

第24回NMR討論会

講演要旨集

1985年11月6日(水)・7日(木)・8日(金)

工業技術院筑波研究センター
共用講堂

共 催

日本化学会・日本農芸化学会・日本分析化学会
日本薬学会・日本生化学会・日本生物物理学会

11月6日(水)

A 会場

9 : 30 ~ 10 : 30

座長 引地 邦 男

- A 1. 時間反転または周波数倒置を用いた2次元位相スペクトル
(日本電子) ○永山国昭 実宝敏代 1
- A 2. プロトンエンハンス2次元J分解法(II) (selective 2D INPT)
(日本電子) ○実宝敏代 永山国昭 5
- A 3. テーラードパルスを用いたFTNMR法
(日本電子) ○大内宗城 永井壮市 小川秀次郎 9

*** 休憩 (10分) ***

10 : 40 ~ 12 : 00

座長 竹内 敬 人

- A 4. Multiple-Relayed COSY — 糖質への応用 —
(北大理) ○伊倉光彦 引地邦男 13
- A 5. 二次元NMR法による天然物の構造解析 — 二次元スペクトルのピークサーチ —
(東レリサーチ) ○稲垣冬彦 (日本電子) 松浦俊雄 鈴木一 17
- A 6. Selective coherence transfer法の構造解析への応用
(東大応微研) ○降旗一夫 瀬戸治男 (日本電子) 大内宗城 21
- A 7. 液晶NMR法による分子構造と分子配向の研究. フェノチアジン誘導体について
(阪大薬) 藤原英明 ○渡辺昌幸 高木達也 佐々木喜男 25

*** 昼食 ***

13 : 00 ~ 15 : 00

座長 藤原 英 明

- A 8. シスーおよびトランスージアゼンのOne-Bond ^{15}N - ^{15}N スピン結合定数の符号決定
(京大薬) ○黒田義弘 (京都薬大) 藤原精弘
(名古屋市立大教養) 桑江彰夫 (日本電子) 松下和弘 29
- A 9. アニリン誘導体のリチウム塩のNMR
(名工大) ○井出正一 岩沢一久 吉野明広 吉田忠義 高橋憲助 33

-
- A 10. ピリジオンN-オキシドの ^{17}O -NMR スペクトル — ケミカルシフト置換基効果 —
(阪大産研) ○沢田正実 高井嘉雄 木村聡 三角荘一 37

座長 中 西 洋 志

- A 11. アリール置換ゲルミルアニオンの NMR 研究
(学習院大理) 持田邦夫 ○若狭雅信 (東大教養) 竹内敬人 41

- A 12. 有機ゲルマニウム化合物の NMR (II) 対称四置換ゲルマンの緩和機構と四極子結合定数
(東大教養) ○原園としえ 田中克巳 竹内敬人
(浅井ゲルマニウム研) 柿本紀博 44

- A 13. テトラ (p-エトキシフェニル) ポルフィンLn (III) のシフト能
(茨大理) ○堀江克之 平山昌甫 (茨城高専) 蝦名不二夫
(日立那珂) 池辺義紀 吉田慎 48

*** 休 憩 (20分) ***

15 : 20 ~ 17 : 20

座長 早 水 紀久子

- A 14. アセチル化糖の ^1H nmr シフトに及ぼす溶媒効果
(阪大産研) ○高井嘉雄 沢田正実 市川宏之 三角荘一 52

- A 15. NOE による構造決定 花色色素アントシアンへの応用
(名大化測機セ) 近藤忠雄 (名大農) 田村啓敏 ○河合隆利 後藤俊夫 56

- A 16. m-フェニレン型 PGI_2 誘導体の立体配座解析
(東レリサーチ) ○三輪優子 稲垣冬彦
(東レ基礎研) 長瀬博 松本和久 岩永由紀 大野清隆 60

座長 高 橋 憲 助

- A 17. キニジン類の立体化学におけるスピナー格子緩和時間の利用
(神戸女子薬大) ○杉浦真喜子 蔡東玲 高尾梢雄 (阪大薬) 藤原英明 64

- A 18. ペリ置換ナフタレン誘導体の動的挙動と NMR スペクトル
(化技研) ○名川吉信 本田皓一 石塚靖子 中西洋志 山本修 68

- A 19. マイクロコンピュータ向けプロトン NMR データ検索システムの作製
(国立衛生試) ○叶多謙藏 (三菱レイヨン商品開発研) 片桐禅 72

B 会 場

13 : 00 ~ 15 : 00

座長 安 藤 勲

- B 8. NMR ケミカルシフトの磁場依存性について・金属核 (^{111}Cd , ^{109}Ag etc.)
(三菱製紙感材研) ○遠藤一央 山本京之介 (日本電子) 松下和弘 出口健三 77
- B 9. 金属核 NMR の化学シフトに及ぼす溶媒効果の origin
(近畿大理工) ○宗像恵 北川進 八木富士夫 佐々木学 81
- B 10. ゲージ不変な化学シフトの計算
(北見工大) ○福井洋之 三浦宏一 85
- 座長 池 田 龍 一
- B 11. 回転している固体における ^{13}C 化学シフト異方性及び ^{13}C - ^1H 間の相互作用の測定
(京大理) 寺尾武彦 ○三浦等 雑賀亜幌 89
- B 12. 固体 ^{13}C NMR による尿素包接化合物中のアルカンの化学シフトと運動性
(京大理) 今城文雄 中井利仁 ○前田利之 三浦等 寺尾武彦 雑賀亜幌 93
- B 13. アモルファスシリコン及び微結晶シリコンの ^{29}Si NMR
(化技研) ○林繁信 早水紀久子 山本修
(電総研) 山崎聡 松田彰久 田中一宜 97

* * 休 憩 (20分) * *

15 : 20 ~ 17 : 20

座長 寺 尾 武 彦

- B 14. ^{17}O 濃縮硫酸アンモニウムの $^1\text{HT}_{1\rho}$, T_{1D} と硫酸イオンの運動
(日大文理) ○千葉雄彦 宮島清一 101
- B 15. フェロセンの固相相転移と分子運動
(名大理) 久保厚 ○池田龍一 中村大雄 105
- B 16. ^{35}Cl 及び ^1H NMR を用いた塩素イオンとトリハロメタンの水素結合に関する研究
(北見工大) ○三浦宏一 福井洋之 田中雅伸 109

座長 千葉雄彦

- B 17. 一次元投影法による液-ガス系のスピン格子緩和の直接分離測定
(北大工) ○下川繁三 山田英二 113
- B 18. スピンロッキング法による蛋白水和水の自己拡散係数の測定(2)
(北大低温研) 花房尚史 117
- B 19. H_2O/D_2O 混合系での重水素核スピン格子緩和における水素同位体効果
(防衛大化, 東工大原子炉) ○垣花真人 岡本真実 南雲正 121

11月7日(木)

A 会場

9 : 30 ~ 10 : 50

座長 赤坂 一之

- A 20. 2D-INADEQUATE 法と Polarization Transfer 法のコンビネーション
— セスキテルペン類構造決定への応用 —
(Max-Planck-Institut für Kohlenforschung) R. Benn ○森山広思 125
- A 21. Distance Geometry 法による分子座標生成とその $^1\text{H}-T_1$, NOE の定量解析への応用
(三共分析代謝研) ○春山英幸 近藤三千男 129
- A 22. ^{23}Na 固体高分解能 NMR (1) 線巾, 化学シフト, 電子構造
(国立がんセンター研) ○相田美砂子 多部田涼子 斎藤肇 133
- A 23. ^{23}Na 固体高分解能 NMR (2) Na 塩, Na コンプレックスのキャラクタリゼーション
(国立がんセンター研) ○斎藤肇 多部田涼子 相田美砂子 137

*** 休憩 (10分) ***

11 : 00 ~ 12 : 00

座長 亀井 裕 孟

- 特別講演 磁性合金の話
(電総研) 近藤 淳 141

*** 昼食 ***

13 : 10 ~ 15 : 10

座長 北丸 竜 三

- A 24. ^1H 及び ^{23}Na NMR と DSC による水-高分子スルホン酸誘導体 Na 塩系の相転移に関する研究
(製科研) ○畠山兵衛 岩田ひろ (織高研) 畠山立子 143
- A 25. 規則構造をもった高分子鎖の ^{13}C NMR — 化学シフト理論とその応用 —
(東工大工) ○山延健 安藤勲 147
- A 26. NMR による高分子膜中の低分子の挙動 (I) 酢酸セルロース膜-水・メタノール系
(化技研) ○松村和紀 早水紀久子 柳沢勝 中根堯 柳下宏 山本修 151

座長 森 島 績

- A 27. 含水試料に対する CP/MAS ^{13}C NMR
(京大化研) ○堀井文敬 平井諒子 北丸竜三 155
- A 28. ^{13}C 磁気緩和によるポリエチレンの結晶 — 非晶界面相の検出 —
(京大化研) 村山浩一 堀井文敬 ○北丸竜三 159
- A 29. 固体高分解能 ^{13}C NMR によるイオノファーのコンホメーション解析
(国立がんセンター研) ○多部田涼子 斎藤肇 163

* * 休 憩 (20分) * *

15 : 30 ~ 16 : 30

座長 斎 藤 肇

- A 30. チトクロム C 中間酸変性 "molten globule" の ^1H -NMR による構造研究
(日本電子) ○大串幹夫 永山国昭 167
- A 31. チトクロム C 関連化合物の NMR — チトクロム C_1 及びアポチトクロム C-プロ
トヘム複合体のヘム近傍構造 —
(京大工) ○舟橋孝 森島績 171
- A 32. 金属ポルフィリンラジカルの NMR — メソオキシヘミンの特異な常磁性 NMR と
その電子構造 —
(京大工) ○城宜嗣 森島績 (京大医) 佐野晴洋 175

* * 休 憩 (10分) * *

16 : 40 ~ 17 : 40

座長 京 極 好 正

- 特別講演 生化学における NMR
(東大理) 宮澤辰雄 179

* * 懇親会 [18 : 00 ~ 20 : 00] * *

B 会 場

9 : 30 ~ 10 : 50

座長 池 上 恒 男

- √B 20. 不均一系材料のNMR イメージング
(電総研) ○亀井裕孟 片山義朗 183
- B 21. 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
— スペクトル帯域の拡大 —
(日立中研) ○松井茂 関原謙介 小野寺尚 塩野英己 河野秀樹 187
- B 22. 磁場勾配の時間依存性の測定法 — 高速ケミカルシフトイメージングへの応用 —
(日立中研) ○小野寺尚 松井茂 関原謙介 塩野英己 河野秀樹 191
- B 23. NMR 映像法による乱流のイメージング (II)
(東芝総合研) ○巨瀬勝美 佐藤幸三 岡本和也 伊藤阿耶雄 195

13 : 10 ~ 15 : 10

座長 西 川 弘 恭

- √B 24. 糸状菌菌糸中の水の T_1 の解析及び殺菌剤処理による T_1 の変化
(農業環境技研) ○吉田充 能勢和夫 199
- √B 25. ^{31}P -NMR による赤潮鞭毛藻のポリリン酸代謝過程に関する研究
(国立公害研) ○渡辺正孝 木幡邦男 功刀正行 203
- √B 26. ^{31}P -NMR saturation transfer 法による大腸菌のエネルギー代謝の研究
(Oxford 大) ○三森文行 D. Rees G. K. Radda I. D. Campbell 207

座長 巨 弘

- J B 27. NMR 法による *in vivo*, 生体組織の研究
(京都府立医大) ○吉崎和男 犬伏俊郎
(Pennsylvania 大, Oxford 大) M. Schnall J. S. Leigh B. Chance G.K.Radda 211
- B 28. ^{23}Na -NMR による神経細胞内 Na^+ と活動電位の相互関係の解析
(京都府立医大) ○西川弘恭 (生理研) 瀬尾芳輝 215
- B 29. ^1H と ^{23}Na -NMR 緩和時間による椎間板髄核内水, Na の動態の研究
(京都府立医大) ○三船哲郎 日下義章 西川弘恭 山下文治 榊田喜三郎
(生理研) 瀬尾芳輝 219

*** 休憩 (20分) ***

15 : 30 ~ 16 : 30

座長 亀井裕孟

- B 30. 水溶性シフト剤の灌流ラット唾液線への応用
(生理研) 瀬尾芳輝 村上政隆 巨弘 (京都府立医大) 西川弘恭
(北大獣医) 松本武久 223
- B 31. ^{19}F -NMR の生体への応用
(京都府立医大) ○樋口敏宏 成瀬昭二 堀川義治 田中忠蔵 平川公義
西川弘恭 227
- B 32. NMR による病態解析 (VI) — NMR による抗癌剤の治療効果の判定 —
(熊本大医) ○山崎政城 下村義文 231

11月8日(金)

A 会場

9 : 30 ~ 10 : 50

座長 稲垣冬彦

- A 33. NMR スペクトル法による DNA の構造の研究 (第 5 報) d-ヌクレオチド-シクロ
デキストリン包接体と NMR スペクトル
(化技研) 石塚靖子 名川吉信 ○中西洋志 山本修 235
- A 34. ヌクレオシド環状ケイ素誘導体のコンホメーション
(織高研) ○曾良達生 古沢清孝 上野勝彦 坂井士 津田圭四郎 239
- A 35. ニワトリ赤血球核及びクロマチンの ^{31}P 固体 NMR
(阪大蛋白研) 西本正三 ○阿久津秀雄 京極好正 243
- A 36. 光 CIDNP 法によるタンパク質の研究 — 免疫グロブリンを例にして —
(阪大蛋白研) ○林文晶 京極好正 (東大理) 遠藤聡史 荒田洋治 247

*** 休憩 (10分) ***

11 : 00 ~ 12 : 00

座長 阿久津 秀 雄

- A 37. 免疫系タンパク質の高次構造: ^1H NMR による研究法とその成果
(東大理) 遠藤聡史 武藤裕 伊藤涉 田中俊之 鳥越秀峰 ○荒田洋治 251
- A 38. 蛋白質 NMR シグナルの一般的帰属手法
(東京都立大理) ○甲斐荘正恒 長尾洋昌 朝長典子 内田健一 中村好邦
(バリアン・インスツルメント) 串田克彦 255
- A 39. 銅蛋白質モデル複核銅 (II) 錯体の NMR スペクトル
(近畿大理工) ○北川進 宗像恵 前川雅彦 259

*** 昼食 ***

13 : 00 ~ 14 : 40

座長 荒田 洋 治

A 40. ^{15}N CP-MAS NMR : 合成ポリペプチドの立体構造と ^{15}N 化学シフトとの関係
(群大工短大) ○ 荏司 顯 尾崎 択男 (日本電子) 藤戸 輝昭 出口 健三
(東工大工) 安藤 勲 263

A 41. 蚕ならびに絹フィブロインのNMR
(農工大工) ○ 朝倉 哲郎 田中 智子 山口 禎二 267

A 42. TRNOE によるペプチドとリン脂質二重膜との相互作用の解析 : コンホメーション
及び膜内での深さ
(東大理) ○ 岡田 明彦 若松 馨 鈴木 緑子 東島 勉 宮澤 辰雄 271

座長 甲斐 荘 正 恒

A 43. リン脂質に埋もれた生理活性ペプチドの構造と活性相関
(東レリサーチ) ○ 稲垣 冬彦 寺沢 功 275

A 44. リン脂質モデル膜の固体高分解能 NMR
(理研) ○ 柴田 俊之 鵜沢 洵 池上 明 279

第 1 日

11 月 6 日 (水)

A 会 場

(日本電子 生体研) ○永山 国昭 実宝 敏代

【はじめに】

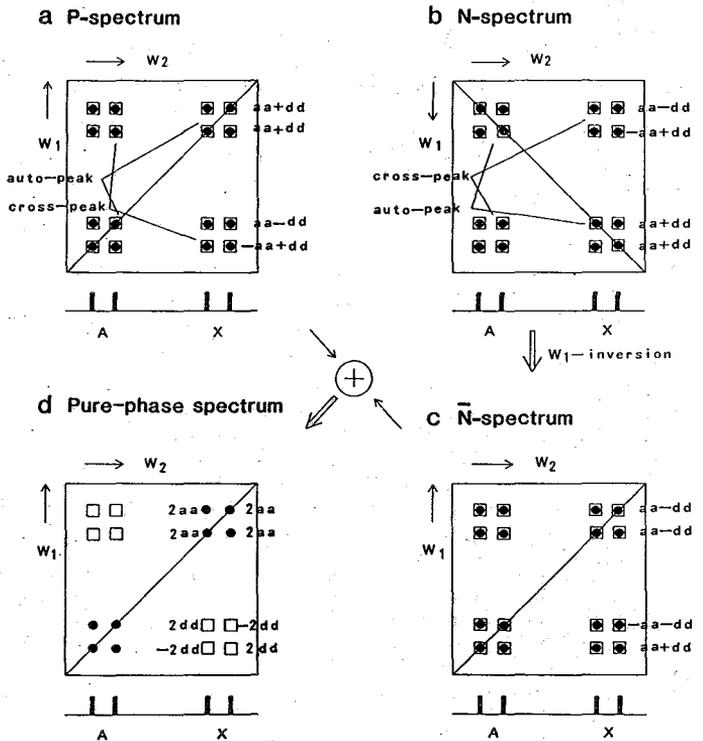
二次元NMRスペクトルは従来絶対値による表示が用いられてきた。この表示法の利点は位相補正なしの手軽さとS/N比利得にあったが、反面、(1)重ね合わせがきかず定量的解析に不向き、(2)1/2で落ちてゆく長い裾を引くためピークの分離が悪い、(3)符号がすべて正になるためクロスピークとNOEクロスピークの差が区別できない、などの欠点を持つ。この欠点は位相表示スペクトルでカバーされるが、そのためには各ピークが混合位相を持たないようにする必要がある。混合位相というのは位相変調型の二次元応答を持つ分解二次元NMRなどに特徴的に見られる²⁾。本来COSY, NOESY等のNMR出力は純位相を持つ強度変調型であった。検出に単一位相を使い、周波数オフセットをスペクトルの左右の端にセットする古い二次元NMRでは従ってCOSY, NOESYスペクトルは二次元純位相スペクトルを表示し得た。しかし検出に兩位相、いわゆるカドラチャー検出(QD)を用いるに及んで二次元応答は意識的に位相変調タイプに変換させられ、混合位相の問題が生ずるようになった。QDを用いた二次元法では、二次元周波数上のオーからオ四象限全てを用いるため当然ではあるが周波数の正負を区別せねばならず、それができるのは位相変調型の応答であるためである。

従ってQD-二次元法では周波数の正負を区別しかつ純位相となる二次元スペクトルを工夫する必要があった。この問題に対し今まで二つの方法が提案されている。一つはω方向の時間域信号を通常のQDと同じように複素化することで、²⁾もうひとつはRedfield trick³⁾を用いω方向の周波数オフセットをスペクトルの両端に持つていくものである。⁴⁾我々はオ3の方法を考えたので報告したい。⁵⁾

【方法】

図1に示すようにPとNの両スペクトルを用いる所が我々の基本である。AXスピンのCOSYスペ

図1. 周波数倒置を用いたCOSYスペクトルにおける純位相化の様式図



ながやまくにあき・じっぽうとしよ

クトルでこれを説明すると、Pスペクトル、Nスペクトルの位相の混合の仕方はクロスピーク、オートピークで図1(a),(b)のようになる。PとNは一見鏡映対称性があると思われるがこれは正しくない。オートピークに注目するとそのピークの位相は共に純吸収(a a)と純分散(d d)が和として表示される。今Nスペクトルの ω 方向の倒置を行うと図1(c)のようにNの鏡映スペクトル \bar{N} ができる。ここで吸収、分散の周波数倒置に対する規則 $a(\omega)=a(-\omega)$, $d(\omega)=-d(-\omega)$ を用いた。従って図1(c)のように純分散のみの成分d dが $-d d$ と符号を変える。このようにして得た \bar{N} とPの両スペクトルの和をとるとめでたく純吸収ピークがオートピークに対し実現する(図1(d))。この場合クロスピークは逆に純分散型になる。周波数倒置は線形演算なので同じことが時間域の信号の時間反転についても成り立つ。これを数式を用いて説明しよう。P, N両スペクトルに対応する時間域信号は一般に下のように表される。

$$\left. \begin{aligned} P(t_1, t_2) &= \exp(\Omega_1 t_1) \exp(\Omega_2 t_2), & \Omega_1 &= i\omega_0^{(1)} - \frac{1}{T_2^{(1)}} \\ n(t_1, t_2) &= \exp(\Omega_1^* t_1) \exp(\Omega_2 t_2), & \Omega_2 &= i\omega_0^{(2)} - \frac{1}{T_2^{(2)}} \end{aligned} \right\} (1)$$

時間反転は $t \rightarrow T-t$ (T は最大時間) に変える変換である。これを(1)の $n(t_1, t_2)$ の t_1 に適用すると $\bar{n}(t_1, t_2) = \exp(\Omega_1^*(T-t_1)) \exp(\Omega_2 t_2)$ となる。 $P(t_1, t_2)$ と $\bar{n}(t_1, t_2)$ の和を取って ω 方向についてフーリエ変換を行うと、

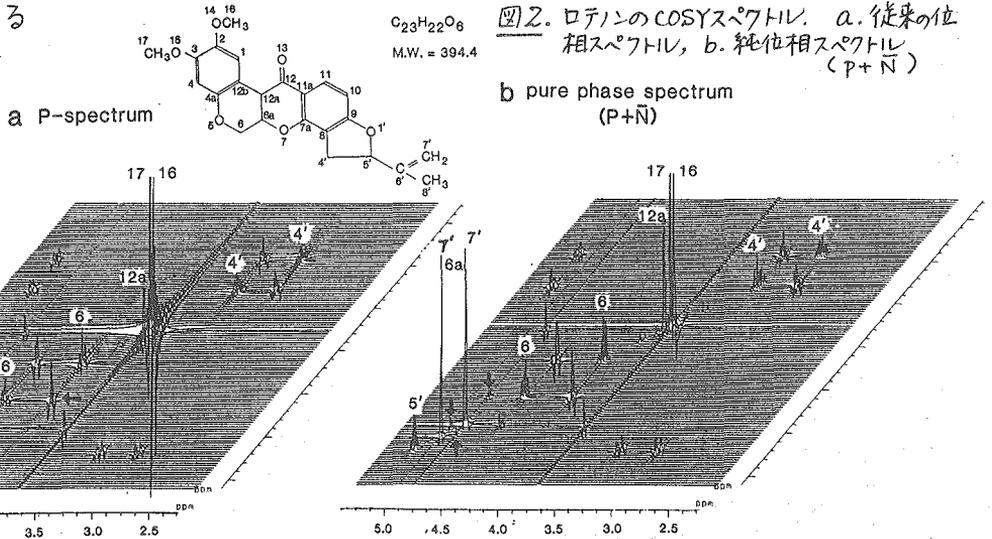
$$\int_0^T [P(t_1, t_2) + \bar{n}(t_1, t_2)] e^{i\omega_1 t_1} dt_1 = (1 - \cos[(\omega_1 - \omega_0^{(1)})T] e^{-\frac{1}{2}T}) \frac{1/T_2^{(1)}}{(\omega_1 - \omega_0^{(1)})^2 + (1/T_2^{(1)})^2} e^{i\omega_2 t_2} \quad (2)$$

となる。これは ω_1 方向について正しく吸収型となっている。 ω_2 方向についても吸収型をreal partとして取り出せるので、両方向の純位相スペクトルが実現される。

【実験】

COSYについて本方法を適用したのが下に示す図2である。(a)は吸収、分散の混合した通常用いられる

Pスペクトルの位相スペクトル、(b)は図1の方法を適用して得た純位相



スペクトルである。今までのPスペクトルは図2(a)のような混合型から絶対値(パワー)スペクトルを作ってきたわけだから方向に極めて長い裾を引くことが分る。例えばG, G', 17, 16のオートピークは分散成分に由来する強い裾を持ち、かつピークは正と負の強度をとる。図2(b)はこれらのピークの分散成分を消したため、その裾が完全に消え吸収カーブ特有の切れのよいピークが実現している。これによりGメチレン基間のクロスピーク(矢印)が図2(b)でより鮮明に浮かび上がった。オートピークが純吸収表示されるため対角線まわりのクロスピークがよく見える点でこの方法は優れている。もしN-Pのスペクトルの組み合わせをとると逆にオートピークが純分散表示され、クロスピークは純吸収型となる。これを図3に示した。この場合対角線まわりははっきりした pure phase spectrum (N-P)

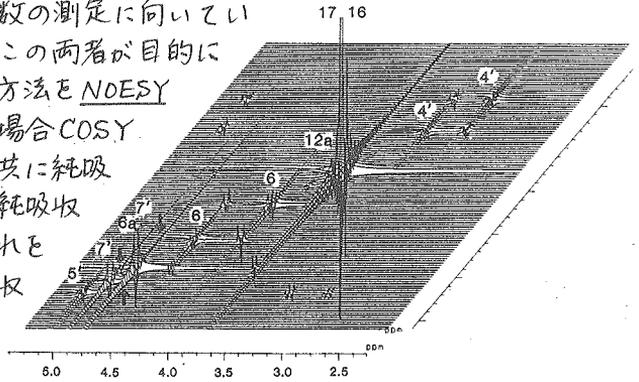


図3. ロテインの COSY スペクトル(N-P)
図2(b)と異なりクロスピークが純吸収型を示す

くなるが、対角線から遠く離れたクロスピークは純吸収型なのでピークの切れが良く、J結合定数の測定に向いている。我々の方法の利点は、PとNからこの両者が目的に応じて作れる点である。次にこの方法を NOESY に適用した結果を図4に示した。この場合 COSY と異なり、オートピーク、クロスピーク共に純吸収型、純分散型が得られる。もちろん純吸収型の表示が優れているので図4にはそれを示した。はしがきで述べたように純吸収表示ではクロスピークの符号を見られるのでそれがJクロスピークか、本来の NOEピークかが区別される。

図4(a)の矢印で示すG'のクロスピークはオートピークと違い負

の強度と a になってい
る。
これは

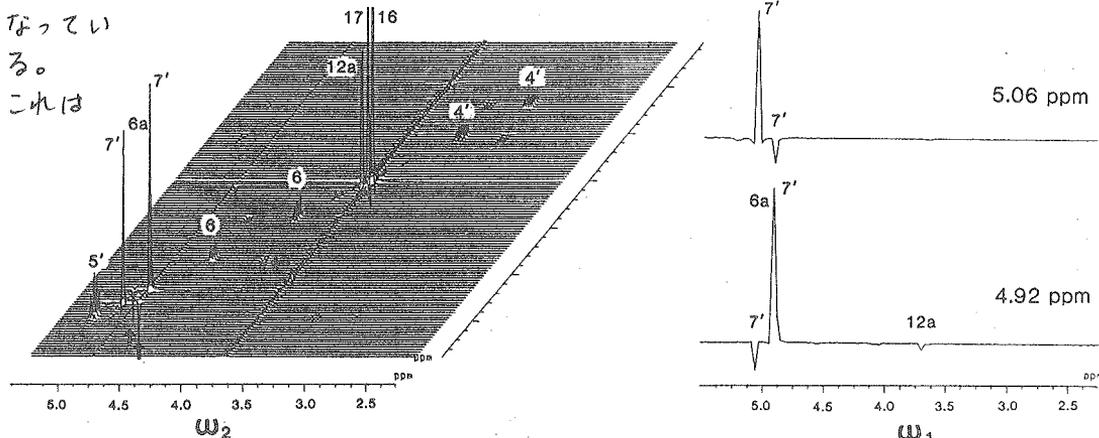


図4. ロテインの純吸収表示スペクトル. a. 3次元表示, b. 7の ω_1 方向の断面図.

図2(b)のCOSYのグのクロスピークの符号と逆である。従って確かにNOEピークと主張できる。NOEピークが負となるのは但し低分子の場合で、スピン拡散が効く高分子ではNOEピークの符号は正である。いずれにせよ対角線まわりの切れの良さは接近したピーク間のクロスピークの分離にとって重要である。S/N比向上 本方法の重要なもうひとつの側面はS/N比の向上である。我々の方法では従来法と同じ測定時間内にPとNの両スペクトルが取れる。PとNのスペクトルに現われる雑音にはコヒーレンスがないことが証明できるので、この両者の和をとることはいわば異なる2回の実験結果の和をとることに等しい。当然ではあるが $\sqrt{2}$ のS/N利得がかせげるのである。このことを示すために図5にはNOESYの絶対値スペクトルに対しP+NのスペクトルとP、Nのスペクトルを比べた。このことは一般にPとNの2つのタイプの表示を持つ全ての2次元法に適用されることを示すため図6には ^1H - ^{13}C シフト相関法についてその絶対値スペクトルがP+Nにおいて $\sqrt{2}$ のS/N比向上を得ることを示した。

【文献】

1. G. Bodenhausen et al., J. Magn. Reson. 26, 133 (1977).
2. D.J. States et al., J. Magn. Reson. 48, 286 (1983).
3. A.G. Redfield and S.D. Kuntz, J. Magn. Reson. 19, 250 (1975).
4. D. Marion et al., Biochem. Biophys. Commun. 113, 967 (1983).
5. K. Nagayama, 投稿中.

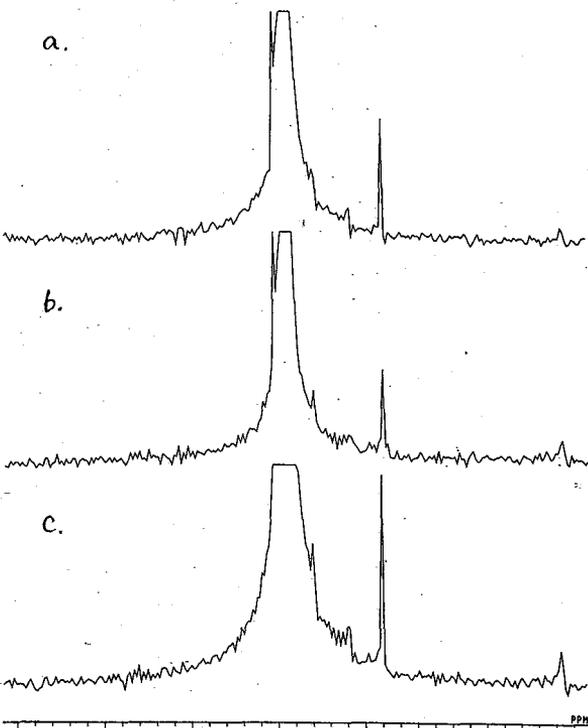


図5. ロテインのNOE絶対値スペクトル、7メチレン(5.06ppm)の断面図。a. Pスペクトル, b. Nスペクトル, c. P+Nスペクトル

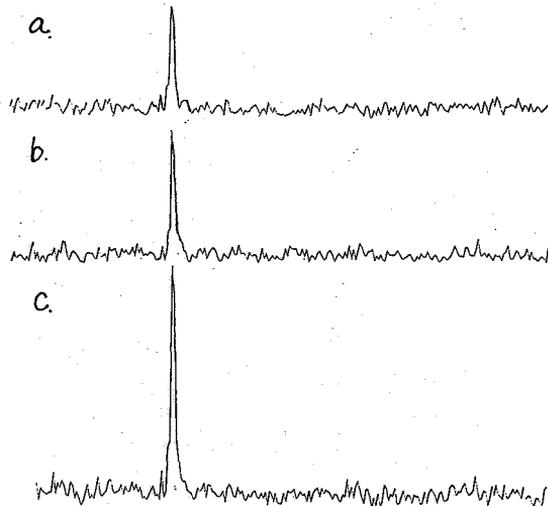


図6. オキシチンのH-C COSY (^1H - ^{13}C シフト相関)スペクトルの断面図(Tyr) a. Pスペクトル b. Nスペクトル c. P+Nスペクトル (すべて絶対値表示)

(日本電子 生体研) ○実室 敏代 永山 国昭

【はじめに】

昨年の討論会で報告したINEPT法の2次元法の拡張によるJ分解法の改良を行った。この方法は通常相関法に用いられてきた磁化分極移動の考えをJ分解法に応用するものである。すでにプロトン間のJ結合を、分極移動を用いて¹³C核で測定する方法が提案されているが¹⁾、¹H-¹³C核間のJ結合を分極移動で見る方法とは異なる。我々の方法は、¹H-NMRにおけるカーボンサテライトを¹³Cで観測する方法であると言える。この方法の利点は、INEPTと同じように¹H核の磁化強度と速い繰り返しパルスが可能という2点にあるが、昨年度の報告に見るように3つの問題を解決する必要があった。それは、(1) J_{HH}由来の分裂がJ_{CH}の分裂に重なる。(2) 不必要に強い-CH_nのJ結合があり長距離結合のJ_{CH}に重なる。(3) 1つの¹³C核に注目した時、数多くの長距離J_{CH}結合が重なる。我々の方法は、特に非常に弱い長距離J_{CH}結合を測定するのが目的であるのでこれら3者がすべて解決される必要がある。本報告では、この問題の解決といくつかの応用について述べる。

【方法とテスト】

アイデアは極めて簡単であり、図1(a)に示す2DINEPT法において¹H核に照射する180°パルスを選択的に特定の核に限定する選択的ソフトパルスに変えればよい。これによりまず、J_{CH} > 100 Hzのカーボンサテライトは照射されないで(2)が解決し、選択的¹H

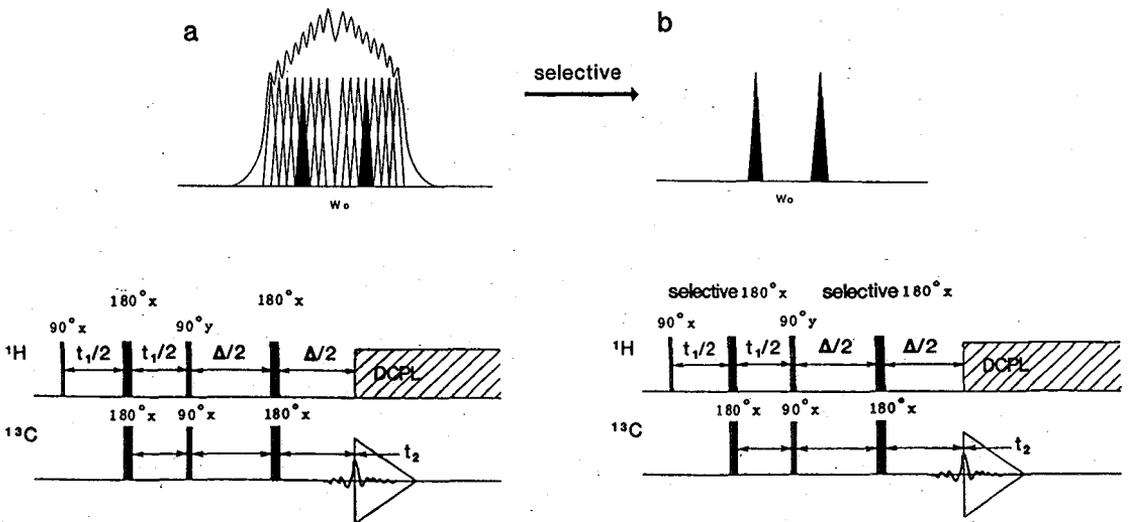


図1. 非選択的2DINEPT法(a)と選択的2DINEPT法(b)

じっぽうとしよ・ながやまくにあき

核 180° パルスである為自動的にプロトン間のデカップリングが行われ、(1)の問題が解決する。そして特に有効なのは、数多くの J_{CH} 結合による multiple-doublet の問題(3)が回避されることである。このことは模式的に図1に示したが、一般に2番目の 90° パルスの後に ^{13}C 核は Δ の待ち時間を置いてデカップルされるが、デカップリングのない時の幅広い ^{13}C 核の線幅は図1(a)に見る多くの J_{CH} による分裂に起因するものである。これは ^{13}C 核の速い緩和を引き起こし、分極移動の効率を著しく低下させる。分極移動の効率は次式で決まるが、multiple-doubletのため一見 T_2^* が非常に小さくなってしまいうわけである。

$$\sin \frac{J}{2} \Delta \cdot \exp(-\Delta/T_2^*) \quad \text{----- (1)}$$

選択法は特定の J_{CH} 結合のみを取り出すので、本来のシャープな線幅が実現し(図1(b))低分子では T_2^* が大きく待ち時間 Δ を $\sin \frac{J}{2} \Delta = 1$ の最大効率に合わせられるわけである。multiple-doubletの問題が、特にオ 290° パルス後の待ち時間 Δ の設定に重要であることを図2に示した。非選択法では $\Delta > 50\text{ms}$ では殆ど ^{13}C 核が減衰してしまう。他方選択法では 400ms 以上に渡り殆ど ^{13}C 核が本来の T_2 で減衰せずに残っているのがわかる。

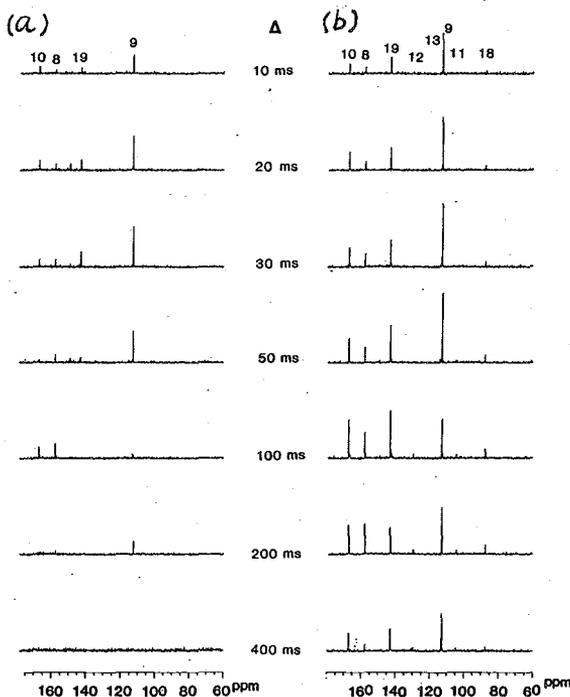


図2. 2DINEPT法における最後の 180° パルスの非選択、選択照射の比較。最初の 180° パルスは両者共に選択パルスを用いた。 Δ は図1のオ2の待ち時間である。サンプルはロテノンで図3に示す測定条件とほぼ同一で行った。
(a) 非選択照射。
(b) 選択照射。

【実験と応用】

この方法を中程度の有機化合物に応用する目的で実験を行った。

ロテノン(M.W. ~ 400) の長距離 J_{CH} 結合

結果を図3に示した。4'位のメチレン核のうち、高磁場側を選択的に 180° パルスで照射したものであり、5ボンド以内1Hzまでの J_{HC} 結合が見えている。その値は図内に示すクロスセクションから

$$\left. \begin{aligned} J_{4'-9'} &= 3.1 \text{ Hz}, & J_{4'-7a} &= 2.0 \text{ Hz}, \\ J_{4'-6'} &= 3.5 \text{ Hz}, & J_{4'-11} &< 1 \text{ Hz}, \\ J_{4'-11a} &= 1.0 \text{ Hz}, & J_{4'-8} &= 6.5 \text{ Hz}, \\ J_{4'-10} &< 1 \text{ Hz}, & J_{4'-5} &= 1.6 \text{ Hz}. \end{aligned} \right\}$$

とわかった。特に $J_{4'-11}$ は結合距離が5ボンドもありこの方法なくしては測定不可能と思われる。本方法ではまた、全ての ^{13}C 核が選択的にたたかかれている核間のみとの J 結合を表示するため、全てがdoubletとして出現するので J_{HC} 軸の周波数範囲を著しく制限できる。図3に用

じっぽうとしよ・ながやまくにあき

¹³C

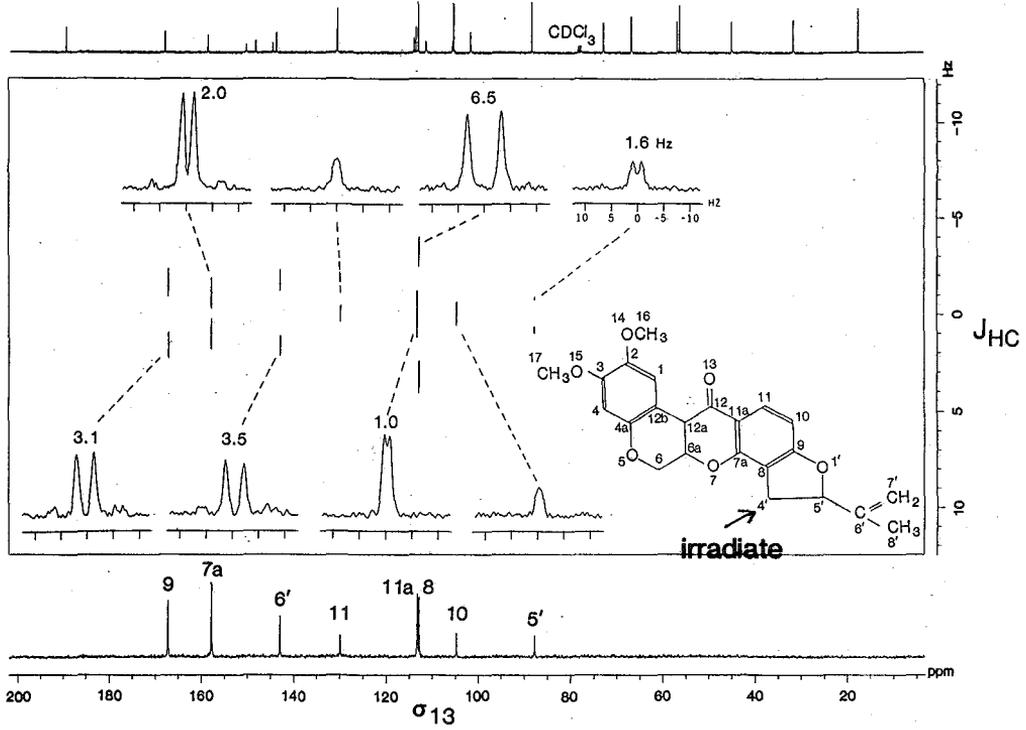


図3. ロテンン(0.5M CDCl₃溶液)の選択的2D INEPTスペクトル。
400MHz, 25°C, テータマトリックス 4段x64, Δ = 200 ms.

たマトリックスが小さいのはそのためである。

ペプチド骨格のJ_{CH}結合定数

次に本法をペプチド骨格の種々のJ結合に用いた結果を示す。ジペプチドを用いて、C_αH, NHに選択的180°パルス当ててペプチド骨格のJ_{CH}を求めた。特に我々の関心は、隣り合うアミノ酸にまたがるJ結合、例えば²J_{CONH}, ³J_{CO_αH}などであり、骨格プロトンのシーケンシャルな帰属を行うことを考えている。次に述べるように本方法の一次元版である選択的INEPTにおいてJの大きさは実験条件 τ, Δ の設定に必須である。J結合の値の結果のみを右図に示した。²J_{CONH} = 3.4 Hzと小さいが、この程度の値であれば中程度のペプチドについてINEPT法の適用が可能であろう。

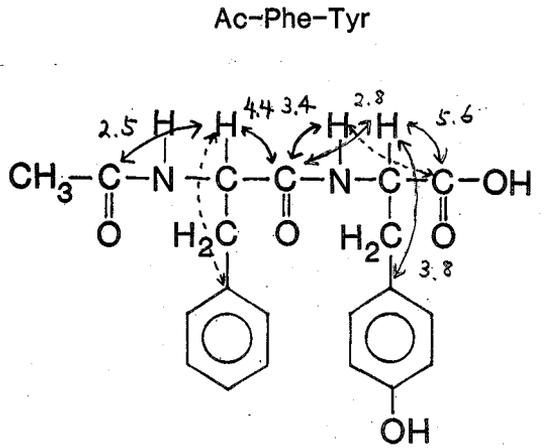


図4. ジペプチドの骨格J_{CH}の大きさ
Ac-Phe-Tyr (0.1M DMSO溶液)

じっぽうとしよ・ながやまくにあき

オキシトシン誘導体の骨格結合の同定 1,6-Aminosuberyl-Oxytocin

(M.W. 956.11)

選択法の通常INEPT法への応用を、ペプチドの骨格のつながりを明らかにする目的で行った。用いたサンプルは分子量約1000である。ここで前出の式(1)を用いて、 Δ の待ち時間の最適化を図った。

J_{CONH} の値は3.5 Hzを用い、 $T_2^{-1}(^1H) \approx 2 \text{ Hz}$, $T_2^{-1}(^{13}C) \approx 1.5 \text{ Hz}$ と見積もって得られた結果が図5に示すものである。GlnNHの選択的照射の場合強い2つの $^{13}C=O$ が見えているが、これは $^2J_{CONH}$ と $^3J_{CONH}$ の両者に由来するものと思われる。従ってIle CO, Gln COと同定される。 $^3J_{CONH}$ についてはペプチドの

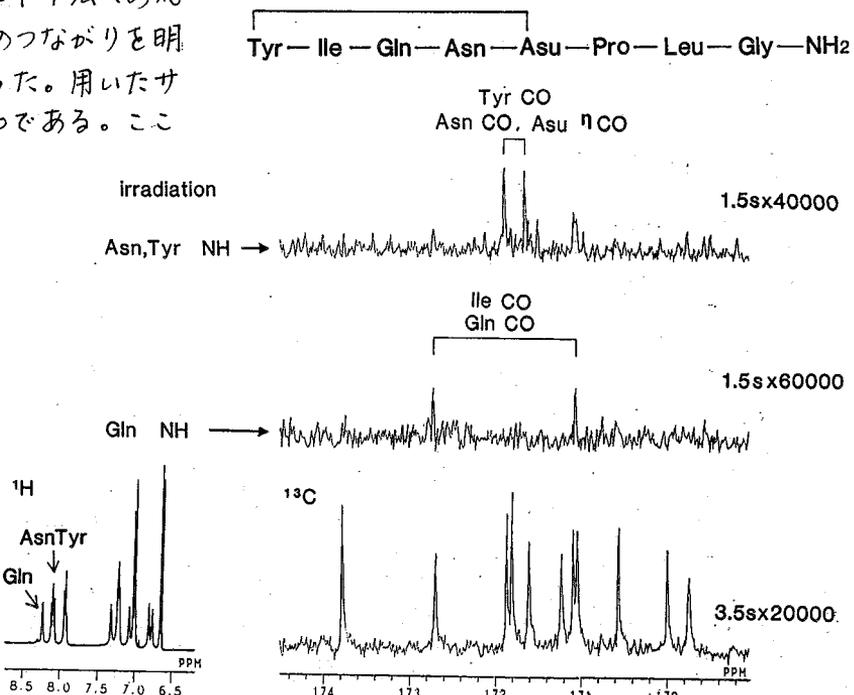


図5. アミンスベリルオキシトシンのペプチド結合の同定とカルボニル ^{13}C 核の帰属。18mM DMSO溶液, 400MHz, 37°C。
 $t_1 = 76 \text{ ms}$, $\Delta = 96 \text{ ms}$ 。

の角に依存するので一般には常に現われるとは限らない。Asn, TyrのNHは殆んど重なっているため両者は共に照射される。図5では2本の強いピークが見えるが可能性としてTyr CO, Asn CO, Asu COの3つが1次構造から推定される。

【まとめ】

選択的2D INEPT法は長距離 J_{CH} 結合について帰属とその値の測定を同時に行う特徴を持つ。 J_{CH} 測定については選択的照射を用いたいくつかの方法が提出されている^{2,3)} また長距離の $^1H, ^{13}C$ を結ぶINEPTのバリエーションもこの他の提案がある⁴⁻⁷⁾ どれがどのサンプルに最適かはこれからの数多くの経験から明らかにしてゆくべき問題と考えている。

【文献】1) G.A. Morris, *J. Magn. Reson.* **44**, 277 (1981), 2) A. Bax and R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 1099 (1982), 3) H. Seto et al., *Tetrahedron Lett.* **25**, 337 (1984), 4) C. Wynants et al., *J. Magn. Reson.* **57**, 93 (1984), 5) A. Bax, *J. Magn. Reson.* **57**, 314 (1984), 6) H. Kessler et al., *J. Magn. Reson.* **57**, 331 (1984), 7) G. Commenges and R.C. Rao, *J. Magn. Reson.* **58**, 496 (1984).

じっぽうとしよ・ながやまくにあき

(日本電子) ○大内宗城 永井壮市 小川秀次郎

<序>

従来よりFTNMRにおいて、短い長方形パルスが、すべてのスピンを励起するために用いられている。また、FTNMRにおいて、一部のスピンを励起するためのパルス(部分励起パルス)は、この長方形パルスを種々に組み合わせ ①長いパルス ②DANTEパルス ③REDFIELDパルス ④Time Share REDFIELDパルス等に応用されている。この長方形パルスをフーリエ変換すると、不必要な高調波成分を持ち、部分測定では、必要な範囲外の不要なシグナルをも励起し、スペクトル中に不必要なピークを生じる。例えば、NOEの測定のように非常に弱い長いパルス(〜10msec)を使用する実験で、近くに他のシグナルがある場合、一つのシグナルだけでなく、同時に他のシグナルまで励起し、目的のシグナルより起因するNOE効果を測定することが困難である。これを避けるために、Freemanらは、Gaussian形パルスを考案し、NOE測定等に応用している¹⁾。このGaussian形パルスは、不要なシグナルを励起しないが、周波数分布が一定でない等の問題が残っている。さらに精度を上げるため、台形の周波数分布関数を逆フーリエ変換し、テーラードパルスの一つであるsinc関数形のパルスを作った²⁾。理論的には、種々のsinc関数に応じたテーラードパルスを無数に作る事が可能であり、これを使用したパルスシーケンスを組むことができる。しかし、実際には、いくつかの特定のsinc関数形をもったテーラードパルスでパルスシーケンスを作製すれば、部分励起の目的には十分である。

二次元NMRにおいて、通常測定時間の制約により、一次元NMRに較べてかなり小さなデータ点数を使用して測定を行っているため、デジタル分解能は低い。極端に大きなデータ点数を取るか、または、部分励起パルスを使用し、ある狭い範囲のみ測定すれば、二次元NMRでもデジタル分解能を上げることは可能である。しかし、従来のような長方形パルスでは、不必要なピークまで検出されスペクトル中に不要なシグナルが現われる。不要なシグナルを除くため前述のsinc関数形パルスを使用したテーラードパルスにより、二次元NMRの部分測定の検討を行ったので報告する。

<原理>

$0 < t < T$ なる長方形パルス(図1a)を、フーリエ変換すると $\sin(\pi F) / \pi F$ なる周波数成分を持つ。この実測NMRシグナルは図1bに示すようになる。次に $0 < f < F$ なる周波数分布関数を逆フーリエ変換すると、 $\sin(\pi t) / \pi t$ なる時間成分を持

おおうち むねき ながい そういち おがわ ひでじろう

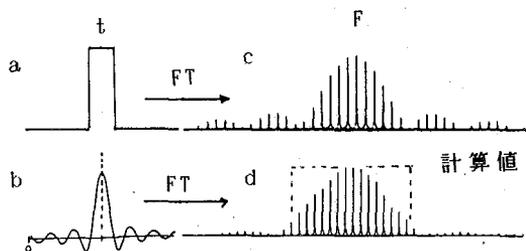


図1 長方形パルス(a)とsinc関数形パルス(b)とそのフーリエ成分

共鳴周波とのずれ、 ω_1 はパルスの強さ ($= \gamma H_1$)、 σ_x は磁化の x 成分である。また、 $\sin(\pi t) / \pi t$ なる形の 90° パルス後の磁化成分 $R(\Delta\omega)$ は $R(\Delta\omega) = \omega_1 / \Delta\omega \sigma_x$ となる。パルス中の時間依存ハミルトニアン $\mathcal{H}(t)$ が、 $0 < t < T$ なる時間のとき、 $\mathcal{H}(t) = \hbar \Delta\omega \sigma_z + \hbar \omega_1(t) (\sigma_x \cos \phi + \sigma_y \sin \phi)$ となり、それ以外の時は $\mathcal{H}(t) = 0$ となることから①および②式が求められる。ここで、 $\sigma_{x,y,z}$ は磁化の x、y、z 成分、 $\omega_1(t)$ はパルスの強さ ($= \gamma H_1(t)$) である。図1dにおける実測値と②式より求めた計算値のずれは、使用したパルスのなまり、または、シグナルの T_2 による減衰に起因しているものと思われる。 $\sin(\pi t) / \pi t$ なる形のパルスは長方形パルスに較べ時間が長くなるので、サンプルの T_2 の影響を無視出来なくなり、通常 $\sin(\pi t) / \pi t$ の一つまたは二つの周期 ($-2 < t < 2$ 、または $-4 < t < 4$) を使用して擬似的な $\sin(\pi t) / \pi t$ なる形のパルスを作成している。さらに $\sin(\pi t) / \pi t - \sin(n\pi t) / \pi t$ なる形のパルスを使用して、 $R(\Delta\omega) = (\omega_1 / \Delta\omega) - (\omega_1 / n\Delta\omega) \sigma_x$ なる NMR シグナルを検出することも可能である。

さて、①、②式より、 $\Delta\omega$ がある狭い範囲が選択されるような、部分測定において、長方形のパルスでは、高周波成分により範囲外のシグナルも励起されるが、 $\sin(\pi t) / \pi t$ なる形のパルスでは、 $\Delta\omega = \omega_1$ となり、ある狭い範囲のシグナルのみ励起されることが容易にわかる。したがって、一次元 NMR のみならず、二次元 NMR に応用することも可能である。たとえば、図2aのように、二次元相関 NMR の長方形パルスを、sinc関数形のパルスにおきかえることができるが、第一パルスは必ずおきかえなければならないので、パルス系列は図2b、またはcのようになる。

ち、これを励起用パルス(図1c)として用いた実測 NMR シグナルは、図1dに示すようになる。両方の NMR シグナルは励起後の磁化により表示できる。長方形の 90° パルス後の磁化の成分 $R(\Delta\omega)$ は

$$R(\Delta\omega) = 2\omega_1 \sin(1/2 \Delta\omega T) / \Delta\omega \sigma_x \text{ --- ①}$$

$$R(\Delta\omega) = \omega_1 / \Delta\omega \sigma_x \text{ --- ②}$$

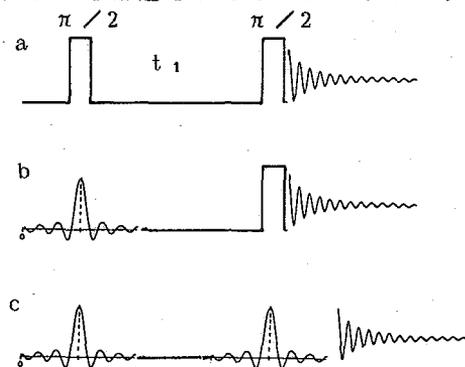


図2 長方形パルスとsinc関数形パルスを用いた2次元相関NMR

< 実験 >

G×400 にテーラードパルス発生ユニットを付加し、実験を行った。この装置の略図を図3に示す。このテーラードパルス発生ユニットはsinc関数形のパルスを作るとともに分光計のパルサーの指令により

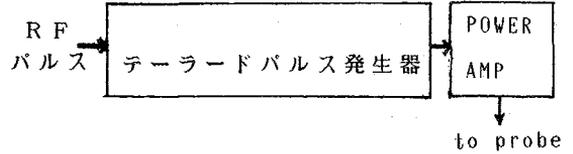


図3 装置の略図

図2bのようなパルス系列を用いた時に、長方形パルスを通わせることもできる。また、パルスの出力は可変である。使用したサンプルは、市販Tomatine 10mg を 0.5ml重ピリジンにとかし、5 mm φ tubeに入れた。測定時間はすべてのスペクトルでほぼ一定である。

< 結果と考察 >

図4 a に、長方形パルスを使用したTomatineの通常の二次元相関NMRデータ (F₁, F₂ともデータ点数は512)を示す。このスペクトルは、8 Hzのデジタル分解能であり、このスペクトルから結合定数を読み取ることは不可能である。結合定数を読みとるためには、1 Hz程度のデジタル分解能が必要であり、部分測定二次元NMRが必要となる。前述のように長方形パルスを基本とした部分測定に使用されるパルスには、種々のものがあるが、最も簡単な長い長方形パルスを使った例を図4 bに示す。図4 aは通常のパルスパワー ($\pi/2$ 10⁻⁶ sec) 図4 bは部分測定のため、第一パルスの出力を下げパルス幅を600 μ sec に設定した二次元データである。図4 bのAで示されるように0~4 ppmのところは、シグナル群が残っている。励起範囲のみに観測幅を狭くし、部分測定を行っても残ったシグナルが折り返しのシグナルとなる。これらは電気的なフィルターにより減少させることも出来るが、一般的にはスペクトルに重なりあって、解析を困難にする。

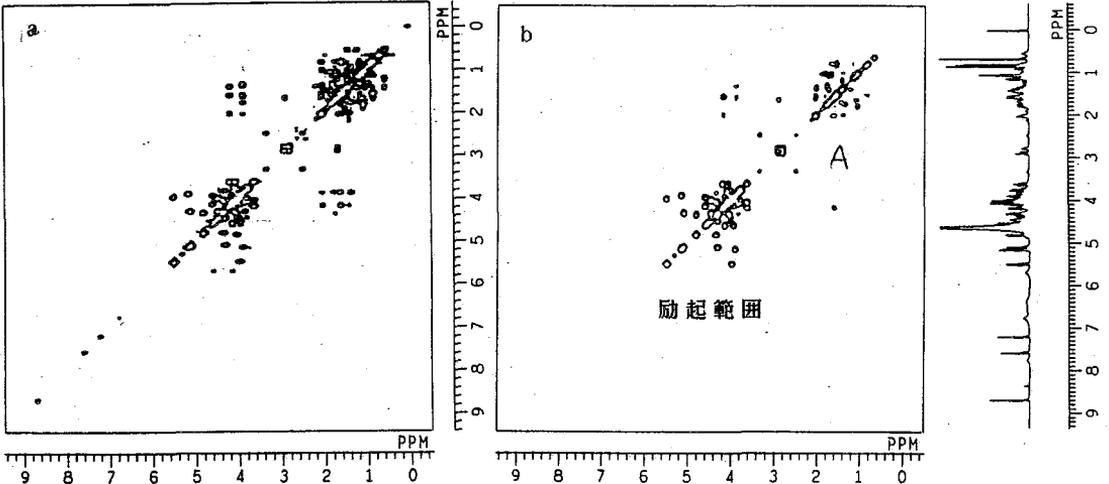


図4 長方形パルスを用いた2次元相関NMR
(a) 全領域スペクトル (b) 部分励起スペクトル

sinc関数形のテーラードパルスを用いた二次元データを図5に示した。図5 aは、図2 bのパルス系列で一つのsinc関数パルスと一つの長方形パルス($\pi/2$ 、 $10 \mu\text{sec}$)を使用し、図5 bは、図2 cのパルス系列で二つのsinc関数形パルスを用いている。図5 aのスペクトル中には、2 ppmのところにシグナルBが現われているが、ステロイド骨格中のプロトン(図7中の β 、 δ)のシグナルである。これらのシグナルは図5 bに現われていない。図5 aでは、短い長方形の観測用パルスにより、すべてのシグナルが励起されるが、図5 bでは、sinc関数形の観測用パルスにより、ある範囲のみのシグナルしか励起されないことに起因する。デジタル分解能を上げるため、観測幅を狭くし、励起範囲のみ測定した二次元NMRデータを図6に示した。このスペクトルはデジタル分解能1 Hzとなり、結合定数を読み取ることが可能となった。

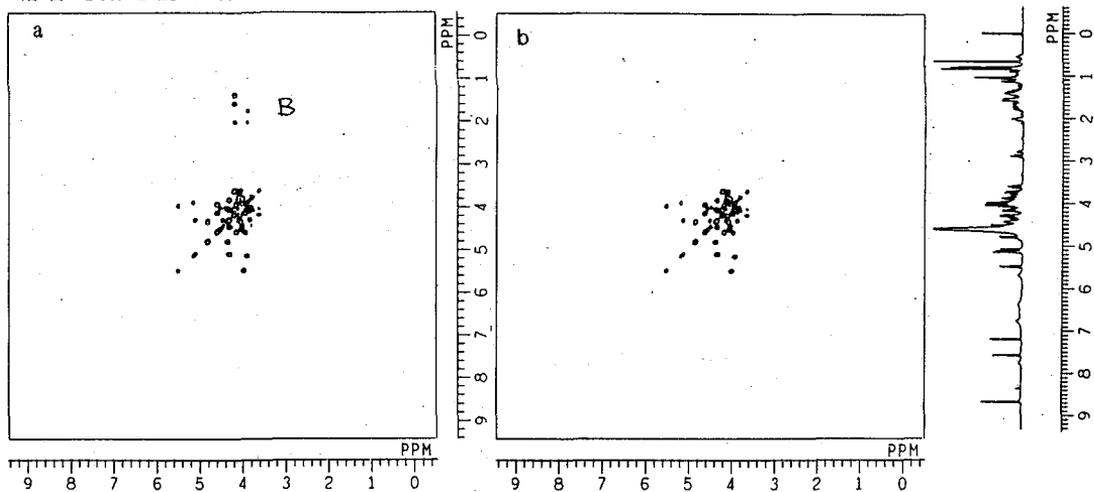


図5 sinc関数形パルスを用いた部分励起2次元相関スペクトル

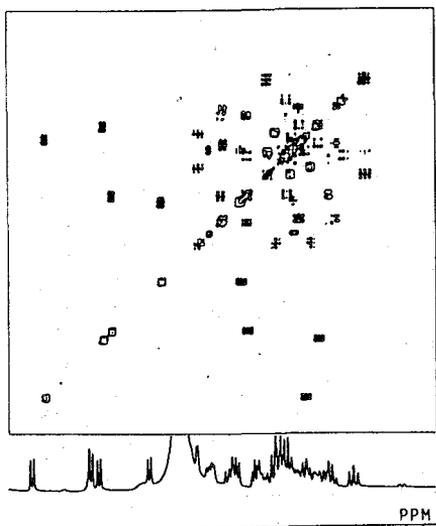
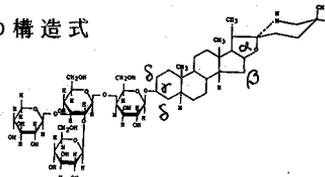


図6 部分領域スペクトル

図7 Tomatineの構造式



以上述べたように、sinc関数パルスは部分測定に十分使用可能と判定出来る。しかし、サンプルの T_2 の影響、より計算値に近いパルスの作成、本稿では言及しなかったが、複数の周波数成分をもつパルスの作成等、残された問題もある。

二次元相関NMRの例について述べたが他の二次元NMRへの応用も可能であり、今後検討を行いたい。

- 1) Bauer et.al. J.Magn Reson 58 442(1984)
- 2) Silver et.al. ibid 59 347 (1984)

(北大理) ○伊倉 光彦、引地 邦男

(序) 2次元NMRの多種多様な測定法が数多く報告されるなかで、比較的初期に発表されたCOSYはその簡便さと有益さゆえに現在もなお広く使われている。COSYの限界は、磁化移動が直接相互作用する2つのスピン間にはしか起こらないという点にある。このため、AMXとA'M'X'の2つのスピン系においてMとM'の化学シフトが同じ場合、A-M-XかA-M-X'かの区別はつかない。1982年 Eich, Bodenhausen, Ernstらは Relayed COSY法を紹介し、AとXの相関をとることによってCOSYの問題点をおぎなった(1)。これをさらに拡張すると、4スピン系以上の解析にはMultiple-Relayed COSY法が必要となるが、現在までにその報告例はあまりない(2)。筆者らは、Double, triple, four (以下 2-, 3-, 4- と略す) Relayed COSY法を検討し、糖質の1Hスペクトル解析においてその有用性を確かめたので報告する。

(実験) 測定はJEOL GX-500を用い、1H 500 MHzで測定した。パルスシーケンスは PLEXUS Ver.

1.41 の PEGS(Pulse Editing Graphic Software)でプログラムし、PGX-300 pulse generatorで制御した。グルコース、セロビオースは市販品を用いた。セロトリオース、セロテトラオース、セロペンタオース、セロヘキサオースはセルロースの加水分解物を精製して得た。溶媒はD₂O, 糖濃度 10-20mg/ml, 温度60°Cで測定した。

(結果と考察) 図1にCOSY, Relayed COSY, 2-Relayed COSY, 3-Relayed COSY, 4-Relayed COSYのパルスシーケンスを示す。Relayed COSYはCOSYのシーケンスにτ-180°-τ-90°を付け加える。Multiple-Relayを行うには、さらにτ-180°-τ-90°を増やしてゆ

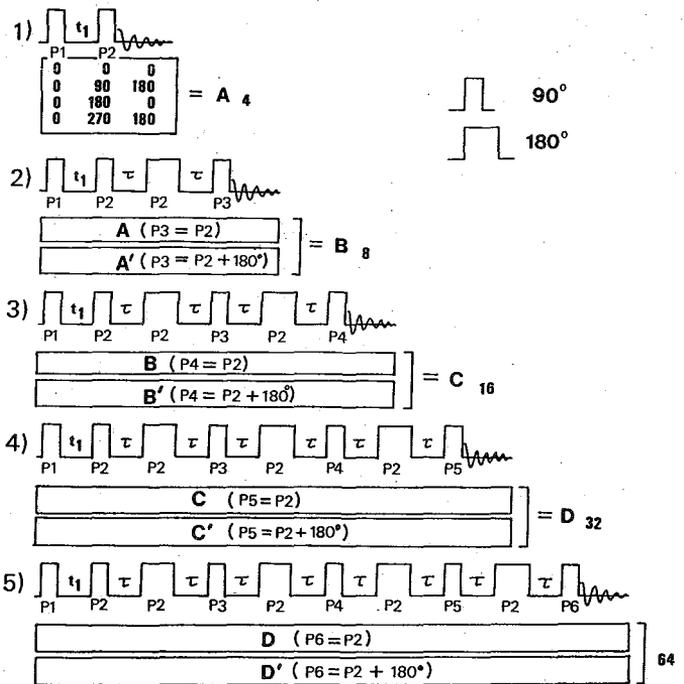


Fig.1 Pulse sequences of (1) COSY, (2) Relayed COSY, (3) 2-Relayed COSY, (4) 3-Relayed COSY, and (5) 4-Relayed COSY.

いくら みつひこ、ひきち くにお

けばよい。ただし、axialピークを消すためにパルスの位相を図のように回さなければならないので、4-Relayed COSYでは最低64scansが必要となる。

6員環の糖の場合、図2に示すように ^1H - ^1H のcouplingが存在し7スピン系となる。一般に糖質の ^1H スペクトルでは、1位のプロトンのピークは比較的よく分離しているが、2から6位のプロトンは複雑に重なって現れる。図2にMultiple-Relayed COSYによるピラノース類のスペクトル解析のstrategyをわかりやすく示した。H1を観測核とすると、COSYではH2が見つかる。Relayed COSYではH2とH3が見つかる。2-Relayed COSYではさらにH4まで見つかり、3-Relayed COSYではH5まで、4-Relayed COSYを用いるとH6までのすべてのプロトンを見い出せる。この5種類の測定法の併用によって、複雑なオリゴ糖、配糖体、または一部の多糖についても目的のH1ピークが分離していれば、H2からH6までのすべてのプロトンの帰属が原理的には可能である。

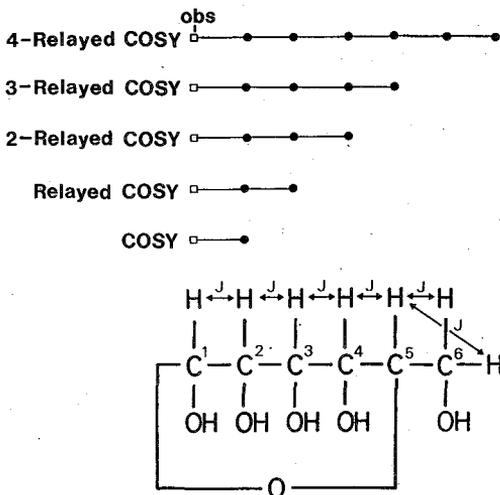


Fig.2 Scheme for the identification of a spin network of pyranose ring protons by Multiple-Relayed COSY.

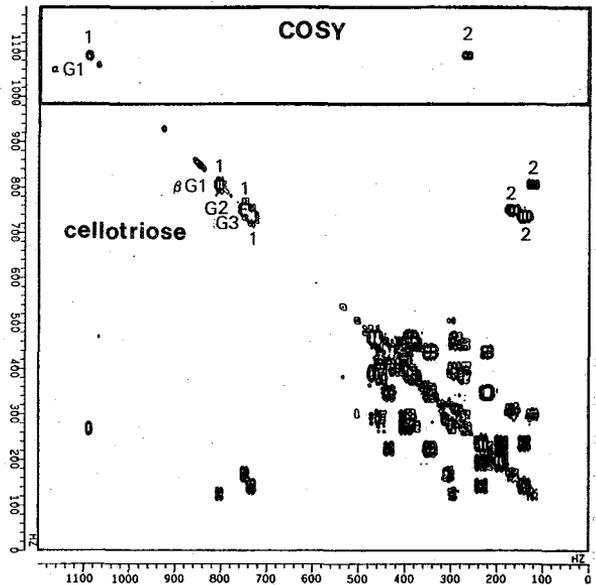
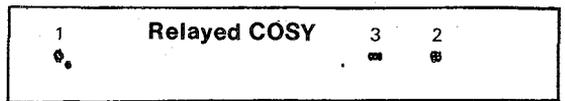
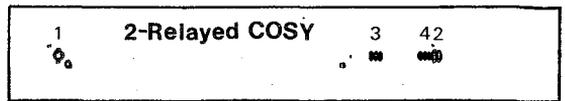
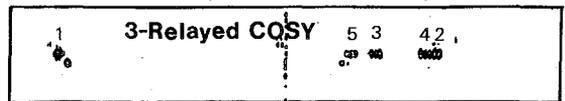
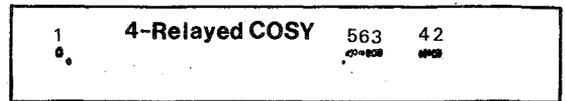


Fig.3 COSY, Relayed-COSY, and Multiple-Relayed COSY spectra of cellotriose. Only partial regions are shown for single- and multiple-Relayed COSY.

図3に、セロトリオースの α G1残基の帰属の例を示す。COSYでH2が帰属され、4種類のRelayed COSYでH3, H4, H5, H6が順に帰属される様子がよくわかる。一般に糖質のスペクトル解析において、COSYだけで相関をつないでゆく従来の方法では置換基効果などの経験則に依存するケースが多かったが、Multiple-Relayed COSYを用いればはるかに任意性は減り帰属が簡単に行える。Multiple-Relayed COSYのクロスピークをより完全に観測するためには、すべてのmixing time についての最適化が必要である(2)。1回目のrelayには $J(H2, H3)$ 、2回目のrelayには $J(H3, H4)$ 、3回目のrelayには $J(H4, H5)$ 、4回目のrelayには $J(H5, H6)$ をそれぞれ用いて、 $\tau = 1/nJ$ ($n=1, 2, 4, 8, \dots$)に選ぶ。セロオリゴ糖の場合、 J のばらつきはそれほど大きくないので、平均値7-8Hzを用いてすべて $\tau = 30$ ms ($1/4J$)に設定した。

図4にグルコースの4-Relayed COSYスペクトルを示す。各プロトンの帰属は、セロトリオースの場合(図3)と同じ方法で行った。 α , β アノマーのH1ピークのクロスセクションをとると(AとB)、2つの異性体の一次元スペクトルをほぼ完全に分離することができる(図5)。この手法を“スピנקロマトグラフィー”と呼ぶ。同種の方法が、多量子遷移2次元NMRを用いて行われている(3)。本方法を用いれば、異性体の分離と同様に、2糖以上の場合に構成糖残基のスペクトルを分離することもできる。ただし、特定残基への帰属は別の手法(NOESY(4), long-range COSY(5), long-range 1H - ^{13}C COSY(6))を用いなければならない。

セロテトラオースからセロヘキサオースまでのセロオリゴ糖についても Multiple-Relayed COSYを検討したが、同様にその有用性が確かめられた。図6Bに、セロヘキサオースの1次元スペクトルからセロピオースの1次元スペクトルを差し引いたものを示

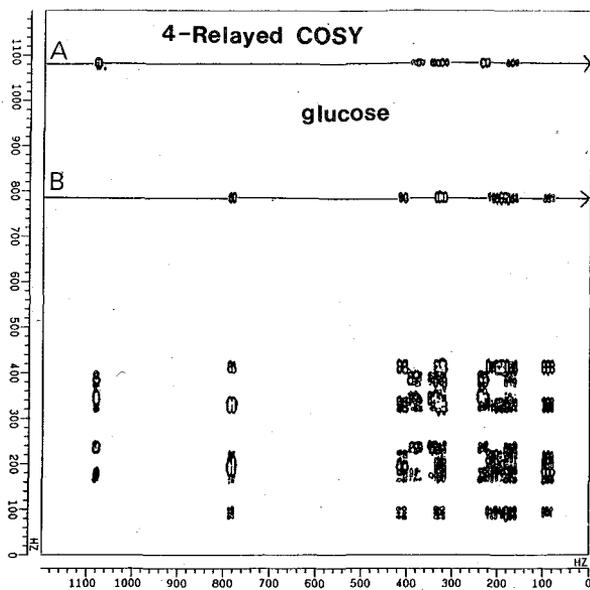


Fig.4 4-Relayed COSY spectrum of glucose.

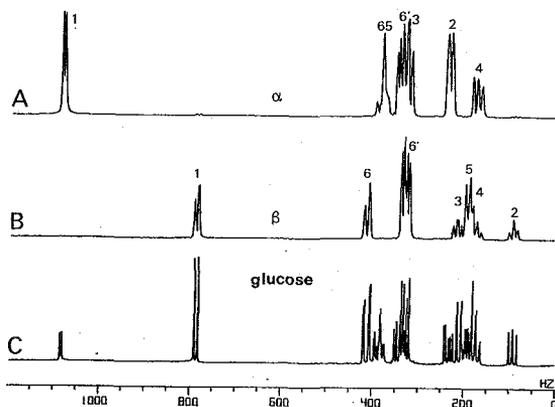


Fig.5 (A) Cross section A of the 4-Relayed COSY spectrum of glucose shown in Fig.4, (B) cross section B of the same spectrum, (C) normal spectrum of glucose.

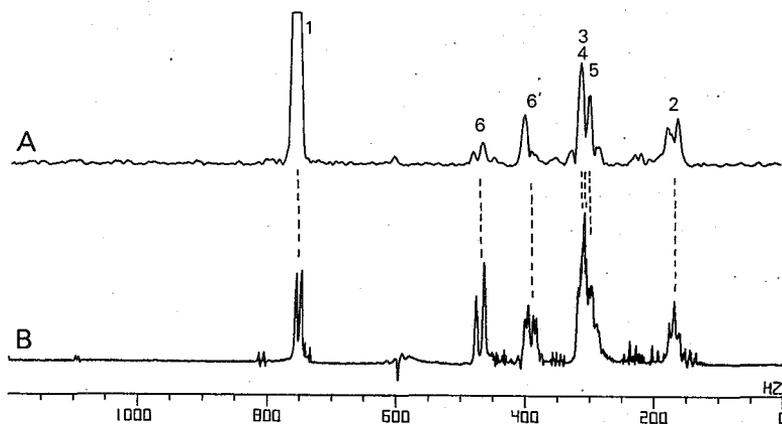


Fig.6 (A) Cross section parallel to F_1 -axis at H1 peak of G2 residue of cellobiose.
 (B) Difference spectrum subtracting a normal spectrum of cellobiose from that of cellohexaose.

す。つまり、これはセロヘキサオースのG2からG5の4残基由来のスペクトルに対応する。この差スペクトルとセロトリオースの4-Relayed COSYから得られるG2（中央の残基）のクロスセクションのスペクトル（図6A）は非常によく一致する。この結果から、3糖以上のセロオリゴ糖では還元末端と非還元末端の2残基を除く他のすべての残基は、H1からH6についてほぼ同一のスペクトルを与えることが判明した。しかも、Multiple-Relayed COSYを用いて、すべてのプロトンの帰属がなされた。

Multiple-Relayed COSY法の問題点は、次数が高くなるにつれてmixing periodが長くなり（4-Relayed COSYで約240 ms）、その結果 T_2 による磁化の減衰が著しくなる点にある。したがって、分子量が大きくなるにつれて高次のRelayed COSYが役立たなくなる可能性がある。実際、分子量 8100 の蛋白質（F34 fragment of calmodulin）では、single-relayed COSYが限界であった。この問題を少しでも克服するために、一般に測定温度はできるだけ高温にした方がよい。

（謝辞）セロオリゴ糖を御提供頂いた北大理・米山道男助教授に深く感謝致します。

（文献）

1. G. Eich, G. Bodenhausen, & R. R. Ernst J. Am. Chem. Soc. 104 3731 (1982).
2. A. Bax & G. Drobny J. Magn. Reson. 61 306 (1985).
3. L. Braunschweiler, G. Bodenhausen, & R. R. Ernst Mol. Phys. 48 535 (1983).
4. T.A.W. Koerner Jr., J. H. Prestegard, P. C. Demou, & R. K. Yu Biochemistry 22 2687 (1983).
5. G. Batta & A. Liptak J. Am. Chem. Soc. 106 248 (1984).
6. Y. Kuramitsu, M. Ikura, & K. Hikichi unpublished results.

(東レリサーチセンター, 日本電子*)

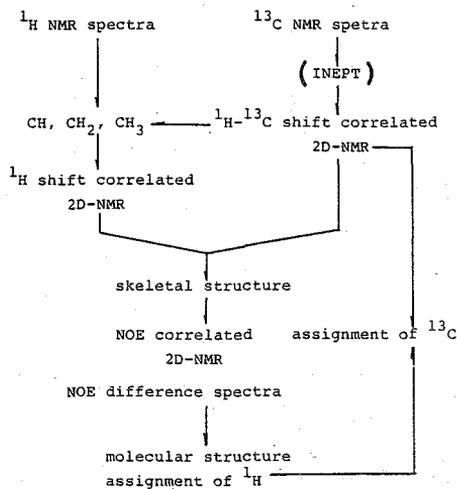
○ 箱垣冬彦 阿部明 松浦俊雄* 鈴木一*

〔はじめに〕

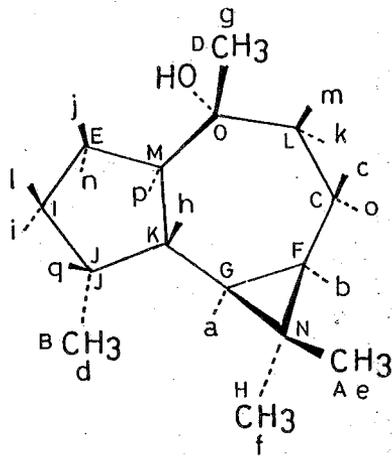
一 昨年 の NMR 討論会 で、我々は二次元 NMR 法を用いた天然物の構造解析法について報告した(3,2)。図1は構造解析法のスキームを示したものである。本研究では、F₂デカップルにより、二次元 NMR の測定感度向上と二次元スペクトルの簡略化をおこなうとともに、この構造解析法の自動化を目的として、二次元スペクトルのピークサーチについて検討した。グローボール(図2)を例として本方法のあらましを紹介する。

〔CHシフト相関二次元NMRの測定感度向上および二次元スペクトルのピークサーチ〕

図1に示す構造解析法の律速段階はCHシフト相関二次元NMRの測定であり、CHシフト相関法の測定感度の向上が本方法への最大の要請となる。そこで²HホモデカップリングをくみこんだCHシフト相関二次元NMR法について検討をおこなった(3)。展開時間の真中で¹³C核への180°パルスと同時に、¹H核に90°x-Δ-180°x-Δ-90°x(Δ=1/2J_{CH})のsemi selective pulseをかけ、¹H同士のスピン結合のデカップルもおこなう。図3はこのパルス系列を用いて測定したグローボールのCHシフト相関二次元NMRスペクトルである。図4(a)に図3のスペクトルのF₁軸へのプロジェクション、図4(b)~(f)にメチン炭素H, G, J, K, Mのクロスセクションを示す。¹H間のスピン結合はデカップルされ、シングレットとして観測されるため、測定感度は向上していることがわかる。図3は20mg/500μlの試料溶液を用い、一時間で測定した列であり、十分なS/Nの二次元スペクトルが得られている。なお注意すべき点は、semi selective pulseでは非等価なメチレンプロトン間のスピン結合はデカップルされないため、図3に示すように、L, I, E, Cのメチレ



(図1) 二次元NMR法を用いた天然物の構造解析法



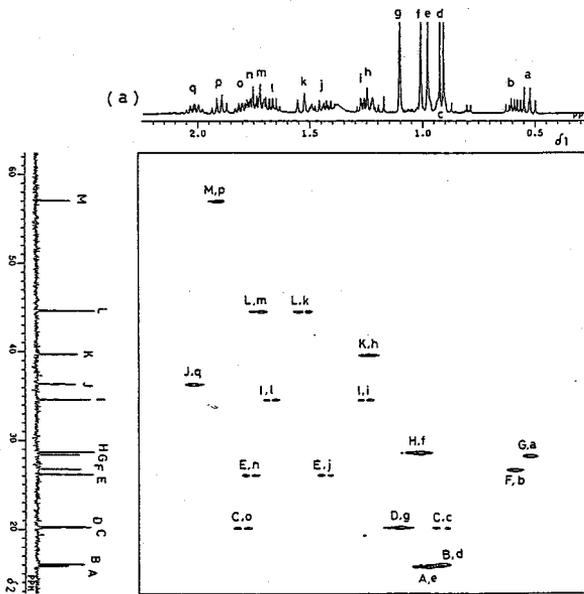
(図2) グローボールの分子構造と¹Hおよび¹³Cの帰属。グローボールはユズの圧搾油に含まれる三環のセステルペンアルコールである。

○ いながき ふゆみこ あべ あきら まつうらとしお すずきはじめ

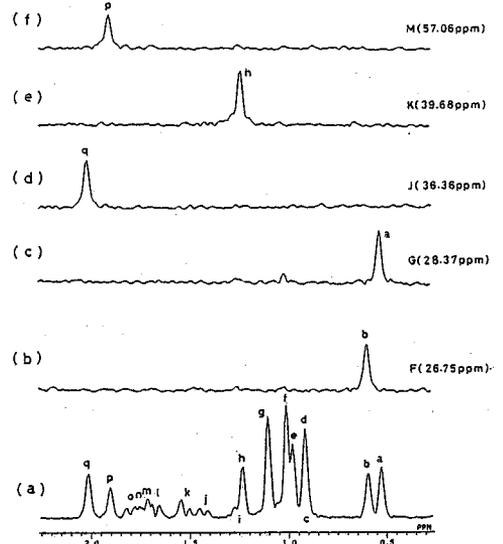
ン炭素のシグナルは doublet に分裂している点である。この場合でも $^3J_{HH}$ 以上のスピ
ン結合のデカップルによる感度向上は顕著であった。F₁ デカップルをおこなうもう一つ
の利点は、二次元スペクトルより 1H と ^{13}C の化学シフトを直接検索できる点であり、二
次元スペクトルのピークサーチの手続きは簡略化される。

[1H シフト相関二次元NMRスペクトルのピークサーチ]

CHシフト相関二次元NMRにより、直接結合した 1H と ^{13}C の化学シフトを一義的に
決定することができる。次の問題は 1H シフト相関二次元スペクトルより、交差ピークの
化学シフトを検索することである。グローブロールの場合には、スピンス糸が複雑なこと、化
学シフトが接近しているため、通常の 1H シフト相関二次元スペクトルより、交差ピーク
の化学シフトを求めることは困難であった。そこで二次元スペクトルの簡略化を目的とし
て、F₂デカップルによる 1H シフト相関二次元NMRの測定をおこなった。パルス系列と
しては、 $90^\circ - t_{z/2} - 180^\circ - (t_e - t_{z/2}) - 90^\circ - t_z$ を用いた⁽⁴⁾。図5(A)はこのパルス系
列を用いて測定したグローブロールの 1H シフト相関スペクトルであり、F₁方向にデカッ
プリングされ、スペクトルは著るしく簡略化されている。したがって、各プロトンについ
て、F₂軸方向のクロスセクションをとれば、クロスセクションより交差ピークの化学シ
フトを検索することができる。図5(B)は、p, m, l, b, a における F₂軸方向のクロ
スセクションを示したものであり、m, l 等、化学シフトの接近している場合でも交差ピ



(図3) 1H デカップルによるグローブロールのCHシフト
相関二次元スペクトル。F₂ × F₁ = 1024 × 256。
16回積算により128ブロック取込後ゼロファイリングを
おこなった。



(図4) (a) 図3のスペクトルのF₁軸のF₂セクション
(b)~(f)メタン炭素F, G, J, K, Mにおける
クロスセクション

ークの分離はすぐれている。F₁ デカップルによる ¹H シフト 相関 二次元 スペクトル では、F₂ 軸 方向 のみ ピーク 検索 を おこなえばよく、通常 の スペクトル に 比較 すれば、交差 ピーク の 化学 シフト の 検索 は 簡略 化 される。また 図 5 (B) に 示す よう に ¹H シグナル が 複雑 に 重なっ ている 場合 でも、F₂ 軸 方向 の クロス セクション を とる こと により、特定 の スピン 系 を ぬき 出す こと も 可能 となり、実用 的には 有効 な 手法 と いえ よう。

〔二次元 NMR 法 にも とづく 自動 構造 解析〕

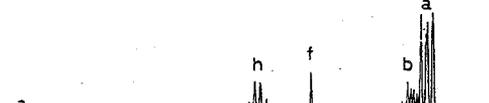
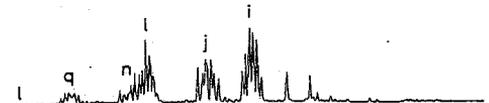
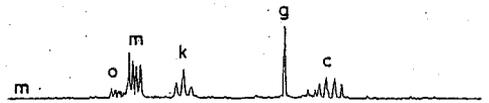
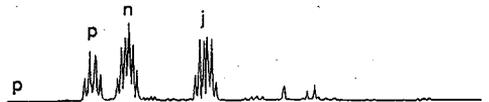
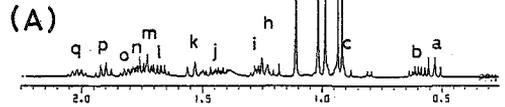
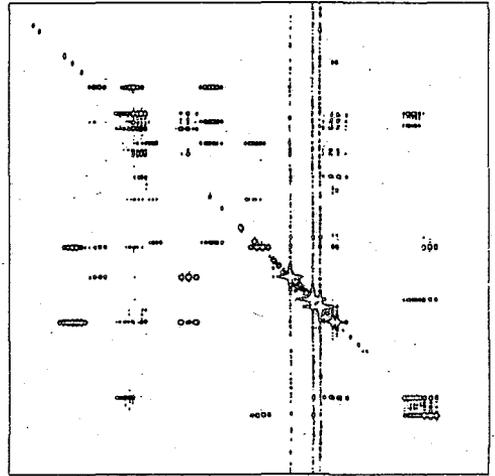
現在、¹H シフト 相関 スペクトル の コンピューター による ピーク 検索 は 完了 して いる。しかし、化学 シフト への リダクション は 困難 な 点 が 多く、C-H シフト 相関 より 求め た ¹H の 化学 シフト を 参照 する の が 実際 的 な 方法 と いえる。以下、図 1 の スキーム に 従い、コンピューター による 自動 構造 解析 の 手順 について 述べる。

- ① C-H シフト 相関 スペクトル の ピーク 検索 を おこなう。交差 ピーク の F₁, F₂ 側 の 座標 より ¹H および ¹³C の 化学 シフト を 決定 すると 同時に C-H の 相関 リスト が 作成 される (表 1)。
- ② ¹H シフト 相関 二次元 スペクトル の ピーク 検索 を おこなう。C-H シフト 相関 より 求め た ¹H の 化学 シフト を 参照 して、スピン 間 の カップリング を 明らか に する。
- ③ ② の 作業 により ¹H - ¹H の カップリング リスト が 作製 される (表 2)。
- ④ ① と ③ の 結果 から、H-H カップリング リスト の H の 番号 と 結び つく C の 番号 を C-H リ

(図 5) (A) F₁ デカップル による グロブローールの ¹H シフト 相関 二次元 スペクトル。

試料 溶液 20mg/500μl。F₂ × F₁ = 1024 × 512。
16 回 積算 により 256 フロク 取込 後 ゼロ フロク を おこなった。Z₀ = 160ms に 設定。

(B) 上より p, m, l, b, a における F₂ 軸 方向 の クロス セクション



(B) chemical shift (ppm)

ストから選択すると、C-Cの結びつきが明らかになる。

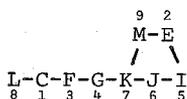
①～④の手順に従い、分子の骨格構造を明らかにできる。しかしこの段階では、四級炭素の結合は明らかにされていない。そこで、四級炭素を含む炭素骨格の結合を明らかにするために、長距離結合を利用した選択的INEPT法⁽⁵⁾を検討した。グローボールを例として構造解析の手順を述べる。

表1は図3より求めたCH間の相関リストであり、表2は図5のクロスセクションより求めた¹H間の相関リストである。表1, 2の結果にもとづき、骨格構造の検索をおこなうと、表2の下に示す部分骨格構造が得られた。次の問題は、四級炭素N, Oの接続である。図6(b)はfメチルプロトンを選択照射した場合のINEPTスペクトルであり、長距離結合を通して、A, N, G, Hの¹³C核に、分極移動が観測された。これより、四級炭素はG, Hに接続される。同様にgメチルプロトンを照射した場合には、O, M, L, Cに分極移動が観測される。これより四級炭素OはM, Lに接続される。以上の手続きにより最終的にグローボールの骨格構造が決定される。

文献 (1) 稲垣, 阿部, 松浦, NMR討論会講演要旨(1983), (2) H. Inagakı, A. Abe
JCS Perkin II in press, (3) A. Bax, R. Freeman, J. Magn. Reson. 44, 542 (1981)
(4) A. Bax, J. Magn. Reson. 53, 517 (1983), (5) A. Bax, J. Magn. Reson. 57, 314 (1984)

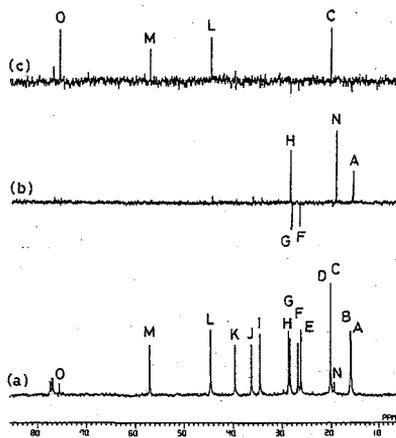
(表2) ¹Hスピン間の相関リストと自動構造解析より求めたグローボールの部分骨格構造

HH(1) = 1(a) - 2(b)	HH(12) = 5(i) - 13(q)
HH(2) = 1(a) - 4(h)	HH(13) = 6(j) - 8(l)
HH(3) = 2(b) - 3(c)	HH(14) = 6(j) - 10(n)
HH(4) = 3(c) - 7(k)	HH(15) = 6(j) - 12(p)
HH(5) = 3(c) - 9(m)	HH(16) = 7(k) - 9(m)
HH(6) = 3(c) - 11(o)	HH(17) = 7(k) - 11(o)
HH(7) = 4(h) - 12(p)	HH(18) = 8(l) - 10(n)
HH(8) = 4(h) - 13(q)	HH(19) = 8(l) - 13(q)
HH(9) = 5(i) - 6(j)	HH(20) = 9(m) - 11(o)
HH(10) = 5(i) - 8(l)	HH(21) = 10(n) - 12(p)
HH(11) = 5(i) - 10(n)	



(表1) CH間の相関リスト

C:4(G)-H:1(a)	C:5(I)-H:8(l)
C:3(F)-H:2(b)	C:8(L)-H:9(m)
C:1(C)-H:3(c)	C:2(E)-H:10(n)
C:7(K)-H:4(h)	C:1(C)-H:11(o)
C:5(I)-H:5(i)	C:9(M)-H:12(p)
C:2(E)-H:6(j)	C:6(J)-H:13(q)
C:8(L)-H:7(k)	



(図6) (a)ノーマルスペクトル, (b)fメチル (c)gメチルプロトンを選択的に照射した時のINEPTスペクトル

(東大応微研) ○降旗一夫、瀬戸治男(日本電子) 大内宗城

はじめに

NMRにより天然有機化合物の構造解析を行なう場合、プロトン間の関係を明らかにすることが必須であり、そのために現在二次元COSYスペクトル法が多用されている。しかし複雑な化合物においてはスペクトルの解析が困難であり、一次元NMRの併用が必要とされる場合が数多く認められる。

我々は一次元NMRで複雑な化合物を解析する場合、decoupling差スペクトルやtriple resonance 差スペクトル法が非常に有効な方法であることを明かにしてきた¹⁾。一方、これらの方法よりもよりエレガントなselective coherence transfer法、selective relayed coherence transfer法²⁾が提案されているが、これらの実験条件の詳細な報告は殆どなされていない。そこで、我々はこのselective coherence transfer法の有用性についての検討を行なったのでその結果について報告する。

<Selective COSY>

図1に使用したパルス系列を示す。本方法では二次元基本パルス $90^\circ-t-90^\circ$ において、最初のパルスにsoftパルスを用い、展開時間を任意の値に固定し積算を行なう。

例えばAXスピン系について、最初のパルスでプロトンAを選択的に励起させる。XY平面に倒れた磁化は時間の経過とともに速いスピン(F)と遅いスピン(S)に分裂する。適当な時間の後 90° パルスをY方向からかけると、X方向の成分はZ軸方向に配向する。一方このスピンとJ結合したスピンXは、この縦磁化成分に比例した大きさを逆平行にX軸方向に配向する。測定はtransferに寄与しないsignal成分を消去するように位相を回して積算する。

selective coherence transfer法を行なう場合、使用するsoftパルスの選択性が重要な因子となる。そこで励起パルスの選択性を高める目的で、図2に示すtailoredパルスを使用した。通常の測定で使用するパルスはrectangleパルスであり、このパルスの周波数分布はsinc関数分布となる。したがってrectangleパルスをsoftパルスとして使用した場合励起パルスの選択性は低下する。しかしこ

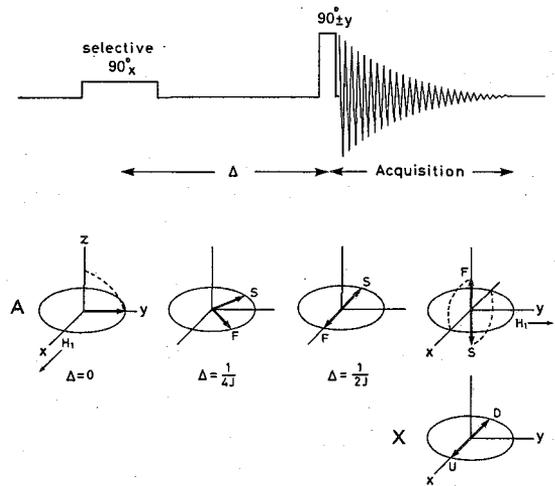


図1. selective COSYのパルス系列とAXスピンの磁化ベクトル展開図。

ふりはた かずお、せと はるお、おおうち むねき

の sinc 関数の tailored パルスを使用すると、周波数分布は理論的には矩形分布となり、rectangle パルスの逆の形になる。

この sinc 関数パルスを soft パルスとして使用する場合、パルス巾が非常に長くなる。パルス巾が長くなると、 T_2 により signal 成分が減衰し S/N が悪化する。またこのパルスを発生している間にスピンの分裂を招くため、展開時間の設定が困難になる。従って soft パルスとしては、パルス巾が短くかつ選択性が高いものであることが望ましい。sinc 関数パルスのパルス巾として周期 $\pi, 2\pi, 4\pi$ のパルスが可能であるが、それぞれの周期における、励起パルスの周波数分布に差が認められなかったため最も短い周期 π を使用した。図 3 は rectangle パルスと sinc 関数パルスの実験による周波数分布を比較したものである。selective coherence transfer 法では展開時間を任意の値に固定するので、良い結果を得るためにはこの展開時間の設定値が非常に重要なパラメーターになる。

図 4 にモネンシンの 3 位のプロトンに対し、時間を 40 msec 毎に変化させ、rectangle パルスで測定した例を示す。モネンシンの 3 位のプロトンは 2 位のプロトンと、10.25 Hz、4 位のプロトンと 1.5 Hz で分裂している。図からわかるように、3 位のプロトンの励起により、2、4 位の両方のプロトンを同時に観測するためには、展開時間を約 160-200 msec に設定する必要がある。

この展開時間の設定は、プロトンが doublet, triplet に分裂している場合は、それぞれ $1/2J$, $1/4J$ に設定すれば最も効率良く観測されるが、実際測定する場合はプロトンが複雑に分裂し、結合定数もまちまちであるため、一概に決定できない。

< Selective relayed COSY >

スペクトルの複雑な領域における、プロトン間の関係を明かにできれば構造解析は一段と容易になる。selective relay 法 (図 5) を用いれば、プロトン-プロトン-プロトン

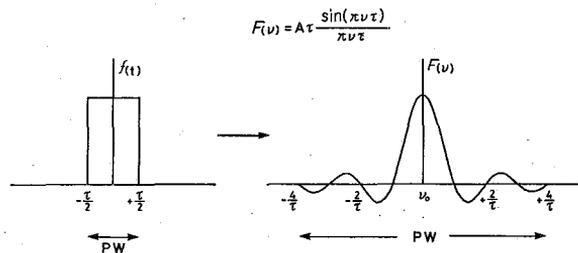


図 2. rectangle パルスと sinc 関数の tailored パルス

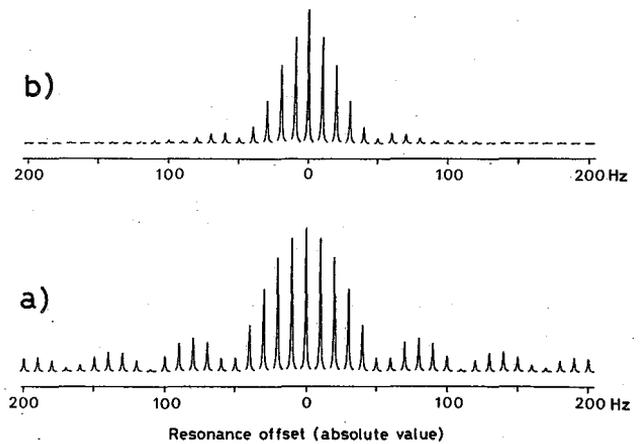


図 3. rectangle パルス(a) と sinc 関数パルス(b) の周波数分布。 $\gamma H_1/2\pi = 14\text{Hz}$, rect.PW=18msec, sinc.PW=50msec (周期 = π)

間の結合を明らかにすることができるので、複雑な化合物の構造解析に有力な手段となる。本方法をモデル化合物、2,4-hexadienalに応用した例を図6に示す。(a)最初のdelay timeでJ結合により1位の磁化は2位へ移動する(selective COSY)。(b)更に第2のdelay timeで2位と3位のJ結合により1位の磁化は3位のプロトンにまで移動する(selective relay)。その結果、1位と3位の間にJ結合がなくても、あたかもJ結合があるかのように観測される。従ってsignalを帰属する場合、selective COSY法から2位が判明し、次いでselective relay法により3位が決定される。

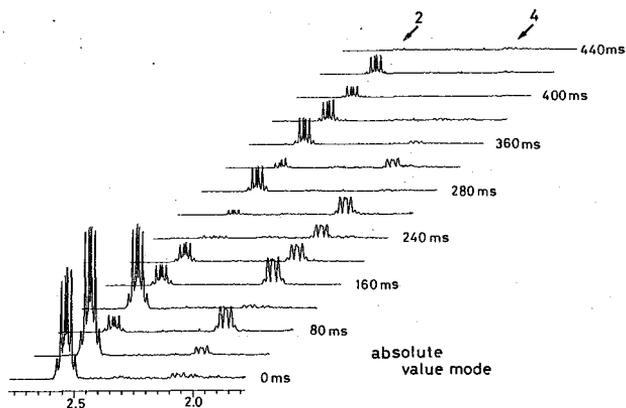


図4。モネンシンH3に対するselective COSYスペクトル。delay timeを40msec毎に変化させた。rect.PW=40msec, J=10.25Hz J=1.50Hz

<selective coherence transfer法の応用>

ポリエーテル抗生物質モネンシンにselective COSY, selective relay法を適用しその有効性を検討した(図7)。まずselective COSYにより17位のプロトンとスピリン結合している18位のsignalが観測される(a)。同様に20位のプロトンに対し、19位の非等価なメチレンプロトンが観測される(b)。従来の方法では、この18位と19位のプロトンの結合を明らかにすることは非常に困難である。この18、19位間のプロトン-プロトンの関係を明らかにするために、17位のプロトンにselective relay法を適用してみた(c)。図より明らかなように、17位のプロトンに対し18位のプロトンと、これに隣接する19位

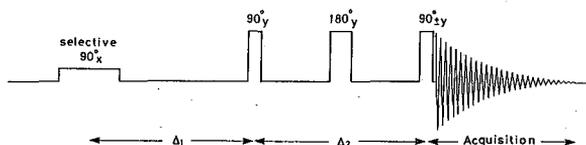


図5。selective relay法のパルス系列

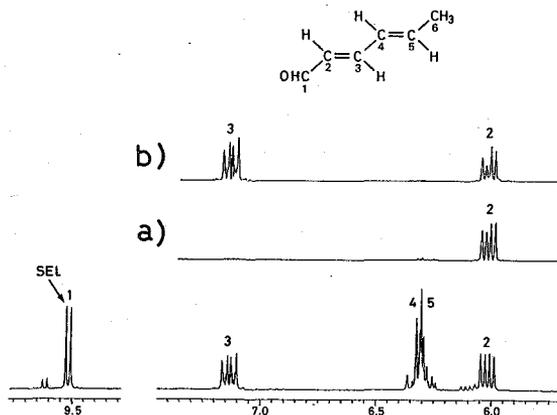


図6。2,4-hexadienalの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル、1位のプロトンに対する a)selective COSY法 b) selective relay法 sinc.PW=190msec, $\Delta_1=60\text{msec}$ $\Delta_2=40\text{msec}$ (absolute value mode)

のプロトンおよび18-Meの signalが選択的に観測され、しかもその分裂パターンも判明することにより、17、18、19、20の部分構造を明らかにすることができた。

<まとめ>

selective coherence transfer法は、二次元NMRの cross section を選択的に取り出したようなデータを与えることにより、プロトン間の結合を明らかにする。しかも分解能良く観測されるため signalの分裂パターンがはっきりと認められる。特に selective relay法はdecouplingを適用できない複雑なスペクトル中のプロトン-プロトンの関係を明らかに出来るという点で、天然物の構造解析に非常に有効な方法であると言えることができる。しかしこれらの方法を使用するにあたっては、decoupling法と異なり

、selective excitationパルスの選択性がかなり重要なファクターとなり、今回使用したようなtailoredパルスを使用することが望ましいと思われる。

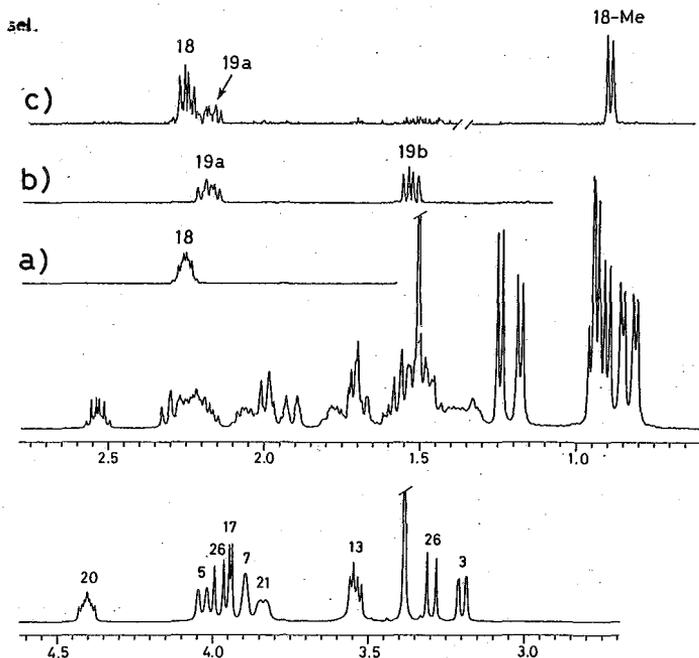
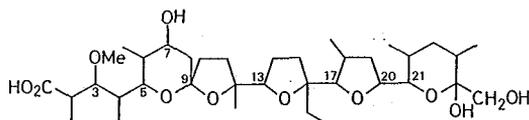


図7. モネンシンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル。

- a) H_{17} に対する selective COSY. sinc.PW=250msec, $\Delta=0$
 b) H_{20} に対する selective COSY. sinc.PW=250msec, $\Delta=0$
 c) H_{17} selective relay 法. sinc.PW=250msec, $\Delta_1=0$,
 $\Delta_2=170\text{msec}$ (absolute value mode)

- 1) 瀬戸治男: "NMR-総説と実験ガイド" (II) 宮沢辰男、荒田洋治編、化学の領域増刊 142号、1983, p.1.
- 2) C. Millot, J. Brondeau, D. Canet; J. Magn. Reson. 58, 143 (1984)
 C. Baver, R. Freeman, T. Frenkiel, J. Keeler, A. J. Shaka; J. Magn. Reson. 58, 442 (1984)
- 3) G. Eich, G. Bodenhausen, R. R. Ernst; J. Am. Chem. Soc. 104, 535 (1983)

1. 序

液晶中に配向した分子のNMRスペクトルの解析は、直接結合定数 (D_{ij}) を与えるが D_{ij} は (1) 及び (2) 式のように配向テンソル ($S_{\alpha\beta}$) と構造パラメーター (r_{ij} と A_{α}) に関係する¹⁾.

$$D_{ij} = -\frac{h \nu_i \nu_j}{4 \pi^2} \left\langle \frac{S_{ij}}{r_{ij}^3} \right\rangle \quad (1)$$

$$S_{ij} = \sum_{\alpha, \beta} \cos A_{\alpha} \cos A_{\beta} S_{\alpha\beta} \quad (2)$$

一方、生体膜の構造は液晶様組織であり、液晶をそのモデルとして考えることができる。従って、薬物分子の液晶NMR法による解析は、生体中での薬物と媒質との相互作用、あるいは薬物の膜透過に関して重要な手がかりを与えると考えられる。

今回我々は、神経遮断薬であるフェノチアジン誘導体について液晶NMR法による解析を試みた。フェノチアジン誘導体あるいはチオキサテン誘導体等の三環性複素環化合物は、抗精神病活性を有し、その作用機序はドーパミンレセプター阻害によるものと考えられている。フェノチアジン誘導体は、N-S軸に沿って折れ曲がり、2つの芳香環の間の二面角は誘導体により変わることが知られている。

この二面角が構造活性相関において重要な因子となり得る。

今回解析を行なったのは、7スピンにスペクトルを単純化した3,7-ジクロロ-10H-フェノチアジン及び3,7-ジブromo-10H-フェノチアジンである。後者の解析は第21回本討論会でも報告したが、前回ではスペクトルのS/N比が悪く、また配向パラメーターの S_{yz} を零と仮定していたので、今回はこれらを正確に取り扱った。

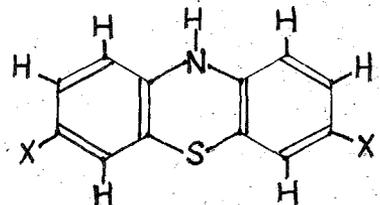


図1.

X = Cl, 3,7-ジクロロ-10H-フェノチアジン
X = Br, 3,7-ジブromo-10H-フェノチアジン

2. 実験

3,7-ジクロロフェノチアジンはStrellら²⁾の方法により、また3,7-ジブromoフェノチアジンは池田ら³⁾の方法により合成した。双方共に金属性不純物によると思われる線幅の広がりが見られるので、微量のフェナントロリンの添加により、これを防いだ。

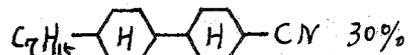
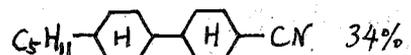
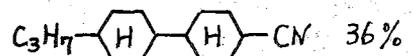


図2. ZLI 1167

ふじわらひであき、わたなべまさゆき、たかぎたつや、ささきよしお

液晶溶媒として、ZLI 1167 (Merck製: トランス-トランス-4'-アルキルビシクロヘキシル-4-カルボニトリル誘導体の3成分混合物, 図2) を用いた。試料濃度はジクロロ体が5.3%, ジブロモ体が5.2%である。プローブ内で温度が十分均一になった後、34.1°Cで測定した。

液晶中試料の¹H NMRは、Varian XL-200 FTNMR装置(200 MHz)により測定した。取り込み幅は8000 Hz, パルス角度は約40°で5000回積算し、16 K点でフーリエ変換した。液晶自身によるバックグラウンド信号を除く為に、コンボリューション差スペクトルを取った。得られたスペクトルの半値幅は、10~15 Hzである。等方溶液の¹H NMRは、日立R-22 NMR装置(90 MHz)によりCW法で測定した。溶媒にはDMSOと四塩化炭素の混合溶媒(30%)を用いた。

スペクトルの予備計算及びiterationには、直接結合定数を考慮したLAOCN3プログラム⁴⁾を使用した。また、構造パラメーター及び配向パラメーターの算出にはSHAPEプログラム⁵⁾によって行なった。計算スペクトルはPICプログラムによって、ローレンツ型曲線を用いて作図した。計算は、大阪大学大型計算機センターACOS, S-1000により行なった。

3. スペクトル解析

配向したジハロゲン化フェノチアジン(C₂対称)のスペクトルはA²B²BB²CC²D系となり、独立なNMRパラメーターは、シフトが4個($\delta_1, \delta_2, \delta_3, \delta_4$)とD_{ij}が12個(D₁₂, D₁₃, D₁₄, D₁₅, D₁₆, D₁₇, D₂₃, D₂₄, D₂₅, D₂₇, D₃₄, D₃₇)である。間接結合定数Jの値は、等方溶液中で測定した値をそのまま用いた。ただし、J₁₂(=8.25 Hz)とJ₂₃(=2.25 Hz)以外は小さく零と見なした。

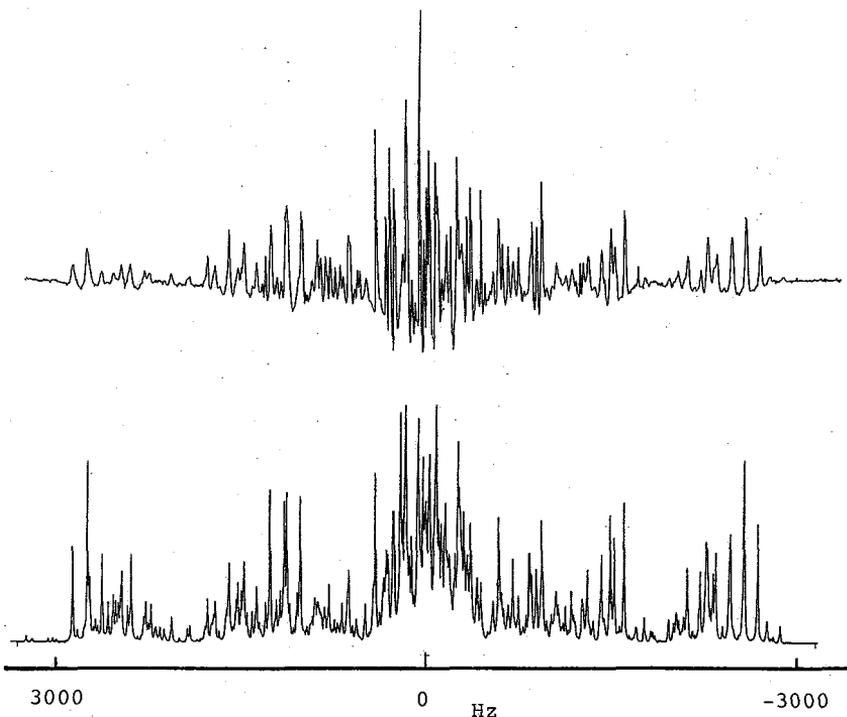
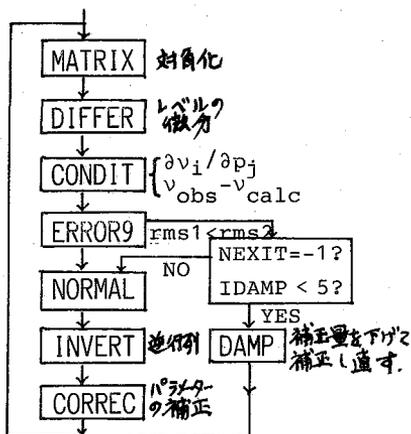


図3. 3,7-ジクロロ-10H-フェノチアジンの¹Hスペクトル。
溶媒: ZLI 1167, 上: 実測, 下: 計算



スペクトル解析上のパラメーター数に比べて、帰属したピークの数が多い(2倍程度)場合には、パラメーターの補正量が大き過ぎて、RMSが大きくなり、iterationが止まってしまうことがある。これを避ける為、補正量を適当な割合に減らすようなサブルーチンDAMPを追加したプログラムLAODAMPを作製し、解析の初期の段階で利用した。この減少係数は、0.5程度とし、最大4回まで繰り返した。(左図)

4. 結果と考察

LAOCNの解析結果を図3と4及び表1に記す。RMSは、1.6Hzと少し大きいが生スベクトルの両端の線幅の広がり、あるいは中央部のピークの重なりによるものであろう。H₂とH₃のシフトは、ジクロロ体、ジブromo体ともに、液晶中と等方溶液中で順序が逆転しているが、溶媒効果(極性効果)によると思われる。

得られた直接結合定数の値から、SHAPEにより構造パラメーターと配向パラメーターを求めると表2の結果

となった。配向パラメーターより、ZLI1167が磁場に垂直に配向し易いことを考慮して、フェノチアジンの三環は溶媒に平行な方向に配向し易いこと、及びS_{xx}とS_{yy}が負でしかも|S_{xx}|>|S_{yy}|であることはY方向がX方向よりも磁場に平行になり易いことを意味し、いずれも妥当な結果である。(図5)

化学構造については、H₁の座標より、endo型であることが裏付けられた(図6)

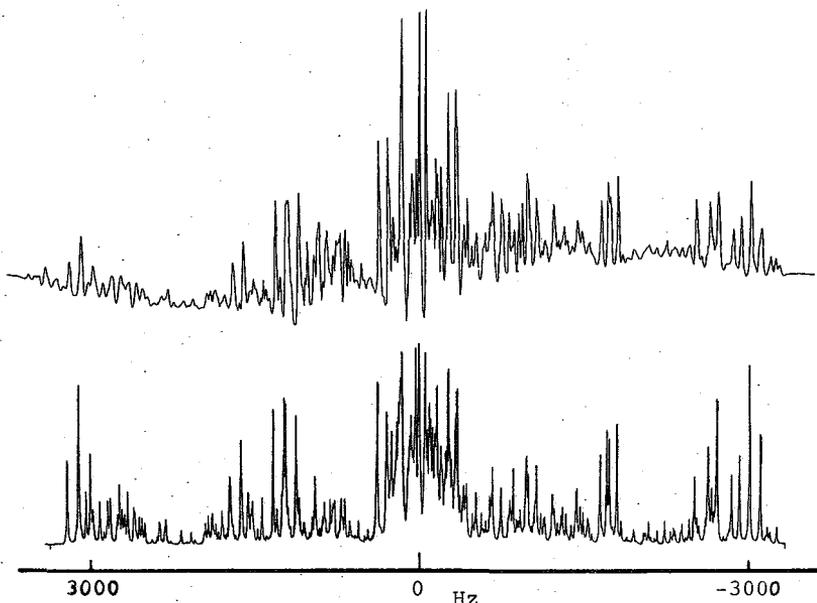


図4. 3,7-ジブromo-10H-フェノチアジンの¹Hスペクトル。溶媒: ZLI1167, 上: 実測, 下: 計算

各原子間の距離は、表2よりジクロロ体よりモジブromo体の方が r_{12} が大きい傾向が見られ、単純な予想とは反対の結果となった。これについては、更に検討中である。二面角はジクロロ体では 148° 、ジブromo体では 157° となり、置換基の効果が大きいことがわかる。

表1. 液晶中の D_{ij} とシフト(H_a)

	dichloro-	dibromo-
$D(1,2)$	733.2	824.9
$D(1,3)$	73.4	53.2
$D(1,4)$	31.8	36.8
$D(1,5)$	41.4	44.0
$D(1,6)$	137.6	158.8
$D(1,7)$	882.9	1027.1
$D(2,3)$	117.7	97.7
$D(2,4)$	23.6	26.8
$D(2,5)$	20.2	21.9
$D(2,7)$	116.4	136.2
$D(3,4)$	87.3	99.1
$D(3,7)$	61.9	54.5
$\nu_2 - \nu_1$	76.8	117.0
$\nu_3 - \nu_1$	84.3	138.7
$\nu_7 - \nu_1$	363.6	397.3

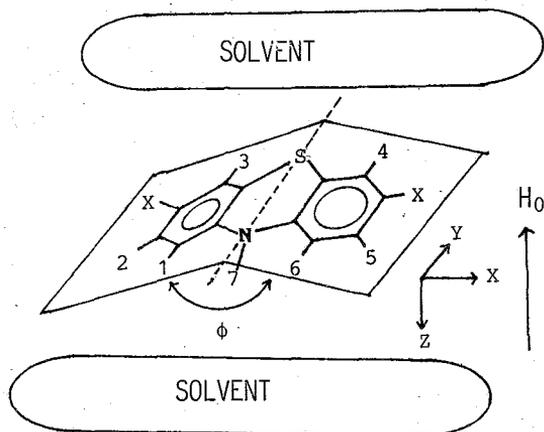


図5. フェノチアジンの配向

表2. 構造と配向パラメーター

	dichloro-	dibromo-
$R(1,3)/R(1,2)$	2.017	1.910
$R(1,4)/R(1,2)$	2.848	2.735
$R(1,5)/R(1,2)$	2.760	2.731
$R(1,6)/R(1,2)$	1.864	1.814
$R(1,7)/R(1,2)$	0.957	0.930
$R(2,3)/R(1,2)$	1.691	1.612
$R(2,4)/R(1,2)$	3.249	3.183
$R(2,5)/R(1,2)$	3.551	3.562
$R(2,7)/R(1,2)$	1.872	1.861
$R(3,4)/R(1,2)$	2.169	2.114
$R(3,7)/R(1,2)$	2.224	2.152
S_{XX}	-0.1290	-0.1471
S_{ZZ}	0.2161	0.2032
S_{YZ}	-0.0243	-0.0629

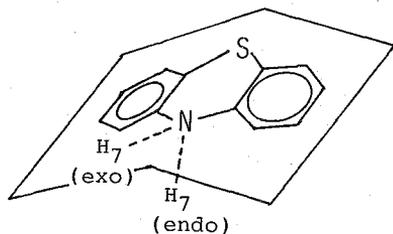


図6. フェノチアジンのendo型とexo型

文献と注

- 1) A_d, A_β は核iと核jを結ぶ軸がある瞬間にのみ、 β 軸となす角度であり、 $S_{d\beta}$ は磁場に対する溶質分子の配向パラメーター、 h はプランク定数、 γ は磁気回転比、 r_{ij} は核iと核jのある瞬間における距離、 S_{ij} は核iと核jを結ぶ軸の磁場に対する配向パラメーターである。(d, $\beta = X, Y, Z$)
- 2) M. Strell and M. Rupprecht, Ger. Pat. 938669 (1956).
- 3) 池田嘉一, 志村武彦, 葛田栄一郎, 日本化学会誌, 437 (1979)
- 4) H. Fujiwara, K. Takahashi, and Y. Sasaki, J. Magn. Reson., 41, 171 (1980).
- 5) P. Diehl, P. M. Henrichs, and W. Niederberger, Mol. Phys., 20, 139 (1971).

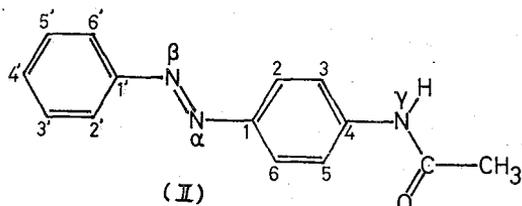
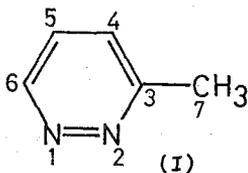
シスーおよびトランスージアゼンのOne-Bond $^{15}\text{N} - ^{15}\text{N}$ スピン
結合定数の符号決定

(京大薬) ○黒田義弘 (京都薬大) 藤原靖弘 (名市大教養)

桑江彰夫 (日本電子) 松下和弘

1 ^{15}N 核を含む核スピン結合定数の符号および大きさは ^{15}N 核の lone-pair の有無および lone-pair の配向に大きく依存することが知られている。然しながら ^{15}N 核間のスピン結合定数の符号決定についての実験例は非常に少なく、この原因の一つとして実験方法の困難さが考えられる。そこで本研究においては前回の討論会で紹介した $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴法を使用することで比較的容易に ^{15}N 核間結合定数の符号決定が出来ることを示す。標記シスーおよびトランスージアゼンの $^1J(\text{N}-\text{N})$ の符号について、先に報告した 3-メチルピリダジン(1)¹⁾ および trans-4-アミノアゾベンゼン²⁾ に関する INDO法による理論計算あるいは Schulman 等のヒドラジンに関する INDO³⁾, Ab Initio法⁴⁾ による理論計算によればシス型の場合マイナス、トランス型ではプラスの符号であると考えられる。今回この点について実験的に検討した。

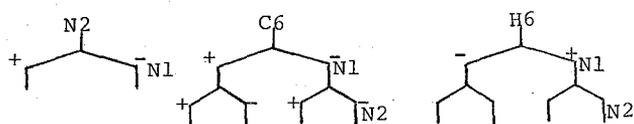
2 3-メチルピリダジン- $^{15}\text{N}_2$ (3-MePyd $^{15}\text{N}_2$) は昨年と同じ試料を使用した。4-アセチルアミノ ^{15}N -アゾベンゼン- α, β - $^{15}\text{N}_2$ (II, acetyl-



AAB $^{15}\text{N}_3$) は 4-アミノ- ^{15}N -アゾベンゼン- α, β - $^{15}\text{N}_2$ (AAB- $^{15}\text{N}_3$)²⁾ から合成した。 ^1H (199.6 MHz), ^{13}C (50.2 MHz), および ^{15}N (20.2 MHz) NMR スペクトルは JEOL FX-200 にて測定した。

3 (i) 3-MePyd $^{15}\text{N}_2$ (1) の $^1J(\text{N}=\text{N})$ の符号決定

図1に N2, C6 および H6 のスペクトルの模式図を示す。N2, C6 は ^1H とのスピン結合を noise decoupling した状態、H6 は H6-{H4, H5} の状態として示した。今、 ^{15}N のスピン状態を説明の都合上 + および - で示す。その規約は ^{15}N 核とのスピン結合で分裂した doublet のうち高磁場側に + 符号を付けた場合を そのスピン結合の "reduced" coupling 定数、 $n\text{K}$ ⁵⁾ が + であると約束



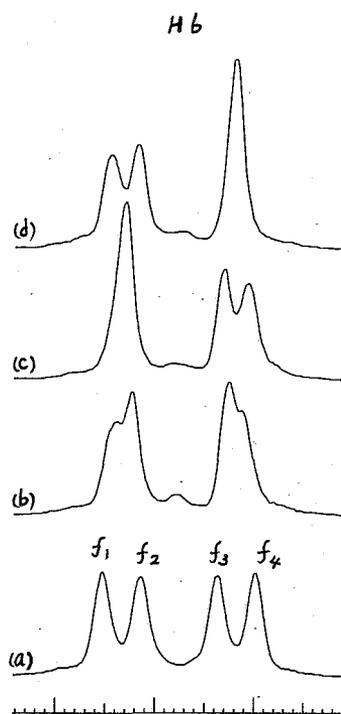
[図1] 3-MePyd- $^{15}\text{N}_2$ の N2, C6, H6 スペクトルの模式図 N2, C6 は ^1H -noise decoupled 状態、H6 は H5, H4 とのスピン結合が decoupling された状態を示す。 $^1J(\text{N2-N1}) = -22.1\text{Hz}$, $^1J(\text{C6-N1}) = +6.4\text{Hz}$, $^2J(\text{C6-N2}) = +4.8\text{Hz}$, $^2J(\text{H6-N1}) = -11.6\text{Hz}$, $^3J(\text{H6-N2}) = 4.0\text{Hz}$

くろだ よしひろ ふじわら やすひろ くわえ あきお まつした かずひろ

する。例えば $^1J(C6-N1)=+6.4\text{Hz}^1$ の場合 ^{13}C と ^{15}N の磁気回転比の符号は逆であるので、この場合図1に示すように高磁場側が一となる。 $^1J(N-N)$ の符号は図1に示した C6, H6 のように N1およびN2との間に適当な大きさのスピ結合を持った炭素または水素原子を選び、N2(またはN1)の N1(またはN2)により分裂した高磁場側または低磁場側のシグナルを選択的に照射した時に C6(または H6)の N2による分裂が C6(または H6)の N1による分裂の高磁場側において有効にdecoupleされるか低磁場側においてかを検討することにより得られる。図2に H6についての $^1\text{H}-\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ タイプの三重共鳴実験の結果を示す。(a)は H6- $\{H4, H5\}$ のスペクトルを示す。今、N2の化学シフト位置を ^{15}N 照射した時(b)の程度に $^3J(H6-N2)$ がdecoupleされる照射パワーを用いて、その照射位置を高磁場側(c)および低磁場側(d)に10Hz ずらして測定すると、それぞれ f_1-f_2 , f_3-f_4 が有効にdecoupleされた。この結果をH6の模式図に合わせると、 $^2J(H6-N1)$ は一であることが lone-pair の向きにより明らかであるので、 $^1J(N-N)$ は一の符号であることがわかる。従つて一般的にシスージアゼンの $^1J(N-N)$ は一符号であると結論出来る。

(ii) acetylAAB- $^{15}\text{N}_3$ の $^1J(N-N)$ の符号決定

AAB 誘導体をトランスージアゼンモデルとした場合の $^1J(N-N)$ の符号決定は上記シスに比べ次の理由で困難になる。すなわち 構造式(11)を参照にして明らかなくとく N^α 及び N^β とスピ結合を持った原子として C1(またはC1')を選ぶのが適当であると考えられるが、One-bond lone-pair効果⁶⁾により $^1J(C1-\text{N}^\alpha)\sim 0$ であることが多いためであり、事実、先に報告したAAB- $^{15}\text{N}_3$ の場合においても $^1J(C1-\text{N}^\alpha)\sim 0$, $^1J(C1'-\text{N}^\beta)\sim 0$ であった。²⁾そこで $^1J(C1-\text{N}^\alpha)$ が少なくとも1 Hz以上の大きさで観測されるような AAB 誘導体を種種検討した結果 AAB のN-acetyl化体で $^1J(C1-\text{N}^\alpha)=1.2\text{Hz}$, $^1J(C1'-\text{N}^\beta)=1.5\text{Hz}$ が観測出来たので、acetyl AAB- $^{15}\text{N}_3$ について $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴実験をおこなった。 ^{13}C スペクトルを図3に、C4, C2, 6, C2', 6' のスペクトルと共に示す。図4に $\text{N}^\alpha, \text{N}^\beta, \text{C1}', \text{C1}, \text{C4}, \text{C2}, 6, \text{C2}', 6'$ の模式図を示す。図3(d)の $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$ スペクトルに見られるように C1は上記 N^α 以外に N^β とのスピ結合 [$^2J(C1-\text{N}^\beta)=5.1\text{Hz}$]により double-doubletとして観測される。 N^α および N^β の帰属は ^{15}N 核の低磁場側の



[図2] 3-MePyd- $^{15}\text{N}_2$ in CDCl_3 (a) $^1\text{H}-\{^1\text{H}\}$ 二重共鳴 H4, H5 照射, (b)(c)(d) $^1\text{H}-\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 (b): N2の化学シフト位置を照射, (c): (b)より10Hz高磁場側照射, (d): (b)より10Hz低磁場側照射

doublet [$^1J(N\alpha-N\beta)=15.6\text{Hz}$] を示すシグナルを照射した時 [図(c)] C1の $N\alpha$ とのOne-bond coupling がdecoupleされることより確定出来る。今、 $N\alpha$ の化学シフト位置から高磁場側(b) および低磁場側(a)へ 8Hz ずらした位置を選択的に照射すると C1においてそれぞれ低磁場側、高磁場側の $^1J(C1-N\alpha)$ の分裂が効果的にdecoupleされる。

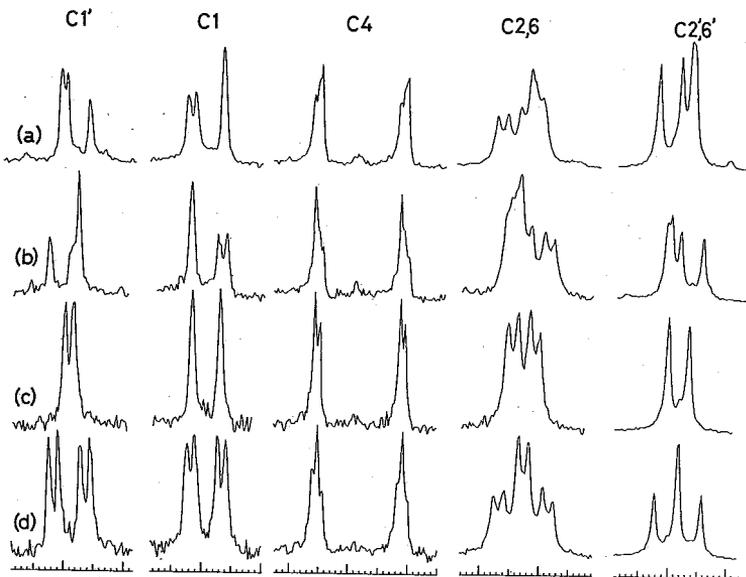
先に報告したtrans-アゾベンゼンにおける $^1J(C1-N)$, $^2J(C1-N)$ の符号決定の結果⁷⁾ からacetyl-AAB $^{15}\text{N}_3$ の $^1J(C1-N\alpha)>0$, $^2J(C1-N\beta)<0$ と考えられるから C1の模式図に付した ^{15}N のスピ状態を考慮すれば $^1J(N\alpha-N\beta)$ は一と導かれる。すなわち理論計算に基づいた

予測とは逆の符号である。

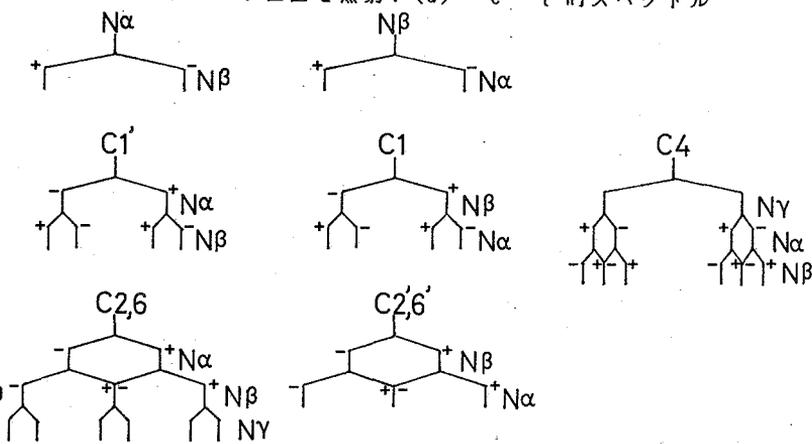
$^1J(N\alpha-N\beta)$ が一であることはC1'についても同様に導かれ、またこれら ^{15}N 照射実験を $N\beta$ に関して行っても同じ結果が得られた。

この符号に関する理論計算予測との不一致の原因は

(1) 理論計算の誤り(計算に使用された近似およびパラメトリゼーションが不適当)または(2) $^1J(C1-N\alpha)>0$ $^2J(C1-N\beta)<0$ ではなくそれぞれ逆の符号である場合の二通りが考えられる。(2)の場合 $^2J(C1-N\beta)<0$ である根拠は C1が $N\beta$ の lone-pair と cis の関係にあることに



[図3] acetyl AAB- $^{15}\text{N}_3$ in DMSO- d_6 . (a)(b)(c) $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ スペクトル (a): $N\alpha$ の化学シフト位置から低磁場側へ 8Hz ずらした位置を照射、(b): 同(a) 8Hz高磁場側へずらした位置、(c): $N\alpha$ の化学シフト位置を照射、(d) $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$ スペクトル



[図4] acetyl AAB $^{15}\text{N}_3$ の $N\alpha, N\beta, C1', C1, C4, C2,6, C2',6'$ に関する模式図. $^1J(N\alpha-N\beta)=-15.6\text{Hz}$, $^2J(C1'-N\alpha)=-5.1\text{Hz}$, $^1J(C1'-N\beta)=+1.5\text{Hz}$, $^2J(C1-N\beta)=-5.1\text{Hz}$, $^1J(C1-N\alpha)=+1.2\text{Hz}$, $^1J(C4-N\gamma)=(-)14.4\text{Hz}$, $^4J(C4-N\alpha)=+0.7\text{Hz}$, $^5J(C4-N\beta)=-0.7\text{Hz}$, $^2J(C2,6-N\alpha)=-4.2\text{Hz}$, $^3J(C2,6-N\beta)=-4.2\text{Hz}$, $^3J(C2,6-N\gamma)=-1.7\text{Hz}$, $^2J(C2',6'-N\beta)=-3.9\text{Hz}$, $^3J(C2',6'-N\alpha)=-3.9\text{Hz}$

基づいているが、本試料について直接 ${}^2J(C1-N\beta) < 0$ を証明する実験は困難である。そこで今回は図3(および図4)から ${}^2J(C2,6-N\alpha)$ の符号が

${}^1J(N-N) < 0$ に対する相対符号として、やはり一であることに

注目し ${}^2J(C2,6-N\alpha)$ の符号を

${}^3J(N\alpha-H2,6)$ の符号を介して

さらに ${}^1J(C2-H2) [= {}^1J(C6-H6)]$

と関連づけることを試みた。

この ${}^1J(C-H)$ は+であること

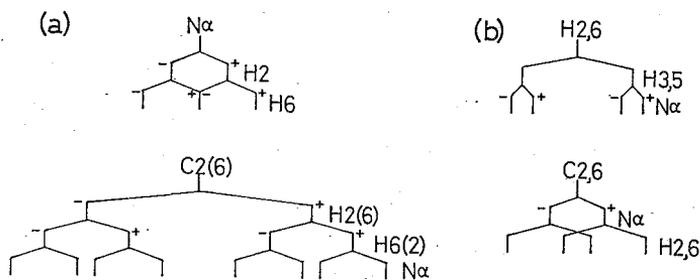
が知られている。⁸⁾ この実験は

${}^3J(N\alpha-H2,6)$ がはっきりと観測出来る $AAB-{}^{15}N_3$ について行った。図5に模式図のみを示す。(a)において proton-coupled 状態における $C2,6$ の ${}^{13}C$ スペクトルについて $N\alpha$ の化学シフト位置から数ヘルツ高磁場側または低磁場側へずらした位置を選択的に ${}^{15}N$ 照射することにより $H2, H6$ のスピン状態との関係から ${}^1J(C-H) > 0$ に基づいて ${}^3J(N\alpha-H2,6) < 0$ と証明出来た。次に (b) においては $C2,6$ の ${}^{13}C$ スペクトルを $H2,6$ の化学シフト位置から 20Hz 高磁場側または低磁場側へずらした位置において 1H 照射しながら観測することにより、 $N\alpha$ のスピン状態との関係から ${}^3J(N\alpha-H2,6) < 0$ のとき ${}^2J(C2,6-N\alpha) < 0$ であることが証明出来た。

理論計算の予測符号(プラス)との不一致については、核スピン結合定数に寄与する Fermi contact(FC), orbital-dipole(OB), および spin-dipole(SD) 項のうち OB項の寄与を先のスーおよびトランスージアゼンモデルの INDO計算^{1,2)} においては過小評価しているためと解釈することが出来る。Schulman等⁶⁾ および Webb等⁹⁾ はニトリル、イソシアニドの ${}^1J(C\equiv N)$ の計算(INDO)において OB項に効くパラメーター($\langle r^{-3} \rangle$ 値)を異常に大きくする必要があると報告している。対してヒドラジンの場合このOB項はジアゼンに比し無視出来る程小さいので、trans形ヒドラジンの ${}^1J(N-N)$ は計算の予想どおり+であろうと思われる。

References

- 1) Y.Kuroda, Y.Fujiwara, and K.Matsushita, J.Chem.Soc.Perk.2, 1985 (in the press).
- 2) Y.Kuroda, H.Lee, and A.Kuwa, J.Phys.Chem., 1980,84,3417. 3) J.M.Schulman, J.Ruggio, and T.J.Venanzi, J.Am.Chem.Soc., 1977,99,2045. 4) J.M.Schulman and W.S.Lee, J.Magn.Reson., 1982,50,142. 5) J.A.Pople and D.P.Santry, Mol.Phys., 1964,8,1. 6) J.M.Schulman and T.Venanzi, J.Am.Chem.Soc., 1976,98,4701.
- 7) Y.Kuroda and Y.Fujiwara, J.Phys.Chem., 1981,85,2655. 8) A.D.Buckingham and K.A.McLauchlan, Proc.Chem.Soc.,London, 1963, 144. 9) Tun Khin and G.A.Webb, Org.Magn.Reson., 1978,11,487.



