

第26回NMR討論会

プログラム

日時：昭和62年11月17日(火)～19日(木)

会場：千里協栄生命ホール

共催：日本化学会・同近畿支部・日本薬学会・日本生物物理学会
日本生化学会・日本農芸化学会・日本分析化学会

1. 研究背景与意义

2. 研究目标与内容

3. 研究方法与技术路线

4. 研究结果与讨论

5. 结论与展望

11月17日(火)

9:10~12:00

座長 高橋 憲助

1. 溶液中の立体化学における ^1H Bi-selective T_1 の利用(その3)
(神戸女薬大・阪大薬) ○杉浦真喜子・高尾 植雄・市丸 百代
加藤 篤・藤原 英明 …… 1
2. 緩和時間法によるストリキニーネの溶液内化学構造と動的性質の研究
(阪大薬分析) ○渡辺 昌幸・藤原 英明・佐々木喜男 …… 5
3. Histamine の溶存構造に関するNMR及び計算化学的考察
(阪大薬分析) ○谷 美香・高木 達也・藤原 英明
渡辺 昌幸・前崎 博信・永井 伸二
佐々木喜男 …… 9

座長 佐々木 喜男

4. アントラセン誘導体ジアニオンの ^1H 、 ^{13}C NMR
(茨城大理) ○小林 正明・平山 昌甫 …… 13
 5. SOS-CI法による核スピン結合定数の計算
(北見工大) ○福井 洋之・三浦 宏一・松田 弘喜 …… 17
 6. ナフチルアミンアニオンのNMR
(名工大) ○横山 幸弘・高橋 憲助 …… 21
- 座長 鵜沢 洵
7. サイクロデキストリン誘導体-アゾ色素錯体の化学シフトと運動性
(阪大薬NMR室) ○鈴木美代子・佐々木喜男 …… 25
 8. ^1H -NMRによるカルボン酸型イオノホアの構造解析
(東工大工) ○久保庭 均・斉藤 義治・山口 和夫
中浜 精一 …… 29
 9. 新規免疫抑制物質 FR 900506 の構造に関する研究(1) - ^{13}C -NMR法による解析 -
(藤沢薬品物性研) ○島谷 憲司・佐藤 明啓・藤岡 守
羽根 一輝・森本 行洋 …… 33

— 昼 食 —

13:00~14:55

座長 瀬戸治男

10. 酸素を含有した C_6F_6 及び $C_6H_4(CF_3)_2$ の ^{19}F nmrの研究
(三菱製紙感材研・京都産大・立命館大) ○山本京之介・遠藤 一央・門 良一
鈴木 啓三 …… 37
11. シクロヌクレオシドのN-15 NMRスペクトル
(理 研) ○鶴沢 洵・安斉謙太郎 …… 41
12. セルロースアセテートの 1H 及び ^{13}C -NMRスペクトル帰属の戦略
(北大理・花王和歌山研) ○加藤 徹・伊倉 光彦・引地 邦男 …… 45
- 座長 引地 邦男
13. 異種核間デカップリングと同種核間交差分極の効率—多重パルスにおける長時間特性と短時間特性—
(日本電子) ○藤原 敏道・永山 国昭 …… 49
14. 二次元NMRにおけるゴースト信号の消去法
(日本電子・東大応微研) ○大内 宗城・河野 静江・今成 司
降旗 一夫・瀬戸 治男 …… 53
15. Time sharing 照射磁場を用いた新しい差スペクトル法
(東大応微研・日本電子) ○降旗 一夫・瀬戸 治男・大内 宗城 …… 57

15:00~15:50

座長 稲垣冬彦

特別講演—I. New Two-Dimensional NMR Techniques for the Study of
Organic and Biomolecules

(NIH) A. Bax …… 61

— 休 憩 —

16:00~18:35

座長 竹内敬人

16. MEMのNMRへの応用
(阪大産研) ○高井 嘉雄・沢田 正実・山田 等
○福田 房子・田中 高紀・花房 昭静 …… 63

17. NMR用対称型マイクロ試料管による水溶液NMRスペクトル
 (日女大・日本電子) ○高橋 征三・永山 国昭…… 67
18. 常用基準法の落とし穴と理想的外部基準法の提案
 (元横浜国大工・神奈川県工試) ○桃木 弘三・深沢 宜行…… 71
 座長 永山 国昭
19. ハロゲルマンの ^{73}Ge の緩和機構へのスカラー緩和の寄与
 (東大教養) 原園としえ・田中 克己・○竹内 敬人…… 75
20. イオン交換膜中における ^{23}Na -NMRケミカルシフトの磁場強度依存性
 (旭硝子開発研) 実桐 幸男・○米森 重明・能代 誠
 西村 啓道 …… 79
21. モリブデン、タングステン、及びその混合金属クラスター錯体の ^{95}Mo 及び ^{183}W NMR
 (東北大理) ○永澤 明・佐々木陽一・王巴 特爾
 猪狩 伸治・伊藤 翼 …… 83
 座長 藤原 英明
22. 四重結合を持つMoクラスター化合物のDiamagnetic Anisotropy
 (近畿大理工・テキサスA&M大) ○北川 進・F. A. Cotton…… 87
23. ^{113}Cd NMR. 速い化学交換反応を有するCd(II)錯体の溶液内平衡の研究
 (近畿大理工) ○宗像 恵・北川 進・田村 義隆…… 91

11月18日(水)

9:00~11:50

座長 下川 繁三

24. 溶液内化学交換効果を考慮した核磁気共鳴における縦磁化回復と吸収スペクトル
(北大理) ○市川 和彦・神 隆…… 95
25. 溶液内化学交換反応のキャラクターゼーション-多核の縦磁化回復とNMRスペクトル-
(北大理) ○神 隆・市川 和彦…… 99
26. 高圧NMR法による金属イオンの溶媒交換反応の活性化体積の測定
(名大理) ○石井 雅男・舟橋 重信・田中 元治…… 103

座長 安藤 勲

27. 室温から超臨界域を含む有機液体の自己拡散系数
(北大工) ○下川 繁三…… 107
28. メタルフリーフタロシアニンのβ型結晶相における分子内水素のスイッチング運動
(阪大理) ○宮久保圭祐・武田 定・千原 秀昭…… 111
29. 固体高分解能¹³C NMRによる液晶の研究(第2報) -強誘電性液晶のCP-MAS法による¹³C-NMRの温度変化-
(化技研) 早水紀久子・○松村 和紀・植村 寿公
柳沢 勝 …… 115

座長 早水 紀久子

30. 含水試料に対するVT/MAS¹³C NMR
(京大化研) ○伊藤 司・堀井 文敬・北丸 竜三…… 119
31. ポリプロピレン等温結晶化物の相構造に関するVT/MAS¹³C NMR研究
(昭和電工大分研・京大化研) ○斉藤 茂樹・茂木 義博・中川 将
堀井 文敬・北丸 竜三 …… 123
32. シクロパラフィン結晶のVT/MAS¹³C NMR
(京大化研・東農工大工・三菱化成総研) ○中川 将・堀井 文敬・北丸 竜三
田中 康之・佐藤 寿弥・坂田 育幸
早瀬 哲郎 …… 127

— 昼 食 —

12:50~14:45

座長 北丸 竜三

33. 固体状態における高分子鎖の ^{13}C NMR化学シフトと電子構造; ポリオキシメチレンの鎖間相互作用
(東工大・東工芸大工) ○黒子 弘通・山延 健・甲本 忠史
安藤 勲 …… 131
34. ポリカルボシランの不融性機構の固体 ^{29}Si 高分解能NMRによる解析
(徳島大工短大・東北大金研) ○多木 敏彦・岡村 清人・佐藤 光彦 …… 135
35. III-V族化合物半導体のNMR- InX ($\text{X}=\text{Sb}, \text{As}, \text{P}$)を中心として
(キャノン中研・日本ブルカー・北海道工大工) ○櫛引 信男・恵良田知樹・相馬 純吉 …… 139
座長 赤坂 一之
36. 無機ガラスの ^{19}F MAS NMR
(化技研・イリノイ大・トロント大) ○林 繁信・R. J. Kirkpatrick
D. B. Dingwell・E. Oldfield …… 143
37. 粉末試料における双極子相互作用測定のための2次元及び3次元NMR
(京大理) ○中井 利仁・寺尾 武彦・雑賀 亜帆 …… 147
38. α -D-グルコース-1-リン酸二カリウム二水塩単結晶の ^{13}C 及び ^{31}P 化学シフトテンソル。
 ^{13}C - $\{^1\text{H}, ^{31}\text{P}\}$ 三重共鳴の応用
(ブリティッシュコロロンビア大・京大理) C. A. McDowell・○内藤 晶
D. L. Sastry・竹腰清乃理 …… 151

14:50~15:40

座長 官澤 辰雄 与花 武彦

特別講演-II. 緩和時間測定による固体の動的構造

(阪大理) 中村 巨男 …… 155

— 休 憩 —

15:50~18:10

座長 齊藤 肇

39. 取り消し
40. 血漿アルブミンの溶液、ゲル状態における水及び蛋白質構造の研究
(岐阜大医・生理研・京大理) ○恵良 聖一・桑田 一夫・藤井 裕子
曾我美 勝・鈴木 英司・亘 弘
赤坂 一之 …… 159

41. 固体アミノ酸、タンパク質の重水素NMR
(京大理・日本電子) 内藤 晶・田村 厚夫・○赤坂 一之
清水 章三 …… 163

座長 神藤 平三郎

42. 高出力²H NMR, Choleic Acids におけるホスト-ゲスト相互作用
(国立がんセ研) 齊藤 肇・○横井もと子 …… 167

43. ¹³C CP-MAS NMR. β-(1→3)グルカンの固体構造におけるNMR、X線の比較
(国立がんセ研・日本ブルカー) ○齊藤 肇・多部田涼子・横井もと子
恵良田知樹 …… 171

44. ¹⁵N NMR法による合成ポリペプチドの固体構造の研究
(群馬大工短大・日本電子・東工大工) ○荏司 顕・尾崎 拓男・藤戸 輝昭
出口 健三・安藤 勲 …… 175

座長 ~~小林 祐次~~ 子母沢 正

45. 絹フィブロインの構造と利用に関するNMRによる研究
(東農工大工) 朝倉 哲郎・○平野 幸喜・吉水 広明 …… 179
46. 配向DNAに及ぼす結合低分子の影響-³¹P NMRによる検討
(東薬大・中央大理工) ○杉渕 直文・神藤平三郎・松本 潮
千喜良 誠 …… 185

18:30~20:30

懇親会 (千里阪急ホテル)

11月19日(木)

9:00~11:50

座長 亘 弘

47. NMRによる病態解析(VIII) - 遅延型アレルギー反応巢の解析
(熊本大医) ○山崎 政城・石松 隆志……187
48. 殺菌剤処理による菌糸細胞の生理変化と水の T_1 、 T_2 の変化
(農業環境技研) ○吉田 充・能勢 和夫……191
49. 差分NMR法による左右大脳半球機能差。一次視覚野の時間応答
(電総研) ○亀井 裕孟・片山 義朗・横山 浩……195

座長 亀井 裕孟

50. In situ ラット心の ^{31}P -NMR
(京都府立医大・武田薬品中研) ○西川 弘恭・嶋本 典夫・新谷 元章
沈 行良・吉崎 和男 ……199
51. ^{31}P -NMRによる軟体動物平滑筋の catch 収縮機構の検討
(国立公害研・東大理) ○三森 文行・石井 直方・高橋 景一……203
52. ^{31}P -NMR化学シフト・イメージング法の生体組織への応用
(京都府立医大生理・脳外科) ○吉崎 和男・西川 弘恭・成瀬 昭二……207
- 座長 西川 弘恭
53. DESPOT法を用いた ^{31}P -NMR T_1 緩和時間測定
(生理研) ○鈴木 英司・村上 政隆・前田 宗宏
瀬尾 芳輝・亘 弘 ……211
54. ^{13}C -標識フラビンをを用いたフラビン酵素の複合体及び反応中間体の ^{13}C -NMR
(国立循環器病セ研) ○三浦 洸 ……215
55. 酸化型と還元型Thioredoxinの構造の比較
(北大工・カルガリー大) ○平沖 敏文・H. J. Vogel ……219

— 昼 食 —

12:50~14:25

座長 森島 績

56. 常磁性ヘムタンパク質の ^{13}C -NMR
(東工大) ○山本 泰彦…223
57. ^1H -NMR でみた meso-テトラプロピルヘミンを含むミオグロビンの構造
(京都薬大) ○根矢 三郎・舟崎 紀昭…227
58. 多ヘムタンパク質の酸化還元電位の ^1H -NMR による決定
(横浜国大工・阪大蛋白研) ○阿久津秀雄・范 可君・仁木 克己
京極 好正 ……231
- 座長 阿久津 秀雄
59. 転移リボ核酸の動的構造と機能との関連性の解析
(東大理) ○河合 剛太・横山 三紀・横山 茂之
宮澤 辰雄 ……235
60. 完全緩和行列法による2DNOEスペクトルの解析—DNAオリゴマーの詳細な分子構造—
(カリフォルニア大サンフランシスコ) ○鈴木栄一郎・N. Pattabiraman
G. Zon・T. L. James ……239

14:30~15:20

座長 京極 好正

特別講演—III. Determination of Three-Dimensional Structures of Proteins
in Solution.

- (マックスプランク研) A. L. Gronenborn…243

— 休 憩 —

15:30~18:05

座長 荒田 洋治

61. 計算機実験によるタンパク質のプロトン緩和機構の研究
(京大理・近畿大医) ○伊島理枝子・柴田 進・赤坂 一之…245
62. 微生物起源蛋白性プロテアーゼ・インヒビター SSI 立体構造の揺らぎに関して
(都立大理) ○甲斐荘正恒・長尾 洋昌・広沢 敦彦
佐藤 晴哉・内田 健一・三宅 洋子
細谷 仁子 ……249

63. トリプトファン合成酵素のプロトンNMRスペクトルに及ぼすアミノ酸置換の影響
 (阪大蛋白研・横浜国大工) ○油谷 克英・阿久津秀雄・澤田慎太郎
 小笠原京子 …… 253
 座長 横山 茂之
64. ヒトおよびマウス上皮成長因子(EGF)の連鎖帰属(sequence specific resonance assignment)と高次構造
 (都臨床研・東大理・湧永製薬・岐阜薬大) ○稲垣 冬彦・神田 大輔・宮澤 辰雄
 三宅 哲雄・不破 亨・林 恭三 …… 257
65. 糖-蛋白質間相互作用のTRNOEと量子化学計算による研究
 (国際基督大・千葉大・理研・国立がんセ研) ○梅本 公子・笈川 節子・菅原 洋子
 相田美砂子 …… 261
 座長 甲斐荘 正恒
66. TRNOEによるイソロイシルtRNA合成酵素に結合したアミノ酸のコンホメーション解析
 (東大理) ○横山 茂之・河合 剛太・神田 大輔
 宮澤 辰雄 …… 265
67. ^1H NMRによる多機能巨大タンパク質の高次構造研究法
 (東大薬) 田中 俊之・西村 実和・矢田 信久
 遠藤 聡史・○荒田 洋治 …… 269
68. 免疫グロブリンのCPMG法による解析
 (阪大蛋白研・東大薬) ○林 文晶・京極 好正・遠藤 聡史
 荒田 洋治 …… 273

第 1 日

11 月 17 日 (火)

溶液中の立体化学に於ける ^1H Biselective T_1 の利用
(その3)

(神戸女薬大・阪大薬*) ○ 杉浦真喜子・高尾檜雄
市丸百代・加藤篤・藤原英明*

Application of ^1H Biselective T_1 Data on Stereochemistry in Solution. (No.3)
Makiko Sugiura, Narao Takao, Momoyo Ichimaru, Atsushi Kato, and Hideaki Fujiwara*

(Kobe Women's College of Pharmacy and *Faculty of Pharmaceutical Science, Osaka University)

Selective (T_1^S) and biselective relaxation times (T_1^{BS}) have been measured for several protons of Guinesine A, B, and C which are stereoisomers of the structure as shown in Fig. 1. The cross-relaxations (σ_{ij}) for some proton pairs have been obtained from T_1^S and T_1^{BS} by using equation (3), and correlated with H-H distances (r_{ij}). The configurations and conformations of these alkaloids have been discussed based on the estimated values of r_{ij} and are suggested as shown in Fig. 3.

[はじめに]

化合物の立体化学(立体配置、立体配座)を議論する際に、H-H間の空間的距離は、有用な情報となる。しかし溶液状態で、H-H間の空間的距離を得る方法はそう多くはない。Nuclear Overhauser Effect (NOE)は、相対的にH-H間の距離を得るのに有用であり、これまでも多く利用されてきているが、定量的議論に耐えうるデータを得るのは、それ程容易ではない。

我々はこれまで、Biselective T_1 の有用性について、議論をしてきたが、今回は、Biselective T_1 と Selective T_1 の組み合わせにより、交差緩和 σ_{ij} が得られることより、それによってH-H間の距離 (r_{ij}) を求める試みを行った。さらにそれを利用して、天然物の立体化学についての議論を行った。

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

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

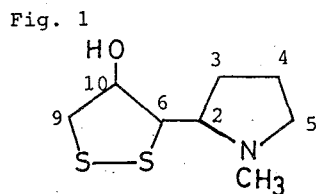
$$R^i(ij) - R^i(i) = N_j \sigma_{ij} \quad (3)$$

$$\sigma_{ij} = 1/10 \gamma^4 n^2 r_{ij}^{-6} \{ 6\tau_c^{ij} / (1 + 4\omega^2 \tau_c^{ij2}) - \tau_c^{ij} \} \quad (4)$$

$$\sigma_{ij} = 1/2 \gamma^4 n^2 r_{ij}^{-6} \tau_c^{ij} \quad (5)$$

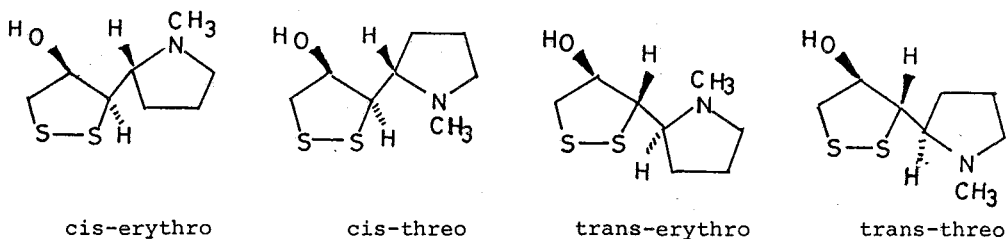
($\omega^2 \tau_c^{ij2} \ll 1$)

^1H の Selective 及び Biselective T_1 は、それぞれ (1), (2) 式で表され、それらの逆数の差は、(3) 式のように σ_{ij} となる。さらに σ_{ij} は、(4) または (5) 式で示されるように r_{ij}^{-6} に比例する。従って測定された2種類の緩和時間よりいく



Guinesine A, B, and C

Fig. 2



つかの H-H 間の σ_{ij} を得、更にそれから必要な H-H 間の距離 (r_{ij}) を得ることが出来れば、溶液中での立体化学を議論出来る。この方法の特徴は、測定で得られる緩和時間に、分子内双極子緩和以外の寄与 (ρ^*) が存在しても問題のない点である。

対象とした天然物は、アマゾン産、ヒルギ科植物 *Cassipourea guianensis* の樹皮よ

Table 1. Nonselective (T_1^{NS}), Selective (T_1^S), and Biselective (T_1^{BS}) proton Relaxation Times (sec.) for Guanine A, B and C.

