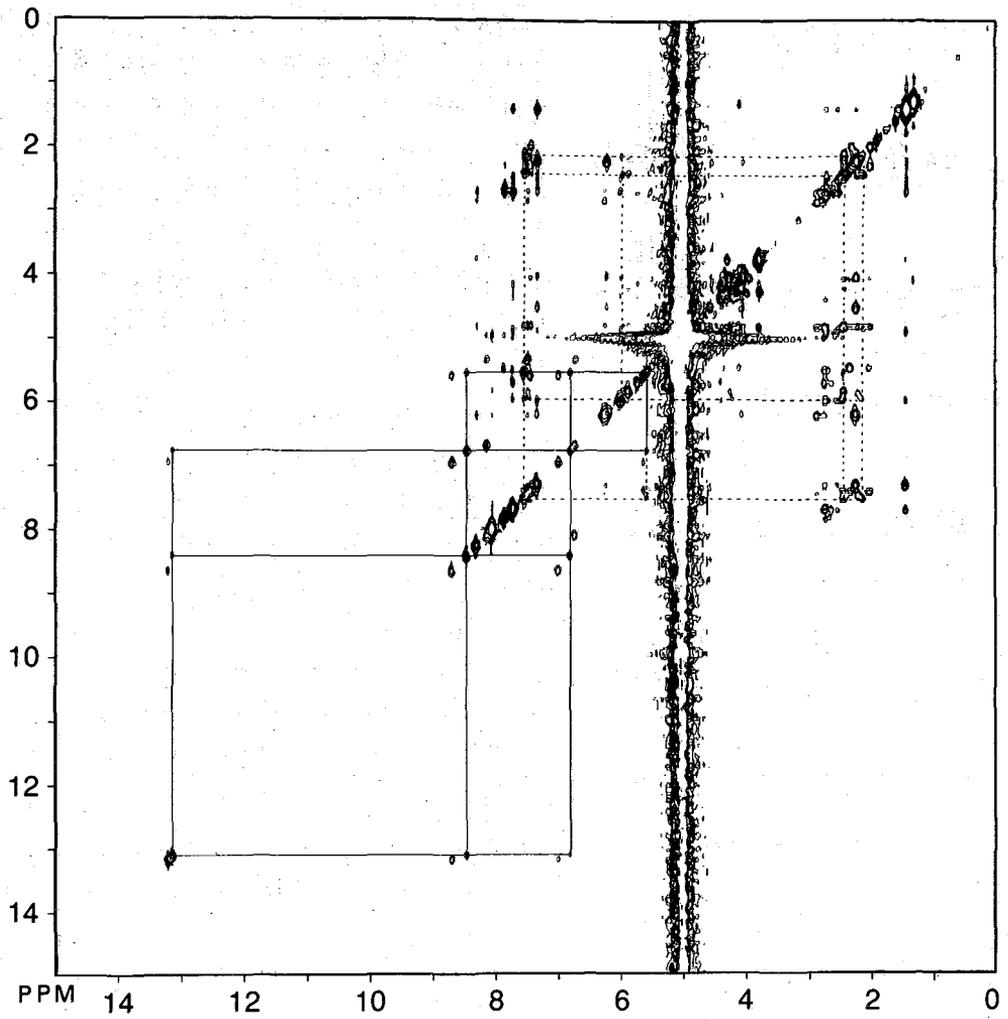


図5. dA CCC GGG T の軽水中の 2D NOE

90°-t₁-90°-τ-90°(11 pulse)-FID(t₂). — ; exchangeable proton の関係する NOE connectivity ; non-exchangeable proton 間の NOE connectivity .

配は無いはずである。その目的で軽水中の 2D-NOE を試してみた。現在使用中のルガーの關係で、観測パルスとところのみ(11)とTS Longにしたものを試みた。図5にその一例を示す。水のシフトが抑えられているため、かなり近傍で trace でき、かつ(11)パルスTfαで水シフトの高、低磁場側の connection も可能である。適用したDNAは対称的の ^dA CCC GGG T / T G G C C C A d であるから、1次元NMRでは3つのGCイミノプロトンが検出されているが、この2次元では1つのGCイミノとH₂O間の交換によるNOE、2つのGCイミノとCアミノ間のNOEが見られる。アミノ基は2つのプロトンが非等価である。さらにこれからCアミノ-C⁵H---C⁶H---C¹H---C²H, C³Hという具合に trace できる。

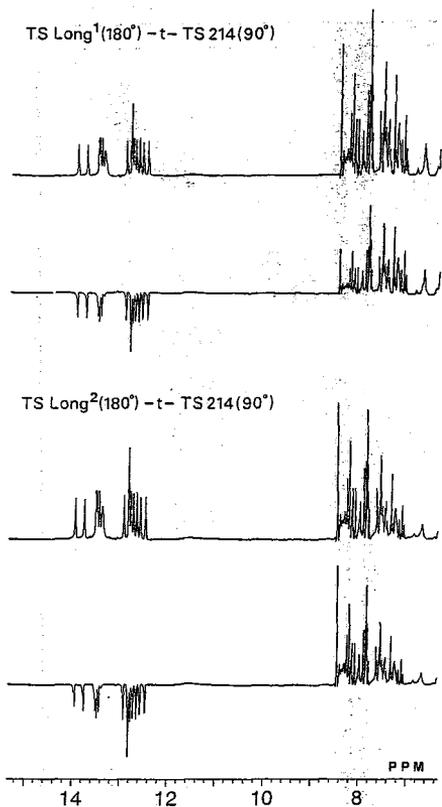


図6. TS Long pulse - TS 214 pulse による T_1 測定.

TS Long¹ は first order null, TS Long² は second order null を使ったもの.

各測定の上は $t=3000$ msec, F は $t=10$ msec に対応する。

T_2 測定: 図5にも見られるようにイミ170プロトンがH₂Oと容易に交換し、その交換の度合は、塩基対の transient は opening の度合を示すと考えられる。したがって、イミ170プロトンのみわけの T_2 は、双極子相互作用による寿命 T_{2D} と、交換による寿命 τ とが重なり、たものであるが、時には後者の効果が反動的に大きい場合もあるので、 T_2 測定から、塩基対ゆらぎの程度を見積りすることができ。

$1/T_{app} = 1/T_{2D} + 1/\tau$ 但し close $\xrightarrow{K_e}$ open $\xrightarrow{K_e}$ H₂O $K_e \gg 1/\tau$
 上記の仮定には他のプロトンとの cross relaxation などの影響は無視している。理想的には selective に各シグナルを照射して、回復立ち上りの rate を観測するのがよい。 T_1 測定には inversion recovery 法で、 $180^\circ - \tau - 90^\circ$ パルスと $180^\circ, 90^\circ$ のところを TS 214, TS Long および 214 を 1st order と 2nd order の組み合わせで試してみたい。図6はイミ170プロトンの領域に 180° (TS L) パルスを当て、H₂O は勿論 CH やアミ170プロトンの反転を抑え、観測の 90° パルスに TS 214 を使、たものである。水の影響を抑えるだけならば 180° (TS L²) でもよいがアミ170プロトンの影響をも抑えるには 180° (TS L²) を使う方がよい。

REFERENCES

1. A.G.Redfield, S.D.Kunz and E.K.Ralph, *J. Magn. Reson.*, 19(1975), 114-117
2. T.A.Early, J.Feigon and D.R.Kearns, *J. Magn. Reson.*, 41(1980), 343-348
3. J.M.Wright, J.Feigon, W.Denny, W.Leupin and D.R.Kearns., *J. Magn. Reson.*, 45(1981), 514-519
4. P.Plateau and M.Gueron, *J. Am. Chem. Soc.*, 104(1982), 7310-7311
5. G.M.Clore, B.J.Kimber and A.M.Gronenborn, *J. Magn. Reson.*, 54(1983), 170-173
6. V.Sklenar and Z.Starcuk, *J. Magn. Reson.*, 50(1982), 495-501
7. E.Ohtsuka, M.Shin, Z.Tozuka, A.Ohta, K.Kitano, Y.Taniyama and M.Ikehara, *Nucleic Acids Research, Sym. Ser. No. 12*(1983) 197-200

阪大蛋白質研 の阿久津秀雄, 京極好正

[はじめに] λファージは大腸菌を宿主とするコリファージの一種で、遺伝学的に最もよく研究されているウィルスの一つである。その形は丁偶数系ファージに似ており、径約 0.05μ の正20面体の頭部と長さ約 0.15μ の尾部よりなる(図1)。ファージ粒子の生物学的機能はファージDNAの保護と、ファージ粒子の再生産をめぐしての宿主細胞への感染、即ちファージDNAの宿主細胞への注入である。前者はコートによるDNAの物理的保護を意味するが、後者はファージ粒子の吸着とDNAの移送という動的な過程を含み、生化学的の意味で、真に機能と言うべきものである。ファージの吸着は低温でも起るが、DNAの移送は 15°C 以下では起らないことが知られている。¹⁾この内DNAの移送にはファージたんぱく質と共にDNAのpackaging構造、その動的状態が密接に関連していると考えられる。従って、λファージ中に折りたたまれたDNAの動的性質はDNAのcondensationという物理化学的興味だけでなく、機能との関連においても興味あるものである。

λファージ内のDNAの物理化学的性質についてはX線によるpackingの解析、²⁾流動二色性によるDNAの配向方向の解析、³⁾蛍光回転緩和によるDNAの運動性の解析、⁴⁾等がある。それによると、DNAはファージ内で互いに平行にpackingされており、全体としては糸巻き状になっていると考えられている(図1)。蛍光回転緩和は折りたたまれたDNAの運動が著しく制限されていることを示した。われわれは一昨年の本討論会で^{31}\text{P}}固体NMRによる研究について端緒的な報告を行なった。⁵⁾この方法では^{31}\text{P}}という核種に注目することによりDNAのbackboneに関する情報を得ることが可能である。λファージのような非配向系ではX線のような構造情報を得ることはできないが、DNAの運動性に関する情報を得ることができる。又、相関時間が 10^{-9}s から 10^{-4}s 程度までの広い範囲の運動を捉える点でも他の方法よりすぐれている。本研究では一昨年の結果を更に詳しく検討すると共に、17.6%のDNAを欠損した変異株についても調査と比較検討を行なった。

[試料の調製]

野生型のλファージとしてはλcI857s7を用い、溶原菌を大量培養することにより得た。一方、DNA欠損変異株としては17.6%のDNAを欠くλΔ52401cI57を用いた。こ

あくつひであ、きようこくよしまさ

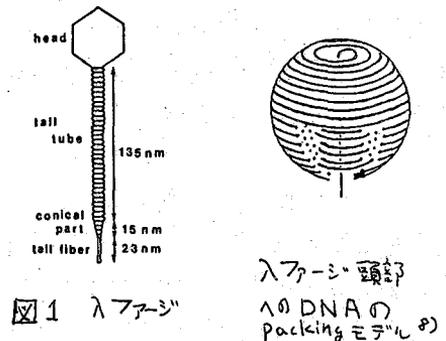


図1 λファージ

λファージ頭部
のDNAの
packingモデル

これは京大理学部の山岸秀夫博士より分与されたλDS2401cI⁻に、大量の試料調整をやりやすくする為にΔという変異を遺伝的組み換えにより導入して得た。これについては本年の生体分子の構造に関する討論会に報告した。変異Δは溶菌を阻害するもので、ファージの濃縮精製に非常に有効である。ファージ粒子の精製は常法に従い、最終的にはstepwiseのCsCl濃度勾配遠心できれいにした。

[NMRの測定] NMRの測定はJEOE FX-100 NMR分光計 (³¹Pで40.3 MHz)に固体用高出力増幅器、温度制御可能な³¹P高出力フローヘッドを接続させて行なった。フロー照射による温度上昇は、同じ溶媒で校正曲線を作って補正を行なった。

測定用試料の溶媒は20 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.3 を用い、溶液の場合は100~200 μg / 0.5 ml 位まで濃縮して用いた。遠心 pellet の場合はRP30ローターで20,000 rpm 2 hr の pellet を NMR tube に移して測定に用いた。

NMRの測定はsingle pulse あるいはクロスポーラリゼーション法によって行なった。³¹PのT₁測定は通常のinversion recovery法とクロスポーラリゼーション法による。後者のpulse sequence を図2aに示す。b) 図のように³¹P channel の位相を交互に変えて積算すると

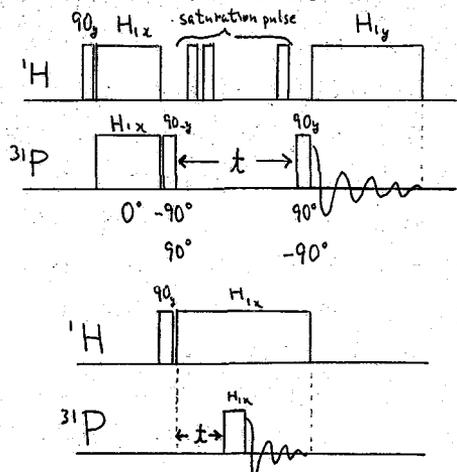


図2 クロスポーラリゼーション法によるT₁ (a) 及びT_{1ρ} (b) のpulse sequence

$$M \propto \exp(-t/T_1) \dots (1)$$

となる。¹HのT_{1ρ}の測定は図2bのように、¹Hの90° pulse と³¹Pのcontact pulse の間隔を変えることにより、クロスポーラリゼーション法で行なった。

[結果及び考察] 図3に30% sucrose 存在下でのλファージ (λと略す) 及びそのDNA欠損変異株 (λΔと略す) の³¹P-NMRスペクトルを示す。30%蔗糖はファージ粒子の回転を抑えると共に、ファージを安定化させる為に入れてある。比較として一番下に乾燥させた固体DNAのパウダースペクトルを入れてある。このスペクトルの特異点 (即ち、両端と中程のピーク) は化学シフトテンソルの主値を与える。既に報告したようにλファージにおいてはこれに比較して、化学シフトの異方性が平均化され、スペクトル幅が小さくなっている。一方、λΔではこれが更に小さくなる。これを温度を変えて比較したのが図4である。λΔの化学シフトの異方性 (スペクトル幅をとっている) はλのそれと較べて約10 ppm 小さくなっているが、その温度依存性はほとんど変わらない。λとλΔではDNA鎖間の距離が変わるだけで、DNAのpackingの仕方はほとんど変わらない。従って、この傾きはDNAのpackingの仕方を反映しているものと考えられる。

これは同じような packing をしていることが知られている T4 ファージの結果⁷⁾と比較すると更にはっきりする。図4に見るように、T4 ファージの場合は DNA 密度の高さを反映して化学シフトの異方性が更に大きくなっているが、温度変化の傾きはほとんど変わらない。一方、これらのファージとは全く異なる PM2 においては化学シフトの異方性の温度依存性が異なっている。

化学シフトの異方性を平均化する運動としては二種類のものが考えられる。一つは制限された角度内での速い運動であり、もう一つは 2π の 1/100 程度の遅い運動である。前者の場合は運動は速くてもその範囲が制限されている為に化学シフトの異方性は平均化されない。後者の場合は運動の範囲に制限がなかったとしても、十分に速くない為に異方性が平均化されない。この両者は溶媒の粘度を変えてことにより区別できる。もし速い運動が効いていれば、溶媒の粘度を上げて、運動を遅くしても制限された角度が変わらない限り、平均化される割合は変わらない。もし遅い運動が主要な原因であれば、運動の速さの変化は直ちにスペクトルパターンの変化を

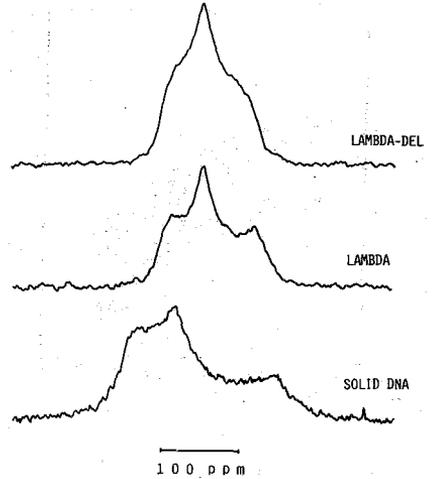


図3 λ, λΔ 及び固体DNAの³¹P-NMR スペクトル

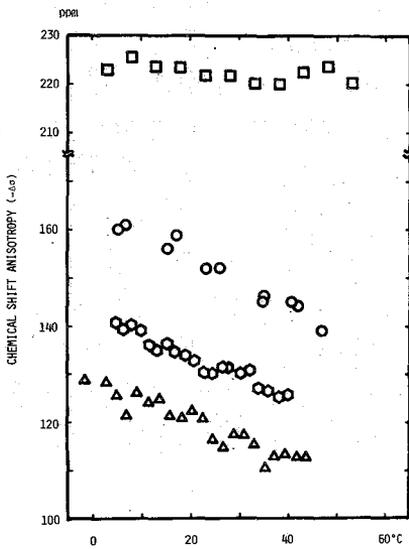


図4 リンの化学シフトの異方性の温度変化
○: λ, △: λΔ, ○: T4 ファージ
□: 固体 DNA

引き起す。そこで、λ の溶媒中の蔗糖濃度を 0%, 30%, 60% と変化させてみた。0% ではファージ粒子の回転を抑制し為に pellet で測定した。30% と 60% ではほとんど変化が見られず、0% では異方性の著かな減少が見られた。このことは λ ファージ内での化学シフトの異方性の平均化には制限された角度内での速い運動が効いていることを示す。

次に速い運動に関するより定量的情報を得る為に ³¹P のスピン-格子緩和時間を測定した。これについても一部は既に昨年報告した。図5に30%蔗糖存在下で、inversion recovery 法によって測定した λ ファージ内の DNA の T₁ の温度依存性を示す。0°C から 40°C の間で、約 2 sec から 3 sec まで変化する。温度上昇と共に T₁ は長くなるので T₁ を支配する運動は所謂 fast motional regime にあることがわかる。30%蔗糖存在下で、ファージ頭部から飛び出した DNA の T₁ は温度を上げると共に減少し、この場合の T₁ を支配する運動は slow motional regime に入っている。従って、ファージ頭部内に折りたた

引き起す。そこで、λ の溶媒中の蔗糖濃度を 0%, 30%, 60% と変化させてみた。0% ではファージ粒子の回転を抑制し為に pellet で測定した。30% と 60% ではほとんど変化が見られず、0% では異方性の著かな減少が見られた。このことは λ ファージ内での化学シフトの異方性の平均化には制限された角度内での速い運動が効いていることを示す。

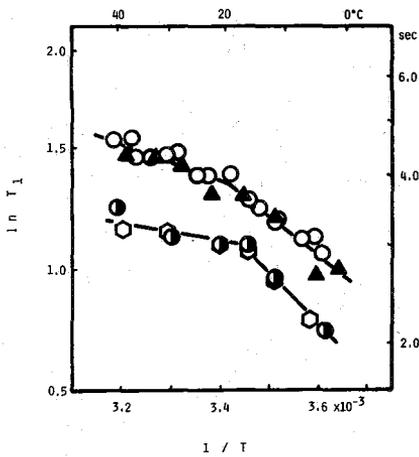


図5 T_1 の温度依存性

○, ●: 蔗糖 30% } 中の λ - Φ
 ○, ▲: " 0% }
 ▲ はクロスポーラーレシジョン法による

セーション法により三つの独立な T_1 測定を行なり。図5にプロットした。相関時間が fast motional regime にあることを反映して、粘度の減少と共に T_1 は大きくなっていく。傾きの変化は蔗糖30%の場合に較べて小さくなっているが、折れ曲り点は明らかに同じ温度領域にあって、同じ T_1 値の所にはない。従って、 T_1 の温度依存性の変化

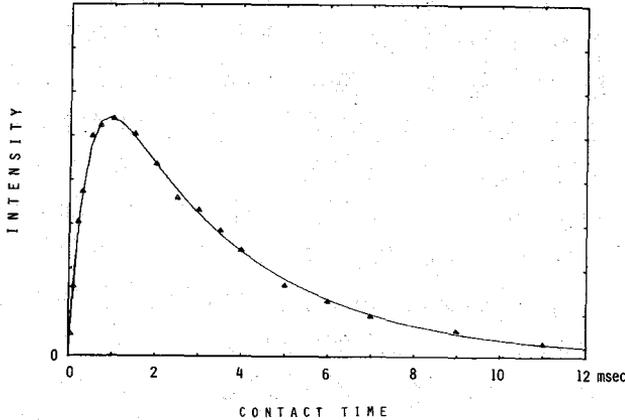


図6 λ - Φ のクロスポーラーレシジョンスペクトル強度の contact time 依存性

References.

- 1) D.J.Mackay and V.C.Bode, Virology, 72, 154-166(1976)
- 2) W.C.Earnshaw and S.C.Harrison, Nature, 268, 598-602(1977)
- 3) S.B.Hall and J.A.Schellman, Biopolymers, 21,2011-2031(1982)
- 4) I.Ashikawa, T.Furuno, K.Kinoshita, Jr., A.Ikegami, H.Takahashi and H. Akutsu, J. Biol. Chem., 259, 8338-8344(1984)
- 5) 阿久津秀雄, 藤倉武彦, 藤倉重博, 京都府立医科大学誌, 第21回NMR討論会要旨集 225-228 (1972)
- 6) 前田大輔, 寺尾武彦, 藤倉重博, 第18回NMR討論会要旨集 49-52 (1979)
- 7) H. Akutsu, H.Satake and R.M.Franklin, Biochemistry, 19, 5264-5270(1980)
- 8) S.C.Harrison, J. Mol. Biol., 171, 577-580(1983)

ま水たDNAの T_1 を支配する運動と free のDNAのそれとは明らかに異なっている。freeのDNAではDNA鎖の bending が効いていると考えられているが、頭部内ではDNA鎖の密な packing の為にはそれが抑えられ、制限された角度内での backbone の速い運動が効いているものと考えられる。

次に T_1 の温度依存性を見ると15~20°Cを境に高温側では変化が小さくなっている。これに関して前回は二つの可能性を示唆した。即ち、DNAの動的状態の変化と運動の異方性の為に T_1 が相関時間に対して二つの極小を持つ場合である。もし後者であれば溶媒の粘度を変えても同じ T_1 値の付近で折れ曲がりが見られる筈である。そこで、蔗糖0%について、inversion recovery 法、クロスポーラー

レシジョン法により三つの独立な T_1 測定を行なり。図5にプロットした。相関時間が fast motional regime にあることを反映して、粘度の減少と共に T_1 は大きくなっていく。傾きの変化は蔗糖30%の場合に較べて小さくなっているが、折れ曲り点は明らかに同じ温度領域にあって、同じ T_1 値の所にはない。従って、 T_1 の温度依存性の変化はDNAの重積の状態の変化を表わしているものと考えられる。

更に、遅い運動の情報を得る為に、図6のようにスペクトル強度の contact time 依存性を調べ、その curve fitting より交叉繪和時間 T_{HP} と Ψ の回転系におけるスピン格子-繪和時間 $T_{1\rho}$ を求めた。又、図2bの pulse sequence を用いて $T_{1\rho}$ を直接的に求め、検討を行なった。

(阪大蛋白研) 〇林 文晶 小林祐次 京極好正

CIDNP強度がタンパク質のアミノ酸残基の露出度と関係づけられて以来、光CIDNP法は、NMRによる構造解析に広く用いられるようになってきた。ところが、唯一X線解析の結果と一致しない例が、Kapteinらによって報告されている¹⁾。それによれば、リゾチームとインヒビターであるNAG(N-アセチルグルコサミン)の結合によってTrp 62は溶媒からしゃへいされる²⁾ことが知られているが、CIDNP強度は逆に増大する。今回我々はNAGおよび、より強いインヒビターである(NAG)₃が結合したリゾチームについて実験を行ないこの原因について検討した。

〈実験〉

測定は、日本電子GX-500Sを用いて行なった。これ以外の装置のset-upに関しては、昨年の本討論会と同様なので省略する。

測定条件: レーザパワーは1.1W(488nm single line), 交差緩和によるスペクトルの複雑化、CIDNP強度の変化を避けるために光照射時間は100msを用いた。pre-saturation pulseは、400msで等間隔に区切られた5個の90° pulseを含むパルス列を用いた。軽水中の測定は、time shared Redfield 214 パルス列を用いた。またこのときは、pre-saturation pulseは用いなかった。濃度は2mM, pD 4.5, 色素濃度0.2mM, 24°Cを用いた。

試料: リゾチームはSigmaより購入したものをpH 3で、アミコンで限外ろ過し精製したものをを用いた。またインヒビターとして用いたN-アセチルグルコサミンは半井化学より購入したものをを用いた。N-アセチルグルコサミントリマーは奈良女子大中沢博士、大阪大学池中研究室原助教授よりいただいたものをを用いた。

〈結果および考察〉

我々はNAGについて観測されたCIDNP強度の増大が、より強いインヒビターである(NAG)₃についても観測されるかどうか調べてみた。比較のために、リゾチーム、NAGの結合したリゾチームについても同様の実験を行なった。図1がそのスペクトルである。A、Bについては、Kapteinによって帰属が試みられており²⁾、CIDNPの大きい方がTrp 62、小さい方がTrp 129とされている。Cについては観測される残基はTrp 2個でA、Bと変わらないが、そのスペクトルは大きく変化する。とくに芳香族領域のパターン変化とC_α-Hの低磁場側のシグナルの増大は顕著である。この変化はKapteinの帰属が正しいとするとX線の露出度とCIDNPの強度にくい違いが生じ直観的には理解しにくいように思われる。そこで我々は、帰属の確認および複雑なTrpのシグナルの挙動をより簡単化するために、Trp環のN-Hプロトンに注目し、軽水中におけるCIDNPの実験を試みた。(図2)こ

はやしふみあき こばやしゆうじ きょうごくよしまさ

photo-CIDNP difference spectra
in D₂O

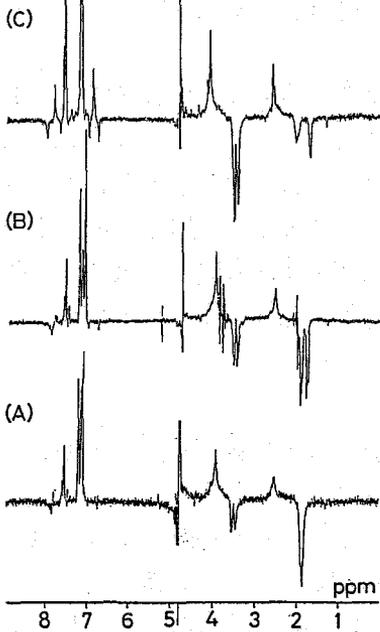


図1 重水中リゾチームCIDNP差スペクトル

A: インヒビターなし B: 64倍量 NAG
C: 2倍量(NAG)₃

photo-CIDNP difference spectra
in H₂O

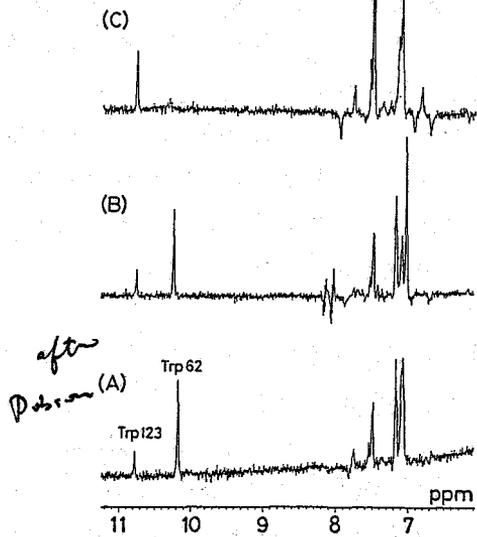


図2 軽水中リゾチームCIDNP差スペクトル

れによれば、A、Bでは Kaptain の帰属どおり CIDNP の大きい方が Trp 62、小さい方が Trp 123 であることがわかった。さらに C においては、Trp 123 のシグナルが A、B のものよりも 2 倍以上に増大し、一方 Trp 62 のシグナルは消失し、別の chemical shift にはほんのわずかなシグナルが 2 本観測された。これは (NAG)₃ の titration, および saturation transfer の実験より、(NAG)₃ の結合したリゾチームには 2 種のコンフォーマが存在し、この 2 本のわずかな CIDNP シグナルは、これらのコンフォーマーの中の Trp 62 に由来するシグナルであることがわかった。

次に inhibitor の titration に伴う CIDNP 強度変化を調べた。それをまとめたのが図 3 である。図からわかるように CIDNP 強度は NAG の結合したものでは Trp 62, Trp 123 のシフトとも一様に増大し、約 60 倍量のインヒビター存在時に飽和に達し、その強度は、もとのシグナルの約 1.5

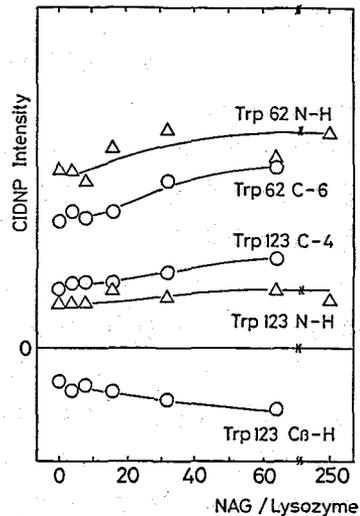


図3(a) NAG 添加に伴う
CIDNP 強度変化

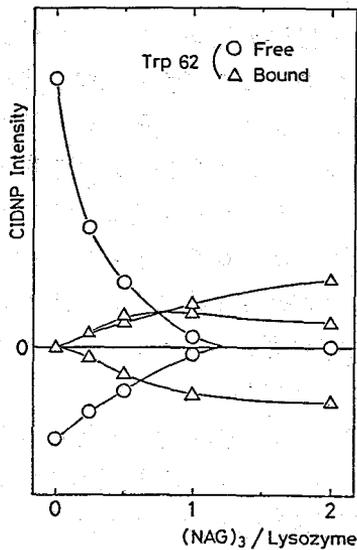
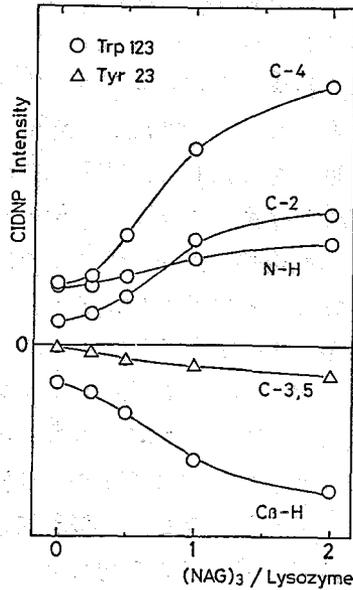


図 3 (b)



(c)

(b) (NAG)₃ 添加に伴うリゾチーム Trp62 の CIDNP 強度変化

(c) 同じく リゾチーム Trp123 Tyr 23 の CIDNP 強度変化

縦軸の 0 より上は正のシグナル 下は負のシグナルを表わす。

倍になっていることがわかった。一方 (NAG)₃ の結合の場合は、2種のコンフォーマーの存在の影響が大きく出る Trp 62 の場合は、その強度の比較は単純にはむずかしいが、その特徴としては、inhibiter が結合していないリゾチーム由来のシグナルは inhibiter とタンパク質のモル比がほぼ 1:1 のところで完全に消失し、inhibiter の結合したシグナルの CIDNP が増大してくる。一方 Trp 123 のシグナルは、inhibiter free と bound form のケミカルシフトが同じで、その CIDNP 強度は増大しモル比が約 1:2 の時に飽和に達しその強度は約 4 倍に達した。ここで注目すべきことは、free のシグナルが消失しても CIDNP 強度が増大していることであり、このことは、インヒビターがリゾチームに 1 個以上結合していることを示している。従って上で述べた (NAG)₃ が結合した 2 種のコンフォーマーはインヒビターが 1 個ついたものと 2 個ついたものであることがわかる。

CIDNP 強度増大の原因 我々は X 線による静的な構造より得られた露出度以外に CIDNP 強度に影響を与えると考えられる要素について実験を試みた。

構造に関する要因として考えられるのは、タンパク質の局所的なゆらぎの増加による溶媒への accessibility の増大である。これは Trp 環の N-H プロトンの HD 交換によって観測することができる。この結果を今問題になっている Trp 123 について解析したところ (NAG)₃ の結合に伴ってむしろ HD 交換速度は遅くなっており、この CIDNP 強度増大がゆらぎによる accessibility の増加によるのは難しい。

構造に関する要因以外の要素としては、タンパク質の残基とフラビンの相互作用による吸収波長、強度の変化によってもたらされるレーザ励起光の吸収効率の変化、および同じ原因によるフラビンの一重項状態の安定性の変化による三重項状態への項間交差の確率の

変化が考えられる。前者はフラビンの紫外・可視スペクトル、後者はフラビンの蛍光スペクトルにより観測することができる。

紫外・可視スペクトル測定の結果、少なくともレーザによる励起光近辺では、インヒビターの結合による変化はほとんどなく、(NAG)₃の結合した状態のものが少し吸収強度が減少していたのみであった。従ってこれはCIDNP強度増大にはほとんど関係しないであろう。一方蛍光スペクトル観測の結果、フラビンの蛍光はリゾチームの添加によって強く消光され、それがインヒビターの添加に伴なって少し回復しており、その程度はNAGよりも(NAG)₃の方が大きかった。これはインヒビターとリゾチームの結合によって、リゾチームの活性部位にあった4個のトリプトファンとフラビンとの接触が妨げられ、消光が回復したものと考えられる。これによって光反応に必要な三重項状態のフラビンの生成の効率が増大しCIDNP強度の増大がもたらされたと考えることができる。

CIDNP強度変化まとめ タンパク質などのCIDNP強度は、静的・動的な露出度という構造に関する要因以外に、色素であるフラビンの溶存状態すなわちアミノ酸残基とフラビンの相互作用に大きく影響される。従ってこの場合のCIDNP強度変化は、活性部位のTrp残基がインヒビターでしゃへいされたことによる効果がフラビンに伝達され、それが同じタンパク質の別の残基の強度の増大としてあらわれたことになる。

またこれと似た現象がTrp 62とTrp 63の間で観測された。X線解析の結果によれば、Trp 63はTrp 123とはほぼ同程度露出している。しかしながら、CIDNPが観測されたのは、Trp 123でTrp 63は全く観測できなかった。ところがTrp 62をKynurenineにmodifyしたリゾチームではTrp 123のシグナルとともに明瞭なTrp 63のシグナルが観測された。Kyn-リゾチームは活性があり構造は保たれているものと考えられる。これは次の様に考えれば説明できる。すなわち、Trp 62にもTrp 63にもフラビンは近づきうるが、CIDNPによる分極の生成に必要な拡散過程において、電子スピン相関を保ちうる距離内に複数個のCIDNP活性残基(芳香族残基)が存在する場合、より埋もれている残基とのスピン相関は最も露出度の高い残基によってこわされる。このことは次の2点から支持される。まず第1にKyn-リゾチームでもインヒビターによってCIDNPの増大がおこることである。これはTrp 62以外の活性部位のTrpの消光の効果がフラビンに及んでいることを示しており、すなわちフラビンはTrp 63などと相互作用していることを示している。第2に電子スピン相関を保ちうる距離は数Å程度と考えられており、Trp 62, 63はこの距離内にある。

この様に、タンパク質残基のCIDNP強度は、その色素であるフラビンへの影響を通じて互いに影響を及ぼし合っており、一概にその強度変化は露出度の変化と関係づけることが難しい場合もあることがわかった。

<文献>

- 1) R. Kaptein NMR Spectroscopy in Molecular Biology (Pullman, B, Ed.) P211 (1978)
- 2) R. Kaptein Biochemistry 22 1911-1917 (1983)

tRNAによるコドン認識の分子機構
 アンチコドン1字目の修飾ウリジンの役割
 東京大学理学部生物化学教室
 横山 茂之, 渡辺 達夫, 宮沢 辰雄

はじめに 遺伝コード(図1)は, 3つのヌクレオチドの配列(コドン)がアミノ酸を指定することによって成立っている。20種のアミノ酸の多くは, 複数のコドンによって指定される。メッセンジャーRNA(mRNA)におけるコドンの配列は, タンパク質合成過程において, アミノ酸配列へと翻訳される。この過程で, 転移RNA(tRNA)[図2]が重要な役割を果たす。tRNAは, それぞれ, 特定のアミノ酸に特異的であって, アミノアシルtRNA合成酵素により, 3'末端部分で(図2), アミノ酸とエステル結合する。そして, リボソームにおいて, アミノアシルtRNAは, アンチコドン部分で mRNAのコドンと3つの塩基対を形成することによって, コドンを認識する(図2)。アンチコドンの3字目および2字目は, Watson-Crick型のA・UあるいはG・C対によって, コドンの1字目および2字目を認識する。これにたいし, アンチコドン1字目とコドン3字目の塩基は, Watson-Crick型のみでなく, それ以外の型の塩基対もつくと考えられている。遺伝コードにおいては, 1字目と2字目は共通で, 3字目のみが異なるひと組みのコドンで指定されるアミノ酸が多い。non-Watson-Crick型の塩基対をも形成することによって, ひとつのtRNA分子種で, 複数のコドンを認識することができるので, タンパク質を効率よく合成できることになる。

CrickのWobble仮説によると, アンチコドン1字目の塩基は, Watson-Crick型の塩基対をつくるときの位置からずれることによって, non-Watson-Crick型の塩基対をつくりうる。図3に, アンチコドン1字目のウリジン(U)による, 4種の塩基対を示す。しかし実際には, アンチコドン1字目のウリジンは, ほとんど例外なく, 転写後修飾

UUU Phe UUC --- UUA Leu UUG ---	UCU Ser UCC --- UCA --- UCG ---	UAU Tyr UAC --- UAA term UAG ---	UGU Cys UGC --- UGA term UGG Trp
CUU Leu CUC --- CUA --- CUG ---	CCU Pro CCC --- CCA --- CCG ---	CAU His CAC --- CAA Gln CAG ---	CGU Arg CGC --- CGA --- CGG ---
AUU Ile AUC --- AUA --- AUG Met	ACU Thr ACC --- ACA --- ACG ---	AAU Asn AAC --- AAA Lys AAG ---	AGU Ser AGC --- AGA --- AGG Arg
GUU Val GUC --- GUA --- GUG ---	GCU Ala GCC --- GCA --- GCG ---	GAU Asp GAC --- GAA Glu GAG ---	GGU Gly GGC --- GGA --- GGG ---

図1. 遺伝コード

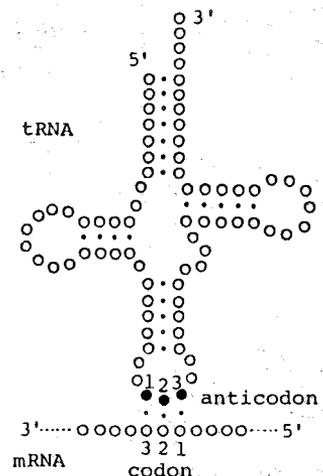


図2. tRNA

よこやま しげゆき, わたなべ たつお, みやざわ たつお

を受ける。そのような転写後修飾は、tRNAの特色のひとつである。DNAから転写されてできた新生tRNAに、一連の酵素が作用して、特定の位置の残基を修飾するのである。どの生物種においても、Gln, Lys, Gluに特異的なtRNAには、5-メチル-2-チオウリジン誘導体 (xm^5s^2U)、Val, Ser, Thrなどに特異的なtRNAには、5-ヒドロキシウリジン誘導体 (xo^5U)が見いだされている(図4)。本研究においては、アンチコドン1字目のウリジンについての2種の転写後修飾(図4)によって、アンチコドン部分の「Flexibility/Rigidity」が制御され、タンパク質の生合成が、効率よく、かつ誤りなく行なわれるという基本的な分子機構を明らかにした。

1H -NMRによる修飾ウリジンヌクレオチドのコンホメーション解析 ゆれゆれは、

NMRスペクトルの解析によって、水溶液におけるヌクレオチドのコンホメーションを研究してきた。とくに、ランタニドプローブ法を完成することによって、ヌクレオチドにおける局所コンホメーション間の近距離相互依存性を定量的に解析することに成功した。ヌクレオチド単位よりなる核酸の特長として、近距離相互依存性(ある結合のまわりの回転異性が、立体障害などによって、隣接する結合のまわりの回転異性に影響を及ぼすこと)は、核酸の動的構造特性を支配している。そのような近距離相互作用のあるヌクレオチド—リン酸部分についての詳細なコンホメーション解析にもとづいて、tRNAの動的構造特性を論じることができる。

第2に、本研究においては、tRNAの転写後修飾に着目し、修飾ヌクレオチドのコンホメーション特性を、修飾されていないヌクレオチドの特性と比較し、その「差」を抽出することにより、修飾の生物学的意義との関連を考察する。tRNAのアンチコドンについて、修飾によってもたらされる動的構造特性の「差」は近距離相互作用(立体障害など)によるものである。そして、その相互作用の程度は、塩基のスタッキングおよび氷素結合と比べても十分に強いものであるので、リボソームにおけるコドンと