[図5] $AAB-{}^{15}N_3$ の $N\alpha, C2(6), H2,6$ に関する模式図.

$${}^1J(C2,6-H2,6) = +160.8\text{Hz}, \quad {}^3J(C2-H6) [{}^3J(C6-H2)] = 5.8\text{Hz},$$

$${}^2J(C2,6-N\alpha) = -4.3\text{Hz}, \quad {}^3J(N\alpha-H2,6) = -1.5\text{Hz}, \quad {}^3J(H2-H3) [{}^3J(H5-H6)] = 8.8\text{Hz}, \quad J^r(C-H) = 7.8\text{Hz} \quad (J^r: \text{residual coupling})$$

(名工大) ○井出正一, 岩沢一久, 吉野明広, 吉田忠義, 高橋憲助

1 序

本研究室では、種々のカルバニオンのNMR研究を行なってきた。特に、ベンジル型カルバニオン、ピコリル型カルバニオンに研究の中心を置いてきた。ピコリル型カルバニオンでは、メチレン基の束縛回転に興味ある知見を得ている¹⁾

ピコリル型カルバニオンは、芳香環内に窒素原子を含むピリジン系のカルバニオンである。このアニオンの窒素原子の¹⁵N化学シフトは、報告されている²⁾。そこで、今回は、芳香環の外に窒素原子がある最も簡単な化合物の一つであるアニリドアニオン類について研究を行なった。このアニリドアニオンは、ベンジルアニオンと等電子分子であるため、興味のある比較を行なうことができる。

また、アニオン性置換ベンゼンの研究は、カルバニオン以外は比較的少ない³⁾

2 実験

リチウム塩の合成は、従来の方法⁴⁾に従って行なった。まず、高真空下で、*n*-ブチルリチウム(ヘキサン溶液)とアニリン誘導体(脱水後、真空蒸留)を反応させると、黄色の沈殿物が生じた。充分反応させた後、揮発性物質を除去して、溶媒に溶かしてNMR試験管に封じた。溶液の色は、やはり黄色で、アニリンのLi塩は、かなりうすい黄色である。

¹³C, ¹⁵N, ⁷Li NMRスペクトルは、Varian XL-200, ¹H NMRは、加えて、日立R-20BNMR分光計でも測定した。¹H, ¹³C化学シフトは、使用した溶媒のピークを内部基準とした。¹⁵N化学シフトは、ニトロメタン(380.23 ppm)を外部基準として求めた。

3 結果と考察

1) ¹H, ¹³C化学シフト

表1に、アニリン誘導体のリチウム塩(溶媒THF)の¹H化学シフトをまとめた。環プロトンのすべての吸収は、中性物質よりも高磁場にシフトしている。負電荷が芳香環に非局在化しているのがわかる。シフトの程度は、オルト位(-0.16 ~ -0.47 ppm), メタ位(-0.29 ~ -0.43 ppm), パラ位(-0.56 ~ -0.86 ppm)である。オルト位とメタ位は同程度で、パラ位がかなり大きい。⊖N-Hプロトンも、約1.7 ppm高磁場シフトするが、

Table 1 H-1 Chemical Shifts^{a)} of Lithium salts of Aniline Derivatives

	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	CH ₃	NH(NHCH ₃)
1 C ₆ H ₅ NHLi	6.25	6.67	5.84	6.67	6.25	----	2.50
2 (o-CH ₃ -C ₆ H ₄)NHLi	----	6.70	5.89	6.68	6.47	2.06	2.41
3 (m-CH ₃ -C ₆ H ₄)NHLi	6.14	----	5.72	6.56	6.07	2.07	2.45
4 (p-CH ₃ -C ₆ H ₄)NHLi	6.17	6.49	----	6.49	6.17	2.04	2.31
5 (o-OCH ₃ -C ₆ H ₄)NHLi	----	6.53	6.05	6.49	6.39	b	2.55
6 (m-OCH ₃ -C ₆ H ₄)NHLi	5.88	----	5.50	6.60	5.88	b	2.45
7 (p-OCH ₃ -C ₆ H ₄)NHLi	6.21	6.41	----	6.41	6.21	b	2.21
8 (2,6-CH ₃ -C ₆ H ₄)NHLi	----	6.64	5.92	6.64	----	2.13	2.52
9 C ₆ H ₅ N(CH ₃)Li	6.31	6.81	5.95	6.81	6.31	----	2.80
10 (o-CH ₃ -C ₆ H ₄)N(CH ₃)Li	----	6.65	5.86	6.76	6.07	2.06	2.79
11 (m-CH ₃ -C ₆ H ₄)N(CH ₃)Li	6.21	----	5.85	6.76	6.16	2.15	2.85

a) in ppm, THF solutions, 0.5 - 1.0 M

b) peak not observable, because peak overlaps solvent peak

いぞ しょういち, いわさわ かずひさ, よしの あきひろ, よしだ ただよし
たかはし けんすけ

⊖N-CH₃プロトンは、必ずしも、高磁場シフトしていない(+0.11~-0.04 ppm)。

次に、表2に、¹³C化学シフトをまとめた。リチウム塩と中性物質のシフト差Δδ_{13C}値は、オルト位(+1.3~-2.4 ppm)、メタ位(+0.4~-2.6 ppm)、パラ位(-6.3~-11.5 ppm)となる。Δδ_{13C}の値は、オルト位とメタ位で同程度である。また、オルト位とメタ位は、アニオン化して必ずしも高磁場シフトしていない。パラ位のΔδ_{13C}値は、予想通り大きな負の値をとる。π電子密度を増加させる共鳴効果のために、オルト位もかなり高磁場シフトすると期待される。しかし、実際は、オルト位の変化は非常に小さい。この原因は、アニリドアニオン特有の孤立電子対の影響であると推論でき^{3a)}。

Jackman⁵⁾は、リチウムフェノレートの場合で、パラ位のΔδ_{13C}値を会合の目安としている。Δδ_{13C}の値が、-6, -12, -15 ppmの時、各々、四、二、単量体であると報告している。本研究のアニリドリチウム塩類の場合も、p-アニジンのLi塩だけは-6 ppmで他の場合(-8~-11 ppm)よりかなり小さく、会合状態が異なるかと推測される。この確認を得るために、¹³C, ⁷LiのT₁(obs)を求めてみた。その結果、p-アニジンのLi塩(⁷LiのT₁=0.03 s, 環炭素のT₁=0.20 s)は、他の場合(⁷LiのT₁ 0.10~0.32 s, 環炭素のT₁ 0.5~1.2 s)と比べてすべてのT₁値が小さくなった。p-アニジンのLi塩は、他より大きな会合体を形成していることがわかる。

2) C-N回転障壁

N-メチルアニリンのLi塩では、常温で、オルト位の¹³Cピークがブロードであった。-50℃で、オルト位(127.36, 129.78 ppm), メタ位(107.16, 119.05 ppm)が、各々、二本に分れることを確認した。これは、⊖N-Cの周りの回転が束縛されたことを示唆している。また、N-メチル-m-トルイジンのLi塩も、常温で、オルト位の¹³Cピークがブロードであり、束縛回転を示唆している。一方、N-メチル-o-トルイジンのLi塩は、-90℃まで温度を下げて、⊖N-CH₃プロトンピークは一本のままで分裂しなかった。

3) ¹⁵N化学シフト

表3に、アニリン誘導体のリチウム塩の¹⁵N化学シフトを、カチオンの文献値⁶⁾と合わせてまとめた。なお、⊖N-CH₃の¹⁵Nピークは、今のところ観測できていない。アニオンになると、中性より約40 ppmの低磁場シフトが見られる。すなわち、アニリドアニオン、アニリン、アニリウムイオンの順にシフトを後けている。これは、単純に考えたのと全く逆である。CNDO/2計算でも、全電子密度は、アニリウムイオン、アニリン、アニリドアニオンの順に増えている(順に、4.9987, 5.2228, 5.5304)。これより、電子

Table 2 C-13 Chemical Shifts^{a)} of Lithium salts of Aniline Derivatives

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CH ₃	(δ _{C4} - δ _{C3})
1	165.60	116.38	129.05	108.05	129.05	116.38		-21.00
2	163.35	120.58	129.92	108.48	127.17	115.80	19.60	
3	165.48	117.14	137.35	109.28	128.94	113.88	22.19	
4	163.17	116.14	129.67	115.90	129.67	116.14	20.74	
5	153.85	149.17	109.70	109.22	122.79	117.26	55.56	
6	166.88	101.18	162.23	94.46	129.14	110.35	54.58	
7	159.80	116.25	116.25	147.19	116.25	116.25	57.28	
8	161.33	120.61	128.36	108.78	128.36	120.61	20.06	-19.58
9	164.06	113.00 (br)	128.97	108.25	128.97	113.00 (br)	37.49	-20.72
10	162.46	123.21	127.96	107.94	129.15	108.19	20.54 37.73	
11	164.07	114.08 (br)	137.26	109.73	129.08	109.77 (br)	22.47 37.50	

a) in ppm, THF solutions, 0.5 - 1.0 M
errors are within ± 0.07 ppm

密度だけでは、この40 ppmの低磁場シフトは説明できない。そこで考えられるのが、混成の効果である。2)で、アニオンのC-N結合の二重結合性が高まっていることが確認できた。アニオンの窒素原子は、s p²混成軌道を取っていると考えられる。本来、アニオンの¹⁵N化学シフトは、負電荷によるしゃ入いで高磁場シフトするはずである。しかし、この効果よりも、s p²混成による脱しゃ入い効果の方がこの場合は大きいと推定できる。

s p²混成を裏付けるために、リチウム塩のときの¹J_{NH}を測定してみた。

4) ¹J_{NH}, ²J_{NC}

図1, 図2に、¹J_{NH}を測定した代表例を示す。図1は、INEPT法を用いてある。結果として、THF溶媒中では、すべてのLi塩で、¹J_{NH}は約55 Hzとなった。この値は、予想値 (s p²混成とすると、約90 Hz, %s = 0.43¹J_{NH} - 6¹⁷) を大きく下回る。何らかの交換が起こっていないかと考えて、o-トルイジンのLi塩, アニリン-¹⁵NのLi塩の温度可変実験を試みたが、+60 ~ -50 °Cの間で約55 Hzであった。また、他のエーテル性溶媒 (DME, 2MeTHF) 中でも、約55 Hzであった。以上の結果より、エーテル性溶媒中では、¹J_{NH}は約55 Hzで固有であると結論できる。

アニリン-¹⁵NのLi塩で、¹J_{NC}, ²J_{NC}を測定した(表4)。¹J_{NH}の場合と同様に、¹J_{NC}も中性の値と比べて絶対値が減少している。¹J_{NH}, ¹J_{NC}は、フェルミ項によって支配されている。孤立電子対軌道のs性が強くなると、フェルミ項に正の寄与をもたらす。観測される¹J_{NC}が小さくなるという報告¹⁰⁾がある。このアニリドリチウムの場合も、同様な説明が可能であろう。

Table 3 ¹⁵N-15 Chemical Shifts of Cations, Neutrals, and Anions of Aniline Derivatives

R	Anilinium ion ^{a)}	Aniline ^{b)}	Anilide anion ^{b)}	$\Delta\delta_N$
H	51.0 ₃	54.1	96.0	41.9
2-CH ₃	48.7 ₃	52.1	92.6	40.5
3-CH ₃	50.2 ₃	53.5	94.7	41.2
4-CH ₃	49.5 ₃	51.4	90.9	39.5
2-OCH ₃		43.7	83.0	39.3
3-OCH ₃		54.6	97.0	42.3
4-OCH ₃		48.6	84.3	35.7
2,6-CH ₃		49.5	91.5	42.0

- a) Ref. 6 in Trifluoroacetic acid external NH₄Cl = 24.93 ppm downfield from liquid ammonia
 b) in THF, observed values external CH₃NO₂ = 380.23 ppm downfield from liquid ammonia
 c) $\Delta\delta_N = \delta_{\text{anilide anion}} - \delta_{\text{aniline}}$

Fig 1 ¹⁵N NMR INEPT Spectrum of Lithium salt of m-Toluidine



Fig 2 ¹⁵N NMR Spectra of Anilide-¹⁵N Lithium

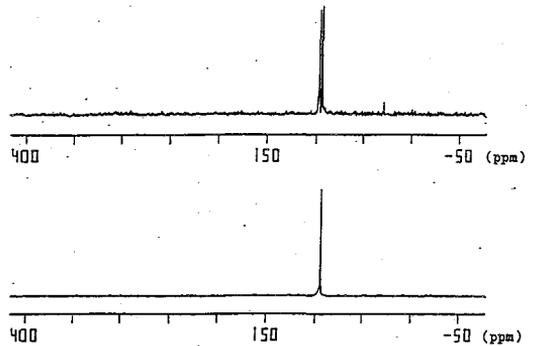


Table 4 ¹J_{NH}, ¹J_{NC} of Aniline-¹⁵N and its Lithium salt

Lithium salt ^{a)}	¹ J _{NH}	¹ J _{NC}	² J _{NC}	³ J _{NC}
Lithium salt ^{a)}	54.7±0.3	3.0±0.5	3.4±0.5	< 0.5
Neutral	(-82.6 ^{b)} - 82.3 ^{c)}	(-11.47 ^{d)}	- 2.66 ^{d)}	- 1.29 ^{d)}

- a) in THF sign is uncertain
 b) in DMSO-d₆ Ref. 8a)
 c) in DMSO-d₆ Ref. 8b)
 d) in (CD₃)₂CO Ref. 9

5) DMSO中の¹⁵N化学シフト, ¹J_{NH}

アニリンのLi塩の場合、溶媒を変えて、¹⁵N化学シフト, ¹J_{NH} を求めてみた(表5)。その結果、DMSO中では、エーテル性溶媒中と大きく状況が異なることがわかった。

まず、DMSO中の¹⁵N化学シフトは、エーテル性溶媒中よりさらに20 ppmほど低磁場シフトすることがわかった。たぶんこれは、¹⁵N化学シフトが、Li塩の溶媒和能力の違いに敏感であるためと予想される。また、DMSO中では、¹J_{NH}は観測できなく、何らかの交換が起こっていると想像され、興味深い。

Table 5 N-15 NMR data of Anilide Lithium in various solvents

solvent	N	J _{NH}
THF	96.0	54.7±0.3
DME	94.0	55.2±0.5
2Me-THF	95.7	55.4±1.2
DMSO	118.0	

6) アニリドリチウムとベンジルリチウム

表6に、THF中の各々の¹³C化学シフトを載せて比較した。一般に、(δ_p - δ_m)_{13C}の値が、(モ)置換ベンゼンの環への置換基からの電荷の共鳴非局在化の程度を目安になるとされている。両方の(δ_p - δ_m)の値から、この二つのLi塩の共鳴非局在化の程度は似ていることがわかる。

ベンジルリチウムのα-炭素は、15 ppmほど中性より低磁場シフトするが、これは混成の変化によって説明されている¹¹⁾。アニリドリチウムの窒素原子も、混成の効果で低磁場シフトするとして説明できる。

Table 6 Comparison of Anilide Lithium and Benzyl Lithium^{a)} in THF

	C-1	C-2	C-3	C-4	C _α	δ _{C4} - δ _{C3}
C ₆ H ₅ NHLi	165.60	116.38	129.05	108.05		- 21.00
C ₆ H ₅ CH ₂ Li	161.5	117.0	128.6	104.7	36.9	- 23.9
C ₆ H ₅ NH ₂	149.21	115.07	129.59	117.37		
C ₆ H ₅ CH ₃	138.5	129.0	129.7	126.1	21.5	
Δδ (anilide)	16.39	1.31	- 0.54	- 9.32		
Δδ (benzyl)	23.0	-12.0	- 1.1	-21.4	15.4	

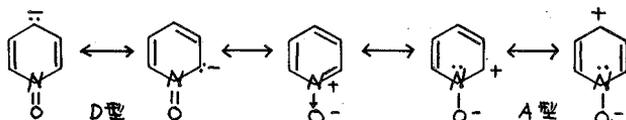
a) Ref. 11

References

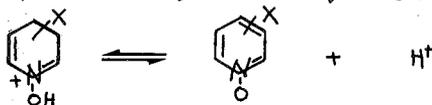
- 1 H. Matsui, A. Yoshino, T. Yoshida, K. Takahashi, Bull. Chem. Soc. Jpn., **57**, 1052 (1984)
- 2 K. Konishi, A. Yoshino, M. Katoh, H. Matsumoto, K. Takahashi, H. Iwamura, Chem. Lett., (1982) 169
- 3a) R. Batchelor, T. Birchall, J. Am. Chem. Soc., **104**, 674 (1982)
- b) R. Batchelor, T. Birchall, J. Am. Chem. Soc., **105**, 3848 (1983)
- c) E. Buncel, T. K. Venkatachalam, B. Eliasson, U. Edlund, J. Am. Chem. Soc., **107**, 303 (1985)
- 4 K. Takahashi, K. Konishi, M. Ushio, M. Takaki, R. Asami, J. Organomet. Chem., **50**, 1 (1973)
- 5 L. M. Jackman, C. W. DeBrosse, J. Am. Chem. Soc., **105**, 4177 (1983)
- 6 L. Psota, M. Franzen-Sieveling, J. Turnier, R. L. Lichter, Org. Magn. Reson., **11**, 401 (1978)
- 7 G. Binsch, J. B. Lambert, B. W. Roberts, J. D. Roberts, J. Am. Chem. Soc., **86**, 5564 (1964)
- 8a) T. Axenrod, P. S. Pregosin, M. J. Wieder, E. D. Becker, R. B. Bradley, G. W. A. Milne, J. Am. Chem. Soc., **93**, 6536 (1971)
- b) L. Paolillo, E. D. Becker, J. Magn. Reson., **2**, 168 (1970)
- 9 M. Hansen, H. J. Jakobsen, Acta Chem. Scand., **26**, 2151 (1972)
- 10 J. M. Schulman, T. Venanzi, J. Am. Chem. Soc., **98**, 4701 (1976)
- 11 K. Takahashi, Y. Kondo, R. Asami, Y. Inoue, Org. Magn. Reson., **6**, 580 (1974)

1. はじめに

ピリジンN-オキシド (PYNO) は有機化学, なかでも複素環化学, において重要な位置を占める key化合物であり, 合成, 反応, 物性等の研究に長い歴史を持ち, 今なお興味を持たれている。^{1,2} PYNOが対応するピリジン (PY)³ に比べて保有している著るべき特徴は, 下記極限構造式で明らかになるように, そのN-O官能基が電子求引性基 (Acceptor型) としても, また電子供与性基 (Donor型) としても働き得るという dual functionalityにある。



芳香族求電子置換反応の代表であるニトロ化反応は PYNO の 4 位に比較的容易に起こるといふ事実が D 型共鳴寄与の証明として有名である。われわれも既に置換基効果の観点から, X, Y, Z 置換 PYNO の水中でのプロトン塩基性 (ΔpK_a 値) の詳細な解析を行い, 種々の置換基定数を駆使して, この本質的 dual functionality の定量化に成功している。⁴



NMR 置換基ケミカルシフト (SCS) は probe 核上の電子密度を鋭敏に反映する。^{5,6} そこで, 今回は主として 4-置換 PYNO を対象化合物に選び, dual functionality の寄与の源である ¹⁷O 核の SCS を測定し, 中性分子 PYNO の基底状態の挙動を検討した。¹⁷O 核は低い天然存在比

(R=0.037%), 小さい磁気回転比 ($\gamma = 3.63 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 比較的大きな四極子モーメント ($Q = -2.6 \times 10^{-26} \text{ cm}^2$), 核スピン $I = \frac{5}{2}$, を持ち, NMR シグナル検出上有利な臭は少ない。しかし, ¹³C 核に比べて稀役に

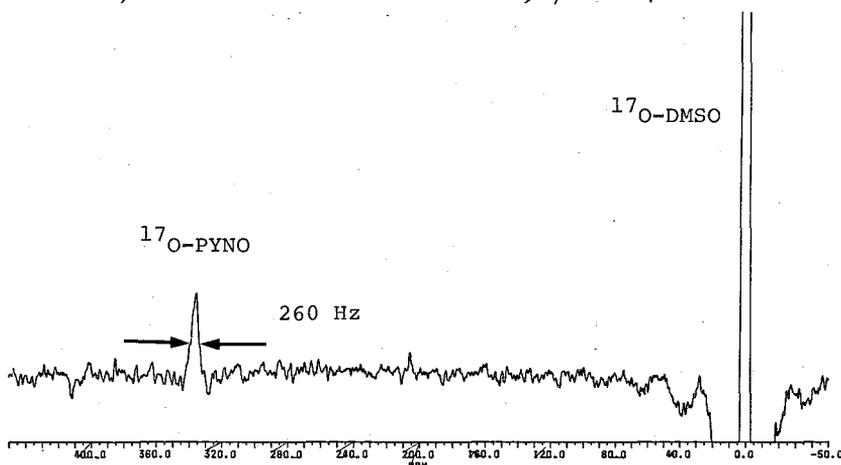


図-1.

さめたまさみ・たかいよしお・きむらさとし・みすみぞういち

大きなケミカルシフト/電子密度比 ($\sim 2000 \text{ ppm/e}$) を有しており、この長所一長に着目した。

ス. 実験

試料は市販品を再結晶するか、常法により PY を H_2O_2 酸化して合成、再結晶を行い、天然存在比の ^{17}O 核の PYNO を試料とし、特に enrich は行わなかった。

溶媒に粘度の高い DMSO を使用する事は線巾をせばめる莫から有利ではないが、 80°C 等の比較的高温

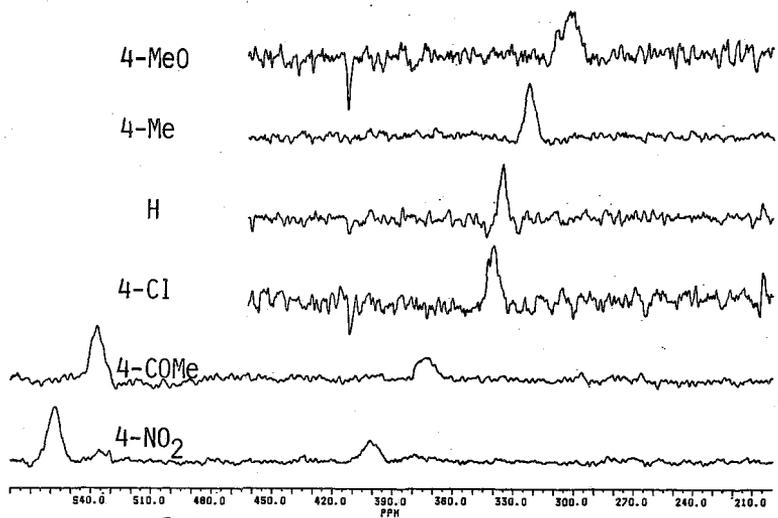


図-2

表-1

Natural Abundance ^{17}O -NMR Data in DMSO

Subst.	W/V %	Temp $^\circ\text{C}$	No Scan	$W_{1/2}$ Hz	$\delta^{17}\text{O}$ ppm	$\Delta\delta^{17}\text{O}$ ppm	$\Delta\delta^{17}\text{O}_{\text{ave.}}$ ppm	Others $\delta^{17}\text{O}(W_{1/2})$
4-NO ₂	5	50	96000	830	400	66		
	20(26)	80	233000	550	401(400)	65(64)	65±1	558(480)
4-CN	5	50	168000	1400	383	49		
	10	80	183000	380	390,387	54,51	51±3	
4-COCH ₃	5	50	244000	---	---	---		
	20	80	242000	570	375,374	39,38	39±1	537(440)
4-COC ₆ H ₅	5	50	---	---	---	---		
	30	80	261000	650	372,373	36,37	36±1	532(430)
4-Cl	5	50	316000	920	343	9		
	14(11)	80	150000	430	340(340)	4(4)	6±3	
H	5	50	300000	550	333			
	13	50	100000	550	334	0		
	13	80	109000	260	336,336	0	0	
4-CH ₃	7	50	62000	920	321	-13		
	21	80	140000	380	322,323	-14,-13	-14±1	
4-t-Bu	8	80	---	---	---	---		
4-CH ₃ O	5	50	485000	830	298	-39		
	16(11)	80	288000	710	303(305)	-33(-31)	-34±5	40(280)
4-N(CH ₃) ₂	10	50	893000	br.	~244?	~90?		
	14(12)	80	677000	br.	~245?	~91?	~90?	

条件下でも蒸発が少いことや反応性データとの対比の容易さ等を考慮して選定した。従って、ケミカルシフトは溶媒の DMSO- d_6 を内部基準として決定した (lock 用に DMSO- d_6 を約 0.5 ml 加えた)。試料濃度が数 % にはシグナル検出のばらばらな場合も多く、最終的には $\sim 75^\circ\text{C}$ で溶解度一杯 (10~30%) まで濃度を上げて測定効率を上げた。

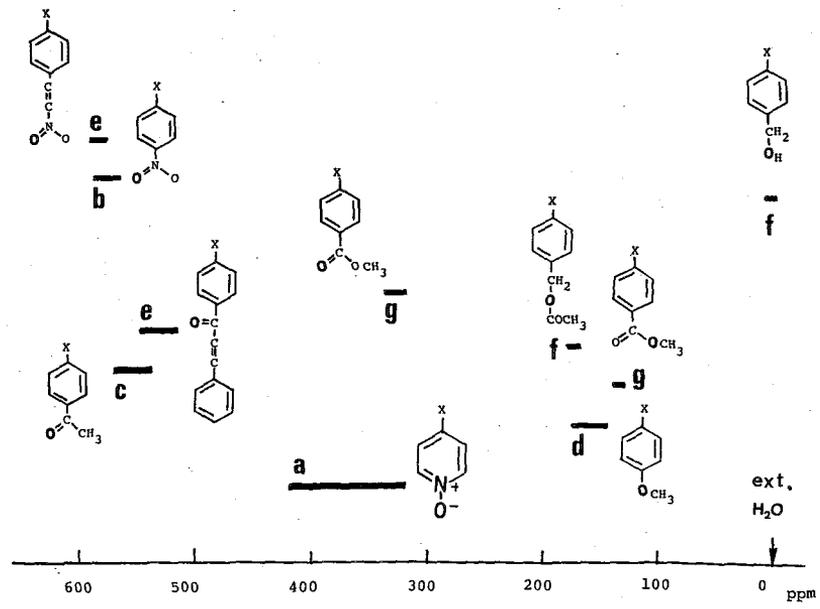


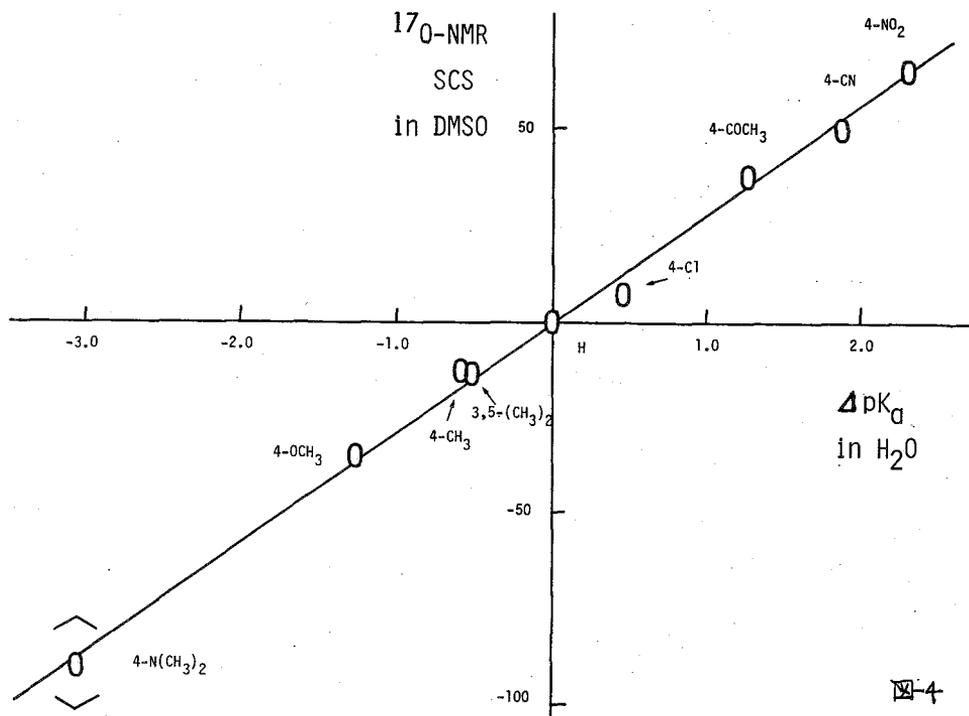
図-3. a: present study, b: Ref 9, c: Ref 10, d: Ref 11, e: Ref 12, f: Ref 13, g: Ref 14.

^{17}O -NMR 測定用機器として Bruker AM360 を使用した。無置換 PYNO の 0.46g/3.5 ml 溶液 (13% $\approx 1.4\text{M}$), 80°C , 10 中 NMR チューブ 使用下の測定条件は以下の通りであり、そのスペクトルは図 1 に例示した。共鳴周波数 48.816 MHz, パルス中 30 μs , データ収集用 D.P. 1k, データ処理用 D.P. 8k, スペクトル中 25 kHz, AT 20.5 ms, DT 25.0 μs , 積算回数 10 万回。データ処理には exponential weighting 関数を FID に乗じてフーリエ変換し、変換スペクトルに 50 Hz の line broadening が加わった。Rolling ベースラインは FID のレットシフト (50~100 μs) で減らした。

3. 結果と議論

4-置換 PYNO の測定条件の一部や ^{17}O -SCS の結果は表 1, 図 2 にまとめた。スペクトルの S/N 比は充分であったが、半値中は 80°C で、4-NMe $_2$ の場合を除いて、約 500 Hz 前後であり、このブロードな線中によるケミカルシフト読み取りの不確定性は約 5 ppm と推定した。SCS は繰り返しエラー、一般に再現性は濃度、温度変化も含む 20 以上の平均 ± 5 ppm 以内であった。

^{17}O -NMR の種々の総説類を見ても PYNO 類のケミカルシフト値の報告は見あたらなかった。⁸ DMSO のシフトは external H $_2\text{O}$ から 17 ppm と報告されている⁷ ので、これを考慮して今回の結果を図 3 に表示した。ここには 4-MeO 基から 4-NO $_2$ 基への置換基変化に起因する種々の系における ^{17}O -SCS の変化が示されている。電子供与性基 4-MeO



から電子求引性 4-NO₂ までの SCS は本研究の PYNO の場合 100 ppm に及び、類似の位置関係にある対応する 4-置換アミノ-IV 類の 29 ppm に比較して 3 倍以上の広がりを持ち、dual functional 性の発現を強く示している。電子供与性基は高磁場シフト、電子求引性基は低磁場シフトあるいはゆる正常方向シフトを示す。

本研究において見いだす、強調したい重要な事実は PYNO の ^{17}O -SCS は PYNO の ΔpK_a 値と驚く程の直線関係を示すという観測事実である(四-4)。つまり、パラ置換 PYNO の ^{17}O -SCS は置換基の極性効果と共鳴効果との両方に大きく依存しており、以下の式で定量的に記述できることが判明した。

$$^{17}\text{O}\text{-SCS} = 28.3 \Delta pK_a$$

$$^{17}\text{O}\text{-SCS} = 68.0 (\sigma^{\circ} + 0.62 \Delta\sigma_{\text{R}}^{+} + 0.30 \Delta\sigma_{\text{R}}^{-})$$

- References:** 1) D. M. Smith, "Comprehensive Organic Chemistry", Vol. 4, Pergamon Press (1979), Chap. 16. 2) H. Tanida et al., J. Org. Chem., 49, 2527 (1984). 3) M. Sawada et al., Anal. Chem., 1985, in press; Tetrahedron Lett., 1985, in press. 4) M. Sawada et al., Tetrahedron Lett., 21, 4013 (1980). 5) D. F. Ewing, "Correlation Analysis in Chemistry", Plenum Press (1978), Chap. 8. 6) D. J. Craik et al., "Progress in Physical Organic Chemistry", Vol. 14, John Wiley (1983), Chap. 1. 7) C. Rodger et al., "NMR and the Periodic Table", Academic Press (1987), Chap. 12. 8) W. G. Klemperer, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 17, 246 (1978); T. St. Amour et al., Bull. Magn. Reson., 1, 118 (1980). 9) R. T. C. Brownlee et al., Org. Magn. Reson., 21, 616 (1983). 10) D. J. Craik et al., J. Org. Chem., 48, 1601 (1983). 11) M. Katoh et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 52, 3475 (1977). 12) D. W. Boykin et al., Spectrochimica Acta, 40A, 887 (1984). 13) P. Balakrishnan et al., Tetrahedron Lett., 25, 169 (1984). 14) P. Balakrishnan et al., Org. Magn. Reson., 22, 753 (1984).

(学習院大理) 持田邦夫, ○若狭雅信

(東大教養) 竹内敬人

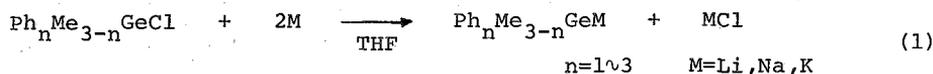
1. 緒言

4 B族元素(ケイ素, ゲルマニウム, スズ)アニオンの化学は対応する炭素アニオンに比較して有機合成上および反応機構上から興味もたれ、最近著しく研究されている。しかし、それらの研究はアニオンそのものの物性や構造についてあまり行なわれておらず、わずかに炭素とケイ素のアニオンにおいてUV吸収スペクトルやNMRによって研究されているだけである。

本討論会では、ほとんど研究例がないフェニル置換ゲルミルアニオンについて ^1H , ^{13}C -NMRを測定し、LAOCN3を用いた完全解析によってNMRパラメーターを決定した。更に類似化合物であるクロルゲルマンおよびハイドロゲルマンとNMRパラメーターを比較し、UV吸収スペクトルの結果を含めてゲルミルアニオンの電子状態や結合について検討したので報告する。

2. 結果と考察

2-1. フェニル置換ゲルミルアニオンの合成 ; フェニル置換ゲルミルアニオンは対応する塩化物をテトラヒドロフラン(THF)中、アルカリ金属と反応させることにより合成した。(式1)



フェニル置換ゲルミルアニオンは、空気、湿気に非常に鋭敏であり、UV, NMRの測定には図1(右)のような装置を工夫し、完全に密閉系でアニオンを合成した。その後、脱気封管し各測定を行なった。

2-2. UV吸収スペクトル ;

ゲルミルアニオンは置換基の種類、アルカリ金属の種類により黄色から赤褐色を呈する。図2, 3にフェニル置換ゲルミルアニオンとその関連物質のUVスペクトルを示す。また、フェニル置換ゲルミルアニオンのUVスペクトルの結果を表1にまとめて記す。

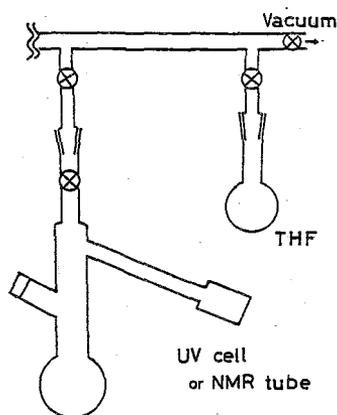


Figure 1. Apparatus.

もちだくにお・わかさまさのぶ・たけうちよしひと

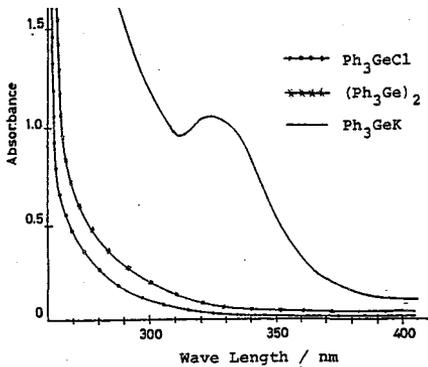


Figure 2. UV Spectra of Ph_3GeK and related compounds.

290~330 nm はアニオン特有の吸収である。この吸収はフェニル基の数で変化することから、アニオン中心のゲルマニウムからフェニル環への電子の非局在化が存在すると考えられる。一方、Evans¹⁷⁾らは炭素アニオンおよびシリルアニオンについて報告している。

彼らはアニオン中心が炭素の場合にはアニオン特有の吸収がフェニル基の数で変化するが、ケイ素の場合にはまったく変化しないことを見だし、炭素の場合と異なりケイ素からフェニル環への電子の非局在化は存在しないと示唆している。このことは炭素、ケイ素、ゲルマニウムの系統で考えたときに非常に興味ある結果である。表1の結果の解釈としてアニオン中心金属とフェニル基の結合距離とフェニル基のねじれが考えられる。

2-3. $^1\text{H-NMR}$; 図4に典型的な例として Ph_3GeLi の実測スペクトルと LAOCN3 によるシミュレーションスペクトルを示す。更に類似体を含めた $^1\text{H-NMR}$ の化学シフトを表2に、代表例の結合定数を表3に示す。

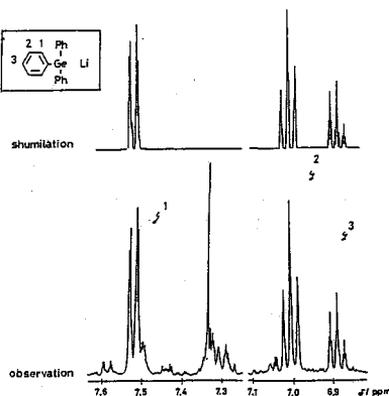


Figure 4. ^1H NMR Spectrum of Ph_3GeLi .

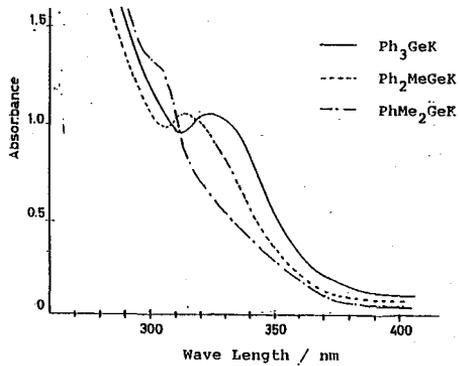


Figure 3. UV Spectra of Phenyl-substituted Germlyl Anions.

Table 1. UV Data of Phenyl-Substituted Germlyl Anions

Compound	M=	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ in THF		
		Li	Na	K
Ph_3GeM		308 (308)*	297	330 (337)**
Ph_2MeGeM		309 (309)	313	324 (339)
PhMe_2GeM		289 (288)	290	304 (310)

* added 12-Crown-4 ether ** added 16-Crown-6 ether

Table 2. ^1H NMR Data

Compounds	δ , ppm (in THF)			
	o-H	m,p-H	Me	Ge-H
Ph_3GeH	7.87~7.30			5.82
Cl	7.86~7.49			
Li	7.58~7.48		7.16~6.98	
Ph_2MeGeH	7.73~7.33		0.88	5.23
Cl	7.88~7.38		1.32	
Li	7.63~7.54		7.51~6.94	
PhMe_2GeH	7.70~7.30		0.64	4.61
Cl	7.83~7.43		1.22	
Li	7.55~7.45		7.07~6.83	

中性の物質 (H, Cl 体) に対するアニオンのパラ位の化学シフトがフェニル環の電子密度のよい目安になることが知られている。表 2 からあきらかなようにアニオンにおいてパラ位のシグナルは高磁場にシフトしておりこのことはフェニル環の電子密度が増加したことを意味する。オルト位やメタ位では顕著なシフトは見られない。

2-4. ^{13}C -NMR ; 図 5 に典型的な例として PhMe_2GeLi とその関連物質のデカップルシグナルを示す。またそれらの化学シフトを表 4 にまとめて記す。

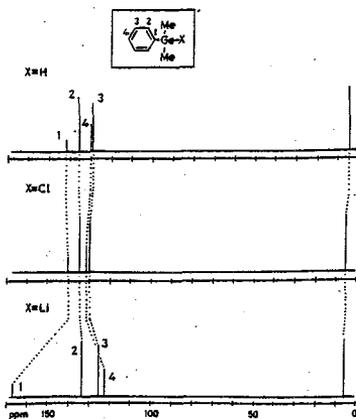
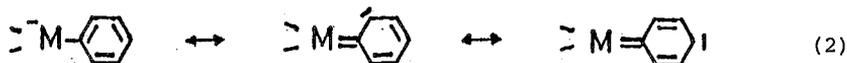


Figure 5. ^{13}C NMR Spectra of PhMe_2GeLi and related compounds.

^1H -NMR と同様に中性物質に対するアニオンのパラ位の化学シフトがフェニル環上の電子密度を反映すると考えられている。パラ位のシグナルは明らかに高磁場シフトしている。この解釈として式 2 のようなアニオン中心のゲルマニウムの 4 p 軌道とフェニル環の炭素の 2 p 軌道の共役による非局在化が考えられる。



実際、アニオン中心が炭素の場合、式 2 のような非局在化によると考えられるオルト位ならびにパラ位の高磁場シフトが報告されている。しかし、ゲルマニウムの場合オルト位の高磁場シフトは認められず、逆にメタ位が高磁場シフトしている。これはゲルミルアニオンにおいては、ゲルマニウムとフェニル環の共役があまり有効に働かず、

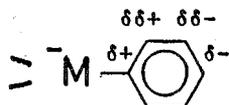


Figure 6. Polarization. 比較的局在化したアニオン中心金属上の電子とフェニル環上の電子が反発しあい図 6 のような分極構造をとっている為ではないかと思われる。

Table 3. Coupling Constant

$J_{12} = J_{45} =$	7.284^*
$J_{13} = J_{35} =$	1.364
$J_{14} = J_{25} =$	$.647$
$J_{15} =$	1.015
$J_{23} = J_{34} =$	7.196
$J_{24} =$	1.303

* Hz

Table 4. ^{13}C NMR Data of Phenyl-substituted Germyl Anions and related compounds

Compounds	ppm (in THF)					
	C1	C2	C3	C4	Me	
	X=H	137.4	136.8	130.1	130.9	
	Cl	136.8	135.5	130.4	132.3	
	Li	161.2	136.0	127.9	125.4	
	X=H	139.2	136.0	129.9	130.5	4.3
	Cl	138.6	134.9	130.2	131.9	2.3
	Li	163.1	134.8	125.8	123.0	3.8
	X=H	141.0	135.3	129.8	130.2	3.3
	Cl	140.4	134.1	130.0	131.7	5.0
	Li	167.4	133.5	125.3	122.0	5.4

1) A.G.Evans, M.A.Hamid, N.H.Rees, J.Chem.Soc. (B), 1110 (1971)

有機ゲルマニウム化合物のNMR(11) 対称四置換ゲルマンの
緩和機構と四極子結合定数

(東大教養、浅井ゲルマニウム研*) ○原園としえ・田中克己・
竹内敬人・柿本紀博*)

【序】

核スピン $I = 9/2$ をもつ Ge-73 核は主に四極子緩和機構で緩和することが知られている。我々は既に、ゲルマニウムに炭素原子が結合した四置換ゲルマンの緩和時間を測定し、対称性のよいものでも緩和時間が短く、また、緩和時間は分子半径に大きく依存していることを報告した。1) ゲルマニウム化合物の緩和機構をさらに詳しく研究し、分子構造との関連性を調べるため、今回、対称性のよい四置換ゲルマン GeR_4 ($R = \text{Me, Et, n-Pr, n-Bu, Cl, Br, I}$) を合成し、Ge-73核の縦緩和時間 (T_1) を反転回復法 (IRFT) で、横緩和時間 (T_2) を線幅 ($\Delta\nu_{1/2}$) と、Carr-Purcell-Meiboom-Gill法 (CPMG) で測定した。その結果、アルキルゲルマンの緩和は主に四極子緩和でおこるが、ハロゲルマンの緩和には、四極子緩和の他に、スカラー緩和が含まれていることが見いだされた。さらに、粘度測定から相関時間を求め、これより四極子結合定数を得、Rとの相関性を研究した。

Table 1 The values of T_1 (IR), T_2 (CPMG), $T_2(\Delta\nu_{1/2})$, τ_c , E , and e^2Qq/h of alkyl and halo tetra-substituted germans

compounds	T_1 (IR)	T_2 (CPMG)	$T_2(\Delta\nu_{1/2})$	$\tau_c(30^\circ\text{C})$	ΔE	e^2Qq/h
	ms	ms	ms	10^{-8}s	KJ mol^{-1}	MH_2
GeMe_4	290	270	320	0.69	9.6	1.89
GeEt_4	220	200	240	2.2	11.4	1.19
GePr_4	100	100	90	4.5	11.9	1.26
GeBu_4	80	80	80	10.9	13.2	0.88
GeCl_4	280	120	120	0.78	9.6	1.82
GeBr_4	160	130	130	1.8	11.2	1.57
GeI_4	80	80	80			

○はらぞのとしえ・たなかかつみ・たけうちよしと・かきもとのりひろ

【実験】 (1: 合成) GeR_4 ($R = \text{Me}, \text{Et}, \text{n-Pr}, \text{n-Bu}$)²⁾, ($R = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$)³⁾ はそれぞれ文献に従って合成した。

(2: NMRの測定) NMR測定用の試料は CDCl_3 に溶かし、脱気封管した。ただし、 GeI_4 はベンゼ- d_6 と CS_2 にとかした。NMRスペクトルは低周波数観測用インサートNM-1T10LFを装備したJNM-FX-90Qを用いて測定した。共鳴周波数は3.10MHz, 180°パルスは540 μ sであった。

(3: 粘度の測定) GeR_4 を CHCl_3 溶液とし、ウペローデ型粘度計(柴山科学KK製、S-S-290S型)で落下時間を測定し、水に対する相対粘度として粘度を計算した。密度はピクノメーターを用いて測定した。粘度、密度測定には、 $\pm 0.001^\circ\text{C}$ にコントロールされた恒温槽を使用した。アルキルゲルマンの分子半径は分子力場計算より求めた。

【結果】

Ge-73 の $T_1(\text{IR})$, $T_2(\text{CPMG})$, $T_2(\Delta\nu_{1/2})$ を 30°C で測定した結果を表1に示す。どの化合物においても、CPMG法から得られた T_2 と線幅から計算された T_2 はほぼ等しい値となった。アルキルゲルマンでは T_1 と T_2 が同じ値であったが、ハロゲルマンでは、 T_1 が T_2 より長い。一般に核スピン $I > 1/2$ の核は、四極子緩和で緩和することが知られており、緩和時間は再配向回転の条件下で、次式のように表される。

$$\pi \Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_2} \frac{3\pi^2}{10} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left(\frac{e^2Qq}{h}\right)^2 \left(1 + \frac{\zeta^2}{3}\right) \tau. \quad (1)$$

ここで、 e^2Qq/h は四極子結合定数、 ζ は非対称パラメータ、 τ は相関時間である。

また、相関時間は、Debyeの式にmicroviscosity factor f を導入したGierer-Wirtzの式(2)で表される。

$$\tau_0 = \frac{4\pi r^3 \eta \cdot f}{3kT} \quad (2)$$

ここで r は分子半径、 k はBoltzmann定数、 η は粘度、 T は絶対温度である。

また、 τ は、一般に活性化エネルギー ΔE を用いて、次式の様に表される。

$$\tau = \tau_0 \exp(\Delta E/RT) \quad (3)$$

ここで R は気体定数である。

各ゲルマニウム化合物について、 $\ln \tau_0$ を $1/T$ についてプロットしたものを図1に示し、 30°C の τ_0 の値と、図1の傾きから求めた ΔE も表1に示した。又、式(1)より計算した四極子結合定数も表1に示した。

もし緩和が四極子緩和機構だけで起こっているとすると、式(1)と式(3)より次式の関係が成立する。

$$\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T_1 = 1/\pi T_2 \propto \tau_0 \propto \exp(\Delta E/RT) \quad (4)$$

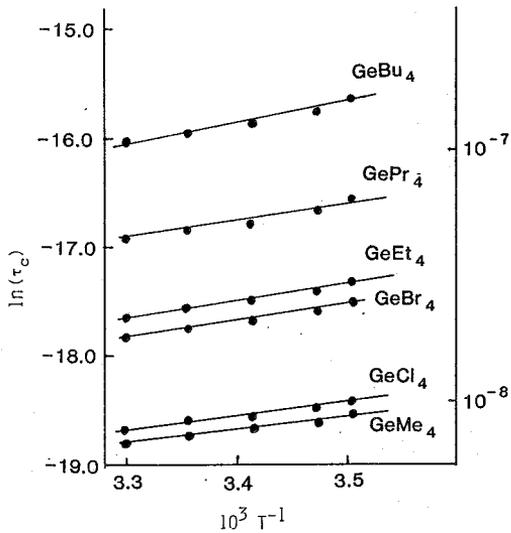


Fig. 1 Plots of $\ln \tau_c$ vs. $1/T$

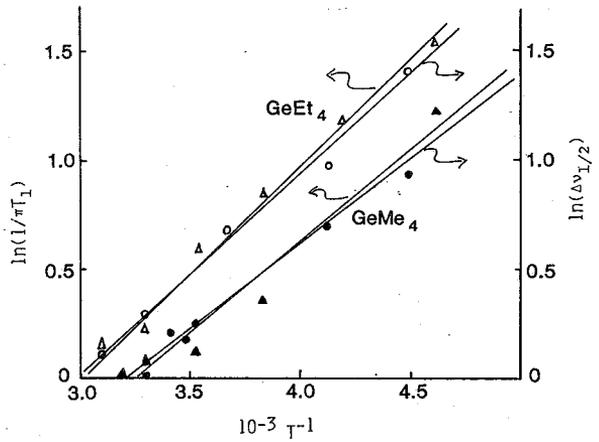


Fig. 2 Plots of $\ln(1/\pi T_1)$ and $\ln(\Delta v_{1/2})$ vs. $1/T$ ○; $\ln(\Delta v_{1/2})$ of GeEt_4 △; $\ln(1/\pi T_1)$ of GeEt_4 ●; of GeMe_4 ▲; of GeMe_4

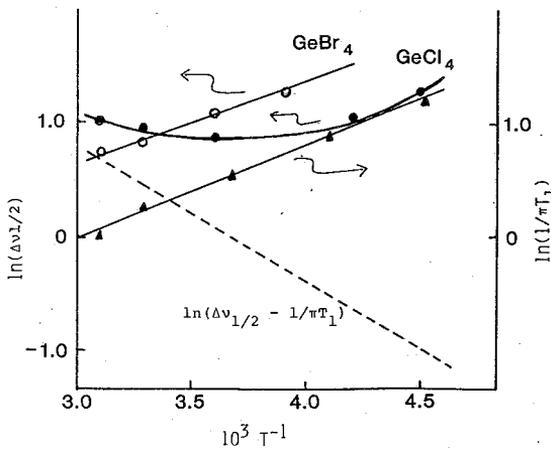


Fig. 3 Plots of $\ln(\Delta v_{1/2})$ and $\ln(1/\pi T_1)$ vs. $1/T$ ●; $\ln(\Delta v_{1/2})$ of GeCl_4 ○; of GeBr_4 ▲; $\ln(1/\pi T_1)$ of GeCl_4

$\ln(\Delta v_{1/2})$, $\ln(1/\pi T_1)$ と $1/T$ の関係を、 GeMe_4 , GeEt_4 についてプロットしたものを図 2、 GeCl_4 , GeBr_4 についてプロットしたものを図 3 に示した。 GeMe_4 , GeEt_4 は、図 2 から分かるように、 $\ln(1/\pi T_1)$ も $\ln(\Delta v_{1/2})$ もよく一致し、 $1/T$ に対して直線となった。一方、 GeCl_4 は、図 3 に示したように、 $\ln(1/\pi T_1)$ は直線となったが、 $\ln(\Delta v_{1/2})$ は極小値を持つ曲線となった。 GeBr_4 の $\ln(\Delta v_{1/2})$ は、この温度範囲では、ほぼ直線であった。

【考察】

アルキルゲルマンは、 T_1 、 T_2 共に四極子緩和で緩和しており、分子量が大きくなるほど、又、分子半径が大きくなるほど、緩和時間が短くなっている。相関時間は30℃で $10^{-8} \sim 10^{-7}$ secとかなり長い値が得られた。 ΔE は約10 kJ/molとなった。 τ_c 、 ΔE 共に、分子の大きさや、分子量が大きくなるにつれて、大きくなっている。四極子緩和定数は約0.9~1.9 MHzとなり、Ge-73核の回りの対称性は、置換基の影響をあまり受けていない事がわかった。一方、ハロゲルマンの T_1 は T_2 よりも長く、又、 GeCl_4 の $\ln(\Delta\nu_{1/2})$ vs. $1/T$ のプロットは曲線となることから、縦緩和は四極子緩和で起こっているが、横緩和には四極子緩和以外の緩和が含まれていることが分かる。ハロゲンは $1 \neq 1/2$ (Cl-35 = 3/2, Cl-37 = 3/2, Br-79 = 3/2, Br-81 = 3/2, I-127 = 5/2)であるから、これらと結合しているGe-73核には、スカラー緩和が関与する可能性がある。スカラー緩和は次式で表される。

$$\frac{1}{T_1} = \frac{2A^2}{3} S(S+1) \frac{\tau_{s'}}{1 + (\omega_1 - \omega_s)^2 \tau_{s'}^2} \quad (5)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{A^2}{3} S(S+1) \left\{ \tau_s + \frac{\tau_{s'}}{1 + (\omega_1 - \omega_s)^2 \tau_{s'}^2} \right\} \quad (6)$$

ここで $A = 2\pi J$ rad/sec, ω は共鳴周波数、 $\tau_s = T_1^s$, $\tau_{s'} = T_2^s$, suffix l はGe-73, suffix S はハロゲン核を示す。

$\{1 + (\omega_1 - \omega_s)^2 \tau_{s'}^2\}^{-1} \ll 1$ であるから、

$$1/T_1 \sim 0; \quad \frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_1} = \frac{A^2}{3} S(S+1) T_1^s \quad (7)$$

となる。故に、

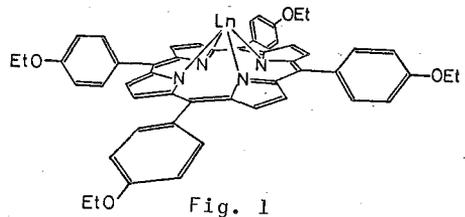
式(7)から $T_1^s \propto (\tau_c^s)^{-1} \propto \{\exp(\Delta E/RT)\}^{-1}$ となるから、これを $1/T$ に対してプロットしてみると、温度の低下と共に減少する。 GeCl_4 は、図3に示したように、 $\ln(\Delta\nu_{1/2} - 1/\pi T_1)$ が点線で示した直線によくのり、Clに結合したGe-73核は、スカラー緩和でも緩和しているといえる。Cl-35, Cl-37の T_1 から、カップリング定数 J が求められる。 GeBr_4 は GeCl_4 に比べて、スカラー緩和の割合は小さい。これは、Ge-Br結合のカップリング定数がGe-Cl結合のカップリング定数 J に比べて小さいためであろう。ハロゲルマンの τ_c , ΔE 、四極子結合定数についての考察は、アルキルゲルマンと同様である。ハロゲンの T_1 、 T_2 の測定を含めた更に詳しい研究は現在当研究室において進行中である。

- 1) 原園、市川、柿本、竹内 第51日化春季年会、1985年4月
- 2) D. L. Tabern, W. R. Orndorff and L. M. Lewis, J. Am. Chem. Soc., 47, 2039 (1925)
- 3) A. W. Laubengayer and P. L. Brandt, J. Am. Chem. Soc., 54, 621 (1932)

(茨大理) 〇堀江克之 平山昌甫 (茨城高専) 蝦名不二夫
(日立那珂) 池辺義紀 吉田慎

[序]

シフト試薬としてのポルフィリン Ln(III) は、 β -ジケトン Ln(III) と比較して基質-Ln 結合の立体特異性、ポルフィリン環の反磁性環電流効果などがあるため興味あるものである。しかし水溶性 Tetra(p-sulfonatophenyl)porphine Ln(III) [LnTPPS] (昨年度発表)^{1,2)} の場合は、溶解度が低いこととシフト試薬自体の aggregation のため、固有シフトがあまり正確に得られず定量的な議論には至らなかった。また、適当な内部基準が使用できず磁化率補正の複雑さのため、一般測定的应用にはあまり適さない。一方、非水溶媒中で用いられる p-CH₃TPP Ln(III) のシフト能が γ -picoline でテストされたが³⁾ やはり溶解度が小さいため定性的な議論におわっている。我々は今回、夾題の錯体 Tetra(p-ethoxyphenyl)porphine Ln(III) [LnETPP] を合成し、典型的な基質である直鎖のアルコール、アミン、元系のピリジン、キノリン誘導体についてシフトの特性を検討した。



[実験]

LnETPP (Ln=Eu, Tb, Ho, Er, Tm, Yb, Lu) (L) は、p-ethoxybenzaldehyde と pyrrole より作られた free base と Ln(acac)₃ と反応させて合成し、精製はカラムクロマト (Al₂O₃) により行い、UV スペクトル、元素分析により確認した。元素分析値は一分子の acac が結合していることを示す。

基質 (S) としては 1-hexanol (1), 1-hexylamine (2), 4-phenylpyridine (3), 4-methylquinoline (4) を用いた。¹H 測定は CDCl₃ 中 (TMS 内部基準)、日立 R-250、バリアン CFT-20 (proton probe 使用) により行った。S の L への脱着速度は、NMR time scale に比べて充分速いことがわかったので、希法により [L]/[S] (ρ) のできるだけ高い値まで測定を繰り返して、lanthanoid-induced shift (LIS) (δ) vs ρ plot の解析により比較すべきシフト値を得た。

[結果と考察]

LnETPP は λ 系の基質約 0.15 M に対して $\rho = 0.3 \sim 0.5$ の範囲で溶けるが、Eu を除いた Ln series 後半では溶解度の限界が来る前に広中化のため、シフトの測定が不可能となる。また、 λ 系いずれも δ vs ρ plot の直線領域は $\rho = 0.15 \sim 0.2$ 程度であり、Sivers 試薬 (Ln(fod)₃) の場合と比較してかなり L-S 間の平衡定数 (K) が小さいと思われる。

ほりえかつゆき・ひらやままさとし・えびなふじお・いさべよしのり・よしだまこと

しかし上記の理由で正確なK, 固有シフトが得られなかった。

そこで近似的に初期句配の1/10の値($\rho=0.1$ の値)を用い、分子内、分子間の比較を行うことにする。

(1) 1-hexanol LuETPPによる反磁性cfδの修正を加えたHaのδ値(δ')と残りのHβ~HεのHaに対する相対値をLn(fod)₃の場合と比較したのがTable 1である。TmETPPによるシフト例をFig. 2に示す。LnETPPがLn(fod)₃より大きなシフトを示すのはEr(約1.3倍)だけでありEu, Hoが約0.4倍、Ybでは極端に小さい(Tb-, Tm(fod)₃は検討中)。Ln(fod)₃では、Lnによる分子内シフト比はHaのわずかなCSの寄与を考慮するとやや一定と見られるが、LnETPPではかなり大きなばらつき(特にHo)が見られる。これはLnによりLS(あるいはLS₂) adductの幾何形態(配位角度等)が異なるためではないかと考えられる。acacの有無にかかわらず配位した基質の運動によりadduct全体にeffectiveな軸対称性があると一応考えられるので、

$$\delta' = CS + pCS = A\langle S_z \rangle + G \cdot D$$

$$\delta' / \langle S_z \rangle = A + G \cdot D / \langle S_z \rangle$$

におけるδ'/⟨S_z⟩ vs D/⟨S_z⟩ plotを試みた。ここでAはhfs定数、⟨S_z⟩⁴⁾、D⁵⁾はそれぞれGoldingによるTotal S'値の成分の平均値、Bleaney等によるpCSの計算値である。Gは立体因子(3cos²θ-1)/r³である。Fig. 3にその結果を示す。H_β, H_γについてはやや直線性が良いが、H_αはかなり悪い。このことより、全般的にGeometryがLnにより微妙に変わることの他に特にH_αのAの大きさがLnにより変動するのではないかとと思われる。Ybでは異常にシフト値が小さいが、今の所決定的な理由が見当たらない。反磁性LuETPPにより、高磁場シフトが見られるが、これは、Lu(fod)₃には見られないいわゆるポルフィリン環の環電流効果によるものである。特にHoでH_αよりも大きな値が得られるのは興味深い。Homrocks等は(p-CH₃)TPPLn(III)へo-picoline系でLn Series前半ではほとんどシフトが観測され

Table 1 Isotropic shifts(in ppm) of 1-hexanol induced by LnETPP($\rho=0.1$)

	δ(H _α) ^{a)}	relative shift to that of H _α					
		α	β	γ	δ	ε	ζ
Eu (ETPP ^{b)})	1.02	1.00	0.73	0.32	—0.23—		0.21
fod	2.30	1.00	0.61	0.44	0.24	0.13	0.07
Tb (ETPP ^{b)})	-6.88	1.00	0.78	0.25	0.16	0.06	0.04
fod	---	---	---	---	---	---	---
Ho (ETPP ^{b)})	-6.48	1.00	0.46	0.29	—0.27—		0.08
fod	-14.3	1.00	0.64	0.38	0.21	0.11	0.08
Er (ETPP ^{b)})	3.72	1.00	0.82	0.32	—0.17—		0.08
fod	2.76	1.00	0.77	—0.42—		0.16	0.13
Tm (ETPP ^{b)})	4.22	1.00	0.77	0.36	0.22	0.14	0.08
fod	---	---	---	---	---	---	---
Yb ₂ (ETPP ^{b)})	-0.05	1.00	0.6	—0.4—			0.2
fod	3.05	1.00	0.55	0.34	0.18	0.12	0.07
Lu (ETPP)	-0.12	1.00	1.17	—0.25—			0.08
fod	0	0	0	0	0	0	0

a) Negative shifts denote high-field shifts.

b) Corrected for the diamagnetic shift taken to be that of LuETPP.

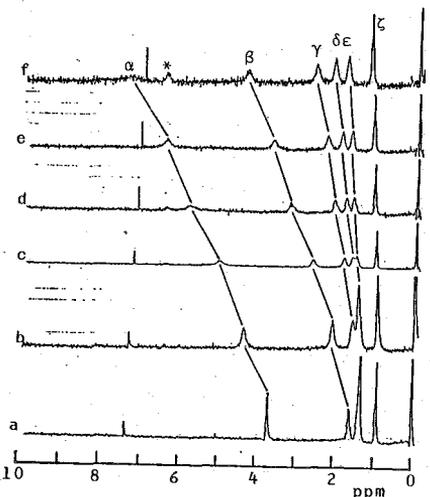


Fig. 2 Effect of increasing concentrations of TmETPP on the 250 MHz ¹H NMR of 1-hexanol in CDCl₃.

a) ρ=0, b) 0.015, c) 0.028, d) 0.051
e) 0.068, f) 0.100, *: protons of TmETPP

ないことに対する説明の一つの可能性として、配位角が、PCSが0に近くなる位置にあると述べているが、³⁾ 幾々の場合はFig. 3よりそういう意味での前半と後半の区別はする必要がない。いずれにしてもこのような状況ではこの方法によるCS, PCSの分離は無理であろう。

(2) 1-hexylamine
 $\rho = 0.1$ の時のシフト値(cfsの補正をしてある)(δ')の相対値をLn(fod)₃の場合と比較したのがTable 2である。

Table 2 Isotropic shifts(in ppm) of 1-hexylamine induced by LnETPP($\rho=0.1$)

	$\delta(H_a)^a$	relative shift to that of H _a					
		α	β	γ	δ	ϵ	ζ
Eu (ETPP ^b)	-1.74	1.00	0.75	0.52	0.17	0.10	0.05
fod	2.13	1.00	0.61	0.42	0.18	0.12	0.07
Tb (ETPP ^b)	-7.48	1.00	0.78	0.25	0.16	0.06	0.04
fod	-10.5	1.00	0.5	-0.32	-0.18	---	0.13
Ho (ETPP ^b)	-11.68	1.00	0.28	0.20	0.10	0.10	0.06
fod	-16.80	1.00	0.56	0.31	0.18	0.10	0.07
Er (ETPP ^b)	4.57	1.00	0.69	0.25	0.23	0.10	0.09
fod	4.15	1.00	0.61	0.34	0.22	0.12	0.08
Tm (ETPP ^b)	6.45	1.00	0.77	0.36	0.22	0.14	0.08
fod	---	---	---	---	---	---	---
Yb (ETPP ^b)	-0.07	1.00	1.29	---	---	0.57	-0.14
fod	5.18	1.00	0.60	0.32	0.17	0.11	0.06
Lu (ETPP)	-0.22	1.00	0.5	---	0.27	---	0.14
fod	0	0	0	0	0	0	0

a), b) See Table 1.

LnETPPによるシフトの大きさのLn(fod)₃との比較は、1-hexanolの場合とはほぼ同じ傾向を示す。極端にシフト値の小さいYbを除けばErだけがLn(fod)₃よりも大きな値を与える。また、符号の分布も双極子相互作用の理論的な値と一致し、これも1-hexanolの場合と同じである。全体としてPCSのみで(α -位にわずかなCSがあり得る)解釈される。Fig. 4で、大きな直線関係が得られている。(H_aのHoだけはかぎりずれる)が、1-hexanolの場合と同様、正確には勾配、切片を求めるには至らない。解釈の可能性としては、Ybは別として他のLn adduct間で微妙な構造の違い、あるいは特異なCSを発生させる為のMechanismがあるなどが考えられよう。

(3) 4-phenylpyridine Er-ETPPによるシフト例をFig. 5に示す。一般にH_aのシフトが大きく、H_b以下は急に小さくなり、大きなシフトを与える後半のLnは、線巾を大きく広げるのでH_{a'}, H_{b'}, H_{c'}は正確に分離できずH_a, H_bのシフト比のみをTable 3に掲げる。π配位子独特のCSの寄与のため、Ln(fod)₃と同様、 $\delta(H_b)/\delta(H_a)$ は一定にならない。H_aのシフトの絶対値も、Ln(fod)₃に比べてやや小さく(Tb, Tmでは広巾化のため、

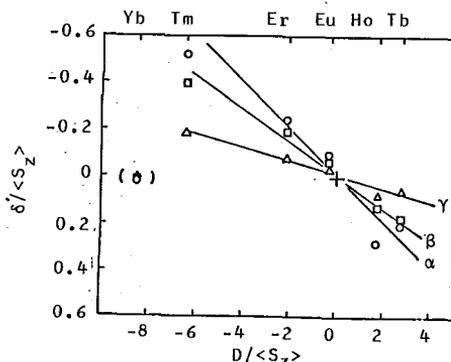


Fig. 3 $\delta'/\langle S_z \rangle$ vs $D/\langle S_z \rangle$ plots for the 1-hexanol-LnETPP system

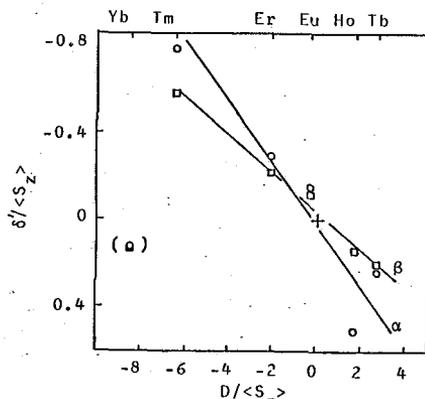


Fig. 4 $\delta'/\langle S_z \rangle$ vs $D/\langle S_z \rangle$ plots for the 1-hexylamine-LnETPP system

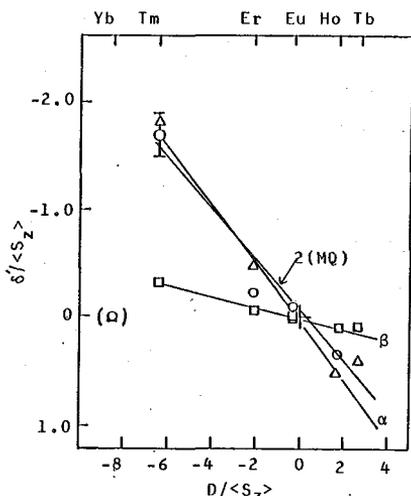


Fig. 6 $\delta/\langle S_z \rangle$ vs $D/\langle S_z \rangle$ plots for the 4-phenylpyridine- and 4-methylquinoline-LnETPP systems.

正確に測定できない) 良好な結果が得られないし、
 2と同様、Ybの値は異常に小さい(検討中)。ただし
 Fig. 6でH β が比較的良い直線性を与えるのに比べて
 H α が極めて悪いことからH α のhfs定数AがLnによ
 って異なるような配位様式の差違があるのではないかと推
 察される。

以上の結果を次のようにまとめる。

- ①合成が出来た唯一の前半LnであるEuでは広巾化が
 少ないがシフト量が小さいのであまり有効ではない。
 後半Lnではほとんど合成可能であら、だが、シフト
 量と共に広巾化もかなり激しいので、正確な測定
 に着しい妨げとなる。
- ②acacがNMRスペクトル上で明確にassignされて
 いないのでその結合状態が不明であり、したがっ
 て今の所基質の配位状態をPCGから考察すること
 ができない。
- ③全般的にLn(fod)₃よりもやや小さいシフトを与え
 るが、定性的な議論には非水溶媒系で使用可能で
 ある。特にEr-ETPPは期待がもてる。

1) 第23回 NMR 討論会講演要旨集 P. 164

2) W. DeW. Horrocks, Jr., and E. G. Hove, J. Am. Chem. Soc., 100, 4386 (1978).

3) W. DeW. Horrocks, Jr., and Ching-Ping Wong, J. Am. Chem. Soc., 98, 7157 (1976).

4) R. M. Golding and M. P. Halton, Aust. J. Chem., 25, 2577 (1972).

5) 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.

Table 3 Isotropic shifts (in ppm) of 4-phenylpyridine induced by LnETPP ($\rho=0.1$)

	$\delta(H_\alpha)^a$	$\delta(H)/\delta(H_\alpha)$	
		α	β
Eu (ETPP ^b)	1.16	1.00	0.34
fod ^b)	2.38	1.00	0.30
Tb (ETPP ^b)	---	---	---
fod ^b)	-6.3	1.00	0.32
Ho (ETPP ^b)	-7.5	1.00	0.27
fod ^b)	-9.2	1.00	0.40
Er (ETPP ^b)	3.1	1.00	0.18
fod ^b)	3.3	1.00	0.30
Tm (ETPP ^b)	17 ± 2	1.00	0.14
fod ^b)	---	---	---
Yb (ETPP ^b)	0.02	1.00	---
fod ^b)	3.75	1.00	0.35
Lu (ETPP ^b)	-0.27	1.00	0.8
fod ^b)	0	0	0

a), b) See Table 1.

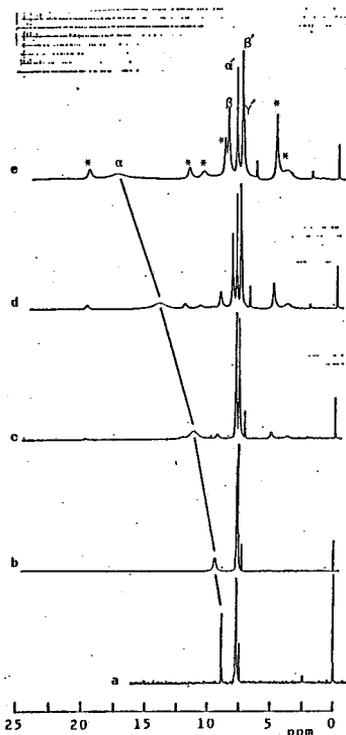


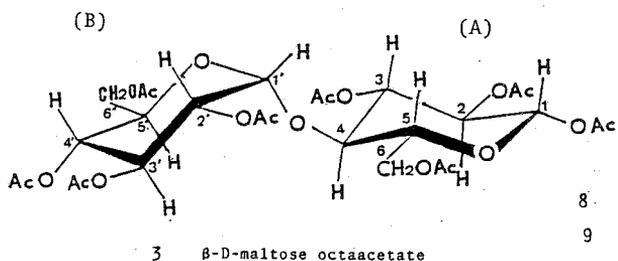
Fig. 5 Effect of increasing concentrations of ErETPP on the 250 MHz ¹H NMR of 4-phenylpyridine (0.147 M) in CDCl₃. a) $\rho=0$, b) $\rho=0.020$, c) $\rho=0.080$, d) $\rho=0.181$ e) $\rho=0.327$, * : protons of ErETPP

(阪大 産 研) 高井嘉雄 沢田正実 市川宏之 三角荘一

1. はじめに

糖類は単糖、二単糖、オリゴ糖、多糖、糖タンパク、配糖体として天然に広く存在している。これら糖類の構造決定は、その構成単糖の種類、組成、配列、糖基基向の結合位置、結合配位、及び構成糖の環構造など多くの要素がありなかなか容易でない。中でも多糖の構造決定は、化学的、酵素的、物理的手段を駆使して行われている。物理的手段の一つとして、NMRは約20年前から利用され、特に単糖の構造決定にアノメリック位プロトン共鳴を中心に行われた。しかし、完全分解による生成単糖の完全解析を基にした多糖の構造決定には、単糖の組成比が決定されるものの、糖配列などに不確実性が多いので、我々はアセトリスや酵素法などを用いた部分分解による生成オリゴ糖の完全な構造解析から、構造決定が可能になると考えた。

今回、上記目的達成の一手段として、下記、単糖、二単糖のアセチル誘導体と合成し、超広帯NMRを用いて、全ての糖環プロトンの完全帰属を行い、その¹Hnmrシフトに及ぼす溶媒効果を求め、糖構造との関係を検討した。今回使用した溶媒は、溶媒効果の基準としての重クロロホルム、磁気異性性のため代表格としての重ベンゼン及び高誘電率を示すアプロテック溶媒としての重DMSOを用いた。



- 1 α -D-cellobiose octaacetate
- 2 β -D-cellobiose octaacetate
- 4 β -D-lactose octaacetate
- 5 α -D-melibiose octaacetate
- 6 α -D-glucose pentaacetate
- 7 β -D-galactose pentaacetate
- 8 Methyl- α -D-glucoside tetraacetate
- 9 Methyl- β -D-glucoside tetraacetate

2. 実験

1~9の単糖、二単糖のアセチル誘導体は、市販のそれらの糖とピリジン溶液中、無水酢酸溶媒中、温度50°Cで0.5~3時間、撪拌、合成した。糖アセチル誘導体はエタノール及び含水エタノールにより再結晶を行った。

¹Hnmrスペクトルは、Bruker AM360を用い、キャリブレーション360,13MHzの測定により、測定温度305°Kで得た。NMR試料の調整は、テトラヒドロフラン内部基準のTMSを加えて、試料濃度5mg/100 μ lで行った。又、一連の溶媒効果の測定においては、Bruker B-ACS60オートサンプラーを用い自動的に行った。この場合のNMRロックは、重クロロホルム-重DMSO系において、100%重クロロホルム溶媒の場合重クロロホルムの²H α 、それ以外の重DMSOを含む場合には重DMSOの²H β を用いた。

たかいよしお さわだまさみ いちかわひろゆき みずみょうりょう

、重クロロホルム-重ベンゼン混合溶媒系の場合には、それぞれ²Hシフトが非常に近接しているためどちらかのシグナルをまとめてロックシグナルとした。自動測定の場合は、あらかじめ必要測定条件をコンピュータにインプットしておき、試料の有動インポート、測定待ち時間(試料-プローブの熱平衡)10分を設け、自動3H(Z1, Z2)後、FID強度の自動調整、測定と順次コンピュータコントロールにより実行を行った。図1のシリアル試料はこの様な連続自動¹H NMR測定とβ-D-セロゼオースオクタアセテートの重クロロホルム-重DMSO混合溶媒系の溶媒濃度比を順次変えて測定した結果を示したものである。

3. 結果と考察

6~3.6ppmの糖環プロトンシグナルのみを拡大した図1の¹H NMRスペクトルの結果は、糖環プロトンシグナルが溶媒濃度比に応じて指数函数的に低磁場、高磁場にシフトしていることがわかる。従って、この連続した溶媒濃度比に応じたシグナルシフトから、100%重DMSO溶媒下では帰属不可能な4ppm付近の糖環プロトンの帰属が、帰属可能な重クロロホルムのデータを用いて容易に可能になった。これは、オートサンプラーを積極的に用いた応用例といえる。

この帰属方法は通常のホモ核からフリッピング実験、二次元NMRのCOSY法などを使用し、9種の糖アセチル誘導体のそれぞれ重DMSO下の糖環プロトンの帰属を行い、結果をTMSからのシフトの値で表1に示した。表1の結果から、溶媒効果 $\Delta\delta_{\text{solvent}}$ ($\delta_{\text{solvent}} - \delta_{\text{CDCl}_3}$)は、極性の低い重クロロホルムのシフトを基準として表わすことにした。この結果の重DMSO、重ベンゼンのそれぞれ重DMSO溶媒効果 $\Delta\delta_{\text{DMSO}}$, $\Delta\delta_{\text{C}_6\text{H}_6}$ を表2, 3にまとめた。

β-D-セロゼオースオクタアセテート, β-D-フルクトースオクタアセテートの場合の重DMSO溶媒効果(表2)を、各構成単糖、糖環プロトンにかけ(別2の様に)、縦軸に溶媒効果の程度、横軸に糖環プロトン位置番号(C6位メチレンプロトン類は5位プロト

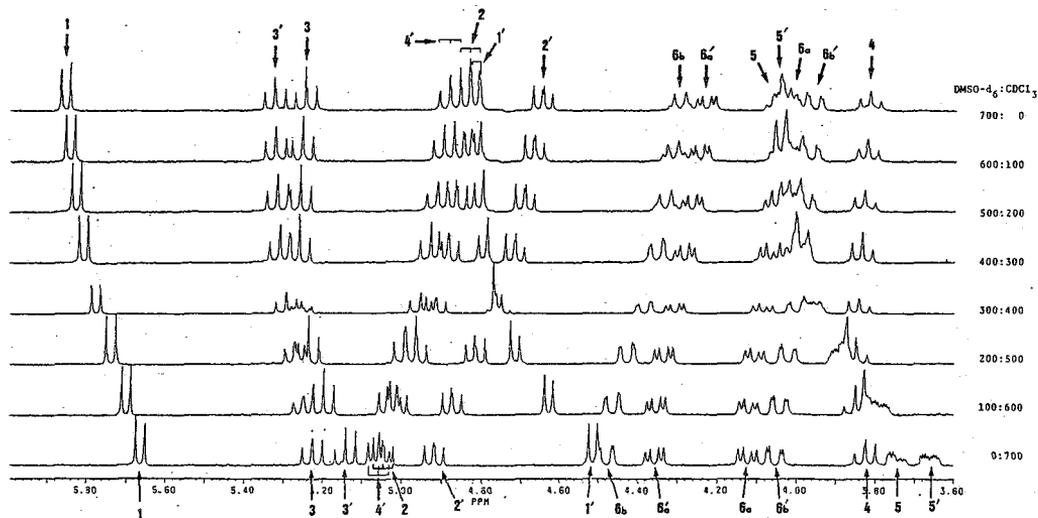


図1. β-D-セロゼオースオクタアセテートの重クロロホルム-重DMSO混合溶媒系の¹H NMRスペクトル

ンとのシシナルカリブ
 リング定数の大きい方
 をaとし、小さい方を
 bとした)をとり、ポ
 ロットした。2つのグル
 コースがβ-1,4結
 合したセルロースの
 β体の重DMSO溶解
 効果は、両グル
 コース環プロトンの1,
 5位プロトンが大き
 く正方向に、偶数位
 の2, 4, 6位プロト
 ンは大きく負値を示
 し、そのパターンを
 示す。一方、2つのグル
 コースがβ結合した
 マルトースのβ体のそ
 の特徴は、グルコシド
 (A環)側はセルビオ
 ースのβ体のパターン
 とほぼ同じ正負シグマ
 パターンを示すが、
 グルコシル(B環)側

表1. 糖アセチル誘導体の溶解 $CDCl_3$, DMSO- d_6 , C_6D_6 の糖環プロトンシシナル

			C1-H	C2-H	C3-H	C4-H	C5-H	C6-H _a	C6-H _b
1 ~	α-D-cellobiose octaacetate	C ₆ D ₆	(A) 6.55	5.23	5.83	3.64	4.16	4.20	4.53
			(B) 4.41	5.15	5.35	5.19	3.32	4.37	3.94
		DMSO- d_6	(A) 6.11	4.90	5.24	3.89	4.01	4.04	4.31
2 ~	β-D-cellobiose octaacetate	C ₆ D ₆	(A) 6.11	4.90	5.24	3.89	4.01	4.04	4.31
			(B) 4.81	4.65	5.36	4.89	3.99	4.25	3.96
		CDCl ₃	(A) 6.25	5.01	5.44	3.79	3.99	4.12	4.47
3 ~	β-D-maltose octaacetate	C ₆ D ₆	(A) 5.77	5.36	5.36	3.64	3.18	4.06	4.42
			(B) 4.32	5.12	5.32	5.18	3.28	4.34	3.90
		DMSO- d_6	(A) 5.86	4.83	5.26	3.82	4.02	4.03	4.29
4 ~	β-D-lactose octaacetate	C ₆ D ₆	(A) 5.86	4.83	5.26	3.82	4.02	4.03	4.29
			(B) 4.82	4.64	5.32	4.88	4.02	4.24	3.92
		CDCl ₃	(A) 5.66	5.05	5.23	3.75	3.75	4.12	4.49
5 ~	α-D-melibiose octaacetate	C ₆ D ₆	(A) 4.51	4.93	5.14	5.07	3.66	4.37	4.05
			(B) 4.51	4.93	5.14	5.07	3.66	4.37	4.05
		DMSO- d_6	(A) 5.78	5.16	5.36	3.90	2.84	4.04	4.29
6 ~	α-D-glucose pentaacetate	C ₆ D ₆	(A) 5.93	4.82	5.47	3.99	4.15	4.12	4.34
			(B) 5.30	4.88	5.22	4.99	3.96	4.12	4.01
		CDCl ₃	(A) 5.74	4.98	5.30	4.04	3.84	4.23	4.46
7 ~	β-D-galactose pentaacetate	C ₆ D ₆	(A) 5.41	4.86	5.36	5.06	3.94	4.24	4.04
			(B) 5.41	4.86	5.36	5.06	3.94	4.24	4.04
		DMSO- d_6	(A) 5.76	5.36	5.36	3.68	3.26	4.08	4.44
8 ~	Methyl-α-D-glucoside tetraacetate	C ₆ D ₆	(A) 4.32	5.51	5.10	5.46	3.64	4.12	4.07
			(B) 4.32	5.51	5.10	5.46	3.64	4.12	4.07
		DMSO- d_6	(A) 5.88	4.83	5.33	3.84	4.06	4.02	4.27
9 ~	Methyl-β-D-glucoside tetraacetate	C ₆ D ₆	(A) 4.75	4.85	5.16	5.23	4.23	4.03	3.99
			(B) 4.75	4.85	5.16	5.23	4.23	4.03	3.99
		CDCl ₃	(A) 5.67	5.05	5.25	3.85	3.76	4.13	4.46
10 ~	α-D-glucose pentaacetate	C ₆ D ₆	(A) 4.47	5.11	4.95	5.35	3.87	4.08	4.15
			(B) 4.47	5.11	4.95	5.35	3.87	4.08	4.15
		DMSO- d_6	(A) 6.57	5.24	5.81	5.34	4.13	3.66	3.46
11 ~	β-D-galactose pentaacetate	C ₆ D ₆	(A) 5.34	5.49	5.76	5.72	4.33	4.16	4.25
			(B) 5.34	5.49	5.76	5.72	4.33	4.16	4.25
		DMSO- d_6	(A) 6.14	4.94	5.35	5.13	4.09	3.66	3.60
12 ~	Methyl-α-D-glucoside tetraacetate	C ₆ D ₆	(A) 5.14	4.92	5.17	5.33	4.16	4.04	4.00
			(B) 5.14	4.92	5.17	5.33	4.16	4.04	4.00
		CDCl ₃	(A) 6.29	5.04	5.48	5.15	4.05	3.72	3.62
13 ~	Methyl-β-D-glucoside tetraacetate	C ₆ D ₆	(A) 5.16	5.10	5.34	5.45	4.21	4.09	4.06
			(B) 5.16	5.10	5.34	5.45	4.21	4.09	4.06
		CDCl ₃	(A) 6.58	5.23	5.79	5.31	4.11	4.28	4.05
14 ~	α-D-glucose pentaacetate	C ₆ D ₆	(A) 6.17	5.01	5.34	5.08	4.14	4.18	4.02
			(B) 6.17	5.01	5.34	5.08	4.14	4.18	4.02
		CDCl ₃	(A) 6.34	5.10	5.48	5.15	4.15	4.27	4.09
15 ~	β-D-galactose pentaacetate	C ₆ D ₆	(A) 5.83	5.73	5.16	5.42	3.41	4.06	4.12
			(B) 5.83	5.73	5.16	5.42	3.41	4.06	4.12
		DMSO- d_6	(A) 5.88	5.08	5.33	5.29	4.41	4.06	4.00
16 ~	Methyl-α-D-glucoside tetraacetate	C ₆ D ₆	(A) 5.70	5.33	5.08	5.43	4.05	4.17	4.12
			(B) 5.70	5.33	5.08	5.43	4.05	4.17	4.12
		DMSO- d_6	(A) 4.88	5.05	5.84	5.30	3.81	4.26	4.07
17 ~	Methyl-β-D-glucoside tetraacetate	C ₆ D ₆	(A) 4.92	4.82	5.29	4.96	3.91	4.15	4.05
			(B) 4.92	4.82	5.29	4.96	3.91	4.15	4.05
		CDCl ₃	(A) 4.96	4.90	5.48	5.07	4.00	4.28	4.11
18 ~	α-D-glucose pentaacetate	C ₆ D ₆	(A) 4.13	5.31	5.39	5.26	5.23	4.24	4.05
			(B) 4.13	5.31	5.39	5.26	5.23	4.24	4.05
		DMSO- d_6	(A) 4.70	4.76	5.26	4.96	4.00	4.18	4.04
19 ~	Methyl-β-D-glucoside tetraacetate	C ₆ D ₆	(A) 4.44	4.99	5.21	5.10	3.72	4.28	4.15
			(B) 4.44	4.99	5.21	5.10	3.72	4.28	4.15
		CDCl ₃	(A) 4.44	4.99	5.21	5.10	3.72	4.28	4.15

(単位 ppm)

表2. 糖アセチル誘導体の糖環プロトンの重DMSO溶解効果(ΔDMSO)

			C1-H	C2-H	C3-H	C4-H	C5-H	C6-H _a	C6-H _b
1 ~	α-D-cellobiose octaacetate	(A)	-0.14	-0.11	-0.20	0.10	0.02	-0.08	-0.16
		(B)	0.29	-0.29	0.21	-0.18	0.32	-0.13	-0.09
2 ~	β-D-cellobiose octaacetate	(A)	0.20	-0.22	0.03	0.00	0.27	-0.09	-0.20
		(B)	0.31	-0.29	0.18	-0.19	0.36	-0.13	-0.13
3 ~	β-D-maltose octaacetate	(A)	0.19	-0.16	0.17	-0.05	0.31	-0.11	-0.12
		(B)	-0.11	0.02	-0.14	-0.07	0.06	-0.12	-0.03
4 ~	β-D-lactose octaacetate	(A)	0.21	-0.22	0.08	-0.01	0.30	-0.01	-0.19
		(B)	0.28	-0.26	0.21	-0.12	0.36	-0.05	-0.16
5 ~	α-D-melibiose octaacetate	(A)	-0.15	-0.10	-0.13	-0.05	0.04	-0.06	-0.02
		(B)	-0.02	-0.18	-0.17	-0.12	-0.05	-0.05	-0.06
6 ~	α-D-glucose pentaacetate	(A)	-0.17	-0.09	-0.14	-0.07	-0.01	-0.10	-0.07
		(B)	-0.17	-0.09	-0.14	-0.07	-0.01	-0.10	-0.07
7 ~	β-D-galactose pentaacetate	(A)	0.18	-0.25	0.25	-0.14	0.36	-0.11	-0.12
		(B)	0.18	-0.25	0.25	-0.14	0.36	-0.11	-0.12
8 ~	Methyl-α-D-glucoside tetraacetate	(A)	-0.04	-0.08	-0.19	-0.11	-0.09	-0.13	-0.06
		(B)	-0.04	-0.08	-0.19	-0.11	-0.09	-0.13	-0.06
9 ~	Methyl-β-D-glucoside tetraacetate	(A)	0.26	-0.23	0.05	-0.14	0.28	-0.10	-0.11
		(B)	0.26	-0.23	0.05	-0.14	0.28	-0.10	-0.11

(単位 ppm)

表3. 糖アセチル誘導体の糖環プロトンの重C₆D₆溶解効果(ΔC₆D₆)

			C1-H	C2-H	C3-H	C4-H	C5-H	C6-H _a	C6-H _b
1 ~	α-D-cellobiose octaacetate	(A)	0.30	0.22	0.39	-0.51	0.17	0.08	0.06
		(B)	-0.11	0.21	0.20	0.12	-0.35	-0.01	-0.11
2 ~	β-D-cellobiose octaacetate	(A)	0.11	0.31	0.13	-0.18	-0.57	-0.06	-0.07
		(B)	-0.19	0.19	0.18	0.11	-0.38	-0.03	-0.15
3 ~	β-D-maltose octaacetate	(A)	0.04	0.18	0.06	-0.14	-1.00	-0.42	0.05
		(B)	0.09	0.18	0.46	0.33	0.19	0.19	0.29
4 ~	β-D-lactose octaacetate	(A)	0.09	0.31	0.11	-0.17	-0.50	-0.05	-0.02
		(B)	-0.15	0.40	0.15	0.11	-0.41	0.04	-0.08
5 ~	α-D-melibiose octaacetate	(A)	0.28	0.20	0.33	0.19	0.08	-0.06	-0.16
		(B)	0.18	0.39	0.42	0.27	0.12	0.07	0.19
6 ~	α-D-glucose pentaacetate	(A)	0.24	0.13	0.31	0.16	-0.04	0.01	-0.04
		(B)	0.24	0.13	0.31	0.16	-0.04	0.01	-0.04
7 ~	β-D-galactose pentaacetate	(A)	0.13	0.40	0.08	-0.02	-0.64	-0.11	0.00
		(B)	0.13	0.40	0.08	-0.02	-0.64	-0.11	0.00
8 ~	Methyl-α-D-glucoside tetraacetate	(A)	-0.08	0.15	0.37	0.23	-0.19	-0.02	-0.04
		(B)	-0.08	0.15	0.37	0.23	-0.19	-0.02	-0.04
9 ~	Methyl-β-D-glucoside tetraacetate	(A)	-0.31	0.32	0.18	0.16	-0.49	-0.04	-0.10
		(B)	-0.31	0.32	0.18	0.16	-0.49	-0.04	-0.10

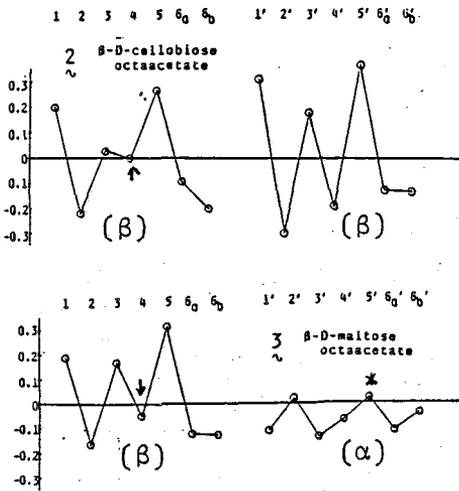


図2. Δ_{DMSO} の糖環プロトンの挙動
(グラフ左はA環, 右はB環)

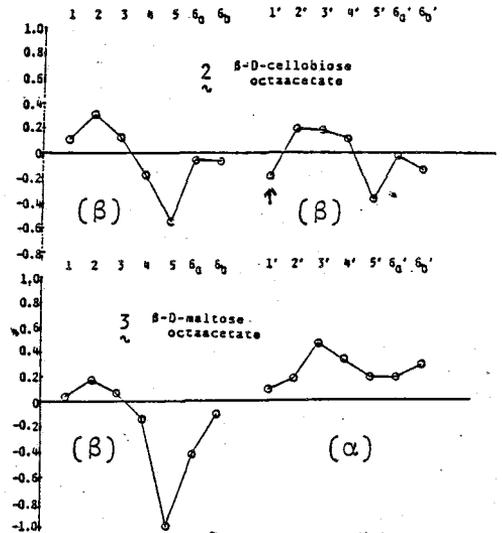


図3. Δ_{Cl_3D} の糖環プロトンの挙動

はすべての糖環プロトンがわがわが負値を示し、下側が「ジグザグ」パターンを示す。この種のパターンは上記2種だけの特長だけでなく、他の単糖、二単糖にもあいて見られる。又、グルコースの4位プロトンがエアトリアルにあるガラクトースやとよとグルコースが β -1,4結合したラクトースなどのアセチル誘導体の場合でも、同様の挙動が得られ、C1位の立体配置が強くこの効果(パターン)の差を生かすことと見られる。

一、重 CD_3 の溶媒において、上記と同一の化合物で見ると(図3)、 β -セルロースでは、A, B糖環プロトンの5, 5'位プロトンが特徴的に負を示す。 β -マルトースの場合、A環側は β -セルロースと同様の5位プロトンの大きな負値を示し、グルコシド結合が α 結合しているグルコシル基(B環)は、C1位が β 立体配置をもち糖環の誘導とは異なり、糖環プロトンすべてにわがわが正値の挙動を示す。

重DMSO, 重ベンゼンの溶媒効果パターンから二単糖の α, β 立体配置が容易に決定できる。また、詳細に結果を検討することにより、単糖の種類やその配列も決定可能と思われる。

上記溶媒効果の取扱は重ベンゼンにおいてはAS1S3プロットとして有効であり、アセチル基のカルボニル炭素との結合によるベンゼン分子の磁気異方性(寄与)もその一つであろう。一、重DMSO溶媒においては、単糖のアセチル誘導体とアセオンとの場合による研究結果が推定すると、糖アセチル誘導体と高誘電率の極性あるDMSO分子との場合による誘電効果によると思われる。

4. 文献

- 1) J. Ronayne and D.H. Williams, J. Chem. Soc.(B), 1967, 540
M.H. Freeman and W.G. Overend, J. Chem. Soc.(B), 1969, 547
- 2) J.S. Martin, J. Hayami, R.U. Lemieux, Can. J. Chem., 46, 3263 (1968)

1. はじめに

NMRによる複雑な天然物の構造解析は、近年、高磁場 (^1H 400~500 MHz) の装置の出現と測定法の多様化により大きく進歩してきた。しかしながら、糖を多く含む分子量1000以上の配糖体では、そのスペクトルはピークの重なりとブロード化でたいへん複雑となり、現段階の2D-NMRではデジタル分解能を落とさざるを得ないのでその解析は極めて困難である。また、これらの中程度の分子量を持つ化合物は一般にNOEがほとんどなくなるため、立体的な情報も得られないと考えられてきた。しかし、測定温度を下げることにより、室温では観測できなかったNOEも強く出現することが明らかになり¹⁾、さらに生体高分子タンパク質などで見られる現象であるスピン拡散²⁾までおこることがわかった。また、温度を適当に制御することにより、高分子のある部分でのみスピン拡散をおこさせることも可能である。これらの現象を積極的に使って、千~数千の分子量を持つ配糖体である花の色素、西洋アサガオのHBAの構造決定とツユクサのコンメリニンの構造解析を行ったので報告する。なお、使用した装置はJEOL JNM GX-500 (500 MHz) である。

2. 基礎的実験

1) 温度とNOE

西洋アサガオの色素HBA (Heavenly Blue Anthocyanin: m/z 1597) をメタノール中でアルカリ加水分解すると、化合物Aが得られる。これを CD_3OD に溶かしたものをを用いて、 \blacksquare -glucoseのアノマープロトンを preirradiation した場合のNOE差スペクトルを図1に示す。

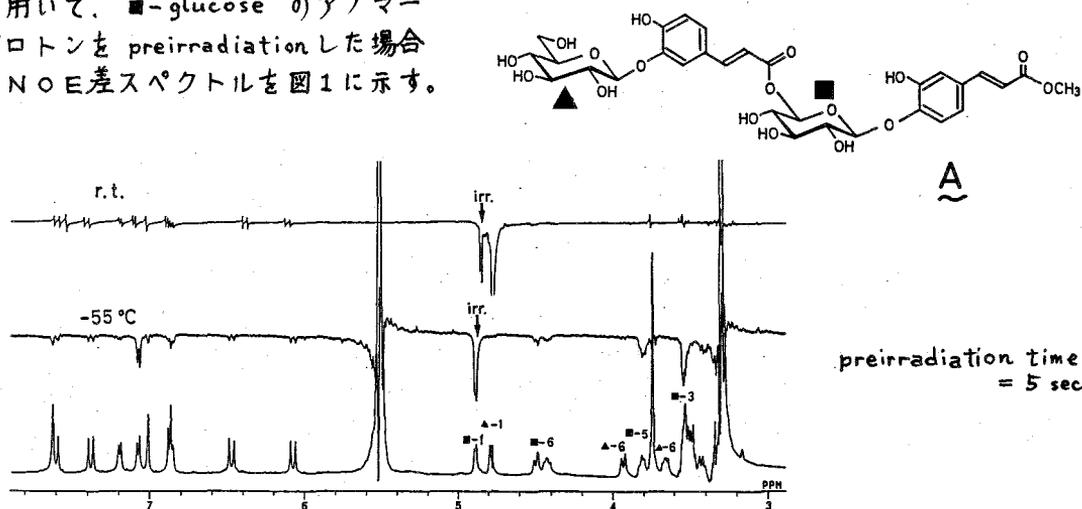


図1. 化合物AのNOE差スペクトル

こんどうただお・たむらひろとし・かわいたかとし・ごとうとしお

図1より明らかなように、室温では全くNOEがないにもかかわらず、温度を下げることによってアノマープロトンとカフェー酸のプロトン及び β -glucose の3位, 5位のプロトンとの間に負のNOEがはっきりと現れてくる。また、部分的にスピン拡散も起こっており、 β -glucose の2位, 4位、さらに6位のプロトンにまでも影響が出てくる。グルコースのアノマープロトンと6位のプロトンとを関係づけるのは、従来のデカップリングによる方法では困難であったが、この方法を用いることにより極めて容易にかつより直接的に同一糖内のプロトンとを関係づけることができた。

2) 温度とNOEの大きさ

温度を下げすぎると、スペクトルのブロード化によるピークの重なりとスピン拡散が起こることによりかえってNOEの情報が少なくなってしまうため、測定には至適温度を選ぶ必要がある。ここではサンプルとしてHBAを3% TFA- d /CD₃OD に溶かしたものをを用い、母核の3位に結合したグルコースのアノマープロトンを preirradiation した場合の母核4位のプロトンに現れるNOEの大きさを指標にして、温度との関係を調べた。

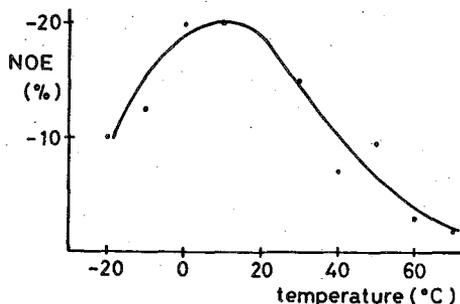
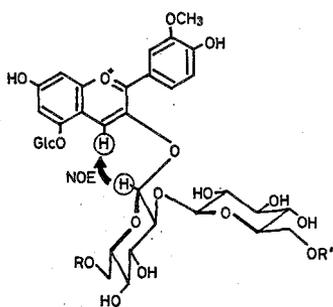


図2. HBAの温度とNOEの関係

結果が図2である。負のNOEの極大は0~10°Cの間にあり、また-10°C以下ではそのスペクトルは極めてブロードで構造解析は困難であり、部分的にスピン拡散が起こっている。

3) 分子量とNOEの関係

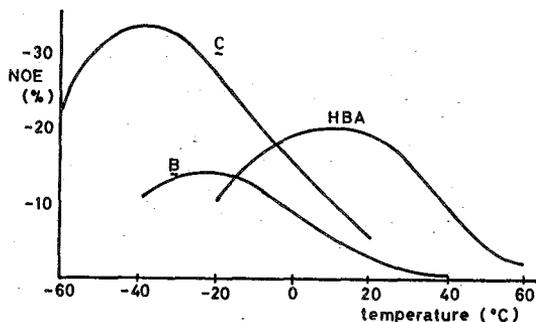


図3. 分子量の違いによる温度とNOEの関係

HBAをアルカリ加水分解して得られる低分子量の色素 B (m/z 949), 及び C (m/z 625) についても同様の実験を試みた(図3)。この結果から、分子量の小さい化合物ほど温度を下げた方がNOEを効率よく観測できることがわかる。

3. HBAの構造決定

HBAはアルカリ部分加水分解すると、化合物 A と Bisdeacyl HBA (見) を与える。A は図1に示した構造である³⁾。Bisdeacyl HBA⁴⁾ をさらにアルカリ加水分解すると、Trisdeacyl HBA とメタグルコシルカフェー酸を与えた。3%-TFA-d/CD₃OD 中、温度 5°C でHBAの測定を行った。そのアノマープロトンを preirradiation して得られたNOE差スペクトルの糖の部分为例に示すと、図4である。HBAは Bisdeacyl-HBA に A がエステル結合したものであるが、その結合箇所の可能性は17ヶ所ある。

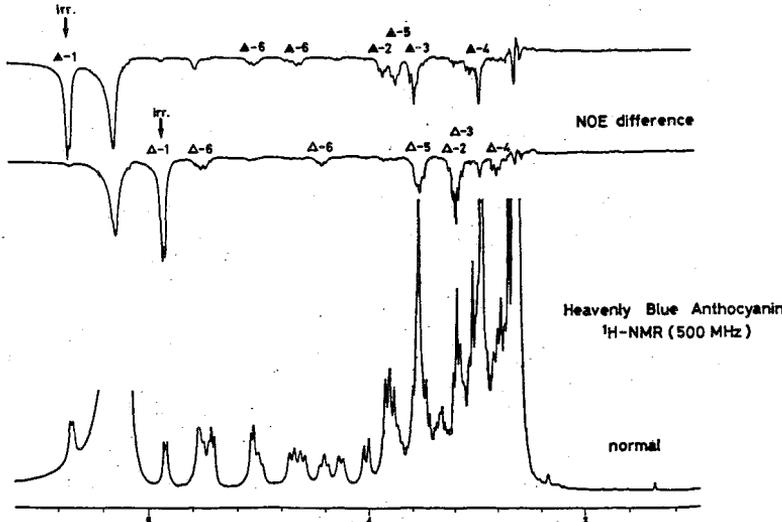


図4. HBAのNOE差スペクトル

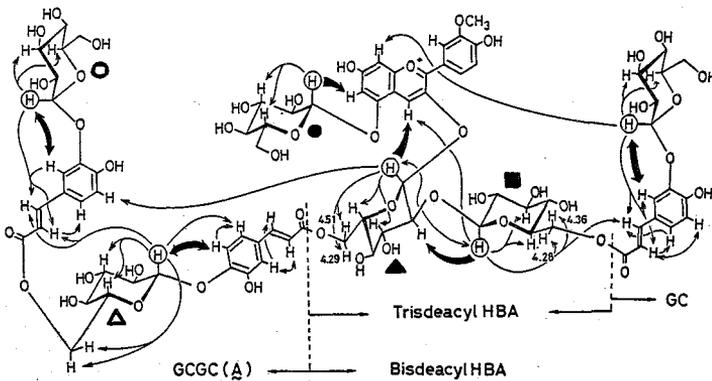


図5. HBAの全構造とNOEネットワーク

り、このことから A はその水酸基にエステル結合していることになる。このようにしてHBAの構造を図5のように決定した。NOEのネットワークのうちで Long-range NOEの結果から3次構造を組立てると、化学的に不安定なアントシアニジンの母核を側鎖上のカフェー酸が上下からかおいかぶさることによって安定化していることが推定される。

HBAに A がエステル結合したものであるが、その結合箇所の可能性は17ヶ所ある。

そこで¹H-NMRのPRFT法とデカップリングを適用してみると、HBAのメチレンプロトンが3組低磁場シフトしていることから、5つのグルコースのうち3つのグルコースの6位の水酸基がアシル化されていることがわかった。

今回新たに、Bisdeacyl-HBAの構造を再検討した結果、すでに報告したとおり β -glucose にメタグルコシルカフェー酸がエステル結合していることを再確認した。

HBAのpreirradiationによる各プロトン間の負のenhancementの結果を示すと、図5のようなNOEネットワークが形成されている。NOEの相関から α -glucoseの6位の水酸基が低磁場シフトしていることがわ

4. ツユクサの色素コンメリニンへの応用

ツユクサの色素コンメリニンは分子量が約 9500 である。その構成成分は、マグネシウム 2, マロニルアオブアニン (MA)⁵⁾ とフラボコンメリン (Fc) が 6 ずつである (図 6)。

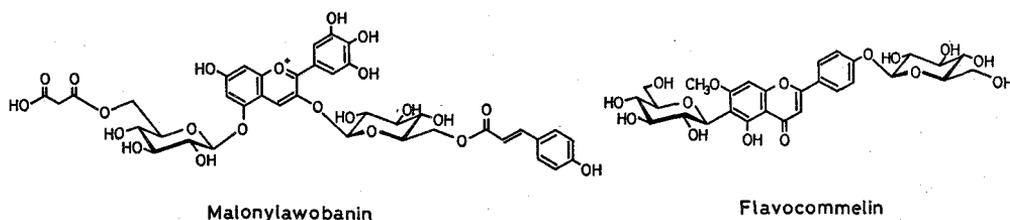


図 6. コンメリニンの構成成分

コンメリニンの $^1\text{H-NMR}$ より、6 組の MA·Fc は対称性のよい complex であることがわかる。NMR 的にはあたかも 1 組の MA·Fc しか存在しないかのようなのである。コンメリニン分子中における MA と Fc の相対的位置関係を調べるため NOE 実験を行った。しかし、分子量がタンパク質レベルであるので、図 7 に示したように室温ではスピンの拡散をおこしてしまっただ。そこで、分子量が小さいものほど低温にしないと NOE が現れてこないという先の実験から、逆に分子量の大きなものでは温度を上げればよいのではと考え、 40°C にして NOE を測定してみると、はっきりと NOE とわかるピークが現れてきた。さらに、コンメリニンの類似体の NOE 実験の結果も合せて、正確なスペクトルの帰属を行い、現在高次構造について検討している。

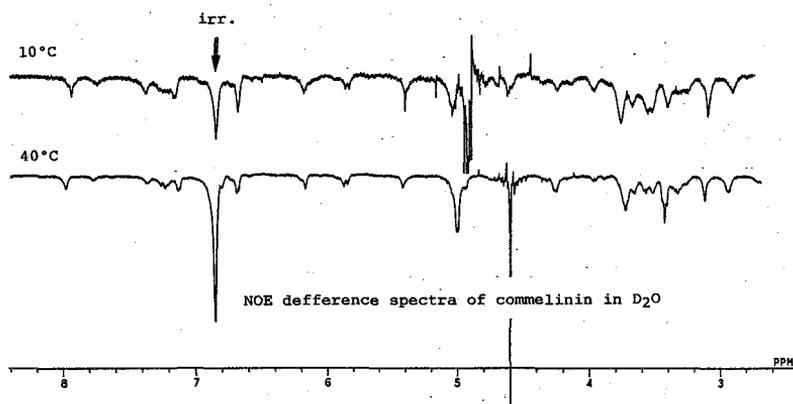


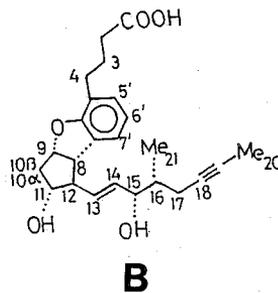
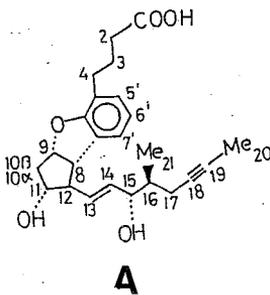
図 7.
コンメリニンの
NOE 差スペクトル

- 1) Eric M. Krauss and Sunney I. Chan, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6953-6961 (1982)
- 2) A. Kalk and H.J.C. Berendsen, *J. Mag. Res.*, **24**, 343-366 (1976)
- 3) T. Goto, T. Kondo, H. Imagawa, and I. Miura, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 3213-3216 (1981)
- 4) T. Goto, H. Imagawa, T. Kondo, and I. Miura, *Heterocycles*, **17**, 355 (1982)
- 5) T. Goto, T. Kondo, H. Tamura, and S. Takase, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 4863-4866 (1983)

(東レリサーチセンター, 東レ基礎研*)。三輪慶子, 梶垣冬彦
長瀬博*, 松本知久*, 岩永由紀*, 大野清隆*

<はじめに>

プロスタグランジンI₂ (PGI₂) は、生体内で必要に応じて、アラキドン酸から合成され、血小板凝集抑制作用をもつ生理活性物質である。PGI₂ は、非常に不安定であるため、東レ(株)では、より安定なPGI₂ 誘導体の開発をおこなってきた。この開発過程で、16位メチル(下図)の光学異性体であるm-フェニレン型PGI₂ 誘導体AおよびBの生理活性が、相当異なることを見出した。



本研究では、A, B二つの誘導体のクロロホルム中のコンホマーシオンを明らかにし、活性との相関を解明することをこころみた。なお、A, とBの、ヒト血小板凝集抑制作用は表1に示すとおりであり、AはBの10倍の活性を有する。

<実験>

NMR測定には、100mMの重クロロホルム試料溶液を用いた。溶存酸素の影響を除去するため、Heガスを20分程度バブルした後封管して用いた。日本電子製 GX-400を用い、室温で測定をおこなった。¹Hシフト相関二次元NMRの測定は、スペクトル幅2500Hz, F₂ × F₁ = 1024 × 256データポイントを用いた。¹HJ分解二次元スペクトルの測定は、F₁のスペクトル幅50Hz, F₂のスペクトル幅2000Hzを用い、64回の積算で、128ブロックのヒリこみをおこなった。NOE差スペクトルの測定は、照射8回、非照射8回を、各々8回づつくり返した。

表1. PGI₂誘導体の薬理活性

試料	ヒト血小板凝集抑制作用	
	*IC ₅₀ 値	PGI ₂ 比
A	0.7ng/ml	3×10 ⁻¹
B	8ng/ml	3×10 ⁻²

* IC₅₀値: 50%血小板凝集抑制濃度

みわゆりこ, いながきふゆひこ, ながせひろし, まつもとかずひさ, いわながゆき,
おののきよたか

〈結果〉

PGI₂ 誘導体 A, B の 400 MHz ¹H NMR スペクトルを図 1 に示す。これらのピークの帰属をおこなうため ¹H シフト相関二次元 NMR の測定をおこなった。図 2A は試料 A の ¹H シフト相関二次元 NMR スペクトルであり、交差ピークを順次追うことにより図 1 に示すシグナルの帰属が完了した。試料 B についても同様の測定をおこない、帰属をつけた。

次に、スピン結合定数について検討をおこなった。

10β, 4 位などノーマルスペクトルでは、シグナルの重なりがありスピン結合定数を見極めることが困難なため、¹H J 分解二次元 NMR スペクトルの測定をおこなった。

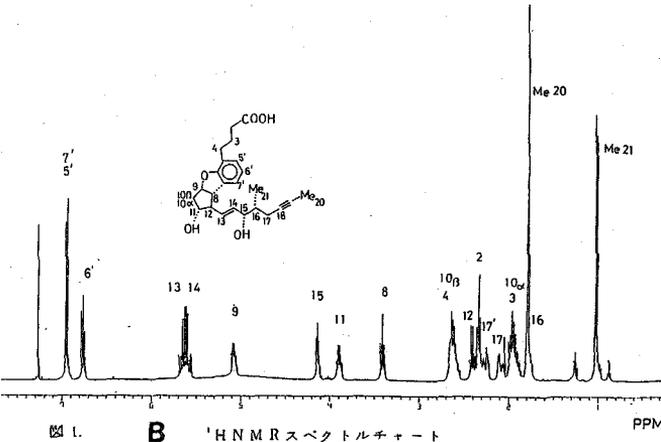
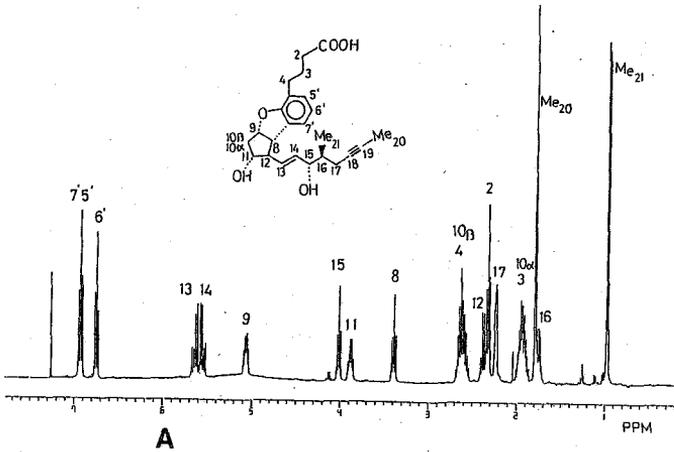


図 1. B ¹H NMR スペクトルチャート

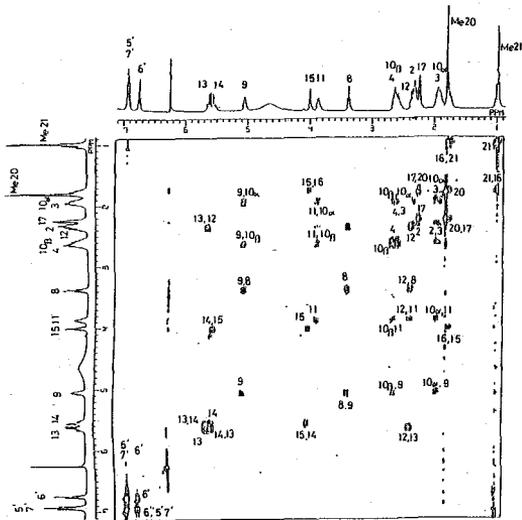
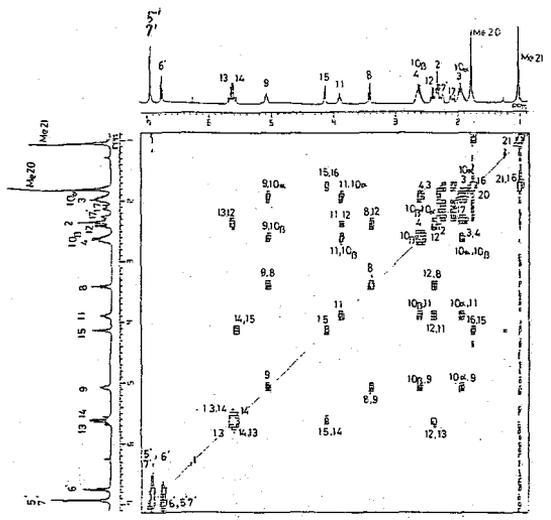


図 2. ¹H シフト相関二次元 NMR



B

図3は、試料Bの10 β , 12, 17位のプロトンのクロスセクションであり、1-マルスペクトルおよび¹HJ分解二次元NMRスペクトルの解析をおこなひ、スピン結合定数を求めた。表2に結果をまとめる。

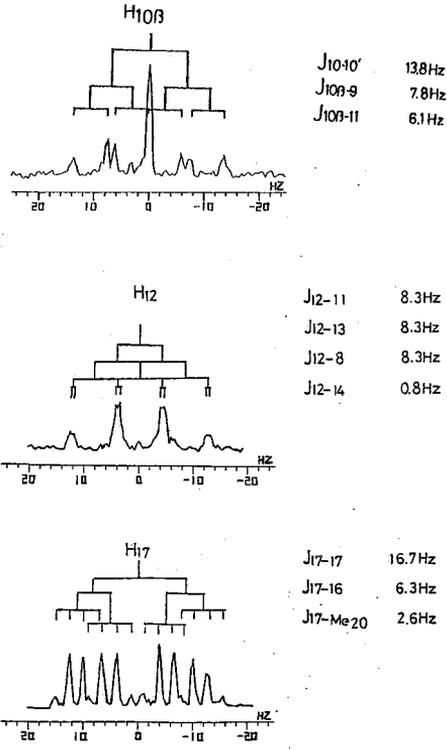


図3. cross section

試料A, Bについて差NOEの測定をおこなった。一例として、8位のプロトンを照射した時のNOE差スペクトルを図4に示す。A, B誘導体ともに、8位と9位の距離は、固定していると考えられるから、9位との間のNOEをreferenceとして、他のプロトン間のNOEの面積強度を比較した。照射時間として0.7 sec, 待時間 3 sec で測定をおこなったものであり、NOEの面積強度の比を表3にまとめた。以下スピン結合定数とNOEを満足する構造を求めることになる。

表2. カップリング定数と二面体角

A			B		
	J Hz \pm 0.5 Hz	ϕ		J Hz \pm 0.5 Hz	ϕ
J _{8,9}	9.3	0°	J _{8,9}	9.3	0°
J _{8,12}	8.5	156°	J _{8,12}	8.3	155°
J _{9,10β}	7.0	29°	J _{9,10β}	8.0	20°
J _{9,10α}	5.3 (6.5)	135°	J _{9,10α}	6.0	140°
J _{10α,11}			J _{10α,11}	9.5	-166°
J _{10β,11}	6.5	-32°	J _{10β,11}	6.0	-36°
J _{11,12}	8.5	156°	J _{11,12}	8.3	155°
J _{13,14}	1.5		J _{13,14}	1.53	
J _{13,12}	8.3		J _{13,12}	8.1	

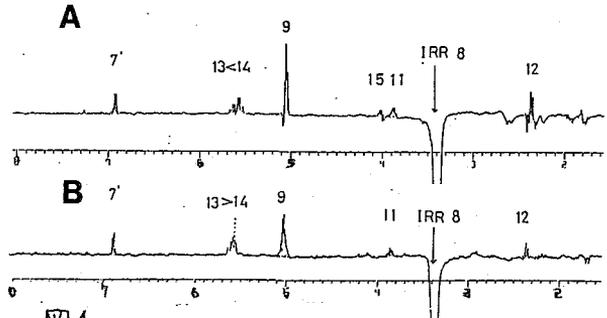


図4. NOE差スペクトル (IRR 8)

表3. 8プロトン照射のときのNOEの値

プロトン	A			B		
	S	r	RA°	S	r	RA°
9	1.00	1.00	2.35	1	1.00	2.35
7	0.345	1.19	2.80	0.217	1.29	3.08
13	0.186	1.32	3.10	0.391	1.17	2.75
14	0.292	1.28	2.89	0.304	1.22	2.87
11	0.230	1.28	3.01	0.250	1.26	2.96
15	0.0974	1.47	3.45	0	0	-

S: ピーク面積比 (9プロトンのピーク面積を1.0とする)

r: 8プロトンからの距離 (8-9プロトンの距離を1.0とする)

R: 8-9プロトン間の距離を2.35Åとしたときの値 (H. G. S. モデルより)

<考察>

五員環のConformation

まずはじめに、五員環のConformationについて、NOEおよびスピン結合定数の解析をおこなった。図4に示すように、8位のプロトンと照射した場合には、A、B共に9位の他に11位のプロトンにもNOEが観測されている。従って11位のプロトンが8位のプロトンに近接していることを示唆している。すなわち11 envelope型の構造をとっている。一方スピン結合定数については(1)式に従い二面体角を求めた。求めた二面体角を表2に示す。スピン結合定数は、A、B共によく類似しており、五員環部分のconformationは類似していると考えられる。(1)式に従って求めた二面体角は、NOEから求めた11 envelope構造²⁾説明できた。以上より、五員環部分は、A、B共に11 envelope型をとることが明らかとなった。

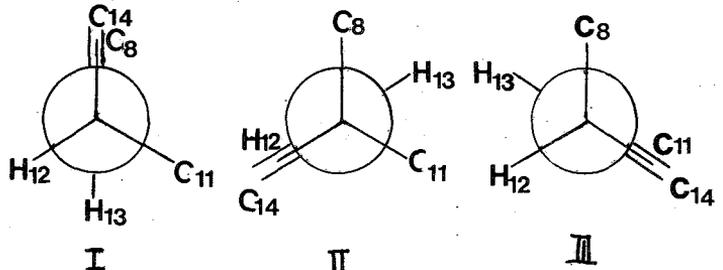
$$J = 9 \cos^2 \phi - 0.5 \cos \phi + 0.5 \quad (1)$$

J: スピン結合定数

ϕ : 二面体角

12-13位まわりのConformation

二重結合ごたりの単結合の内部回転異性については、Cis型、skew型が知られている。したがって、Cis, skew型の二つを考慮に入れ、右図に示す三つの回転異性体を考慮する。ビニール、アリリックプロトン間のカップリング定数と二面体角については、(2)式を用いた。



$$J^3 \approx \begin{cases} 6.6 \cos^2 \theta + 2.6 \sin^2 \theta & (0 \leq \theta \leq 90^\circ) \\ 11.6 \cos^2 \theta + 2.6 \sin^2 \theta & (90^\circ \leq \theta \leq 180^\circ) \end{cases} \quad (2)$$

観測した12, 13位プロトン間のスピン結合定数よりIIと(I+III)の割合を求めるとA, B共に、IIが~60%, (I+III)が~40%となる。一方、NOEの結果より求めた平均的構造は、8位と13位プロトン間の距離で比較して、Aでは8位と14位のプロトンの方が短いことを示しており、Bでは8位と14位のプロトンの方が長いことを示している。このことは、A, Bの12, 13まわりの異性体の存在確率(I+III)が異なることを示している。これは16位メチルの影響が出ていることが考えられる。Bに関してはIとIIIの存在確率はどちらも~20%と見積られるが、AではIの存在確率が増えていることがいえる。現在分子力学による12, 13位まわりの回転異性の計算、さらにリン脂質二重膜に存在する場合のモデルとして、重水素化リン脂質ミセルを用い、ミセル中のA, Bの構造について解析をおこなっている。

引用文献

1) Altona, C., Buys, H.R. and Haringa, E. Rec. Trav. Chim., 85 983 (1966)

ibid. 85, 973 (1966).

2) Edgar, W. Garbisch, Jr. J. Am. Chem. Soc., 86, 5561 (1964).

(神戸女子薬大) ○ 杉浦真喜子 蔡 東玲 高尾檜雄
(阪大薬) 藤原英明

〔はじめに〕

^1H スピン-格子緩和時間(T_1)は、H-H間の距離(r_{ij})と分子の回転相関時間(τ_c)の関数となる為分子の立体化学及び分子の運動性についての情報を与え、有機化合物の立体配置、立体配座を知るのに有用な手段である。これまでにも T_1 とNOEを組み合わせたでの立体化学に関する研究が多くなされ、演者らも主にNONSELECTIVE及びSELECTIVE T_1 とNOEを定量的に取り扱って溶液中での立体配座を検討する試みを行ってきた。しかしこれまでの例からも解るように、 T_1 のみで立体化学を議論することはあまり容易ではなく、多くの場合NOEと組み合わせられてきた。今回演者らは、NONSELECTIVE及びSELECTIVE T_1 に加え、BISELECTIVE T_1 を用いて、化合物の立体化学(主に立体配座)を検討することを試みた。BISELECTIVE T_1 を用いる試みはHallら²⁾、Gribbonsら³⁾によってなされ、2つの水素間のd-d緩和の寄与を見積もるのに有用なことが知られているが、その利用の例はそう多くない。これは1つには測定法の問題と思われる。即ちBISELECTIVE T_1 を測定する為には同時に2つのシグナルを選択的に励起しなければならず、通常の1つのdecoupler発振器しか持たない機械では不可能である。そこで演者らは2つの周波数のパルスが続けてかけることによって、殆ど同時に励起したのと同じ効果が得られるのではないかと考え、SELECTIVE INVERSIONのパルス系列を一部修正して使用した。今回の実験では、この方法で得られる T_1 の値がBISELECTIVE T_1 の値として使用出来るかを吟味することも1つの目的とした。

プロトン $i(\text{H}_i)$ がいくつかの周囲のプロトン $1, 2, \dots, j(\text{H}_1, \text{H}_2, \dots, \text{H}_j)$ によって分子内d-d緩和する時、 H_i のSELECTIVE(T_1^s)、BISELECTIVE(T_1^{bs})及びNONSELECTIVE T_1 (T_1^{ns})は、式(1)-(3)のように表される。

$$1/T_1^s = R^i(i) = \sum_j N_j \rho_{ij} + \rho^* \quad (1)$$

$$1/T_1^{bs}(j) = R^i(ij) = N_j \sigma_{ij} + R^i(i) = N_j \sigma_{ij} + \sum_j N_j \rho_{ij} + \rho^* \quad (2)$$

$$1/T_1^{ns} = R^i(\text{all}) = \sum_j R^i(ij) = \sum_j N_j \sigma_{ij} + R^i(i) = \sum_j N_j \sigma_{ij} + \sum_j N_j \rho_{ij} + \rho^* \quad (3)$$

ここで

$$\sigma_{ij} = 1/10 \gamma^4 \hbar^2 r_{ij}^{-6} [6\tau_{ij} / \{1 + 4\omega^2(\tau_{ij})^2\} - \tau_{ij}]$$

$$\rho_{ij} = 1/10 \gamma^4 \hbar^2 r_{ij}^{-6} [\tau_{ij} + 3\tau_{ij} / \{1 + \omega^2(\tau_{ij})^2\} + 6\tau_{ij} / \{1 + 4\omega^2(\tau_{ij})^2\}]$$

(1),(2),(3)式より

$$R^i(ij) - R^i(i) = N_j \sigma_{ij}$$

$$R^i(\text{all}) - R^i(i) = \sum_j N_j \sigma_{ij}$$

$$\text{従って} \quad f_{ij} = \{R^i(ij) - R^i(i)\} / \{R^i(\text{all}) - R^i(i)\}$$

$$= N_j \sigma_{ij} / \sum_j N_j \sigma_{ij} = N_j \rho_{ij} / \sum_j N_j \rho_{ij} \quad (4)$$

$$f_{i1} : f_{i2} : \dots : f_{ij} = r_{i1}^{-6} : r_{i2}^{-6} : \dots : r_{ij}^{-6} \quad (5)$$

すぎうらまきこ・さいとうれい・たかおならお・ふじわらひであき

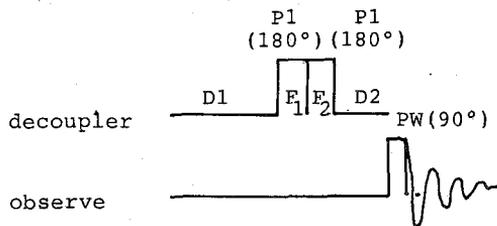
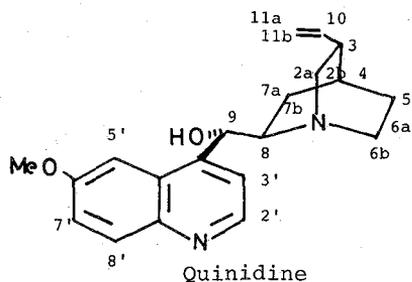


Fig. 1. Pulse sequence for selective T_1 .