H	G. A			G. B			G. C		
	T_1^{NS}	T_1^S	T_1^{BS}	T_1^{NS}	T_1^S	T_1^{BS}	T_1^{NS}	T_1^S	T_1^{BS}
2	4.48	6.14	5.56 6.06 (H-6) (H-10) 5.59 (N-Me)	4.78	6.39	6.15 5.78 (H-3a) (H-3b) 5.86 6.30 (H-6) (H-10) 5.80 (N-Me)	3.51	4.88	4.37 4.50 (H-6) (H-10) 4.31 (N-Me)
3a				2.78					
3b				2.83					
5a	2.45	3.46	2.64 (H-5b)	3.00	4.22	3.25 (H-5b)	2.44	3.42	2.67 (H-5b)
5b	2.65	3.95	2.93 (H-5a)	3.49	4.91	3.62 (H-5a)	2.41	3.48	2.74 (H-5a)
6	5.10	7.06	6.19 6.41 (H-2) (H-10) 6.29 (N-Me)	5.29	7.18	6.55 6.97 (H-2) (H-3a) 7.06 6.33 (H-3b) (H-10) 7.00 (N-Me)	3.98	5.56	5.05 5.28 (H-2) (H-10) 5.13 (N-Me)
9a	3.56			3.27			2.71		
9b	3.50			3.25			2.54		
10	3.93	5.47	5.26 5.06 (H-2) (H-6)	4.42	5.82	5.69 5.14 (H-2) (H-6) 5.76 (N-Me)	3.90	5.19	4.73 5.05 (H-2) (H-6)
N-Me	1.94			2.22			1.86		

り得られ、殺虫効果を有する含イオウアルカロイド、Guinesine A, B, C である。これらは、Fig. 1 に示される平面構造式を持つ立体異性体であるが、10 位の水酸基の配置及び、2 位、6 位での配置の組み合わせにより、Fig. 2 に示すような 4 種の異性体が考えられる。B, C については、本研究と平行して行われた、X 線構造解析で、それぞれ *cis-threo*, *trans-erythro* であることが最近判明した。

[実験]

サンプルは、それぞれ CDCl_3 に溶解し、脱ガス、溶封した。濃度は、それぞれ A: ~ 0.16 M, B: ~ 0.1 M, C: ~ 0.1 M で調整した。測定は、Varian XL-200 (200.06 MHz) を用い、 ^1H Selective, Biselective T_1 の測定は、前回の本討論会で述べたパルス系列を用いた。Selective 及び Biselective T_1 は、シグナルが、単独で観察されるものについてのみの測定を行った。すべて、測定は 2 回又は 3 回を行いその平均値を観測値とした。

[結果と考察]

Table 1 に、Guinesine A, B, C の観測可能なプロトンの Nonselective (T_1^{NS}), Selective (T_1^S) 及び Biselective T_1 (T_1^{BS}) の観測値を示した。Nonselective T_1 のデータは、直接今回の取扱には、必要ないが、参考のために測定を行っている。B が、スペクトルの関係から一番多くのデータを得ることが出来たが、他のものも距離が問題になりそうな H-H 間については T_1^{BS} を得ることが出来ている。これら T_1^S , T_1^{BS} より、式 (3) にしたがって σ_{ij} を計算し、その値を Table 2 に示した。(4) または (5) 式から解るように、 σ_{ij} と σ_{ji} は等しくなるはずであるが、Table 2 に示された値は、お互いにほぼ近い値になっている。このことは、 T_1^{BS} , T_1^S の観測値の妥当性と、さらにそれから得られた σ_{ij} の値の妥当性を示すものである。

Table 2. Obtained σ_{ij} values for several proton pairs of Guinesine A, B and C.

		G. A		G. B		G. C	
H_i	H_j	$\sigma_{ij}/10^{-3}$	$\sigma_{ji}/10^{-3}$	$\sigma_{ij}/10^{-3}$	$\sigma_{ji}/10^{-3}$	$\sigma_{ij}/10^{-3}$	$\sigma_{ji}/10^{-3}$
2	3a			6.2			
2	3b			16.4			
2	6	17.1	20.0	14.2	13.2	20.4	18.1
2	10	2.6	7.4	2.3	3.8	14.0	18.8
2	N-Me	5.3		5.3		7.9	
5a	5b	90.4	88.5	70.4	72.7	82.1	83.9
6	3a			4.2			
6	3b			2.3			
6	10	14.3	14.8	18.6	22.5	9.5	5.3
6	N-Me	5.7		1.1		5.0	

ここで、立体配座、配座には関係なく固定されており、なおかつ既知の r_{ij} があれば、その r_{ij} と σ_{ij} の値から、 τ_c の値が得られるはずである。その条件を満たすものとしては、H-5a, H-5b が最適であると考えられ、分子モデルから $r_{5a,5b} = 1.8 \text{ \AA}$ とした。いま、これらの化合物が、等方性運動をしていると仮定すると、 $\sigma_{5a,5b}$ または $\sigma_{5b,5a}$ とこの $r_{5a,5b}$ の値より、(5)式を使って、それぞれの化合物の回転相関時間 τ_c を計算することが出来、A: $\tau_c = 10.70 \times 10^{-12} \text{ sec}$, B: $\tau_c = 8.56 \times 10^{-12} \text{ sec}$, C: $\tau_c = 9.92 \times 10^{-12} \text{ sec}$ の値を得ることが出来る。AとBに於ける差は濃度の差を反映しているものと思われるが、Cの値が比較的大きいことについては、現在のところ原因が不明である。

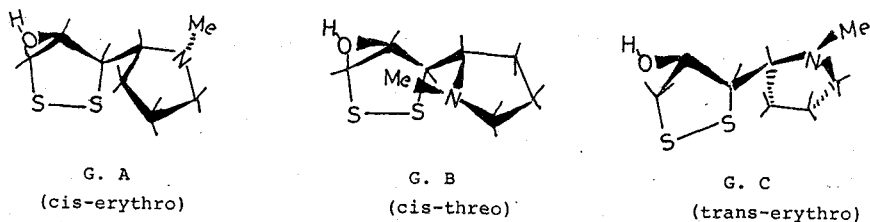
これらの値を用いて逆に、(5)式によって、それぞれの σ_{ij} から r_{ij} を得ることが出来る。そのようにして得られた r_{ij} の値を、Table 3 に示した。得られた $r_{6,10}$ の値を見ると、H-6 と H-10 の配座は、B が cis、C が trans であることが解り、X線構造解析の結果と一致している。又、Aについては、その値から、B同様 cis 配座が示唆される。また Fig. 2 に示される、4種の異性体について、得られた Table 3 の r_{ij} を満足する立体配座を、分子モデルを使って検討すると、A: cis-erythro, B: cis-threo, C: trans-erythro となる。又その時の立体配座を、Fig. 3 に示したが、それらは、これらアルカロイドの CDCl_3 中での優位立体配座であると言える。

以上、 T_1^{BS} , T_1^S の2種の T_1 の測定から σ_{ij} を求め、さらに r_{ij} と関連づけて溶液中での立体化学が議論出来ることを明らかにした。対象とする化合物が等方性運動を仮定出来るか、又得られた T_1 値の精度等、今後さらに検討を加えなければならぬ点もあるが、ここで示したように、この方法は、条件を選べば、中程度の大きさの天然物の構造決定又は、溶液中の立体配座解析に十分適用可能と思われる。

Table 3. Estimated r_{ij} (\AA) values for several proton pairs of Guinesine A, B and C.

H_i	H_j	G.A	G.B	G.C
2	3a		2.7	
2	3b		2.3	
2	6	2.3	2.4	2.3
2	10	2.9	3.0	2.4
2	N-Me	2.9	2.8	2.8
6	3a		2.9	
6	3b		3.2	
6	10	2.4	2.2	2.7
6	N-Me	2.9	>3.5	2.9

Fig. 3



緩和時間法によるストリキニーネの溶液内化学構造と
動的性質の研究

(阪大薬分析) ○渡辺昌幸・藤原英明・佐々木喜男

Molecular Dynamics and Chemical Structure of Strychnine in Solution
Determined from Relaxation Time Analysis

Masayuki Watanabe, Hideaki Fujiwara and Yoshio Sasaki

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

We studied the molecular dynamics and chemical structure of strychnine in CDCl_3 by measuring the ^{13}C T_1 data. The data was analyzed based on the three models of overall molecular reorientation, i.e. isotropic model, symmetric top model and fully anisotropic model. As the result of this analysis, strychnine is found to exhibit a degree of anisotropy in solution. The difference between the principal axes of rotational diffusion and those of the moment of inertia is discussed in relation to the solvation of strychnine by CDCl_3 .

1. 序

溶液状態でのNMRスピン-格子緩和時間 T_1 は、分子の動的性質に密接な関係があり、 T_1 データより求められる回転拡散定数 D (あるいは相関時間 τ)より、分子運動の動的性質を論ずることができ、一般にスピン-格子緩和機構は数種の寄与よりなるが、双極子-双極子相互作用による寄与が支配的であることが多くの化合物で知られており、また双極子-双極子緩和時間 T_1^{DD} はNOE因子を利用して求められるため最も利用され易い。 ^{13}C T_1^{DD} は、式(1)のように表わされる。

$$\frac{1}{T_{1\text{CT}}^{\text{DD}}} = \frac{1}{10} \sum_{i=1}^n \frac{\gamma_c^2 \gamma_H^2 \hbar^2}{r_{c-Hi}^6} [J(\omega_c - \omega_{Hi}) + 3J(\omega_c) + 6J(\omega_c + \omega_{Hi})] \quad (1)$$

さて、緩和時間データの解析には分子の運動を単純化したモデルが利用されるが、最も簡単なモデルは等方運動を行なっている場合のモデル、すなわち等方モデルであり、1つの回転拡散定数が与えられる。しかしながら、分子の形あるいは様々な実験データから、分子の回転軸の方向が等方的でないことが予想され、回転に異方性を含ませることは当然必要となる。異方モデルには軸対称楕円体モデルと完全異方モデルがあり、極度尖鋭化の条件下($\omega\tau \ll 1$)では、スペクトル密度 $J(\omega)$ は、それぞれ式(2)、(3)のように表わされる。

$$J(\omega) = \frac{A}{6D_1} + \frac{B}{5D_1 + D_2} + \frac{C}{2D_1 + 4D_2} \quad (2)$$

$$J(\omega) = \frac{C_1}{4D_1+D_2+D_3} + \frac{C_2}{4D_2+D_1+D_3} + \frac{C_3}{4D_3+D_1+D_2} \quad (3)$$

$$+ \frac{C_4}{6[R+(R^2-L^2)^{1/2}]} + \frac{C_5}{6[R-(R^2-L^2)^{1/2}]}$$

$$R = 1/3(D_1+D_2+D_3)$$

$$L^2 = 1/3(D_1D_2+D_1D_3+D_2D_3)$$

ここで、式(2)のA~C, 式(3)のC₁~C₅は幾何学的な関数である。また、これらのモデルの解析には分子に固定した座標軸と回転拡散の軸とのずれを示す角度パラメータが必要となるが、その数は軸対称楕円体モデルで2個(θとφ), 完全異方モデルで3個(オイラー角α, β, γ)である。

今回我々は、猛毒性アルカロイドであるストリキニーネについて緩和時間法による解析を試みた。ストリキニーネは、光学分割剤としても用いられ、その溶解和や錯形成の形を知るうえで、緩和時間法は有用であると考えられる。

2. 実験

¹³CNMR緩和スペクトルは、日本電子製GX-500型FTNMR装置によって、T-180°-τ-90°パルス系列で完全プロトン照射により室温で測定した。観測周波数は125.72MHzである。取り込み幅は200ppm, 180°パルスの照射時間は24.2μsec, 128回積算し、16K点でフーリエ変換した。試薬は東京化成工業製(純度98%)を用いた。試料はCDCl₃に溶解して溶液は脱ガスし、濃度が0.29Mと0.46Mの2種を調製した。また、T₁の算出に際し、付属のコンピューターを用いて縦磁化の80%回復までのデータについて線形の最小二乗法を適用した。尚、4級炭素のT₁測定はFIRFT法により行なった。測定誤差は±5%である。

T₁解析は、等方および軸対称楕円体モデルについてはプログラムTRANSO¹⁾, 完全異方モデルについてはプログラムMÖLDYN²⁾を使用した。また、慣性モーメントの計算にはプログラムXYZ³⁾を一部修正した後使用した。計算は大阪大学計算機センターACOS6, NEAC-1000およびバクトル計算機SX-1により行なった。

3. T₁解析

解析に用いた座標は、硫酸ストリキニーネ五水和物の結晶構造解析データ⁴⁾を利用した。また、回転拡散の主軸と慣性モーメントの主軸との間には分子の形から相関があると考えられるため、分子を慣性モーメントの主軸系において解析を行なった。解析には、水素原子が直接付加していないため、双極子双極子緩和が起こりにくいと考えら

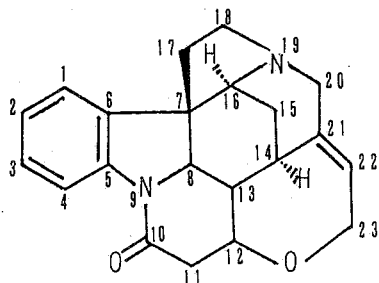


Fig.1 Molecular Structure of Strychnine.

れる4級炭素の T_1 データは省くことにした。また、NOEデータは $\eta = 1.7 \pm 0.4$ と測定誤差が大きく、NOE因子は最大値をとる、すなわち T_1 の実測値が T_1^{calc} を表わすものとして解析を行なった。

4. 結果と考察

TABLE 1 ^{13}C T_1 ANALYSIS FOR ISOTROPIC MODEL, SYMMETRIC TOP MODEL AND FULLY ANISOTROPIC MODEL FOR STRYCHNINE

CHEMICAL SHIFT	No.	0.29M				0.46M			
		T_1 OBSD.(SEC)	T_1 CALCD.(SEC)			T_1 OBSD.(SEC)	T_1 CALCD.(SEC)		
			MODEL1	MODEL2	MODEL3		MODEL1	MODEL2	MODEL3
26.7	15	0.605	0.632	0.613	0.568	0.537	0.589	0.542	0.492
31.4	14	1.302	1.202	1.347	1.352	1.194	1.120	1.358	1.254
42.2	11	0.753	0.643	0.695	0.688	0.714	0.599	0.636	0.647
42.6	17	0.654	0.634	0.636	0.650	0.622	0.591	0.586	0.599
48.0	13	1.234	1.214	1.213	1.168	1.085	1.132	1.106	1.128
50.1	18	0.643	0.631	0.579	0.566	0.618	0.588	0.609	0.600
51.7	7	12.530				13.080			
52.4	20	0.654	0.640	0.667	0.641	0.561	0.596	0.574	0.564
59.8	16	1.211	1.216	1.101	1.134	1.300	1.133	1.069	1.125
59.9	8	1.229	1.252	1.309	1.301	1.174	1.167	1.126	1.197
64.3	23	0.676	0.640	0.706	0.707	0.587	0.596	0.610	0.631
77.3	12	1.328	1.200	1.322	1.324	1.212	1.118	1.292	1.176
115.8	4	1.010	1.273	1.177	1.069	1.163	1.186	1.334	1.211
121.9	1	1.069	1.264	1.150	1.114	0.991	1.178	1.110	1.074
123.8	2	1.041	1.237	1.108	1.127	1.041	1.153	1.057	1.106
126.8	22	1.008	1.200	1.134	1.031	1.184	1.119	1.152	1.082
128.1	3	1.025	1.235	1.105	1.036	0.889	1.151	1.042	0.930
132.4	6	8.635				7.913			
140.2	21	4.548				4.379			
141.8	5	8.639				8.017			
168.8	10	9.072				8.583			

THE NUMBERING IS SHOWN IN FIG.1.

MODEL1: ISOTROPIC MODEL, MODEL2: SYMMETRIC TOP MODEL, MODEL3: FULLY ANISOTROPIC MODEL

解析結果をTable 1と2に示す。この結果より、等方モデルよりも異方モデルの方が実験値の傾向を良く再現していることがわかり、ストリキニ-ネの分子運動の回転軸の方向には2~3倍程度の異方性があることが見出された。

ストリキニ-ネの慣性モーメントの主軸の大きさを求めると、 $I(X) = 1343.2$, $I(Y) = 2022.7$, $I(Z) = 2913.0$ となる。すなわち、X軸回りの回転が最も起こり

TABLE 2 CALCULATED PARAMETERS BY THE $^{13}\text{C}_{\text{T}_1}$ ANALYSIS BASED ON THE VARIOUS DYNAMICS MODELS FOR STRYCHNINE

MODEL	PARAMETER	0.29M	0.46M
ISOTROPIC MODEL	D	$4.6 \times 10^9 \text{SEC}^{-1}$	$4.3 \times 10^9 \text{SEC}^{-1}$
	SD	0.11SEC	0.13SEC
SYMMETRIC TOP MODEL	D_2	$5.8 \times 10^9 \text{SEC}^{-1}$	$5.6 \times 10^9 \text{SEC}^{-1}$
	D_1/D_2	0.47	0.44
	θ	45.3°	35.9°
	ϕ	28.6°	68.3°
	SD	0.12SEC	0.09SEC
FULLY ANISOTROPIC MODEL	D_1	$6.8 \times 10^9 \text{SEC}^{-1}$	$6.6 \times 10^9 \text{SEC}^{-1}$
	D_2/D_1	0.74	0.59
	D_3/D_1	0.32	0.37
	α	9.49°	-26.4°
	β	12.6°	8.13°
	γ	-41.2°	-29.4°
	SD	0.09SEC	0.07SEC

易いと予想できる。完全異方モデルによる解析により得られた最も回転し易い軸(D₁軸)は、X軸に近い軸であり、これらの計算結果の妥当性を裏付けている。また、慣性モーメントの主軸と回転拡散の主軸のずれより、CDCl₃が水素結合によりN9位に溶媒和すると考えられる。ストリキナーのHT₁データについて軸対称楕円体モデルを用いて解析を行なった結果、D₁/D₂の値は0.29Mでは0.32±0.26、0.46Mでは0.46±0.29となり、 $^{13}\text{C}_{\text{T}_1}$ の解析結果と誤差範囲内で一致する。このことより、HT₁での解析も異方運動を調べるうえで有効であろうと考えられる。

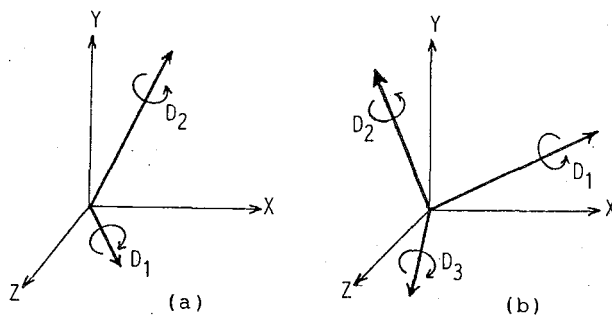
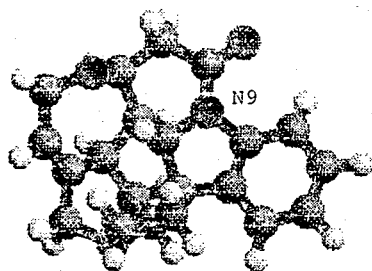


Fig.2 Determination of the principal axes for the rotational diffusion of strychnine(0.29M). (a)Symmetric Top Model(b)Fully Anisotropic Model

References

- 1) H.Fujiwara, T.Takagi, M.Sugiura and Y.Sasaki, J.Chem.Soc., PERKIN TRANS. II 1983, 903.
- 2) A.Kumar, D.J.Craik and G.C.Levy, QCPE, No.489, Indiana University.
- 3) QCPE, No.178, Indiana University.
- 4) D.S.Sake Gowda, L.Cartz and S.Natarajan, Acta Cryst. B29, 2760(1973).

Histamineの溶存構造に関するNMR及び計算化学的考察

(阪大薬分析)○谷 美香・高木達也・藤原英明・渡辺昌幸・前崎博信・永井伸二・佐々木喜男

NMR and Computational Studies on the Conformation of Histamine in Solution

Mika Tani, Tatsuya Takagi, Hideaki Fujiwara, Masayuki Watanabe, Hironobu Maezaki, Shinji Nagai, and Yoshio Sasaki

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

Conformational energies of histamine were studied using the SIMP system of calculation. They predict a strong preference of gauche conformer for the monocation. In order to predict the conformation in solution, hydrated species were calculated using the same system. The results indicated a decrease in the energy difference between the gauche and trans conformers suggesting a mixture of the two conformers in solution. These computational results are supported by the conformational analysis based on the ^1H NMR spectroscopy. Also, NMR spectroscopy using liquid crystal phases is applied to simulate a state of histamine dissolved in biomembrane, and the solution structure and orientation are discussed.