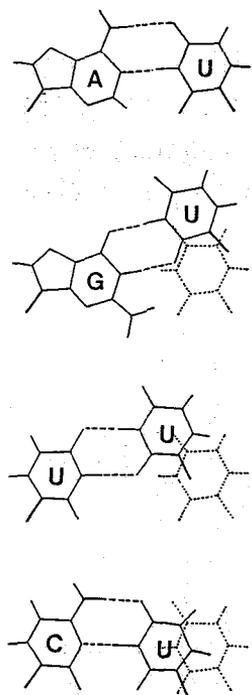


図3. アンチコドン1字目のUのつくる塩基対

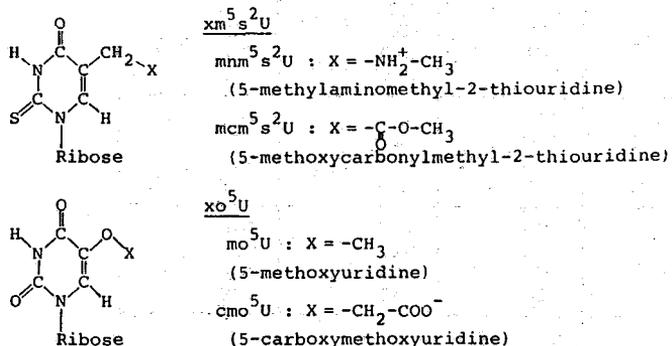


図4. アンチコドン1字目の修飾ウリジン

アンチコドンの相互認識において、ほぼそのまま、修飾による「差」として保たれると考えられる。そのような変化は、まさに、生物学的な役割をはたすために導入されるものなのである。修飾による「差」を取り扱っているかぎりでは、リボソームの作用のように、ヌクレオシドの種類によらないで共通にはたらく要因は、関与しない。

本研究においては、アンチコドン1字目に見いだされる修飾ウリジン(図4)について、プロトンNMRにより、コンホメーション特性を解析した。すでに述べたように、重要な近距離相互作用のあるモデルとして、ヌクレオシド 5'-モリリン酸をとりあげた。スピン結合定数、核オーバーハウザー効果、縦緩和速度のデータより、局所コンホメーション平衡(図5)についての異性体存在率を得た(表1)。

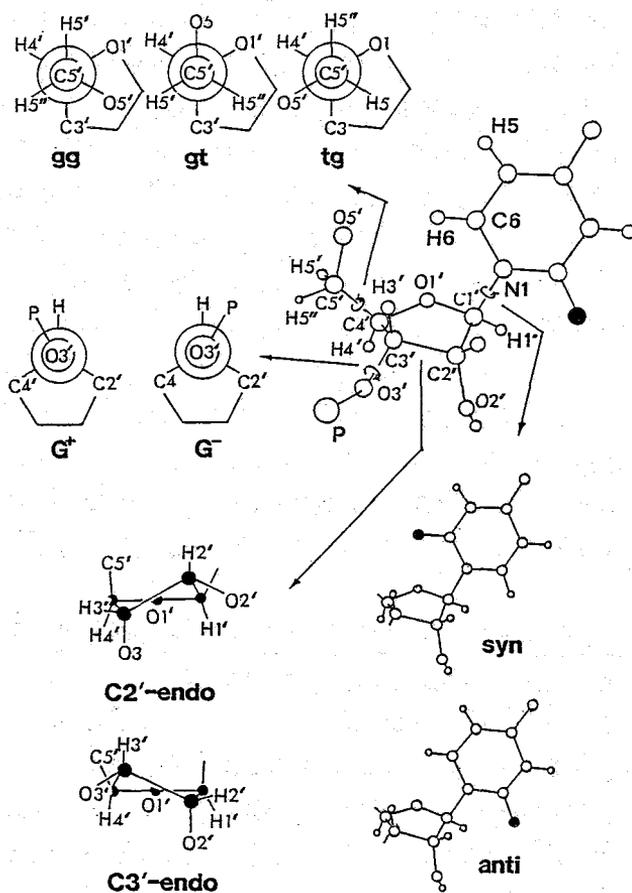


図5. ウリジン残基の局所コンホメーション

表1. 23°Cにおける局所コンホメーションの存在率(%)およびC2'-endo形とC3'-endo形のエンタルピー差とエントロピー差

		pU	pmnm ⁵ s ² U	pnc ⁵ U
C1'-N1 bond	<u>syn</u>	11(8)	4(4)	11(2)
	<u>anti</u>	89(8)	96(4)	89(2)
C5'-C4' bond	gg	89	100	91
	gt	8	0	7
	tg	3	0	2
Ribose ring	C2'-endo	47	22	65
	C3'-endo	53	78	35
	ΔH	0.09(0.02)	1.10(0.05)	-0.72(0.02)
	ΔS	0.69(0.07)	1.27(0.17)	-1.27(0.07)

かっこ内は
標準偏差

修飾ヌクレオチド, $pmnm^5s^2U$ および pmo^5U のリボース環のバックリング平衡は、修飾されていない pU のバックリング平衡と大きく異なっていることが明らかになった (表1)。すなわち, pU においては, $C2'-endo$ 形と $C3'-endo$ 形のエンタルピー差 (ΔH) は、わずか 0.09 kcal/mol であって、これらの2種の異性体は、ほぼ等しく安定である。しかし、ウリジンの2位のカルボニル酸素原子がイオウ原子で置換され、さらに、5位に長い側鎖をもつ $pmnm^5s^2U$ では、 $C3'-endo$ 形のほうが、 $C2'-endo$ 形よりも 1.10 kcal/mol 安定である。これにたいし、ウリジンの5位にメキシコ側鎖をもつ pmo^5U においては、 $C2'-endo$ 形のほうが、 $C3'-endo$ 形よりも 0.72 kcal/mol 安定になっている。この傾向は、 $pmnm^5s^2U$ を含む pxm^5s^2U のグループおよび pmo^5U を含む pxo^5U のグループ (図4) のそれぞれのなかで、共通に認められる。また、さまざまなヌクレオチドおよびヌクレオチドのアナログのコンホメーション特性との比較によって、 pxm^5s^2U における $C3'-endo$ 形の安定化、 pxo^5U における $C2'-endo$ 形の安定化の要因も明らかになった。

アンチコドン1字目のウリジンの転写後修飾の役割— コドン認識の分子機構

xO^5U われわれは、局所コンホメーション向の近距離相互依存性にもとづいて、アンチコドン1字目の xO^5U が、コドン3字目の A, G, U を認識するときのコンホメーションを見出した。A を認識するときは、 $C3'-endo - G^-$ 形であるが、U を認識するときは、 $C2'-endo - G^+$ 形である (図6)。 $C2'-endo$ 形になると、コドン3字目として G も認識できる。 xO^5U 自身の $C2'-endo$ 安定性のため、アンチコドン部分は、より「flexible」になり、non-Watson-Crick型のコドン認識ができる。このために、 xO^5U をもつて RNA は、4つのコドンに対応するアミノ酸 (Val など) への翻訳効率よく行なえる。 xm^5s^2U この修飾ウリジン自身の $C3'-endo$ 安定性のため、アンチコドン部分は、より「rigid」になり、Aのみを認識する。Gln, Lys, Glu に特異的な tRNA のアンチコドン1字目のウリジンは、 xm^5s^2U に修飾されることにより、His, Asn, Asp のコドンを誤って認識しないように保証される。

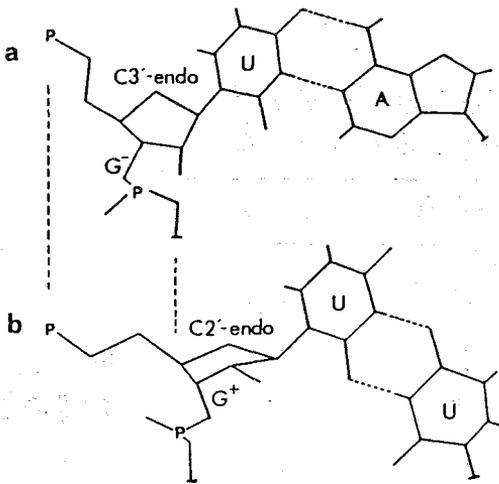


図6. アンチコドン1字目の修飾ウリジンと A (a) および U (b) との塩基対

謝辞 Bruker WM-400型 NMR 分光計の使用についてご協力下さった日本ブルカー (株) にたいして、謝意を表する。

京大理、生理研*、都立大理**、味の素中研***、阪大蛋白研****

○井上智子、赤坂一之、巨弘*、阿部公恵**、甲斐荘正恒**、辻尚志***、京極好正****

[序] *Streptomyces*

subtilisin inhibitor (SSI) は、2個の等価なサブユニットより構成されている、分子量23000の球状タンパク質である。各々のサブユニットは223個のアミノ酸残基から成り、そのうち芳香族アミノ酸はTyr 3個、Phe 3個、His 2個、Trp 1個の計9個である。このSSIの¹H-NMRスペクトルは、芳香族領域においても重なりが大きく、通常の線形解析を行うことが非常に困難なばかりでなく、緩和機構が複雑な為に

プロトン緩和から有効な情報をとり出すことができない。そこで、今回はこれらの芳香族アミノ酸の環プロトンを選択的に重水素化したSSIを用いて、特に3個のTyr残基の存在状態について研究した。まず、(i) 単純化されたTyrの環プロトンのスペクトルを利用して、 $C_{\beta}-C_{\gamma}$ 軸まわりの回転について調べた。次に、(ii) T_2 に対する重水素化効果(以下、“ T_2 -DESERT”と称する)を測定して、 $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 軸まわりの運動等を検出する新しい方法を考察し、これを3個のTyrに適用した。さらに、(iii) Tyr環と隣接残基との磁気的相互作用を通じて残基間相互作用について調べた。

これらの結果を、今まで得られた溶液中での情報及び結晶中でのマイクロ環境と対比して考察する。

[実験] 重水素ラベルしたSSIの調製 環プロトンを重水素ラベルした芳香族アミノ酸を含むアミノ酸培地中で、*Streptomyces albogriseolus* S-3253 を培養した後、培養上澄液をDEAE-セルロース、Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー等を用

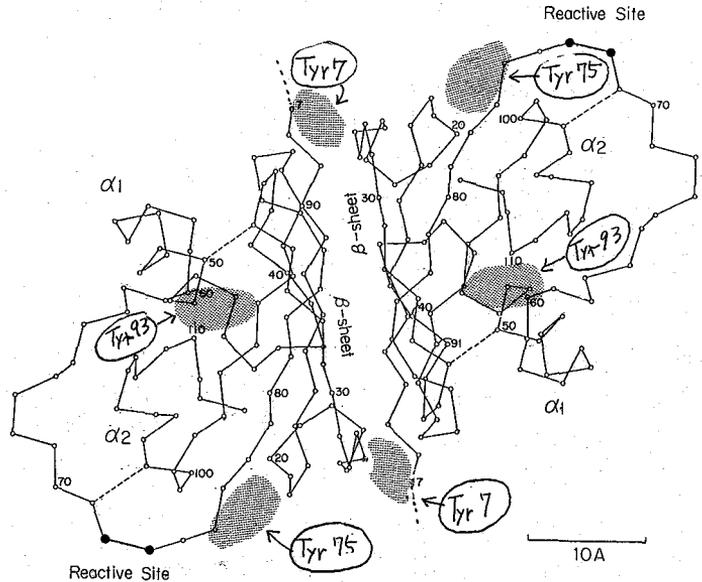


図1. SSIダイマーの立体構造 (i) 及び 3個のTyr残基の位置

いのがとも、あかさかすゆき、わたりひろし、あべきみえ、かいのいよまつね、つじたかし、きょうじいまさ

いて精製することによって、
 数種の重水素ラベルSSI
 を得た。例として、Phe-Trp
 及び Tyr の 2,6 位を重水素
 ラベルした SSI の ^1H NMR
 スペクトルを図 2 に示す。

^1H NMR の測定

^1H NMR は、Bruker WM-
 360wb (生理研)、日本電
 子 GX-500 (阪大蛋白研)
 日本電子 GX-400 (京大理)
 を用いて測定した。測定試
 料の SSI 濃度は 10 mg/ml、
 緩衝液は pH 7.0、0.1 M

リン酸、0.1 M NaCl の
 重水緩衝液を使用した。化

学シフトの内部標準には TSP を用いた。 T_2 測定には CPMG 法を用い、選択励起に
 よる T_1 測定には Decoupler channel を利用した Inversion Recovery 法を採用した。

[T_2 -DESERT 法を用いた Tyr 環の回転相関時間 τ_c の決定法]

SSI では顕著なスピン拡散の為に、通常の T_1 測定からは定
 量的な局所情報は得られない。⁽²⁾ そこで、CPMG 法により測
 定した T_2 について、以下に述べる選択的軽水素化効果 (DESERT)
 を調べる方法⁽³⁾⁽⁴⁾ を採用した。

例として Tyr の 3,5 位のプロトンの緩和について考える。

Native SSI の場合 (即ち、右図で X = H の場合) には、
 隣りの 2,6 位のプロトンとの相互作用、及び残基間の相互作用

が緩和に有効である (①式)。一方、2,6 位を ^2D でラベルした SSI の場合には、前者が
 ほとんど無視できる程度になり、後者が主たる緩和機構となる (②式)。

$$T_2^{-1}(X = ^1\text{H}) = T_2^{-1}(\text{ring}) + T_2^{-1}(\text{inter-residue}) \quad \dots \text{①}$$

$$T_2^{-1}(X = ^2\text{D}) = 0.06 \times T_2^{-1}(\text{ring}) + T_2^{-1}(\text{inter-residue}) \quad \dots \text{②}$$

従って①式から②式を差し引くと、

$$\Delta T_2^{-1} = T_2^{-1}(X = ^1\text{H}) - T_2^{-1}(X = ^2\text{D})$$

$$= T_2^{-1}(\text{ring}) \times 0.94$$

$$= (9/20) (\gamma_{\text{H}}^4 \hbar^2 / r_{\text{HX}}^6) \tau_c \times 0.94 \quad (\omega^2 \tau_c^2 \gg 1) \quad \dots \text{③}$$

但し、運動は等方回転を仮定した。 r_{HX} については、L-Tyrosine の中性子線回折の結果
 から、2.4706 Å という値が得られている⁽⁵⁾ ので、これを③式に代入すると、結局では

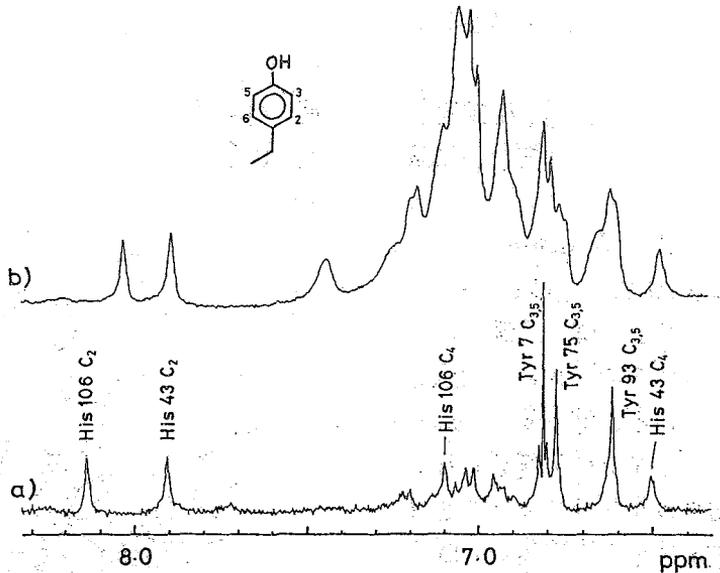
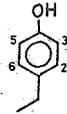


図 2. SSI の ^1H NMR スペクトル (芳香族領域)

a) SSI-Phe, Trp, Tyr_{2,6}-d b) Native SSI
 共に 360 MHz, 50°C

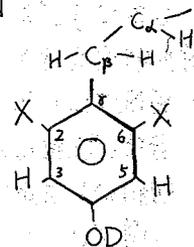


図 3 Tyrosine 残基

④式で表わされる。

$$\tau_c = 0.944 \times 10^{-9} \times (\Delta T_2^{-1}) \quad \text{④}$$

τ_c はベクトル \vec{r}_{fix} の回転相関時間であって、これには $C_\beta - C_\gamma$ 軸まわりの回転は寄与しない。 τ_c に寄与するのは、タンパク質分子全体の回転運動の他、内部運動として $C_\alpha - C_\beta$ 軸まわりの回転およびその先の主鎖のゆらぎ (ψ, ϕ 角のゆらぎ) である。

[結果]

線形の温度依存性

SSI-Phe, Trp, Tyr_{2,6}-d

(図4) 及び SSI-Phe, Trp

Tyr_{3,5}-d について

~0°C まで温度を下げて測定を行ったが、それぞれの Tyr について各一本の吸収線しか観測されなかった。このことは3個の Tyr ring がいずれも、3位と5位の

プロトン間及び2位の

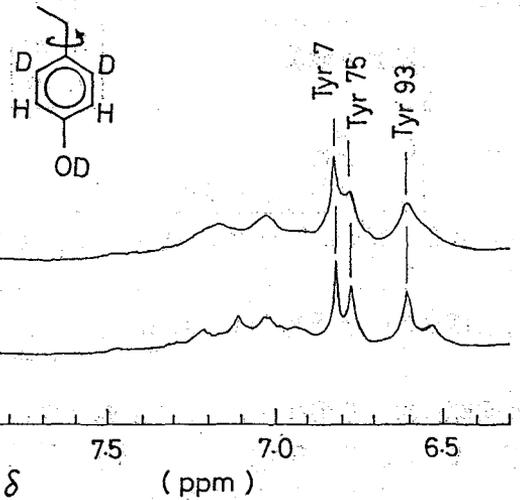
6位のプロトン間のシフト差に比べて十分速い速度 (遅くとも 10^2 sec^{-1} 程度以上であろう) で 180° flip していることを示すものである。

T₂ 測定と T₂-DESERT 法の適用

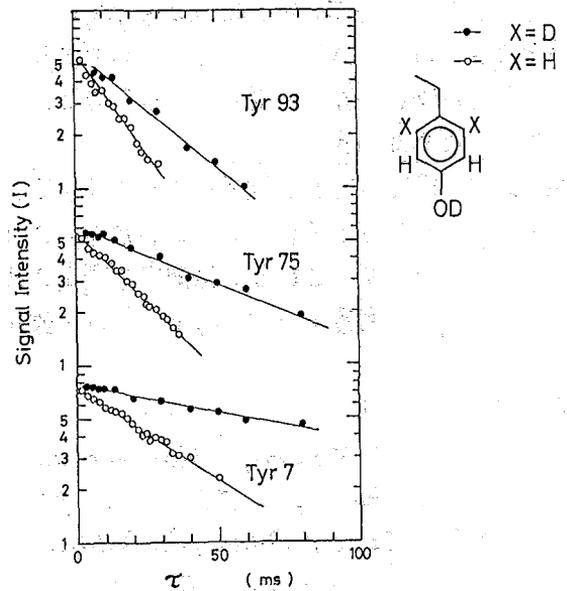
25°C における T₂ 測定の結果を図5に示す。3個の Tyr のいずれにおいても、2,6位が 1H の場合と 2D の場合とでは、3,5位のプロトンの T₂ に著しい差が見られる。計算により得られた T₂ と ΔT_2^{-1} 及び④式を用いて得られる τ_c の値を表1. にまとめた。

選択的 T₁ SSI-Phe, Trp, Tyr_{2,6}-d

について、芳香族領域のシグナルのみを選択的に反転させて、Tyr の 3,5位プロトンの T₁ を測定した。その結果、25°C, pH7.0



↑ 図4. SSI-Phe, Trp, Tyr_{2,6}-d の ¹H NMR スペクトル (500 MHz)



↑ 図5. CPMG法により測定された横磁化の減衰 (25°C, pH7.0)

では Tyr 7 で 0.82 sec, Tyr 75 で 0.39 sec, Tyr 93 で 0.25 sec という値が得られた。

表1. Tyr 3.5位プロトンの T_2 と T_2 -DESERT法の適用により得た τ_c (25°C, pH 7.0)

	T_2 (msec)		ΔT_2^{-1} (s ⁻¹)	τ_c (10 ⁻⁹ s)
	2.6位 ^o ¹ H	2.6位 ^o ² D		
Tyr 7	47	83	9.2	8.7
Tyr 75	30	52	14.0	13.0
Tyr 93	18	38	29.0	27.0

[考察] 3個の Tyr ring (Tyr 7, 75, 93) について得られた以上の結果について考察する。

(i) C_β - C_r 軸まわりの

回転 (180° flip) について

線形の温度依存性からは3個の Tyr ring がいずれも $\sim 10^2 \text{sec}^{-1}$ 以上で 180° flip しているであろうという推測が得られた。結晶構造で考えると、Tyr 7 及び Tyr 75 はかなり露出しており、180° flip に際しての立体的な障壁は小さいと予想され、上の結果は一応妥当なものであると言えよう。しかし一方、Tyr 93 についてはその周辺環境はかなり密であり、結晶構造を維持したままでは ring の回転は起こり得ない。この Tyr 93 についても ring の flip が起こっているということは、従って、それを可能にする様な、周囲の原子団の協調的な運動が β 構造の中に存在していることを意味している。

(ii) (i) 以外の内部運動について (C_α - C_β 軸まわりの回転や主鎖のゆらぎ)

T_2 -DESERT から得られた 25°C での τ_c は 3個の Tyr 間で非常に異なる。このことは少なくとも Tyr 7, Tyr 75 には ring flip 以外の内部運動が存在することを示している。特に Tyr 7 の τ_c が短いことは明白であり、この内部運動には露出した N 末端 7 残基の主鎖自体の速い運動⁽²⁾ の寄与があるものと考えられる。

(iii) 残基間相互作用

T_2 又は 選択的 T_1 を比較することによって、残基間相互作用の大きさは Tyr 93 > Tyr 75 > Tyr 7 の順になっていることがわかる。これは X 線から得られる結果 (93 > 7 > 75)⁽¹⁾ とは異っているが、これまで溶液中で測定された化学修飾のされ易さや、¹H NMR から得られた Tyr 水酸基の pKa 値と⁽⁶⁾ 良好一致を示す。

[References]

- (1) Y. Mitsui, Y. Satow, Y. Watanabe and Y. Iitaka, J. Mol. Biol. 131, 697 (79)
- (2) K. Akasaka, J. Mag. Res. 51, 14 (83)
- (3) R. Cassels, C.M. Dobson, F.M. Paulsen, R.G. Ratcliffe and R.J.P. Williams, J. Mag. Res. 37, 114
- (4) K. Akasaka, T. Imoto, S. Shibata and H. Hatano, J. Mag. Res. 18, 328 (1975) ⁽¹⁹⁸⁰⁾
- (5) M.N. Frey, T.F. Koetzle, M.S. Lehmann and W.C. Hamilton, J.C.P. 58, 2547 (1973)
- (6) S. Fujii, K. Akasaka and H. Hatano, Biochemistry 20, 518 (1981)

Stable Isotopes : Production and topical applications
in NMR fields

JEAN ROZENBERG

Head Bureau des Isotopes Stable at CEA/ORIS

(CEA: フランス原子力庁)

Stable isotopes are widely used in scientific research, in industry and in the biomedical field.

As tracer atoms, they are often an advantageous alternative route to radioactive elements, without noxious effect and needs of radioprotection.

Moreover, as for nitrogen and oxygen, they are unique as tracers.

As specific products, they are made on an industrial scale. For instance, D_2O to be used in heavy water reactors, deuterium gas in fusion machines, helium 3 in neutron detectors or for very low temperature devices, lithium 6 for tritium production, lithium 7 at the contrary to lower tritium content in pressurized water reactors, etc....

CURRENT STATUS OF SEPARATION METHODS

Heavy water is mainly prepared by chemical exchange process: water/ H_2S or hydrogen/ammonia. Deuterium gas is recovered from D_2O electrolysis.

Radioactive decay of tritium leads to stable Helium-3 atom.

Most of carbon 13 is obtained by cryogenic distillation of carbon monoxide.

Nitrogen 15, oxygen 17 and 18 are separated when using cryogenic distillation of nitric oxide. For oxygen isotope, water distillation and counter current distillation of heavy water are alternative methods.

Gas phase thermal diffusion is the main process to produce enriched noble gases.

Most of the other stable isotopes, particularly enriched metals, may be produced from electromagnetic separator. In such machines, capital and energy costs are high and production rates low.

STABLE ISOTOPE COMMERCIAL MARKET

Deuterium, in the form of D_2O , D_2 , D-solvents or D-labelled molecules is number one of commercialized stable isotopes. Since it is a strategic material who needs a government approval for export, annual market is unknown but it might be in the order of hundreds of millions U.S. dollars.

With sales of tens of millions U.S. dollars, lithium isotopes and helium-3 come after, these isotopes are also considered as strategic material by some governments and need licence approval.

Separated metal isotopes and nitrogen 15 are marketed in a range of few millions U.S. dollars.

Under one million U.S. dollar, the estimate for annual sales of noble gases, oxygen istopes and carbon 13.

APPLICATION TO NMR

Separated stable isotopes are also important to nuclear magnetic resonance spectrometry.

$^1\text{H}(1/2)$, $^2\text{H}(1)$, $^{13}\text{C}(1/2)$, $^{14}\text{N}(1)$, $^{15}\text{N}(1/2)$, and $^{17}\text{O}(5/2)$ all have non-zero nuclear spins and can, therefore, be detected by NMR spectroscopy. The overwhelming majority of the studies employing NMR have involved proton and ^{13}C .

Increased sophistication in signal averaging, as well as probe frequency, sample size, and magnet size have made metal ion NMR studies feasible for elements throughout the periodic table.

Of particular interest are ^{53}Cr , ^{57}Fe , ^{61}Ni , ^{105}Pd , ^{123}Te , ^{135}Ba , ^{183}W and ^{191}Ir .

Some examples of application will be given.

第 4 日

11 月 29 日 (木)

1000

1000

北大理 °伊倉光考、引地邦男

(序) $^1\text{H-NMR}$ を用いる蛋白質の構造解析は、二次元NMRによって飛躍的な進歩を遂げた。WüthrichらをはじめてBPTIに適用した二次元相関法(COSY、SECSY)と二次元NOE法(NOESY)によるスペクトルの解析手順は、基本的にはいかなる蛋白質においても有効である。¹しかし、彼らの用いた蛋白質は、分子量が小さい割に(MW. 6900) S-S結合の多い硬い構造をもつ特殊な蛋白質であった。X線による結晶構造もわかっていて、生体系で機能する蛋白質は、一般に分子量が1万以上で、S-S結合も少なく構造が柔かい。分子量の増加は指数関数的にスペクトルを複雑にし、構造の柔軟性は二次のシフトを小さくするので共鳴線同志を重複させる。したがって、機能性蛋白質の場合には、小さくて硬い蛋白質で成功した解析法だけでは限界が生じた。Ernstらによって報告された二次元Relayed Coherence Transfer (RCT)法²や、我々の開発した二次元Double-Quantum Coherence Echo Correlated Spectroscopy (DECSY)³は、“共鳴線の重複”問題に対して有効であり、蛋白質への応用が期待される。

細胞内で Ca^{2+} の情報を酵素に伝える働きをする Ca^{2+} レセプターは、4つの Ca^{2+} 結合部位をもつ分子量16700(148残基)のCysを含まない一本鎖の蛋白質で、カルモデュリンとよぶ。カルモデュリンの結晶構造は報告されていないが、数多くの研究から、N末端側の2つの Ca^{2+} 結合部位(IとII)をもつ安定なドメインとC末端側の2つの Ca^{2+} 結合部位(IIIとIV)をもつ安定なドメインからなる。⁴この2つのドメインは、トリプシン分解によって、安定な2つのフラグメントF12(1-75残基)とF34(78-148残基)として得られる。今回、我々は、COSY、NOESY、さらにRCT、DECSYを含めた4つの二次元の手法を用いて、分子量8300と8100の比較的柔かい構造をもつポリペプチドF12とF34についてスペクトル解析を試みたので報告する。

(実験) カルモデュリンとトリプシン分解フラグメントF12とF34は、文献5に従って得た。測定はJEOL GX-500で行った。二次元スペクトルは、F1軸4000~5500 Hz/256ポイント、F2軸4000~5500 Hz/2Kポイントで測定し、zero fillingによって1K×2Kのmatrixにした。window関数はsinebellを用いた。二次元スペクトルは絶対値表示で示す。パルス系列は文献1-3,6によった。蛋白質濃度6mM, KCl 0.2M, pH 5.5-8.5, 30-40°Cで測定した。水のピークはgate decoupleで消した。DECSYの測定には、45° phase shifterを用いた。二次元スペクトルは、すべて両軸共Quadrature detectionを行い、N-type selectionである。

いくら みつひこ、ひきち くに お

(結果と考察) <一次元スペクトルの特徴>

図1にF34の90% H₂O中での一次元スペクトルを示す。0 ppm附近の分離した数本のシグナルは、リングカレントシフトをうけるメチルプロトンによるもので、高次構造の存在を示す。ほぼ7 ppmより低磁場には、主鎖のアミドプロトンのシグナルが複雑に重なっている。これらのアミドプロトンのシグナルは、D₂O中ではほとんど観測されない。このことは、主鎖のアミドプロトンと水との化学交換が非常に速く、構造が柔軟であることを示している。

<二次元NMRによる解析>

一般に、ポリペプチド(蛋白質)の個々のアミノ酸残基は、1つの閉じたスピン系を与える(ただし、芳香族アミノ酸は2つ)。したがって、スペクトル解析の第一段階は、20種類のアミノ酸について(実際には、F12で16、F34では19種類)蛋白質に含まれる数だけスピン系を個々に決めることにある。ここでは、主にCOSY、RCT、DECSYが役に立つ。第二段階は、それらの閉じたスピン系を一次構造を参考にしていかにつなぐかであり、NOESYが強力な武器となる。こうして、ある共鳴線を特定のアミノ酸残基の特定のプロトンに帰属する。

I) アミノ酸の種類への帰属 (D₂O中)

Gly Glyは非等価な2つのαプロトンによって、D₂O中では簡単なAXスピン系を与える。これらは、COSYの交差ピークの特徴的な微細構造によって比較的容易に見い出せる。また、H₂O中のCOSYでは、主鎖のNHプロトンとα-CH₂プロトンの交差ピークが2個存在するので、Glyの帰属に有効であった。この方法で、F12では5個、F34では4個のGlyを帰属した。

Ala, Thr AlaとThrは4 ppm附近のCHプロトンが非比較的遠い1 ppm附近のCH₃プロトンと直接スピン結合するので、他のアミノ酸とは区別しやすい。しかし、分子量が大きくなると交差ピークの数も増すので、この区別も難しくなる。DECSYの"磁氣的等価"を示す交差ピークは、CHプロトンの相手がCH₃プロトンであることを確かめるのに有効であった。AlaとThrの区別はRCTで行った。Alaのスピン系はA₃X、ThrはA₃MXと異なるのでCOSYで決まりそうだが、ピークの重複によってThrのA₃M部分とMX部分を一義的に結ぶことが難しくなる。RCTはA₃とXの間に交差ピークを与えるので、この問題を解決する。この方法で、F12のAla 5個、Thr 8個、F34のAla 5個、Thr 4個が帰属された。

Val, Ile, Leu これらは、いずれも2つのメチルをもつので特徴的なスピン系を与える。-CH-CH₃部分の帰属はCOSYの交差ピークの微細構造によった。主鎖のα-CHプロトンの帰属は、NOESYのα-CHプロトンとCH₃プロトンとのNOE交差ピークを決め手とした。RCTとDECSYは、-CH-CH₃部分とC^αH-C^βH (Val, Ile)もしくはC^αH-C^βH₂ (Leu)部分を連結するのに利用できる場合もあった。この方法で、F12ではVal 2個、Ile 1個、Leu 1個、F34では、Val 5個、Ile 2個、Leu 2個を帰属した。

Phe, Tyr, His 芳香族アミノ酸は、7 ppm附近のリングプロトンのスピン系とC^αH-C^βH₂

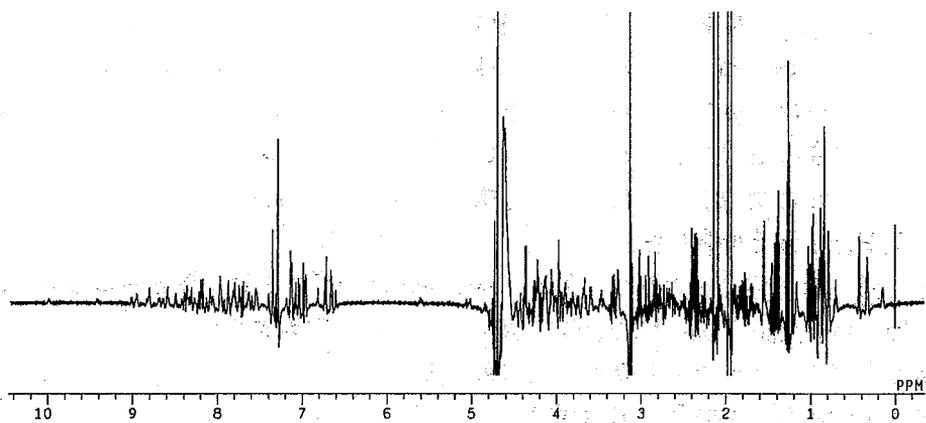


Fig. 1 1D spectrum of calmodulin fragment F34 in 90 % H₂O at pH 5.6 and at 30°C.

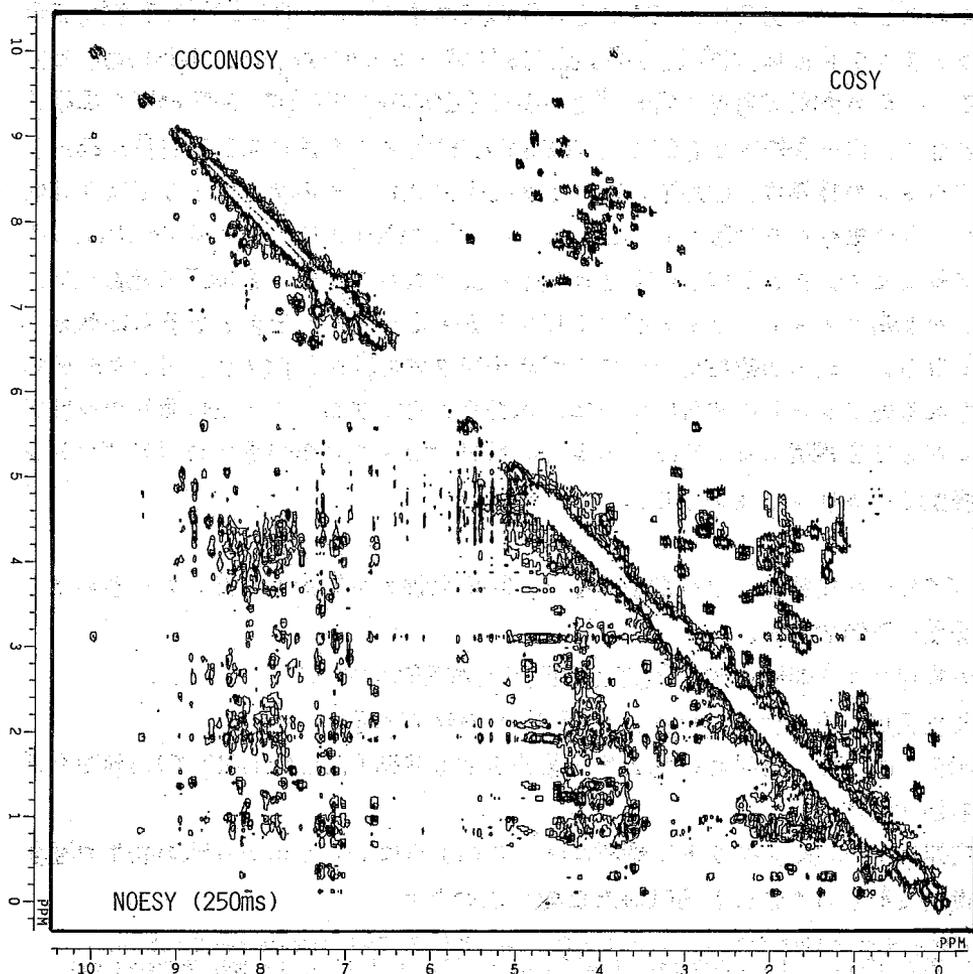


Fig. 2 2D COCONOSY spectrum of F34 in 90 % H₂O at pH 5.6 and 30°C.

のAMX スピン系が独立に存在する。芳香環領域は、類似したスピン系が複雑に重なるが DECSY の "remote connectivity"³ を利用してほぼ完全に帰属した。AMX スピン系は COSY で容易に見い出せるが、他の AMX 系 (Asp, Asn, Ser) とは区別できない。しかし、NOESY によってリングの δ プロトンと $C^{\alpha}H-C^{\beta}H_2$ プロトンの間に NOE の交差ピークが観測されたので決定できた。この方法で、F12 では Phe 5 個、F34 では Phe 4 個、Tyr 1 個、His 1 個を帰属した。

その他のアミノ酸 上で述べたように、Asp, Asn, Ser は同類のスピン系を与えるので、特定するのは難しい。Glu, Gln, Met, Pro, Arg, Lys は、側鎖が長くなるのに比例してスピン系が著しく複雑になるので帰属が困難であった。

II) 特定のアミノ酸残基への帰属 (H₂O 中)

一次構造上1つしかないアミノ酸 (His-107, Tyr-138 など) は、スピン系がわかれば同時に特定の残基への帰属が完了するが、複数個ある場合には、個々のスピン系が決っても何番目の残基かはわからない。図2に、F34 の COSY (右上半分) と NOESY (左下半分) を示す。この2つのスペクトルは、 $90^{\circ}-t_1-90^{\circ}-Acq.$ (for COSY) - Δ - $90^{\circ}-Acq.$ (for NOESY) のパルス系列を用いて、一度の測定で同時に得た。⁶ この手法 (COCONOSY) は、測定時間を短縮できるばかりでなく、同一条件下で COSY と NOESY を測定できる点に大きな利点がある。主鎖の NH プロトンの帰属は、COSY において α -CH プロトンとの交差ピークで決まるが、いくつかはピークの重複のため難しい。これには、RCT の NH プロトンと β -CH プロトンの交差ピークが役に立つ。たとえば、F34 では Val と Ile の NH プロトンを RCT で帰属した。NH プロトンの帰属によって、アミノ酸のスピン系を特定の残基に帰属できる可能性がきわめて大きくなる。これらの詳細については現在検討中であるが、F12 と F34 にそれぞれ存在するとされる逆 β シートの部分について、 n 番目の CH プロトンと $n+1$ 番目の NH プロトンの間に NOE を確認した。また、 n 番目の NH プロトンと $n+1$ 番目の NH プロトンの NOE が観測されるケースもあった。

(結論) 1. COSY の交差ピークの微細構造は、各共鳴線の多重度を繁栄しているので、スピン系の帰属に有効である。

2. 共鳴線の重複による問題には、RCT と DECSY が有効である。

3. 分断されたスピン系をつなぐには、NOESY が有効である。

4. COCONOSY は、測定時間の短縮と同一条件下で二種類 (COSY と NOESY) の情報を得られる点で有効である。

蛋白質の複雑な ¹H-NMR スペクトル解析には、このようにいくつかの手法の併用が重要であり、今後益々新しい手法による試みが必要と思われる。

REFERENCES 1) Strop, Winder, Wüthrich, J. Mol. Biol. 166, 641 1983. 2) Eich, Bodenhausen, Ernst, J. Am. Chem. Soc. 104, 3731 1982. 3) Ikura, Hikichi, J. Am. Chem. Soc. 106, 4275 1984; 引地, 伊倉, 本邦信学会 (No. 8). 4) Ikura, Hikichi et al. Biochemistry 23, 3124, 1984; 伊倉ら, 生体分子の構造に関する討論会 (No. 4) 17, 1984 横浜. 5) Minowa, Yagi, J. Biochem. in press, 1984. 6) Haasnoot et al., J. Magn. Reson. 56, 343 1984; Gurevich et al., J. Magn. Reson. 56, 471, 1984.