(4)式より解るように $T_1^S, T_1^{BS}, T_1^{NS}$ の実測値より得られる f_{ij} は、 H_i の分子内 d-d 緩和における H_j の寄与の割合を示すことになる。従って分子の等方性運動が仮定されるならば ($\tau_{c11} = \tau_{c12} = \dots = \tau_{c1j}$), (5)式が成り立ち、原理的には、全てのプロトンの $T_1^S, T_1^{BS}, T_1^{NS}$ から全ての f_{ij} が求められ、分子の立体化学は一義的に決まることになる。

Table 1. Nonselective (T_1^{NS}), Selective (T_1^S), and Biselective (T_1^{BS}) Proton Relaxation Times for Quinidine in $CDCl_3$.

H_i	$T_1^{NS(a)}$ (sec.)	T_1^S (sec.)	T_1^{BS} (Hj) (sec.)			
2a	0.53 (0.52)	0.71	0.55(2b)	0.69(9)	0.67(10)	
2b	0.46 (0.53)	0.61	0.50(2a)	0.62(3)		
3	1.09 (0.89)	1.35	1.26(2b)	1.23(4)	1.26(5a,b)	1.29(6a,b)
4	1.06 (1.06)	1.36	1.27(3)	1.28(5a,b)	1.27(7a)	1.27(7b)
5a&5b	0.44 (0.45)					
6a	0.46 (0.47)					
6b	0.43 (0.47)					
7a	0.48 (0.47)	0.72	0.53(7b)	0.66(4)	0.70(9)	0.71(10) 0.71(3')
7b	0.46 (0.47)	0.69	0.65(4)	0.70(5a,b)	0.53(7a)	0.65(8)
8	0.75 (0.81)	0.98	0.92(5a,b)	0.85(6a,b)	0.99(7a)	0.91(7b)
9	0.66 (0.98)	1.00	0.99(2a)	0.99(7a)	0.95(8)	0.88(5')
10	2.03	2.69	2.48(2a)	2.64(3)	2.50(7a)	2.40(11a,b)
11a&11b	1.84					
2'	3.32 (3.64)	4.75	3.68(3')			
3'	1.69 (1.65)	2.40	2.28(7a)	2.34(8)	1.97(2')	
5'	0.83 (0.84)	1.21	1.13(8)	1.01(9)		
7'	3.84 (3.64)	5.40	3.92(8')			
8'	3.84 (3.68)	5.61	4.12(7')			
OMe	1.08					

a Values in parentheses represent the calculated values for the optimum conformation.

今回は、実験値の精度の問題もあり、特定のいくつかのカギになる部分の f_{ij} を半定量的に取り扱って、化合物の立体配座を決めることを試みた。この実験の対象とした化合物は、抗不整脈薬として服用されているキニジンである。

この化合物はキヌクリジン部分とキノリン部分からなり、その溶液中の立体配座は、薬理作用との関連か^も興味を持たれるところである。

[実験]

キニジンは市販品をそのまま用い、0.03Mの濃度で“100%D” $CDCl_3$ に溶解し、脱ガスして測定サンプルとした。測定は Varian XL-200(200.06MHz) を用い、NONSELECTIVE T_1 は IR 法、SELECTIVE T_1 は従来通り SELECTIVE INVERSION のパルス系列を用いた IR 法によった。BI-SELECTIVE T_1 は Fig. 1 のような SELECTIVE INVERSION パルス系列を修正したパルス系列を用い、 F_1, F_2 を入れ替えて 2 度づつ測定を行った。

【結果と考察】

Table 1に各プロトンの T_1^{NS} , T_1^S 及びいくつかの T_1^{BS} の実測値を示した。

T_1^{BS} の値を見ると、距離的に近くのプロトンによるものは、その値が小さく T_1^{NS} の値に近くなっており、一方離れているものによる T_1^{BS} は T_1^S の値に近くなっ

ている。このことは得られた T_1^{BS} の値が妥当なものであり、少なくとも半定量的には利用できることを示している。これらの値から式(4)によって得られる f_{ij} の内、この化合物の立体化学で問題になりそうなものをいくつかと、各 H_i に対するそれら f_{ij} の比 Ratio^{calc.} (一番大きな値を1とした)をTable 2に示した。

キニジンの溶液中での優位conformationを考える時、 C_3-C_{10} , C_8-C_9 及び C_9-C_4 結合の回転が問題になる。まず C_3-C_{10} の回転については、 $J_{3,10}$ の値から、Fig. 2に示されるような4つのconformationの可能性が考えられるが、 $T_1^3(10) > T_1^3(11a, b)$ により、 H_3 は $H_{11a, b}$ により近いことが示唆され、conformation A又はBが可能な優位conformationと考えられる。 C_8-C_9 の回転については、やはり $J_{8,9}$ の値からFig 3に示す4つのconformationの可能性が考えられるが、IIとIVについては、実際に分子模型を組んでみると空間的にかなり混み合った型になり、優位なconformationとは考えにくい。従ってI, IIIのconformationを可能な優位conformationとした。又、 C_9-C_4 の回転につい

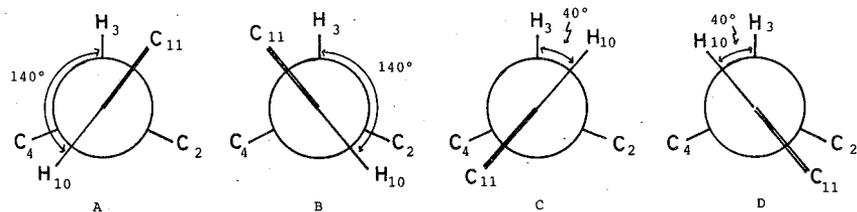


Fig. 2 The possible conformations about C_3-C_{10} .

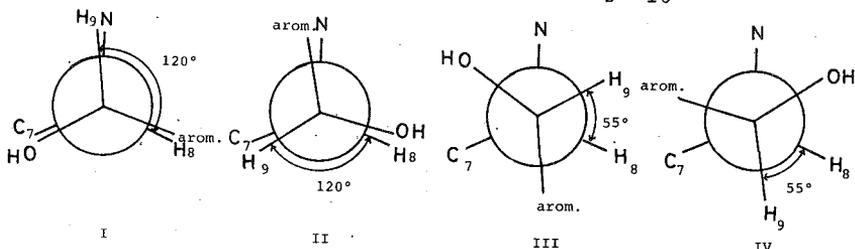


Fig. 3 The possible conformations about C_8-C_9 .

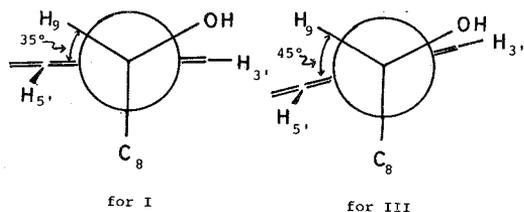


Fig. 4 The possible conformations about C_9-C_4 .

Table 2. Several f_{ij} values and their Ratios and the calculated Ratio values for conformation IA, IB, IIIA, and IIIB.

H_i	H_j	f_{ij}	Ratio ^{calc.}	Ratio ^{calc.}			
				IA	IB	IIIA	IIIB
2a	2b	0.86	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	10	0.18	0.21	0.05	<u>0.23</u>	0.05	<u>0.23</u>
	9	0.09	0.10	0.40	0.33	<u>0.04</u>	<u>0.03</u>
7a	7b	0.72	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	3'	0.03	0.04	0.03	0.03	0.30	0.18
	10	0.03	0.04	0.14	<u>0.05</u>	0.13	<u>0.06</u>
8	7b	0.25	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	9	0.18	0.72	0.23	0.23	<u>0.62</u>	<u>0.62</u>
	5'	0.18	0.72	0.19	0.19	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>
	3'	0.10	0.40	0.11	0.11	0.03	0.03
9	5'	0.26	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	8	0.10	0.38	0.10	0.10	<u>0.35</u>	<u>0.35</u>
	2a	0.02	0.08	0.57	0.57	<u>0.07</u>	<u>0.07</u>
10	11a,b	0.37	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	2a	0.26	0.70	0.25	<u>1.00</u>	0.25	<u>1.00</u>
	7a	0.23	0.62	0.75	<u>0.25</u>	0.75	<u>0.25</u>
3'	2'	0.52	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	7a	0.13	0.25	0.17	0.17	0.07	0.07
	8	0.06	0.11	0.17	0.17	1.00	1.00
5'	9	0.43	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	8	0.13	0.30	0.10	0.10	0.59	0.59

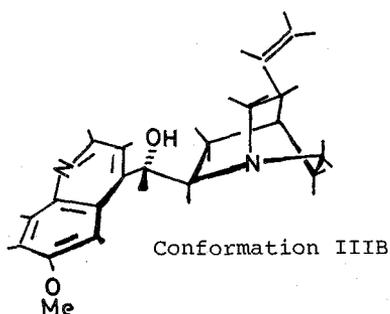


Table 3. The results of the calculations for several possible conformations of Quinidine using nonselective T_1 values.

Conformation	Quinuclidine Part		Quinoline Part	
	R-factor (%)	$\tau_c/10^{-11}$	R-factor (%)	$\tau_c/10^{-11}$
IA	18.6	6.1	15.8	7.6
IB	18.1	6.2	15.8	7.6
IIIA	9.6	5.6	7.9	7.2
IIIB	7.5	5.6	7.9	7.2

ては, conformation I, III に対してそれぞれ Fig. 4 に示したような型で固定して考えた. 以上のように C_3-C_{10} , C_8-C_9 に関してそれぞれ 2 つずつの可能性の組合せから, IA, IB, IIIA, IIIB の 4 つの可能性のある conformation を考え, それぞれについて, r_{ij} から計算出来る f_{ij} の比 (Ratio) を求め, Table 2 に示した. それぞれ決め手となる値を下線で示したが, これらの値と実測値の比較から conformation III B (C_3-C_{10} に関しては B, C_8-C_9 に関しては III) が, 優位 conformation であることが示唆される. ただしキヌクリジン部分の水素とキノリン部分の水素の間 (例えば H_2 と H_{7a} , H_3 と H_8 など) では, 必ずしも conformation III B における計算値と観測値のよい一致が見られない. これは C_9-C_{10} の回転について検討の余地があるのか, 或はキヌクリジン部分とキノリン部分の回転関連時間が等しくない為かどのいずれかであろうと思われる.

一方これら 4 つの conformation について, 実測値と計算値が一番良く fit するような計算値と相関時間 (τ_c) を求める従来の方法を T_1 NS を使って行い, その結果 (その時の agreement factor - R-factor - と τ_c) を Table 3 に示した. この結果からも III B の R-factor がキヌクリジン部分, キノリン部分共に一番小さく, これが最適な優位 conformation であることが解り, f_{ij} の値から得られる結論と矛盾しない. 又この時の (conformation III B の) T_1 NS の計算値を, Table 1 の実測値の下に () で示している.

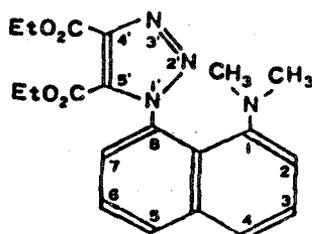
以上のように, T_1 NS を用いて f_{ij} を求めそれから conformation を検討する方法は, 立体配座解析の新しい方法として十分に使用できることが解った. この方法のメリットは, 式 (1) ~ (3) から解るように, 分子内 d-d 緩和以外の緩和の寄与 (ρ) があっても問題にならない点, $\omega^2 \tau_c \ll 1$ の条件下でなくても使用出来ることなどである. しかし f_{ij} は NOE の値に対応するものであるが, T_1 NS, T_1 S, T_1 BS の 3 つの測定をしなければならない為 NOE の測定に比べて必ずしも測定が簡単であるとは言いがたい. 又精度の点でも, それぞれの T_1 の誤差がかかってくるので f_{ij} の値は誤差が大きくなりがちであるなどの難点があり, 今後この点を含めてその使用方法を検討していく必要があると思われる.

[文献]

- 1) M. Sugiura, K. Iwasa, N. Takao, and H. Fujiwara, J. Chem. Soc. Perkin Trans 2, in press; 杉浦, 岩佐, 高尾 第 23 回 NMR 討論会講演要旨集 P124 (1984); 杉浦, 岩佐, 高尾 第 27 回天然有機化合物討論会講演要旨集 (1985).
- 2) L. D. Hall and H. D. W. Hill, J. Am. Chem. Soc., 98 1269 (1976); L. D. Hall, K. F. Wong, and H. D. W. Hill, J. C. S. Chem. Comm., 1979, 951.
- 3) M.-C. Kuo, T. Drakenberg, and W. A. Gibbons, J. Am. Chem. Soc. 102 520 (1980).

(化技研) 〇名川吉信, 本田皓一, 石塚靖子, 中西洋志, 山本修

1. 我々はこれまで、ナフタレン環の1位および8位にトリアゾール基またはアミノ基が置換した化合物群を新規に合成し、主としてNMR法によって、これらの立体構造について研究してきた²⁾。その結果、これらの化合物が、立体的に非常に混み合った構造を有するために、興味ある回転異性——すなわち、トリアゾール環とナフタレン環の間の束縛回転、エステル基を持つものについてはトリアゾール環の5位の炭素とカルボニル炭素との間の $C_{sp^2}-C_{sp^2}$ 結合の回転異性体 (*S-trans*, *S-cis* 体)、ナフタレン環に対する2個のトリアゾール環の *flipping* 異性体 (*d*, *e* 体) など——を示すことが明らかにされた。ここでは、1-ジメチルアミノ-8-(4', 5'-ジエトキシカルボニル-1'-H-1', 2, 3'-トリアゾリル)ナフタレン(I)のNMRスペクトルを、種々の温度および溶媒で測定した結果、興味ある知見が得られたので報告する。



(I)

2. 1, 8-ジアジドナフタレンと、アセチレンジカルボン酸ジエチルとの1:1付加体を $H_2/Pd-C$ により還元して、1-アミノ-8-(4', 5'-ジエトキシカルボニル-1'-H-1', 2, 3'-トリアゾリル)ナフタレンを合成し、ついで、アセトニトリル中、ホルムアルデヒドと $NaBH_3CN$ を用いた還元的メチル化反応によりIを合成した。

NMRの測定は JEOL GX-400 ($^1H:399.65$ MHz) で行い、試料濃度は 0.024 Mとした。

3. Iの $CDCl_3$ 中 $23^\circ C$ における 1HNMR スペクトルを図1に示す。このスペクトルより、3つの興味ある事柄が読みとれる。

すなわち、

- (i) 2個のN-メチル基のメチルプロトンが異なった化学シフトを示す。
- (ii) 4'位および5'位のエトキシカルボニル基のメチレンプロトンのシグナルは単純な4重線ではない。
- (iii) 5'位のエトキシカルボニル基のメチルプ

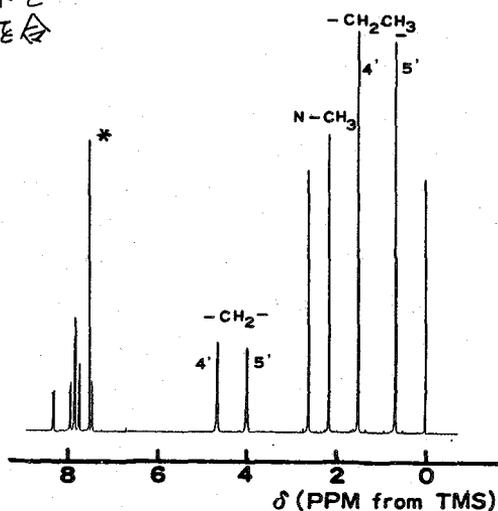


図1. Iの 1HNMR スペクトル ($CDCl_3$ 中, $23^\circ C$) * $CHCl_3$

たがわよしのぶ, ほんだこういち, いしづかやすこ, ながにしひろし, やまもとおさむ

ロトンは2位のそれに比較して著しく高磁場である。

以下、これらについて詳しく述べる。

N-メチル基のシグナルが2本に付いていることは、室温付近ですでにジメチルアミノ基の回転が止まっていることを示している。¹³C NMRにおいてもN-メチル基は2本であり、-70°C ~ 120°CでN-メチル基以外のシグナルの分裂はいし、broadeningはほとんど見られなかった。温度変化を行うことにより、N-メチル基の線形変化を測定した。DMSO-d₆ 中95°Cが coalescence temperature であることがわかった。ジメチルアミノ基の自由回転は立体的に困難であるので、

図2に示すように、ジメチルアミノ基とナフタレン環の間のC-N結合の部分束縛回転による線形変化であると結論される。ジメチルアミノ基とナフタレン環の間のC-N結合の回転が室温で止まった例は初めてである。図2でAとB', BとA'が交換するが、AとBおよびA'とB'の化学シフト差は十分に大きく、AとA', BとB'の化学シフト差は非常に小さいと考えられる。コンピュータシミュレーション法による完全線形解析を行い、活性化パラメータを求めた結果、以下の値が得られた。

$$E_a = 16.7 \text{ kcal/mol} \quad \Delta G^\ddagger = 23.7 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta H^\ddagger = 16.0 \text{ kcal/mol} \quad \Delta S^\ddagger = -20.6 \text{ e.u.}$$

at 100°C in DMSO-d₆

図2のような立体構造であるとする、B (B')のプロトンとナフタレン環の2位のプロトンは空間的に近接した位置にあると考えられる。図3は¹H NOE 相関二次元NMRスペクトルを示す。7.20 ppm と 2.53 ppm のシグナル間にクロスピークが現れている。7.20 ppm のシグナルはナフタレン環の2位のプロトンと帰属される。従って、N-メチル基の2つのシグナルのうち、低磁場側のシグナルが、図2のB (B')プロトンによるものと考えられる。トリアゾール環は6π系であり、その環電流効果により、図2のAのメチル

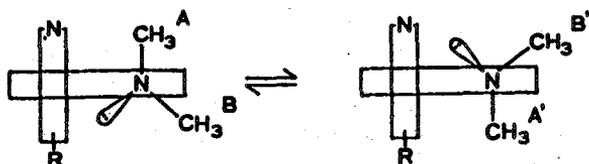


図2. C(1)-N(ジメチルアミノ基)結合の廻りの回転異性体

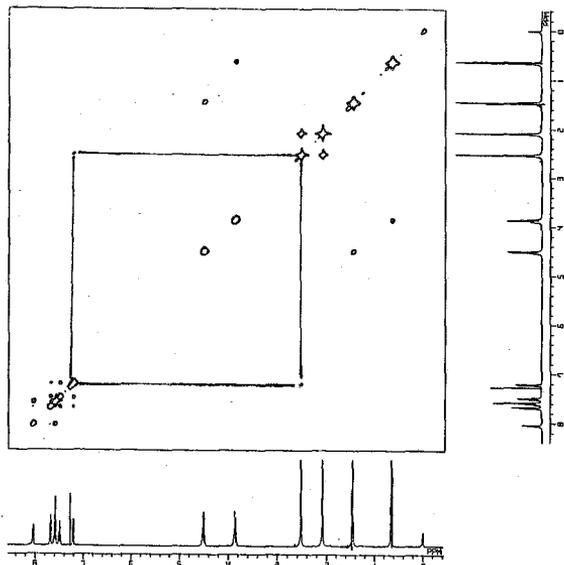


図3. Iの¹H NOE 相関二次元 NMR スペクトル

基のプロトンが高磁場にシフトしたものである。

Iの $CDCl_3$ 中、 $23^\circ C$ における 1H NMR スペクトルのエトキシカルボニル基のメチレン部分を 図4 に示す。4'位 (低磁場側), 5'位 (高磁場側) 共に複雑な分裂を示しており、メチレンの2つのプロトンは非等価で ABX_3 型のカップリングパターンとなっている。

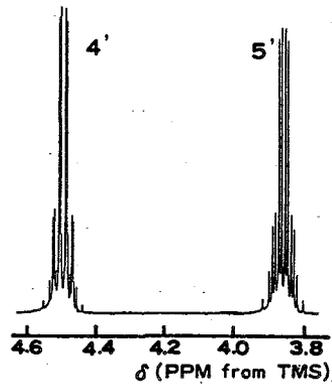
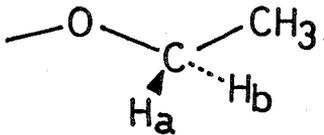


図4. Iのメチレン部分の拡大図 ($CDCl_3$, $23^\circ C$)

このことは、 γ -ビス(トリアゾリル)ナフタレンでも見られており、分子不整による非等価性が原因と考えられる。LAOCNプログラムによるコンピュータシミュレーションの結果、以下のパラメーターが得られた。

4'位 $J_{geminal}$: -10.84 Hz
 $J_{vicinal}$: 7.15 Hz
 δ_{Ha} : 4.508 ppm δ_{Hb} : 4.492 ppm

5'位 $J_{geminal}$: -11.05 Hz
 $J_{vicinal}$: 7.07 Hz
 δ_{Ha} : 3.889 ppm δ_{Hb} : 3.847 ppm

トルエン- d_8 中では、図5に示すように5'位のメチレン部分の線形が変化し、コンピュータシミュレーションの結果、 $CDCl_3$ 中と比較して J はそれほど変化しはじい、 δ_{Ha} と δ_{Hb} の差が大きくなることがわかった。

($23^\circ C$: δ_{Ha} : 3.548 ppm δ_{Hb} : 3.480 ppm
 $\Delta\delta$ 0.068 ppm)

$CDCl_3$ 中と比較すると、いずれも高磁場にシフトしており、トルエンのASISの効果を受けているものと考えられ、その度合が、 Ha と Hb で異なることと解釈できる。 $-70^\circ C$ においては、 δ_{Ha} と δ_{Hb} の差が 0.244 ppm にも大きくなることがわかった。一方、 $100^\circ C$ では、5'位の方は、エチル基の一次のカップリングパターン

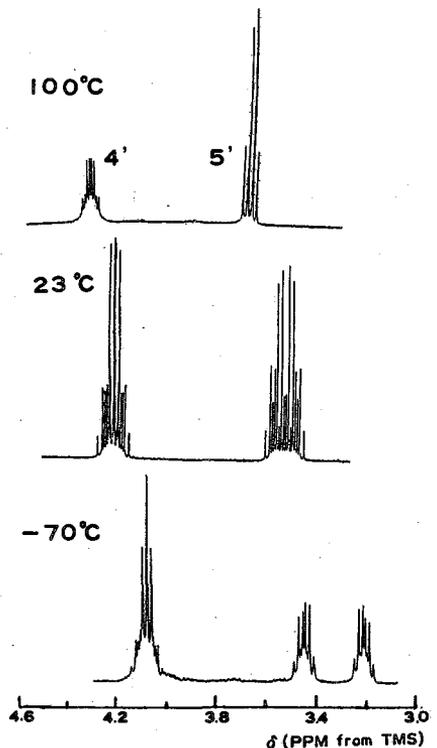
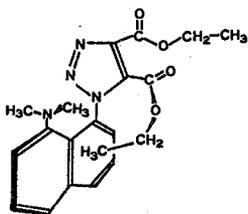


図5. メチレン部分のトルエン- d_8 中における温度変化

と同様になった。メチレン基のプロトンのトルエン- d_8 中における化学シフトの温度変化を図6に示す。いずれのプロトンも温度が下がるに従って高磁場シフトすることが認められた。しかし、 δ 位の方はHaとHbのプロトンが同程度に高磁場シフトするのに対し、 δ' 位では、一方のプロトンが著しく高磁場シフトすることがわかった。このことは、トルエンと δ' 位のカルボニル基との collision complex が強く形成され、しかも、その影響が一方のメチレンプロトンに現われるように配向していることを示唆している。

図1に示したようにエトキシカルボニル基の δ' 位のメチルプロトンは δ 位のそれに比較して著しく高磁場である。($\Delta\delta$: 0.808 ppm)

その理由としては、トリアゾール環の δ と δ' の電子的環境の相違、カルボニル基の磁気異方性効果の受け方の相違などが考えられる。もう一つの要因としては、下図のようにナフタレン環にメチル基がかかり近接しているとするものである。



このような立体構造であるとする、ナフタレン環の環電流によって高磁場シフトすると考えられる。トルエン- d_8 中では、ASISの効果によりさらに高磁場シフトする。図7にトルエン- d_8 中におけるエトキシカルボニル基のメチル基の化学シフトの温度変化を示す。温度が下がるにつれて、高磁場シフトするが、その度合は、 δ 位に比較して δ' 位の方が大きい。 -90°C では、 δ' 位のメチル基のプロトンはTMSより高磁場で共鳴することがわかった。(δ : -20.58 ppm) エチル基のメチルの化学シフトがTMSより高磁場になることはシフト試薬を加えた場合などの特殊な例を除いて、比較的、珍しいことといえる。

参考文献

- 1) K. Honda, H. Nakanishi, Y. Nagawa and A. Yabe, J.C.S. Chem. Commun., 450 (1984)
- 2) 中西, 久川, 本田, 山本 第17回構造有機化学討論会 2349 (1984) 東京

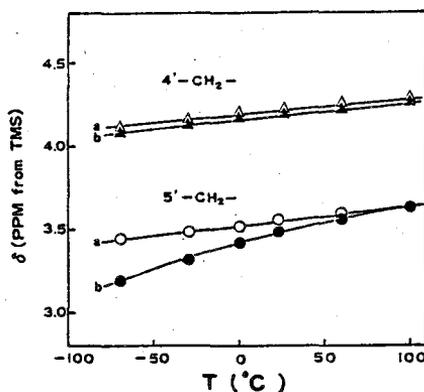


図6. メチレンプロトンの化学シフトの温度依存性 (トルエン- d_8 中)

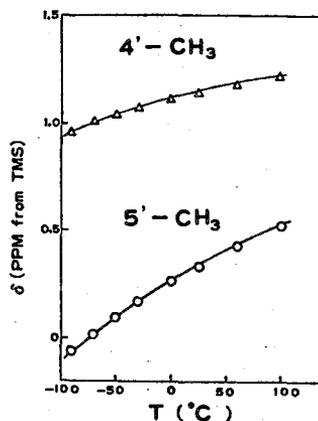


図7. メチルプロトンの化学シフトの温度依存性 (トルエン- d_8 中)

マイクロコンピュータ向けプロトンNMRデータ検索システム
の作製
(国立衛試) ○ 叶多 謙藏 (三菱レイヨン) 片桐 禅

1. スペクトル検索システムなどのファクト・データベースの作製は、大きな企業或いは政府関連事業によるほかないと考えられがちであるが、高額な計算機でのみ処理可能であったりコンピュータ可読データの収集に高いコストを払う必要のあった時期においてはいたしかたなかつたというほかない。

データベース(DB)産業は公共性が強い反面、その利用は個人、あるいは個体の関心に関わるものでしかなく、DB検索とはデータの利用者向け抽出・編集作業といえることができる。利用者はDBの総量ではなく、DB中の関心事項の量と質・調査に必要な費用のみに注目する。

近年マイクロコンピュータは、性能・コストの両面でいちじるしく改善され、サブ・ギガバイト・レベルの容量を持つハードディスク、光ディスクが実用化されるようになっており、大量のDBを個人が所有することも可能となっている。

そのメリットは、低コストで情報検索が可能となった点もあろうが、コンピュータを専有できるところから、自己判断のみで新データを追加して、自己DB財の蓄積をはかることができるようになった事態にも留意すべきであろう。

演者らは先に、SADTLER社のNMRデータ30000をDBとするプロトンNMRスペクトル検索システムを作成し¹⁾、またこのシステムのマイクロコンピュータ向けサブセット版を発表し²⁾、あわせてデータの追補の方法としては、スペクトルが収納されているコンピュータの記憶メディアではなく、逆に一旦記録紙にプリントアウトした、紙ベースで採用可のスペクトルを、タブレット・デジタイザーを使ってコンピュータに入力できるようになれば異機種で生産されるスペクトルでも容易に1記憶メディアに統合できると考えて実験を行い、充分利用価値のあるシステムを作製した³⁾。

今回は以上のサブルーチン・ジョブも含めて総合的な検索システムの設計、製作を試みたのでその成果を報告する。

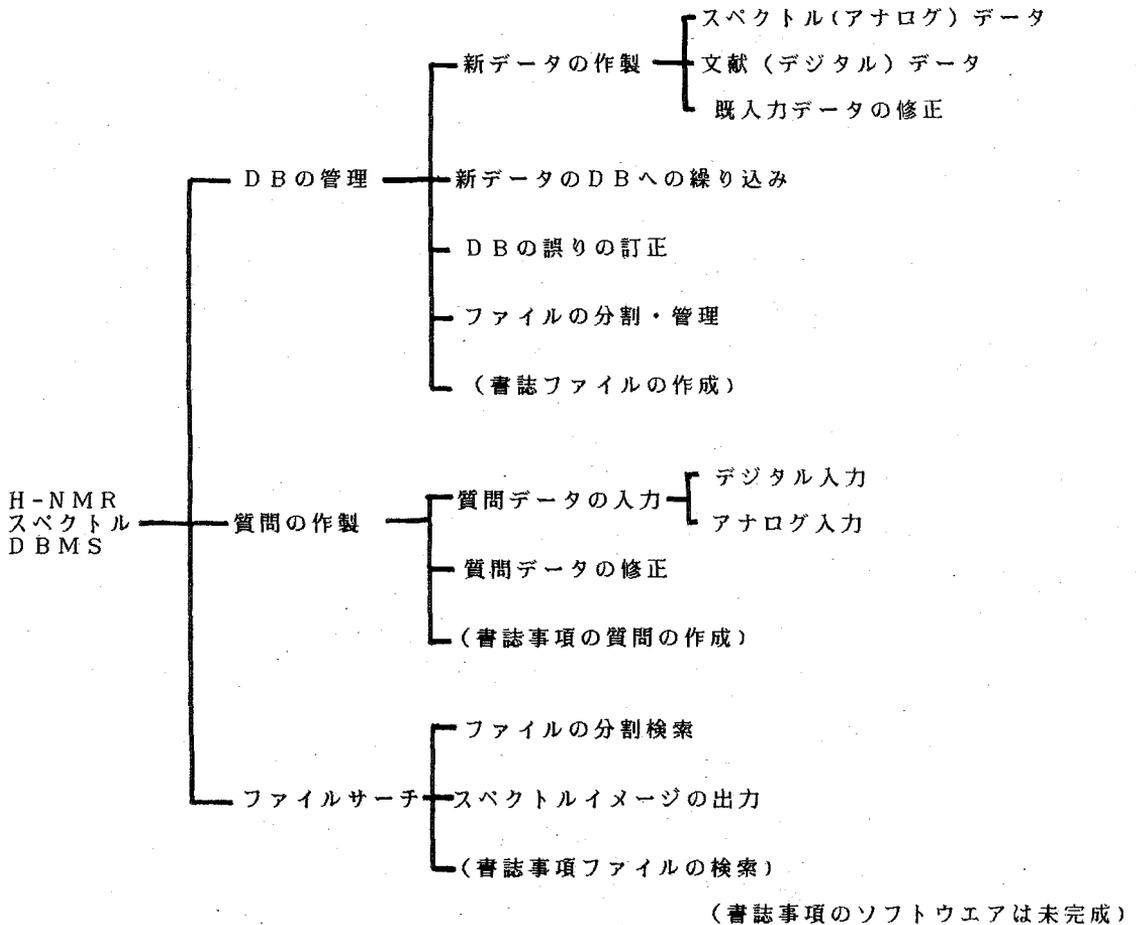
2. 装置

マイクロコンピュータ:NEC製PC-9801E, 640KB. ハードディスク・ドライブ, 緑電子製MD-526他40MB.OSはNEC BASIC OS あるいはMS-DOS言語ユーティリティーはNEC BASIC インタープリターおよびコンパイラー. ならびにマクロソフト社製MS-BASCOM.

タブレット・デジタイザー: グラフテック社製KD-4030(電磁誘導方式, いわゆるA3サイズ相当), RS-232CインターフェースでCPUと接続. ボーレート9600.

かのうた けんぞう , かたぎり ゆずる

3. マイクロコンピュータ PC-9801EによるプロトンNMRスペクトルデータ検索用
統合ソフトウェア概要



統合プログラムは上の表のように、ほぼ3つに分類できる。

1983年におけるマイクロコンピュータ製品の実情は、フォートランなどのサブセット版はまだ利用できず、装置のオペレーティング・システムも汎用性のあるOSはまだ普及していなかった。唯インタープリター型BASIC言語しか実用的でなかったので、大型計算機用フォートランによる検索プログラムは、いわゆるN88BASIC言語に忠実に翻訳することし、固定長488バイトから成る30000件のSADTLERスペクトルデータはACOS350システムを用いてデータ圧縮、及びベーシック用シーケンシャルデータ(全データで約2.9MB)に変換した。

Table 1に各種計算機ならびにOS、言語ユーティリティーによるスペクトル検索に要する時間をあげる。

DATA TRANSFER : 30000	100	90	37	—
SPECTRA SEARCH: SINGLE	50	70	15	5
; DOUBLE	+10	+10	+ 1/10	+1

min.

Table 1 Times of Data Processing

4. 本検索システムの操作例

本統合プログラムは凡てMS-DOS上でオブジェクト・プログラム(..... EXE)をコールすることにより実行されるよう統一されている。マイクロコンピュータのハードおよびソフトウェアのいずれについても日進月歩がいちじるしいから、利用価値ありと認められさえすればシステムで用いるプログラムはMS-DOS上でコールできれば、いづれの言語の混用も可と考える。

本システムの操作例としては、Fig. 1の3-メチル-1-ペンテンの60および200MHzスペクトルを未知化合物データとみなして質問の入力と検索結果をあげる。

Fig. 2はSADTLER ナンバー14306のスペクトル・イメージをリスト・アウトさせたもの(60MHz)であり、Fig. 3-1,-2は60MHzのスペクトルにつき、解析習熟度の異なる2人にコーディングさせ検索した結果で、スコアの差はあれ いづれも正解をえている。

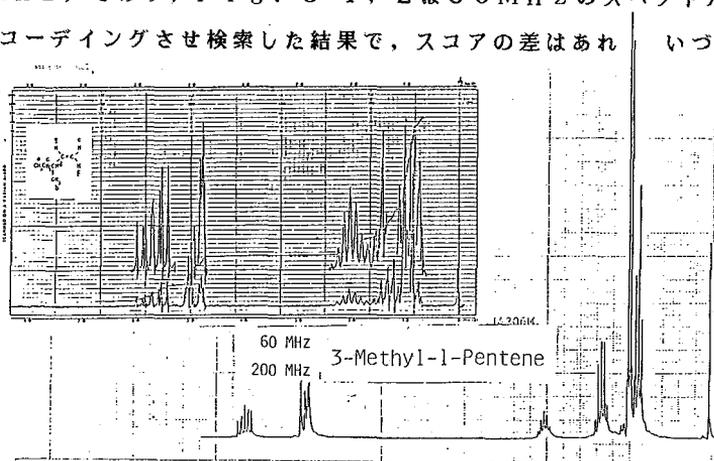


Fig. 1 NMR Spectra of 3-methyl-1-pentene

Fig. 2 List of 60MHz Spectra Image of the Compound

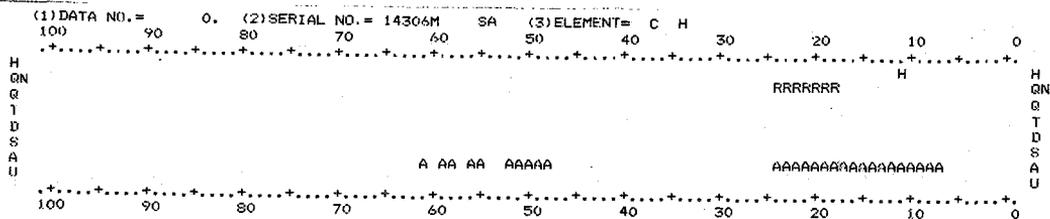


FIG. 3-3は200MHZスペクトル・データをコード化してデータ・ファイルにアペンドする一方、質問データとしても入力検索させた例で、200MHZデータがヒットしているのは当然として、スコアは低いとしても3-メチル-1-ヘキセン等の質問化合物と同族体の60MHZスペクトルがいくつか抽出されているのが注目に値しよう。

参照用スペクトル・ファイルには同一磁場強度で測定したスペクトルのみを編集すべきであろうが、未知化合物の検索にあたっては、測定磁場と同一のファイルについての検索で0解答しか得られないような場合には、他の磁場データにつて編集しているファイルでも検索を試みるのは意味のないことではないと思われる。

- 文献： 1) 著者ら: Anal. Chim. Acta 133 535 (1981)
 2) 同上 : Abstr. of Papers the International Chemical Congress of Pacific basin Societies, 08P15 (Honolulu, Hawaii, Dec. 21, 1984)
 3) 同上 : 第8回情報化学討論会講演予講集 p.146 (昭和60年10月7日, 金沢)

Fig. 3 Spectra File Search of 3-methyl-1-pentene
 3-1 60MHZ-a 3-2 60MHZ-b 3-3 200MHZ Spectra

```

*****
* PRIVATE CHEMICAL DATABASE MANAGEMENT SYSTEM *
* H-NMR SPECTRA SEARCH SUBSET *
*****
10-05-1984/10:24:28
DEMONSTRATION TO THE ATTENDANTS (Test on Appendix of New Reference to the Database)

***** Input of Unknown Spectra *****
Question No. 1
Sample Name : 14306H . K
Essential Element:
Element Not Present : 0 N
Threshold value 1-3-3: 2 - 40 - 2
Bad Mark Parameters Set :
1 2 S D T Q QN H
6 10 4 2 2 2 2 4
Peak Data Description:
Code Proton Chemical Shift
A 0 00.65-01.70
H 0 01.03
QN 1 01.70-02.35
A 2 04.75-05.15
A 1 05.42 05.00
A 0 05.55 05.58
A 0 05.70 05.73
A 0 05.82 05.86

***** Input of Unknown Spectra *****
Question No. 1
Sample Name : methylp6 KK
Essential Element:
Element Not Present :
Threshold value 1-3-3: 2 - 10 - 5
Bad Mark Parameters Set :
1 2 S D T Q QN H
6 10 4 2 2 2 2 4
Peak Data Description:
Code Proton Chemical Shift
D 3 00.34-01.11
H 0 00.99
H 0 01.01
QN 2 01.16-01.51
QN 1 01.91-02.14
A 2 04.75-05.03
QN 1 05.51-05.74

Accepted Data No. 2
Sample No. 14306B KK
Essential Element 3
Element Not Present 12
H-Peak 4
Not-Signal 3857
Gravity 2.10
Sigma 1.75
Peak Data Codes Conversion Table
-7 2 2 2 2
130 2 2 2 2
2 2 66 66 66
66 66 66 66 -23
-2 2 2 2 -1 2
-2 -1 2 -40 0

Accepted Data No. 1
Sample No. 14306H K
Essential Element 3
Element Not Present 12
H-Peak 4
Not-Signal 3985
Gravity 2.07
Sigma 1.81
Peak Data Codes Conversion I
-7 2 2 2 2
130 2 2 2 2
2 2 66 66 66
66 66 66 66 -23
2 2 2 2 2
-2 66 66 66 66
66 66 -41 0

Accepted Data No. 1
Sample No. methylp6 KK
Essential Element 3
Element Not Present 0
H-Peak 6
Not-Signal 3985
Gravity 2.08
Sigma 1.78
Peak Data Codes Conversion Table
-6 18 18 154 138
74 66 66 66
-3 66 66 66 -25
2 2 2 2 -4
66 66 66 -43 0

***** List of Fit Spectra *****
***** Database : The first 30000 of Sadtler Collection *****
No. Sample Code No. 11437: TPA Esters of 2-Succinol Derivatives
1 14306H K No. 11441:
2 14306B KK No. 671: 2-Methyl-2-Propanol-1-Pentanol
17:33:44 No. 3953: N-4-Dimethyl-2-Meocentyl-1-Pentene

***** Question No. 1 methylp6 KK ** Hit Spectra Count is 11 passed thru
Frs-ELM: 29998 Abs-ELM: 29998 HI-PK: 1694 Not-SGN: 1431 and GRVTY: 1094

SCORE SPEC.NO. NOTES GRAVITY ELEMENTS
100 30001 2.05
34 21512M 1.15
32 23381M 1.44 Br
20 11432M 1.33 O F
18 11441M 1.43 O F
16 471M 1.26 O
16 19992M 1.25
14 3963M 1.37
12 12911M 1.68 O
12 39935M 1.17 N
10 5944M 1.42
10:43:06

***** Job finished. And how about the results ? *****

***** List of Fit Spectra *****
***** Database : The first 30000 of Sadtler Collection *****
No. Sample Code No. 11437: TPA Esters of 2-Succinol Derivatives
1 14306H K No. 11441:
2 14306B KK No. 671: 2-Methyl-2-Propanol-1-Pentanol
17:33:44 No. 3953: N-4-Dimethyl-2-Meocentyl-1-Pentene

***** Question No. 2 14306B KK ** Hit Spectra Count is 2 passed thru
Frs-ELM: 29998 Abs-ELM: 1924 HI-PK: 601 Not-SGN: 108 and GRVTY: 21 ***

SCORE SPEC.NO. NOTES GRAVITY ELEMENTS
100 14306H 2.22
48 3422M 2.11
44 27195M 2.08

***** Question No. 1 14306H K ** Hit Spectra Count is 3 passed thru
Frs-ELM: 29998 Abs-ELM: 1924 HI-PK: 601 Not-SGN: 233 and GRVTY: 51 ***

SCORE SPEC.NO. NOTES GRAVITY ELEMENTS
100 14306H 2.22
48 3422M 2.11
44 27195M 2.08

***** Job finished. And how about the results ? *****

```


第 1 日

11 月 6 日 (水)

B 会 場

(三菱製紙・感材研) 遠藤一夫・山本京之介
(日本電子) 松下和弘・出口健三

1. Ramsey¹⁾が「NMRのケミカルシフトの磁場依存性(主に磁場の強さの二乗に依存)」を指摘して以来、未だにその実測値が報告されていなかった。それは、シフト定数の磁場依存性が小さい為である。しかし、最近では、超電導高磁場における測定器が増加し、多核NMR測定も盛んに行われているので、この効果が見出されると考えている。漢者らは数年、金属錯体のNMR²⁾を追究する一方、このシフトの磁場依存性は、重原子ほど起こり易いと考えていたので、水溶液中における金属塩の⁶³Cu, ⁶⁷Zn, ¹⁰⁹Ag, ¹¹³CdのNMR測定を試みた。その結果僅かではあるが¹⁰⁹Agには、正のシフトの磁場依存性、¹¹³Cdには、負のシフトの磁場依存性を見出したので、その結果を報告すると共に、この理論的根拠も述べたい。

2. ① 理論的背景

全シフト(σ^T)に関しては、通常のシフト(σ)と磁場依存のシフトとの和で考えられ、磁場依存の項は、テーラー展開して、結局(1)式で書ける。¹⁾

$$\sigma^T = \sigma + \tau H_0^2 + \dots \quad (1)$$

ただし、 H_0 の奇数べきは、対称性の要求から消える。又(1)を共鳴条件の式に代入すれば(2)式になり、 ω (周波数)が H_0^3 に依存することが分かる。

$$\omega = (1 - \sigma^T) \gamma H_0 = (1 - \sigma) \gamma H_0 - \tau \gamma H_0^3 \quad (2)$$

ケミカルシフトを求めるには、 $\mu \cdot H$ に比例する項を捨てる必要はないから、 τH_0^2 (磁場依存シフト)も σ と同様、摂動論により得られる。ただし4次及び5次の摂動法³⁾となる。まず全演算子の中から、必要な項だけを選出して書くと、以下ようになる。

$$\mathcal{H}^{(1)} = -\sum_R (H_0 + 2\mu_A / r_R^3) m_{zR}^{(1)} \quad (3)$$

$$\mathcal{H}^{(2)} = \frac{16}{3} \pi \beta \sum_R (S_R \cdot \mu_A) \delta(\nu_{AR}) \quad (4)$$

$$\mathcal{H}^{(3)} = \sum_R \lambda_A L_R \cdot S_R \quad (5)$$

こゝでの言ひ方は、通常の磁気共鳴の教科書と同様である。

次に、4次摂動項を τH_0^2 及び5次摂動項を τH_0^3 とし、具体的に書くと、

$$\tau H_0^2 = -2\alpha \sum_{n, n'} \frac{\langle 0 | \sum_R H_0 l_{zR} | n \rangle \langle n | \sum_R H_0 l_{zR} | n' \rangle \langle n' | \sum_R l_{zR} | n'' \rangle \langle n'' | \sum_R (l_{zR} / r_R^3) | 0 \rangle}{(E_n - E_0)(E_{n'} - E_0)(E_{n''} - E_0)} \quad (6)$$

えんどうがづぶな・やまもとさうのすけ・まつしたかづひろ・でぐちけんぞう

$$\mathcal{I}_2 H_0^2 = \frac{16}{3} \pi \alpha^4 \lambda \sum_{n, n', n''} \frac{\langle 0 | \sum_k H_{kz} | n \rangle \langle n | \sum_k H_{kz} | n' \rangle \langle n' | \sum_k H_{kz} | n'' \rangle \langle n'' | \sum_k H_{kz} | 0 \rangle}{(E_n - E_0)(E_{n'} - E_0)(E_{n''} - E_0)} \quad (7)$$

で、0は基底状態の波動関数、 n, n' 等は励起状態の波動関数を表す。

基底状態及び励起状態の波動関数は、次の様に与える。

$$(\Phi_0) \quad (\Phi_{i,j}, {}^3\Phi_{i,j})$$

$${}^1\Phi_0 = (\varphi_1 \alpha)(\varphi_1 \beta) \cdots (\varphi_n \alpha)(\varphi_n \beta), \quad (8)$$

$${}^1\Phi_{i,j} = (\varphi_1 \alpha)(\varphi_1 \beta) \cdots (\varphi_{i-1} \beta)(1/\sqrt{2}) \{(\varphi_i \alpha)(\varphi_j \beta) - (\varphi_i \beta)(\varphi_j \alpha)\} (\varphi_{i+1} \alpha) \cdots (\varphi_n \beta), \quad (9)$$

$${}^3\Phi_{i,j} = (\varphi_1 \alpha)(\varphi_1 \beta) \cdots (\varphi_{i-1} \beta) \left\{ \begin{array}{l} (\varphi_i \alpha)(\varphi_j \alpha) \\ (1/\sqrt{2}) \{(\varphi_i \alpha)(\varphi_j \beta) + (\varphi_i \beta)(\varphi_j \alpha)\} \\ (\varphi_i \beta)(\varphi_j \beta) \end{array} \right\} (\varphi_{i+1} \alpha) \cdots (\varphi_n \beta), \quad (10)$$

ただし φ_i は Hartree-Fock オペレーターの固有函数とし、このMOはAOの線型結合として表される。

$$\varphi_i(R) = \sum_a C_{ai} X_a(R) \quad (11)$$

厳密に求める必要があるが、今回は ${}^3E_{ji} - E_0$ のかわりに、支配的E valueを用い、(6),(7)式に(8),(9),(10)を代入し更に(11)式でA.O.まで展開し、次式を用いて整理する。

$$P_{ab} = 2 \sum_{i=1}^{occ} C_{ai} C_{bi}, \quad Q_{ab} = 2 \sum_{i=1}^{unocc} C_{aj} C_{ij} \quad (12)$$

(ここで P_{ab} は charge-bond-order matrix の要素)
(" Q_{ab} も ") (空軌道に関して)

• $\mathcal{I}_1 H_0^2$ に関しては 波動函数の取り方から 2組 $\{(i \rightarrow j \rightarrow i \rightarrow j' \rightarrow i)\}$ 及び演算子の置換から 4組の項が出てくる。ここでは、その1組を(13)式で与える。
P軌道について

$$(\mathcal{I}_1 H_0^2)_{zz} = -\frac{\alpha^4}{8} \frac{H_0^2}{E^3} (P_{xy} Q_{xy} - P_{yy} Q_{xx} - P_{xx} Q_{yy} + P_{xy} Q_{xy})^2 \langle Y_{10} \rangle_p, \quad (13)$$

ただし $(i \rightarrow j \rightarrow i \rightarrow j \rightarrow i)$ の組である。

• $\mathcal{I}_2 H_0^2$ については、波動函数に取方は 2組 $\{(i \rightarrow j \rightarrow i \rightarrow j' \rightarrow j'' \rightarrow i)\}$ 及び演算子の置換から計30組の項となる。その1組を書くと(14)式となる。
(ただし $(i \rightarrow j \rightarrow i \rightarrow j \rightarrow j \rightarrow i)$ の組)

P軌道について

$$(\mathcal{I}_2 H_0^2)_{zz} = \frac{\pi}{6} \alpha^4 \lambda |S(0)|^2 \frac{H_0^2}{E^4} (P_{xy} Q_{xy} - P_{yy} Q_{xx} - P_{xx} Q_{yy} + P_{xy} Q_{xy}) \times (P_{sx} Q_{xy} Q_{sy} + P_{sy} Q_{xy} Q_{sx} - P_{xx} Q_{yy} Q_{xx} - P_{yy} Q_{xx} Q_{yy}). \quad (14)$$

② NMR測定

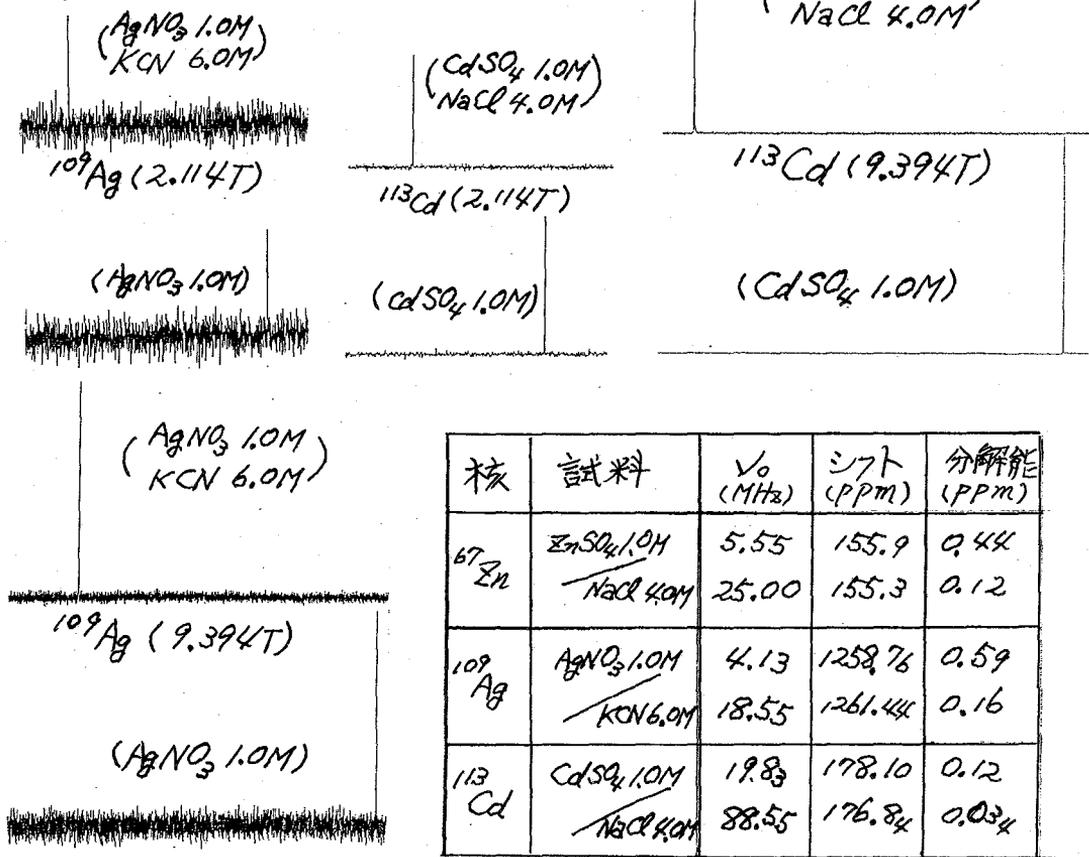
試料は市販品を用い、20.10%を含有する水溶液とした。基準は、すべて1.0Mの金属塩($ZnSO_4$, $AgNO_3$, $CdSO_4$)の水溶液とした。装置は、JEOL FX 90Q (2.114T) 及び GX 400 (9.394T) を用いた。測定内容は右表に示した。測定の再現性を数回確認した。

(測定内容)

核	ν_0 (MHz)	パルス幅 (μs)	$2\pi\nu_{H1}$ (kHz)	data point	積算回数 (\leq 風時間)	測定温度 (°C)
^{67}Zn	5.55	60	20	16,384	3000 (1s)	30.0
	25	20	50	65,536	261 (1s)	30.0
^{109}Ag	4.13	25 (2s)	20	16,384	300 (10s)	30.0
	18.55	10	100	65,536	233 (20s)	30.0
^{113}Cd	19.83	13 (1.5s)	20	16,384	1024 (1s)	30.0
	88.55	10	50	65,536	1000 (1.1s)	30.0

3. 測定結果

下図には、2.114T 及び 9.394T における ^{109}Ag と ^{113}Cd のスペクトルを示し、下表には、シフト及び分解能を著した。 ^{109}Ag には正、 ^{113}Cd には、負のシフトが認められる。



4. 実測値を式(13)及び(16)の定数などから概算してみる。それぞれの $\tau_1 H_0^2$ 及び $\tau_2 H_0^2$ は以下のように近似される。

$$\tau_1 H_0^2 \simeq -\frac{\alpha^4}{8} H_0^2 \frac{\langle 1/r^3 \rangle_{5p}}{E^3} \beta_d \times 8 \quad (15)$$

$$\tau_2 H_0^2 \simeq \frac{\pi}{6} \alpha^4 \lambda_A H_0^2 \frac{|S(0)|^2}{E^4} \times 60 \quad (16)$$

[$\tau_1 H_0^2$ 及び $\tau_2 H_0^2$ の定数値 (a.u.)]

核	$\lambda_A(p)$	$\lambda_A(d)$	$\langle 1/r^3 \rangle_{5p}^{(5)}$	$\langle 1/r^3 \rangle_{4d}^{(5)}$	$ S(0) ^2$	E (1st I.P.)
Ag	8.6×10^{-4}	4.6×10^{-3}	1.38	3.68	8.62	0.278
Cd	9.4×10^{-4}	5.3×10^{-3}	1.47	4.17	2.44	0.330

(15)及び(16)式を用いて、概算すると、下表の様に $10^{-12} \sim 10^{-11}$ と、とても実測に合わない値を示している。(計算には、左表の値を用いた。) その理由は、①Eの見積りが大きすぎる。

② $\langle 1/r^3 \rangle_{p,d}$ の粗い近似によると考えられる。

[$\tau_1 H_0^2$ 及び $\tau_2 H_0^2$ の概算値]

核	$\tau_1 H_0^2$ 9.397 (5.5×10^3 a.u.)		$\tau_2 H_0^2$ 9.397 (5.5×10^3 a.u.)	
	5p	4d	5p	4d
Ag	5.4×10^{-12}	1.5×10^{-11}	3.4×10^{-12}	1.8×10^{-11}
Cd	3.4×10^{-12}	9.8×10^{-12}	5.2×10^{-13}	3.0×10^{-12}

References

1. N. F. Ramsey, Phys. Rev. A 1, 1320 (1970)
2. H. Nakatsuji, K. Kanda, K. Endo and T. Yonezawa, J. Am. Chem. Soc. 106, 4653 (1984); K. Endo, K. Yamamoto, K. Matsushita, K. Deguchi, K. Kanda and H. Nakatsuji, J. Magn. Reson. 65, Dec. (1985) in press
3. E. U. Condon and G. H. Shortley, The Theory of Atomic Spectra (Cambridge U. P. Cambridge, 1935)
4. C. C. J. Roothaan, Rev. Mod. Phys. 23, 69 (1951)
5. E. Clementi, D. L. Raimondi and W. P. Reinhardt, J. Chem. Phys. 47, 1300 (1967)

(近畿大・理工) ○宗像 恵・北川 進・八木富士夫・佐々木学

1. 金属イオンは一般に Lewis 塩基の溶媒に溶解し金属溶媒和イオン $[MS_x]^{n+}$ を生成する。 $[MS_x]^{n+}$ の金属核 NMR の化学シフトは溶媒の影響を著しく受ける。それ故、金属核 NMR は金属イオン-溶媒相互作用について多くの有益な情報を提供してくれることが期待されているが、それに答えられる現状にあるとはいえない。

^{23}Na , ^{27}Al , ^{133}Cs の NMR 化学シフトは donor number (DN) とよい相関があると報告されている。一方、その他の金属核 (^7Li , ^{205}Tl など) の NMR 化学シフトについては溶媒の誘電率, Z 値, DN などの物理化学的性質との相関は見出されていない。

このことから広範な金属核 NMR 化学シフトの溶媒効果を、溶媒の性質から説明しようことは不可能であるという悲観的考えさえ出ている¹⁾。

金属イオンは Lewis 酸とみなすことができるが、金属イオンと溶媒との相互作用は金属イオンの性質のみならず溶媒の塩基性 (又は電子供与性) に依存する。溶媒の塩基性を表わす一つの尺度である DN も十分に確立されたものではない。特に共有結合性を有する金属イオンには不適當であることが指摘されている。演者らは溶媒

の塩基性の新しい尺度として coordination power (CP) を提案 表 1 溶媒の CP

した。錯形成反応, 錯体の安定度定数, 金属イオンの redox potential における溶媒効果は CP と極めてよい相関があることを明らかにし CP の妥当性を実証した²⁾。

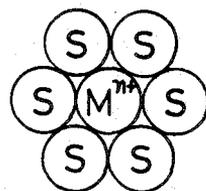
本研究は金属核 NMR 化学シフトと CP との関係について検討し, 金属核 NMR の化学シフトに及ぼす溶媒効果を明らかにすることを目的として行なった。

2. 金属イオンはすべて過塩素酸塩 $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, RbClO_4 , $\text{Cd}(\text{H}_2\text{O})_6(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6(\text{ClO}_4)_3$ を使い, 使用前に P_2O_5 存在下で減圧乾燥したものを使用した。溶媒はすべて常法により脱水精製して使用した。NMR の測定は Jeol FX 200 NMR spectrometer を用いた。

3. Coordination power (CP). CP は Ni^{2+} イオンを用い, 均等配位子場の規則を適用して求めた溶媒の相対的な配位力 (MeCN の CP を 0 とする) であり, 次式で与えられる²⁾。

$$CP = 1 / 6 \log \left(K_{\text{NiS}_6}^{\text{Ni}} / K_{\text{Ni}(\text{MeCN})_6}^{\text{Ni}} \right) \quad (1)$$

S = solvent



金属溶媒和イオン

solvent ^a	CP ^c
py	2.24
Me ₂ SO	1.24
def	0.85
H ₂ O	0.79
dmf	0.72
MeOH	0.11
tmp	0.08
MeCN	0.00
n-HxOH	-0.07
n-PeOH	-0.07
EtOH	-0.12
n-BuOH	-0.12
n-PrOH	-0.14
PrCN	-0.15
PhCN	-0.37
AN	-0.46
i-BuOH	-0.46
Me ₂ CO	-0.48
i-PrOH	-0.54
s-BuOH	-0.68
pc	-0.77
t-BuOH	-0.92

むなかためぐむ・きたがわすすむ・やぎふじお・ささきまなぶ

$$K_{\text{NiS}_6}^{\text{Ni}} = \frac{[\text{NiS}_6]}{[\text{Ni}^{2+}][\text{S}]^6}$$

$$K_{\text{Ni(MeCN)}_6}^{\text{Ni}} = \frac{[\text{Ni(MeCN)}_6]}{[\text{Ni}^{2+}][\text{MeCN}]^6}$$

つまりC Pはアセトニトリルの溶媒和イオン
 $[\text{Ni(MeCN)}_6]^{2+}$ の生成定数と目的とする溶媒和イオン
 $[\text{NiS}_6]^{2+}$ の生成定数の差である。22種の溶媒のC Pを
 表1に示した。

^{113}Cd d (II). 4位置換体ピリジン(4-Mepy,
 4-CH₂=CHpy, 4-Acpy, 4-CNpy)溶媒中のCd(ClO₄)₂の
 ^{113}Cd NMRシグナルは溶媒に著しく依存し(図1),
 pKaが大きくなるほど低磁場シフトすることを³⁾報告し
 した。つまりCd-溶媒の相互作用の強さと ^{113}Cd
 NMR化学シフトときわめてよい相関があることを見出
 した(図2)³⁾。ピリジン以外の各種溶媒中での
 Cd(ClO₄)₂の ^{113}Cd NMR化学シフトを測定した。
 図3に示すようにアルコール溶媒のC Pと ^{113}Cd
 NMR化学シフトと極めてよい相関が得られた。この
 よい相関はC PがCd²⁺イオンに対しても適用できるこ
 と, および溶媒和イオンの溶媒の配位数が本質的に同じ
 ことを示している。ニトリル溶媒中の ^{113}Cd NMR化
 学シフト(MeCN, 25.2ppm; PrCN, 22.3ppm; PhCN, 10.3ppm;
 AN, 14.3ppm)もC Pが大きくなるほど低磁場シフトする
 傾向が得られた。アルコールやニトリル化合物のように
 それぞれ官能基が同じ溶媒系列ではC PがCd-溶媒相
 互作用の強さを表すよいパラメーターであることが理



図1 カドミウム(II)溶媒和イオンの ^{113}Cd NMRスペクトル

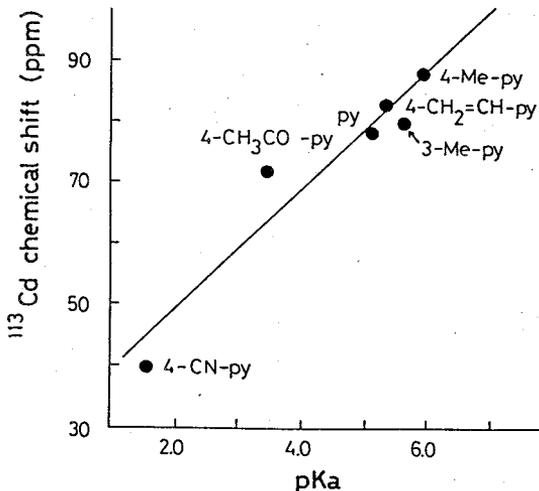


図2 4位置換体ピリジン溶媒和中の ^{113}Cd NMR化学シフトとpKaとの関係

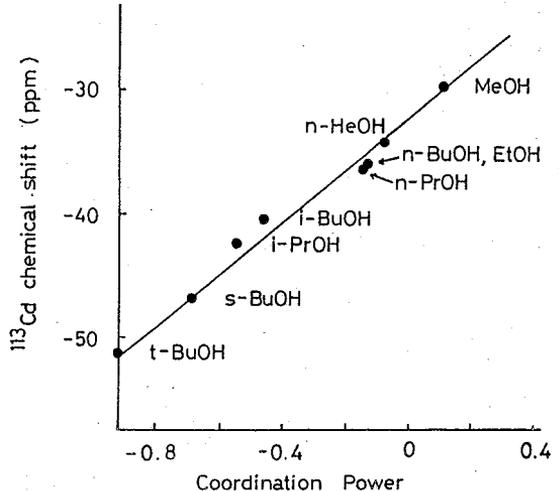


図3 Cd²⁺のアルコール溶媒和イオンの ^{113}Cd 化学シフトとC Pとの関係

解される。一方、官能基が異なる溶媒の CP と ^{113}Cd NMR 化学シフトとの相関は得られなかった。このことは Cd 溶媒の相互作用の中身(結合の性質, 配位数, 対アニオン効果など)が溶媒の官能基によって異なることを示唆している。同じ 2B 族の Zn^{2+} の溶媒和イオンの ^{67}Zn NMR 化学シフトとは ^{113}Cd の化学シフトときわめてよい相関が得られ(図 4), 両イオンの溶媒との相互作用が類似していることを示している。

^{205}Tl (I). 上で述べたように, ^{205}Tl NMR の化学シフトに及ぼす溶媒効果は DN, Z 値, 誘電率などとの相関は見出されず, Tl-溶媒相互作用の解明はきわめて困難であると考えられてきた¹⁾。図 5 に ^{205}Tl の化学シフト⁴⁾ をプロットした。CP が大きくなるにつれて低磁場シフトすることが明らかとなった。従来, 極めて複雑な溶媒効果を示すと考えられていた ^{205}Tl の化学シフトが CP によって説明されることは注目値する。

Tl⁺ はイオン半径が 1.44 Å で Rb⁺ の 1.48 Å に対応する値である。その化学的性質は Rb⁺ や Ag⁺ イオンに類似している場合が多い。図 5 の関係は Ag⁺ よりむしろ Rb⁺ の性質に似ている。というのは ^{109}Ag NMR シフトの溶媒依存性と異なっているからである。 ^{113}Cd と異なって溶媒の官能基に関係なく良い相関性を示すことは強調されなければならない。

^{27}Al (III). Tl⁺ と同じ 3A 族の Al³⁺ は, 配位している溶媒の交換速度が遅く, inert な金属イオンである。Al³⁺ 溶媒和イオンの ^{27}Al NMR 化学シフト⁵⁾ を図 6 に示した。アルコール(MeOH と n-PrOH)以外の溶媒は CP とよい相関が示

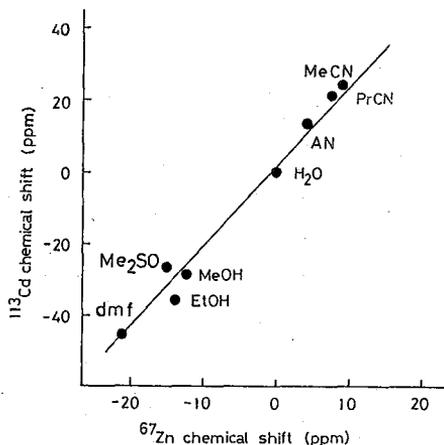


図 4 ^{113}Cd と ^{67}Zn の各種溶媒和イオンの化学シフトの比較

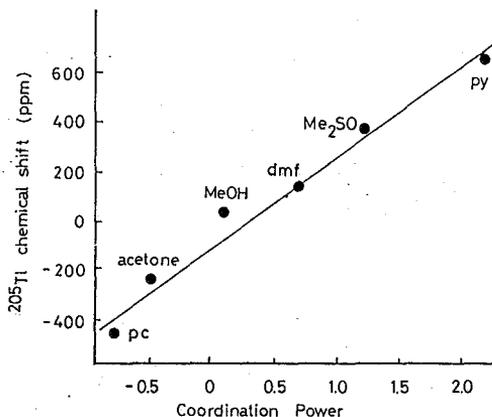


図 5 ^{205}Tl 溶媒和イオンの化学シフトと CP との関係

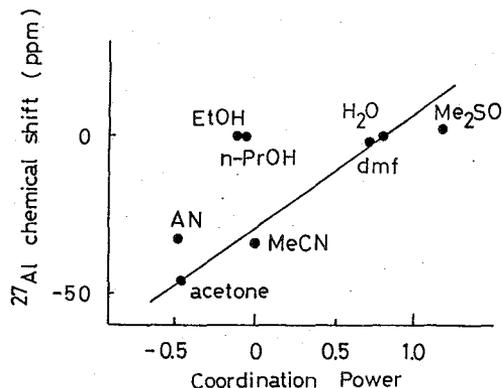


図 6 ^{27}Al 溶媒和イオンの化学シフトと CP との関係

された。アルコール溶媒とその他の溶媒との相違については検討中であるが、配位数が異なるか、アルコールのCPが Al^{3+} では低く見積もられている可能性がある。

$^{23}Na(I)$ 。最後に、静電力の小さいアルカリ金属イオンについて検討した。

^{23}Na の化学シフトはDN(溶媒和エンタルピー)と良い相関性が報告されている⁶⁾。

^{23}Na NMR化学シフトは、ニトリル、ピリジン及びアセトン溶媒中での化学シフトはいずれもCPとも良い相関性があり

CPが大きくなるにつれて低磁場シフトした(図7)。 Na^+ のような静電力の小さい

イオンでも溶媒との結合の強さが化学シフトに影響することを示している。さらにこの結果は Na^+ イオンに配位している溶媒の配位数も本質的に同じであることを示唆している。しかし、 Al^{3+} と同じようにアルコール溶媒中での化学シフトは、これらのCPから予想される値より低磁場に現れた。

4. 以上の結果をまとめると、(1) 金属核NMRの化学シフトに及ぼす溶媒効果はその溶媒和イオンの化学種が同じものについて比較する必要がある。(2) 溶媒の配位力が增加するにつれて、金属核はdeshieldされる。(3) 金属核NMRは金属-溶媒相互作用の研究において極めて有力な手段である。最近の ^{113}Cd NMR化学シフトの理論計算⁷⁾によると $Cd(II)$ への配位子からの電子供与的結合がシフトに重要な寄与をしていることが示された。即ち、金属-配位子結合性を考慮した金属核化学シフトの解釈が必要である。ところで金属-配位子結合を明確に考慮しない Na^+ シフトなどの溶媒効果についても、結合性を考慮に入れたCP値との良い相関関係があったことから、溶媒分子の金属への配位がその核のシフトに大きく寄与していることを示している。さらに、これら核のシフトを検討する上でCP値は良い尺度であると言える。

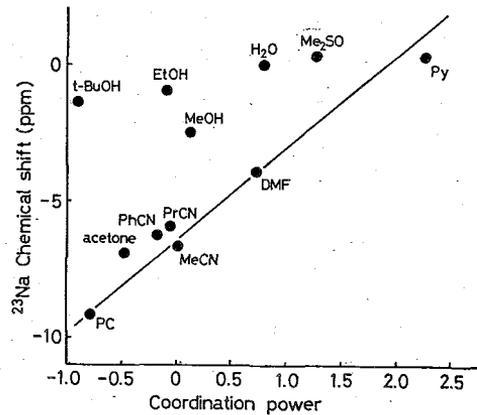


図7 ^{23}Na 溶媒和イオンの化学シフトとCPとの関係

- 1). J. Burgess "Metal Ions in Solutions" Ellis Horwood, Chichester, 1978, pp66.
- 2). M. Munakata, S. Kitagawa and M. Miyazima, Inorg. Chem. 1985, 24, 1638.
- 3). 宗像, 北川, 八木, 第23回NMR討論会発表(1984)
- 4). J. J. Dechter and J. J. Zink, Inorg. Chem. 1976, 98, 1690.
- 5). H. Haraguchi and S. Fujiwara, J. Phys. Chem. 1969, 73, 3467.
- 6). R. H. Erlich, and A. I. Popov, J. Am. Chem. Soc. 1971, 93, 5620
- 7). N. Nakatsuzi, K. Kanda, K. Endou, and T. Yonezawa, J. Am. Chem. Soc. 1984, 106, 4655.

(北見工大) ○福井洋之、三浦宏一

Abstract: A clear definition for the division of the magnetic shielding tensor (σ) into two terms of the diamagnetic part (σ^d) and paramagnetic part (σ^p) is proposed based on the gauge invariant coupled Hartree-Fock (GI-CHF) theory. In this definition, each of σ^d and σ^p is invariant to displacement of the coordinate origin, and both Hermitian conjugate. The present formulae are applied to calculate the magnetic shielding tensors of diatomic molecules, and lead to better results, even with small basis sets, than gauge dependent results obtained with large basis sets.

I. THEORY

In the previous paper¹ in this series, we presented the gauge invariant coupled Hartree-Fock (GI-CHF) formulae^{2,3} for calculating the shielding tensor of a nucleus placed in a uniform magnetic field. However, division of the magnetic shielding tensor into two terms, i.e., diamagnetic part and paramagnetic part, was rather ambiguous. We therefore propose here a clear definition for these two terms.

The expression giving the tu ($t, u=x, y, z$) element of the shielding tensor of nucleus N takes the form

$$\sigma_{tu}^N = \sigma_{tu}^{Nd} + \sigma_{tu}^{Np}, \quad (1)$$

where σ_{tu}^{Nd} and σ_{tu}^{Np} are diamagnetic and paramagnetic terms, respectively. The criteria for dividing σ into σ^d and σ^p should be (i) σ^d depends only on an unperturbed wave function; (ii) each of σ^d and σ^p is invariant to displacement of the coordinate origin; (iii) both σ^d and σ^p are written by Hermitian operators. According to this criteria, the division is uniquely performed. Our previous paper shows

ふくいひろゆき、みうらこういち

$$\sigma_{tu}^{Nd} = (\alpha^2/2) \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu}^{(0)} \langle \chi_\mu | r_N^{-3} \{ \vec{r}_\nu \cdot \vec{r}_N \delta_{tu} - r_{\nu,u} r_{N,t} + (\vec{R}_{\mu\nu} \times \vec{r}_\nu)_t (\vec{r}_N \times \vec{v})_u \} | \chi_\nu \rangle, \quad (2)$$

$$\vec{r}_\nu = \vec{r} - \vec{R}_\nu, \quad (3)$$

$$\sigma_{tu}^{Np} = (\alpha^2/2) \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu}^{(0)} (\vec{R}_\mu \times \vec{R}_\nu)_t \langle \chi_\mu | r_N^{-3} (\vec{r}_N \times \vec{v})_u | \chi_\nu \rangle + \alpha^2 \sum_{ij} S_{t,ij}^{(1,0)} H_{Nu,ij}^{(0,1)} + 2\alpha^2 \sum_i \sum_a \text{occ unocc} d_{t,ai}^{(1,0)} H_{Nu,ia}^{(0,1)}, \quad (4)$$

$$\vec{R}_{\mu\nu} = \vec{R}_\mu - \vec{R}_\nu, \quad (5)$$

$$S_{t,ij}^{(1,0)} = \sum_{\mu\nu} \langle \chi_\mu | (\vec{R}_{\mu\nu} \times \vec{r})_t | \chi_\nu \rangle C_{\mu i}^{(0)} C_{\nu j}^{(0)}, \quad (6)$$

$$H_{Nu,ij}^{(0,1)} = \langle \psi_i^{(0)} | r_N^{-3} (\vec{r}_N \times \vec{v})_u | \psi_j^{(0)} \rangle. \quad (7)$$

In the above equations, α is the fine structure constant, i.e., 7.2973506×10^{-3} , and $C_{\mu i}^{(0)}$ and $P_{\mu\nu}^{(0)}$ are the unperturbed LCAO coefficients and density matrix elements, respectively. In Eq. (4) $d_{t,ai}^{(1,0)}$, the projections of $C_{t,\mu i}^{(1,0)}$ on the vacant orbital coefficients $C_{\mu a}^{(0)}$, can be obtained from the following simultaneous equations

$$\begin{aligned} (\epsilon_a^{(0)} - \epsilon_i^{(0)}) d_{t,ai}^{(1,0)} + \sum_j \sum_b \text{occ unocc} (\langle bi | aj \rangle - \langle ji | ab \rangle) d_{t,bj}^{(1,0)} \\ = H_{t,ai}^{(1,0)} + \epsilon_i^{(0)} S_{t,ai}^{(1,0)} + \sum_{jk} \text{occ} \langle ji | ak \rangle S_{t,jk}^{(1,0)} - G_{t,ai}^{(1,0)}, \end{aligned} \quad (8)$$

($i \in \text{occ}, a \in \text{unocc}$)

where

$$\langle bi | aj \rangle = \int \psi_b^{(0)}(1) \psi_i^{(0)}(1) r_{12}^{-1} \psi_a^{(0)}(2) \psi_j^{(0)}(2) d\tau_1 d\tau_2, \quad (9)$$

$$H_{t,ai}^{(1,0)} = \sum_{\mu\nu} \langle \chi_\mu | (\vec{r}_\nu \times \vec{v})_t + (\vec{R}_{\mu\nu} \times \vec{r})_t \{ \frac{1}{2} \Delta + \sum_A (Z_A / r_A) \} | \chi_\nu \rangle C_{\mu a}^{(0)} C_{\nu i}^{(0)}, \quad (10)$$

$$G_{t,ai}^{(4,0)} = \sum_{\mu\nu\lambda\sigma} [\int \chi_{\mu}(1)\chi_{\nu}(1)(\vec{R}_{\mu\nu} \times \vec{r}_1)_t r_{12}^{-1} \chi_{\lambda}(2)\chi_{\sigma}(2) d\tau_1 d\tau_2 - \frac{1}{2} \int \chi_{\mu}(1)\chi_{\sigma}(1)(\vec{R}_{\mu\sigma} \times \vec{r}_1 + \vec{R}_{\lambda\nu} \times \vec{r}_2)_t \cdot r_{12}^{-1} \chi_{\lambda}(2)\chi_{\nu}(2) d\tau_1 d\tau_2] P_{\lambda\sigma}^{(0)} C_{\mu a}^{(0)} C_{\nu i}^{(0)} \quad (11)$$

II. RESULTS

The above formulae have been applied to calculate the diamagnetic and paramagnetic contributions to the magnetic shieldings of diatomic molecules. The calculation was performed by using the 4-31G⁴ or 6-31G^{5,6} basis sets with standard scale factors and experimental bond lengths. Our calculated results are shown in Table I with other calculated results^{7,8} and observed values. In table I, all compounds are linear and so σ_{\parallel}^D is zero. Although experimental data are limited, table I shows that the GI-CHF calculation gives better results, even with small basis sets, than gauge dependent results obtained with large basis sets.

ACKNOWLEDGMENTS

All the calculations were performed on a HITAC M-200H at the Hokkaido University Computing Center. It is a pleasure to express our appreciation to Dr. F. Sasaki for providing us with computer programs for molecular integrals.

References

1. H. Fukui, K. Miura, H. Yamazaki, and T. Nosaka, *J. Chem. Phys.* **82**, 1410 (1985).
2. R. Ditchfield, *Mol. Phys.* **27**, 789 (1974).
3. C. M. Rohlfing, L. C. Allen, and R. Ditchfield, *J. Chem. Phys.* **79**, 4958 (1983). References to other SCF perturbation calculations with gauge invariant atomic orbitals (GIAO) are therein.
4. R. Ditchfield, W. J. Hehre, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **54**, 724 (1971).
5. W. J. Hehre, R. Ditchfield, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **56**, 2257 (1972).
6. J. D. Dill and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **62**, 2921 (1975).
7. M. Iwai and A. Saika, *J. Chem. Phys.* **77**, 1951 (1982).
8. R. M. Stevens and W. N. Lipscomb, *J. Chem. Phys.* **40**, 2238 (1964).

TABLE I. Magnetic shielding tensors (ppm) of diatomic molecules.

Compd.	Basis set	Bond length (Å)	Nucl.	σ_{\parallel}^d	σ_{\perp}^d	σ_{\perp}^p	σ_{\parallel}	σ_{\perp}	σ	$\sigma(\text{other results})^c$	$\sigma(\text{experiment})$
H ₂	4-31G	0.742 ^a	H	27.6	27.0	0.0	27.6	27.0	27.2	27.00(H) ^d	26.17 ^f ; 26.23 ^f
Li ₂	6-31G	2.672 ^a	Li	104.1	102.1	-3.8	104.1	98.3	100.2		
N ₂	4-31G	1.094 ^a	N	338.5	316.8	-656.1	338.5	-339.3	-113.4		
F ₂	4-31G	1.435 ^a	F	488.1	450.1	-1024.1	488.1	-573.9	-219.9	40.47(F) ^d	-210.1 ^f
LiH	6-31G	1.595 ^a	Li	101.6	101.8	-11.6	101.6	90.2	94.0	90.15(Li) ^e	
			H	28.3	25.8	-0.3	28.3	25.5	26.4	26.45(Li) ^e	
OH ⁻	4-31G	0.984 ^b	O	414.5	385.5	-159.3	414.5	226.2	289.0		
			H	48.3	28.2	10.0	48.3	38.2	41.6		
FH	4-31G	0.917 ^a	F	482.7	461.8	-85.7	482.7	376.1	411.6	428.9(F) ^d ; 426.8(H) ^d	410 ^f
			H	43.5	19.8	4.4	43.5	24.2	30.6	27.89(F) ^d ; 34.75(H) ^d	28.37 ^f
CO	4-31G	1.128 ^a	C	271.0	246.5	-411.0	271.0	-164.5	-19.3		
			O	410.5	400.1	-764.8	410.5	-364.7	-106.3		
CN ⁻	4-31G	1.07 ^b	C	282.1	257.1	-308.4	282.1	-51.2	59.9		
			N	346.6	340.0	-486.3	346.6	-146.4	18.0		
LiF	6-31G	1.51 ^a	Li	106.6	95.2	-7.1	106.6	88.1	94.3		
			F	481.7	471.5	-179.2	481.7	292.3	355.4		

a. Taken from J. A. Pople and D. L. Beveridge, Approximate Molecular Orbital Theory (McGraw-Hill, New York, 1970).

b. Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions, Supplement (The Chemical Society, London, 1965).

c. Nucleus within parentheses indicates the gauge origin.

d. Reference 7.

e. Reference 8.

f. Taken from Ref. 7.

《 序 論 》

粉末試料での高分解能NMRスペクトルを測定するために用いられるCPMAS法では、heteronuclear decoupling と magic angle spinning を同時に行いながら観測するので、IS間の双極子相互作用、間接スピンスピン結合、化学シフト異方性などの、分子構造、運動及び電子状態を反映する重要な情報を失ってしまう。我々はすでに、粉末試料において¹³C-¹H間接スピンスピン結合 J_{CH} を測定する1次元J分解NMR法¹⁾および、異方性相互作用を分離測定する2次元NMR法であるSASS法^{2,3)}の開発を行った。今回は、これらの方法によるスペクトルの解析の方法と応用例について述べるとともに、一般に異方性相互作用が試料の回転周波数より大きいときに現われる spinning side band の強度分布と各々の形状が、相互作用テンソルの主値と相対的な主軸方向を反映するものであることを示し、2, 3の例をあげて説明する。

我々は、ギ酸カルシウムにおいて双極子相互作用SASSスペクトルからCH結合距離 r_{CH} ならびに J_{CH} の大きさと絶対符号を、また、spinning side patternの解析から化学シフトテンソルのCH結合に対する方向を決定した。また尿素4オクテン包接化合物中の guest分子の双極子相互作用を測定し、その運動状態の解析を試みた。

《 原 理 》

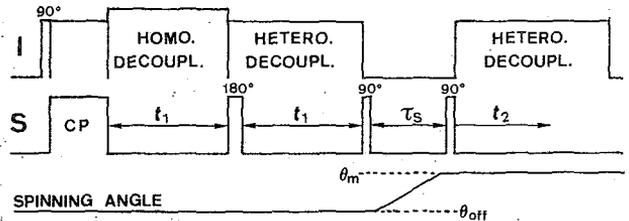
Iを abundant spin, Sを rare spin とすると、回転している固体で heteronuclear decoupling または homonuclear decoupling を行っている場合のS(観測核)系のハミルトニアンはそれぞれ

$$H_S = H_I^0 + S_0 H_0$$

$$H_S = H_I^0 + S_0 H_0 + S_0 S r_s H_0^{IS} + S r_s H_0^{IS}$$

と書くことができる。ここで H_I^0 と H_0 はそれぞれ化学シフトの等方成分と異方成分であり、 H_0^{IS} と H_0^{IS} はそれぞれIS間の双極子相互作用及び間接スピンスピン結合である。また、 $S_0 = P_2(\cos\theta_{ss})$ と $S r_s$ はそれぞれ試料の回転及び homonuclear decoupling による scaling factor である。これらの表式から明らかなように、off-magic angleで試料をslow spinningして、heteronuclear decoupling を行うと化学シフト異方性による spinning side patternが、また、homonuclear decoupling を行うと化学シフトおよび双極子相互作用による spinning side pattern が得られる。また双極

図1. 双極子相互作用 SASS スペクトルを測定するための pulse sequence.



てらおたけひこ・みうらひとし・さいかあぽろ

子相互作用 SASS スペクトルをとるために我々が用いた pulse sequence を図 1 に示す。この原理については文献 (3) を参照されたい。

1次元スペクトルにおける spinning side pattern は FID の sampling と試料の回転を同期させることにより、また、SASS スペクトルでの ω_1 dimension の spinning side pattern は ω_1 を回転周期の整数倍としさらに S_0 を調整して異方性を回転周波数 ν_k より小さくすることにより、すべて center pattern に集中することが可能となる。

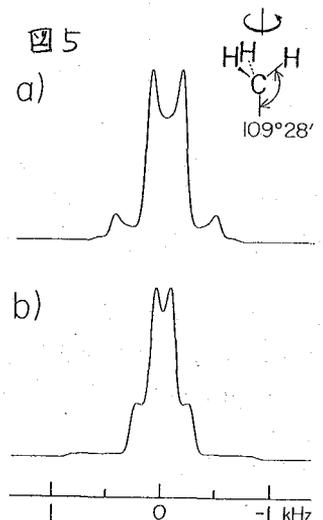
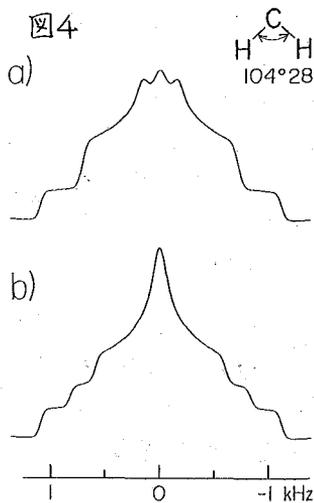
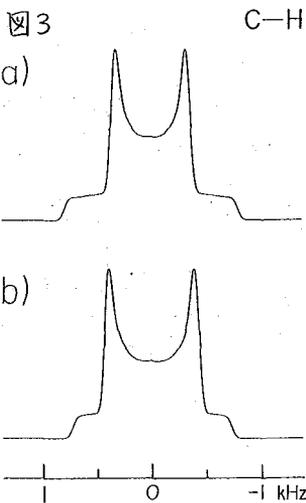
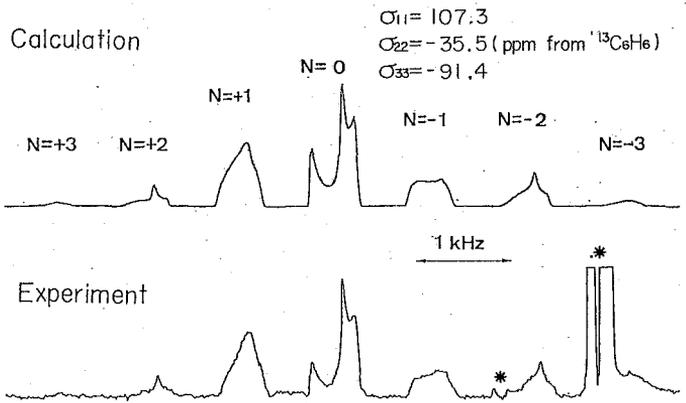
《 実験 》

実験は自作の装置で ^1H の共鳴周波数 90 MHz で行った。 ^1H の homonuclear decoupling には MREV-8 pulse cycle を用い、pulse 間隔 τ は 3.2 μsec とした。ローターは自作の double bearing のシリンダタイプで、圧縮空気の流量を調整することにより回転周波数を安定化した。各 spinning angle での S_{rf} は、1メチルシクロヘキサノールのメチル基の真の J_{CH} の値と固体を測定するのと同じ条件で測定した値とを比較することによって決定した。

《 化学シフト異方性 》

図 2 に示すのはヘキサエチルベンゼンの ring carbon の ^{13}C 化学シフト異方性による spinning side pattern とその simulation である。simulation には Waugh らによって報告されている単結晶の実験結果⁴⁾を用いた。このように多数の side pattern に分裂する場合でもその center pattern ($N=0$) からテンソルの主値を

図 2. ヘキサエチルベンゼンの ring carbon の化学シフト異方性 spinning side pattern。 $\nu_k = 1.0 \text{ kHz}$, $\theta_{\text{off}} = \theta_m + 5^\circ$ 。
*印はメチルヒメチレンの信号。



正確に読みとることができる。

《双極子相互作用》

CH, CH₂, CH₃における, 縮小された双極子相互作用スペクトルを, それぞれ図3, 4, 5に示す。いずれも Srf=0.45, r_{CH}=1.09 Å, J_{CH}=150 Hz とし, a) θ_{off}=θ_m+3° (S₀=-0.0725), b) θ_{off}=θ_m-2.89° (S₀=+0.0725) として, CH および CH₂は rigid な場合, CH₃は対称軸まわりに速い回転を行っている場合について計算したスペクトルである。スペクトルの形は, r_{CH}, J_{CH} および結合角に敏感に影響される。

図6に示すのは, ギ酸カルシウムにおいていくつかのθ_{off}のもとでとられた双極子相互作用SASSスペクトル及びそのsimulationである。互いに反転した軸対称パターンが重なり, J_{CH}によって反対方向にシフトしている。これらのスペクトルから, 直接結合している¹³C-H間のJ_{CH}の絶対符号は正であることがわかる。simulationの結果, 結合距離r_{CH}=1.13 ± 0.01 Å, J_{CH}=+220 ± 20 Hz と決定された。このr_{CH}は rigid な場合の典型的な値1.09 Åに比べてやや長く, 何らかの分子運動の存在が示唆される。またJ_{CH}の値は液体のギ酸の222 Hzに変わって近い。

図7には, 尿素に包接されたトランス4オクテンの双極子相互作用SASSスペクトルおよびそのsimulationである。simulationでは, 包接された分子がオールトランス構造をもつものと仮定した。これは, まずメチル基がその対称軸のまわりに速く回転しておりまた分子全体が長軸まわりに速く回転しているとし, さらに双極子相互作用は, C₄の場合はその0.7倍に, 他の炭素に関しては0.5倍程度に縮小されるとすると実験とはほぼ一致する。このことから, 尿素に包接された4オクテンは長軸まわりの回転の他にも運動を行っていると考えられる。なお, C₂とC₃のスペクトルの中央の鋭いピークはHのspin

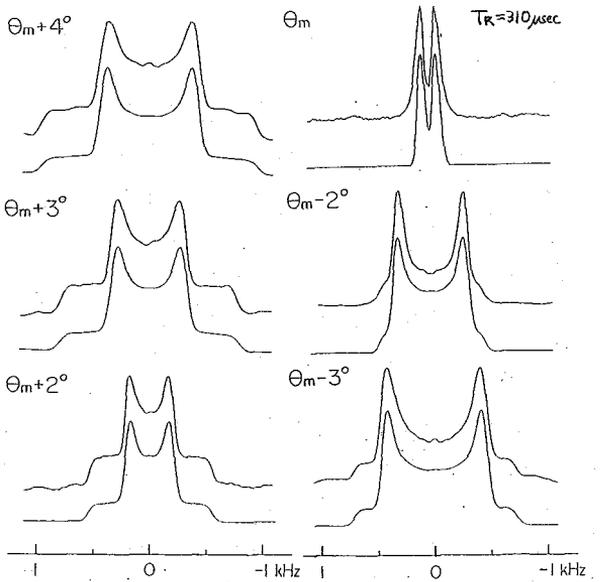


図6. ギ酸カルシウムのCH双極子相互作用SASSスペクトル(上)とそのシミュレーション(下)

(CPMAS スペクトル)

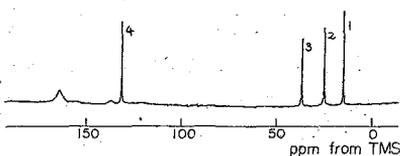
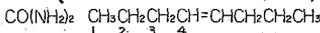
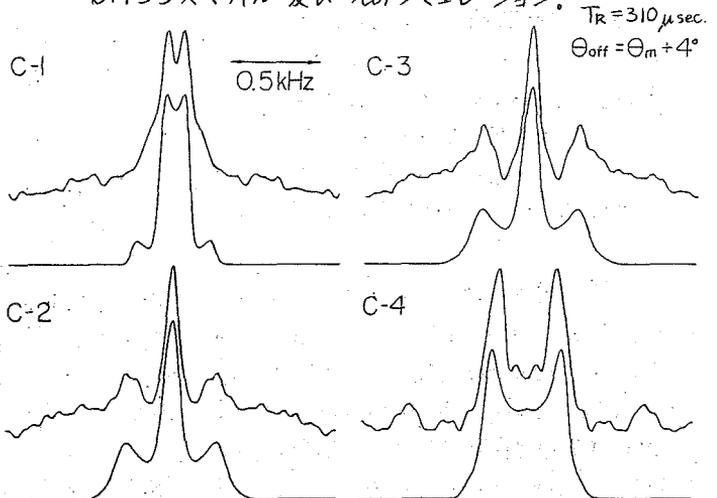


図7. 尿素に包接された4オクテンの双極子相互作用SASSスペクトル及びそのシミュレーション。



configurationが \uparrow および \downarrow の場合に対応しており, simulationではこのピークの強度も0.5倍にした。

《化学シフト双極子相互作用相関スペクトル》

図8 a, bに示すのはギ酸カルシウムにおける ^{13}C 化学シフト双極子相互作用相関 spinning side pattern およびその simulation である。また図9は, $\theta_{\text{off}} = \theta_m$ として観測したものとその simulation および静止した試料の powder pattern (計算) である。図9の各々の side band は J_{CH} によって分裂している。また包絡線は静止した試料の powder pattern の形に対応している。複数の相互作用テンソルが存在する場合は, これらの例で示した side pattern 及びそれらの包絡線は, テンソルの主値及び相対的な方向によって形を変える。図8と図9のスペクトルの形は, Waughらによってこの化合物の単結晶の測定結果から得られた, 化学シフトテンソルとCH結合との相対的な方向に関する結論によく一致している。

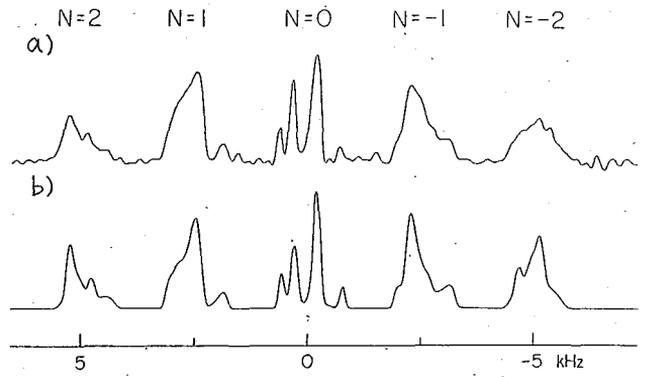


図8. ギ酸カルシウムの off-magic angle $\theta_{\text{off}} = \theta_m + 3^\circ$ 化学シフト双極子相互作用相関スペクトルおよび computer simulation.

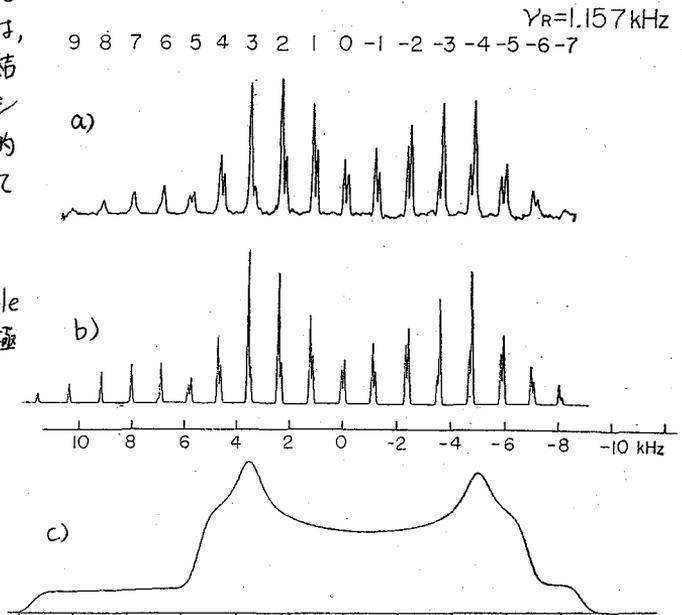


図9. ギ酸カルシウムの magic-angle spinning a) としての, 化学シフト双極子相互作用相関スペクトルとその simulation (a) と b)). c) は静止した試料の化学シフト双極子相互作用相関 powder pattern. 図8および図9の simulation は文献(5)の parameter を用いた。

《 参考文献 》

(1) T. Terao, H. Miura, A. Saika, (a) J. Chem. Phys. 75, 1573 (1981), (b) J. Magn. Reson. 49, 365 (1982), (c) J. Am. Chem. Soc. 104, 5228 (1982). (2) T. Terao, T. Fujii, T. Onodera, and A. Saika, Chem. Phys. Lett. 107, 145 (1984). (3) 寺尾武彦, 三浦 篤, 小野尚尚, 藤井拓, 雑俊重博, 第23回 NMR 討論会要旨集 P49. (4) S. Pausak, J. Tegenfeldt, and J. S. Waugh, J. Chem. Phys. 61, 1338 (1974). (5) J. L. Ackerman, J. Tegenfeldt, and J. S. Waugh, J. Am. Chem. Soc. 96, 6843 (1974).

固体¹³C NMRによる尿素包接化合物中のアルカンの化学シフトと運動性

(京大理) 今城文雄 中井利仁 ○前田利之 三浦等
寺尾武彦 雑賀亜悦

§1. *n*-アルカンとその誘導体の尿素包接化合物のNMRによる研究は種々の核種や方法について行われてきているが、ゲスト分子であるアルカン類の構造や運動の様式について全ての報告が一致しているわけではない。一つの理由として特定の部位の情報のみをとり出すことが容易でないことがある。そこで固体¹³C NMR法を用いて基本的な化合物である*n*-アルカンの尿素包接化合物について¹³C化学シフト(等価平均値)を測定して、他の状態での値と比較し、また主鎖の長さによる変化を調べて包接格子内での*n*-アルカンの構造を考察した。さらにアルカンの分離された各炭素位置でのCH双極子スペクトルを測定して各位置での双極子相互作用の違いについて考察した。

§2. C₇H₁₆ から C₁₈H₃₈ までの *n*-アルカン を尿素のメタノール飽和溶液から再結晶させて包接化合物を合成した。¹³C CPMAS NMR スペクトルは自作の装置(22.6 MHz)を用いて常温で測定した。混合時間は 8 ms であり、くり返し時間は 3 s、積算回数は 300-3000 回である。この条件下では尿素の炭素原子の信号は明確には測定できなかった。¹³C 化学シフトはローター内にペレットとして試料と混ぜたアダマントンの信号を基準として鏡みヒリ TMS からの ppm 値に換算した。CH 双極子スペクトルは *n*-オクタンの尿素包接化合物について同じ装置を用いて SA

SS 法により常温で測定した。混合時間は 4 ms、くり返し時間は 2.5 s、マジック角からのずれ(θ_{off})は 8° で回転周期(t_r)は 310 μs で t_r を同期させて 60 点での測定を行った。

§3-1. ¹³C 化学シフト。包接化合物中の *n*-アルカンの炭素核の信号は 4 或は 5 本が分離観測できた。化学シフトの帰属は強度等より高磁場側から C₁, C₂ (C₄(C₅以上), C₃) とできる。末端から 3 番目の位置のスペクトルが分離観測できるのは ¹³C CPMAS NMR の長所である。得られた ¹³C 化学シフトは表 1 に示した。C₁-C₄ の炭素の化学シフトを鎖の長さに対してプロットしたのが図 1 である。また参考として溶液状態と固体状態での *n*-アルカンの ¹³C 化学シフトをそれぞれ表 2 と表 3 に示した。図 1 より全ての位置

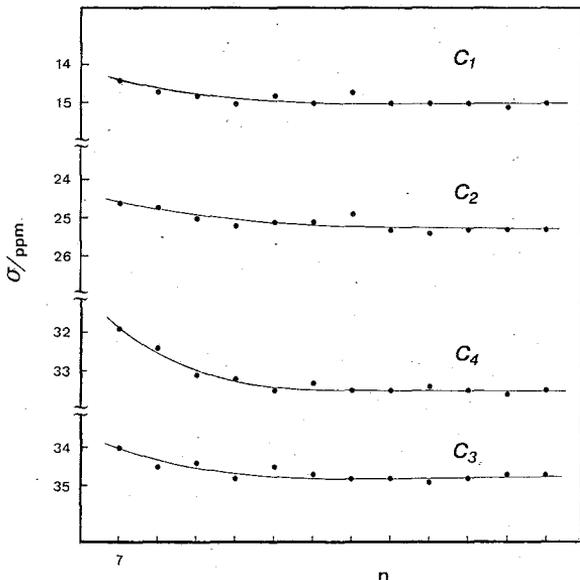


図 1. 尿素包接化合物中の *n*-アルカン (C_nH_{2n+2}) における C₁-C₄ 炭素の ¹³C 化学シフトの炭素数 (n) による変化

いましろ ふみお, なかい としむと, まえだ としゆき, みうら ひとし,
てらお たけひこ, さいか あづろ

表1. 尿素包接化合物における n -アルカンの ^{13}C NMR 化学シフト^a とパラメータ

$\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$	C_1	C_2	C_3	C_4	$\text{C}_5\dots$	B	A_α	A_β	A_γ
$n=7$	14.4	24.6	34.0	31.9	-	-3.1	10.2	9.4	-2.1
8	14.7	24.7	34.5	32.4	-	-3.0	10.0	9.8	-2.1
9	14.8	25.0	34.4	33.1	33.1	-3.5	10.2	9.4	-1.3
10	15.0	25.2	34.8	33.2	33.2	-3.2	10.2	9.6	-1.6
11	14.8	25.1	34.5	33.5	33.1	-3.9	10.3	9.4	-1.0
12	15.0	25.1	34.7	33.3	33.3	-3.3	10.1	9.6	-1.4
13	14.7	24.9	34.3	33.5	32.9	-4.1	10.2	9.4	-0.8
14	15.0	25.3	34.8	33.5	33.5	-3.5	10.3	9.5	-1.3
15	15.0	25.4	34.9	33.4	33.4, 34.0	-3.3	10.4	9.4	-1.5
16	15.0	25.3	34.8	33.5	33.5	-3.5	10.3	9.5	-1.3
17	15.1	25.3	34.7	33.6	33.6	-3.4	10.2	9.4	-1.1
18	15.0	25.3	34.7	33.5	33.5	-3.5	10.3	9.4	-1.2

^a TMSからのppm値

表2. 溶液状態における n -アルカンの ^{13}C NMR 化学シフト^a とパラメータ

$\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$	C_1	C_2	C_3	C_4	$\text{C}_5\dots$	B	A_α	A_β	A_γ
$n=7^b$	13.8	22.8	32.2	29.3	-	-1.7	9.0	9.4	-2.9
8^b	13.9	22.9	32.2	29.5	-	-1.7	9.0	9.3	-2.7
8^c	13.9	22.7	31.9	29.3	-	-1.5	8.8	9.2	-2.6
9^b	13.9	22.9	32.3	29.7	30.0	-1.9	9.0	9.4	-2.6
10^b	14.0	22.8	32.3	29.8	30.1	-1.8	8.8	9.5	-2.5
18^c	14.0	22.6	31.9	29.6	29.7	-1.6	8.6	9.3	-2.3
19^d	14.05	22.6	31.89	29.65	29.65	-1.55	8.57	9.27	-2.24
20^d	14.05	22.6	31.89	29.65	29.65	-1.55	8.57	9.27	-2.24

^a TMSからのppm値. ^b ジオキサン中. E.G. Paul, D.M. Grant, J. Am. Chem. Soc., **85**, 1701 (1963). ^c CDCl_3 中. ^d CCl_4 中. D.L. VanderHart J. Magn. Reson., **44**, 117 (1981).

表3. 固体状態における n -アルカンの ^{13}C NMR 化学シフト^a とパラメータ

$\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$	C_1	C_2	C_3	C_4	$\text{C}_5\dots$	B	A_α	A_β	A_γ
$n=19$	14.81	24.99	34.91	33.66	33.66	-4.04	10.18	9.92	-1.25
23	15.06	25.59	35.06	33.62	33.62	-3.50	10.53	9.47	-1.44
32	15.25	25.53	35.08	33.66	33.66	-3.16	10.28	9.55	-1.42
Av. ^b	15.0	25.4	35.0	33.6	33.6	-3.6	10.4	9.6	-1.4

^a TMSからのppm値, D.L. VanderHart. J. Magn. Reson. **44**, 117 (1981).
^b 平均値

での炭素の化学シフトの鎖の長さの増加とともに低磁場側に移動している。特にC₄についての値の変化が顕著であるが、それでもn=11以上の長さではほぼ一定の値をとっている。溶液状態でのn-アルカンの¹³C化学シフトについては加減則が成立して各番目の炭素の化学シフトδC_kは次式で表わされる。

$$\delta C_k = B + \sum_l A_l n_{kl}$$

ここでBは定数、A_lはkからl番目の炭素原子(その数n_{kl})の寄与を表わすパラメータである。通常lとしては0位までが考えられているが、ここではγ位までの寄与を考える。それぞれの化学シフトから求めたパラメータ(B, A_l)の値は表1-3に示してある。Bの値は溶媒などまわりの環境からの寄与を含む定数であって表1-3の3つの状態のそれぞれで一定の値をとっているが、A_lは分子内、即ちコンホメーションの違い或いは種々のコンホメーションの寄与の程度を反映している。このことは特にA_γの値に影響を及ぼすはずであり、実際3つの状態でも大きく異なっているのがA_γである。一方A_βの値は3つの状態ではほぼ等しいが、A_αの値は少し異なっていて包接化合物中の値は固体状態での値に近い。A_γの値は鎖の長さによる違いも顕著でA_γ(n=7)の値(-2.1)は溶液状態での値に近いが、A_γ(n≥9)では固体状態での値に近づいていく。固体n-アルカンはその回転相(II相)において低濃度のゴーゼ型存在が認められている。従って尿酸包接化合物中の高級アルカンのコンホメーションは全トランス形であると考えられるが、n=7,8の低级アルカンではもう少し自由度の大きい状態にあると考えられる。

表4. 尿酸包接化合物中におけるn-C₈H₁₈のCH双極子スペクトルのパラメータ

	R _{CH} /Å	D/kHz	J/Hz	R ^a
C ₁ -H	1.11	22.1	125	-0.15
C ₂ -H	1.12	21.5	125	-0.45
C ₃ -H	1.12	21.5	125	-0.48
C ₄ -H	1.12	21.5	125	-0.50

^a 減少因子(D'/D)

した。また図3にシミュレーションスペクトルを示したが、ここでは速い分子運動によって減少した双極子相互作用の大きさ(D')を仮定し、全てのCHのJ値を+125Hzとし、γfによるスケールリング因子を0.415とθ_{off}による因子(-0.185)から計算した。ただし双極子相互作用による分裂を示さないメチレン基の中心ピークの強度は理論値の0.354倍とした。MM2分子力場計算によるCH核間距離(R_{CH})とそれから得られるCH双極子相互作用の大きさD = γ_Hn_H/2πR_{CH}³、そして減少因子R = D'/D等を表4に示した。メチレン基のR値の絶対値はC₄が最大でC₂へと順に少しずつ減少している。²Hのスペクトルでは内部メチレン基と同じ寄与を示すと考えられていた²C₃の環境はC₄とは異なることが示されている。包接されているn-C₈H₁₈分子のコンホメーションが全トランスであって長軸ま

§3-2. CH双極子相互作用.

包接化合物中のn-アルカンの¹³C化学シフトが4種以上分離して観測されることからSASS法を適用することにより各部位での相互作用を二次元的に分離できる。ここではゲスト分子としてn-C₈H₁₈のCH双極子スペクトルの測定を試みた。この分子では化学シフトとして独立した炭素核は4種であって全ての位置でのCH双極子相互作用を分離できる。測定結果は図2に示

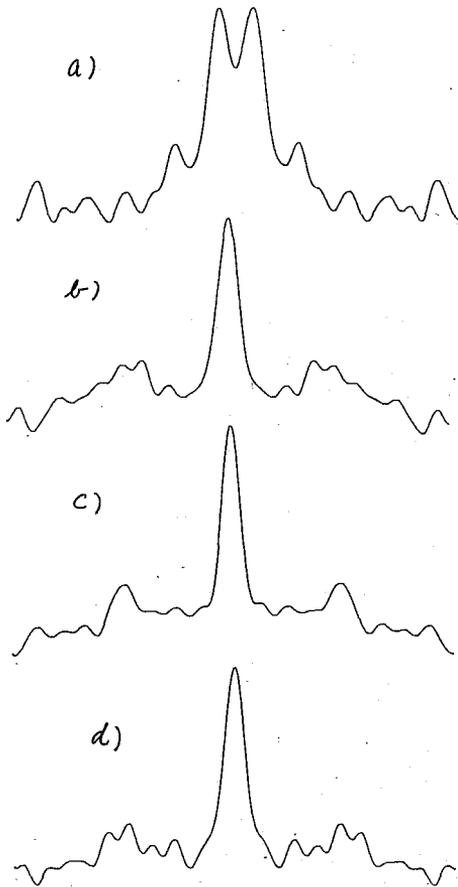


図2. 炭素包接化合物における
 $m\text{-C}_8\text{H}_{18}$ のCH双極子スペクトル。
 a) C_1 , b) C_2 , c) C_3 , d) C_4 .

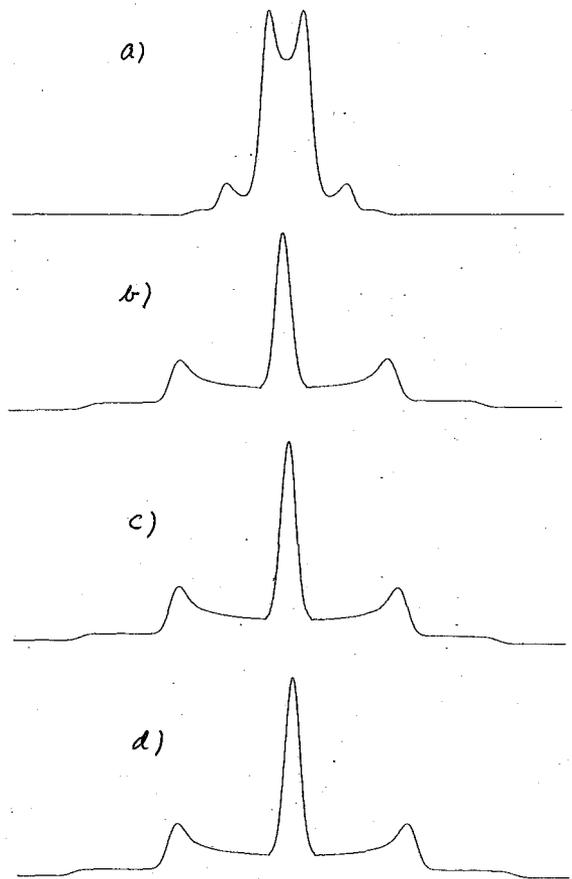


図3. シミュレーションスペクトル。
 a) C_1 , b) C_2 , c) C_3 , d) C_4 .

わりに速い回転を行なっているとするとメチレン基のCHバクトルは分子の長軸と 90° の角をなすので $R = P_2(\cos 90^\circ) = -0.5$ となる。末端のメチル基はその対称軸のまわりに速い回転 ($\angle C_2C_1H = 111^\circ$) をしてさらに分子軸まわりの回転を考えるとMMスカラ計算から C_2-C_1 軸と分子軸のなす角は 34° であるから $R = P_2(\cos 111^\circ) \cdot P_2(\cos 34^\circ) = -0.16$ となり、実測値 (-0.15) はこの値よりわずかに小さいが C_2 や C_3 のメチレン基の減少の程度と大差はなく、メチル基が特別な運動をしているとは考えにくい。即ち、 C_2-C_3 軸のねじれによるゴースト形への移行は C_3-C_4 結合の逆方向のねじれにより短軸方向のかさばりをなくすることからできる。これにより C_2 及び C_3 のCHバクトルが長軸となす角が 90° より傾いたためR値がより減少することになる。これらのねじれでは C_4 のCHバクトルの方向は影響を受けない。

1. T. Terao, T. Fujii, T. Onodera, and A. Saika, *Chem. Phys. Lett.*, **107**, 145 (1984), 寺尾, 三浦, 穂實, 本討論会 講演番号 B11.
2. H. H. Carroll, D. G. Cameron, E. C. Kelceby, *J. Chem. Phys.*, **80**, 1407 (1984).

(化技研) 〇林 繁信・早水紀久子・山本 修

(電総研) 山崎 聡・松田 彰久・田中 一宜

< 序 >

アモルファスシリコン ($\alpha\text{-Si:H}$) 及び微結晶シリコン ($\mu\text{c-Si:H}$) は電子デバイスとして注目されている材料であり、結晶シリコンのスパッタリングや SiH_4 ガスのグロー放電分解によって作製されている。 $\alpha\text{-Si:H}$ 及び $\mu\text{c-Si:H}$ の構造についてはいろいろと研究がなされているが、まだ不明な点が多い。

^1H NMR を用いていくつかのグループが $\alpha\text{-Si:H}$ における水素の分布状態を調べている。その結果、分散状態の異なる2種類の水素の存在が明らかになった。一方、 $\mu\text{c-Si:H}$ には $\alpha\text{-Si:H}$ 中の水素とは性質の異なる水素、即ち、motional narrowing している水素が含まれていることが ^1H NMR によって示されている。

^1H に比べ、 ^{29}Si 核を観測したという報告はきわめて少ない。現在までに、クロスポーラリゼーション (CP) / マジックアングルスピニング (MAS) 法を $\alpha\text{-Si:H}$ の ^{29}Si 核に適用したという報告が数報あるにすぎず、スペクトルの解釈がまだできていない。

本研究では、 $\alpha\text{-Si:H}$ 及び $\mu\text{c-Si:H}$ の ^{29}Si NMR スペクトルの測定を CP, MAS 法を併用して行ない、さらに ^1H 核のスペクトルも測定した。これらの結果から、 ^{29}Si スペクトルのシフト値や線幅について考察し、 $\alpha\text{-Si:H}$ 及び $\mu\text{c-Si:H}$ の構造について検討した。

< 実験 >

$\alpha\text{-Si:H}$ 及び $\mu\text{c-Si:H}$ は SiH_4 ガスのグロー放電分解によってアルミニウム基板上に製膜した。製膜条件を表1に示した。全ガス圧は 50 mTorr である。 $\mu\text{c-Si:H(D)}$ の微結晶の平均直径は約 90 Å であり、全体の 40% が結晶相、残りがアモルファス相である。アルミニウム基板を塩酸で溶かした後、NMR 用試料とした。

NMR 測定には、ブルカ-CXP-100 を主に用い、一部、日本電子 FX-200 を用いた。 ^{29}Si 及び ^1H 核の共鳴周波数はそれぞれ、CXP-100 で 17.89, 90.03 MHz, FX-200 で 39.60, 199.51 MHz である。MAS 用ローターはデルリンもしくは Kel-F 製を用い、回転速度は約 3.5 kHz とした。測定温度はすべて室温である。

< 結果 >

図1に ^1H と ^{29}Si スピン間のクロスポーラリゼーション (CP) と ^1H の双極子デカップリング (DD) を行なって測定した ^{29}Si 核のスペクトルを示した。CP のコンタクト時間を 5 msec, くり返し時間を 15 sec とした。

図2に、CP/DD にさらに MAS 法を併用して測定したスペクトルを示した。

表1. 製膜条件

Sample	Flow rate of SiH_4 (SCCM)	H_2/SiH_4 ratio	Discharge power (W/cm^2)	Substrate temperature ($^{\circ}\text{C}$)
$\alpha\text{-Si:H(A)}$	5	0	0.02	250
$\alpha\text{-Si:H(B)}$	5	0	0.02	r. t.
$\alpha\text{-Si:H:P(C)}$ ^a	5	0	0.02	250
$\mu\text{c-Si:H(D)}$	1	19/1	0.8	350

^a $\text{PH}_3/\text{SiH}_4 = 0.10$

はやし しげのぶ, はやみず きくこ, やまもと おさむ, やまさき さとし,
まつだ あきひさ, たなか かずのぶ

対応する CP/DD スペクトルに比べ線幅が狭くなっているが、著しく狭くなることはない。

次に、CP法を用いないで通常の単パルス法で測定を行った。α-Si:Hではシグナルを検出できなかったが、μC-Si:H(D)において検出することができた。図3にそのスペクトルを示す。パルスのフリップ角を45°、くり返し時間を60 secとした。くり返し時間を2 secにするとシグナルの検出はできなかった。このことから、図3のシグナルのT₁は100 sec程度と考えられる。一方、α-Si:Hの²⁹Si核のT₁は数百 sec以上である。

図3ではMASもしくはDDを併用して測定したスペクトルを示したが、DDが線幅に影響しないのに対し、MASは線幅を約16 ppm減少させている。また、どのスペクトルもCPを用いたスペクトルに比べて線幅が非常に狭くなっている。測定周波数をほぼ2倍にして39.60 MHzで測定を行ったところ、ピーク位置は変わらず、線幅は約2倍(ppm単位では一定)になった。

以上の²⁹Si NMRの結果を表2にまとめた。

図4に通常の単パルス法で測定した¹H NMRスペクトルを示した。くり返し時間を15 sec以上にとった。どのスペクトルも線形及び線幅の異なる2成分から成っている。そこで、線幅の狭いローレンツ型成分と線幅

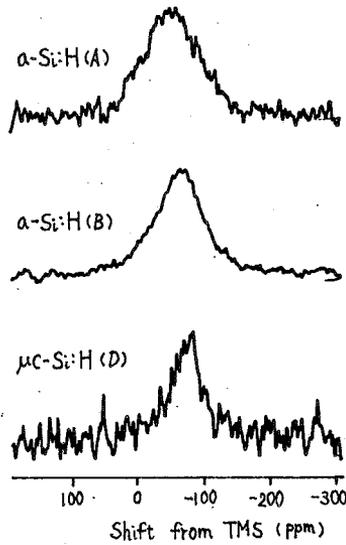


図1. ²⁹Si CP/DD NMR スペクトル (17.89 MHz)

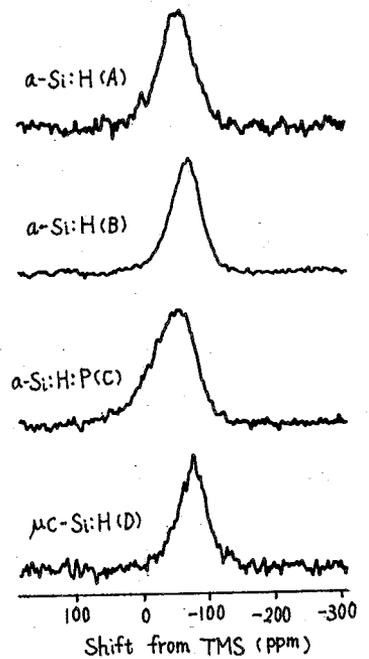


図2. ²⁹Si CP/MAS/DD NMR スペクトル (17.89 MHz)

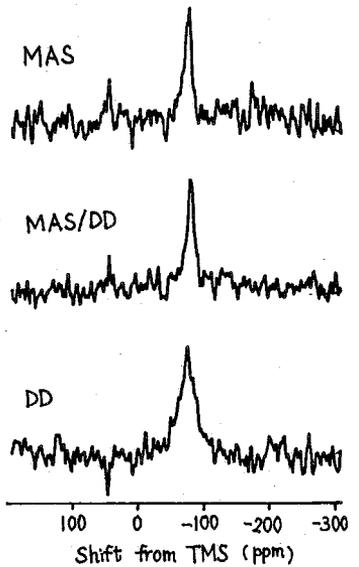


図3. 通常の単パルス法により測定したμC-Si:H(D)の²⁹Si NMR スペクトル (17.89 MHz)

表2. ²⁹Si NMRの結果^a

Sample	Measuring mode	Shift ^b (ppm)	Width ^c (ppm)
α-Si:H(A)	CP/DD	-83	98
	CP/MAS/DD	-56	58
α-Si:H(B)	CP/DD	-79	78
	CP/MAS/DD	-74	51
α-Si:H:P(C)	CP/MAS/DD	-56	78
μC-Si:H(D)	CP/DD	-83	52
	CP/MAS/DD	-83	43
	MAS	-79	9
	MAS/DD	-80	9
	DD	-78	25
	MAS ^d	-80	9
MAS/DD ^d	-80	9	

^a Resonance frequency is 17.89 MHz, unless noted.

^b Peak position relative to TMS, the error of which is about ±2 ppm.

^c Full width at half maximum, the error of which is about ±2 ppm.

^d Resonance frequency is 39.60 MHz.

の広いガウス型成分とに分離した。その結果を表3にまとめた。水素量は、スペクトルの積分により相対的水素量を求めた後、昇温脱離によってキヤリブレーションした。

表3. ^1H NMRの結果

Sample	FWHM (kHz) ^a		Fraction (%) ^b		CH (%) ^c
	narrow	broad	narrow	broad	
a-Si:H(A)	3.5	28	48	52	16
a-Si:H(B)	4.3	36	13	87	40
a-Si:H:P(C)	4.4	29	41	59	13
$\mu\text{C-Si:H(D)}$	0.49	22	57	43	10

^a Measured at $\nu_0 = 90.03$ MHz, and the error is about 10% of the value.

^b The error is about 10%, except for a-Si:H(B) where the error is about 5%.

^c The ratio of H to Si(+P) atoms.

基板温度の高い a-Si:H(A) と a-Si:H:P(C) では2成分がほぼ等量存在するが、基板温度の低い a-Si:H(B) では広い方の成分が非常に多い。一方、 $\mu\text{C-Si:H(D)}$ の狭い方の成分の線幅は非常に狭く、motional narrowing している。

< 考察 >

^{29}Si CP NMR スペクトルのシフト値 図2に示した C

P/MAS/DD スペクトルのピーク位置は a-Si:H(A) -56 ppm, a-Si:H(B) -74 ppm, a-Si:H:P(C) -56 ppm, $\mu\text{C-Si:H(D)}$ -83 ppm である。

従来は、SiH と SiH₂ の2種類の結合の仕方によってシフト値の説明が試みられたが、うまく説明がついていない。

ところが、本研究において ^{29}Si のシフト値が ^1H スペクトルの線形とよく対応していることを見出した。

^1H NMR よりシリコン膜に2種類の領域—DI, CL領域と呼ぶ—が存在することが示されている。DI領域は ^1H スペクトルの狭い成分に対応しており、SiH種が分散して存在している。一方、CL領域は広い成分に対応しており、SiH, SiH₂種がかたまった状態で存在している。

^{29}Si スペクトルは、DI領域が -40 ppm, CL領域が -80 ppm を中心としたシグナルを持つと仮定すると、図5のようによく解釈できる。 $\mu\text{C-Si:H(D)}$ において非常に線幅の狭い成分は motional narrowing しているため CPは無効であり、その領域の ^{29}Si

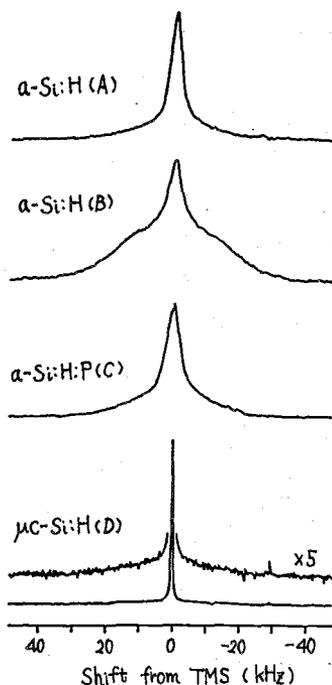


図4. ^1H NMR スペクトル (90.03 MHz)

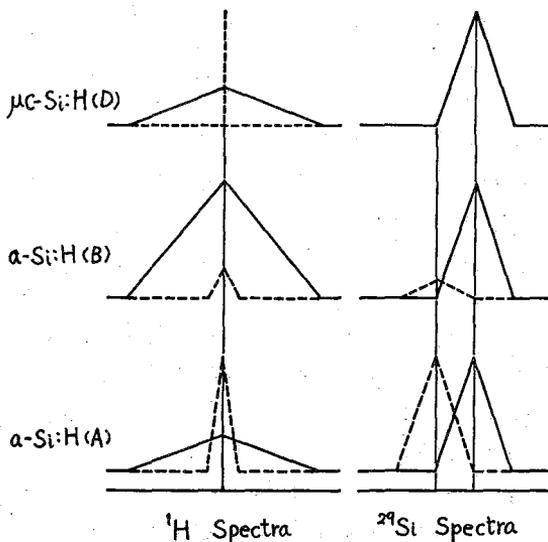


図5. ^{29}Si CP/MAS/DD スペクトルと ^1H スペクトルとの関係の模式図。

は観測されない。¹Hスペクトルで4 kHz程度の線幅を示すDI領域は $\mu\text{C-Si:H(D)}$ には無く、CL領域の²⁹Siのみが観測されるため-80 ppm付近にピークを持つ。 $\alpha\text{-Si:H(B)}$ ではCL領域が大きく-80 ppm付近に大きなシグナルを示すが、DI領域が存在するため少し低磁場側にピークがシフトする。 $\alpha\text{-Si:H(A)}$ ではCL、DI両領域がほぼ等量存在するため両領域のシグナルの中間、-60 ppm付近にピークを示す。 $\alpha\text{-Si:H(A)}$ の線幅が $\mu\text{C-Si:H(D)}$ や $\alpha\text{-Si:H(B)}$ に比べて広いのは、CL、DI両領域のシグナルが重なっているためと解釈される。また、 $\alpha\text{-Si:H:P(C)}$ は $\alpha\text{-Si:H(A)}$ とピーク位置が一致するが¹Hスペクトルの線形が $\alpha\text{-Si:H(A)}$ とほぼ同じであることから、上述のモデルで解釈できる。

シフト値を決める要因として、ケミカルシフトとナイトシフトが考えられるが、後者は今回の²⁹Siスペクトルでは無視できる。もしナイトシフトがあるならば、 $\alpha\text{-Si:H:P(C)}$ はPのドーピングによって $\alpha\text{-Si:H(A)}$ に比べ低磁場側にシフトするはずであるが、実際にはピーク位置は変化していない。また、 τ_1 が非常に長く伝導電子との相互作用によるスピン-格子緩和がみられないことから、ナイトシフトが数 ppm以下と見積もられる。

シリコン膜中ではSi原子が網目構造を形成して無限につながっており、しかもH原子とのつながり方がランダムであるため、特定の構造単位を抽出するのは困難である。第1近傍の結合原子のみに着目すると $\text{Si}^*\text{Si}_{4-n}\text{H}_n$ という分類ができるが、¹³C NMRのシフト値からよく知られているように、第2、第3近傍の結合原子の影響を無視できない。上述のモデルでは、第1近傍より遠い位置にある原子の影響も含めて水素原子の空間分布状態で考慮しており、水素の空間密度が高いほど高磁場側にシフトすることになる。

²⁹Si CP NMR スペクトルの線幅

表4にSi-H系における²⁹Si NMRの線幅を決める要因をあげた。Dipole-dipole interaction, bonding conformation, magnetic susceptibilityの値は計算値であり、scalar couplingの値は文献値である。bonding configuration及びshift anisotropyの値はスペクトルから得た値であり、製膜条件によってバラつきが見られる。

$\mu\text{C-Si:H}$ における“動く”Si

$\mu\text{C-Si:H}$ (D)ではCPを用いずに²⁹Siシグナルが検出された。この²⁹SiはCPスペクトルに現われた²⁹Siとは別種のものであり、CPが有効に働いていない。 $\mu\text{C-Si:H}$ には motional narrowingした¹Hが含まれており、前述の²⁹Siはこの¹Hと結合して運動していると考えられる。この運動により²⁹Siの τ_1 が短くなっている。また、MASによる線幅の変化が見られることから、完全に自由な運動ではないことがわかる。

この“動く”Siとして、端をピン止めされた SiH_2 鎖のような構造が考えられる。

表4. Si-H系の²⁹Si NMRの線幅

Mechanism	Magnitude ^a	Method of elimination	
Dipole-dipole interaction	²⁹ Si- ¹ H	7 kHz ^b	DD, (MAS) ^c
	²⁹ Si- ²⁹ Si	180 Hz ^b	MAS
Chemical shift dispersion (bonding configuration) (bonding conformation)	10-20 ppm 30 ppm	impossible impossible	
Chemical shift anisotropy	0-26 ppm	MAS	
Bulk magnetic susceptibility	2 ppm	MAS	
Scalar coupling ²⁹ Si- ¹ H	200 Hz	DD	

^a Widths expressed in unit of ppm are proportional to the applied magnetic field, while those in Hz are independent of the field.

^b SiH bonded to the silicon network is assumed.

^c MAS can eliminate width less than the rotation speed of the rotor.