ヒスタミンは生体内活性物質として知られているが、アレルギー性反応や胃液分泌に重要な役割をもつことが明らかとなっている。ヒスタミンにはアレルギー反応等の発現を介する H_1 、胃液分泌の促進等を介する H_2 の2種類の受容体が確認されており、 H_1 -blockerとしてはクロルフェニルアミン等が、 H_2 -blockerとしてはシメチジン等が知られている。現在ではヒスタミンはこれら2種類の受容体にそれぞれ異なったコンフォメーションで結合すると考えられているが、X線回折やMO計算では側鎖が折り畳まれた形の gauche 型が圧倒的に優勢であることが示されている。

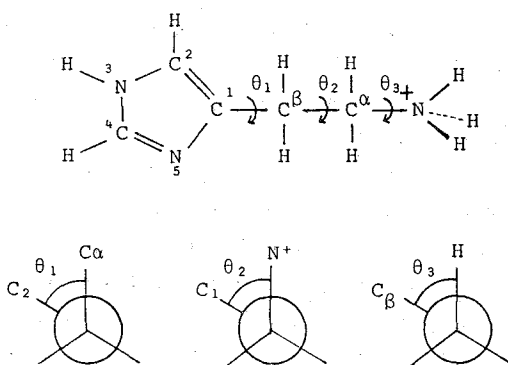


Fig.1. ヒスタミンモノカチオン

そこで我々は、当研究室で開発された分子間相互作用シミュレーター、SIMP¹⁾ (Simulator of Intermolecular Potentials) によりヒスタミンの水溶液中のコンフォメーションを推定、NMR法による実験結果との比較検討を行った。SIMPとはMNDO法に分子間パラメーターを導入することにより、MNDOで成功している単一分子系の分子定数の計算に加え分子間相互作用についても良好な再現性を有するように改良

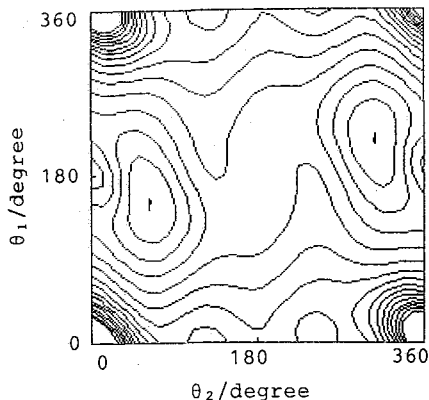


Fig.2. 孤立系

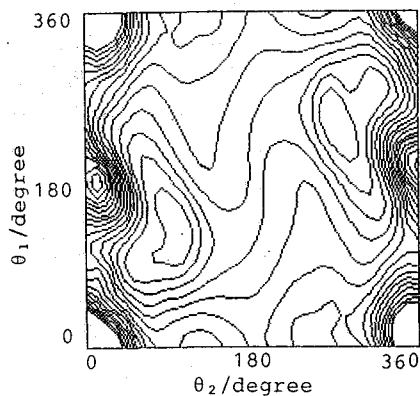


Fig.3. 4水和系

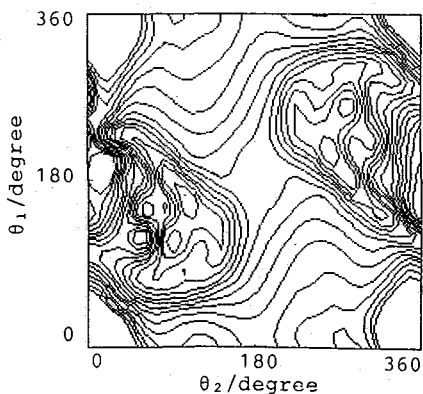


Fig.4. 5水和系

したものである。ヒスタミンは pH7 付近において、mono cation の形をとっていることが知られているので今回我々はこの mono cation の形を計算に用いた。結合距離、及び、結合角度は MNDO MO 法により最適化を行った。ヒスタミンには flexible な twist angle が 3 種類考えられるが、今回は Fig.1 のように定義し、このうち θ_1, θ_2 を変数として conformational energy map を描いた。 θ_3 は逐次最適化した。ここで θ_2 が $120^\circ \sim 240^\circ$ のときを trans 型、 $0^\circ \sim 120^\circ$ 、及び、 $240^\circ \sim 360^\circ$ のときを gauche 型と定義する。孤立系における conformational energy map を Fig.2 に示した。これにより側鎖が折り畳まれた形の gauche 型のほうが側鎖が伸びた形の trans 型よりも優勢であることがわかる。実際、最安定構造は gauche 型 ($\theta_1 = 146^\circ, \theta_2 = 61^\circ$) に現れ、trans 型における最安定構造とのエネルギー差は 28 kJ/mol であった。また、水溶液中のコンフォメーションを知るために、水を 4 分子配位させた 4 水和系及び 5 分子配位させた 5 水和系についても同様な計算を行った。この際、 θ_3 及びヒスタミン分子と水分子との距離は逐次最適化した。得られた結果を Fig.3., Fig.4. に示す。水和系ではエネルギー的に安定な部分がわずかながら trans 型へと移行している。水和系においても最安定構造は gauche 型 (4 水和: $\theta_1 = 242^\circ, \theta_2 = 263^\circ$ 5 水和系: $\theta_1 = 245^\circ, \theta_2 = 218^\circ$) であるが、trans 型とのエネルギー差はそれぞれ 26 kJ/mol , 16 kJ/mol となる。つまり、孤立系では gauche 型が優勢であるが、水和系では gauche 型が trans 型よりも若干安定ではあるものの、その差は孤立系に比べて縮まっており、水溶液中では両者が共存していることを示唆している。また、先に得た energy map からスプライン関数により各系における θ_2 の平均角度を求めた結果を Table.1 に示した。水和分

子の増大に伴い、trans 型へと移行していることがわかる。次に、種々の溶媒中で側鎖の $^1\text{H-NMR}$ 測定を行い LAOCON5²⁾ によりスペクトル解析した。また得られた間接結合定数を用い、種々の溶媒中での優勢なコンフォメーションを求めた。結果を Table 2 に示す。溶媒の極性が下がるに連れて gauche 型の存在確率が增大しており、これは先に述べた SIMP による計算結果と良好な一致を示している。

Table 1. θ_2 の計算値

system	θ_2 / degree
Histamine	62
Histamine + 4H ₂ O	93
Histamine + 5H ₂ O	99

Table 2. コンフォーマーの存在比(実験値)

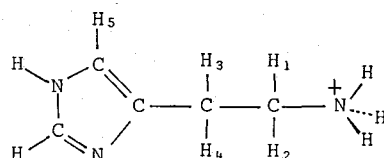
solvent	gauche/%	trans/%
D ₂ O	66	34
CD ₃ OD	65	35
(CD ₃) ₂ CO	71	29

次に、生体膜中でのヒスタミンのコンフォメーション及び配向を推定する目的で、液晶NMR法による検討を行った。これまでに種々の液晶相が知られているが、今回液晶相として用いたのは配向性の点から生体膜に近いモデルと考えられるリオトロピック液晶相である。sodium dodecyl sulfate (SDDS)系としては、sodium dodecyl sulfate, decanol, sodium sulfate, water を重量比 14:1:1:20 で用い、potassium laurate (PL)系としては、potassium laurate, decanol, potassium chloride, water を重量比 7.5:1.5:1:15 で用いた。³⁾ pH 値は前者が 7.2、後者が 11.3 であるが

ヒスタミンの pK_{a1} , pK_{a2} が 5.80, 9.40 であることから SDDS 中では monocation、PL 中では neutral として存在する。液晶中での NMR スペクトルを解析するに当たって必要な独立可変パラメーターは化学シフトでは $\nu(1)=\nu(2)$, $\nu(3)$

Table 3. 配向スペクトルの解析結果(単位は Hz)

	SDDS	PL
D(12)	-134.98 ± 0.01	-70.66 ± 0.10
D(13)(24)	12.78 ± 0.63	2.77 ± 0.14
D(14)(23)	16.94 ± 0.74	-6.94 ± 0.14
D(15)(25)	26.74 ± 0.06	-14.12 ± 0.07
D(34)	-30.50 ± 0.07	6.20 ± 0.08
D(35)(45)	42.04 ± 0.06	-25.17 ± 0.07
$\nu(1)(2)$	1052.65	913.96
$\nu(3)(4)$	1022.87	880.39
$\nu(5)$	1832.99	1694.04
r.m.s. error	0.48	0.59



$\nu(4), \nu(5)$ の3種類が、直接結合定数では $D(12), D(13)=D(24), D(14)=D(23)$
 $D(15)=D(25), D(34)$ の6種類がある。又、解析に使用した間接結合定数の値は
 SDDS, PL系液晶の高温での等方相中の値を用いた。測定温度はそれぞれ 31.0
 $^{\circ}\text{C}, 24.4^{\circ}\text{C}$ であり、各々の実験スペクトルについて LAO3D9⁴⁾により繰り返し
 計算を行うことによりスペクトル解析を行った。結果を Table 3 に示す。又、それ
 らの値を用いて、再現したスペクトルを実験スペクトルと共に Fig.5 に示した。こ
 れらのスペクトル解析では J を繰り返し計算で決めることは未完成であるが、それ
 はスペクトルが一次分裂パターンに近く J と D を同時に可変にした繰り返し計算が
 難しいこと、及び、大きな D に比べ J が小さいため J の精度が上がらないことなど
 による。この問題は測定磁場を下げることや液晶の外部磁場に対する配向方向をマ
 ジック角度に近づけることにより克服されると思われる。液晶中のスペクトルが等
 方相中の J を用いることにより再現できることから、液晶中のコンフォメーション
 も等方相中と、大きな相違は無いと予想されるが、さらに精密な解析を継続中であ
 る。液晶中のヒスタミンの配向については $D(12)$ が負で絶対値が大きいことから、
 H_1-H_2 方向が外部磁場に並行方向を取り易いことがわかる。リオトロピック液晶
 中では長いアルキル鎖が柱状に集まってヘキサゴナル格子を形成し、それが外部磁
 場に垂直に配向し易いことが知られている。従って、ヒスタミンの長軸がヘキサゴ
 ナル格子の長軸に垂直方向に埋め込まれた配向状態を取ると考えられる。

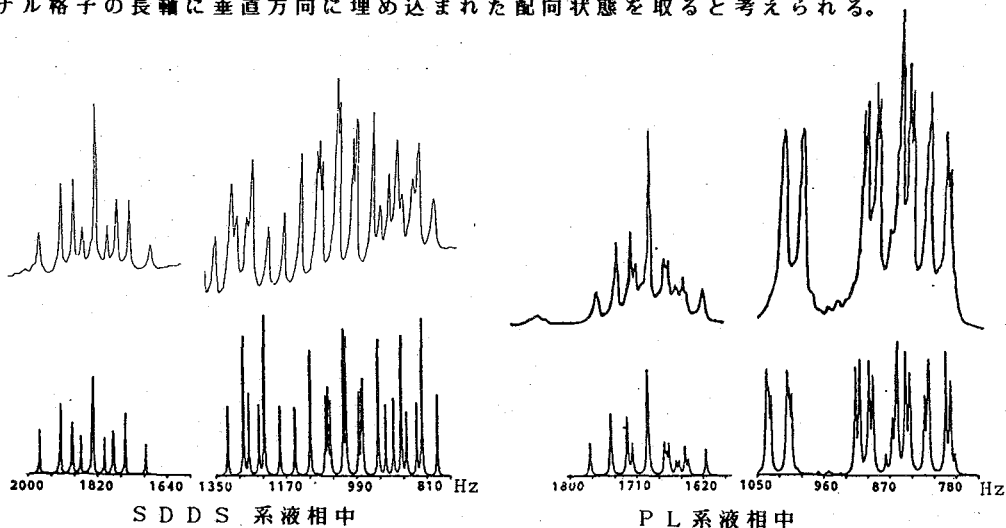


Fig.5. ヒスタミンの実験スペクトル(上)と計算スペクトル(下) .200MHz

<参考文献>

- 1) T. Takagi, et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 59, 1317 (1986).
- 2) L. Cassidei, et al., QCPE No458.
- 3) a) C. L. Khetrupal, et al., Proc. Liquid Crystals Conference, Bangalore (1973)
 b) R. C. Long, et al., J. Mag. Res. 12, 216 (1973)
- 4) H. Fujiwara, M. Watanabe, I. Yamanaka, T. Takagi, and Y. Sasaki, Bull. Chem. Soc. Jpn.,
 submitted.

(茨城大理) ○小林 正明 平山 昌甫

 ^1H and ^{13}C NMR of Dianions of Several Anthracene Derivatives

Masaaki Kobayashi and Masatoshi Hirayama

(Department of Chemistry, Faculty of Science, Ibaraki University)

The formation of π -dianions of 9-phenyl-(1), 9,10-diphenyl-(2), and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene(3) by alkali metal reduction of its precursor in vacuo was confirmed by ^1H and ^{13}C NMR, its quenching products with O_2 , H_2O , and D_2O , and the reduction of a reducible aromatic compound, while for 1^{2-} the monoanion was also formed by subtraction of a deuteron from DME-d_{10} or THF-d_8 . It was suggested that for 1^{2-} the ion-pairing occurs with Li^+ , Na^+ , and K^+ , where its tightness of interaction differs between in DME and THF. It was proposed by comparing with CNDO excess charge-densities that the shift pattern of 3^{2-} may be interpreted in terms of a large contribution of paratropic ring current of the central ring of anthracene.

[序]

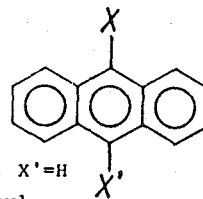
π -荷電分子(多縮合環芳香族化合物、アヌレン等)の生成、反応性、およびそれらのESR、NMRとMO計算との対応等については、現在もなお研究が進展しているが¹⁾、特に、最近、trianion、tetraanionが、いわゆる新分子種として大変興味を持たれている。dianionの生成の場合、その難易度は炭素原子1個あたりの共鳴エネルギーから予想されているが²⁾、実際は、平衡濃度としての、アニオンラジカルとの電子交換、counterion効果による安定化等、個々の場合により異なる。

今回、過剰電子密度の特に高い9、10位に芳香環を置換したanthracene dianion³⁾ 3種類について、その生成と電子密度分布に関して報告する。

[実験]

取り扱った化合物は 9-phenyl- (PA) (1)、9,10-diphenyl- (DPA) (2)、9,10-bis(phenylethynyl)- (BPEA) (3) anthraceneであり、溶媒は、 THF-d_8 、 DME-d_{10} である。dianionの生成は、常法(NMR管上部にアルカリ金属を封入したもの)により真空中、室温あるいは、低温でアルカリ金属(Li, Na, K)と接触させた。NMR (or ESR) をモニターしながら最良の状態、NMRを測定した。 ^1H -、 ^{13}C -NMR測定は、300 MHz、75 MHzで行い、帰属のためにH-H、C-Hシフト相関二次元NMRも測定した。MO計算はプログラム"Y4CB04"(東大計算機センターライブラリー)を利用し、HITAC M-240H(茨城大)で行なった。

こばやし まさあき ひらやま まさとし



- 1) X=phenyl, X'=H
- 2) X=X'=phenyl
- 3) X=X'=phenylethynyl

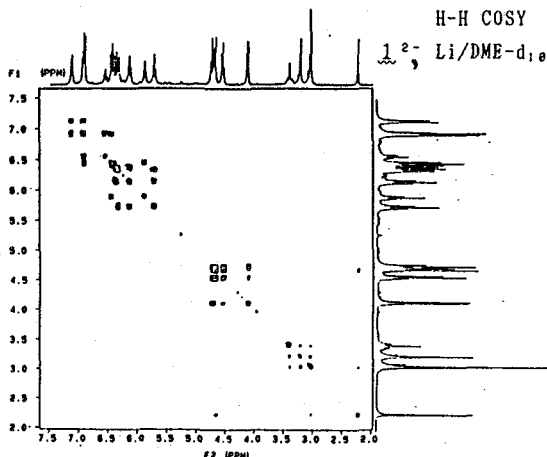
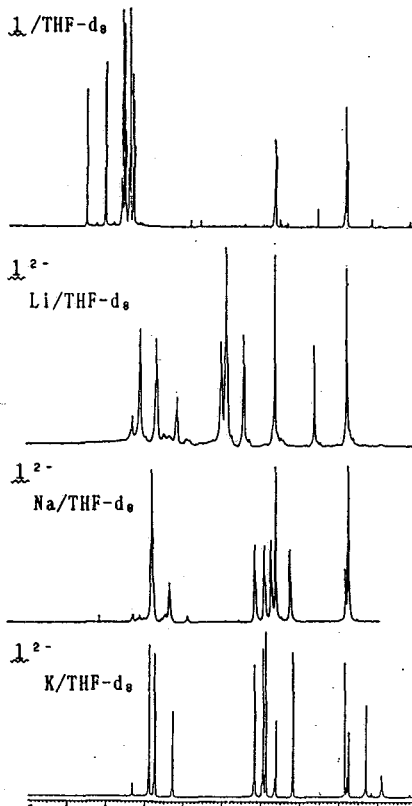
[結果と考察]

[1] 長時間(2週間以上)接触により、Na/THF、および、K/THFの系において、 $\underline{1}^{2-}$ のみが得られた。他の系(Li/THF、Li/DME、Na/DME、K/DME)では、溶媒から重水素の引き抜きによる monoanion ($\underline{1}-D$)とみられる吸収線がスペクトル上に重畳している。これは、 H_{10} 、 C_{10} のシグナルが、aliphatic領域に移動し、 D_{10} による H_{10} の3重線が観測され、 1H 、 ^{13}C 共に $\Delta\delta_{00}$ ($\underline{1}$ よりのシフト、高磁場を+)が全般的に $\underline{1}^{2-}$ とのシフト差より小さくなっていることからわかる。

dianion生成は、以下の実験により確認された。

- (a) 還元過程において、ESR吸収が消失した後に、NMRが観測される。
- (b) スペクトルパターンに、 $\underline{1}^{2-}$ としての矛盾がない。
- (c) 期待通りのquenching productが、得られること。
(O_2 で $\underline{1}$ が再生、 H_2O 、 D_2O で、 $M/e=256$ 、 258 のものがマススペクトルにより検出された。)
- (d) 2当量のdinitrobenzeneとの反応で、これのanion radicalのESRシグナルが得られる。

$\Delta\delta_{00}$ は、THFの場合、 $Na > K >> Li$ (phenylのm、p-位を除いて)であり、 $\underline{1} \cdot M^+$ との類推により contact ion pair $\underline{1}^{2-} \cdot 2M^+$ (あるいは M^+ が1個ずつ入れ替わる)が存在し、 M^+ のイオン半径によりクーロン相互作用が大きく異なるものと予想される。また、DMEでも $Na > Li$ であるが、溶媒間で比較すると、 $Na/THF > Na/DME$ 、 $Li/THF < Li/DME$ (H_{17} 、 H_{18} では、 Na, Li いずれも $DME > THF$)となり、ionとの相互作用がTHFとは異なっている。つまり、solvent-separated ion pair (一般にTHFよりもDMEの方がイオンとの相互作用が強い)の生成が考えやすい。



一方、 $(1-D)^-$ では、 $\Delta\delta_{\text{obs}}$ は、Li/THFと、Li/DMEが同程度、Na/DME>Li/DME であるが、 1^2- ほど顕著ではないことは、 M^+ が1個であることを考えれば、つじつまが合う。次に、anthracene環とphenyl環との距離、角度を変えながら Δq_c^{π} (1 から 1^2- への π -電子密度変化)のCND O計算を行ない、 $\Delta\delta = k \cdot \Delta q_c^{\pi}$ ($k_H = 10.7$, $k_C \approx 160 \text{ ppm/e}$)から求めた $\Delta\delta_{\text{calc}}$ と比較したが、counterion 効果、ring current effect等を合理的に説明するには至っていない。

[2] Li/THFで、 2^2- に同定されるスペクトルが得られた。 1^2- とほぼ同じ状況であるので省略する。Li/DME,K/THF では、重水素を、1個、及び2個引き抜いたと思われる分子種の重なりが得られており、解析が完全になされていない。

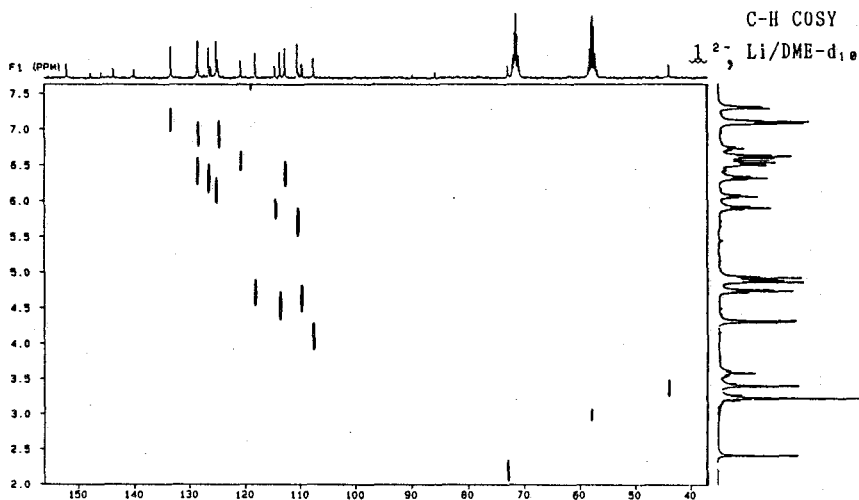
[3] Na/THFでは、 3^2- 以外に、重水素引き抜きによる monoanion は認められない。 3^2- であることの確認には、[1]と同様(a)-(d)により行なった。4級炭素は、関連化合物、過剰電子密度等を考慮してtentativeに帰属した。それ以外は、 3 、 3^2- ともに、coupling pattern、H-H、H-C COSY等により帰属を行なった。 ^{13}C の $\Delta\delta_{\text{obs}}$ の平均値(シフト値重心の 3 からのシフト)5.26 ppmは、 $k_C \approx 160 \text{ ppm/e}$ から得られる値、10.67 ppmの約半分であり、monoanionの生成を思わせるが、これは偶然の一致である。