(都立大理) °甲斐正恒, 長尾洋昌, 今村有紀子, 中村好邦,
朝長典子, 内田健一

〈序〉 過去数年の間に、 ^1H -NMR スペクトルによる蛋白質の構造化学的研究は画期的な質的变化を遂げた。超電導ソレノイド磁石を用いる高磁場装置の著しい進歩と普及、および二次元 FT-NMR の諸手法の発達により、小さな球状蛋白質であり、かつアミノ酸配列さえ明らかであれば、溶液中での高次構造が容易に決定できるような印象が広がりつつある(1)。しかし、より現実的に進歩の実態をなかがれば、最も成功をおさめている蛋白質 BPTI (アミノ酸残基数 58) とはじめて、これらの進歩の恩恵を充分に受けられる系は、分子量 1 万以下の、しかも二次元 FT-NMR 測定上の種々の制約を満足することのできるいくつかの“特殊な”蛋白質に限られていることが明らかとなる。いかに制約が強くてしそれらを満足する蛋白質は数多く存在することは明らかであるが、一方、その制約を部分的に、あるいは全面的に満足しない蛋白質が圧倒的多数であることも明らかである。従って NMR スペクトルによる蛋白質の構造研究にとって、より一般性のある、しかも蛋白質分子の特定部位に関する構造情報を選択的にもたらし得る手法の開発は、依然として最も重要な課題として存在し続けている。

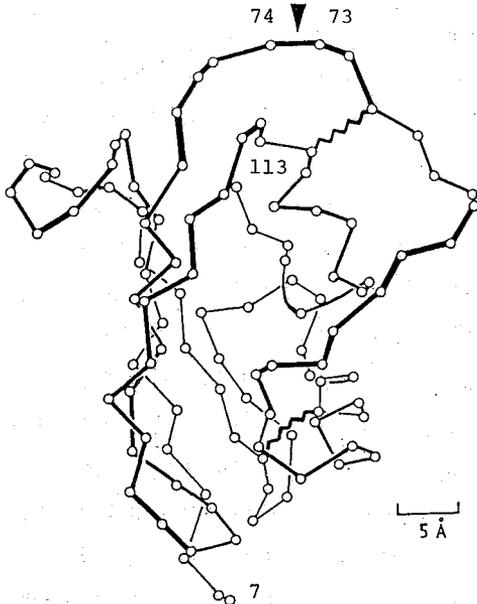


図-1. SSI サブユニットの主鎖構造の模式図(4)。

SSI は、アミノ酸 113 個から成る等価なサブユニット(図-1) 二個から形成される微生物起源の蛋白質プロテアーゼインヒビターであり、セリンプロテアーゼ、特にサブチリシン類を強く阻害する。この蛋白質の最も重要な部位は、法性部位 Met(73)-Val(74)、なかんづく Met(73)のカルボニル炭素であることが知られている。ダイマーとして分子量 2.3 万、しかもカルボニル炭素の構造情報が重要であるという事実は、まさに上述した低分子量蛋白質の ^1H -NMR 研究手法の適用範囲外に SSI が属していることを示している。我々は、このために蛋白質の主鎖カルボニル炭素の ^{13}C -NMR スペクトルを観測、帰属する一般的な手法を独自に開発した(2)。この手法を SSI に徹底的に用いることにより、主鎖を構成する 113 残基の内多くの

かいのしょう まさつね, なかお ひろまさ, いまむら ゆきこ, なかむら
よしくに, ともしか りこ, うらだ けんいち

カルボニル炭素を観測し、帰属することに成功した。本報に於いては、SSI 主鎖カルボニル ^{13}C -NMRシグナルのもとらす構造化学的情報を集成し、これらの情報の特徴とその応用可能性について考察を加える。

〈結果と考察〉：SSI の ^{13}C -NMRスペクトルを天然存在比の同位体レベルで測定すると、図-2の様に、500本のシグナルが重なり合っ

て出現する。これらの内には法性部位、Met(73)のカルボニル炭素シグナルなど113本のカルボニル炭素シグナルが含まれており、我々は、これらのシグナルを次の二段階に分けて帰属した。

第一に、各アミノ酸残基に対応するカルボニルシグナルへの帰属を行う必要がある。このためには、カルボニル炭素のみを ^{13}C -標識したアミノ酸を組み込んだSSIを調製し、その ^{13}C -NMRスペクトルを測定すれば良い。もし、SSI生産中に他のアミノ酸へ代謝されたり、あるいは、菌自体の生産するアミノ酸により大

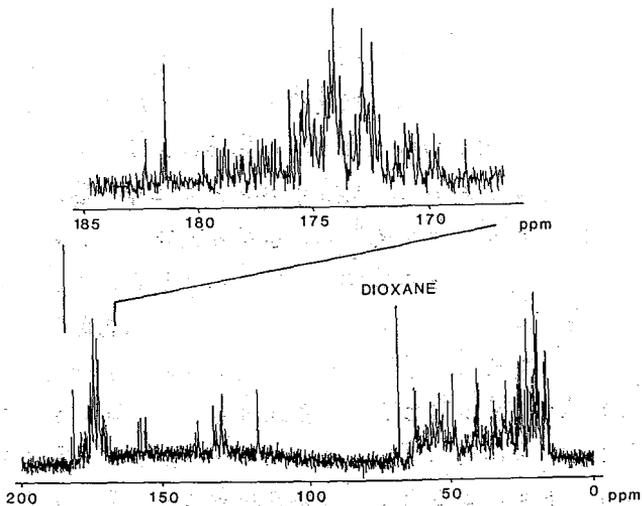


図-2. 天然存在比に於けるSSIの ^{13}C -NMRスペクトル。75 MHz, 50 °C, $pD = 7.0$.

幅に希釈されたりすることかなければ、図-3に示したアミノ酸配列に含まれる数に応じた ^{13}C -NMRシグナルが観測できる。更に、これらのシグナルを各部位の残基に帰属する必要がわかるが、これにはいくつかの手法がある。

N-15, C-13 二重標識法 この手法は最も厳密であり、一般性を持つ手法である(2)。

この手法の原理は蛋白質のアミノ酸配列の不規則性に依存している。つまり、配列中、X-Yジペプチド単位を考えたみる。Xに相当するアミノ酸を $[1-^{13}\text{C}]$ Xに、Yに相当するアミノ酸を $[^{15}\text{N}]$ Yに置換したアミノ酸培地で蛋白質を生合成する。得られた蛋白質はXに相当するアミノ酸残基のカルボニル炭素は全て ^{13}C 標識され、一方、Yに相当する残基は全て ^{15}N 標識される (^{14}N 希釈が実際には起こる)。

X-Yジペプチド結合はXのカルボニル炭素とYのアミド窒素から形成されているので、Xのカルボニル炭素の ^{13}C -シグナルには $^1J_{\text{CN}}$ の分裂が観測されるこ

図-3. SSIの一次構造(3)。

とになる。SSI に於いてはこの手法のみで約70%のカルボニルシグナルが一義的に帰属できる。

アミノ酸置換変異蛋白質質間のスペクトル比較 SSI は放線菌の生産する蛋白質であるが同種の蛋白質性インヒビターとして API-2c, Plasminostreptin (PS) など知られている。これらの蛋白質の間 SSI と PS は、単結晶の X 線回折 (4,5) による結晶構造が知られており、特に主鎖ペプチド鎖は殆んど等しい構造をしている。従って、SSI と API-2c の様に90%近い相同性のある蛋白質などでは構造は互いに良く似ていると考えるが良い。このようなケースでは、特定残基のカルボニル炭素をラベルした蛋白質の¹³C-NMR スペクトルを比較することにより変異部位のアミノ酸残基のシグナルを容易に特定できる。

化学修飾法 蛋白質側鎖官能基を比較の様やかな条件で化学修飾することか可能な場合が多い。Lys, Arg, Met, Cys, Tyr, His などには特に容易に修飾することかできる。プロトン化(脱プロトン化)も一種の化学修飾と考えるも良い。これらの変化が側鎖上に起ると、その残基のカルボニルシグナルは大きく変化する。この手法はシグナルの帰属にも有用であるし、逆に帰属の確定したシグナルに用いれば、修飾部位を特定することかできることになる。一方、化学修飾を受けた残基の C-, N-末端側隣接残基も少なからぬ影響を受けていると考えられるが、実際のところ影響は、選択的に N 末端側残基のみについて、そのカルボニル¹³C-NMR シグナルをシフトさせシグナルの帰属を確定することか可能である。

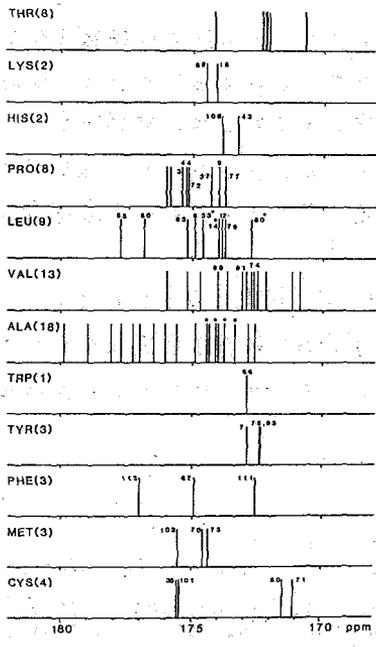


図-4. SSI の主鎖カルボニル炭素の化学シフト。50°C, pD = 7.0.

アミド水素の重水素化に伴う同位体シフト アミド水素は重水中で容易に重水素置換される。既に多くの例に示されている様に、隣接プロトンが重水素化されると、二次的同位体シフトにより一般にアミドカルボニル炭素の¹³C-NMR 化学シフトは約 0.1 ppm ほど高磁場シフトする。この同位体シフトを利用することにより、種々の帰属手法が生じる。例えば、C-末端 (SSI の場合は Phe-113) はカルボニル基であることから、重水と軽水でシフト変化を示さない。また側鎖のカルボニル炭素も、アミドとカルボキシル基との区別をすることもできる。より有用な応用は次に述べる "フロリン効果" である。

"フロリン効果" フロリンは蛋白質中に含まれる唯一のイミドである。従って X-Pro2 ニットのアミドには、水素がなく重水中と軽水中で X 残基のカルボニル炭素の¹³C-NMR シグナルはシフト変化を示さない。このような特殊な効果を我々はフロリン効果と呼んでおり、極めて有用な帰属手法となっている。

帰属の確定したカルボニル ^{13}C -NMRシグナルから得られる構造情報

化学シフトと高次構造 図-4に示した様にSSIのサブユニットに含まれる113アミノ酸残基の内65%におよぶ主鎖カルボニル炭素の化学シフトを既に観測し、その分布を調べた。その結果、残基により分布の重心が大幅に異なることがわかった。これは明らかに側鎖の構造上の差に由来するものかカルボニルシフトに含まれていることを示している。しかしながら、各残基のカルボニルシグナルの化学シフト自体も大きく分布しており(Ala, Val, Leu等の分布を参照)、これらのシフトが鋭敏に蛋白質の構造を反映していることが明らかである。我々は各サイトの化学シフトとX線回折から得られた構造とを対比させることにより、化学シフトと立体構造との間の経験則を確立しようと試みている。

ペプチド結合のミス、トランス異性 ミスペプチド結合は、X-Pro部分に局在していることは良く知られていることであり、事実SSIに唯一含まれるミスペプチドはAla(36)-Pro(37)にある。[^{13}C]Ala, [^{15}N]Pro 標識SSIの ^{13}C -NMRスペクトルは4組のダブルットを示し、これはSSI中A-Pジペプチドが4個存在することに相対している。その内3個は16Hzと正常のトランス結合の値と、一組のダブルットのみは20Hzと極めて大きいスピン結合を示した。このことから、Ala(36)-Pro(37)のミスペプチドがこのシグナルと予想しており、現在その確認を行なっている。もし、この予想が正しく、ミス結合がJの値から特定できることになれば極めて有意味な構造化学的プローブを手に入れることができることになる。

主鎖アミド水素の溶媒露出度 既に述べた様に、ペプチドカルボニル炭素は隣接するアミド水素が重水素の場合と軽水素の場合とで異なった化学シフトを与える(同位体シフト)。アミド水素が溶媒に露出している場合には、速い重水素交換を示すために、50%重水(H:D=1:1)で生じる二重ピーク(速い交換)は観測されず、平均化された一本のシグナルを生じる(遅い交換)。このことを利用して、アミド水素の各サイトに於ける溶媒露出度を評価することができる。

以上の様な構造パラメータは全て、アミノ酸配列のみを必要な前提条件として行なわれることを留意すれば、これに基づいてX線回折とは独立に溶液中での立体構造推定へのアプローチがうかがいあがってくる(6)。講演に於いては、この新しいアプローチについて重点的にふれるつもりである。

(文献)

- (1) NMR-総説と実験ガイド [I],[II], 南江堂(1983).
- (2) M. Kainosho and T. Tsuji, *Biochemistry*, **21**, 6273-6279 (1982).
- (3) T. Ikenaka, S. Odani, M. Sakai, Y. Nabeshima, S. Sato and S. Murao, *J. Biochem. (Tokyo)*, **76**, 1191-1209 (1974).
- (4) Y. Satow, Y. Mitsui and Y. Iitaka, *J. Biochem. (Tokyo)*, **84**, 897-906 (1978).
- (5) N. Kamiya, M. Matsushima and H. Sugino, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 2075-2081 (1984).
- (6) M. Kainosho, H. Nagao, Y. Imamura, Y. Nakamura, N. Tomonaga, K. Uchida and T. Tsuji, *J. Mol. Structure*, in press.

I. 免疫グロブリンの機能

免疫グロブリンは、異物の認識と排除のために巧みにデザインされた糖タンパク質である。免疫グロブリンをおたやかな条件で酵素消化すると、それぞれの機能を持つ別々のフラグメントを得ることができる。一方のフラグメントは、抗原結合部位を持つところから Fab (antigen-binding fragment), もう一方のフラグメントは、Fc (crystalline fragment, ウサギ免疫グロブリンの場合、このフラグメントは結晶化しやすい) と呼ばれる。抗原の認識に関わる免疫グロブリンの不均一性は Fab 部分が受け持っている。一方、Fc 部分はこの免疫グロブリンでも共通の構造を持っていて、補体 (complement) の結合と活性化による異物排除の舞台となる。Fab 部分が抗原との結合に関わる一方で、Fc 部分が補体成分や Fcレセプターと結合する。それぞれの部分がお互いに機能を発現するには、次の条件が満たされていなければならない。(i) 二つの Fab は相互の間隔を自由に变化させ、いろいろの大きさの抗原と最適な条件で結合すること。(ii) Fab, Fc 部分は、たがいにじゃますることなく、自らの機能を遂行できること。別の言葉でいえば空間的に、必要にして十分なだけ隔たっていること。免疫グロブリンは酵素消化によって2つの Fab と一つの Fc に分かれるが、酵素の攻撃を受ける部位はまさにこの2つの要請を満たすために存在するのである。この部位は蝶つがいにばねをえてヒンジと呼ばれている(図1参照)。

II. 複数のドメインから成り、それぞれのドメインが異なる機能を担っている免疫グロブリン G (IgG) 分子を対象として、我々がとっている方法論のまとめ

① IgG 分子の一部が欠損したり、あるいは特定のアミノ酸残基に置換が起っている "mutant protein", ② ドメイン単位で IgG 分子を切りはなして得たフラグメント, ③ IgG 分子より切りだした特定のペプチドフラグメントを用意し、測定にあたっては、spin diffusion を積極的に利用し、IgG 分子内の柔構造について、他法では得られない知見を得ることを目指す。本研究においては、ヒンジ部を保有する "正常な" IgG1 (IgG Ike-N) およびヒンジ部の大部分を欠く IgG1 (MIT, L.A. Steiner 博士より IgG Dob 粗分画の提供を受けた) を用いた。

III. 実験結果と議論

1. IgG の NMR スペクトル(図2): IgG 分子には顕著に flexible な部分が存在する。芳香環プロトン領域には His-224 の C2-, C4-H プロトンのピークが、また高磁場側には Lys, Thr, Ala, Leu などのピークが浮かび上がる。ヒンジの主要部分を欠く IgG Dob のスペクトルには、spin diffusion によって浮かび上

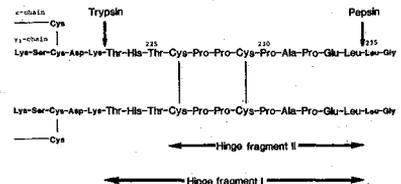


図1 ヒトIgG1のヒンジ領域

が、てくるピークがない。
この結果は2つの点で重要である。1) IgG Dob には "正常" な IgG 分子にみられる flexible な

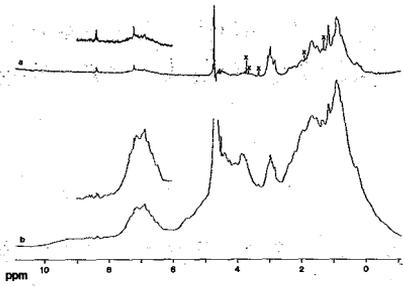


図2 IgG Ike-Nの400MHz ¹H NMRスペクトル (a) H₂Oを照射(0.5sec, δH₂/2π ≒ 360Hz), (b)照射せず

部分かほとんどない。2) 図2でみられるピークは、IgG分子のヒンジ部分に由来する。

2. ヒンジフラグメントI (HF-I) の NMR スペクトル (図3): Pro 残基を除くすべての残基の帰属を行うことができる。得られた結果の要点: 1) 2本の H 鎖は等価である。2) Cys-226, Cys-229 の α, β のプロトンのシグナルが別々に観測される。3) His-224 の C2-, C4-H プロトンの pH 滴定曲線は、IgG, F(ab)₂ の場合に比べ、大きく異なる。

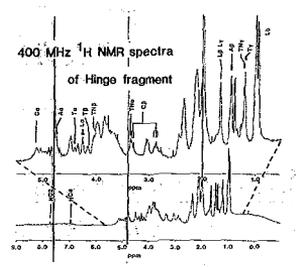


図3 ヒンジフラグメントIの400MHz ¹H NMRスペクトル

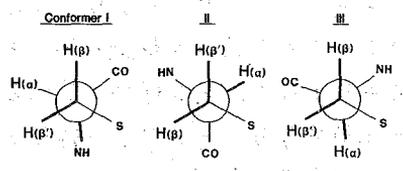


図4 Cys 残基のコンホマー

2.1 2個の Cys 残基の帰属について: HF-I の N 端側 3 残基を切り落したヒンジフラグメント II (HF-II) の NMR スペクトルの pH 依存性を測定することにより、Cys-226, Cys-229 の帰属を行うことができる。

2.2 Cys 残基のコンホメーション: C_α-H プロトン, H_β-H プロトン (β, β') の間のスピン結合定数は、J_{αβ} ≒ 13 Hz, J_{αβ'} ≒ 4 Hz, J_{ββ'} ≒ 13 Hz となる。この値は 1) Cys-226, Cys-229 で共通、2) pH = 2 ~ 9, 温度 = 25 ~ 55 °C, イオン強度 = 0 ~ 0.2 の範囲でほとんど変化しない。この結果、2つの Cys 残基とも、C_α-C_β のまわりのコンホマー I, II, III (図4) のうち、II あるいは III に固定されているものと考えられる。

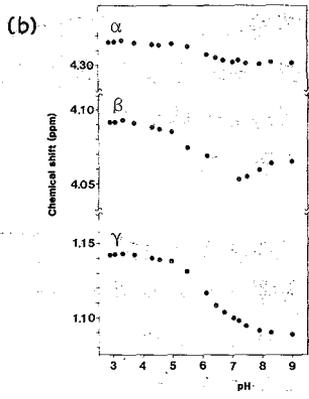
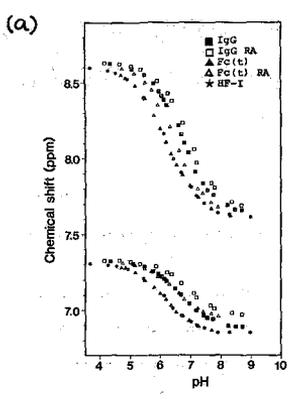


図5 ヒンジフラグメントIの (a) His-224, (b) Thr-225 の pH 滴定曲線

2.3 His-224 の pH 滴定曲線: HF-I の結果を図5a に示す。図から明らかのように、この結果は、IgG, F(ab)₂ (両者は C2-, C4-H と完全に一致) の場合と大きく異なる。Thr-225 の α, β, γ-H の pH 滴定曲線 (図5b) には、pH ~ 6 に変曲点が存在する。この変曲点は F(ab)₂ においては観測されない。Thr-223

をN端とするFc(t)は、HF-Iと同様のN端を有するが、His-224, Thr-225に関する上の記述はすべてあてはまる。

3. ヒンジ部コアCysProCys (CPPC)に続くセグメントProAlaGluLeuの形について：この部分も、本質的にはflexibleと考えてよいであろう。しかし、この部分を含むFc(ab)₂ Fc, IgGいずれの場合にも、H鎖間のS-S結合を還元アルキル化すると、NMRスペクトルの線幅はシャープとなり、flexibilityが増加することが明瞭に観測される。したがってこのセグメントには、何らかの束縛が加わっているものと考えられる。HF-I(分子量3000)は、HPLCにより、分子量を算定すると、21000となる。これらの事実は、ヒンジフラグメントが、何らかの理由により、伸びた形をとっていることを示す。

4. IgG分子のX線結晶解析：ヒンジ部の存在は、X線結晶解析の結果に重大な影響を及ぼす。ヒンジを持つ“正常”ヒトIgGの場合には、N端からFab全域とCPPCまでが電子密度像を与える。Pro-230よりあとのヒンジ部とFcは、電子密度像が得られない。これに対して、ヒンジを欠くIgG Dobの場合には、Fab, Fc両方を含む全領域の電子密度像が得られる。“正常”なIgG分子の場合には、ヒンジ部の柔構造にもとづく結晶中ドメイン間の相対的な位置関係—FabからみたFcの向き—のばらつき(Staticな)が存在するものと考えられている。X線解析によって得られたCPPCの形をみると、Cys-226は図4のコンホマーIII, Cys-229はコンホマーIIに相当する。NMRの結果は、水溶液中において、pH=2~9, 温度25~50°C, イオン強度0~0.2の範囲でCPPCがrigidであることを示している。すなわち、水溶液中においても、X線解析でみられるCPPCの構造が、rigidに保たれていることがわかる。正常IgGのX線結晶解析によると、ヒンジコアとFabの間に介在するAsp²²¹LysThrHisThr²²⁵は1回転あまりの α -helixを形成している。水溶液中におけるIgGおよびFc(ab)₂のNMRスペクトルを見るとこの部分はとくにflexibilityに富む。His-224のイミダゾール環のC2-, C4-HプロトンのpH滴定曲線は、単純なペプチドの場合に非常に近い。すなわち、イミダゾール環は、他のアミノ酸残基と相互作用していることはないと思われる。水溶液中においても、この部分がhelixを形成していると考えれば、pH滴定曲線の結果は説明できる。一方、この部分をLys²²²Thr²²³の間で切断し、HF-IあるいはFc(t)とすると事態は一変する。HF-I, Fc(t)のHis-224のpH滴定曲線は完全に一致する。また、図5bに示すように、pH~6に変曲点が観測される。ここで見られる結果はIgG, Fc(ab)₂の場合とは大きく異なる。この結果は、N端側AspLysを失うと、 α -helixの形がくずれ、His-224のイミダゾール環とThr-225のC β -OHが水素結合を形成すると考えると、よく説明できる。この点はHF-I, Fc(t)に共通に観測されることであり、したがって、CPPCのあとに続く部分の存在に関係ない。かたいていCPPCのコアとFabにはさまれて存在するThrHisThrセグメントは、スピン拡散の実験からみて、分子量16万、ドメイン12個からなるIgG分子のなかにあってもっともflexibleな部分である。この部分が、何故にそのようにflexibleなのかは、興味のあるところである。ここでは、1回転の α -helixの存在がそれと密接に関連していることを提案したい。すなわち、かたいてい2つの部分にはさまれて、 α -helixはいわばクッションの役

割をはたし、 α -helixを保ったまま、Fab, Fcとの相対的な向きをさまざまに変形する。これがIgGの internal flexibility の主要な原因と考えてはどうであろうか。

もう一つの疑問：“正常”IgGのX線結晶解析において、**CPPC**直後から電子密度像が消失するのはなぜか。X線解析の結果にもとづいて、CPKモデルで**CPPC**を作ってみると図6に示したように、Cys-229において、NH-C α とC β -Sの結合のまわりに回転の自由度が存在し、これによって、Cys-229のまわりにflexibilityが生じる。Cys-226とCys-229の化学シフトを温度に対してプロットしてみるとCys-229はCys-226に比べ、温度に対してはるかに敏感であり、上述のモデルを支持する。すでに述べたように、ヒンジの大部分を欠くIgG Dobは、分子全体の電子密度像を与える。ここで注目すべきことは、IgG Dobにおいても、Ala-231以降のヒンジ部分は保持されている点である。にもかかわらずIgG Ike-Nの場合にみられたAla-231, Glu-233, Leu-234のピークが見えないことは何を意味するのか？ 上述のCys-229の内部回転が**CPPC**に続くヒンジ部のflexibilityに深くかかわっているためではないであろうか。

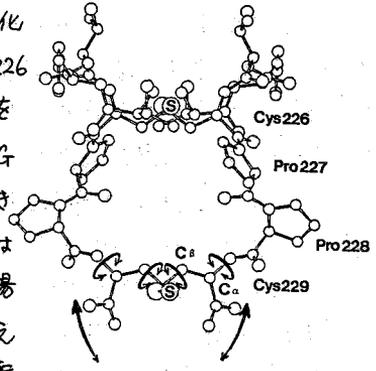


図6 **CPPC**の構造とCys-229周辺の動き

Ⅶ. 結語

以上の実験から明らかかなように、IgG分子における internal flexibility は**CPPC**の前後数残基ずつからなるヒンジ部分が担っている。しかし、さらに詳細にみるとそれぞれの部分が、flexibility 発現にはたしている役割は、その軽重において異なっているように思われる。ThrHisThrは1回転の α -helixを形成し、これがクッションとなり、硬いFab, **CPPC**の間に介在し、flexibility を発現している。つづく**CPPC**は文字通りヒンジの要としての働きをしている。ThrHisThrのflexibilityとともに、Cys-229の内部回転に由来する動きが存在する。このため、Glu-216-Pro-230を欠くIgG Dobでは、スピン拡散の実験から明らかかなように、IgG Ike-Nに比較してflexibilityが非常に低い。要約すると、IgG分子のflexibilityは複数の因子が担っていると見るのが妥当である。S-S結合で架橋された**CPPC**の存在は、flexibility についてだけいえば、本質的ではなさそうである。還元アルキル化したIgG, F(ab) $_2$, Fc, Fc(x)においては、ヒンジ部のflexibilityは上昇するからである。還元アルキル化によって intact IgG にみられたヒンジの柔構造の不均一性は除かれ、ヒンジ部は均等にflexibleになるように見える。これは、しかしながら、IgG分子の生物活性には致命的な影響を及ぼす。すなわち、IgG分子の補体系活性化能、Fcレセプターへの結合能が**CPPC**の崩壊とともにほとんど失われる。不均一な柔構造をもつヒンジこそが、IgG分子の生物活性の要なのである。

(国立がんセンター研) 齊藤 肇[○], 多和田涼子

ポリペプチドや多糖類のヘリックス・コイル転移にともなう化学シフトの変化は、コンホメーション依存シフトが存在する一つの証拠である。しかし、溶液状態で観測される化学シフトは、多数のコンホマー向の平均化学シフトであることが多い。また、このような転換がない場合、 β -シート構造のポリペプチドのように、分子向の aggregation により、高分解能スペクトルの観測と不可能にしてしまうことも多い。このため、通常の高分解能 NMR の範囲内では、コンホメーション依存シフトについての系統的な研究が全くなされていない。

これに反して、CP-MAS による固体高分解能 NMR の手法は、このような制限を受けず。実際、固体状態でのスペクトルピークの分離が十分であるならば、得られた化学シフト値と X 線回折から求めたコンホメーションの関係と明確にすることが出来る。われわれの一連の研究から、75.46 MHz の高磁場 CP-MAS NMR を用いたのは、 ^{13}C - ^{15}N 双核子相互作用による分離によってもなされること¹⁻⁹⁾なく、ポリペプチド、蛋白質の分離の良い ^{13}C NMR スペクトルが得られることを示した。さらに、これらの化学シフトは、主鎖の二面体角 (ϕ, ψ) および水素結合挙動により変化する。

本研究では、これらの生理活性ペプチドの溶液状態のコンホメーションが、固体状態とどのような差異があるかと、固体 NMR データをもとに考察する。

実験方法 化学 CP-MAS NMR スペクトルは、Bruker CXP-300 スペクトロメータを用い、75.46 MHz で記録した。化学シフトは、TMS 外部基準を表わした。測定試料はいずれも市販品を用い、場合により文献記載の方法で再結晶を行った。

結果と考察

A. Pro-Leu-Gly-NH₂ · 0.5 H₂O これは、オキシトシンの C-末端のトリペプチドであり、メラニン細胞刺激ホルモン (MSH) の抑制ホルモンと考えられている。Pro(O) と Gly NH₂ 向の水素結合により全体がコンホメーション (β -ターン) が決定されている¹⁰⁾ ことが、 ^1H NMR による X 線回折から提唱されている。したがって、もしこの状態を全く等しいコンホメーションと見なすならば、化学シフト値は両方の状態で実験誤差の範囲内で一致するはずである。図 1 に示すように、固体状態の化学シフトはよく分離しており、すでに示している溶液状態の ^{13}C NMR スペクトルとともに、容易に帰属を行うことができた。¹⁰⁾ 化学シフトの比較は、表 1 にまとめられている。Pro C β , C α と隣り、重水溶

液と固体状態の化学シフトの一致はさわりが良い。C β ピークの変化は、固体での C β , C γ ピークの差, $\Delta\mu_r$, が 3.8 ppm であるのに対し, 水溶液中では 5.1 ppm と増加している。これは、溶液中では Pro-Leu 部分の内部回転が起り易いことによるものであろう。実際, $\Delta\mu_r$ は Pro の下角に因るものと考えられる。¹¹⁾

$$\Delta\mu_r = 0.0361\theta + 0.73$$

$$\theta = 14 - 60^\circ$$

これから求めた固体状態の下角は 145.5° で, X線回折による値 152.9° とよく一致する。¹²⁾ 上での述べた Pro-Leu 回りの回転の存在は, すでに報告されているように, 水溶液中ではフレキシブルであるという結果と一致する。意味あることに, DMSO-d₆ 溶液では, C=O ピークがいずれも 2~3 ppm 近郊にシフトしているが, $\Delta\mu_r$ 値が逆に固体の値に近づいていることから, この変化はむしろ溶媒効果によるものと考えられるのが妥当であろう。

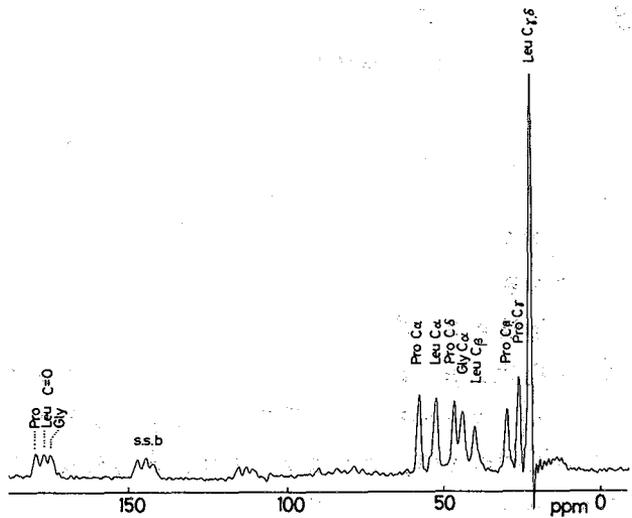


図1. Pro-Leu-Gly-NH₂·0.5H₂O の 75.46 MHz ¹³C CP-MAS NMR スペクトル

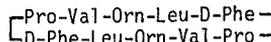
表1. Pro-Leu-Gly-NH₂·0.5H₂O の固体および溶液状態の ¹³C シフトの比較 (±0.5 ppm)

		Solid state	Solution ^a	
			D ₂ O	DMSO-d ₆
Pro	C α	58.0	61.07	61.09
	C β	30.0	31.63	31.91
	C γ	26.2	26.48	27.31
	C δ	46.7	47.62	48.20
	C=O	179.2	178.99	175.87
Leu	C α	52.7	53.63	52.17
	C β	40.1	40.81	b
	C γ	} 22.7	25.53	25.89
	C δ		23.27	24.59
	C δ		21.86	23.24
C=O	176.2	176.52	173.69	
Gly	C α	44.2	43.25	43.39
	C=O	174.5	175.23	172.34

a: 文献 10

b: 溶媒 ピーク下

B. グラムジジン S



の一次構造をもつテカペプチド抗生物質で, グラム陰性菌に対して殺菌的に作用する。比較的構造が単純であるにもかかわらず, これまでに 12 個以上の構造が提案されている。その理由は, X線回折によるコンホメーションは一般的に決定されていないからである。しかし, 溶液状態の種々の分光学的手法を用いた化学的手法にもとづいたプリート・シート構造が, 現在認められた構造とされている。¹³⁾ 図2に, グラムジジン S の固体および溶液の ¹³C NMR スペクトルを示す。一般に, 個々のアミノ酸残基のピークの分離がよく, 固体と溶液の化学シフトの比較が可能である。期待通り, 両結晶試料の方が粉末試料よりも線幅が窄く, 特に C=O ピークの分離が結晶試料の場合が良い。さらに, 粉末試料の場合 Phe C β ピークが, Leu C β とおなじ Orn C δ ピークと分離していない。コンタクト時間を 800 μ s から 2 m μ s に増加させた場合に若干のピーク強度の変動がみられている。また、固体と溶液の ¹³C 化学シフトの比較

であり、Val と Phe Leu 残基の β -シート構造の ^{13}C シフトを主とめる。しかし、 $\text{C}=\text{O}$ および側鎖の一部の化学シフトが、上記の β -シート構造の値に一致するものの、Val $\text{C}\alpha$ と Phe Leu $\text{C}\beta$ のシフト値は著しくずれており、 β -シートとの二面角の差異を反映している。さらに、これらの残基の α -ヘリックス構造のシフトからみれば著しく、 α と β の α/β -構造の存在は否定できる。

一般に、 $\text{C}=\text{O}$ 結合の δ 値は、溶液状態の値と化学シフトがよく一致 ($< 4 \text{ ppm}$) しており、溶液の場合と同様の β -シート (C_2 対称) が固体にありても存在している証拠である。 $\text{C}=\text{O}$ 結合は水素結合に関与しない残基に帰属できるが、溶液中で溶媒分子との相互作用がみられる。すなわち、Phe の芳香環 δ 値の強度が著しく低下しているのは、固体状態の分子配向による。

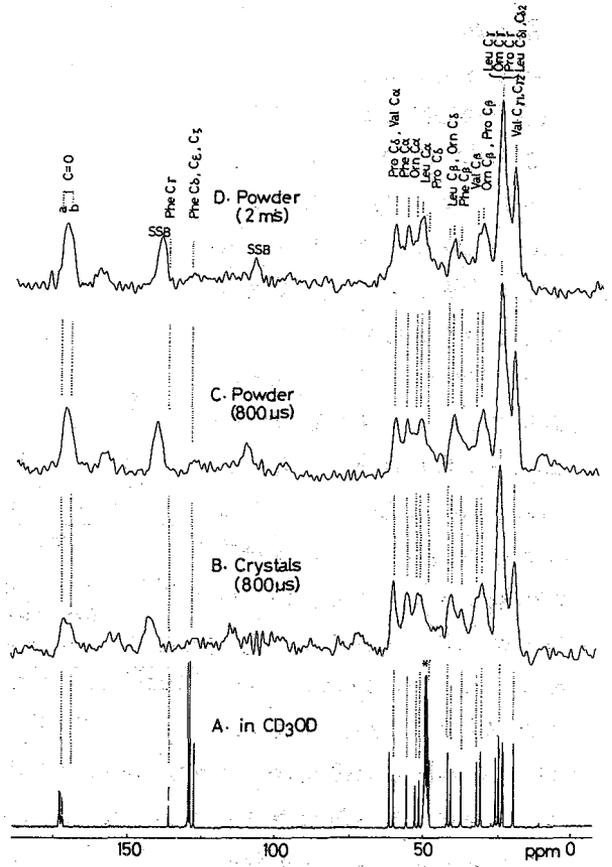


図2. グラムジシン S の固体 (B-D) と CD_3OD 溶液中の ^{13}C NMR スペクトル

C. バリノマイシン

バリノマイシンは抗生物質系イオノファーズであり、生体膜での K^+ イオンの透過性を促進する。その一次構造は、 $(\text{L-Val-D-Hyi-D-Val-L-Lac})_3$ であり、L-D-Val の他に、Hyi (2-ヒドロキシイソ酪氨酸)、Lac (乳糖) を含む。非極性溶液中では、 $\alpha \rightarrow \beta$ β -ターンにより安定化された C_3 対称の β -シート構造、極性溶液中では β -ターン構造に移行することが知られている。固体状態では様々な

Table 2. ^{13}C Chemical Shifts of Gramicidin S in the Solid and Solution

	Solid state	Solution ^a		β -sheet ^b	
		CD_3OD	DMSO-d_6	Val	Leu
Val $\text{C}\gamma$	18.9	18.5	18.9	18.8	
Cy		18.7	19.9		
$\text{C}\delta$		22.1	23.5		
Leu $\text{C}\delta$	23.5	22.5	23.7		
Pro $\text{C}\gamma$		23.6	24.1		
Orn $\text{C}\gamma$		23.7	24.1		
Leu $\text{C}\gamma$	29.8	24.7	25.0		24.7
Pro $\text{C}\beta$		29.6	30.0		
Orn $\text{C}\beta$		29.8	30.6		
Val $\text{C}\beta$	31.6	31.1	31.6	32.4	
Phe $\text{C}\beta$	36.7	36.3	36.7		
Orn $\text{C}\delta$	40.1	39.7	c		
Leu $\text{C}\beta$	40.9	40.8	41.8		43.3
Pro $\text{C}\delta$	48.8	47.1	47.0		
Leu $\text{C}\alpha$	51.0	50.7	50.6		50.5
Orn $\text{C}\alpha$	51.7	52.1	52.0		
Phe $\text{C}\alpha$	55.7	55.1	54.8		
Val $\text{C}\alpha$	60.3	59.6	57.9	58.4	
Pro $\text{C}\alpha$		61.1	60.9		
$\text{C}=\text{O}$	170.1				170.5
		171.8	170.8	171.8	
	172.2	172.0	171.2		
		172.6	171.8		
		172.8	172.0		
		173.1	172.7		

^a 25 mg/ml, from ext TMS. ^b Ref. 14, 16. ^c Hidden under solvent peak.

結晶多形は存在するものの、
 それらの構造はほぼ同一で、
 C₃軸は存在しない。実際、
 図3の¹³C CP-MAS NMRス
 ペクトルは、Hylのみで、
 LacのCαピークは全く見え
 ず本に分裂してあり、溶液に
 存在するような対称性は存在し
 ない。DuaxらのX線解析に
 よれば、表3のような Torsion
 angleの分布が知られており、
 Hyl, Lacの各3本への分裂
 はこの Torsion angle の分布
 で説明がつく。また、D-, L-
 Valが2本に分裂している

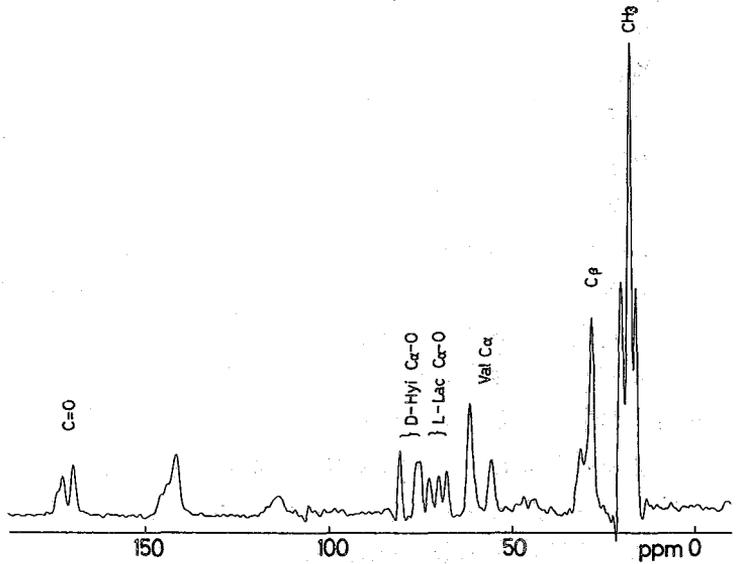


図3. バリリマイシンの 75.46 MHz ¹³C CP-MAS NMR スペクトル

Table 3. Torsion angles (°)

Angle(°)	D-Val	L-Lac	L-Val	D-Hyl
φ	67; 54; 105	-71; -100; -165	-110; -67; -71	147; 81; 98
ψ	-136; -133; -88	-11; 13; 31	89; 132; 130	-6; 3; 7

のみ、(67, -136), (54, -133)
 : D-Val と、(-67, 132) (-71,

130): L-Val が左旋構造例、(105, -88): D-Val のみ (-110, 89) L-Val が右旋構造例で、
 2: 1 αピーク強度に等しい。また、K⁺コンプレックス生成によるシフト変化とコンホメ
 -リシオン変化についてを報告する。

結論: 生理活性ペプチドの¹³C CP-MAS NMRピークは 75.46 MHz ではよく分裂し、固
 体構造と溶液構造の差異を検討するの有用な手段であると明らかにした。

1. T. Taki, S. Yamashita, M. Satoh, A. Shibata, T. Yamashita, R. Tabeta, and H. Saito, Chem. Lett., 1803 (1981).
2. H. Saito, Y. Iwanaga, R. Tabeta, M. Narita, and T. Asakura, Chem. Lett., 427 (1983).
3. H. Saito, R. Tabeta, A. Shoji, T. Ozaki, and I. Ando, Macromolecules, 16, 1050 (1983).
4. H. Saito, R. Tabeta, I. Ando, T. Ozaki, and A. Shoji, Chem. Lett., 1437 (1983).
5. I. Ando, H. Saito, R. Tabeta, A. Shoji, and T. Ozaki, Macromolecules, 17, 457 (1984).
6. H. Saito, R. Tabeta, T. Asakura, Y. Iwanaga, A. Shoji, T. Ozaki, and I. Ando, Macromolecules, 17, 1405 (1984).
7. A. Shoji, T. Ozaki, H. Saito, R. Tabeta, and I. Ando, Macromolecules, 17, 1472 (1984).
8. H. Saito, R. Tabeta, A. Shoji, T. Ozaki, I. Ando, and T. Miyata, Biopolymers, 23, in press.
9. A. Shoji, T. Ozaki, H. Saito, R. Tabeta, and I. Ando, Makromol. Chem. in press.
10. I. C. P. Smith, R. Deslauriers, H. Saito, R. Walter, C. Garrigou-Lagrange, H. McGregor, and D. Sarantakis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 222, 597 (1973).
11. I. Z. Siemion, T. Wieland, and K. H. Pook, Angew. Chem., 87, 712 (1975).
12. L. L. Reed and P. L. Johnson, J. Am. Chem. Soc., 95, 7523 (1973).
13. Y. A. Ovchinnikov and V. T. Ivanov, Tetrahedron, 31, 2177 (1975).
14. R. A. Komoroski, I. R. Peat, and G. C. Levy, Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 272 (1975).
15. V. F. Bystrov, Y. D. Gavrillov, V. T. Ivanov, and Y. A. Ovchinnikov, Eur. J. Biochem., 78, 63 (1977).
16. G. D. Smith, W. L. Duax, D. A. Langs, G. T. DeTitta, J. W. Edmonds, D. C. Roher, and C. M. Weeks, J. Am. Chem. Soc., 97, 7242 (1975).