(日大文理) 千葉雄彦 宮島清一

γ の小さな核種や存在比の小さい核のNMRへの利用のうち弱小スピンの関わる緩和現象の研究は興味ある分野である。都合のよい系の場合これは共存する強力なスピンのたすけをかりて観測することができ、この種の測定では緩和効果の大きい T_{1D} や $T_{1\rho}$ によることが必要である。われわれは今回 ^{17}O 核を含む硫酸アンモニウム(ASと略す)について、 SO_4^{2-} イオンの運動が ^{17}O スピンとHの相互作用を通してHの低磁場緩和に及ぼす影響を観測し、このイオンの運動について知見を得た。

^{17}O 濃縮ASは $\text{H}_2\text{O}^* + \text{excess Br}_2 \rightarrow \text{SO}_2$ を通じて作った H_2SO_4 に NH_3 を吸収させて作り、メタノール水混媒から再結晶した。試料の SO_4^{2-} 中の ^{17}O 濃度は D_2O 溶液の高分解能 ^{17}O NMRにより決めた。 ^{17}O 濃度2.4%及び20%の水を用いて夫々0.8%及び7.3%濃度の試料を得た。以下0.8% ^{17}O の試料を試料A, 7.3%のものを試料Bとよぶことにする。

測定は自作のパルス法装置で行った。Spin lockingはadiabatic passageを用い、静磁場はrf源の周波数で ^1H シグナルを用いてlockした。

硫酸アンモニウムは高温の常誘電相と低温の強誘電相の間に $T_c = 223\text{K}$ の一次相轉移があり、 ^1H , ^2D のNMRについては多くの報文がある。低温相では2つの非等価な NH_4^+ の再配向運動について別々に活性化エネルギー E_a が得られ、para相での平均の E_a はそれより少し小さい。高温では NH_4^+ の拡散による $T_{1\rho}$, T_{1D} の急激な低下が起る。森本らは最近通常のAS試料についてわれわれと同様な ^{17}O の効果報告している⁽¹⁾。

通常のAS, ^{17}O 濃縮試料A及びBについて30MHzで測定した T_{1D} の結果をFig. 1に示す。通常試料では常温 $\sim T_c$ 間のpara相の $\log T_{1D}$ vs $1/T$ は直線とならず僅に下側になるんだ曲線となり、森本らはこれを天然存在比の ^{17}O によるものとしたが、この効果は ^{17}O 濃縮試料では $\sim 250\text{K}$ に極小のある顕著な T_{1D} の低下として現れる。その効果はA, B試料で ^{17}O 濃度にはほぼ比例している。又高温領域でも ^{17}O 濃度にはほぼ比例した減少が観測されたが、この原因については現在解明できていない。

試料Aについて予備的に測った T_{1D} は30MHzと異った値を示し顕著な H_0 依存性のあることが判った。そこで効果の大きい試料Bにつき30MHzと10MHzで T_{1D} , $T_{1\rho}$ を全領域で測定し(Fig. 1~3)、この結果にもとづいて SO_4^{2-} イオンの運動とそれによる緩和機構について検討した。Fig. 1~3にみられる T_{1D} , $T_{1\rho}$ の特徴は① 30MHz, 10MHzで大きく異り、 H_0 依存性の大きいこと。② 30MHzの $T_{1\rho}$ 曲線に2つの極小がみられ、 H_1 の増大に伴って左斜め上に平行移動する。(二極小の間隔は一定) ③ これに対し10MHzでは一つの極小のみみられない。④ T_{1D} と $T_{1\rho}$ では T_c での変化の様子が異なる。

以後の解析ではHをIスピン、 ^{17}O をSスピンとする。緩和の H_0 依存性からSスピンの四重極緩和の寄与が示唆されるが、 SO_4^{2-} の ^{17}O eq Q/Rの値として数MHz程度と仮定すると、本実験の条件下ではゼーマン項とcomparableで、 SO_4^{2-} 再配向運動によって強い四重極

ちばたけひこ・みやじませいいち

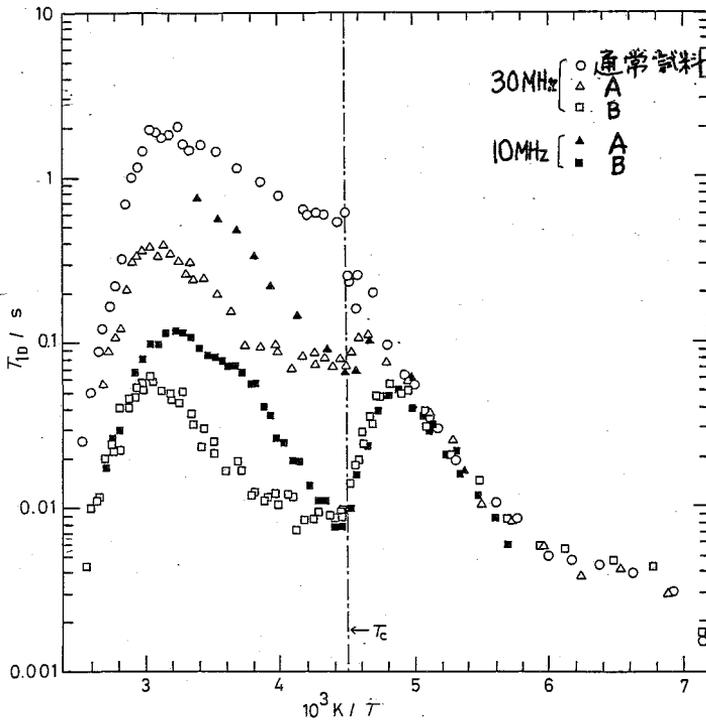


Fig. 1 T_{1D}

緩和が起る筈である。S スピンに単一の T_{1S} を仮定し、I-S 双極子相互作用が SO_4^{2-} の再配向運動による変動と T_{1S} による S_z の変動の両方の作用をうけるとして緩和の式を立てる。

SO_4^{2-} 再配向運動の相関時間を τ_c とすると、 T_{1S} は考えている温度範囲では

$T_{1S}^{-1} = \alpha \tau_c^{-1}$ (α はより小さな係数) とすると、 T_{1D} については回転系 I スピン間相互作用 $\mathcal{H}_0 = \gamma_I \hbar^2 \sum_{ij} a_{ij} (I_i \cdot I_j - 3I_{iz} I_{jz})$, 又 T_{1D} については $H_1 \gg H_L$ (H_L は回転系局所場) の場合として回転系ゼーマン項

$\mathcal{H}_0 = -\gamma_I \hbar H_L \sum I_{ix}$ をとる。
擾動項は $\mathcal{H}_1(t) = \gamma_S \hbar^2 \sum_{k,l} c_{lk} I_{lz} S_{kz}$
こゝに k は S スピンの番号である。

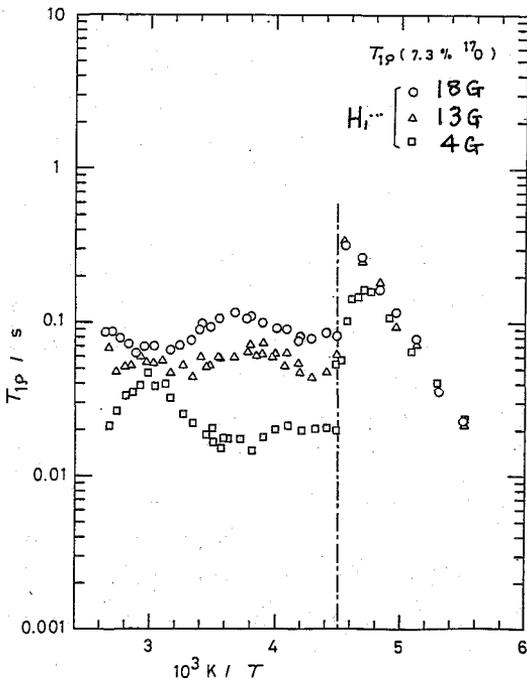


Fig. 2 30MHz の T_{1P} (試料 B)

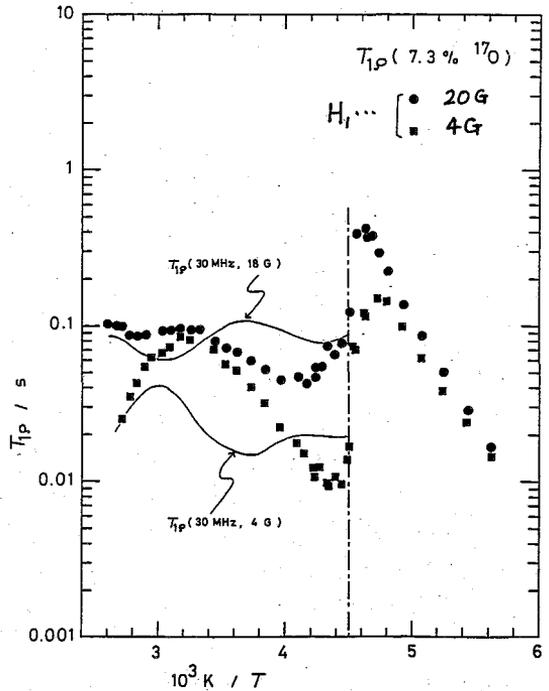


Fig. 3 10MHz の T_{1P} (試料 B)
曲線は 30MHz のときを示す

又 a, c は $a_{ij} = \frac{1}{2}(3\cos^2\theta_{ij} - 1)/r_{ij}^3$, $c_{ik} = (3\cos^2\theta_{ik} - 1)/r_{ik}^3$.

$\mathcal{H}(t)$ の time dependence は $c_{ik} = c_{ik}^0 + c_{ik}(t)$ 及 $i'' S_{kz}(t)$ の双方に含まれるので緩和式の式は $c_{ik}^0 S_{kz}(t)$ を含む項と $c_{ik}(t) S_{kz}(t)$ を含む項に分けられる。

$c_{ik}^0 S_{kz}(t)$ 項からは T_{IS} を相関時間とする緩和式 $T_{ID}^{(1)}$, $T_{IP}^{(1)}$ が導かれる。ここで S スピンの緩和が充分強く, S は格子の一部と考慮して $S_{kz}(t) S_{kz}(0) = \frac{1}{2} S(S+1) e^{-t/T_{IS}}$ の相関関数を仮定している。

$$(T_{ID}^{(1)})^{-1} = \frac{1}{18} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) j(\omega_I) G f_S \dots (2)$$

$$\therefore G = \sum_{ij} a_{ij}^2 \left\{ \sum_k (c_{ik}^0 - c_{jk}^0)^2 \right\} / \sum_{ij} a_{ij}^2 \dots (3) \quad j(\omega) = 2T_{IS} / (1 + \omega^2 T_{IS}^2) \dots (4)$$

同様にして $(T_{IP}^{(1)})^{-1} = \frac{1}{18} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) j(\omega_I) G_1 f_S \dots (5)$

$$\therefore G_1 = \left\{ \sum_k (c_{ik}^0)^2 \right\} / n \dots (6), \quad f_S \text{ は } ^{17}\text{O} \text{ の濃度, } n \text{ は } I \text{ スピンの数である.}$$

次に $c_{ik}(t) S_{kz}(t)$ 項による $T_{ID}^{(2)}$, $T_{IP}^{(2)}$ の取扱いは, c_{ik}, S_{kz} 両方の time dependence の間に相関がないと仮定すると, 相関時間 τ_c' で表わせる。 $\therefore \tau_c' = \tau_c / (1 + \alpha) \dots (7)$

$$(T_{ID}^{(2)})^{-1} = \frac{1}{18} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) j'(\omega_L) G' f_S \dots (8)$$

$$\therefore G' = \sum_{ij} a_{ij}^2 \sum_k \left[\sum_l (c_{il} - c_{jl})^2 - \frac{1}{2} \left\{ \sum_l (c_{il} - c_{il})^2 \right\} \right] / \sum_{ij} a_{ij}^2 \dots (9)$$

$$j'(\omega) = 2\tau_c' / (1 + \omega^2 \tau_c'^2) \dots (10) \quad (\text{L は } S \text{ スピンの } \omega \text{ の } 4 \text{ つの値をあらわす})$$

同様にして $(T_{IP}^{(2)})^{-1} = \frac{1}{18} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) j'(\omega_I) G_1' f_S \dots (11)$

$$\therefore G_1' = \frac{1}{4} \sum_{ik} \left\{ \sum_l c_{il}^2 - \frac{1}{2} \left(\sum_l c_{il} \right)^2 \right\} / n \dots (12)$$

上記の取扱いで $T_{ID}^{(1)}$ は格子の一部とみなした S スピンによる緩和であり, $T_{ID}^{(2)}$ は直接 I-S 結合の異相向運動による変動と, その運動が時々起す S スピンの flip (7式) による緩和和である。 $T_{ID}^{(2)}$ (又は $T_{IP}^{(2)}$) は α を無視すれば ω_L (又は ω_I) $\sim \tau_c'^{-1}$ で極小となり, 又 $T_{ID}^{(1)}$ (又は $T_{IP}^{(1)}$) は ω_L (又は ω_I) $\sim T_{IS}^{-1}$ のとき極小がおこる。 G, G_1 及び G', G_1' は共に最近接 O...H の寄与が支配的であるから同程度の値であり, 従つて2つの極小値もほぼ同程度となるであろう。だが Arrhenius 型の温度依存性を示すとき緩和時間の温度変化は Fig. 4 のようになり, T_{IP} の2つの極小が同程度の深さにあらわれること, 及び H_1 をかえた時に平行移動することを説明できる。

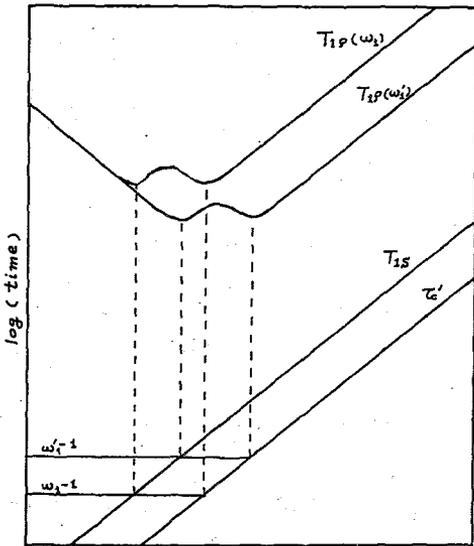


Fig. 4

T_{ID}, T_{IP} の極小値の数値計算にあつては着目した SO_4^{2-} イオンの近傍の O...H 距離 3Å 以内をもつ NH_4^+ イオン及びそれから 5Å 以内の N-N 距離にある NH_4^+ を考慮に入れた。これから粉末試料についての T_{ID}, T_{IP} の値を求めこれを表 1 に示す。実測の極小値上の一一致は満足

できるものである。以上のことから30MHzの T_D にみられる極小は $T_D^{(1)}$ によるもので $T_D^{(2)}$ による極小は相転移のためかくれていると考えられる。

T_S は $T_S^{-1} \propto H_0^2$ とみられ($\omega_s \tau_c \gg 1$ の領域として)、或は四重極項が大きいかう更に強い H_0 依存性が予想され、10MHzでは τ_c に近い値となる。(30MHzでは $T_S \sim 14 \tau_c$) そのような場合2つの機構が別々に緩和を惹起するという取扱いは適用できない。更に四重極項の比重が大きくなるとSスピンの量子化方向が H_0 からズレる効果も予想される。このような困難のため10MHzの結果について定量的解析はできないが、10MHzでは単一の極小が、30MHzのときの低温側の極小に近い温度に見られその値がやや小さくなっていること、又 T_D についても同様の傾向がみられることは定性的には理解できる結果である。

Fig. 1~3の高温側のslopeをArrhenius式 $\tau_c = \tau_0 \exp(E_a/RT)$ にfitさせ E_a と τ_0 を求めた。 τ_0 は T_D の低温側の極小点の温度及び T_D のそれ(想定値)で $\tau_c = \omega^{-1}$ の関係から求めた。 $E_a = 21 \text{ kJ/mol}$, $\tau_0 = 3 \times 10^{-11} \text{ s}$ (森本らの $E_a = 17.2 \text{ kJ/mol}$)でこれらの値は構造の似た $(\text{NH}_4)_2\text{BeF}_4$ の BeF_4^{2-} イオンの再配向の文献値との比較からも妥当と思われる。

τ_c 以下の温度では T_D , T_D から NH_4^+ 運動の寄与を除いた値から $E_a \sim 64 \text{ kJ/mol}$ となる。適当に見積った τ_c 直下の τ_c と、この E_a から、 τ_0 として $\sim 10^{-20} \text{ s}$ と、不当に小さい値が得られる。このようなferro相での E_a の急激な増大と τ_0 の異常に関連して興味あることは NH_4^+ イオンについてO'Reilly等が $T_c \sim 170 \text{ K}$ での大きな E_a 値が更に低温での値と一致せず、 E_a の連続的な変化が起っているためとし、この温度領域での熱膨張率の異常の実験事実もこれに関連していると結論している。(2) 本実験の結果はこれとよく符合しており SO_4^{2-} イオンについても同じ温度領域で E_a の連続的な変化とそれに対応する τ_c の異常な温度変化が起っていることが判った。 τ_c において T_D 値は不連続がみられるが T_D は殆ど連続している。これは T_D の場合は T_c は $\log T_D$ vs $1/T$ の低温側のほぼ直線部にあること、これに反し T_D の場合は T_c は2つの極小の間で変化に鈍感な領域にあるためと考えられる。したがって T_D の T_c でのjumpの大きさは T_c のjumpの大きさを示しており T_c はpara \rightarrow ferroで3~4倍の変化が起る。(これも NH_4^+ の場合と似ている)。低温相に於ては T_S による緩和の効果は小さく、 H_0 による変化は殆ど認められない。

以上本研究で判った SO_4^{2-} イオンの挙動はpara相では $E_a = 21 \text{ kJ/mol}$ のnormalな再配向運動があり、ferro相に転移すると T_c は不連続に3~4倍となり以下数百度にわたって E_a の温度変化に伴って急速に増大して行く。 T_c 点での τ_c のjump及びそれ以下の温度での異常は NH_4^+ イオンの挙動と酷似しており構造上の変化が両者に同様な効果を及ぼしているようにみえる。

^{17}O 核はO-Hが近接している時は顕著な ^{17}O 低磁場緩和への効果が期待できその効果は ^{17}O 濃度依存から正確に抽出でき種々の系に適用できると思われるが四重極相互作用の大きい事が解析を困難にする欠点がある。これは高磁場の使用で改善できよう。

	$T_D^{(1)}$	$T_D^{(2)}$	$T_D^{(1)}$	$T_D^{(2)}$
計算値	10	6.8	80*	67*
実験値	8	—	18**	15**
			70*	80*
			17**	(<20)**

実験に協力頂いた鈴木裕子さん、 ^{17}O 核の分析スペクトルをお預りした日本電子株式会社 感謝いたします。

表1 T_D , T_D の極小値(ms) * $H_1 = 18 \text{ G}$
** $H_1 = 4 \text{ G}$

(1) K. Morimoto, K. Shimomura, J. Phys. Soc. Japan 53, 59, 2752 (1984)

(2) D. E. O'Reilly, T. Tsang, J. Chem. Phys. 46, 1291 (1967)

(名大理) 久保 厚, O池田 龍一, 中村 大雄

<序>

フェロセン $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ は室温以下の温度領域で三つの結晶相をもつことが知られている。室温相は単斜晶系に属し、冷却すると164Kで転移して三斜晶系の結晶になる。最近、低温で結晶を長時間アニールすることにより、新たに低温安定相が見い出された¹⁾。この相は斜方晶系に属し、加熱すると242Kで室温相(単斜相)に転移する。従って、単斜相は転移することなく容易に164Kまで過冷却すること、また、低温相(三斜相)は準安定相であることが明らかになった。

これらの結晶相において興味深いことは、分子内の *cyclopentadienyl* (C_5H_5) 環(以下 Cp 環と略す)の *conformation* が各相において異なることである。X線構造解析により、分子内の2個の Cp 環は、単斜相では *staggered*, 斜方相では *eclipsed*, 三斜相では *eclipsed* の構造から約 90° 回転した位置にあることが報告されている。

一方、164Kの相転移はλ型の熱容量の異常を示し、その転移の *entropy* (ΔS_{tr}) は $R \ln 2$ に近い値 ($5.3 \text{ J/K} \cdot \text{mol}^{-1}$) になっている。そのため、この転移は Cp 環の配向に関する秩序—無秩序型の転移であるという解釈が出され²⁾、X線、中性子線回折による単斜相の構造解析が再度行われた。その結果、乱れた配向をもつ Cp 環の存在を仮定すると、回折パターンがよく説明され、熱容量測定の結果と一致した。このように、フェロセンにおいては、Cp 環の配向と相転移が深く関係している。本研究では、従来の研究では欠けている Cp 環の動的ふるまいと相転移の関係を調べる目的で、¹H NMR の測定を行なった。

<実験>

フェロセンは市販の特級試薬を3回真空昇華して精製した。CW NMR は日本電子 JNM-MW-40S 分光器を用いて測定した。¹H T₁ は自家製の装置を用いて $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ 法で決定した。示差熱分析 (DTA) の測定には自家製装置を用いた。

<結果>

序で述べたように、フェロセンは試料に加える熱履歴によって安定相と準安定相が混合する可能性があるため、DTA の測定を繰り返して行ない、既に報告されている熱測定の結果と比較しながら、各結晶相の作成条件を定めた。斜方相へ完全に転移していることは、DTA を測定して、164K の転移の熱異常が全く消滅していることによって確かめた。我々の試料については、単斜相を約 200K に 72 時間保つと完全に斜方相へ転移した。

三つの結晶相について、共鳴周波数 9.8, 20.0 MHz で測定した ¹H T₁ の温度変化を図 1 に示す。三斜相と単斜相についての測定結果は、既に Campbell らによって報告されている値³⁾ にほぼ一致したが、今回幾つかの情報が新たに得られた。第一に、三斜相での T₁ は幅広く単一の BPP 曲線では説明できない。第二に、164K の相転移近傍で、T₁ は大きく連続的に変化して二次相転移の特徴を示すが、転移点 T_{tr} で T₁ の大きな jump (約 2 倍) があり、1 次相転移という熱測定の結果と一致することがわかった。第三に、単斜相の T₁ の温

くぼ あつし, いけだ りゆういち, なかむら だいゆう

度変化が明白に観測されており、この相での運動の活性化エネルギーが求められる。次に、斜方相のT₁が今回初めて観測された。

¹H核共鳴吸収線の二次モーメントM₂の温度変化を斜方相と単斜相について測定し、結果を図2に示した。三斜相のM₂は既に報告されているが、80K以上で温度変化がな<一定(1.5 G²)である。

<考察>

報告されている結晶構造を用いて、予想される非等価のCp環によるC₅軸まわりの再配向運動についてM₂の理論値を計算した。計算はVan Vleckの式に基づいて三つの結晶相について行ない、結果を表1に示した。三斜相では、結晶の単位格子内に2個の非等価なフェロセン分子があり、各分子内の2個のCp環も非等価であるが、これら4種類のCp環がすべてC₅再配向していることがわかり、HolmとIbers⁴⁾の報告と一致した。

以上の結果から、三斜相で観測された幅広いT₁極小はCp環のC₅再配向に帰属できるが、単一の運動モードでは説明できない。測定されたT₁曲線を4種類のCp環による4個のBPP極小の重ね合せと考えると

$$T_1^{-1} = \frac{2}{3} \gamma_H^2 \sum_{i=1}^4 \Delta M_{2i}^2 g(\tau_i) \quad (1)$$

$$g(\tau_i) = \frac{\tau_i^2}{(1 + \omega^2 \tau_i^2)} + \frac{4\tau_i}{(1 + 4\omega^2 \tau_i^2)} \quad (2)$$

と書ける。ここでΔM_{2i}はi番目のCp環の回転によるM₂の減少量、τ_iはその相関時間、ωはLarmor周波数である。i番目

図 1

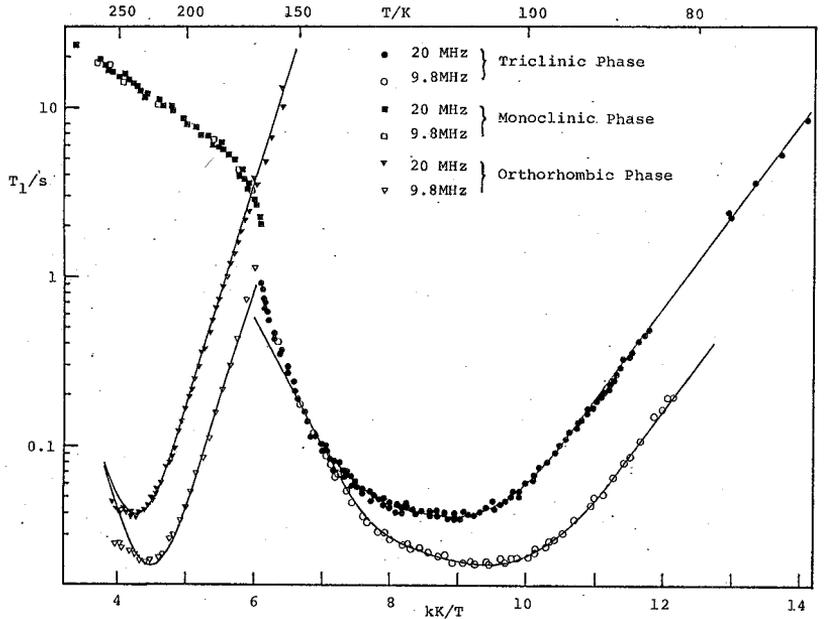


図 2

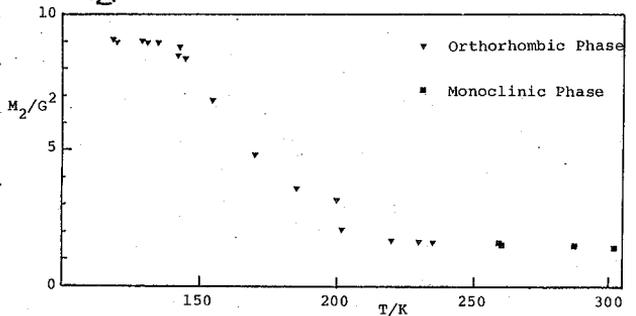


表 1

		Number of Reorienting Cp Rings				
		0	1	2	3	all
Triclinic						
M ₂ /G ²	calcd	8.58	6.36	4.45	2.92	1.78
	obsd (CW)					1.5
ΔM ₂ /G ²	calcd	2.22	1.91	1.53	1.14	
	obsd (T ₁)	2.2	1.9	1.5	1.4	
Monoclinic						
M ₂ /G ²	calcd	8.16				1.57
	obsd (CW)					1.4
Orthorhombic						
M ₂ /G ²	calcd	9.46	4.20			1.64
	obsd (CW)	9.0				1.6
ΔM ₂ /G ²	calcd	5.26		2.56		
	obsd (T ₁)	4.6				

のCp環の回転に対する活性化エネルギーをE_aとすると、τ_iは次式で与えられる。

$$\tau_i = \tau_{i0} \exp(E_{a_i}/RT) \quad (3)$$

最小二乗法を用いて式①~③を実測値に合せた。得られた未知変数ΔM_{2i}, E_{a_i}, τ_{i0}を表1と表2に示す。ΔM_{2i}の理論値と最小二乗法で決定した値はよく一致し、上述のCp環のモデルは正しいと考えられる。注目すべき点は、Cp環再配向のE_a値が10~17kJmol⁻¹とかなり幅をもっていることである。best fitしたT_i曲線は図1に示されているが、約150K以上で実測値からのズレが出てくる。これは相転移の影響で、T_{tr}に近づくときCp環再配向のτが急速に短くなるためと考えられる。Cp環再配向の平均の相関時間<τ>と

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum \Delta M_{2i} \tau_i}{\sum \Delta M_{2i}} \quad (4)$$

と定義すると、ωτ_i << 1の条件下でT_iは

$$T_i^{-1} = \frac{10}{3} \gamma_H^2 \langle \tau \rangle \sum \Delta M_{2i} \quad (5)$$

で与えられる。実測のT_iと表1に示したΔM_{2i}を式⑤に代入し、150~164Kでの<τ>を求めた。<τ>とT_iの温度変化を図3に示した。単斜相のT_iも同様にして次式で与えられる。

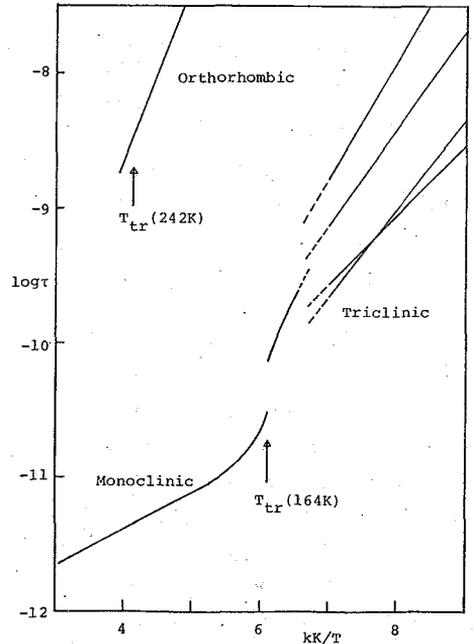
$$T_i^{-1} = (10/3) \gamma_H^2 \tau \Delta M_{2m} \quad (6)$$

ここで、ΔM_{2m}は単斜相ですべてのCp環がC₂再配向する時のM₂減少量である。ΔM_{2m}の値(6.59G²)は単斜相についてのM₂の計算値(表1)から求めた。このΔM_{2m}と実測のT_iを式⑥に入れて単斜相のτ値を求め図3に示した。Cp環再配向のτ値は164KのT_{tr}の両側の広い温度領域(約30K)にわたり急激な変化をしていることがわかる。約180K以上の単斜相では、τはArrhenius型の温度変化を示し、傾きから求めたCp環再配向のE_a(表2)は三斜相の値よりかなり小さくなった。またτ値も10⁻¹²sの桁になり、室温ではCp環はひじょうに束縛の小さい回転をしていることがわかった。

斜方相では、単一のT_i極小が観測されたが、この極小は結晶中のすべてのCp環が回転しているとして求めた極小値よりかなり浅い。実際に最小二乗法によるT_i曲線のfittingで決定したΔM₂(4.6G²)は、測定値(7.4G²)より小さい。X線構造解析によると斜方相には2種の非等価なCp環が存在しているので、それらの再配向の相関時間が異なり、短い相関時間をもつCp環の極小のみがT_{tr}の低温側に観測されると推定される。2種類のCp環の一つが静止し、他が回転しているモデルについて、構造解析の結果を用いてΔM₂の計算をすると、5.26G²となり、T_i曲線の最小二乗fittingから得た値(4.6G²)に近くなった。斜方相について求めたE_a(表2)とτ(図3)の値から判断すると、斜方相におけるCp環の回転は、三斜相や単斜相と比較するとはるかに束縛が大きい

Phase	E _a /kJmol ⁻¹	logτ ₀ /s
Triclinic	10.0 ± 0.5	-13.3
	12.7 ± 2.0	-14.3
	13.9 ± 2.0	-14.2
	16.9 ± 2.0	-15.0
Monoclinic	5.3 ± 0.5	-12.5
Orthorhom.	25.1 ± 0.5	-13.9

図 3



ことがわかる。このことは斜方相では分子がより密に詰まっていることを意味し、斜方相が安定相であるという熱測定の結果と一致している。

164Kの転移で観測された ΔS_{rot} は秩序—無秩序型転移における C_p 環の配向のentropy変化と考えられているが、この解釈は転移において系が獲得するその他のentropy, 例えば振動や結晶の熱膨張などのentropy変化が無視できる場合にのみ正しい。このことは、振動のentropyの場合についていえば、振動のpotential曲線の形が転移の前後でほとんど変わらず、振動の各準位の分布数が変化しないという条件が必要である。

今回のNMRの測定結果から、単斜相での C_p 環の再配向の E_a は三斜相での値の半分以下まで減少することがわかった。このことは転移の前後で再配向のpotentialの高さが大きく変化していることを意味する。単斜相の E_a (5.3 kJ mol^{-1}) は T_m での分子の熱エネルギー ($RT \sim 1.4 \text{ kJ mol}^{-1}$) と大差がないことから考えると、分子内の C_p 環および分子全体の C_5 軸まわりの束縛回転について、各エネルギー準位の分布数が T_m においてある程度変化していると予測される。そこで、 T_m における C_p 環の束縛回転についてentropy変化の計算を行なった。単斜相と三斜相の C_p 環を一次元の回転子と仮定し、束縛のpotential V を回転角 θ の関数として、次式で書き表わす。

$$V(\theta) = (V_0/2)(1 - \cos 5\theta) \quad (7)$$

ここで V_0 は回転のbarrierの高さで、 $V_0 = E_a$ と近似して以下の計算を行なった。式(7)のpotential下の一次元束縛回転子のSchrödinger方程式を解き、エネルギー準位 E_i を求めた。この計算において、 C_p 環は正五角形でC—C, C—H距離はそれぞれ1.43, 1.00Åとした。 C_p 環の束縛回転のentropy $S_{rot}(T)$ は回転子が準位 E_i に存在する確率 $P_i(T)$ を用いて

$$S_{rot}(T) = -R \sum_i P_i(T) \ln P_i(T) \quad (8)$$

$$P_i(T) = \exp(-E_i/RT) / \sum_i \exp(-E_i/RT) \quad (9)$$

となる。転移点164Kにおける分子内の1個の C_p 環についての S_{rot} の値を三斜相と単斜相に対して計算し表3に示した。Pitzerが報告している結果⁵⁾を用いてもほぼ同じ値が得られた。分子内の2個の C_p 環が互に独立に再配向しているとすると、 ΔS_{rot} は $9.6 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ となり実測値 ($5.31 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) より大きくなる。自由なフェロセン分子の分子内回転のbarrierは 3.8 kJ mol^{-1} と予測されている⁶⁾ので、2個の C_p 環の回転はある程度coupleしていると思われる。この効果を考慮すると、計算値は実測値に近すぎ、測定された ΔS_{rot} は C_p 環の束縛回転のentropy変化で十分説明できる。

表 3

References		$E_a / \text{kJ mol}^{-1}$	$S_{rot} / \text{JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
1) J. Chem. Phys., <u>73</u> , 438 (1980); Mol. Cryst. Liq. Cryst., <u>71</u> , 189 (1981).	Triclinic	10.0	57.22
		12.7	54.83
		13.9	53.98
2) Trans. Faraday Soc., <u>56</u> , 660 (1960).		16.9	52.18
3) Mol. Cryst. Liq. Cryst., <u>36</u> , 1 (1976).		5.3	64.15 (164K)
4) J. Chem. Phys., <u>30</u> , 885 (1959).	Monoclinic		70.96 (240K)
5) J. Chem. Phys., <u>5</u> , 469 (1937).		25.1	55.12 (240K)
6) Acta Chim. Scand., <u>22</u> , 2653 (1968).	Orthorhom.		

^{35}Cl 及び ^1H NMRを用いた塩素イオンと
トリハロメタンの水素結合に関する研究
(北見工大) ○三浦宏一、福井洋之、田中雅伸

<概要>

アセトニトリル、アセトン、DMF 溶媒中におけるクロロホルムと Cl^- イオンの水素結合による錯体形成反応について、クロロホルムの ^1H 化学シフトと塩素イオンの ^{35}Cl 線幅測定による検討を行った。その結果、プロトンシフトの測定から得られた平衡定数と Cl^- の線幅測定から得られた平衡定数の間には若干の相違が見られた。また錯体を形成したときの線幅には溶媒による相違が見られた。この溶媒による違いは溶媒の誘電率の違いに関係することが示された。これに対してプロトンシフトから求めた錯体形成シフトは溶媒に依存せず、ほぼ一定であることがわかった。

<序>

^{35}Cl NMRの線幅は、塩素原子の化学結合の違いに応じて著しく変化することが知られている。例えば0.5Mの $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 水溶液中の ClO_4^- は5Hz以下の線幅(半値幅)を与え、一方四塩化炭素の塩素原子の線幅は14.5 kHzにもなる。NMRの線幅はスピン-スピン緩和時間 T_2 によって決まるが、 $^{35}\text{Cl}(I=3/2)$ のような核四極子をもった核種の緩和速度は、extreme narrowing の条件下では分子の回転の相関時間 τ_c と四極子結合定数(e^2qQ)の2乗に比例する。粘性の小さい動き易い液体中では τ_c は $10^{-11}\sim 10^{-12}$ 秒でほぼ一定であるから、線幅は核のまわりの電場勾配 eq の大きさで決まると考えてよい。従って Cl^- が単独に存在したときのように原子核のまわりの電荷分布が球対称であれば、 eq は0となり、観測される線幅は磁場の不均一性のみから決まり、極めてnarrowなシグナルが得られる。これに対して塩素原子が共有結合をしている場合には、核のまわりの電子雲がひずむために大きな電場勾配が生じ、イオンの場合に比べて非常に大きな線幅をもつことになる。このように、 ^{35}Cl NMRの線幅が塩素原子の化学結合状態の変化を非常に敏感に反映することを利用して、溶液中の塩素を含む電解質の解離平衡と線幅の関係や、イオンの溶媒和とイオン対形成との関連について多くの研究が行われている。^{1,2} しかし溶液中で塩素イオンと分子とが水素結合によって会合したときの Cl^- の線幅変化についての報告はまだ見当たらない。そこで本研究では、有機溶媒中における塩素イオンとトリクロロメタン(クロロホルム)の水素結合による弱い錯体形成反応について、 ^{35}Cl と ^1H NMRによる実験を行い、溶媒による違いを調べてみた。

<実験>

溶媒としてはアセトニトリル(AN)、アセトン(AC)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)を用いた。 ^{35}Cl NMRによる線幅測定は、0.1M濃度のテトラ-n-ブチルアンモニウムクロライド(TBAC)を溶かした溶媒に、クロロホルムを濃度0から2Mまで加えた溶液を用いて行った。 ^1H 化学シフトは溶媒に0.1M濃度のクロロホルムを加え、これに Cl^- 濃度が0から1MになるようにTBACを溶解して測定した。NMR測定は、JEOLのFX-200 FT-NMR(^{35}Cl 19.55MHz、 ^1H 200MHz)を用いて、室温($22.2\pm 0.2^\circ\text{C}$)で行った。

みうらこういち、ふくいひろゆき、たなかまさのぶ

<結果及び考察>

§ 1. クロロホルムとCl⁻の水素結合による錯体形成反応

有機溶媒にTBACとクロロホルムを溶かしたとき、溶液中でTBACが解離して生じたCl⁻とクロロホルムとが水素結合によって会合し、弱い錯体を形成することが知られている。³ もしCl⁻とクロロホルムが1:1で会合すると仮定すると、



$$K = \frac{[\text{CCl}_3\text{H}\cdots\text{Cl}^-]}{[\text{CCl}_3\text{H}][\text{Cl}^-]} \quad (2)$$

という平衡が成り立つ。ここでクロロホルムのプロトンに着目すると、Cl⁻と会合したクロロホルムはFreeな状態に比べ低磁場にシフトする。常温ではFreeな状態(δ_F)と会合した状態(δ_o)の間の交換が速いので、NMRでは次式に示す両者の平均位置(δ)にシグナルが現れる。

$$\delta = \frac{[\text{CCl}_3\text{H}]}{[\text{CCl}_3\text{H}]_o} \delta_F + \frac{[\text{CCl}_3\text{H}\cdots\text{Cl}^-]}{[\text{CCl}_3\text{H}]_o} \delta_o. \quad (3)$$

我々は測定したδ(obs)と(2)と(3)式に従って計算したδ(calc)との差が最小になるようにδ_oと平衡定数Kを求めた。

化学シフトの場合と同様に、塩素イオンの線幅を測定すれば、FreeなCl⁻のシャープなピーク(Δν_F)と、Cl⁻がクロロホルムと錯体を形成したときのブロードなピーク(Δν_o)との平均した線幅(Δν)が観測されることになる。すなわち

$$\Delta\nu = \frac{[\text{Cl}^-]}{[\text{Cl}^-]_o} \Delta\nu_F + \frac{[\text{CCl}_3\text{H}\cdots\text{Cl}^-]}{[\text{Cl}^-]_o} \Delta\nu_o. \quad (4)$$

となる。ここでは、共有結合しているクロロホルムのCl原子のピークは、その線幅が測定幅に比べて非常に大きいので観測されない。線幅の場合も、化学シフトの場合と同様の方法で解析することにより、これからΔν_oとKを求めることができる。

§ 2. クロロホルムの錯体形成シフトと平衡定数

我々ははじめにCl⁻イオンとクロロホルムが水素結合によって錯体を形成したときのクロロホルムのプロトンシフトに着目した。三種類の溶媒を用いてTBAC濃度を変えて測定したクロロホルムのプロトンシフトの変化をFig. 1に示す。

ここで(δ_o-δ_F)を錯体形成シフトΔ_oと定義する。Fig. 1の結果を§1の方

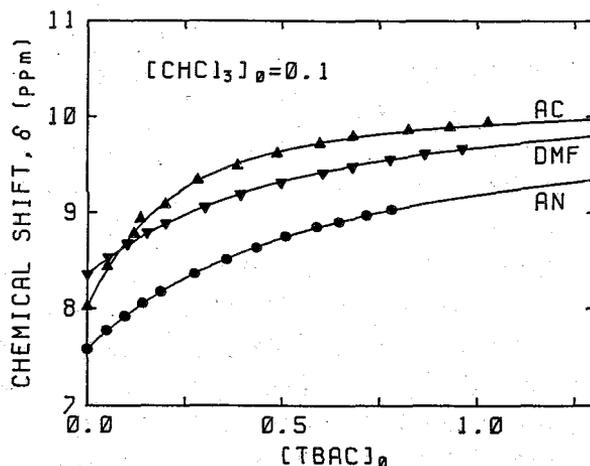


Fig. 1 TBACの濃度変化によるクロロホルムの¹H化学シフトの変化

法に従って解析し、錯体形成シフトと平衡定数を得た。その結果をTable 1に示す。この実験では、錯体形成シフト Δ_{O} は溶媒の種類によってあまり大きく変化せず、2ppmから2.5ppmの間の値を示した。しかし平衡定数Kについては、ANとDMFは約 2 M^{-1} とほぼ等しい値を示すが、ACは 6.6 M^{-1} とかなり大きな値を示した。この点については後程考察する。

§ 3. Cl^- の錯体形成線幅と平衡定数

次に錯体形成における Cl^- イオンの ^{35}Cl NMRスペクトルの線幅(半値幅)の変化について検討する。プロトンシフトの場合と同様に、三種類の溶媒を用いてクロロホルムの濃度を変えて Cl^- の線幅の変化を測定した。クロロホルムの濃度が増加するのに伴い、 Cl^- の線幅は顕著に大きくなることがわかった。Fig. 2は三種類の溶媒における線幅変化を表している。この線幅変化を§ 1の方法に従って解析し、錯体の線幅と平衡定数を得た。その結果をTable 2に示す。Table 2を見ると、平衡定数KはANとDMFにおいてはほぼ等しいが、ACではこれらに比べて3倍も大きくなっており、プロトンシフトにおける結果と同様の傾向を与えている。しかし値そのものは、いずれの溶媒においても、プロトンシフトから得られたKに比べて小さくなっており、約1/2になっている。本来、平衡定数Kは、それぞれのspeciesの活動度によって定義される値である。従ってプロトンシフトの測定のように、クロロホルム濃度を低い濃度に固定してTBAC濃度を変化させたととき、逆に Cl^- の線幅測定のように、TBAC濃度を低い濃度で一定にしてクロロホルムの濃度を変えたときとは、活動度係数が異なり、このようなKの相違が当然現れると考えられる。次に錯体形成線幅であるが、これは錯体形成シフトとは異なり、三種類の溶媒によって異なっている。すでに述べたように、 ^{35}Cl NMRの線幅は、 (e^2qQ) の2乗と τ_{O} の積に比例す

Table 1. クロロホルムの ^1H 化学シフトから求めた錯体形成シフトと平衡定数。

Solvent	Δ_{O} (ppm) ^a	$K(\text{M}^{-1})$
AN	2.53 ± 0.11	1.84 ± 0.15
AC	2.21 ± 0.03	6.61 ± 0.41
DMF	2.05 ± 0.06	2.05 ± 0.14

a $\Delta_{\text{O}} = \delta_{\text{O}} - \delta_{\text{F}}$ 。

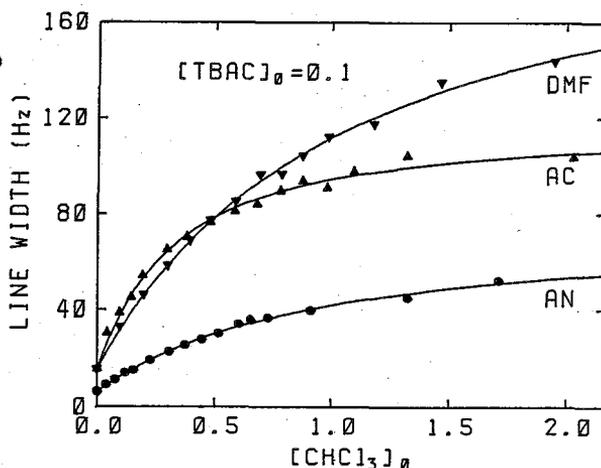


Fig. 2 クロロホルムの濃度変化による Cl^- の線幅変化

Table 2. TBACの Cl^- の ^{35}Cl 線幅から求めた錯体形成線幅と平衡定数。

Solvent	$\Delta \nu_{\text{O}}$ (Hz)	$K(\text{M}^{-1})$
AN	69 ± 3	1.12 ± 0.08
AC	102 ± 2	3.63 ± 0.29
DMF	199 ± 7	0.99 ± 0.06

るため、核の回りの電場勾配とCl⁻の回転運動の二つの寄与を含むことになる。

我々は電場勾配eqが錯体の線幅Δν_cに与える寄与を見積もるために、τ₀の寄与を除くことを考えた。問題を簡単化するために、τ₀は純溶媒の粘度ηに比例すると仮定し、(Δν_c/η)を求め、これが電場勾配のみに依存する錯体線幅に比例した量であると考えた。結果をTable 3に示す。この結果を見るとAN

Table 3. 溶媒の粘度ηと比誘電率(ε/ε₀)、及び錯体線幅と溶媒粘度の比(Δν_c/η)。

Solvent	η (cP)	ε/ε ₀	Δν _c /η (Hz/cP)
AN	0.364	37.5	207
AC	0.323	20.7	365
DMF	0.893	36.7	240

とDMFにおける(Δν_c/η)は同程度の値を示すが、これに比べACの(Δν_c/η)はかなり大きくなり、その傾向は平衡定数の場合に類似している。そこでこの溶媒による(Δν_c/η)の相違、すなわち電場勾配の寄与による錯体線幅の溶媒依存性について考察する。今、Cl⁻とクロロホルムが水素結合によって錯体を形成したときのCl⁻の最高被占有軌道をψ_{3Pz}=x_{3Pz}(Cl⁻)+cx_{1s}(H)とする。CCl₃HとCl⁻が錯体をつくったときの結合軸をz方向にとり、静電ポテンシャルをVとすれば、電場勾配eqは、Cl⁻の原子核を原点として

$$e q = \frac{\partial^2 V}{\partial z^2} = \frac{e}{2\pi\epsilon} \left[\langle \psi_{3Pz} | \frac{r^2 - 3z^2}{r^5} | \psi_{3Pz} \rangle - \langle x_{3Pz} | \frac{r^2 - 3z^2}{r^5} | x_{3Pz} \rangle \right]$$

$$= \frac{c e}{\pi \epsilon} \langle x_{3Pz}(\text{Cl}^-) | \frac{r^2 - 3z^2}{r^5} | x_{1s}(\text{H}) \rangle \quad (5)$$

となる。ここで錯体をつくったときのCl⁻とH原子の間の距離は溶媒によらず一定であると仮定すると、eqは共有結合性を表す係数cに比例し、比誘電率(ε/ε₀)に逆比例することになる。Table 3に溶媒の比誘電率を示してあるが、これをみるとACの比誘電率はAN、DMFに比べて小さくなっており、得られた線幅と粘度の比(Δν_c/η)と比誘電率との間に相関性がみられる。c²は共有結合%を意味するので、溶液中でCl⁻が水素結合による錯体をつくったときのCl⁻線幅は共有結合性の割合を反映することになる。

また平衡定数KはΔG⁰=-RTlnKから、錯体を形成したときと錯体をつくらないときの自由エネルギーの差に関係づけることができる。この反応において、ΔG⁰はイオンのつくる静電ポテンシャルVに依存した量となるであろう。Vは誘電率εに逆比例することから比誘電率の小さいACがAN、DMFよりも大きなKを与えると考えられる。

<文献>

1. H. A. Berman and T. R. Stengle., J. Chem. Phys., 79, 1011 (1975).
2. M. Yudasaka, T. Sugawara, H. Iwamura, and T. Fujiyama, Bull. Chem. Soc. Jpn., 54, 1933 (1981).
3. R. D. Green and J. S. Martin, J. Am. Chem. Soc., 90, 3659 (1968).

北大 工 ○下川繁三, 山田英二

序 我々は最近高温高圧下での有機液体の物理化学的性質を理解するためにトルエン等をその例として室温から超臨界域までの温度 ($\sim 650^\circ\text{C}$) でそのスピン格子緩和時間や拡散係数を測定して調べた。その方式の特徴は封管内の自己蒸気圧を用いた処にあり簡単であるとともに脱気精製が容易でコイルや耐圧容器を汚すこともない。又作業上極めて安全である。温度変化の実験で注意しなければならない事はその液体の体積も温度と共に変化していることである。体積変化に対してその分子運動は甚だしく影響を受けると考えなければならない。だから一般的には等温圧縮等の条件が必要となつて来る。我々の電磁石のギャップの中ではこれ以上の複雑な細工は不可能である。加へるに我々のセルはあらかじめ臨界点附近でガス化出来る様な空間が用意されており自己加圧によつてその蒸気圧は温度と共に変化する。つまり液体と気体の二相が常に存在している。昨年我々はこの様な場合に用いられる *in situ* で測ることの出来る密度測定の方法について提案した¹⁾。これによれば温度とともに変化するそれ等二相の体積変化がすぐに求められこれから密度の変化が液とガスの両方共判る。こうして圧力測定の複雑さ困難さから解放された。さらにもう一度自問自答するとこの様な場合の液体の緩和測定は一体何を測つていたのか問題であらう。普通測定の結果が実験誤差内である様な場合にはそれをかくれ箕としてポカしてしまうことが多い。否我々は昨年までその方法を知らなかつたので液とガスの二相系での緩和にはガスの影響を全く考慮しなかつたのである。

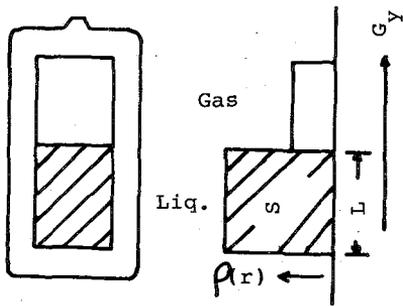
本研究の目的は同じ物質の液体とその蒸気 (気体) の存在する二相系でのスピン格子緩和時間の測定法に関するもので、一次元投影法を用いると液とガスの T_1 の値が独立にしかも正しく求められることを示そうというものである。緩和の理論によれば気体の緩和機構は液体のそれに比べて (実験上の困難さを除くと) 一般に簡単に扱われる。そしてその効果は主としてスピン回転相互作用に起せられる。これに比べて液体の場合には分子内と分子間の相互作用の程度が同じ程度であるためにその分離は非常に面倒になる (プロトンの緩和の場合) しかし我々は臨界域を越えた緩和の測定からこれを克服することが出来た。液体の臨界域での異常な性質を理解する上で分子の形や大きさと分子運動との関係が調べられよう。

今回の報告では実験事実のみで緩和機構の解折にはいたらなかつた。緩和の測定法とその得られた結果についてのみ述べてみたい。

実験と結果

試料はシクロペンタンを用いた。(a) には $0.101\text{ g} / 0.298\text{ ml}$ 図の様な容器

しもかわ しげぞう やまだ えいじ

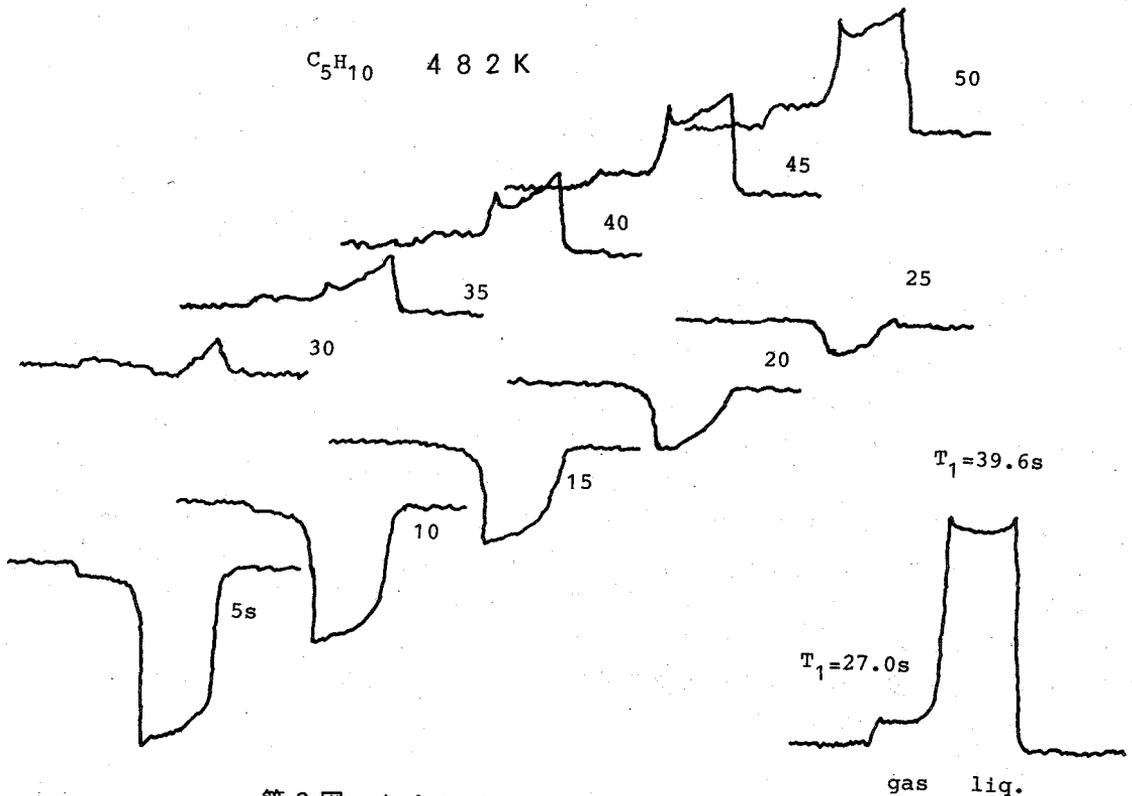


第1図セルの中の試料
と線形磁場勾配の方向

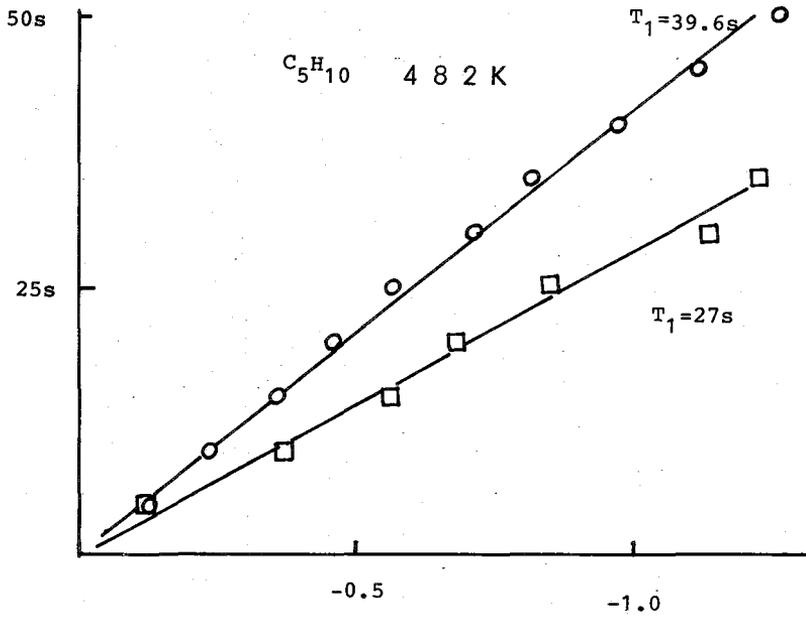
に脱気封入した (b) 0.060/0.315 (c) 0.037/
と仕込量の異なる場合についても行った 0.306ml
それぞれの密度は前報の様にあらかじめ測定し
た。得られた直線磁場勾配のもとでのフーリ
エスペクトルを第2図に示す

右下には 90° 単発パルスによる全領域のスペ
クトルを示している。シクロペンタンは単一
なスペクトル故に磁場勾配の下での幅広いスペ
クトルは単純明解で解折が容易である。もしも
化学シフトが存在すると投影スペクトルはシフ
トによる複雑な重なりのために液とガスの境界
が判別出来なくなる。それを解決する方法はい
くつか考えられる。その一つは重水素化するこ
とで我々はトルエンに適用し化学シフトに由

来する複雑さから逃れることが出来た。²⁾ 第3図は2図の結果をプロットしてみたもの



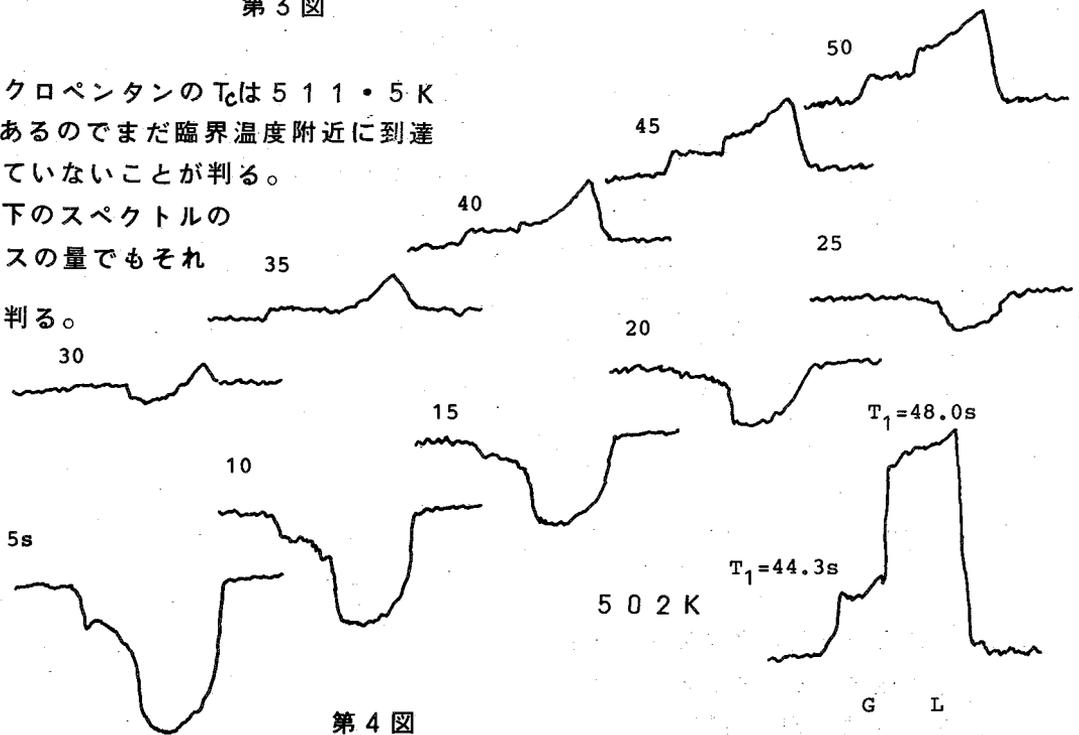
第2図 シクロペンタンの一次元投影
PRFTスペクトル (482 K)



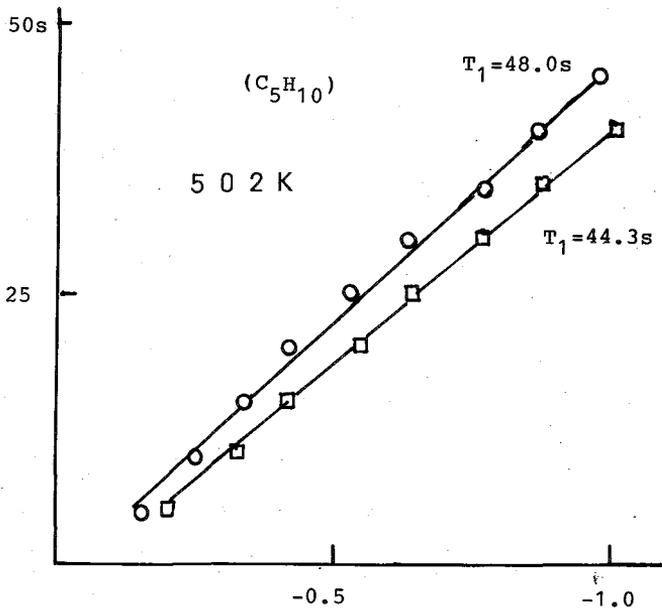
第3図

である。液とガスのプロットは良く直線に乗っていることが判る。我々の予想に反して緩和時間は液体のそれより短いガスの緩和時間を得た。第4図は502 Kにおける線形磁場勾配のもとでの90°パルス後のフーリエスペクトルとPRFTスペクトルである。

シクロペンタンの T_c は 511.5 K であるのでまだ臨界温度附近に到達していないことが判る。右下のスペクトルのガスの量でもそれが判る。



第4図



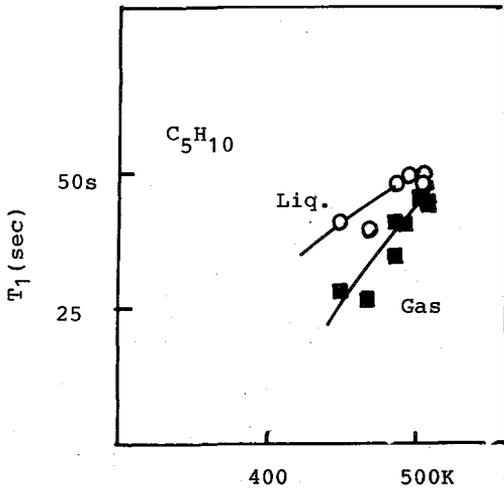
第5図

しかし第5図のプロットからその T_1 の値が48sと44.3sと非常に接近していることが判明した。現在の我々の温度精度は4%程度なので臨界域附近を正しく求めることは出来ない。第6図は以上の液体とガスのスピン格子緩和時間を温度に対してプロットしたものである。一次元投影法を用いることにより空間的に離れた場所にある液体と気体の二相のスピン格子緩和時間を同時に区別して直接に求めることが出来た。この方法は高温高圧下でのオートクレブを用いた分光学的研究に役立つものと考えられる。

ガスを含めた緩和機構の解析は別に報告する。

文献

- 1) S.Shimokawa et.al., Rev.Sci.Instrum 56,1220 (1985).
- 2) S.Shimokawa, Ber.Bunsenges.Phys. Chem. in press.



第6図一次元投影法により直接分離測定したシクロペンタンのスピン格子緩和時間

(北大 佐温研) 花房尚史

蛋白質の構造、機能、その安定性と水の関連については古くから多くの報告があるが、また解明がなされつつある。その一環として、蛋白質が変性して高次構造が変化した時、蛋白質表面の構造、即ち水和水が結合する極性基の立体的な配置が変化すると、水和水の動的状態がどうなるかという事は興味のある問題の一つである。

今回、いくつかの蛋白質を用い、結晶、粉末状の場合と、溶液状態とついで、未変性の native 状態と変性したあとで、水和水の蛋白質表面に接しての並進運動、即ち、自己拡散係数 D がどうなるかという事を、 $^1\text{H-NMR}$ をより $T_{1\rho}$ を測定して調べた。

〔材料〕市販の二回結晶標品を用いた。卵アルブミン、BSA、RNase、リゾチン、ミオグロビン、ヘモグロビンの六種類で、結晶状態とついではそのまま、溶液で4リットル水に1%水溶液として用いた。

〔方法〕試料はそれぞれ、まず対照として未変性の状態で測定し、同じ試料を試料管ごと95°C 30分加熱して変性したものをついで測定した。結晶蛋白質では表面の結合水(水和水)を23°Cで、溶液の場合を凍結状態で凍った2リットル水に4リットルの温度で測定した。JEO FX100 FT NMR を用い、90°パルスは4μsec、観測周波数は20KHz、ロッキングパワーは6~1 gaussの周でスピニングにより $T_{1\rho}$ を測定した。

前回の討論会で述べたように、自己拡散係数の測定には溶液系では一般にパルス破壊法を用いるから、こゝでの場合のほうは rapid 系で、1リットル水和水のスピニングピークで多成分と考えられる系では、技術的々と合理的な、ロッキングパワー W_1 を変えて測定し、 $T_{1\rho}$ と W_1 の互換として D を計算する方がはるかに有効である。又、こゝで得られる $T_{1\rho}$ の値から、別の計算によって同時に、その温度での回転の角速度 ω 、スピニング距離 r 、 T_2 等の情報も得られる。

こゝでは、変性と未変性の比較が目的なので、水和水のプロトンの緩和状態が極子間相互作用だけと仮定して、 W_1 を変えて $T_{1\rho}$ を測定すると、自己拡散係数 D は、(2') 式のよ

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

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

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

$$\therefore D = (-\sqrt{2} \delta^4 h^2 N / 80 \pi \alpha)^{1/2} \quad (2')$$

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

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

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

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

は対小之 なが小

うに計算之れ²⁾、同時に(3)式によつて、 ν 、 τ_c 、 T_2 を求められたる。

[結果と論考]

図1, 2は、それぞれ結晶アルブミンおよびBSAの測定結果が

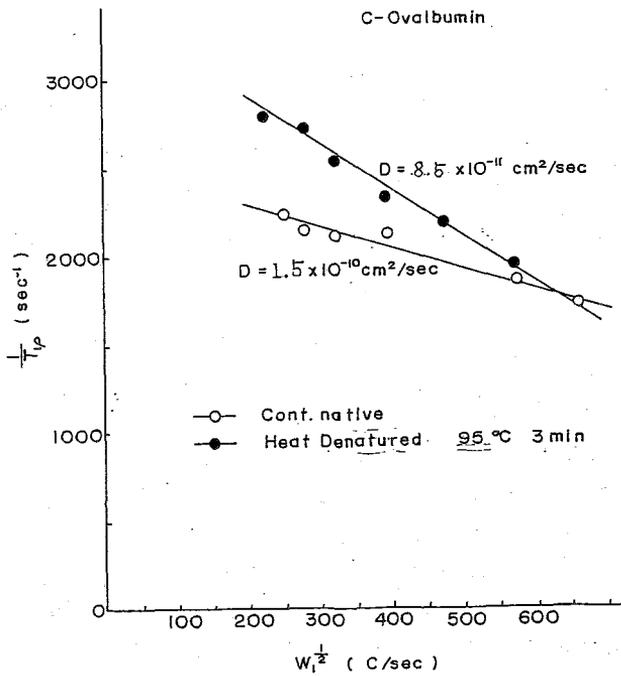


図. 1

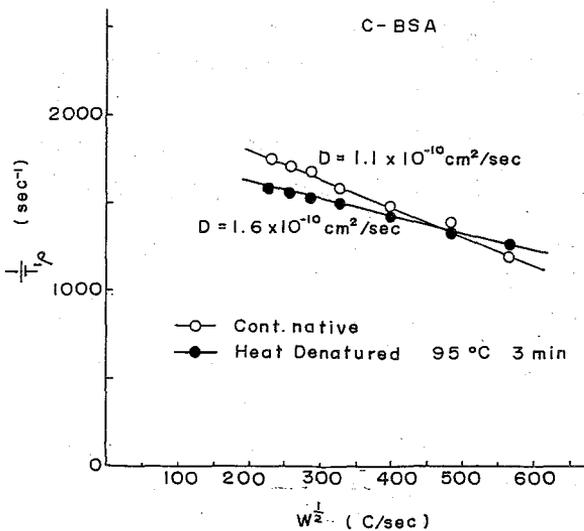


図 2.

ロッキングバリー- W_{10} 平方根の対して T_p の逆数をプロットしたもので、10ヶ
 九の場合も良好な直線性を示してゐる。
 この直線の傾斜から(2)式によつてD
 の値が求められる。図に示すように、
 卵アルブミンでは変性するとDの値は
 明らかに小さくなり、又、BSAでは大
 きくなる。表1に示すように、他の蛋
 白についても同様で、Dの値の変化の
 程度は小さいが、変性によつて明らか
 にDの値、即ち並進運動の素過程の値
 は変化する。変化の程度は小さいと
 ても、Dが変性によつて増加するが、
 減少する方が多く、この蛋白により決
 まり、その傾向は常々一定してゐる。
 結晶が蛋白の結合水(水和水)につ
 りては、親性基の数や表面の表面積の
 計算で、その水和水量はほぼア、
 水一分子アの水和水であると考へら
 るるので、この自己拡散係数の値は、
 蛋白表面に於つての並進の速さを示
 してゐると考へられる。

蛋白の溶液系についても同様な結
 果になる。之を述べたように、結晶
 卵アルブミンは熱変性によつてDは減
 少するが、アルブミン溶液(1%)で
 も同様で、-10, -25, -35, -45°Cで
 不凍水について測定した結果で、 τ_c
 の値とともに図3に示す。どの温度で
 も、熱処理によつて、結晶の場合と同
 様に、Dの値は減少し、 τ_c は増加して
 いる。表1に示すように、結晶ハモグ
 ロピンは、熱変性によつてDの値はあ
 りる増加するが、溶液の場合も、同
 様に示すようにDは増加し、 τ_c は減少

する。勿論この変化の程度は提りつ
 僅かであるが、結晶、溶液ともこの
 傾向は全く同様である。

蛋白質溶液の場合、よく知られて
 るように、¹H NMR で不凍水量を
 求めると、-25℃~45℃ で一定の値を
 とり、これは他の方法で求めた水含量
 とよく一致して、NMR による水含量
 の測定法として用いられてゐる。²⁾この
 水含量から、-35℃ 近傍ではやはり
 一ア—分子の水物であることが推算
 され、溶液系の場合でも -35℃ 近傍の

表 1.

Comparison of NMR Characteristics of Hydration Water
 in Native and Heat Denatured Proteins

	D (cm ² /sec)	spin-spin Distance (Å)	T _c (sec)	T ₂ (sec)
c - Hb (N)	4.0 × 10 ⁻¹⁰	2.3	7.7 × 10 ⁻⁶	5.7 × 10 ⁻⁸
" (D)	9.5 × 10 ⁻¹¹	2.3	1.1 × 10 ⁻⁴	5.2 × 10 ⁻⁹
c - EA (N)	1.5 × 10 ⁻¹⁰	2.0	5.3 × 10 ⁻⁷	4.8 × 10 ⁻⁸
" (D)	8.5 × 10 ⁻¹¹	2.2	9.5 × 10 ⁻⁹	4.3 × 10 ⁻⁸
c - Hb (N)	1.0 × 10 ⁻¹⁰	2.0	7.1 × 10 ⁻⁷	3.8 × 10 ⁻⁸
" (D)	1.1 × 10 ⁻¹⁰	2.1	7.3 × 10 ⁻⁷	4.3 × 10 ⁻⁸
c - BSA (N)	1.1 × 10 ⁻¹⁰	2.3	1.1 × 10 ⁻⁶	5.8 × 10 ⁻⁸
" (D)	1.4 × 10 ⁻¹⁰	2.3	8.1 × 10 ⁻⁷	6.4 × 10 ⁻⁸
c - Lys. (N)	4.7 × 10 ⁻¹¹	2.0	1.1 × 10 ⁻⁶	2.1 × 10 ⁻⁸
" (D)	5.2 × 10 ⁻¹¹	2.0	1.0 × 10 ⁻⁶	2.3 × 10 ⁻⁸
c - RNase (N)	9.9 × 10 ⁻¹¹	2.3	1.1 × 10 ⁻⁶	5.1 × 10 ⁻⁸
" (D)	1.1 × 10 ⁻¹⁰	2.1	8.7 × 10 ⁻⁶	4.0 × 10 ⁻⁸

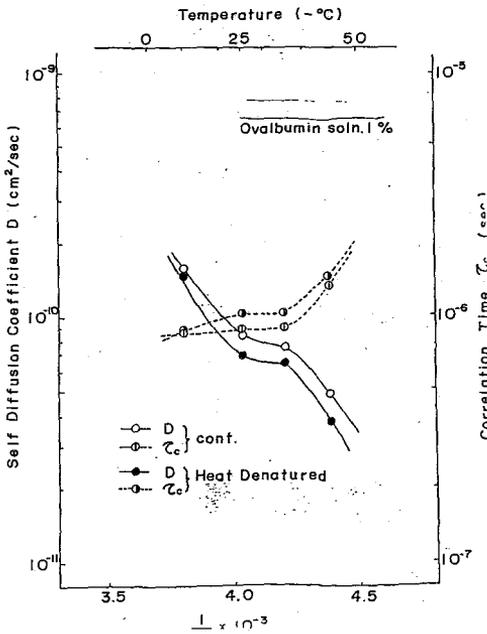


図. 3

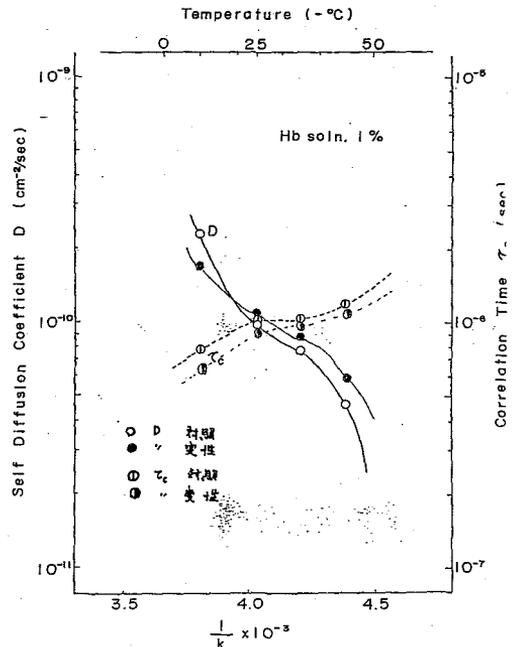


図. 4

自己拡散係数の値は蛋白質分子の表面に沿った並進運動の速度を示してゐると考えら
 れる。-10℃ あたりでは、2分子ア—分子ア—なので、必ずしも表面に沿つた動きのみでなく、
 水物ア—の中を運しての運動の場をも含み得ると思はれるので、かなり複雑なものと考
 えられる。-45℃以下の温度では、残つてゐる不凍水を凍結して、単分子ア—の水物構造を破壊
 した領域と考へられるが、T_c 温度での多分子ア—単分子ア—破壊した単分子ア—の境界で

ある -25° , -35°C の近傍に温度に対しての D と E のプロットの変曲点がある。

いづれにせよ、これらの結果から、蛋白質が熱変性によりその立体構造、従って高層の状態が変ると、水和水の並進運動の束縛の度合が変化し、変性によりそれが増加することが減少するが、それぞれの蛋白質の構造により異なる固有の性質であることがわかった。又、水和構造の動的性質は、これらの水和水が結合する極性基の立体配向を大きく影響させ、特に並進運動の場合はその影響が強くあらはれると考えらる。

今後更に変性の速度との定量的関係、それとこの層の厚さとの関係、chemical change と用いた変性率について調べておきたい。

文 献

- 1) 花房尚史 第23回NMR 討論会予稿集 (1964)
- 2) Burnett, L. J. J. Chem. Phys., 1273 (1942)
- 3) J. P. Kuntz & W. Kauzmann Adv. Protein Chem. 25, (1974)

(防大化・東工大原子炉*) ○垣花真人 *岡本眞實 南聖正

【緒言】これまで、重水素核を“プローブ”とした核磁気緩和による純水の動的挙動の研究は幅広く行われてきた。しかしながら、報告されている緩和時間の値は互いに一致しておらず、また精度も高くない。¹⁾⁻⁵⁾ このため、緩和時間における微小な同位体効果に着目した研究例は少ない。緩和時間における同位体効果は、系の構造や動的性質等に敏感であると考えられ、そのような同位体効果の知見は、これらの性質を理解する一助となりうるものと考え、本研究では、まず H₂O/D₂O 混合系で 25℃ における重水素核スピン格子緩和時間 (T₁) を重水素原子分率 (n) の関数として精密に測定し、T₁ と n との関係を詳細に調べた。次に、5℃~25℃ の温度範囲で T₁ の温度依存性をいくつかの n について検討し、水分子の緩和過程における活性化エンタルピー (Δ^{*}H) 及び活性化エントロピー (Δ^{*}S) をそれぞれの n について算出し、水の他の動的物性 (拡散, 粘性等) におけるそれらと比較した。

【実験】①試薬 D₂O (カナダ Merck, 99.7% D) 及び脱イオン H₂O はそれぞれ 2 回蒸留した。H₂O/D₂O 混合試料の n は、比重を測定し決定した。試料の脱酸素は、乾燥 Ar 雰囲気下で溶液に Ar を通じて行なった。②装置及び T₁ の算出 バリアン社製 XL-200, -300 をロックをかけずにそれぞれ 30.7, 46.2 MHz で使用した。T₁ は D 核の共鳴周波数に依存しなかった。T₁ は、inversion-recovery 法により、種々の遅延時間 τ (180°-90° パルス間の時間) におけるスワクトル線の強度 (ピーク高) I_z(τ) を単一指数関数型の式 (1) に A, B, T₁ を調整パラメータとし、最小自乗法で curve-fitting させ決定した。

$$I_z(\tau) = A + B \cdot \exp(-\tau/T_1) \quad (1)$$

【結果・考察】①緩和速度 T₁⁻¹ と n との関係 25℃ に

おける T₁ の測定結果を表 1 に、T₁⁻¹ vs. n プロットを図 1

(A) に示す。比較のために Lankhorst 等の結果³⁾ を図 1(B) に

示す。T₁⁻¹ は n の増加と共に増加する事が見出された。

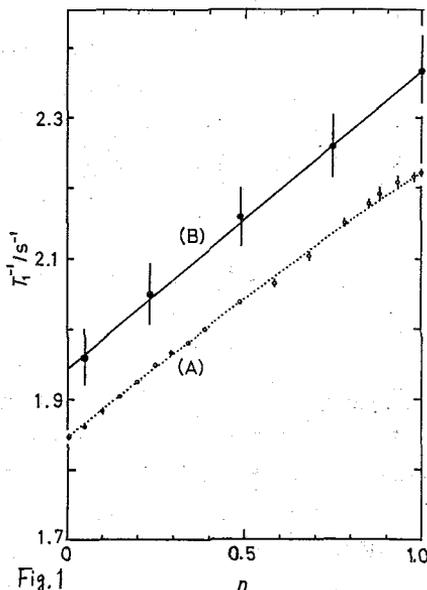
T₁⁻¹ は水分子の相関時間 τ_c(n) と、

$$T_1^{-1} = (3\pi^2/2) (e^2q/h)^2 (1 + s^2/3) \cdot \tau_c(n) \quad (2)$$

の関係にある。ここで、e²q/h は核四極子結合定数、

Table 1. Dependence of T₁ on deuterium atom fraction, n, for H₂O/D₂O mixtures at 298.2 K. (46.2 MHz)

n	no. of runs	T ₁ ^a /s	n	no. of runs	T ₁ ^a /s
0.0049	6	0.5414±0.0010	0.489	4	0.4908±0.0005
0.049	6	0.5375±0.0007	0.586	6	0.4845±0.0010
0.097	6	0.5310±0.0012	0.683	9	0.4757±0.0013
0.147	6	0.5250±0.0011	0.783	12	0.4650±0.0008
0.196	7	0.5196±0.0012	0.850	6	0.4590±0.0013
0.244	11	0.5130±0.0010	0.878	3	0.4560±0.0020
0.293	8	0.5083±0.0007	0.930	3	0.4527±0.0026
0.342	6	0.5053±0.0009	0.979	4	0.4510±0.0015
0.391	6	0.5000±0.0005	0.997	4	0.4500±0.0013



かきはなまさと・おかもとまこと・なくもたし

δ は非対称パラメータである。(2)式から、 T_1^{-1} に見出された同位体効果は、a) τ_c の n 依存性あるいは b) e^2qQ/h , δ の n 依存性により説明できる。溶液状態での水の e^2qQ/h , δ は直接的には知られていないが、気体及び固体状態での水のそれらは、 H_2O 中の HDO 及び D_2O 中の D_2O について精度よく測定されており、これまでに $HDO-D_2O$ 間に同位体効果は見出されていない。^{6,7)} そこで、本解析では b) の可能性は小さいものとして無視し、同位体効果としては a) のみを考慮し、 e^2qQ/h , δ には水について得られた値 ($e^2qQ/h = 213.7 \text{ kHz}$, $\delta = 0.117$)⁶⁾ を転用した。

H_2O/D_2O 混合系では、 $H_2O + D_2O = 2HDO$ (3) の平衡が成立している。この同位体交換反応の平衡定数を n とすれば、各同位体水分子の濃度は n を用いて、 $[H_2O] = (1-n)^2$ (4), $[HDO] = 2n(1-n)$ (5), $[D_2O] = n^2$ (6)

のように表わせる。今 HDO, D_2O 分子に D 核を見出す確率をそれぞれ P_{HDO}, P_{D_2O} とし、 n における HDO, D_2O の相関時間を $\tau_{c,HDO}(n), \tau_{c,D_2O}(n)$ とする。もし、 D 核の交換の平均寿命時間 τ_h が、水分子の相関時間に比べて充分長ければ、すなわち、

$$\tau_h \gg \tau_{c,HDO}(n), \tau_{c,D_2O}(n) \quad (7)$$

が成立すれば、実測される見かけの相関時間 $\tau_c(n)$ は $\tau_{c,HDO}(n), \tau_{c,D_2O}(n)$ を用いて、

$$\tau_c(n) = P_{HDO} \cdot \tau_{c,HDO}(n) + P_{D_2O} \cdot \tau_{c,D_2O}(n) \quad (8)$$

のように表わされる。^{8,9)} ここで、 $P_{HDO} + P_{D_2O} = 1$ (9) であり、(4)~(6)式から、

$$P_{D_2O} = n/(2-n) \quad (10)$$

である。中性溶液では、 τ_h は 10^{-3} s 程度であり、¹⁰⁾⁻¹²⁾ τ_c は 10^{-12} s 程度であるので、(8)式は、 H_2O/D_2O 混合系で成立している。 $n=0$ 及び $n=1$ の時の τ_c は、 T_1 の実測値を $n=0, n=1$ にそれぞれ補外することによって(2)式から得られるが、図1(A)の結果を用いると、 $\tau_{c,HDO}(0) = 2.717 \text{ ps}$, $\tau_{c,D_2O}(1) = 3.273 \text{ ps}$ となった。今、 n における $\tau_{c,HDO}(n)$ 及び $\tau_{c,D_2O}(n)$ の $\tau_{c,HDO}(0)$ 及び $\tau_{c,D_2O}(1)$ からの偏差をそれぞれ $\Delta\tau_{HDO}(n), \Delta\tau_{D_2O}(n)$ とすれば、すなわち、

$$\tau_{c,HDO}(n) = \tau_{c,HDO}(0) + \Delta\tau_{HDO}(n) \quad (11)$$

$$\tau_{c,D_2O}(n) = \tau_{c,D_2O}(1) + \Delta\tau_{D_2O}(n) \quad (12)$$

と表わし、次に(9)~(12)を(8)に代入し、さらに(2)式を考慮すれば、 $T_1(n)^{-1}$ は、(10)式で定義される有効相関時間 $\tau_{c,eff}$ を用いて、

$$T_1(n)^{-1} = (3\pi^2/2)(e^2qQ/h)^2(1+\delta^2/3) \cdot \tau_{c,eff} \quad (13)$$

と表わされる。ここで、

$$\tau_{c,eff} = \left(\frac{2-n}{2-n}\right) K_t + \frac{n}{2-n} \tau_{c,D_2O}(1) + \frac{2-n}{2-n} \Delta\tau_{HDO}(n) + \frac{n}{2-n} \Delta\tau_{D_2O}(n) \quad (14)$$

であり、

$$K_t = \tau_{c,HDO}(0) / \tau_{c,D_2O}(1) \quad (15) \quad \text{である。}$$

② $\Delta\tau_{HDO}(n), \Delta\tau_{D_2O}(n)$ の関数形並びに水分子の相関時間における水素同位体効果

(14)式から明らかのように、 $\tau_{c,eff}$ は n の複雑な関数であり、 $\tau_{c,eff}$ を予測するには、 $\Delta\tau_{HDO}(n), \Delta\tau_{D_2O}(n)$ の関数形を知らねばならない。本研究では、 $\Delta\tau_{HDO}(n), \Delta\tau_{D_2O}(n)$ に種々の関数形を仮定し、色々の n について $T_1(n)^{-1}$ を計算し、これを実験結果(図1)と比較したところ、これら関数形としては、

$$\Delta\tau_{HDO}(n) = a \times n \quad (16)$$

$$\Delta\tau_{D_2O}(n) = b \times (n-1) \quad (17)$$

が適当であることが経験的にわかった。(16)(17)を(14)に代入し、 a 、 b を可変パラメータとし、実測値を(13)に curve-fitting させ、 a 、 b の最確値として $a=0.539$ ps, $b=0.450$ psの結果を得た。このときの計算値は、図1(A)の曲線で示されている。次に、(11)(12)に(16)(17)を代入しそれぞれ $n=1$ 、 $n=0$ とおけば、

$$a = \tau_{C,HDO}(1) - \tau_{C,HDO}(0) \quad (18)$$

$$b = \tau_{C,D_2O}(1) - \tau_{C,D_2O}(0) \quad (19)$$

が得られる。従ってパラメータ a 、 b は、注目しているHDO及びD₂O分子の相関時間における溶媒(バルクH₂O-D₂O間の)同位体効果を表わす。 a 、 b の値が等しくないのは、水分子の相関時間が溶媒水分子の同位体組成に依存するだけでなく、共鳴D核を含む水分子の同位体組成(HDO, D₂O)にも依存することを示唆している。以上の結果を整理すると、水分子の相関時間は、溶媒及び共鳴化学種の同位体組成の双方に依存し、

1) HDO in H₂O, $\tau_{C,HDO}(0) = 2.717$ ps (図1(A)の $n=0$ への補外値より算出)

2) D₂O in H₂O, $\tau_{C,D_2O}(0) = 2.823$ ps ($\tau_{C,HDO}(0)$, a を用い(18)式より算出)

3) HDO in D₂O, $\tau_{C,HDO}(1) = 3.256$ ps ($\tau_{C,D_2O}(1)$, b を用い(19)式より算出)

4) D₂O in D₂O, $\tau_{C,D_2O}(1) = 3.273$ ps (図1(A)の $n=1$ への補外値より算出)

の順に長くなることがわかった。

③ 絶対反応速度論による取扱い。 Δ^*H , Δ^*S における水素同位体効果

表2に、5°C~25°Cの温度範囲での $\tau_{C,eff}$ の温度依存性のいくつかの n について得られた結果を示す。 $\tau_{C,eff}$ に Eyring の絶対反応速度論が適用できるとすれば、

$$\tau_{C,eff}^{-1} = (R\theta/R) \cdot \exp(\Delta^*S/R) \cdot \exp(-\Delta^*H/R\theta) \quad (20)$$

が成立する。ここで、 R , R , R はそれぞれボルツマン・プランク・ガス定数、 θ は絶対温度である。 Δ^*H , Δ^*S が温度に依存しないならば、(20)式を変形して、 $\ln(R/R \cdot \tau_{C,eff} \cdot \theta) \sim \theta^{-1}$ プロットは直線になるはずである。図2は、表2の結果に基づきこのようなプロットをしたものである。プロットは、わずかに上に凸の曲線となり、 Δ^*H , Δ^*S が温度に依存することを示している。本研究では、このプロットを直線近似して、その直線の傾斜と切片とから、その温度範囲における平均の Δ^*H , Δ^*S を

Table 2. Effective correlation times ($\tau_{C,eff}$) obtained from quadrupole relaxation of deuterium for H₂O/D₂O mixtures at 30.7 MHz.

θ/K	deuterium atom fraction (n)				
	6.8×10^{-3}	6.8×10^{-2}	0.244 ^a	0.500	0.997
	$\tau_{C,eff}^a / ps$				
278.2	4.995±0.010	5.020±0.024	5.335±0.056	5.620±0.024	6.380±0.019
283.2	4.213±0.006	4.264±0.019	4.493±0.026	4.689±0.010	5.296±0.011
288.2	3.631±0.012	3.627±0.011	3.854±0.020	3.996±0.007	4.473±0.005
293.2	3.141±0.011	3.149±0.011	3.331±0.010	3.426±0.010	3.786±0.013
298.2	2.740±0.008	2.757±0.004	2.870±0.006	2.989±0.013	3.273±0.007

^a at 46.2 MHz.

^a $\tau_{C,eff}$ was obtained by using values of 213.7 kHz and 0.117 for the quadrupole coupling constant and asymmetry parameter, respectively.

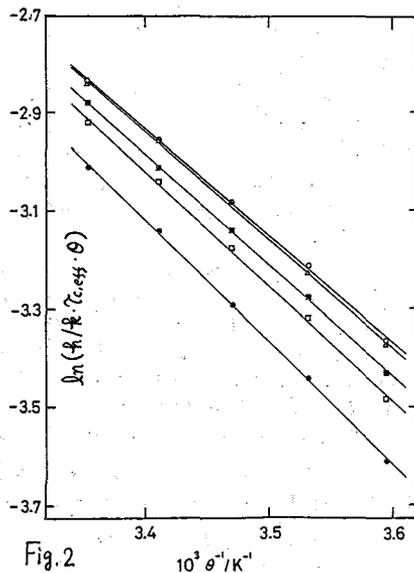


Fig. 2

算出した。 Δ^*H , Δ^*S は、図3に示すように n の増加と共に直線的に増加する。すなわち、5℃~25℃の温度範囲で Δ^*H , Δ^*S は、

$$\Delta^*H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1} = 2.46 \times n + 18.2 \quad (21)$$

$$\Delta^*S/\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1} = 6.77 \times n + 37.5 \quad (22)$$

で表わされる。 Δ^*H が大きな値を示すのは、活性化状態が形成される過程でいくつかの水素結合がこわされることを示唆している。このことは、 Δ^*S がかなり大きな正の値をとることと矛盾しない。すなわち、もし緩和過程に水素結合の破壊が伴うならば、活性化状態でのエントロピーは、初期状態でのエントロピーより大きくなると考えられるので、 Δ^*S は正の値をとる。ところで、 D_2O は H_2O と比べていわゆる“構造形成的 (structure-making)”性質が高いことが知られている^{13,14)}。これは、 $O-D\cdots O$ 重水素結合が $O-H\cdots O$ 水素結合に比べて強いからだと考えられている。本研究で得られた Δ^*H , Δ^*S の n 依存性の結果 (式(21), (22)) は、この定性的な解釈と調和している。たとえば、(22)式から、 D_2O 分子は活性化状態を形成する過程で H_2O (HDO) 分子より $6.77 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ だけ余分にエントロピーを獲得することが見出されたが、これは、初期状態において D_2O 分子の方が H_2O (HDO) 分子より“構造形成的”であることから容易に予想されることである。

同様の解析を、誘電緩和、粘性、自己・相互拡散について、同じ温度範囲で試みたところ、NMR 緩和で得られた結果と類似の結果が得られた (表3)。

【文献】 1) D.E. Woessner, *J. Chem. Phys.* 40, 2341 (1964). 2) J.C. Hindman et al. *ibid.*, 54, 621 (1971). 3) D. Lankhorst et al. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 86, 215 (1982). 4) V. I. Ionov et al. *J. Struct. Chem. USSR*, 11, 198 (1970). 5) T. DeFries et al. *J. Chem. Phys.* 66, 5393 (1977). 6) D.T. Edmonds et al. *J. Magn. Reson.*, 20, 515 (1975). 7) H. Bluysen et al. *Phys. Lett.*, 25A, 214 (1967). 8) H.G. Hertz, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 71, 979 (1967). 9) J.E. Anderson et al., *J. Chem. Phys.*, 50, 3784 (1969). 10) S. Meiboom, *ibid.*, 34, 375 (1961). 11) D.L. Turner, *Mol. Phys.* 40, 949 (1980). 12) B. Halle et al. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, 79, 1031 (1983). 13) E.H. Arnet et al. "Solute-Solvent Interactions", Marcel Dekker: N.Y. 1969, Chap. 6. 14) G.C. Pimental et al. "The Hydrogen Bond", Freeman, San Francisco, 1960. 15) E.H. Grant et al. *Brit. J. Appl. Phys.* 18, 1807 (1967). 16) E.H. Grant et al. *Trans. Faraday Soc.* 65, 1519 (1969). 17) L. Korson et al. *J. Phys. Chem.* 73, 34 (1969). 18) F.J. Millero et al. *J. Chem. Eng. Data*, 16, 85 (1971). 19) R. Mills, *J. Phys. Chem.* 77, 685 (1973). 20) L.G. Longworth, *J. Phys. Chem.* 64, 1914 (1960).

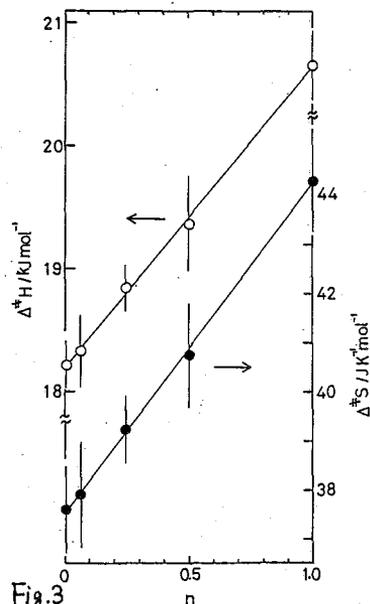


Fig.3

Table 3. Mean activation enthalpy and entropy for some dynamic properties of H_2O and D_2O derived from their temperature dependence between 278.2 K and 298.2 K.

Property	$\Delta^*H/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$		$\Delta^*S/\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$		Ref.
	H_2O	D_2O	H_2O	D_2O	
NMR Relaxation	18.2	20.7	37.6	44.3	This Work
Dielectric Relaxation	16.3	17.3	25.3	26.6	(15,16)
Viscosity ^a	18.3	20.4	30.7	35.8	(17,18)
Self-Diffusion ^b	17.1	18.8	----	----	(19)
Mutual-Diffusion ^c	17.0	18.6	----	----	(20)

^aThe viscosities of 100 mol% D_2O are obtained by linear extrapolation of the tabulated values for 98.35 mol% and 99.88 mol% D_2O (18).

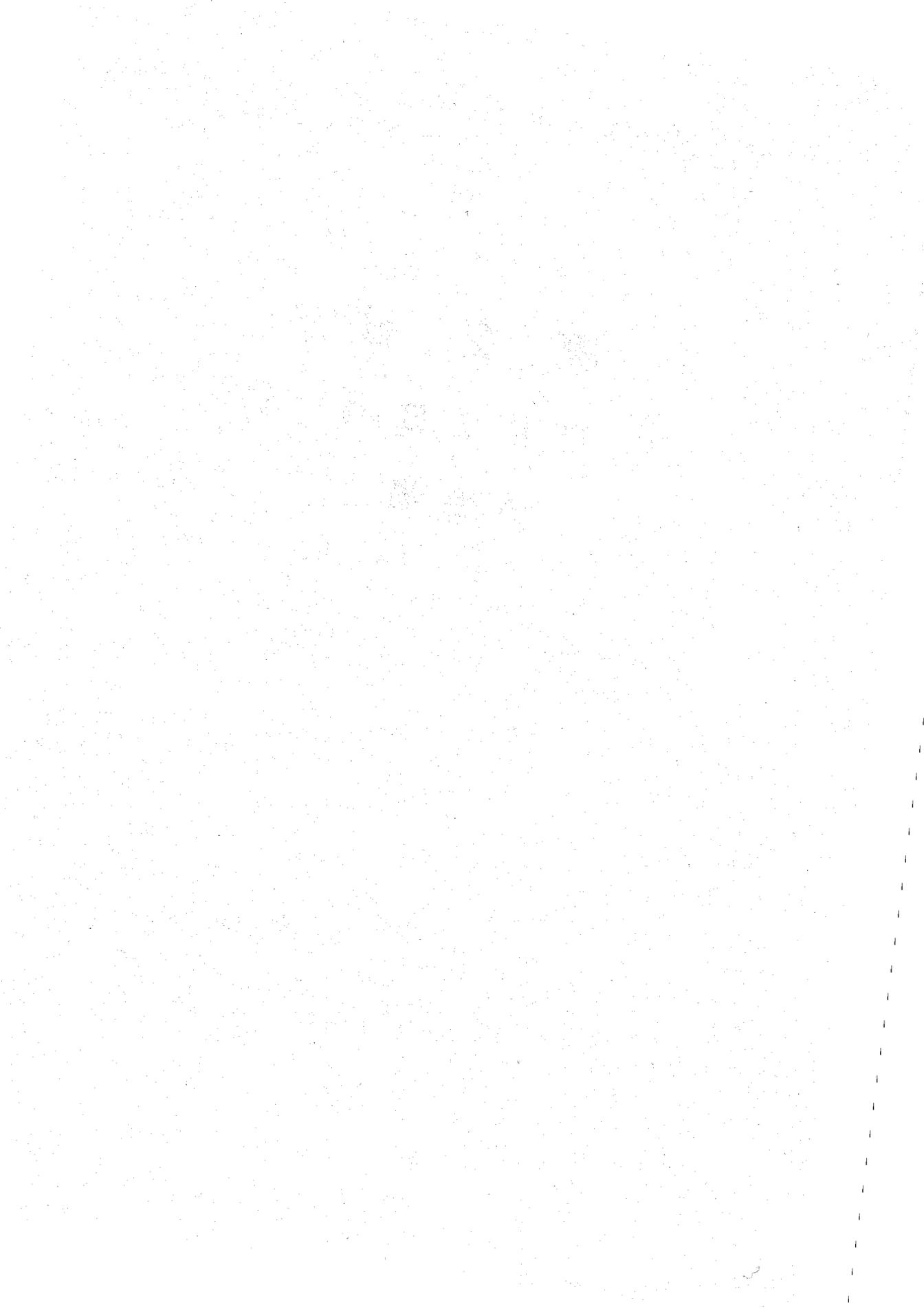
^bTracers used are HTO and DTO in H_2O and D_2O media, respectively.

^cExtrapolated to 0 mol% and 100 mol% D_2O using the diffusion data for a number of H_2O/D_2O mixtures.

第 2 日

11 月 7 日 (木)

A 会 場



Combination of 2D INADEQUATE with Polarization Transfer
Techniques and its Application to Structure
Determination of Sesquiterpenes

R. Benn and H. Moriyama

(Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, D-4330 Mülheim a. d. Ruhr)

Abstract: The polarization transfer techniques (INEPT and DEPT) have been incorporated in the 2D INADEQUATE sequence, thereby achieving a significant reduction of the spectral recording time for identification of satellites at protonated carbons. The use of the combined pulse sequences is illustrated by the structure elucidation of a sesquiterpene.

Introduction: There are several powerful two-dimensional NMR techniques ¹⁾ for structure elucidation of a carbon skeleton. Among these, 2D INADEQUATE ²⁾ is most direct but suffers from its low sensitivity. Several approaches have been undertaken to improve this situation. The signal intensity of the satellites of quaternary carbons can be optimized by taking into account the relaxation behaviour of the AX spin systems ³⁾. On the other hand, satellites at protonated carbons can be enhanced combining INEPT ⁴⁾ with INADEQUATE ⁵⁾. More recently DEPT ⁶⁾ has also been utilized in this sequence ^{7,8)}. Purging pulses, introduced to INEPT and DEPT ⁹⁾, reduce distortions in proton-coupled spectra. Consequently, purging and sandwich pulses are of central interest when polarization transfer techniques are combined with INADEQUATE. In the following we illustrate the use of such sequences for structure elucidation, taking a sesquiterpene as an example.

Experimental: The pulse sequences for combination of 2D INADEQUATE (1a) with INEPT (1b) and DEPT (1c) are illustrated in Fig. 1. The parameters τ_3 and θ are optimized for the detection of methine, methylene, and methyl carbon atoms. For the experiments with the sesquiterpene 1, τ_3 was set to $(8J_{CH})^{-1}$ and θ to 45° . The

ラインハルト・ベン・オモリヤまひろし

relaxation delay was 3 s. $\tau_1 = (4J_{CC})^{-1}$ was chosen as 0.007 s and $\tau_2 = (4J_{CH})^{-1}$ was 0.002 s. τ_4 (sequence b) is given by $\tau_1 - \tau_3$, whereas τ_5 (sequence c) is $\tau_1 - 2\tau_2$. The 2D INADEQUATE experiments were carried out with 32 phase cycles. For sequence (b) and (c) 8 phase cycles for the polarization transfer experiments were employed, yielding 256 phase cycles in total. In the case of large pulse angles, sandwich pulses¹⁰⁾ are recommended instead of the 180° pulses. Composite pulse decoupling¹¹⁾ should give the best results. The experiments were carried out on a Bruker AM 200 spectrometer equipped with a process controller and using a 5 mm ¹H/¹³C dual probe head. The preparation of sesquiterpenes such as 1 was reported recently¹²⁾.

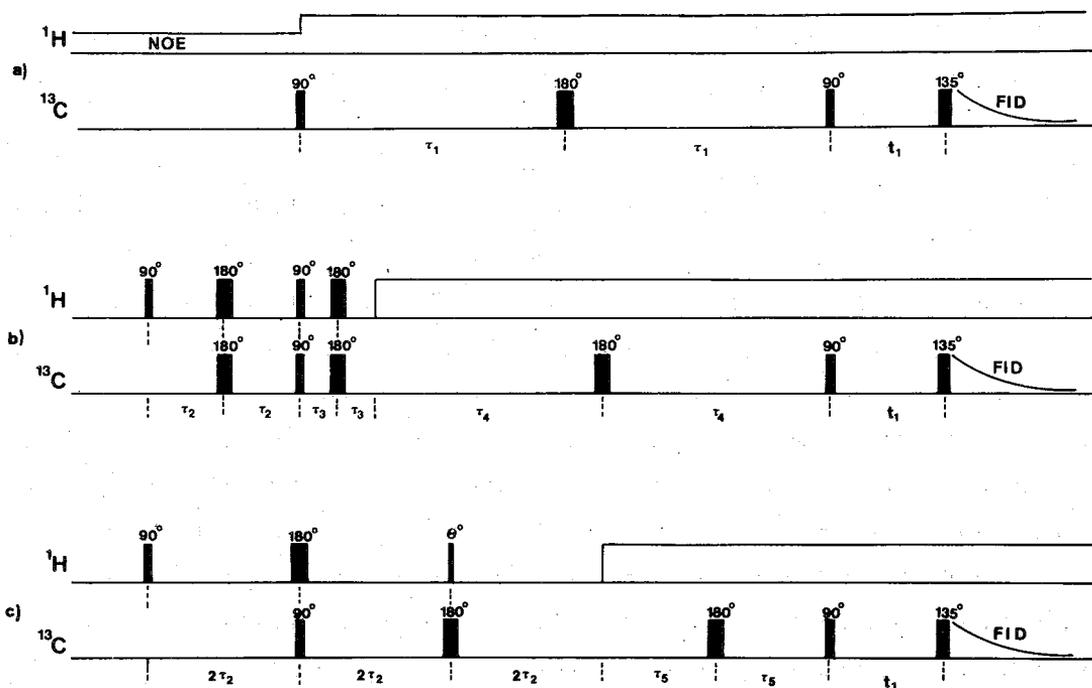


Fig. 1: Pulse sequences for the 2D INADEQUATE experiments with sensitivity enhancement (a) via NOE²⁾; combination of 2D INADEQUATE with INEPT (b) and with DEPT (c). In (b) and (c) the carbon magnetisation can be presaturated in the preparation time. (For other variants cf. text).

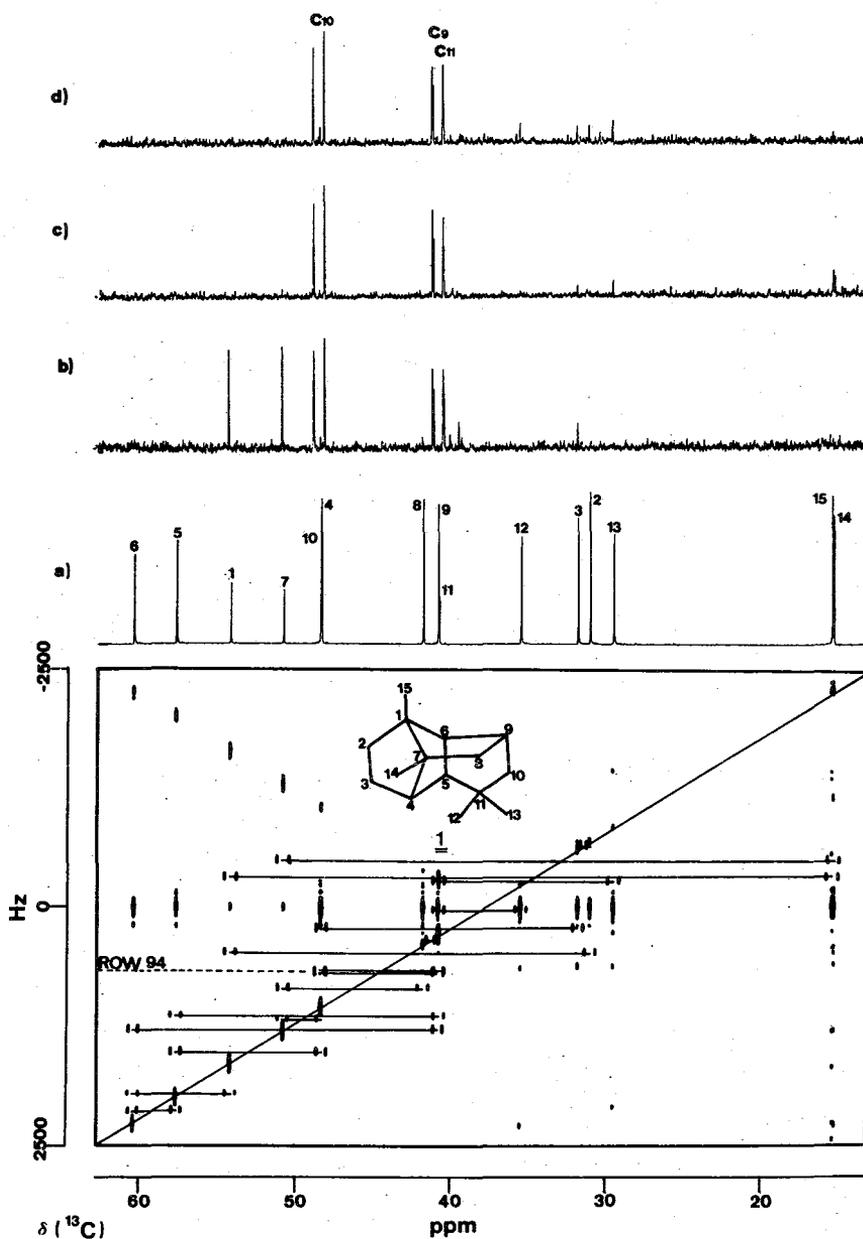


Fig. 2: (a) 50.33 MHz $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ NMR spectrum of 1; (b) - (d) cross section of row No. 94 showing the normalized intensity of the satellites at carbon C_9 , C_{11} and C_{10} recorded with the 2D INADEQUATE sequence (b), with INEPT + INADEQUATE (c) and with DEPT + 2D INADEQUATE (d). Contour plot belonging to cross section (d) and structure of the sesquiterpene 1.

Results and Discussion: The contour plot of the two dimensional ^{13}C - ^{13}C satellite spectrum of the sesquiterpene isomer 1, obtained from the combined DEPT + 2D INADEQUATE sequence is presented in Fig. 2. Except for the satellites belonging to the bond between C_1 and C_7 , all connectivities can be deduced unambiguously. A significant enhancement in sensitivity is obtained compared with the standard 2D INADEQUATE experiment (cf. the cross section (b) (row 94) in Fig. 2). Theoretically, the maximum enhancement is $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}}$ as opposed to $1 + \gamma_{\text{H}}/2\gamma_{\text{C}}$, provided that the full NOE factor is obtained. A further advantage of sequence (1b) or (1c) is that the repetition time of the pulse sequences using the polarization transfer technique is determined by T_1 of the protons. In practice, a sensitivity enhancement of 2-3 can be obtained, which reduces the spectral acquisition time by a factor of 4-9. By implementation of DEPT⁺⁺ 9), INEPT GL, INEPT⁺GL or MODEPT 13) further improvements of the sequences (1b) and (1c) are achieved. It is also noted that by combination of these variations of DEPT with INADEQUATE an editing of satellites 14) due to the multiplicity of the parent carbon atoms becomes possible.

Acknowledgement: We are indebted to Dr. R. Rienäcker for providing us with the sesquiterpene. H. M. gratefully acknowledges the grant of a stipend from the Max-Planck-Gesellschaft.

References

- 1) W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, **64** (1976) 2229; R. Benn, H. Günther, *Angew. Chem.*, **95** (1983) 381.
- 2) A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.*, **43** (1981) 478; T. H. Mareci, R. Freeman, *J. Magn. Reson.*, **48** (1982) 158.
- 3) R. Benn, *J. Magn. Reson.*, **59** (1984) 164.
- 4) G. A. Morris, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.*, **101** (1979) 760.
- 5) O. W. Sørensen, R. Freeman, T. Frenkiel, T. H. Mareci, R. Schuck, *J. Magn. Reson.*, **46** (1982) 180.
- 6) D. M. Doddrell, D. T. Pegg, M. R. Bendall, *J. Magn. Reson.* **48** (1982) 323.
- 7) cf. Ref. 3; R. Benn, *Abstr. 8th. Meeting on Magn. Reson. ISMAR, Chicago, p. 38* (1983).
- 8) S. W. Sparks, P. D. Ellis, *J. Magn. Reson.*, **62** (1985) 1.
- 9) O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **51** (1983) 477.
- 10) M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.*, **48** (1982) 234.
- 11) M. H. Levitt, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, **55** (1983) 247; A. J. Shaka, J. Keeler, R. Freeman, *J. Magn. Reson.*, **53** (1983) 313.
- 12) R. Rienäcker, J. Graefe, *Angew. Chem.*, **97** (1985) 348.
- 13) U. B. Sørensen, H. Bildsøe, H. J. Jakobsen, *J. Magn. Reson.*, **58** (1984) 517.
- 14) R. Benn, *J. Magn. Reson.*, **56** (1983) 460.

1. 序

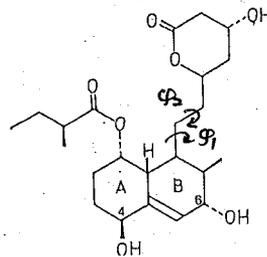
我々は、溶液中における分子の三次元構造(コンホメーション、及びコンフィギュレーション)を解析する手段の一つとして、 $^1\text{H-NMR}$, NOE の定量解析の利用を検討している¹⁾。結合定数などの他の NMR パラメータから、考慮すべきコンホマーの数を限定し、必要ならば、コンフィギュレーションをも考慮して得られるいくつかの分子構造について、それらに予想される Ti , NOE の大きさを計算し、実測値と比較検討する事によって、最も確からしい溶液中のコンホメーションを推定しようとするものである。その最初のステップとして、考慮すべき分子構造の三次元座標が必要である。従来、X線結晶解析とは独立に座標を求める方法としては、Dreiding model から直接読みとったり、内部座標を指定する方法などが行なわれてきたが、天然有機化合物のような複雑な分子へ応用するには煩雑でもあり、又精度も十分でなかった。我々は $\text{HMGR-CoA reductase}$ の阻害剤として知られる ML-236B (*mervastatin*) の代謝産物、 $4\beta, 6\alpha$ -dihydroxy ML-236B (1) のコンホメーション解析において、そのテカリン環部分の種々のコンホメーションの座標を得る目的から、distance geometry法(DG法)²⁾の適用を試みた。DG法は、元来タンパク質など高分子化合物のコンホメーションを規定する方法として開発されたものであるが、若干の修正を加える事によって、低分子化合物への応用も可能である事がわかった。

以下、DG法による座標生成、及び1の Ti , NOE の解析結果について報告する。又同様に ML-236B の代謝産物であり、X線結晶解析が行なわれている 3β -hydroxy ML-236B についての Ti , NOE の定量解析結果についても述べる。

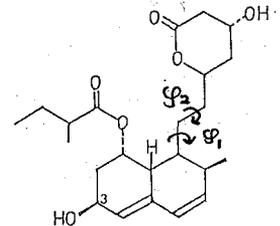
2. 実験法、及び解析法

2-1 $^1\text{H-NMR}$

1, 及び2の0.5% (w/v) CD_3OD 溶液を、凍結融解を5回繰り返した後、凍封し、 Ti , NOE 測定用試料とした。 $^1\text{H-NMR}$ はIRFT法により測定し、 NOE は差スペクトル法により測定した。 Ti , NOE の計算は、DG法によって得た座標を用いて既に報告した方法¹⁾に従って行なった。



1, $4\beta, 6\alpha$ -dihydroxy ML-236B



2, 3β -hydroxy ML-236B

2-2 distance geometry 法による座標計算

DG法は、分子の全原子間距離を知って、それを三次元座標に変換する方法である。原子 i , j 間の距離 d_{ij} について上限値 u_{ij} , 下限値 l_{ij} を与え、 $[l_{ij}, u_{ij}]$ の範囲で

はるやまひでゆき・こんどうみちお

d_{ij} を random に選択し、 d_{ij} を成分とする距離行列 D を求める。 D から、 R_{ij} , R_{ij} の内積を成分とする計量行列 Q を求め、 Q のスペクトル表示から三次元座標を計算するが、その最終段階で、得られた座標が $[l_{ij}, u_{ij}]$ の範囲を満足するように、誤差関数 $F_{err.}$ を用いて座標の最適化を行なう必要がある。低分子化合物へ適用する場合、二重結合の平面性を確保するなどの為には、原子間距離のみを制限条件としたのでは不十分であったたり、

(1)式

$$F_{err.} = \sum' (l_{ij}^2 - d_{ij}^2)^2 + \sum' (u_{ij}^2 - d_{ij}^2)^2 + \sum (f_{ch}^* - f_{ch})^2 + \sum' (\varphi_l - \varphi)^2 + \sum' (\varphi_u - \varphi)^2 \dots (1)$$

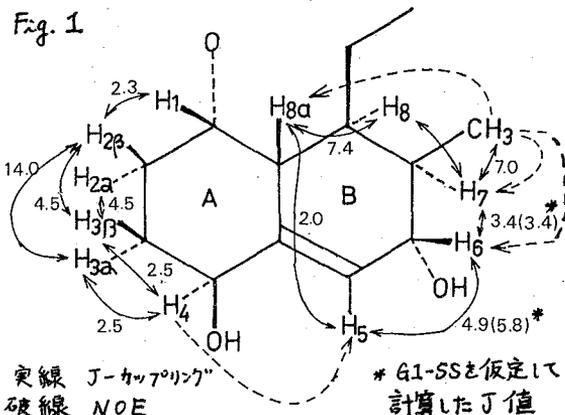
に示すように新たに、オ4、オ5項を付加し、二面角 φ が $\varphi_l \leq \varphi \leq \varphi_u$ の条件を満足するよう座標の修正を行なう事とした。尚、オ1、オ2項は d_{ij} がその下限値、及び上限値より小さく、あるいは大きくなった場合についてのみ和をとり、オ3項は *chilarity* を指定する為の項である。 $F_{err.}$ の極小化は二段階に分けて行ない、最初はオ3~オ5項について極小化を行ない、次いで全部の項を含めた極小化を行なった。このようにして得られた座標は、さらに分子力場計算 (MM2) によって精密化を行なった。

3. 結果、及び考察

3-1 4 β , 6 α -dihydroxy ML-236 B (2)

スペクトルの帰属は decoupling 及び NOE 差スペクトルによって行なった。Fig. 1 に示すように、 $J_{2\beta, 3\alpha} = 14 \text{ Hz}$ である事から

Fig. 1



より、 $H_{2\beta}$, $H_{3\alpha}$ は、*anti-periplanar* の関係にあり、 H_1 は、ブロードな *singlet* として観測される事から $H_{8\alpha}$, $H_{2\alpha}$, $H_{2\beta}$ とは互いに *gauche* の関係にある事が示唆される。したがってA環は *chair*型コンホメーションをとっていると考えられるが、B環のコンホメーションは、結合定数だけでは決められない。

この T_1 , NOE の値を定量的に解釈するため、DG法による座標の生成を行なった。Fig. 2 に示す 13 原子からなる系について

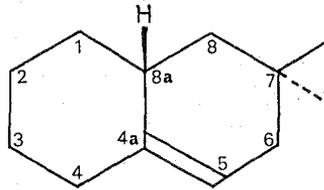
DG法を適用した。C7 のメチル炭素、及び H_7 , $H_{8\alpha}$ は、7位、8a位の *chilarity* を正しく指定するためである。表1に典型的な入力条件、及びDG法の実行結果を示す。結合距離、結合角として標準値を用い、その他に5コの二面角及び6コの非結合原子間距離を制限条件とした。化学的に "reasonable" な座標を生成させる為には、このような非結合原子間距離を入力する事は必須であった。*Chilarity* の指定は 8a 位についてのみ行なった。DG法を実行した結果、入力した値は、右欄に示す値となった。ほぼ入力条件を満足

Table 1 A Typical Constraints Applied to the Distance Geometry Generated Structure for the $\Delta^{7\alpha}$ octaline unit of 1

Constraints	Results
Bond Lengths (Å)	
C _{sp3} -C _{sp3}	1.54 1.56 + 0.04 (1.55 + 0.01) ^a
C _{sp3} -C _{sp2}	1.53 1.45 + 0.09 (1.53 + 0.03) ^a
C _{sp2} -C _{sp2}	1.34 1.49 (1.35) ^a
Bond Angles (°)	
C _{sp3} -C _{sp3} -C _{sp3}	110.0 110.9 + 4.9 (110.8 + 1.7) ^a
C _{sp3} -C _{sp2} -C _{sp3}	120.0 122.2 + 2.7 (122.9) ^a
Inter Atomic Distances (Å)	
C ₁ -C ₄	2.8 - 3.0 2.86
C ₂ -C _{4a}	2.8 - 3.0 2.96
C ₃ -C _{8a}	2.8 - 3.0 2.98
C _{4a} -C ₇	2.9 - 3.1 2.91
C ₂ -C ₅	4.5 - 5.5 4.35
C ₃ -C ₇	4.5 - 5.5 5.15
C ₃ -C(7-Me)	5.8 - 6.2 6.41
Dihedral Angles (°)	
C _{8a} -C _{4a} -C ₅ -C ₆	-5.0 - 5.0 3.3
C ₂ -C ₁ -C _{8a} -C _{4a}	50.0 - 70.0 33.3
C ₁ -C ₂ -C ₃ -C ₄	50.0 - 70.0 64.2
C ₆ -C ₇ -C ₈ -C _{8a}	50.0 - 70.0 65.5
C _{8a} -C ₁ -C ₂ -C ₃	-70.0 - -50.0 -54.0
Chirality Constraint	
f _{ch} (C8a)	-8.8
F _{err}	0.440

(ている事がわかる。得られた座標は、水素原子を付加し分子力場計算によって精密化した後、緩和パラメータの計算に用いた。 δ -lactone側鎖などの鎖状部分は、後に必要に応じて付加した。4通りの入力条件について、各10回の試行を行ない、得られたコンホマーの中から Fig. 3に

Fig. 2



示す G1 から G5 までのコンホマーを選択し、以下の計算に用いた。これらのA環は chair 型で

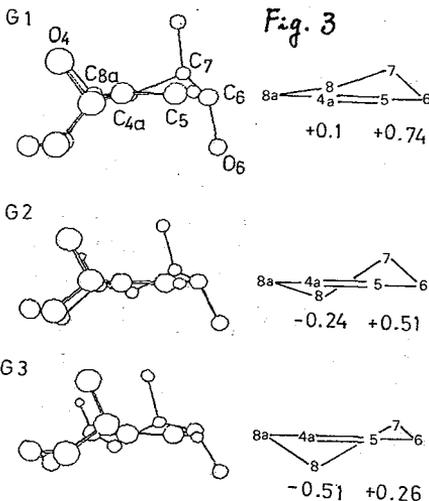
あるが、G1~G4のB環は、7 β , 8 α -half chair, G5のB環は half-boat 型コンホメーションをとっている。J_{8,8a}の大きさから考え、B環が7 α , 8 β -half chairの可能性は排除できる。

G1~G5について $\tau_c = 0.8 \times 10^{-10}$ s を仮定して計算した T₁、及び NOE の値を実測値

と一緒に表2.3に示す。計算に際しては、さらに4, 6位の水酸基の配置、 δ -lactone側鎖のコンホメーションをも考慮して

実測値を最もよく説明するコンホメーションを探索した。その結果、G1のコンホメーションで、水酸基はともにS配置とした場合に実測値との一致が最

a) Values after energy minimization



良となった。この時 δ -lactone 側鎖のコンホメーションは、 $\varphi_1 = 120^\circ$, $\varphi_2 = 180^\circ$ であった。すなわち、 δ のテカリン部分の B 環は、 $\gamma\beta$ -sofa 型であり、 δ -lactone 側鎖は、比較的限られたコンホメーションをとっている事がわかった。 δ の水酸基の配置はこの解析によって確定する事ができた。

3-2 $\beta\beta$ -hydroxy ML-236B (2)

δ について X 線結晶解析結果を用いて T_1 の定量解析を行なった所、実測値をよく再現した。この時、 δ -lactone 側鎖について、 $\varphi_1 = 60^\circ$, $\varphi_2 = 180^\circ$ となって、結晶中の値、 $\varphi_1 = 55.1^\circ$, $\varphi_2 = 176.3^\circ$ とよく一致し、結晶中のコンホメーションが溶液中でも保たれている事が示された。 δ のテカリン環の生成に DG 法を適用した結果についても報告する。

最後に試料を恵与された当社、井澤博士に感謝する。

(文献)

- 1) H. Haruyama, H. Kurihara and M. Kondo, Chem. Pharm. Bull, **33**, 905 (1985)
- 2) G. M. Crippen, "Distance Geometry and Conformational Analysis", Research Studies Press (1981)

Table 2 Observed and Calculated T_1 Values for 1

	H ₁	H ₄	H ₅	H ₆	H ₇	H _{8a}	7-Me	q
Obs.	0.60	1.00	1.28	1.08	0.72	0.65	0.57	
Calc.								
G1-SS	0.66	0.92	1.27	1.21	0.74	0.67	0.54	0.07
G1-SR	0.66	0.91	1.59	1.49	0.72	0.67	0.56	0.14
G1-RR	0.66	1.42	3.91	1.48	0.72	0.61	0.56	0.30
G1-RS	0.66	1.42	2.55	1.19	0.74	0.61	0.54	0.23
G2-SS	0.60	0.98	1.26	1.23	0.67	0.59	0.50	0.09
G2-SR	0.60	0.97	1.43	1.37	0.62	0.59	0.52	0.12
G2-RR	0.60	1.39	3.36	1.35	0.62	0.55	0.52	0.29
G2-RS	0.60	1.38	2.64	1.21	0.67	0.55	0.50	0.24
G3-SS	0.54	1.23	1.66	1.17	0.80	0.57	0.51	0.15
G3-SR	0.54	1.23	1.77	1.34	0.69	0.57	0.54	0.16
G3-RR	0.53	1.40	3.33	1.33	0.69	0.52	0.54	0.29
G3-RS	0.53	1.40	2.98	1.16	0.80	0.52	0.52	0.27
G4-SS	0.58	1.23	1.75	1.09	0.75	0.56	0.48	0.16
G4-SR	0.58	1.23	1.73	1.33	0.62	0.56	0.50	0.17
G4-RR	0.58	1.41	3.22	1.32	0.62	0.50	0.50	0.30
G4-RS	0.58	1.40	3.27	1.09	0.75	0.50	0.48	0.29
G5-SS	0.62	1.41	2.77	0.99	0.84	0.74	0.52	0.25
G5-SR	0.62	1.43	1.91	1.43	0.71	1.22	0.52	0.26
G5-RR	0.61	1.51	2.53	1.38	0.72	1.13	0.50	0.29
G5-RS	0.62	1.50	4.18	1.04	0.86	0.70	0.50	0.30

Table 3 Observed and Calculated NOE factors for 1

Irr.	7-Me		H ₄						
	H ₅	H ₆	H ₇	H _{8a}	H ₃	H ₅	H ₆	H _{8a}	
Obs.									
obs.	0.00	0.10	0.12	0.08	0.03	0.02	0.18	-0.02	0.00
calc.									
G1-SS	0.00	0.14	0.11	0.07	0.06	0.02	0.25	-0.03	0.00
G1-SR	0.03	0.00	0.12	0.07	0.06	0.02	0.30	-0.02	0.00
G1-RR	0.08	0.00	0.12	0.06	0.00	0.06	0.07	0.00	0.04
G1-RS	0.01	0.14	0.11	0.06	0.00	0.06	0.05	0.00	0.04
G2-SS	0.00	0.15	0.10	0.11	0.05	0.03	0.26	-0.03	0.00
G3-SS	-0.01	0.19	0.11	0.18	0.04	0.03	0.26	-0.03	0.00
G4-SS	-0.02	0.21	0.11	0.18	0.03	0.04	0.22	-0.02	0.00
G5-SS	0.00	0.05	0.17	0.00	0.03	0.03	0.22	0.00	0.00

(国立がんセンター研) \circ 相田美砂子, 多田涼子, 斎藤 肇

1. はじめに

最近, ^{13}C , ^{29}Si などのスピンの数が $1/2$ の核種の女ならず, スピン数 $> 1/2$ の核四重極モーメントを有する核の固体高分解能 NMR の実験が数多く試みられるようになってきている。これらの核の NMR シグナルの鋭化は, マジックアングルスピンニング (MAS) のみならず, 54.44° 以外の角度での高速回転がより有効な場合がある。今回とりあげた ^{23}Na はスピン数 $3/2$ でこのカテゴリーに入る。しかし, 核四重極結合定数 e^2qQ/h や Asymmetry factor η が小さい場合, MAS による鋭化が十分期待できる。そこで, 4つの異なる核四重極結合定数 e^2qQ/h の ^{23}Na コンプレックスの MAS NMR スペクトルを測定し, 化学シフトの精密測定を行おうと同時に, 化学構造との相関関係を探ることとした。

したがって, 本報では ^{23}Na 化学シフトの固体状態での範囲, コンプレックスのモデルシステムを用いたリガンドから Na への電子移動の見積り, static ^{23}Na NMR スペクトルから得られる核四重極結合定数の見積りおよび化学シフトの補正, さらに MAS による線巾減少効果, 等について述べる。

2. 実験方法

^{23}Na MAS NMR スペクトルの測定は, Bruker CXP-300 スペクトロメーター, Z 32DR MAS プロブを用いて, 79.35 MHz で行った。固体試料をテリリシローターにつめて, $2\sim 3\text{ kHz}$ での高速回転を行った。この場合のスペクトル観測巾は 30 kHz データポイントは 4 K と使用した。化学シフトの標準は 1 M NaCl 溶液の ^{23}Na ピークを用いた。

Static ^{23}Na NMR スペクトルは, 同じスペクトロメーターで 32 VHP 高出力プロブを使用し, 観測巾 500 kHz , データポイントは 2 K によった。核四重極結合定数は, 一次振動によるサテライトピークの分裂間隔および, 二次振動効果にもとづく中央 ($3/2 \leftrightarrow 1/2$) 遷移の分裂パターンから求めた。¹⁾

H_2O および $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$ をリガンドとした時の, リガンドから Na への電子移動およびコンプレックスの安定化エネルギーを, $6-31\text{ G}$ の basis set とする Ab Initio MO 計算 (IMPACT プログラム) により求めた。

3. 実験結果と考察

A. Static ^{23}Na NMR スペクトル

図1にスペクトル巾 500 kHz をとることによって得た NaClO_3 の static ^{23}Na NMR スペクトルを示す。(A) の中央ピークの両側にあるピークが ($3/2 \leftrightarrow 1/2$), ($1/2 \leftrightarrow 3/2$) 遷移によるサテライトピーク, (B) は中央ピークの拡大スペクトルで二次振動によるピークの分

あいだ・女さこ, たべた・りまうこ, さいとう・はらの

裂を示している。一次振動分裂の場合、中央ピークとサテライトピークの向隔の4倍が e^2qQ/h の値になる。二次振動による分裂の向隔を Δ とすると、

$$\frac{v_Q^2}{v_0} = \frac{4\delta}{25} \Delta \quad (1)$$

$$v_Q = \frac{1}{2} \cdot \frac{e^2qQ}{h}$$

からモア重接結合定数 e^2qQ/h と求めることができる。ここで、 v_0 はラモア周波数である。このようにして求めたモア重接結合定数と表1にまとめた。ただし、この解析は

asymmetry factor がゼロの場合のみ正しいが、スペクトルパターンからみて、あるいは化学構造からみて今回ここで取り上げた試料についてはこの仮定が成立する。

Lippmaa らは、半整数スピンのMAS NMR スペクトルから得られるスペクトルピークの重心は、モア重接結合定数がゼロでない場合次式により、高電圧側にシフトすること

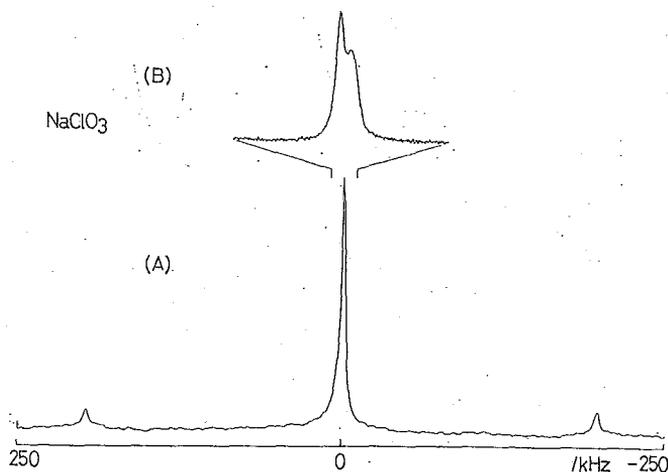


図1. NaClO₃ の Static ²³Na NMR スペクトル

Table 1. ²³Na Chemical Shifts of Some Inorganic Salts in the Solid State (ppm from 1 M NaCl Soln.)

	Static		MAS (ppm)			Crystal structure
	Type of spectrum ^{a)}	$\frac{e^2qQ}{h}$ (kHz)	Obsd chemical shifts	Correction of chemical shifts by quadrupole interaction ^{b)}	Corrected chemical shifts	
NaF	s	0	7.9 ± 6	0	7.9 ± 6	Cubic
NaCl	s	0	7.9 ± 0.3	0	7.9 ± 0.3	Cubic
NaBr	s	0	6.0 ± 0.3	0	6.0 ± 0.3	Cubic
NaHCO ₃	s	0	-0.2 ± 0.7	0	-0.2 ± 0.7	
Na(Tetrakis(4-fluorophenyl)borate)	s	0	-0.5 ± 0.3	0	-0.5 ± 0.3	
NaBiO ₃	s	0	-0.8 ± 1.3	0	-0.8 ± 1.3	
NaSCN	s	0	-2.1 ± 0.6	0	-2.1 ± 0.6	
NaI	s	0	-2.7 ± 0.4	0	-2.7 ± 0.4	Cubic
NaN ₃	f.o.	286±2	-3.5 ± 0.3	0.3	-3.2 ± 0.3	Rhombohedral
NaHCO ₃	s.o.	700±10	-5.4 ± 0.6	1.9±0.1	-3.5 ± 0.7	Monoclinic
NaClO ₃	f.o./s.o.	785±2	-6.5 ± 0.6	2.4	-4.1 ± 0.6	
NaNO ₃	f.o.	332±2	-7.3 ± 0.2	0.4	-6.9 ± 0.2	Rhombohedral
NaBH ₄	s	0	-8.5 ± 1.7	0	-8.5 ± 1.7	Cubic
NaIO ₄	f.o.	47±2	-12.5 ± 0.4	0.02	-12.5 ± 0.4	Tetragonal
NaClO ₄	o	0	-20.0 ± 0.5	0	-20.0 ± 0.5	Tetragonal
NaBF ₄	s.o.	1200±100	-24.8 ± 1.2	5.7±1	-19.1 ± 2.5	Tetragonal
NaBPh ₄	s	0	-51.7 ± 1.6	0	-51.7 ± 1.6	

^{a)} s stands for single line; f.o. stands for the first-order split signal; s.o. stands for the second-order split central peak.