Eliasson⁴⁾らにより、 $4n\pi$ 系における、環プロトンの paratropic ring currentによる、anisotropic highfield shiftと、実測値による k_C 値との相関関係からanthraceneでは、89 ppm/eが与えられている。 3^2- でほぼ、80%の過剰電荷が anthracene環により占められているので、partially paratropic effectにより、上述の炭素原子のdeshieldingが説明される。次に、CND O法による、 $\Delta\delta_{\text{calc}}$ との対応を考える。(I) phenyl 基のプロトンに比べて、anthracene環の1、2-protonは、異常に $\Delta\delta_{\text{obs}}$ が、 $\Delta\delta_{\text{calc}}$ よりも大きい。(3^2- ~ 3 の間で3重結合の anisotropyの差は無視する。)

(II) C_{11} 、 C_{22} では、異常deshieldingがみられないが、一方 C_9 、 C_{11} では非常に大きい。

(III) C_{17} ~ C_{28} では $\Delta\delta_{\text{obs}}$ と $\Delta\delta_{\text{calc}}$ との対応がよい。

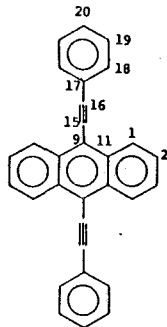
(IV) C_{15} 、 C_{18} (sp混成)では、適切な k_C が見つかっていないので、比較できない。



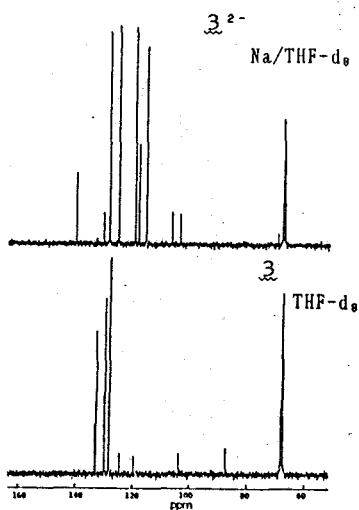
このことから、anthracene環の中心環が主に、paratropic ring currentに寄与していると考えられる。

Table . Comparison of Changes of Calculated and Observed ^1H and ^{13}C Shifts of $\underline{3}^{2-}$ from $\underline{3}$ ^{a)}

	$\Delta q_c^{b)}$	$\Delta \delta_{\text{calcd}}^{c)}$	$\Delta \delta_{\text{obsd}}^{d)}$
H_1		0.92	2.70
H_2		0.46	1.98
H_{18}		0.58	1.07
H_{19}		0.04	0.63
H_{20}		1.17	1.07
C_1	0.0858	13.73	12.51
C_2	0.0429	6.86	8.46
C_9	0.4700	75.20	63.60
C_{11}	0.0349	5.58	-2.94
C_{15}	-0.0458	(-7.33) ^{e)}	-12.69
C_{16}	0.1318	(21.09) ^{e)}	-16.63
C_{17}	-0.1037	-16.59	-15.85
C_{18}	0.0543	8.69	7.36
C_{19}	0.0041	0.66	1.06
C_{20}	0.1090	17.44	11.60



a) In ppm. b) Excess π -charge density of $\underline{3}^{2-}$ relative to that of $\underline{3}$.
 c) Shifts of $\underline{3}^{2-}$ from those of $\underline{3}$ calculated using $k_H=10.7$ ppm/electron and $k_C=160$ ppm/electron in $\Delta \delta_H = k_H \cdot \Delta q_c^{\pi}$ and $\Delta \delta_C = k_C \cdot \Delta q_c^{\pi}$, respectively.
 d) High-field shifts are denoted by positive signs. e) Shift values in parentheses are not reliable because the standard k_C value (160 ppm/electron) may not be applied to sp-hybridized carbons.



References

- 1) K. Mullen, Chem. Rev., 84, 603 (1984); K. Mullen, Pure Appl. Chem., 58, 177 (1986).
- 2) R. B. Bates, B. A. Hess, Jr., C. A. Ogle, and L. J. Schaad, J. Am. Chem. Soc., 103 5052 (1981).
- 3) R. G. Lawler and C. V. Ristagno, J. Am. Chem. Soc., 91, 1543 (1969); K. Mullen, Helv. Chim. Acta, 61, 1296 (1978).
- 4) B. Eliasson, U. Edlund, and K. Mullen, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1986, 937.

Calculation of the nuclear spin-spin coupling constants by SOS-CI method

Configuration interaction calculation of σ - and π -electron contributions

Hiroyuki Fukui, Koichi Miura, and Hiroki Matsuda (Kitami Institute of Technology)

Abstract: Configuration interaction calculation for σ - and π -electron contributions to the nuclear spin-spin coupling constants in acetylene and ethylene molecules is presented. The calculation is performed by sum-over-states configuration interaction (SOS-CI) method with the two kinds of electron correlation approximations, which use singly and doubly excited configuration interaction (SD-CI) calculation for the ground state and use S-CI or SD-CI calculation for the excited triplet states. Quantitative agreement between the calculated and experimental coupling constants is not good, but the π -electron contribution J^π shows the same trends for all the used basis sets and the approximations of electron correlation. J^π contributes negligibly to the one-bond coupling constants $^1J_{CC}$ and $^1J_{CH}$, but it makes important contributions to the two-bond coupling constants $^2J_{HH}$, $^2J_{CH}$, and $^2J_{CC}$.

I. INTRODUCTION

In the previous papers,^{1,2} we reported on the semi-empirical calculations for σ - and π -electron contributions to nuclear spin-spin coupling constants. A striking feature of the results was the prediction of large π -electron contributions to the two-bond coupling constants $^2J_{HH}$, $^2J_{CH}$, and $^2J_{CC}$, whereas Pople and Bothner-By³ assumed no contribution of π orbitals to the geminal proton-proton coupling constants $^2J_{HH}$ in CH_2 groups with sp^2 hybridization. Given the results by the semi-empirical method, one is prompted to ask if the same trend may be obtained from non-empirical calculations.

The non-empirical coupled Hartree-Fock (CHF) or finite perturbation (FP) method has been successfully used to calculate nuclear spin-spin coupling constants in hydrogen molecule,^{4,5} the simple hydrides,⁶⁻⁹ and the singly bonded methyl derivatives.¹⁰⁻¹² However, the non-empirical CHF method is not applicable to calculations of the nuclear spin-spin coupling constants in the molecules with multiple bonds like acetylene, ethylene or hydrogen cyanide. The reason for this is the fact that for these unperturbed systems the lowest energy spin unrestricted Hartree-Fock (UHF) solution is not usually an eigenfunction of \hat{S}^2 with the eigenvalue $S=0$. That is, the systems display the so-called triplet instability.^{8,13}

The problem of the triplet instability would be circumvented (i) by using a well correlated zeroth order wave function or (ii) by using a nonrelaxed molecular orbital system in which the orbitals themselves are assumed to be independent of the presence of the external perturbation field. The former category includes e.g. the finite perturbation-multiconfigurational SCF (FPMC) method^{14,15} and equations-of-motion (EOM) or higher random phase approximation (higher RPA) method.^{16,17} The latter includes e.g. sum-over-states configuration interaction (SOS-CI) method,^{18,19} double perturbation method,^{20,21} and coupled cluster singles and doubles (CCSD) method using unrelaxed SCF orbitals.²²

In this paper, we report the results provided by an *ab initio* SOS-CI calculation for σ - and π -electron contributions to the nuclear spin-spin coupling constants in the molecules with

multiple bonds. In Sec. II, an outline of computational method is given. Section III is devoted to presentation and discussion of the theoretical results.

II. METHOD OF CALCULATION

If the coupling between two particular nuclei A and B is investigated, the form of the hamiltonian becomes

$$\hat{H} = \hat{H}(0) + \hat{V}_A \cdot \hat{I}_A + \hat{V}_B \cdot \hat{I}_B + \hat{I}_A V_{AB} \hat{I}_B . \quad (1)$$

Ramsey^{2,3} showed that there are four distinct mechanisms that contribute to the nuclear spin-spin coupling. Therefore \hat{V}_A , \hat{V}_B , and V_{AB} should, in principle, cover all of them. However, in this study we limit ourselves to the Fermi contact interaction which is overwhelmingly dominant. In this case $V_{AB}=0$, and \hat{V}_A , \hat{V}_B can thus be written

$$\hat{V}_N = (8\mu_B h r_N / 3) (\mu_0 / 4\pi) \sum_i \beta (\hat{r}_{Ni}) \hat{S}_i , \quad N=A,B . \quad (2)$$

The phenomenological isotropic coupling constant J_{AB} is defined from the second order energy $E_{AB}^{(2)}$ by

$$E_{AB}^{(2)} = h J_{AB} \hat{I}_A \cdot \hat{I}_B . \quad (3)$$

Using the conventional second order perturbation theory, J_{AB} can be written with only one component, say z, of the vectors \hat{V}_A and \hat{V}_B as

$$J_{AB} = (2/h) \langle \Psi^{(0)} | V_{AZ} | \Psi_{BZ}^{(1)} \rangle , \quad (4)$$

where $\Psi_{BZ}^{(1)}$ is the first order correction to the ground state wave function caused by V_{BZ} . $\Psi_{BZ}^{(1)}$ can be obtained by solving the equation

$$(\hat{H}(0) - E^{(0)}) \Psi_{BZ}^{(1)} = -V_{BZ} \Psi^{(0)} , \quad (5)$$

because the first order energy $E_{BZ}^{(1)}$ is zero.

Equation (5) may be solved by expanding $\Psi^{(0)}$ and $\Psi_{BZ}^{(1)}$ in some orthonormal function sets. In Eq. (5) $\Psi^{(0)}$ is sufficiently well expanded in all singly and doubly excited singlet configurations generated from a doubly occupied reference configuration. According to Kowalewski et al.,^{18,19} the expansion of $\Psi_{BZ}^{(1)}$ is carried out at the two kinds of levels of electron correlation approximation, J_3 and J_4 , presented below.

- (a) J_3 : $\Psi_{BZ}^{(1)}$ expanded in singly excited triplet configurations.
- (b) J_4 : $\Psi_{BZ}^{(1)}$ expanded in all singly and doubly excited triplet configurations.

The σ -electron contribution J_{AB}^σ is calculated by excluding π -orbitals from the hole and particle states in expansions of $\Psi^{(0)}$ and $\Psi_{BZ}^{(1)}$. The total coupling constant J_{AB} is evaluated by including the configurations with even numbers of π -orbitals in the hole plus particle states in expansions of $\Psi^{(0)}$ and $\Psi_{BZ}^{(1)}$. The π -electron contribution J_{AB}^π is simply defined by

$$J_{AB}^\pi = J_{AB} - J_{AB}^\sigma . \quad (6)$$

III. RESULTS AND DISCUSSION

We calculated J^σ , J^π , and J for the two simple unsaturated hydrocarbons, i.e., acetylene

and ethylene molecules using the *ab initio* SOS-CI method at the J_3 and J_4 levels in terms of Kowalewski et al.'s theory. The basis sets employed are the 4-31G²⁴ and 6-31G²⁵ sets with the optimum scale factors and the double-zeta one²⁶, and the experimental equilibrium geometries²⁷ were used. The spin unperturbed ground state SCF-CI wave function $\psi^{(0)}$ is given as the lowest eigenvalue function of a large scale CI matrix, which was calculated iteratively by the method of Shavitt et al.²⁸ The first order wave function correction $\psi^{(1)}$ was determined by solving iteratively the linear equation system derived from Eq. (5).²⁹

Our calculated results are presented and compared with experimental values in Table I. The calculated results show a rather small dependence on the basis sets used and the levels of CI calculation for triplet states. However, this does not mean adequacy of the basis sets used and unnecessary inclusion of triply excited triplets. The calculated total coupling constants are considerably smaller in magnitude than the experimental values. Moreover, the opposite sign is predicted for the ${}^2J_{HH}$ of ethylene. Quantitative agreement of the results with experiment is not good. The reason for this is not completely clear, but one can suspect that a major reason is referred to inadequacy of the basis sets used. The calculations using much larger basis sets would be necessary to get a quantitative agreement.

The semi-empirical results by us¹ are also presented in the last three columns in Table I. The semi-empirical values for J^σ and J differ from the non-empirical results, but both calculations for the π -electron contribution show the same trend in the signs and magnitudes. That is, J^π contributes negligibly to the one-bond coupling constants ${}^1J_{CC}$ and ${}^1J_{CH}$, but it makes important contributions to the two-bond coupling constants ${}^2J_{HH}$, ${}^2J_{CH}$, and ${}^2J_{CC}$.

References

1. H. Fukui, T. Tsuji, and K. Miura, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3652 (1981).
2. H. Fukui, K. Miura, K. Ohta, and T. Tsuji, *J. Chem. Phys.* **76**, 5169 (1982).
3. J. A. Pople and A. A. Bothner-By, *J. Chem. Phys.* **42**, 1339 (1965).
4. J. Oddershede, P. Jørgensen, and N. H. F. Beebe, *Chem. Phys.* **25**, 451 (1977).
5. J. Kowalewski, A. Laaksonen, B. Roos, and P. Siegbahn, *J. Chem. Phys.* **71**, 2896 (1979).
6. H. Fukui, A. Sanyoshi, and K. Miura, *J. Chem. Phys.* **69**, 943 (1978).
7. H. Fukui, K. Miura, and N. Ishigami, *J. Chem. Phys.* **71**, 560 (1979).
8. W. S. Lee and J. M. Schulman, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5184 (1980).
9. J. Kowalewski, A. Laaksonen, and V. R. Saunders, *J. Chem. Phys.* **74**, 2412 (1981).
10. P. Lazzeretti, *J. Chem. Phys.* **71**, 2514 (1979).
11. A. Laaksonen, J. Kowalewski, and P. Siegbahn, *Chem. Phys. Lett.* **69**, 109 (1980).
12. A. Laaksonen and J. Kowalewski, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5277 (1981).
13. M. F. Guest, V. R. Saunders, and R. E. Overill, *Mol. Phys.* **35**, 427 (1978).
14. A. Laaksonen and V. R. Saunders, *Chem. Phys. Lett.* **95**, 375 (1983).
15. A. Laaksonen, J. Kowalewski, and V. R. Saunders, *Chem. Phys.* **80**, 221 (1983).
16. V. Galasso, *J. Chem. Phys.* **82**, 899 (1985).
17. V. Galasso and G. Fronzoni, *J. Chem. Phys.* **84**, 3215 (1986).
18. J. Kowalewski, B. Roos, P. Siegbahn, and R. Vestin, *Chem. Phys.* **3**, 70 (1974).
19. J. Kowalewski, B. Roos, P. Siegbahn, and R. Vestin, *Chem. Phys.* **9**, 29 (1975).
20. E. Hiroike, *J. Phys. Soc. Jpn.* **22**, 1079 (1967).

21. E. Hiroike, *J. Phys. Soc. Jpn.* **23**, 379 (1967).
22. H. Sekino and B. J. Bartlett, *J. Chem. Phys.* **85**, 3945 (1986).
23. N. F. Ramsey, *Phys. Rev.* **91**, 303 (1953).
24. R. Ditchfield, W. J. Hehre, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **54**, 724 (1971).
25. W. J. Hehre, R. Ditchfield, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **56**, 2257 (1972).
26. H. Basch, M. B. Robin, and N. A. Kuebler, *J. Chem. Phys.* **47**, 1201 (1967).
27. Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions, Supplement (The Chemical Society, London, 1965).
28. I. Shavitt, C. F. Bender, A. Pipano, and R. H. Hosteny, *J. Comput. Phys.* **11**, 90 (1973).
29. J. Kowalewski, *Chem. Commun. Univ. Stockholm* 1974 No. 14.

TABLE I. Calculated and Experimental Values of the Nuclear Spin-Spin Coupling Constants (Hz)

		4-31G			6-31G			DZ			Exptl ^a	INDO ^b		
		J ^σ	J ^π	J	J ^σ	J ^π	J	J ^σ	J ^π	J	J	J ^σ	J ^π	J
Acetylene														
1J _{CC}	J ₃	85.7	8.1	93.8	102.3	9.7	111.9	110.0	7.6	117.6	171.5	143.7	20.1	163.7
	J ₄	86.4	8.9	95.3	103.2	10.6	113.8	110.3	7.4	117.7				
1J _{CH}	J ₃	136.2	4.4	140.6	154.0	4.9	158.8	171.6	4.5	176.1	248.7	226.9	5.7	232.6
	J ₄	137.8	5.3	143.2	155.7	5.7	161.3	173.2	5.0	178.1				
2J _{CH}	J ₃	21.2	-4.2	17.0	25.2	-4.6	20.6	28.3	-4.0	24.3	49.3	8.2	-5.7	2.5
	J ₄	22.1	-2.9	19.2	26.2	-3.1	23.1	29.3	-2.3	27.0				
3J _{HH}	J ₃	3.0	2.4	5.4	2.9	2.4	5.3	2.3	2.3	4.6	9.5	9.4	1.6	11.0
	J ₄	3.1	2.4	5.5	3.1	2.4	5.4	2.4	2.4	4.8				
Ethylene														
1J _{CC}	J ₃	43.8	4.1	47.9	52.7	4.7	57.4	58.1	3.0	61.1	67.6	67.2	14.9	82.1
	J ₄	43.6	3.9	47.6	52.3	4.6	56.9	56.8	2.6	59.4				
1J _{CH}	J ₃	99.4	2.1	101.4	109.7	2.2	112.0	111.7	1.8	113.5	156.4	152.3	4.4	156.7
	J ₄	99.8	2.3	102.0	110.1	2.4	112.5	112.2	1.8	114.0				
2J _{CH}	J ₃	0.5	-2.0	-1.5	0.8	-2.1	-1.3	0.3	-1.6	-1.3	-2.4	-7.2	-4.4	-11.6
	J ₄	0.9	-1.8	-0.9	1.3	-1.9	-0.7	0.9	-1.3	-0.5				
2J _{HH}	J ₃	-2.4	-1.0	-3.5	-2.3	-1.0	-3.3	-2.2	-0.9	-3.1	2.5	4.5	-1.3	3.2
	J ₄	-1.8	-0.8	-2.5	-1.6	-0.7	-2.3	-1.7	-0.7	-2.3				
3J _{HH} (cis)	J ₃	5.8	1.0	6.8	5.8	1.0	6.8	6.0	0.9	6.9	11.7	8.0	1.3	9.3
	J ₄	6.3	1.2	7.5	6.4	1.2	7.6	6.5	1.0	7.6				
3J _{HH} (trans)	J ₃	9.4	1.0	10.4	9.5	1.0	10.5	9.5	0.9	10.4	19.1	23.9	1.3	25.1
	J ₄	10.2	1.3	11.5	10.3	1.3	11.6	10.2	1.2	11.4				

a J. A. Pople and D. L. Beveridge, *Approximate Molecular Orbital Theory*, McGraw-Hill, New York, 1970; pp 154.

b Taken from Ref. 1.

(名工大) ○横山幸弘・高橋憲助

An NMR Study of the Naphthylamine Anions

Yukihiro Yokoyama and Kensuke Takahashi

(Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology)

The proton and carbon-13 NMR spectra were observed for the organolithium compounds produced from 1-, 2-amino- and 1,5-, 1,8-diaminonaphthalenes in HMPA and/or THF-HMPA mixed solvents. The formation of the anionic species by the deprotonation of the neutral precursors causes significant changes in their NMR parameters. The delocalization of the excess charges into the whole naphthalene ring of the anions was confirmed from the NMR chemical-shift data. The results are discussed in comparison with the NMR parameters of the delocalized benzyl type organic anions.