はじめに

サブスタンス P は Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ のアミノ酸配列よりなるペプチドである。サブスタンス P は哺乳動物の中樞神経系の伝達物質であることが大塚らの広範な研究により明らかにされている。矢内原らによりサブスタンス P アナログの合成がおこなわれ、生理活性と構造との相関が研究されている。これらの研究結果をまとめると

- ① C末端6残基を含むアナログはサブスタンス P (SP) と同じ生理活性を有する。
- ② Met-11 のないアナログの生理活性はない。
- ③ D-Leu-10 および D-Met-11 SP アナログは SP と比較して生理活性は 1/100 に低下する。
- ④ N-Me-Phe 8, N-Me-Gly 9 SP アナログでは SP と比較して生理活性はかわらない。

我々は SP および SP アナログについて DMSO 溶液中におけるコンホメーションについて、詳細な研究をおこなってきた。その結果これらのペプチドは本質的にフレキシブルであり数多くのコンホマー平衡にあることがわかった。(したがって DMSO 溶液における SP および SP アナログの構造と活性の相関を明らかにすることは困難のように思われた。SP は神経中枢に存在するリセプター蛋白と結合(刺激を伝達する)。(したがって第一段階の反応は膜面への結合であり、その後膜面内を拡散しリセプター蛋白と結合すると考えられている。そこで我々は生体膜内でのサブスタンス P のモデルとして、コリンヘッド、リン酸基部および疎水的なアルキル鎖よりなるドデシルホスホコリン (DP) ミセルに存在する SP の構造を決定し、構造と活性の相関を明らかにすることを試みた。

結果

図 1(a) は SP の 400 MHz ¹H NMR スペクトルの全領域である。SP はシャープなシグナルを与える。この溶液に全重水素化 DP を加えた時のスペクトルが図 1(b) である。DP の臨界ミセル濃度は ~1 mM であり、測定条件下ではミセルを形成している。DP のアルキル鎖のシグナルが観測されているが、このシグナルは 18 個のアルキル鎖プロトンのうち

いながき 3つは、てらさわ いさお

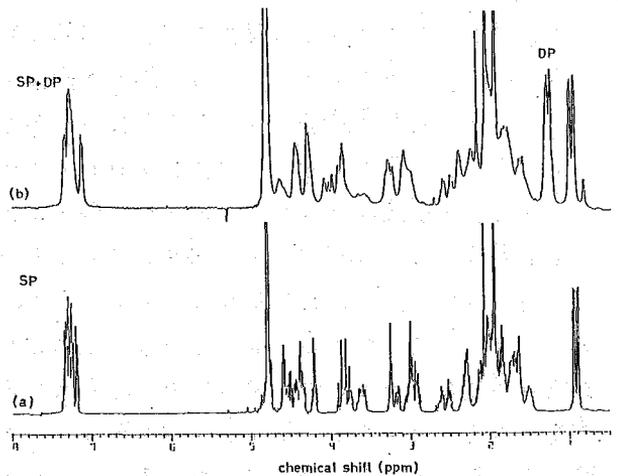
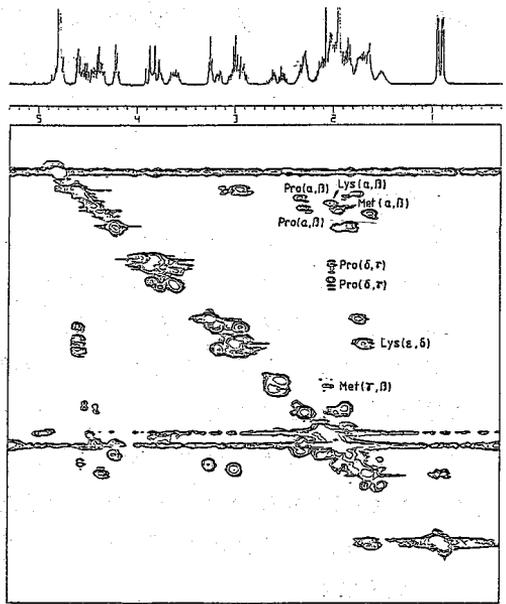


図 1(a) SP の重水溶液の 400 MHz ¹H NMR スペクトル
(b) ~40 倍モルの全重水素化 DP 存在下の SP の NMR スペクトル

重水素化されずに残ったプロトンに由来するものであり、全重水素化率99%以上を考慮するとDP40個につき1個のSPが結合したミセルを形成していることがわかる。DPは単独でも約40個一つのミセルを形成することが報告されており、SPはこのようなミセルにとりこまれていると考えるのが妥当である。全重水素化DPを用いるメリットは、このスペクトルに示されるように、40倍ものDPの存在にもかかわらず、SPのシグナルを明瞭に観察できる点にある。ミセルにとりこまれた場合のSPのシグナルはブロードになるばかりでなく、シフトしている。SPのシグナルの帰属をおこなうため、SPの¹Hシフト相関二次元NMRの測定をおこなった。図2は重水溶液におけるSPの¹Hシフト相関二次元スペクトルのアリファ

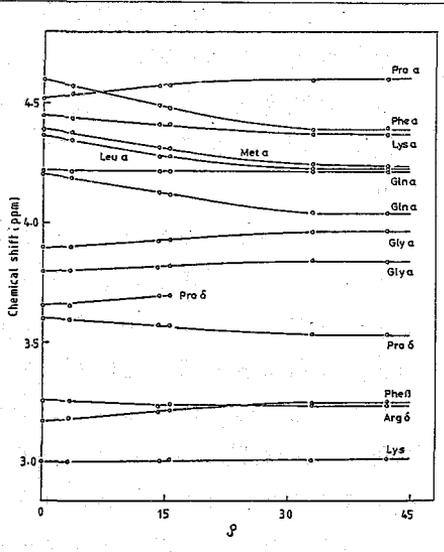


(図2) SPの重水溶液の¹Hシフト相関二次元スペクトルと交叉ピークの帰属

ティック領域を示したものである。軽水溶液における二次元NMRの測定もおこない、アミドも含めたNMRシグナルのアミノ酸残基への帰属をおこなった。

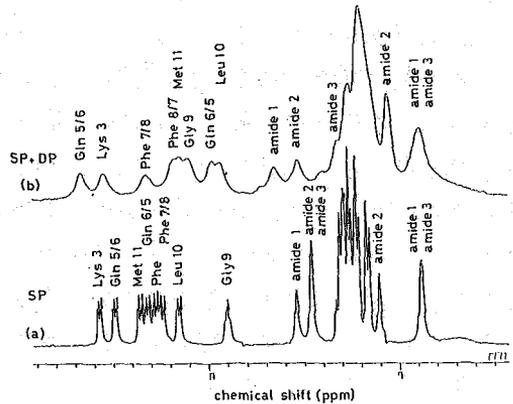
SPにDPを逐次加えると、SPのシグナルは図3に示すようにシフトする。これはミセルに結合した状態のSPとフリーのSPが速い平衡関係にあることを示す。したがってミセル濃度が高くなるにつれ、ミセルに結合した状態のSPの割合がふえることになる。化学シフトのDP濃度依存性は図3に示すように、 $\rho = DP/SP$ のモル比が30以上でほとんどかわらない。

この極限シフトはミセルに埋めこまれた状態におけるSPの化学シフトと考えられる。図3の結果はミセルとSPは化学量論的には、きりした複合体を作っていることを示している。アミドプロトンの化学シフトもDP濃度に依存して変化する。図4はSP(軽水溶液, pH5.0)のみとDPを40倍モル加えた時の400MHz¹H NMRスペクトルを示す。アミドプロトンもかなりシフトしている。以上より、主鎖の構造を含めてミセル中に埋めこまれたSPの構造はフリーの場合と比較してかなり異なることが期待される。そこでミセル中のサブスタンスPの構造を差NOE法を用いて検討した。図4にNOE差スペクトルを示す。この図に示す照射ピークは他の



(図3) SPのシグナルの化学シフトのDP濃度依存性

シグナルとの重なるの少ないものであり、選択的照射条件がみにたされている。図5(b)は Leu-10 の δ メチルを照射した場合の NOE 差スペクトルであり、Phe の芳香族プロトンに NOE が観測されている。Phe の芳香族プロトンを照射した場合には (図5(c)), Leu-10 や Met-11 のメチルシグナルに NOE が観測される。同様に、Gln-d, Met S-Me および Gly の α プロトンを照射した場合にも Leu や Phe のシグナルに NOE が観測されるのである (図5(d)~(f))。しかし、Pro δ を照射した場合には、NOE の強度もはるかに弱く、かつ

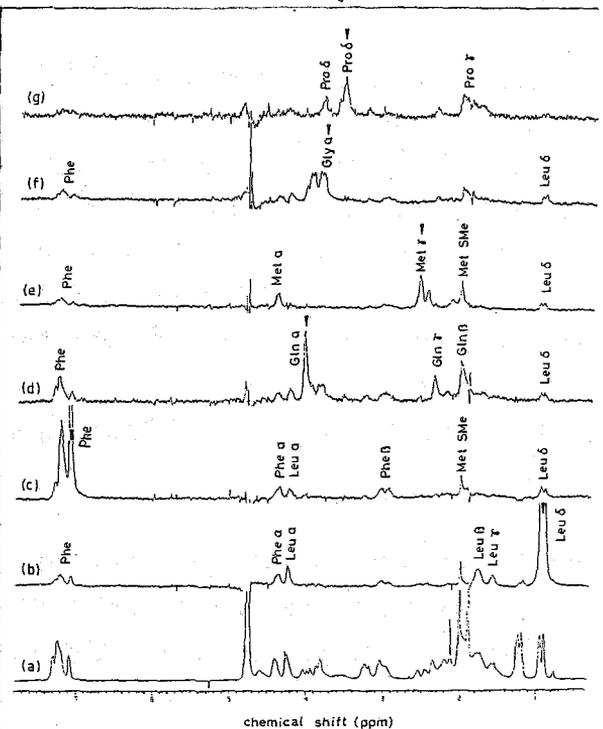


(図4) (a) SPのみ および (b) 40% 脂モルの DP 存在下におけるアミドプロトン領域の NMR スペクトル

Phe や Leu に NOE は観測されない (図5(g))。ミセルの分子量は ~ 5 万であり、ミセルの中に埋もれた SP の運動性は制限されるため、負の大きな NOE が観測される。一方ミセルの外側に出た部分はかなり運動性が高いため、小さな NOE が期待される。したがって Pro 残基の場合にみられた小さな NOE は Pro 残基を含む部分がミセルの外側にでており、運動性が高いためと考えられる。一方、-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ の C 末端 6 残基の側鎖間で観測された NOE は、これらの 6 残基が疎水的クラスターを形成してミセル中に埋もれていると考えられる。これらの残基が helix 構造をとる可能性が支持された。図6は C 末端 6 残基が α -helix をとる場合に各側鎖の配置を示したものである。なお N 末端 5 残基については側鎖間の NOE が観測されなかったことを考慮すると水溶液中に露出していると考えられる。

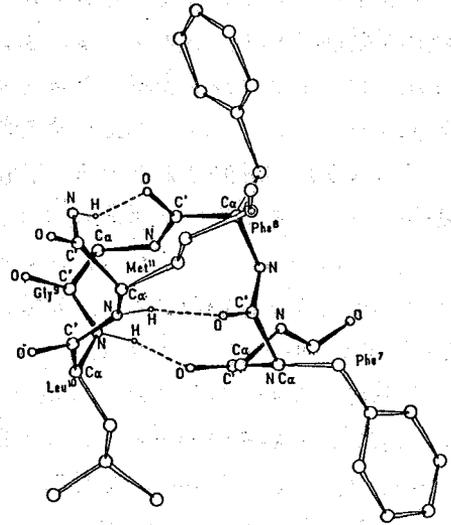
考察

SP は C 末端 6 残基は疎水性アミノ酸残基、N 末端は親水性アミノ酸基を含む特異的な一次構造をとる。生理活性には C 末端側 6 残基が重要なことが生理活性データより明らかにされている。本研究より、ミセルに埋もれた状態では C 末端 6 残基は helix 構造をとる、側鎖は疎



(図5) ミセル中の SP の NOE 差スペクトル

水的クラスターを形成している。ミセル中の環境は二重膜の場合と類似していることを考えあわせると、生体膜の場合も類似した構造をとることが期待される。C末端6残基は α helixを形成し、側鎖を特異的な方向に突出している。このような側鎖の配置がリセプター蛋白との結合に不可欠なのかもしれない。したがってこのようなhelix構造をとることが生理活性に重要な意義を持つのであろう。サブスタンスPが図6に示すような α -helix構造をとるとすれば、



(図6) DPミセルに埋め込めたSP-C末端6残基の α -helix

- ① C末端6残基は α -helixの構成単位であり、C末端6残基を含むアナログはSPと同じ生理活性を有する。
- ② deo-Met体ではMetのC末に対応するアミドプロトンが存在しないため、 α -helixを形成することはできない。そのため、活性はなくなる。
- ③ D-Leu-10 および D-Met-11 SPアナログでは、L体と異なり、側鎖は逆向きになるため、疎水性クラスターの形成が防がられる。そのため活性は1/100に低下する。
- ④ Phe-8, Gly-9のアミドプロトンは水素結合に関与していないため、アミドをN-Me化しても生理活性には影響はない。

以上、SPがミセル中でとる α -helix構造は①~④に示したように生化学的データともよく対応していることがわかる。今後生理活性ペプチドの活性相関を解明する上で、更にドッキングデザインとも関連し、ミセル系を用いた薬物の構造決定は重要な意義を持つと思われる。なお、東京大学理学部生物化学教室宮沢教授らにより、全重水素化二重膜ベシクルおよびTRNOEを用い、膜に結合した生理活性ペプチドの構造解析がおこなわれていることを付記する。

なお、本研究は科学技術庁「生体膜機能の解析・利用技術の開発に関する研究」の一部である。

謝辞 全重水素化ドデカン酸の合成法について貴重な御助言をいただきました 都立大 理・甲斐荘正恒博士に感謝いたします。DMSO中のSPおよびSPアナログの構造解析は東大理生化 宮沢教授との共同研究であり、本研究について 種々御討議いただいたことに感謝いたします。

蛍光性分子を取り込んだレシチンベシクル中のスピンド散と
膜の運動性との関係について

(京大 薬) 黒田義弘 松崎勝巳 早田哲郎 中垣正幸

1. $^1\text{H-NMR}$ のスピンド散現象を利用した研究が近年、特に蛋白質を中心に行われつつある。一方、このスピンド散はレシチンベシクル等のその構成分子の動きが比較的速いと考えられるモデル膜中では存在しないと報告されてきた。しかし昨年のNMR討論会において我々は200MHzの観測周波数においてスピンド散現象を負のNOEの遠距離プロトンまでへの伝達現象により検出できることをレシチンベシクル-クロロプロマジン相互作用系について示した。^{1,2)} 本研究においてはスピンド散現象の τ_c 依存性に注目し、この現象が膜の運動性の情報を得る有効な方法となりうるかどうかを判断するための基礎的知見を得ることを目的とする。その方法論としては、やはりNOEの照射時間依存性を観測する。しかし、レシチン分子はflexibleであるためにNOE実験の結果からプロトン間距離 r を固定して τ_c を論じることに限界がある。またシグナルの重なるのために(特に脂肪酸鎖)、モニターとして使えるシグナルも限られている。そこで本研究においては

rigidな芳香環を持つ蛍光性分子をレシチンベシクル内に導入し、①その芳香環のプロトンを照射し、同じ環内の他のプロトンのNOEを観測して τ_c を求めること、②さらに膜表面を代表して $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 基、膜内部を代表して CH_3 基のプロトンを照射してレシチンの他のシグナルのNOEを観測することによりレシチン分子の運動性に関する知見を得ることを試みた。

蛍光プローブを膜内に導入して、蛍光の偏光解消の時間経過から蛍光発色団の回転運動の速さを求め、発色団周辺のリン脂質分子の運動性を論じることが最近広く行われているが、今回の①の方法は τ_c を交叉緩和速度 σ_{ij} から芳香環内プロトン間距離を一定($r=2.5\text{\AA}$)として求める点が特徴である。蛍光性分子として今回は2-および16-(9-Anthroxlyoxy) palmitic acids (2AP, 16APと略す)を選んだ(図1)。

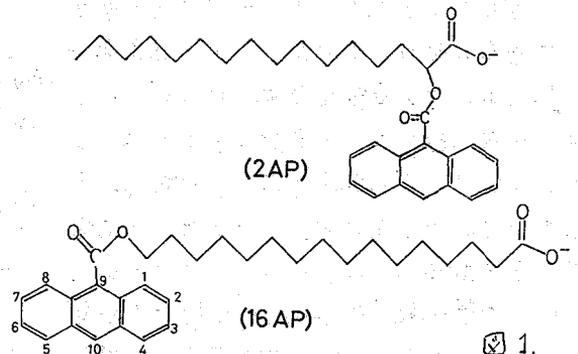


図 1.

2. 2AP又は16AP(P-L Biochemicals)を取り込んだレシチンベシクル(それぞれLE-2AP, LE-16APと略す)は常法に従って重水中にて調製した。レシチンは市販の卵黄レシチン(Sigma)を使用した。2AP又は16APとレシチンとのモル比は1:4であり、またベシクルの安定化のために1/4のナステチニ酸(Sigma)を混入させた。 $^1\text{H-NMR}$ はJEOL FX-200(200MHz)にて測定した。定常状態および時間分割されたNOEは全て差スペクトルによる。まづざきかつみ はんだてつろう なかがきまさゆき

トルとして記録した。化学シフトはHDO基準とした。

3. ① i) Anthroyl基での推定

図2 (a)~(k) に LE-16AP における定常状態のNOE 差スペクトルを, (m)(n)にはそれぞれLE-16AP, LE-2AP 重水溶液の通常の¹H-NMRスペクトルを示す。(a)~(k)は(m)においてラベルされたシグナルA~K4をそれぞれ照射(5秒間)したものである。

(a)~(g)において芳香環プロトンK1~K4が, また(k1)~(k4)においてはレニチン由来のシグナル(たとえばA:CH₃, F:N⁺(CH₃)₃)が観測されていることは16APが確かにレニチンベシクル中に取り込まれて存在することをはっきり示す証拠である。先にニコチンアミドを例として示したように,^{1,2)}ベシクル中に存在しないときにはこのような異種分子間でのスピン拡散は伝達されない。つまり定常状態のNOEを調べることはレニチンベシクル中に果分子(16AP)が可溶化されているかどうかの判定に使えることをあらためて強調しておきたい。2AP及び16APの蛍光発色団(Anthroyl基)の存在部位については, 2APは膜表面付近に^{3a)} 16APは脂質二重層の中心付近に^{3b)} 存在するとされている。今回の我々の¹H-NMRスペクトルにおいてもLE-16APではA:CH₃, B:(CH₂)_n, C:CH₂-C=C がLE-2APのそれらのシグナルに比べて高磁場シフトしており, 一方LE-2APではF:N⁺(CH₃)₃, G:CH₂N⁺ がLE-16APのシグナルに比べて高磁場シフトしていることから, これらの発色団の存在部位を支持する。

図3にシグナルK1について照射時間を100-ms から5.5-sまで変化させて照射した時のNOEの生長の様子をLE-16AP(図3a), LE-2AP(図3b)についてそれぞれ示す。図4にLE-16APのK4のNOE, $\eta(t)$, の生長曲線を示す。縦軸は定常状態におけるNOE値 $\eta(5)$ との比(%)で示した。今two-spin近似を仮定すれば $\eta(t) = \frac{\sigma_{ij}}{(\sigma_{ij}/\rho_j)}(1 - e^{-\rho_j t}) \dots (1)$ で与えられるので σ_{ij} は実験 $\eta(t)$ を(1)式にCurve fittingするが, 又は $t=0$ における初期勾配 $(\frac{d\eta}{dt})_{t=0} = \sigma_{ij} \dots (2)$ から求められる。この σ_{ij} は r 及び τ_c と $\sigma_{ij} = \frac{\gamma_i \gamma_j}{10^4} (\frac{6\tau_c}{1+4\omega^2\tau_c^2} - \tau_c)$ の関係にある。LE-16APについて(1)式でのCurve fittingから σ_{ij} を求めると $\sigma_{ij} = -6.7 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ となり, $r = 2.5 \text{ \AA}$ とすれば $\tau_c = 2.9 \pm 0.1 \times 10^{-8} \text{ s}$ が得

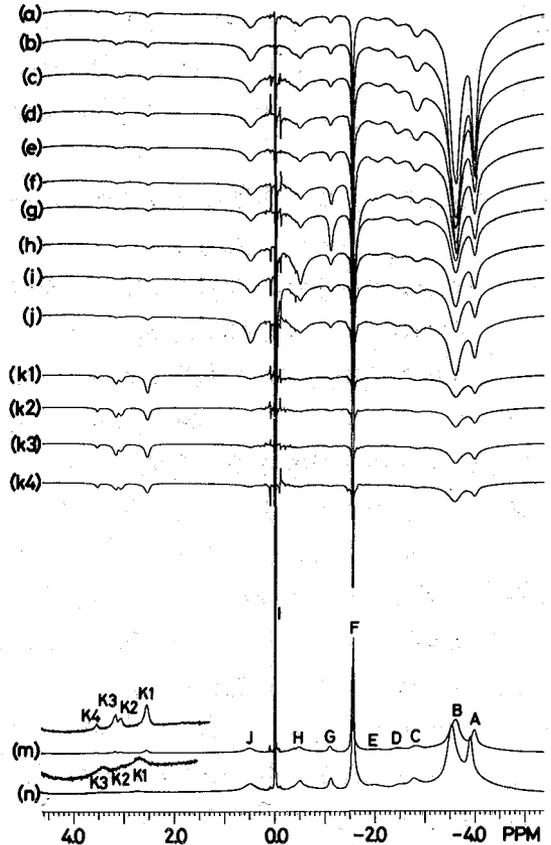


図2. (a)~(k) LE-16APの定常状態NOE差スペクトル。(m) LE-16APの¹H-NMRスペクトル。(n) LE-2APの¹H-NMRスペクトル。

られる。一方 LE-2AP について同様の生長曲線を得ようとしたが図 3b から明らかなように K1 を照射したとき既に 100-ms において K3 の NOE は定常値に達しているため σ_{ij} の下限 ($|\sigma_{ij}| \geq 10^5$) し加得られない。そこで LE-2AP の σ_{ij} を得るために十分に短い照射時間として 17.5-ms の間 K1 を照射した NOE 差スペクトルを図 5a に示す。また図 5b に LE-16AP についての対応する NOE 差スペクトルも示した。

図 5a から K3 について $\tau(0.075)$ より初期勾配として $\sigma_{ij} = -2.7 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$ が得られ、 $\tau_c = 1.1 \pm 0.3 \times 10^{-7} \text{ s}$ となる。LE-16AP については図 5b から同様に K4 については $\sigma_{ij} = -6.2 \pm 1.4 \text{ s}^{-1}$, $\tau_c = 2.7 \pm 0.6 \times 10^{-8} \text{ s}$ が得られ、図 4 から既に得た値と良く一致する。

ii) 蛍光プロバ法から得られる τ_c との比較

H. Kutchai 等⁹⁾ は Egg PC の multi

lamellar やニクシル状態での LE-16AP, LE-2AS ($S = \text{stearic acid}$) について Anthroyl 基の回転拡散定数 R を報告している。彼らの値(文献 4 の図 8) から τ_c を $\tau_c = 1/6R$ として見積もると LE-16AP で $1 \times 10^{-9} \text{ s}$, LE-2AS で $2.2 \times 10^{-9} \text{ s}$ となる。明らかに今回の我

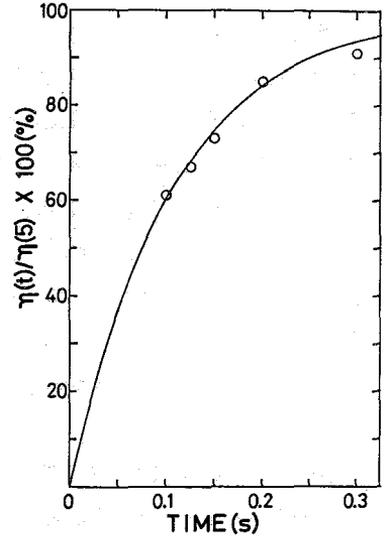
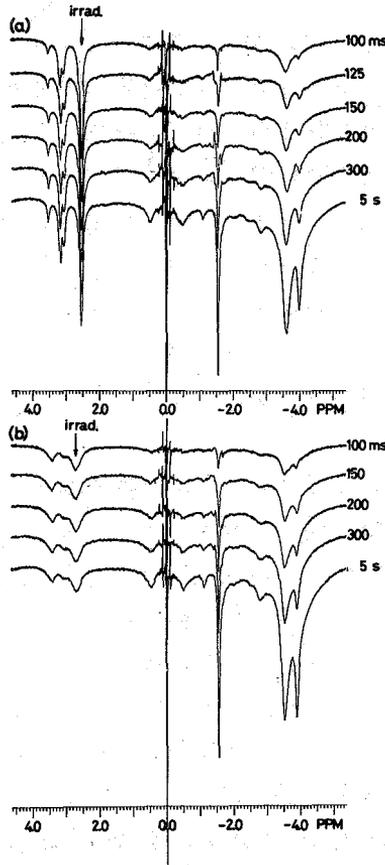


図 4. LE-16AP について K1 を照射した場合の K4 における NOE の照射時間依存性。

図 3. K1 を照射した場合の NOE 差スペクトルの照射時間依存性。(a) LE-16AP, (b) LE-2AP.

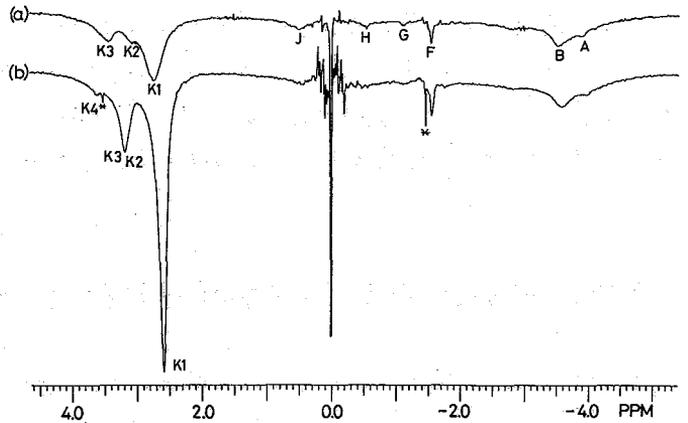


図 5. K1 の位置を 17.5-ms 照射した NOE 差スペクトル。(a) LE-2AP, (b) LE-16AP.

々の結果とは一致しない。 蛍光法は29倍(16AP)から50倍(2AS)短い τ を与える。このうちがいずれの方法が検出した Anthroyl 基の γ シグナル中での回転運動モードの違いに起因するものと思われる。 アントラセン環の長軸は膜面に垂直な方向を向いていると考えられており、 蛍光法ではこの長軸まわりの回転運動を反映している⁴⁾のに対して NMR法はこの長軸に垂直な方向 γ の回転運動を反映した τ を与えていると考えられる。 但し 蛍光法のデータは multilamellar γ シグナルについてであり、今回用いたような Anthroyl-oxy プローブによれば超音波処理した γ シグナル中の発色団の運動は99層のリポソームよりも制限されているという報告もあり⁵⁾ 超音波処理した γ シグナルを使えばもう少し長い τ を与えるかも知れない。 また今回の実験条件では蛍光法に比べて Probe:lipid の比率が非常に大きいことにもある程度の原因があるかも知れない。

② $N^+(CH_3)_3$ 及び CH_3 基を照射した時のレシチンの他のシグナル及び Anthroyl 基プロトシグナルの各々の NDE の生長曲線を調べた結果、たとえば 200-ms における $\eta^{(0.2)}/\eta^{(5)}$ の値でも、生長の速さを比較してみると、LE-16AP, LE-2AP は K1 以外はほとんど変わらないことがわかった。 K1 については①で得られた結果から予想されるように 2AP の K1 の方が 16AP の K1 よりもはるかに生長が速い。 そこで次に LE-16AP と LE-2AP の各シグナルの NDE の生長速度があまり変わらないということが、どの程度の“運動性の感度”において変わらないのかを知るために温度を 10°C 上昇して ($23^\circ\text{C} \rightarrow 33^\circ\text{C}$)、 $\eta^{(0.2)}/\eta^{(5)}$ を各シグナルについて求めた結果 $\eta^{(0.2)}/\eta^{(5)}$ の値は約 1~2割小さくなることがわかった。 つまり $\eta^{(0.2)}/\eta^{(5)}$ の値の LE-16AP, LE-2AP 間での 1~2割の違いは 10°C の温度変化に相当する τ の違いの範囲内であると考えられる。 τ の温度変化の活性化エネルギーを 3.1 Kcal/mol ($(CH_2)_n$ の γ の温度変化より得られたもの⁶⁾) と仮定すればこのとき τ は約 16% 短く(速く)なっている。 スピン拡散は $\omega^2 \tau^2 \gg 1$ を満足するような遅い運動モードに起因しており、これが膜面に平行な方向への運動であるならば LE-16AP, LE-2AP 間でレシチン分子の運動の速さとしてはあまり変わらないのはむしろ妥当な結果であろう。

[謝辞] 本研究の一部は文部省科学研究費補助金の助成をうけた(黒田)。

[文献] 1) 黒田・北村 第22回 NMR 討論会(1983); 第33回 日本薬学会近畿支部大会(1983)。

2) Kuroda, Y.; Kitamura, K. J. Am. Chem. Soc. 1984, 106, 1-6.

3) (a) Podo, F.; Blazie, J. K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977, 74, 1032-6.

(b) Handa, T.; Matsuzaki, K.; Nakagaki, M. 投稿中。

4) Kutchai, H.; Chandler, L. H.; Zavoico, G. B. Biochim. Biophys. Acta 1983, 736, 137-49.

5) Thulborn, K. R.; Tilley, L. M.; Sawyer, W. H.; Treloar, F.E. Ibid. 1979, 558, 166-78.

6) Gent, M. P. N.; Prestegard, J. H. J. Magn. Reson. 1977, 25, 243-62.

日立中研 ○松井 茂, 関原謙介, 塩野英己, 河野亮樹

< 序 >

NMRを用いたスピンのイメージング⁽¹⁾が主として生化学的, 医学的分野で注目と集め活発な研究が進められている⁽²⁾。スピンの位置情報を識別することは生体等のように空間的に不均一な系のNMR研究においては不可欠である。このような研究と更に一歩進めた手法として, 最近多次エフーリエ変換NMR法を応用してスピンの位置情報とケミカルシフト等のspectroscopicな情報を同時に測定するという新しい方法(ケミカルシフトイメージングと呼ばれることが多い)が提案されている⁽³⁻⁶⁾。この方法は, 互いに直交する磁場勾配を印加することによりスピンの位置情報をphase-encodingした後, 均一な静磁場のもとでFID信号を観測するものであり, 多次エフーリエ変換NMR法の常として長大な測定時間を要するという欠点を持つている。

そこで今回我々は, この長大な測定時間の短縮化を目的として, 磁場勾配を周期的に反転させることにより生ずるマルチプルエコー信号を用いてケミカルシフトイメージングを試みた。本方法によれば, 現在の多次エフーリエ変換NMRを用いた測定法に比べ, 1次元分の測定回数と節約することができるため, 高速でケミカルシフトイメージングが可能となる。

< 原理 >

一般に2種の情報を表わすハミルトニアンを各々 $\mathcal{H}_1, \mathcal{H}_2$ とし, これらがいづれもinhomogeneousな相互作用であり, \mathcal{H}_2 のみが時間依存性を持つ。この場合, 観測される複素NMR信号 $S(t)$ は密度行列を用いて

$$S(t) = \exp\left(\frac{i}{\hbar} \|\mathcal{H}_1\| t + \frac{i}{\hbar} \int_0^t \|\mathcal{H}_2(t')\| dt'\right) \quad [1]$$

のように計算できる。ここで $\|\mathcal{H}_1\|$ はハミルトニアン \mathcal{H}_1 のspin operator以外の部分を示している。
[1]式から次のことがわかる。すなわち $\|\mathcal{H}_2(t)\|$ が周期的に振動あるいは反転している場合, $\int_0^t \|\mathcal{H}_2(t')\| dt' = 0$ となるような時点で信号をサンプリングすれば $\|\mathcal{H}_1\|$ のみに関する情報が得られること。更に, そのようなサンプリングシーケンスの時間原点を Δt だけシフトして得られた信号は, $\|\mathcal{H}_1\|$ に関して識別される各信号成分に対して等しく Δt 時間だけ $(\|\mathcal{H}_1\| + \|\mathcal{H}_2\|)$ の情報とphase-encodingしたものととなる。 $\|\mathcal{H}_1\| \ll \|\mathcal{H}_2\|$ の時, このphase-encodingは実質上 $\|\mathcal{H}_2\|$ に支配される。従って, 次々に Δt シフトを行って得られる各信号を2次元的に配列しこれを2次元フーリエ変換することにより, [1]式のような1次元信号を $\mathcal{H}_1, \mathcal{H}_2$ の2次元情報に変換することができる。⁽⁷⁻¹¹⁾

本方法においては $\mathcal{H}_1 = \gamma \hbar H_0 \sigma I_z$, $\mathcal{H}_2(t) = \gamma \hbar G_x(t) \sigma I_x$ である。ここで σ, γ が各々求まらなければならないが, しばしばけんすけ, しほのひでみ, こうのひでみ

めたいケミカルシフト、スピンの α 座標であり、 $G_x(t)$ が周期的に反転する α 方向の磁場勾配である。したがって、ケミカルシフト σ を持ち、位置 α にあるスピンに対して $G_x(t)$ をEFP加して得られる信号 $S_{\sigma\alpha}(t)$ は

$$S_{\sigma\alpha}(t) = \exp\left[i\gamma(H_0\sigma t + \alpha \int_0^t G_x(t) dt)\right] \quad [2]$$

となる。[2]式から上述のようなデータ処理により、 σ, α の2次元情報を一挙に得ることが出来る。この結果、現在の多次元フーリエ変換NMR法を応用したイメージング手法において、測定回数を1次元分だけ減少させることが可能となる。

以上のような多次元フーリエ変換イメージング法に対して、投影再構成法⁽¹⁾を利用した本方法の適用も可能である。例えば2次元(α, β)物体のイメージングにおいて、 $G_x(t)$ を印加して得られる信号に上述のデータ処理を施したものは、各ケミカルシフトについてのスピン分布を各々 β 方向へ投影したものとなっている。したがって、反転磁場勾配の方向を α, β 平面内で等間隔に回転させて測定を行えば、投影再構成法により2次元物体のケミカルシフトイメージが得られる。 < 実験 >

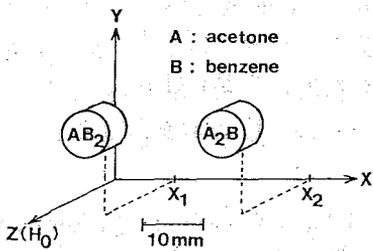


Fig.1 One-dimensional phantom comprising acetone (A) and benzene (B). Each cylinder has a diameter of 8 mm and a length of 10 mm. AB2 and A2B denote the constitution of the solution at $x=x_1$ and $x=x_2$, respectively.

今回の実験では、本方法の基本原理の有効性を確認するために図1に示すような1次元ファントムを用いてケミカルシフト1次元イメージングを行なった。ファントムはアセトン(A)とベンゼン(B)の混合溶液から成っており、 $\alpha = \alpha_1$ の位置では AB_2 、 $\alpha = \alpha_2$ の位置では A_2B の組成となっている。測定はプロトンに対して共鳴周波数21.28 MHzで行った。装置は小動物のイメージング^(2,13)用に製作したものである。

図2に実験に用いたパルスシーケンスを示す。磁場勾配のスイッチング時間($\sim 50 \mu s$)が有限であることを補償する目的、及びマルチプルエコー信号中の最初のエコー信号の前半を測定するために $90^\circ - \tau_c - 180^\circ$ ($\tau_c = 10 ms$)のスピンエコー法を用いた。図2に示すように磁場勾配 G_x は時刻 $2\tau_c$ 後 $\tau_c - (2\tau_c)N$ ($N=32, \tau_c=1.248 ms$)の時間間隔で連続的に反転させる。この際、スピン位相に対する G_x の効果が時刻 $2\tau_c + (2\tau_c)N$ ($N=0, 1, 2, 3, \dots$)で常にキャンセルするように G_x 反転のタイミングを微調整した。

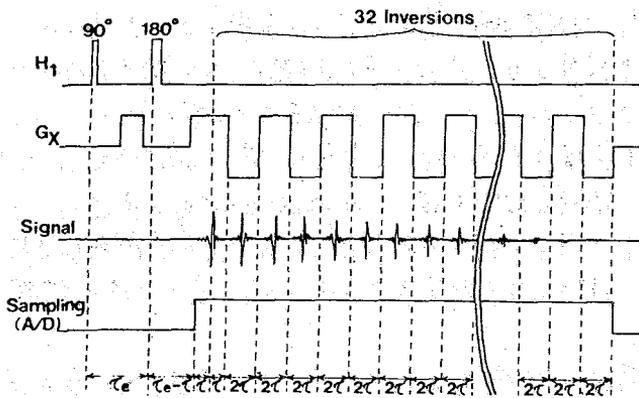


Fig.2 Pulse sequence for high-speed spectroscopic one-dimensional spin imaging.

<結果と議論>

図3に実際に観測されたマルチプルエコー (エコートレイン) 信号を示す。A/D rateは 78.0ms で 1024 points のサンプリングを行く。この

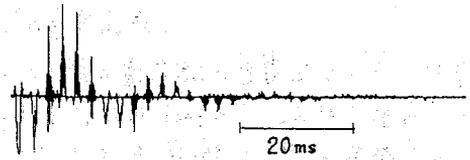


Fig.3 Observed echo-train. Only one-half of the quadrature-detected signals is shown. Note that the modulation of the echo envelope is due to chemical shift.