^{b)} Estimated errors smaller than 0.1 ppm are not shown.

と見い去る。²⁾

$$\delta = \frac{1}{40} \left(\frac{e^2 q Q}{h} \right)^2 / \nu_0 \quad (2)$$

(ただし, $\eta = \frac{3}{2}$). 2の補正項を表1にまとめたが, NaBF_4 の場合に最も大きく5.7 ppm である。

B. MAS ^{23}Na NMR

図2に示すように, MASによって十分に narrowing があがり, 高分解能 NMR スペクトルとして十分に耐える。今回の測定は高磁場で行ったものであり, $e^2 q Q/h \neq 0$ である NaN_3 , NaHCO_3 , NaNO_3 などの場合もシングルピークとして挙動を示している。このスペクトル線の分裂は $(e^2 q Q/h)^2 / \nu_0$ に比例する

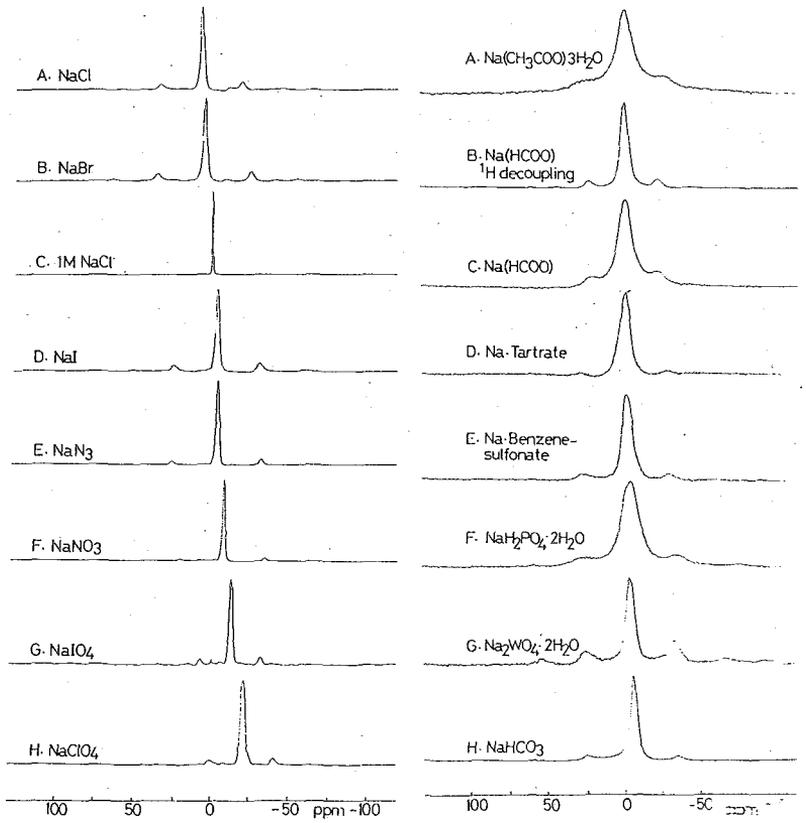


図2. ^{23}Na NMR スペクトルの MAS による Narrowing

ため、実質上はこの条件では観測される、スペクトル線幅を極めて容易に1にする要因でもある。

スペクトルの線幅は無換塩の場合500 Hz以下に減少している。³⁾しかし、図2の右側に示すように無換塩の場合ほどには減少せず、1500 Hzにあり、その原因は、線幅の拡がりの一つの原因として、 ^1H の dipolar field が無視できない場合があり、たとえ図2右側 B, C のように ^1H デカップリングによる narrowing があってもある。さらに、²⁾ 遷移遷移する溶媒分子が Na に配位したコンプレックスでは、 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{D}_2\text{O}$ によって著しい narrowing がみられた。

表1からわかるように、固体状態の ^{23}Na 化学シフトの範囲は60 ppmに及ぶ。とくに NaBPh_4 は -51.7 ppm にシフトがみられ、溶液状態でもこれに認められる Na^+ イオンの値 -61.9 ppm に近い。Muller, Fraga の計算にもとづき ^{23}Na から中心の s 電子が欠けた時の diamagnetic term は 7.7 ppm であることと考慮すると、ガス状態に相当する Na^+ イオンの化学シフトは -55.4 ppm になり、 NaBPh_4 の化学シフトはこの値に極めて近い。さういふことは、この場合のアニオンから Na の電子移動が無視できるほど小さく、その結果化学シフトの常磁場項が存在せず、異常に高磁場側にピークがみられたこととなる。一般に、アニオンのサイズが大きいほど高磁場シフトの傾向がある(表1参照)。同様のことが、遷移遷移する溶媒分子が Na に配位したコンプレックスの場合についても起こる。そこで、次第でこれらの Na コンプレックスを決定して、リガントから Na

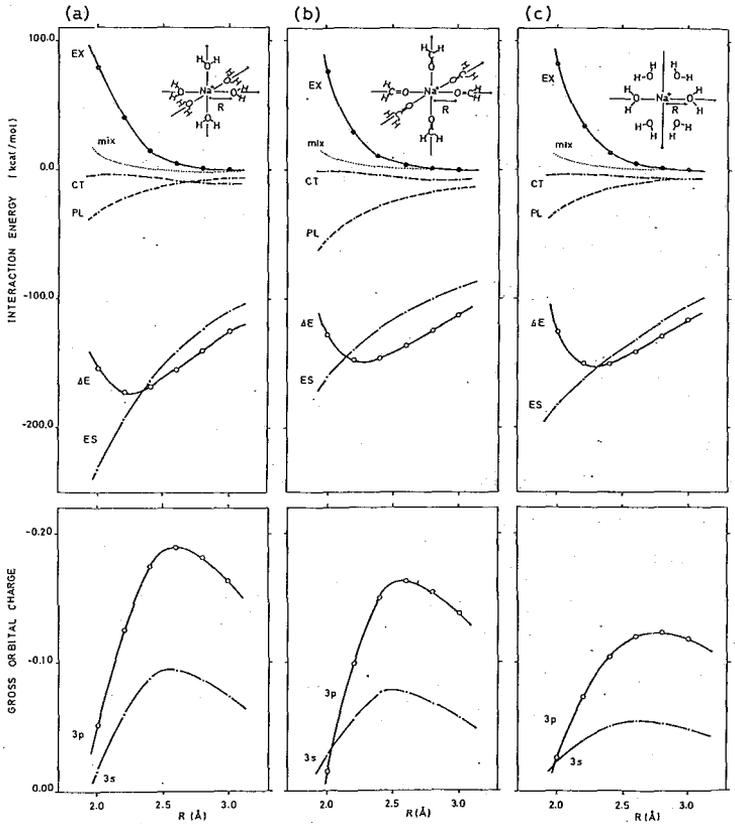
イオンへの電子移動効果と Ab Initio MO 計算から見れる。
C. Ab Initio MO 計算

²³Na 化学シフトは Kondo, Yamashita¹⁾によるアニオン外側の s, p 電子と金属イオンの 3p 軌道の重なりによって説明できる。しかし、この取り扱いは水分子の同様に不満足である。Bloor, Kidd²⁾は Shneider-Buckingham に基づいて、3p 電子 1 個あたり 11α 核磁矩項の寄与は -270 ppm とした。したがって、これに基づいて 3p 軌道への電子移動と Ab Initio MO で計算することができれば、水分子の実験データ（主として鏡散³⁾）と解釈するに都合がよい。

図 3 は Na コンプレックスのモデル系として、Na に H₂O (あるいはエーテルのモ

デル) を配位した H₂C=O (アセトン, バリノマイシン等の C=O 基がリガンドとなるモデル), が配位したもの (a, b), あるいは平面に H₂O が配位したクラウンエーテルのモデル (c) について、相互作用エネルギー (上段), 電子密度 (下段) と Na-O 距離 R に従ってプロットしたものである。明らかに相互作用エネルギーが極小になるのは R=2.4 Å 付近で、実験結果とよく合う。また静電相互作用 (ES) が最も重要な役割を担っている。電子移動は (a), (b), (c) のいずれも R=2.5 Å 付近で最大で、その後は距離が大きくなるにつれて減少する。R=2.5 Å の 3p 軌道の電子密度は (a), (b), (c) をそれぞれ 0.19, 0.16, 0.11 となり、Bloor, Kidd の報告から²⁾Na 化学シフトは -4, -12, -25 ppm に与える。ただし、この時がス状態の Na⁺イオンの化学シフトは -55.4 ppm と計算に用いている。ここで得られた²³Na 化学シフトは、鏡散³⁾で述べた Na コンプレックスの²³Na 化学シフトとよく説明できるとともに、²³Na 化学シフトは主として、アニオン配位リガンドからの 3p 軌道への電子移動によって生じる換算の妥当性を示す。もちろん、この電子移動はエネルギー的には安定化の寄与は小さいが、²³Na 化学シフト α 変化は鏡散に反映する。

図 3. Na コンプレックスの安定化エネルギーと電子移動効果



1) Cohen, M. H.; Reif, F. "Solid State Physics", Vol. 5. Seitz, F.; Turnbull, D. Eds. Academic press, 1957. 2) Kundla, E.; Samoson, A.; Lippmaa, Chem. Phys. Lett., 1981, 83, 229. 3) Tabeta, R.; Saitô, H. Chem. Lett., 1984, 293. 4) 齊藤, 多野田, 相田, 才 24 回 NMR 討論会要録, 1985. 5) Kondo, J.; Yamashita, J. J. Phys. Chem. Solid, 1959, 10, 245. 6) Bloor, E. G.; Kidd, R. G. Can. J. Chem., 1968, 46, 3425.

1. はじめに

Na, K などのアルカリ金属の関与する配位化学は、これらのイオンの生体における役割を考えると極めて重要である。さらに、クラウンエーテル、クリフタンド等との選択的な相互作用の問題も各方面から注目を集めている。これらの金属イオンとリガンドの相互作用を溶液で調べる場合、イオン-イオン、イオン-溶媒、イオン-リガンドの相互作用面の極めて速い交換状態をみるのが普通である。しかし、固体状態で固体高分解能 NMR スペクトルを用いると、これらの化学種を分離して観測することができる強みがある。すなわち、固体状態で生成したコンプレックスの電子状態について詳細に調べることができると同時に、溶液状態で得られたデータを解釈する際の有力な手がかりが得られる。この点を考慮して、われわれは前報¹⁾に引きつづき、Na と溶媒分子、種々のリガンドとのコンプレックスの ²³Na NMR スペクトルを MAS ²³Na NMR 法によって測定した。得られたコンプレックスの ²³Na 化学シフトは、リガンド分子の種類、Na-O 距離によって大きく変化することがわかり、前報で述べたモデルコンプレックスの Ab Initio MO 計算結果による電子移動の大きさや平行関係にあることを認めた。

2. 実験方法

Na の周りに H₂O が 6 配位したコンプレックスは、Na₂SO₄ · 10H₂O, Na₂HAsO₄ · 7H₂O, Na dAMP · 6H₂O (いずれも市販品) を用いた。ジオキサン、メタノール、アセトン、DMF 等の溶媒と Na のコンプレックスは、いずれも NaI, NaClO₄, NaSCN, NaBF₄ などの無機塩と上記の溶媒との 1:3 の混合物から結晶を得た。バリコマイシン、ノナクテンなどのイオノファア-抗生物質²⁾、あるいはクリフタンド、クラウンエーテル³⁾ とのコンプレックスは、いずれも別報に述べた方法によって調製した。その他のコンプレックスは、市販品あるいはわれわれの研究室で調製したものを使用している。²³Na NMR スペクトルは、MAS および高出力 static ²³Na NMR の方法で測定した。化学シフトの基準はいずれも 1M NaCl 水溶液である。

3. 実験結果と考察

Na の周りに H₂O, メタノール, ジオキサン, アセトン, DMF 等の溶媒が 6 配位したコンプレックスが結晶として取り出すことが出来 (solvent complex), その ²³Na 化学シフトが母体の無機塩の場合に比べてどのような変化があるか、詳細に調べることができる。表 1 に、このようにして得た ²³Na 化学シフトと、X 線回折によるコンプレックスの構造をまとめ、基準となる無機塩のデータは、前報の表 1 をみられたり。また、このようにして得られた MAS ²³Na NMR スペクトルの一部を図 1 にまとめる。NaClO₄ とジオキサンのコ

さいとう・はじめ, たべた・りょうこ, あいだ・みまこ

コンプレックスは、風解性のため、試料調製条件によって著しく NMR パターンが異なるが、明らかにピーク b がコンプレックスのシグナル、ピーク a, c はそれぞれ分解した無水塩共存している誘致に由来するピークである。しかし、 NaIO_4 とのコンプレックスの場合は

Table I ^{23}Na Chemical Shifts of Sodium Ions in Solvent Complexes, Complexes with Small Ligand Molecules and Complexes with Ionophores (ppm from 1 M NaCl Soln.)

	Static		MAS		Bonding features		
	Type of spectrum ^{a)}	$\frac{2}{h}e^2qQ$ (kHz)	Chemical shifts	Correction of chemical shifts by quadrupole interaction	Type of ligands ^{b)}	Bond distance (Na-O, A)	Coordination number
A. Solvent complexes							
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	s	0	2.3 ± 1.5	0	H_2O	av. 2.43	6(octahedral)
$\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	s	0	1.0 ± 1.5	0	H_2O	2.35-2.48	6(octahedral)
Na dAMP $6\text{H}_2\text{O}$	s	0	1.9 ± 1.3	0	H_2O	2.37-2.45	6(nearly octahedral)
$\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	s	0	-0.2 ± 1.7	0	$5\text{H}_2\text{O}, \text{COO}$	2.35-2.56	6(distorted octahedral)
NaI $3\text{CH}_3\text{OH}$	s	0	-2.9 ± 0.4	0	CH_3OH	av. 2.47	6(octahedral)
$\text{NaClO}_4 \cdot 3\text{DX}$	s	0	-11.3 ± 1.5	0	DX	av. 2.43	6(elongated octahedral)
$\text{NaIO}_4 \cdot 3\text{DX}$	s	0	-1.2 ± 1.0	0	DX		
$\text{NaBF}_4 \cdot 3\text{DX}$	s	0	-11.6 ± 1.6	0	DX	av. 2.43	6
NaI 3DX	s	0	-9.4 ± 1.6	0	DX	av. 2.43	6
$\text{NaSCN} \cdot 3\text{DX}$	s	0	-10.0 ± 1.0	0	DX		
NaI 3DMF	s	0	-11.7 ± 1.0	0	DMF	av. 2.40	6(in between trigonal prism and octahedral)
NaI $3(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}$	s	0	-6.2 ± 0.9	0	$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}$	av. 2.46	6(octahedral)
B. Complexes with small ligands							
Na(1-phenylbutane-1,3-dionate)(ethylene glycol)	s	0	-8.7 ± 2.8	0	$3\text{C}=\text{O}$ 2OH	2.29-2.36 2.32-2.33	5(tetragonal pyramid)
$\text{Na}_3(\text{nitrilotriacetate})\text{H}_2\text{O}$	s	0	-8.7 ± 0.4	0	$\text{COO}\cdot\text{H}_2\text{O}$	2.28-2.67	6(distorted octahedron)
Na (ascorbate)	s	0	-9.6 ± 1.9	0	$4\text{OH}, \text{C}=\text{O}$ ether	2.42-2.72	6(distorted octahedron)
Na (D-isoascorbate)	s	0	-0.6 ± 1.5	0	$3\text{OH}, 2\text{ether}$ H_2O	2.30-2.39	6(distorted octahedron)
NaI(glycine) $_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	s	0	0.4 ± 0.2	0	$\text{COO}, \text{H}_2\text{O}$	2.32-2.64	6 (octahedral)
NaI(triethanolamine)	f.o.	464	-3.8 ± 1.9	0.9	OH	2.45-2.62	7 (irregular)
$\text{NaH}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	s	0	-0.6 ± 0.9	0	COO	2.40-2.44	6 (trigonal prism)
C. Ionophores							
NaSCN -valinomycin	s	0	-23.3 ± 4.7	0	$\text{C}=\text{O}$	2.69-2.83 ^c	6(octahedral)
NaSCN -nonactin	s	0	-18.2 ± 1.0	0	$\text{C}=\text{O}, \text{ether}$	2.36-2.80	8(distorted cubic)
NaSCN -tetraactin	s	0	-24.0 ± 1.2	0	$\text{C}=\text{O}, \text{ether}$	2.43-2.95	8(distorted cubic)
Lasalocid	s	0	-11.6 ± 3.3	0	ether	2.28-2.77	6(monocapped pentagon)
Monensin	s	0	-14.2 ± 3.4	0	ether	2.35-2.52	6(distorted octahedron)
NaSCN -[2.2.1]	s	0	-16.4 ± 2.8	0	ether	2.45-2.52	7
NaI-[2.2.2]	s	0	-16.2 ± 1.7	0	ether	2.57-2.58	8
NaSCN -[2.2]	s	0	-18.3 ± 3.5	0	ether		7
NaSCN -18-crown-6	s	0	-16.0 ± 0.9	0	ether	2.45-2.62	7(distorted pentagonal bipyramid)

^a s stands for single line; f.o. stands for the first-order split signal. ^b DX and DMF stand for 1,4-dioxane and N,N-dimethyl formamide, respectively. ^c Data from potassium complex.

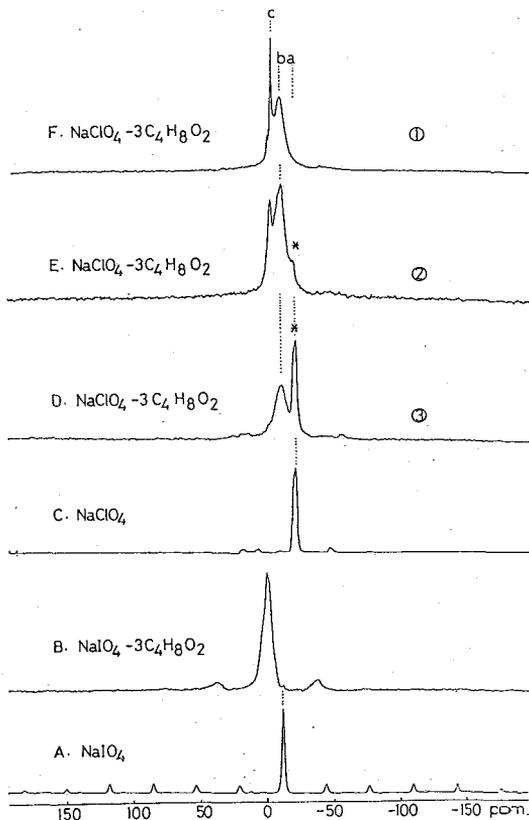


図1. Na-ジオキサン solvent complex の固体 ^{23}Na NMR スペクトル

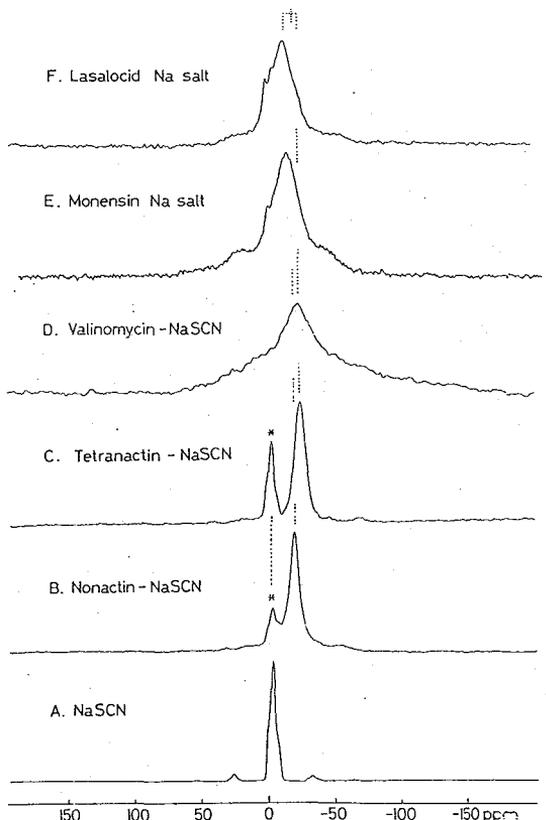
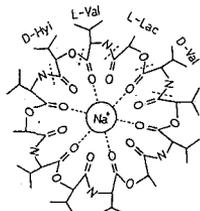


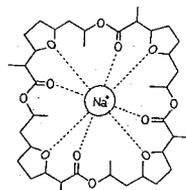
図2. Na-イオン-抗生物質 complex の固体 ^{23}Na NMR スペクトル

比較的安定で、上に述べた分解物に由来するピークはみられない。同様に、表1に示すように種々のリガンド、特に種々のイオン-抗生物質のコンプレックスの ^{23}Na NMR スペクトルを測定した(図2)。

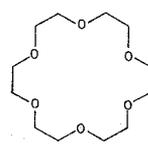
ここで用いたイオン-抗生物質を図3に示す。この場合も明らかに free の無秩序 (*印) とコンプレックスで明確な化学シフト値の差異がみられる。static ^{23}Na NMR スペクトルで、核四重極相互作用によるピークの分裂がみられたのは、NaI (トリエタ)



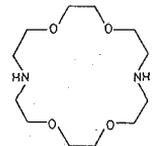
Valinomycin



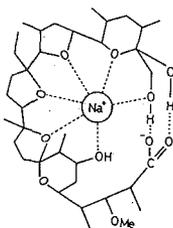
Nonactin



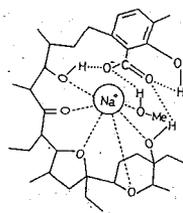
18-Crown-6



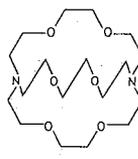
Cryptand [2.2.1]



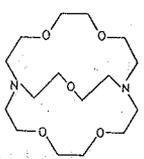
Monensin



Lasalocid



Cryptand [2.2.2]



Cryptand [2.2.1]

図3

ールアミン)のみで、実際に多くの試料は対称性が6又は8配位の octahedral あるいはそれに近い構造をとるために、 $e^{2qQ}/h \approx 0$ とはっている。

図4に表1および図1,2から得られた ^{23}Na 化学シフトの範囲を模式的に示した。但し、 $\text{Na}-\text{O}$ 距離が2.3-2.5 Å の正常値にある場合の ^{23}Na 化学シフト範囲を実線で、これよりも距離が長くなる場合を点線で表示してある。表1および図4から、 ^{23}Na 化学シフトの特徴は大きく分けて次の三点で表現できる。

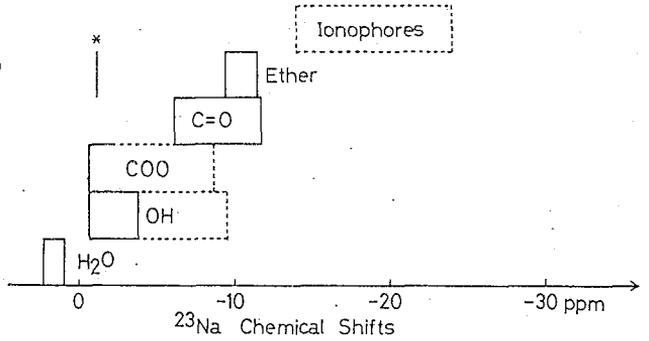


図4. リガンド分子のタイプで分類した ^{23}Na 化学シフト範囲の模式的表現 (点線で囲ったものは $\text{Na}-\text{O}$ 距離が標準値よりも長いもの)

まず、オーに $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na dAMP} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の ^{23}Na 化学シフトは、アニオンの種類の差異にかかわらず一定の1.0-2.3 ppm にあられる。また、1,4-ジオキサソンの4種類の Na コンプレックス (NaClO_4 , NaBF_4 , NaI , NaSCN) もまた、アニオンの種類にかかわらず一定の化学シフト値をもつ。(但し、 NaIO_4 とのコンプレックスは -2.9 ppm と、異常に低磁場ピークを示しており、この理由は明らかでない。但し、このピーク位置を図1で *印で表示)。これらの結果は、 ^{23}Na 化学シフトは直接結合している6個の H_2O 又はジオキサソンの相互作用によって決定され、それよりも遠距離にありかつ結合に参与していないアニオンの種類によらないことを示している。同時に、 $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ の ^{23}Na 化学シフトは、上記の6配位の Na コンプレックスの場合に近いが、この場合は5個の H_2O と1個の COO への配位結合のためである。

オニに、 COO や OH に配位した場合の ^{23}Na 化学シフトは、 H_2O に配位した場合とそれほど変化しない。一方、 Na リガンド分子の $\text{C}=\text{O}$ 基に配位した場合、 ^{23}Na ピークは5-10 ppm 高磁場にシフトする。オ三に、 $\text{Na}-\text{O}$ コンプレックスの $\text{Na}-\text{O}$ 距離が長くなった場合、特にイオノファア-の場合は明らかに他と比べて高磁場にピークが表れている。これは、イオノファア-分子の多くは、 K イオンに対して選択性が大きい場合が多く、キャビティーのサイズは Na イオンに対して若干大きすぎるためでもある。これに関連して、 $\text{Na}_3(\text{nitrilotriacetate}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ の場合、リガンドの種類が H_2O , COO にもかかわらず、-8.7 ppm という高磁場にピークが出現しているのも同じ理由による。

以上の結果は、前報で述べたモデル Na コンプレックスで取り扱った、Ab Initio MO 計算による電子移動の値と平行関係にある。すなわち、種々のコンプレックスにおけるイオン-配体、イオン-リガンド相互作用によって得られる ^{23}Na 化学シフトは、両者の乗での電子移動の大きさによって説明できると考えるわけである。したがって、固体高分解能 ^{23}Na NMR スペクトルは、これらの化学種の電子構造についての重要な知見を与えると同時に、溶液あるいは生体膜中におけるこれらのイオノファア-の挙動を知る上で重要なプロブとして使用出来ることがわかる。

- 1) 相同英分子, 多印用探子, 斎藤 肇, 第24回 NMR 討論会 要旨集, 1985
- 2) R. Tabeta and H. Saito, Biochemistry, in press.
- 3) R. Tabeta and H. Saito, Bull. Chem. Soc. Jpn., in press.

(電総研) 近藤 淳

金属は1つの大きな量子系である。それに量子力学を適用することによって始めて理解出来る性質が沢山ある。例えば金属中の電子が、気体中の分子のように金属中を動き回っているとするれば、 $k_B R$ の比熱が見られる筈であるが、実際にははるかに小さな比熱しか観測されない。この事象の量子力学的説明は次のようである：金属中の電子の密度は非常に大きい。従って電子1コに割当てられた体積は非常に小さい。一般に粒子を小さい体積に押し込めると、粒子は速く廻り出すというのが量子力学の教える所である。(不確定性原理 $\Delta x \cdot \Delta p \approx \hbar$ により、 Δx が小さいと Δp は大きい。) 従って金属中の電子は大きな運動エネルギーを持っている。その値は数eVに達し、温度に直せば数万度となる。従って室温附近又は低温で温度を多少変えても、電子系のエネルギーは殆んど変化しないのである。

さて磁性原子(典型的なものはFe, Mn等)を少量含む金属(例えばCu, Ag, Mg)は、低温において色々と変わった振舞を示す。変わったといつても目を見張るようなという程ではない。電気抵抗が温度変化しないはずが温度変化したり、比熱に山が生じたりという程度である。しかし無いはずのものがあるという事はやはり大問題であって、それがなぜかという事が永い間真剣に議論されて来た。最近になってる柄の全容が明らかになったがそれについて出来るだけ易しくお話しする。

まず金属電子をどのように量子力学的に考えるかについてのべる。金属球を考え、その中心に座標軸の原点をとって巨大な原子とみなす。そして最も粗り近似として電子に加わるポテンシャルは一定とする。こうすると原子の時と同じように角運動量 $l=0, 1, 2, \dots$ (s, p, d, \dots) を持った軌道が得られるが、 l の値は 10^3 程度迄必要である。また1つの l に対し、エネルギー準位は半連続的に無数に生じる。これらの準位に電子を2コずつめると金属の電子状態が得られる。

次に不純物原子を原子に1コおいたとしよう。このときポテンシャルは一定とはみなされず、原子付近では不純物原子のポテンシャルに近いだろう。この場合のシュレーディンガー方程式を解くと、金属の場合と同様の準位の他に、不純物原子固有の準位も生じるだろう。例えば不純物としてFeの場合を考えると、1s, 2s等の準位は孤立原子と殆んど同じものが得られるだろう。このことは1s, 2s, 2p, 3s, 3pについていえるが、4sと3dについては事情が異なる。4sは金属固有の準位と混りあつてあつかもない。3dは中間的であつて、孤立原子の3dの性質をかなり保ってはいるが、金属の準位とも混りあう。磁性合金の色々な性質は専らこの軌道にはいつた電子によって生じる。特にこの軌道は空間的に局在しているのでクーロン積分が大きい。従つてこれに電子が2コはいるとエネルギーが上つてしまうので、1コしかはいるないことが多い。すなわちスピンを持った状態にある。これが磁性合金であつて、このスピンのよつて色々な変わった振舞が生じることになる。このことについて講演の際にお話しする。

こんどうじゅん

^1H 及び ^{23}Na NMRとDSCによる水-高分子スルホン酸誘導体
Na塩系の相転移に関する研究
(製材研)の島山 英衛・岩田 ひろ (織高研)島山 立子

1 緒言

高分子電解質水溶液の物理化学的性質については、既に多くの研究が行われている。特に、イオン周りの水分子の構造については、NMRを始めとして、各種の測定法に立脚して議論が行われている。^{1~3)}しかし、水が非常に小さく、固体と溶液の中間状態にある系についての報告は少ない。^{4,5)}

本研究においては、ポリスチレンスルホン酸Na塩(NaPSS)及びセルロース硫酸エステルNa塩(NaCS)と水による非常に濃厚な混合系について、NMRにより、 ^1H 及び ^{23}Na の緩和時間(T_1)及び緩和時間(T_2)を測定した。また、これらの系の相転移温度を示差走査熱量法(DSC)により測定し、NMRとDSCの測定結果の比較検討を行った。

2. 実験

2.1. 試料

NaPSSはScientific Polymer Products社の分子量(Mw) 7×10^4 の市販品とXの3を用いた。NaCSは同じくScientific Polymer Products社の市販品で、硫酸エステルの置換度(D.S.) 2.3のものを用いた。

試料の含水率(W_c)は、加えた水の重量(W_w)を試料の絶乾重量(W_s)で除し、次式によって求めた。

$$W_c = W_w / W_s \quad (1)$$

2.2. 測定

^1H 及び ^{23}Na NMRスペクトルの測定にはNicolet社のFT-NMR-NT-200WBを用いた。測定温度は温度可変装置により、 $+30 \sim -70^\circ\text{C}$ の範囲で変化させた。 T_1 はInversion Recovery法により測定した。 T_2 の測定は主として、Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)法を行った。NMR測定用の含水試料はあらかじめ秤量した試料管に試料を充填し、秤量したのち、脱気処理した純水を一定量加え、均一な溶液としたのち、再度脱気処理を行い測定に供した。

DSCによる測定には、Perkin Elmer社製DSC 正型を用いた。試料2~3mgをあらかじめ微量天秤により秤量した銀箔型アルミニウムパンに入れ、秤量し、さらに一定量の水を含ませた後、密閉して測定に供した。昇温速度 $1.25 \sim 20 \text{ K/min}$ 、降温速度 10 K/min で、測定温度範囲は $+50 \sim -100^\circ\text{C}$ であった。

3. 結果と考察

Fig. 1に、異なる W_c を有するNaPSS-水系の T_1 を絶対温度の逆数に対して 7°

はたけやひろ・いぬかひろ・いぬかひろ

ロットレック結果を示す。NaPSS-水系においては、低温において、 ^1H NMRシグナルのスプリットは認められなくなる。しかし、 T_1 は温度の低下と共に減少し、 W_c が1.20及び2.01の試料では、 -15°C 付近で急激に減少し、段差が認められる。さらに、 T_1 は -30°C 付近で最小値を示し、それより低温で再び増大する。このような T_1 の変化は、通常物質の相転移と結びつけて説明されている。⁶⁾しかし、このような相転移現象と、他の測定手段で得られる結果と関連させて、説明している例は少ない。そこで、本報告では、一つの試みとして、熱測定の結果と対比させてみた。熱測定においては、NMRと異なり、温度に関する情報が正確であるという利点がある。一方、緩和現象についての情報は同様のしか得ることができない。従って、NMRと熱測定結果の対比は興味あるものと考えられる。

我々は既に、親水性基を有する高分子においては、極めて一般的に次の関係があることを明らかにしてきた。^{4,5,7,8)}

$$W_c = W_{nf} + W_f \quad (2)$$

ここで、 W_{nf} は不凍水 (non-freezing water) であり、 W_f は凍結可能水 (freezing water) である。

NaPSS-水系の W_c と W_{nf} 及び W_f の関係をFig. 2に示す。図から明らかなように、 $W_c < 0.62$ の領域では、一般的に意味での水の結晶化は認められない。従って、このように吸着水の結晶化が起らなくなる限界となっている水分率を限界水分率 (critical water content) と定義している。

Fig. 3にNaPSS-水系を室温付近から低温まで降温した場合に、DSCにより観測される相転移温度を、 W_c の関数として示す。図中のDSC曲線にも示されているように、 W_c の低いNaPSS-水系においては、室温付近にいわゆる中間相 (meso phase) が存在し、さらに冷却すると結晶相へと転移する。等方液相から中間相への転移温度を T_c^* として図示してある。 T_c^* はNaPSS-水系全体の分子運動に関与しているため、 $W_c < 0.62$ の領域においても、DSCにより観測しうる。一方、系中の水の結晶化 T_c は、 T_c^* よりも低温で観測され、 $W_c > 0.62$ の領域において

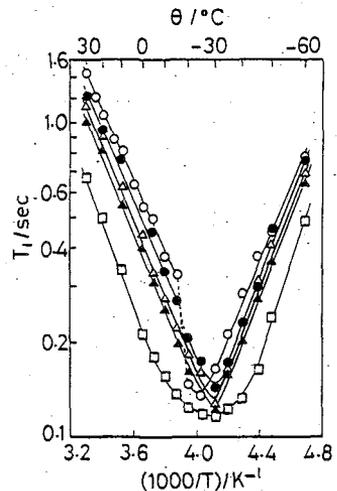


Fig. 1 ^1H Longitudinal relaxation time (T_1) in NaPSS-water vs inverse temperature.

○ $W_c=2.01$ ● $W_c=1.20$ △ $W_c=1.08$
▲ $W_c=0.83$ □ $W_c=0.63$

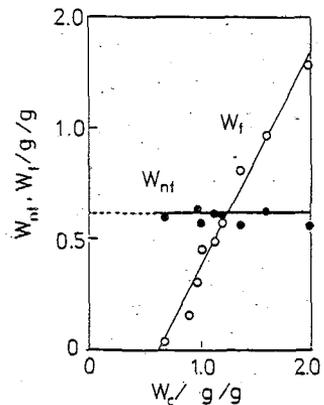


Fig. 2 Relationship between water content (W_c), freezing water (W_f) and non-freezing water (W_{nf}) of NaPSS-water system.

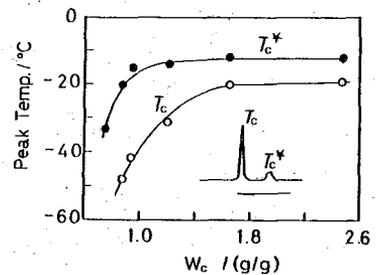


Fig. 3 Relationship between water content (W_c) and phase transition temperatures (T_c and T_c^*).

のみ観測される。

NMRとDSCでは観測の対象とする運動の周波数領域が異なること、前者では静準的に温度を下げてゆくのに対して、後者では一定の降温速度で走査しているため、直接的な比較が困難である。しかし、両測定法共に類似の相転移現象を観測の対象としていると考えてもよからう。このような観測から、Fig. 1と Fig. 3を比較すると、Fig. 1で認められる -150°C 付近の T_1 の急激な減少は、中間相の形成によるものと考えられる。さらに、 -30°C 付近の T_1 の最小値は、NaPSS-水系中の水の結晶化に対応すると考えられる。実際 -30°C より低温において、 T_1 が再び増加するのは、水の結晶化に伴って系の分子運動が遅くなることに対応すると考えられるので、両測定法の比較によって得られる結果は妥当である。

さらに、 ^{23}Na NMRによる T_1 の測定結果においても、 W_c のほぼ同じ領域において、 -150°C 付近から同様の T_1 の急激な減少が認められ、NaPSS-水系の中間相の形成には、 ^{23}Na の運動が関与していることが認められる。

W_c を限界水分率付近で変化させた場合の、 ^1H の T_1 及び T_2 の変化を、NaCS-水系について調べた。Fig. 4は、 T_1 を W_c と温度の関数として3次元に図示している。図からも明らかのように、測定した全ての温度領域について、 $W_c \sim 0.4$ に T_1 の値の谷があることが分る。高温側では T_1 の値は谷の両側すなわち W_c の大きい方でも、小さい方でもほぼ均等に増加している。しかし、低温側では水の運動が凍結を始めるため、 W_c の小さい方では T_1 が大きくなり、 W_c の大きい方では、 T_1 の増加が余り顕著でない。

DSCによって、 W_f 、 W_{nf} と W_c の関係を調べた結果をFig. 5に示す。この図から求めた限界水分率は0.38であって、Fig. 4に示す T_1 の最小値から推定された値、 $W_c \sim 0.4$ とよく一致する。すなわち、 $W_c < 0.4$ の領域では、水はNaCSに強く吸着されているため、その運動が強く束縛されて、 T_1 の値は大きくなる。しかし、 W_c が大きくなるに伴い、 T_1 の値は減少し、限界水分率付近で最小となり、 W_c がそれより大きくなると、すなわち $W_c > 0.4$ の領域では、吸着水の運動が W_c の増加に伴って増し、 T_1 の値が増加する。

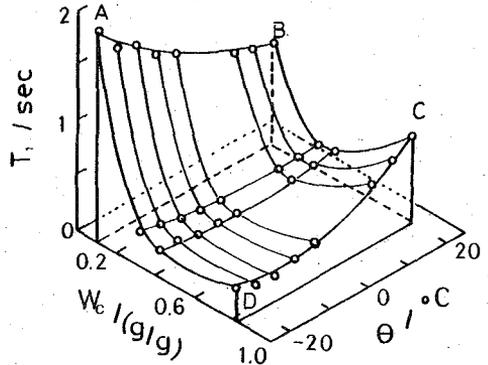


Fig. 4 Three-dimensional diagram between ^1H longitudinal relaxation time (T_1), water content (W_c) and temperature (θ).

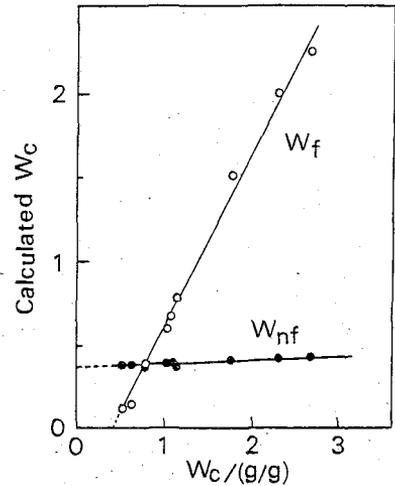


Fig. 5 Relationship between water content (W_c), freezing water (W_f) and non-freezing water (W_{nf}) of NaCS-water system.

この現象についてもう少し詳しく論ずると、Fig. 4からも明らかのように、 T_1 の谷にあたる $W_c \sim 0.4$ においては、 T_1 の値は、温度に対してこの測定範囲内においてはあまり変化しない。このことは、DSCから求めた 限界水分率に対応する W_c 付近の水の T_1 は温度変化に対して極めて鈍感であることを示している。これに対し、 $W_c = 0.70$ (Fig. 4の線AB) 及び $W_c = 0.82$ (線CD) の T_1 は温度に大きく依存している。ちなみに、DSC測定結果より、前者は全て W_{mf} であり、後者はかなりの量の W_f を有している。なお、 $W_c = 0.82$ の系の T_1 の最小値が -20°C 付近に観測されるのは、系中の水の結晶化に対応すると考えられる。

なお、Woessner⁹⁾によれば、水の H の縦緩和時間及び横緩和時間と T_{1b} 及び T_{2b} とすると、次のような関係がある。

$$1/T_{1b} = G \sum_i K_i \left(\frac{\tau_{ci}}{1 + \omega_0^2 \tau_{ci}^2} + \frac{4\tau_{ci}}{1 + 4\omega_0^2 \tau_{ci}^2} \right) \quad (3)$$

$$1/T_{2b} = \frac{1}{2} G \sum_i K_i \left(3\tau_{ci} + 5 \frac{\tau_{ci}}{1 + \omega_0^2 \tau_{ci}^2} + 2 \frac{\tau_{ci}}{1 + 4\omega_0^2 \tau_{ci}^2} \right) \quad (4)$$

ここで $\sum K_i = 1$ である。

(3) 及び (4) を用いて、 $W_c = 0.1$ の場合について τ_c を求め、さらに式(4)が成立しているとして、活性化エネルギー (E_a) を求めた。

$$\tau_c = \tau_0 \exp(E_a/RT) \quad (5)$$

得られた $E_a \sim 2.9 \text{ Kcal/mol}$ であり、他の系について得られている文献値と比較的に一致がみられる。^{10, 11)}

文献

- 1) J. J. van der Klink, L. H. Zuiderweg, J. C. Leyte, J. Chem. Phys., **60**, 2391 (1974)
- 2) H. Gustavsson, B. Lindman, J. Bull. J. Am. Chem. Soc., **100**, 4655 (1978)
- 3) R. A. Komoroski, K. A. Mauritz, *ibid.*, **100**, 7487 (1978)
- 4) H. Hatakeyama, H. Yoshida, T. Hatakeyama in "Cellulose and Its Derivatives" (G. O. Phillips et al. eds.), Ellis Horwood, Chichester (1985) p. 255
- 5) T. Hatakeyama, K. Nakamura, H. Yoshida, H. Hatakeyama, *Thermochimica Acta*, **88**, 223 (1985)
- 6) T. Tsang, T. C. Farrar, J. Chem. Phys., **50**, 3498 (1969)
- 7) K. Nakamura, T. Hatakeyama, H. Hatakeyama, *Textile Res. J.*, **51**, 607 (1981)
- 8) T. Hatakeyama, A. Yamauchi, H. Hatakeyama, *Eur. Polym. J.*, **20**, 61 (1984)
- 9) D. E. Woessner, J. R. Zimmerman, *J. Phys. Chem.*, **67**, 1590 (1963)
- 10) M. J. Tait, A. Suggest, F. Franks, S. Aebett, P. A. Quickenden, *J. Sol. Chem.*, **1**, 131 (1972)
- 11) R. A. Komoroski, in "Ions in Polymers (A. Eisenberg ed.)", *Am. Chem. Soc.*, Washington D. C. (1980) p 151.

(東工大工) ○山延 健、安藤 勲

1) NMR 化学シフトは電子構造と密接に関係しており、電子構造を通して NMR 化学シフトの挙動を考えることは重要である。このことは低分子においても、高分子においても同様である。このように電子構造を通して NMR 化学シフトを考えるためにはどうしても量子化学的な手法を用いる必要がある。規則構造を持つ高分子鎖の電子構造を求める方法としては次の二通りの方法がある。

a) モデル化合物 (二量体、三量体) を用いて量子化学計算を行なう。

b) モデル化合物を用いずに高分子鎖の電子構造を直接計算する。

a) の方法は取り扱う電子数があまり多くないので厳密な量子化学計算が容易である。局所的な構造によって高分子の電子構造が決定されている場合は a) の方法は適切である。しかし、 α -ヘリックスの水素結合のような比較的長距離の相互作用の場合には二量体や三量体のようなモデルでは直接評価することができない。b) の方法は高分子鎖の規則性を利用することによってその電子構造を直接評価する方法である。この方法を用いることにより α -ヘリックスの水素結合を直接評価することができる。本研究では b) の方法をいくつかの高分子鎖に適用し、その有用性を議論する。

2) 理論と計算

高分子鎖の電子構造を直接評価する方法としては固体物理で用いられているバンド理論を応用した Tight Binding (TB) 近似がある。この方法は高分子鎖の規則性を利用することによって直接高分子の電子構造を求める方法である。高分子鎖中の電子の波動関数は Bloch の定理により原子軌道の線形結合でつぎのように表わすことができる。

$$\Psi_n(k) = N^{-\frac{1}{2}} \sum_{\nu} \sum_j^N \exp(ikj) C_{\nu n}(k) \phi_{\nu}(r-ja) \quad (1)$$

ここで k は電子の波数、 l はモノマー単位内の原子軌道の数、 N はモノマー単位の数、 $C_{\nu n}$ は n 番目のバンドの ν 番目の原子軌道の係数である。(1) 式を用いて得た電子構造、すなわち、波動関数の係数を用いて ^{13}C NMR 化学シフトを評価する。 ^{13}C NMR 化学シフトの評価は Sum-over-State 法に TB 近似の波動関数を適用して導出したものを用いた。¹⁾ ^{13}C NMR 化学シフトは主に反磁性項と常磁性項の和で表わすことが、特に常磁性項が支配的な寄与をする。TB 近似の波動関数を適用した場合の反磁性項と常磁性項の式はそれぞれ、(2)、(3) 式ようになる。ここで、 $P_{\nu\nu'}$ は電子密度を表わしており、 X 、 Y は結合次数に相当する因子であり (4)、(5) のように表わすことができる。(1) の $C_{\nu n}$ は複素数であり、(5) の R 、 I はそれぞれ

やまのべたけし・あんどういさお

$C_{\nu m}$ の実数部、虚数部を表わしている。T B 近似で得られる波動関数の係数の虚数部が高分子鎖が無限に長いという効果を含んでいる。($E_m^0 - E_0$) は一電子励起エネルギーである。この式を用いて ^{13}C NMR 化学シフトの評価を行なった。これらの計算は全て CND0/2 に基づいて行なった。計算は東京大学大型計算機センター S810 スーパーコンピュータ、分子科学研究所電子計算機センター M200H コンピュータ 及び東京工業大学総合情報処理センター M280H コンピュータにより行なった。

3) 結果と考察

i) ポリエチレン

図1にポリエチレンのNMR化学シフトテンソルの β 、 $K\pi$ 依存性を示す²⁾。ここで β 、 $K\pi$ は CND0/2 計算で Fock Matrix 要素を計算するパラメータである。実測値は図の一番下に示した。図からわかるように主軸の順序がパラメータの変化によって大きく影響されることがわかる。図の左上が Pople の標準値である。Pople の標準値を用いるとその主軸の順序は低磁場から σ_{yy} 、 σ_{xx} 、 σ_{zz} である。一方、図の右下は安藤らによって提出されたパラメータである。安藤らのパラメータを用いると主軸の順序は低磁場から σ_{zz} 、 σ_{yy} 、 σ_{xx} となる。実測と比較してみると、安藤らの値を用いることにより実測をかなり再現することができる。

表1に環状パラフィン、n-パラフィンおよびポリエチレンの固体高分解能NMRから得られたトランスジグザグ部のメチレ

$$\sigma_A^d(k) = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{2e^2}{3m_e} \sum_{\nu\nu'} P_{\nu\nu'}(k) \langle \phi_\nu(r) | r^{-1} | \phi_{\nu'}(r) \rangle \quad (2)$$

$$\sigma_{A,\alpha\beta}^p(k) = -\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\hbar^2 e^2}{m_e} \sum_m \frac{\text{occ}}{m} \sum_n \frac{\text{unocc}}{n} \sum_j \langle r^{-3} \rangle_{2p} (E_m^0 - E_0)^{-1} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} & \times \sum_{bl} \sum_{\alpha} (X(j, m, n, \beta, \gamma) X(1, n, m, \gamma, \alpha) \\ & - Y(j, m, n, \beta, \gamma) Y(1, n, m, \gamma, \alpha) \\ & + X(j, m, n, \gamma, \alpha) X(1, n, m, \beta, \gamma) \\ & - Y(j, m, n, \gamma, \alpha) Y(1, n, m, \beta, \gamma)) \end{aligned}$$

$$P_{\nu\nu'}(k) = \sum_m \frac{\text{occ}}{m} C_{\nu n}^*(k) C_{\nu' m}(k) \quad (4)$$

$$X(j, m, n, \beta, \gamma) = C_{jm}^{\beta\beta} C_{jn}^{\beta\gamma} + C_{jn}^{\beta\beta} C_{jm}^{\beta\gamma} - C_{jn}^{\beta\gamma} C_{jm}^{\beta\beta} - C_{jm}^{\beta\gamma} C_{jn}^{\beta\beta} \quad (5)$$

$$Y(j, m, n, \beta, \gamma) = C_{jm}^{\beta\beta} C_{jn}^{\beta\gamma} - C_{jn}^{\beta\beta} C_{jm}^{\beta\gamma} + C_{jm}^{\beta\gamma} C_{jn}^{\beta\beta} - C_{jn}^{\beta\gamma} C_{jm}^{\beta\beta}$$

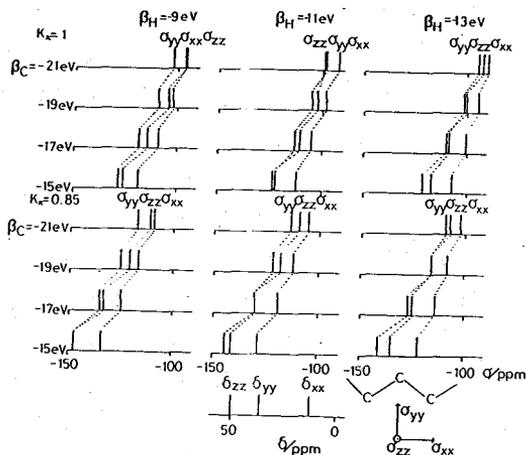


図1

ン炭素の ^{13}C NMR 化学シフトを示した³⁾ 表1
 この表からわかるように環状 $\text{C}_{160}\text{H}_{320}$ を除
 いた環状パラフィンの ^{13}C NMR 化学シフ
 トは約 34 ppm である。また、環状 $\text{C}_{160}\text{H}_{320}$
 、n-パラフィン 及びポリエチレンの ^{13}C
 NMR 化学シフトは約 33 ppm である。
 注目している炭素はトランスジグザグ部の
 炭素であり、この約 1 ppm の差は結晶格
 子の違い (triclinic, orthorhombic) に帰
 属出来る。図2に triclinic, orthorhombic
 の結晶格子の簡単なモデルを示した { (a)
 triclinic, (b) orthorhombic }。図中
 R、R' は面間距離である。図3に R、R'
 を変化させたときの ^{13}C NMR 化学シフト
 の変化を示した。図からわかるように R、
 R' の増加と共に triclinic 及び orthorhombic
 の ^{13}C NMR 化学シフトはそれぞれ約 4.0
 Å、約 4.5 Å までは高磁場にシフトする。
 R、R' が更に増加すると ^{13}C NMR 化学
 シフトは低磁場にシフトする。X線回折
 によりそれぞれポリエチレン、 $\text{C}_{39}\text{H}_{78}$ につ
 いて決定された格子定数を用いて表から
 triclinic, orthorhombic の ^{13}C NMR 化
 学シフトを読み取る。用いた R、R' はそ
 れぞれ

$$R = 4.08 \text{ \AA}$$

$$R' = 4.00 \text{ \AA}$$

図3

である。この距離での ^{13}C NMR 化学シフ
 トを読み取るとつぎのようになる。

$$\sigma_{tri} = -58.6 \text{ ppm (triclinic)}$$

$$\sigma_{ort} = -56.7 \text{ ppm (orthorhombic)}$$

triclinic のほうが orthorhombic に比べて
 低磁場に現われており、実測と一致している。

ii) ポリアセチレン

シス、トランスポリアセチレンは固体高

Sample	Crystallographic form	^{13}C NMR chemical shift ^{a)} δ/ppm
Cyclic paraffin		
$\text{C}_{36}\text{H}_{72}$	triclinic	34.0
$\text{C}_{40}\text{H}_{80}$	triclinic	33.5
$\text{C}_{48}\text{H}_{96}$	triclinic	33.7
$\text{C}_{64}\text{H}_{128}$	triclinic	33.8
$\text{C}_{80}\text{H}_{160}$	triclinic	34.0
		Averaged $\delta_c = 33.8$
$\text{C}_{160}\text{H}_{320}$	orthorhombic	32.9
n-Paraffins		
n- $\text{C}_{22}\text{H}_{46}$	orthorhombic	33.0
n- $\text{C}_{32}\text{H}_{66}$	orthorhombic	33.0
n- $\text{C}_{44}\text{H}_{90}$	orthorhombic	32.8
Polyethylene	orthorhombic	32.9
		Averaged $\delta_c = 32.9$
		$\delta_1 - \delta_2 = 0.9$

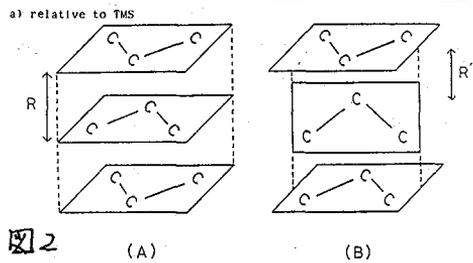
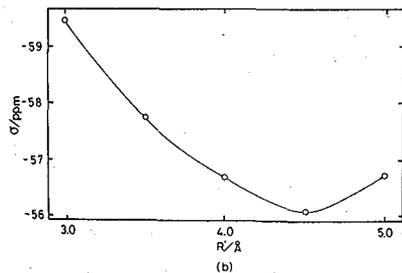
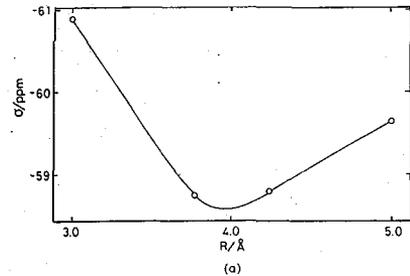


図2



分解能 NMR 測定よりシスポリアセチレンがトランスポリアセチレンより約 10 ppm 高磁場に現われることが報告されている。表 2 に実測と計算によるシス、トランスポリアセチレンの等方平均 ^{13}C NMR 化学シフトと化学シフトテンソルを示した。²⁾

表 2

	Observed ^{a)}				Calculated ^{b)}			
	σ_{iso}	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}	σ_{iso}	σ_{zz}	σ_{xx}	σ_{yy}
cis	127.7	218±2	138±1	22±2	-109.6	-235.2	-148.7	-118.9
trans	137.3	219±2	144±1	47±2	-111.5	-236.0	-152.3	-120.2

a) Ref.24. in ppm from Me_4Si .

b) The negative sign means deshielding. see text.

実測では等方平均 ^{13}C NMR 化学シフトとテンソルともにシスポリアセチレンがトランスポリアセチレンより高磁場に現われていることがわかる。計算と実測を比較してみると計算においても等方平均 ^{13}C NMR 化学シフト、テンソルともにシスポリアセチレンがトランスポリアセチレンより高磁場に現われており実測を再現している。各成分について見ると、計算は σ_{zz} 、 σ_{xx} についてはかなり定量的に実測を再現している。 σ_{yy} については実測を定性的には再現しているがその差は実測と比較すると小さい。そのために等方平均シフトは実測に比べると小さく再現されている。化学シフトテンソルの主軸の方向を図 4 に示した。(a) は実測のトランスポリアセチレンの主軸の方向、(b) は計算によるトランスポリアセチレンの主軸の方向である。計算が実測を良く再現していることがわかる。計算で定性的にしか再現されなかった σ_{yy} は分子面に対して垂直な方向であることがわかる。すなわち、共役している π 電子の挙動が $\text{CND0}/2$ ではあまり良く再現されていないのであろう。(c) に計算によるシスポリアセチレンのテンソルの主軸の方向を示した。シスポリアセチレンについては実測でテンソルの主軸の方向は決定されていないが、計算から主軸の方向はこのようになることが予想される。以上のようにポリエチレン、ポリアセチレンについて TB 近似を適用した結果、等方平均 ^{13}C NMR 化学シフトにおいても、テンソルにおいても実測をかなり再現することがわかった。

References: 1) T.Yamanobe, et al., Mol.Phys., 50,1231(1983); 2) T.Yamanobe et al., J.Chem.Phys., in press; 3) T.Yamanobe et al., J.Mol.Structure, in press

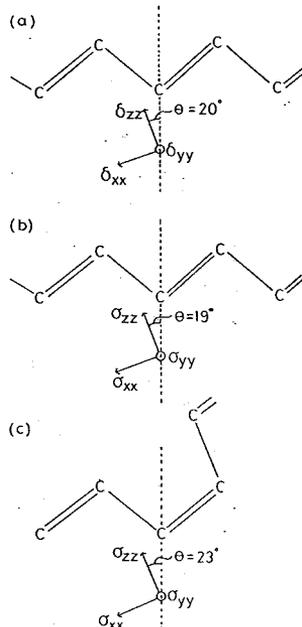


図 4

(化技研) ○松村 和紀, 早水 紀久子, 柳沢 勝
中根 堯, 柳下 宏, 山本 修

1. はじめに

酢酸セルロース膜は、海水の淡水化のように主として脱塩の分野で用いられているポピュラーな膜であるが、その分離機構を解明するにあたり最も重要な溶媒の保持状態に関して、すでにながりの研究がなされているが、まだ明らかとなっていない部分が多い。酢酸セルロース膜中に保持された水については、ラマン散乱を用いて R. Young らが、酢酸セルロースのカルボニル基の $C=O$ に H_2O が水素結合していることを報告しており¹⁾、また広中 NMR 法を用いて C. W. Wilson らが、 1H NMR スペクトルが膜の含水量および磁場と膜のなす角度によって変化することを報告している²⁾。我々は Wilson らの研究では解決されていない膜中に保持された H_2O 分子の異方性の問題について研究を進め、 H_2O 分子は $H-H$ 軸が膜に対して垂直となるように保持される傾向があることを明らかにしたので報告する。さらに膜中の含水量および温度を変えたときのスペクトルも、統一的に解釈されることにも言及する。またメタノールの系についても少し触れる。

2. 実験

酢酸セルロース膜としては、Eastman Kodak 社製の酢酸セルロース (E398-3) をアセトンに溶解し、温度 $25^\circ C$ 湿度 50% の条件下でガラス板上に流延し自然乾燥して得た均質膜を用いた。この膜を折り畳んで 10mm の NMR 管に入れ室温で 8 時間真空乾燥させた後、 H_2O 、 CH_3OD 、 CD_3OH の各蒸気雰囲気下に静置して、膜中に各溶媒を吸収させることで試料サンプルを得た。 H_2O については湿度をコントロールしたデシケータ内に膜の入った NMR 管を静置し、時々重量変化を調べ希望の含水量になった時点で NMR 管を密閉して数種の含水量のサンプルを得た。 CH_3OD 、 CD_3OH についてはこれらの溶媒を 10mm の NMR 管に入れ膜の入った NMR 管とジョイントで接合し、やはり膜がメタノール蒸気を吸って希望の含水量になった時点で膜入りの NMR 管を密閉して試料サンプルとした。

このようにして調製した試料サンプルの 1H NMR スペクトルを JEOL-FX-90Q 分光器を用いて、図 1 に示すように磁場と膜のなす角度を変えながら測定した。また化学シフトは、TSP- d_4 のシフト値を外部基準とした。

3. 水系の結果と考察

3-1. 膜中の水の 1H NMR スペクトル

図 2 に、常温で角度を変化して測定した 1.9% 含水膜の 1H NMR スペクトルを示す。角度を変えるとスペクトルの線中と化学シフトが変化し、磁場と膜のなす角度が 90° 付近ではスペクトルが 2 本に分裂するのが観察される。見かけの線中の角度依存性を、異なる含水量の膜の値とともに図 3 に示す。

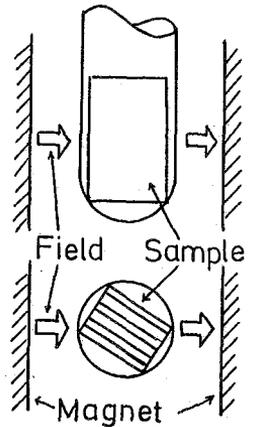


図 1.
磁場と膜の関係

まつむら かずのり, はやみず きくこ, やなぎさわ まさる
なかぬ たかし, やなぎした ひろし, やまもと おさむ

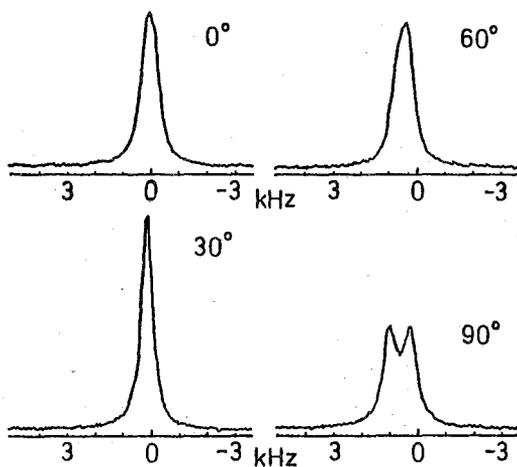


図2. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの角度変化
(1.9% 含水膜, 常温)

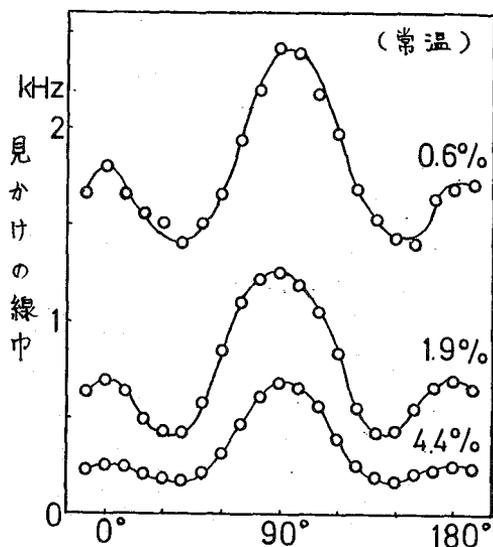


図3. 見かけの線巾の角度依存性

図3から含水量が増加すると、見かけの線巾が全体的に狭くなり、また線巾の角度変化が小さくなるが、角度 40° 付近で線巾が最小となり、 90° で最大となる点は含水量に依存しないことがわかる。なお常温では、0.6%、1.9%の含水膜は 90° でスペクトルが2本に分裂するが、4.4%含水膜では分裂は見られない。しかし後に述べるように、温度を下げると4.4%含水膜でも分裂が見られる。

図4に、1.9%含水膜のスペクトル中心の化学シフトの角度変化を示すが、この値は含水量に依存せず、水分子の化学シフト値は、膜と磁場のなす角が 0° で最も高磁場側で、 90° のとき最も低磁場側である。この化学シフトの変化は膜の持つ異方的な反磁性に因るもので、膜の磁化率の水平方向成分の値が垂直方向成分の値よりも大きいと考えると説明できる。

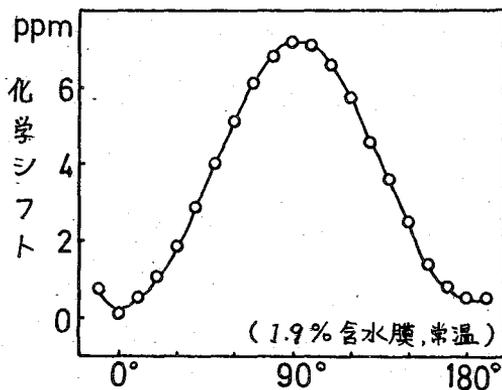


図4. 化学シフトの角度依存性

図5に、膜の含水量とスペクトルの面積強度の相対値の関係を示したが、含水量とスペクトル強度は比例関係にある。このことから、本研究で観測している $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、膜に含まれている H_2O 分子全部を反映しており、また酢酸セルロース分子中の ^1H のシグナルを含んでいないと考えられる。

3-2. スペクトルの解析

図2に示したように角度 90° でスペクトルが2本に分裂して、角度が 90° からずれるにつれて分裂巾が小さくなり1本のシグナルになる現象が観測されたが、この分裂巾が、膜と磁場のなす角度

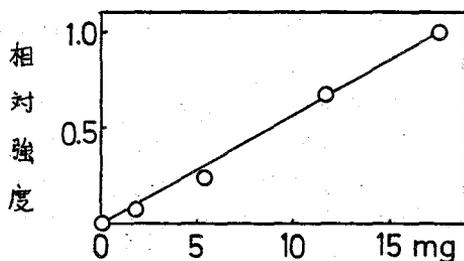


図5. 含水量とスペクトル強度の関係

に依存する現象は、双極子-双極子相互作用によって説明される。この双極子相互作用の観測される典型的な例は、液晶媒体中で配向した小分子であるが、本研究の膜中のH₂O分子も液晶中の小分子のように、分子運動はするが異方性のある空間内で平均的に配向していると考えてよい。一般に双極子相互作用によるスペクトルの分裂中D_{ij}^{dir}は、
$$D_{ij}^{dir} = -\frac{\hbar \mu_0 \gamma_i \gamma_j}{4\pi^2} \frac{1}{r_{ij}^3} \langle \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \rangle$$
 と表されるが³⁾

本研究では膜中に保持されたH₂O分子内の2つの¹Hの双極子相互作用を考えればよいため分裂中D_{HH}は

$$D_{HH} = -30.4 \times \left\langle \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right\rangle \quad [\text{kHz}]$$

となる。

ここでθはH₂OのH-H軸が磁場となす角度であり、 $\langle \rangle$ は平均を意味している。このD_{HH}の値が、膜と磁場のなす角度にどのように依存するかを解析すれば、H₂OのH-H軸が膜となす角度を求めることができる。膜中でH₂O分子は運動性を持っているのでdoubletの吸収線はローレンツ型になると仮定した。分裂中D_{HH}を求めるために1.9%含水膜の¹H NMRスペクトルの波形分離を行ない、図6に例を示す。doubletだけでは精度よく実測スペクトルを再現することはできず、面積強度で6%程度の未知のスペクトル成分を加えると、実測スペクトルがすべての角度について精度よく再現できることがわかった。

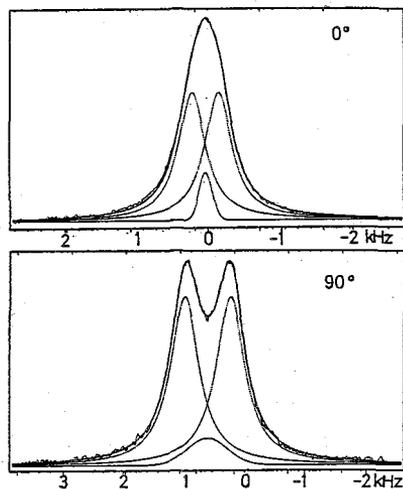


図6. 波形分離の例 (常温, 1.9%)

3-3. 分裂中の角度依存性

波形分離によって得られた分裂中D_{HH}の値を、膜と磁場のなす角度に対してプロットして図7に示す。膜と磁場のなす角度が90°のときD_{HH}が最大となるから、このときH-H軸は磁場方向を向いていると考えられる。そこでH-H軸が膜と垂直になるようにH₂O分子は保持されていると仮定してθを求め、 $D_{HH} \propto \left| \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right|$ の規格曲線を図中に実線で示した。この規格曲線で実測値全体を説明できるから、平均的にH₂O分子はH-H軸が膜と垂直になるように膜中に保持されていると結論できる。

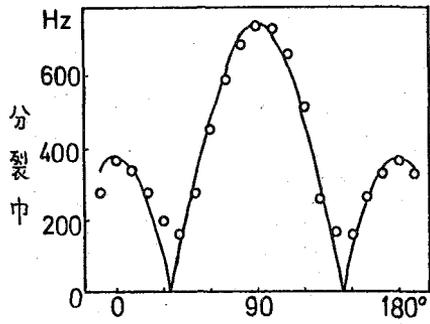


図7. 分裂中の角度依存性 (常温, 1.9%含水膜)

また含水量の異なる膜について、常温、角度90°におけるスペクトルを波形分離して、その分裂中と吸収線の線中を比較して表1に示した。分裂中が大きいことは膜中のH₂O分子の配向性が良いことを意味し、線中が広いことは膜中のH₂O分子の運動性が小さいことを意味する。膜中には結合状態の異なるH₂O分子が存在している¹⁾²⁾が、それらはNMRのtime scaleでは自由に交換しており、含水量が増えると膜と弱く結合しているH₂O分子の割合が増え、見かけとしてH₂O分子の運動性が大きくなり配向性が小さくなると考えると、表1の傾向は説明できる。

表1. 含水量と分裂中・線中

含水量	分裂中	線中
0.6%	842 Hz	1298 Hz
1.9%	788 Hz	621 Hz
4.4%	385 Hz	382 Hz

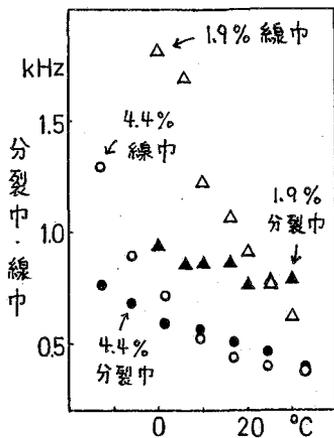


図8. 分裂中・線中の温度変化

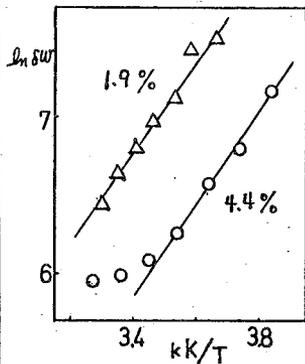


図9. 線中の温度依存性

温度範囲ではスペクトルの分裂が見られる。含水率が低い膜ほど線中・分裂中ともに大きいことは、温度を下げても変わらない。

線中 δw の対数値を絶対温度 T (K)の逆数に対してプロットし、図9に示す。1.9%の値は直線に載り、4.4%の値も低温部は直線となるので、直線の傾きから膜中での H_2O 分子の見かけの運動の活性化エネルギーを求めると、1.9%と4.4%の両方の値から $+2.5$ kJ/molという等しい値が得られた。以上から、膜中の H_2O 分子は温度が下がると運動性が小さくなり、また配向性も良くなると結論できる。

3-5. 水系のまとめ

本研究により、酢酸セルロース膜中に保持された H_2O 分子について、以下の3点が明らかになった。

- 1) 膜と磁場のなす角度に 1H NMRスペクトルが依存することから、平均的に H_2O 分子は膜に対して $H-H$ 軸が垂直となるように保持されていることが認められた。
- 2) 膜中には結合状態の異なる H_2O 分子が分布して存在しており、それらはNMRのtime scaleでは自由に交換しているが、含水量が増えると膜と弱く結合している H_2O 分子の割合が増え、見かけとして H_2O 分子の運動性が大きくなり配向性が小さくなる。
- 3) 低温では、膜中の H_2O 分子の運動性が小さくなるとともに、 H_2O 分子の配向性が良くなり、 1H NMRスペクトルの線中と分裂中が広がる。

膜の分離機能は膜と水の結合状態に依存すると考えられるので、本研究の方法を種々の膜に適用してデータを蓄積すれば、膜素材の性能評価も可能である。

4. 膜中のメタノールの 1H NMRスペクトル

CD_3OH を12.5%含んだ膜および CH_3OD を14.4%含んだ膜について、水系と同様に 1H NMRを膜と磁場のなす角度を変えて測定すると、見かけのスペクトルの線中・線型化学シフトが変化する事実を得ている。このことからメタノールも膜中に配向性を持って保持されていると考えられるが、その配向性の方向等詳細は現在検討中である。

References

- 1) J.R.Scherer, G.F.Bailey, S.Kint, R.Young, D.P.Malladi, and B.Bolton, *J.Phys.Chem.*, **89**, 392 (1985)
- 2) S.Krishnamurthy, D.McIntyre, E.R.Santee, Jr., and C.W.Wilson, III *J.Poly.Sci.:Polymer Physics Edition*, **11**, 427, (1973)
- 3) P.Diehl and C.L.Khetrapal, "NMR Volume 1", edited by P.Diehl E.Fluck and R.Kosfeld, Springer p.9 (1969)

(京大化研) °堀井 文敬・平井 諒子・北丸 竜三

1. 緒言

固体高分解能 NMR 法では, ^1H と観測核の磁気双極子-双極子相互作用を消去するためにハイパワーの ^1H dipolar decoupling (DD) を行うとともに, 観測核の化学シフトの異方性を平均化するため magic-angle sample spinning (MAS) を行なう。この MAS の回転数は通常 3~4 兆 Hz であり, 試料は極めて大きい遠心力を受ける。したがって, 特別の工夫をしていない市販の MAS ロータを使用した場合この遠心力により脱水が起こるため, 含水試料を一定含水量を保持した状態で測定することは難しい。

本報告では, 我々^{1,2)} が最近開発した含水試料用の O-ring 付 MAS ロータについて述べるとともに, このロータを用いて行なった含水状態のアミロース,^{2,3)} セルロース,⁴⁾ 絹フィブロインの CP/MAS ^{13}C NMR 研究について述べる。

2. 実験方法

固体高分解能 ^{13}C NMR の測定は JEOL JNM-FX 200 spectrometer に CP/MAS ユニートを接続して, 4.7 T の静磁場下室温で行なった。 ^{13}C および ^1H の回転磁場強度 $\gamma B_1 / 2\pi$ は 69.4 兆 Hz で, DD のための ^1H のそれは 54 兆 Hz とした。乾燥および含水試料にはそれぞれ図 1 に示したロータを用い, 回転数は 3.2~3.5 兆 Hz にセットした。CP を用いた場合の contact time は 1~2 ms である。また, ^{13}C 化学シフトはポリエチレン結晶の CH_2 ピーク (33.6 ppm) あるいはポリオキシメチレン結晶の CH_2 ピーク (89.11 ppm) を内部基準として決定した。

アミロース試料として, 市販 potato および corn 粉末を精製して用いた。^{2,3)} また, バロニア, バクテリア, 木綿, ラミーなどの天然セルロースおよび再生セルロース試料も常法により精製して用いた。⁴⁾ 絹フィブロインは, 農業生物資源研究所馬越博博士から提供された α 型 (silk I) および β 型 (silk II) 試料について検討した。前者は, 家蚕生糸を精練・脱ワックス後, Li Br 水溶液に溶解して透析したのち 37°C で chymotrypsin 処理して得られる泥殿脚を凍結乾燥して得た。一方, 後者は家蚕の絹系腺から取出した液状絹を 30°C で乾燥後, セリシンを除いて用いた。上記各試料は 50°C で数日減圧乾燥後, またはその一部を常法により調湿または水浸漬後製

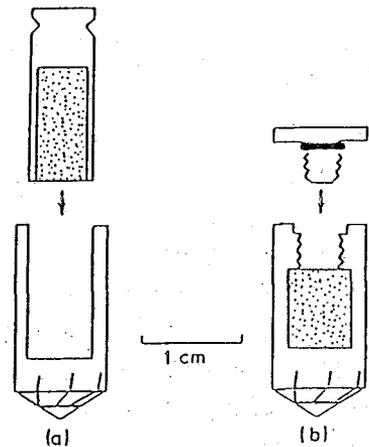


Fig. 1 Schematic diagrams of a conventional MAS rotor (a) and a newly developed rotor with an O-ring seal (b).

ほりいふみたか・ひらいあさこ・きたまるりょうぞう

定に供した。

3. 結果および考察

3.1. 含水試料用 MAS ロータ

図1に、市販弾丸型およびこれを改良したO-リング付MASロータを示す。これらロータはいずれも市販の poly(chlorotrifluoroethylene) 棒を 200°C で約20時間熱処理をしたのち切削加工して得た。この程度の熱処理は回転による変形・磨耗を少なくし、長時間安定な回転を行なう上で必須である。O-リング付ロータはほとんど水の損失なく一週間程度以内の連続使用が可能であるが、O-リング部分の外筒の変形が起こりやすく、繰り返し何回も使用するにはなお改良の余地がある。これに対して、弾丸型の場合かなりの連続・繰り返し利用が可能である。

連続使用中の回転軸および回転数はほぼ一定しているが、繰り返し使用する場合はそれぞれの場合で magic angle を調整する必要がある。この場合、少量(50~60 mg)の KBr 結晶を同時にロータに充てんし、⁷⁹Br をモニターすることにより調整するのが便利である。⁵⁾ 含水試料の場合には水に KBr が溶解するため、たとえばポリエチレンフィルムに KBr を溶封してみた。結果を図2に示す。この場合も ±0.2° 以内に MAS 軸を調整できることがわかる。

3.2. アミロース試料^{2,3)}

図3 a-e に種々の含水率をもつ potato starch の CP/MAS ¹³C NMR スペクトルを示す。各共鳴線が含水率の増加とともに顕著にシャープになることが観測され、O-リング付ロータにより水の影響を良好に測定できることがわかる。また、含水により C1 共鳴線はいくらか高磁場シフトするとともに doublet に分裂するが、C4 共鳴線は約7 ppm 高磁場シフトするのみである。同様な水の影響は corn starch でも認められたが、C1 共鳴線は triplet に分裂した。このことは、corn および potato starch がそれぞれ A- および B- アミロースという異なる結晶構造をもつためと考えられるが、分裂の原因は必ずしも明らか

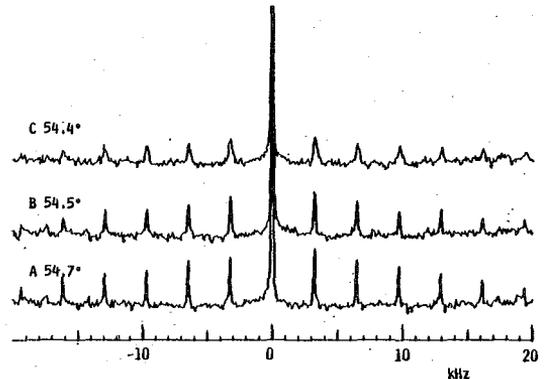


Fig. 2 50 MHz MAS ⁷⁹Br spectra of KBr packed in polyethylene films at the magic-angle (A) and off angles (B, C) in the presence of a hydrated sample.

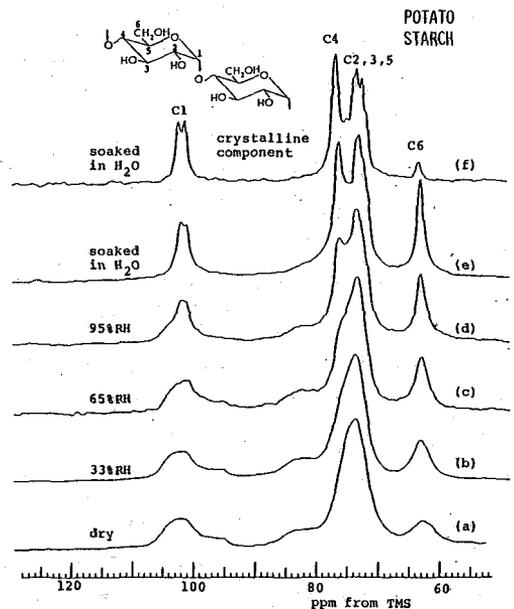


Fig. 3 50 MHz CP/MAS ¹³C NMR spectra of potato starch with different water contents.

ではない。同様なC1共鳴線の分裂は低分子量アミロースを結晶化させて得たA-, B-アミロースについても認められた。³⁾

表1には, Torchiaのパルス系列⁶⁾で測定した¹³C T₁を示す。いずれの試料に対しても各共鳴線には長短2種のT₁が存在したが, 長いT₁を結晶成分のT₁とみなした。表1には比較のため次に述べるセルロースの結果も示した。アミロースの環炭素のT₁はいずれの結晶の場合も乾燥状態より含水状態の方がかなり短い。このことは水により β -1,4-グリコシド結合のまわりの torsional motion がかなり増大することを示し, アミロース分子の α ヘリックス構造が結晶状態でもかなりflexibleなことを示す。これに対して, セルロース結晶のT₁は乾燥および含水いずれの状態でもかなり長い。このことは β -1,4-グリコシド結合をもつセルロースは β ヘリックス構造をとるためほぼ線状であり, flexibilityがかなり低いことを示唆する。

3.3. セルロース試料

種々の天然および再生セルロース試料の結晶および非晶成分の乾燥状態における特徴的な分子鎖コンホメーション, 分子運動性については既に報告した。^{7,8)} これらに対する水の影響は図1bのロータを利用することにより検討できる。

図4, 5には, 結晶成分と非晶成分の¹³C T₁の違いを利用して測定したバクテリアおよび木綿の乾燥および含水状態における結晶成分のスペクトルを示す。乾燥状態では不明瞭なC1, C4共鳴線が,

Table I ¹³C Spin-Lattice Relaxation Times T_{1C} of the Respective Carbons of Amylose and Cellulose

	Water ^{a)} content %	T ₁ /s			
		C1	C4	C2,3,5	C6
A-amylose	0	20.3	17.6	16.3	3.7
	100	8.9	6.6	5.1	1.6
B-amylose	0	21.0	18.3	16.1	3.0
	101	8.7	8.9	7.5	1.9
cotton crystalline (cellulose I)	0	128, 104	131	109	109
	161	107, 71	125	143	170
cupra rayon crystalline (cellulose II)	0	96, 64	69	60	68
	158	71, 71	91, 102	—	80

a) (g water/g polymer) x 100

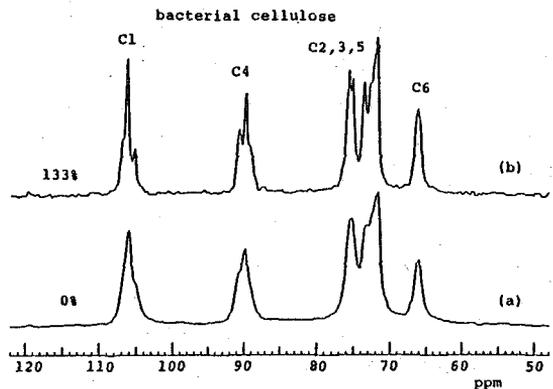


Fig. 4 CP/MAS ¹³C NMR spectra of the crystalline components of bacterial cellulose with water contents of 0%(a) and 133%(b).

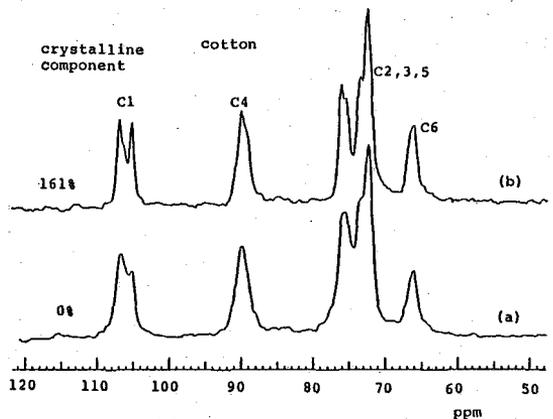


Fig. 5 CP/MAS ¹³C NMR spectra of the crystalline components of cotton cellulose with water contents of 0%(a) and 161%(b).

含水状態ではいずれも triplet に分裂することがわかる。しかし、各 triplet 中の相対強度は両試料で異なり、天然セルロースの結晶構造(セルロース I)が微細な点で両試料で異なることを示す。このような triplet 中の相対強度の違いから天然セルロースをバクテリア・バロニアのグループと木綿・ラミーのグループに大別した。分裂の原因については必ずしも明らかではなく、2種の結晶⁹⁾あるいは単位格子¹⁰⁾に基づくモデルでは triplet 中の相対強度比を説明できない。

全体のスペクトルから結晶成分のスペクトルを差し引くことにより非晶成分のスペクトルを得ることができる。^{14, 7-9)}乾燥状態と含水状態の非晶成分のスペクトルを比較した結果、再生物では含水により各共鳴線の線幅はほとんど変化しなかったが、天然物のそれは著しく減少した。このことは、含水によりセルロースの分子運動性はそれ程増大しないが、天然物の非晶分子鎖はより規則性のあるコンホメーションをとることを示唆する。したがって天然セルロースは液晶のような規則性のある状態から結晶化するものと推定される。

3. 4. 絹フィブロイン

図6に silk I 型絹フィブロインの乾燥および含水状態の CP/MAS ¹³C NMR スペクトルを示す。各共鳴線の帰属は朝倉ら¹¹⁾斎藤ら¹²⁾に基づいて行なった。明らかに含水により各共鳴線はシャープになる。特に、Ala C_βの分裂が明瞭になるとともに、Ser C_αの共鳴線も観測可能になる。同様な水の影響は silk II 型試料の場合も認められたが、Ala C_αに対する影響は silk I の場合に比べてそれ程顕著ではない。また、Ser C_αの共鳴線は乾燥状態でも明瞭に単独のピークとして観測された。こゝらスペクトルおよび¹³C T₁への水の影響から分子鎖コンホメーション、分子運動性について検討中である。

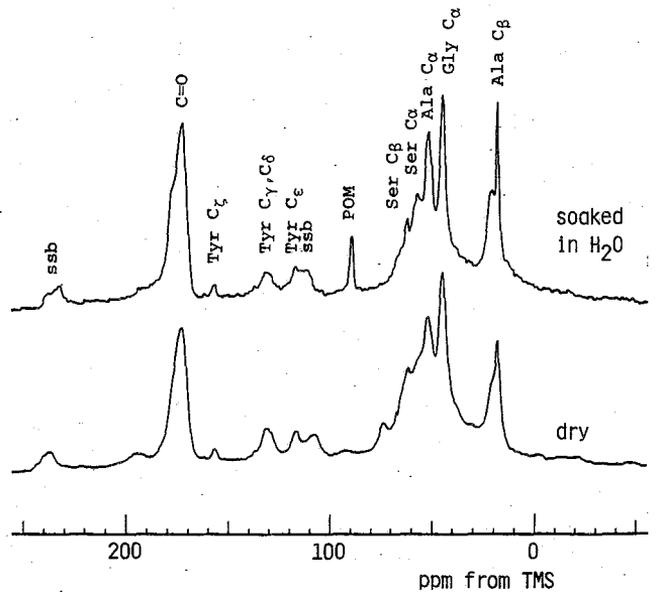


Fig. 6 CP/MAS ¹³C NMR spectra of silk fibroin (Silk I).

文 献

- 1) F. Horii, A. Hirai, R. Kitamaru, I. Sakurada, Cellulose Chem. Technol., in press.
- 2) F. Horii, A. Hirai, R. Kitamaru, Macromolecules, submitted.
- 3) F. Horii, A. Hirai, R. Kitamaru, Y. Yamamoto, Polym. Prepr. Japan, 34, 2469 (1985).
- 4) A. Hirai, F. Horii, R. Kitamaru, Polym. Prepr. Japan, 34, 2473 (1985).
- 5) J. S. Frye, G. E. Maciel, J. Magn. Reson., 48, 125 (1982).
- 6) D. A. Torchia, J. Magn. Reson., 30, 613 (1978).
- 7) F. Horii, A. Hirai, R. Kitamaru, ACS Symp. Series, 260, 27 (1984).
- 8) F. Horii, A. Hirai, R. Kitamaru, J. Carbohydr. Chem., 3, 641 (1984).
- 9) D. L. VanderHart, R. H. Atalla, Macromol., 17, 1465 (1984).
- 10) J. J. Cael, D. L. W. Kwoh, S. S. Bhattacharjee, S. L. Patt, Macromol., 18, 821 (1985).
- 11) T. Asakura, Y. Watanabe, A. Uchida, H. Minagawa, Macromol., 17, 1075 (1984).
- 12) H. Saito, R. Tabeta, T. Asakura, Y. Iwanaga, A. Shoji, T. Ozaki, I. Ando, Macromol., 17, 1405 (1984).

1. 緒言

良く知られているように、ポリエチレンを融体から融点近傍で等温結晶化させた場合いわゆるラメラ結晶が生成する。このラメラは通常数百 Å の厚さをもち、分子鎖軸はラメラ面にはほぼ垂直である。したがって、分子鎖長がラメラ厚より十分長い通常の高分子では、各分子は同一ラメラあるいは他のラメラを何回も出入りすることになる。一方、このようなラメラ間には非晶領域が存在し、そのかなりの部分の分子鎖コンホメーションはランダムである。したがって、規則正しく配列した結晶領域とランダムな非晶領域の中間に転移領域すなわち界面相が存在する。

本研究では、このようなラメラ構造をもつ直鎖ポリエチレン試料の相構造とくに界面相について、固体高分解能 ^{13}C NMR 法で得られる ^{13}C 核の化学シフト、 T_{1C} 、 T_{2C} 、あるいはスピン拡散が影響する ^1H 核の T_{1H} などにより characterize を行なった。

2. 実験方法

試料はすべて直鎖ポリエチレンである。バルク等温結晶化試料 (BCPE) は減圧下 160°C で加熱融解後、 130 または 129°C で 2~4 週間等温結晶化した。^{1,2)} 溶液結晶化試料 (SCPE) は 0.08% トルエン溶液から 85°C で 2 日間等温結晶化した。^{1,2)}

固体高分解能 ^{13}C NMR 測定は JEOL JNM-FX 200 スペクトロメータにより 4.7 T の静磁場下室温で行なった。 ^{13}C および ^1H の回転磁場強度 $\gamma B_1 / 2\pi$ は 69.4 kHz で、dipolar decoupling (DD) 時のみ ^1H のそれを 59.5 kHz とした。magic-angle spinning (MAS) の回転数は 3.3~3.5 kHz で、回転数およびマジック角度の調整は試料ロータに同時に充てんした KBr の ^{79}Br モニタにより行なった。³⁾ TMS 基準の化学シフトは、アダマンタン固体の CH 共鳴線 (29.50 ppm) を外部基準として決定した。図 1 には、本研究で用いたパルス系列を模式的に示した。パルス系列 I は cross polarization (CP) 法のかわりに ^{13}C スペクトルを得るために用いた

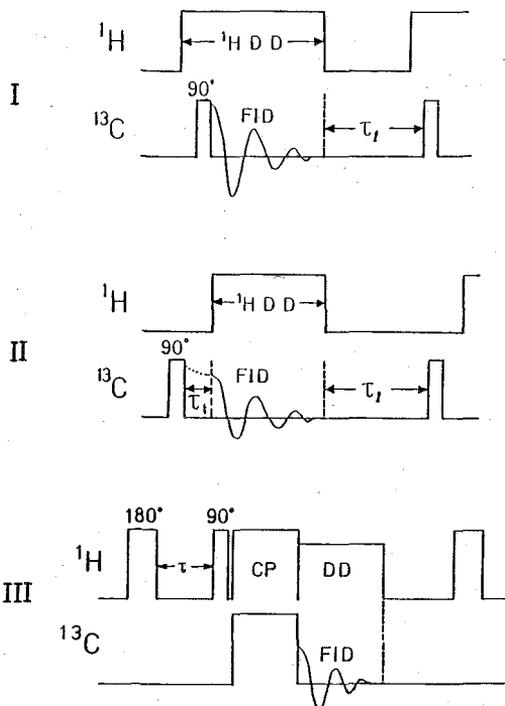


Fig. 1 Pulse sequences used in this work.

むらやまこういち, ほりいふみたか, きたまるりょうぞう

もので、パルス待ち時間 T_d を適当に選ぶことにより全成分または T_{1C} の短い成分のみのスペクトルを測定できる。パルス系列IIは、一定期間 (T_d) DDを行なわないうで ^{13}C 磁化を横緩和させたのちDD条件下でFIDを観測するためのもので、 T_d を適当に選ぶことにより T_{2C} の長い成分のみの選択的観測が行なえる。一方、 T_{1C} の測定は、その値が長い場合はCP法を用いたTorchiaのパルス系列⁴⁾、短い場合にはCP法を用いない inversion recovery 法または saturation recovery 法により行なった。また、 1H 核のスピン-格子緩和時間 T_{1H} はパルス系列Iにより決定した。

3. 結果および考察

図2にパルス系列I ($T_d = 17,000$ s) により測定したBCPE ($\bar{M}_v = 3 \times 10^6$) の全成分を反映したDD/MAS ^{13}C スペクトルを示す。同図に示したスペクトル解析の結果については後述する。ピークI、ピークIIはそれぞれ斜方晶系結晶成分、ゴム状非晶成分と帰属される。^{5,6)}

T_{1C} を測定した結果、ピークIには 2560 s, 263 s, 1.7 s の3成分が含まれているが、ピークIIは 0.37 s の1成分のみであることが判明した(表1参照)。しかし、図3に示すように、inversion recovery 法 ($\pi - \tau - \pi/2 - FID - 10$ s) で測定した部分緩和スペクトル、例えば $\tau = 0.40$ s のスペクトルには、ピークIIに相当するシャープなゴム成分 (31 ppm) に加えて、より低磁場側にほぼ T_{1C} の等しいブロードな成分が存在する(なお、33 ppm 付近の成分は結晶成分のうちの $T_{1C} = 1.7$ s の成分である)。

このブロードな成分は非晶成分と考えられるが、このことをより明らかにするためパルス系列IIにより横緩和挙動を測定した。図4に、種々の T_d に対する部分緩和スペクトルを示す。この場合、 $T_d = 3.5$ s としたため非晶成分の全成分および $T_{1C} = 1.7$ s の結晶成分の一部が観測される。図から明らかかなように、 T_d の増大とともに結晶成分は急激に減少するが、非晶成分は徐々に減少する。図5には、図4の非晶成分のピーク強度の自然対数を T_d に対してプロット

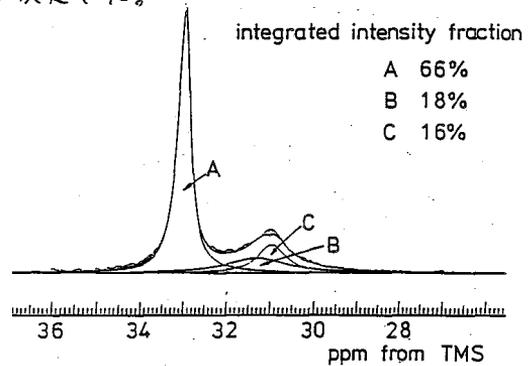


Fig. 2 50 MHz DD/MAS ^{13}C NMR spectrum of BCPE ($\bar{M}_v = 3 \times 10^6$). A: crystalline component, B: interfacial component, C: rubbery component.

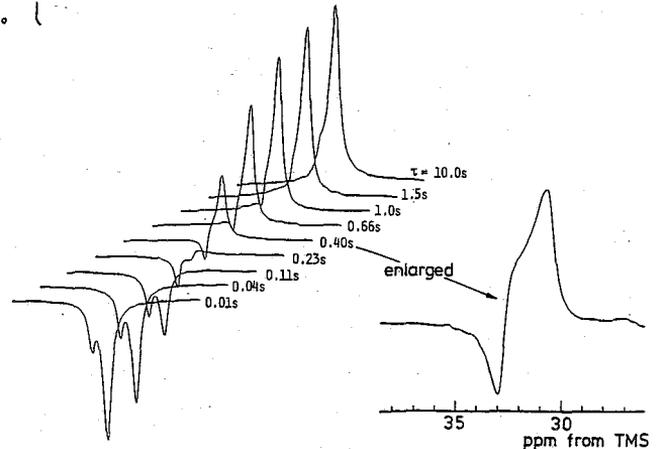


Fig. 3 Partially relaxed spectra of BCPE ($\bar{M}_v = 3 \times 10^6$), measured by inversion recovery pulse sequence ($\pi - \tau - \pi/2 - FID - 10$ s).

トした。同図下部に示した全体の緩和曲線から明らかのように、この T_2 緩和は $50 \mu\text{s}$ 以内の速い緩和とこれに続く遅い緩和の2つの部分から成ることがわかる。遅い部分の初期勾配から得た T_{2c} は 2.4 ms であり、この値を用いて $\tau_c < 50 \mu\text{s}$ の部分を2成分解析して得た速い緩和成分の T_{2c} は $44 \mu\text{s}$ である。なお、 $T_R = 3.5 \text{ s}$ 。

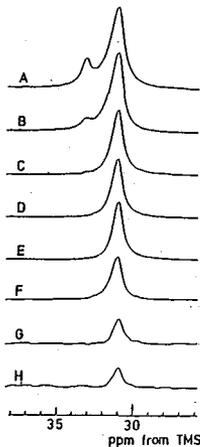


Fig. 4 Partially relaxed spectra measured by pulse sequence II at $T_R = 3.5 \text{ s}$.

$T_{2c} = 2.4 \text{ ms}$ の成分の緩和は単純な指数減衰で記述されないが、ポリエチレンの融体の ^{13}C 横緩和も同様な非指数減衰型であるため、この結果はゴム状あるいは液状高分子に特有な挙動であると考えられる。

以上の結果から、ピークIIには T_1 が同じで T_2 の異なる2成分が存在すると結論される。これら2成分は、 T_1 に関与する 10^8 Hz のような高い周波数成分をもつ局所運動については同程度の分子運動性をもつが、 T_2 を決定する比較的遅い long-range な分子運動については著しく異なる。この結果と以下で述べるいくつかの理由により、 $T_{2c} = 2.4 \text{ ms}$ の成分はゴム成分、 $T_{2c} = 44 \mu\text{s}$ の成分は界面成分と帰属される。

図2の全体のスペクトルを各成分に分離するためにはそれぞれの共鳴線の形状を決定する必要がある。ゴム成分に対しては、図3で界面成分が十分緩和してロトみなせる状態(例えば図6B, $\tau_c = 140 \mu\text{s}$)が利用できる。一方、界面成分は図6A(図4Aと同一図)から図6Bを差し引くことにより得られる(図6C)。図6Cには $T_1 = 1.7 \text{ s}$ の結晶成分も含まれているが、界面成分は 31.3 ppm にピークをもつゴム成分よりブロードなローレンツ曲線で近似できることが判明した。図2には、計算機による最小2乗法で、結晶、界面、ゴム成分に分離した結果を示す。この場合結晶成分も一つのローレンツ曲線で近似した。三成分の合成曲線の一致は極めて良い。

同様な解析は表1に示した他のBCPE、およびSCPE(図7)でも可能であった。ただし、これら二試料では単斜晶系結晶に基づく寄与(34.4 ppm)を考慮する必要がある。また、SCPEでは T_{2c} の長いゴム成分は観測されず非晶成分は分子運動の拘束された界面成分のみであることが判明した。一方、表1に示したように、これらの各試料の結

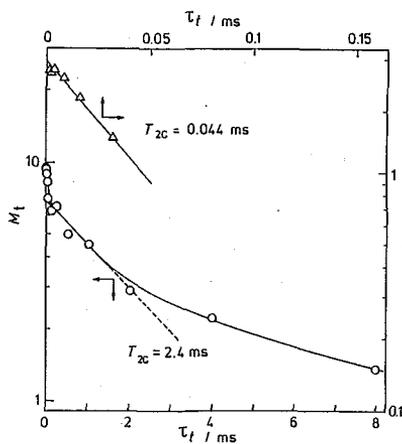


Fig. 5 Peak height of peak II as a function of T_1 's.

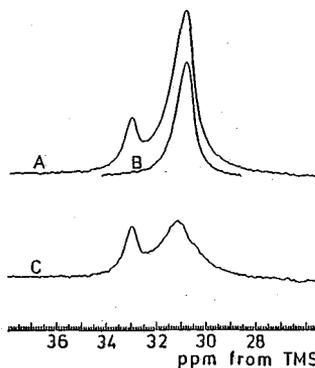


Fig. 6 Component spectra of BCPE ($M_v = 3 \times 10^6$). A: the same as shown in Fig. 4A, B: rubbery component (the same as shown in Fig. 4E), C: A-B.

Table I Samples used and their characterization

Sample	crystallinity		crystalline components			noncrystalline components	
	(1-λ) ^{a)} a	(1-λ) ^{b)} BL	monoclinic (34.4 ppm) ^{e)}	orthorhombic (33.0 ppm) ^{e)}	interfacial (31.3 ppm) ^{e)}	rubbery (31.0 ppm) ^{e)}	
Bulk-Crystal							
1	—	0.620	w ^{c)}	*0	0.66	0.18	0.16
$\bar{N}_V=3 \times 10^6$			v _{1/2} ^{d)} /Hz		18	85	38
			T _{1H} /s		1.87	1.61	0.39
			T _{1C} /s		2560, 263, 1.7		0.37
			T _{2C} /ms		—	0.044	2.4
2	0.761	0.755	w ^{c)}	0.06	0.70	0.16	0.08
$\bar{N}_V=248,000$			v _{1/2} ^{d)} /Hz	50	18	86	37
			T _{1H} /s	—	2.20	2.04	0.50
			T _{1C} /s	—	2750, 111, 1.3		0.41
Solution-Crystal							
	0.834	0.780	w ^{c)}	0.09	0.68	0.23	*0
$\bar{N}_V=91,000$			v _{1/2} ^{d)} /Hz	60	20	133	
			T _{1H} /s	—	1.90	1.90	
			T _{1C} /s	—	220, 21, 2.0	0.46	

a), b) Crystalline fractions from the density measurements and the ¹H broad-line NMR spectrum analysis, respectively. c) Mass fractions. d) Halfwidths of the resonance lines. e) Chemical shifts from TMS.

晶成分と界面成分のT_{1H}はかなり近い値をもつ。このことはこの2成分間で¹Hスピンの拡散がかなり起っていることを示し、両成分が互いに接していることを示す。

本研究で得られた結晶、界面、およびゴム成分は、我々が広幅¹H NMRのスペクトル解析^{1,2)}で得た結晶、中間、および狭幅成分にそれぞれ良く対応する^{5,6)}。両方法による解析結果からラメラ構造を仮定して界面相の厚さを計算すると、分子量30,000~110,000の試料では約34 Åとなった。この値はFloryら⁷⁾が格子モデルを用いて計算した界面厚15~20 Åとほぼ良く一致する^{1,2)}。

文 献

- 1) R. Kitamaru, F. Horii, Adv. Polym. Sci., 26, 137(1978).
- 2) F. Horii, R. Kitamaru, J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed., 19, 109(1981).
- 3) J. S. Frye, G. E. Maciel, J. Magn. Reson., 48, 125(1982).
- 4) D. A. Torchia, J. Magn. Reson., 30, 613(1978).
- 5) R. Kitamaru, F. Horii, K. Murayama, Macromolecules, in press.
- 6) F. Horii, M. Nakagawa, K. Murayama, Q. R. Zhu, R. Kitamaru, Polym. Prepr., Japan, 34, 2069(1985).
- 7) P. J. Flory, D. Y. Yoon, K. A. Dill, Macromolecules, 17, 862, 868(1984).

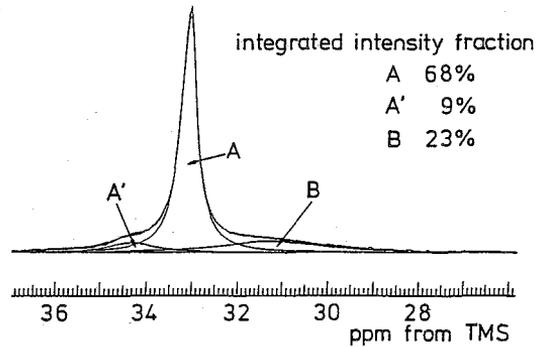


Fig. 7 50 MHz DD/MAS ¹³C NMR spectrum of SCPE. A: orthorhombic crystals, A': monoclinic crystals, B: interfacial component.

<はじめに>

細胞膜やモデル生体膜中でのアルカリイオンの透過性は、イオノファアの存在によって著しく影響を受ける。これには、生体膜中でのカチオンとのコンプレックス生成能およびそれに関連したイオノファアのコンホメーション変化が重要な要因と考えられている。しかし、生体膜中でのこれらの分子のコンホメーションを調べようと思っても、固体や溶液状態に比べて著しく困難であることが多い。

我々は、固体高分解能NMRを用いた一連の研究において、コンホメーション依存¹³Cシフトはどのような分子系に存在し、またどの程度の大きさの変化を伴うかを明らかにしてきた。言うまでもなく、¹³C化学シフト変化を指標としたアプローチは、上記の問題あるいは生体膜中でbiologically activeな分子のコンホメーションを調べる有力な手がかりを与える可能性がある。

本研究では、バリノマイシン、ノナクチン、テトラナクチン等のイオノファアと種々の金属イオンとのコンプレックスについて、結晶および溶液状態での¹³C NMRスペクトルを測定した。得られた¹³C化学シフト変化をX線回折による固体状態でのコンホメーションをもとに検討し、コンホメーション解析のプローブとして極めて有用であることを見出した。

<実験方法>

¹³C CP-MAS NMRスペクトルは、Bruker CXP-300 スペクトロメーターを用い、75.46 MHzで行なった。化学シフトの基準は、TMSからのPPMで表した。バリノマイシン、ノナクチンは市販品を用い、テトラナクチンは中外製薬より提供を受けた。

<結果と考察>

A. バリノマイシン

バリノマイシン(図1)は、特にK⁺イオンと選択的に強く結合し、イオンの膜透過を促す抗生物質である。溶液中では種々のコンホメーションの存在が知られており、非極性溶媒中では、4→1, β-ターンにより安定化したC₂対称の“グレスレッド”構造、極性溶媒中では“プロペラ”構造に移行する。一方、固体状態ではそれぞれフリー、K⁺コンプレックスに若干の多形が存在するが、それぞれがほぼ同一の構造をとる。特に、K⁺コンプレックスではS₆対称をとるが、

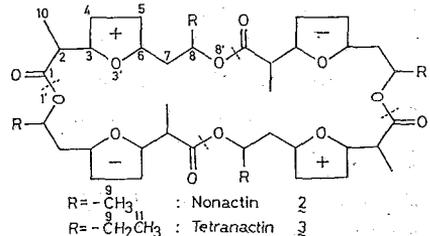
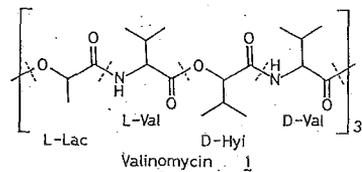


図1

たべたりょうこ・さいほうはじめ

フリーでは C_3 対称もとらない。

図2に、バリノマイシンのフリーおよび K^+ , Na^+ , Cs^+ コンプレックスの ^{13}C CP-MAS NMR スペクトルを示す。フリーでは、3つのD-Hyl-L-Lac, L-D-Val残基のローカルなコンホメーションが異なるために、それぞれ二本のピークに分裂しているが、コンプレックスではいずれも対応する1本のピークに変化する。これは明らかにコンプレックス形成に伴うコンホメーション変化によるもので、この ^{13}C シフトの挙動については、フリーと K^+ コンプレックスのX線回折からの torsion angle の分布とよい相関関係があることを以前に示した⁴⁾ Na^+ , Cs^+ コンプレックスのコンホメーションでは、X線回折によるデータが報告されていないが、3種類のコンプレックス間で、ほぼ同じスペクトル形および ^{13}C シフト値を示すことから、 Na^+ , Cs^+ コンプレックスのコンホメーションは K^+ コンプレックスと同じであるといえる。興味あることに、クロロホルム溶液中では、 K^+ コンプレックスは固体状態と類似の ^{13}C シフトを示すが、フリーおよび Na^+ , Cs^+ コンプレックスの場合は著しくピーク位置が異なり、もはや固体でみられた構造は維持できない。

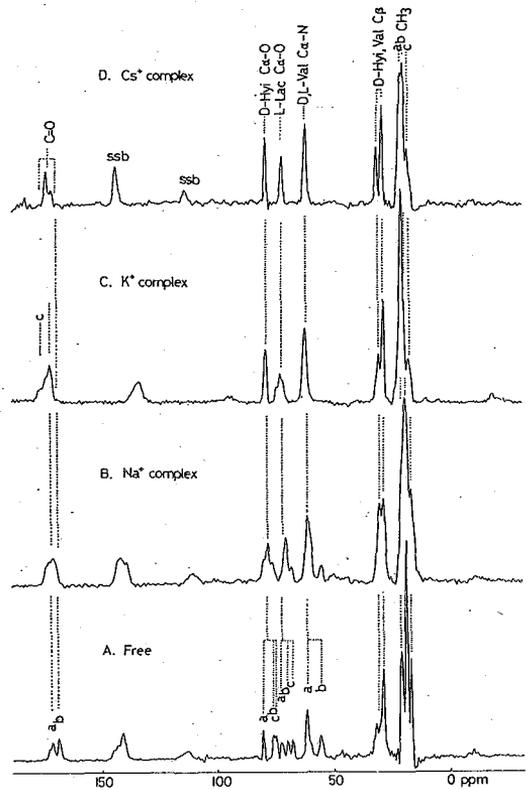


図2. バリノマイシンの ^{13}C CP-MAS NMR スペクトル

B. ノナクチンとテトラナクチン

ノナクチン、テトラナクチンは、バリノマイシン同様カチオン担体として膜のイオン輸送を行なう環状テトラエステル抗生物質である。化学構造は交互に enantiomeric (+)(-) の4つの nonactic acid からなる。両者の唯一の違いは、C-8炭素の置換基がノナクチンではメチル基でテトラナクチンではエチル基をもつことである。(図1)

ノナクチン、テトラナクチンとも、フリーとコンプレックスではそれぞれスペクトルに大きな変化がみられる(図3,4)。フリーのノナクチンの ^{13}C ピークは、4つのくり返しユニットからの1本のシグナルに対応しており、これはノナクチンが S_4 対称に近いコンホメーションであることと関連している。フリーのテトラナクチンでは、特にC-3, 6, 8シグナルの相対ピーク強度が1:4:1となり、ちょうどC-3, 8のダブルレットピークがC-6に重なって現われたものである。すなわち、後で述べるようにノナクチンのような対称構造はとらない。

図4(A)に、フリーのノナクチンとテトラナクチン間における主鎖の bond 回りの torsion angle の差($\Delta\phi$)を示す。⁵⁾ (+) nonactic acid ではテトラナクチンのコンホメーションは、ノナクチンと非常によく似ており、($\Delta\phi < 7^\circ$) 一方、(-) nonactic acid では全く異なっている。

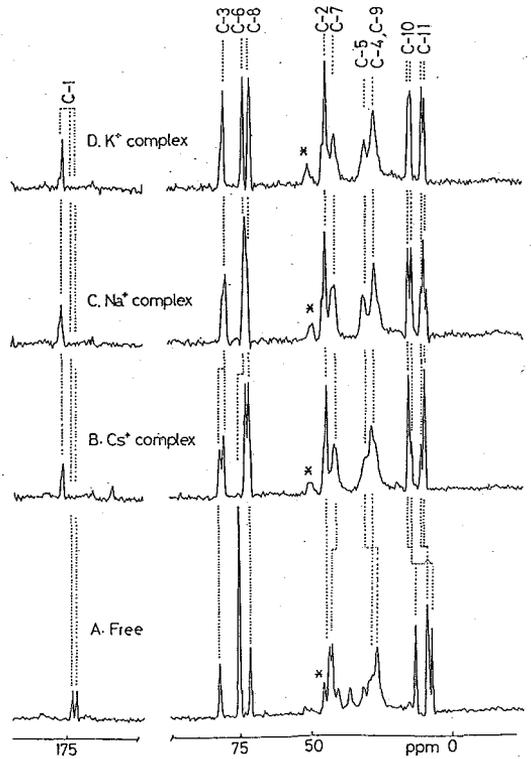
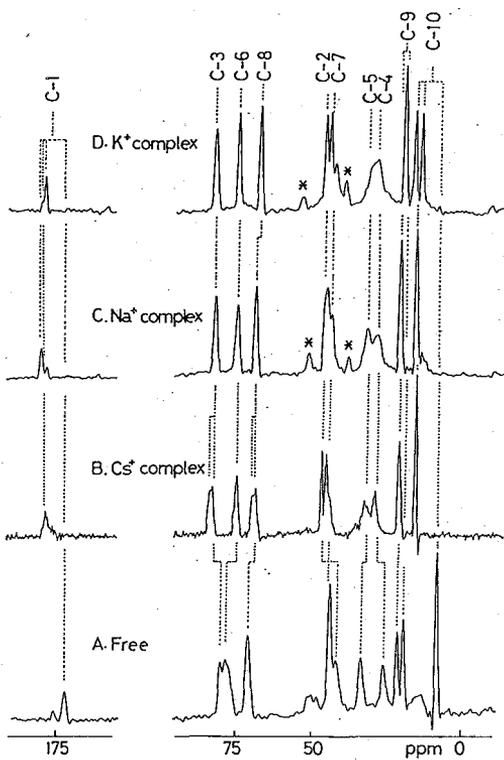


図3. 1ナフタールの¹³C CP-MAS NMR スペクトル

図4. テトラナフタールの¹³C CP-MAS NMR スペクトル

主鎖炭素の¹³Cシグナルが、コンホメーション依存¹³Cシフトによりその近傍の torsion angle と関係があるとすれば、上記のこゝからテトラナフタールは2種類の着与からなる¹³C NMRシグナルが期待できる。つまり、1ナフタール様のローカルなコンホメーションをもつユニット (+)nonactic acid)からのピークと、torsion angleの異なるコンホマー (-)nonactic acid)からのピークである。(+)nonactic acid)では、C-8の置換基効果と1ナフタールとテトラナフタールのテトラヒドロフラン環のコンホメーションのちがいによるC-3,4シフトを考慮すれば、テトラナフタールは1ナフタールと実験誤差内で同じ¹³Cシフト値を示し、1ナフタール様コンホメーションをとることがわかる。C-1, 3, 7, 8, 10シグナルのsplittingは、明らかにこのような2種類の非等価なエナンチオマーの存在により起こる。このこゝは、テトラナフタールの分子構造が、ねじれたC2対称をとることとよく一致する。

1ナフタール、テトラナフタールとも、金属イオンとコンプレックスを作った場合、¹³Cスペクトルは、フリーに比べて大きく変化している。これは明らかにligand分子のdrasticなコンホメーション変化によるものである。しかし、コンプレックス内では、K⁺, Na⁺, Cs⁺ともほぼ同じスペクトルを示す。図5(B)(1ナフタール、テトラナフタールのフリーとコンプレックス間のtorsion angle変化を示したもの)によれば、コンプレックス形成により最も大きな影響を受けるtorsion angleは、金属イオン(K⁺, Na⁺, Cs⁺)、ligand分子(1ナフタール、テトラナフタール)の種類にかかわらず、12, 23, 36, 88' bond 回りにある。これに対して、K⁺コンプレックス形成による1ナフタールの¹³Cシフトの移動は、

C-1 (6.6 ppm), C-2 (5.3 ppm), C-10 (6.0, 8.3 ppm), C-3 (2.4 ppm), C-6 (-2.0 ppm), C-8 (-2.5 ppm)で、明らかに torsion angle の変化と対応する。又、6種類のコンプレックス間の C-1 ~ C-6 のコンホメーション依存性 ^{13}C シフト値は、実験誤差内 ($\pm 0.8 \text{ ppm}$) で一致し、torsion angle についても有意な差がないことから ligand 分子のローカルなコンホメーションは同じであることがわかる。このように、torsion angle の変化が 10° 以下のものは化学シフトの有意な移動は認められず、 30° よりも大きな変化は、コンホメーションに依存した ^{13}C シフトの移動をもたらすことがわかった。

コンホメーション依存性 ^{13}C シフトにより分子コンホメーションを議論

する場合、固体と溶液間の ^{13}C シフトの比較をもとに、固体状態でのコンホメーションが溶液中でどの程度保たれているかを調べることも重要である。クロロホルム溶液中では、テトラナクチンの K^+ , Na^+ , Cs^+ コンプレックスとノナクチンの K^+ コンプレックスは、固体とほぼ同じ ^{13}C シフトを示し、固体状態でのコンホメーションを維持しているが、フリーのノナクチン、テトラナクチンと、ノナクチンの Na^+ , Cs^+ コンプレックスでは、もはや同じコンホメーションを保っていない。特に、フリーのテトラナクチンで、固体スペクトルでみられた C 対称によるシグナルは、溶液中では観測されない⁶⁾。これは、分子運動による速いコンホメーションのゆらぎによる化学シフトの平均化による。

<結論>

^{13}C CP-MAS NMR 法により測定した抗生物質イオノファールのコンホメーション依存性 ^{13}C シフト値は、X線回折によるコンホメーションとよい相関を示し、フリーとコンプレックスの固体構造および溶液構造を検討するうえで有用な手段となる。

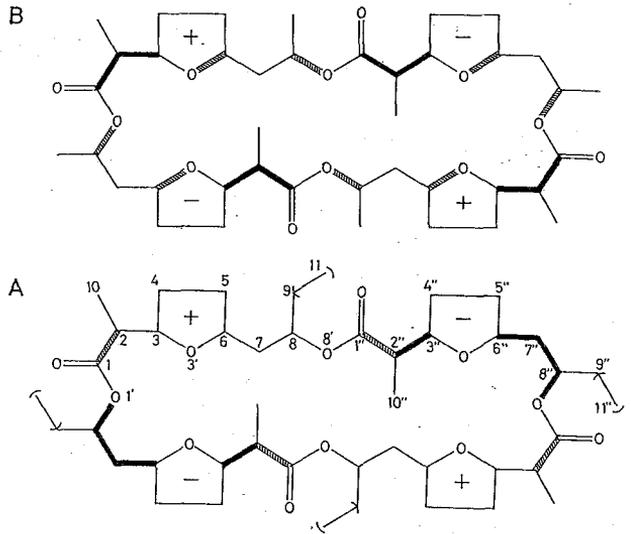


図5. ノナクチン、テトラナクチンのフリーおよびコンプレックスにおける torsion angle の変化
 ■, $\Delta\phi > 70^\circ$; ▨, $30^\circ < \Delta\phi < 70^\circ$

- 1) H. Saitō, R. Tabeta, A. Shoji, T. Ozaki, I. Ando, and T. Asakura, in "Magnetic Resonance in Biology and Medicine", ed. by G. Govil, C. L. Kheterapal, and A. Saran, Tata McGraw-Hill, New Delhi, p. 195, 1985.
- 2) R. Tabeta and H. Saitō, Bull. Chem. Soc. Jpn., in press.
- 3) R. Tabeta and H. Saitō, Biochemistry, in press.
- 4) 多野由美, 第23回NMR討論会要旨集, 1994, p.251
- 5) M. Dobler, Helv. Chim. Acta, 55, 1371 (1972); Y. Nawata, T. Sakamaki, and Y. Iitaka, Acta Cryst., B30, 1047 (1974); T. Sakamaki, Y. Iitaka and Y. Nawata, ibid., B32, 768 (1976).
- 6) Y. Kyogoku, M. Ueno, H. Akutsu, and Y. Nawata, Biopolymers, 14, 1049 (1975).

チクロムC中間酸変性“molten globule”の
¹H-NMRによる構造研究
 (日本電子) ○大串幹夫 永山国昭

1. 序 ¹H-NMRスペクトルの二次シフト(secondary shift: 以下 σ と略記)を利用して、弱い変性条件における球状蛋白質分子の無秩序領域——但し、主鎖の巻きほだけ(unfolding)を伴わない——の位置と広がりを求める試みについて述べる。はじめに方法を考察し、次に馬フェリチクロムC酸変性に対して試みた例を報告する。

2. 方法論 2-1 σ の解釈 σ が球状蛋白質分子の主鎖の巻きほだけ(unfolding)の指標になることは、リソチム⁽¹⁾、BPTI⁽²⁾などについて知られており、すでに確立された解釈といってよい。ここでは主鎖が天然状態と同様に折れたたんだ状態で、 σ が蛋白質分子内部の無秩序さの指標になるかどうかを検討する。ベンゼン環の環電流による σ を例にとって、観測されるプロトンとベンゼン環の立体的配置の変動に伴い、平均化によって σ が減少することを次に示す。図1はJohnson⁽³⁾とBovey⁽³⁾が求めたベンゼン環周辺の σ である。 σ が大きいのは斜線部——衝突のためにプロトンが位置しえない部分——のふちの近くである。ベンゼン環に近くて大きな σ を持つプロトンの方が——環に近づく方向ではゆるいといけないうことと、 σ の勾配が大きいために——ゆるぎによる影響を強く受けて値が小さくなる傾向がある。(たとえばa点とb点を比較)。蛋白質分子内部に数Åのゆるぎがあれば、もともと大きな σ をもつピークには顕著な σ の減少が期待できる。

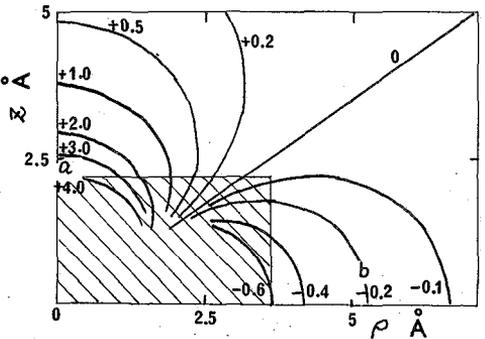


図1. ベンゼン環(中心原点, ρ 平面上)のまわりの σ

2-2 無秩序領域の同定 球状蛋白質分子の立体構造が知られていて、その中の充分に多くのプロトンに対してNMRのピーク帰属がなされているが、それらのプロトンは立体構造の局所的变化——無秩序化を名む——に対してよりフローブとなる⁽⁴⁾。変化の起こった部分のプロトンに対してだけ σ が変化し、その他の部分では不変だからである。

2-3 構造変化を起こした蛋白質分子に対する¹H-NMRピークの帰属 研究の対象になっている構造状態('X')と仮りに名付ける)におけるピークの帰属は天然状態('N')のピーク帰属をもとにして得ることが出来る。N \leftrightarrow Xの転移が、各ピークの2状態間の周波数差よりも充分速ければ、溶媒条件をNが優勢である条件からXが優勢になる条件まで徐々に変化させながら化学シフトの変化を眺めることができる。転移が共鳴周波数よりも遅い場合には、NとXが共存する溶媒条件下で、一種類のプロトンに対して、N及び

おおぐしみきお・なかやまくにあき

Xに対応する位置に2つのピークがある。この場合は saturation transfer 法によって両者を結びつけることができる。

3. 馬フェリチンクロムCの酸変性状態 (AG) への適用

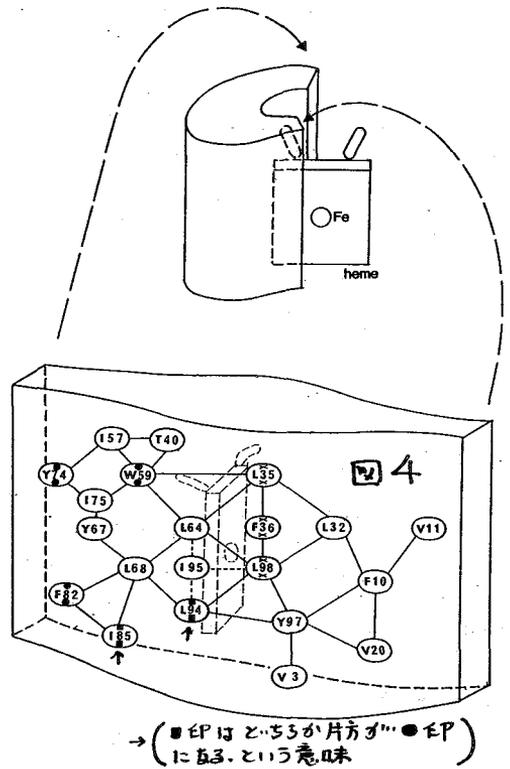
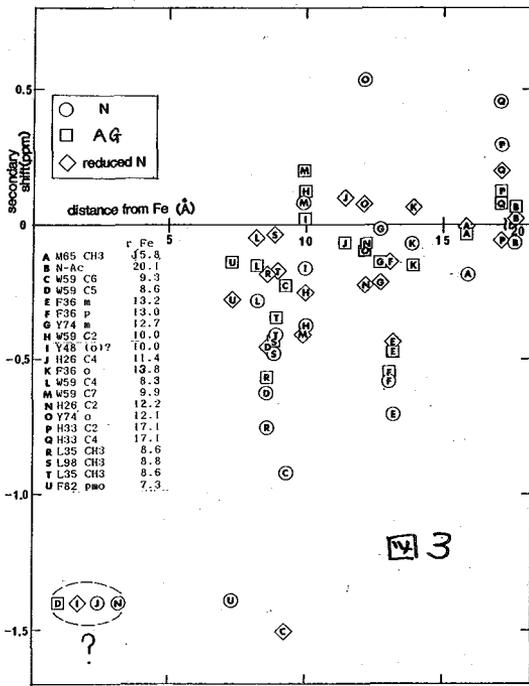
2. で述べた方法によって、馬フェリチンクロムCの、高塩濃度下における酸変性状態 (Acidic Globule state) を研究した。同蛋白については、Williams⁵⁾の帰属決定により、大部分の疎水性側鎖のメチル基と芳香族側鎖のピークが帰属されている。⁽⁵⁾⁽⁶⁾

3-1 従来の研究と今回の目的 筆者らは、馬フェリチンクロムCのAGにおいて、遠紫外CD、固有粘度、 τ_M によるトリプトファン蛍光の消光、蛋白分子の拡散係数からみて、ポリペプチドが天然状態(N)と同じ大きさの球状に凝集していることを示した。一方、¹H-NMRスペクトルは全体として σ_S の減少を思わせる変化を示していた。我々はこの状態が molten globule (MG) 状態であると報告した。⁽⁷⁾ MGとは、主鎖の折れたたみはNと同様だが側鎖のゆるみか著しく大きくなっていて、蛋白分子内部が液体的性格を強く持っている状態である。81年に Pletysyn⁽⁸⁾と知田の議論の中からこの名が生まれた。本研究では、 $N \rightarrow AG$ で σ_S が小さくなっているピークのフォトンが蛋白分子内に局在しているかどうかを検討した。

3-2 測定 ¹H-NMR測定は JEOL GX400 (400MHz) により行なった。スペクトルのpH変化測定には0.5MKCl、蛋白2wt%の試料を用い、45°CでpH 8.3 ~ 2.0まで23点で測定した。saturation transfer の測定は0.5MKCl、蛋白8wt%の試料を用い、5°C、pH 3.6, 3.9, 4.2の各pHで行なった(5°CでNとAGの中点は3.4辺)。NOEと区別するために、5°C、中性pHにおける測定と比較した。pH変化測定を45°C、s.t.測定を5°Cで行なった理由は、2-3で述べたことから前者に対しては $N \rightleftharpoons X$ の転移が速い方が有利であり、後者に対しては—— τ を越えない範囲で——遅い方が有利だからである。

3-3 結果 (σ_{AG} を求める) 中性pHから酸性pHへのピークの変化の1方は三様である。すなわち、a. pH 2.5まで追えるピーク、b. 転移中点pH付近まで追えるピーク、c. pH 4以上でbroadening が激しくなり消失するピーク、の3カテゴリーに分かれる(図2, 図3)。aカテゴリーについては、pH 2.53における化学シフトをAGのシフト(σ_{AG})とした。bカテゴリーについては、aカテゴリーのピークの転移中点pHの平均値($pH_m = 3.7 \pm 0.2$)を用いて、 $(\sigma_{AG} + \sigma_N) / 2 = \sigma_{pH_m}$ の関係式から σ_{AG} を求めた。cカテゴリーに対してはスペクトルのpH変化からは σ_{AG} が求められない。cカテゴリーに対しては温度を下げて(5°C) saturation transfer を試みた。Phe 82 について exchange peak が観測された。

3-4 解析 (σ_S の比較) 観測されたシフト(σ_{obs})から σ_S を求めるために、 $\sigma_{obs} = \sigma_p + \sigma_s$ の関係式を用いた。但し σ_p は一次シフト(立体構造がないときのシフト)である。ここでは、BunditとWüthrich⁽⁹⁾がオリゴペプチド中に各アミノ酸残基を組み込んでD₂O中で測定したシフトを σ_p とする。こうして求めた σ_S を、AGについては $\sigma_S(AG)$ 、Nについては $\sigma_S(N)$ とする。 $\sigma_S(AG)$ と $\sigma_S(N)$ の比較を図3に示す。対照として還元型チトクロムCの σ_S ($\sigma_S(cred)$)も加えた。図4は、チトクロムCの τ_M をとりまく疎水性領域の中で、 σ_S の減少が顕著な残基(●印)とAGで



も大きな σ_s を残している残基(X印)の分布を図示したものである。

3-5 考察 図4をみると、無秩序化領域が図中74の左側に局在するといえそうである。1か1。●印もX印もつけられない残基が多かった。これは、①45°CのNで帰属が不明(Y67, F10*, Y97*, L32)が ②ピークが混みすぎて図2でpH変化が追えなかったもの(V11, V3, V20, I95)あるいは ③saturation transferが不満足だったもの(L68, F10*, Y97*, L64)である。(●印は5°Cでは帰属されている)。この3つの他に、もともとNで σ_s が小さいピークは使えない、という制限がある。以上の4つがこの方法を適用する上での実際上の問題点である。また、チトリロムCの特殊事情として、NとAGで常磁性シフトが異なることを示唆する証拠(Nはlow spin AGはmixed spin)があることも解釈をむかかしくしている。

reference (1) C.C. McDonald et al. J. Amer. Chem. Soc. 93 ('71) p235-

- (2) A. Masson & K. Wüthrich FEBS Lett. 31 ('73) p 114
- (3) C. E. Johnson & F.A. Bovey J. Chem. Phys. 29 ('58) p 1012
- (4) G.S. Crispin et al. Eur. J. Biochem. 124 ('82) p 295-303
- (5) G.R. Moore & R.J.P. Williams Eur. J. Biochem 103 ('80) p493-502
- (6) G. Williams et al. J. Mol. Biol. 183 ('85) p 409-428
- (7) M. Ohgushi & A. Wada FEBS Lett. 164 ('83) p21-
- (8) D.A. Dolgikh et al. FEBS Lett. 136 ('81) p311-
- (9) A. Bundi & K. Wüthrich Biopolymers 18 ('79) p285-297.