(序) 有機アニオン種の研究は アニオン中心の構造や電荷分布, 対カチオンとの相互作用を中心に, この種の研究に極めて有効であるNMR分光法を用いて行なわれてきた。従来の研究対象のほとんどは, 炭素原子をアニオン中心とする, いわゆるカルバニオンであったが最近炭素以外の元素を含む有機分子から生成するアニオン種にその対象を拡大している¹⁾。しかしながら, ヘテロ原子をアニオン中心とするアニオン種に関する種々の課題について, 十分な議論ができるほど, 研究されていない。我々はヘテロ原子を含む有機アニオン種に構造化学的興味をもって, アニリドリチウム, フェニルホスフィン類から生成するアルカリ金属塩に関するNMR研究を行ってきた²⁾。本報告では, 1-及び2-アミノナフタレン並びに1, 5-及び1, 8-ジアミノナフタレンから生成するアニオン種のNMRスペクトルから得られる知見, 特にナフチル基の過剰電荷の非局在化能及び, アニオン中心としての窒素原子の特徴について述べる。

(実験) 出発物質は, 真空中で昇華精製し, 十分に乾燥したTHFまたはDMEに溶解する。この溶液に出発物質のNH₂基と当量のn-またはtert-ブチルリチウムを加え, 十分に反応させる。次いで, 揮発性物質を真空中で除去し残渣をHMPAまたはTHF-HMPA混合溶媒に溶解し, 濾過してNMR試料管に封入した。濃度はこれらのリチウム塩の溶解度が低いので0.2~0.5mol/lとした。NMRスペクトルの測定はVarian XL-200, 一部VXR-300で行った。化学シフトは, 溶媒として用いたHMPAの高磁場吸収線を, ¹Hに対しては2.58ppm, ¹³Cに対しては37.00ppmとして測った。スペクトルの帰属は¹H (¹H)ホモデカップリングおよび¹³C (¹H)選択的デカップリングより確かめた。

(結果と考察) 1-アミノナフタレン(1-AN)アニオン

^1H NMRスペクトルを図1に示す。また他の化学種とともに、表1および表2に ^1H および ^{13}C 化学シフトを示してある。NHプロトンおよびナフタレン環プロトンは脱プロトン化に伴う遮蔽の増加を受け、中性分子種より全て高磁場シフトしている。これらの高磁場シフトのうちNHプロトンのものが最も大きいけれども(約2ppm)、窒素原子がアニオン中心であるから当然といえる。環プロトンでは、4位のプロトン(約1ppm)2位(約0.7ppm)、次いで7位(約0.5ppm)3、5位(約0.4ppm)の高磁場シフトを示しており、NH基で置換された環部分ばかりではなく他方の環もかなり過剰電荷が非局在化していることが分る。表2から分るように ^{13}C 化学シフト変化は、4位が最も大きく(約14ppm)、次いで7位(約6ppm)であり ^1H 化学シフトと同様にこのアニオンがナフタレン環全体に過剰電荷が非局在化した種であることを示している。図1のb)、d)はそれぞれ24及び80℃のアニオン種のスペクトルであるが24℃のスペクトルにおいて、8位と2位のプロトン吸収はかなり広幅化している。この広幅化の現象は、アニオン化に伴うN-C結合が部分二重結合性を帯びる結果、コンホメーションが区別されつつあることを示唆している。図2に、THF-HMPA混合溶媒中のアニオンの ^{13}C NMRスペクトルを示す。a)のスペクトルでは、ほぼ平均化したコンホメーションを示している。他方、-50℃のスペクトルでは、a)における各々の吸収はコンホマーのシフト差に応じて広幅化したり、2つに分裂している様子が見られる。

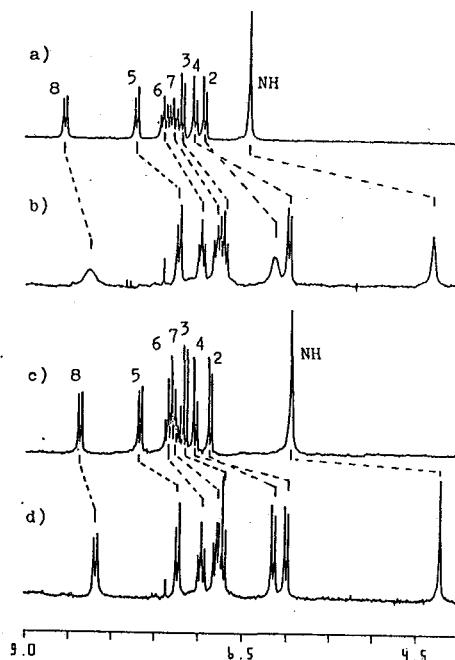


Figure 1. ^1H NMR spectra of 1-aminonaphthalene and its anion in HMPA. (a) neutral molecule at 24°C, (b) anionic molecule at 24°C, (c) neutral molecule at 80°C and (d) anionic molecule at 80°C

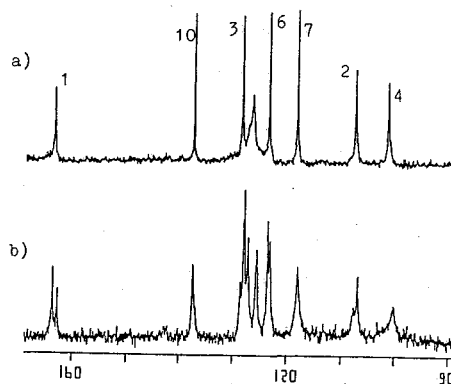


Figure 2. ^{13}C NMR spectra of 1-aminonaphthalene anion in THF-HMPA mixed solvents. (a) at -10°C and (b) at -50°C.

Table 1. The Proton Chemical Shifts of Naphthylamine Anions and Its Precursor in ppm

Comp.	Solvent	Temp. /°C	H-1 to H-8								NH
			H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	
1-ANLi	HMPA	24	---	6.15 ^{a)}	6.75	6.00	7.26	7.00	6.82	8.29	4.33
		80	---	6.16	6.75	6.02	7.26	6.98	6.81	8.20	4.24
2-ANLi	THF-HMPA	24	---	6.16	6.73	6.03	7.24	6.96	6.81	8.21	4.14
	HMPA	24	6.05	---	6.8 ^{b)}	6.9 ^{b)}	7.08	6.32	6.8 ^{b)}	6.9 ^{b)}	3.63
1,5-DANLi	HMPA	80	6.08	---	6.7 ^{b)}	6.9 ^{b)}	7.08	6.32	6.7 ^{b)}	6.9 ^{b)}	3.56
		80	---	6.24	6.64	7.08	---	6.24	6.64	7.08	4.03
1,8-DANLi	THF-HMPA	80	---	5.46	6.30	5.75	5.75	6.30	5.46	---	3.34
1-AN	HMPA	24	---	6.94	7.21	7.05	7.73	7.41	7.30	8.56	6.43
		80	---	6.90	7.20	7.07	7.71	7.38	7.30	8.40	5.97
2-AN	THF-HMPA	24	---	6.79	7.11	7.06	7.63	7.31	7.24	8.35	6.08
	HMPA	24	6.97	---	7.16	7.52	7.60	7.01	7.23	7.39	6.10
1,5-DAN	HMPA	80	6.96	---	7.15	7.50	7.58	7.01	7.21	7.41	5.70
		80	---	6.69	7.00	7.29	---	6.69	7.00	7.29	5.17
1,8-DAN	THF-HMPA	80	---	6.73	7.00	6.94	6.94	7.00	6.73	---	5.56

a) Broad signal b) With large error because of overlapping of the signal

Table 2. The Carbon-13 Chemical Shifts of Naphthylamine Anions and Its Precursor in ppm^{a)}

Comp.	Temp. /°C	c-1 to c-10									
		c-1	c-2	c-3	c-4	c-5	c-6	c-7	c-8	c-9	c-10
1-ANLi	24	163.39	107.41	128.60	100.60	126.45 ^{b)}	123.60	118.03	125 ^{b,c)}	127 ^{b,c)}	137.79
	80	163.43	107.33	128.51	101.06	126.53	123.45	118.07	125.00	127.22	137.79
2-ANLi	80	103.18	165.09	121.97	126.91	127.23	112.75	124.12	125.70	137.23	123.02
1,5-DANLi	24	153.20 ^{b)}	107.19	122.61	103.97 ^{b)}	153.20 ^{b)}	107.19	122.61	103.97	127.52	127.52
	80	157.88	106.30	122.80	102.46	157.88	106.30	122.80	102.46	128.34	128.34
1,8-DANLi	80	166.42	106.79	125.87	104.93	104.93	125.87	106.79	166.42	120.12	141.55
1-AN	24	146.97	107.66	127.09	114.58	127.97	125.35	124.19	121.38	123.98	135.32
2-AN	24	106.00	148.96	119.41	128.30	128.00	120.25	125.67	125.26	136.32	126.95
	80	106.55	148.50	119.41	128.34	127.90	120.50	125.64	125.39	136.31	127.28
1,5-DAN	24	145.98	107.52	124.08	110.42	145.98	107.52	124.08	110.42	124.94	124.94
	80	145.52	108.06	124.28	110.64	145.52	108.06	124.28	110.64	125.11	124.11
1,8-DAN	80	147.45	110.87	126.09	117.89	117.89	126.09	110.87	147.45	117.53	137.78

a) In HMPA solution b) Broad signal c) With large uncertainty because of the extreme signal broadening

2-アミノナフタレン (2-AN) アニオン

表1及び2のシフト変化から分るように、このアニオンもまた過剰負電荷がナフタレン環全体に非局在化した化学種である。2-ANの脱プロトン化に伴う環プロトンの高磁場シフトは1位が最大(約0.9ppm)であり、次いで6位が0.7ppm、他の位置でも約0.6~0.4ppmもある。¹³C化学シフト変化からみると、6位が最も大きく(7.5ppm)、次いで10位(約4ppm)が大きい。従って、このアニオン種では、1-ANアニオンの場合より更にNH基の置換されていない方の環へ大きく過剰電荷が非局在化している。

1,5-ジアミノナフタレン(1,5-DAN) ジアニオン

¹³C NMRスペクトルを図3に示す。24°Cに於いて1-ANアニオンと同様に広幅化吸収線を与える。ジアミノナフタレン類のリチウム塩は溶解度がかなり低いので低温測定は出来ない。しかしながら、80°Cのスペクトルがシャープな吸収線を見せることから、1-ANの場合と同様にN-C回転が束縛されていると考え

られる。 ^1H 及び ^{13}C 化学シフト変化は、他の種と比較して最も小さい。これは、2つのNH基のもたらすナフタレン環への非局在化が環上で相殺されているからである。しかし、この場合にもNH基と向い合う4, 8位の電荷分布が高いことが分る。

1,8-ジアミノナフタレンジアニオン

この場合には、脱プロトン化によって大きなシフト変化を見せる。これは2つのNH基の環への非局在化が環上で相殺されることなく、アニリドリチウムの場合と同様の状況にあるためである^{2a)}。過剰電荷分布の高い位置は、4, 5位及び2, 7位である。

アミノナフタレンアニオン類における過剰電荷分布の非局在化の指標及びベンジル型アニオンとの比較

フェニルメチルカルバニオンでは α 位、イプソ位はそれぞれ15.4, 23.0 ppm低磁場シフトし、オルソ、メタ、パラ位はそれぞれ12.0, 1.1, 21.4 ppm高磁場シフトすることが知られている³⁾。個々で α 炭素の混成変化を約100 ppmの低磁場シフトとすれば、一般に ^{13}C について用いられている。1電子当たり160 ppmの高磁場シフトを満足する。一方、 α 位がヘテロ原子の場合には、ヘテロ原子のもたらす効果の見積りができないために、 α 位ヘテロ原子から遠いパラ位の炭素のシフト変化の大きさを非局在化の指標としてきた。しかしながら、アミノナフタレンアニオンのようなナフタレン環上の非局在化の指標は知られていない。今回の報告で、1位-置換体の場合では、4, 7位、2位-置換体では6, 10位が、1, 5位-2置換体及び1, 8置換体ではNH基と向い合う位置がその指標となることが確認された。

尚、一部のNMRスペクトルを測定して戴いたバリアン社の申田氏に深謝いたします。

References

- 1) a) R. Batchelor and T. Birchall, *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 674(1982), b) *ibid.* 105, 3048 (1983), c) E. Buncel et al., *ibid.* 107, 303(1985).
- 2) a) S. Ide, et al., *Magn. Reson. Chem.* 25, 675(1987) b) Y. Yokoyama and K. Takahashi, The 25th Symposium on NMR Spectroscopy, Tokyo, Nov. 1986, Abstr. p.28, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, in Press.
- 3) K. Takahashi et al., *Org. Magn. Reson.* 6, 580 (1974)

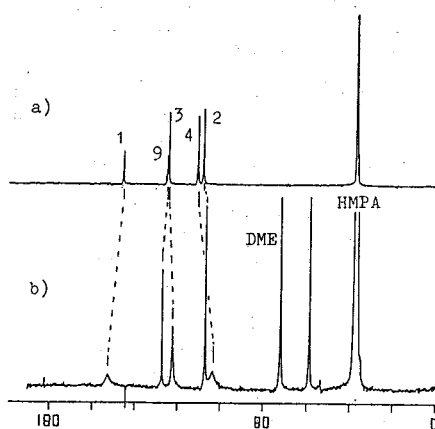


Figure 3. ^{13}C NMR spectra of 1,5-diaminonaphthalene; (a) and its dianion; (b) in HMPA at 24°C.

サイクロデキストリン誘導体-アゾ色素錯体の
化学シフトと運動性
(阪大薬・NMR) ○鈴木美代子・佐々木喜男

¹³C Chemical Shifts and Molecular Dynamics of Cyclodextrin Derivatives and Their Complexes with Azo Dyes

Miyiko Suzuki, Yoshio Sasaki

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

The molecular motions of the inclusion complexes of 5 kinds of cyclodextrin with azo dyes have been studied by ¹³C nuclear relaxation. Upon inclusion, the complex formation ratio, the lengthening of the hydrophobic torus of cyclodextrin by substituting with methyl groups gave large influence to overall correlation times of azo dyes and cyclodextrin. The ratios of the overall correlation times of azo dyes to those of cyclodextrin in the complexes were 0.3~0.9. Those values suggest that azo dyes reserve an independent motion in the cavity.

(はじめに) サイクロデキストリン(cdx)は、D-glucopyranoseの1,4結合した環状化合物であって大きな円周に12つの水-級水酸基、小さな円周に6つの水-級水酸基を有する円筒状の形をしておりその内部は比較的 hydrophobic であって fixした sizeの guest分子と結合して通常1:1錯体を形成する。今回は¹³C NMRの緩和時間より求めた回転相関時間を使って異なる内径、長さを持つ cdxの空洞の内に包まれたアゾ色素の運動状態を検討した。

(実験方法)

¹³C T₁は日立 R-900 NMR Spectrometerを用い inversion recovery法で測定した。試料は freeの host, guest分子に対しては 60°Cにおける 0.05~0.1M 飽和, 錯体については測定は hostと guest分子 0.1M, 他は 0.15Mとし 60°Cにおける飽和溶液と平衡に達した後、迅速に測定した。アゾ色素の chemical shift の帰属は simple sum法, 各 cdx の帰属は OFS reso-

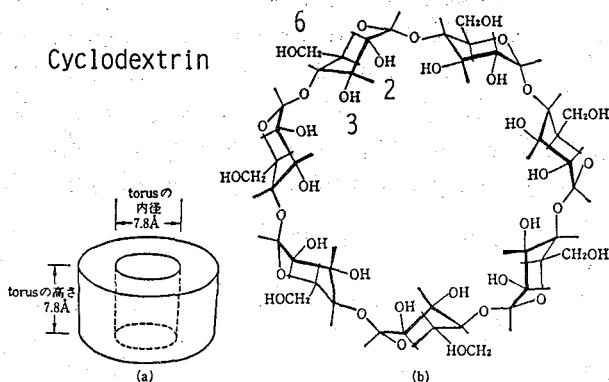


図 3.5 β-CD 分子 (a) 分子形態の模式図 (分子の寸法を示したもの) (b) 分子構造

- α-CDX = 重合度 6
- β-CDX = " 7
- γ-CDX = " 8
- DMB = 2,6-DIMETHYL β-CDX
- TMB = 2,3,6-TRIMETHYL β-CDX

nance, selective decoupling 法によつて。

(結果と考察)

1. 緩和時間と相関時間

各錯体のスペクトルは1組の peak から成っているので1組の錯体形成が起つておき、その過程は ^{13}C NMR time scale において早いと考えられる。Table I に free cdx とアゾ色素, 見積られた錯体の T_1 値を示す。

水素が直接結合している炭素の T_1 値は主として回転運動によつてもたらされた $^{13}\text{C}-\text{H}$ 双極子-双極子緩和に帰せられる。等方性モデルによると

$$1/T_1 = F^2 \gamma_C^2 \gamma_H^2 \rho_{CH}^2 \tau_{eff} \dots \dots \dots (1)$$

部分的に内部回転をしている cdx 中の α -級アルコール基, アゾ色素の phenyl 環については

$$1/T_1 = F^2 \gamma_C^2 \gamma_C^2 \rho_{CH}^2 \tau_{eff} \{A + B \cdot 6ZG / (6ZG + 2\tau_{eff}) + C \cdot 3ZG / (3ZG + 2\tau_{eff})\} \dots \dots (2)$$

$$A = 1/4 (3 \cos^2 \theta - 1)^2, B = 3 \sin^2 \theta \cos^2 \theta, C = 3/4 \sin^4 \theta$$

部分的に内部回転をしている Me 基については

$$1/T_1 = F^2 \gamma_H^2 \gamma_C^2 \rho_{CH}^2 [A/6D + B/(6D + R_{int}) + C/(6D + 4R_{int})] \dots \dots \dots (3)$$

が成立する。

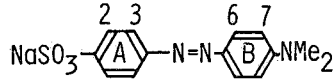
測定された T_1 値よりみて cdx の pyranose ring の C-H はほぼ同じ値を示すので cdx は等方性運動をしている。C-6 H₂OH の T_1 値はそれよりやや長い値を示すので C-5-C-6 軸廻りに free rotation が考えられる。 α, β, γ -cdx の T_1 値は異なり、それらの容積と関係している。β-cdx に Me 基が置換されると pyranose ring の T_1 値は大きく減少する。アゾ基は各環の T_1 値よりみて tumbling motion による異方性が観察される。B 環は常に最小値を示し、II, III の phenyl 環の $T_1(\text{ortho, meta})/T_1(\text{para})$ は1より大きく、I の NMe₂ 基も早い自由回転をしている。

2. アゾ色素と cdx の分子運動に及ぼす錯体形成の結果

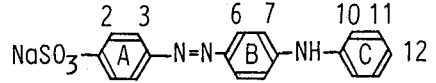
(1), (2), (3) 式より求めた cdx, アゾ色素, 錯体の全回転, 部分回転運動の相関時間 (τ_{eff}, τ_G), free 状態に対する錯体状態の比, 錯体時の cdx, アゾ色素の運動状態 ($\tau_{cdx, dye} / \tau_{cdx, dye}$) と Table II に示す。色接によって変化する τ_{eff} の変動は cdx よりもアゾ色素の方が大である。 $\tau_{cdx, dye} / \tau_{cdx}$ は $\gamma > \alpha \sim \beta > \text{TMP} \sim \text{DMP}$ の順であつて、錯体の値が大いのは2:1の錯体形成のためである。β-cdx の Me 誘導体に関しては pyranose ring, Me 基共に色接による変動を殆ど示さない。C-6 H₂OH の τ_G は変動が少く、 $\tau_{cdx, CH_2OH, dye} / \tau_{cdx, CH_2OH}$ よりみれば、おつて自由回転をして

Azo Dyes Used

Methyl orange (I)



Tropaeolin (II)



Metanil yellow (III)

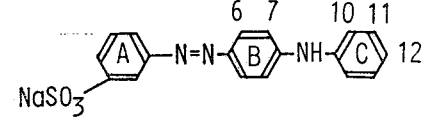


Table 1. ^{13}C Relaxation Times for Cyclodextrin, Azo Dyes and Their Inclusion Complexes