ような信号を以下のようなデータ処理により

図5に示すケミカルシフトイメージに変換した。

i) 図4に示すようにマルチプルエコーを時間 4τ 毎に分割し、各々時間段に E_n ($n=1,2,3,\dots,16$) と名づける。更にこれらを図4のように再配列する。ここで t_1 軸 (16 points) がケミカルシフトに対応し、 t_2 軸 (64 points) がスキャンに対応している。このような再配列は前記で述べた原理に等価な操作である。

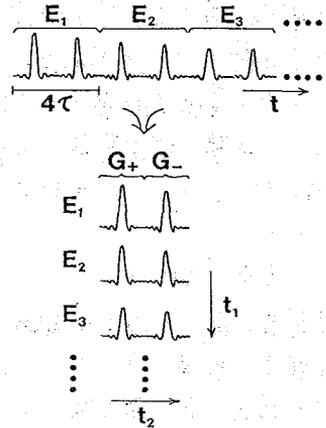


Fig.4 Conversion from one-dimensional echo train to two-dimensional echo array.

ii) 次の2次元フーリエ変換を行う前に、各 E_n を磁場勾配の符号により更にグループ分けし、各々 $E_n(G_+)$, $E_n(G_-)$ と名づける。

iii) 各エコーの前半と後半を交換した後、 t_1 軸と t_2 軸に関して2次元フーリエ変換を行う。

iv) 本実験においては、 $E_n(G_+)$ のフーリエ変換のみを用いて図5に示す2次元プロットを行く。ここでフーリエ変換後の実数部が位相補正 (周波数依存性なし) して示されている。 $E_n(G_-)$ のフーリエ変換を用いること、及び実数部の代わりに絶対値を用いることに関しては後述する。

図5の結果から $\alpha=\alpha_1$ の位置には Benzene は Acetone の2倍存在しており、 $\alpha=\alpha_2$ の位置では逆に Acetone が Benzene の2倍存在していることがわかる。この結果は図1と良く対応している。更に、各位置におけるスポットがその位置に特有の小さなシフトを示していることがわかる。このシフトは静磁場の空間的不均一性により各位置での磁場強度がわずかに異なることに起因するものである。したがって、本実験を更に2次元あるいは3次元イメージングに拡張すれば、このようなシフトから逆に静磁場強度の空間分布を得ることが出来る。真のケミカルシフトを得るには、この磁場分布によるシフトを各位置において補正する必要がある。このような補正に関する議論から本方法は静磁場の空間分布を測定する^(14,15) 目的にも有用であることがわかる。

図5の2次元プロットには $E_n(G_+)$ のフーリエ変換のみを用いたが、 $E_n(G_-)$ のフーリエ変換を用いても同様の情報を得ることが出来る。しかしながら、後者の実数部を用いる場合には周波数に依存した位相補正が必要となる。このことは $E_n(G_-)$ が $E_n(G_+)$ に対して、ケミカルシフトと静磁場の不均一性のもとで2次元時間だけ dephase していることから理解できる。

位相補正も行、実数部を表示する代わりに、フーリエ変換の絶対値を用いることも可能である。この場合にはスファトルの分解能が約1.4倍低下するが、データ処理が簡潔であり、位相に対する種々の誤差要因に影響されないという点で有利である。実数部表示、絶対値表示のいずれの場合も、S/N比向上のためこれら2種のデータ $E_n(G_+)$, $E_n(G_-)$ のフーリエ変換を加算することが可能である。この際、位置座標の符号が互いに逆になっていることに注意しなければならない。

< 系 語 >

本報告において我々は初めて、従来の比ベ非常に高速ケミカルシフトイメージングを行うことが可能であることを理論的、実験的に確認した。本方法によれば、従来の多次元フーリエ変換NMRイメージングに比ベ測定回数も1次元分だけ減らすことができ、測定時間は著しく短縮される。

本実験では spectroscopic な情報としてケミカルシフトのみを取り上げたが、間接スピン-スピン相互作用が存在する場合でも本方法は有効である。また装置上の制約のため、最終イメージの画素数は (32×32) (ケミカルシフト軸は16 pointsより補間) となっているが、更に画素数を増やし高分解能化することは容易である。

現在、本方法による2次元物体の高速ケミカルシフトイメージングの実験が進行中であり、講演ではその結果も併せて報告する。

* 本研究の一部は J.Magn.Reson.(S.Matsui et al.) に投稿した。

< 文 献 >

1. P.C.Lauterbur, Nature(London) 242,190 (1973).
2. P.Mansfield and P.G.Morris, "NMR Imaging in Biomedicine", Academic Press, New York, 1982.
3. T.R.Brown, B.M.Kincaid, and K.Ugurbil, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79, 3523 (1982).
4. A.A.Maudsley, S.K.Hilal, W.H.Perman, and H.E.Simon, J.Magn.Reson. 51, 147 (1983).
5. I.L.Pykett and B.R.Rosen, Radiology 149, 197 (1983).
6. L.D.Hall and S.Sukumar, J.Magn.Reson. 56, 314 (1984).
7. P.Mansfield, J.Phys. C10, L55 (1977).
8. P.Mansfield and I.L.Pykett, J.Magn.Reson. 29, 355 (1978).
9. J.S.Waugh, M.M.Maricq, and R.Cantor, J.Magn.Reson. 29, 183 (1978).
10. M.M.Maricq and J.S.Waugh, J.Chem.Phys. 70, 3300 (1979).
11. T.Terao and S.Matsui, Phys.Rev. B21, 3781 (1980).
12. 松井茂也, 第22回NMR討論会講演要旨集 P266 (1983).
13. H.Kato, K.Kogure, H.Ohtomo, M.Tobita, S.Matsui, E.Yamamoto, and H.Kohno, to be published in J.Cerebral Blood Flow and Metabolism.
14. A.A.Maudsley, H.E.Simon, and S.K.Hilal, J.Phys. E: Sci.Instrum. 17, 216 (1984).
15. K.Sekihara, S.Matsui, and H.Kohno, J.Phys. E: Sci.Instrum. in press.

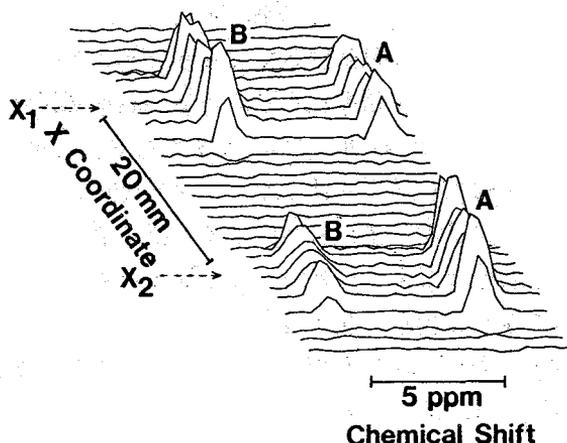


Fig.5 The converted two-dimensional plot of the chemical-shift-resolved spin distribution of the phantom shown in Fig.1. No signal-accumulation was made. Both the x and chemical-shift axis are represented by 32 points, the latter interpolated from 16 points.

67 スピンエコー・フーリエ法によるケミカルシフトイメージングの基礎的検討

(東芝総研, 筑波大物工)^{*} 佐藤幸三, 巨瀬勝美, 井上多門^{*}

はじめに

NMRスペクトルの空間的分布を映像化する, いわゆる化学シフトイメージングの手法が種々開発されている。これらのうちで, Maudsley¹⁾及びPykett²⁾によるフーリエ映像法の拡張においては, 空間位置情報とスペクトル情報を時分割でスピンエコー信号の位相及び周波数にエンコードすることにより, 単なるフーリエ逆変換で化学シフト像が求まり, 現在のところ, 最もオーソドックスな方法となっている。本研究では, 上記のフーリエ法に基づいて, 静磁場の不均一性(特に, 試料自身の反磁性によって誘起される不均一磁場)及び同種スピン間の間接交換相互作用の化学シフト像に及ぼす影響について簡単な評価ファントムを用いて実験的に調べた。

実験方法

実験に用いた磁石は通常の物性測定用鉄芯電磁石で, 共鳴周波数は30MHzである。磁場均一性は, 7mmφ×4mmのディスク状映像領域で0.1ppm, 又, 磁場のドリフトは, 0.3ppm/day以内である。送信コイルは20mmφ×40mmの鞍型コイルを, 受信コイルは12mmφ×15mmのソレノイドコイルを用いた。x及びy勾配コイルは平行四線コイルで, z勾配コイルは四重極コイルによって作成し, 5Aの駆動電流において, おおの, 4及び3kHz/mmの磁場勾配が得られる。図1に座標系を示す。勾配磁場のスイッチングに伴い磁極内に誘起される渦電流による磁場は~2msec以内で消失し, 結果には何ら影響を及ぼさない。スライス厚は±4πで切断したsinc関数で変調した選択励起パルスを用いて行った(有効スライス厚は4mm)。用いたパルス列を図2に示す。空間情報の位相エンコードは, $G_{x,z} = 0.49\text{kHz/mm}$ の勾配強度で, $1.28 \leq t_x, t_z \leq 1.28\text{msec}$ の時間域において, $\Delta t_x, \Delta t_z = 160\mu\text{sec}$ の時間ステップで行った。t_x及びt_zの(17×17)の組み合わせについて, 4msecのサンプリング間隔で, スピンエコーの後半を, 128msecの時間領域においてデータ収集した。エコーピークをt_δ=0とし, 前半のエコーデータは, エルミート性 $S(-t_\delta, t_x, t_z) = S^*(t_\delta, -t_x, -t_z)$ を用いて求め, (64×16×16)マトリックスの三次元フーリエ変換によって化学シフト像 $\tilde{\rho}(\omega_\delta, rG_x X, rG_z Z)$ が得られる。結果は, CRT上に256階調グレースケールで表示。観測時間ΔT

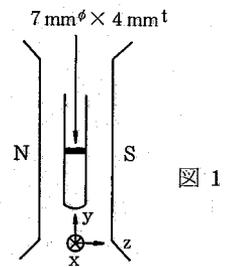


図1

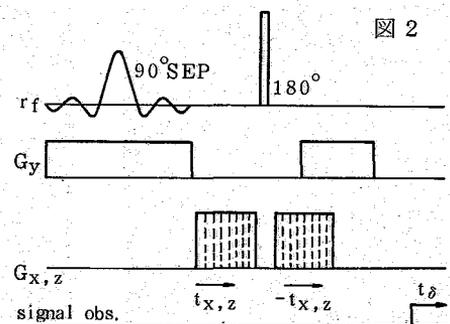


図2

さとう こうぞう, こせ かつみ, いのうえ たもん

と周波数不確定 ΔF に対する関係 $\Delta T \cdot \Delta F > 1$ から決まる空間分解能及びスペクトルの周波数分解能は、 0.8mm 及び 3.9Hz である。データ収集及び画像の計算に要した時間は約 20 分である。実験結果と議論

(A) 試料によって誘起された不均一磁場の効果

(1) 水・アセトン混合液

内径 $7.0\text{mm}\phi$ 、肉厚 0.5mm 、長さ 180mm のパイレックスガラス試料

管内の体積比 1 : 1 水・アセトン混合液について化学シフト像を求めた。このファントムにおいては、試料の空間分布の円筒対称性と、一様帯磁率のために、試料及びガラス管によって誘起される反磁性磁場は一様である。図 3 で示される表示フォーマットにより、 ω_δ をパラメータとして 3.9Hz のステップで増加させて 64 枚

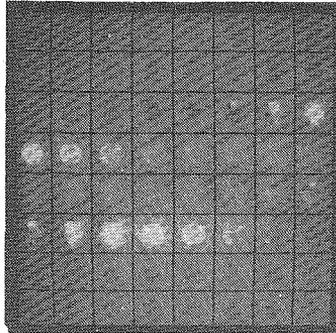


図 4

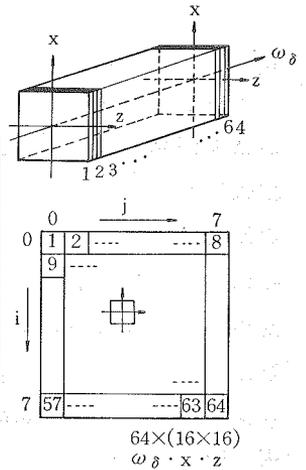


図 3

の空間分布を表示したものを図 4 に示す。 $(i, j) = (3, 0)$ に中心を持つ空間分布はアセトンに、 $(5, 3)$ の像は水に対応する。アセトンと水のピークの周波数差は 69Hz である。空間分布の歪みは、磁石の残留磁場不均一性による。

(2) 同軸二重管配置のベンゼン・シクロヘキサン (ファントム A), 及び水・アセトン (ファントム B)

異なる帯磁率を持つ物質の空間的分布による試料誘起不均一磁場の効果を調べるために、図 5 に示す二種類のファントムについて化学シフト像を求めた。二重管は、内径 $3.2\text{mm}\phi$ 、外径 $4.0\text{mm}\phi$ 、長さ 150mm の内管と、これらが、 $7.0\text{mm}\phi$ 、 $8.0\text{mm}\phi$ 及び 180mm の外管から成る。ファントムを構成する、ベンゼン、シクロヘキサン、水及びアセトンの体積帯磁率は、 $-10^{-6}/\text{cc}$ の単位で、 0.626 ,

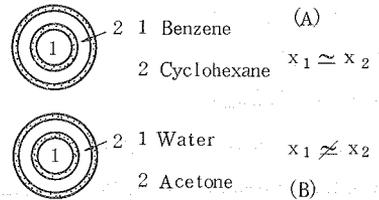


図 5

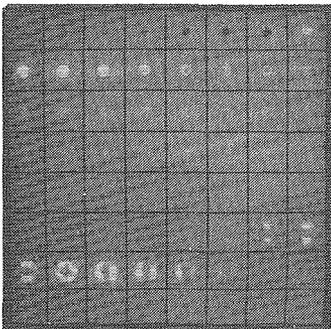


図 6

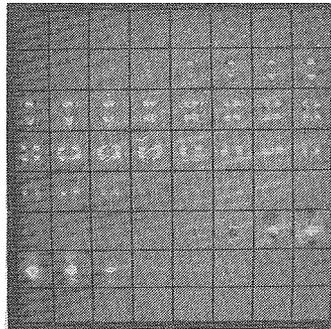


図 7

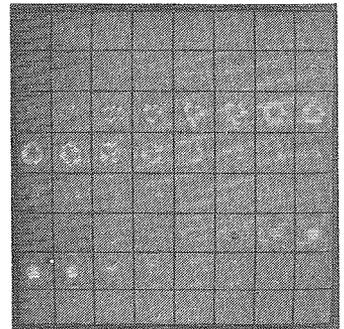


図 8

0.631, 0.721 及び 0.460 である。帯磁率の差は、ファントム A では無視できるが、B では顕著な差が存在する。図 6 及び 7 に、ファントム A 及び B の化学シフト像を示す。予想通り、A では ω_δ 軸に沿ってほとんど歪みがみられないが、B では大きい歪みがみられる。二重管配置において、試料による誘起磁場は、

$$-\frac{2}{3}\pi X_1 H_0$$

for $r \leq a$

$$\left[-\frac{2}{3}\pi + 2\pi \frac{\cos 2\theta}{r^2} \left\{ \frac{X_1}{X_2} a^2 + \frac{X_3}{X_2} (b^2 - b^2) - b^2 \right\}\right] X_2 H_0$$

for $b \leq r \leq c$

と計算される。ここで、 X_1 、 X_2 及び X_3 は、内管中試料の、内管と外管の間の試料の、及びガラスの体積帯磁率である。a, b, c, r 及び θ は図 9 の如くである。このように磁場分布が知られている場合には、(x, z) 位置のスペクトルを、 ω_δ 軸に沿って $-r \Delta H(x, z)$ だけシフトすることにより歪みを補正することができる。ファントム B について、 $\Delta H(x, y)$ の不均一部分のみを考慮して補正した結果を、図 8 に示す。円環領域の歪みが、かなり減少したことがわかる。

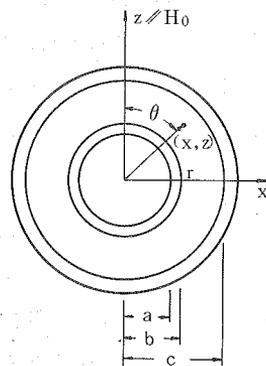


図 9

(3) 非楕円体対称性を持つ水分布

帯磁率の空間的分布が一様でも、分布形状が楕円体対称性からずれると不均一磁場が誘起され、化学シフト像が歪む。これを調べる

ために、図 10 で示す二種類の水分ファントムについて化学シフト像を求めた。どちらの場合にも歪みが存在するが、(a) の場合には特に顕著である。(2) の場合と同様に誘起磁場 $\Delta H(x, z)$ に対する補正を行うと、図 11、が図 12 に、図 13 が図 14 のようになる。このように大きい誘起不均一磁場が存在する場合には、化学シフト像だけではなく、通常のスピンドensity分布像も歪みを生ずると思われる。

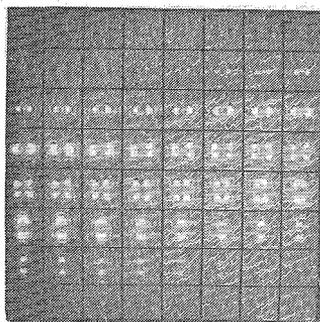


図 11

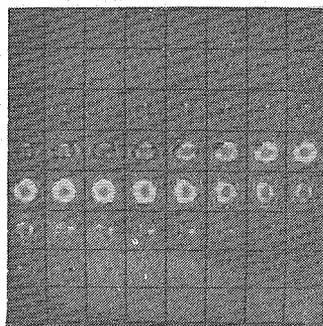


図 12

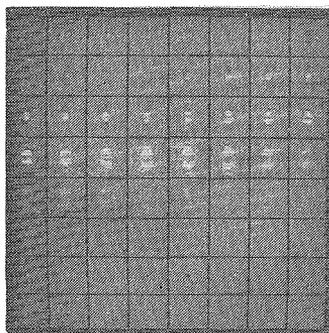


図 13

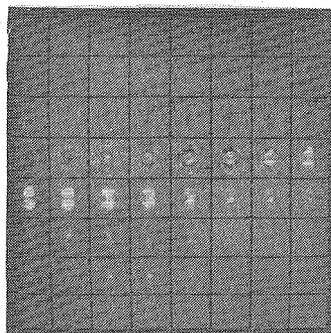


図 14

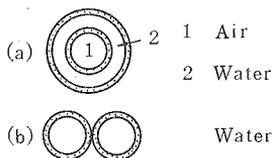


図 10

(B) 同種スピン間の間接スピン間相互作用の効果

以上の実験例は、全て、単一吸収線を示す分子から成る液体を、ファントム構成要素として用いており、当然、 J の効果は存在しない。スピンエコー・フーリエ法による化学シフト映像法においては、エコーピーク ($t=2\tau$) で、 $\phi \sim 2\pi J\tau$ の位相変調が加わるので、吸収と分散が混合し、純粋な吸収スペクトルが得られない。 τ を短くすることにより、 ~ 0 に

すれば、近似的に正しい吸収スペクトルが得られる。 $2\tau=16\text{msec}$ として、エチルアルコールの化学シフト像を求めた。図 15 に結果を示す。CH₃、CH₂ 及び OH に対応する分布が識別される。 $(x, z) = (0, 0)$ のスペクトルは、図 16 のようになり、CH₃ の三重項は、一応分離されている。

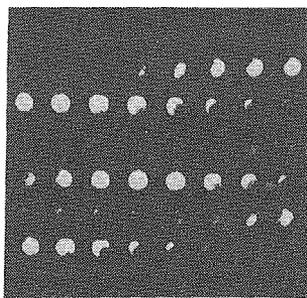


図 15

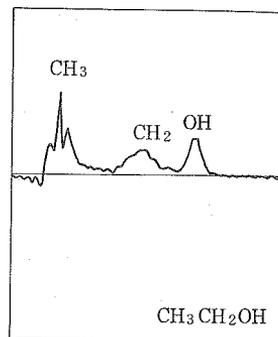


図 16

結 論

- (1) 試料自身の磁性によって試料中に誘起された不均一磁場が、化学シフト像を歪ませる重要な因子となる。誘起磁場分布、 $\Delta H(x, z)$ が既知の場合には、各点 (x, z) のスペクトルを、スペクトル軸に沿って $-r\Delta H(x, z)$ だけ相対的にシフトさせることによって、このような歪みは容易に補正できる。生体の場合には、 $\Delta H(x, z)$ を知ることは、一般に困難であり、試料誘起不均一磁場が化学シフト像の歪みの究極の因子になると思われる。試料の分布が楕円体対称性から大きくずれる場合には、通常のスピン密度分布像をも顕著に歪ませることがある。
- (2) $2\pi J\tau \approx 0$ になるように充分短い τ を用いることにより、同種スピン間の間接交換相互作用 J による位相変調は無視できるので、スピンエコー・フーリエ法による化学シフトイメージングによって、近似的に正しい吸収スペクトルを得ることができる。

参 考 文 献

- (1) A. A. Maudsley, S. K. Hilal, W. H. Perman and H. E. Simon, J. Magn. Reson. 51, 147 (1983).
- (2) I. L. Pykett and B. R. Rosen, Radiology 143, 157 (1982).

(東芝総研、筑波大物工*) °巨瀬 勝美、佐藤 幸三、井上 多門*

はじめに

NMR映像法は、空間的な位置を区別したNMR測定法である。われわれは、この方法を発展させ、層流の流速の空間分布を求める方法を開発し、パイプの中を流れる水の流速分布を求めた。以下にその方法と実験例を示す。

流速イメージングの方法

用いた方法は、図1の通りである。すなわち、 $t=0$ において流れに垂直な厚さ l の断面内の核磁化のみを 90° パルスで飽和させ、 $t=\tau$ において同じ断面内の核磁化の分布を映像化するという方法である。この方法は以前用いられた方法と基本的に同じであるが^{1,2)}この原理を用いて正しい流速分布を求めるためには、次の二つの点の問題となる。一つは図1の様に厚さ l の領域のみを、理想的に飽和・観測することは不可能であるという点と、もう一つは、流れの方向に磁場勾配を印加して選択照射パルス (selective irradiation pulse: 以下SIPと略す) を照射するため、従来のスライス法では、核磁化の位相が乱れ、正しい核磁化の分布像は得られないという事である。これらの問題を解決するため、流れている試料に、流れの方向の磁場勾配とSIPを印加した場合のシミュレーションを行い、それに基づいて流体を映像化するためのパルス系列を決定した。次にその詳細を示す。

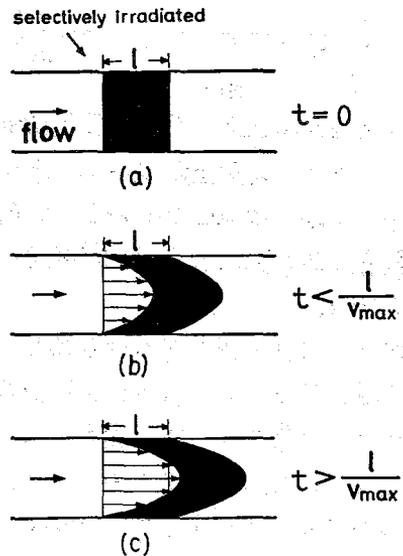


図1

(1) スライス法

まず流体が静止している場合を考える。実際に用いたSIPは図2のとおりである。一様静磁場 H_0 ($\parallel z$) 中におかれた y 方向には一様な試料に、線形磁場勾配 G_y とこのパルスを印加し、 $t=t_0$ で G_y を反転させると、 $t < t_0$ において一度乱れた核磁化の位相はそろい始め、 $t = 2.04 t_0$ で y' 方向の全磁化は最大となり、エコーを生ずる。このときの核磁化分布の計算結果を図3に示す。

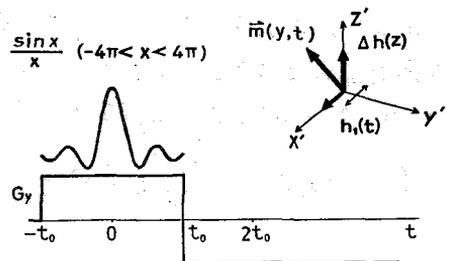


図2

こせ かつみ、 さとう こうぞう、 いのうえ たもん

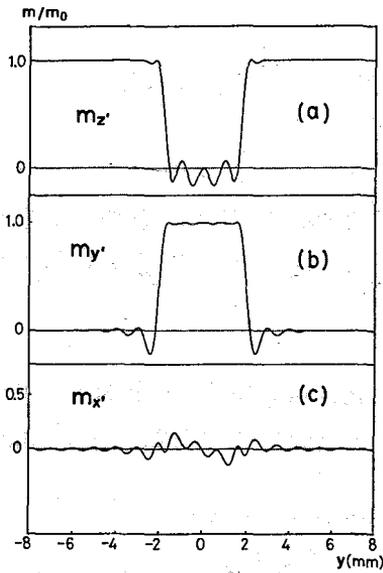


図 3

$t_0 = 1.28 \text{ msec}$, $G_y = 7.8 \text{ KHz/cm}$ としたので、スライス厚は約 4 mm となっている。 $m_{x'}$, $m_{y'}$, $m_{z'}$ は $\omega_0 (= -\gamma H_0)$ で回転する回転座標系 $(0-x'y'z')$ における核磁化の y 方向の分布である。

次に流体が一定の速度 v で流れている場合を考える。このとき、流れによる核磁化の位相の乱れを再び集めるには、図 4 に示すシーケンスでスライスを行う。 $v = 25.0 \text{ cm/sec}$ の場合の $t = 4T$ における核磁化の分布の計算結果を

図 5 に示す。この場合も、静止している場合と同様のスライス特性を得ることができる。

(2) 流れのイメージング

上に述べたスライス法を用いて、流れに垂直な断層面内の核磁化分布を映像化するパルス列を図 6 に示す。SIP を印加する直前の核磁化の分布を $\rho(x, y, z)$ (z 方向の成分、 x, y' 成分はないものと仮定) とすると、 $t = 4T + t_x$ における位相換波した信号は、

$$S_{y'}(t_x, t_z) = \iiint \rho(x, y, z) \{ m_{y'}(y) \cos \phi(x, z) - m_{x'}(y) \sin \phi(x, z) \} dx dz \quad (1)$$

$$S_{x'}(t_x, t_z) = \iiint \rho(x, y, z) \{ m_{x'}(y) \cos \phi(x, z) + m_{y'}(y) \sin \phi(x, z) \} dx dz \quad (2)$$

$$\phi(x, z) = -\gamma G_x x t_x - \gamma G_z z t_z \quad (3)$$

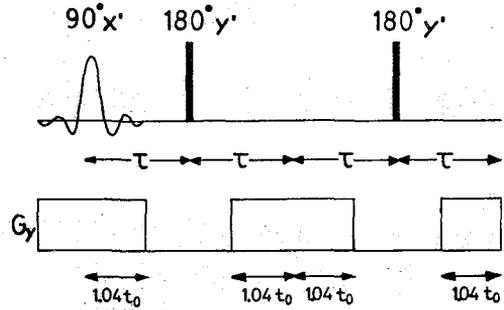


図 4

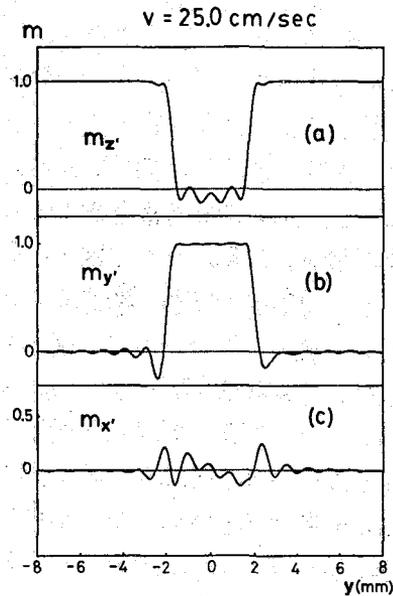


図 5

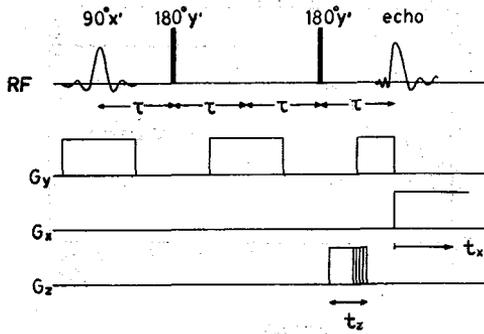


図 6

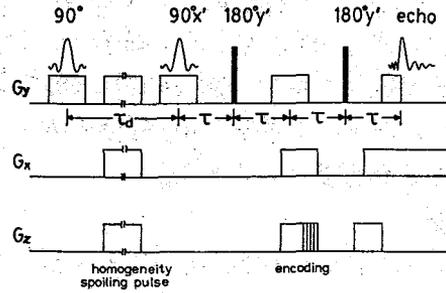


図 7

となる。ここに、 $S_{y'}$ 、 $S_{x'}$ は回転系における y' 、 x' 方向の核磁化に対応しており、 G_x 、 G_z はそれぞれ x 、 z 方向の磁場勾配である。図 3 と図 5 に示す様に、 $m_{x'}(y)$ は $m_{y'}(y)$ に比べて非常に小さいのでこれを無視すると、次の様に表現することができる。

$$S(t_x, t_z) = S_{y'}(t_x, t_z) + i S_{x'}(t_x, t_z) \\ = \iint \left(\int \rho(x, y, z) m_{y'}(y) dy \right) \exp(-i\gamma G_x x t_x - i\gamma G_z z t_z) dx dz \quad (4)$$

ここで、() の積分を $\bar{\rho}(x, z)$ とおくと、 $\bar{\rho}(x, z)$ は $S(t_x, t_z)$ のフーリエ変換によって求められる。

図 7 に、流速を映像化するためのパルス列を示す。最初の S I P を印加する前には、スピン系は熱平衡状態にあり、二番目の S I P の前には横磁化はないものとする。二番目の S I P の直前の核磁化の分布は、

$$\rho(x, y, z) = \rho_0(x, z) \left[1 - \{1 - m_z(y - v(x, z)\tau_d)\} \exp(-\tau_d/T_1) \right] \quad (5)$$

と表わされる。ここに $v(x, z)$ は点 (x, y, z) における流速、 T_1 は流体中の対象核の縦緩和時間である。よって図 7 のシーケンスで求められる断面内の核磁化分布は、

$$I(x, z) = \int \rho(x, y, z) m_{y'}(y) dy \\ = \rho_0(x, z) \int \left[1 - \{1 - m_z(y - v(x, z)\tau_d)\} \exp(-\tau_d/T_1) \right] m_{y'}(y) dy \quad (6)$$

と表わされる。一番目の S I P が無いときの画像は、(6) で $\tau_d \rightarrow \infty$ に対応し、

$$I_0(x, z) = \rho_0(x, z) \int m_{y'}(y) dy \quad (7)$$

となる。(6) と (7) より、

$$I(x, z)/I_0(x, z) = \int \left[1 - \{1 - m_z(y - v(x, z)\tau_d)\} \exp(-\tau_d/T_1) \right] m_{y'}(y) dy / \int m_{y'}(y) dy \quad (8)$$

となる。これは一つの断層面では $v(x, z)$ にしかよらないので $I(v)$ とみると、図8に示す様に、 v のある範囲では v に関し単調に増加する。よって、これを用いて核磁化の空間分布から v の空間分布を求めることができる。

実験結果

測定は、30MHzの小型NMRイメージングシステムで行った。図9は、 y 軸に平行におかれた7.0mmφの円管の中の水(CuSO₄ドープ、 $T_1 = 210\text{msec}$)が、 $\bar{v} = 1.5\text{cm/sec}$ で流れている場合に、図7のパルス列で測定した画像である。いずれもパルス列の繰返しは1100msecである。 τ_d の間に、最初のSIPの影響を受けていない水が観測領域に流入した様子が見られる。 $\tau_d = 100\text{msec}$ のときの画像と熱平衡状態の核磁化の密度像を用い、図8に示した関係から $v(x, z)$ の分布を求めると図10の様になる。流速分布はNavier-Stokesの方程式の厳密解の一つとして知られるPoiseuille流になっていることがうかがえる。またこの映像法で求めた流速の絶対値は、流量計で求めた流速(平均値)とよく一致しており、この方法が正しく流速分布を求める方法であることを示している。³⁾

文献

- 1) A. N. Garroway: *J. Phys.* D7 (1974) L159.
- 2) J. R. Singer and L. E. Crookes: *Science* 221 (1983) 654.
- 3) K. Kose, K. Satoh, T. Inouye and H. Yasuoka: submitted to *J. Phys. Soc. Jpn.*

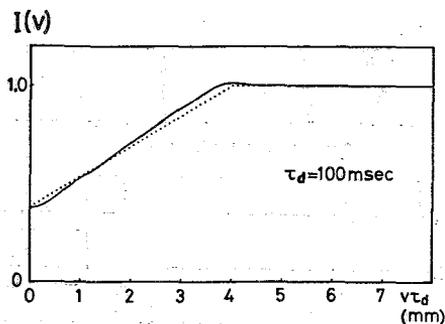


図 8

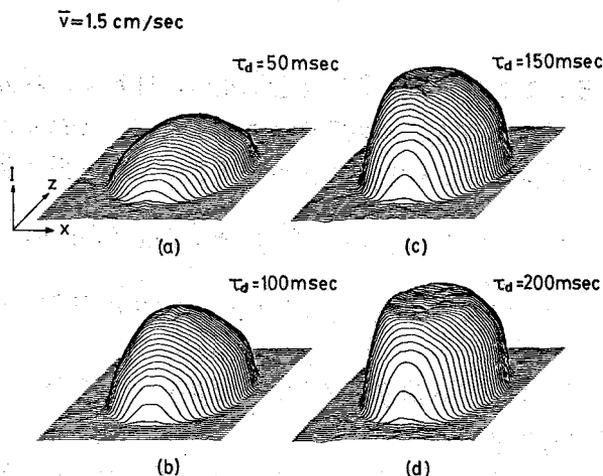


図 9

velocity distribution
in a circular pipe

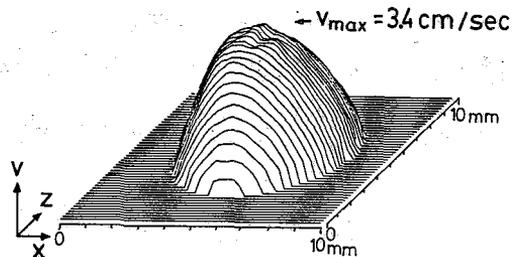


図 10



(電総研) ° 亀井 裕孟、 片山 義明

NMRイメージングは、臨床医学の分野で実用化段階に入りつつあるが、このNMRイメージングの分解能を高めたものがNMR顕微鏡である。NMR顕微鏡は数多くの特長を持っているが、そのうち主なものをあげると、1) 物理的情報とともに化学的情報が描出できる、2) 完全に非破壊的に任意の方向の断層像を得ることができる、の2点であろう。これらは、従来の光学、電子いずれの顕微鏡も持っていなかった特長である。たとえば、細胞内液の流動性の空間分布、特定物質の空間分布、その時間的変化などを画像として可視化することができる。また、組織片などをなんら傷つけることなく、任意の断層面内のさまざまな情報を可視化することが可能である。

さきに、われわれはGX-270型スペクトロメータの室温電流シムをそのまま用いて、磁場勾配を発生させ、NMRイメージングを試みた。そのときの磁場勾配の大きさは、最大1.84 $\mu\text{T}/\text{mm}$ で、約30 μm の分解能を得ることができた。¹⁾ NMR顕微鏡のさまざまな応用分野を考えると、より高い分解能の画像が得られることが望まれる。高分解能化のためには、より大きな線形磁場勾配の発生が必要である。そこで、スペクトロメータの室温電流シムを改造し、安全に、より大きな磁場勾配が発生できるようにし、イメージングの高分解能化を試みたので、その結果について報告する。

【実験】 JEOL GX-270型スペクトロメータを使用した。NMR信号はフーリエ変換までをGX-270で行った。得られた投影スペクトルはData general NOVA-3型ミニコンピュータに転送し、ここでフィルタ再構成法によってNMR画像を得た(図1)。

線形磁場勾配を発生させるため室温電流シムを改造した。xおよびy方向の線形磁場勾配発生コイルは、Nazarovら²⁾にした

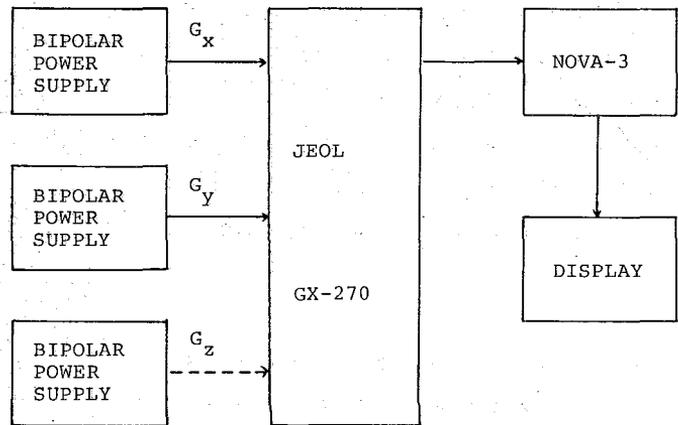


図1. NMR顕微鏡ブロック図

かめい ひろたけ、 かたやま よしろう

がって作製した。概念図を図2に示す。x、y方向の線形磁場勾配の大きさは、 $25 \mu\text{T}/\text{mm}$ まで安定に得ることができた。磁場勾配発生用電源としてバイポーラ型外部制御電源を使用した。

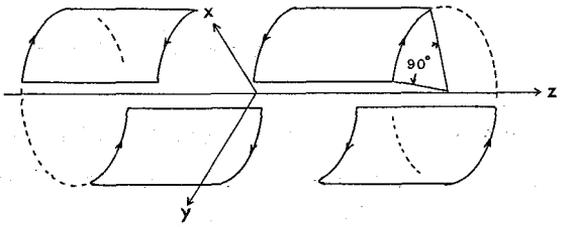


図2. 磁場勾配コイル

【結果】 磁場勾配の線形性 直径3.7mmの水柱の投影スペクトルを図3に示す。このときの線形磁場勾配の大きさは、 $13.2 \mu\text{T}/\text{mm}$ である。図から明らかなように実験値と計算値はよく一致し、磁場勾配の線形性は十分満足すべきものである。

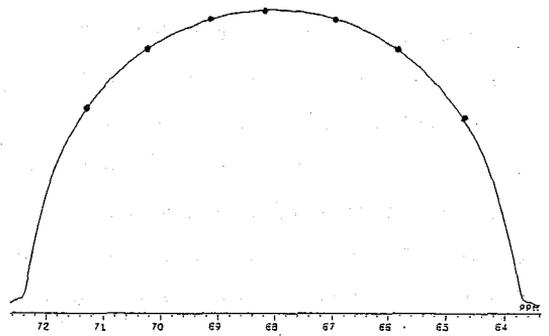


図3. 円柱水(3.7mmφ)の投影スペクトル

NMR画像 分解能評価用ファントムは前回とほぼ同様のものを用いた。断面図を図4に示す。斜線部分が水、白い部分はガラスである。このファントムの投影スペクトルの例を図5に示す。S/Nは十分高く良好な結果が得られている。64投影スペクトルを用いて得られた試料中央部分のNMR画像を図6に示す。

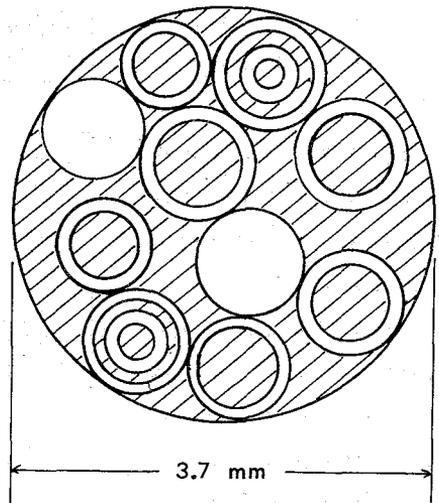


図4. ファントムの断面図

面内分解能は、 $10 \mu\text{m}$ を割りマイクロシオードに入っている。この値は、投影スペクトルのデータポイント数および投影数を考慮すると十分満足すべきものである。現在使用しているコンピュータの容量から測定条件に制限を受けているが、目下、改良を進めており、さらに高分解能化が可能であろう。

NMR顕微鏡は分解能という点では、光学顕微鏡に及ばないが、NMR顕微鏡像に含まれる情報量は他のいかなる顕微鏡より多い。この点は分解能の低さを補って、なおあまりあるものがある。将来、広範な分野での利用が期待される。

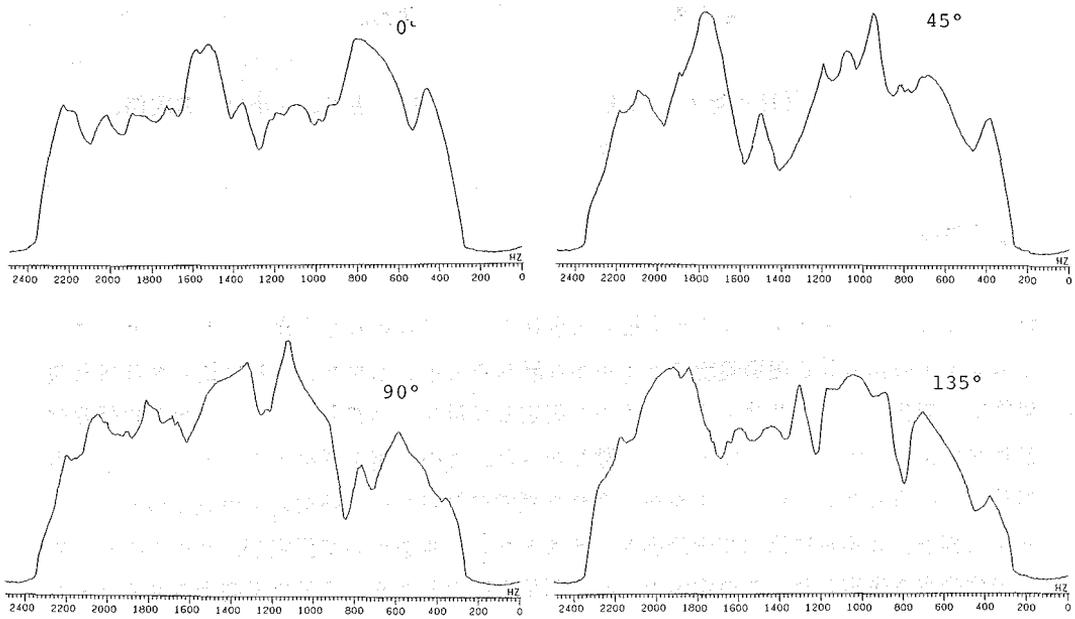


図 5 . ファントムの投影スペクトル

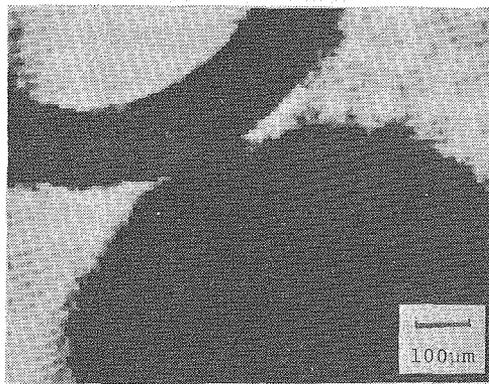


図 6 . ファントム中央部のプロトン密度像、分解能 $10 \mu\text{m}$ 以下

文献

- 1) 亀井、片山： 第 22 回 NMR 討論会 (1983, 11, 京都) .
- 2) N. B. Nazarov et al. : Cryogenics, 12, 470 (1972) .