チトクロムC関連化合物のNMR.
 -チトクロムC₁ およびアポチトクロムC-プロトヘム
 複合体のヘム近傍構造-

(京大工) ○舟橋 孝, 森島 績

序. 生体内の呼吸鎖では, チトクロムC₁ (Cyt c₁), チトクロムC (Cyt c), チトクロムオキシダーゼ(Oxidase)と呼ばれるヘムを含んだ電子伝達体が存在し, ヘム鉄の価数変化を利用して電子の受け渡しを行っている. このなかで, Cyt c₁, Cyt cは, 一分子中にヘムC (heme c)一個を有し, 一個の電子を伝達する. Heme cは, 生体内に広く存在するミオグロビン(Mb), ヘモグロビン(Hb)に含まれるプロトヘム(protoheme)と異なり 図1に示したようにヘムがチオエーテル結合で蛋白と結合している. また, ヘム鉄の第5, 第6配位子側も蛋白と結合している. このヘム近傍の結合の特徴は, Cyt c₁やCyt cの酸化還元電位および構造安定性がこれらの結合と密接に関連する事を示唆している. そのためcyt cについては, X線結晶解析, ESR, NMR法等でヘム近傍構造が詳細に論じられてきた. そして, 最近では, ヘムの交換した人工のCyt cをつくり その構造および機能を研究する試みも行われはじめた. 一方, Cyt c₁はCyt cに電子をあたえる重要な蛋白質であるにもかかわらず膜蛋白質であるため精製が困難で ヘム近傍構造は, ほとんどわかっていない. たとえば, ヘム鉄の軸配位子は, Cyt cとおなじメチオニン(Met)-ヒスチジン(His), もしくはMet-システイン(Cys)と考えられている^{1,2}. そのようにCyt c₁のヘム近傍構造が不明な原因としてX線結晶解析やNMRスペクトルの得られていないことがあげられる.

そこで本研究では, Cyt c₁ およびApocyt c-protoheme complexのヘム近傍構造をNMR法で検討した.

実験. Cyt c₁は, 大阪大学理学部松原研究室より提供していただいた. Cyt cは, Sigma社より購入した. Apocyt c-protoheme complexは, 常法により得たApo cyt cにprotohemeをシアン存在下で加えて得た.³ NMRの測定は Nicolet NT-300を用いた. 測定に用いた蛋白の濃度は, 0.5-1.5 mMである. 軽水中での蛋白の測定は Super WEFT法および Low-power presaturation法を適宜使い分けた.^{4,5}

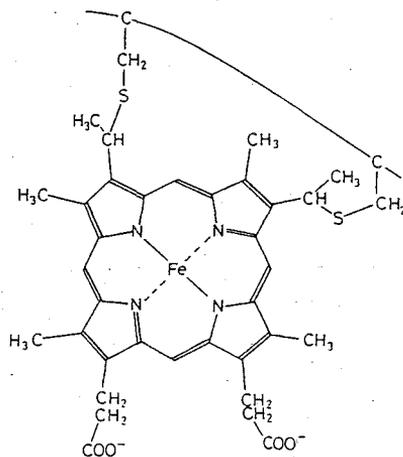


図1. Heme c

ふなはし たかし, もりしま いさお

結果及び考察

1. Cyt c₁ と cyt c, c₅₅₁ のヘム近傍構造の比較

表1に Cyt c₁の既知の性質をしめした. Cyt c₁は, その吸収スペクトルや酸化還元電位が Cyt cと類似であるため比較されてきた.¹ しかし, Van Gelderらのように軸配位子の種類および性質を反映するCyt c₁のESRのg-値は, Cyt cの値と大きく異なりこの事が, 軸配位子の一方がHisでない証拠の一つと考える人もいる.²

表1. チトクロムc類の性質

sample	cyt c ₁	cyt c ₅₅₁	cyt c
Red-ox(mV)	+228	+286	+260
Number of amino acids	241	82	104
M.W.	27,874	8,700	12,384
pI	3.6	4.7	10.4
Axial ligands	Met-His or Cys	Met-His	Met-His
g-values measured by ESR	3.36 2.04 -	3.24 2.06 1.48	3.06 2.25 1.25

ところで軸配位子がCyt cと同じバクテリアのCyt c₅₅₁のg-値や酸化還元電位に注目すると, これらの値はCyt c₁の値に近い事がわかる. このことから, Cyt c₁のヘム近傍構造は, Cyt c₅₅₁に近い事が予想される.

図2に酸化型Cyt c₁のスペクトルをcyt c, c₅₅₁と比較した. その結果, -12.8 ppmおよび-40.7 ppmのシグナルはそれぞれMetのε位, γ位のプロトンにまた24.5, 20.2 ppmのシグナルは, ヘム側鎖のメチルシグナルに帰属される(23°C). ここで注目すべきは Cyt c₁において Metのシグナルが, Cyt c₅₅₁に類似している点である. Cyt cとCyt c₅₅₁はX線結晶解析が行われており図3に示したようにMetの配位構造が異なっている. 従って, 上記の類似性は, Cyt c₁では, Cyt c₅₅₁同様Metのβ位の炭素原子とε位の炭素原子が, γ, δ炭素軸に対してシス位にくる構造を持つと考えられる.

図4は 軽水溶液中の酸化型Cyt c₁の交換性プロトンシグナルのpH依存性を示した

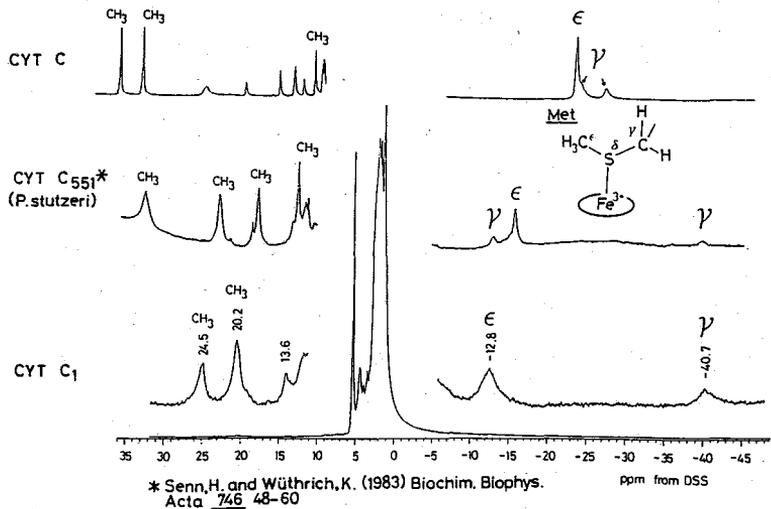


図2. Cyt c₁, c₅₅₁, cのNMRスペクトル. 23°C.

(at 8°C). 14.3 ppmの重水中で見られないシグナルは、pH 5.8ではその強度を増す事がわかった。このpHに依存した変化は、ヘム鉄に配位したHisのイミダゾールN₁Hのみである事からCyt c₁の交換性プロトンシグナルは、HisのイミダゾールN₁Hと考えられる。⁶ また、このシフト位置はCyt cの場合の16 ppmに近い。

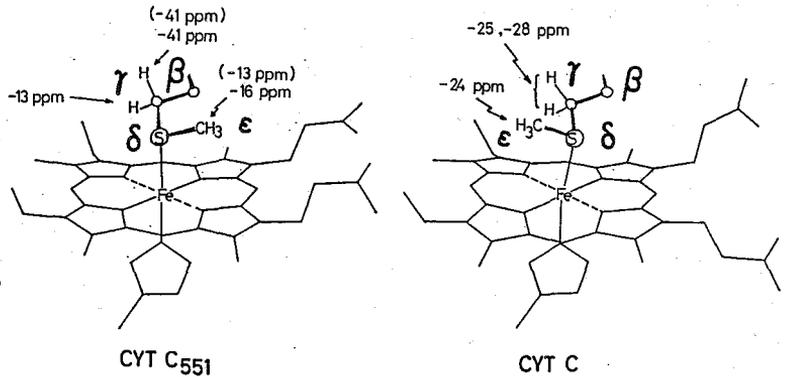


図3. Cyt c₁, c₅₅₁, cのヘム近傍構造。括弧内は、Cyt c₁のシフト位置。

以上のように、Cyt c₁は、Cyt cとおなじくMetとHisを軸配位子にもちMetの配位構造がCyt c₅₅₁に近い事が示唆される。しかし、Cyt c₁の低磁場側のヘムメチルシグナルのシフト位置に注目するとCyt cやCyt c₅₅₁とも異なっている。つまりCyt cやCyt c₅₅₁では、ヘムメチルシグナルの一部が選択的に低磁場シフトして観測されるが、Cyt c₁ではこのようなシフトはない。Cyt cやCyt c₅₅₁では、Metのイオウのsp³ lone pairが、ピロール窒素の方向に配向しヘム鉄のd_{xz}もしくはd_{yz}軌道との重なりが生じこれがヘムメチルシグナルのシフト位置に影響を与えていると考え、Cyt c₁ではMetのイオウのsp³ lone pairとヘム鉄のd_{xz} or d_{yz}軌道の重なりがCyt cやc₅₅₁とも異なって少ないことによると考えられる。⁷

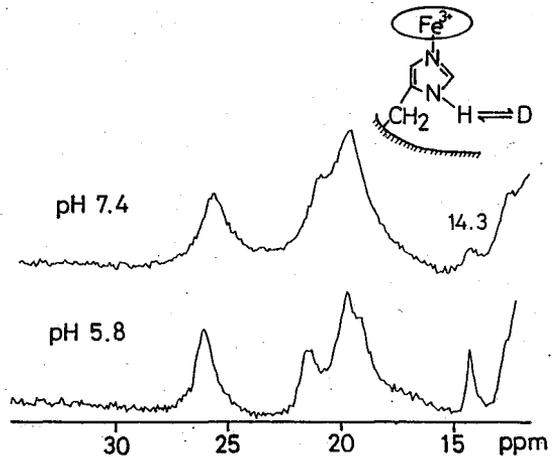


図4. 交換性プロトンシグナルのpH依存性。8°C.

2. Apocyt c-protoheme complexのヘム近傍構造

以上は、Cyt c₁のヘム近傍構造について述べてきたが、はじめに述べたようにCyt cは、その構造が詳細に検討されている蛋白質の一つである。このCyt cは、ヘリックス含量が約15%と少なく、構造を安定化するのは、ヘムと蛋白質の結合によるものと考えられている。従って、Mbの再構成と同様の方法でApocyt cにprotohemeを加えてもcomplexは作れないと考えられている。⁸ しかし、生体内では、Cyt cシンセターゼ存在下、Apocyt cとProtohemeからCyt cが作られることからヘムとApocyt cの間には相互作用が存在する事が推定

される。事実、Apocyt c とフタロシアニンの complex や protoheme complex について存在が示唆されている。

図 5 A に、高濃度のシアンイオン存在下で得られた Apocyt c-protoheme complex の NMR スペクトルを天然の Cyt c のシアン体と比較して示した。Apocyt c protoheme complex は、24.8, 24.0, 17.8 ppm にヘムメチルシグナルが、交換性プロトンシグナルも天然の cyt c のシアン体 (15.6 ppm) とほぼ同じ 16.6 ppm に観測され軸配位子が His であることを示している。このスペクトルは、Heme c peptide や変性下の Cyt c のシアン体のスペクトルとも異なり天然の Cyt c のシアン体のそれに近い。一方低濃度のシアンイオン存在下では、図 5 B に示した様に新しいシグナルが観測され 36.3, 30.7 ppm はヘムメチル、-24.4 ppm は、軸配位子の Met メチルシグナルと帰属される。この結果は、天然の Cyt c と同様に Met の配位した complex の出来る事を示している。以上の様に Protoheme を用いて Cyt c とスペクトル上類似の complex がえられる。

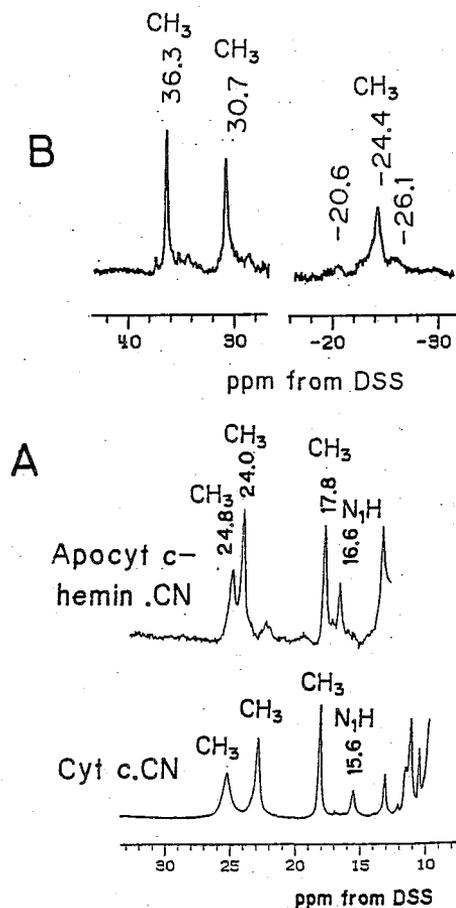


図 5. Apocyt c-hemin complex と Cyt c の NMR スペクトル。A; 3°C pH 6.0 B: 8°C, pH 5.8.

REFERENCES

1. Wakabayashi, S., Matsubara, H., Kim, C.H., and King, T.E. *J. Biol. Chem.* (1982) **257**, 9335-9344.
2. Tervoort, M.J., and Van Gelder, B.F. *Biochim. Biophys. Acta.* (1983) **722**, 137-143.
3. Przywarska-Boniecka, H., and Ostropliska, L. *J. Inorg. Biochem.* (1983) **19**, 119-127
4. Inubushi, T., and Becker, E.D. *J. Mag. Reson.* (1983) **51**, 128-133
5. Morishima, I., and Hara, M. *Biochemistry* (1983) **22**, 4102-4107.
6. Cutnell, J.D., Lar Mar, G.N., and Kong, S.B. *J. Am. Chem. Soc.* (1981) **103**, 3567-3572
7. Morishima, I., Funahashi, T., Wakabayashi, S., Mukai, K., and Matsubara, H. in preparation.
8. Fisher, W.R., Taniuchi, H., and Afinsen, C.B. *J. Biol. Chem.* (1973) **248**, 3188-3195.

(京大工) 城 宜嗣、 森島 績 (京大医) 佐野 晴洋

【序】

ヘムタンパク質は、生体内において酸素の運搬・貯蔵、酸化・酸素添加反応の触媒、あるいは電子伝達など多種多様な機能に関わっている。これらヘムタンパク質に補欠分子族として含まれているヘム(鉄-ポルフィリン錯体; a)は、生体内で合成され、ヘムタンパク質の活性中心として機能した後は、分解され体外に排出される。このヘムの代謝は、ヘムオキシゲナーゼと呼ばれる酵素によって触媒され、図1のような反応スキームによって行なわれると考えられている²。本研究では、このヘム代謝の重要な反応中間体と考えられている、メソオキシヘミン(b)の特異な電子状態を、NMR・ESRを用いて明らかにし、ヘム代謝反応との関連で検討した。

【実験】

メソオキシヘミンの合成、4種類の異性体(α 、 β 、 γ 、 δ ; 図2参照)の分離・精製は佐野らの方法¹に従った。吸収・NMR・ESRスペクトルの測定は、すべて脱気下で、溶媒には60%ピリジン-水混合溶媒あるいは100%ピリジンを用いた。¹H-NMRスペクトルは300 MHz Nicolet NT-300を用いて、ESRスペクトルはJEOL JES-3Xを用いて測定した。

【結果】

α 、 β 、 γ および δ -メソオキシヘミンそれぞれの室温における¹H-NMRスペクトルを図3に示した。4つのすべてのスペクトルにおいて、高磁場-100から-150 ppmに、プロトン1個分の3本のシグナル(X、Y、Z)が観測された。選択的重水素化によって、これらはメソ位の3つのプロトンに帰属された。これ以外の、低磁場40から20 ppm(A、B)、高磁場-10から-20 ppm(C-F)のシグナルは側鎖のメチル基・ビニル基のプロトンに帰属された。

図4に、 α -メソオキシヘミンの¹H-NMRシグナルの温度依存性を、Curieプロットの形で示した。

しろ よしつぐ、もりしま いさお、さの せいよう

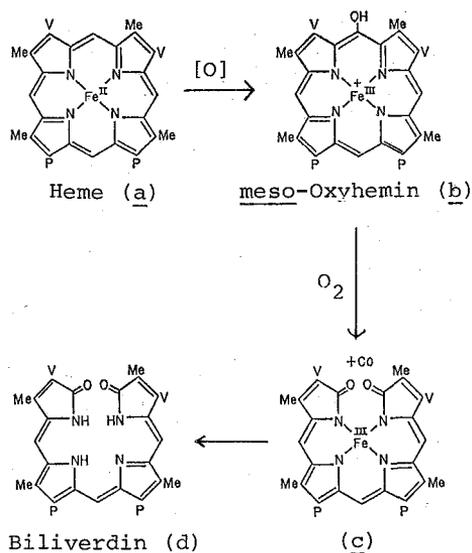


図1. ヘム代謝の反応経路

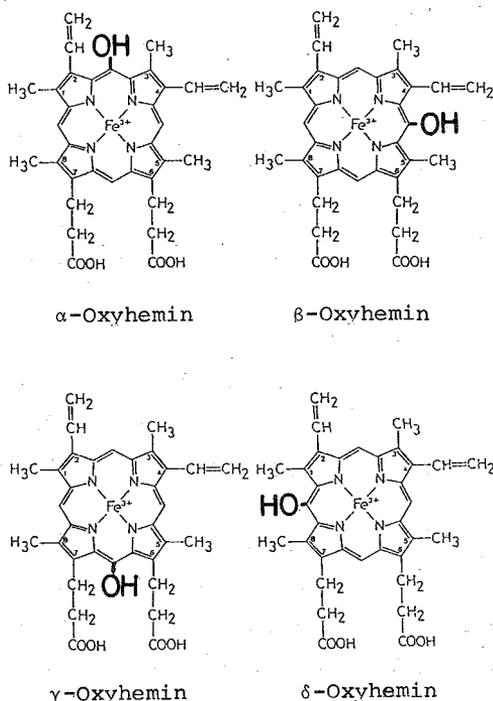


図2. メソオキシヘミン

メソ位のプロトンシグナルは、温度上昇に伴って低磁場ヘシフトしているが、その $1/T=0$ への外挿値はそれぞれ (X; 49 ppm, Y; 50 ppm, Z; 80 ppm) と反磁性領域から大きくはずれており、Curie 則に従っていない。メチル基及びビニル基プロトンシグナルに関しては直線関係さえ示さなかった。β、γ、δ-異性体においても同様の結果が得られた。

このメソオキシヘミンは室温から -40°C (NMR測定可能温度) においては、全くESRシグナルが観測されず、NMRの結果と一致した。しかし、これを徐々に -80 から -100°C 迄冷却すると、 $g = 2.24$ 、 $g = 1.83$ のESRシグナルが現われ初め、更に低温にすると同じ g 値のままシグナルの強度が増大した。図5に77Kにおける、そのESRスペクトルを示した。

＜考察＞

1. メソオキシヘミンの電子構造

メソオキシヘミンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (図3) は、いままで報告されている鉄1価から鉄4価までのすべての常磁性鉄-ポルフィリン錯体のものとは全く一致せず、むしろポルフィリン環が一電子酸化されたポルフィリンのπラジカルのスペクトルに類似であった。特に、メソプロトンシグナルのシフト位置は、先に我々が報告したRu-あるいはCo-ポルフィリンπカチオンラジカルのものと良く一致している。^{3,4} 以上の事から、メソオキシ

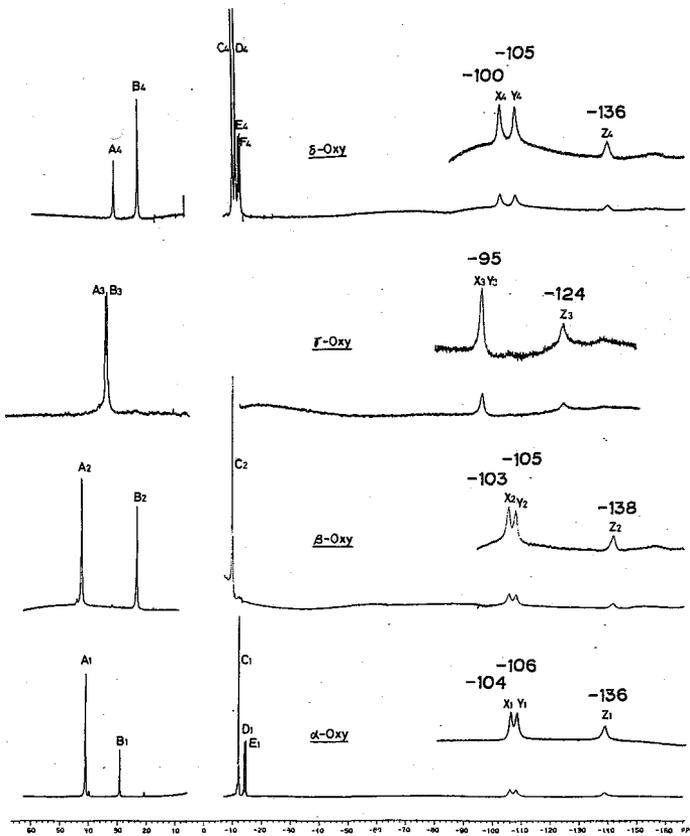
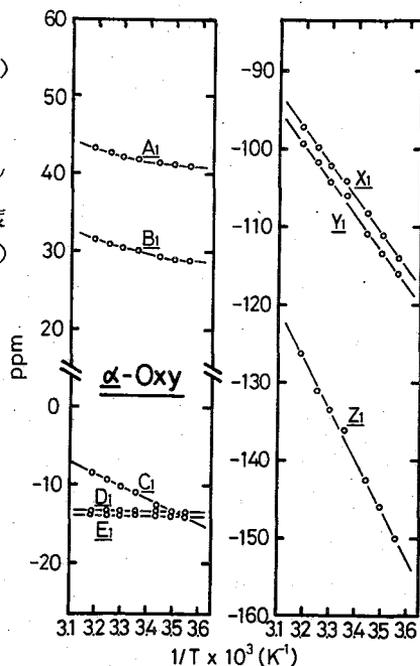


図3. メソオキシヘミンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (22°C)

図4. α-メソオキシヘミンのNMRシグナルの温度依存性 (Curie プロット)



ヘミンのプロトンの大きな常磁性シフトは、鉄の常磁性よりもむしろ、ポルフィリンラジカルの常磁性によるものと考えられた。実際、CND0/2 MO法によりメソオキシポルフィリンのスピンドensityを計算すると、HOMOである b_2 軌道では、メソ炭素上に大きなスピンドensityがある事が明らかになり(図6)、NMRの結果と良い一致を示した。以上の結果から、メソオキシヘミンの室温における電子状態は、ピリジン溶媒中でプロトン解離したエノレートアニオンから鉄へ電子分子内移動した、Fe(II)-ポルフィリン π 中性ラジカルであると示唆された(図7)。

これに対して、77 KのESRスペクトル($g = 2.24$, $g = 1.83$)は有機ラジカルによるものとは考えられず、むしろFe(I)-ポルフィリン錯体のものと全く同等である⁵。つまり、低温においては、ポルフィリン π ラジカルからさらに一電子分子内移動した、Fe(I)-ポルフィリンの電子構造をとっていると結論された。さらに、温度上昇に伴ってこのFe(I)-ポルフィリンに対応するESRシグナルが減少する結果とを併せて考えると、メソオキシヘミンはピリジン溶媒中、Fe(II)-ポルフィリン中性ラジカルとFe(I)-ポルフィリンの温度に依存した平衡状態にある事が明らかにされた(図7)。

2. ポルフィリン中性ラジカルの電子スピン緩和

室温において、メソオキシヘミンの中性ラジカルのESRシグナルが観測されず、かわって非常にシャープなH-NMRシグナルが観測されたことは、このラジカルの電子スピンの緩和が何らかの要因で非常に促進されている事を示している。さらに、NMRシグナルがCurie則に従わない結果を考慮すると(図4)、これらの実験事実は、ある2種類の電子状態間に平衡が存在し、その平衡間の電子交換が電子スピン緩和を促進している事を示していると考えられる。このような平衡として、Fe(II)-ポルフィリン π 中性ラジカルとFe(I)-ポルフィリンとの平衡が考えられるが、ESRの結果はNMR測定温度においてはFe(I)-ポルフィリンの割合は全くないことを示しており、この平衡と電子スピン緩和との関連はほとんど無視できると思われる。一方、我々は先に、ポルフィリン π

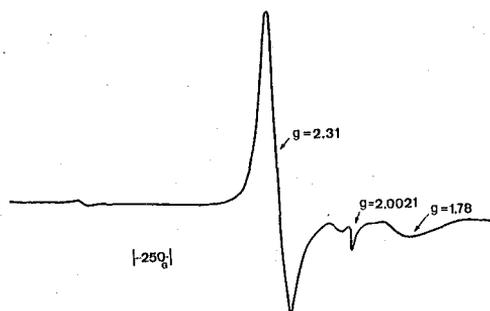
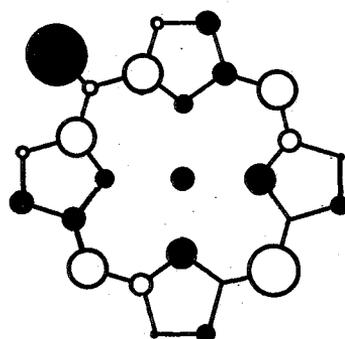
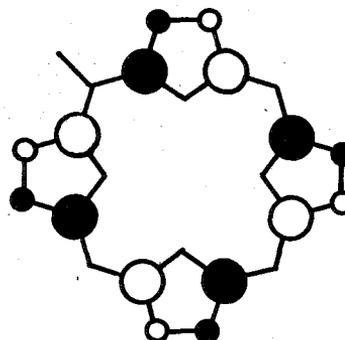


図5. メソオキシヘミンのESRスペクトル (77 K)



b_2 (HOMO)



a_2 (next HOMO)

図6. メソオキシヘミンのスピンドensity分布

カチオンラジカルにおいて、縮退しているか、あるいは非常に近いエネルギー準位にあるポルフィリンの2つのHOMO (a_{1u} と a_{2u})が温度に依存して混ざり合う可能性がある事を指摘してきた。⁴ 今回のメソオキシヘミンの場合にも同様に、HOMOである b_2 軌道に非常に近いエネルギー準位に、 a_2 軌道が存在する事が明らかになっている(図6)。以上の事から、メソオキシヘミンの π 中性ラジカルも、HOMOの b_2 軌道から一電子抜けた 2B_2 状態に 2A_2 状態が温度に依存して混ざり合い、その結果NMRスペクトルが異常な温度依存性(図4)を示したと結論できた。さらに、縮退したHOMOを持つ π ラジカルのESRシグナルの超微細結合が温度依存性を示す例を⁶考慮すると、ポルフィリン π 中性ラジカルの2つのHOMO間の電子交換が、ラジカルの電子スピンの緩和に影響をおよぼしているものと考えられた。

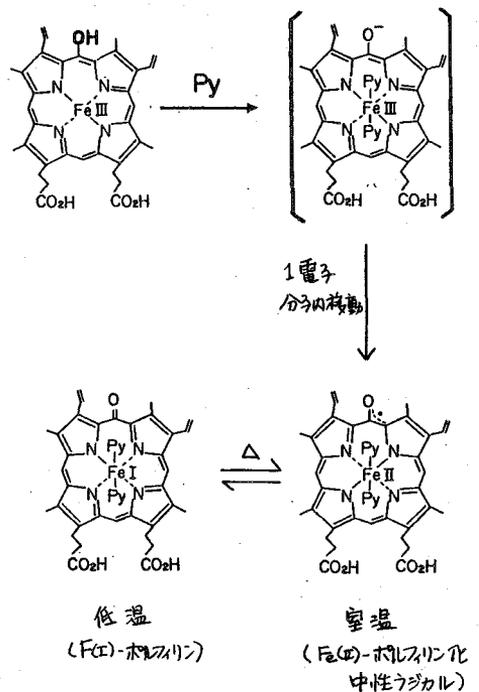


図7. メソオキシヘミンの電子構造

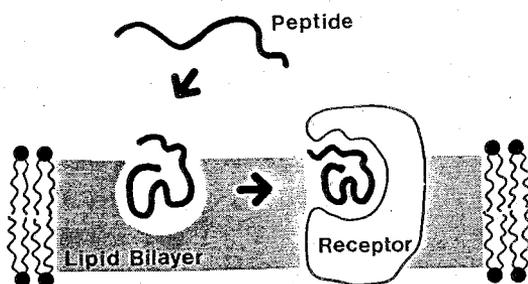
文献

1. Sano, S.; Sano, T.; Morishima, I.; Shiro, Y.; Maeda, U. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. in Press.
2. Jackson, A. H. in "Iron in Biochemistry and Medicine" (1974) pp.145-182, Academic Press, New York.
3. Morishima, I.; Shiro, Y.; Takamuki, Y. J. Am. Chem. Soc. (1983) 105, 6168-6170.
4. Morishima, I.; Takamuki, Y.; Shiro, Y. ibid, (1984) 106, 7666-7672.
5. Cohen, I. A.; Ostfeld, D.; Lichtenstein, B. ibid, (1972) 94, 4522-4525.
6. "Radical Ions" (Kaiser, E. T.; Kevan, L. eds.) (1968) John Wiley & Sons, New York.

(東大理) 宮澤辰雄

1. 生理活性ペプチドの活性コンホメーション (TRNOEによる解析)

ペプチドホルモンは、産生細胞で微量に合成され、標的細胞にたいして、特異的な強い作用を及ぼすものである。イーストの α 接合因子(MF) [Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr]は、 α タイプの細胞から産生され、 α タイプの細胞のDNA複製を阻害する。水溶液においては、活性のあるMFも不活性のアナログも円二色性(CD)スペクトルはほとんど同じであるが、リン脂質のリポソームに結合させると、不活性のアナログペプチドのCDはMFのCDとは異なる¹⁾。このように、MFなどの生理活性ペプチドは、水溶液ではいわゆるランダムコイル構造であるが、標的細胞の膜に達し、リン脂質膜と相互作用して、特定のコンホメーションになって膜内にはいる(膜内を移動してレセプターに結合する)というスキームが確かになってきた。したがって、生理活性ペプチドの活性コンホメーションを調べるためには、リン脂質膜に結合しているときのコンホメーションを解析することが重要である。



リン脂質膜に結合したペプチドのコンホメーションを解析するとき、リン脂質自身による共鳴シグナルはきわめて強いので、水素をすべて重水素に置きかえたリン脂質を調製して、そのリポソームにペプチドを結合させればよい。ただし、リポソームに結合した状態のペプチドは運動性が低いために、プロトンシグナルは幅が広くて観測できない。しかし実験条件を適当に設定して、TRNOEの実験を行なうことにより、リン脂質のリポソームに結合したペプチドのコンホメーションを明らかにできる。²⁾ TRNOEの解析により、MFのアミノ末端側はヘリックス構造をとって膜に埋もれているのにたいし、カルボキシル末端部分は、膜から遊離していることが分った。同じようなTRNOEは、活性のあるアナログ(Trp¹-Gln¹⁰)でも観測できたが、2位に^DHisのある不活性のアナログでは、TRNOEのパターンがまったく異なっていた(若松馨ほか)。このようにして、生理活性ペプチドの活性は、リン脂質膜に結合しているときのコンホメーションに関連していることが、TRNOEの実験でも確かめられた。

2. 酵素へのインヒビターの結合 (NOEによる解析)

NOEの方法は、酵素へ結合しているインヒビター(低分子)の構造を解析するのに有効である。たとえば、リボヌクレアーゼ T₁ に 2'GMP あるいは 3'GMP を結合させると、H1プロトンとH8プロトンの間にNOEが現れるのシン型構造であることが分かり、これにたいし、3',5'-GDPでは、H1とH8との間のNOEは現れないので、アンチ型とし

てリボヌクレアーゼ T_1 に結合することが明らかである。基質アナログとして、グアニリル (3'→5')ウリジンの2位のOHをFに置換した誘導体(池原研究室で合成)をリボヌクレアーゼ T_1 に結合させたところ、シン型の構造になっていることが明らかになった。これらのNOEの解析によって、リボヌクレアーゼ T_1 にはグアニン塩基と3'リン酸の結合部位はあるが、5'リン酸の結合部位はないことが分かった。³⁾

3. 乳酸脱水素酵素のアロステリック効果 (TRNOEによる解析)

高度好熱菌の乳酸脱水素酵素は、分子量12万のテトラマーであって、FBP(フルクトース-1,6-リン酸)で活性化されるアロステリック酵素である(これにたいし脊椎動物の乳酸脱水素酵素はアロステリックでない)。FBPの存在下および非存在下で、高度好熱菌の酵素に結合したNAD⁺のコンホメーションは、TRNOEで解析できる(ニコチンアミド部分のH4とH5の距離およびH5とH6の距離(0.246 nm)が基準になる)。FBPが酵素に結合すると、NAD⁺のアデノシン部分のリボース環は、C2'-endoからC3'-endo形に変わる。この高度好熱菌のアデノシン部分のC3'-endo形は、脊椎動物の酵素に結合したNAD⁺の場合と同様になる。しかし、高度好熱菌の酵素に結合しているNAD⁺のアデニン—リボース結合のアンチ型構造は、FBPが結合しても、変わらない。これにたいし、ニコチンアミド—リボース結合のシン型構造は、FBPが結合すると、アンチ型に変わる。このように、高度好熱菌の乳酸脱水素酵素に結合したNAD⁺のコンホメーション変化は、FBPによるアロステリック制御に関与している。⁴⁾

4. 酵素とタンパク性インヒビターの結合 (ダブルラベル法による解析)

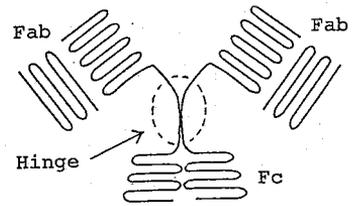
酵素のインヒビターがタンパク質であると、インヒビターの共鳴シグナルは酵素タンパク質の共鳴シグナルと重なりあい、NOEの実験で結合の様式を調べることができない。しかし、タンパク性インヒビターの分子内の特定の位置を¹³Cでラベルし、¹³C-NMRを解析すれば、その特定の部分の構造などについては詳細な知見が得られる。微生物に由来するタンパク質は、¹³Cラベルを含む培地で培養することにより、特定の位置をラベルできる。SSI(subtilisinインヒビター)は、Met⁷³-Val⁷⁴の部分で subtilisin に結合する。甲斐荘正恒博士らは、SSIのMet残基のカルボニル炭素を¹³Cラベルして¹³C-NMRを測定し、3個のMet残基の共鳴シグナル(シングレット)を観測し、さらに、Val残基のアミド窒素を¹⁴NラベルしたSSIを調製した。このダブルラベルしたSSIについて、Met⁷³の¹³Cシグナル(ダブルット)を確定した。⁵⁾

ダブルラベルしたSSIのMet⁷³残基の¹³Cシグナル(ダブルット)のスピ結合定数により、Met⁷³-Val⁷⁴のペプチド結合の状態を調べることができる。このインヒビターが subtilisin と Michaelis complex を形成しても、スピ結合定数はほとんど変わらないが、Tetrahedral intermediateへ移行すると結合定数は小さくなる。このスピ結合定数の測定により、コンプレックスはMichaelis型のままであることが分かった。⁶⁾

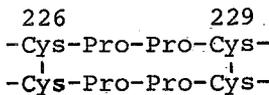
5. 免疫グロブリンのヒンジ領域の動的構造

免疫グロブリン(IgG)は、分子量が16万の糖タンパク質であり、脊椎動物において、細菌などの異物を認識して排除するために、巧妙にデザインされたタンパク質である。IgGをおだやかにプロテアーゼで限定分解すると、フラグメントに分けることができる。抗原に結合する部位はF_{ab}フラグメントにある。IgGが、2つのF_{ab}部分で異物の細胞表面にとりつくと、F_c部分で補体の第一成分を活性化し、ひき続いて、9つの成分よりな

る補体系をカスケード的に活性化して、異物の細胞をこわす。免疫グロブリンIgGのX線解析は Davies 博士らにより行なわれ、免疫グロブリンの分子のイメージが具体的に明らかになった。ただし、その免疫グロブリンは、Dob という mutant であり、ヒンジの部分を欠いていて、補体系を活性化する能力を失ったものであった。その後、ヒンジ部分のある免疫グロブリンの結晶解析が Huber 博士らにより報告されたが、Fc 部分は電子密度が低く、構造が不明である。この Fc 部分には、補体系の第一成分と相互作用する部分があって、その構造解析は、免疫グロブリンの機能を分子レベルで解明するための基礎として必須である。



そこで、ヒンジのある免疫グロブリンについて、水溶液でプロトンNMRの解析を行なうことが重要であり、荒田洋治博士らがこの課題にとりくんでいる。分子量が16万の大きいタンパク質であるが、それでも、重水溶液のプロトンNMRスペクトルにはいくつかのシャープなシグナルが現れる。タンパク質の主鎖の α プロトンを照射すると、スピン拡散(赤坂一之博士)のため、分子内の堅い部分にあるプロトンのシグナルは消えて、軟かい部分にあるプロトンによるシャープなシグナルが残る。これにたいして、ヒンジのない Dob では、シャープなシグナルは認められないので、正常な免疫グロブリンに現れるシャープなシグナルはヒンジ部分のプロトンによるものである。これは、免疫グロブリンの分子において、ヒンジ部分の運動性の高いことを示している。⁷⁾ ヒンジの中央部には、特異



なコア配列があり(左側の構造式)、この小さいコア部分が実は、16万もの大きい免疫グロブリン分子の機能にとって重要である(コアのシスチン架橋を還元しカルボキシメチル化すると補体系を活性化する機能を失う)。

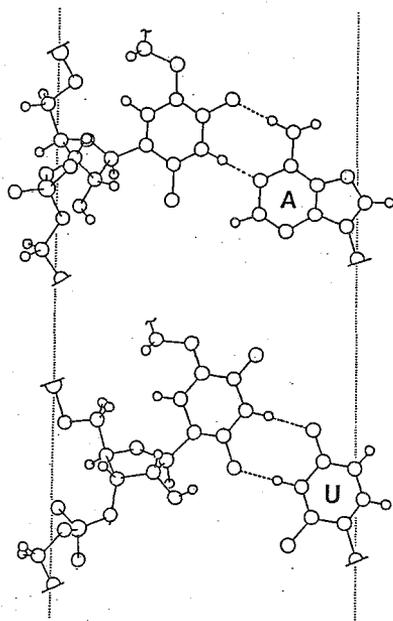
そこで荒田博士らは、トリプシンとパバインでヒンジ部分を分離調製してプロトンNMRを解析し、Cys²²⁶の周辺は変形しにくいのにたいし、Cys²²⁹残基はフレキシブルであることを見いだした。⁸⁾ このようなコアの動的構造が、Fab部分およびFc部分の相対的配置にどのように関わるかを明らかにすることは、分子構造レベルで補体系活性化のメカニズムを調べるうえで重要である。

6. 転移リボ核酸の転写後修飾

転移リボ核酸(tRNA)のアンチコドン1字目のヌクレオシドは、mRNAのコドンの3字目のヌクレオシドと、ワトソン・クリック型の塩基対および他の型の塩基対を形成する。アンチコドン1字目にあるウリジン残基には、2つのタイプの修飾ウリジンが知られていた。そのひとつは、ウリジンの5の位置にメトキシなどが置換したもの(xo⁵U)であり、もうひとつは、5の位置にメチルアミノメチルなどが置換しているうえに、2の位置がチオカルボニルになっているもの(xm⁵s²U)である。xo⁵UをもつtRNA(Val, Ala, Thrに特異的)は、コドン3字目として、AとGのみでなくUをも認識する(西村暹博士ほか)のにたいし、xm⁵s²UをもつtRNA(Gln, Lys, Gluに特異的)はコドンの3字目として主としてAを認識する(関屋剛男博士)。このようなウリジンの修飾により、どのようにして、コドン認識のパターンが2とおりに切りかえられるのであろうか?

さきに横山茂之博士らは、ランタニドイオンをプローブとする構造解析法を開発して、ウリジンヌクレオチドのコンホメーションの特性を解析した。⁹⁾ その結果、リボース環が

C2'-endo形をとると、C3'-O3'結合のまわりで、 G^- よりは G^+ 形になりやすく、C3'-endo形をとると G^- 形になることが明らかになった。さらにリボース環のプロトンのスピン結合定数（および温度依存性）より、ウリジンを xo^5U に修飾すると、C2'-endo形が安定になるが、 xm^5s^2U に修飾すると、まったく対照的に、C3'-endo形が安定になることが分かった。このようなコンホメーション特性の差異により、アンチコドンの部分の動的構造が制御される。すなわち、アンチコドン1字目のウリジン残基を xm^5s^2U に修飾すると、この部位に固有のC3'-endo- G^- をますます安定にし、コドンの3字目としてAのみを認識する（コドンの正しい翻訳に寄与）。これにたいし、ウリジン残基を xo^5U に修飾すると、アンチコドンの1字目において、C2'-endo- G^+ も安定にする。その結果、ウラシル塩基はmRNAのほうに移動し、コドンの3字目のUと水素結合を形成する。そこで、 xo^5U をもつtRNAは3種のコドンを認識する（コドンの効率よい翻訳に寄与）。¹⁰⁾



最近、横山博士らは、マイナーのtRNA^{Leu}（大腸菌）のアンチコドン1字目に、5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチルウリジンを見いだした〔日本生化学会大会で発表（1985）〕。微量の新しい修飾ヌクレオシド（10ナノモル程度）の化学構造の決定に、プロトンNMRの方法が威力を発揮したのは、感度が高くなったためである。

8. おわりに

この十数年の間に、NMRの測定技術とデータ処理法は格段に進歩した。特に、NMRの測定感度が向上したのが重要である。新しい発想で生化学の課題をとりあげ、それについて生化学の手法による実験を進めつつ、それとよく対応をつけて、NMRなどの分子分光法を活用することにより、生化学の分野に新たな展開をもたらし得ると期待できる。

- 文献 1) T. Higashijima, K. Fujimura, Y. Masui, S. Sakakibara & T. Miyazawa, *FEBS Lett.*, **159**, 229 (1983). 2) K. Wakamatsu, T. Higashijima, M. Fujino, T. Nakajima & T. Miyazawa, *FEBS Lett.*, **162**, 123 (1983). 3) F. Inagaki, I. Shimada & T. Miyazawa, *Biochemistry*, **24**, 1013 (1985). 4) M. Machida, S. Yokoyama, H. Matsuzawa, T. Miyazawa & T. Ohta, *J. Biol. Chem.* (in press). 5) M. Kainosho & T. Tsuji, *Biochemistry*, **21**, 6273 (1982). 6) T. Tsuji, Dissertation, University of Tokyo (1983). 7) S. Endo & Y. Arata, *Biochemistry*, **24**, 1561 (1985). 8) W. Ito & Y. Arata, *Biochemistry* (in press). 9) S. Yokoyama, F. Inagaki & T. Miyazawa, *Biochemistry*, **20**, 2981 (1981). 10) S. Yokoyama, T. Watanabe, K. Muraio, H. Ishikura, Z. Yamaizumi, S. Nishimura & T. Miyazawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 4905 (1985).

第 2 日

11 月 7 日 (木)

B 会場

(電線研) ○亀井 裕孟, 片山 義朗

1. はじめに

NMRイメージングは臨床医学の分野で既に実用化段階に入っている。NMRイメージングのもつ多くの特徴を考慮すると、単に医学分野での利用だけでなく、広く不均一系の物性研究の分野で、有用な研究手段となると考えられる[1]。このような観点から、演者らは既に「NMR顕微鏡」を開発した[2]。今回は、固体試料について、NMRイメージングを試みたのでその結果について報告する。

2. 分解能と線形磁場勾配

NMR画像の分解能は共鳴線幅 $\Delta\nu$ 、線形磁場勾配の大きさ G 、データポイント数 N 、投影スペクトルの数 n などに依存する。投影スペクトルにおける空間分解能 ρ_H は、 N が十分であれば

$$\rho_H \sim 2\pi\Delta\nu / \gamma G \quad (1)$$

となる。 ρ_H は長さの単位で表される。できるだけ高い分解能を得るためには、線形磁場勾配を大きくすればよいことになる。

共鳴線幅は試料本来の線幅と静磁場の不均一性などによって決まるが、高分解能スペクトロメータの磁石を用い、固体試料を測定対象とした場合には、静磁場の不均一性は殆んど考慮しないでよからう。

十分に大きな G を加えた場合には、投影スペクトル数の寄与が主になる。測定しようとする試料部位の最大径を D とすると、このときの分解能 ρ_S は、

$$\rho_S \sim D / n \quad (2)$$

で与えられ、高い分解能を得るには n を大きくする必要がある。

NMRは検出感度の最も低い分光法の1つである。測定時間はできるだけ短いほうが望ましいという点を考慮すると、分解能は検出感度によって決められる。このときの分解能 ρ_t は

$$\rho_t \sim A [\psi^{1/3} a^{1/3} (T_1 / T_2^*) \nu^{-2/12} t^{-1/6}] \quad (3)$$

で与えられる。ここで、 A は測定条件などで決まる定数、 ψ は S/N 、 a は試料の半径、 ν は観測周波数、 t は測定時間である。最終的な分解能は ρ_t で決まるとみてよい。

不均一系試料では、当然、磁化率にも空間的分布ができていいる。磁化率の分布が分解能に与える影響をみてみよう。体積磁化率 χ_a の物質が、半径 a の円柱状に存在し、その周囲を体積磁化率 χ_b の物質が、平均半径 r で同心円柱状に取り囲んでいるとき、体積磁化率によるシフト $\delta B_0 / B_0$ は

$$\delta B_0 / B_0 = 4\pi(\chi_a - \chi_b) a^2 / r^2 \quad (4)$$

となる。有機系試料では、多くの場合、 $\chi_a - \chi_b$ は 10^{-7} のオーダーと考えられ、

かめい ひろたけ, かたやま よしろう

$a/r = 0.1$ の場合でも $\delta B_0 / B_0$ は 10^{-8} 程度で、静磁場の不均一性と同程度となるので、特殊な場合、例えば、小さなシフト量を問題にする化学シフトイメージングなどの場合を除いて殆んど考慮しなくてもよいことになる。

3. 装置

母体となる装置としては、日本電子製 GX-270 型スペクトロメーターを使用し、それにイメージングシステムを結合している。装置のブロック図を図 1 に示す。

線形磁場勾配発生コイル

GX-270 型スペクトロメーターの電流シムをそのまま用いたとき、発生できる線形磁場勾配の最大値は 1.84 mT/m 、また、太い銅線を用いて巻き直したときの磁場勾配の最大値は 25 mT/m であった。固体試料について、十分な空間分解能を得るためには、この磁場勾配の大きさでは不十分である。そこで、小

さな電力消費量で、大きな磁場勾配の発生できるコイルを開発した。x および y 軸磁場勾配 (G_{xy}) コイルは断面が扇紙面型の 4 個のソレノイドコイルで構成されている。概念図を図 2 に示す。 G_{xy} コイルは高周波コイルを取り囲むかたちでセットされている。図 3

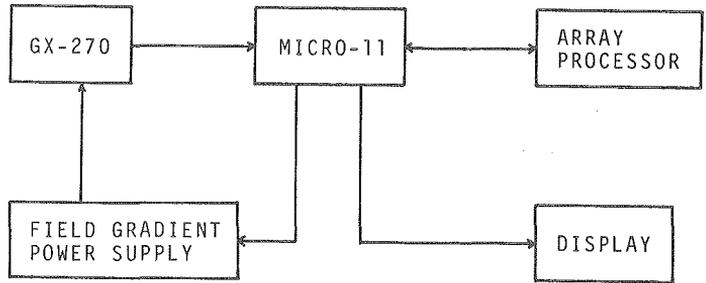


図 1. NMR イメージング装置のブロック図。

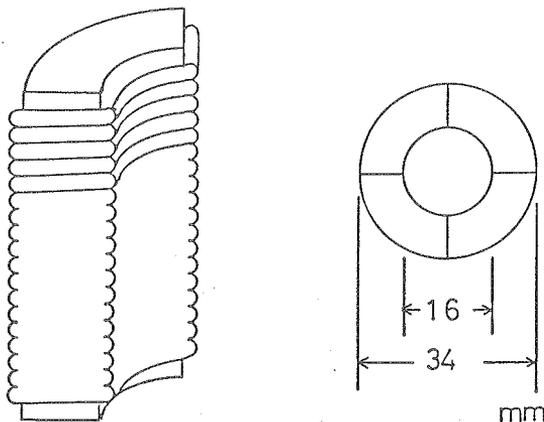


図 2. 線形磁場勾配コイル概念図。

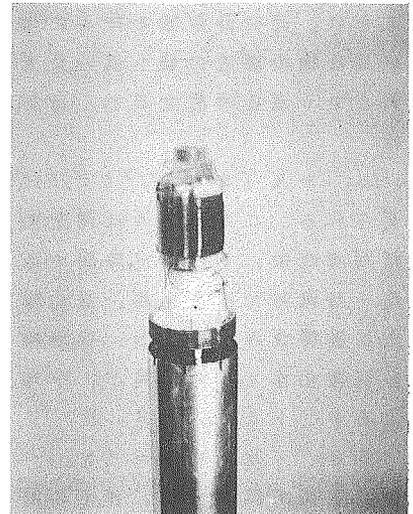


図 3. 線形磁場勾配コイル。

にプローブ頭部の写真を示す。G_{xy} コイルは通風によって冷却され、大きな磁場勾配発生時の過熱を防いでいる。直径3.7mmの円柱水について得られた投影スペクトルを図4に示す。このときのG_{xy} は67mT/mである。安全に得られる最大磁場勾配は112mT/mであり、比較的動き易いプロトンをもつ高分子材料のイメージングには十分な値である。この磁場勾配コイルは、容易に大きな磁場勾配が発生できるとともに、パルス磁場勾配の応答速度も速い利点がある。

4. 結果

試料として、石英光ファイバを用いた。投影スペクトルを図5に示す。積算回数は16回である。32方向の投影スペクトルから、フィルタ逆投影法によって再構成した画像を図6に示す。中央の黒い部分が石英ファイバ、その周囲の明るい部分が保護プラスチック層、さらにその外側の暗い部分が編組ガラス繊維、最外部の明るい部分が塩化ビニル被覆である。

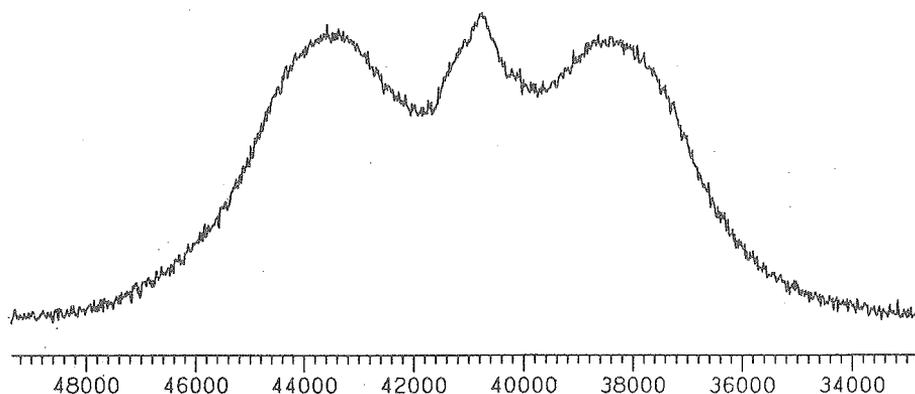


図4. 光ファイバの投影スペクトル。

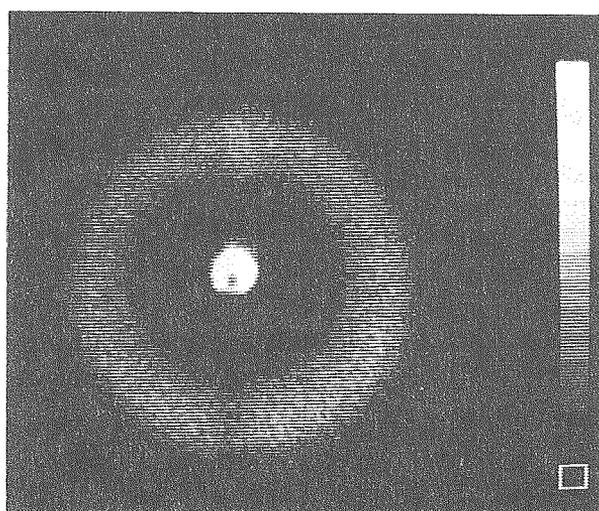


図5. 光ファイバのプロトン像。

5. おわりに

固体試料のNMRイメージングを試みた。通常のNMRイメージング法でも、比較的動き易いプロトンであれば、固体試料でもNMRイメージングが容易であることが明らかとなった。しかし、不均一系材料の内部診断という立場からは、さらに動きにくいプロトンのイメージングが必要である。

文献

- [1] 亀井裕孟：日本物理学会誌，39 (1984) 439.
- [2] H.Kamei and Y.Katayama: Med. Bio. Eng. Comput., 23 (1985) S805.

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
 - スペクトル帯域の拡大 -

日立中研 ○松井 茂, 関原謙介, 小野寺尚, 塩野英己, 河野秀樹

< 序 >

"NMR Spectroscopic Imaging (Chemical Shift Imaging と呼ばれる)" あるいは "Spatially Resolved NMR Spectroscopy" は生体系等の空間的に不均一な系の NMR による研究において有力な手段となりつつある。(1, 2) しかしながら, このような測定は一般に多次元 (3次元空間, 1次元スペクトル) となるため測定時間が長大となってしまう。この問題解決の一策として, 我々は前回, 磁場勾配の周期的な反転により生ずるマルチプルエコーライン信号を用いることにより, 多次元 FT 測定 (3) の測定次元を 1次元だけ減らすことが可能であることを示した。(4, 5) しかし, この方法においては測定時間が飛躍的に短縮する反面, 得られた局所スペクトルの帯域が磁場勾配反転周期の逆数により限定されてしまうという demerit が存在する。一般に, 磁場勾配の Switching rate は 0.1~1 ms 程度であり, 更に反転周期はこの Switching rate より十分長い必要がある。したがって 1 kHz 以上のスペクトル帯域を得るのは実際上困難となる。このことは本方法を高磁場で種々の核種に適用する上で大きな障害となる。

このスペクトル帯域の問題に対し, 拙々は 2つの帯域拡大法を考案し, 実験を行ったのでその結果を報告する。

< スペクトル帯域拡大法 >

図1は本方法で得られるエコーライン信号からスペクトル情報と1次元空間情報(X)を抽出するための echo rearrangement を示したものである。奇数番目と偶数番目のエコーを各々分離して再配列し, 2 sets の 2次元 echo array をつくる。ここで新たに2つの時間軸 t_s , t_x を図のように定義する。 t_s 軸方向では磁場勾配 G_x の信号に対する効果は quench しているため, t_s 軸に関するフーリエ変換はスペクトル情報を与える。一方, t_x 軸方向では, 信号の時間変化 (echo shape) が磁場勾配 G_x の効果により変配されているため, この方向のフーリエ変換は良し近似で空間情報 X を与える。

図1からわかるように, t_s 軸方向の信号の minimum sampling interval は磁場勾配の反転周期 4τ で限定され, その結果スペクトル帯域は 4τ の逆数となる。

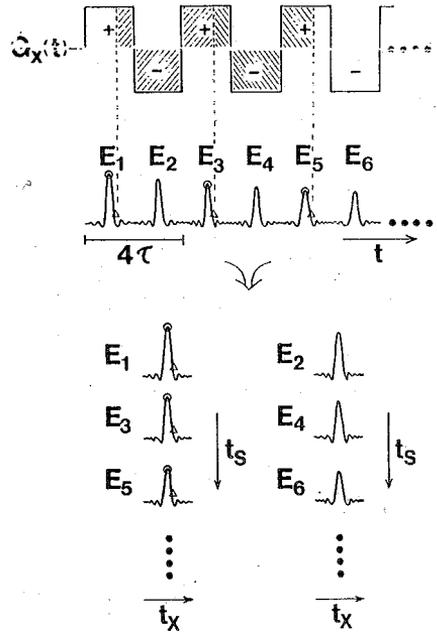


図1. スペクトル情報 (t_s) と空間情報 (t_x) 抽出のための echo rearrangement

まっしげる, セミはらけんすけ, おうぞらたかし, しおひでみ, こうのひでみ

帯域拡大のオシのアプローチは、正の強度に対して n_g 倍だけ大きい負の強度を持つ磁場勾配を周期反転に用いることである。この場合、エコートレイン信号誘起のため、負の磁場勾配印加時間は $1/n_g$ に短縮される。この結果、周期は $(n_g+1)2\tau/n_g$ に短縮され、スペクトル帯域が $2n_g/(n_g+1)$ 倍だけ拡大される。図2は、この実験に必要な磁場勾配 G_x の反転シーケンスを示したものである。奇数番目のエコーを用いれば、空間分解能、視野等のイメージング特性を変えずにスペクトル帯域を拡大できる。この際、偶数番目のエコーは磁場勾配の transient effect の影響をより強く受けるため、データとしては用いない。

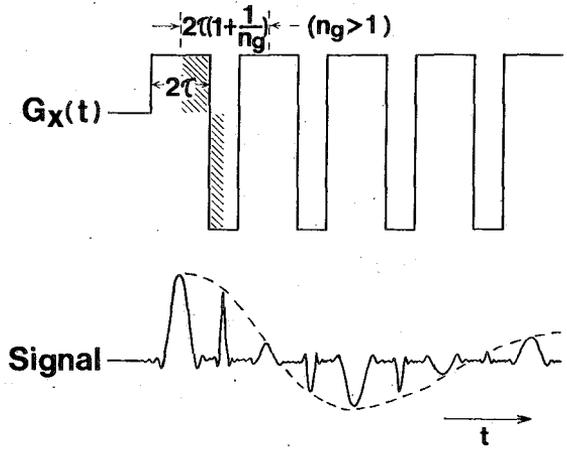


図2. 非等強度をもつ磁場勾配の周期反転

上記の帯域拡大法では2倍拡大が最高であり、一般的な応用には不十分である。したがって、我々はオシの一般的な帯域拡大法を考案した。(6) オシの方法では多数の "delayed echo trains" と測定されることを combine する。この方法では反転周期の短縮は必要でない。図1の奇数番目のエコーに注目してオシの方法を述べる。(偶数番目のエコーに対しても同論適用可能である) 図1から次のことを

言う。すなわちエコートレインは各 echo shape の中に空間情報を保持しながら、時刻

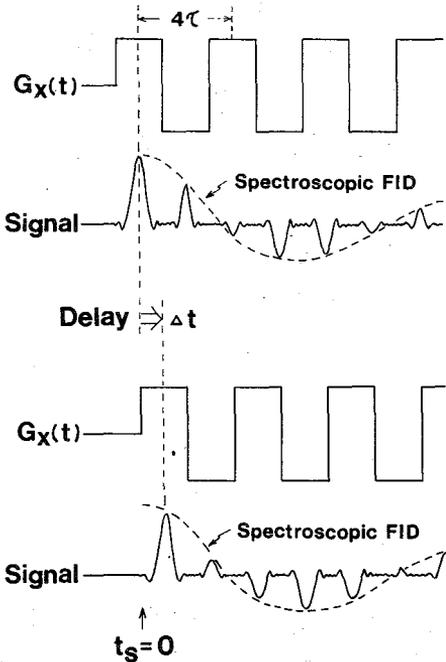


図3. 磁場勾配反転シーケンスの delayed application.

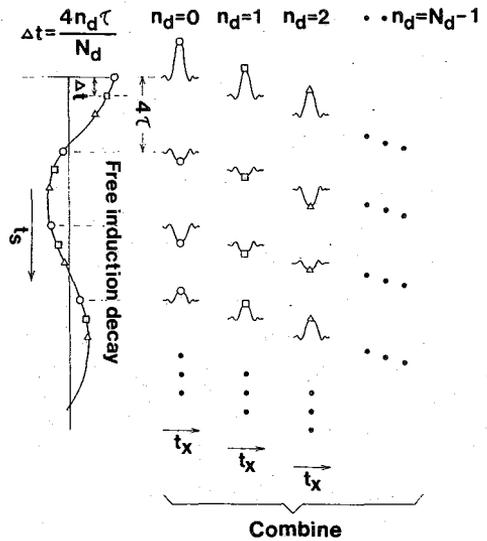


図4. Delayed echo trains から得られる echo array データの combination.

$t_s = 4n\tau$ ($n=0, 1, 2, \dots$) における spectroscopic FID を表わしている。したがって、磁場勾配の反転シーケンスを図3に示すように Δt だけ delay をせば、上では得られなかった時刻 $t_s = 4n\tau + \Delta t$ における spectroscopic FID を表わす "delayed echo train" が得られる。 t_x 軸に関する情報はこのような delay τ より影響を受けないので、複数の delayed echo arrays は combine することができ、この際 combine した echo array のフーリエ変換のため、delay time は $\Delta t = 4n_d\tau / N_d$ ($n_d = 0, 1, 2, \dots, N_d - 1$) のように選ぶ必要がある。これによりスペクトル帯域を任意の整数 N_d 倍に拡大することができ、

Delayed echo trains から得られる echo arrays は、図4に示すように combine される。 N_d sets の echo arrays は t_s 軸の時間に従って combine される。このようなオ2の方法は Mansfield (7) により理論的に述べられた、磁場勾配の反転シーケンスの位相を逆転させた測定を併用する splicing technique の一般化とみなすことができる。

オ1の方法に比べオ2の方法は、反転周期を短縮することなく原理的に何倍にでも帯域を拡大できる。しかしながら、全測定時間は拡大率に比例して増大する。このことは本測定法の最も重要な特徴である "高速測定" を犠牲にしてしまう。したがって、実際の測定においては、実験に必要なスペクトル帯域を最低限カバーできるようにオ1とオ2の方法を併用することが得策である。

< 実験 >

図5に示すようなアセトン(A)とベンゼン(B)から成る2次元テストサンプルを用いて実験を行った。実験条件は前回と同様(4-6)、プロトンに対して共鳴周波数 21.28 MHz で行った。測定パルスシーケンスも前回と同様であり、磁場勾配 $G_x = 6.8 \text{ mT/m}$ を32回反転し、 $G_y = 6.8 \text{ mT/m}$ を32回の phase encoding に用いた。磁場勾配の反転周期は $4\tau = 4.992 \text{ ms}$ 、信号の sampling rate は $78 \mu\text{s}$ 、視野は $44 \times 44 \text{ mm}$ 、スペクトル帯域 9.4 ppm (拡大なしの場合) とした。ただしオ1の帯域拡大法においては $n_g = 2$ とならう、別の磁場勾配 13.6 mT/m とし43回の磁場勾配反転を行った。オ2の方法においては $N_d = 4$ までの実験を行った。

< 結果 >

オ1の方法により $n_g = 2$ とし得られた結果を図6に示す。図5のテストサンプルの4ヶ所における局所スペクトルが表わされている。合計43個のエコーのうち、21個の奇数番目のエコーを用いてデータ処理を行った。帯域拡大なしの場合(a)に比べ、ほぼ理想的に帯域拡大(4/3倍)を行うことができた。

オ2の方法により $N_d = 2$, $N_d = 4$ とし得られた結果を図7に示す。同じく帯域拡大なしの場合(a)に比べて、ほぼ理想的に2倍(b)、4倍(c)の帯域拡大を行うことができた。

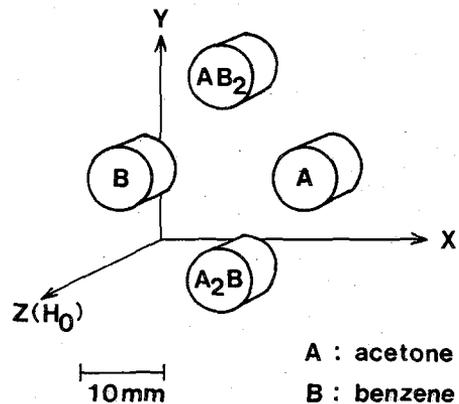


図5. 2次元テストサンプル

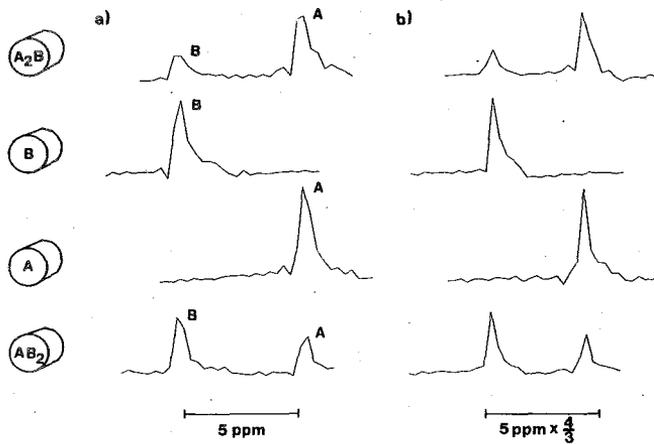


図6. 非等強度磁場勾配 ($N_g=2$) によるスペクトル帯域の拡大.

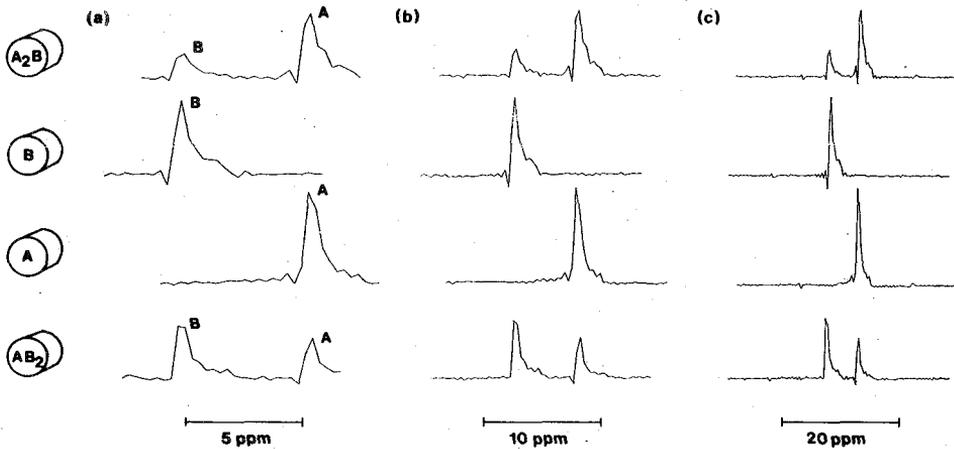


図7. Delayed echo trains によるスペクトル帯域の拡大
 $N_d=2$ (b), $N_d=4$ (c).

REFERENCES

1. I. L. Pykett and B. R. Rosen, *Radiology* **149**, 197 (1983).
2. A. A. Maudsley, S. K. Hilal, H. E. Simon, and S. Wittekoek, *Radiology* **153**, 745 (1984).
3. A. A. Maudsley, S. K. Hilal, W. H. Perman, and H. E. Simon, *J. Magn. Reson.* **51**, 147 (1983).
4. 松井茂, 関原謙介, 塩野英己, 河野孝樹, 第23回NMR討論会講演要旨集 P263 (1984).
5. S. Matsui, K. Sekihara, and H. Kohno, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 2817 (1985).
6. S. Matsui, K. Sekihara, and H. Kohno, *J. Magn. Reson.* **64**, 167 (1985).
7. P. Mansfield, *J. Phys. D* **16**, L235 (1983); *Magn. Reson. Med.* **1**, 370 (1984).

1. はじめに

NMRイメージングの高速化の手段として、近年、エコープレナ法¹⁾や、マルチエコートレインによる高速ケミカルシフトイメージング法²⁾が注目されつつある。これらの方法は、周期的に反転する磁場勾配を印加して、2次元情報を1次元情報に変換して測定することにより、高速イメージングを実現するものである。しかしながら、特に大型システムでは、磁場勾配発生系の応答特性のために、完全な矩形波状の反転磁場勾配を実現することは困難であり、このことが実用化への一つの障害となっていた。そこで、矩形波状の反転磁場勾配のかわりに、正弦波状、あるいは台形状に周期変化する磁場勾配を用いることが検討され、矩形波からのずれに伴う像劣化を補正するためのアルゴリズムがいくつか提案されている。これらのアルゴリズムでは、いずれの場合にも、磁場勾配の時間依存性に関する情報が必須である。そのため、実際の磁場勾配波形を実測する方法を確立することの必要性が指摘されてきた。磁場勾配の過渡応答の実測に関しては、微小な試料によるNMR信号の時間微分を用いる方法³⁾が示されているが、試料の配置に対する要請が厳しく、ノイズに敏感である等、実用上いくつかの問題点を含んでいる。

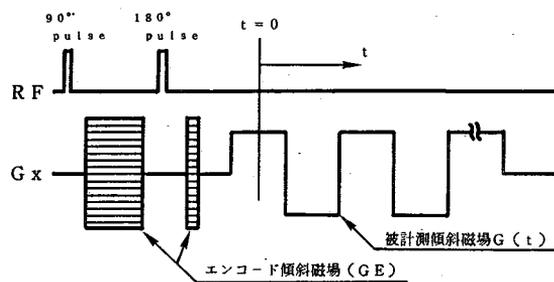
ここでは、磁場勾配の時間依存性の新しい計測法を提案し、その原理、及び計測結果について報告する。この方法によると、磁場勾配の時間積分波形が、容易に高精度で得られる。さらに、1次元高速ケミカルシフトイメージングにおいて、磁場勾配の実測結果を用いて、像再生を行った結果についても報告する。矩形波状、および正弦波状の磁場勾配に対して、Troppnerによって提案された像再生法⁴⁾を適用することにより、磁場勾配の時間依存性の実測値を用いて像再生を行うことの有効性が確認された。

2. 磁場勾配の時間依存性計測の原理

簡単のために1次元空間の場合について記述する。2次元、3次元への拡張は容易である。計測のためのパルスシーケンスを、図1に示す。本計測法では、計測したい磁場勾配に先立って同方向にエンコード磁場勾配GEを印加することにより、NMR信号に位相変化を導入する。エンコード磁場勾配の強度を順次変化させて一連の計

測を行うと、NMR信号の組として $S(n \Delta t, k \Delta G e)$ が得られる。ここで、 Δt はサンプリング間隔、 $\Delta G e$ は、エンコード磁場勾配の積分値の変化の単位量である。このとき、 $S(n \Delta t, k \Delta G e)$ は複素数として次式のように表現できる。

図1 磁場勾配の時間依存性の測定シーケンス



おの であ たかし、まつい しげる、せきはら けんすけ、しおの ひでみ、こうの ひでき

$$S(n\Delta t, k\Delta Ge) = \int_{x_1}^{x_2} \exp\{-i\gamma x(k\Delta Ge + f(n\Delta t))\} dx \quad (1)$$

ただし、
 x_1, x_2 : 均一な試料が分布する範囲の下限、上限
 γ : 核スピンの磁気回転比
 $f(t)$: 磁場勾配の時間積分関数

ここで、静磁場不均一性、横緩和の効果は無視した。式(1)の右辺の積分を実行すると次式を得る。

$$S(n\Delta t, k\Delta Ge) = (x_2 - x_1) \cdot \exp\{i\gamma(x_1 + x_2)/2 \cdot (k\Delta Ge + f(n\Delta t))\} \cdot \text{sinc}\{i\gamma(x_2 - x_1)/2 \cdot (k\Delta Ge + f(n\Delta t))\} \quad (2)$$

この式から、NMR信号 $S(n\Delta t, k\Delta Ge)$ は、

$$k\Delta Ge + f(n\Delta t) = 0 \quad (3)$$

のとき、位相因子を除いて最大となることがわかる。このことは、エンコード磁場勾配と被計測磁場勾配の積分値が等しくなるような時刻において、エコーピークが生ずることを意味している。この性質を利用して磁場勾配の時間積分関数 $f(n\Delta t)$ あるいは逆関数 $f^{-1}(k\Delta Ge)$ を決定できる。まず、 n を固定して考えると、式(2)のNMR信号 S の振幅は、 $k\Delta Ge$ に関する sinc 関数になる。この sinc 関数のピーク位置を $k_p\Delta Ge$ とすると、
 $f(n\Delta t) = -k_p\Delta Ge \quad (4)$
すなわち、 n を固定して、 k に関するピーク検出を行うことにより $f(t)$ を算出できる。また、 k を固定して、 n に関するピーク検出を行うことにより、同様にして、 $f^{-1}(k\Delta Ge)$ を算出できる。

以上述べたように、計測したい磁場勾配と同方向にエンコード磁場勾配を印加して計測を行えば、容易に、磁場勾配の時間積分関数 $f(n\Delta t)$ 、あるいはその逆関数 $f^{-1}(n\Delta t)$ を求めることがで

図2 計測されたNMR信号
(正弦波)

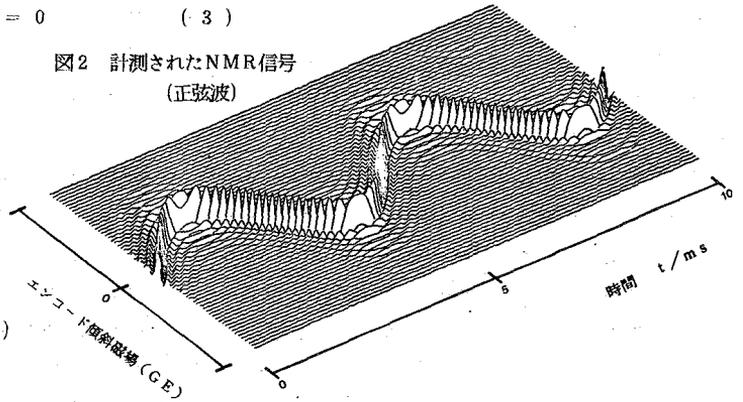
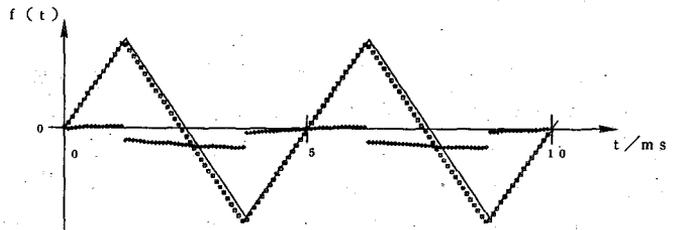
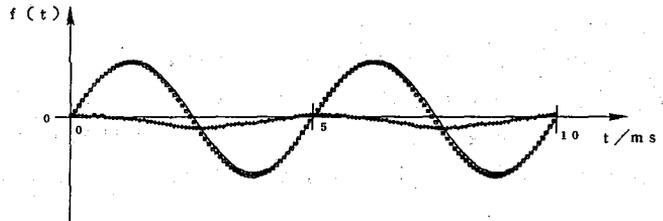


図3 磁場勾配の時間積分波形の実測結果

(a) 矩形波



(b) 正弦波



— 設定条件から算出した値
 実測結果
 差のプロット(2倍に拡大)
 $f(t)$: 傾斜磁場の積分波形

きる。 $f(n\Delta t)$ を微分すればもとの磁場勾配波形が得られるが、像劣化の補正の目的には、積分波形のみ知れば十分である。

3. 静磁場不均一性の効果の除去

実際の測定では、静磁場不均一性のために、観測されるNMR信号の波形に歪みが生ずる。この効果は、次のようにして除去できる。 $S(n\Delta t, k\Delta Ge)$ において各 $n\Delta t$ 毎に、 $k\Delta Ge$ に関する離散逆フーリエ変換を実行した結果を $U(n\Delta t, m\Delta x)$ とすると、これは、位置 $x = m\Delta x$ のまわりの微小体積からくるFID信号を与える。ここで、静磁場不均一性の大きさが、各微小体積内において一定値 $\Delta H_0(m\Delta x)$ とみなせる場合には、 $U(n\Delta t, m\Delta x)$ の各点に $\exp\{i\gamma\Delta H_0(m\Delta x) \cdot n\Delta t\}$ を乗ずることによって、不均一性の効果を除去できることがわかる。この結果を再び m に関して離散フーリエ変換すれば、式(1)に対応する結果が得られる。各位置における静磁場不均一性の大きさ $\Delta H_0(m\Delta x)$ は、他の計測により得ることができるので、この補正は容易に実行可能である。特に、磁場勾配の波形が周期的である場合には、周期性を利用して、 $U(n\Delta t, m\Delta x)$ から $\Delta H_0(m\Delta x)$ を決定できるので、別途計測を行う必要はない。

4. 実験の方法および結果

実験は、開口径300mmφ、静磁場強度0.5Tの超電導磁石を用いて行った。矩形波状、および、正弦波状の磁場勾配を、150mmφのくらし形コイルで生成し、前述の計測法により実測した。磁場勾配の周期は4.992msとし、最大強度は $68\mu\text{T}/\text{cm}$ とした。波形計測のための試料として、硫酸銅水溶液で満たした、長さ37mm、内径4mmの1次元円筒試料を用いた。エンコード磁場勾配の単位変化量 ΔGe は、 $5.30 \times 10^{-3}\mu\text{T} \cdot \text{sec}/\text{cm}$ とし、エンコード点数は64点とした。サンプリング間隔 Δt は、1周期あたりの測定点数が64点となるように、 $78.0\mu\text{s}$ に選んだ。

計測されたNMR信号の例として正弦波に対する計測結果の実部を図2に示す。式(2)から期待されるように、磁場勾配の積分波形に対応してエコーピークが生じていることがわかる。さらに、計測信号に対して、1次元モーメントを用いてピーク検出をおこない、時間積分波形を決定した結果を、図3に示す。(a)、(b)は、それぞれ、矩形波、正弦波に対応する結果を表す。磁場勾配の設定値と実測値の間に、かなりの差異が認められる。これは、磁場勾配発生系の応答特性などに起因するものと考えられる。

5. 1次元高速ケミカルシフトイメージングへの応用

次に、実測した磁場勾配の時間依存性を用いて画像を再生することの有効性を検証するために、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計測²⁾を試みた。計測シーケンスを図4に示す。この方法によると、1回の計測で2次元情報が得られるため測定時間が著しく短縮される。像再生法は、Troppetによって提案された方法を採用した。この方法は、各位置

図4 高速ケミカルシフトイメージングの測定シーケンス

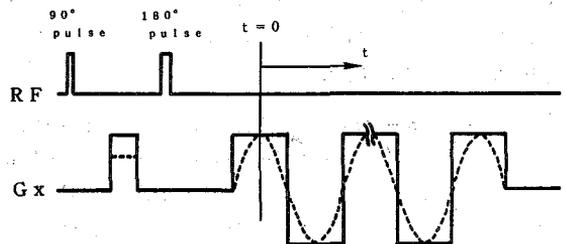
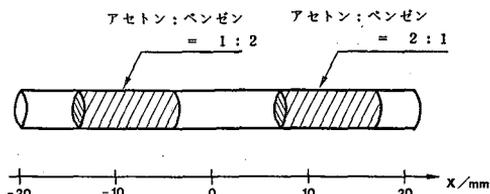


図5 測定に用いた試料

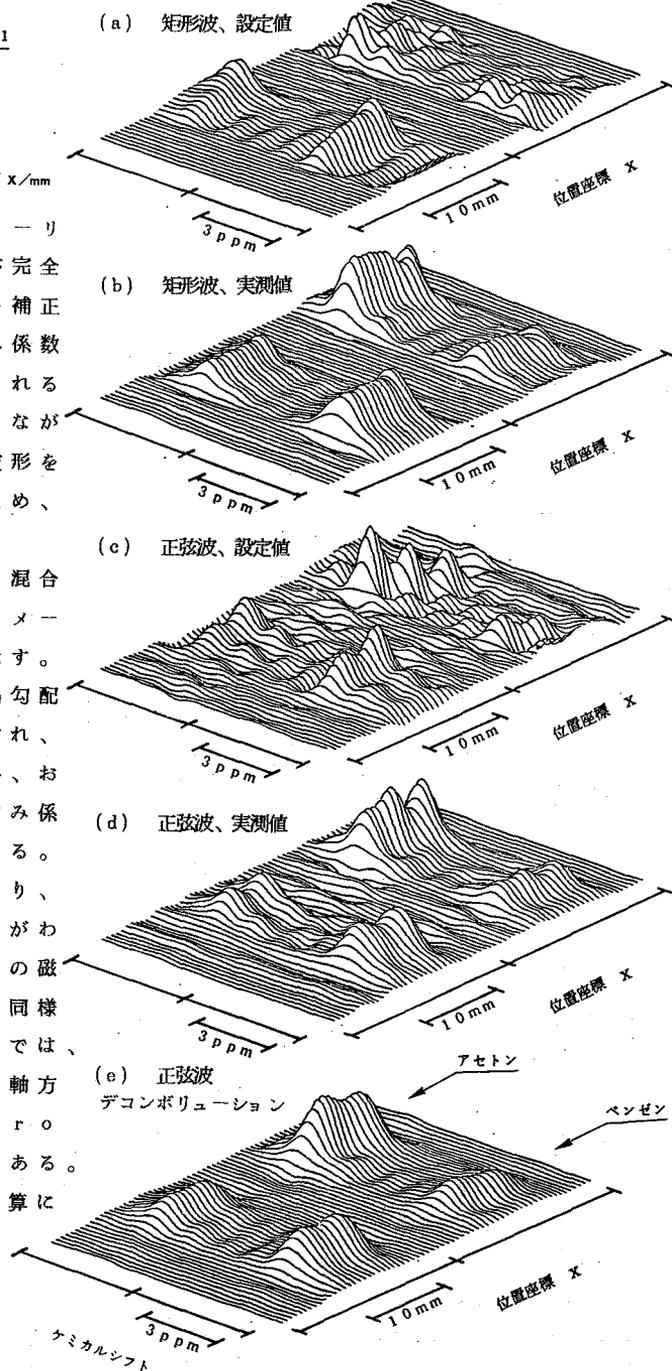


毎に異なる重み係数を乗じてからフーリエ変換することにより、磁場勾配が完全な矩形波でないことによる像劣化を補正するものである。ここで用いる重み係数は、磁場勾配の積分波形から算出される（詳細は文献(4)参照）。しかしながら、前節でみたように、磁場勾配波形を正確に制御することは困難であるため、実験的検証はなされていなかった。

図5に示したアセトン・ベンゼン混合試料に対して高速ケミカルシフトイメージング計測を行った結果を図6に示す。

(a)、(b)は、矩形波状の磁場勾配を用いた計測結果に対して、それぞれ、設定値から期待される磁場勾配波形、および実測された磁場勾配波形から重み係数を算出して、像再生した結果である。磁場勾配の実測値を用いることにより、像劣化が著しく改善されていることがわかる。(c)、(d)は、正弦波状の磁場勾配を用いた計測結果に対して、同様に、像再生した結果である。(d)では、劣化はかなり改善されているが、x軸方向の歪みが認められる。これは、Tropperの理論の限界によるものである。ここでは、デコンボリューション演算により、この歪みを補正した。結果を図6(e)に示す。この方法によると正弦波状の磁場勾配に対しても、矩形波と同等の画像が得られる。

図6 ケミカルシフトイメージング像



参考文献 1) P. Mansfield and I. Pykett, *J. Magn. Reson.* **29**, 355 (1978)
 2) S. Matui, K. Sekihara, and H. Kohno, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 2817 (1985)
 3) 山本, 電気通信学会, MBE84-59
 4) M. M. Tropper, *J. Magn. Reson.* **42**, 193 (1981)

(東芝総研) °巨瀬勝美 佐藤幸三 岡本和也 伊藤阿耶雄

はじめに

NMR映像法による流速分布のイメージング法は、大きく二つの方法に分けられる。一つは核磁化の大きさ(NMR信号の強度)を用いる方法で、もう一つは核磁化の位相(NMR信号の位相)を用いる方法である。前回われわれは、前者の方法に分類される、選択照射パルスによる saturation を用いた方法と、この方法による断層面に垂直な流速分布画像を報告した。今回は、後者の方法に関し、ファントム実験と理論的解析を行い、断層面内を流れる水の流速ベクトル $\vec{v}(x, y)$ を映像化することに成功したので、その方法と結果を報告する。

原理と方法

空間のすべての点での流速ベクトル $\vec{v}(x, y, z, t)$ を求めることが最終目標となるが、測定時間、データ量が膨大となるので、特定の断層面内での流速ベクトルを求めるのが実用的である。ここでは特に、断層面内の定常流の映像法を示す。

xy 面内の核スピン密度を $\rho(x, y)$ 、流速分布を $\vec{v}(x, y) = (v_x(x, y), v_y(x, y))$ とする。この流れを図1に示すパルスシーケンスで映像化する場合、エコーのピークにおいて (x, y) の位置にある核磁化の位相 $\phi(x, y, t_x, t_y)$ は、 2τ 間の流速は一定として、

$$\begin{aligned} \phi(x, y, t_x, t_y) &= -\int_{-2\tau}^{\tau} (-\gamma \Delta H) dt + \int_{-\tau}^{t_y} (-\gamma \Delta H) dt \\ &= -\gamma G_x v_x (T_x^2 + T_x' T_x) - \gamma G_x (x - v_x T_x') t_x - \frac{1}{2} \gamma G_x v_x t_x^2 \\ &\quad - \gamma G_y v_y (T_y^2 + T_y' T_y) - \gamma G_y y t_y - \frac{1}{2} \gamma G_y v_y t_y^2 \end{aligned} \quad (1)$$

となる。すなわち、静止している核磁化では位相シフトは t_x と t_y に関して一次の項だけであるが、一定の速度で動く核磁化では、 t_x, t_y に関し0次の項と、 t_x, t_y に関しそれぞれ二次の項が付け加わることが判る。これよりエコー信号強度は、

$$S(t_x, t_y) = \iint \rho(x, y) x e^{i\phi(x, y, t_x, t_y)} dx dy$$

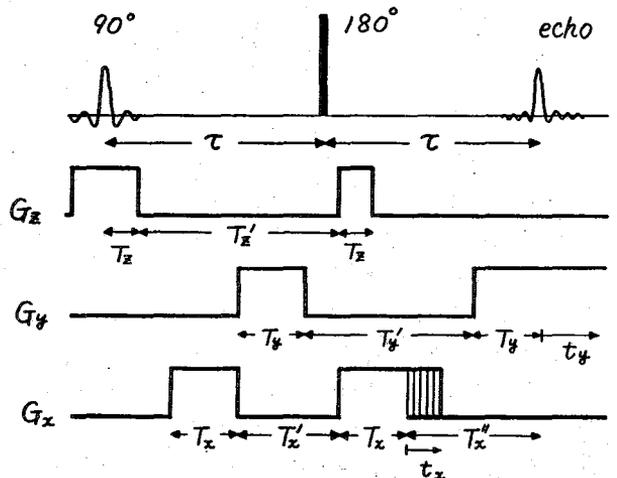


図 1

こせ かつみ、 さとう こうぞう、 おかもと かずや、 いたう あやお

$$= \iint \tilde{p}(x, y) \exp(-i\gamma G_x(x - v_x T_x) t_x - \frac{1}{2} i\gamma G_x v_x t_x^2 - i\gamma G_y y t_y - \frac{1}{2} i\gamma G_y v_y t_y^2) dx dy \quad (2)$$

但し $\tilde{p}(x, y) = p(x, y) \exp(-i\gamma G_x v_x (T_x^2 + T_x' T_x) - i\gamma G_y v_y (T_y^2 + T_y' T_y))$

よって、エコー信号を二次元 Fourier 変換することにより得られる画像 $I(x, y)$ は、

$$I(x, y) = \frac{\gamma^2 G_x G_y}{(2\pi)^2} \iint S(t_x, t_y) \exp(i\gamma G_x x t_x + i\gamma G_y y t_y) dt_x dt_y \quad (3)$$

となる。(3)に(2)を代入して積分順序を交換すると、

$$I(x, y) = \frac{\gamma^2 G_x G_y}{(2\pi)^2} \iint \tilde{p}(x', y') g(x, x', y'; v_x) h(y, x', y'; v_y) dx' dy' \quad (4)$$

$$g(x, x', y'; v_x) = \int \exp(-i\gamma G_x(x' - x - v_x T_x) t_x - \frac{1}{2} i\gamma G_x v_x t_x^2) dt_x \quad (5)$$

$$h(y, x', y'; v_y) = \int \exp(-i\gamma G_y(y' - y) t_y - \frac{1}{2} i\gamma G_y v_y t_y^2) dt_y \quad (6)$$

但し、 $v_x' = v_x(x', y')$, $v_y' = v_y(x', y')$

となる。 $v_x' \neq 0$, $v_y' \neq 0$ においては

$$g(x, x', y'; v_x) = \sqrt{\frac{2\pi}{|\gamma G_x v_x|}} \exp\left(\frac{i\gamma G_x(x' - x - v_x' T_x)^2}{2v_x} - \frac{i\pi}{4}\right) \quad (7)$$

$$h(y, x', y'; v_y) = \sqrt{\frac{2\pi}{|\gamma G_y v_y|}} \exp\left(\frac{i\gamma G_y(y' - y)^2}{2v_y} - \frac{i\pi}{4}\right) \quad (8)$$

となる。これらはいわゆる point spread function になっているが、単に $x'-x, y'-y$ の関数ではなく、 $v_x(x, y), v_y(x, y)$ の汎関数にもなっている。このため(7),(8)の一般的评价は難しいが、位置のボケの評価を以下に示す。図2に $h(y, x', y'; v_y)$ の $y'-y$ による変化を示す。 v_y はこの±1.25mmの範囲で一定(10cm/sec)とし、 $\gamma G_y = 9.8 \text{ kHz/cm}$ とした。また図3には、畳み込み積分の有効な範囲を見るために、 $h(y, x', y'; v_y)$ の $y'-y$ に関する積分値を示した。これらの図から判るように、 $\gamma G_y (y'-y)^2 / 2v_y \geq 2\pi$ においては振動の周期が極めて短くなるため、この領域での h と $\tilde{p}(x', y')$ の畳み込み積分値は、通常は非常に小さくなる。すなわち、流れの方向の流速変化の空間的スケールが、 $\Delta y = \sqrt{4\pi v_y / |\gamma G_y|}$ に比べて大きいときは、二次元 Fourier 変換で再構成された画像は、 $\tilde{p}(x, y)$ に Δy 程度のボケが加わったものとなる。

次に上に示した条件が満たされた場合に、 v_x, v_y を映像化する方法を示す。詳細は述べないが、図1のシー

$h(y, x', y'; v_y)$

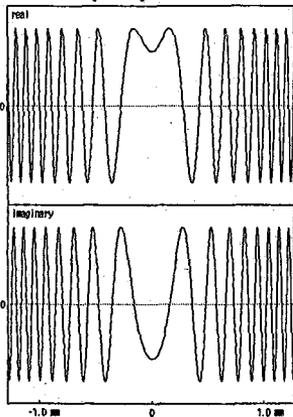


図2

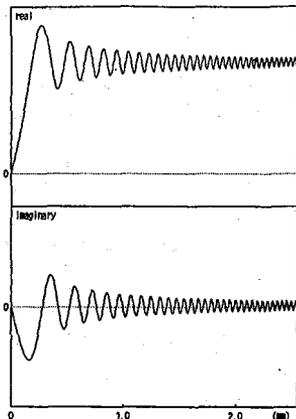


図3

ゲンスで画像化した画像を $\tilde{f}_0(x, y)$ 、 T_x と $T_x + \Delta T$ に変化させて取得した画像を $\tilde{f}_1(x, y)$ とするとき、 $v_x(x, y)$ は ΔT が小さい場合には次の式に従った画素間演算により求められる。

$$\text{即ち、 } v_x(x, y) = -\frac{1}{\gamma G_x (2T_x \Delta T_x + T_x \Delta T_x + \Delta T_x^2)} \text{Im} \left(\frac{(\tilde{f}_1(x, y) - \tilde{f}_0(x, y)) \tilde{f}_0^*(x, y)}{|\tilde{f}_0(x, y)|^2} \right) \quad (9)$$

となる。同様に、 T_y と $T_y + \Delta T_y$ に変化させた画像を $\tilde{f}_2(x, y)$ とおくと、 v_y も (9) と同様の $\tilde{f}_2(x, y)$ と $\tilde{f}_0(x, y)$ の画素間演算により求められる。

実験結果

測定は前回と同様の 30MHz の小型イメージング装置で行った。図4は、y軸方向の内径 7.0mm の円管の中を流れる水を、y軸に垂直な面でスライスを行い、x-z 面内で画像化した例である。面内での流れはないが、スライスのために印加した y 方向の勾配磁場により速度に比例した位相シフトが観測される。平均流速は 10.0 cm/sec である。

図5は、この円管の流れを、z軸に垂直な面で画像化した例である。

平均流速は 3.0 cm/sec であり、水は左から右へと流れている。エコー信号のサンプリング時刻のずれにより非対称性が生じているが、上に述べたように、流速に比例した位相シフトが観測される。図6は、(9)式に従って、二枚の画像から求めた流速分布であり、ポアズイユ流をよく再現している。

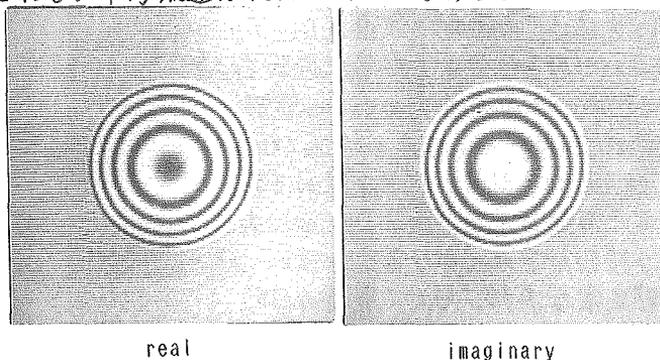


図4 $\bar{v} = 10.0 \text{ cm/sec}$

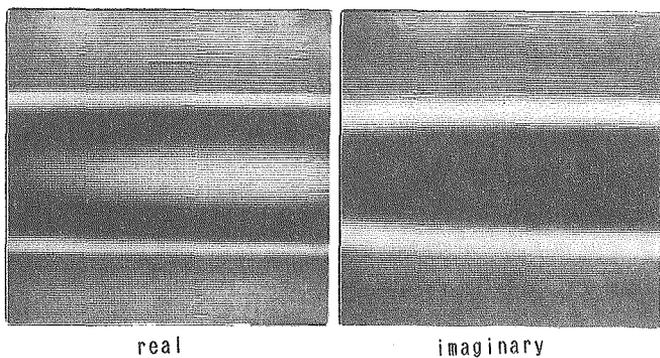
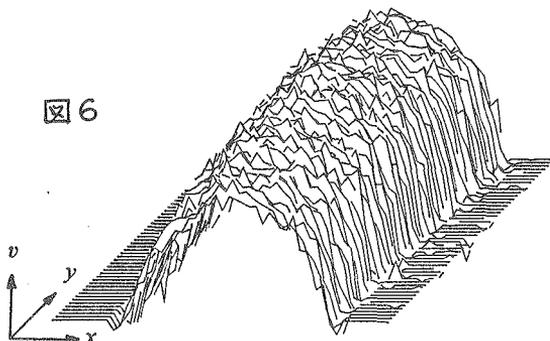


図5 $v = 3.0 \text{ cm/sec}$

図7(a), (b), (c)は、両端の内径が 7.0mm、中央部の内径が 4.0mm の狭窄管の中を流れる水の画像で、それぞれ上に述べた \tilde{f}_0 、 \tilde{f}_1 、 \tilde{f}_2 に対応するものである。入口での平均流速は 1.0 cm/sec で水は左から右へと流れているが、狭窄部の手前で非対称な位相シフトが見られる。これは狭窄部における絞り込みによる x 方向の流れが生ずるためである。この場合、 v_x および v_y は最大でも 5 cm/sec 程度であり、 $\gamma G_x = \gamma G_y = 9.8 \text{ kHz/cm}$ であるので、 Δy は 0.3 mm となる。ピクセルサイズは 0.2 mm x 0.2 mm であるので、画像のボケはあまり大きくないものと考えられる。

図8は (9) 式に従って求めた $v_x(x, y)$ 、 $v_y(x, y)$ の分布である。 $v_y(x, y)$ の



画像から、流れが絞られてジェット状に噴出している様子が伺え、 $v_x(x,y)$ の画像からは、上下方向に流れが絞られている状況が明らかである。

むすび

断層面内を流れる二次元的な流れの流速ベクトルを求める方法と、その際の問題点を検討し、実際に狭窄管の中を流れる水の流速ベクトルを求めることに成功した。この方法は、断層面と垂直方向にも流れがある場合にも容易に拡張でき、一つの断層面内での三次元流速ベクトル $\vec{v}(x,y) = (v_x(x,y), v_y(x,y), v_z(x,y))$ を求める非常に有効な方法である。さらにより複雑な流れ、より高速な流れ、非定常な流れ、そして究極の目的である心腔内血流速度ベクトルの画像化は、これからの課題である。

<文献>

1. K. Kose, K. Satoh, T. Inouye and H. Yasuoka: *J. Phys. Soc. Jpn.* 54 54 (1985) 81-92.
2. F.W. Wehrli, A. Shimakawa, J. R. MacFall, L. Axel and W. Perman: *J. Comput. Assist. Tomogr.* 9 (1985) 537-545.
3. P. R. Moran: *Mag. Res. Imaging* 1 (1982) 197-209.

real

imaginary

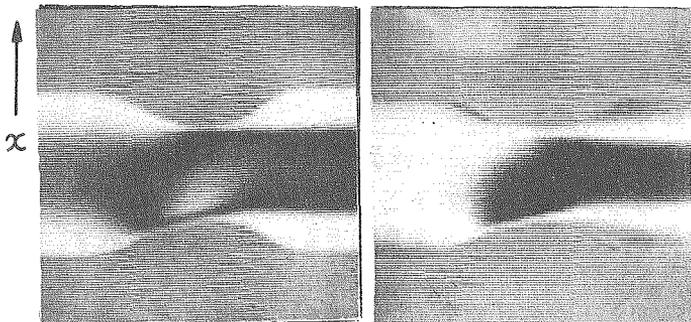


図7(a)

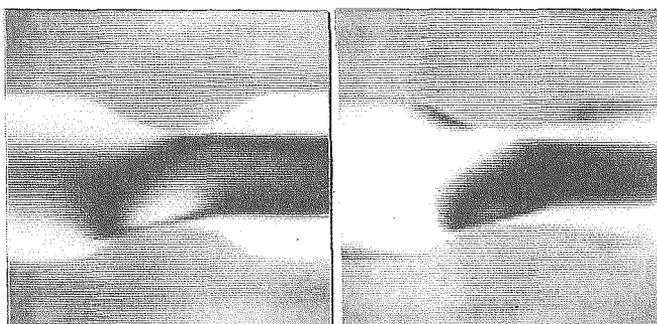


図7(b)

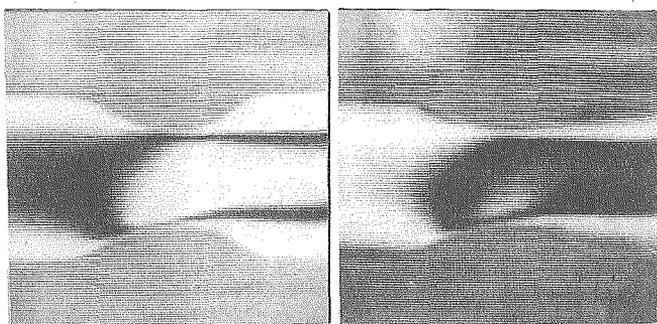


図7(c)

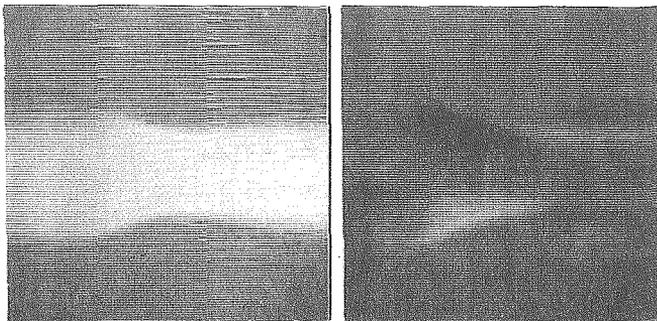


図8

(農業環境技研) ○吉田 充, 能勢和夫

1. 序

灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) の菌糸の ¹H NMR スペクトルを測定すると強い水のシグナルが観察される。一方、糖や脂質のシグナルは極めて小さく、水のシグナルのすそに隠れてほとんど検出が不可能なくらいである。この水のプロトンのスピン-格子緩和時間T₁は菌糸細胞内における水の存在状態を反映し、そしてそれは細胞の生理状態を表わすと考えられる。そこでこの水のプロトンのT₁の測定を行い、殺菌剤処理による菌糸細胞の変化に伴うT₁の変化から殺菌剤の生理作用に関する知見を得ることを試みた。

菌糸の水のシグナルを inversion recovery 法 (180°-t-90° パルス系列) で観測し、t-ln Z プロット (図1) を行うと曲線が得られ (直線とはならない)、菌糸内にはT₁の異なる複数種の水が存在することが推測された。そこで、菌糸内の水のプロトンのスピン-格子緩和に関して下式を仮定し、シンプレックス法¹⁾ による Z の実測値と計算値とが最も良く一致するようパラメーター A_i, B_i, C を求めた。

$$Z(t) = C + \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/B_i} \dots \dots \dots (1)$$

$A_i \geq 0, C \geq 0$

(Z, t: 図1の説明を見よ)

なお、この式において、A_iは菌糸内の全水量を1とした場合の各々の水の成分の割合を表わし、B_iは各成分のT₁の値と作る。Cは系統的な測定誤差など未解明の因子に由来する定数である。

このよりな方法で菌糸内の水の各成分のT₁とその成分の含有率を求め、さらに菌糸を各種殺菌剤で処理した時の各成分の変化を調べた。

2. 実験

PD培地 (2.4% dehydrated potato dextrose broth, 0.5% yeast extract) で30時間振とう培養した対数増殖期の菌糸1gを150mlの同培地に植えつけ、12~18時間、26.5℃中、ロータリーシェーカー上でインキュベートした後、菌糸を濾過により回収する。蒸留水で洗浄後、外側に付着している水をパーパータオルで取り除

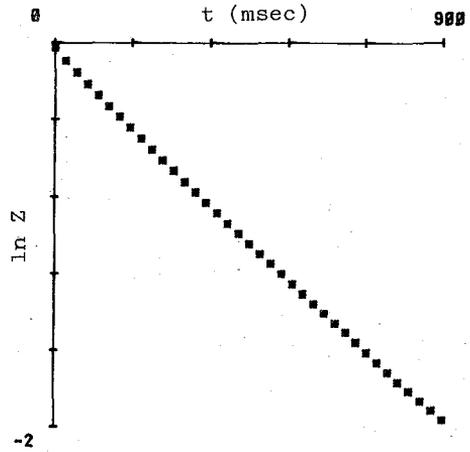


図1 菌糸中の水のプロトンのスピン-格子緩和

t: 180°パルスと90°パルスの間の時間

$$Z(t) = \frac{M_0 - M(t)}{Z M_0}$$

M₀: t = ∞ (3sec) の場合の水のシグナル強度

M(t): 180°パルスと90°パルスの間の時間を t とした場合の水のシグナル強度

よしだ みつる, のせ かつお

ぎ、0.5gを10mmφ試料管に詰め、日本電子のFX-90A スペクトロメーターを用いて¹H NMRスペクトルの測定を行った。

180°- t -90°パルス系列間の間隔を3secとし、積算回数を12回として1つのスペクトルを得、 t を0.01msecから900msecまで25msecごとに変化させて1サンプルについて37のスペクトルデータを得た。測定開始時には、 $t=\infty$ (実際には3secとした)として M_0 を求めた。また、第19番目と第20番目のデータ取得の間、及び測定終了時にも $t=\infty$ で測定を行い、 M_0 の時間変化を調べ、計算の際に M_0 の時間変化の補正を行った。測定時間は1サンプルにつき約40分である。

このよりにして得られたデータをシンプレックス法により多変数関数の最小値を求めるためのサブルーチン「SIMPLE」²⁾を用いて(1)式に当てはめ、 Σ の実測値と(1)式による計算値との残差二乗和の最小値を与えるパラメーター A_i, B_i, C_i を推定し、各水の成分の含有率と T_i の値を得た。

また、インキュベート時に培地に殺菌剤を添加し、殺菌剤処理による菌系内の水の T_i の変化を調べた。

3. 結果

シンプレックス法による解析の結果、(1)式において $i=2$ の場合が最もAIC(赤池の情報量規準)²⁾が小さくなり、 Σ の実測値と計算値の一致が良くなること示された。従って、菌系中の水は主に二つの成分から成ると考えられた。

種々の濃度のベノミル、プロシミドン、EDDP処理を行った場合の菌系内の水の成分の T_i と含有率の変化は図2に示した通りである。なお、菌の生育阻害が観察されるようになる濃度は、ベノミル0.1ppm、プロシミドン1ppm、EDDP 40ppmである。

ベノミル処理では、処理濃度0.1ppmから主成分の T_i が短くなり始め、処理濃度の上昇に伴ってその短縮の割合は増してゆく。また、0.5ppm処理では第二成分(T_i の短い成分)の含有率の増加が認められ、1ppm及び2ppm処理ではさらにその含有率は増加した。

プロシミドン処理では、0.5ppm処理で第二成分の含有率の増加が認められ始め、1ppm処理では主成分及び第二成分の T_i が短くなることともに第二成分の含有率が減少し、2ppm処理では再び第二成分の含有率が増加した。

EDDP処理では、20ppm処理で第二成分が増加し、60ppm処理では主成分の T_i が短くなり、第二成分はほとんど検出されなくなった。80ppm処理では、第二成分の含有率の増加が認められた。

以上のよりに、殺菌剤処理を行うと菌の生育阻害濃度前後の処理濃度において菌系内の水の状態に変化が生じ、処理濃度の上昇に伴い主成分及び第二成分の T_i が共に短くなること明らかになった。しかし、第二成分の含有率の変化についてみると、処理濃度の上昇に伴って含有率も増加する場合(ベノミル処理)と、ある処理濃度でいったん含有率が低下し、さらに濃度を上げると再び含有率が増加する場合(プロシミドン、EDDP処理)とがあった。

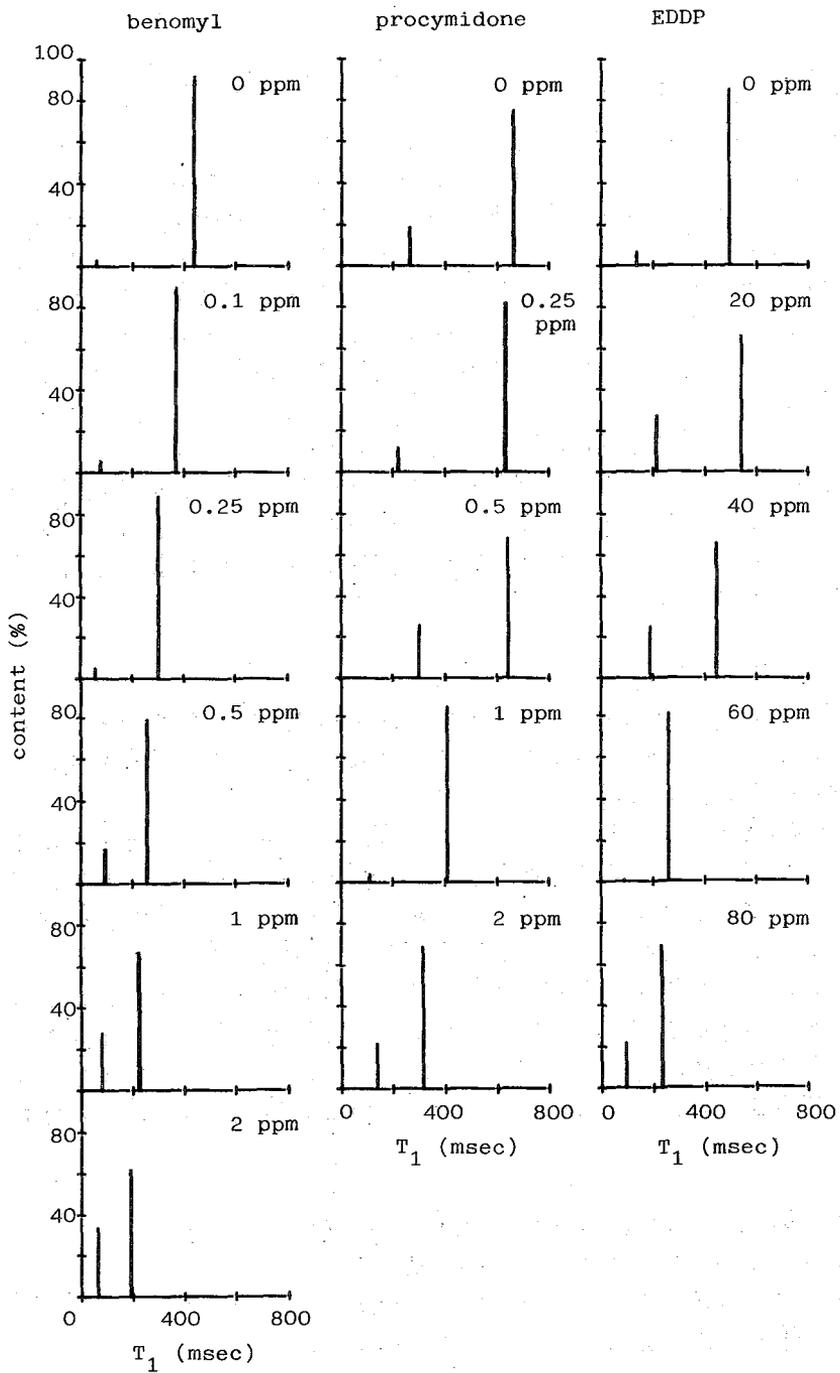


図2 殺菌剤処理による菌糸内の水の成分の変化

4. 考察

① シンプレックス法について

(1) 式のパラメーター A_i , B_i , C の推定に用いたシンプレックス法は、これらのパラメーターの初期値と最初の変化幅を与えると、各パラメーターについてその一つだけを変化させた場合の実測値と計算値との差の二乗を計算し、この値が最大となるパラメーターの組に注目し、この点以外の点の重心を求め、これに対する鏡映、縮小、拡大、最小頂点へ向っての縮小などの操作によってパラメーターを変化させることを繰り返し、ついに収束条件に達する方法である。この方法は、パラメーターの初期値や変化幅の与え方が粗であっても良く収束するという利点がある。実際にシンプレックス法を用いてみて、この方法が生物試料のようにランダム誤差の多い対象に関する測定値の解析に極めて有効な方法であることがわかった。

各サンプルについて求められた A_i の値の総和 ($\sum A_i$) は 0.94 から 0.96 の間に分布し、ほぼ 1 に近く、このことはこの方法が菌糸内の水の成分の解析結果を合理的な値に導くことについての一つの裏づけを与えている。また、得られた C の値は 0.04 以下で、 A_i に比べて極めて小さく、 C が由来するところの未説明の因子がこの解析結果に及ぼす影響は無視できる程度であると考えられる。

② 測定結果について

殺菌剤処理による菌糸内の水の T_1 の変化は、菌糸細胞の生理状態の変化を反映していると考えられる。そこで、水の T_1 の変化を詳細に調べることにより、殺菌剤の作用機作に関する知見が得られることが期待される。

ここでは、微小管タンパク質チューブリンに作用して細胞の有糸分裂を阻害するベノミル⁵⁾、ホスファチジルコリン合成系を阻害し膜系に異常を起ささせる EDDP⁶⁾、作用機作が未だ明らかでないプロシモドンの3種の殺菌剤処理を行い、いずれの場合も菌糸内の水の T_1 が短くなること、及びベノミルと後二者とは処理濃度の变化に伴う第二成分の消長に差が観察された。これらを手がかりに、今後、菌糸内の水の T_1 の変化と薬剤の生理作用との対応をさらに深く調べてゆく予定である。また、その過程で、細胞内の水の T_1 がどういう水の存在状態に対応するものであるのかについても明らかにされるであろう。

¹H NMRが殺菌剤薬理の分野においても有力な非破壊分析法となり得る可能性が示された。

文献

- 1) 小林和彦, 農林水産研究計算センター報告, A12, 55 (1981)
- 2) 赤池弘次, 数理科学, No. 153, 5 (1976)
- 3) 赤池弘次, 日本物理学会誌, 35, 608 (1980)
- 4) 赤池弘次, 数理科学, No. 213, 7 (1981)
- 5) L. C. Davidse and W. Flach, J. Cell Biol., 22, 174 (1977)
- 6) O. Kodama, H. Yamada and T. Akatsuka, Agric. Biol. Chem., 43, 1719 (1979)

(国立公害研究所) 渡辺正孝・木幡邦男・功刀正行

瀬戸内海で発生する赤潮の多くは鞭毛藻による場合が多い。この鞭毛藻の増殖を制限する要因の中で最も重要なものはリンである。バッチ培養での藻類は、培地中でのリン濃度がなくなっても増殖を続けることが知られており、その増殖は細胞内リン含有量に依存すると考えられている。従来鞭毛藻に対して ^{31}P -NMRの応用は行なわれてこなかったが大量培養装置(容積 1m^3)の完成により大量のサンプル収集が可能になり、 ^{31}P -NMRによるリン代謝過程の計測が行なえるようになった。ここではリン欠乏状態からリン添加した状態までの鞭毛藻*Heterosigma akashiwo*によるリン取込みとリン蓄積過程を ^{31}P -NMRを用いて行った。

(実験方法)

大量培養装置を用いて*H. akashiwo*の純培養を行った。八丈島沖の黒潮域より搬入した海水を用いて $1/2$ 培地を作成し、*H. akashiwo*クローン株を12:12時間のLD周期、明期の照明条件は $175\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で培養した。初期リン酸濃度は $\text{PO}_4\text{-P} = 1.5\mu\text{M}$ 、初期細胞数は 100 cells/ml を与えている。培養槽下部より空気を入れながらはん培養を行い、温度 $20\pm 1^\circ\text{C}$ で培養を行った。細胞数計測は1日1回14:00に行う。接種後9日目に細胞数は $1.1\times 10^4\text{ cells/ml}$ (比増殖速度 $\mu = 0.63\text{ d}^{-1}$)に達した時点で $\text{PO}_4\text{-P}$ は完全に欠乏状態となっている。この時ば、気を停止し表層に集積させサンプルングを行った。サンプルング後は直ちにばつ気を開始した。培養9日目の朝9時に $4.5\mu\text{M}$ の $\text{PO}_4\text{-P}$ を添加し、1時間ばつ気混合を行った後、ばつ気を停止し表層に集積させサンプルングを行った。以下同様に1日1回行った。NMR用のサンプル3Lは直ちに温度 5°C にて15分間の遠沈を行った後過塩素酸(20ml 35%)による抽出を行った。抽出後遠沈により上澄液を残し、5mlのEDTA(10mM)添加後 K_2CO_3 により $\text{PH} = 7.5$ に調整した。遠沈により KClO_4 を除去し凍結乾燥を行った後、3mlのTES(8mM)にて溶解し $\text{PH} = 7.5$ にてNMR計測を行った。 ^{31}P -NMR測定は日本電子(株)、JNM-GX-400超電導NMRを使用し、観測周波数161.8 MHz、観測範囲20 KHz、デュータメモリ-32Kワード、 45° ないし 60° パルスで数回の積算にて行った。繰り返し時間は、緩和時間の差による信号強度の積分誤差をできるだけ少なくするため、約1.7秒と長めにとっている。10mm径のNMR試料管に、30~40mmの高さに試料を入れ測定した。外部標準には外径約2mmのキャピラリーに、 $\text{PH} = 0.5$ の D_2O 溶液中のリン酸を使用している。キャピラリー中の D_2O はNMRコック用信号に使用し、得られた化学シフト信号は、85%リン酸を基準として記録している。NMR計測と同時に細胞数、TP, DTP, DIPの計測を行った。

わたくしはたたくはくぬぎますゆき

(実験結果)

リンの欠乏状態からリン添加にいたる過程での細胞数の変化と、外液中のリン濃度及び細胞内リン含有量の変化を図1, 図2に示す。

培養8日目において外液中の無機リン酸は全く無くなっている。しかし細胞数は依然として対数増殖を続けている。この時点での細胞内リン含有量は $76 \text{ f mol P} \cdot \text{cell}^{-1}$ となっており、報告されている *H. akashiwo* のリン細胞内最小含有量 ($q_0 = 95 \text{ f mol P} \cdot \text{cell}^{-1}$, 渡辺ら, 1982) 以下の値となっている。このことは細胞が完全にリン欠乏状態となっていることを示している。

無機リン酸添加後5時間で細胞内リン含有量は $q = 134 \text{ f mol P} \cdot \text{cell}^{-1}$ と急激に増加しており、リン取込み速度は $V_{p04} = 11.6 \text{ f mol P} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ となっている。リン添加後2.3日では $q_0 = 180 \sim 200 \text{ f mol P} \cdot \text{cell}^{-1}$ に収束し、リン取込み速度も $V_{p04} = 2.6 \text{ f mol P} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ となっている。

図3に過塩素酸抽出液の ^{31}P -NMRのスペクトルを示すがそれらのピークの帰属は報告されている値にもとづいて行った (Navon et al, 1979)。リン欠乏状態からリン添加とそれに続くリン過剰摂取の経過の ^{31}P -NMRスペクトルを図4に示す。リン欠乏状態での *H. akashiwo* 細胞中のリンは sugar phosphate, P_i , PEP から成っている。わずかにポリリン酸もみられるが、ほとんど無視できる量である。リン添加後顕著な変化はポリリン酸の急激な増加である。表-1に ^{31}P -NMRシグナルを積分して求めたリン中間生成物質の相対的な存在率を示すと同時に non-terminal と terminal の強度比によりポリリン酸の chain length も求めた。リン欠乏状態では抽出液中わずかに 5.8% がポリリン酸で chain length も9と短い。リン添加後5時間で 43.7%, chain length は14と急激に増加し、リン添加後3日では63.3% がポリリン酸となり、chain length も17と増加している。同時に ATP/ADP 比はリン欠乏からリン添加過程において2時間で14から2.3とほぼ2倍に増加しており、ポリリン酸はリンの蓄積アールとしてのみならずエネルギー蓄積としても機能していることがわかる。この時点で細胞内リン含有量は $172 \text{ f mol P} \cdot \text{cell}^{-1}$ とほぼ最終値になり、リンの急激な摂取もなくなっている。以上のこ

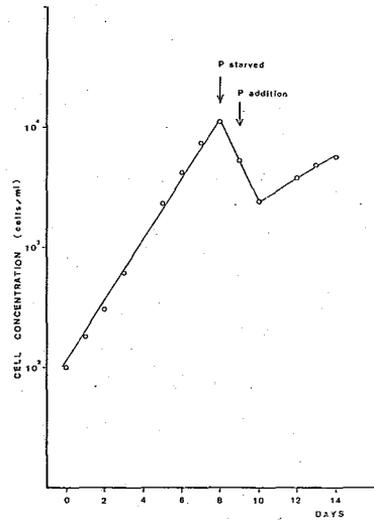


図1. *H. akashiwo* 細胞数の変化

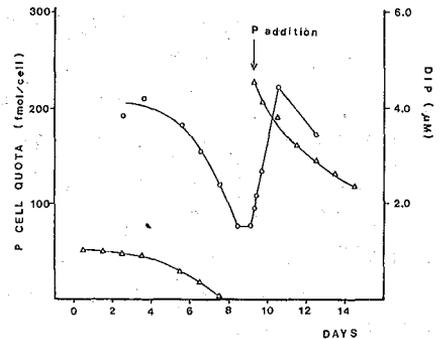


図2. DIP濃度と細胞内リン含有量の変化

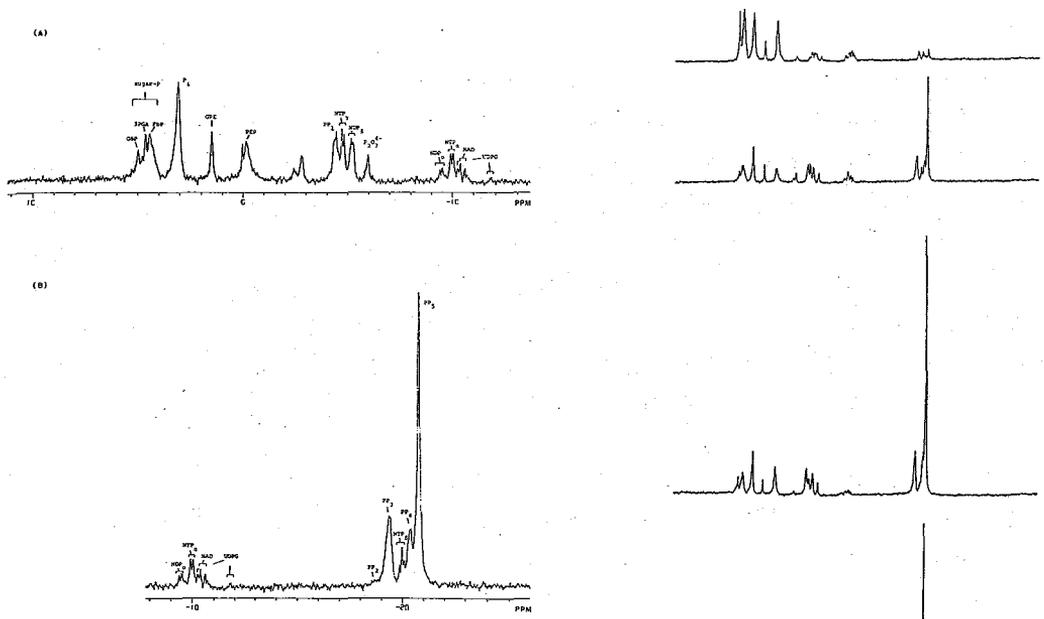


図3. *H. akashiwo* 抽出液中の ^{31}P -NMR のスペクトル

図4. リン欠乏状態からリン添加状態での ^{31}P -NMR スペクトルの変化

とから、リン欠乏状態にリンを添加した場合、急激なリン摂取が見られるが、これは摂取したリンを増殖のためのみならず、ポリリン酸としてできるだけ早く蓄積してしまい、ポリリン酸のプールが飽和状態になった段階以降では、増殖に必要なリンだけを摂取することが示唆された。

Days	Sugar P %	P_i %	PEP %	GPE %	ATP %	ATP/ADD	PP %	Chain length	P.Cell Gupta fmol P cell^{-1}
Starved condition	33.5	21.5	16.9	4.4	5.6	1.4	5.8	9	76
2 hr after addition of P	12.1	10.9	12.2	3.3	7.4	2.3	43.7	14	108
1 day after additon of P	9.0	9.5	6.7	1.8	-	-	59.1	20	222
3 days after addition of P	9.2	8.4	6.6	2.8	-	-	63.3	17	172

表1. *H. akashiwo* 細胞の抽出液中に占めるリン化合物各成分の比率変化

(考察)

海洋生物資源は多岐にわたっており、それらが生産する物質については未知なものが多い。特に藻類は生態系の一次生産を担っており、それらの代謝過程が変動は生態系全体に影響を及ぼすものと考えられる。海産藻類は高濃度に培養することが困難で、このためNMR手法の応用は不可能であった。大量培養法の完成により高濃度のサンプルを得ることが可能になったが、鞭毛藻は自ら遊泳性を持っているため、高濃度でサンプル管に入ると藻類の活性が著しく変化し、正確な生理状態を把握することが困難となる。このため今回は過塩素酸による抽出によりサンプル時の生理活性状態をなるべく再現できるように試みた。鞭毛藻は殻を持たないため、過塩素酸抽出によりほぼ細胞内リンを抽出することができる。今後はサンプル管内で高濃度に細胞を維持できるよう改良する予定である。

(謝辞)

本研究の遂行に当り御協力下さった山田明、吉田勝美(茨城環境技術センター)両氏に感謝致します。

(参考文献)

Navon, et al, 1979, Biochem. 18: 4487 - 4499

Watanabe, M. M. et al, 1982, Jpn. J. Phycol. 30: 279 - 288.

〈序〉 saturation transfer法は、化学交換を行なっている系の片方を選択的に飽和し、交換反応による飽和磁化の移動を解析することにより交換系の反応速度が求められるユニークな方法である。Brownらはこの方法をはじめて intact 生体系に適用し、大腸菌の $\text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ 生成速度定数を求め、これが F_0F_1 ATP synthase によるものと結論した¹⁾。大腸菌の F_0F_1 ATP synthase は細胞膜に存在し、細胞膜を介したプロトンの電気化学ポテンシャル差により駆動されると考えられる。しかし、最近 Alger らは同じ大腸菌の系において $\text{ATP} \rightarrow \text{P}_i$ の saturation transfer が細胞膜内外の pH 差にほとんど依存しないことを示した²⁾。本研究においては野生株および、遺伝子操作により F_0F_1 ATP synthase を野生株の 5 倍量生産する overproducer 株を用いて $\text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ 生成反応の解析を行い、Brown らと異なる結論を得た。

〈方法〉 ATP 生成反応を $\text{P}_i \rightleftharpoons \text{ATP}$ の交換反応として捉え、ATP を選択的に照射し、飽和磁化の P_i への移動を観測した。交換反応以外の非特異的な照射効果を除くため、ATP への P_i に対する対称位置を同一強度で照射し、これをコントロールスペクトルとし、両者の差スペクトル上で P_i の変化を観測した。結果は 2 site model に従い

$$\Delta M/M_0 = 1 - T_1^*/T_1 \quad \text{--- (1)}, \quad 1/T_1^* = 1/T_1 + k_1 \quad \text{--- (2)}$$

の 2 式を用いて解析した。ただし、 k_1 , $\text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ の反応速度定数; M_0 , 定常状態における P_i の磁化; ΔM , saturation transfer による P_i の磁化変化; T_1 , 交換反応がない場合の P_i のスピン格子緩和時間; T_1^* , ATP を照射下における P_i のスピン格子緩和時間である。測定は、Oxford Instrument 4.3 T ワイドボア磁石を基本とする分光計を用い、 ^{31}P を 73,836 MHz で測定した。パルス繰り返し時間 0.43 秒、待ち時間 0.2 秒の間に第二周波数による選択照射を行なった。スペクトルは 24 x 64 回のプロフ積算を行い、S/N 比を改善するために、さらに 5~10 のスペクトルを平均した。化学シフト値は、キャピラリーに封入した 400 mM MDP ヒープを基準として用いた。大腸菌細胞は野生株 (MRE 600), ATP synthase overproducer (CM2786)³⁾ とともに M9 培地で、コハク酸を炭素源として好氣的に振とう培養し、対数期後期に集菌した。細胞ペレット 4 ml を 20 mm φ サンプル管内で緩衝液 (NaCl, 40 mM; KCl, 10 mM; P_i , 0.9 mM; PIPES, 40 mM; ADA, 100 mM, pH 6.1) に suspend し 12.5 ml とした。炭素源として 312 μmol コハク酸を与え、酸素バブリング (0.15 + 1 l/min) を行なった。

〈結果〉 細胞外のコハク酸を消費しつくと細胞は endogenous 炭素源を用いた定常的代謝状態に達する。この定常状態は約 2 時間継続し、この間、細胞の酸素消費量は 16 nmol/s (ml packed cell), suspension 内の溶存酸素濃度は 1 mM である。この定常状態で saturation transfer の測定を行なった。図 1 に野生株でのスペクトル

みつもり, ふみゆき, D. リース, G. K. ラッタ, I. D. キンベル.