Compound	^{13}C NT ₁ (sec)									
	1	2	3	4	5	6	<T ₁ > ₁₋₅	2Me	3Me	6Me
α -cdx(0.05)	0.43	0.36	0.37	0.35	0.38	0.52	0.38			
α -cdx(0.1)	0.33	0.35	0.35	0.31	0.34	0.40	0.34			
α -cdx, II	0.15	0.15	0.14	0.15	0.16	0.22	0.15			
α -cdx, III	0.14	0.15	0.14	0.15	0.14	0.20	0.14			
β -cdx	0.27	0.30	0.32	0.27	0.27	0.34	0.29			
β -cdx, I	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.17	0.11			
β -cdx, II	0.13	0.12	0.14	0.14	0.13	0.19	0.13			
DM β^a	0.10	0.07	0.07	0.07	0.07	0.12	0.08	0.57		0.64
DM β , I	0.07	0.07	0.08	0.08	0.06	0.10	0.07	0.57		0.63
DM β , II	0.07	0.07	0.08	0.08	(0.08)	0.14	0.08	0.58		0.61
TM β^a	0.12	0.13	0.15	0.15	0.12	0.14	0.13	0.56	0.50	0.54
TM β , I	0.08	0.12	0.12	0.10	(0.17)	0.09	0.12	0.67	0.55	0.58
γ -cdx	0.22	0.25	0.21	0.22	0.22	0.26	0.22			
γ -cdx, I	0.07	0.07	0.08	0.08	0.07	0.11	0.07			
	2	3	6	7	Me					
I	0.90	0.97	0.62	0.70	2.33					
I, β -cdx	0.49	0.51	0.36	0.37	1.09					
I, DM β	0.25	0.28	0.19	0.18	0.91					
I, TM β	0.42	0.45	0.32	0.35	1.02					
I, γ -cdx	0.19	0.17	0.13	0.11	0.75					
	2	3	6	7	10	11	12			
II	0.86	0.98	0.90	0.79	1.89	2.00	0.62			
II, α -cdx	0.58	0.60	0.46	0.51	0.98	1.08	0.56			
II, DM β	0.16	0.15	0.08	0.08	0.14	0.16	0.05			
III			0.21	0.19	0.51	0.47	0.29			
III, α -cdx			0.36	0.36	1.04	0.91	0.33			

measured in D₂O solution at 60°C

a measured at 34°C

() overlap

強めている。Z_{cdx-dye}/Z_Iは γ >DM β >TM β ~ β 錯体の順であって錯体形成比、cdxへの置換基の導入等の影響が大きい。IのNH₂基は(3)式より判断して芳香環とdecoupleされており自由回転をしている。この関係は包接後も保たれておりMe基はcdxの外に出ている。

Z_{cdx-dye}/Z_{cdx-dye}であらわされるcdx内におけるIの運動性は γ >DM β >TM β > β <1であって単環基のguest分子に比して大きい。Iは分子がより長くcdx内を貫通しているため再配向しにくくなっているであろう。これらの値はIがcdx空洞内において高運動性を示していることを指

Table 11. Rotational Correlation Times τ_{eff} and τ_G of Cyclodextrin, Azo Dyes and Their Inclusion Complexes
Correlation Times(10-11Sec)

Compound	cdx overall		CH ₂ OH internal	
	τ_{eff}		τ_G	
α -cdx(0.05)	13		14	
α -cdx(0.1)	14		34	
α -cdx, II	33(2.4)		27(0.8)	
α -cdx, III	35(2.5)		32(0.9)	
β -cdx	17		40	
β -cdx, I	45(2.6)		30(0.8)	
β -cdx, II	38(2.2)		31(0.8)	
DM β	62		62	
DM β , I	70(1.1)		62(1.0)	
DM β , II	70(1.1)			
TM β	38		213	
TM β , I	41(1.1)			
γ -cdx	22		56	
γ -cdx, I	70(3.2)		45(0.8)	

	Substrate overall		Phenyl internal	
	τ_{eff}		τ_G	$\tau_{\text{cdx-dye}}/\tau_{\text{cdx-dye}}$
I	8			
I, β -cdx	13(1.6)			0.29
I, DM β	26(3.3)			0.37
I, TM β	14(1.8)			0.34
I, γ -cdx	41(5.1)			0.59
II	6		1	
II, α -cdx	11(1.8)		3.0(3.0)	0.33
II, DM β	62(10)		13(13)	0.89
III	25		7	
III, α -cdx	14(0.6)		2(0.3)	0.40

摘している。

3. 錯体の化学シフトと緩和時間が与える情報

アゾ色素の包接シフトは主として cdx 空洞内部の hydrophobic な性質と包接時の立体障害に起因すると考えられる。hydrophobic な要素 E dioxane 溶液中のアゾ色素のケミカルシフトで近似し包接シフトと比較すると立体障害に起因するケミカルシフトを見積ることが出来る。この方法で求めた包接位置と今回の T₁ 測定で示された結果とは矛盾していない。

(東工大・工)○久保庭 均・齋藤義治・山口和夫・
中浜精一

Conformational Analysis of Carboxylic Ionophore by ¹H-NMR

Hitoshi Kuboniwa, Yoshiharu Saito, Kazuo Yamaguchi, Seiichi Nakahama

(Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology)

We have prepared the synthetic ionophores with ether oxygens and aromatic rings. The solution conformation of the synthetic ionophores are investigated based on ¹H-NMR. Assignment was carried out using 2DNMR methods. Rotamer population analysis, NOE experiment and T₁ measurement were employed to estimate the solution conformation. The ionophore which has long polyether chain 1 has coiled conformation and encapsulates potassium ion in chloroform. On the other hand, another ionophore with shorter polyether chain 2 has pseudo cyclic conformation. The relationship between the solution conformation and ion transport are discussed.

1 はじめに 生体膜、有機液膜を通して金属イオンを選択的に輸送するモネンシン、ニゲリシンなどのカルボン酸型イオノホアは、末端にカルボキシル基、他末端に水酸基を持つポリエーテルで、疎水性のフラン環、ピラン環等を持っている。これらのイオン輸送機構は、図1の様に考えられている。カルボキシル基と水酸基のhead-to-tail水素結合によって環状コンホメーションをとり、金属イオンはその環の空孔に入ることにより脂溶化される。イオン選択性は、空孔と金属イオンの適合により発現する。我々は、カルボン酸型イオノホアの合成類似体による有機液膜中でのイオン輸送について検討し、1、2がK⁺イオンに対して高い選択性を示すことを明らかにした(1; K/Na=10, 2; K/Na=4.6)¹⁾。一方2のカルボキシル基置換位置異性体である3は、全くイオン輸送能を示さない事も示した²⁾。本研究では1、2及び3のアルカリ金属錯体の¹H-NMRをクロロホルム中で測定し、錯体構造と、イオン輸送能及び選択性との関係を調べた。

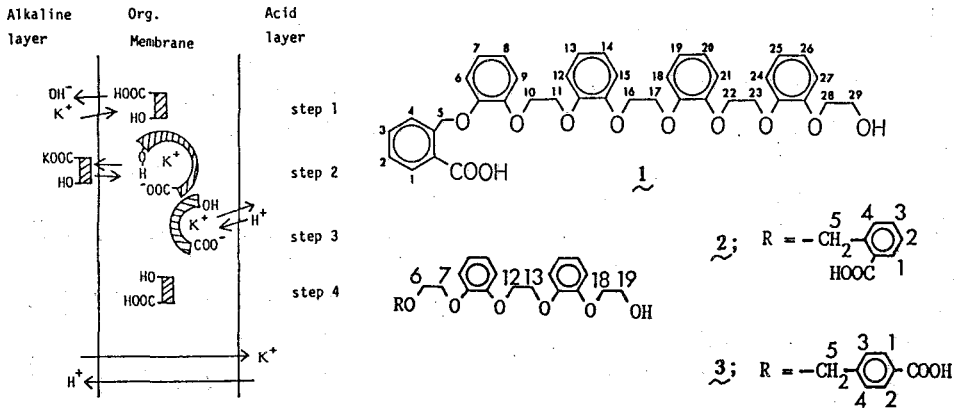


Fig.1 Ion transport mechanism

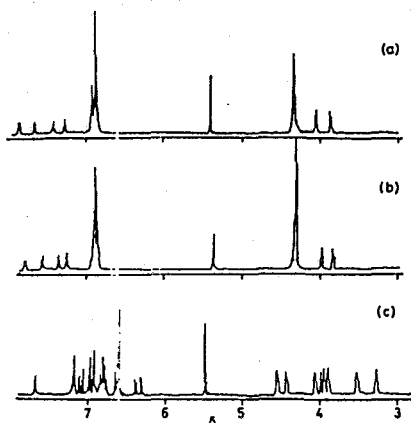


Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ spectra in CDCl_3
(a) $\underline{1}$, (b) $\underline{1-Na}$, (c) $\underline{1-K}$

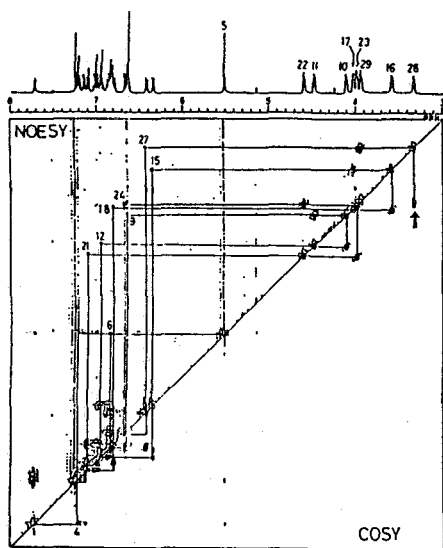


Fig. 3 Combined 2DCOSY-2DNOESY
of $\underline{1-K}$

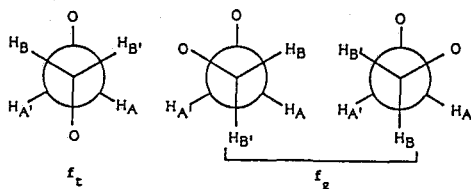


Fig. 4 Newman projection of the three conformers about C-C bond of the oxyethylene group

2 実験 金属錯体は、0.1N MOH (M=Na or K)水溶液中に $\underline{1}$ を加え、クロロホルム抽出した後凍結乾燥して調製した。 $\underline{2}$ のアルカリ金属錯体は、 $\underline{2}$ のメタノール溶液を 0.01N MOH (M=Na or K)水溶液で中和した後、凍結乾燥して得た。 $^1\text{H-NMR}$ の測定は、日本電子 GX-400 を用いて室温で行った。金属錯体濃度は 10-20mM (CDCl_3) とした。試料は、凍結-脱気を 4 回繰り返した後、試料管を封じて測定に供した。メチレンプロトン間の結合定数は、LAOCN3 を用いて求めた。

3 結果と考察

3-1 $\underline{1-M}$ 錯体について

$\underline{1}$ -Free, $\underline{1-Na}$, $\underline{1-K}$ の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを図 2 に示した。Na 錯体では、水酸基末端を除く内部のオキシエチレンプロトンが、4.3ppm にほぼ単一のシグナルを与える。一方、K 錯体ではオキシエチレン基のプロトンが 8 本のシグナルに分裂しており、芳香族プロトン領域も複雑な分裂を示している。即ち、Na 錯体と異なり K 錯体では、オキシエチレン及び芳香族領域の個々のプロトン環境が異なった構造に固定されている可能性がある。そこで以下のように K 錯体の配座解析を行った。まず、COSY 及び NOESY の組合せにより水酸基末端からのシーケンシャルな帰属を行った。スペクトル及び結果を図 3 に示す。次に、LAOCN3 を用いてオキシエチレンプロトン間の結合定数を求め、得られた J 値及び Colucci の Karplus 型の式³⁾ から得られる J_o 及び J_i ($J_o=2.1, J_i=14.0$) を用いて (1) 式からトランス及びゴーシュコンホマー (図 4)

Table 1 Vicinal coupling constants (Hz) and fraction of conformers (%) for the oxyethylene groups of $\underline{1-K}$

proton	$J(\text{AB}), J(\text{A}'\text{B}')$	$J(\text{AB}'), J(\text{A}\text{B})'$	G(%)	T(%)
10H-11H	2.5	6.3	97	3
16H-17H	2.2	6.3	99	1
22H-23H	2.3	5.5	99	1
28H-29H	2.9	5.3	93	7

の存在確率を求めた(表1)。

$$J(AB) = J(A'B') = f_t J_t + f_g J_g \quad \left. \vphantom{J(AB)} \right\} (1)$$

$$f_t + f_g = 1$$

K⁺の対イオンであるカルボキシル基末端に近い二組のオキシエチレン基の配座はほぼ100%ゴーシュであるのに対して、カルボキシル基から離れた二組のオキシエチレン基ではゴーシュ比がやや低くなっている。更に、結合順序の上では遠く離れている5H-16H, 5H-22H間にNOEが観測される(図5)事も併せて考えると、1はK⁺を螺旋状に取り巻いて錯体を作り、カルボキシル基末端から離れるにつれてエーテル酸素の配位が弱くなる構造を取っていると考えられる(図6)。

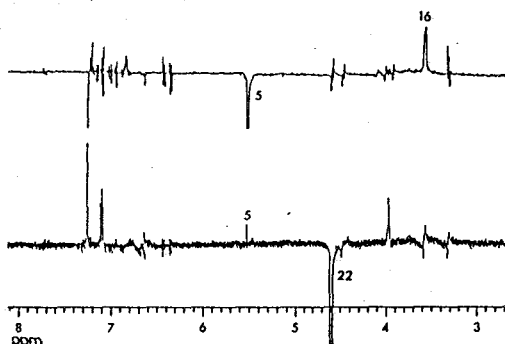


Fig.5 Results of NOE difference experiments H-5 and H-22 are saturated in (a) and (b), respectively

Table 2 Proton relaxation time(T_1) for 1, 1-K⁺ and 1-Na⁺

proton	<u>1</u>		<u>1</u> -K ⁺		<u>1</u> -Na ⁺	
	CDCl ₃		CDCl ₃	+D ₂ O	CDCl ₃	+D ₂ O
aromatic						
1	3.30					
2	2.11					
3	2.02					
4	2.00					
15	} 1.58		0.91	0.91	} 1.32	} 1.32
27			0.85	0.84		
aliphatic						
5	} 0.59		0.34	0.33	} 0.36	} 0.18
10			0.32	0.34		
11	} 0.51		0.31	0.34	} 0.36	} 0.40
16			0.36	0.34		
17			0.34	0.33		
22			0.35	0.34		
23			0.34	0.33		
28		0.69	0.35	0.34	0.40	0.42
29		0.62	0.34	0.40	0.45	0.35

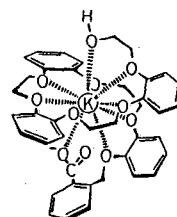


Fig.6 A preferred conformer of 1-K⁺ estimated from this study

次に、Free, 1-Na⁺, 1-K⁺のプロトン緩和時間測定の結果を表2に示す。Na, K錯体ともにFreeに比べてオキシエチレンプロトンの T_1 が短くなっている。これは、エーテル酸素が金属に配位する事によりオキシエチレン部分がゴーシュに固定され、運動性が低くなっているためと考えられる。またCDCl₃中にD₂Oを添加した場合、K錯体ではほとんど T_1 が変化していないのに対してNa錯体の場合は末端カルボキシル基近傍のプロトン(1H, 5H)の T_1 が著しく短くなっている。この事はK錯体の方がNa錯体よりも水分子による構造変化を起こし難く、安定な錯体で

ある事を示唆している。

3-2 2-M⁺錯体について

2も1と同様、アルカリ金属と錯形成することにより、ケミカルシフト、ビシナルメチレンプロトンの結合定数に変化を起こす。CPKモデルから、オキシエチレン基がゴーシュ配座を取り、全てのエーテル酸素がアルカリ金属イオンに配位しているとすると、2-M⁺は擬環状構造であると推定される。そこで1と同じ手法で結合定数からオキシエチレン基のゴーシュートランス存在確率を見積った(表3)。

Table 3 Vicinal coupling constants(Hz) and fraction of conformers(%) for the oxyethylene groups of 2 and its metal salts

compound	proton	J(AE),J(A'B')	J(AB'),J(A'B)	G(%)	T(%)
2-Free	6H-7H	3.1	6.1	92	8
	12H-13H	3.3	6.2	90	10
	18H-19H	3.3	5.4	90	10
2-Li ⁺	6H-7H	3.1	6.1	92	8
	12H-13H	-	-	-	-
	18H-19H	3.3	5.4	90	10
2-Na ⁺	6H-7H	2.8	6.2	94	6
	12H-13H	2.7	6.1	95	5
	18H-19H	3.3	5.5	90	10
2-K ⁺	6H-7H	2.5	6.3	97	3
	12H-13H	2.0	6.6	100	0
	18H-19H	2.9	5.6	93	7

Table 4 Ion transported % through a dichloro ethane liquid membrane by 2

Li	Na	K	Total
0	11	-	11
-	13	60	73

3-Free, 2-Na⁺, 2-K⁺ともゴーシュ配座が優位であり、とくに2が輸送選択性を示すK⁺イオンの場合は最もゴーシュ比が高く、イオン輸送の結果と良く一致する(表4)。次に2及び3とそれらのアルカリ金属錯体のオキシエチレンプロトンのケミカルシフトを図7に示した。全くイオン輸送能を示さない3では全てのオキシエチレンプロトンが3-Free, 3-Na⁺, 3-K⁺の順に一律に高磁場シフトしている。一方、K選択性を示す2の場合は、2-Na⁺, 2-K⁺の順に6,7Hは高磁場シフトし、12,13,18,19Hは低磁場シフトしている。この結果は、2-K⁺と3-K⁺では-COO⁻M⁺の作る電場に対するオキシエチレンプロトンの空間的な位置が非常に異なっている事を示している。

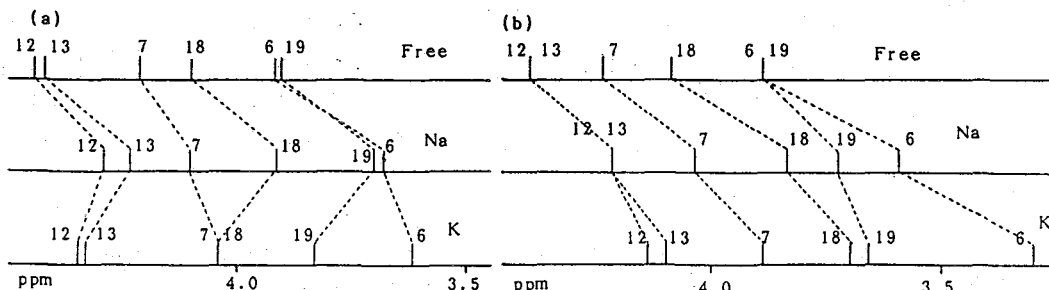


Fig.7 ¹H-NMR chemical shift of (a); 2 and its salts (b); 3 and its salts

1) H. Kuboniwa, S. Nagami, K. Yamaguchi, A. Hirao, S. Nakahama and N. Yamazaki, J. Chem. Soc., Chem Commun., 1468 (1985)

2) H. Kuboniwa, K. Yamaguchi, A. Hirao, S. Nakahama and N. Yamazaki, Chem. Lett., 1937 (1982)

3) W. J. Colucci, S. J. Jungk, R. D. Gandour, Magn. Reson. Chem., 23, 335 (1985)

新規免疫抑制物質FR900506の構造に関する研究(1)

— ^{13}C -NMR法による解析 —(藤沢薬品・物性研) ○島谷憲司・佐藤明啓・藤岡守・
羽根一輝・森本行洋Structural Analysis of a Novel Immunosuppressant, FR900506 by ^{13}C -NMR
Kenji Shimatani, Akihiro Sato, Mamoru Fujioka, Kazuki Hane and Yukiyoshi
Morimoto

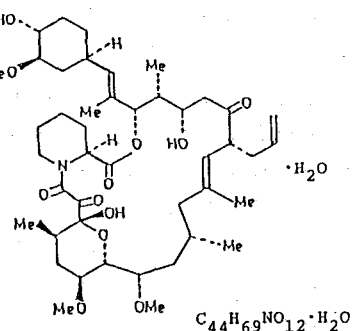
(Analytical Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.)

FR900506 (1) is a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993. The Structure of 1 has been determined by X-ray crystallography.¹⁾ Herein, our ^{13}C -NMR data has proved that 1 existed as an equilibrium mixture of two conformational isomers in solution and the isomerism of 1 in solution was associated with a restricted rotation of the amide bond within the macrolide ring. Furthermore, the free energy of activation (ΔG^\ddagger) for the restricted rotation between the two form was determined to be about 20 kcal/mol.