(日本電子) ○ 梅田 雅宏、 江口 恵二、 小川 秀次郎、
永井 壮市

はじめに

我々は今までサーフェイスクoilを用いて生体の ^{31}P -NMRを測定してきた。サーフェイスクoilの作るRF磁場強度はcoilから離れると小さくなり、それに従ってNMR磁場強度も変化する。⁽¹⁾ サルフェイスクoilで測定しNMRスペクトルに、生体のどの部分がどれだけ寄与しているかを知ることが難しかった。この問題を解決するために、前回の本討論会で報告したように、coilから離れた点でのNMR信号強度、その点での 90° パルス幅を、coilに比べて十分小さなテストサンプルを用いて測定し、coilのRF磁場強度分布を決定した。この測定で、測定部位を限定したり、SN比を向上させるcoil形状を評価し、サーフェイスクoil法に用いる最適のcoil形状を知ることができた。しかし、空気中でのRF磁場強度分布は生体中でのRF磁場強度分布とは異なるので、さらにこのcoilを用いて、生体中でのそれを調べておくことが、サーフェイスクoil法の使用に当たっては重要と思われる。最近サーフェイスクoilを用いて、生体内の一部を選択的に観測するためのパルスシーケンスが提案されている。^(2,3) これらのパルスシーケンスを用いて局部測定を行なうにも、生体内でのRF磁場強度分布を知る必要がある。そこで我々は、最近研究が進んでいるNMRイメージングの手法を用いて、サーフェイスクoilによるリン酸の生理食塩水を用い、この溶液中の空間の各点のNMR信号強度を測定し、coilのRF磁場強度分布を求める方法を試みた。また生理食塩水の他、マウスを試料として同様の実験も行なった。これにより、生体中の各点のNMR信号強度とRF磁場強度を見積もることができた。また pulse width modulation 法⁽³⁾による局部測定の状態をイメージ像の上で確認できた。

方法

イメージの方法としては、spin warp 法⁽⁴⁾を用いた。NMR実験系を図1に示す。50%リン酸の生理食塩水溶液をセルAに入れ、これをサーフェイスクoil Bに取り付け、セル

うめだ まさひろ、えぐち けいじ、 おがわ ひでじろう、 ながい そういち

A中の水及びリン酸の ^1H -NMR,及び ^{31}P -NMRイメージングを行なった。実験に用いたコイルは5ターンの渦巻き型コイルである。⁽⁵⁾ この時、パルス幅は一定にし、観測RFパルスの強さをアッテネーターで変化させ、イメージ像上の各点のNMR信号強度の変化を調べた。また、図2に示すのは空気中でのRF磁場強度の測定結果と比較するための実験系である。水又はリン酸を入れたキャピラリーを、コイルから4mm離れた点に置き、 ^1H 及び ^{31}P の 180° パルス幅に相当するときのアッテネーター値を調べた。セルAの代わりに生体試料としてマウスを用いて ^1H -NMRイメージングも行なった。さらに、局部測定のためのパルスシーケンスの一例として、前回の本討論会で我々が提唱した pulse width modulation 法を spin warp 法と併用して、セルA中の ^{31}P -NMRイメージングを行なった。今回用いた spin warp 法は、 180° パルスを使わずに、勾配磁場の反転によってエコーが生じるので、RFの不均一性はエコーの発生には影響を与えないと考えられる。

結果

図3に図1の実験系で測定した ^{31}P -NMRイメージングを示す。図3(a),(b),(c)はそれぞれ観測RFパルスの強さを制限するアッテネーター値を26dB,20dB,14dBと比べて、RFパルスのパワーを強くした場合のコイル垂直断面上のNMR信号の強度変化を示している。コイルは図の下方に置かれている。各像の右側にある曲線は、各像の中央線上の信号強度を示している。図3(c)

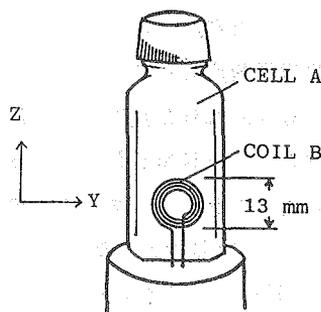


図1 溶液内にサーフェイスコイルが作るRF磁場強度分布を測定するための実験系

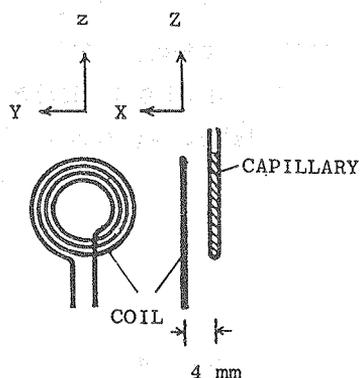


図2 空気中でのRF磁場強度分布測定のための実験系

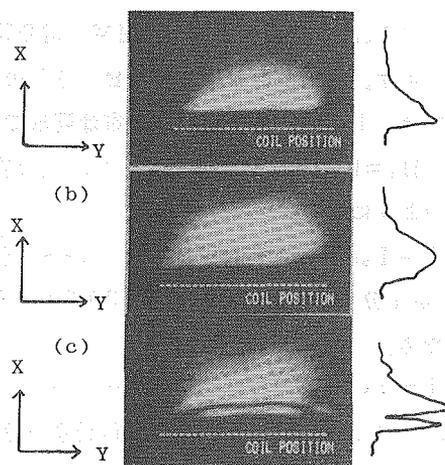


図3 溶液内のコイル垂直断面上の ^{31}P -NMR信号強度を示すイメージ像(左)とその中央線上の信号強度曲線(右) (a) 26dB (b) 20dB (c) 14dB

のA点では信号強度が低くなっているが、後述するように、この点が 180° パルス幅に相当するRF磁場強度の点であると考えられる。コイルから4mm離れた点に置かれたキャピラリーに内の ^{31}P -NMR信号の 180° パルス幅に相当するRFパルスパワーのアッテネーター値は16dBであった。図4に図1の装置での ^1H -NMRイメージングと、その中央線上の信号強度曲線を示す。図5にpulse width modulation法を用いて行なった ^{31}P -NMRイメージングの結果を示す。右側には同じく像中央線上の信号強度曲線を示した。図6に ^{31}P (109MHz)と ^1H (270MHz)での試料内部の信号強度曲線を示す。

考察

一般に強度 H_1 のRF磁場を t 時間かけた時に得られるNMR信号強度は次式で表わされる。

$$I = I_0 \sin(\gamma H_1 t) \quad \text{--- (1)}$$

ここで I_0 は着目点での最大NMR信号強度を示す。空気中におけるキャピラリーの測定では、 I_0 と H_1 の空間強度分布は同形であった。 $H_1 = kI_0$ と近似すると、(1)式は次式のようになる。

$$I = I_0 \sin(\gamma k I_0 t) \quad \text{--- (2)}$$

H_1 が十分小さければ(2)式は(3)式のようになる。

$$I = \gamma k I_0^2 t \quad \text{--- (3)}$$

(3)式はフリップアングル($\gamma H_1 t$)を十分小さく設定して測定した時のNMRイメージ像が、コイルの作るRF磁場強度の自乗の分布を反映することを示す。図3(a)のイメージ像を測定した時、コイル近傍のフリップアングルが十分小さいと仮定されるならば、このイメージ像の信号強度から、コイルの作るRF磁場信号強度分布を知ることができる。又、

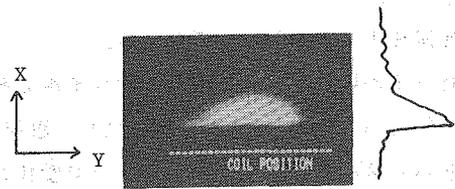


図 溶液内のコイル垂直断面上の ^1H -NMR信号強度を示すイメージ像(左)とその中央線上の信号強度曲線(右)

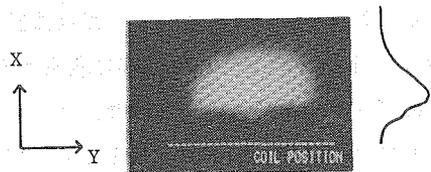


図 pulse width modulation法を用いて行なった溶液内のコイル垂直断面上の ^{31}P -NMR信号強度を示すイメージ像(左)とその中央線上の信号強度曲線(右)

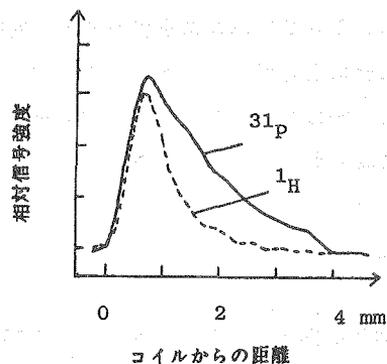


図6 ^{31}P -NMR(109MHz) ^1H -NMR(270MHz)での中央線上の溶液内部の信号強度曲線

図3(c)の中央信号強度曲線のA点部分の H_1 は、(1)式から、フリップアングルが 180° に相当していると考えられる。このように、フリップアングルが 180° になる点のHをプロットすることでも、物質内のRF磁場強度(H_1)の分布を知ることができる。

H_1 を強くして測定した図3(c)では、(a),(b)よりも、内部及びコイル近傍両方の信号強度が高いのに比べ、pulse width modulation法を使った図5のイメージ像ではコイル近傍の信号強度は低くなっており、内部の信号強度が高くなっている。このことは pulse width modulation法により、サーフェスコイルを用いて物質内部のNMRスペクトルを選択的に測定可能であることがより明確になった。

今回我々はNMRスペクトル中に強い信号を1つだけ持つサンプルを用いて、イメージングによるRF磁場強度を測定したが、生体中のリン化合物のように広い周波数範囲に信号が存在するような場合、ケミカルシフトイメージング法^(6,3)を用いて、生体内部でのRF磁場強度分布を知る必要がある。または、 ^{31}P -NMRの代わりに、 ^1H -NMRを用いてRF磁場強度を評価する方法も考えられる。この場合、RFの周波数の違いによる電磁波の通過度合の違いを考慮しなければならない。このためには図6に示したような内部信号強度曲線が重要になる。Bendallらも、深部測定のためのパルスシーケンス⁽²⁾をイメージ手法によって評価している。⁽⁷⁾ 今後、イメージ手法はNMRコイルのつくるRF磁場強度分布を調べるだけでなく、選択性を高くするパルスシーケンスや、コイル形状を評価するのに有効な手段となると考えられる。

文献

- (1) J.J.Ackerman, T.H.Grove, G.G.Wong, D.G.Gadian, and G.K.Radda, Nature, Vol. 283 167-170 (1980)
- (2) M.R.Bendall J.M.R. Vol. 53 365-385 (1983)
- (3) 梅田雅宏、江口恵二、小松国人、永山国昭、豊岡照彦 NMR医学 Vol. 4 134-135 (1984)
- (4) J.M.S.Hutchison, W.A.Edelstein,etal J.Phys E : Sci. Instrum, 13 : 947-955,(1980)
- (5) 湯浅龍彦、桑原武雄、江口恵二、梅田雅宏、小川秀次郎、第22回 NMR討論会講演要旨集 259-261 (1983)
- (6) D.H.Laurance,S.Subramaniam, J.M.R. Vol. 56 314-317 (1984)
- (7) M.R.Bendall society of Magnetic Resonance in Medicine Theird Annual Meeting, 45-46 (1984)

(富山医大 戸)

麻生正邦, 亀井哲也, 日原敏彦, 柿下正雄

1. はじめに

高分子水溶液において、水分子プロトンの緩和時間は著明に短縮する。この機序として、従来より数種のモデルが提案されているが、近年、高分子表面における水分子プロトンと高分子プロトンとの交差緩和(cross relaxation)が主因であるとする説が認められてきている¹。そこで我々は、交差緩和モデル^{2,3}に基づき、水分子プロトン群と高分子プロトン群を磁氣的に相互作用する2スピン系と見做し、両系間の交差緩和速度をNOE (nuclear Overhauser effect)の時間的变化より計測すること(時間依存性NOE)を試みた。今回は、この“時間依存性NOE”により、水分子プロトン群-高分子プロトン群間の交差緩和速度が、近似値として簡便に得られることを示すと共に、若干の考察を加えて報告する。

2. 試料と方法

試料調整：ヒト血液をEDTA採血管にて採取し、生理食塩水で2回、等張食塩重水で4回遠心洗浄後、血漿、白血球、血小板を除去し、沈渣赤血球(ヘマトクリット96%)および上清を試料とした。試料は、NMR試料管(φ5mm)に挿入し、アルゴンガス(99.999%)を吹き込んで溶存酸素を置換した。

NMR測定：装置は、Varian XL-200 NMR spectrometer (^1H :200MHz)を使用した。パルス系列は、 $[-\tau(\omega) - \text{observation pulse}(45^\circ) - t_A - t_D -]n$ とし、 τ を変数として、高分子プロトン領域を照射することによる水分子プロトンシグナル強度の時間的变化を計測した。但し、 τ は照射時間、 ω は照射周波数、 t_A はデータ取得時間、 t_D は遅延時間、 n は積算回数である。測定条件は、沈渣赤血球NMR測定では、 $t_A = 0.8 \text{ sec}$, $t_D = 10 \text{ sec}$, $n = 20$ 回、スペクトル幅10000 Hz。上清NMR測定では、 $t_A = 4 \text{ sec}$, $t_D = 120 \text{ sec}$, $n = 10$ 回、スペクトル幅2000 Hzとした。

3. 結果と考察

図1は、非照射時($\tau = 0 \text{ sec}$)の沈渣赤血球および上清 ^1H スペクトルであり、シグナル強度の基準としたものである。沈渣赤血球 ^1H スペクトルでは、高分子領域(alip. Ratic region, anomatic region)にブロードなシグナルが認められる。図中の矢印A, B, Cは、以下の実験での照射部位を示している。

あそうまさくに、かめいてつや、ひほうとしひこ かきしたまさお

図2は、3種の照射
 パワー（0.8 watt,
 0.2 watt, 0.08
 watt）を用い、図に
 記した照射位置、照射
 時間で照射した際の沈
 渣赤血球¹H スペクト
 ルである。照射位置、
 照射パワーが一定では、
 水分子シグナル強度も
 高分子領域シグナル強
 度も、照射時間に比例
 した減少を示している。
 また、照射パワー、照
 射時間が一定では、照
 射パワー0.8 wattで
 照射時間200 m. sec.
 以降の場合を除き、照
 射部位 A と B で、水
 分子シグナル強度も高
 分子領域シグナル強度
 も差異が認められる。
 図3は、沈渣赤血球
¹H スペクトルの水分
 子シグナル強度および
 高分子領域シグナル強
 度（チャート紙上の面
 積）、上清¹H スペク
 トルの水分子シグナル
 強度、それぞれの飽和
 度（ $S - S_0 / S_0$ および
 $P - P_0 / P_0$ 、但し、 S 、
 P は水分子および高分
 子領域シグナル強度で、
 S_0 、 P_0 はそれぞれの
 平衡値を示している。）

図1.

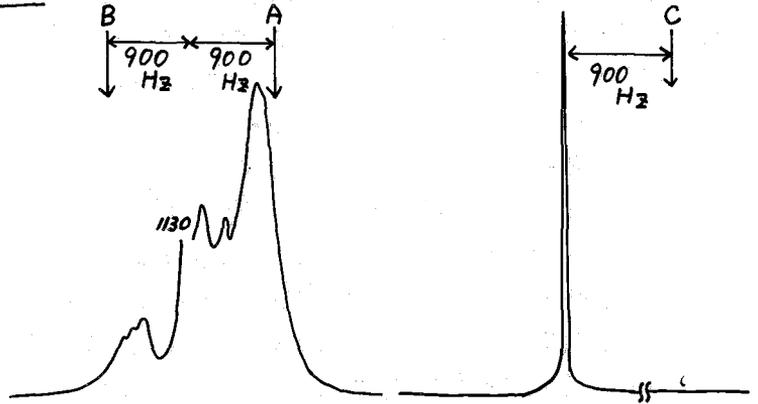
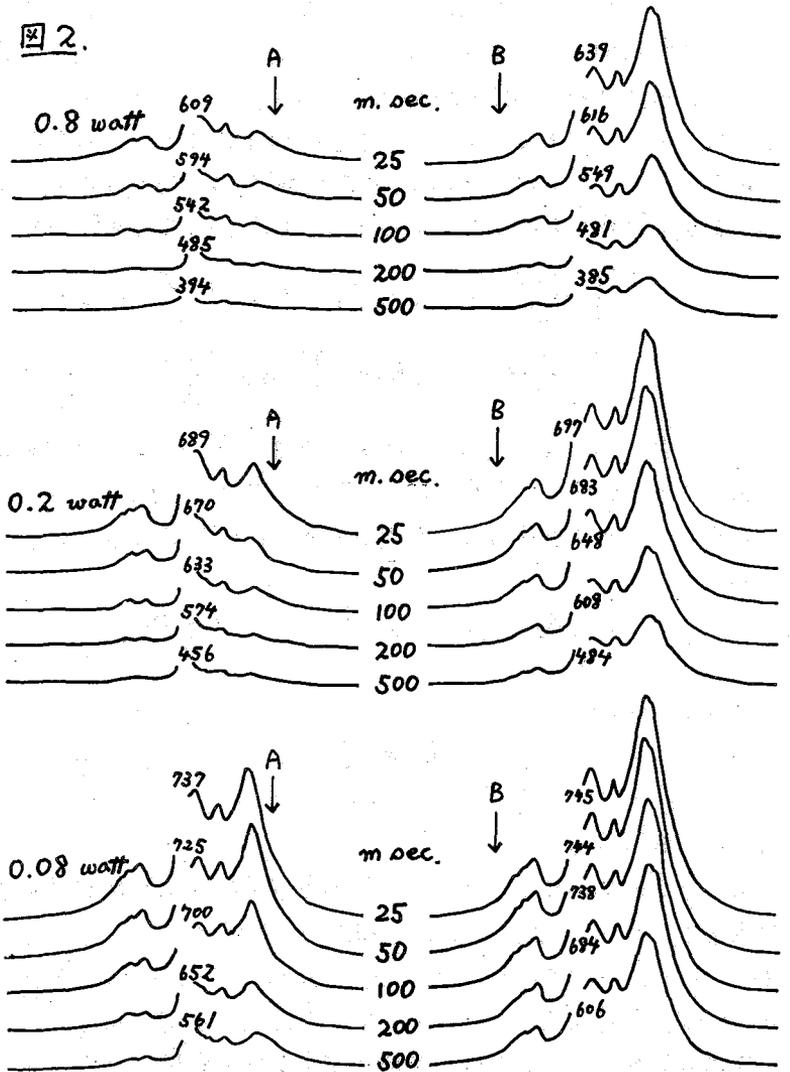


図2.



と照射時間との関係を示したものである。上清 ^1H スペクトルでは、水分子シグナル強度に変化を認めないが、沈渣赤血球 ^1H スペクトルでは、高分子領域シグナル強度の減少に伴い、水分子シグナル強度も減少を示している。以上より、水分子プロトンと高分子領域プロトンとの間に磁化の移動 (Transfer of Magnetization) の存在することは明らかであり、試料が D_2O 優位状態にあることから、化学交換 (水分子プロトンと高分子交換性プロトンとの) の影響は軽微と考えられ、磁化の移動は、主に、水分子プロトンと高分子プロトンとの交差緩和によるものであることが示唆される。

一般に、高分子プロトンでは、 $\omega_0^2 T_2^2 \gg 1$ (ω_0 は共鳴周波数、 T_2 は回転相関時間) が成立し、分子内交差緩和に基づくスピン拡散により、高分子プロトン群は比較的短時間に均一なスピン温度に到達する⁵。事実、図2で見られるように、照射により、高分子プロトン群はほぼ均一なシグナル強度の減少を呈する。従って、緩和速度測定タイムスケールでは、高分子プロトン群を均一系と見做すことができる。一方、高分子水溶液中の水分子の存在状態に関しては種々のモデルが提案されているが、3状態モデルによれば、高分子表面における水分子の滞在時間は 10^{-6} sec. のオーダーであり、水分子プロトン群も均一系と見做すことができる。そこで、交差緩和モデルでは、水分子プロトンスピン群 (以下 S) と高分子プロトンスピン群 (以下 P) は、磁気的に相互作用する2スピン系として扱われ、化学交換の影響を無視できると仮定した場合、磁化の挙動は次式で記述される。

$$\frac{d}{dt} \cdot \frac{S - S_0}{S_0} = -(F \cdot R_S + R_T) \cdot \frac{S - S_0}{S_0} + R_T \cdot \frac{P - P_0}{P_0} \quad \dots\dots\dots ①$$

$$\frac{d}{dt} \cdot \frac{P - P_0}{P_0} = -(R_P + \frac{S_0}{P_0} \cdot R_T) \cdot \frac{P - P_0}{P_0} + \frac{S_0}{P_0} \cdot R_T \cdot \frac{S - S_0}{S_0} \quad \dots\dots\dots ②$$

但し、 R_S 、 R_P は S と P の縦緩和速度、 R_T は両スピン系間の交差緩和速度、 F は水中のプロトン (^1H) とドイテロン (D) の比である。

ここで、 P のみを照射し、瞬時に飽和 ($P = 0$) が得られるならば、十分に短い照射時間の範囲で、

$$\frac{S - S_0}{S_0} \doteq 0 \quad \dots\dots\dots ③ \quad \frac{P - P_0}{P_0} = -1 \quad \dots\dots\dots ④$$

が成立し、式①より、

$$\frac{d}{dt} \cdot \frac{S - S_0}{S_0} \doteq -R_T \quad \dots\dots\dots ⑤$$

の関係が得られる。

そこで、上清水分子シグナルの飽和度を基準として平衡値を設定すると (すなわち、平衡値として $S'_0 = S_0 \times$ 上清の飽和度を用いる。)、図3で見られるように、照射パワー 0.8 watt、照射時間 100 msec. 以内で、 $0 > \frac{S - S'_0}{S'_0} \gg -1$ 、 $0 \gg \frac{P - P_0}{P_0} > -1$ が成立し、近似値として $R_T \doteq 1.5 / \text{sec.}$ が得られる。

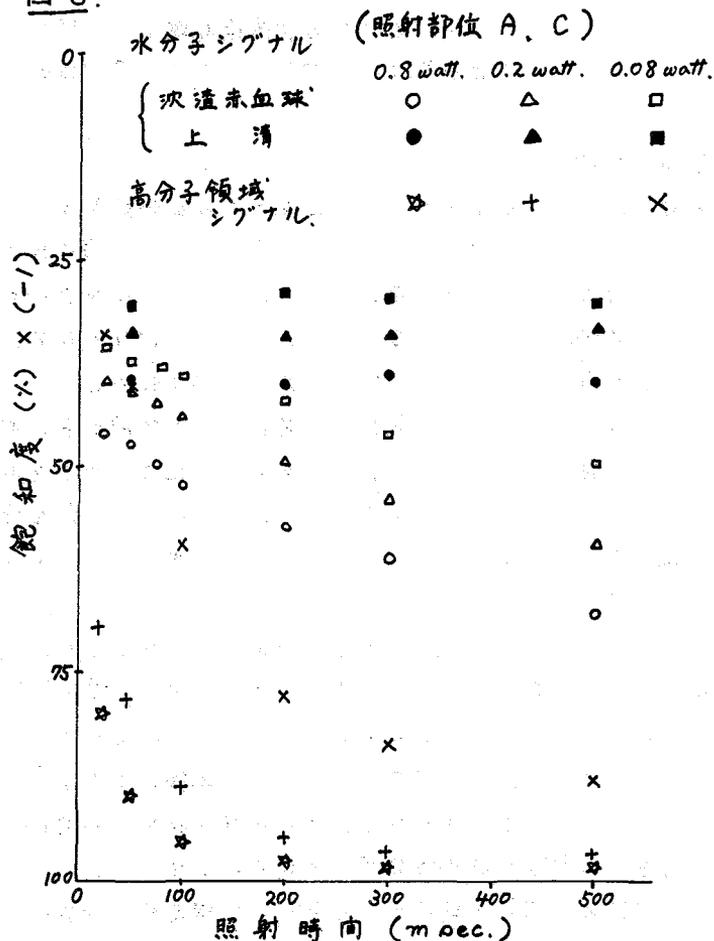
以上の結果は、 D_2O 優位状態で化学交換の影響は無視できると仮定したものであるが、

実際には、影響も完全に無視することはできないものと思われ、照射部位AとBで、高分子領域シグナル強度差に比して水分子シグナル強度差が著明で無いこと、

0.8 watt, 200 msec. 以降で、水分子シグナル強度が逆転することなどは、照射部位Bで、-NHプロトン領域を直接照射していることが原因ではないかと考えられる⁶。

最後に、今回の実験で得られた交差緩和速度値は、ヘマトクリット96%、室温、脱ガス、条件下のものであり、異なる条件下では異なる値が得られる。同一条件下では、データの再現性も良好であり、本法は、水・高分子間交差緩和速度の近似値を簡便に得る手段として有用と思われる。

図 3.



(文献)

1. B. M. Fung and T. W. McGaughey, *J. Magn. Reson.* 43, 316 - 323 (1981)
2. B. D. Hilton, E. Hoi, and R. G. Bryant (1977) *J. Am. Chem. Soc.* 99, 8483 - 8490
3. S. H. Koenig, R. G. Bryant, K. Hallenga, and G. S. Jacob (1978) *Biochemistry* 17, 4348 - 4358
4. 麻生正邦, 亀井哲也, 柿下正雄, 第4回核磁気共鳴医学研究大会講演要旨集, 118 (1984)
5. 赤坂一之, *化学* 34, 338 (1979)
6. J. Feeney and G. C. K. Roberts, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 205 (1971)

(はじめに)

生体におけるエネルギーの転換はすべての生命活動の根幹であり、また筋肉の収縮は、生体におけるエネルギー転換過程を代表する。筋収縮においては、ATPの化学エネルギーが力学的エネルギーに転換されるが、クレアチンキナーゼ反応の存在のために実際に収縮によって減少が観測されるものは、ATPではなくして、クレアチン燐酸(PCr)である。またこれと同時に無機燐酸(P_i)の増大が観測される。

筋肉におけるエネルギー転換の研究には、力学的エネルギーの産出と、化学的エネルギーの利用の対応を調べることが必要である。化学分析法を用いる化学エネルギーの利用の研究は、この方法が破壊的であるためにたいへんな困難を伴う。 ^{31}P NMRはその非破壊的特性のために、化学エネルギー利用の経時的変化を調べる上でたいへん有利な方法である。

我々は筋収縮におけるエネルギー利用の経過をできるだけよい時間分解能をもって測定する目的で大口径NMR試料管中で、できるだけ大量の筋組織を生理的狀態に保ち、 ^{31}P スペクトルのS/Nを向上させる方法を用い、上にのべたような、収縮のエネルギー転換の研究を行ってきた。その結果、これまでに収縮によるクレアチン燐酸の消費は収縮の経過中だけに生じているのではなく、その一部は収縮が弛緩した後さらに分解されること(ATPあるいはPCrの収縮後分解)が明らかとなった。

^{31}P NMRを用いて観測されるPCrの収縮後分解が真に化学的過程であるならば、その経過は温度依存性を示すはずである。また、その温度依存性から、化学過程の性質を知ることにも可能となる。

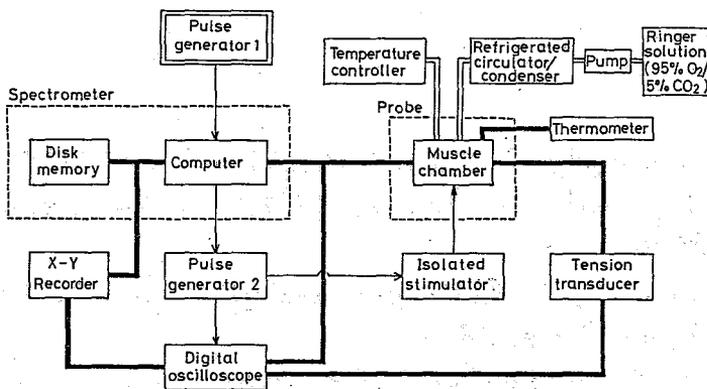


図1. NMRによる筋収縮の研究を行うためのシステムのブロックダイヤグラム。太い実線はデータの移動を、細い実線はパルスによる制御を、また中空の結線はRinger液などの移動を示す。スペクトロメータは外部からのパルスで制御する。

やまだ かずひろ, たのくら まさる

(方法)

Bruker WM 200 wb スペクトロメータを用い、外径25mm 試料管を筋チエンバーとした。約200gのウシガエルからそれぞれ1対の縫工筋を摘出し、8対の縫工筋を1回の実験に用いた。6mM Pipes Ringer 液 (pH7), あるいは 18mM bicarbonate Ringer (5% CO₂, 95% O₂ で飽和, pH7) を用いて筋チエンバーを灌流した。スペクトル観測には60°RFパルスを照射し、図1に示すように外部パルスをを用いてスペクトロメータをトリガーして、RFパルスインターバルを正確に4秒とした。30~60分おきに筋を刺激し、収縮と同期したFIDを積算してS/Nの向上をはかった。

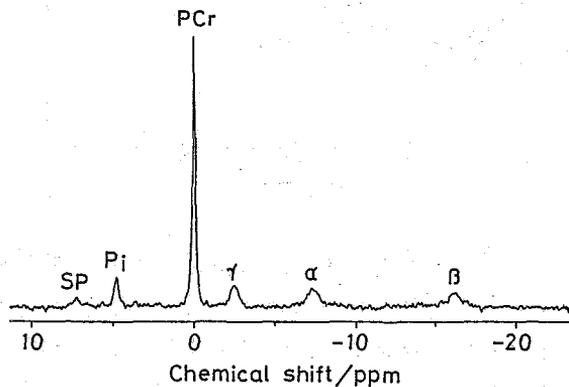


図2. 筋肉の ³¹P NMR スペクトル。1回の60°RFパルス照射による、いわゆる single scan によって得られたスペクトル。筋肉はウシガエル縫工筋8対(約10g)を用いている。実際には筋肉を16回収縮させ収縮に同期したscanを積算しているが、“シャッタースピード”は10~20ミリ秒である。Line broadening, 5Hz. 18mM Na bicarbonate Ringer (5% CO₂, 95% O₂ 飽和)。1°C。無機磷酸 (P_i) の化学シフトの位置から、細胞内pHは7であることがわかる。

(結果と考察)

上にのべたような方法を用いて得られた結果は、すでに第21回及び第22回 NMR 討論会において報告したように、4°C 附近での測定結果は、P_i は収縮の弛緩直後にその遊離量が最大であり、直ちに回復が開始して、指数曲線にしたがって次第に減少する。一方、PCr は、収縮の弛緩後さらに数分間減少が持続した後回復過程が明らかとなり、収縮前のレベルに向って指数曲線にしたがって増大する(図3)。

このようにして明らかにされたATPの収縮後分解のメカニズムについては、1) PCr 減少と P_i 増大との間のくい違い、及び 2) PCr の収縮後分解の絶対量が約 1mmol·kg⁻¹ であることから、収縮タンパクであるアクチン(A)とミオシン(M)の間の反応中間体(A-M·ADP)が比較的長い寿命をもつとするとよく説明されることを指摘してきた。

このようなATPの収縮後利用が、上にのべたような化学的過程に由来するとき、この過

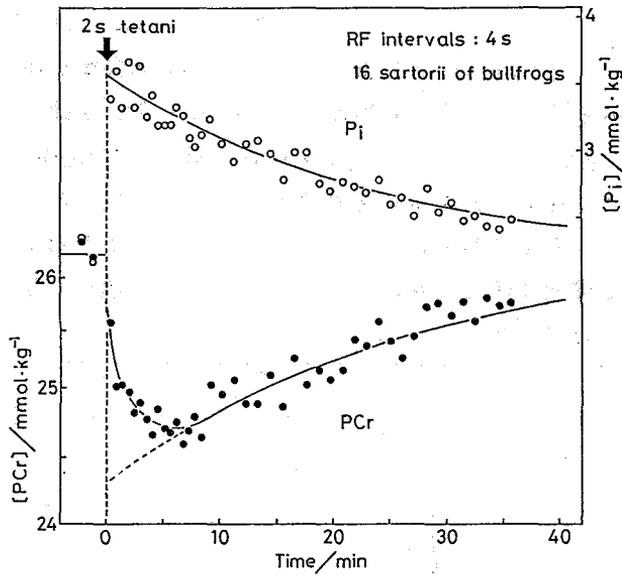


図3. 収縮による P_i の増加と PCr の減少, およびその回復の時間的経過. ウシガエル 縫工筋, 4°C . 時間零において, 短い強縮刺激を加え, 筋を2秒間持続的に収縮させた. 60°RF パルスを4秒おきに照射し, 8ヶのFIDを積算して測定の単位とし(時間分解能32秒), さらに同じ収縮を16回くり返して, 収縮と同期したFIDを積算した. その結果収縮の直後から約4分間, PCrの減少量は P_i の増加量よりも小さいことが示されている. 実線は P_i の回復の経過にフィットさせた指数関数である. PCrの回復過程にも同じ曲線を描いてある. 6mM Pipes Ringer液 ($5\% \text{CO}_2$, $95\% \text{O}_2$ で飽和) で高速灌流を行った ($\sim 60 \text{ ml/min}$).

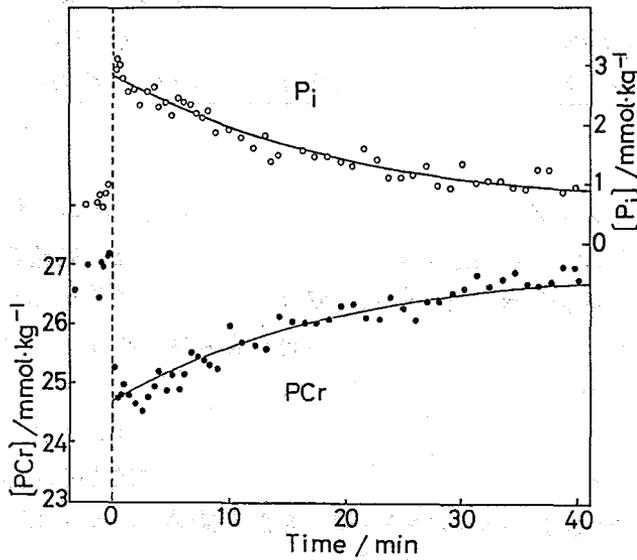


図4. 図3と同様の測定を10で行った結果. 60°RF パルスを4秒おきに照射し, さらに

同じ収縮を16回くり返して、収縮と同期したFIDを積算した。最も良い時間的分解能を必要とするところでは4個のスペクトルについての測定結果を平均した(時間分解能, 16秒)。結果は、収縮後のごく短い時間を除くと、 P_i の増大とPCrの減少は良く一致して居り、4°Cにおけるような両者の不一致はみとめられない。実線は P_i の回復の経過にfitさせた指数曲線。18mM bicarbonate Ringer液(5% CO_2 , 95% O_2)で灌流した。

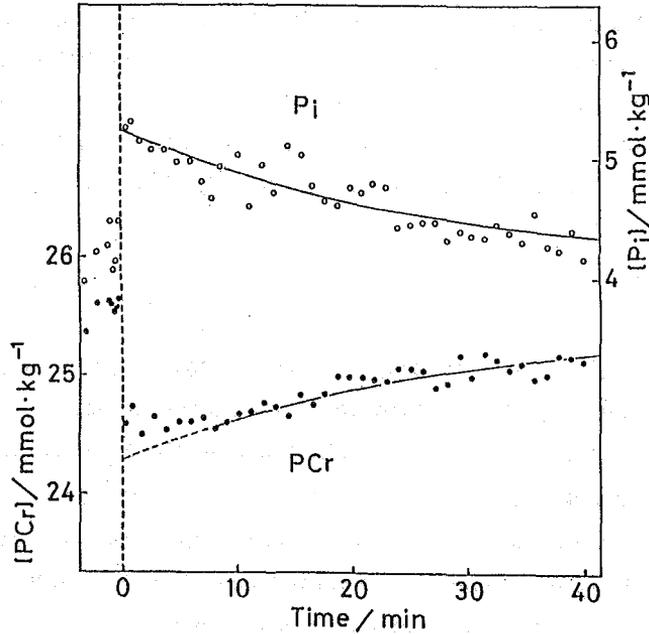


図5. 図2, 3と同様の測定を行った結果。測定方法の詳細は図4と同様である。低温であるためにATPの消費量が少ないので、よいS/Nが得られないが、収縮後の回復の経過の初期の約10分間、PCrの減少量は P_i の増加量よりも小さい。

程は温度依存性が大きいはずである。1°Cおよび10°Cにおいて同様の実験を行った結果は、図4及び図5に示すように、1°Cにおいては P_i 遊離とPCr減少の間の相違がさらに長い期間持続するのにたいして、10°Cにおいては、 P_i とPCrの相違が殆んどみとめられなくなることが明らかとなった。

以上の結果は、 ^{31}P NMRにおいて明らかにされた収縮後のPCrの遅延性の減少が、収縮後のATP利用の過程によるものであり(化学的過程)、また上にのべたような収縮蛋白の関与するメカニズムによることを支持している。

(謝辞)

本研究の遂行には、大学院学生 北野敬明氏の協力を得たので記して感謝したい。

(文献)

山田・田倉・米谷(1982) 才21回NMR討論会講演要旨集 133-136

山田・田倉・(1983) 才22回NMR討論会講演要旨集 277-280

Yamada, K. & Tanokura, M. (1983) Jpn. J. Physiol. 33, 909-919.