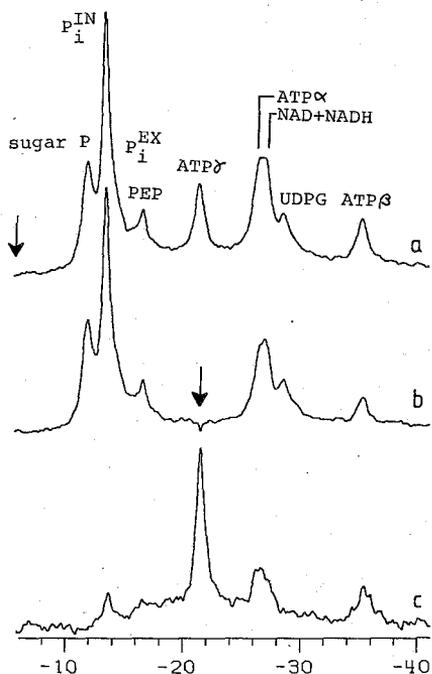


Fig. 1. 野生株大腸菌 (MRE 600) の ^{31}P -NMR スペクトル。(a) コントロール照射 (\downarrow), (b) ATP と照射 (c) (a-b) $\times 2$. 測定温度 20°C

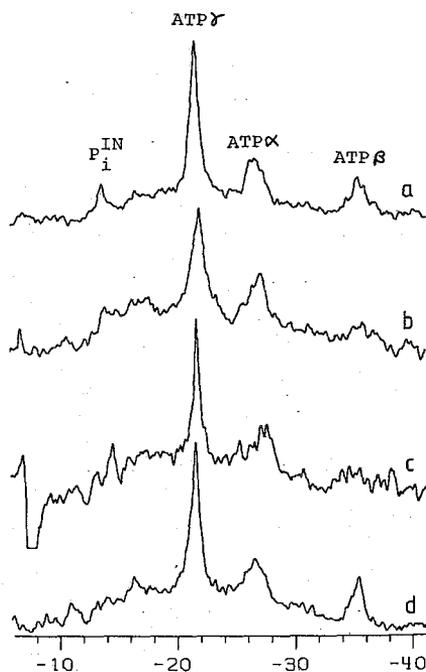


Fig. 2. 大腸菌の saturation transfer 差スペクトル。(a) 無処理 MRE 600, (b) overproducer, (c) DCCD 処理 MRE 600, (d) IAA 処理 MRE 600

Table I. Summary of saturation transfer results

	$\Delta M/M_0$	k_1^*	P_i^{IN} concn. ^{**}	$P_i \rightarrow \text{ATP}$ rate ^{***}
wild type (untreated)	0.05	0.13	8.0	1
overproducer	0.07	0.18	6.0	1
DCCD-treated w.t.	0.16	0.47	2.1	1
IAA-treated w.t.	n.d.	-	7.2	-

^{*}, s^{-1} ; ^{**}, $\mu\text{mol/ml}$ packed cell; ^{***}, $\mu\text{mol/s(ml}$ packed cell)

Table II. Enzyme activity

	F_1F_0 ATPase [*]	GAPDH ^{**}	PGK ^{**}
wild type (untreated)	22	4.0	5.2
overproducer	119	4.3	4.2
DCCD-treated w.t.	0.4		
IAA-treated w.t.	22	0	5.1

^{*}, $\text{nmol ADP/s(mg protein)}$; ^{**}, $\mu\text{mol NADH/s(ml packed cell)}$

を示す。図1Cの差スペクトル上 P_i^{IV} の位置に明らかに saturation transfer によるヒープが認められる。その強度 $\Delta M/M_0$ は5%である。 P_i^{IV} のスピン格子緩和時間は0.4秒であった。 $\Delta M/M_0$ が小さいため T_1 の交換の影響を無視して、(1)(2)式より、 k_1 および $P_i \rightarrow ATP$ の取りこみ速度を算出した(表I)。Overproducer細胞においても同様の測定を行なった。差スペクトルを図2b、計算結果を表Iに示す。5倍量のF₁F₀ ATP synthase にもよらず、 $P_i \rightarrow ATP$ 生成速度は野生株と同じである。

$P_i \rightarrow ATP$ 反応の起源を確定するために DCCD を用いて F₁F₀ ATP synthase を選択的に阻害した細胞、イソド酢酸 (IAA) により解糖系の7-リセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素系 (GAPDH) を阻害した細胞を用いて、さらに測定を行なった。本実験で用いた細胞の関連する酵素活性を表IIに示す。1mM DCCD の存在下では図2Cに示すように ATP γ \rightarrow P_i の saturation transfer が認められたが、IAA 処理した細胞では図2dに示すように、この transfer がみられなかった。表Iに $\Delta M/M_0$ および、これより得られた $P_i \rightarrow ATP$ 生成速度を示す。

最後に、GAPDH/PGK系での P_i , ATP の交換反応の有無を確認するために、精製した GAPDH, PGK 溶液中での saturation transfer の測定を行なった。この系の反応スキームを図3に示す。溶液中の GAPDH, PGK 活性は、表IIに示した無処理細胞の酵素活性と同じになるように調整した。また基質濃度も、細胞内濃度を再現するように設定した。図4はこのスペクトルを示す。ATP γ \rightarrow P_i は48%の transfer が観測され、平衡状態でも交換反応が存在していることは明らかである。 P_i の T_1^* 7秒を用い、(1)(2)式より $k_1 = 0.07/s$ 、また $P_i \rightarrow ATP$ の反応速度を $0.14 \mu mol/s \cdot ml$ と算定した。

<考察> F₁F₀ ATP synthase を野生株の5倍量有する overproducer においても $P_i \rightarrow ATP$ の取りこみ速度が野生株と同じであるという結果は、この反応が ATP synthase によるものであるとする

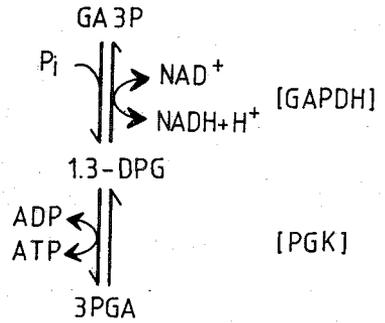


Fig. 3. GAPDH/PGK系の反応スキーム

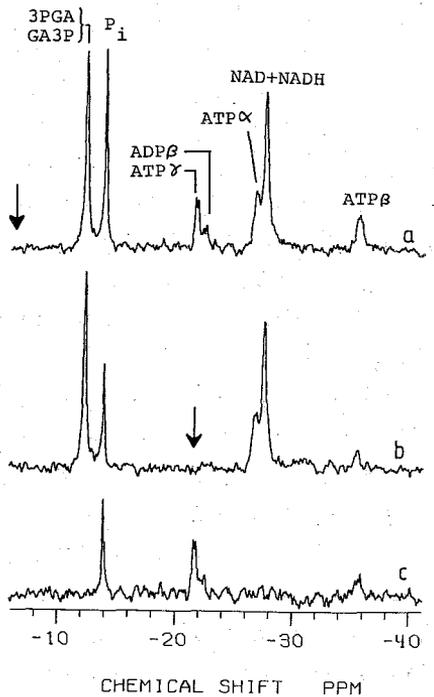


Fig. 4. GAPDH/PGK 溶液の ^{31}P -NMR スペクトル。(a) コントロール照射 (↓) (b) ATP γ 照射 (↓) (c) a-b. 平衡状態での基質濃度: P_i , 2.0; ATP, 2.0; ADP, 0.2; GA3P, 0.2; 3PGA, 3.6; NAD, 2.0; NADH, 0.1 (mM) pH 7.43. 積算 12x16回 (30.7秒 x 18 x 2)

Brown 3 の解状に疑問を抱かせる。大腸菌細胞内においては $P_i \rightleftharpoons$ ATP 交換反応は、 F_1F_0 ATP synthase, 解糖系の GAPDH/PGK 系の 2 つの酵素系による反応が考えられる。また ATP の共鳴位置には GTP の寄与も考えられることから、TCA サイクルに存在する Succinyl CoA synthase による $P_i \rightleftharpoons$ GTP 交換反応も P_i への saturation transfer の起源となる可能性がある。しかし、saturation transfer が DCCD の影響を受けない、IAA による GAPDH 阻害で消滅するという結果は、この $P_i \rightarrow$ ATP 反応が ATP synthase によるものでなく、解糖系の GAPDH/PGK によるものであることを示している。succinyl CoA synthase による $P_i \rightarrow$ GTP 反応の可能性も、IAA 処理細胞で saturation transfer が見られないうことから否定される。Brown 3 と我々の結果の最も大きな違いは、DCCD 存在下での saturation transfer の有無であるが、彼らの実験では無処理細胞での測定に比べて DCCD 存在下での測定を行っており、この同炭素源を与えていない。これに対し我々の実験では、DCCD 存在下で ATP レベルを保つため 45 分毎に 312 μ mol のグルコースを与えている。

さて、細胞の酸素および基質消費速度より、GAPDH/PGK 部位での $P_i \rightarrow$ ATP の net 生成量を算定することが可能である。解糖系の産物が途中で蓄積、排出されることなく、完全に酸化されると仮定すると、酸素消費量 16 nmol/s (ml packed cell) より GAPDH/PGK 部位での net flux は 5.3 nmol/s (ml packed cell) と推定される。この値は saturation transfer により求められた $P_i \rightarrow$ ATP 生成速度の 1/190 にすぎない。また、基質としてグルコースを与えたときの消費速度 53 nmol/s (ml packed cell) から解糖系の net flux の最大値をみとめることができる。この方法が明らかに net flux を過大にみとめることとなるが、この推定値 106 nmol/s (ml packed cell) も saturation transfer より得られた単方向速度の 1/10 である。この比較から GAPDH, PGK 部位での $P_i \rightleftharpoons$ ATP の反応は平衡状態に近いところで行なわれていると考えられる。この結論は平衡状態にある GAPDH/PGK 溶液でも $P_i \rightleftharpoons$ ATP の交換反応が観測されたことによつて支持される。

ところで、in vitro での測定においては、ATP α の照射により P_i だけでなく、ATP β にも 60% の saturation transfer が観測された (図 4)。これは ATP α 近傍の ADP β の能和による saturation transfer と考えられ、PGK による $ATP\beta \rightleftharpoons ADP\beta$ の交換反応に由来していると解釈できる。in vivo の測定においてもこの ATP β への saturation transfer は明らかに認められる (図 2)。さらに注目されることは、IAA 処理細胞においては、 P_i への transfer は観測されないのに対し、ATP β への transfer はむしろ無処理細胞より大きくなっていることである。このように $ATP\beta \rightleftharpoons ADP\beta$ の交換反応が $ATP\alpha \rightleftharpoons P_i$ の反応と対向して観測されることも、本実験で観測された P_i の ATP α の取りこみが GAPDH/PGK の反応によるものであるという先の結論を支持する。

References:

1. T.R. Brown, K. Ugurbil, R.G. Shulman (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5551-5553
2. J.R. Alger, R.G. Shulman (1984) Quat. Rev. Biophys. 17, 83-124
3. K. von Meyenburg, B.B. Jorgensen, J. Nielsen, F.G. Hansen, O. Lichelsen (1982) Tokai J. Exp. Clin. Med. 7, Supplement 23-31

(京都府立医科大学) ○吉崎和男、(Pennsylvania 大) 犬伏俊郎、
M.Schnall, J.S. Leigh, B.Chance(Oxford大)G.K. Radda.

〔はじめに〕

演者(吉崎)はすでに本討論会で ^{31}P -NMR スペクトルのみならず、選択的水飽和法を用いれば単離した筋肉や脳組織の ^1H -NMR スペクトルが測定できることを報告した⁽¹⁾。今回、生体組織の *in vivo* 測定としてネコの脳について ^{31}P のみならず ^1H および ^{23}Na -NMR スペクトルの同時測定が単一 surface coil で可能となったこと、さらにヒトの手足の ^{31}P -NMR スペクトルについても報告する。

〔方法〕

用いた NMR 装置は主に米国 Phospho-Energetics 社 PE250-80 NMR で、 ^1H の共鳴周波数 80 MHz (^{31}P :32MHz, ^{23}Na :21MHz) である。有効ボア径 25cm の横型の超電導磁石である。

ネコを麻酔して大腿動・静脈を確保し、気管にカニューレを挿入し人工呼吸を行った。ネコの頭部を頭蓋骨固定器のついたプローブに固定し、頭頂部付近の皮膚および筋肉を電気メスで切除し、直径 25mm の surface coil を置いた。

図 1 に単一 surface coil を用いた二核種同時測定用の回路の一例を示す。surface coil の左側は ^1H 用、右側は ^{31}P 用の同調回路であり、ネコの頭部に surface coil を設置後、各々の同調および整合用コンデンサーを調節した。

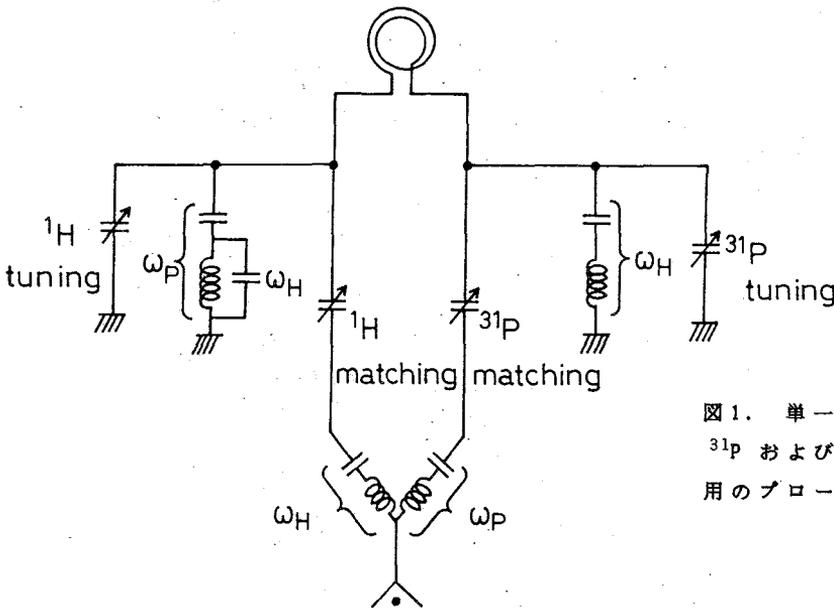


図 1. 単一 surface coil を用いた ^{31}P および ^1H -NMR スペクトル測定用のプローブ内の回路図

よしざきかずお、いぬぶしとしろう、シュネル、リー、チャンス、ラッダ

〔結果および考察〕

図2にネコの頭部（脳）の同時測定した ^{31}P および ^1H -NMRスペクトルを示す。一組のスペクトル測定は約15分である。

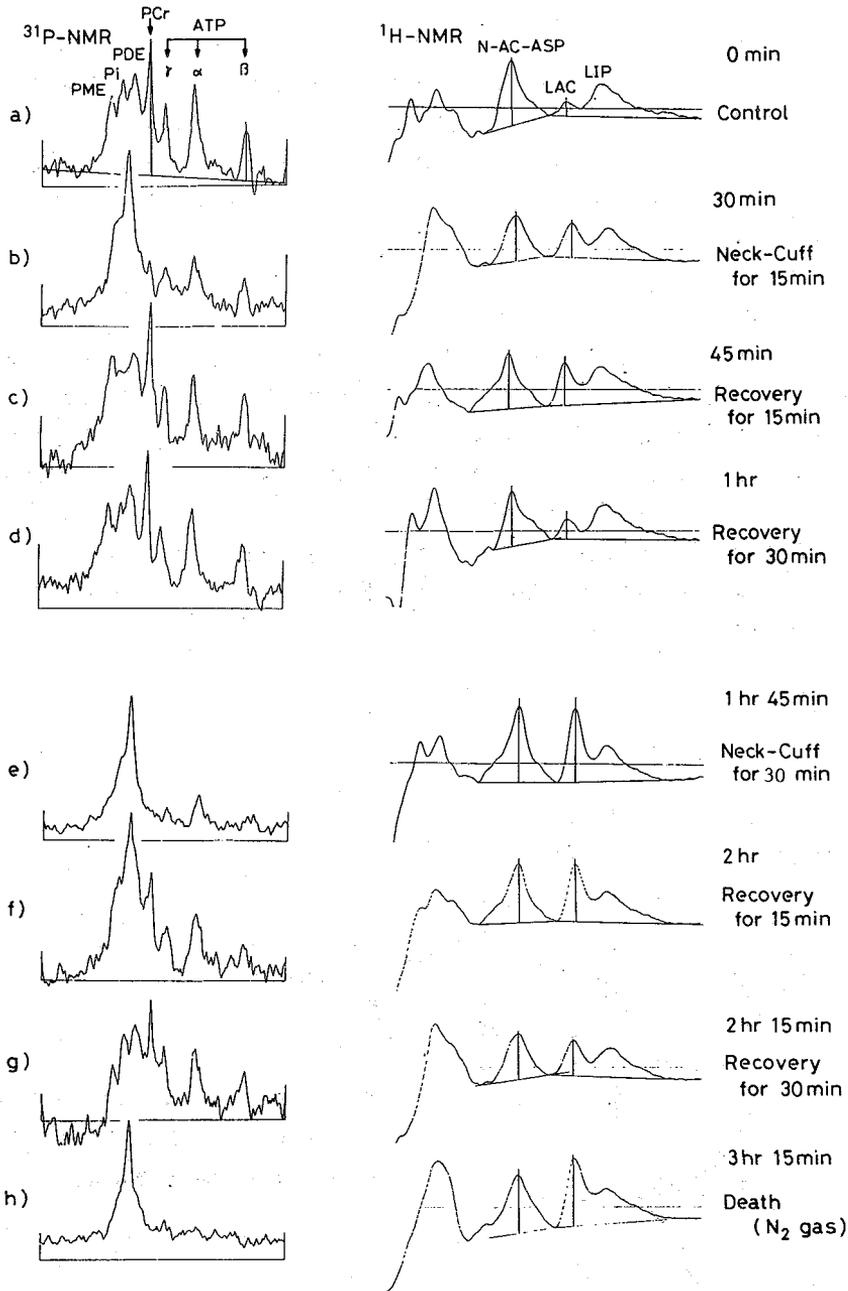


図2. ネコの頭部（脳）の ^{31}P および ^1H -NMRスペクトル。単一 surface coilを用いた同時測定。脳への血流抑制およびその再開通の影響。本文参照。

^{31}P -スペクトルには図2 a)に示す様に右の高磁場側からATP,クレアチン磷酸(PCr),リン酸ジエステル(PDE),無機磷酸(Pi),リン酸モノエステル(PME,従来sugar-Pと呼ばれている)のシグナルが検出できる。 ^1H -スペクトルには乳酸の検出を目的とし、1331パルス系列で測定したもので、最も高磁場側のメチル基のシグナル(LIP:脂質のメチル基か?),乳酸(LAC)およびN-Acetylaspartate(N-AC-ASP)が検出できた。

ネコの頸部に血圧測定用のマンシュート(カフ)をまき、動脈血圧以上の圧をかけて頭部への血流を15分間抑制し(b)、引き続き血流再開後の変化を追跡した(c,d)、血流抑制によりPCrの著明な減少、ATPの減少、Piの増大とその高磁場側へのシフト(pHの酸性化)がみとめられ、この時乳酸も増加した。血流再開後15分間でPCrおよびATPはほぼもとに戻ったが、乳酸もとのレベルへの減少は15分ではみられず30分後にみとめられた。同様に血流を30分間抑制した場合、乳酸の増加がさらに著明となった。ケイレン発作を生じさせるbicucullineを静脈内に投与すると脳波の振巾が著明に増大した。この時PCrの減少や細胞内pHの酸性化、乳酸の増加が認められた。

ところで興味深いことに三核種同時測定にてNaのシグナル強度を測定すると先程の脳血流を抑制した場合、ならびにbicucullineによる脳波の振巾の増大時に、このNaシグナル強度が10~20%減少し、血流再開や、脳波の振巾の減少に伴ない、Naシグナルがもとにもどる傾向がみられた。このNaシグナル強度の減少の原因として、脳への血流抑制時にはATP減少のためにNa-Kポンプが働かなくなり細胞内に Na^+ が蓄積し、bicucullineの場合

は脳の活発化した電気現象のために細胞内Naが蓄積した結果、NMRで観測できるNaシグナルへの寄与が細胞内での四重極相互作用のため小さくなったと考えられる。

以上の様に単一のsurface coilを用いて三核種のNMRスペクトルの同時測定が可能となり、 ^{31}P -NMRはエネルギー代謝を、 ^1H -NMRは乳酸を指標とした解糖系、さらに ^{23}Na -NMRは電気活動の指標として有用であることが明らかになった。

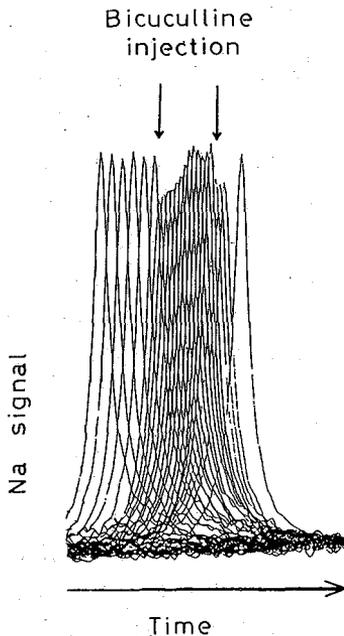
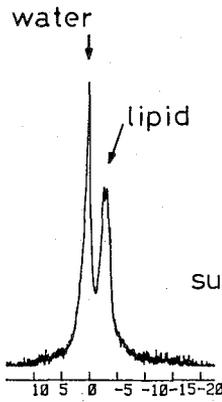
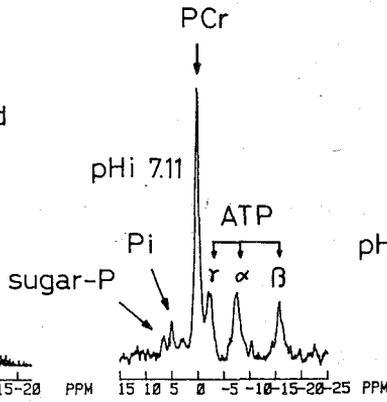


図3、ネコの頭部の ^{23}Na -NMRスペクトル。
Bicuculline投与による変化を重ねがきした。

a) $^1\text{H-NMR}$



b) $^{31}\text{P-NMR}$



c)

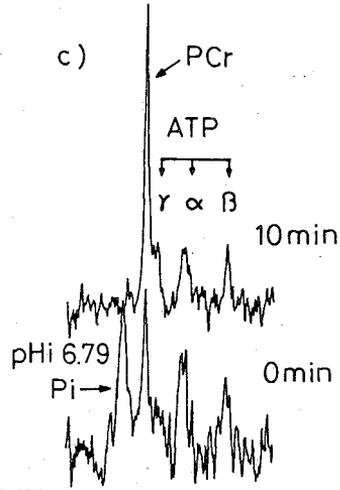
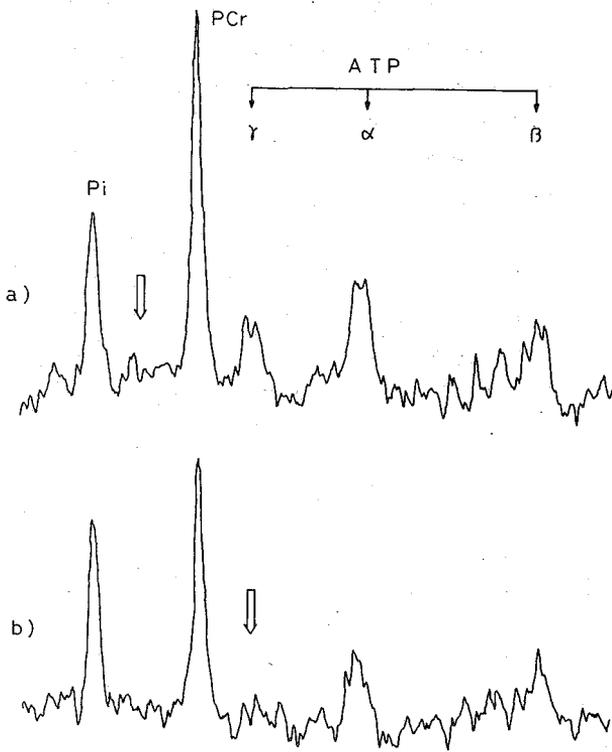


図4. ヒト(演者)の足の a) $^1\text{H-NMR}$ 、および b) $^{31}\text{P-NMR}$ スペクトル、 c) 運動負荷直後および10分後の $^{31}\text{P-NMR}$ スペクトル



最後にヒトの手足のNMR スペクトルを図4 および図5 に示す。図4 a)は足の腓腹筋の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで水および脂肪を検出できる。b)は $^{31}\text{P-NMR}$ スペクトルでPiの化学シフトからpHは7.1であった。運動負荷直後にはpHは8.8まで下がり、10分後にはPCrが回復している。図5 a)はヒトの手の $^{31}\text{P-NMR}$ スペクトルで、運動負荷中である。b)は γ -ATPを照射した場合であり、PCrの減少からcreatine kinaseによる飽和移動が生じていることがわかる。

図5. ヒト(演者)の腕の運動負荷中の $^{31}\text{P-NMR}$ スペクトル(a) および γ -ATP照射時のスペクトル(矢印は照射位置を示す)

〔文献〕

- 1). 吉崎ら 第18回NMR 討論会講演要旨集 (1979), p137
第20回NMR 討論会講演要旨集 (1981), p177

(京都府立医大) ○西川弘恭、(生理研) 瀬尾芳輝

〔はじめに〕

^{23}Na -NMRで水溶性化学シフト剤、 $\text{Dy}(\text{PPPi})_2^{7-}$ を用い、カエル坐骨神経細胞内外の Na^+ の共鳴線を得、その細胞内 Na^+ 濃度を算出し、また細胞内 Na^+ のNMR緩和時間より、 Na^+ の存在状態を解析し、報告した⁽¹⁾。本研究では、低 Na^+ と Na^+ -free等張溶液中に置いたカエル坐骨神経の細胞内 Na^+ 濃度と電気刺激による神経の活動電位発生の関係を上記 ^{23}Na -NMR法を用いて解析したので報告する。

〔方法〕

試料として、食用ガエル坐骨神経を用いた。神経は脊椎骨近傍から大腿膝部までを分離した。分離した神経(4本、約0.5g w.w.)は結合組織を剝離し、リンガー氏溶液に約30分置いた。その後、化学シフト剤含有リンガー氏溶液(NaCl :78.2mM, KCl :2.5mM, CaCl_2 :1mM, $\text{DyCl}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$:4mM, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$:8mM, HEPES:5mM, NaOH でpH7.3に調整)に2時間置いて、 ^{23}Na -NMRスペクトルを得、これを対照とした。NMR測定後、試料を NaCl をCholine chlorideで置換した低 Na^+ または Na^+ -free等張溶液(15°C)に置き、2時間ごとに ^{23}Na -NMRスペクトルを得た。各 ^{23}Na -NMR測定は試料を口紙にて軽くぬぐい、付着した溶液を除去しNMR試料管に入れて行われた。また各NMR測定直前に電気刺激による活動電位を記録した。8時間目のNMR測定後、湿潤重量と乾燥重量を計り、湿性灰化した試料の Na^+ と K^+ 濃度を炎光光度法にて測定した。

^{23}Na -NMR装置はJEOL PFT-100 NMR spectrometerを用いた。磁場は2.1304 Tesla、観測

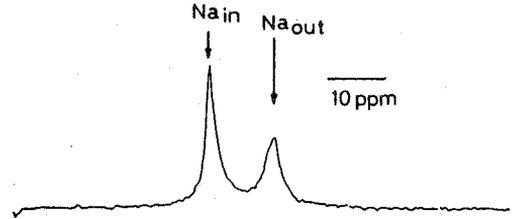


Fig.1. 4mM シフト剤含有リンガー氏溶液に2時間置いた食用ガエル坐骨神経の ^{23}Na -NMRスペクトル。低磁場側共鳴線は細胞内 Na^+ 高磁場側は細胞外 Na^+ による

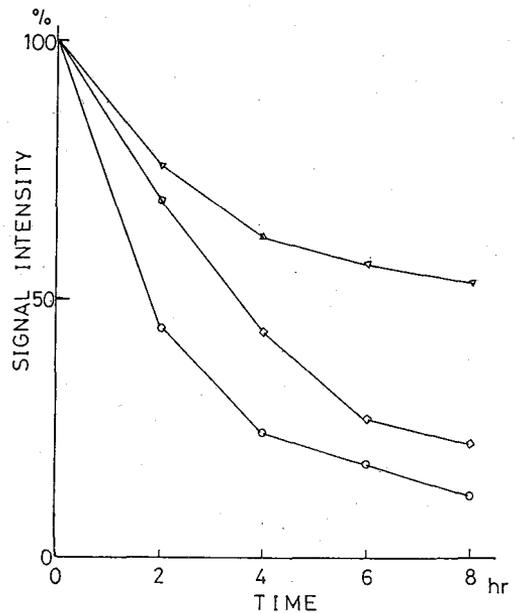


Fig.2. 低 Na^+ -free等張溶液に置いた坐骨神経の細胞内 Na のNMR信号強度の経時的变化。△: 71.7mM, □: 21.0mM, ○: 11.5mMの Na^+ 濃度。

にしかわひろやす・せおよして

れらより、低 Na^+ 等張溶液に置かれた神経の細胞内 Na^+ 濃度の減少速度、すなわち、 Na^+ のefflux rateは細胞外 Na^+ 濃度に依存し、細胞外 Na^+ 濃度が低いほど、efflux rateは大きい。細胞外 Na^+ 濃度が71.7mM, 21.0mMでは細胞内 Na^+ 濃度は細胞外 Na^+ 濃度より低く保たれているが、11.5mMでは細胞内 Na^+ 濃度は細胞外よりわずかに高くなっている。これは8時間目ではまだ平衡状態でないためであろう。Fig.3では8時間目での細胞内外の関係がほぼ細胞外 Na^+ 濃度80mMを境に差異がみられる。これは細胞外 Na^+ の低濃度側では初期の大きな細胞内外の Na^+ 濃度差が Na^+ のeffluxにより急速に減少し、低細胞内 Na^+ 濃度での Na^+ のefflux rateが高細胞内 Na^+ のそれより小さいためと考えられる。

Na^+ -free等張溶液に神経を置いた時の細胞内 Na^+ の信号強度を対照を100%とし経時的にFig.4に示した。●はOuabain ($1 \times 10^{-4}\text{M}$)を添加した場合で、▲は無添加の場合である。各々曲線にNMR測定直前の活動電位を図示した。Table 2に各試料の8時間目での Na^+ , K^+ 細胞内濃度をTable 1と同様の方法で算出した値を示した。Fig.5にFig.4のデータを片対数プロットし、 Na^+ のeffluxの時定数を求めた。Ouabain存在下では1成分(4.9時間)であり、Ouabain-freeでは2成分(4.9時間と1.1時間)の時定数が得られた。また、Ouabain-freeでの2つの異なる時定数をもつ Na^+ のeffluxの各々分画は4.9時間の時定数のeffluxは55%であり、1.1時間のeffluxは45%であった。これらより、Ouabain存在下ではOuabain-freeに比し、Fig.4にみられるごとく、細胞内 Na^+ 濃度は全経過中高く保たれている。これはOuabain sensitive Na^+ active transportがOuabainで阻止されたためであり、Fig.5に示した4.9時間の Na^+ effluxの時定数をもつ拡散によるeffluxのみによるためと言える。Table 2に示したように蛍光光度法から求めた細胞内 Na^+ 濃度でも

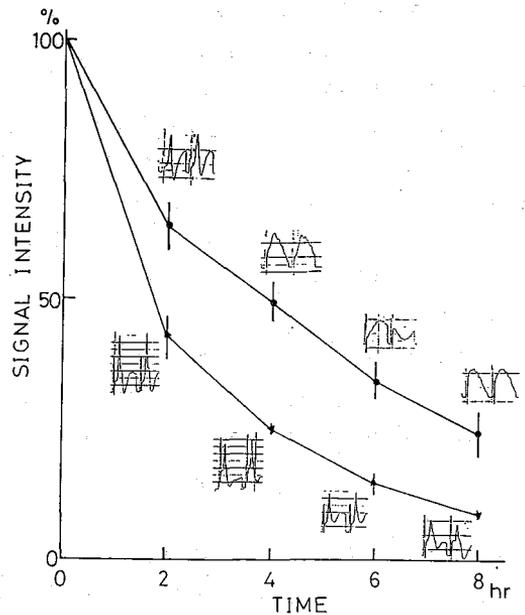


Fig.4. Na^+ -free等張溶液中に置いたカエル坐骨神経の細胞内 Na^+ のNMR信号強度の経時的变化とNMR測定直前に記録された活動電位。●: $1 \times 10^{-4}\text{M}$ Ouabain 添加, ▲: Ouabain 無添加。

Table 2. Fig.4の試料で8時間目に蛍光光度法で得た細胞内 Na^+ と K^+ 濃度。

	$[\text{Na}^+]_{in}$	$[\text{K}^+]_{in}$
● Ouabain +	19.9	56.2
▲ Ouabain -	10.6	59.9

mM/kg w.w.

Ouabain 存在下では Ouabain-free に比し、NMR のデータとほぼ同様の濃度比を示している。電気刺激による活動電位発生については、Ouabain 存在下で 2 時間目まで活動電位がみられ、Ouabain-free では 8 時間目でも活動電位がみられた。両者の差異は Ouabain sensitive Na^+ active transport の有無である。活動電位発生のためには細胞内 Na^+ 濃度は細胞外膜近傍 Na^+ より低くなくてはならない。一方、神経は Na^+ -free 等張溶液に置かれているため、細胞膜表面から十分離れた位置での Na^+ 濃度はほぼ 0mM である。したがって、Ouabain-free で長時間活動電位が観測しうるのは、Ouabain sensitive Na^+ active transport による Na^+ の細胞外膜近傍への輸送が膜近傍から Na^+ -free 等張溶液への Na^+ の拡散による減少より多いことを示している。

〔文献〕

- (1) 西川弘恭、瀬尾芳輝、第 23 回 NMR 討論会講演要旨集、302 ~ 305、1984。

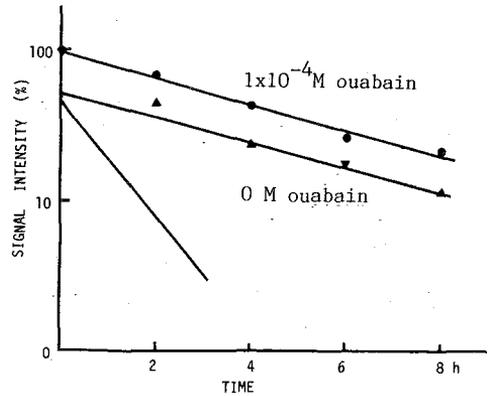


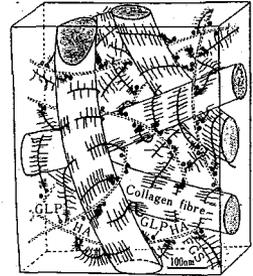
Fig. 5. Fig.4 の片対数表示。 Na^+ -free 等張溶液で Ouabain 添加および無添加の場合について回帰直線を求めた。

(京都府立医大) ○三船哲郎、日下義章、西川弘蒸、山下文治、
榊田喜三郎、(生理研) 瀬尾芳輝

〔目的〕

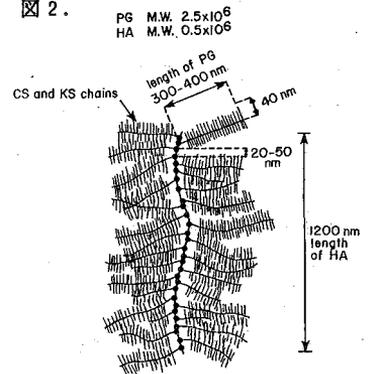
脊椎々間板は脊柱の力学的緩衝系として中心的役割を果たす粘弾性に富む支持組織である。髄核は椎間板の中心に存在するゲル状の軟骨であり、細胞成分に乏しく、大部分が細胞外基質から成る無血管組織である。基質の主要構成体は重量比で約75%を占める多量の水と約20%のコラーゲン(Coll.)及び約5%のプロテオグリカン(PG)であり、Coll.の作る骨組みの中にグリコサミノグリカン(GAG)を主成分とするPGが複雑にからまりあった網目状構造(図1. 2.)をとる。この網目の間に存在する水分は、髄核特有の粘弾性の維持、あるいは髄核細胞への物質の輸送に重要な役割を果たしている。

図1.



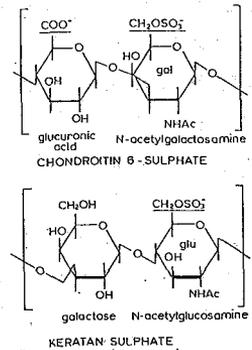
GAGは2糖単位のくり返し構造をもち、コンドロイチン硫酸(Ch-S)は単量体当りカルボキシル基と硫酸基を一個ずつ、ケラタン硫酸(KS)は硫酸基を一個もつポリアニオンである(図3)。この固定された陰性荷電のため髄核内の陽イオン濃度は高く、 Na^+ では組織外液より約2.5倍高くなっている。このイオン濃度差による浸透圧がさらに多くの水分子を基質内にひき込んでいる。

図2.



髄核のColl.は、その85%がtype II Coll.であり、微細な線維束をつくりやすく、PGのしだの葉状構造と相まって、基質内の低分子の自由な運動を制限し基質内に水分子 Na^+ が一層保持されやすくなる。

図3.



以上のように基質を構成する高分子は、水分子、 Na^+ の存在状態と密接に関係しており、これらの運動性に大きな影響を与えていると考えられる。そこで基質構成成分の量的変化が水分子、 Na^+ 運動性に与える影響を明らかにするため、牛尾の椎間板髄核を試料としGAG, Coll.の含有量の異なる髄核を作り、これらの水分子、 Na^+ のNMR緩和時間を測定し解析した。

〔方法〕

屠殺直後の成牛尾部椎間板の髄核を試料とし、一頭の牛より得られた髄核を3群に分け、I群には何ら処理を加え

○みふね、てつろう、くさか よしあき、にしかわ ひろやす、やました ふみはる、
さかきだ きさぶろう、せお よして

ず、control とした。II、III群は0.15M NaClを含むリン酸緩衝液中で37°C、2時間incubationした。III群の緩衝液中には羊羣丸ヒアルロニダーゼを加え、GAGを分解除去した。II、III群では髄核組織はincubationの際に緩衝液を吸収し、摘出時の湿重量の約2倍に膨張した。このため試料を透析膜に包み60%ポリエチレングリコール(PEG)を含む緩衝液中で浸透圧脱水し、摘出時重量と一致するように調整した。以上の3群について、水分子、Na⁺のNMR緩和時間(T₁, T₂)、GAGの密度を示す陰性荷電量(Fixed Charge Density: FCD)の乾燥重量による固形成分量を測定した。

¹H- および ²³Na-NMR緩和時間 表1. JEOL PFT-100 NMR (¹H; 100MHz, ²³Na; 24MHz)

間の測定にはJEOL PFT-100 NMR装置を用い、プロトンでは内部重水ロック、Naでは外部重水ロックを行なった。表1に他の条件を示す。

nucleus	T ₁		T ₂	
	¹ H	²³ Na	¹ H	²³ Na
pulse sequence	180°-τ-90°		CPMG	
repetition time (sec)	20	0.8	25	0.8
pulse interval (msec)	100-2000	2-30	2	1
accumulation (times)	4	80	4	100
temperature (°C)	24			

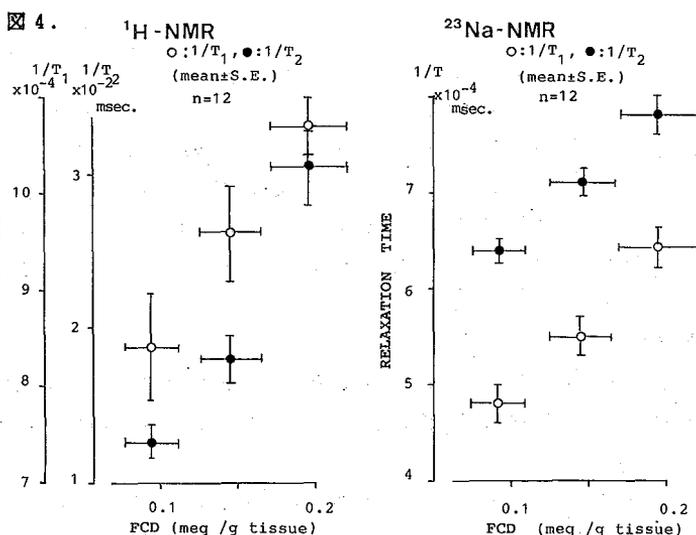
FCDの測定はUrbanら(1979年)のtracer-cation exchange法に準じた。²²Naをtracerとして使用し稀薄なNaCl溶液中で試料内外の

²²Naを平衡させ、そのRI count値からDonnanの平衡を成立させるFCDを求めた。固形成分量は試料を100°C、10日間乾燥した重量とした。

〔結果〕

髄核内FCDと水分子、Na⁺の1/T₁, 1/T₂の関係を図4に示す。右端のpointはI群のcontrolであり、左端はGAGを分解除去したIII群、中間はincubationしただけのII群である。III群のFCDはI群の43%に低下し、II群ではincubationによりGAGが脱失しI群の74%に低下していた。FCDの減少に伴ない水分子、Na⁺の1/T₁, 1/T₂が減少した。また観測されたT₁, T₂緩和過程はともに1成分であった。

乾燥重量から求めた固形成分量と水分子、Na⁺の1/T₁, 1/T₂との関係を図5に示す。右端からI群、II、III群のpointであり、固形成分量の減少に伴ない、水分子、Na⁺の1/T₁, 1/T₂が減少した。固形成分量はGAGとColl. および非コラーゲン性蛋白(non-Coll.)



の合計量である。固形成分量の減少幅は約6.5%であるが、このうちFCDの変化から予想されるGAGの減少は高々3~4%であり、残りの2.5~3.5%はColl. およびnon-Coll.の減少による。
〔考察〕

髄核基質内GAGの密度を示すFCDの減少とともに、基質内の水分子はGAGの作る網目状構造による運動の束縛を受けにくくなり、Na⁺は静電的な束縛を受けにくくなり、運動性が增大することがわかる。また、Coll. およびnon-Coll.量の变化も、

これらのT₁、T₂に影響を与えていると考えられる。そこで、GAG量あるいはColl. およびnon-Coll.量が各々、水分子、Na⁺のT₁、T₂の変化にどの程度影響するかを明らかにする必要がある。

髄核内GAGはほとんどCh-SとK-Sから成り、これらの分画比が約1.0であること、K-SはCh-Sと異なりヒアルロニダーゼで分解されないことを考えるとFCDはGAG量に変換することが可能である。さらに固形成分量よりGAG量を減じた量をColl. およびnon-Coll.量とし図4.5の結果を用いて、GAG量あるいはColl. およびnon-Coll.量と水分子、Na⁺の1/T₁、1/T₂との関係を、各々、図6あるいは図7にプロットした。GAG量あるいはColl. およびnon-Coll.量の減少に伴ない、水分子、Na⁺の1/T₁、1/T₂が減少することがわかる。各図において右端よりI、II、III群を示す。しかし図6

あるいは図7において、各群に含まれるColl. およびnon-Coll.量あるいはGAG量が異なるため、緩和時間の変化は単にGAG量あるいはColl. およびnon-Coll.量に対応しない。

髄核内においてGAG量とColl. およびnon-Coll.量は独立した変化量であるため、各々の重量分率をX(% w/w)、Y(% w/w)とし、測定された緩和時間をT(msec)とし、

$$1/T = aX + bY + c$$

図5.

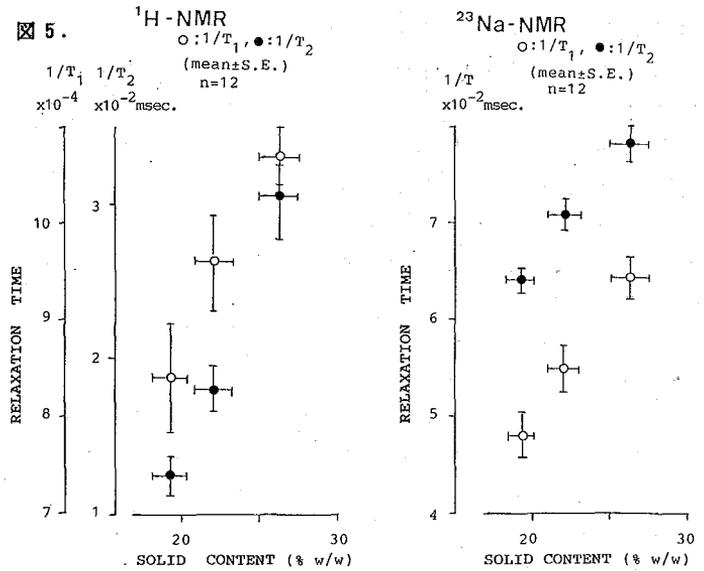
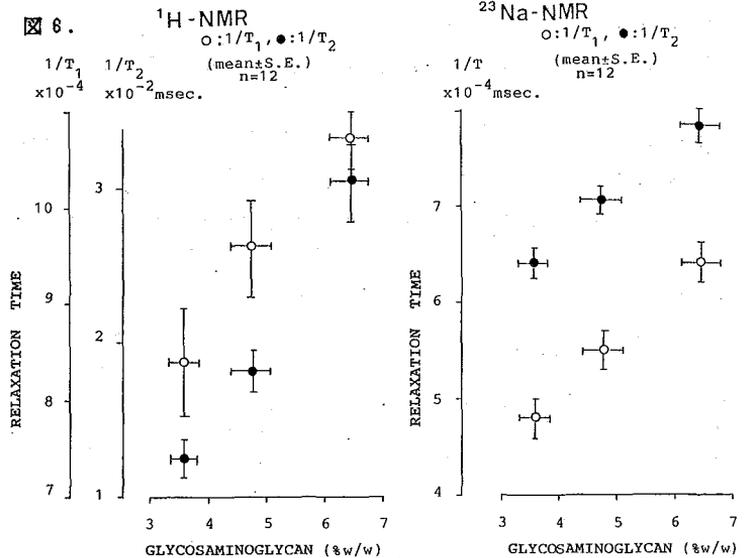


図6.



なる回帰平面で近似した。得られた a/b を表 2 に示す。a/b の値から各々の分画の NMR 緩和時間に与える影響の強さを比較することができる。水分子の T_1 については GAG 量より Coll. および non-Coll. 量の寄与が大きく、 T_2 については逆に GAG 量の方が大きい。 Na^+ の T_1 , T_2 については GAG 量の影響が大きく出現した。今回の実験では椎間板髄核に羊羂丸ヒアルロニダーゼを作用させることによって、GAG が低分子化あるいは分解除去された。このような環境下では水分子、 Na^+ は GAG の立体構造や荷電による運動の制限を受けにくくなり、 T_1 , T_2 が延長するものと考えられた。

また Coll. および non-Coll. 量の変化が認められ、この蛋白量の減少に伴ない結合水量あるいは局所的な Na^+ -space の減少が生じたため、緩和時間が延長するものと考えられた。

軟骨基質の変性では PG の低分子化、GAG 量の減少が早期に出現する。プロトンの T_2 は軟骨変性の評価に良い指標となり得ることが示唆された。

〔文献〕

日下義章ほか： 1H -NMR 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。第 23 回 NMR 討論会講演要旨集，306 ~ 309，1984。

図 7.

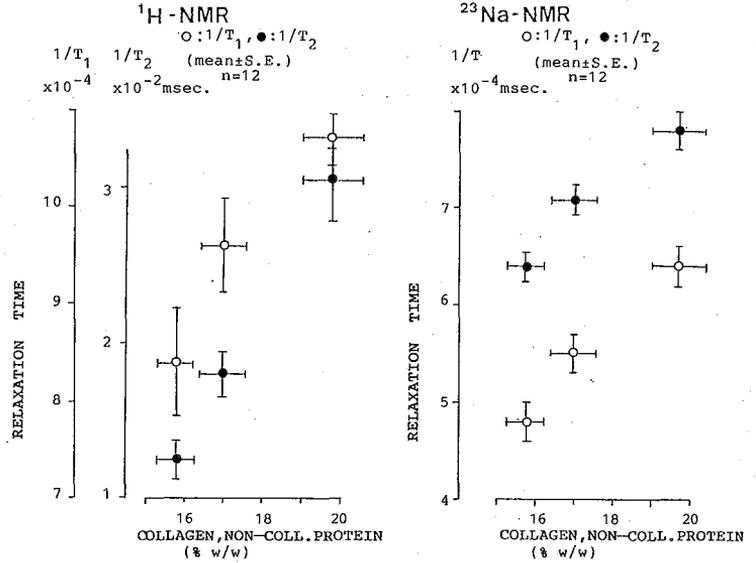


表 2.

	1H -NMR		^{23}Na -NMR	
	T_1	T_2	T_1	T_2
a/b	0.76	2.5	1.3	1.6

(生理研) ○瀬尾芳輝、村上政隆、巨 弘、
(京都府立医大) 西川弘恭、(北大獣医) 松本武久

唾液腺は水・電解質を経上皮的に輸送し唾液分泌を行なう。分泌刺激により唾液分泌が誘発されるが、このとき、エネルギー代謝が亢進する。水分分泌の本態は血管側から管腔側へのイオン能動輸送に伴う浸透流と考えられ、分泌時に増加したエネルギー産生は、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseなどのイオン能動輸送系に主としてATPの形で供給され、消費されと考えられる。静止時、および唾液分泌時の細胞内Naイオンの動態を明らかにすることは、唾液分泌の本態を解明するために不可欠である。今回、灌流ラット顎下腺に水溶性化学シフト剤を用い ^{23}Na -NMR法により静止時および、分泌刺激時における細胞内外のNaイオンの測定を行なったので報告する。

[実験方法]

ラットをチオペンタール麻酔下に手術し、顎下腺(湿重量 0.2g)を100% O_2 で飽和したKrebs-Henseleit Ringer液を用い定流灌流(毎分2ml)した。水溶性化学シフト剤としてDysprosium triethylenetetramine-N,N,N',N'',N'''-hexaacetic acid ($\text{Dy}(\text{TTHA})^{3-}$)を用いた。細胞外に $\text{Dy}(\text{TTHA})$ を添加すると、 $\text{Dy}(\text{TTHA})$ の持つ磁気双極子磁場の影響を受け、細胞外Naイオンの化学シフトは低磁場側へシフトする。一方、($\text{Dy}(\text{TTHA})$)は細胞膜を通れず、細胞内に入ることができない。また、細胞内外でのNaイオンの交換速度はNaイオンの緩和時間に比べ著しく遅いので、細胞内Naイオンは($\text{Dy}(\text{TTHA})$)の影響を受けず、その化学シフトは変化しない。こうして、細胞内、外のNaイオンの信号を分離して得ることができる。NMR測定には、WM-360wb spectrometer(Bruker) (8.45Tesla)を用いた。ラット顎下腺を血管灌流しつつ径10mmの試料管内に設置し、腺外には300mM sucrose液を流し、静脈流出液を洗い流した。 ^{23}Na -NMRスペクトルは観測周波数95.27MHz、 20° RFパルスを用い、スペクトル幅10KHz、積算回数180回(1分間)で測定した。また、 ^{31}P -NMRスペクトルは観測周波数145.8MHz、 15° RFパルスを用い、スペクトル幅10KHz、積算回数1000回(5分間)で測定した。

[結果と考察]

1) $\text{Dy}(\text{TTHA})^{3-}$ のシフト効果と、2価イオンの影響

$\text{Dy}(\text{TTHA})$ は安定度定数が23.29であり、また、カルシウム、マグネシウムとの安定度定数の差は約9であり、Dysprosium triphosphonate ($\text{Dy}(\text{PPPi})^{6-}$)に比べ安定である。Naイオンの化学シフトは、 $\text{Dy}(\text{TTHA})$ の濃度増加に比例して低磁場側へシフトする。 $\text{Dy}(\text{TTHA})$ の化学シフト効果は $\text{Dy}(\text{PPPi})$ のおよそ1/2である(図1)。しかしながら、シフト剤の濃度を高くしても、半値幅の拡がり小さく(図1)。また、Ca、Mgイオンは、シフト効果を小さくするものの、 $\text{Dy}(\text{PPPi})$ をもちいた場合に比べ、その影響は比較的小さい(図2)。

せお よしてゐる、むらかみ まさたか、わたり ひろし、にしかわ ひろやす、
まつもと だけひさ

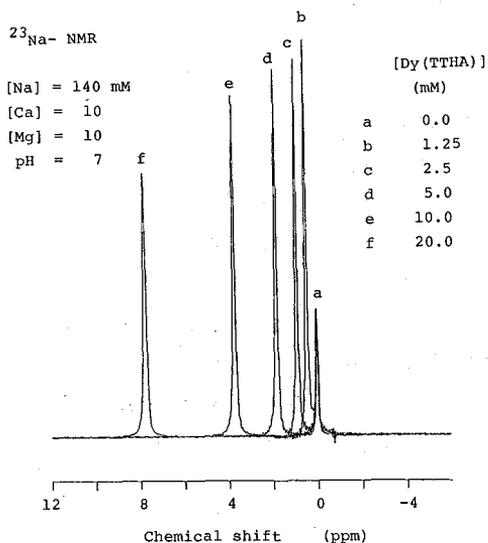


図1. $\text{Dy}(\text{TTHA})^{3-}$ によるNaイオンの化学シフトおよび、線幅の変化。

化学シフトは、10mm径試料管内に設置した5mm径試料管に封入した140mM NaCl溶液の信号(a)を0ppmとして示す。

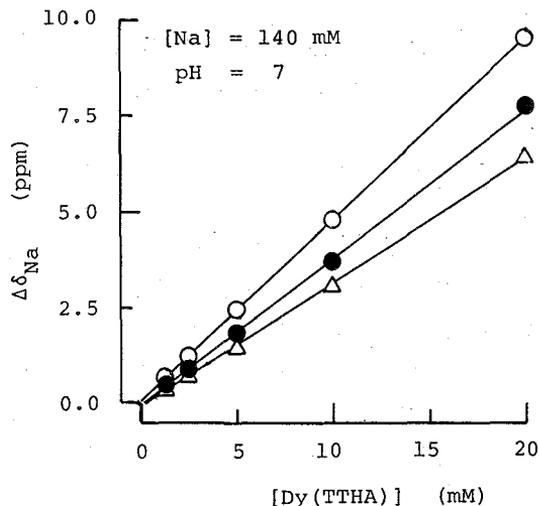


図2. $\text{Dy}(\text{TTHA})^{3-}$ の濃度と、Na化学シフトとの関係、およびCa、Mgイオンの影響。

Ca、Mgの存在しないとき(O)、10mMのCa、Mgを加えたとき(●)、20mMのCa、Mgを加えたときの化学シフトの変化量($\Delta\delta\text{Na}$)を示す。

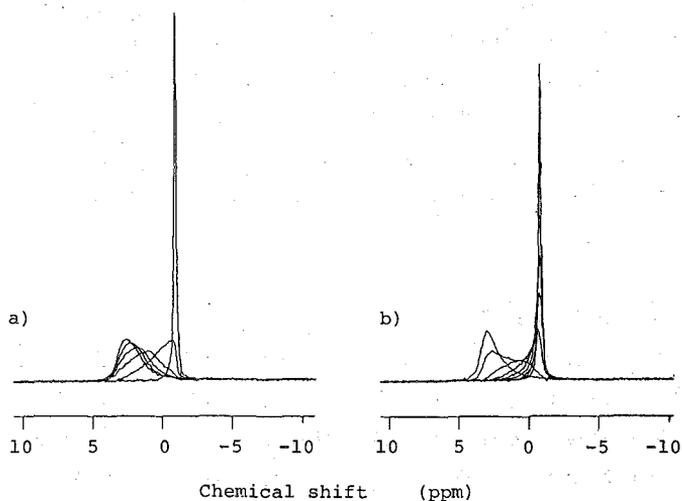


図3. 化学シフト剤の投与(a)、除去(b)に伴う細胞外液Naイオンの化学シフトの変化。ラット灌流唾液腺の灌流液を、10mM $\text{Dy}(\text{TTHA})^{3-}$ 添加した灌流液にかえると、細胞外液のNaは低磁場側へシフトし、かつ線幅が広がる(a)。逆に灌流液を通常リンガー液に戻すと、速やかに、高磁場側へシフトする。各スペクトルは、1分間隔でとっており、灌流液交換は約10分間で終了している。

Ca、Mgイオンは、Dyと競合しTTHAと錯体を形成する。一方、唾液腺において、灌流液中のCaイオンの存在は唾液分泌に不可欠である。10mM Dy(TTHA)の唾液腺機能への影響について検討した、まず、 ^{31}P -NMRを用い高エネルギーリン化合物を測定した。図4-aは、静止時のラット顎下腺のスペクトルである。この腺を10mM Dy(TTHA)を添加したRinger液で灌流したときのスペクトルが、図4-bである。線幅が、いくらかひろがり、約1ppm低磁場側へシフトしているが、ほぼ正常のスペクトルパターンを示している。灌流液中の無機リン酸(*)は大きく低磁場側へシフトしている。線幅の拡がりと、低磁場へのシフトは、シフト剤が細胞内に入ったためではなく、細胞外液空間にシフト剤が入ったことによる静磁場の乱れと考えられる。Dy(TTHA)を灌流液から取りざると、速やかに通常のスペクトルパターンに戻る(図4-c)。また、アセチルコリン 10^{-6}M による分泌刺激を行なうと、唾液は分泌し正常の分泌経過を示した。しかし、分泌量は、約30~50%減少した。分泌量の減少は、TTHAによりCaがキレートされることによる細胞外Caイオン濃度の減少に由来すると考えられる。以上より、Dy(TTHA)の唾液腺機能への影響は小さいと結論される。

2)ラット唾液腺の細胞内Na濃度の測定

10mMDy(TTHA)添加Ringer液で灌流を開始すると、図3-aに示すように約10分間で灌流液および細胞外液の交換が終了する。その後、スペクトルの線形は、少なくとも2時間は安定で、シフト剤を除去すると、図3-bに示すように、速やかに元に戻る。静止状態での ^{23}Na -NMRスペクトル(図5-a Control)では細胞内Naを基準として4ppmに細胞外Naの共鳴線が認められた。細胞外Naの線幅は約1.5ppmと大きくなる。この線幅は、化学シフト剤の細胞外スペースでの濃度分布の不均一によるものと考えられ、その分散は約1.5mMと計算される。

静止状態での細胞内Na濃度は低く、約3mmol/l細胞内液量であった。図5-bにアセチルコリン 10^{-6}M 投与による分泌時の細胞内Naの変化を静止時との差スペクトルで示す。投与5分で、細胞内Na濃度は最大に達し、約15mmol/l細胞内液量の増加を示した。その後、分泌刺激中細胞内Na濃度は高値を保つ。刺激を中止すると、速やかに減少した。(図6)

分泌刺激により、血管側のNa透過性が亢進し、血管側から細胞内へNaが流入し、最終的には、管腔側へNaを放出し、その結果として浸透流が生じ、水分分泌が行なわれるといわれているが、今回、分泌刺激による細胞内へのNa流入を直接観測することができた。

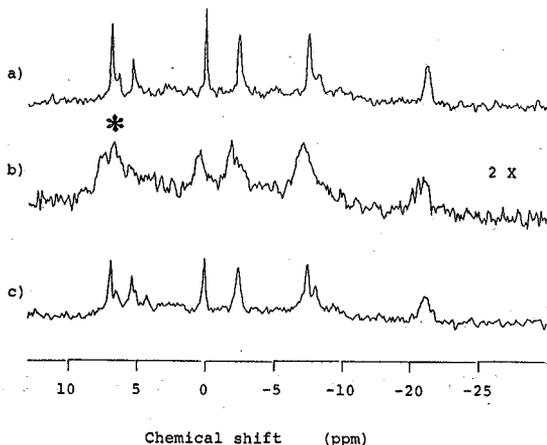


図4 化学シフト剤投与によるラット灌流唾液腺の ^{31}P -NMRスペクトルの変化
a)化学シフト剤投与前、b)10mM Dy(TTHA) $^{-3}$ 投与中、c)化学シフト剤除去後のスペクトル。細胞外液中のリン酸の信号を図bに*で示す。

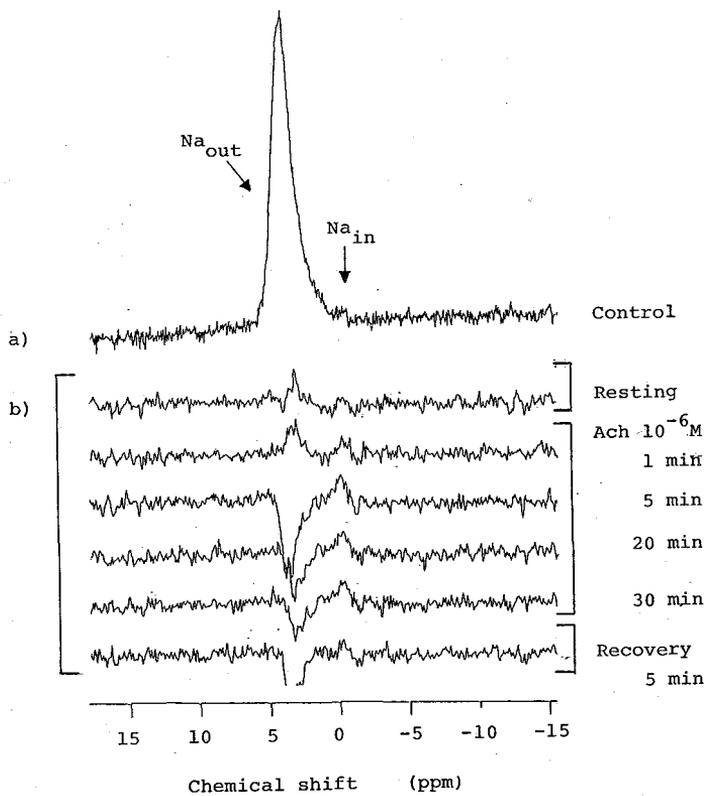


図5. a)灌流ラット顎下腺、静止時の ^{23}Na -NMRスペクトル。b)アセチルコリン 10^{-6}M 投与による細胞内Na (Na_{in}) の変化。静止時のスペクトルをコントロールとして差引いた、差スペクトルで示す。

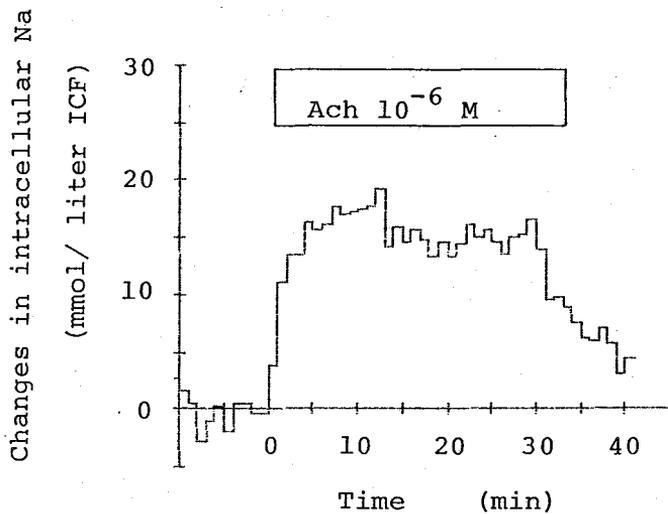


図6. アセチルコリン 10^{-6}M 投与による唾液分泌刺激にともなう細胞内Na濃度の変化。静止時の細胞内Na濃度からの変化分を示す。

京都府立医科大学 ○樋口 敏宏 成瀬 昭二 堀川 義治
田中 忠蔵 平川 公義 西川 弘恭

1 はじめに

最近、¹Hや³¹P以外の他核種NMRの生体への応用がすすめられている。なかでも¹⁹Fは生体内に測定可能な状態ではほとんど存在しないうえに、高いNMR感度を持っており、投与したフッ素化合物の動態の観察にはNMR法が有効であると考えられる。今回われわれは、surface coilを用いたin vivo ¹⁹F-NMR法により生体に投与した揮発性麻酔薬のhalothane、人工血液として開発中のperfluorochemical (PFC; 20% FC-43)の分布および経時的変化について検討を加えた。

2 実験

装置はJEOL SCM200 (4.8 tesla) を用い、測定には直径約10mmのsurface coilを使用した。まず試料管に入れたhalothane液と20% FC-43を測定した (Fig. 1)。次いで Wistar ratをpentobarbital (35mg/kg i.p.) 麻酔下に 1) halothane 0.5%を含むroom airを流下法にて2時間吸入させ、経時的に脳および肝臓から測定を行った (Fig. 2, 3)。2) 20% FC-43 (8ml/kg) を静注直後および24時間後に、脳、肝臓、腹壁筋肉より測定を行った (Fig. 4, 5)。3) Mongolian gerbilをpentobarbital 麻酔下に右側総頸動脈を結紮後、20% FC-43 (8ml/kg) を静注し、結紮側半球と反対側半球から³¹P-および¹⁹F-NMR測定を行った (Fig. 6, 7)。さらに、結紮を解除し脳血流を再開した後にも同様に測定を行った (Fig. 8)。

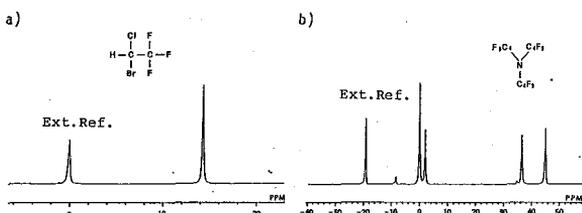


Fig. 1 The ¹⁹F-NMR spectrum; a) liquid halothane and b) 20% FC-43.

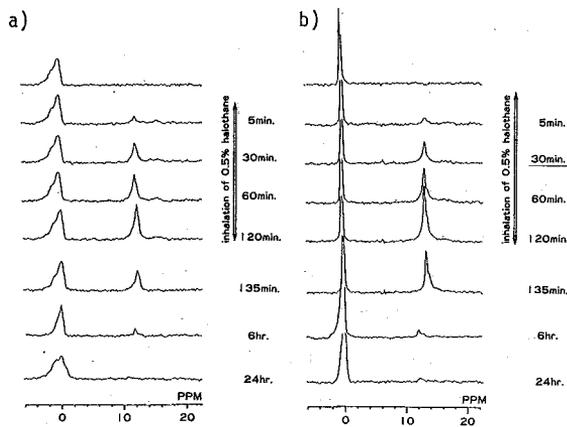


Fig. 2 The sequential changes in ¹⁹F-NMR spectra of halothane obtained from a) the brain and b) the liver, during and after inhalation of 0.5% halothane.

ひぐち としひろ, なるせ しょうじ, ほりかわ よしなる
たなか ちゅうどう, ひらかわ ともよし, にしかわ ひろやす

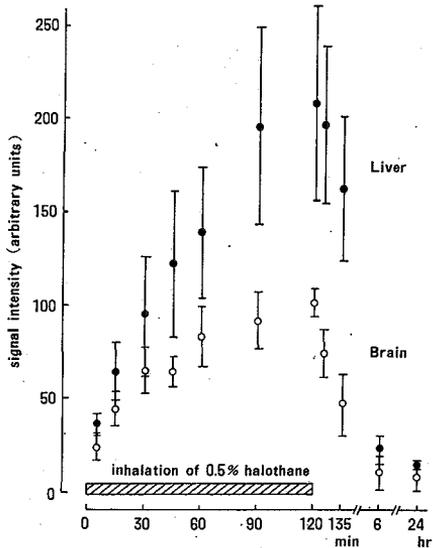


Fig.3 The sequential changes in signal intensity of halothane from the brain and the liver.

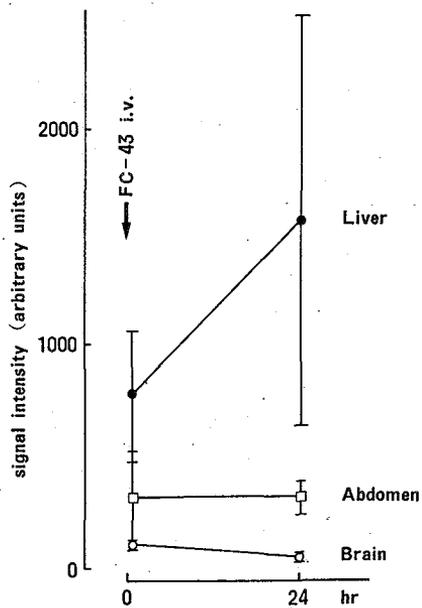


Fig.5 The changes in signal intensity of FC-43 from the brain, the liver and abdominal wall.

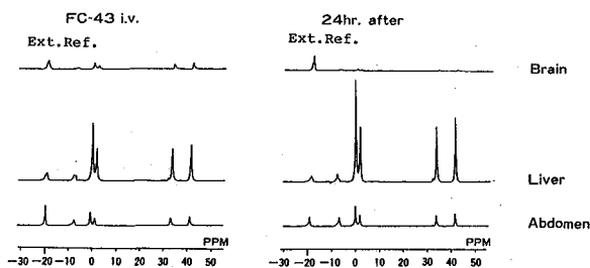


Fig.4 The changes in ^{19}F -NMR spectra of FC-43 obtained from the brain, the liver and abdominal wall immediately after and 24 hours after intravenous administration.

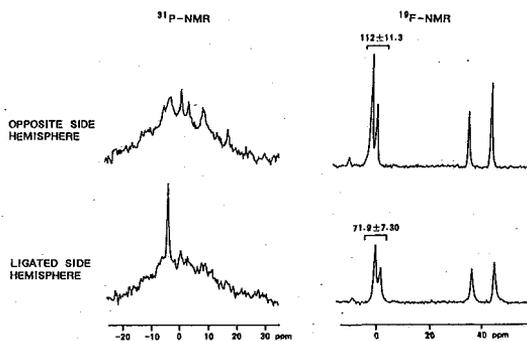


Fig.6 The ^{19}F - and ^{31}P -NMR spectra in the brain of gerbil of which unilateral carotid artery is ligated. Ischemic change is remarkable.

3 結果および考察

^{19}F -NMR spectrumでは halothaneは1つ、FC-43は4つの主要なpeakをみとめた(Fig.1)。halothaneの吸入にて脳からも肝臓からも吸入開始5分後よりpeakが出現し、以後120分後まで増加を示した。吸入を停止すると直後よりpeakの減少を認めしたが6時間後、24時間後でもpeakを観測し得た(Fig.2)。

spectrumを積分することにより、peakのsignal intensityをそれぞれについて定量化し、この経時的变化を調べた($n=5, 6$)。肝臓からのsignal intensityは脳からの約2倍であったがこれは血管床の大きさ、脂質含有量に起因するものと考えられた(Fig.3)。FC-43については静注後、脳、肝臓、および腹壁筋肉からのspectrumは同じpatternを示したがそのpeakの大きさは肝臓>腹壁筋肉>脳の順に高かった。24時間後には脳からのspectrumのpeakは減少し、肝臓からのspectrumのpeakは著明に増大した(Fig.4)。それぞれのpeakのsignal intensityを定量化し経時的变化を調べた($n=5$)。静注直後は肝臓からのsignalは脳からの約8倍であったが24時間後には約33倍となった。これは血管床の大きさ、早期よりおこるPFCの網内系への蓄積に起因するものと考えられた(Fig.5)。

Mongolian gerbilの総頸動脈結紮による実験的脳虚血モデルにおいては、結紮側の ^{31}P -NMR spectrumでATP, phosphocreatineの高エネルギーリン化合物が減少しinorganic phosphateが増大した虚血変化をみとめた群とみとめなかった群に分かれた。前者では ^{19}F -NMRにて結紮側からのFC-43のsignal intensityは反対側の約64%に減少していた($n=6$)(Fig.6)が後者では結紮側と反対側からのFC-43のsignal intensityに有意差をみとめなかった($n=5$)(Fig.7)。さらに前者に脳血流の再開を行うと直後よりFC-43のsignal intensity

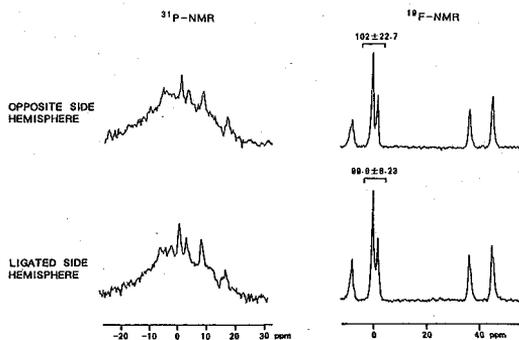


Fig.7 The ^{19}F - and ^{31}P -NMR spectra in the brain of gerbil of which unilateral carotid artery is ligated. No ischemic change was observed.

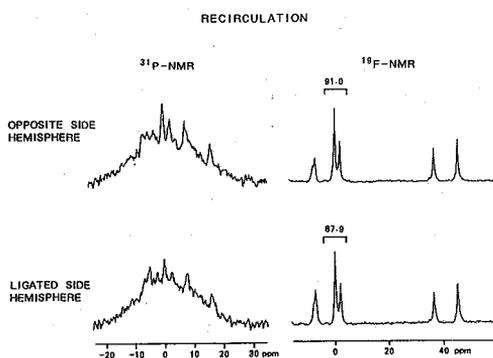


Fig.8 The ^{19}F - and ^{31}P -NMR spectra in the brain of gerbil immediately after recirculation of ligated unilateral carotid artery.

は反対側と同じレベルまで回復したが、脳エネルギー代謝の回復は遅れる傾向にあった (Fig. 8, 9)。また、いずれの場合も反対側の脳エネルギー代謝は障害をうけていなかった。以上よりこのモデルにおいて ^{31}P -NMR により測定される脳エネルギー代謝と ^{19}F -NMR により測定される脳血流は高い相関関係にあることが明らかとなった。また、従来より指摘されていた gerbil の一側総頸動脈結紮による脳虚血の発生が個体によって不確実であることは、個体によっては結紮を行っても脳血流の低下が行わないことに起因することが明らかとなった。

in vivo ^{19}F -NMR は生体に投与したフッ素化合物の分布と経時的変化の追跡に有用であり、特に PFC を血流マーカーとして投与した後に測定を行うことにより脳血流の指標として評価することが可能である。

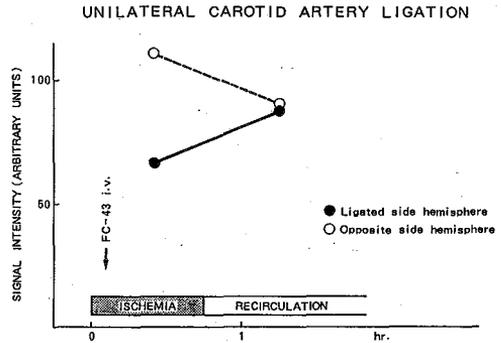


Fig. 9 The changes in signal intensity of FC-43 from the brain during ischemia and after recirculation.

4 文 献

- 1) Horner SD, et al: Proceedings of the 3rd Annual Meeting of SMRM, New York, p.338, 1984
- 2) Naruse S, et al: *In vivo* ^{31}P NMR studies on experimental cerebral infarction. *Jpn J Physiol* 33: 19-28, 1983
- 3) Naruse S, et al: Measurements of *in vivo* energy metabolism in experimental cerebral ischaemia using ^{31}P -NMR for the evaluation of protective effects of perfluorochemicals and glucerol. *Neurol Res* 6: 169-175, 1984
- 4) Naruse S, et al: Observations of energymetabolism in neuroectodermal tumors using *in vivo* ^{31}P -NMR. *Magnetic Resonance Imaging* 3: 117-123, 1985
- 5) Wyrwicz AM, et al: Noninvasive observations of fluorinated anesthetics in rabbit brain by fluorine-19 nuclear magnetic resonance. *Science* 222: 428-430, 1983

○山崎政域, 下村義文* (熊本大・医・生化,*整形外科)

一般に、骨腫瘍・軟部腫瘍では悪性と良性とで治療方針がまったく異なるため、骨腫瘍・軟部腫瘍の診断では腫瘍の良性・悪性の判定が大きな意味をもつ。

われわれはここ数年、n.m.r.による病態の解析をこころみ、ヒト骨腫瘍・軟部腫瘍について悪性の診断・悪性度の評価など臨床診断法としてのn.m.r.の有用性を明らかにした (J. Jpn. Orthop., 58, 83-95 (1984), J. Jpn. Orthop., 58, 97-106 (1984), 第23回NMR討論会 p310-313 (1984))。今回さらに骨腫瘍・軟部腫瘍について、抗がん剤の治療効果判定の有効な診断法としてn.m.r.の有用性について検討した。

n.m.r.による抗がん剤の治療効果の判定の可能性 —ヒトレベルでのアプローチ—

抗がん剤の感受性には個体差があり、正確な効果判定の方法の確立が期待されていることをふまえて、ヒト大腿骨に発生した悪性繊維性組織球腫 (MFH, 軟部腫瘍の一種) を例にとり、抗がん剤投与による組織像の変化と緩和時間 (組織中の水のT₁・T₂)との関連について検討した。

抗がん剤未使用の生検時標本では Malignancy Index (MI, T₁ および T₂ より求め、悪性度をあらわす) が5.22で明らかに悪性腫瘍群のMIを示したが、抗がん剤投与後 (Adriamycin-Tincristine-Methotrexate) の大腿部からの切斷時

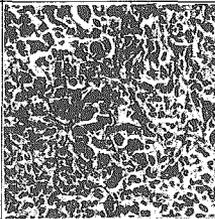
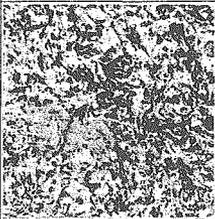
	at the time of biopsy	at the time of amputation
Histological findings		
Malignancy Index	5.21	3.19

Fig. 1 Histological findings and a malignancy index of specimens obtained at the time of biopsy and amputation in the case of MFH.

やまざき まさき ・ じむむら よしふみ

標本では $M.I$ が 3.2 と非悪性群の値を示した (Fig. 1)。切断面標本の組織像 (Fig. 1 右) では病変部のかなりの部分が壊死に陥っており、細胞成分はわずかに存在するものの、その性状は主検時と大きく異なり (Fig. 1 左)、組織学的にも大星の化学療法効果の組織学的判定基準の Grade III に相当する抗がん剤の効果を確認した。

また、骨肉腫 (悪性の骨腫瘍) の症例ごとの (症例の一部を Table 1 に示す)、抗がん剤使用後の標本では未使用標本に比べて予後とは無関係に低い $M.I$ を示す傾向にあることが明らかになった。

Table 1 Summary of 4 cases of osteosarcoma

Case No.	Age	Sex	Chemotherapy before specimen was taken	T ₁ (sec)	T ₂ (msec)	Malignancy Index*	Prognosis after operation in which specimen was taken
1	12	F	+	1.86	9.88	5.54	Alive and well 28 months later
2	17	M	+	1.61	9.96	5.24	Dead 11 months later with pulmonary metastasis
3	66	F	-	1.64	12.68	6.20	Alive and well 14 months later
4	14	M	-	1.51	13.12	6.18	Alive and well 12 months later

このように、 $n.m.r.$ の緩和時間が抗がん剤の効果判定の指標となり得ることが明らかになりつつあるが、抗がん剤の治療効果の判定の診断法として用いるには多数の症例の検討が必要である。この現実には、ヒト骨腫瘍・軟部腫瘍の抗がん剤未投与から投与へと移行していくの出来る症例を短時間に取りまくることは不可能であろう。そこで、「臨床診断法として $n.m.r.$ の有用性を論ずる場合、原則として実験動物レベル (茅炭実験集団) ではなくヒトレベルで研究すべきである」という従来のわかれわかれの主張に変わりはないが、ここでヒトレベルから実験腫瘍のレベルにもとって、抗がん剤の治療効果の判定についての検討を行っていくことにした。

$n.m.r.$ による抗がん剤の治療効果の判定 — 実験腫瘍からのアプローチ —

実験軟部腫瘍として、悪性繊維性組織球腫 (MFH, 2% 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (2mg) を含む R パラフィン 0.1ml を Wistar 系雄ラットの膝関節腔内に 1ヶ月間隔で3回注入し、発生した MFH を同系ラットの背部皮下に移植し継代させたもの) を用いた (Table 2, Tumor)。さらには腫瘍移植1~2週後 (背部に腫瘍を植えるようにした時点)、抗がん剤アドリアマイシン (投与量は Greifeich の換算式を用いる) を投与し、1週後には腫瘍巣を摘出し (Table 2, ADM) 、緩和時間の測定と同時に病理組織標本を作製した。

悪性繊維性組織球腫 (Table 2, Tumor) とは正常組織 (Table 2, Normal) に比べて T_1 ・ T_2 値とも増加 (T_1 値で 1.4 倍・ T_2 値で 2.7 倍) の、両群の重なり

Table 2

	T ₁	T ₂	MI
Normal (n=20)	1.6 ± 0.1	6.6 ± 0.9	2.0 ± 0.2
Tumor (n=20)	2.3 ± 0.1	18 ± 4.2	4.3 ± 0.6
ADM (+) (n=20)	2.1 ± 0.2	10 ± 2.7	2.9 ± 0.5

りはなく、さうく MI の両群を比較しても同様の結果がえられた。つまり、ADM 投与群 (Table 2, ADM ⊕) では悪性腫瘍群にくらべて T₁・T₂ 値ともに減少 (T₁ 値で 10%・T₂ 値で 45% の減少) の、両群の差はなはなく、MI の両群を比較しても同様の減少 (MI で 33% の減少) が認められた。

このように、抗がん剤投与群が未投与群にくらべて明らかに減少した MI を示すことは、緩和時間が抗がん剤の治療効果の判定の指標となり得ることを強く示唆する。

さらにアドリアマイレン投与群について、緩和時間と病理組織像との関連について検討した。がん組織の治療過程や治療効果を組織学的に判定する場合、下の表に示すように Grade 0 から IV までの基準 (大星らの化学療法効果の組織学的判定基準) が用いられる。この基準がうも明らかになるように、Grade 0 および I は抗がん剤による治療が無効であることを示し、Grade II ~ IV は有効であることを示している。Grade II では増殖の可能性のあるがん細胞の存在が認められ (IIa, IIb は単にがん細胞の量的な程度を示すにすぎない)、Grade

化学療法効果の組織学的判定基準

Grade 0	癌に照射効果を認めない
Grade I	細胞障害は認められるが癌巣パターンは破壊は認められない
Grade II	細胞障害、癌巣パターンの破壊が認められる
A	再増殖の可能性の強い形態的にかなりよく保たれた癌細胞が広い範囲に存在する (たとえば腫瘍全断面の 1/4 以上に)
B	増殖の可能性のあるかなりよく保たれた癌細胞が小範囲に認められる (たとえば全体の 1/4 以下に)
Grade III	"non-viable" と思われる癌細胞のみが認められる
Grade IV	癌細胞はまったく認められない
A	広範な壊死巣を伴う
B	主として肉芽組織よりなる
C	緻密組織よりなる

Ⅲは生存不能と思われる高度K変性したがん細胞のみが認められ、また Grade IV では a, b, c とともに生存がん細胞が認められないことをあらわしている。臨床診断法としては、抗がん剤の投与Kより Grade II・Ⅲ・IV のどの Grade K移行したかを迅速かつ正確K知ることK大きな意味がある。

アドリアマイシン投与Kよる腫瘍組織(悪性繊維性組織球腫)の緩和時間とその病理組織像との関連を Table 3 K示す。Grade IIa → Ⅲ → IVa と悪性度が低くなるKにしたがって T₁ 値も減少し、病理像Kよける化学療法効果の大きさが T₁ 値K反映することK明らかにす。

Table 3 ADM投与群の病理組織像(大星らの分類による)

Grade	症例数	T ₁	T ₂	M I
Grade 0				
Grade I				
Grade IIa	4	2.29	10.7	3.05
Grade IIb				
Grade III	8	2.13	10.6	2.92
Grade IVa	4	2.01	10.7	2.87
Grade IVb				
Grade IVc				

ここで再びヒトレベルKもとり、ヒトレベルでの抗がん剤の治療効果の大きさと緩和時間との関連をより明確Kするため、継続して症例を数多く集めることK努力している。

第 3 日

11 月 8 日 (金)

A 会 場

NMRスペクトル法によるDNAの構造の研究(第5報)
 d-ヌクレオチド—シクロデキストリン包接体とNMRスペクトル
 (化技研) 石塚靖子・名川志信・中西洋志・小本修

1. シクロデキストリンは水溶液中で種々の化合物と包接現象を起すことが知られており最近、触媒や人工酵素の簡単なモデルとして関心を集めている。本報告では、種々のシクロデキストリンとDNAモデルである α -D-ヌクレオチドとの相互作用についてNMR法を用いて研究を行ったので、その結果について発表する。

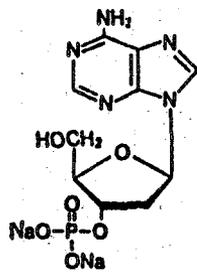
2. 実験 試料の α -及び β -D-ヌクレオチド及び α , β , γ -シクロデキストリン(CD)は市販品をそのまま用いた。NMRスペクトルの測定は、JEOL FX-200, GX 400分光器を用いて行った。基準物質は、トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-d₄とし、キャピラリーを用いた。試料は重水溶液とし、濃度は $2 \sim 5 \times 10^{-2} M$ である。¹H NMRスペクトルの解析はLAOCNプログラムを用いて行った。

3. ¹H, ¹³C NMR化学シフト

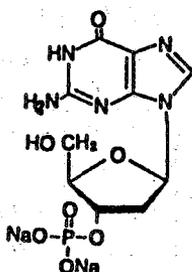
α , β , γ -CDのそれぞれを α 及び β -dAMP, dGMP, dCMP, dTMPとナトリウム塩と混合し、その¹H-及び¹³C NMRスペクトルを測定した。その化学シフトを単体のみの水溶液のピークの化学シフトと比較した結果、 α -CDはこれらのヌクレオチドとほとんど相互作用を行わず、 β -CDは強く相互作用すること及び、 γ -CDは弱く相互作用をしていることがわかった。濃度変化などをを行い、CDとヌクレオチドとの混合による化学シフトの変化を検討した結果、この相互作用は分子間の水素結合によるものではなく、CDとヌクレオチドとの包接現象であることが推論された。

表1に、包接相互作用が最も強いと考えられる β -CDと β -ヌクレオチドと2:1に混合した時とそれぞれの単体の時との化学シフト差($\Delta\sigma$)を示す(室温)。¹H NMR化学シフトにおいて、核酸塩基部分では、dAでは2位、dGでは8位のプロトンがかなり大きく移動し、dCでは5位と6位のプロトンは互に反対方向に大きくシフトする。dTでは変化はほとんどない。又、ヌクレオチドのd-リボース環のプロトンも大きくシフトする。特に2位のメチレンの2個のプロトンが大きく変化を示す。一方、相手の β -CD

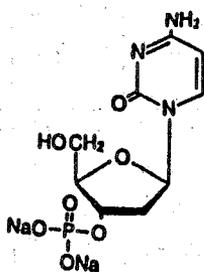
A34



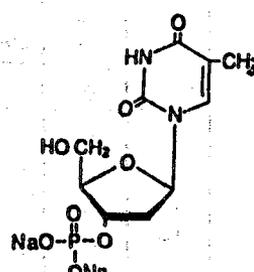
3' dAMP



dGMP



dCMP



TMP

いしづかやすこ, 「おがわよしのお, 「おかにしひろし, やすもとのおさむ

の $\Delta\sigma$ は値としては、ヌクレオチドのものよりかなり小さい。これは、 β -CD が7個のグルコースからできており、平均化されるためであり、この点を考慮すると、CDの炭素にもその $\Delta\sigma$ が相当大きいものがあると予想される。

次に ^{13}C NMRスペクトルの場合にも、ほぼ同様のことが言える。すなわち、塩基部分ではdA, dGで大きな高磁場シフトを示す炭素が存在する。dCの5位, 6位の炭素の化学シフトの移動はかなり小さい。dTの変化は非常に小さい。d-リボース環では、2'位の炭素がdA, dG, dCとも非常に大きく低磁場シフトしている。その他に、dA, dGの3', 4'及び5'位の炭素が大きく低磁場シフトしている。又、1'位の炭素は逆に高磁場シフトを行う。混合によるシグナルのシフトの方向は、各原子によってかは

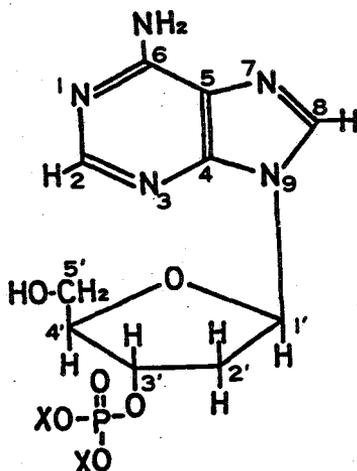


表1. 3'-ヌクレオチドと β -CDの混合によるNMRの化学シフトの変化 ($\Delta\delta$, ppm)

Assignment		^1H				^{13}C			
		3'-dA	3'-dG	3'-dC	3'-dT	3'-dA	3'-dG	3'-dC	3'-dT
NUCLEIC ACID	2	+0.044	—	—	—	+0.19	-0.83	—	-0.20
	4	—	—	—	—	+0.51	+0.56	—	-0.21
	5	—	—	-0.133	—	-0.63	-0.64	-0.54	-0.09
	6	—	—	+0.099	-0.007	-0.27	-1.15	-0.29	-0.09
	8	+0.006	+0.051	—	—	-1.68	-1.37	—	—
	CH ₃	—	—	—	-0.006	—	—	—	+0.17
	1'	+0.047	-0.010	+0.071	-0.006	-0.88	-0.87	—	+0.10
	2'	-0.097	-0.091	+0.005	+0.005	+1.97	+1.66	+0.95	+0.09
	2'	-0.129	-0.023	-0.120	-0.027	—	—	—	—
	3'	—	—	+0.064	+0.033	+1.10	+0.92	+0.47	—
4'	+0.077	+0.056	+0.074	+0.025	+0.71	+0.81	0.00	+0.17	
5'	—	+0.082	—	—	+0.70	+0.59	+0.71	+0.15	
CD	1	-0.032	-0.037	-0.013	-0.006	-0.10	-0.17	-0.15	-0.20
	2	-0.043	-0.053	-0.038	-0.012	-0.29	-0.34	-0.19	-0.22
	3	+0.004	+0.019	+0.029	+0.005	-0.08	-0.13	-0.13	-0.15
	4	-0.024	-0.040	-0.009	-0.004	-0.31	-0.24	-0.19	-0.19
	5	—	-0.090	-0.047	-0.021	-0.17	-0.12	-0.09	-0.12
	6	-0.098	-0.087	-0.040	-0.014	-0.34	-0.22	-0.15	-0.15

混合により低磁場シフトするものは+ (プラス)、高磁場シフトするものは- (マイナス)

り不規則である。分子内水素結合、磁気異方性の効果、立体圧縮効果など要因はかたはり複雑であり、包接体の立体構造が現在わかっていないので、詳細な検討は今後の課題である。

d-ヌクレオチドにおいて、リン酸ナトリウム塩が5'位と3'位に結合したものを測定した結果、3'リン酸塩の方が5'リン酸塩よりも混合による $\Delta\sigma$ がかたはり大きいことが明らかになった。3'-リン酸塩の方が包接が行いやすい(多分立体効果)のであろう。又、水溶液のpHを変化させると、(pH 7.0 と pH 9.3) d-ヌクレオチドでは、中性よりアルカリ性の方が $|\Delta\sigma|$ が大きく、3'-ヌクレオチドでは余り大きな差はないことがわかった。

スピン結合定数

上述したように、化学シフトの変化からCDとヌクレオチドの間に包接現象があることがわかったが、この相互作用について、d-リボース環のスピン結合定数を求めて情報を得ようとした。図1に3'-dAMPの3'-CH₂の¹H NMRシグナルパターンを示す。β-CDを3'-dAMPに加えると、図1bに示したように、スペクトルパターンは大きく変化する。β-CDの添加により、化学シフトだけではなく、スピン結合定数(J)もかたはり大きく変化していることがわかる。d-リボース環には、7個のプロトンが存在し、5'位のメチレンの2個のプロトンは大部分非等価である。¹H NMRスペクトルのパターン解析では、¹Hとリンとのスピン結合が問題になる。リンの隣接するスペクトル部分を解析すると、例えば5'-dAMPでは、5'位のCH₂とのスピン・カップリングは $J_{PH} = 4.0$ 及び 5.0 Hz、3'-dTMP及び3'-dCMPでは、3'位のプロトンとのスピン・カップリングはそれぞれ $J_{PH} = 6.2$ Hz、 8.0 Hzである。その他のプロトンとリン核とのカップリングは非常に小さいことがわかった。リボース環の¹Hスペクトルのコンピューターシミュレーション解析の際には、スピン系を2個に分割してそれぞれのスピン結合定数を求め、それを使って最終的に7スピン系で解析を行った。その結果の一部を表2に示す。試料によっては、CD及びH₂Oの大きなシグナルと重複し、シミュレーション解析が不可能であった。

図1. 3'-dAMP・2Naのd-リボースの2'-CH₂の¹H NMRパターン
a) ヌクレオチドのみ、b) β-CD添加。

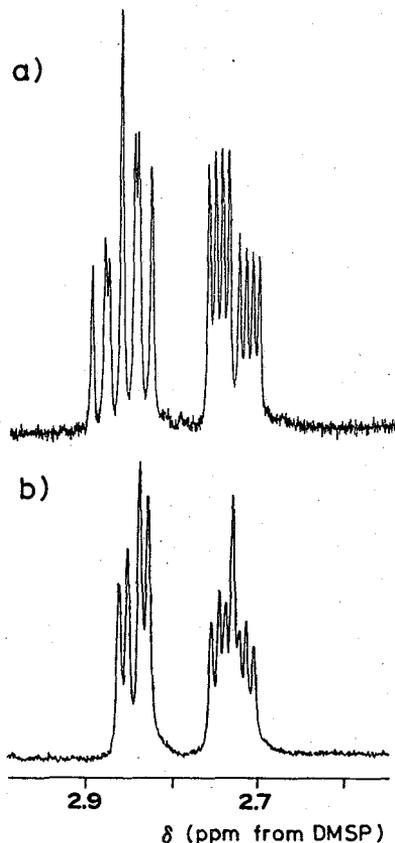


表2から明らかのように、3'-dAMP及びdGMPでは、β-CDを加えると、得られたスピン結合定数は大きく変化している。3'-CMPでも変化が認められる。しかし、3'-dTMPではほとんど変化がない。このことから、β-CDは3'-dTMPと包接体を

表2. 3'-d-ヌクレオチド及びβ-CD添加水溶液でのd-リボース環のプロトンのスピン結合定数 (Hz)

	J _{1'2'A}	J _{1'2'B}	J _{2'A3'}	J _{2'A3'}	J _{2'B3'}	J _{3'4'}	J _{4'5'A}	J _{4'5'B}	J _{5'A5'B}	J _{ps'}
3'-dAMP	6.6	7.3	-13.9	3.0	6.7	3.6	3.4	3.2	-12.4	—
3'-dGMP	6.9	6.4	-13.9	3.7	8.1	3.3	3.9	3.5	-12.5	—
3'-dCMP	6.6	6.8	-13.9	3.9	7.2	3.9	4.9	3.6	-12.6	8.0
3'-dTMP	6.7	6.9	-14.1	4.1	7.0	3.9	4.5	3.8	-12.5	8.2
3'-dAMP+β-CD	9.2	5.5	-13.4	4.9	0.5	—	—	—	—	—
3'-dGMP+β-CD	8.8	5.9	-14.1	5.7	0.1	—	—	—	—	—
3'-dCMP+β-CD	6.5	6.9	-13.6	3.2	7.0	—	—	—	—	—
3'-dTMP+β-CD	6.6	6.9	-14.0	3.9	7.2	—	—	—	—	—

形成しないことが明らかである。その原因としては、dTMPは他の3個の核酸塩基と異って分子内にアミノ基をもたないためであり、又、5位のメチル基が邪魔をすることなどが考えられる。

本研究では、水溶液系での包接現象を取扱っており、水溶液中では包接体と非包接体の平衡になっている。従って、我々が観測しているスペクトル・パターンは、包接体と非包接体との平均化したものであり、表2に示した後段のスピン結合の値は、包接体そのものスピン結合定数ではない。そのために、この値を用いて、包接体の立体構造、すなわち、d-リボース環の立体配座、及びC-Nグリコシド結合の廻りの立体配座 (syn, anti) の詳細について論じることはできない。しかしながら、β-CDを添加した際に、J_{1'2'A}, J_{1'2'B}, J_{2'A3'}, 及びJ_{2'B3'}が (特に3'-dAMP, 3'-dGMPに於て) 大きく変化していることは、これらのヌクレオチドが包接によってリボース環の立体配座、及びC-Nグリコシド結合の廻りの立体配座に於て、かなり変化していることを示唆しているものと考えられる。

表3にリボース環の1'位の炭素と水素とのスピン結合定数J_{CH}の値を示す。3'-dTMPではβ-CDを添加するとJ_{CH}の変化はわずかであるが(1Hz)、3'-dAMP, dGMP, dCMPでは、かなり大きい(5~6 Hz)。4'位のJ_{CH}も同様の傾向が認められた。これらの実験結果は、上に述べた立体配座の変化を示しているものと推論される。

表3. 3'-ヌクレオチドの1'位のC-Hスピン結合定数(Hz)

ヌクレオチド (N)	J _{CH} (N)	J _{CH} (N+CD)	ΔJ _{CH}
3'-dAMP	167.2	162.4	-4.8
3'-dGMP	167.2	162.5	-4.7
3'-dCMP	164.8	158.7	-6.1
3'-dTMP	170.3	171.5	+1.2

文献

- 1) M. L. ベンダ, 小宮山 「シクロデキストリンの化学」 学会出版センター
- 2) Y. Ishizuka, Y. Nagawa, and H. Nakanishi, J. Inclusion Phenomena, 2, 781 (1985).
- 3) 石塚, 名川, 中西, 第12回生体分子の構造に関する討論会 1985年7月(仙台)

(織高研) 〇曾良達生 古沢清孝 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を検討してきているが、その過程で3',5'部にケイ素を含む6員環構造をもつヌクレオシド環状ケイ素誘導体が、二官能性ケイ素試薬を用いて比較的容易に合成できることを見出し報告してきた。これらのヌクレオシド環状ケイ素誘導体は、3',5'部に6員環構造をもつ点で、3',5'-cAMPをはじめとする3',5'環状ヌクレオチドと類似している。昨年のNMR討論会において、デオキシチミジン誘導体など4種のヌクレオシド環状ケイ素誘導体について、¹H-NMRによる糖部分のコンホメーション解析を行い、これら誘導体においても3',5'環状ヌクレオチドと同様、糖部分のコンホメーションが固定されていることを報告した。今回は、アラビノシルアデノシン誘導体を含む4種につき¹H-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報告する。また、すでに糖部分のコンホメーション解析を行った誘導体のうち、デオキシアデノシン誘導体(DTBSdA)については、グリコシド結合まわりのコンホメーションについていくつかの検討を行ったので合わせて報告する。

2 実験

試料は、アラビノシルアデノシンから合成された3',5'-O-(ジ-tert-ブチルシランジイル)アラビノシルアデノシン(DTBSdA)の他、Fig. 1にその化学構造を示したDTBSdG, DTBSdU, DTBSdCの計4種であり、いずれも対応するヌクレオシドより硝酸銀の存在下で二官能性ケイ素試薬を用いて合成された。

NMR測定は、DTBSdUについては重クロロホルムを、他の試料についてはDMSO-d₆を溶媒として室温(20℃)にて行った。測定に用いた装置はNicolet NT-360である。

シグナルの帰属は主にCOSY法により行い、化学シフト、スピン結合定数はシステム付属のプログラムであるITRCALを用いてコンピュータシミュレーションにより決定した。

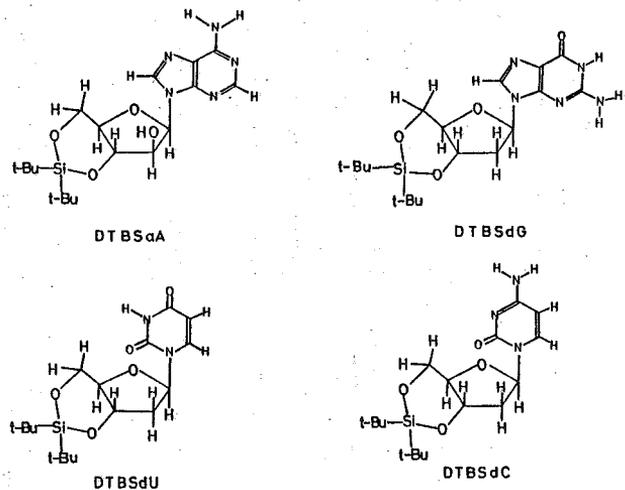


Fig. 1 ヌクレオシド環状ケイ素誘導体の化学構造

かつらたつお・ふるさゆきよたか・うえのかつひこ・さかいつかさ・つだけいしろう

化学シフトは内部規準として加えたTMSからの値である。

DTBSdAについては、減圧下脱気、封入した試料を用い温度変化、T₁測定などを行った。

3 結果・考察

(a) DTBS誘導体の糖部コンホメーション

Fig. 2には、4種のDTBS誘導体の糖部プロトン領域の¹H-NMRスペクトルをシグナルの帰属とともに示した。(DTBSαAのH2', H3'シグナルの区別にデカップリング法を併用した以外、帰属はCOSY法で容易に行えた。)デオキシリボ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H1'と大きなスピン結合定数を示す側をH2'とし他方をH2''とし、また5'位の2個のプロトンについては低磁場側をH5', 高磁場側をH5''と定義してある。

化学シフト、スピン結合定数の決定はコンピュータシミュレーションに依ったが、スピン結合定数の初期値としてすでに解析したDTBS誘導体のうち類似のスペクトルを示すものの値を用いることで容易にシミュレーションを行うことができた。

Fig. 3には、各シグナルについて実測スペクトル(下側)とシミュレーションにより得

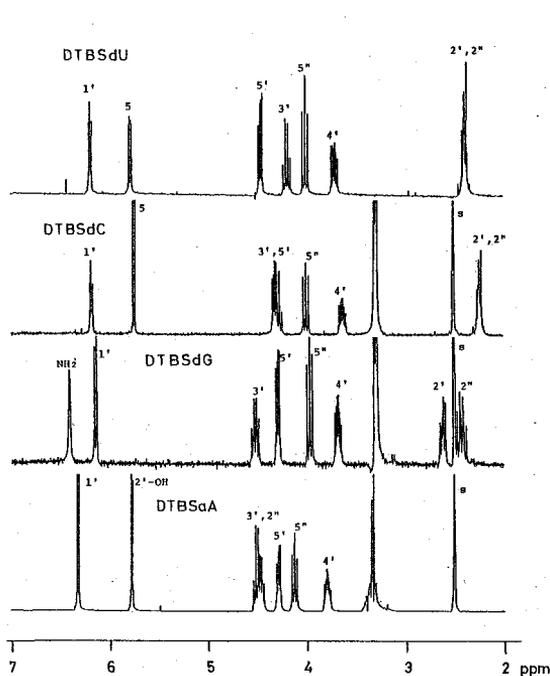


Fig. 2 ヌクレオシド環状ケイ素誘導体の¹H-NMRスペクトル

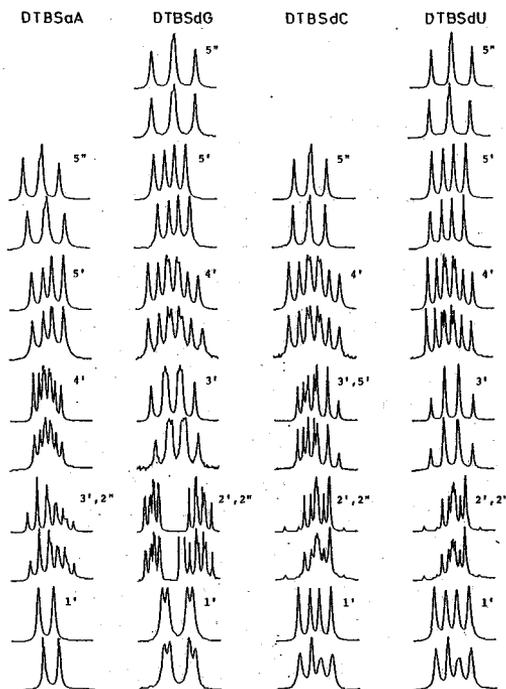


Fig. 3 実測(下側)とシミュレーションによるスペクトル(上側)

られたスペクトル(上側)とを対にして示した。良好な一致が見てとれる。シミュレーションの結果得られた化学シフトの値をTable 1に示した。またTable 2にはスピン結合定数とビシナルスピン結合定数からKarplus式を用いて算出した2面体角が示してある。これらの結果とすでに解析したDTBS誘導体の結果とを合わせる。

TABLE 1. CHEMICAL SHIFTS (PPM FROM INT, TMS)

	DTBSAA	DTBSdG	DTBSdC	DTBSdU
V(1')	6,316	6,141	6,178	6,186
V(2')		2,618	2,229	2,372
V(2'')	4,458	2,426	2,248	2,395
V(3')	4,510	4,517	4,274	4,184
V(4')	3,789	3,680	3,625	3,704
V(5')	4,281	4,286	4,313	4,451
V(5'')	4,121	3,961	3,991	3,996

とDTBS誘導体の化学シフト、スピン結合定数について次のような特徴を抽出できる。

① デオキシヌクレオシド誘導体では、H2', H2''の化学シフトはペリミジンヌクレオシドではほぼ等しい値をもつが、プリンヌクレオシドにおいてはH2'が0.2 ppm程度低磁場側にある。

② H3'の化学シフトは、プリンヌクレオシド誘導体の場合にはペリミジンヌクレオシド誘導体と比し低磁場側に観測される。

③ H1', H3'の化学シフトはゴージャウ位の2'-OHにより高磁場側にシフトする。

④ J(3',4'), J(4',5'), J(4',5'')といった6員環形成に参与する部分のスピン結合定数は、塩基、糖の種類に無関係に非常に良く似た値を示す。さらに残りのスピン結合定数も対応するものどおし似た値を示している。

Table 2 に示した2面体角からも明らかのように、DTBS誘導体の糖部コンホメーションは、3',5'部の6員環形成により固定され、塩基、糖に依らずほぼ同一となる。

TABLE 2. COUPLING CONSTANTS (HZ) AND CALCULATED DIHEDRAL ANGLES (°)*

	DTBSAA	DTBSdG	DTBSdC	DTBSdU
J(1',2')		1.9 (112)	1.9 (112)	2.1 (113)
J(1',2'')	7.2 (27)	8.9 (12)	9.2 (6)	8.5 (17)
J(2',2'')	5.7	-12.8	-13.0	-13.7
J(2',3')		7.6 (25)	8.4 (18)	8.0 (21)
J(2'',3')	8.9 (150)	10.4 (160)	9.8 (156)	10.0 (160)
J(3',4')	9.1 (151)	9.0 (151)	9.0 (151)	9.1 (151)
J(4',5')	5.1 (41)	4.9 (42)	5.0 (41)	5.1 (41)
J(4',5'')	10.4 (160)	10.4 (160)	10.5 (161)	10.4 (160)
J(5',5'')	-8.9	-9.3	-9.2	-9.5

* KARPLUS EQUATION (1) WAS USED,

$$^3J_{(H,H)} = 10.5 \cos^2 \phi_{HH} - 1.2 \cos \phi_{HH} \dots \dots (1)$$

シオンは、3',5'部の6員環形成により固定され、塩基、糖に依らずほぼ同一となる。

2面体角をモデルをもとに算出した値と比較すると糖部のコンホメーションは、G'-endoないしC4'-exoと考えられる。

グリコシド結合まわりのコンホメーションについての知見が化学シフト値の検討

やNOE測定、 T_1 測定といった手法により得られることはよく知られている。
 こゝでは、すでにX線結晶構造解析結果が得られているDTBSdAについて得られた、
 いくつかの知見について報告する。

(b) DTBSdAのグリコシド結合まわりのコンホメーション

前述した①、②の特徴はアリン塩基がSynコンホメーションをとるとき期待される、
 化学シフト値の変化に対応している。また2次元NOE測定の結果 $H_{1'}$ と H_8 間でNOE
 ピークが観測されることから、当初、DTBSdAはクロロホルム溶液中でも結晶中と同
 様Synコンホメーションをとっていると結論した。しかしながらアデニン環8位プロト
 ンを重水素化した8D-DTBSdAを用いた T_1 測定の結果やNOE差スペクトル測定
 さらには糖部プロトンの化学シフトの温度依存性などの結果から、クロロホルム中では、
 Syn-Anti平衡が成立していると考えられる。

Table 3 には8H-DTBSdAと8D-DTBSdAの糖部プロトンの T_1 値を示
 した。アデニン環8位プロトンの重水素化にともない、 $H_{1'}$ および $H_{3'}$ の T_1 値が顕著に
 増大している。アデニン環8位プロトンが $H_{1'}$ と空間的に近い位置のコンホメーションは
 Synに、また $H_{3'}$ と空間的に近い位置のコンホメーションはAntiに対応することか
 ら、Syn, Anti両コンホメーションの存在が結論される。

TABLE 3. T_1 DATA OF DTBSdA (SEC)

	$H_{1'}$	$H_{2'}$	$H_{2''}$	$H_{3'}$	$H_{4'}$	$H_{5'}$	$H_{5''}$
① 8H-DTBSdA	2.17	0.72	0.62	1.55	1.57	0.90	0.77
② 8D-DTBSdA	2.94	0.78	0.64	1.91	1.60	0.91	0.81
① - ② / ①	0.35	0.08	0.03	0.23	0.02	0.01	0.05

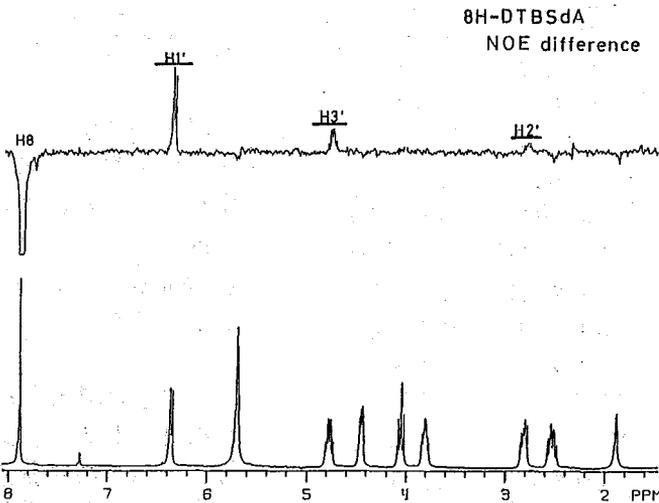


Fig. 4には8H-DTBSdAにつ
 いて、 H_8 を照射したときのNOE
 差スペクトルを示した。 $H_{1'}$ 、 $H_{3'}$ 、
 $H_{2'}$ にNOEが観測され、Syn, An-
 ti両コンホメーションの存在を示
 している。さらに温度上昇にともな
 い $H_{3'}$ 、 $H_{2'}$ のシグナルが低磁場側へ
 移動する結果も室温においてSyn-
 Anti平衡が成り立っているという
 結論を支持するものである。

← Fig. 4 8H-DTBSdAの
 NOE差スペクトル(H_8 照射)

(阪大蛋白研) 西本正三、阿久津秀雄、京極敏正

〔はじめに〕 遺伝子の本体であるDNAと遺伝子の発現を調節したり、構造を安定化したりする種々の蛋白質の間の相互作用の解明は遺伝情報発現の分子論的解釈を与えるものとして関心をもちられている。細菌のような比較的簡単な細胞(原核生物)においては、遺伝子発現の誘導の機構をもとに研究が進められており、多くの成果を上げている。しかし、高等生物の細胞(真核生物)においては、その遺伝を担う器官が原核生物に較べると量的ばかりでなく、形態的にも機能的にも大きく異っており、その制御性高次の構造レベルを伴って行われていると考えられている。特に真核生物に特有なクロマチンの構造は特定遺伝子の転写、DNA複製、細胞の分化に重要な役割を果たしていると思われるが、その実態はほとんど明らかにされていない。この中で基礎構造としてのヌクレオソームの発

見とその三次構造の研究の進展はわかれぬクロマチンに対する理解を大きく前進させた。このような基礎的構造体の解明の上に、実際に機能している巨大構造体の研究を進めていく手段の開発も重要な課題となっている。NMR、特に固体NMRはこのような巨大な構造体を

intactな状態で研究するのに適している。今回、わかれぬ水は ^{31}P 固体NMRを用い、intactなニワトリ赤血球細胞におけるクロマチンから、単離精製したヌクレオソームコアに到る迄の幾つかのレベルのクロマチン試料について研究を行ない、それらの動的構造について、及びその相互関連について若干の知見を得たので報告する。

〔試料の調製〕 ニワトリの血液より赤血球を得、これを0.5% Nonidet P40 を含むSTM buffer (10mM NaCl, 10mM Tris, 3mM MgCl_2 pH7.4) で懸濁した後、4000g 10分間の遠心で核を得た。試料から界面活性剤を除く為に、STM buffer で更に3回洗った。クロマチンはこうして得た核をTE buffer (1mM Tris, 0.2mM EDTA pH7.4) に懸濁することにより得た。精製した核をmicrococcal nuclease で処理し、これを1mM Tris, 1mM EDTA pH7.4 に懸濁して核をこねし、debrisを除いて可溶性クロマチンを得た。次に0.65M NaCl 存在下で、ヒストンH1 H5 を取り出し、これを10000g で除いて、H1, H5 除去クロマチンを得た。このH1, H5 除去クロマチンを用い

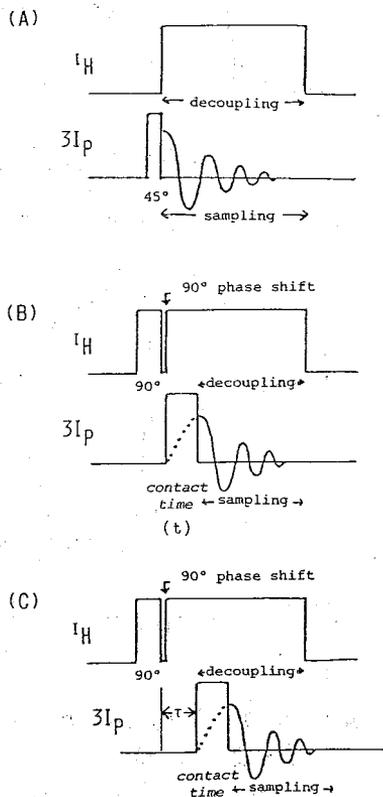


図1 (A) single pulse, (B) cross polarization (C) ^1H -Tip測定用のパルス系列

にしよとしようを、あくつひで、きようごくよしませ

micrococcal nuclease で処理することによりヌクレオソームコアを得た。純度はポリ
アクリルアミドゲル電気泳動で確認した。

[NMR測定] NMRの測定はJEO LFX-100 NMR分光装置に固体用高出力増幅
器、温度制御可能な³¹P高出力プロープヘッドを接続させて行なった。プロトニ照射による
温度上昇は、校正曲線をつくって補正した。測定用試料は特に断水できない限り、30%

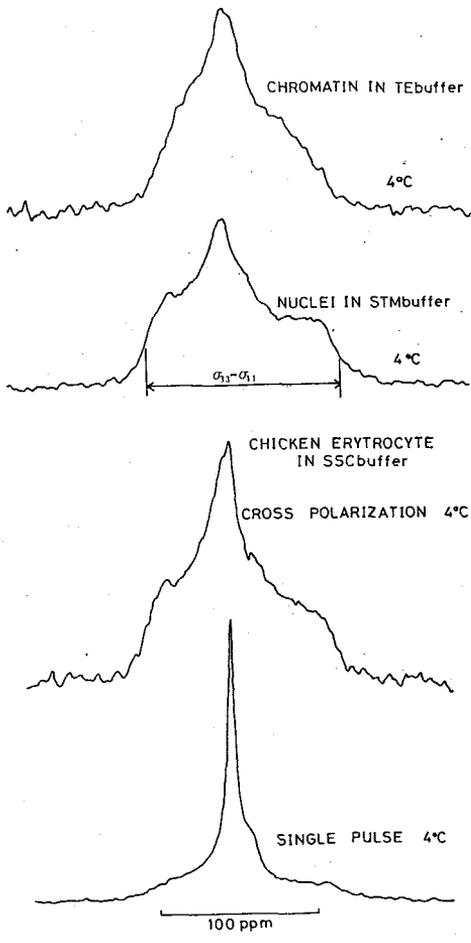


図2 赤血球、核及びクロマチンの³¹P
NMRスペクトル

下から赤血球のシングルパルス、
クロスポーラリゼーションスペクトル、
核及びクロマチンのクロスポーラ
リゼーションスペクトル。赤血球はsucroseを
含む。

sucroseを含むbufferに対して透析したものである。NMR測定は図1に示すようなシングルパ
ルス法あるいはクロスポーラリゼーション法を用
いて行なった。¹HのTipの測定は図1Cのように
¹Hの90°パルスと³¹Pのcontact pulseの周
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1の一番下に intact な
ニワトリ赤血球のシングルパルス法による4°Cの
スペクトルを示す。ニワトリの赤血球細胞には様
々の可溶性リン酸化合物、膜中のリン脂質、DN
A、RNA等が存在する。これは完全にこのスペ
クトルに反映している。ここから核内のDNA由来
のシグナルを分離する為に、クロスポーラリゼ
ーション法を用いた。この方法では運動の遅い
のみを観測でき、可溶性分子の寄与を除くこと
ができる。DNA由来と、膜由来のスペクトルを
区別するにはこれらの接触時間(contact time)

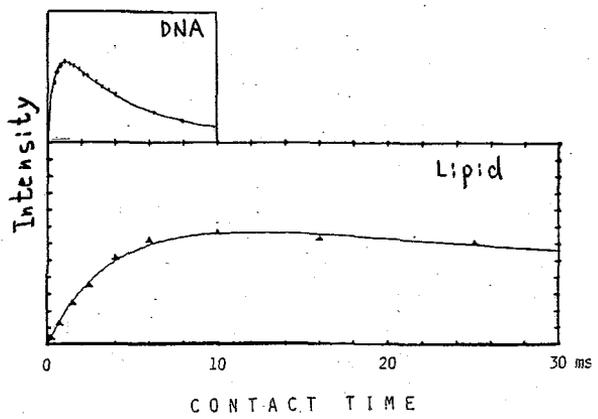


図3 クロマチン及びレシチン二重膜(液晶)の
クロスポーラリゼーション強度の接触時間依存性

依存性の違いを利用した。図3に示すように、クロスポーラリゼーションの効率も最大となるのはクロマチンでは接触時間1msであるが、液晶状態の二重膜では10msあたりである。従って、接触時間1msで測定すれば、DNA核子の密着が圧倒的になると考えられる。そのような条件で測定したスペクトルが図2の下かき二番目のスペクトルである。これは核束束のスペクトルであることはその上の単離した核のスペクトルと比較すると明らかである。これは典型的な非対称パワーパターンであり、核中のDNAの運動が著しく制限されていることを示す。化学シフトの異方性の大きさの目安である($\sigma_{33} - \sigma_{11}$)は共に155ppmであり、クロマチンの構造に関する限り、単離した核とintactな細胞内の核にはほとんど違いがないことを示している。そこで、以後は単離核と、核膜を破壊したクロマチンについて、詳しく検討を行なった。核内のクロマチンのrigidな構造をテスト

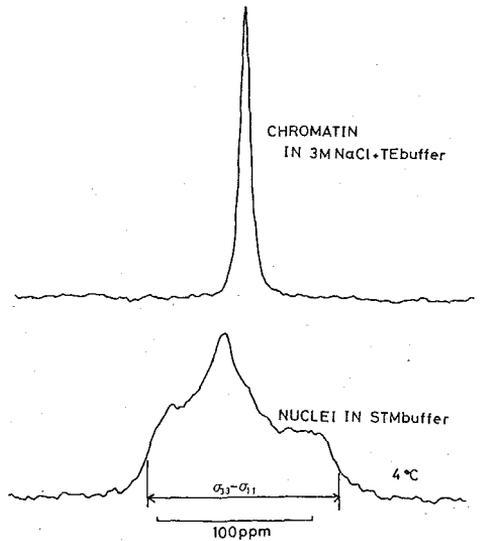


図4 核及び3M NaCl存在下のクロマチンの ^{31}P -NMRスペクトル

同等の核内蛋白質との相互作用によるものであることを図4の結果は示している。3M NaCl存在下ではDNAと結合しているほとんどの蛋白質が外れることが知られているが、そのような条件下では典型的な等方的スペクトルを与え、DNAの運動が著しく速くなっていることがわかる。

このように構造のrigidityを示す化学シフトの異方性を温度を変えて測定した結果を図5にまとめた。intactな赤血球でも、単離核でも、又核膜を除いたクロマチンでもほとんど同じ結果を与え、ここで観測されているクロマチンのrigidity

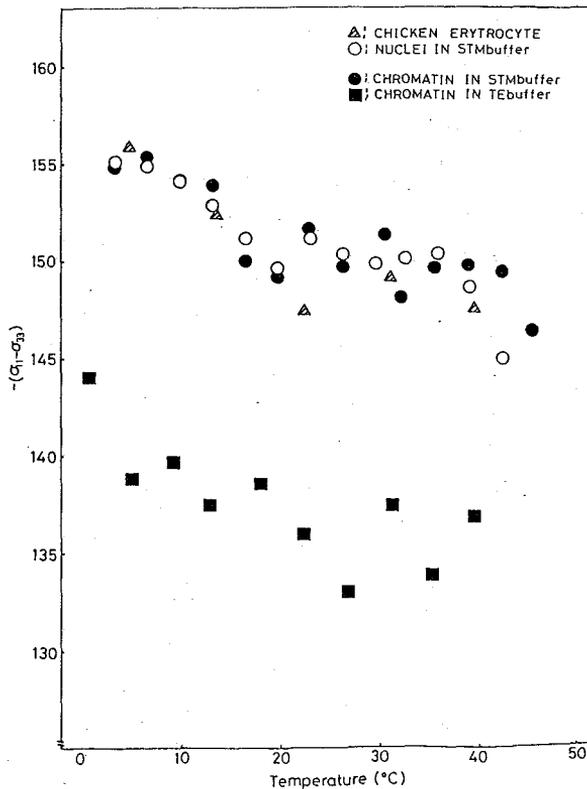


図5 化学シフトの異方性の温度依存性

は核のスパーズによるものではなく、蛋白質との相互作用によってのみ決まっていることがわかる。ところがNaClもMgCl₂も存在しないTEbuffer中では化学シフトの異方性は10 ppm程度減少する。そのような条件下で測定したスペクトルは図2の一番上に示してある。

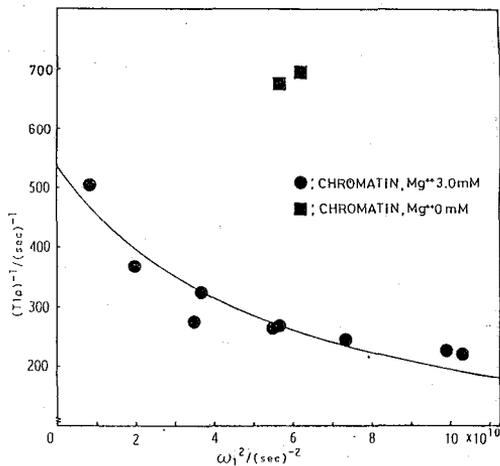


図6 クロマチンの¹H-T_{1ρ}に対するMg²⁺の影響

と一致する。このことは intactなクロマチンでも、この濃度領域でヌクレオフィラメントからソレノイド構造への転移が起こることを示している。しかし、NMRから見るとNaClによってつくられるソレノイドと、MgCl₂によってつくられるものにはそのrigidityに若干の差があることがわかった。

次にクロマチンの最も基本的な構造であるヌクレオソームコアにおけるDNAの運動性を調べた。ヌクレオソームコアとはヒストン8量体にDNAが1.75回転左巻きに巻きついたものである。その³¹P固体NMRスペクトルをクロマチンと比較したものを図7に示す。ヌクレオソームコア中のDNAの化学シフトの異方性は約159 ppmで、クロマチンのそれより約10%だけ大きいだけである。このことはクロマチンで観測される異方性はほとんどヌクレオソームコアで決っており、環境が変わることにより運動性が高くなるとそれが更に平均化されて、減少することを示すものである。

このような変化は単に化学シフトの異方性だけでなく、DNAの¹HのT_{1ρ}にも現われている。図6はクロスポーラリゼーション法で測定した¹HのT_{1ρ}と振動磁場の強さω₁の二乗に対してプロットしたものであるが、Mg²⁺が存在しないと存在する時に較べてT_{1ρ}は著しく短かくなっている。このようなNaCl, Mg²⁺の影響の原因を調べる為に、クロマチンを使ってNaCl, Mg²⁺の濃度変化を行なった。濃度を零から上げていくと、NaClでは10~50 mM, MgCl₂では0.1~0.3 mMで化学シフトの異方性の増大が見られた。これは可溶性クロマチンの電子顕微鏡等による研究で、ヌクレオソームの連なったヌクレオフィラメントから、よりrigidなソレノイド構造への転移を引き起こす濃度領域

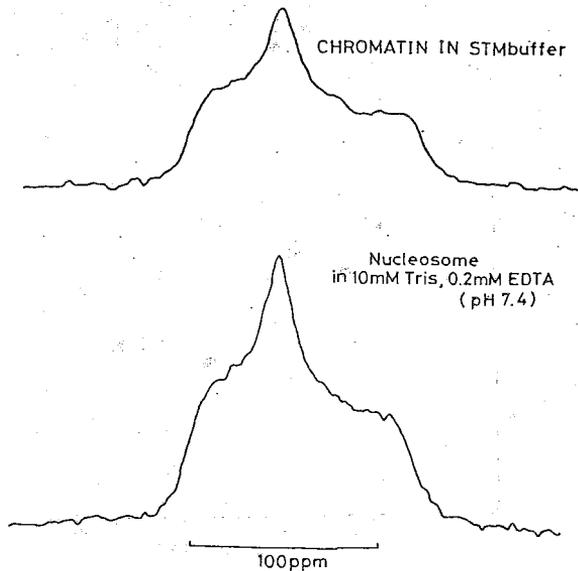


図7 クロマチンとヌクレオソームコアの³¹P-NMRスペクトル

光CIDNP法によるタンパク質の研究

—免疫グロブリンを例にして—

(阪大蛋白研) 林 文晶, 京極 好正

(東大.理) 遠藤 聡史, 荒田 洋治

〈はじめに〉 近年NMR法は、高磁場化やパルステクニックなどの発達で、さまざまな系へ広く応用され成果をあげてきたが、分子量が数万を超える分子種への応用となると、今日でも困難さにはそれほど変わりがない。生体中で重要な機能をもつ分子—タンパク質など—は分子量が数万を超えるものが多く、最近のパルステクニックの恩恵にあずかりうるものの方がむしろ例外的である。Kapteinらによって開発された光CIDNP法は、そのシグナル強度に露出度の情報を含むということはもちろん、スペクトルパターンが特徴的でそれが変化しないこと、得られる情報は His, Tyr, Trp の三残基に限られるが逆にそのために非常に混み合ったスペクトルの中から選択的に情報が取り出せるという点で非常にすぐれた手法である。特に生体高分子への応用に際しては、これらのことが重要になってくる。ここで我々がとり上げた免疫グロブリンは、分子量が約15万あり、またパパイニンで限定分解された Fab, Fc fragmentでも約5万ある。これらのタンパク質は通常のスペクトルでは pH に敏感で比較的鋭いシグナルを与える His のシグナル以外については解析が非常に困難であった。我々はこれまでに BJP およびその fragment に光CIDNP法を適用して観測されたシグナルが主に V 領域の main cavity の入口周辺の残基に由来していることを示してきた。今回、光CIDNP法を intact IgG, 及びその fragment に適用したところ、それぞれの CIDNP スペクトルは特徴的なスペクトルパターンを示し、特に Fab については、それが hinge と V 領域に由来していること、Fc ではシグナルは CH2, CH3 ドメインに分布しているが、特に大きく分極される Tyr のシグナルが、CH2 ドメインの糖鎖の根元付近の loop に位置する Tyr 296 であることなどがわかった。

〈測定条件〉 測定は日本電子 GX-500s に光照射用プローブをつけて行なった。光源として今回はこれまでの 1W, 488 nm single line から、2W multi line に変えた。光照射時間は、10 ms ~ 100 ms までいろいろ変化させて測定した。sample 量は、IgG が通常 5 ~ 10 mg, Fab, Fc が約 5 mg を 0.3 ml D₂O に溶解したものを用い、積算回数は 100 回で行なった。

〈免疫グロブリン〉 図1に IgG の模式図を示す。IgG は 2 本の H 鎖と 2 本の L 鎖から成っている。そしてパパイニンによる限定分解により hinge の部分で切れて 2 個の Fab と 1 個の Fc に分かれる。これらの fragment のうち

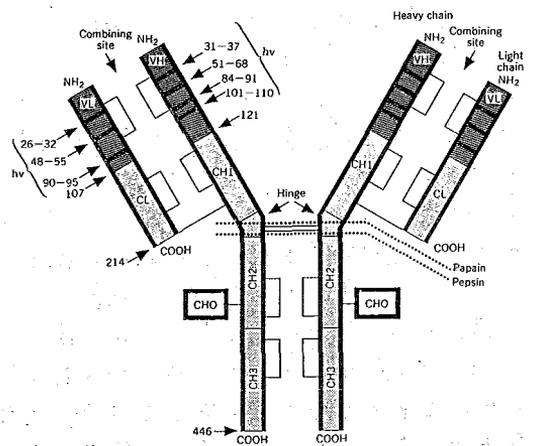


図1 IgG の模式図

はやしふみあき・きょうごくよしまさ・えんどうさとし・あらたようじ

Fabは抗原結合, Fcは補体活性化という機能をもっている。IgG H鎖は、4種のサブクラスから成っており、それぞれ異なった一次構造を持っている。また同じサブクラスの中でもいくつかの部位に置換が起っており、これはアロタイプ変異と呼ばれている。一方L鎖には大きく分けて、 κ , λ の2つのアイソタイプが存在する。そしてさらに λ タイプの中にはいくつかの残基で置換が起っていて、これらも含めてアイソタイプ変異と呼ばれている。今回用いた試料はいくつかのサブクラスのIgGとそのFab fragmentで、Ike-NについてはFcについても調べた。

〈結果と考察〉

我々はまず、IgG L, κ -typeのIke-Nについて intact IgG, 及び Fab, Fc fragment に光CIDNP法を応用した。その結果を図2に示す。一番上のスペクトルは intact IgG の通常のスペクトルで、下の3つが IgG, Fab, Fc のCIDNP差スペクトルである。まず Fab の芳香族領域から *hinge* の His 及び Tyr が4 (or 5), Trp が2個程度出ているのがわかる。またメチル, メチレン領域には、2.5 ppm, 1ppm, -0.7ppm に特徴的なシグナルが観測される。Fc では、非常に露出度の高い Tyr 2個と His 3個が明瞭に現われている。IgGのスペクトルを Fab, Fc のものと比較すると *hinge* の His 及び2個の Tyr を見る限り、だいたい2つのスペクトルを加え合せたようになっているが、水より高磁場側に出ている特徴的な Fab のシグナルは全く反映され

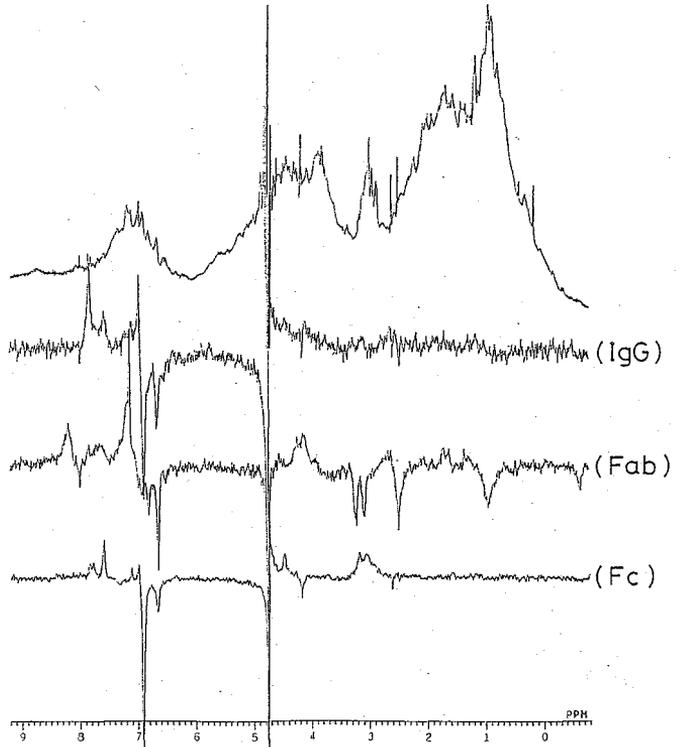


図2 IgG 1 (κ) Ike-N CIDNP差スペクトル

ていない。次に上記 Fab のシグナルが、direct な分極か否か、また残基の種類を調べるために、光照射時間変化, pH 変化の実験を行なった。光照射時間変化の実験では、100ms ~ 10ms まで変化させた。この結果、-0.7 ppm のシグナルは 25ms 光照射のときほぼ完全に消えるが、その他のシグナルは、特に 2.5 ppm, 1ppm のものは 10ms のときにも残るので direct な分極であることがわかった。従って 3.2 ppm, 3.5 ppm のものも含めて、Fab には少なくとも4個の His もしくは Trp が存在することを示している。次に His と Trp の区別をつけるために、pH 変化を行なった。その結果、*hinge* の His に帰属されるもの以外 His による分極は観測されなかった。この2つの実験より、残基の個数は His 1個 Trp 3

個, Tyr 4 (or 5) 個とわかった。また、このうち 2.5 ppm, 1 ppm の高磁場シフトしたシグナルは、Trp 残基由来と思われる。特に 1 ppm 付近のシグナルは pH を下げるに従い 0.4 ppm 程度低磁場シフトするのが観測された。これは、この付近に pKa をもつ残基の charge の影響で、この Trp 周辺の micro な conformation が変化したことを意味している。

各種 IgG 及び fragment 次に IgG1 (K) Ike-N で観測されたシグナルが、Fab 及び Fc のどの domain 由来かを調べるために、別の患者からの、subclass の異なる IgG 及び Fab fragment について光 CIDNP スペクトルをとった。用いた sample は、IgG では Ike-N のほかに Yot, Ku-3, Her, Fab では Yot, Ogo, Ky, Jir でこれらの属する subclass は Ky を除いてわかっている。まず Fab についての結果を図 3 に示した。Ike-N, Yot, Ogo は同じ isotype, subclass に属し、一次構造上異なるのは主に V 領域と考えられる。スペクトルから、ほぼ共通な chemical shift にある hinge の His 以外全く異なったスペクトルパターンを示しており、これらのシグナルは V 領域由来の signal であることを示している。また Ky 及び Jir は hinge の His が出していないこと、特に Jir では全く signal が観測されないことが特徴的である。これより Jir と同じ isotype, subclass をもつものの C 領域には別の allotype 変異による芳香族残基の導入がない限り CIDNP は現われないことがわかる。また Jir の subclass は IgG3 であるが、hinge の His のない allotype に属するようである。IgG の結果は図 4 に示した。