1. 序 論

FR900506 (1)は、放線菌 (*Streptomyces tsukubaensis* No. 9993 株) の生産するマクロライド構造を有す新規免疫抑制物質である。1は、臓器移植において現在多用されているシクロスポリンAと比べ強い免疫抑制作用を有することが知られている。²⁾ また、1の構造は単結晶X線構造解析により、Fig. 1の如く決定された。¹⁾ 一方、1の重クロロホルム溶液中での ^{13}C -NMRスペクトルにおいて、1の炭素数(44個)以上のシグナルが観測され、1は溶液中において2種の異性体の混合物として存在していることが推定されたがその詳細は明らかではない。³⁾

今回我々は、 ^{13}C -NMR法を用い、1が溶液中において2種の平衡混合物として存在していることを明らかにした。また、この平衡現象は、マクロライド構造内でのアミド結合の回転障害に由来していることを解明し、更に、2種の異性体間の活性化自由エネルギー (ΔG^\ddagger) に関して若干の考察を行った。



(1)
Fig. 1 Structure of FR900506

2. 実 験

1の各種溶媒*中での ^{13}C -NMRスペクトル(67.8MHz)を測定した。温度変化(昇温)の実験は、重ニトロベンゼンを用いて、測定温度25℃から160℃の範囲で行った。温度補正は、1,3-プロパンジオールを用い温度校正直線により行った。内部基準は、いずれもテトラメチルシラン(TMS)を用い、装置は、日本電子製JNM-FX 270型スペクトロメーターを用いた。

また、 ^{13}C 固体 NMR (CP/MAS: Cross Polarization/Magic Angle Spinning) の測定は、ブルカー社製 MSL 300 型スペクトロメーター (75.5 MHz) を用いた。化学シフト値は、グリシンのカルボニル炭素 (TMS 基準で 176.03 ppm) を外部基準とした。

* 溶媒: CDCl_3 , $\text{C}_6\text{D}_5\text{NO}_2$, CD_3OD , CD_3COCD_3 , CD_3CN , $\text{DMSO}-d_6$, C_6D_6 及び $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ の市販品をそのまま使用した。

3. 結果及び考察

3-1 平衡現象の解析

$\underline{1}$ の 10% 重クロロホルム溶液中での ^{13}C -NMR スペクトルを Fig. 2 (a) に、また $\underline{1}$ の ^{13}C 固体 NMR (CP/MAS) スペクトルを Fig. 2 (b) にそれぞれ示す。 CDCl_3 中では、 $\underline{1}$ の炭素数 (44 個) 以上の多くのシグナルが観測され、いずれのシグナルもそれぞれ約 3:1 の major 及び minor の対として観測された。一方、CP/MAS では、それぞれのシグナルは単一であり、 $\underline{1}$ の炭素数に相当するシグナルが観測された。特に、カルボニル炭素領域である 160~220 ppm 付近のシグナルを両者で比較すると、CP/MAS では、4 本のシグナルが観測され、一方、 CDCl_3 中では、それぞれ約 3:1 の強度比で対をなした計 8 本のシグナルが観測された。 $\underline{1}$ は、構造上 4 個のカルボニル炭素を有することから、CP/MAS で観測された 4 本の単一シグナルは、それぞれ $\underline{1}$ の 4 個のカルボニル炭素と帰属できる。このことから、 $\underline{1}$ は、固体状態では単一物質であるが、溶液中で 2 種の異性体の混合物として存在していることが示唆された。

そこで、この 2 種の異性体の詳細を明らかにする目的で、昇温及び溶媒変化実験を行った。 $\underline{1}$ の重ニトロベンゼン溶液中での温度変化 (25°C → 140°C → 25°C) 時の ^{13}C -NMR スペクトルにおいて、顕著な変化を示した δ 170 付近のシグナルの変化を Fig. 3 に示す。25°C においては 2 本のシグナルとして観測されたが、昇温によりブロードになり、120°C で 1 本に融合し、140°C でシャープな 1 本のシグナルとして観測された。更に、昇温した試料溶液を 25°C に戻し、再度測定すると昇温前と同一のシグナルを示し、シグナルの変化に可逆性を認めた。また、 $\underline{1}$ を各種溶媒に溶かした液につき、25°C で ^{13}C -NMR スペクトルを測定したところ、溶媒により major と minor の成分比に差を認めた。

ここで、この 2 種の異性体の詳細を明らかにする目的で、昇温及び溶媒変化実験を行った。 $\underline{1}$ の重ニトロベンゼン溶液中での温度変化 (25°C → 140°C → 25°C) 時の ^{13}C -NMR スペクトルにおいて、顕著な変化を示した δ 170 付近のシグナルの変化を Fig. 3 に示す。25°C においては 2 本のシグナルとして観測されたが、昇温によりブロードになり、120°C で 1 本に融合し、140°C でシャープな 1 本のシグナルとして観測された。更に、昇温した試料溶液を 25°C に戻し、再度測定すると昇温前と同一のシグナルを示し、シグナルの変化に可逆性を認めた。また、 $\underline{1}$ を各種溶媒に溶かした液につき、25°C で ^{13}C -NMR スペクトルを測定したところ、溶媒により major と minor の成分比に差を認めた。

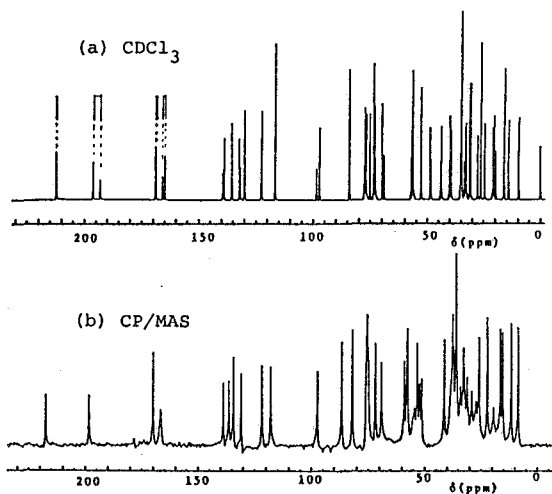


Fig. 2 ^{13}C -NMR spectra of FR900506

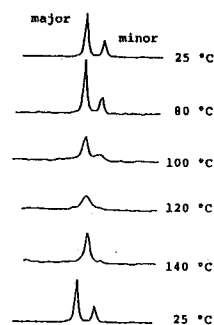


Fig. 3 Temperature dependence of two isomers signal (δ 170)

以上の結果より、1の溶液中で認められた2種の異性体は、平衡関係にあることが判明した。

3-2 平衡部位の解明

1の平衡部位を推定するため、1の類似化合物数種について¹³C-NMRスペクトル(CDCl₃中)を測定した。その結果、いずれも1と同様な現象を認め、1とこれら類似化合物との相互比較から、平衡部位が、ピペコリン酸付近の構造に由来したものと推定された。そこで、モデル化合物として、1と同様の部分構造であるN-アセチルピペコリン酸メチル(2)を用い解析した。2の¹³C-NMRスペクトル(CDCl₃中)は、25℃において、major及びminorの対をなした2種混合のスペクトルを与え、温度変化(25℃→100℃→25℃)を行ったところ、1と同様なシグナル変化を示した。一方、アミド結合を有しないピペコリン酸は、単一シグナルであり、異性体由来したシグナルを認めなかった。

一般に、アミド結合をもった化合物のNMRスペクトルは、アミドの回転障害により、2種のシグナルが観測されることが多い。⁴⁾ また、ペプチド等においても、溶液中でアミドの回転障害に由来したシストランス異性化が観測されることが知られている。⁵⁾

最近、DEPT法等による詳細な解析により、1の¹³C-NMRスペクトル(CDCl₃中)の帰属が行われ、³⁾これに基づき、Fig.1(a)の各炭素シグナルのmajor及びminor両成分の化学シフト差(Δδ)を求めた(Table 1)。その結果、化学シフト差が非常に大きい(Δδ>3)炭素は、Fig. 5に示した如く、1のC-2, 6及び9の炭素であることが判った。C-2及び6の炭素が異性化による影響を最も大きく反映することは先のモデル化合物2の結果と一致している。また、C-9の炭素は、C-8とα, βジケトンであるため、化学シフト差が非常に大きな値を示したと推定される。

以上の解析結果より、1の溶液中における平衡部位は、ピペコリン酸のアミド結合部分であり、その回転障害によるシストランス異性化に由来していると言える。

Table 1 Chemical shift difference between two isomers of FR900506 in CDCl₃

	δ (ppm)		Δδ* (ppm)		δ (ppm)		Δδ* (ppm)
	major	minor			major	minor	
CH ₃	9.53	9.85	-0.32	CH	22.25	26.14	0.12
	14.04	14.22	-0.17		34.61	33.69	0.92
	15.95	15.95	0		34.93	34.93	0
	16.21	16.21	0		39.91	40.40	-0.41
	20.41	19.52	0.89		52.81	52.75	0.06
	56.29	56.06	0.23		56.61	52.75	3.86
	56.61	56.61	0		69.97	68.99	0.98
	56.98	57.50	-0.52		72.82	72.33	0.49
	21.13	20.85	0.28		73.54	73.54	0
	24.53	24.53	0		73.68	73.68	0
CH ₂	27.67	26.26	1.41	75.24	76.62	-1.38	
	30.64	30.64	0	77.34	77.94	-0.57	
	31.30	31.30	0	84.19	84.19	0	
	32.71	32.54	0.17	122.52	122.75	-0.23	
	33.06	-	-	129.89	129.74	0.15	
	34.93	34.93	0	135.56	135.39	0.17	
	35.21	35.56	-0.35	97.09	98.62	-1.53	
	39.27	43.94	-4.67	132.37	131.79	0.58	
	43.48	44.00	-0.52	138.93	139.69	-0.75	
	48.63	48.37	0.26	164.70	165.85	-1.15	
116.61	116.61	0	168.99	168.76	0.23		
			196.17	192.95	3.22		
			212.53	212.38	0.15		

* : Δδ = δ_{major} - δ_{minor}

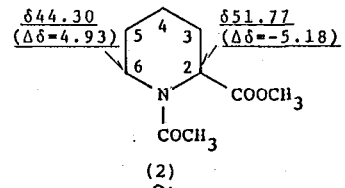


Fig. 4 Assignment of N-acetyl-methylpipercolate

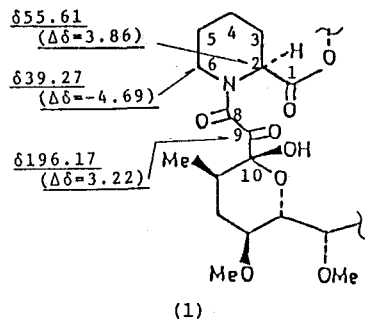


Fig. 5 Assignment of FR900506

3-3 異性化エネルギーの解析

一般に、2つの状態間を相互交換する分子の活性化自由エネルギー (ΔG^\ddagger) は、次式〔1〕の如く表わせる。⁶⁾

$$\Delta G^\ddagger = RT_c \{ \ln(R/Nh) + \ln(T_c/kc) \} \quad [1]$$

ここで、R：気体定数、T_c：融合温度、N：アボガドロ数、h：プランク定数、k_c：融合温度での速度定数を示す。融合温度での速度定数(k_c)は次式〔2〕により与えられる。

$$k_c = \pi |\Delta\delta| / \sqrt{2} \quad [2]$$

ここで、 $\Delta\delta$ は2状態間の化学シフト差を示す。

したがって、式〔1〕及び〔2〕によって活性化自由エネルギー (ΔG^\ddagger) は融合温度(T_c)と化学シフト差($\Delta\delta$)から次式〔3〕によって得られる。

$$\begin{aligned} \Delta G^\ddagger &= RT_c \{ \ln(\sqrt{2} R/\pi N h) + \ln(T_c/|\Delta\delta|) \} \\ &= 22.96 + \ln(T_c/|\Delta\delta|) \end{aligned} \quad [3]$$

1)の昇温実験により、融合温度を測定し、上記〔3〕式により、1)の溶液中における2種異性体間の活性化自由エネルギーを計算したところ、約20 Kcal/molであり、1)と同じ部分構造を有するN-アセチルピペコリン酸メチル(2)では、約18 Kcal/molであった。また、アミド結合を有するピペリジン化合物の活性化自由エネルギーは、一般的に13 Kcal/mol ~ 17 Kcal/molである。^{4), 7)} このことから、1)は、構造上、アミド結合部が環状内で形成されているために、これらのアミド化合物より活性化自由エネルギーが高い値を示したと考えられる。

4. まとめ

新規免疫抑制物質、FR900506は、溶液中において2種の平衡混合物として存在し、その平衡は、マクロライド構造内でのアミド結合の回転障害に由来するシーストランス異性化であることが判明した。また、その異性体間の活性化自由エネルギーは、約20 Kcal/molであり、アミド結合部が環状内で形成されているため、比較的大きい値を示したものと考えられる。

5. 謝 辞

¹³C 固体NMR (CP/MAS) スペクトルの測定に御協力下さった日本ブルカー社(株)の恵良田氏に感謝致します。

○文 献

- 1) T. Taga, et al., Acta Cryst., C43 751 (1987)
- 2) T. Kino, et al., J. Antibiotics, (accepted)
- 3) H. Tanaka, et al., J. Am. Chem. Soc., 109 5031 (1987)
- 4) J. A. Hirsch, et al., J. Org. Chem., 40 3547 (1975)
- 5) J. C. Howard, et al., Macromolecules., 6 535 (1973)
- 6) 竹内敬人, ¹Hおよび¹³C NMR概説, 化学同人, P199 (1986)
- 7) C. Piccinni-Leopardi, et al., Can. J. Chem., 55 2649 (1977)

酸素を含有した C_6F_6 及び $C_6H_4(CF_3)_2$ の ^{19}F nmr の研究

(三菱製紙感研・京都産大*・立命館大²) の山本京之介・
遠藤一央・門良一*・鈴木啓三²

^{19}F NMR Relaxation and MO Studies of Interaction between Fluorocarbon and Oxygen

Kyonosuke Yamamoto, Kazunaka Endo, Ryoichi Kado* and Keizo Suzuki^a
(R&D Laboratory for Photo materials, Mitsubishi Paper Mills, *Faculty of Science, Kyoto Sangyo University and ^aFaculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University)

^{19}F Relaxation of C_6F_6 and $C_6H_4(CF_3)_2$ involving paramagnetic oxygen can be explained by dipolar electronic spin-nuclear spin interactions modulated by translational diffusion. The fluorocarbon-oxygen interaction system interpreted in terms of the diffusion model may correspond to a weak charge transfer interaction between solvent molecule and oxygen, since a downfield ^{19}F contact shift induced by paramagnetic oxygen will be observed for fluorocarbons. The spin density on the fluorine of C_6F_6 will be well reproduced by the UHF CNDO MO calculation. The positive spin density on oxygen is transferred onto ^{19}F nucleus of C_6F_6 by the spin delocalization mechanism through the CT interaction.

1975年の人工血液のシンポジウム(米国での)以来、フルオロカーボンを利用した人工血液の研究開発や製品化が活発に行われている。これはフルオロカーボンが水に比べて30倍、有機溶媒に比して3~5倍位も、酸素を含有することが出来るからである。著者らは、フルオロカーボンの例として C_6F_6 及び $C_6H_4(CF_3)_2$ を選り、酸素及び窒素を含有させて、 ^{19}F nmr の T_1 を測定し、又理論的には RHF 及び UHF CNDO 法を用いて $C_6F_6 \cdots O_2$ の MO 計算を試み、その相互作用の本質を明らかにする。現在までに ^{19}F nmr 法により Delplace^{21a} 等は、 $C_6F_6 \cdots O_2$ の分子間相互作用を T_1 測定から complex 形成による specific binding と結論し、Parham^{21b} 等は perfluorocalicin $\cdots O_2$ などの T_1 測定から steric effect が重要であると述べているが、両者共 Solomon Bloembergen の式から議論している。又最近では、非経験 MO 法²² により $CF_4 \cdots O_2$ 等の相互作用を計算し、安定な相互作用型として $F-C(F) \cdots O_2$ (CF_4 の C_3 軸に O_2 が存在)を指摘している。ここでは ^{19}F nmr の周波数依存性から相互作用の動的モデルを明確にし、MO 計算から相互作用の型を考える。

実験方法

NMR は、 ^{19}F の周波数で 10~55 MHz を測定した。電磁石は JM 360、パルサーは マック-7600 (プログラミング 760)、プログラマーは自作のものを使用し、測定は 25°C で行った。 T_1 は、180°- τ -90°パルス法で測定した。更に 250 MHz nmr で T_1 及びコンタクトシフトを測定する。試料 C_6F_6 及び $C_6H_4(CF_3)_2$ は真空脱気してから用いた。 ^{19}F nmr の測定前酸素及び窒素を含有させる為、 O_2 及び N_2 ガスを各試料に 3~5 分、バブリングした。 $C_6F_6 \cdots O_2$ の CNDO 法による MO 計算は MELCOM 70/50 で行った。

結果及び考察

1) 1F NMR による動的解析

常磁性物質を含む

溶媒分子の核の緩和に対する式は

(a) 並進拡散が支配的な場合 (4) と

(b) コンプレックスを形成して拡散する場合 (5) とに分けられる。

この核緩和が核スピン-電子スピンの双極子双極子相互作用により支配的に特徴づけられる時、スピン格子緩和 T_1 に対し簡略化した式は、次の様に与えられる。

$$(1/NT_1)_{theo} \approx (1/N)(1/T_{1NE})_{dip} = B[3j_d(0) + 7j_d(\omega_s)] \quad (1)$$

for case a, and

$$(N_0/NT_1)_{theo} \approx (N_0/N)(1/T_{1NE})_{dip} = B[3J_d(0) + 7J_d(\omega_s)] \quad (2)$$

for case b, where B and B' are constants including γ_N, γ_e , etc, and where

$$j_d(\omega_s) = (15/2)I(u) \quad (3)$$

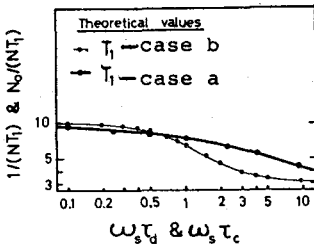
$$I(u) = u^{-6}[u^2 - 2 + \exp(-u)(u^2 - 2) \sin u + (u^2 + 4u + 2) \cos u] \quad (4)$$

$$u = |\omega_s \tau_d|^{1/2} \quad (5)$$

$$J_d(\omega_s) = \tau_c / (1 + \omega_s^2 \tau_c^2) \quad (6)$$

この式(1),(2)を数値計算し、周波数に対し対数プロットすれば下図の様になる。従って緩和時間の周波数依存性を調べれば、どちらの拡散機構に属するか決定できる。

表 I には C_6F_6 及び $C_6H_4(CF_3)_2$ の T_1 を示した。これらを式(1),(2)によってシミュレーションすると、上図に示す様に並進拡散が支配的な場合(a)に非常に良く一致している(ただし



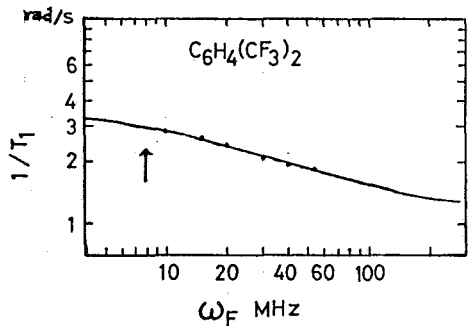
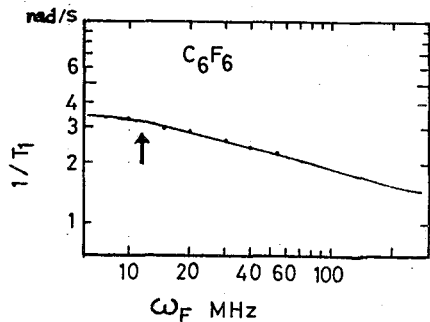
$$B = (16\pi N \gamma_F^2 \gamma_e^2 h^2 \tau_d / 225 d^3) \text{ である。}$$

解析の結果、 $C_6F_6 \cdots O_2$ 系では、 τ_d (並進拡散による相関時間) $\approx 2.0 \times 10^{-11}$ 秒; d (O_2 の F への最近接距離) $\approx 2.8 \text{ \AA}$ 又 $C_6H_4(CF_3)_2 \cdots O_2$ の系では $\tau_d \approx 2.8 \times 10^{-11}$ (秒) 3.2 \AA 又 3.8 \AA を得た。得られた d は F 及び O の van der Waals 半径の合計 4.05 \AA と共有結合半径の合計 2.6 \AA に比較すると後者に近いことが分り、相互作用の存在を示唆しているように思われる。

Table I: Frequency Dependences of Fluorine T_1 of Fluorocarbons Containing Nitrogen and Oxygen at 25°C.

T_1 [s]	freq. MHz					
	10	15	20	30	40	55
C_6F_6 Solvent						
$T_1(N_2)$	12		12			12
$T_1(O_2)$	0.300	0.330	0.345	0.385	0.410	0.430
$C_6H_4(CF_3)_2$ Solvent						
$T_1(N_2)$	4.0		4.0			4.0
$T_1(O_2)$	0.330	0.350	0.380	0.435	0.460	0.480

The probable error of T_1 is $\pm 3\%$.