(京都府立医科大学・第一生理)

○ 瀬尾芳輝、吉崎和男、西川弘恭、森本武利

目的

嫌気条件下で筋収縮を行なう時、エネルギー供給機構として嫌氣的解糖とローマン反応の2つがある。筋収縮によりATPが消費されると、まず、ローマン反応によりクレアチン磷酸からATPが供給される。ついで、解糖によるATP産生がおこなわれる。本研究は、嫌気条件下での筋収縮時エネルギー供給への両機構の寄与を明らかにすることにある。筋の仕事量を変化させ、その時の乳酸産生量とクレアチン磷酸減少量を、各々、 ^1H -および ^{31}P -NMRを用い測定した。この結果より、嫌氣的解糖とローマン反応による化学エネルギー産生量を算出し、各々の寄与率を求めた。

試料と方法

食用蛙縫工筋(約0.8g)を摘出後、1時間以上5mMグルコースを添加したリンガー液(100%窒素ガスにより脱酸素、pH7.4)中におき、実験に用いた。筋収縮は窒素ガス気流中で電気刺激により1Hzの単収縮を行なわせ、等張性トランスデューサーにて収縮高を記録した。負荷として5, 10, 15gの3種を用い、負荷と全収縮高の積より仕事量を算出した。筋収縮の前後で、 ^1H -NMR法により乳酸量を、 ^{31}P -NMR法によりクレアチン磷酸、ATP量を測定した。装置はPFT-100NMR(日本電子)、10mmの試料管口径のプロープを用いた。 ^1H -NMRスペクトル測定には選択的水飽和法(1)を用いた。水の共鳴周波数を5秒間照射し水の磁化を飽和させたのち、45°パルスによりFIDを得た。200回積算(20分間)でスペクトルを得た。乳酸量は、乳酸のメチル基の信号面積(図1)より求めた。スペクトル測定は、0.6秒間隔の30°パルスでFIDを得た。2000回積算(20分間)でスペクトルを得た(2)。燐化合物の定量はDawsonらの方法(3)を用いた。クレアチン磷酸、ATP量は、各々、クレアチン磷酸、 β -ATPの信号面積より求めた(図2)。測定パルスのくりかえしによる信号の飽和は、パルスのくり返し時間を4.5秒とし測定したスペクトルにより補正した。細胞内pHは ^1H -NMR法ではカルノシンの $\text{C}_2\text{-H}$ の化学シフトから、また ^{31}P -NMR法では無機燐酸の化学シフトから算出した(4, 5)。

表1.

		mean \pm SD	n
Lactate	(mmol/kg)	4.9 \pm 2.3 *	34
pH _i		7.15 \pm 0.10 *	34
Creatine phosphate	(mmol/kg)	21.2 \pm 1.4 **	27
ATP	(mmol/kg)	5.2 \pm 0.9 **	27
pH _i		7.22 \pm 0.13 **	27

* : ^1H -NMRによる測定結果, ** : ^{31}P -NMRによる測定結果

結果および考察

1. 静止筋の乳酸、クレアチン磷酸、ATP量および、細胞内pH

表1に嫌気条件下で1~3時間インキュベートした筋の乳酸量、クレアチン磷酸量、ATP量、細胞内pH(pH_i)を示す。いずれの値もインキュベートした時間との間に相関は認められない。乳酸量のばらつきが多少あるが、クレア

せお よして、よしざき かずお、にしかわ ひろやす、もりもと たけとし

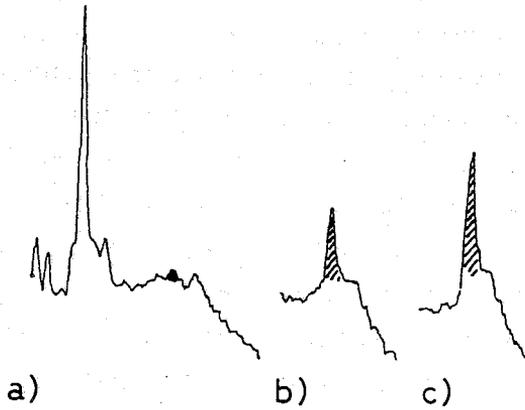


図 1. 筋仕事に伴う¹H-NMR スペクトルの変化。
乳酸のメチル基のシグナルを斜線で示す。

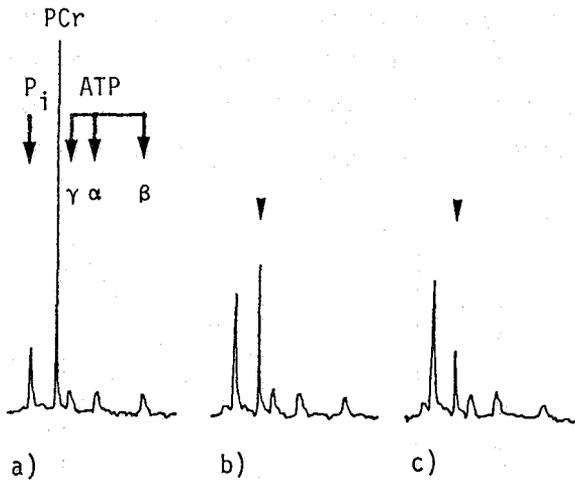


図 2. 筋仕事に伴う³¹P-NMR スペクトルの変化。
信号の同定を a) に示す。b), c) の矢印
はクレアチン磷酸の信号を示す。

チン磷酸量の変動係数は7%と小さく、筋の条件はよくそろっていると考えられる。

2. 仕事に伴う¹H-NMRスペクトルの変化

図 1 に筋収縮前後の¹H-NMRスペクトルの乳酸部分を示す。乳酸のメチル基の信号(図中斜線部)は静止筋では1.9 mmol/kg muscleと小さい(a)。b) および c) は、5g 負荷で100 回収縮および200 回収縮を行なったのちの乳酸のシグナルである。各々、11.4 mmol/kg muscle、20.7 mmol/kg muscleとなっており、嫌氣的解糖によるエネルギー産生が行なわれたことを示している。

3. 仕事に伴う³¹P-NMRスペクトルの変化

図 2 に筋収縮前後の³¹P-NMRスペクトルを示す。a) は静止筋のスペクトルで、無機磷酸(P_i, -4.9 ppm)、クレアチン磷酸(PCr, 0.0 ppm)、γ-ATP (2.5 ppm)、α-ATP と NAD (ATP α, 7.5 ppm)、β-ATP (16.1 ppm) の信号が認められる。b), c) は5g 負荷で100 回収縮および、200/回収縮後のスペクトルである。静止筋で20 mmol/kg muscleであったクレアチン磷酸は、各々、9.0、5.2 mmol/kg muscle と著明に減少するが、β-ATPは5 mmol/kg muscle から、わずかな減少にとどまっている。即ち、ローマン反応によりクレアチン磷酸が消費され、ATP が供給されていることを示している。

4. 嫌氣条件での筋収縮のエネルギー代謝

5, 10, 15g 負荷について、筋収縮回数を変化させ、その時の外部仕事量と解糖および、ローマン反応の関係を検討した。図 4 に5g 負荷での筋仕事量と乳酸産生量 a)、およびクレアチン磷酸、ATP量の変化 b) との関係を示す各々、スペクトル測定中の変化量を差し引いて(4)、仕事に伴う正味の変化量を示す。乳酸産生量は、仕事量の増加とともに直線的に増加し、クレアチン磷酸減少量も仕事とともに増大するが、クレアチン磷酸の枯渇とともに頭打ちとなっている。これに伴って、ATPの減少がはじめて生じてくる。10, 15g 負荷についても同様の結果を得た。乳酸、クレアチン磷酸およびATPの変化量から、化学エネルギー産生量を求めた。嫌氣的解糖においては、ATP 産生数と乳酸産生数の比(A/L)を1.5から1.0とし(6, 7)、ATPの解離を-48 kJ/mol(6)とした。また、ローマン反応によるクレアチン磷酸の解離を-34 kJ/mol(6)とした。即ち総エネルギー産生量(E J/kg

muscle) は、
$$E = 34 \cdot \Delta\text{PCr} + 48 \cdot (\Delta\text{ATP} + \Delta\text{LA} \cdot (A/L))$$

となる。5g 負荷について、筋仕事量と産生エネルギー量との関係を図 5 に示す。各成分は図 4 の結果を仕事量について多項式近似したものをを用いた。全産生エネルギーは仕事量とほぼ直線関係を示している。この傾きより筋の効率を求めると、0.08 - 0.10 となる。これは、0°C における効率に比べ (8, 9)、低い値となっている。

筋が、約 150 J/kg muscle の仕事を行なうと、細胞内 pH は最初約 7.2 であったものが、約 6.5 にまで低下する。この pH 変化から、ATP とクレアチンリン酸の加水分解に伴うエンタルピー変化 (ΔH_m) は、約 25% 低下すると予測される (6)。つまり、仕事量の増大とともに、図 5 においては、傾きが大きくなっていくはずである。しかしながら、測定精度から考えても、筋仕事量が 20~180 J/kg muscle において、傾きは一定とみなす方が妥当であろう。一方、細胞内緩衝物質のイオン化熱は、pH 変化と反対の方向に働き、pH 変化による ΔH_m の変化を緩衝しようという試算がある (6)。今回の結果は、この予測が正しく、in vivo では pH 7.2 から 6.5 の範囲では ΔH_m はほぼ一定であることを確かめることができた。

解糖とローマン反応とは、筋収縮時に平行してエネルギー産生を行なっている。これらの全産生エネルギーに対する寄与率を求めてみると、仕事量の小さい (約 30 J/kg muscle) 時には、ローマン反応の寄与が大きく、約 70% を占めている。仕事量の増加とともに、解糖の寄与が大きくなり、中程度の仕事量 (約 100 J/kg muscle) では、ほぼ 50% を解糖が占めている。このように、解糖とローマン反応系を平行して利用することにより、筋は乳酸産生量を最小限にとどめ、酸素負債を小さくし、あわせて、乳酸の蓄積による細胞内 pH の低下を小さくすることができる。これは、嫌氣的筋収縮後の好氣的回復過程のために、細胞内環境を保つという点からみて、合理的であると考えられる。

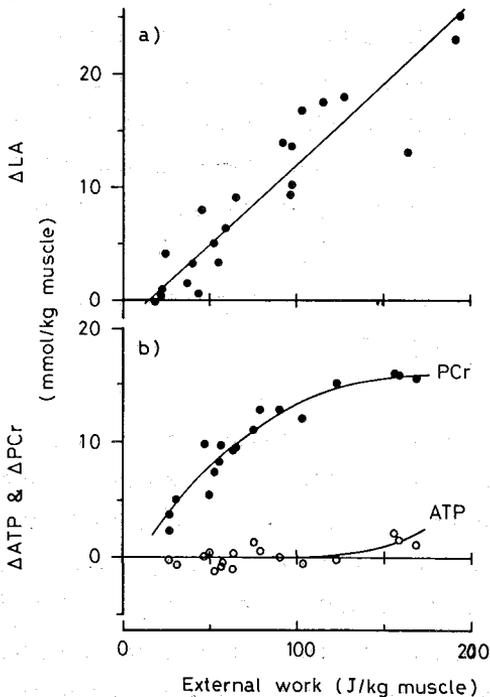


図 4. 筋仕事量 (5g 負荷) と、乳酸産生量 (ΔLA)、クレアチンリン酸減少量 (ΔPCr)、ATP 減少量 (ΔATP) との関係。

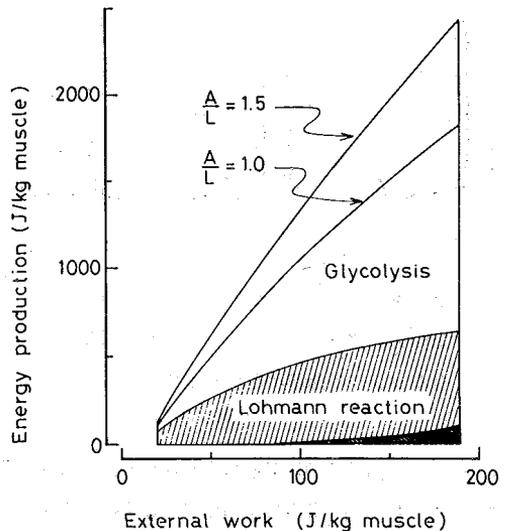


図 5.

筋仕事量 (5g 負荷) と、化学エネルギー産生量との関係。解糖によるエネルギー産生量 (白地)、ローマン反応によるエネルギー産生量 (斜地)、ATP 減少分のエネルギー量 (黒地) の合計が、全産生エネルギー量である。

References

1. Yoshizaki, K., Seo, Y. and Nishikawa, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 678, 283-291.
2. Yoshizaki, K. (1978) *J. Biochem.* 84, 11-18.
3. Dawson, M.J., Gadian, D.G. and Wilkie, D.R. (1980) *J. Physiol.* 299, 465-484.
4. Seo, Y., Yoshizaki, K. and Morimoto, T. (1983) *Jpn. J. Physiol.* 33, 721-731.
5. Seo, Y., Murakami, M., Watari, H., Imai, Y., Yoshizaki, K., Nishikawa, H. and Morimoto, T. (1983) *J. Biochem.* 94, 729-734.
6. Curtin, N.A. and Woledge, R.C. (1978) *Physiol. Rev.* 58, 690-761.
7. DeFuria, R.R. and Kushimerick, M.J. (1977) *Am. J. Physiol.* 233, C30-C36.
8. Carlson, F.D., Hardy, D.J. and Wilkie, D.R. (1963) *J. Gen. Physiol.* 46, 851-882.
9. Hill, A.V. (1964) *Proc. Roy. Soc. B* 159, 319-324.

理研 柴田俊之 宮地貴子* 鷗沢 洵
大澤富彦 池上 明

1. はじめに

n -alkane は直鎖の単純な分子でありながら鎖長が短い ($\text{C}_5 \sim \text{C}_8$) ものは麻酔作用を有するが C_{10} 以上では麻酔作用をもたない¹⁾。リン脂質 bilayer の fluidity の変化や bilayer thickness の変化が麻酔作用の第1ステップではないか、という説が提出されている。従って、bilayer の運動状態や thickness が作用させたアルカン分子鎖長に対してどの様な依存性を示すかを知ることは、麻酔作用の第1ステップを推定するうえで有効であろう。

今回は n -alkane がリン脂質 bilayer 中のどこに存在するか、その動的な状態はどうかについて重水素化した n -alkane の ^2H -NMR を測定することによって調べた。bilayer 中のアルカンの存在状態は今迄、1) リン脂質分子に平行に配向している (Fig. 1 の状態 A)、2) bilayer の中央に存在している (状態 B)¹⁾、3) 状態 A とアルカン rich な相 (状態 B') に二相分離している²⁾ などの諸説が提出されていた。我々の今回の研究の結果 n -alkane ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{12}$) の大部分 (90%強) はリン脂質分子の長軸に平行に配向して anisotropic な運動をしている (A 状態) ことが判明した。10%弱のアルカン分子は isotropic な運動状態にあり、bilayer の中央に存在している (B 状態) と思われる。

2. 実験方法

乾燥した egg phosphatidylcholine (PC)

* 日本合成ゴム所属

しばたとしゆき, みやぢ たかこ, うざわ じゅん, おおさわ とみひこ, いけがみ あきら

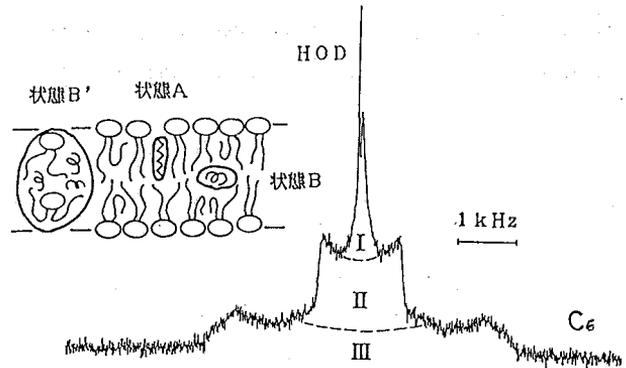


Fig. 1 egg PC dispersion 中の n -hexane- d_4 (ヘキサン/PC=1) の ^2H -NMR のスペクトル。45°パルス, 繰り返し時間 0.6S, 2000 積算

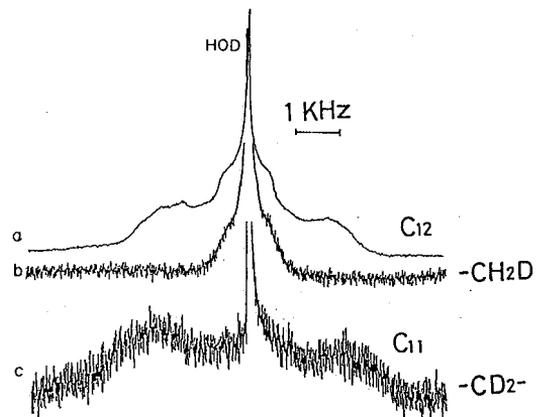


Fig. 2 egg PC dispersion 中の n -alkane の ^2H -NMR: a) 全 D (n -dodecane- d_{26}), b) 末端メチル基のみ D 化した n -dodecane- d_4 , c) メチル基のみ D 化した n -undecane- d_2

に全重水素化した *n*-alkane を加え、vortex mixer でよくかく拌し室温に1~2時間放置した。その後蒸留水を加えて over night 放置し更に vortex mixer でかく拌して NMR 用試料とした。試料の lipid 濃度は 13.5% であった。egg PC は Singleton らの方法により卵黄から抽出した。全 D 化 *n*-alkane は Canada Merk から購入した。末端のメチル基のみを選択的に D 化した *n*-dodecane- d_1 ($C_{12}H_{24}O_2$) は lauryl bromide から、また一つのメチレン基のみを選択的に D 化した *n*-undecane- d_2 ($C_{11}H_{22}O_2$) は 6-undecanone から合成した。

2H -NMR の測定には FX-100 NMR 分光計 (JEOL) の多核観測装置を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 2H -NMR スペクトルのアサイメント

Fig. 1 は egg PC の H_2O dispersion 中の *n*-hexane- d_{14} (C_6) の 2H -NMR スペクトルである。ヘキサン/PC のモル比は 1 である。スペクトルは三つの成分に分けられる。成分 I は等方的な運動を行っている CD 基の線形であり、II, III は分子軸の周りの回転運動は自由だが横方向の運動は制限されている C-D bond の powder pattern に似ている。

このようなスペクトルの特徴は egg PC 中の *n*-heptane- d_{16} (C_7), *n*-decane- d_{22} (C_{10}), *n*-dodecane- d_{26} (C_{12}) にも共通している。それぞれの試料の成分 I の fraction やその他の物理量を Table 1 に summarize した (アルカン/PC ~ 0.5 モル比, 20°C)。いずれの場合も成分 I の fraction は 10% 弱で少ない。

Fig. 2 a は egg PC dispersion 中の *n*-dodecane- d_{26} のスペクトルである。b 図は

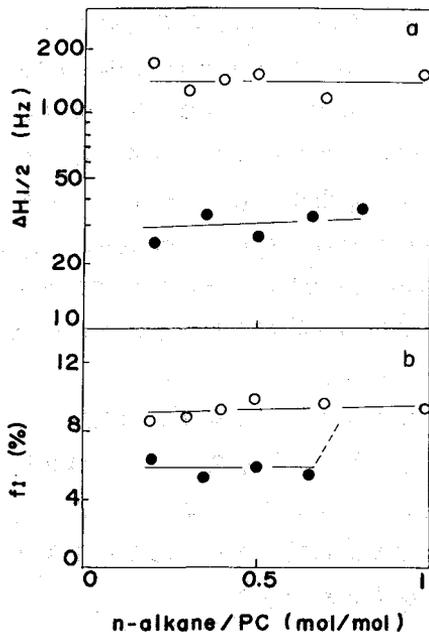


Fig. 3 egg PC 中の *n*-hexane- d_{14} (○) と *n*-dodecane- d_{26} (●) の成分 I の半値幅と fraction

Table 1 egg PC dispersion 中の *n*-alkane の 2H -NMR スペクトルの各成分の物理量, アルカン/PC 0.5 モル比, 20°C

	<i>n</i> -hexane	<i>n</i> -heptane	<i>n</i> -decane	<i>n</i> -dodecane
f_I (%)	9	8	7	6
$\Delta H_{1/2}(I)$ (Hz)	170	155	39	27
$\Delta \nu_Q(II)$ (KHz)	1.6	1.4	1.4	1.3
$\Delta \nu_Q(III)$ (KHz)	4.4	4.9	4.6	4.3
$S_{mol}(CD_3)$	0.07	0.07	0.07	0.06
$S_{mol}(CD_2)$	0.07	0.08	0.07	0.07

末端メチル1ヶ所のみをD化した dodecane ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{D}$) のスペクトルであり、A図に比べ成分Iと成分IIのみになっていることがわかる。C図は中央のメチレンーフをD化した undecane ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CD}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) のスペクトルである。A図に比べ成分Iと成分IIIのみが残っている。

以上のことから成分IIは状態A (Fig. 1) のメチル基、成分IIIは状態Aのメチレン基にアサインされる。成分Iは状態B又は状態B'のアルカン分子と思われる。

3.2 成分Iについて

Fig. 3に成分Iの半値幅と fraction (f_I) のアルカン/PC モル比に対する変化を示した。ヘキサンの場合成分Iの fraction は0.2~1モル比でほぼ一定(約9%)である。ドデカンの場合も0.2~0.65モルの範囲でそれは一定(約6%)である。

Fig. 4にヘキサンとドデカンの $K = f_I / (1 - f_I)$ の値を温度の逆数 $1/T$ に対してプロットした。 f_I は温度の増加に伴って増加する。また、 f_I は温度の増加と減少に対して可逆的に変化する。従って成分Iと成分II, IIIの間は熱平衡状態にあると思われる。

JacobsとWhite²³はヘキサン/DPPCの熱測定とNMRから状態A(混合相)とアルカン rich な相(状態B')に二相分離しているという考之を提出した。二相分離していることはあるアルカン濃度以上ではアルカン分子はlipidの中に入っていないことを意味している。従って f_I はアルカン濃度の増加に伴って増加しなければならない。しかし実験事実はFig. 3bでみるように測定したアルカン濃度範囲で f_I はほぼ一定である。状態Aと状態B'の二相分離モデルは適当ではない。成分Iはbilayerの中央のlipid炭素鎖にはさまれたアルカン分子(状態B)のよるものと思われる。

状態Aと状態Bは熱平衡にあるから、A, Bのfractionを f_A, f_B とすれば



の反応の平衡定数は

$$K = f_B / f_A \quad (1)$$

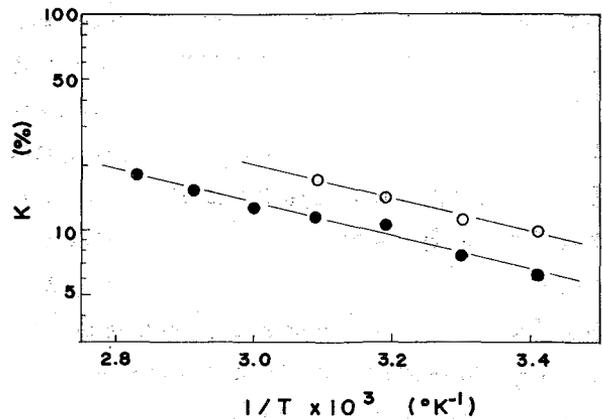


Fig. 4 egg PC中のn-hexane-d₁₄ (○)とn-dodecane-d₂₆ (●)の平衡定数 $K = f_I / (1 - f_I)$ の温度変化 (アルカン/PC 0.5モル比)

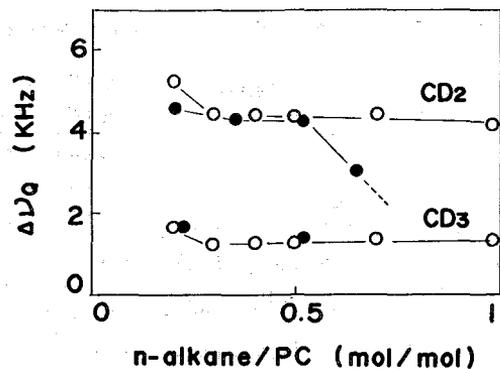


Fig. 5 egg PC中のn-hexane-d₁₄ (○)とn-dodecane-d₂₆ (●)の成分II, IIIの四重極分裂

である。等温、等圧下でファン・ホッフの等温式が成立するから

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (2)$$

ここで $\Delta G^\circ = G_B^\circ - G_A^\circ$ はアルカン1モル当り標準 free energy 差である。また(2)式とギブス-ヘルムホルツの式から

$$\ln K = -\Delta H^\circ/RT + \text{Const.} \quad (3)$$

が導かれる。

Fig. 4 の $K = f_2/(1-f_1)$ と $1/T$ のプロットの勾配から $\Delta H^\circ = H_B^\circ - H_A^\circ$ を求めると、ヘキサンの場合もドデカンの場合もほとんど同じ値であり $\Delta H^\circ = 3.5 \text{ kcal/mol}$ を得た。またこの値から(2)式を用いて 20°C の $\Delta S^\circ = S_B^\circ - S_A^\circ$ を求めるとヘキサンの場合 $\Delta S^\circ = 7.3 \text{ cal/mol-deg}$ 、ドデカンの場合 6.4 cal/mol-deg であった。エントロピー的には状態Bが有利だがエンタルピー的には状態Aが安定なのでアルカンの大部分(90%強)はA状態にあると結論できる。

3.3 成分II, IIIについて

Fig. 5 は成分II (状態Aの CD_3 基) と成分III (状態Aの CD_2 基) の四重極分裂 $\Delta\mu_a$ のアルカン濃度依存性である。ヘキサンではアルカン濃度の小さいところで $\Delta\mu_a$ は少し減少し 0.3 モル比以上ではほぼ一定である。ドデカンの $\Delta\mu_a$ も 0.2 ~ 0.5 モル比の範囲でヘキサンと同じ値である。

Fig. 6 は egg PC 中に 0.5 モル比加えられたヘキサン、ヘプタン、ドカン、ドデカンの $\Delta\mu_a$ の温度変化である。 $\Delta\mu_a$ の値はアルカンの鎖長によってそれ程大きな違いはない。 $\Delta\mu_a$ から

$$\Delta\mu_a = 3/4 (e^2 g Q/h) S_{CD} \quad (4)$$

$$S_{mol} = -2 S_{CD} \quad (\text{for } \text{CD}_2), \quad S_{mol} = -6 S_{CD} \quad (\text{for } \text{CD}_3) \quad (5)$$

(4),(5)式を用いて分子軸方向に関する order parameter S_{mol} を計算した。 20°C における S_{mol} の値が Table 1 に示されている。1) CD_3 の S_{mol} と CD_2 の S_{mol} に大きな差がない。2) 鎖長が C_6 から C_{12} に長くなっても S_{mol} に大きな差がない。3) また Fig. 1 図からもわかる様に、 CD_3 の四重極分裂は一種類しかなく、アルカンの両端のメチル基は同程度の order である。これらの実験事実から状態Aのアルカン分子は Fig. 7 のように bilayer lipid 2 分子にまたがって存在する、それも動的にゆらいで bilayer surface の法線方向に行ったり来たりするのではないかと思われる。 Ref.] 1) Hayden et al.; Nature 268 35(1977), 2) Jacobs et al.; JACS 106 911(1984)

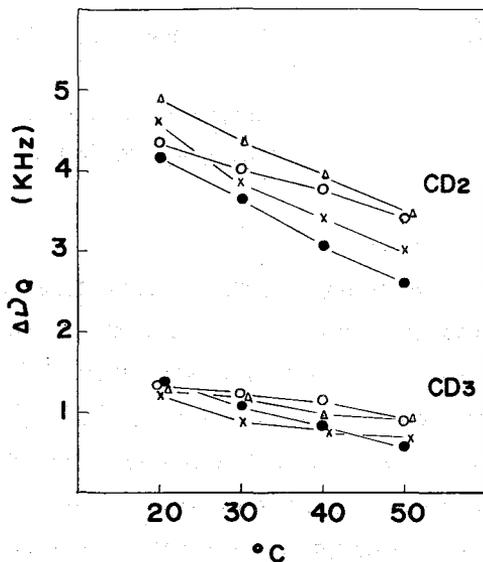


Fig. 6 egg PC 中の n-hexane- d_{14} (O), n-heptane- d_{16} (Δ), n-decane- d_{22} (x), n-dodecane- d_{26} (\square) の四重極分裂の温度変化。(アルカン/PC 0.5モル比)

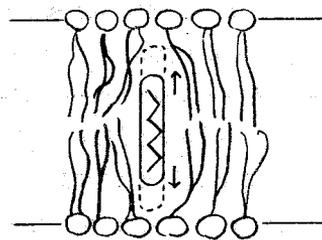


Fig. 7

京都府立医科大学 第一生理

○西川弘恭、瀬尾芳輝

はじめに

生体中の細胞内液と細胞外液中の Na 濃度測定法、および、細胞膜を介する flux の測定法として、従来より、ガラス電極法、R I 法などが用いられてきた。また、 Na - NMR 法も 1970年前後より、筋をはじめ、生体組織中の Na の定量法として、多く報告されてきた⁽¹⁾。近年、細胞内と細胞外の Na の共鳴線を化学シフト剤により分離する方法を R. K. Gupta ら⁽²⁾、と M. M. Pike ら⁽³⁾ が報告し、筋、赤血球などに応用された。今回、われわれは、Gupta らの方法で、水溶性の化学シフト剤を作り、神経組織に適用し、次の実験および、解析を行った。

1. 神経細胞内 Na 濃度と細胞外スペースを Na - NMR スペクトルから得られた信号強度より求めた。2. 細胞外液イオン組成を変え、細胞内 Na 濃度の変化を経時的に Na - NMR で測定し、 Na の膜透過機構と、それに対する 1 価カチオンの作用を検討した。3. Na - NMR 緩和時間 (T_1 , T_2) を細胞内と細胞外 Na について求め、細胞内 Na の存在状態を解析した。

試料と方法

試料として、周囲の結合組織を除去した食用ガエル坐骨神経（長さ約 8cm, 湿潤重量約 120mg）4本を用いた。神経は分離後、カエルリンガー氏溶液中（ 16°C ）に30分間置いた。その後、化学シフト剤 $\text{Dy}(\text{PPPi})_2^{7-}$ を 4 mM 含有するカエルリンガー氏溶液中（ 16°C ）に 2時間、軽く攪拌しつつ置いた。 Na - NMR 測定時、神経表面のリンガー氏溶液を口紙で軽く除去し、NMR 試料管（10 mm ϕ ）に入れた。経時的NMR 測定は、同一試料を用い、毎測定後、元の溶液に置いて行った。全ての試料について、NMR 測定後、湿潤重量、乾燥重量（ 100°C , 24時間乾燥）、硝酸による湿性灰化後、蛍光光度法による Na , K 濃度を測定した。

化学シフト剤含有カエルリンガー氏溶液の組成は、76.2 mM NaCl , 2.5 mM KCl , 1 mM CaCl_2 , 4 mM DyCl_3 , 8 mM $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, 5 mM HEPES で、pHは7.3であった。このリンガー氏溶液の Na 濃度と浸透圧は通常の化学シフト剤を含まないカエルリンガー氏溶液（111 mM NaCl , 2.5 mM KCl , 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7.3）にほぼ等しい値であった。

NMR 装置は JEOL PFT-100 NMR を用いた。観測周波数は 24 MHz, スペクトル幅は 2000 Hz, データポイントは 2048, パルスくり返し時間は 550 msec, 積算回数は 800~1200 回であった。磁場は外部重水ロックで安定化された。 T_1 と T_2 時間測定は $180^\circ - \tau - 90^\circ$ パルス系列と $90^\circ - \tau - 180^\circ$ パルス系列を用いた。測定温度は全て 24°C であった。

結果と考察

1. 神経細胞内 Na 濃度と細胞外スペース。

にしかわ ひろやす、せお よしてる

図 1 に食用ガエル坐骨神経を4 mM Dy(PPi)₂⁷⁻ 含有カエルリンガー氏溶液中に置き、2時間、19時間、25時間毎に得た同一試料のNa-NMR スペクトルを示した。低磁場側に神経細胞内Na, Na_{in}, 10 ppm 高磁場側に細胞外Na, Na_{out}による共鳴線が見られた。これらのスペクトルで見られるNa_{in} と Na_{out} の共鳴線の面積、すなわち信号強度はほぼ等しく、少なくとも、25時間内に神経細胞内外のNa濃度に変化がなかったことを示した。

図 1 の2時間でのスペクトルより得られたNa_{in} と Na_{out} の信号強度より、次の (1), (2) 式を用いて、神経細胞内Na濃度, [Na]_{in}, と細胞外スペース, Sex を求めた。

$$\frac{[\text{Na}]_{\text{in}} \times (1 - \text{Sex})}{[\text{Na}]_{\text{out}} \times \text{Sex}} = \frac{A_{\text{in}}}{A_{\text{out}}} \dots (1)$$

$$[\text{Na}]_{\text{in}} \times (1 - \text{Sex}) + [\text{Na}]_{\text{out}} \times \text{Sex} = [\text{Na}]_{\text{total}} \dots (2)$$

ここで、

[Na]_{out} : 細胞外Na濃度、すなわち、リンガー氏溶液のNa濃度

A_{in} : Na_{in} の共鳴線の面積

A_{out} : Na_{out} の共鳴線の面積

Na_{total} : 試料中のNa濃度

図 1- 2hのスペクトルより求めた、

$$A_{\text{in}} = 781$$

$$A_{\text{out}} = 567$$

同試料の湿性灰化後、蛍光光度法で得た

$$[\text{Na}]_{\text{total}} = 115 \text{ mM/L tissue water}$$

これら値を(1), (2) 式に代入し、

$$\text{Sex} = 41\%$$

$$[\text{Na}]_{\text{in}} = 113.6 \text{ mM/L tissue water}$$

を算出した。細胞外スペースは従来より、RIにより求められている。その1 つにイヌリンによる方法がある。カエル坐骨神経について、NMR測定試料と同様に処理し、

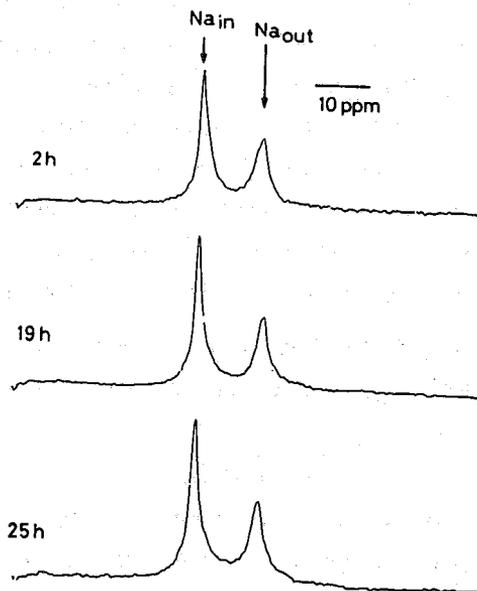


図 1. 4 mM Dy(PPi)₂⁷⁻ 含有カエルリンガー氏溶液中に置いた坐骨神経の経時的Na-NMRスペクトル

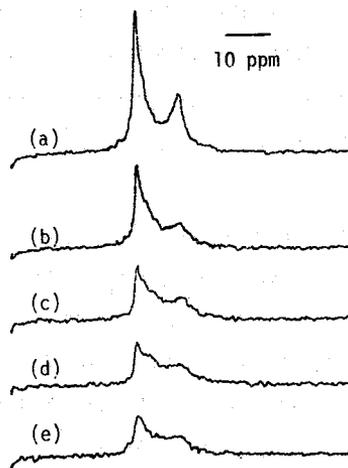


図 2. 低Na高K カエルリンガー氏溶液中に置いた坐骨神経の経時的Na-NMRスペクトル。
a: control, b: 1時間, c: 3時間, d: 4時間, e: 5時間でのスペクトル。

^3H -イヌリンを用いて得た細胞外スペース(イヌリンスペース)は48%であった。この値はNMR法で得た Sex にはほぼ一致するものであった。 $[\text{Na}]_{\text{in}}$ は細胞の種類により大きく異なる。カエル筋では3~8 mM/L tissue waterと低い、イヌ赤血球では約80 mM/L tissue waterと高い。また、同じ細胞種であっても、動物種により異なる。神経組織においても、一般に、神経軸索より、それをとりまくミエリンの方が高く、細胞外液に近い $[\text{Na}]_{\text{in}}$ をもつと言われている。本実験で得られた比較的高い $[\text{Na}]_{\text{in}}$ もこのような事情に基づいていると考えられる。

2. 細胞外イオン組成と $[\text{Na}]_{\text{in}}$

試料を化学シフト剤含有カエルリンガー氏溶液に2時間置き、平衡させた後、低Na高Kの化学シフト剤含有溶液(46 mM NaCl, 80 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7.3)に置き換え、経時的にNa-NMRスペクトルを得、図2に示した。低磁場側の Na_{in} の共鳴線に明らかな減少が見られた。図3に Na_{in} の信号強度の時間変化を示した。

Na_{in} は4時間まで急な減少を示し、その後、初期値の25%の信号強度で一定となった。この状態での $[\text{Na}]_{\text{in}}$ は28 mM/L tissue waterであった。この値は $[\text{Na}]_{\text{out}} = 46 \text{ mM/L}$ に比して低く、細胞内から外へのactive transportが働いていることを示した。上記現象はイオンの膜輸送でNaに似た性質をもつLi, Kに似た性質をもつCsでKを置き換えた場合にも見られた。また、 Na_{in} の減少は、通常のNa, K濃度のカエルリンガー氏溶液に置き換えると可逆的に Na_{in} の増加に変わった。さらに、化学シフト剤を含有しない溶液で求めた Na_{in} も同様の現象を示した。

3. Na-NMR緩和時間と Na_{in} の存在状態

坐骨神経の Na_{in} と Na_{out} の T_1 と T_2 値およびカエルリンガー氏溶液のそれらを表1に示した。 Na_{out} の T_1 , T_2 値は化学シフト剤としての常磁性Dyの影響があるため、 Na_{out} と細胞外物質の相互作用のみを反映するものではない。一方、化学シフト剤は細胞内に入らないため、 Na_{in} についての T_1 , T_2 は Na_{in} と細胞内物質との相互作用を反映していると言える。 $T_1 = 27 \text{ msec} > T_2 = 9.7 \text{ msec}$ の関係から、 Na_{in} はviscous liquidの環境下にあると考えられる。また、 T_1 , T_2 とも1成分の緩和を示したので、交換のない、あるいは非常に交換の遅い異なった Na_{in} の存在状態の分画はないと考えられる。

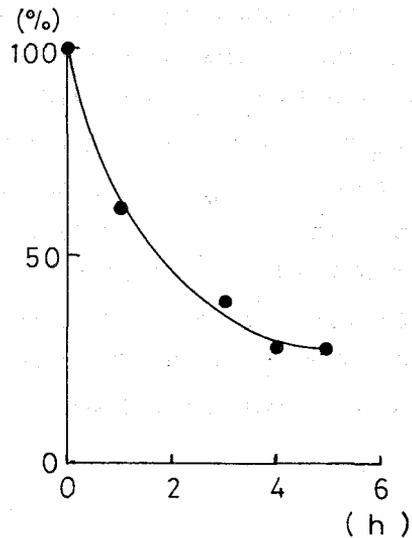


図3. 図2の Na_{in} の信号強度の時間変化をcontrolを100%として表わした。

	T_1 (msec)	T_2 (msec)
Na_{in}	27.0	9.7
Na_{out}	18.5	7.5
リンガー氏溶液	60.2	49.0

表1. 坐骨神経細胞内外Naの T_1 と T_2 。

1. M.M. Civan & M. Shporer, *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 1, p. 1, Plenum Press, New York, 1978.
2. R.K. Gupta & P. Gupta, *J. Mag. Res.*, 47, 344, 1982.
3. M.M. Pike et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 810, 1982.

^1H -と ^{23}Na -NMR 緩和時間によるグリコサミノグリカンと水および Na^+ の相互作用に関する研究

(京都府立医科大学・整形外科, *第一生理)

○日下義章, 三船哲郎, *西川弘恭, *瀬尾芳輝, 山下文治, 榎田喜三郎

目 的

関節軟骨, 脊椎々間板などとして生体内に広く分布する軟骨組織は細胞成分が少なく, その大部分が細胞外基質により成る。軟骨基質の主要な構成要素であるプロテオグリカン(Proteoglycan)は図1に示すようにシダの葉状構造をもち, 図2に示すような軟骨基質の骨格であるコラーゲンとともに網目状の構造を形成している。この網の目の間には重量比で65%~85%と多量の水が保持されており, この水は軟骨組織特有の粘弾性の維持, 関節の潤滑, 軟骨細胞への物質の輸送にきわめて重要である。グリコサミノグリカンであるコンドロイチン硫酸(Ch-S)およびヒアルロン酸(HA)は図3に示すような酸性ムコ多糖の一種であり, プロテオグリカンにおいて, Ch-Sは図1の最も小さい枝の部分, HAは中心鎖を形成する。Ch-Sは単量体当たりカルボキシル基, 硫酸基を1個ずつ, HAは単量体当たりカルボキシル基を1個有するポリアニオンである。この固定された陰性荷電により軟骨基質内の Na^+ 濃度は組織外液の1.5~2倍と高く, これによる浸透圧は軟骨基質内に多量の水を保持するのに重要である。⁽¹⁾ また, この陰性荷電が反発しあうことによりプロテオグリカンは3次元的広がりをもち, 多量の結合水を保持すると考えられる。

図1. プロテオグリカンの模式図

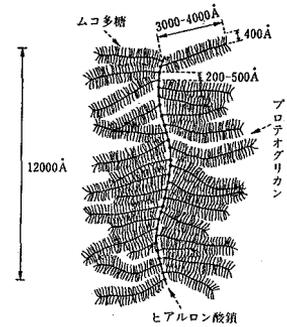


図2.

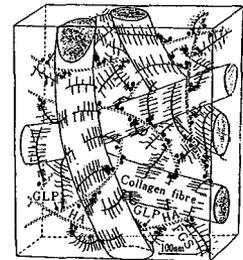
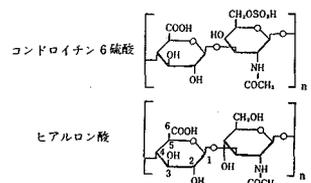


図3.



今回, 軟骨基質モデルとして Ch-S および HA の 0.15M NaCl 溶解液を用い, 種々の濃度の Ch-S および HA の溶液で ^1H -NMR, ^{23}Na -NMR により水および Na^+ の T_1 , T_2 を測定した。また, Ch-S, HA の濃度を一定として pH を変え, 水および Na^+ の T_1 , T_2 を測定した。さらに, Ch-S, HA の濃度を一定として, KCl の濃度を变え, Na^+ の T_1 , T_2 を測定した。以上より, Ch-S, HA と水分子および Na^+ の相互作用を検討し, これからグリコサミノグリカンの軟骨基質における役割に検討を加えた。

試料および方法

試料としてコンドロイチン硫酸ナトリウム (MW: 2.5~5 万; 和研薬), およびヒアル

くさか よしあき, みふね てつろう, にしかわ ひろやす, せお よしてる,
やました ふみはる, さかきだ きさぶろう

ロン酸ナトリウム (MW: 90 万; 生化学工業) を用い, 次の 3 つの試料系を作った。1) 0.15 M NaCl 水溶液で Ch-S を 0 ~ 10 % (w/v), HA を 0 ~ 2 % (w/v) に溶解した系。2) Ch-S の 5 % (w/v), あるいは HA の 1.6 % (w/v) 溶液に HCl または NaOH を加え, pH を 2 ~ 10 とした系。3) Ch-S の 5 % (w/v), あるいは HA の 1.6 % (w/v) 溶液に KCl を添加し KCl 濃度を 0 ~ 2 M とした系。

〔NMR 測定〕核磁気緩和時間の測定には JEOL PFT100 NMR (^1H : 100 MHz, ^{23}Na : 24 MHz) を用いた。 T_1 は inversion recovery 法, T_2 は CPMG 法を用いて測定した。測定温度は 24 °C であった。測定条件を表 1 に示す。

〔結合水の測定〕Ch-S, HA の 0.15 M NaCl 溶液を凍結乾燥器にて乾燥し, 約 10 時間経時的に重量を測定した。その後, 試料を 100 °C で 3 日間乾燥し, こ

の時の結合水量をゼロとした。乾燥時の水分量を時経列にプロットし, 水分量の初期の急激な減少相と, 後期の緩徐な減少相の転移点より結合水の量を算出した。

nucleus	T_1		T_2	
	^1H	^{23}Na	^1H	^{23}Na
pulse sequence	180° - t - 90°		CPMG	
sampling time (sec.)	4.09	2.04	8.19	0.51
repetition time (sec.)	25	2.5	25	1.0
accumulation (times)	4	40	10	100
temperature (°C)	24			

図 4.