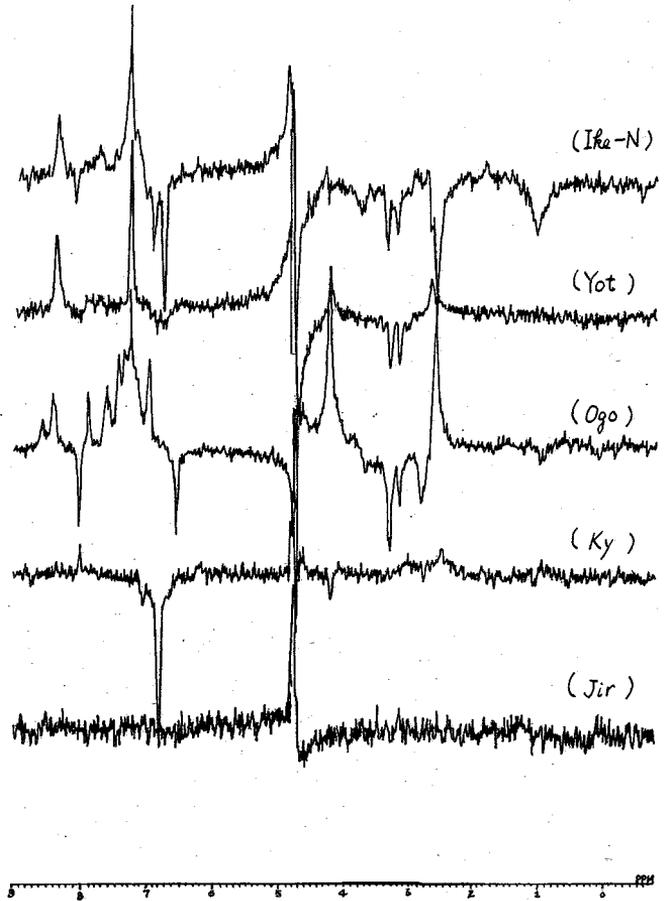


図3 各種 Fab の CIDNP 差スペクトル

それぞれの IgG の subclass は Ike-N, Yot が IgG1, Ku-3 が IgG2, Her が IgG3 に属している。Ike-N 及び Yot は Fab のスペクトルとの比較から、観測される His は hinge 由来であり、特徴的な 2 個の Tyr はともに Fc 領域由来であることがわかる。また subclass 間の比較より Ku-3 では hinge の His 及び特徴的な分極の大きい低磁場側の Tyr が消えており、かなりたくさんの弱い分極が観測される。また Her では、hinge の His 及び Fc の Tyr

に加えて大きな His が 2 個, Trp 1 個の分極が観測される。これらの結果を一次構造と比較するためにまとめたのが下の表である。これは、IgG 1~3 の subclass の一次構造の中から His, Tyr, Trp に関する部分を抜き出したものである。この表から特徴的なこととして、まず IgG 2 は hinge の His がなく、Fc 領域の Tyr 296, 300 が Phe に置換されている。また IgG 3 では His 435 が Arg に、また allotype によって違いが見られるが、Tyr 296, 300, 436 が Phe に置換されている。これらの比較から Fc で特徴的だった 2 本の Tyr の signal のうち分極の大きい方が Tyr 296 だと思われる。また Ike-N で特徴的だった 3 個の His ともう一個の Tyr の帰属は、これまでの結果に X 線解析の結果を追加すると可能で、これらは His 268, 285, 433 及び Tyr 391 とわかった。また以上の結果から Ku-3 で観測されたシグナルのうち Fc 由来と思われる

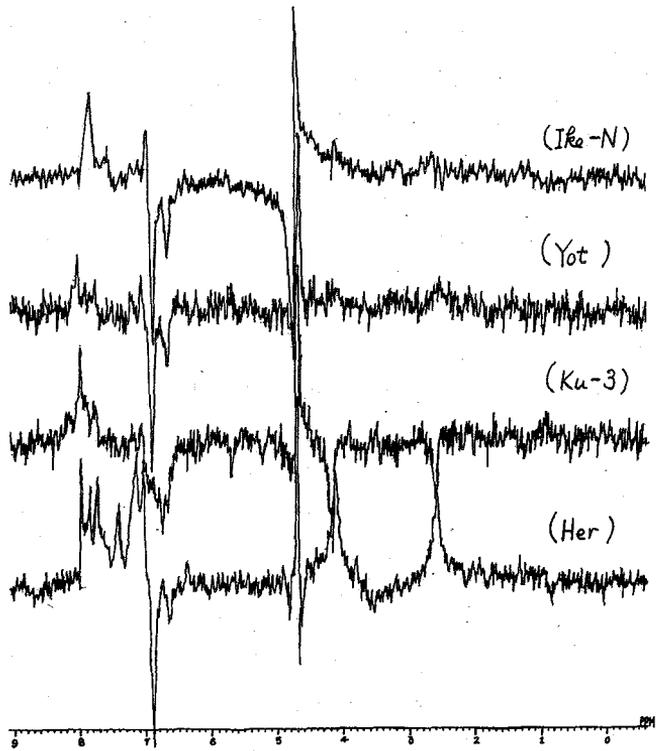


図 4 各種 IgG の CIDNP 差スペクトル

	224	268	277	278	285	296	300	310	313	319	349	373	381	391	407	417	429	433	435	436
IgG1	H	H	W	Y	H	Y	Y	H	W	Y	Y	Y	W	Y	Y	W	H	H	H	Y
IgG2	E	H	W	Y	H	F	F	H	W	Y	Y	Y	W	Y	Y	W	H	H	H	Y
IgG3	H	H	W	Y	H	Y	F	H	W	Y	Y	Y	W	Y	Y	W	H	H	H	Y

His 3 個と Trp 1 個以外は V 領域由来と考えられ、一方 Her では強く分極されていた His 2 個, Trp 1 個も同様に V 領域の可能性が高い。

<まとめ> 以上我々は、光 CIDNP 法を用いて IgG 及びその fragment を調べてきたが、分子量が 15 万と大きいかかわらず、特徴的な CIDNP signal が観測されることがわかった。それらのうちのいくつかは、V 領域, hinge の特徴を、残りは Fc の CH₂ の糖鎖のそばの loop 上及び CH₃ の loop 上に存在することが、一次構造, X 線解析との比較からわかった。これらはいずれも抗体分子の機能発現のために重要な箇所の可能性が高く、今後、機能に関する情報を得るためのマーカーとして用いることができると考えられ、以後の発展が期待できる。

免疫系タンパク質の高次構造：

¹H NMRによる研究法とその成果(東大理) 遠藤聡史 武藤 裕 伊藤 渉
田中俊之 鳥越秀峰 荒田洋治

NMRの特徴を十二分に活かし、溶液中のタンパク質の高次構造について具体的、かつユニークな知見を得るためには、シグナルの確実な帰属が全ての出発点となる。本報告においては、免疫系タンパク質の構造と機能の関連を研究するにあたって、我々が試みている¹H NMR シグナルの帰属の方法とそれが齎した成果について要約する。

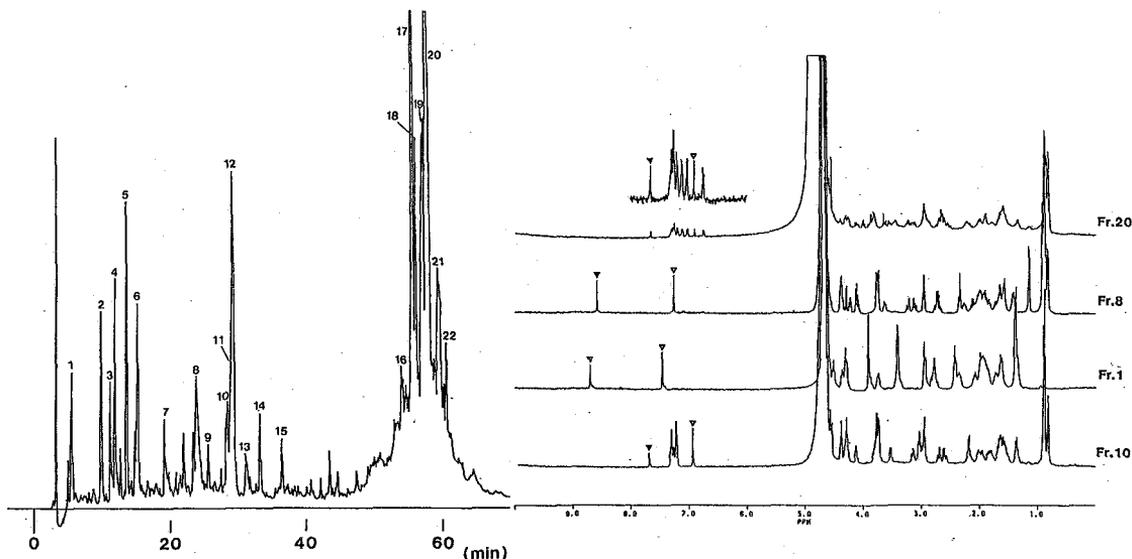
H ⇌ D 交換法による His 残基の帰属：再訪

1972年、成田耕造教授のグループは、トリチウム交換滴定を行うことによって、タンパク質中のヒスチジン残基のイミダゾール環 C2-H プロトンの pKa を決定することが可能であること、トリチウム交換の速度はイミダゾール環を取り巻くマイクロ環境に強く依存することを示した。¹⁾ この方法は、His 残基の¹H NMR シグナルの帰属法へと発展したが、これは、現在に至るもなお、タンパク質に一般的に適用できる、唯一の、確実な帰属法である。我々はトリチウムに代わって重水素を用いる H⇌D 交換法を試み、Bence Jones タンパクの His 残基の帰属を行った。²⁾ この方法では、pH ~ 8 - 9、38°C の条件下、D₂O 中において、タンパク質を incubate し、① NMR 測定により各 His 残基のイミダゾール環 C2-H プロトンにおける H⇌D 交換の程度を、強度の比較から評価し、② タンパク分子より、個々の His 残基を含むペプチドフラグメントを切り出し、ペプチド中の His 残基の重水素化の程度を、¹H NMR によって定量、③ native なタンパク質の示す His 残基のシグナルの帰属を決定する。当時は、標準的な方法であった高圧濾紙電気泳動とペーパークロマトグラフィーの組み合わせにより、His ペプチドの分離を行ったが、今日では、HPLC を用いて、極めて簡便に目的を達することができる。ここでは、β₂-microglobulin 中に存在する4個の His 残基の帰属を行った結果を要約する。

ヒト β₂-microglobulin の一次構造：トリプシン切断部位 (▼)

Ile Gln Arg▼Thr Pro Lys▼Ile Gln Val Tyr Ser Arg▼His Pro Ala Glu Asn Gly Lys▼Ser²⁰
Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu⁴⁰
Lys▼Asn Gly Glu Arg▼Ile Glu Lys▼Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys▼Asp Trp⁶⁰
Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys▼Asp Glu Tyr Ala Cys⁸⁰
Arg▼Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys▼Ile Val Lys▼Trp Asp Arg▼Asp Met⁹⁹

えんどう さとし むとう ゆたか いとう わたる
たなか としゆき とりごえ ひでたか あらた ようじ



④ トリプシン消化産物：

HPLC による分離 (左) と ^1H NMR スペクトル (右)

▼：C2-H プロトン ▽：C4-H プロトン

⑤ ^1H NMR スペクトル：

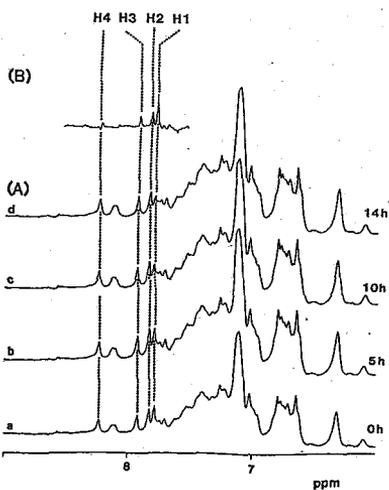
(A) D_2O 中 incubation (40°C、時間は図に記入)

4個の His 残基の C2-H プロトンのシグナルを、
H1, H2, H3, H4 で示す。

(B) 差スペクトル a - d

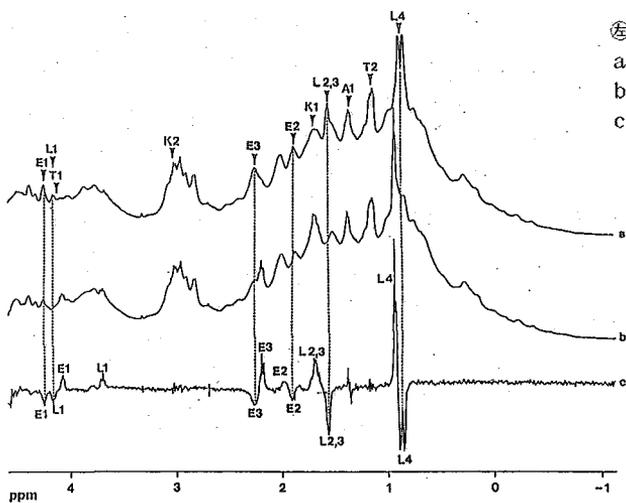
H1	→ His-51
H2	→ His-13
H3	→ His-85
H4	→ His-31

【帰属】



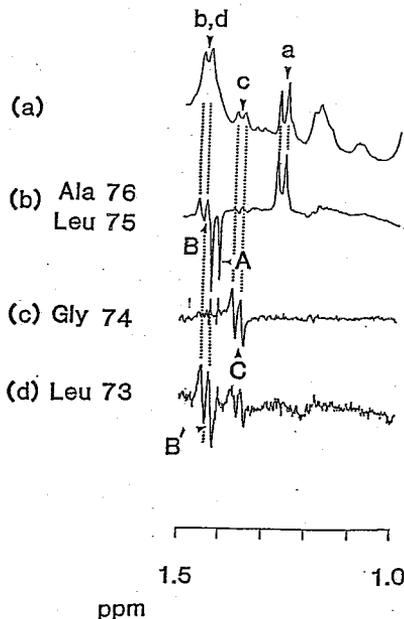
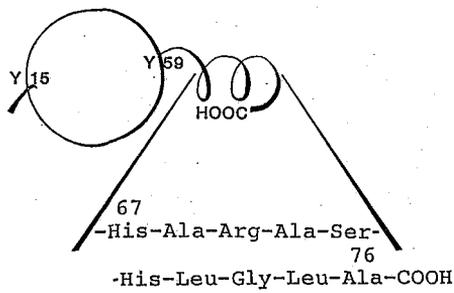
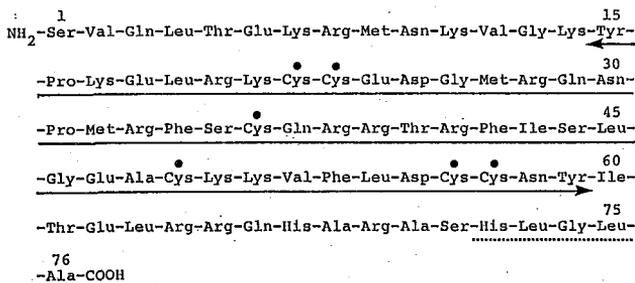
CPase 差スペクトル法

Carboxypeptidase (CPase) を用い、NMR 試料管中で C 末端より、段階的に切断しつつ差スペクトルを測定すると、① それぞれのアミノ酸残基の帰属を行うことができ、さらに、② 切断部位から隔たった部位のアミノ酸残基のシグナルにどのような影響が及ぶかを見ることにより、C 末端セグメントのとりコンホメーションについても知見が得られる。実際には、特異性の異なる CPase A, B, Y を組み合わせて測定を行う。つぎに、ヒト免疫グロブリン F(ab)₂ フラグメント、ヒト補体第三成分 C3 のフラグメント C3a des-Arg について得た測定結果^{3, 4)} をまとめる。



- ㊦ ヒト IgG1 F(ab')₂ の CPase A による消化
- a. CPase 添加 (E:S = 1:4000) 直後のスペクトル
- b. CPase 添加 1 時間後のスペクトル
- c. b - a

E1, E2, E3 は Glu-233 に、L1, L2, L3, L4 は Leu-234 (C 末端残基) に帰属される。下向きのシグナルが、タンパク分子中のアミノ酸残基に対応。Glu-233, Leu-234 以外のアミノ酸残基に由来するシグナルは観測されていないことに注意。この結果は Glu-233, Leu-234 がタンパク分子中の他の部位と相互作用していないことを意味する。



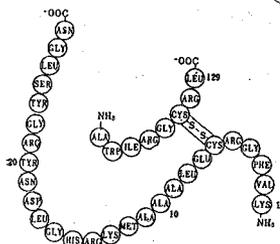
- ㊦ C3a des-Arg の一次構造
- ㊦ CPase 消化にともなうアラニン残基の CH₃ プロトンのシグナルの変化 【帰属】 a → Ala-76, b → Ala-70, c → Ala-68, d → Ala-48
- (b) (c) (d) は、図に示すアミノ酸残基の切断によって得られる差スペクトル
- ㊦ CPase 差スペクトル法の実験結果をもとに、C末端セグメントのコンホメーションを推定する。

Spin Diffusion 差スペクトル法

Spin Diffusion 法は、例えば、免疫グロブリンや補体などの巨大タンパク質の柔構造を、巨視的に把握する上で、極めて優れた方法である。^{3, 5)} 溶液中において自由に運動

する低分子は、勿論 Spin Diffusion の影響を受けない。しかしながら、ひとたび巨大タンパク質と結合するや、その全部または一部が運動性を失い、従って、その結合部位には Spin Diffusion が伝播する。この方法は、抗原抗体反応における結合モードを、アミノ酸残基レベルで検証する有力な方法の一つとなるものと期待して実験を進めている。

㊦ ニワトリリゾチームより切り出した、抗原決定部位を含むペプチドフラグメント P₁₇



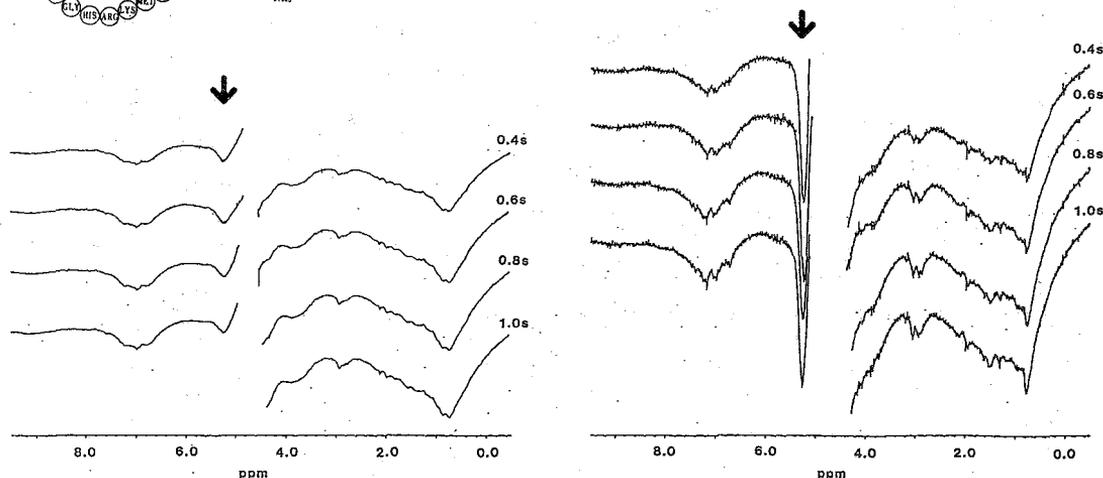
抗ニワトリリゾチームモノクローナル抗体に観測される Spin diffusion : 照射時間ゼロのスペクトルとの差スペクトルとして表現

㊦㊦ 抗体のみの場合

㊦㊦ 抗体 : P₁₇ = 1 : 6 (モル比) の場合

測定条件 : 25 °C, 50 mM phosphate buffer, 0.15M NaCl/D₂O, pH 7.4

[照射 : 5.2 ppm, γ H₂ ~ 70 Hz, 時間は図に示す]



【謝辞】 本報告において用いた ¹H NMR スペクトルは、全て 400 MHz において測定したものである。スペクトル測定に当って全面的に協力していただいた Bruker Japan Hanssum、植木両氏に厚く感謝します。β₂-microglobulin に関しては、日本医動態研（鄭大基博士、斉藤明博士）、抗リゾチームモノクローナル抗体に関しては、大阪大学微研（藤尾啓博士、坂戸信夫博士）のグループとの共同の下に進行中の研究の過程で得られた結果である。

【文献】

1. K.Narita: Frontiers of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology (Ed. S.N. Ananchenko, Pergamon) 135 (1980)
2. Y.Arata, H.Matsuo, and A.Shimizu: J. Am. Chem. Soc. 100, 3230 (1978).
3. S.Endo and Y.Arata: Biochemistry 24, 1561 (1985).
4. Y.Muto, Y.Fukumoto, and Y.Arata: Biochemistry 24, 0000 (1985).
5. K.Akasaka: J. Magn. Resonance 51, 14 (1983).

(都立大理、バリアン*) ○甲斐荘正恒、長尾洋昌、朝長典子、
内田健一、中村好邦、串田克彦*

(序) 我々は昨年の本討論会において、微生物起原プロテアーゼインヒビターSSIをモデルとして開発してきた、蛋白質主鎖カルボニル炭素の ^{13}C -NMRシグナルの種々の観測・帰属手法に関して総括した。また、それらの手法を組合せることによりSSIポリペプチド鎖の約70%に相当する残基のカルボニルシグナルを実際に個別に観測し、それらの約半数については帰属を確定したことを述べた。過去一年間にSSIの研究は進捗し、更に多くの主鎖カルボニル炭素シグナルを、選択的同位体ラベル法により観測することに成功し、これらのシグナルを用いて多くの新しい蛋白質の構造研究手法を開発することができた。蛋白質の高次構造は基本的にはポリペプチド鎖の三次元的折れ曲がり構造に依って規定されるものであり、その意味では主鎖の構造情報を直接与え得るカルボニルシグナルは重要な情報源である。しかしながら、多くの蛋白質機能の担い手はむしろアミノ酸残基の側鎖上の官能基であることは良く知られている通りであり、従って、アミノ酸の配列のみを前提としたカルボニルシグナルの帰属を、側鎖を構成する原子(団)へと拡張する手段の確立が極めて重要となる。本報告では、SSIのカルボニル炭素シグナルの観測・帰属に関するその後の進歩とともに、均一に ^{13}C -ラベルしたアミノ酸を用いた蛋白質NMRスペクトルの新しい包括的帰属手法等についても述べる。

(実験) 安定同位体ラベルしたSSI及びAPI-2cの調製は、培養のためのアミノ酸合成培地中、適当なアミノ酸のみを同位体ラベルアミノ酸に置換することにより行った。NMRスペクトルはXL-300(バリアン)、WH-360(蛋白研)を主として用い測定した。カルボニルシグナルのシミュレーションにはPC-8801を用いた。

(結果と考察) SSIのカルボニル ^{13}C -NMRスペクトル: SSIはアミノ酸残基113の等価なサブユニット2個から構成され、そのアミノ酸配列は図-1に示したように確定している。SSIはイソロイシンを欠くため、各サブユニットは最大18個(アラニン)から最小1個(トリプトファン)の計19種のアミノ酸を含む。従って、天然存在比に於ける ^{13}C -NMRスペクトルで最も低磁場領域に現れるカルボニル炭素シグナルはGlx、Asxの側鎖由来のシグナル15本を含めて計128本から構成

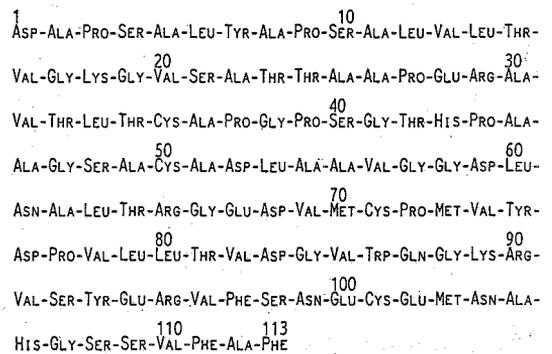


図-1. SSIのアミノ酸配列

かいのしょうまさつね、ながおひろまさ、ともながのりこ、うちだけんいち、
なかむらよしくに、くしだかつひこ

されている筈である。本要旨執筆時点において、主鎖カルボニルとしてはArg, Asx由来の13本を除き全て個別に観測し、側鎖カルボニルも全て観測しているので、合計115本の残基の種類が特定されたカルボニル炭素シグナルを実測したことになる。これは観測可能な全シグナルの約90%に相当する。これらのシグナルの一次構造上の各部位への帰属は更に大きな労力と時間を要するが、徐々に進行し、既にSSIポリペプチド鎖全域にわたって帰属の確定したカルボニルシグナル、つまりそれらの部位近傍の微細な構造変化を鋭敏に検出するプローブを得ている。なを、SSIの構造化学的研究に関しては、本年の生化学会年会、及び蛋白質構造討論会において詳しく述べる。

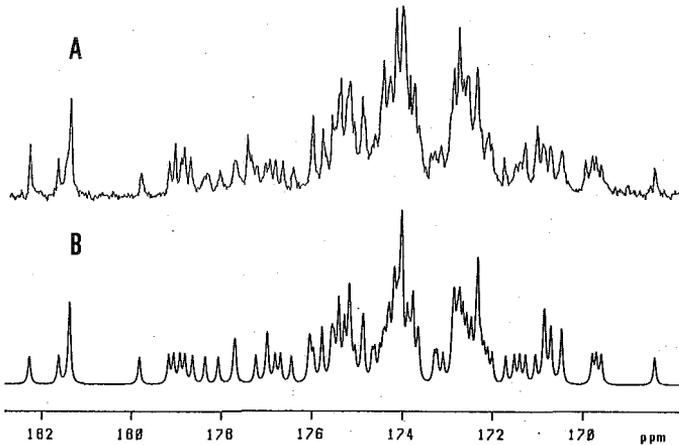


図-Ⅱ. SSIのカルボニル領域の ^{13}C -NMRスペクトル(50℃)。A, 実測; B, 合成スペクトル
比較したものである。現時点で測定されていない13本のシグナルが欠けていること、測定濃度・温度が各サンプルにより微妙に異なることを考慮すれば、これら両スペクトルの一致は極めて満足すべきものである。

蛋白質主鎖カルボニルシグナルの帰属の拡張：既に我々が明らかにしたように、蛋白質の主鎖カルボニルシグナルはアミノ酸配列を基に最も確実な帰属が可能である。もし、帰属の確定したカルボニルシグナルと側鎖原子(団)との間に確実な相関が得られるならば、帰属の確定した側鎖由来のシグナルと云う構造化学的に更に有用なプローブが入手できることになる。この手法は種々考えられるが、大別すれば次に代表的な例を述べる間接的・直接的な二つのアプローチに集約できる。

(1) **側鎖官能基上の構造変化に起因する化学シフトの比較：**昨年度の本討論会において、特定部位の化学修飾を利用する主鎖カルボニルシグナルの帰属法について述べた。この手法の原理は蛋白質の側鎖官能基は同一種類のアミノ酸残基であっても、一次構造上の位置により化学的反応性・pKa値などが異なることを利用する。化学的反応性の差が利用し易い残基としては、メチオニン、シスチン、リジン、ヒスチジン、チロシン、トリプトファン

同位体ラベル法によって観測された個々のアミノ酸残基に由来するシグナルが、確かに天存在比での ^{13}C -NMRスペクトルに含まれていることを立証することは、培地中に加えたラベルアミノ酸がそのままSSIに取り込まれていることを示す最も直接的証拠となる。図-Ⅱは天然存在比での ^{13}C -NMRスペクトルのカルボニル領域を個別に観測された115本のシグナルをコンピューター上で足し合わせた合成スペクトルと比較したものである。

があり、pKa 値の差が有用な残基にはヒスチジン、チロシン、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸が挙げられる。ここでは、SSI に二残基含まれるリジン側鎖の NMR シグナルの帰属の例を紹介する。図- I の SSI のアミノ酸配列によれば、二つのリジン残基 (Lys ; K) は 18 と 89 に含まれる。リジンのカルボニルを ^{13}C -ラベルした SSI ($(\text{K})\text{SSI}$) の ^{13}C -NMR スペクトルには二本の強度の増大したカルボニルシグナルが生じる (図- III a)。

まずシグナルの確実な帰属を行う。この場合は各 C 末端側残基がグリシンとアルギニン (Arg ; R) と異なることを利用する " ^{15}N , ^{13}C -ダブルラベル法" が適用できる (図- I)。図- III に示した帰属はリジンのカルボキシル基の ^{13}C -ラベルに加えて、アルギニンを ^{15}N -ラベルした SSI ($(\text{K}, \text{R})\text{SSI}$) とのスペクトル比較から得られたものである。このようにリジンのカルボニル炭素シグナルの帰属が確定すると、リジン側鎖のアミノ基上で起こる化学修飾によるカルボニル ^{13}C -NMR スペクトルの変化を通じて、反応部位を決定できる可能性がある。そこで高 pH で $(\text{K})\text{SSI}$ を O-メチルイソウレアで修飾すると、二残基のリジン ϵ -アミノ基のみがグアニジル化され、ホモアルギニン (K^* と略) に変化する。修飾に伴いリジン残基の主鎖カルボニルシグナルはどちらも低磁場シフトする (図- III c)。

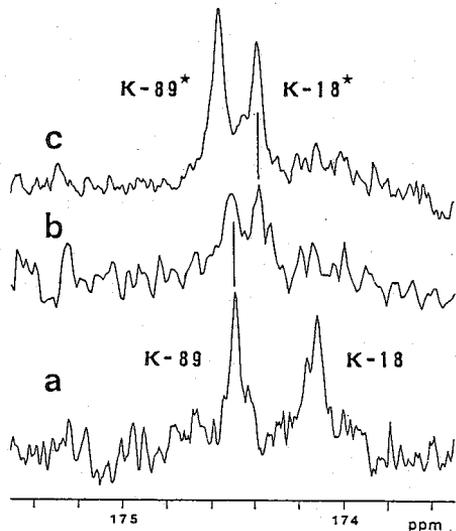


図- III. $(\text{K})\text{SSI}$ の化学修飾に伴う ^{13}C -NMR スペクトル変化

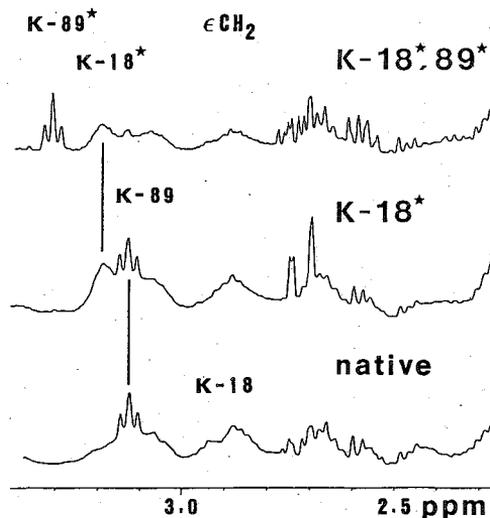


図- IV. SSI のリジン残基修飾に伴う ϵ -メチレンプロトン領域のスペクトル変化。360 MHz, 60°C

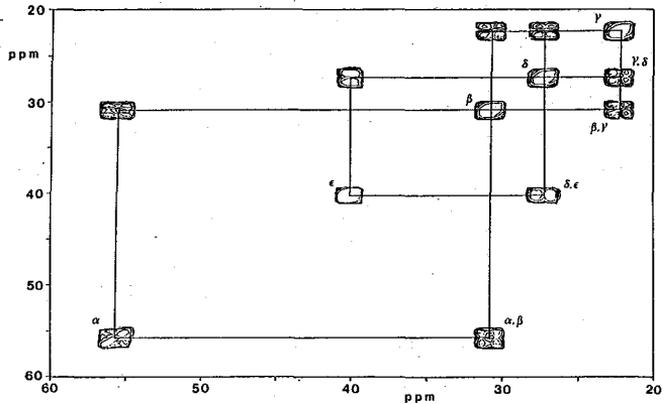
一方、SSI をまず TNBS を用いて TNP 化すると N-端のアミノ基と一残基のリジンのみが修飾され、 ^{13}C -NMR スペクトルからこのリジン残基は K-89 と確定した。従って、TNP-SSI を更にグアニジル化し、アンモニア水で脱 TNP 化すると K-18 のみ選択的にグアニジル化された SSI ($(\text{K}^* - 18, \text{K} - 89)\text{SSI}$) を得ることができた。この修飾 SSI の ^{13}C -NMR スペクトルでは高磁場の K-18 由来のシグナルのみが低磁場シフトを示している (図- III b)。 ^1H -NMR を用いて、以上の化学修飾に対応するスペクトル変化を調べれば、容易にリジンの ϵ -メチレンプロトンの帰属が確定する (図- IV)。リジンの帰属は pH 滴定に伴うシフト変化に依っても可能である。

(2) 二次元FT-NMRによる

包括的帰属: SSI主鎖カルボニル

^{13}C -シグナルの帰属が確定したことを最も有効に利用する拡張手法は、カルボニル炭素とのスピン結合を仲介として側鎖原子(団)のシグナルの帰属を確定することであることは既に我々が再三指摘してきたことである。しかしながら、SSI程度の高分子量蛋白質では単純にカルボニルを ^{13}C -ラベルしただけではこの目的は達成できない。そこでカルボニル炭素を含む全ての炭素を高濃度(90%)に ^{13}C -ラベルしたアミノ酸を調製し、SSIに取り込まれた状態でのこれらの残基に由来する全ての原子(団)のNMRシグナルを二次元FTNMRを用いて一挙に帰属することを試みた。ここでは、SSIに二残基含まれるリジンを例とし、 ^{13}C - ^{13}C 、 ^{13}C - ^1H COSYスペクトルによる炭素-炭素、炭素-水素結合のネットワーク確定の可能性について検討した。遊離の $[\text{u1-}^{13}\text{C}]$ リジン(u1-K)の ^{13}C - ^{13}C COSYスペクトルは予想どおりクロスピークを通じて、カルボニル炭素をスタートとし、 α 、 β 、 γ 、 δ 、及び ϵ 炭素に至る炭素-炭素鎖ネットワークが容易に得られた(図-V; 脂肪族領域のみを示す)。更に、これらの炭素に直接結合しているプロトンのシグナル位置も ^{13}C - ^1H COSYスペクトルにより決定できた。この結果に勇気づけられて、 $[\text{u1-}^{13}\text{C}]$ リジンを組み込んだSSI($[\text{u1-K}]$ SSI)を調製しその二次元FTNMRを測定した。リジンは極性アミノ酸であり、菌体外に加えたラベルリジンの取り込みが極めて低いため、実験は困難であったが、遊離リジンの場合と良く類似した、独立な二つの炭素-炭素結合のネットワークが脂肪族炭素領域に観測された。 α -炭素と帰属の確定しているカルボニル炭素とのクロスピークから、これらのネットワーク帰属、更には ^{13}C - ^1H COSYスペクトルからのSSI中のリジン残基のプロトン化学シフトも確定できた。 ϵ 、 δ -プロトンの帰属は先の化学修飾の利用による結果、或いは18番のリジンを欠くAPI-2cとのスペクトル比較の結果とも一致した。

図-V. $[\text{u1-}^{13}\text{C}]$ リジンの ^{13}C - ^{13}C J相関スペクトル。75 MHz、70℃



(結論) 以上、主としてSSIのリジン残基を例にとり、化学修飾の特異性を利用して側鎖NMRシグナルの帰属を行う手法、及びカルボニル炭素の ^{13}C -NMRスペクトルとスピン結合(J')を仲介として、蛋白質のアミノ酸残基側鎖原子(団)のNMRシグナルの帰属を一挙の行う手法について明らかにした。後者は、アミノ酸配列のみを必要な前提条件としていること、高分子量蛋白質にも適用可能であること等、従来の ^1H 二次元NMRを中心とする手法に比し遙かに一般性の高い蛋白質研究方法を提供すると考えられる。

(近畿大・理工) ○北川 進・宗像 恵・前川雅彦

I. 銅蛋白質に含まれる銅イオンはその蛋白質中における分光学的性質に基いてタイプ1, 2, 3の3種類に分類されている。特にタイプ3銅は ESR シグナルを与えないところから、 d^{10} 電子配置で反磁性の銅(I)状態、もしくは2つの銅が架橋配位子を介して反強磁性相互作用をしている銅(II)状態であると考えられている。このタイプ3銅を含む銅蛋白質は多種存在する。その中でもタイプ3銅のみを含むものに、ヘモグロビンやヘムエリトリンと同様の酸素運搬機能を有するヘモシアニン(Hc)がある。

Hc は節足(Arthropod), 軟体(Mollusc)動物の血液に存在し、門(phylum)により異なるが分子量50万~900万, サブユニット分子量 5万~7.5万の巨大蛋白質である。1つのサブユニットには2個の銅が存在し、これまでの研究から、deoxyHc では銅(I)、oxyHc では O_2^{2-} を架橋分子としてかなり強い反強磁性相互作用 ($|2J| \geq 600\text{cm}^{-1}$, $H = -2JS_1S_2$) をしている銅(II)が含まれて入ることがわかった。極く最近、イセエビ族の deoxyHc の X線構造解析⁽¹⁾より、図1に示したようにヒスチジン残基のイミダゾール基が3個おのおの銅(I)に配位した構造を持つことが明らかとなった。一方、oxyHc は X線構造解析が行なわれていないが、EXAFS⁽²⁾からやはりイミダゾール基が2~3個配位していることがわかっている。しかし、その配位数、および O_2^{2-} の他の架橋原子 X の存在については議論的となっている(図2)。

この蛋白質活性部位モデル系としては、まず deoxyHc 型では①銅(I)錯体で、② O_2 と可逆的に結合し、③イミダゾール基が2~3個配位していること、また oxyHc 型では①複核銅(II)錯体で、②反強磁性相互作用を有するなどの条件が考えられる。

いずれにしても銅に酸素分子が可逆的に脱着するための銅錯体の構造、銅-配位子結合性、蛋白質の役割など諸要因を明らかにするためのモデル系が重要となっている。しかし機能モデル、構造モデルともいずれにしても銅-酸素錯体の単離にまで至っていない。仮に溶液中で酸素錯体の生成に成功したとしてもそれを追究する手段は現状では乏しい。これは

きたがわすすむ・むなかためぐむ・まえかわまさひこ

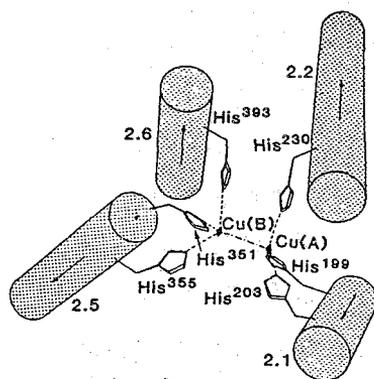


図1. deoxyHc の X線構造解析による銅(I)活性部位の構造⁽¹⁾

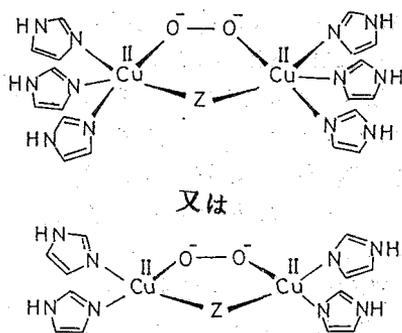
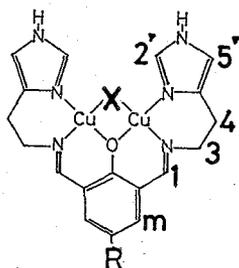


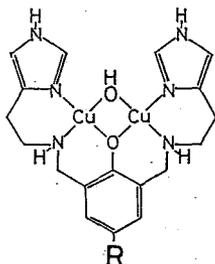
図2. EXAFS 法によるoxyHc銅(II)活性部位の推定構造⁽²⁾

一つに溶液中の反強磁性系錯体の構造や性質を調べる方法論に限りがあるためであり、そこで本研究では NMR 法を用いた反強磁性系の研究を発展させること、ならびに溶液中の銅-酸素錯体を追究するための複核銅(II)モデル系を検討した。

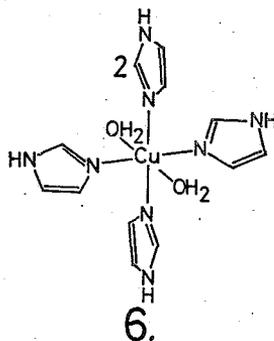
II. (A) 複核銅(II)錯体の合成. Urbach の方法⁽³⁾に従い次のものを合成した。



1. X=OH, R=CH₃
2. X=Cl, R=CH₃
3. X=OH, R=C₂H₅



4. R=CH₃
5. R=C₂H₅

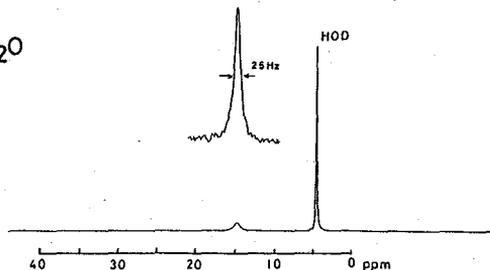


合成した錯体はすべて略称で呼ぶ。[(Cu₂(HA)₂MIPA)X]Y₂ (X=OH, Y=C10₄, 1; X=Cl, Y=Cl, 2), [(Cu₂(HA)₂EIPA)OH](C10₄)₂, 3, [(Cu₂(H₂HA)₂MIPA)OH](C10₄)₂, 4, [(Cu₂(H₂HA)₂EIPA)OH](C10₄)₂, 5, [Cu(Im)₄(H₂O)₂]F₂⁽⁴⁾, 6。
¹H NMR スペクトルの帰属はこれら誘導体の比較および²H ラベルしたものを用いて行なった。

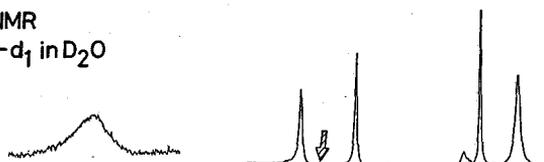
(B) NMR スペクトル測定.

5 mmφ のチューブを用い、濃度 1~5 mM で測定した。測定には Jeol Fx200 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, 2000~5000 回程度積算して観測した。内部基準には DSS

(3) ²H NMR
₁-d₁ in H₂O



(2) ¹H NMR
₁-d₁ in D₂O



(1) ¹H NMR
₁-d₁ in D₂O

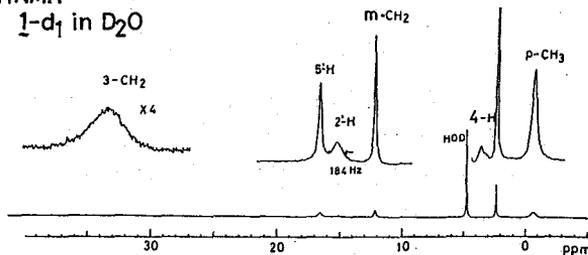


図3. 複核銅(II)錯体1の¹H NMR スペクトル(1), (2) および²H NMR スペクトル(3). イミダゾール2位を²H ラベルした(2), (3). (23°C)

および TMS を用いた。

Ⅲ. (1) イミダゾールシグナルの帰属 複核銅(Ⅱ)錯体 1 ~ 5 はいずれもイミダゾール基を有し、反強磁性相互作用定数 $-2J$ は $156 \sim 545 \text{ cm}^{-1}$ の範囲のものである。 ^1H NMR スペクトルはすでに報告したようにスペクトル幅 100 ppm の範囲内に比較的シャープなシグナルを容易に得ることができた。このイミダゾール基のシグナルは oxyHc の銅に配位したイミダゾール基のシグナルとの関連で興味深く、そのためこの帰属を確実にするために選択的 ^2H 化を行なってその ^1H NMR シグナルを帰属した。図 3 にその一例として 1 の系の ^1H および ^2H NMR スペクトルを示した。この場合、 $2'\text{-H}$ を ^2H 化した。図 3(2) に示したように 15 ppm 付近のプロードなシグナルが消失し、 $2'\text{-H}$ であることがわった。 ^2H NMR スペクトルの観測も行ない、ほぼ同じ位置に ^2H シグナルを得た(図 3(3))。 ^2H 化による線幅の Narrowing 率は $\Delta\nu(^2\text{H})/\Delta\nu(^1\text{H}) = 1/7$ であった。また、反強磁性系との比較のために単核のイミダゾールを有する銅(Ⅱ)錯体 6 の NMR スペクトルを測定した。その ^1H NMR スペクトルは常磁性の銅(Ⅱ)の影響のためイミダゾールの ^1H NMR シグナルは広幅化して消失し得ることができなかった。一方、 ^2H NMR の場合、 33 ppm に半値幅 270 Hz のシグナルを得ることができた。

(2) シフト、線幅と $|2J|$ との関係

このイミダゾールシグナルのシフトと線幅は銅(Ⅱ)-銅(Ⅱ)反強磁性相互作用定数 $|2J|$ と極めて良い相関にあることが明らかとなった。たとえば、 $-2J = 529 \text{ cm}^{-1}$ の 1 はシフト値 15 ppm に半値幅 184 Hz の $2'\text{-H}$ のシグナルを $-2J = 156 \text{ cm}^{-1}$ の 2 はシフト値 27.5 ppm に半値幅 460 Hz の $2'\text{-H}$ のシグナルを与えた。つまり、 $|2J|$ が大きい(反強磁性相互作用が強い) 1 は $|2J|$ の小さい(反強磁性相互作用が弱い) 2 より磁性が弱められ反磁性に近くなり、シフトおよび線幅

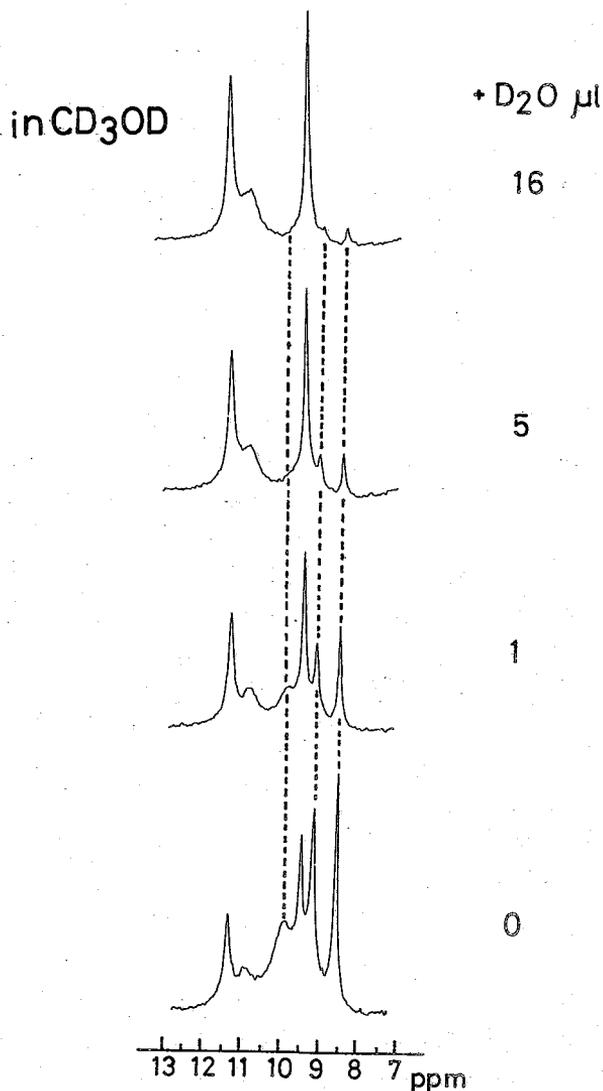
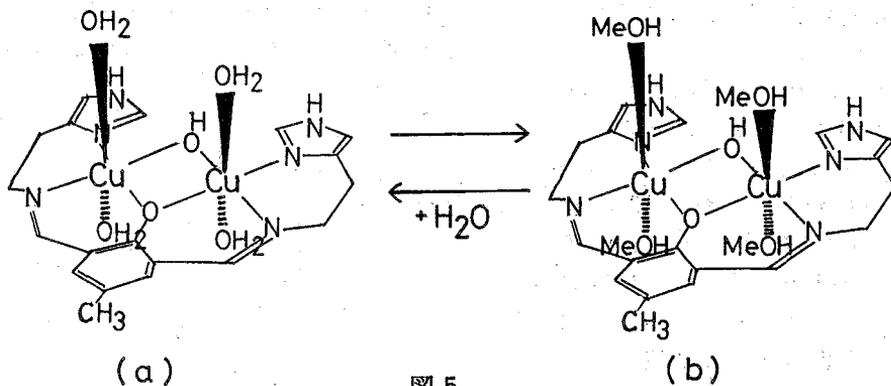


図 4. メタノール溶媒中における複核銅(Ⅱ)錯体の ^1H NMR スペクトル。H₂O 添加によるスペクトル変化 (-70°C)

が小さくなったことを示している。また、 $|2J|$ の代わりに Evans 法により求めた溶液中の磁気モーメントとシフトおよび線幅との間にも同じ関係が見いだされた。

(3) 溶液中における構造 1 は D_2O 中では図 3 (1) に示したようなシグナルを与えたがメタノール中では異なったシグナルパターンを与えた。しかしこれは図 4 に示したように低温 ($-70^\circ C$) で、少量の H_2O を添加することにより、図 3 と同じシグナルを与えたことから、1 は水中では図 5 (a) のように apical 方向から水が配位した構造をとっており、



メタノール中ではメタノールの配位した (b) 型に一部水の配位した (a) 型が存在し、これらの間で平衡にあることが示唆される。このような溶媒分子の配位について、可視スペクトルでは変化が乏しいためその差異を見出すことは不可能であった (水中の UV-VIS スペクトル; λ_{max} 609, 380, 359 nm, メタノール中の UV-VIS スペクトル; λ_{max} 609, 384, 363 nm)⁽³⁾ が、NMR 法ではこれを明らかにすることができた。その他の 2 ~ 5 についても同じ結論が NMR スペクトルより得られた。さらに C1 架橋配位子の 2 は水溶液中では OH 架橋におきかわることも 1H NMR スペクトルから簡便に知ることができた。さらに、図 3 (1) と全く同じスペクトルを与えたことから、対イオンである Cl^- イオンは apical 位から配位しておらず、図 5 (a) の構造であると考えられる。一方、2 はメタノール中で非常に大きいシフト、線幅を与えた。しかしこれは水溶液中と同じスペクトルパターンを示すことから Cl^- 架橋は解離していないこと、さらに apical 位から Cl^- が配位していることを示唆している。

(4) 溶液内の反応 このように 1H NMR 法は極めて溶液中の構造に鋭敏であることから、これを用いて複核銅 (II) 錯体の反応を追跡することが可能であり、特に興味深い O_2^{2-} (Na_2O_2) や O_2^- (KO_2) との反応も試み、その NMR スペクトルの観測を行なった。

(文献) (1) J. J. Beintema, et. al, *Science*, **229**, 519 (1985). および J. J. Beintema, et. al, *Nature*, **309**, 23 (1984). (2) T. G. Spiro, et. al, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 4210 (1980). および K. O. Hodgson, et. al, *ibid.*, **103**, 984 (1981). (3) F. L. Urbach, et. al, *Inorg. Chem.* **17**, 3078 (1978). (4) J. Reedijk, et. al, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 429, 1984.

^{15}N CP-MAS NMR :合成ポリペプチドの立体構造と ^{15}N 化学シフトとの関係(群馬大工短・日本電子⁺・東工大工⁺⁺)○荏司 顯・尾崎拓男・藤戸輝昭⁺・出口健三⁺・安藤 勲⁺⁺

1. 近年、固体試料の測定方法であるCP-MAS-DD (cross polarization - magic angle spinning - dipolar decoupling) 法の開発に伴い、固体高分解能NMRの研究が盛んに行われるようになってきた。特に、 ^{13}C CP-MAS NMRは合成ポリペプチドや天然タンパク質などの固体状態における立体構造の研究に応用され、極めて有用な手段として確立されつつある。¹⁻⁸⁾ タンパク質の立体構造がN-H...O-C間の水素結合の形成様式に強く依存することを考えると、N核を用いたNMR研究は重要かつ興味深いところであり、特に ^{15}N 核は ^{14}N 核と比較して、天然存在比が小さいという不利な条件があるにもかかわらず、その線幅は狭く、構造を研究する上では、むしろ有用性は高い。^{9,10)}

最近、 ^{15}N CP-MAS NMRによる天然タンパク質やペプチドの構造研究が行われるようになってきたが、^{11,12)} これらの研究には、いずれも特定部位のアミノ酸残基を ^{15}N ラベルした試料が用いられている。このような天然タンパク質の構造研究においては、主にその2次構造に関する基礎的な知見が有力な手がかりを与えるものと考えられる。

本研究では、タンパク質の2次構造研究のモデルとして、合成ポリペプチドを用い、その ^{15}N CP-MAS NMRスペクトルを測定して、その固体状態における立体構造と ^{15}N 化学シフトとの関係を調べることに、更に、天然タンパク質の構造研究への応用の可能性を探ることを目的とする。

2. 本研究で用いた試料は、ポリ(ヒアラニン) PLAla, ポリ(L-ロイシン) PLLeu, ポリ(β -ベンジルヒアスパラテート) PBLAsp, ポリ(γ -ベンジル-L-グルタメート) PBLGlu, ポリ(γ -メチル-L-グルタメート) PMLGlu, ポリ(L-バリン) PLVal, 及びポリ(L-イソロイシン) PLIle などのホモポリペプチドで、本研究室において合成したものである。この中で、PBLAsp-100-IIIの試料は、PBLAsp-100を220°C(減圧下)で1時間熱処理したものである。これら各試料のコンホメーションは、赤外吸収、遠赤外吸収及び ^{13}C CP-MAS NMRスペクトルにより確認した。

^{15}N CP-MAS NMRスペクトルは、JEOL GX-270分光計にCP-MAS付属装置を取付けたもので、27.4 MHzで測定を行った。測定条件は、コンタクトタイム 2ms, くり返し時間 5s, 90°パルス幅 5.5 μs , スペクトル幅 20kHz, 及びデータポイント 8K である。天然存在比のままの試料を用い、850-10,000回の積算を行った。 ^{15}N 化学シフト値の基準には、 $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ (飽和水溶液)を外部基準として用い、ppm単位で表示した。 ^{15}N 化学シフト値の実験誤差は、 ± 0.5 ppm以内である。

3. 図1に固体ポリ(ヒアラニン)の右巻 α -ヘリックス(α R-ヘリックス)形(A, B), 及び β -シート形(C)試料の天然存在比における ^{15}N CP-MAS NMRスペクトルを示す。いずれも、約100 ppm付近に鋭い単一ピークが観測されるが、これは、ポリペプチドの主鎖アミドの ^{15}N に由来するものである。このように、天然存在比のままの試料であるに

しょうじ あきら, おぎきたくお, ふじと てるあき, でぐちけんぞう, あんどう いさお

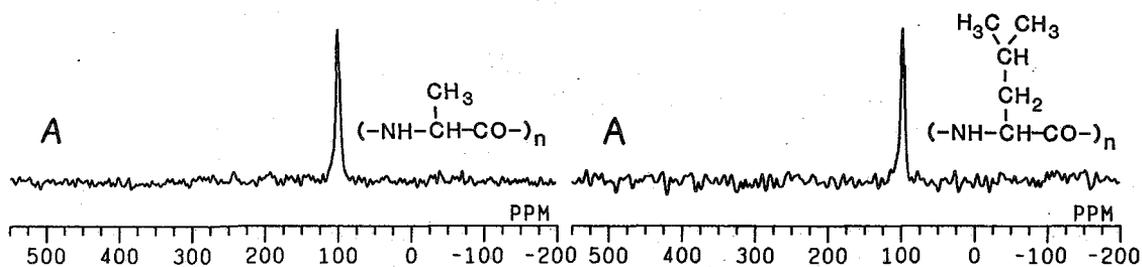


Figure 1. Natural abundance 27.4 MHz ^{15}N CP-MAS NMR spectra of solid poly(L-alanine).
 A & B. PLAla-50 (α R-helix, 2874 scans),
 C. Z-(L-Ala)₇-NHBU (β -sheet, 1927 scans).

もかわらず、2000~3000回程程度の積算で、かなり感度の良いスペクトルが得られていることに注目したい。このことは、一つには ^1H 核の磁気回転比 γ_{H} の値が ^{15}N 核の γ_{N} の絶対値と比べ約10倍大きな値をとっていることに起因すると考えられている。¹³⁾ これは、溶液の ^{15}N NMRには、INEPT (insensitive nuclei enhanced by polarization transfer) 法以外利用できないもので、固体高分解能NMRの有利な点である。図1を更に詳しくみると、 α R-ヘリックス形(B)及び β -シート形(C)に対する主鎖アミドの ^{15}N ピークは、それぞれ98.6 ppmと101.8 ppmに観測され、両者間の化学シフト差は3.2 ppmで、この値は実験誤差と比べると明らかに有意差であると考えられる。したがって、 ^{15}N 化学シフトはコンホメーションに依存することが示唆される。

次に、固体ポリ(ロイシン)の ^{15}N CP-MAS NMRスペクトルを図2に示す。 α R-ヘリックス形と β -シート形に対して、それぞれ97.0 ppmと107.0 ppmにアミドの ^{15}N ピークが観測される。 α R-ヘリックス形の化学シフト値は、 β -シート形に比べて高磁場側に現れるが、この傾向は、ポリ(L-アラニン)の場合とよく対応している。しかし、 α R-ヘリックス形と β -シート形との間の化学シフト差は10.0 ppmあり、これはポリ(L-アラニン)の場合と比べ約3倍大きい値を示し、アミノ酸残基の種類によって異なることを示唆している。

そこで、以上の点を明確にするために、 α R-ヘリックス形又は β -シート形をとる種々のホモポリペプチドについても ^{15}N CP-MAS NMRスペクトルを測定した。そのいくつか

Figure 2. Natural abundance 27.4 MHz ^{15}N CP-MAS NMR spectra of solid poly(L-leucine).
 A & B. PLLeu-100 (α R-helix, 850 scans),
 C. Z-(L-Leu)₆-OEt (β -sheet, 1142 scans).

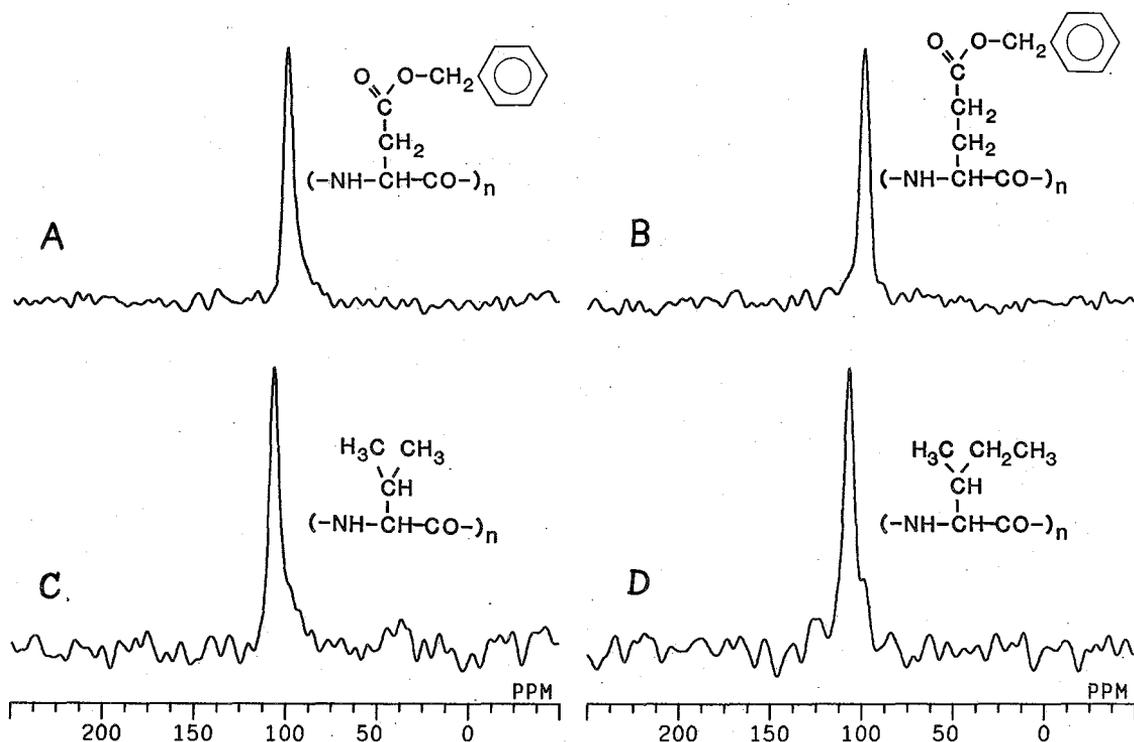


Figure 3. Natural abundance 27.4 MHz ^{15}N CP-MAS NMR spectra of homopolypeptides in the solid state. A. PBLAsp-100 (α R-helix, 9684 scans), B. PBLGlu-100 (α R-helix, 9280 scans), C. PLVal-100 (β -sheet, 1491 scans), D. PLIle-100 (β -sheet, 1347 scans).

のスペクトルを図3に例示し、そこから得られた ^{15}N 化学シフト値を表1にまとめた。表1の結果より次の点が明らかになった。

① 本研究で用いたホモポリペプチドの中では、アミドの ^{15}N ピークは、 α R-ヘリックス形が 97.0 ppm ~ 99.2 ppm の領域に現れ、又、 β -シート形のピークは 99.5 ppm ~ 107.0 ppm の領域に現れている。すなわち、これらのホモポリペプチドでは、 α R-ヘリックス形の ^{15}N 化学シフト値は β -シート形の値に比べ、いずれも高磁場側に現れている。このことから、両コンホメーション間のこの傾向は、アミノ酸残基の種類にはよらず、コンホメーションに依存することが明らかになった。又、PBLAspの場合、低分子量試料と高分子量熱処理試料とが、同じシフト値をとるが、この結果も ^{15}N シフトがコンホメーション依存であることを支持している。

② 同じ種類のホモポリペプチドの中で α R-ヘリックス形と β -シート形との間の ^{15}N 化学シフト差 ($\Delta\delta$) を比較すると、PLAlaでは -3.2 ppm, PLLeuでは -10.0 ppm, PBLAspでは -1.2 ppm, PBLGlu及びPMLGluでは -1.9 ppm と、アミノ酸残基の種類によって、このシフト差はかなり異なっている。一般に、疎水性側鎖をもつものではこのシフト差は比較的大きく、側鎖にエステル基を有する試料ではこのシフト差は 1~2 ppm と小さい傾向が見られる。又、PBLGluとPMLGluの間での、いわゆるエステルの種類による化学シフトの違いは見られない。以上のことから、両コンホメーション間の ^{15}N 化学

Table 1. Comparison of ^{15}N chemical shifts of αR -helix and β -sheet forms of some homopolypeptides in the solid state (ppm from $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$, ± 0.5 ppm)

Sample ^a	Conformation ^b	^{15}N Chemical Shift δ (ppm)	$\Delta\delta$ ^c (ppm)
PLA1a-50.	αR -helix	98.6	
Z-(L-Ala) ₇ -NHBU	β -sheet	101.8	- 3.2
PLLeu-100	αR -helix	97.0	
Z-(L-Leu) ₆ -OEt	β -sheet	107.0	-10.0
PBLAsp-100	αR -helix	99.2	
PBLAsp-5	β -sheet	100.4	- 1.2
PBLAsp-100-III	β -sheet	100.4	
PBLGlu-100	αR -helix	97.6	
Nps-(L-Glu(OBzl)) ₆ -NHBU	β -sheet	99.5	- 1.9
PMLGlu-100	αR -helix	97.6	
Nps-(L-Glu(OMe)) ₄ -OH	β -sheet	99.5	- 1.9
PLVal-100	β -sheet	105.9	
PLIle-100	β -sheet	106.1	

^a Abbreviations: Ala; alanine, Leu; leucine, BLAsp; β -benzyl-L-aspartate, BLGlu; γ -benzyl-L-glutamate, MLGlu; γ -methyl-L-glutamate, Val; valine, Ile; isoleucine, Z; benzyloxycarbonyl, Bu; butyl, Et; ethyl, Nps; o-nitrophenylsulfenyl, Bzl; benzyl, Me; methyl, ^b Conformations of the samples were determined by the IR, Far-IR and ¹³C CP-MAS NMR spectroscopic methods. ^c Differences of the ^{15}N chemical shifts of the αR -helix relative to those of the β -sheet form.

シフト差はアミノ酸残基の種類によって異なることが明確になった。

①と②で述べた ^{15}N 化学シフトと立体構造との関係を確立するためには、量子化学的手法を用いた ^{15}N 化学シフトの理論計算に基づいた考察が必要かつ有効であろうと考え、現在計算を進めている。又、 αR -ヘリックス形や β -シート形以外のコンホメーション(ポリグリシン構造、ポリアロリン構造など)についても、種々の合成ポリペプチド(コポリペプチドを含めて)を用いて、その立体構造と ^{15}N 化学シフトとの関係、及びアミノ酸シーケンスが ^{15}N 化学シフトにどの程度反映されるか、などについて現在、研究を進めているところである。

文献

- 1). T.Taki, S.Yamashita, M.Satoh, A.Shibata, T.Yamashita, R.Tabeta, H.Saito, Chem. Lett. 1981,)
- 2). H.Saito, R.Tabeta, A.Shoji, T.Ozaki, I.Ando, Macromolecules, 16, 1050 (1983).)1803.)
- 3). H.Saito, R.Tabeta, I.Ando, T.Ozaki, A.Shoji, Chem. Lett. 1983, 1437.
- 4). I.Ando, H.Saito, R.Tabeta, A.Shoji, T.Ozaki, Macromolecules, 17, 457 (1984).
- 5). H.Saito, R.Tabeta, T.Asakura, Y.Iwanaga, A.Shoji, T.Ozaki, I.Ando, Macromolecules, 17,)
- 6). A.Shoji, T.Ozaki, H.Saito, R.Tabeta, I.Ando, Macromolecules, 17, 1472 (1984).)1405 (1984).)
- 7). H.Saito, R.Tabeta, A.Shoji, T.Ozaki, I.Ando, T.Miyata, Biopolymers, 23, 2279 (1984).
- 8). A.Shoji, T.Ozaki, H.Saito, R.Tabeta, I.Ando, Makromol. Chem., Rapid Commun., 5, 799 (1984).
- 9). G.C.Levy, R.L.Lichter 著 "N-15 NMRの応用"(荒田洋治, 甲斐正恒 共訳) 培風館, 1981年, 6章
- 10). K.Wüthrich 著 "生体物質のNMR: ペプチド-タンパク質を中心に"(荒田洋治, 甲斐正恒 共訳) 東京化学同人, 1979年, 7章
- 11). Tai-Huang Huang, W.W.Bachovchin, R.G.Griffin, C.M.Dobson, Biochemistry, 23, 5933 (1984).
- 12). T.A.Cross, S.J.Opella, J. Mol. Biol., 182, 367 (1985).
- 13). A.Pines, M.G.Gibby, J.S.Waugh, J. Chem. Phys., 59, 569 (1973).

農工大・工 朝倉 哲郎・田中 智子・山口 禎二

1. 緒言

絹は、優れた繊維特性を有する魅力的な繊維素材であり、近年、天然繊維素材を見直そうとする気運の中で、脚光をあびつつある。従来、我々は、NMR法を主に絹フィブロインの構造解析の研究に用いて来たが、本研究では、 ^{13}C 同位体ラベル法を用いて、実質的に絹フィブロインの合成が行なわれる5齢期の蚕について、その合成の様子を検討したので、報告する。

2. 実験

家蚕、*Bombyx mori* ならびに野蚕の一種であるエリ蚕、*Philosamia cynthia ricini* の、食下葉である各々、桑葉ならびにシンジュ葉の ^{13}C ラベルは、 $^{13}\text{CO}_2$ 存在下での光合成により行なった。 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコース、 $[1-^{13}\text{C}]$ グリシン、および $[1-^{13}\text{C}]$ アラニンの5齢期蚕への取り込みの実験は、この ^{13}C ラベル前駆体を、人工飼料に混入する方法と、注射器にて、直接、中腸に投与する方法を、適宜、用いた。絹フィブロイン水溶液のNMR測定は、エリ蚕については、抽出液状絹を、家蚕については、繭を精練後、得られた再生絹フィブロインを用いた。 ^{13}C NMRの測定は、JEOL FX-200又はFX-90Qを用い、各々、50MHz、22.5MHzにて、 ^{31}P NMRの測定は、JEOL FX-90Qを用い、36.3MHzにて行なった。

3. 結果と考察

桑葉を源とした絹フィブロインの蚕体内での合成について、以下の如く各段階に分けて検討した。最初に、桑葉のどの成分から、主に、絹フィブロインの構成アミノ酸が、合成されるかを検討した。光合成により ^{13}C ラベルした桑葉を、5齢期蚕に与え、得られた絹フィブロインの ^{13}C NMRをFig. 1に示した。グリシン、アラニン、セリンの各炭素主ピークのすそに、 $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ カップリングによるダブルットが観測され、 ^{13}C ラベル桑葉が、絹フィブロイン中に取り込まれていることがわかる。実際、 ^{13}C ラベル桑葉を5齢期に与えた時の各日の食下量と得られた繭の ^{13}C ラベル率との間には、強い相関が認められた。次に、 ^{13}C ラベル桑葉を、80%エタノール可溶性画分と不溶性画分に分離し、別々に、投与して得られた絹フィブロインのNMRスペクトルは、可溶性画分投与の場合のみ、 $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ カップリングによるダブルットが観測された。この ^{13}C ラベルされた可溶性画分の主成分は、スクロースと同定されたので、絹フィブロインの構成アミノ酸は、桑葉中のスクロース由来であると結論できる。尚、絹フィブロインのチロシン炭素については、 $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ カップリングによるダブルットは観測されず、チロシンは、他の経路由来と

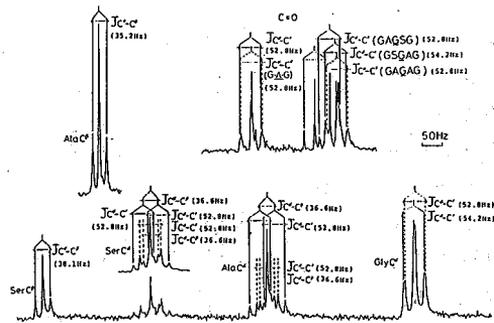


Fig.1 ^{13}C NMR spectra of *B. mori* silk fibroin obtained from the silkworm given ^{13}C labeled mulberry leaves.

あさくら てつお・たなか ともこ・やまぐち ていじ

考えられる¹。更に、スクロースは、蚕体内で、ヘキソースに分解されるので¹次に、ユニホームラベルではなく、1位のみをラベルしたグルコースを投与して、絹フィブロインへの取り込みを検討した (Fig. 2)。aが¹³Cエンリッチしない場合、cが[1-¹³C]グルコースを5齢期に投与した場合、bがチロシンピークを基準としたその差スペクトルで、数字は、取り込みの相対量%を示した。特に、アラニンC^β、セリンC^βへの取り込み率が、大きいことがわかる。このことは、蚕体内の炭化水素の分解の

主経路が、glycolysisと呼ばれる Embden-Meyerhof sequence であり、アミノ交換反応の中で、ピルビン酸→アラニンが活発であること、又、アラニン→セリンの相互交換に加え、3-ホスホグリセリン酸→セリンへの経路の存在も示唆される^{4,2}。次に、このようにして生成したアミノ酸が、どのように、家蚕絹フィブロイン中に取り込まれるかを主成分の[1-¹³C]グリシン投与の実験から検討した。Fig. 3は、5齢期蚕に、一日のみ、一定量の[1-¹³C]グリシンを経口投与し、¹³Cラベルした一連の絹フィブロインのカルボニル部位のスペクトル変化を示した。カルボニル部位は、既に、

ペントペプチドレベルで、帰属されているので³、シーケンスへの取り込み量の変化が観測可能である。5齢期後半程、絹フィブロイン中のグリシンピークが、増大した。更に、注意深く観測すると、各シーケンスの増加の様子が、異なることがわかる。Fig. 4は、アラニン、グリシンならび

に、セリンからなるシーケンスを仮定し、シミュレーションにより求めたペントペプチドレベルでの各シーケンスピークの¹³Cエンリッチ率の名目変化をまとめたものである (チロシンピークを基準とした)。

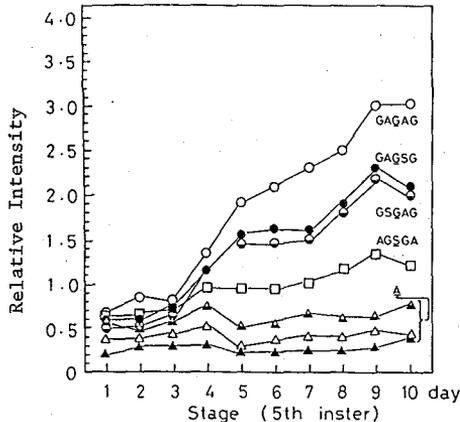


Fig. 4 Change in the intensities of Gly, Ser and Ala carbonyl peaks as a function of the day labeled with [1-¹³C]Gly.

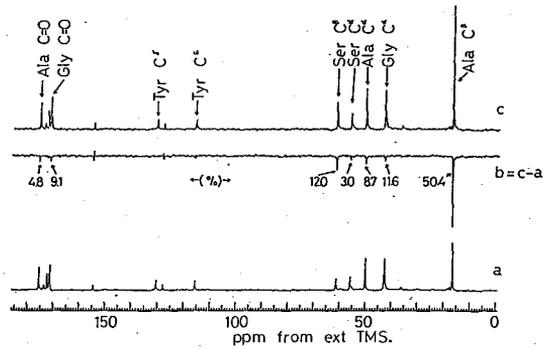


Fig. 2 ¹³C NMR spectra of *B. mori* silk fibroin. a) non-labeled c) labeled with [1-¹³C]Glucose b) the difference between a) and c).

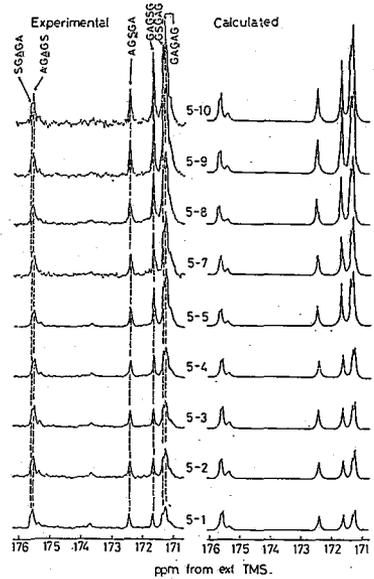


Fig. 3 ¹³C NMR spectra of carbonyl region of *B. mori* silk fibroin. Left; observed spectra Right; calculated spectra

GAGAGシーケンスとセリンを含むGS \underline{G} AGおよびGAG \underline{S} Gシーケンスの ^{13}C エンリッチ率の各日変化を検討すると、5齢期後半程、前者の方が増加していることがわかる。相対的に、セリンは、結晶部に多く含まれることを考慮すると、この増加率の差は、非晶部生成の様子を反映しており、家蚕は、5齢期には、結晶部と非晶部を同時に生成していると推測される。又、セリンピークは、5齢期後半程、増加しているが、これは、グリシン \rightarrow セリンへの変換が起こっており、その変換の割合をFig. 4より定量的に見積もることができる。次に、生成したアミノ酸がどのように絹フィブロイン中に取り込まれるかを生きた蚕について直接観察した。後部絹糸腺を含む第3腹脚近傍に磁場をあて、[1- ^{13}C]グリシン投与後のカルボニル部位のスペクトルの時間変化を検討した (Fig. 5)。得られたピークは、すべて[1- ^{13}C]グリシン由来である。10~70分後のスペクトルでは、少なくとも5本のピークが出現し、蚕体内での[1- ^{13}C]グリシンからの変換を示している。尚、 ^{14}C グリシン投与後のオートラジオグラムの結果⁴を参照すると、 ^{13}C エンリッチ物は、中部ならびに後部絹糸腺外の組織に存在していると考えられる。その後、2本の主ピークのみを与えるが、そのピーク位置から、低磁場側を[1- ^{13}C]グリシン、高磁場側を絹フィブロインのグリシン残基に帰属できる。更に、徐々に、絹フィブロインピークが増大していくが、6時間を経過すると、その相対量は、一定となる。

次に、アラニン含量が多く、アラニンの連鎖から成る α -ヘリックス部分を含み、家蚕とは、そのコンホメーションが異なるエリ蚕について、同様の研究を進めた。エリ蚕の食下葉は、シンジュ葉であるが、 $^{13}\text{CO}_2$ 存在下、光合成により ^{13}C ラベルし、5齢期に与えたときの各日の食下量と得られた繭の ^{13}C ラベル率の間には、家蚕同様、強い相関が認められた。更に、シンジュ葉の ^{13}C ラベルは、スクロースに集中しており、家蚕同様、Glycolysis経路を経て、アミノ酸に変換していくと考えられる。次に、5齢期蚕に、一日のみ、一定量の[1- ^{13}C]アラニンを経口投与し、 ^{13}C ラベルした液状絹のカルボニル部位のスペクトル変化を示した (Fig. 6)。特に、アラニン域で出現する2重ピークは、ヘリックスとコイルの状態を表わしており^{5,6}、5齢期後半程、取り込み率が大いことがわかる。更に、グリシンのピーク域を基準として、差スペクトルをとり、詳細に検討する

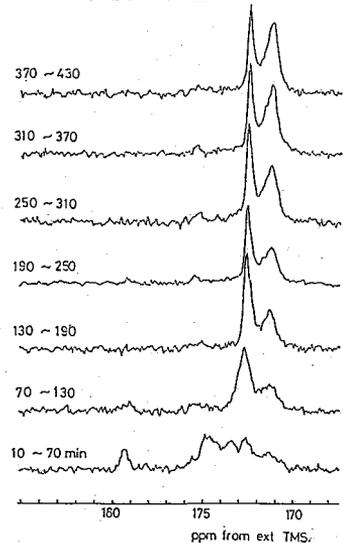


Fig.5 In vivo *B.mori* silkworm carbonyl resonance spectra after feeding [1- ^{13}C] Glycine. The spectra were collected in 1 hour blocks.

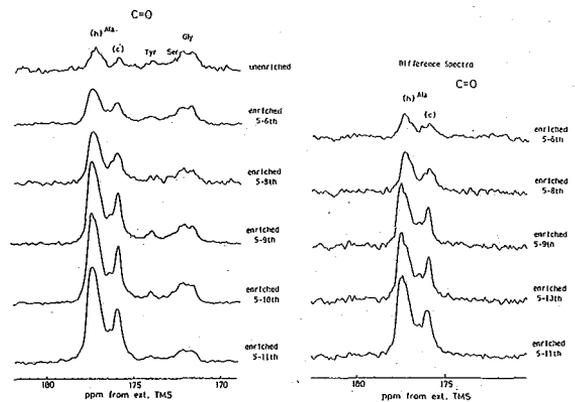


Fig.6 ^{13}C carbonyl resonance spectra of *P.c. ricini* liquid silks.

と、 α -ヘリックス含量は、5齢6日から9日まで増加するが、それ以降は、一定とすることがわかる。

更に、生きたエリ蚕について、[1- 13 C]アラニン投与後のスペクトル変化を検討したところ、余分の[1- 13 C]アラニンは、尿素として、排せつされることが、わかった²。最後に、蚕の生理状態に関する知見を得るために、 31 P NMRを用いて、人工飼料の組成を変化させ、それと対応した蚕の生理状態の変化を検討した。組成変化は、生大豆粉末、シンジュ葉乾燥粉末、ビタミン類とし、全量を一定にするために、セルロース粉末で調整した⁷。7種の組成変化した飼料A~Gを用意し、19頭ずつに分けた5齢期エリ蚕に摂食させた。Fig. 7に、5齢3日から4日目の蚕について得られた 31 P NMRを帰属とともに示した。NMR測定時点での各グループの蚕の外見には、差が認められなかった。Aは、従来から与えている人工飼料であり、シンジュ葉粉末の主成分である。飼育成績は、さなぎになったものが14頭、死亡したものが2頭（残り3頭は、液状絹の 13 C NMRの測定に用いた）であった。Bは、シンジュ葉のかわりに生大豆粉末で置き換えた場合であるが、Aと類似したスペクトルを与え、飼育成績も同様に良好であった。一方、シンジュ葉を、セルロース粉末、ビタミン類で置き換えたC, D, E, Gの場合には、すべて熟蚕に達せず死亡した。これらの蚕の 31 P NMRでは、ATPの相対量が著しく減少していることがわかる。Fは、Bと類似した飼料組成を有するが、アスコルビン酸、ビタミンB混合を含まない場合であり、その 31 P NMRでは、ATP相対量が減少しており、飼育成績も落ちている。以上の様に、ATPの相対量、例えばATPの β 位 31 Pピーク/糖 31 Pピークの比は、エリ蚕体内の5齢期初期の生理状態を反映し、飼育成績の予測を与えることがわかる。A, BおよびFの液状絹の 13 C NMRを測定したところ、アミノ酸組成ならびにカルボニル域から求めたヘリックス含量には、有意差が認められなかった。

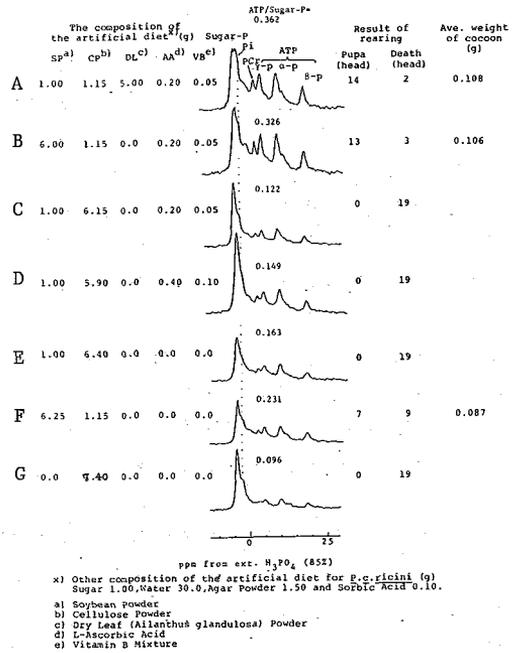


Fig. 7 31 P NMR spectra of *P.c. ricini* silkworms.

参考文献

1. 伊藤智夫編, 家蚕生化学, 養華房, 1984.
2. L. Stryer, "Biochemistry", W. H. Freeman, 1975.
3. T. Asakura, Y. Watanabe and T. Itoh, *Macromolecules*, **17**, 2421 (1984).
4. 田中一行ら, 日蚕雑, **45**, **7**, (1976).
5. T. Asakura and T. Murakami, *Macromolecules*, in press.
6. 朝倉哲郎, 鈴木浩, 田中智子, 日蚕雑, 投稿中.
7. 福田紀文, 蚕試報, **19**, 201 (1964).

TRNOEによるペプチドとリン脂質二重膜との相互作用の解析
 コンホメーションおよび膜内での深さ

(東大理) ○岡田明彦 若松 馨 鈴木緑子 東島 勉
 宮澤辰雄

はじめに

酵素などの生体高分子に結合した低分子リガンドのコンホメーションを知る有力な方法として、近年Transferred NOE(TRNOE)が注目されている。TRNOEとは、高分子に結合した状態においてリガンドに生じた負のNOEが、化学交換によりフリーの状態に伝わる現象である。生理活性ペプチドのような低分子では、図1(b)のようにフリーの状態で、 $\omega_{TC} \approx 1$ となりNOEが観測されない。ところが、このような分子が、 T_c の大きい高分子と結合・解離をくり返している場合には、図1(a)のように、結合状態で近接しているスピンの一方Aをフリーのシグナルを照射することにより飽和すると、フリーのCのシグナルに負のNOEが観測される。従って、TRNOEを解析することにより、高分子に結合した状態の低分子のコンホメーションを間接的に知ることができる。私たちの研究室では、TRNOEの手法を生体膜に結合した生理活性ペプチドのコンホメーションの研究に応用するため、不必要なリン脂質のシグナルを消すべく、全重水素化ホスファチジルコリンを合成した。この二重膜に生理活性ペプチドを結合させてTRNOEを観測し、ペプチドの結合状態におけるコンホメーションを解析することに成功している。本研究では、生理活性ペプチドであるメリチンについて、TRNOEを使って膜に結合した状態のコンホメーションを解析した。同時にスピンラベル化したリン脂質を用いて、膜のどの部分にメリチンが存在するかを明らかにした。

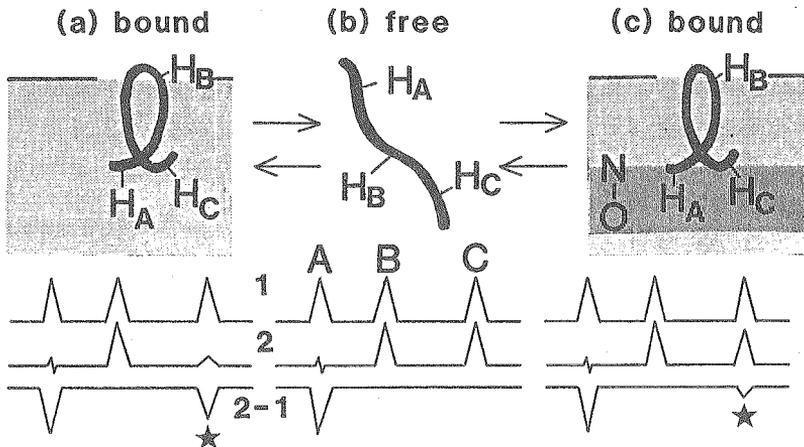


図1. TRNOEの機構と、そのスピンラベルによる減少

今まで、スピンラベルされたリン脂質は、ESRの分野で主として膜の流動性を知る目的で利用されてきた。しかし本研究では、電子スピンの約700倍の磁気モーメントを持つことに着目して、ニトロキシドラジカルを膜の特定の深さに局在させ、これ

おかだあきひこ・わかまつかおり・すずきみどりこ・ひがしじまつとむ・みやざわたつお

を一種の緩和試薬として利用する方法を検討した。すなわち、図1(c)のように、膜に結合したプロトンCのそばにニトロキシドラジカルが存在すると、A-C間に観測されたはずのTRNOEが減少する。ニトロキシドラジカルを膜のいろいろな深さに局在させればペプチドの各プロトンが膜の中でどのような深さに存在するかについての情報が得られるはずである。本研究では、リン脂質スピラベルとして、sn-2位に5-doxylstearic acid および12-doxylstearic acidを組みこんだホスファチジルコリン（それぞれ5-SLPC、12-SLPCと略す）、極性部にTEMPO コリンを持つホスファチジルコリン（C-SLPC）をそれぞれ合成してTRNOEの観測に用いた（図2）。ペプチドのあるプロトンペアに由来するTRNOEが、C-SLPCで減少すれば、そのプロトンペアはリン脂質二重膜の極性部分にあり、5-SLPCで減少すれば非極性部分の比較的浅い所、12-SLPCで減少すれば膜の中央部にあることがわかる。

実験

メリチンは、ハチ毒の凍結乾燥品(Merck) から精製した。一方、プロトンシグナル帰属のために、メリチンに38°C、pH 8.5でロイシンアミノペプチダーゼを作用させ、N端から1-数残基を欠いたフラグメントを得た。これらを逆相HPLCで分離して¹H-NMRの試料とした。

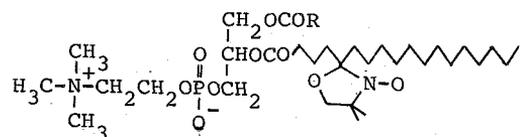
全重水素化ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC-d₈₀)は、Kingsley & Feigensonの方法に従って合成した。ホスファチジルコリンスピラベルは、卵黄レシチンにホスホリパーゼを作用させて、sn-2位の脂肪酸、あるいはコリンを切断し、かわりに脂肪酸スピラベルかTEMPO コリンをそれぞれ結合させることにより合成した。¹H-NMR測定用にはこのようなリン脂質の重水懸濁液を超音波で処理し、ベシクルとしたものを用いた。

¹H-NMRによるTRNOEの測定およびその他の¹H-NMRの実験は、Bruker WH-270, WM-400を用いた。TRNOEの実験は、DPPC-d₈₀の相転位温度(36°C)以上(40-50°C)で行った。

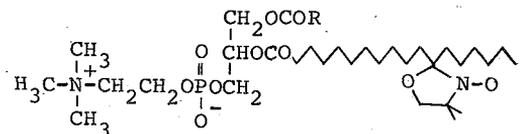
結果

1. プロトンシグナルの帰属 メリチンの場合、図3の一次構造が示すとおり、同種アミノ酸が多いため、アミノ酸の種類は帰属できても、何残基目のアミノ酸であるか知るのはむずかしい。フリーの状態ではNOEがほとんど観測されないため、軽水中でのNOE測定からアミドプロトンとαプロトンの結びつきを知ることはできない。このため、本研

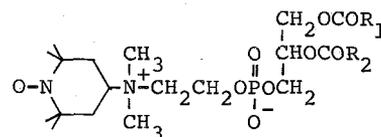
図2. 合成したリン脂質スピラベル
5-SLPC



12-SLPC



C-SLPC



究では、N端から1残基ずつ欠いたフラグメントのスペクトルを比較することにより、アラニン (Ala⁴, Ala¹⁵)、バリン (Val⁵, Val⁸)、グリシン (Gly¹, Gly³, Gly¹²)の帰属を行った。たとえば、図4のように、メリチンの2-26残基、3-26残基のフラグメントを比較すると、2つあるアラニンのメチルプロトンのシグナルのうち、一方だけが低磁場シフトしている。他に変化したのは、切断されて消えたIle²のシグナルと、新たにN端になったGly³のシグナルだけだったことから、アラニンのメチルプロトンに生じた変化は、その残基がN端に近づいた影響と考えられる。従って、変化したほうのアラニンのシグナルがAla⁴、変化しなかったほうがAla¹⁵に帰属できた。

2. TRNOEの解析 メリチンの重水溶液にDPPC-d₈₀のベシクルを加えると、

いろいろなプロトン間に負のTRNOEが観測された。残基間に生ずるTRNOEから、脂質二重膜に結合したメリチンのコンホメーションを次のように明らかにした。まずC端側の部分で、Trp¹⁹βとAla¹⁵α・β; Ser¹⁸βとAla¹⁵α; Ala¹⁵βとGly¹²αなどのプロトン間に生じるTRNOEから、Gly¹²-Trp¹⁹の部分が3-4残基周期で近接していることがわかった。CPKモデルを使った考察から、この部分は1ターン3-4残基のヘリックスをつくっていると考えられる。また、この領域にある2つの帰属されていないイソロイシン (Ile¹⁷, Ile²⁰)のシグナルのうち、一方 (Ile-Iとする)は、Ser¹⁸のプロトンとの間にTRNOEが観測され、他方 (Ile-IIとする)は、Trp¹⁹の各プロトンとの間にTRNOEが観測された。それぞれのイソロイシンは、TRNOEの生じた方の残基に隣接しているはずなので、Ile-IはIle¹⁷、Ile-IIはIle²⁰に帰属されると考えられる。

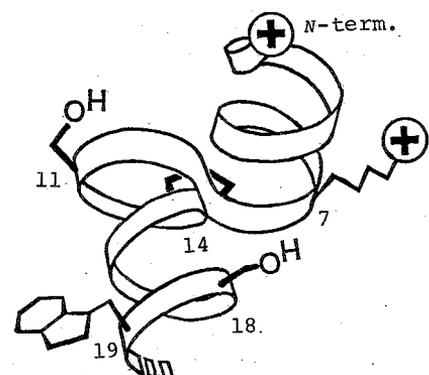
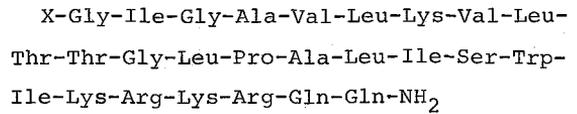


図5. 二重膜に結合したメリチンのモデル



(X= H or HCO)

図3. メリチンの一次構造

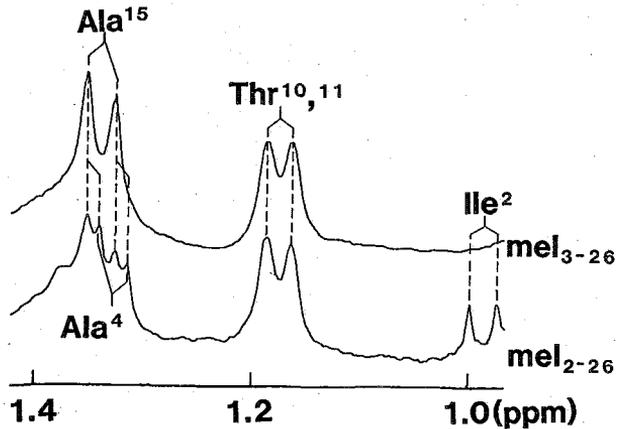
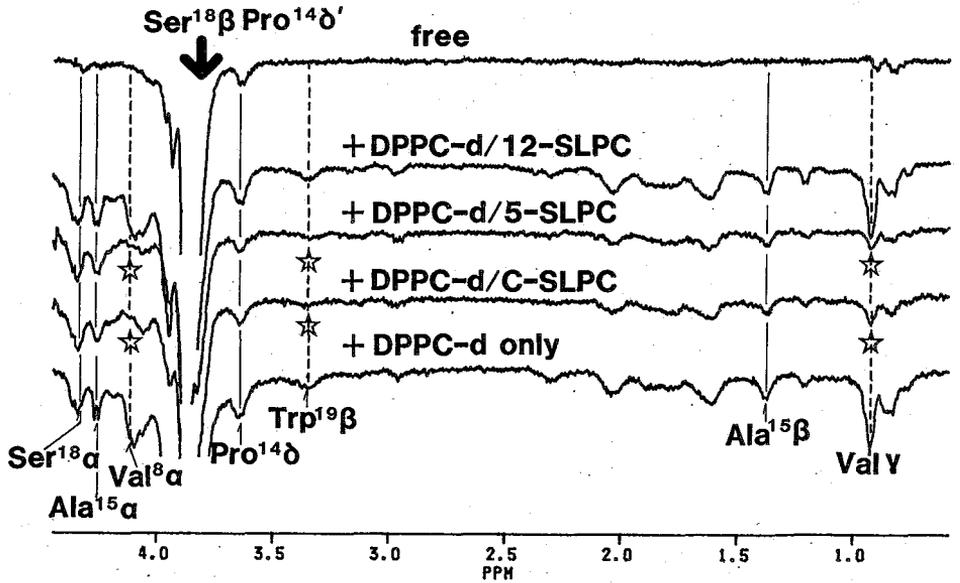


図4. メリチンのフラグメントの270MHz ¹H-NMRスペクトル (pH 3.85)

次にN端側も考えると、Val⁸αとSer¹⁸β; Val⁸αとGly¹²α; Pro¹⁴δとVal⁵α; Gly¹αとAla⁴βなどのプロトン間に生じたTRNOEから、Gly¹-Val⁸の部分もヘリカルなコンホメーションをとっていることがわかった。以上のことからDPPC-d₈₀のベシクルに結合したメリチンは、図5のように2つのヘリカルな領域が折りかさなった非常にコンパクトなコンホメーションをとっていることがあきらかになった。

3. スピンラベルを含んだ膜でのTRNOE 5-

12-、および C-SLPC を、モル比で数パーセント含んだ二重膜で TR NOE を観測すると、TR NOE が減少した。たとえば図 6 では、C-SLPC、5-SLPC を含む膜について、Ser^{18β} を飽和した時に Val^{8α} に生じる TR



NOE が減少している。このような結果を C 端側についてまとめたのが表 1 である。Thr¹⁰-Ile²⁰ の間は、Pro¹⁴、Ala¹⁵、Ser¹⁸、Trp¹⁹、が膜の浅いところに、Thr、Gly¹²、Ile¹⁷、Ile²⁰、が膜の深いところに埋まっていることがわかった。この部分がヘリックスを形成していることを考慮すると、1つのメリチン分子は二重膜の一方に結合し、C 端側のヘリックス軸はほぼ膜の面と平行で、二重膜の非極性の部分にロイシン、イソロイシンの側鎖をつきだしていると推定される。また、さらに C 端側のアルギニンを飽和したときに生じる TRNOE は、C-SLPC があると減少するので、C 端は膜の表面に出ていると考えられる。

考 察

L.R.Brown らは、メリチンを全重水素化した脂質ミセルにとりこませて NOE を測定しミセルに結合したメリチンは、N 端側のドメインと C 端側のドメインに分かれていると指摘した。ところが脂質二重膜に結合したメリチンは、もっとはるかにコンパクトなコンホメーションをとり、疎水性の側鎖を膜の深いところまで埋めていることが、本研究であきらかになった。二重膜はミセルに比べ、はるかに秩序ある構造を持っていることがこのようなコンホメーションの違いをもたらしたと考えられる。従ってペプチドと生体膜との相互作用を ¹H-NMR で研究するには、全重水素化リン脂質の二重膜にペプチドを結合させて TRNOE を観測するのが、現在いちばん確かで有効な手段であるといえる。

図 6. メリチンの TRNOE 差スペクトル (400MHz)

	C-SLPC	5-SLPC	12-SLPC
Thr ^{10,11}		○	○
Gly ¹²	(○)	○	○
Leu ¹³			
Pro ¹⁴	○	○	
Ala ¹⁵	(○)	○	
Leu ¹⁶			
Ile ¹⁷		○	○
Ser ¹⁸	○	○	
Trp ¹⁹	○	○	
Ile ²⁰			○

表 1. リン脂質スピンラベルによる TRNOE の減少 ○: 減少したシグナルを持つ残基

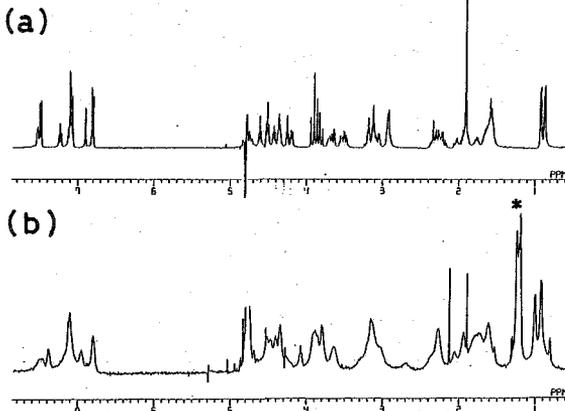
(東レリサーチセンター) ○箱垣 冬彦 寺沢 功

〔はじめに〕 LHRHは $p\text{Glu}^1 - \text{His}^2 - \text{Trp}^3 - \text{Ser}^4 - \text{Tyr}^5 - \text{Gly}^6 - \text{Leu}^7 - \text{Arg}^8 - \text{Pro}^9 - \text{Gly}^{10} - \text{NH}_2$ よりなるデカペプチドアミドである。視床下部ホルモンであり、性腺刺激など重要な役割をはたしている。生理学的重要性からLHRHについては、多くの研究がおこなわれ、構造と活性の相関が報告されている。今迄の研究結果をまとめると

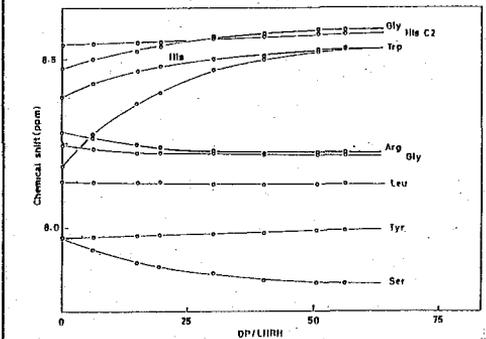
- ① $p\text{Glu}^1$, His^2 , Trp^3 のN末残基は活性に関与している重要な(アミノ)酸残基である。
- ② Ser^4 , Tyr^5 , Arg^8 などの(アミノ)酸残基の置換では、有意の活性は保持されることからこれらの残基は受容体への結合、立体構造の保持に関与している。
- ③ $[\text{D-Phe}^6] - \text{LHRH}$, $[\text{D-Trp}^6] - \text{LHRH}$ はLHRHに比較して100倍の活性を持つ。
- ④ Leu^7 を Gly^7 に置換すると $1/100$ に活性は下がる。

^{13}C -NMRによるLHRHの研究では、水溶液中ではLHRHはフレキシブルな分子であり、厳密な立体構造をとっていない。したがって水溶液中の構造と活性との相関を明らかにすることは困難のように思われた。LHRHの構造形成には、疎水領域と水溶液の界面が重要である。そこで我々は全重水素化リン脂質ミセルを用い、その中に埋めこまれたLHRHの構造をNMRにより決定し、構造と活性の相関について考察した。

〔結果〕 図1(a)はLHRH, (b)にドデシルホスホコリン(DP)ミセルに埋めこまれたLHRHの ^1H 400 MHz NMRスペクトルを示す。LHRHのDPに対するモル比は ~ 60 であり、DPにとりこまれることにより、LHRHのシグナルはシフトするとともに、線幅が増大している。図2はLHRHのアミドプロトンの化学シフト



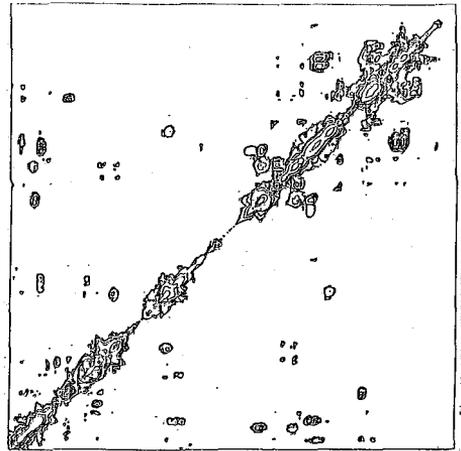
〔図1〕 (a) LHRH (D_2O , pH 7.5) (b) LHRH+DP ($P \sim 60$, pH 7.5, D_2O) の 400 MHz ^1H NMR スペクトル



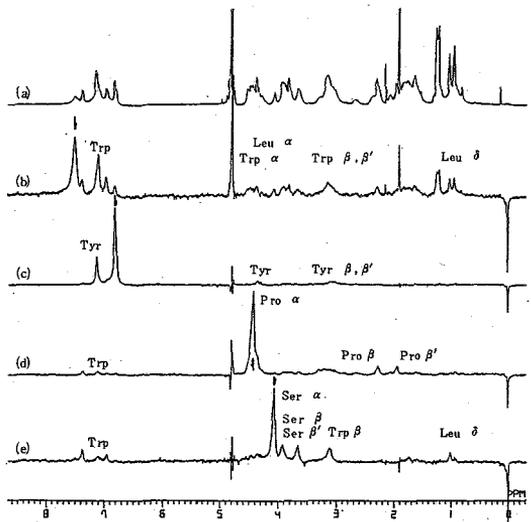
〔図2〕 LHRHのアミドプロトンの化学シフトのDP濃度依存性 (pH 5.0)

○いながき ふゆひこ てらさわ いさお

の濃度依存性を示したものである (pH 5.0)。化学シフトの変化はほぼ40倍モルのDPの存在で飽和に達した。このことはDP40分子につき1個のLHRHが結合したミセルを形成していることを示している。DPは単独でも40分子で一つのミセルを形成することが報告されており、LHRHはこのようなミセルに取りこまれていると考えのが妥当である。このようなシフトが観測されたことは、水溶液からミセルにとりこまれることにより、相当大的な構造変化が誘起されたことを示すばかりでなく、ミセルに結合したLHRHとフリーのLHRHの間で速い交換関係が成立しており、ミセル濃度が高くなるにつれ、ミセルに結合したLHRHの割合が増えることになる。モル比40以上では、大部分のLHRHはミセルに結合した状態となり、ミセルに埋もれたLHRHの極限シフトを与える。なお、60倍モルのDPの存在にもかかわらず、全重水素化DPを用いているため、DP由来のシグナルは1.25 ppm (*)の残余のアシルプロトンのみ観測される点である。全重水素化物を用いることにより、ミセル中の生理活性ペプチドの構造を直接解析することが可能になる。図3にDPに埋もれたLHRHの²Hシフト相関二次元スペクトルを示す。LHRHのみの²Hシフト相関二次元スペクトルおよびDPによる滴定実験の結果も参照し、DPに埋もれたLHRHのシグナルの帰属をつけた。次にミセルに埋もれたLHRHの構造を決定するため、NOEの測定をおこなった。図4はLHRHとDP複合体 (pH 7.5) の差NOEスペクトルを示したものである。Trpの芳香族プロトンを照射すると (図4b), Trpばかりではなく、Leuのδ, Serのα, βプロトンに大きなNOEが観測されている。これより、TrpとLeuの側鎖が空間的に近接していることがわかる。一方、Tyrの芳香族プロトンを照射した場合には (図4c), TyrのみにNOEは観測されている。したがって、Tyrの芳香族環はTrpの場合と異なり、残基側鎖環の少ない状態にあると考

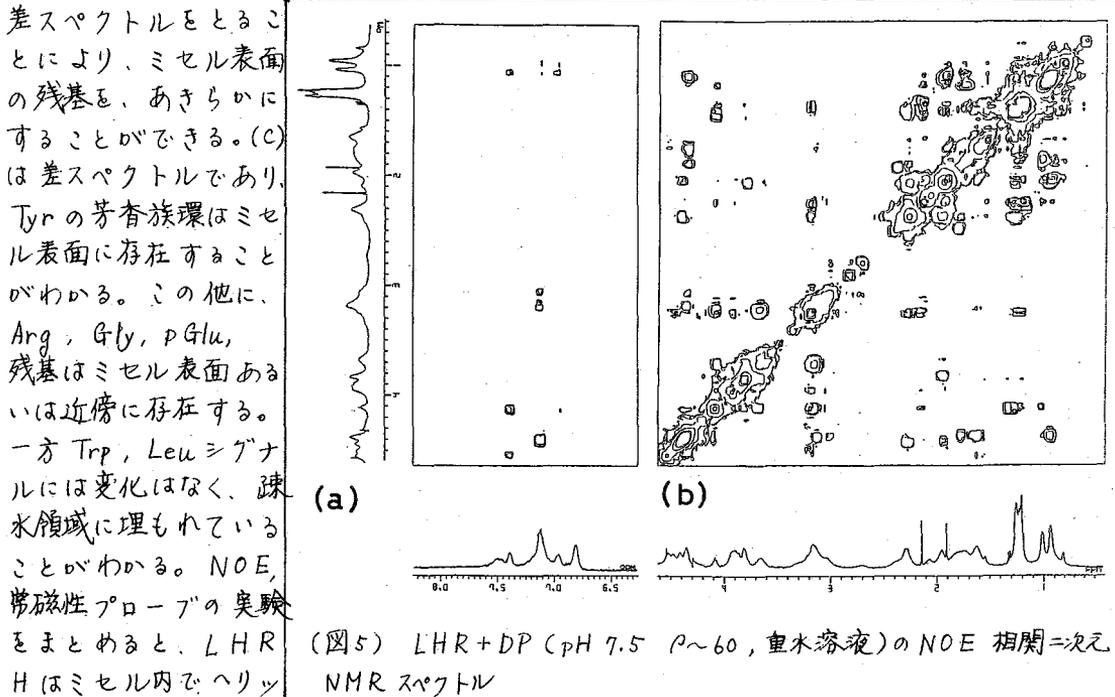


(図3) LHRH + DP (pH 7.5, p ~ 60)
²Hシフト相関 = 次元 NMR スペクトル



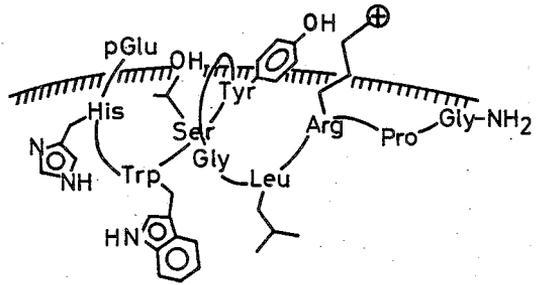
(図4) LHRH + DP (pH 7.5, p ~ 60) の NOE 差スペクトル (a) 1D スペクトル (b) Trp 芳香族 (c) Tyr 芳香族 (d) Pro α (e) Ser α を照射

えられる。Serの α プロトンを照射した場合には(図4e), Trpの芳香族プロトン, β プロトン, LeuのS, β プロトンにNOEが観測されている。これより, Trp, Leu, Serは空間的に近接していると結論できる。LHRHとDP複合体($\rho \sim 60$, pH 7.5, D_2O 溶液)のNOE相関二次元NMRスペクトルを図5に示す。混合時間は100 msとり, Jクロスピークを除くため, t_1 変調をおこなっている。芳香族とアリファティックプロトン間のNOE交差ピークとして, (Ser, Trp), (Trp, Leu), アリファティック領域の交差ピークとして, (Ser d, Trp β), (Ser d, Leu S)が観測されている。これらの結果は, 差NOEスペクトルの結果ともよく対応している。次にこれらのNOEの関係を満足する構造について考察した。四残基はなれたTrpとLeuが空間的に近接することは, LHRHのTrpとLeuを含む部分が α -ヘリックスを形成している可能性を示す。図6は, LHRHのN末端8残基が α -ヘリックスを形成している分子構造のスキームを示している。 α -ヘリックスを形成すると, Trp, Leu, Serは空間的に近接し, Trp, Leu, Ser残基間のNOEを説明することができる。 α -ヘリックス構造をとる場合には, Trp, Leuの疎水性残基はヘリックスの一方の側に, Arg, Tyrなどの親水性残基は, 他方の側に集まっていることがわかる。そこでミセル内部におけるLHRHの配置を調べるため, アニオン性の緩和試薬であるGd(pic) $_3^{3-}$ を添加した。図7(a)は添加前, 7(b)はGd(pic) $_3^{3-}$ を200 μ M添加後のミセルに埋もれた状態におけるLHRHのNMRスペクトルである。Gd(pic) $_3^{3-}$ はミセル内部には入らず, ミセル表面近傍の残基と相互作用する。ミセル表面の残基は, Gd(pic) $_3^{3-}$ の緩和効果により, 線幅が増大する, Gd(pic) $_3^{3-}$ 添加前後の差スペクトルをとることにより, ミセル表面の残基を, あきらかにすることができる。(c)は差スペクトルであり, Tyrの芳香族環はミセル表面に存在することからわかる。この他に, Arg, Gly, pGlu, 残基はミセル表面あるいは近傍に存在する。一方Trp, Leuシグナルには変化はなく, 疎水領域に埋もれていることがわかる。NOE, 常磁性プローブの実験をまとめると, LHRHはミセル内でヘリッ



(図5) LHR+DP (pH 7.5 $\rho \sim 60$, 重水溶液)のNOE相関二次元NMRスペクトル

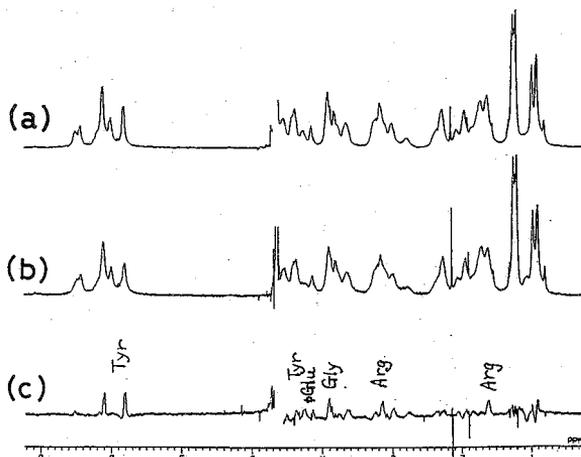
クス軸を水-ミセル界面に平行に、疎水性残基をミセル内に、親水性残基を界面に突出している(図6)。このような構造形成には、まさに水とミセルの界面が重要な働きをしている。次にLHRH-ミセル複合体について、pH滴定をおこなった。図8はpH滴定の結果であり、pHを下けると、Hisのプロトン化にともない、Trp, Ser(Leu)の α プロトンは低磁場にシフトするがArg, Tyr, pGluの α プロトンはほとんど変化しない。このことは、Hisのプロトン化にともない、ミセルに埋もれた部分に構造変化が生じていることを示す。実際 pH 4.0で



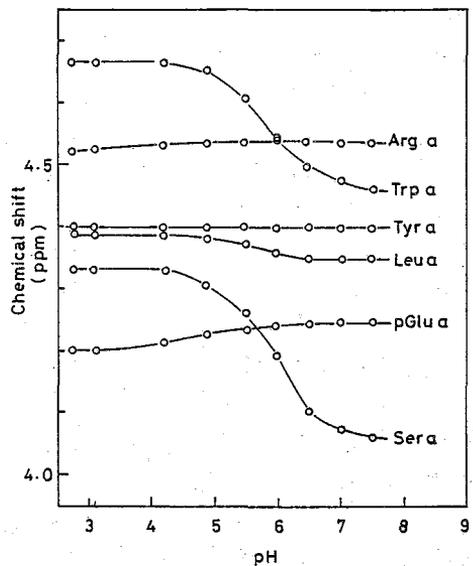
(図6) ミセルに埋もれたLHRHの構造とミセル内部における相対配置

NOEの実験をおこなったが、Trp, Leu, Ser間のNOEを検出することはできなかった。ミセルに埋もれたLHRHの構造の特徴は α -ヘリックス構造であり、Leu⁷をGly⁷に置換することにより、構造は不安定化される。また、D-Phe⁶, D-Trp⁶の置換により、更に疎水性が強まる。一方、親水残基の置換では活性には影響を与えないのであろう。以上ミセル中のLHRHの構造と活性の相関はかなり高く、重水素化ミセルを用いた生理活性ペプチドの構造解析は drug design に有効な手法になると期待される。

本研究は 昭和59年度、科学技術振興調整費による「生体膜機能の解析・利用技術の開発に関する研究」の一環として、おこなわれたものである。



(図7) (a) LHRH + DP (pH 7.5) (b) (a)に $Gd(Pic)_3$ を 200 μM 添加 (c) (a) - (b)



(図8) LHRH + DP (p~60)のpH滴定

(理 研) 柴田俊之, 鶴沢 洵, 池上 明

1. はじめに

昨年の討論会で、我々は全重水素化した *n*-alkane の ^2H NMR を測定してリン脂質二層膜中での *n*-alkane の動的な存在状態について報告した。今回は水を含むリン脂質 α 相 (液晶 L_α 相) の固体高分解能 NMR スペクトルを pulse saturation decoupling 法を用いて測定し、各共鳴線の ^{13}C -T₁ に対する含水量の影響、*n*-alkane の影響を調べ、 L_α 相中のリン脂質分子の極性基や hydrocarbon chain の運動状態がどの様に变化するかを明らかにした。

リン脂質二層膜中において水分子は極性基と chain の境界の CO 基まで浸入していることが中性子回折によって知られている。極性基中に取り込まれている H₂O の数は gel 相で約 2 mol/mol lipid (中性子回折), 液晶相 (L_α 相) で約 5 mol/mol lipid (X線回折) 程度である。¹⁾

n-alkane ($\text{C}_6 \sim \text{C}_{12}$) の二層膜中での存在状態については、昨年報告したように、その 90% 以上はリン脂質分子に平行に配向した状態で存在している (^2H NMR)。

2. 実験

測定には FX-100 分光計に CP-MAS 装置 (JEOL) を組み合わせて用いた。水を含んだ試料は、防水型固体 NMR 用ローター (研工社) を用いて測定した。 L_α 相では MAS スピードに対応したサイドバンドが観測されない。MAS スピードは回転音をコンデンサーマイクで拾い、カウンター及び CRT で周波数を測定して得た。約 3 kHz であった。

リン脂質は卵黄から抽出した egg phosphatidyl-choline (egg PC) を用いた。perdeuterated *n*-alkane は Canada Merk から購入した。含水量は *n*-alkane の有無に関係なく water/(lipid+water) で表わした。

3. 結果及び考察

Fig. 1 は H₂O 20% を含む egg PC L_α 相 (液晶相) の ^{13}C NMR スペクトルである。(a) 図は CP 法 (no MAS) で得られたスペクトルであり、(b) 図は CP-MAS スペクトルである。contact time は 10 ms である。(c) 図は pulse saturation decoupling (p. sat. dec.)-MAS 法によるものである。 ^1H に対して 10 ms 間隔で 90° パルスをかけて ($n=500$) ^1H 核を飽和させ、 ^{13}C 核の NOE enhancement を待って FID を測定する。(b) 図と同じ 100 回の積算であるが、明らかに p. sat. dec.-MAS 法の方

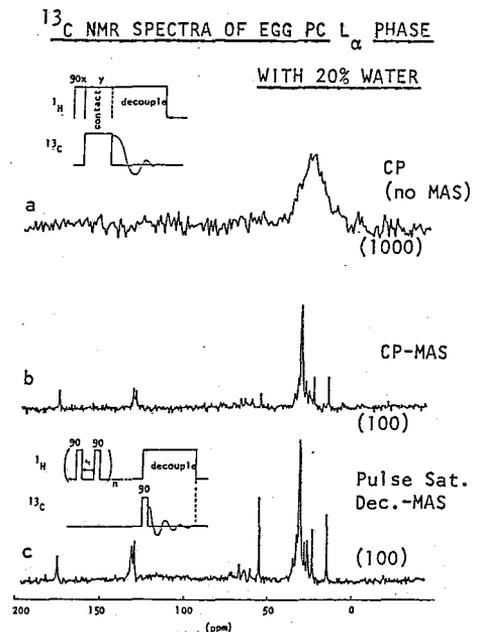


Fig. 1

しばた としゆき, うざわ じゆん, いけがみ あきら

が S/N 比が良好である。以前、加硫ゴムなど運動性の高い物質の MAS スペクトルを測定するには CP-MAS よりも P.sat. dec. 法が良い S/N を与えることが藤原らによって指摘された²⁾。液晶状態のラメラ相を形成している脂質分子の運動は活発であり、このような試料には P.sat. dec. MAS 法が適当であると思われる。

Fig. 2 に p. sat. dec. - MAS 法によって得られた ^{13}C スペクトルの各共鳴線のアサインメントが示されている。MAS スペクトルは半値幅が広い (CH_3 基で約 13 Hz) ことを除けば vesicle の高分解能スペクトルと非常に良く似ており、vesicle のアサインメントの結果³⁾ をそのまま使用した。

次にアサインされた各共鳴線の T_1 の測定を行った。用いたパルス列を Fig. 3 に示す。

^1H に対して pulse saturation をかけ、一方 ^{13}C に対して通常の 180° - τ - 90° pulse を与えて ^1H の inversion recovery を測定した。このパルス列の場合は、 180° パルス直後の ^{13}C の磁化は $-(1+\eta)M_0$ になっている。ここで $(1+\eta)$ は NOE である。これを十分長くとれば磁化は $M(\infty) = (1+\eta)M_0$ に向かって回復する。 τ 時間後の磁化 $M(\tau)$ は

$$M(\infty) - M(\tau) = 2M(\infty)\exp(-\tau/T_1) \quad (1)$$

の式に使う。

MAS 存在下で測定された T_1 に MAS の影響がどの程度入ってきているか問題である。我々の実験では 3 KHz の MAS を行っている。スピン-格子緩和を誘起するタイムスケールは 10^8 程度であるから、3 KHz の MAS による T_1 への影響はほとんど無視できると思われる (Appendix)。

Fig. 4 は p. sat. dec. 法による inversion recovery の測定例であって、サンプルは 20% の水を含む egg PC L_α 相である。N(CH₃)₃ 基と (CH₂)_n 基の $\ln\{M(\infty) - M(\tau)\}$ を時間 τ に対してプロットしたのが Fig. 6 の白丸である。約 1 桁に渡って $\ln\{M(\infty) - M(\tau)\}$ は良い直線になっている。

^{13}C NMR SPECTRUM OF EGG PC L_α

PHASE WITH 20% WATER
(Pulse Sat. Dec.-MAS)

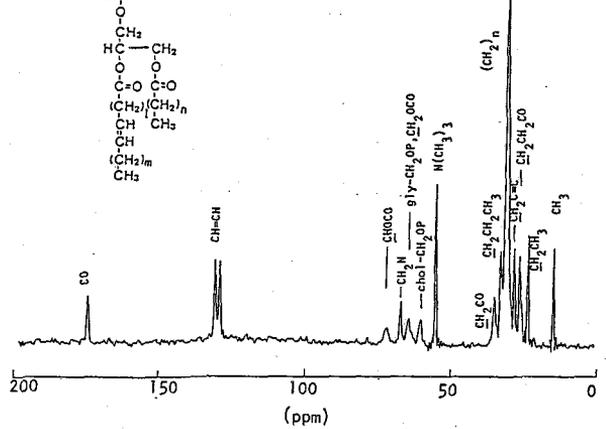


Fig. 2

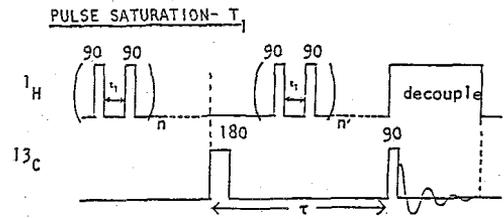


Fig. 3

INVERSION RECOVERY OF ^{13}C NMR (Pulse Sat. - T_1)
(egg PC L_α phase with 20% water)

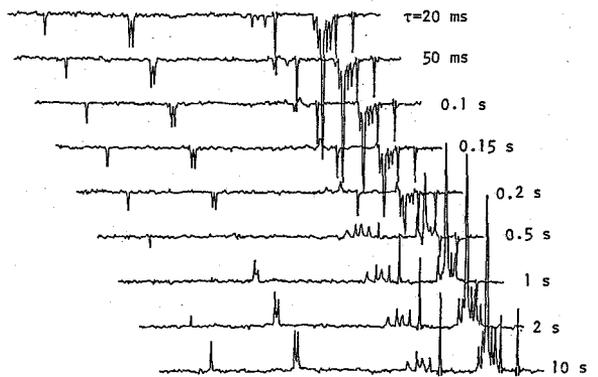


Fig. 4

Fig. 5は各共鳴線の $1/T_1$ をそれぞれのcarbonに結合しているプロトンの数 N で割ったものである。含水量5%のサンプルと20%のサンプルの $1/T_1$ を比較している。含水量が少なくとも5%以上の試料は液晶状態のラメラ相(L α 相)であることがX線回折によって確認されている¹⁾。含水量20%のサンプルの $1/NT_1$ は5%のサンプルのそれよりも分子全体に渡って値が小さくなっている。特に極性基のcholine基($(CH_3)_3NCH_2CH_2-$)の低下が著しい。H $_2$ O分子はbilayerのpolar head acholine基の運動を非常に活発にする。それと同時に分子全体の運動性にも影響していることがわかる。

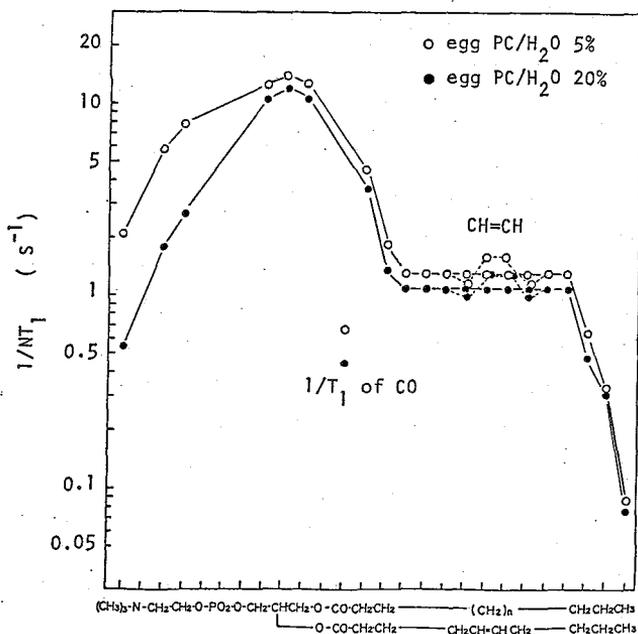


Fig. 5

egg PC L α 相の bilayer thickness d_e は含水量5%の時の48Åから20%の時の43Åへ、含水量の増加に伴って減少する¹⁾。bilayer thicknessの減少は即ち分子のorder parameterの減少である。PC分子をrod-like (so.1Aの長さのrod)であると仮定すれば $d_e = 48\text{Å}$ から $d_e = 43\text{Å}$ への変化はorder parameter $S = 0.88$ (H $_2$ O 5%)から $S = 0.61$ (H $_2$ O 20%)への変化に対応する。Fig. 5の含水量の増加に伴う $1/NT_1$ の減少はPC分子の長軸の周りの回転運動の速度の増加と共に幾分かは分子がdisorderになったことを反映していると思われる。

H $_2$ O分子はPCの極性基間の ionic な cohesive forceを弱める。その結果PC分子は長軸の周りの回転が早くなり、かつdisorderになるのであろう。

Fig. 6の黒丸はegg PC/H $_2$ O 20%のL α 相に0.5 mol比のn-dodecane-d $_{26}$ を添加したサンプルの磁化の回復である。N(CH $_3$)基のdataはdodecaneがないサンプルとほとんど同じ勾配であるが、(CH $_2$) $_n$ 基の場合は両者の勾配に差があることがわかる。

二つのサンプルのPC分子の ^{13}C 共鳴の $1/NT_1$ を比較したのがFig. 7である。choline基とglycerol基の $1/NT_1$ はほとんど差がないが、Chainの $1/NT_1$ はn-dodecane-d $_{26}$ が存在した方が低くなっているのがわかる。

dodecaneが作用しても bilayer thicknessは変化しないらしいことがMcIntoshらのX線回折の実験で報告されている。従ってFig. 7のchainの $1/NT_1$ の違いは、n-dodecaneの作用によりPC分子のchainの

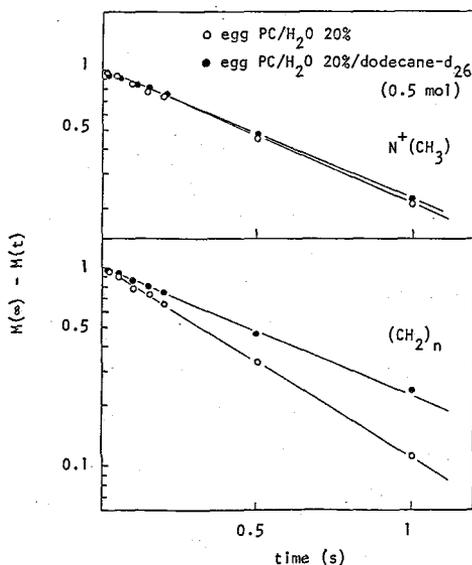


Fig. 6

長軸の周りの回転運動が少し早くなったことを意味している。

長軸の周りの回転のみを仮定し、スピン格子緩和が結合している C-H 間のみ起こると仮定して理論的な T_1 を計算した。実験値との比較から長軸の周りの回転の相関時間で τ_c を求めた。egg PC/H₂O 20% の (CH₂)_n 基の τ_c は 4.6×10^{-10} s, n-dodecane-d₂₆ が作用した場合、 $\tau_c \sim 3.1 \times 10^{-10}$ s を得た。n-dodecane は PC chain の間の回転に対する friction を小さくし、その結果 chain の長軸の周りの回転が早くなったと考えられる。

以上のようにリン脂質 L₂ 相の固体高分解能 NMR の測定が可能になりリン脂質 bilayer に対する H₂O の影響など、vesicle 系では不可能な研究課題を追求できることが示された。

[Appendix]

T_1 に対する MAS の影響を知るために、Woessner の式を少し modify した。Woessner は回転軸と対ベクトルとの為す角度 Δ を一定にして $\phi(t)$ の時間変化で z 軸の周りの回転運動を表わした。そして $\theta(t), \phi(t)$ の時間変化で回転軸の isotropic reorientation を表現した。ここで θ を ϕ と変えて θ, ϕ を空間に固定し、 $\phi(t)$ で MAS を表わし、 $\Delta(t)$ で対ベクトルの reorientation を表わすと考える。Woessner の計算を modify して、isotropic reorientation の状態にある対ベクトルがさらに空間的に固定された軸の周りに回転している場合の T_1 の理論式を求めた。 θ をマジック角にとれば MAS 軸の周りの回転 τ_{MAS} の下での対ベクトルの isotropic な reorientation (τ_R) に関する $1/T_1$ を計算できる。

Fig. 8 はこの様にして得た C-H 対ベクトルの $1/T_1$ である。MAS によって試料が 180° 回転する時間を τ_{MAS} と考えれば 3 kHz の MAS 回転は $\tau_{MAS} = 1.6 \times 10^{-4}$ s に相当する。実線は $\tau_{MAS} = \infty$ 、即ち MAS のない場合である。点線は 3 kHz の MAS の下での T_1 である。MAS の影響は τ_R が 10^{-5} s 以上であって、数 10 s 以上の長い T_1 の時のみ現われる。従って PC L₂ 相のような運動の活発な系では T_1 に対する MAS の影響は無視できる。

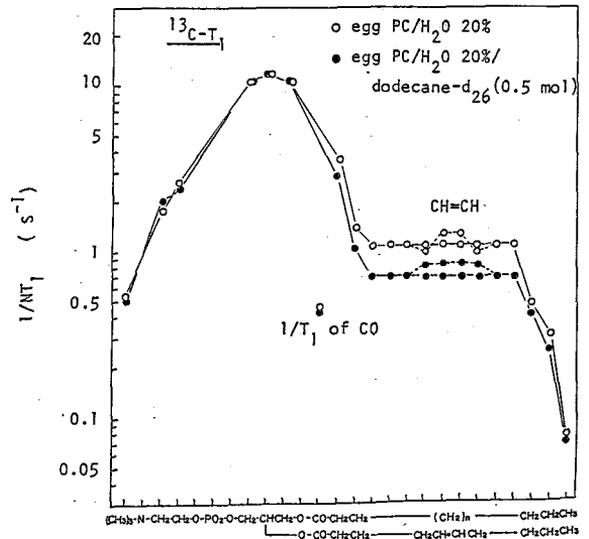


Fig. 7

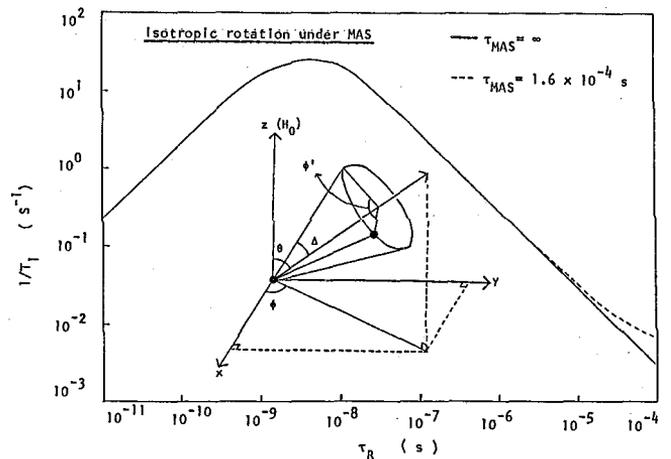


Fig. 8

- [References] (1) T. Shibata et al.; Chem. Phys. Lipids 31 105 (1982)
 (2) 藤子 et al.; 第20回 NMR 討論会, 東京 (1981)
 (3) Y.E. Shapiro et al.; Chem. Phys. Lipids 14 227 (1975)