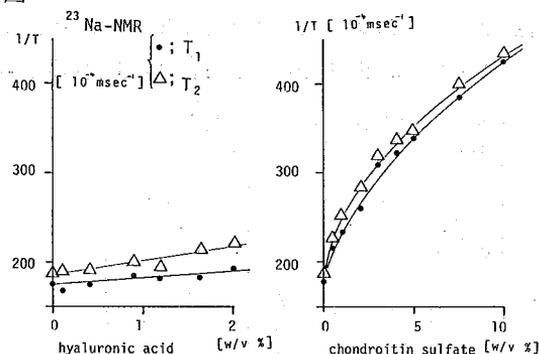
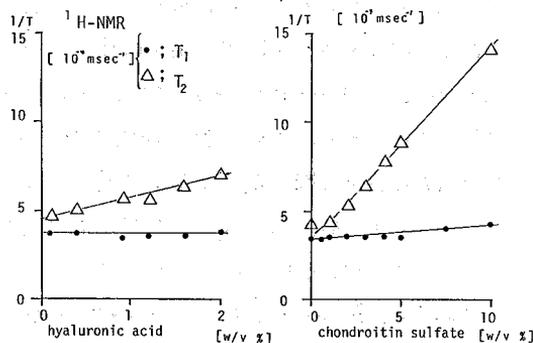
結果および考察

1. Ch-S, HA の濃度と T_1, T_2 について

図 4 に Ch-S および HA 濃度に対し, ^1H -NMR による水の $1/T_1, 1/T_2$ をプロットした。Ch-S では $1/T_2$ は濃度増加に伴ない著明に増加し, $1/T_1$ も増加した。HA では $1/T_2$ は濃度増加に伴ない増加したが, $1/T_1$ は変化しなかった。一方, 凍結乾燥法により求めた結合水の量は Ch-S で約 0.1g/g Ch-S であった。

図 5.

HA では有意に結合水量が得られなかった。図 5 に Ch-S および HA 濃度に対し, ^{23}Na -NMR による $1/T_1, 1/T_2$ をプロットした。Ch-S では $1/T_1, 1/T_2$ ともに濃度増加に伴ない明らかに増加した。HA においても $1/T_1, 1/T_2$ はともに増加傾向を示した。溶液中の Ch-S, HA のまわりにはこれら高分子により運動の束縛された結合水, または Na^+ が存在し, さらにその周囲には自由な水, または Na^+ が存在する。この 2 状態モデルを上記データに適応し, Ch-S, HA と水および Na^+ の相互作用を解析した。本実験では T_1, T_2 ともに緩和過程は一成分であった。したがって, 結合した水, または Na^+ と自由なそれらとの間には, 各々の緩和時間に比して非常に速い交換が行なわれているといえる。Zimmerman, Cooke⁽²⁾⁽³⁾ によれば, このような場合



測定される緩和時間 T は①式のように示される。

$$\frac{1}{T} = \frac{1 - C - Cx}{(1 - C)T_f} + \frac{Cx}{(1 - C)T_b} \dots\dots\dots ①$$

ここで x は試料 1g 当りの結合水, または運動の束縛された Na⁺ の量, T_b はそれらの緩和時間, C は試料の濃度, T_f は自由な水, または Na⁺ の緩和時間である。C が 1 に比して十分に小さい場合, ①式は②式にて近似され, 1/T は C の一次関数となる。

$$\frac{1}{T} = \frac{1}{T_f} + \frac{x}{T_b} \cdot C \dots\dots\dots ②$$

図 4.5 の 1/T と C の関係を最小自乗法により ②式にて近似し, その勾配, すなわち x/T_b を求め表 2 に示す。ここで, Ch-S の濃度は 0 ~ 5% の範囲を近似

表 2.

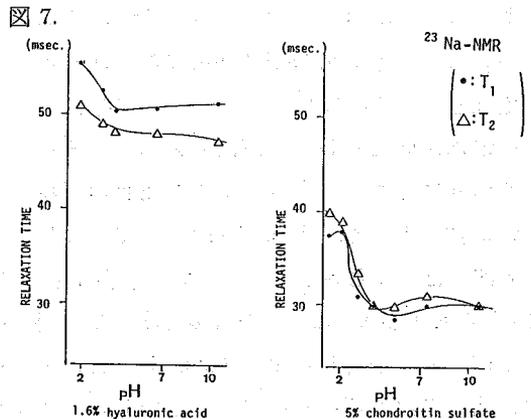
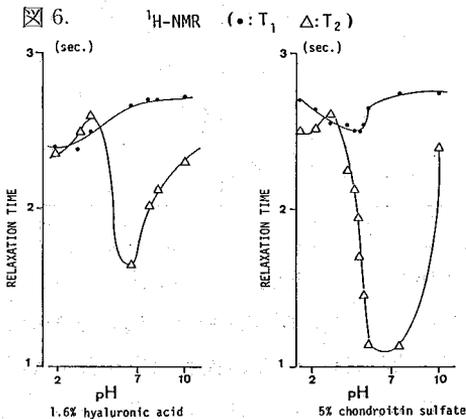
	¹ H-NMR		²³ Na-NMR	
	x/T _{1b}	x/T _{2b}	x/T _{1b}	x/T _{2b}
ヒアルロン酸	0.005	1.1	8.6	17
コンドロイチン硫酸	0.028	1.1	41	42

(ml·g⁻¹·msec⁻¹·10³)

の対象とした。¹H-NMR では Ch-S の x/T_{1b} は 0.028 であり, Ch-S の結合水量(x) 0.1g/g Ch-S を代入すると T_{1b} = 3.6 msec となった。これに対して, HA の x/T_{1b} は 0.005 と低く, また結合水はほとんど存在しないことにより, HA と水の相互作用は非常に弱いことが示唆された。一方, x/T_{2b} は Ch-S, HA ともに 1.1 で差はなかった。これは T₂ には試料の粘性が強く影響するため, 分子量が大きく粘性の高い HA の T₂ が短かく測定されたためである。²³Na-NMR では, x/T_{1b}, x/T_{2b} ともに Ch-S は HA に比して高かった。これにより, Na⁺ との相互作用に関しても Ch-S は HA より強いことが示唆された。以上, Ch-S は HA に比して水および Na⁺ との相互作用が強いことが示され, 軟骨基質でのプロテオグリカンの機能としての水の保持に関して Ch-S は主要な役割を演じていることが示唆された。また, プロテオグリカンにおけるグリコサミノグリカンの大部分が Ch-S であることは合目的と考えられる。

2. 試料の pH と T₁, T₂ について

図 6 に試料の pH に対し, ¹H-NMR による T₁, T₂ をプロットした。T₁ では Ch-S, HA ともに pH による変化は僅かであったが, T₂ は pH の上昇により Ch-S では pH 4.5 付近, HA では pH 5 付近で大きく短縮した。また, pH が 8 以上では T₂ は逆に長くなった。²³Na-NMR では図 7 に示すように Ch-S, HA ともに T₁, T₂ は pH の上昇に伴ない pH 3 付近で大きく短縮した。

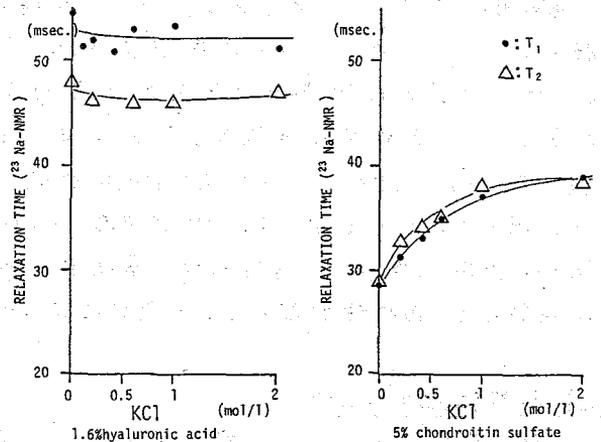


Freeman⁽⁴⁾らによれば Ch-S, HA の等電点は各々, 3.32, 2.80 である。Ch-S や HA は先にも述べたように, これらの持つ多くの陰性荷電により立体的に広がった構造を有する。したがって, ¹H-NMR で水の T₂ が各々の pK 値より約 1.5 高い pH にて大きく変化したことは, これらの pH で Ch-S, HA の立体的構造が大きく変化する, 水の存在状態が変化したことを示す。また, pH が 8 以上で T₂ が長くなったのは, Ch-S, HA が加水分解されて立体構造が壊れたためであると考えられた。一方, ²³Na-NMR では Ch-S, HA とともに pK 値に一致する T₁, T₂ の変化が認められた。これは, Ch-S, HA の陰性荷電により静電的に Na⁺ の運動が束縛されていることによる。軟骨基質内の pH は 7.0 付近にあるとされている。⁽⁴⁾ 上記結果より, pH 7.0 付近では, Ch-S, HA と水および Na⁺ の相互作用は最も強いと考えられ, このことは軟骨基質内に水を保持するのに好都合であると考えられた。

3. 試料の KCl 濃度と Na⁺ の T₁, T₂ について

図 8.

図 8 は試料の KCl 濃度に対し, ²³Na-NMR による N⁺ の T₁, T₂ をプロットした。HA では T₁, T₂ は変化しなかったが, Ch-S では KCl の濃度上昇に伴ない T₁ は 26.5 から 39 msec, T₂ は 28 から 36 msec へと長くなった。この T₁, T₂ の延長は, Ch-S と相互作用をしている Na⁺ が KCl 濃度上昇により K⁺ と競合し, 置換されるために生ずると考えられる。したがって Ch-S に対する Na⁺, K⁺ の親和性が等しいとすれば, 試料の NaCl 濃度と



KCl 濃度が等しい時, Ch-S に束縛された Na⁺ の量は KCl が存在しない時の半分になる。この時, T₁, T₂ 値は, 各々の KCl 濃度の変化による T₁, T₂ の変化幅の中央値, すなわち T₁ は 32.8 msec, T₂ は 32.0 msec となる。図 8 より KCl 濃度が 0.15 M の時, T₁ は約 30 msec, T₂ は約 32 msec であり, これらは上記の T₁, T₂ 値に一致した。これにより, Na⁺ と K⁺ の Ch-S に対する親和性はほぼ等しいと考えられた。

文 献

- (1) Maroudas A., *Biorheology*, 12, 233~248, 1975.
- (2) Zimmerman R. J., *J. Phys. Chem.*, 61, 1328~1333, 1957.
- (3) Cooke R., *Biophys. J.*, 11, 1002~1016, 1971.
- (4) Freeman W. D. S. C., *Ann. Rheum. Dis.*, suppl. 2, 44~45, 1975.

山崎 政城 (熊本大・医)

一般に、軟部腫瘍・骨腫瘍では悪性と良性とで治療方針がま大きく異なる。悪性腫瘍は遠隔転移性を有し、局所浸潤性が高く、その治療は手術による切除療法や放射線療法によるもので、患者への侵襲は大きく、治療によって引き起こされる disability は大変大きなものがあり不必要な治療は避けねばならない。それゆえ、軟部腫瘍・骨腫瘍の診断では腫瘍の良性・悪性の判定が大きな意味を持つ。

われわれはここ数年にわたり、これらの腫瘍の悪性診断法として n.m.r. の有用性を検討してきた。まずに実験骨腫瘍 (Vx₂ 癌腫・Gardner Osteosarcoma 519) のレベルでは悪性腫瘍と非悪性群の識別が可能で、さらに正常組織中に存在するわけが腫瘍細胞の検出も可能であることとを明らかにした (J. Jpn. Orthop., 58, 83-95, 1984.)。またヒトレベルでは、悪性骨腫瘍について n.m.r. 法の有用性を明らかにした (本誌 NMR 討論会, p.121-124, 1982.)。今回ヒト軟部腫瘍・軟骨性腫瘍について、悪性診断・悪性度の評価・抗がん剤の効果判定・転移や再発の検索など臨床診断法としての有用性について検討した。

ヒト軟部腫瘍について

悪性の軟部腫瘍は一般に深在性が大きく、成長がはやいといわれている。軟部腫瘍の臨床診断では X 線からの情報が限られるため、腫瘍の良性・悪性の判定や腫瘍のひろがり等について有用な臨床診断法が期待されている。

手術時および生検で採取したヒト軟部組織 27 例 (Table 1 参照) について緩和時間 (組織中の水の¹H核)を測定し、得られた T₁・T₂ 値より malignancy index を求めた。軟部組織 27 例について、Fig. 1 に示すような T₁・T₂ 値を得た。正常組織については、がん患者より得られた正常組織とがん患者以外より得られた正常組織とでは、T₁・T₂ 値と有意の差を認めなかった。悪性腫瘍群では非悪性群にくらべ T₁・T₂ 値と

Table 1 Materials

	Number of specimens
Soft tissue	
Malignant tumor tissue	11
Benign diseased tissue	
Benign soft tissue tumor	5
Scar	1
Normal tissue	
Fat	5
Muscle	5
Bone tissue	
Malignant tumor tissue	
Primary malignant bone tumor	11
Metastatic bone tumor	4
Benign diseased tissue	
Benign bone tumor	7
Tumorous condition of bone	2
Bone necrosis	1
Normal tissue	
Cortical bone	6
Cancellous bone	4
Bone marrow	6
Cartilage	3

せきまき まさき

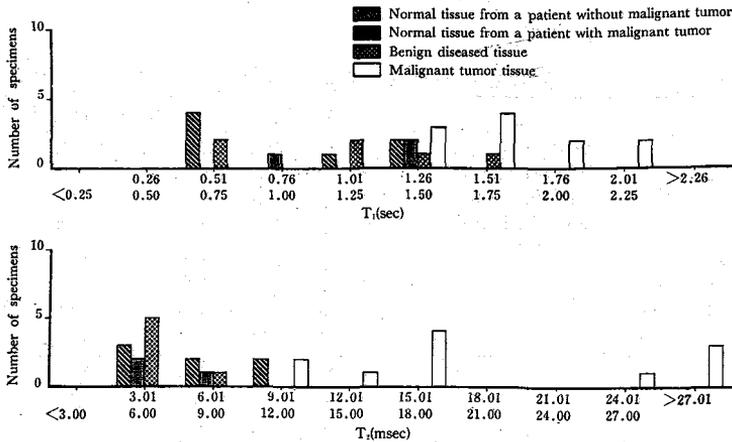


Fig. 1 Distributions of relaxation times in soft tissue specimens.

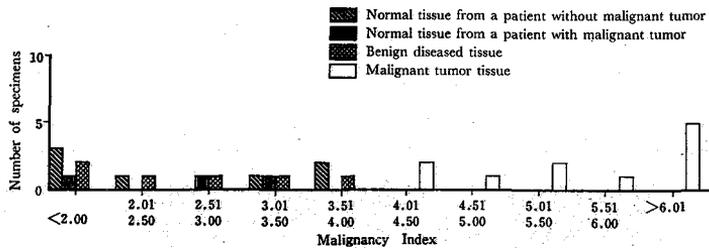


Fig. 2 Distributions of values of the malignancy index in soft tissue specimens. The mean relaxation times of 4 specimens of fat were used as $(\bar{T}_1)_{normal}$ and $(\bar{T}_2)_{normal}$ in calculating a malignancy index.

もく増大の傾向があるが、 T_2 値が T_1 値に比べてより高群を識別しえた (Fig. 1 参照)。このレベルでは年齢や性別差およびサンプル採取時の執がん制技術の有無などのため、 T_1 ・ T_2 値の単独の比較では悪性度の判定に明確な差を欠くが、malignancy index で両群を比較すると、軟部組織では全例で両群の診断が可能であることが明らかになった (Fig. 2 参照)。良性腫瘍と悪性腫瘍の臨床診断上の境界は、malignancy index が 4.0 である。

軟骨性腫瘍について

軟骨組織 44 例 (Table 1 参照) について malignancy index を求め、悪性腫瘍群と非悪性群とを比較した結果、44 例中 42 症例でその診断が可能で、悪性群の値を求めた良性 2 例は いづれも軟骨性良性腫瘍 (Osteochondroma および Enchondroma) であることが明らかになった。この軟骨組織 44 例の中の軟骨性組織 11 症例について検討した結果、軟骨性組織では正常、良性腫瘍、悪性腫瘍と区別され malignancy index が増大することが明らかになった (Table 2 参照)。

Table 2 Summary of cartilaginous specimens

		Age	Sex	T ₁ (sec)	T ₂ (msec)	Malignancy Index*
Chondrosarcoma	Poorly differentiated	31	F	2.24	19.12	5.22
	Well differentiated	46	M	2.27	10.68	3.99
	Well differentiated	56	M	1.87	10.84	3.59
	Well differentiated	36	M	2.16	8.34	3.52
Enchondroma		29	M	1.60	11.78	3.45
Osteochondroma		4	M	1.76	10.62	3.44
Periosteal chondroma		10	M	1.72	5.52	2.64
Osteochondromatosis		69	F	0.83	8.56	2.16
Normal cartilage		40	M	1.02	7.58	2.21
		23	F	0.97	6.40	1.98
		23	M	0.87	6.06	1.82

* The mean relaxation times of 3 specimens of normal cartilage were used as $(\bar{T}_1)_{normal}$ and $(\bar{T}_2)_{normal}$ in calculating a malignancy index.

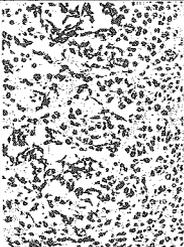
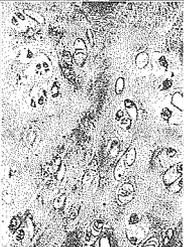
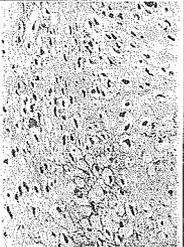
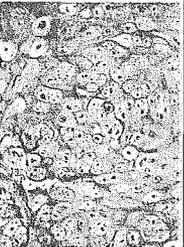
Age Sex	31y. F	46y. M	56y. M	36y. M
X-ray findings				
Histological findings				
		poorly differentiated	well differentiated	well differentiated
Prognosis	dead with pulmonary metastasis	alive and well	alive and well	alive and well
Malignancy Index	5.22	3.99	3.59	3.52

Fig. 3 Summary of 4 cases of chondrosarcoma. The mean relaxation times of 3 specimens of normal cartilage were used as $(\bar{T}_1)_{normal}$ and $(\bar{T}_2)_{normal}$ in calculating a malignancy index.

悪性の軟骨性腫瘍である軟骨肉腫 (*Chondrosarcoma*, Table 2 参照) は骨肉腫
K ついで発生頻度の高い悪性腫瘍で、病理組織上診断のむづかしいもの
の一つとなっている (この軟骨肉腫は、他の腫瘍で通常悪性度の指標として用いられ
る細胞密度や核異型性は臨床的に悪性度と比例しない, Fig. 3 参照)。さう
に軟骨肉腫は分化型と未分化型があり、治療および予後が異なるため正確
な診断が求められる。

軟骨肉腫の *malignancy index* を検討した結果、軟性度を有する未分化型で
は 5.0 以上の *malignancy index* を示すが、分化型では 3.5 ~ 4.0 の *malignancy*
index を有し、*Enchondroma* などの良性腫瘍に近い値を示した (Table 2, Fig.
3 参照)。このように未分化型が分化型にくらべ明らかに増大した *malignancy*
index を示したことは、軟骨肉腫における有効な診断法として期待される。

抗がん剤の治療効果の判定

骨肉腫の抗がん剤感受性は個体差があり、正確で信頼性のある効果判定
の方法の確立が期待されている。骨肉腫を例にとると、抗がん剤使用後の標本
(*malignancy index* = 5.2 ~ 5.5) では、未使用標本 (*malignancy index* = 6.1 ~ 6.2)
にくらべ予後と無関係に低い *malignancy index* を示した。

また、生検時および抗がん剤使用後切斷時の二回の標本の測定より得た悪
性組織性組織球腫の例では、生検時標本は明らかに悪性群の *malignancy*
index を示したが、切斷時には非悪性群の値を示し組織学的にも大星の判定基
準の Grade III に相当する抗がん剤の効果を確認した。これらの結果から、*malignancy*
index が抗がん剤の効果判定の指標となり、予後を類推する上でもきめめ有用
な診断法と考えられる。

本研究より、*n.m.r.* 法が骨肉腫・骨腫瘍の ①悪性診断 ②悪性度の評
価 ③抗がん剤の治療効果の判定に有用であることが明らかにされたが、今後さら
に多数の症例の検討が必要であると考えている。

脳病理変化解析のための試料の標準化 —凍結損傷モデルについて

京都大学脳神経外科教室 安里令人, 上田徹,
半田肇

はじめに 生体機能を担う蛋白質は水溶液中に存在し、膜蛋白質と水と接している。蛋白質の機能はコンホメーションに依存するが、それは水の分子運動の状態と変化する。このため蛋白質の機能すなわち生体機能と水の分子運動の状態との間には密接な関連があると考えられている。生体組織中の水の状態をNMR T_1 緩和時間で解析できる。生体は高度に複雑な系であるため、生体組織の機能変化を個々の生体内物質の機能変化に基づいて解析することは困難である。しかし生命の物質過程の場である水のプロトンNMR T_1 変化の解析によって、機能変化の総体を定性的に把握しようと考えた。病的過程で生起する生体変化の解析には、人為的な動物実験モデルを用いる必要がある。ここで生体組織の構造の変化を知り、生体の機能変化をとりだした他のパラメータを測定するには、生体から組織を切り出す必要がある。こうした試料のNMR測定結果には、試料作成過程に起因する種々の誤差要因が含まれる。本研究ではラット大脳の凍結損傷モデルを用いた場合の誤差要因を検討した。また凍結損傷組織の測定結果について、端的な解析を試みた。

試料及び測定方法

1. 標準試料

1mM Mn-EDTA 水溶液を標準試料として用いた。 H_1 の均一性の最適な領域で測定できるよう、試料容量は0.3mlとした。

2. 生体試料

体重350~400gの雄性Wistarラット12匹と体重400~450gの雌957匹を用いた。大脳皮質から50~70mgの組織を切り出して測定試料とした。直視下で切除した試料を内径4mmのテフロン管に封入し、これを内径9mmのNMR試料管に入れた。標準試料で検討する。

あきとれいじんうんた とある・ほんた はじめ

H₁の均一領域は高さ5~7mm程度であったため、生体試料は高さ5mmを越えないうようにした。

ラットはSomnoplexyl[®] (64mg of sodium pentobarbital per ml) 0.07 ml / 100g 体重 腹腔内投与で麻醉し、腹腔内出血と脱血死させた。断頭後、湿度95%以上の湿潤箱内でラット大脳を摘出し、大脳皮質から試料を切除した。大脳皮質と直下の脳梁白質との境界は肉眼で決定した。試料をガラス板に数回押しつけて表面の水を除去した後、内径4mmのテフロロン管へ挿入しガラス栓で密封した。用いた器具はすべて十分に洗浄し、純水で洗いあげた。断頭後密封終了までの時間は8分以内であった。原則として試料作成直後のNMR測定を開始した。氷冷保存した試料は38°Cの恒温槽で10分間加温後測定した。

2-a 生体試料での偶然的誤差および氷冷保存による誤差の検討

6匹のラットを用い、左右大脳半球からそれぞれ1個の試料を得た。1個は試料作成直後、他の1個は2時間氷冷後に測定した。

2-b 凍結損傷モデルでの誤差の検討

凍結損傷の作成方法とそれに伴う病理変化については第21回討論会の要旨集で述べた。ただNMR測定のS/Nを良くするためには、1か所の凍結病巣では試料量が不足した。そこで今までの骨髄から2mm外側にもう1個の骨髄を穿ち、連続した2個所の病巣を作成した。この改良により広範囲かつ今まで以上に均質な病巣を作成できた。

体重400~450gのラット57匹を用い、病巣作成前、作成後6時間または毎時、8~20時間の間は2時間ごと、2~7日の間は隔日以適当数のラットから試料を得た。別に体重350~400gのラット6匹を用い、18時間後の測定した。

3. NMR測定

水プロトン¹HのNMR測定にはBruker社製minispec PC-20を用いた。標準試料ではFIDを16回積算し、内部ADコンバータで180°パルスから30μsec後の信号強度を読み取った。脳組織ではPC-20の信号をKawasaki Signal Averter TMC-400で64回積算した後2倍に拡大し、XTレコーダにFIDを書き出させた。TMC-400のゲインオフセットは50μsec毎1000ポイントであり、FIDの読み取り誤差は±0.05Vであった。測定温度は38°C±1°Cであった。(プロトン共振周波数は20MHzであった)。

水プロトン¹HのT₁はinversion recoveryパルス列を用いて測定した。10組のdataを $M_z(t) = M_0 [1 - 2 \exp(-T_1/t)]$ (1) により直接最小自乗法による同帰分析を適用してT₁を算出したが、急速降下法を同時に適用し

て M_0 の最適値を得た。

4. 含水量測定

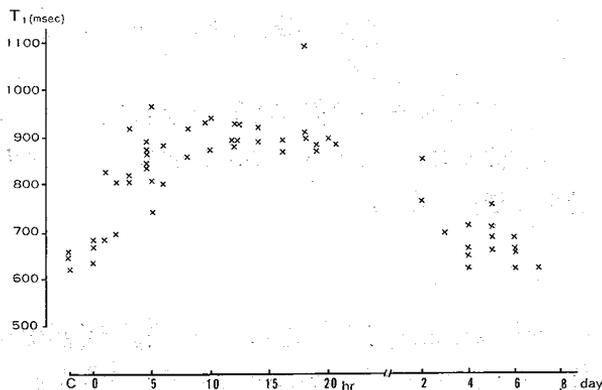
NMR測定終了後、試料の湿度量を測定し、95°Cで5日間乾燥させて一定重量に達したのを望温へ戻し、再び重量を測定した。(湿-乾燥重量)差から含水量を求め、含水比 $X/(1-X)$ を算出した。ここで X は脳組織 1g 中の固体成分量である。

5. 電解質量測定

乾燥させた試料を湿式灰化後 Shimadzu AA-646 を用い原子吸分析法で Na, K 含有量を測定した。 $f_K = [K] / ([Na] + [K])$ を算出しカリウム分画を定義した。

考按

一般に病理組織中の水プロトン ρ の NMR緩和時間測定では標本測定値の残差が大きい。このため切除組織の実験室測定でも、NMR・CTによる生体内測定でも結果の解析が困難になる。その主要な原因としては病理組織が高度に不均一であることが考えられる。NMRを用いた解析には均質標本作成が前提条件である。Klatzoが関与した大脳の凍結損傷モデルは、再現性に優れている。また損傷作成後の経時変化が一定していることも組織学的、生化学的に確かめられている。ところがこのモデルを用いた NMR測定結果は値のばらつきが大きい (Fig. 1)。この結果で、凍結損傷作成直後の 12 時間後と 2 日以降の data のばらつきが大きく、12~20 時間後ではほぼ一定の値の得られていると分かる。12~20 時間では T_1 がほぼ平衡値をとっている。このような結果を解釈するには、測定系にかかわる系統的誤差と試料に起因する偶然的誤差それぞれの大きさを検討しておく必要がある。



ふつう標準試料の NMR測定値の変動係数は $\pm 5\%$ 以内である。本研究でも inversion recovery パルス係数で得た測定値の変動係数は $\pm 2\%$ 以内におさまられた。Mn-EDTA 水溶液でプロトンは単スピン系であり、溶質分子と強い相互作用をする水とそれ以外の水との交換もきわめて速いと考えられる。そのような標準試料で水プロトンの緩和過程は単一の指数関数で表わされるを考えるとよい。そこで標準試料の T_1 は (1) 式を直接解いて得られる。ここで M_0 を精密に測定することは困難なため、急凍降下法により最適値を得た。その結果 $M_2(x)$ の計算値の誤差は $\pm 3\%$ 以内と、きわめて良好な近似結果が得られた (Table 1)。ラット

ス係数で得た測定値の変動係数は $\pm 2\%$ 以内におさまられた。Mn-EDTA 水溶液でプロトンは単スピン系であり、溶質分子と強い相互作用をする水とそれ以外の水との交換もきわめて速いと考えられる。そのような標準試料で水プロトンの緩和過程は単一の指数関数で表わされるを考えるとよい。そこで標準試料の T_1 は (1) 式を直接解いて得られる。ここで M_0 を精密に測定することは困難なため、急凍降下法により最適値を得た。その結果 $M_2(x)$ の計算値の誤差は $\pm 3\%$ 以内と、きわめて良好な近似結果が得られた (Table 1)。ラット

(Table 1) 標準試料計算誤差

EXPERIMENT	NUMBER OF DATA POINTS	SIGNAL INTENSITY		
		S.D. ^a	R ^b	CV ^c
1	10	0.039	0.9996	1.30
2	10	0.063	0.9990	2.13
3	10	0.051	0.9993	1.72
4	10	0.065	0.9989	2.20
5	10	0.035	0.9997	1.18
6	10	0.080	0.9984	2.71
7	10	0.063	0.9990	2.12
8	10	0.069	0.9988	2.32
9	10	0.049	0.9994	1.67
10	10	0.034	0.9997	1.17

^a S.D., STANDARD DEVIATION (VOLT UNITS)^b R, CORRELATION COEFFICIENT^c CV, COEFFICIENT OF VARIATION (%)

大脳灰白質では試料の高さが個々の試料で不定で、しかも標準試料より高いためH₁の最適条件を満せなかった。この場合とMz(c)の計算誤差は±4%以内と、標準試料と同等の結果を得た(Table 2)。以上の結果は逆に測定値自体の誤差が小さいことを示す。

ラット大脳灰白質で、水は細胞膜や神経膜によって空間的に分けられている。しかもそれぞれの compartment 内で相異なる水の存在することが考えられる。本研究ではラット大脳灰白質で水ポルトンの縦線結を10式で良く近似できた。しかもT₂が短い水を測定できるが、その可能性が低く、本研究の測定条件では複雑な相関係の加重平均値が得られたと考えられる。

(Table 3) 大脳灰白質試料の水浄誤差

NUMBER OF SAMPLES	T ₁ (SEC)			
	MEAN	V ^a	S.D. ^b	λ ^c
FRESH 6	0.671	1.24 × 10 ⁻⁴	1.12 × 10 ⁻²	0.0117
STORED 6	0.660	9.62 × 10 ⁻⁵	9.81 × 10 ⁻³	0.0103

^a V, UNBIASED VARIANCE^c λ, PROBABLE ERROR (P = 0.05)^b S.D., STANDARD DEVIATION

大脳灰質試料は肉眼的に切除・作成したため、種々の割合で直下の脳梁白質を含有する可能性がある。しかし、正常組織のT₁の変動係数は±0.50%であり、標準試料の±0.46%と同等であった。しかも、本

研究の手技で常に一定した試料を得られたと考えられる。また正常組織の含水量は79.7%で諸家の報告にはほぼ等しく、その変動係数は0.71%であった。このことは試料作成とNMR測定の過程で著明な水分喪失が無かったこと、一定の試料を作成できたことを示している(Table 3, 4)。このように測定系の系統的誤差、試料作成に伴う偶然的誤差が小さいことがわかり、凍結損傷による病理組織試料ではT₁値のばらつきが大きくなる(Fig 1, Table 4)。

凍結損傷脳の組織像は大きく3つに分けられる。まず表層直下の皮質には多数の空胞と炎症性浸出細胞の浸潤が著明である。その深部には比較的大きな空胞が密に存在する層があり、これを edema front と名付ける。さらに深部から脳梁にかけては空胞は無く

(Table 2) 大脳灰白質試料計算誤差

SAMPLE	NUMBER OF DATA POINTS	SIGNAL INTENSITY		
		S.D. ^a	R ^b	CV ^c
0004	10	0.165	0.9985	2.57
0005	10	0.165	0.9984	2.56
079	10	0.184	0.9976	3.44
080	10	0.185	0.9945	3.35
081	10	0.162	0.9984	2.86
082	10	0.203	0.9973	3.64
083	10	0.332	0.9935	5.82*
084	10	0.185	0.9975	3.41
086	10	0.131	0.9988	2.47
087	10	0.212	0.9973	3.67

^a S.D., STANDARD DEVIATION (VOLT UNITS)^b R, CORRELATION COEFFICIENT^c CV, COEFFICIENT OF VARIATION (%)

炎症細胞が多数存在。
 (しかもこれらの3つの部分
 は均質でなく、表面に近い
 ほど病理変化の程度が
 強い。つまり表面から深
 部に向う強度勾配がある。
 これが、凍凍試料の T_1
 にも組織学的変化の勾配
 に応じた変化があるを期
 得できる。事実、凍結病
 変のアトマンMR画像
 では、緩和時間変化に
 凍結局所を中心とした同
 心円状の勾配を認められた。
 凍結損傷という侵襲に

Table 4.

	NUMBER OF SAMPLES	T_1 (SEC)			H_2O (%)	
		MEAN \pm S.E.	CV(%) ^a	λ^b	MEAN \pm S.D.	CV(%) ^a
DOPED WATER ^c	10	0.405 \pm 1.88 $\times 10^{-3}$	0.46			
RAT CORTEX NORMAL ^d	12	0.666 \pm 3.32 $\times 10^{-3}$	0.50	0.0073	79.7 \pm 5.6 $\times 10^{-2}$	0.71
PATHOLOGICAL 4.5 H ^e	5	0.86 \pm 1.3 $\times 10^{-2}$	1.5	0.029	85.5 \pm 1.2	1.4
12 H ^e	5	0.88 \pm 2.0 $\times 10^{-2}$	2.2	0.055	84.3 \pm 5.9 $\times 10^{-1}$	0.70
18 H ^d	6	0.98 \pm 6.2 $\times 10^{-2}$	0.64	0.006	86.5 \pm 2.7 $\times 10^{-1}$	0.31

^a CV, COEFFICIENT OF VARIATION

^d 350-400 G BODY WEIGHT

^b λ , PROBABLE ERROR (P = 0.05)

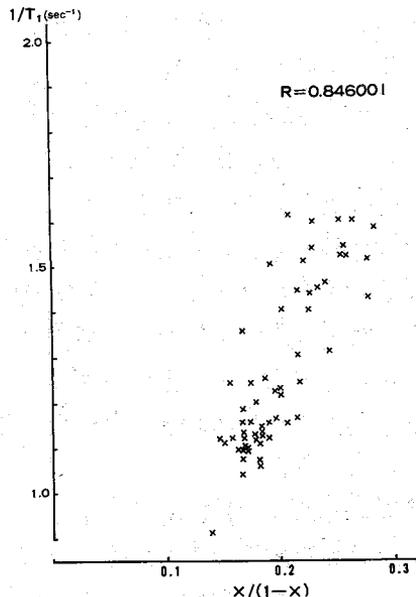
^e 400-450 G BODY WEIGHT

^c 0.3 ML AQUEOUS SOLUTION OF 1 MM MN-EDTA

凍結損傷という侵襲に
 対する生体の反応は均質であり、各時刻での病理変化の強さは個体差がある。これが
 変化の極値の異なるまで、および治癒に向う過程では、病理組織像は個体のま
 での均質でありうる。本研究での T_1 測定値のばらつきはこのような均質性の表現であり、偶
 然的誤差の大きさを示すものではないといえる。病理変化の極値の異なるあとの12-20
 時間では平衡状態が出現し、各個体は一律な組織像を示す。 T_1 値の変動係数が
 損傷作臥18Hで±0.5%と正常組織と等しいといふ、病理組織に個体差が少いこ
 を示している (Fig 1, Table 4)。

各試料の緩和率 ($1/T_1, sec^{-1}$) と含水比との
 関係を検討すると、99%以上の確率で有意な
 正の相関関係を認められた。このことは相係数と考
 えてきたラット大脳灰白質の水、基本的には、遠
 く交換を要する2相系に近似していることを示してい
 る。本研究の data のみでその2相系何を意味す
 るかを明らかにできるが、Clifford のモデルを
 適用することから推察されれば、ラット大脳灰
 白質でのゆるい自由水の T_1 は 2.38 sec と計算
 できた(2)

- Res. 1. Asato, R. (1983) Stroke 14, 191
 2. Hazlewood, C.F. (1979) In Cell-
 Associated Water, Academic Press, 165



特 別 講 演

New NMR Data Processing Methods and Their Application
in Chemistry, Biophysics and Medicine

George C. Levy

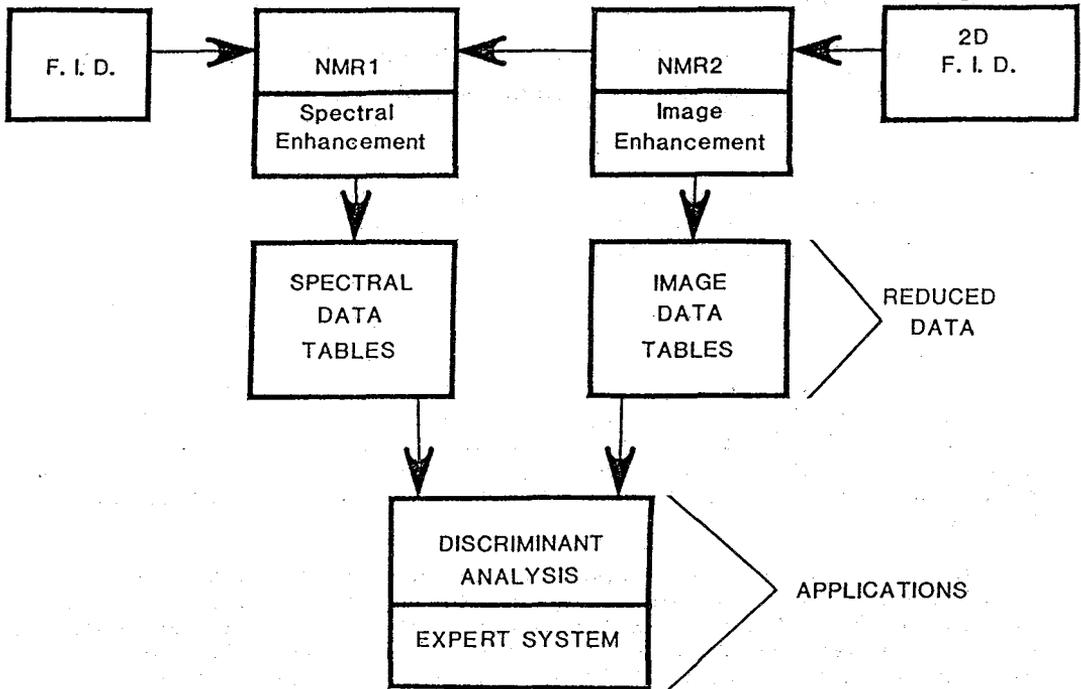
N.I.H. Biotechnology Research Resource For Multi-Nuclei
NMR and Data Processing, Syracuse University, Syracuse,
New York 13210, U. S. A.

In 1978, we initiated a project with then graduate student Charles L. Dumoulin to develop a software system for NMR data reduction which would utilize the power of a general purpose laboratory computer, separated from the tasks of data acquisition and primary processing that resided in NMR spectrometer computer systems.

In 1981, the project expanded to use the additional power of multi-user, multi-programming operating systems and hardware apparent in 32 bit super-minicomputers such as Digital Equipment VAX or Data General MV Systems. Also in 1981, we initiated the second phase of this project, utilizing sophisticated statistical methods to provide a measure of intelligence in the software. Specifically, we set as our goal the ability to completely process a free induction decay, condition the spectrum, quantify all features, perform calculations, assign resonances and prepare reports and annotated plots.

Our software works differently than does commercially available NMR data reduction software in that the computer program itself can calculate procedures and corrections to the data, even in the absence of human supervision. This places severe requirements on the reliability and correctness of individual processing steps, particularly those not amenable to accurate evaluation in the digital computer (such as spectral phasing).

The ultimate goal of our software approach is the total automation of the analysis of NMR data from FID to complete characterization of all spectral information. The figure below describes relationships between our current and planned software systems. This proposed software environment may be applied to a variety of analyses including metabolic NMR spectroscopy, magnetic resonance imaging, process quality control, assignment of complex spectra, etc. Applications will be discussed, including quantitative analysis results, synthetic and biopolymer characterization, and *in vivo* ^{31}P NMR studies of metabolic processes.



Acknowledgements: The software described in this paper has been the product of a group effort. The author particularly acknowledges the contributions of Dr. Charles L. Dumoulin, now at General Electric Corporate Research and Development. Current software development is being supervised by Dr. John Begemann. Financial support from the General Electric Company, IBM Instruments, Inc., Allied Corporation, and the National Institutes of Health are gratefully acknowledged.

GCL:cma