ロ) MO法及び F_{nmr} による静的解析

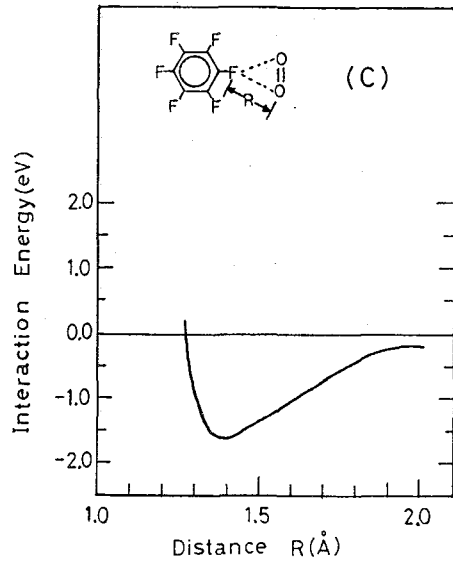
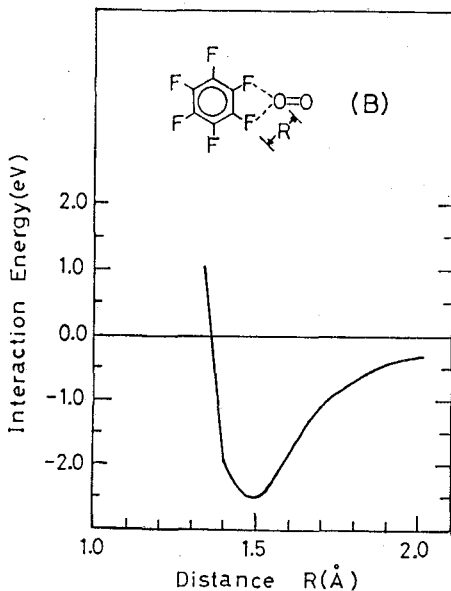
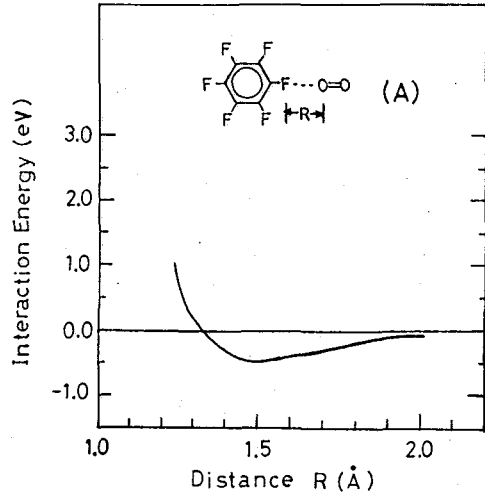
$C_6F_6 \cdots O_2$ の相互作用系に関して、 $O_2 (S=0)$ としCNDO法を用いて、三種類の相互作用型 (A, B, C) のついで、分子間距離を変えて計算した。

・各相互作用型における相互作用エネルギー

相互作用エネルギー ΔE は

$$\Delta E = E_{\infty} - E \text{ で表わした。}$$

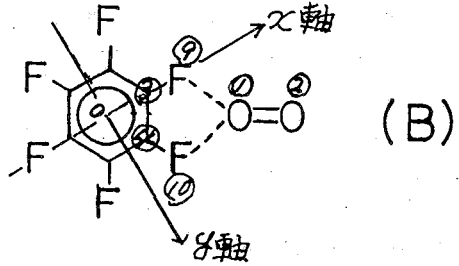
各相互作用型の分子間距離に対する相互作用エネルギーは右図及び下図二者を示した。相互作用型から分かるように、A型…F原子と酸素分子が直線的に近づいた時は、他の相互作用型B, Cに比べて安定化しにくいことが理解できる。非経験MO法でも、A型に近い直線型 $F-C-F \cdots O_2$ では、反発の安定化領域が存在しないと報告している。³⁾ ポテンシャル曲線から、B型の相互作用が最も安定化することが分かる。この三者の中で具体的にB型が分子間の反発も少ないと考えられる。



・相互作用型における電子密度の変化

各相互作用型で、直接 O_2 分子と相互作用したF原子では、その電子密度は、減少しているのに対し、他の原子は、増減の両傾向を帯びる。A及びB型では O_2 内に電荷の偏りが生じている。次頁には、B作用型の電子密度の増減を表にした。(R=1.5Åの安定点)

	electron density isolated	change of electron density interaction	
		S=0	S=1
1O	6.000	-0.089	+0.048
2O	6.000	+0.320	+0.102
3C	3.843	-0.020	-0.023
4C	3.843	-0.020	-0.023
9F	7.157	-0.065	-0.041
10F	7.157	-0.065	-0.041



• C_6F_6 の F の低磁場側コンタクトと UHF CNDO 法によるスピン密度との相関
 著者らは C_6F_6 の F の低磁場側コンタクトをまだ実験していないが、Delpuech^{2) a)} 等によれば 25°C で低磁場側コンタクトとして -0.13 ppm を観測している。これは O_2 分子による F 核に正のスピン密度を生じさせている。そこで $S=0$ での $C_6F_6 \cdots O_2$ 相互作用型の極小法での UHF CNDO 法の計算を行った。右図には、B 型での座標系を又右表には $R=1.5\text{\AA}$ での計算結果を示した。(ただし相互作用エネルギーは 1.20 eV であった。) 右表の各原子の軌道におけるスピン密度を見ると、酸素の正のスピン密度がスピン delocalization による F 核の $S(10)$ に正のスピン密度を誘起していることが分かる。更に詳しく検討中。

Spin Density $S=1$

	isolated	interaction
10s	0.000	-0.001
10x	0.000	+0.192
10y	0.500	+0.573
10z	0.500	+0.181
20s	0.000	-0.000
20x	0.000	+0.019
20y	0.500	+0.059
20z	0.500	+0.816
9Fs		+0.013
9Fx		+0.001
9Fy		+0.065
9Fz		+0.001
10Fs		+0.013
10Fx		+0.036
10Fy		+0.030
10Fz		+0.001
9Fy-10y		+0.194
10Fx-10x		+0.092

References

1. Symposium on Artificial Blood, Fred. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 34, 1428 (1975).
2. a) J.-J. Delpuech, M. A. Hamza, G. Serratrice and M.-J. Stébé, J. Chem. Phys. 70, 2680 (1979). b) P. Parhami and B.M. Fung, J. Phys. Chem. 87, 1928 (1983).
3. a) H. G. Mack and H. Oberhammer, J. Chem. Phys. 87, 2158 (1987). b) P. Ruelle and C. Sandorfy, Theor. Chim. Acta 61, 11 (1982). c) S. Oikawa, M. Tsuda and K. Nagayama, ibid, 64, 403 (1984).
4. a) H. Pfeifer, Ann. Phys. 8, 1 (1961). b) P. S. Hubbard, Proc. R. Soc. London, Ser. A, 291, 537 (1966).
5. I. Solomon and N. Bloembergen, J. Chem. Phys. 25, 261 (1956); I. Solomon, Phys. Rev. 99, 559 (1955).
6. K. Endo, I. Morishima and T. Yonezawa, J. Chem. Phys. 67, 4760 (1977); K. Endo, J. Phys. Chem. 84, 300 (1980).

シクロヌクレオシドの ^{15}N -NMRスペクトル

(理研) 鷗沢 海, 安齊謙太郎

 ^{15}N NMR Spectra of Cyclonucleosides

Jun uzawa and Kentaro Anzai

(The Institute of Physical and Chemical Research)

^{15}N NMR spectra of cyclonucleosides related to adenosine were taken to investigate how the structural modifications were reflected to ^{15}N chemical shifts and long-range N-H coupling constants. The position of acylation to an amidine nucleoside was found to be imino rather than amino group. Selective NOE between ^1H and ^{15}N was observed. An evidence for inhibition of free rotation of the C6-N⁶ bond was presented.

1 序

我々は昨年度の本討論会において、アデノシン関連化合物の ^{15}N -NMRスペクトルと構造について報告した¹⁾。これを要約すると(1) ^{15}N -NMRスペクトルの測定にはINEPTを基本にした手法を使い、選択的に ^1H を照射して帰属の正確さを計ると共に、化学シフトとスピン結合定数を同時に得た。(2)アデノシンのN1に置換基を導入した場合 $\text{>N} \rightarrow \text{O}$, $\text{>N}^+ - \text{OR}$, $\text{>N}^+ - \text{R}$, $\text{>N} - \text{R}$ の順に高磁場シフトする。いずれの場合もスピン結合定数の絶対値はアデノシンの場合に比べて小さくなる。

N-O形の化合物の化学シフトはアデノシンと変わらず酸素の位置がわからないが、スピン結合定数の絶対値が17Hzから4.9Hzへと大きく変わるのでこれが酸素化の位置を決めるための情報となる。(3)N6への置換基の導入に対するN1, N3への影響は概ね置換基のハメット則に従うようである。

今回はシクロヌクレオシドの ^{15}N -NMRについて報告する。シクロ体になることによって、 sp_3 炭素に結合した ^1H との2ボンドスピン結合定数の絶対値が一般に知られている値(約3Hz以下)よりも大きな値(約5Hz)となった。複数の ^1H とのスピン結合によって ^{15}N シグナルが分裂する場合は、INEPT法ではスピン結合定数を読み間違え易くなるので、オーソドックスなデカップリングを併用した。この時、選択的に ^1H を照射したのでNOEも選択的に観測された。化合物10については従来報告してきた構造式が今回の ^{15}N -NMRスペクトルの検討により訂正された。

2 測定法

測定装置はFX-100に多核種観測装置(10mm管プローブ)、三重共鳴ユニット、ローパワーユニットを付けて使用した。試料は54mgないし280mgをDMSO-d₆約1mlに溶解して測定した。化学シフトは $^{15}\text{NH}_4$ 、 $^{15}\text{NO}_3$ の重水溶液を外部基準とし、 NH_4 のシグナルを0 PPMとした。パルス系列は最も基本的なINEPTで、照射パワー($\gamma \text{H}_2/2\pi$)は全領域を観測するときには1170Hzとし、これに特定の ^1H をデカップリングする場合は三重共鳴ユニットから16Hzで ^1H 共鳴周波数を加えた²⁾。選択的INEPTでは21Hzとした。オーソドックスなデカップリング(^{15}N -LSPD)にはGX-400に5mm管用チューナブルプローブを付けて使用した。

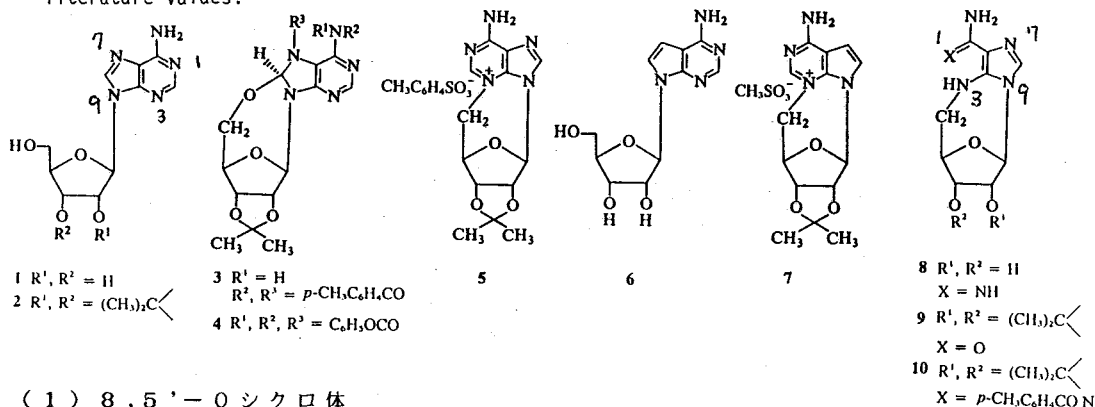
3 結果と考察

7種類のシクロヌクレオシドと3種類の非シクロ体について測定し比較検討した。これらの¹Hおよび¹³C-NMRデータについては既報の文献を参照されたい¹⁾。測定結果を表に示す。

N-15 Chemical shifts and spin coupling constants of cyclonucleoside derivatives in DMSO-d₆.

compound	N1	N3	N7	N9	N ⁶
1	215.3(15.6)	202.6(14.6)	219.5(11.7)	150.3(8.8)	62.5(90.3)
2	217.6(18.6)	204.1(15.6)	222.6(12.7)	151.7(8.8)	63.3(90.3)
3	237.1(14.7)	217.5(14.7)		104.5(6.8)	124.6(88.9)
4	239.2(15.6)	217.9(15.6)		101.3(5.9)	(5.9, H-1')
5	219.5	128.7	227.7	158.2	90.8(90.8)
6	211.5(16.6)	204.2(15.6)		135.2(7.8)	-
7	214.8(13.4)	128.9(7.3)		142.5(4.9)	88.2(90.8)
	(7.3, N ⁶ H)	(7.3, H-5)		(4.9, H-7)	
8	76.2(89.9)	31.5(89.8)	230.7(11.7)	174.3	76.8(91.8)
9		30.3(84.0)	232.9(11.7)	165.4	78.8(88.9)
10		37.4(88.9)	230.7(11.7)	166.1	84.2(89.8)

The minus sign for all of the $^2J_{N,H}$ values listed here is quite likely based on the literature values.



(1) 8, 5'-Oシクロ体

4の選択的INEPTスペクトルを第一図に示す。N9に対してH-8とH-1'からそれぞれ4.9Hzのスピ結合がある。H-8もH-1'もsp₃炭素に付いている水素であり、非シクロ体のアデノシン誘導体ではH-1'からのスピ結合は観測されなかったものである。N9の化学シフト101.3PPMは対応するアデノシン誘導体に比べ50PPM高磁場シフトしている。おそらくC8がsp₂からsp₃に変化したためであろう。N1とN3の化学シフトの変化はN⁶へのアシル基による効果で説明され、既報の結果と傾向は似ている。

(2) N3, 5'-0シクロ体
 7の ^{15}N -LSPDスペクトルを第二図に示す。化合物5および7はいずれもN3に電荷を持ち、アデノシンおよび7-デアザアデノシン(ツベルジジン)に比べて、N3は75PPM、N1は7PPM 高磁場シフトしている。 $^1\text{J}_{\text{N,H}}$ は7.3Hzもあり、アデノシンの場合(約2Hz)と比べ異常に大きい。また、N3はH-5'の一つの ^1H と7.3Hz、N9とH-7との $^1\text{J}_{\text{N,H}}$ は4.9Hzと、それぞれ異常に大きな値を示す。H-1'とN9の間では8,5'-0シクロ体の場合と異なり、大きな結合定数は見られなかった。ここで注目されるのは ^1H と ^{15}N の間に選択的なNOEが見られることである。すなわち、第二図に示すように、選択的にデカップリングするパワーでは照射している ^1H に近い ^{15}N シグナルが小さくなっている。H-8をデカップリングするとN9は二重線になったが、強度は小さくなっており、H-1'をデカップリングしたときは三重線のまま強度が小さくなっている。

Fig.1 Selective $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ INEPT Spectra of 4

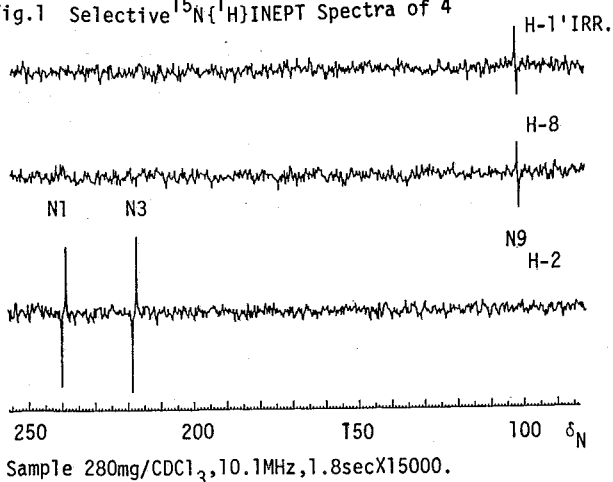
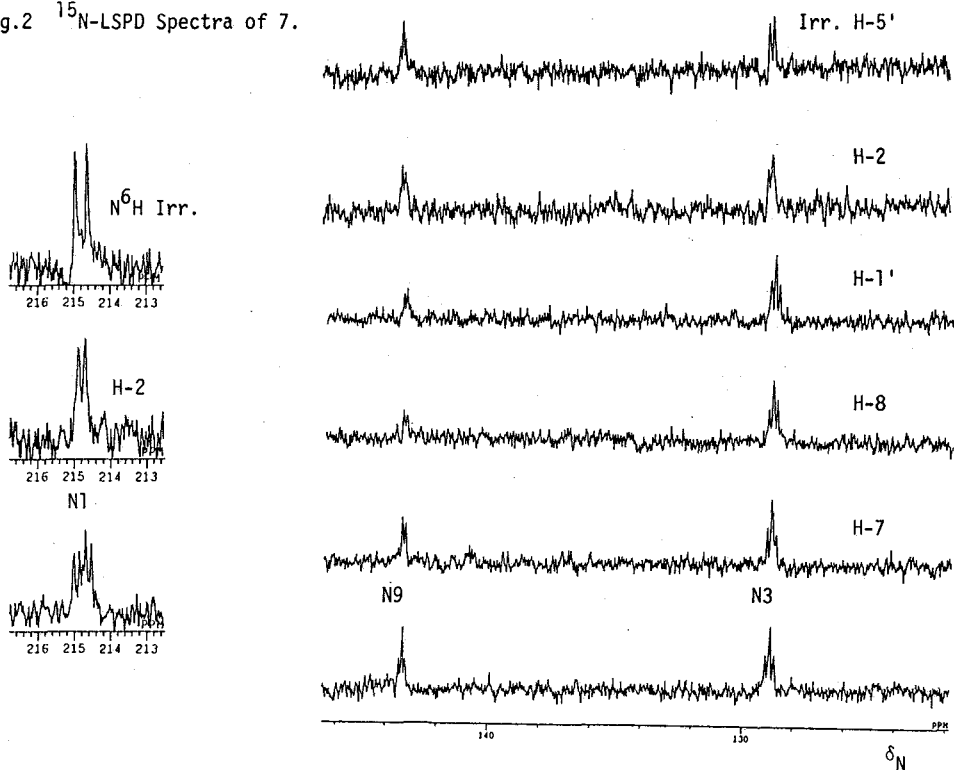


Fig.2 ^{15}N -LSPD Spectra of 7.

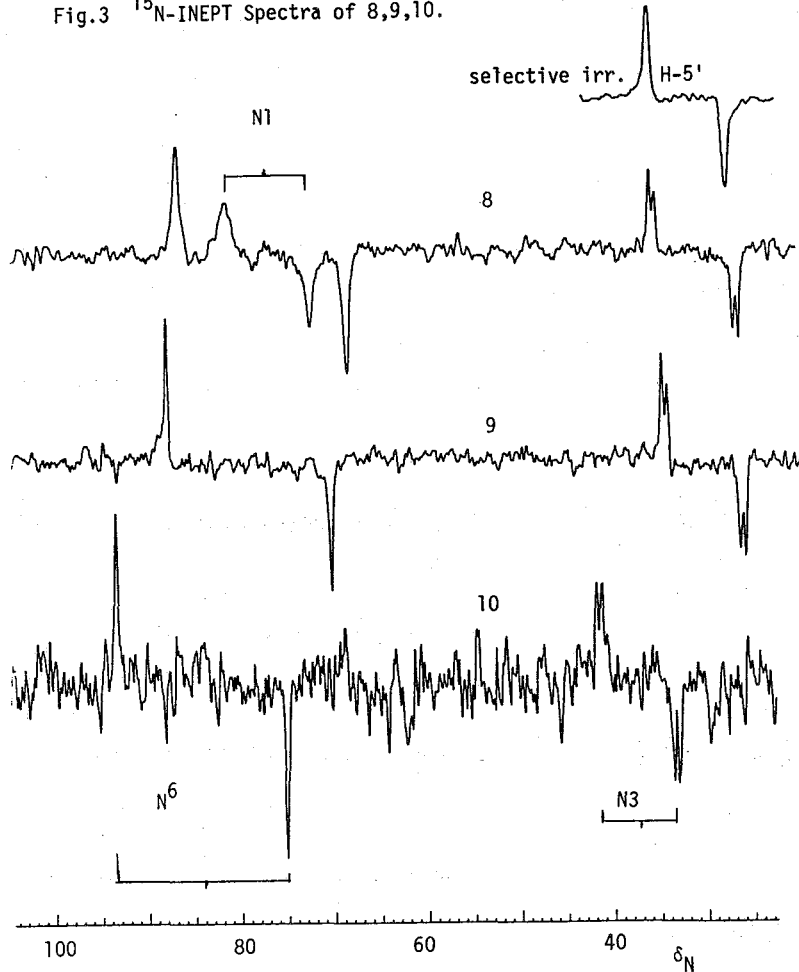


Sample 98mg/DMSO-d6, 40.5MHz, number of accum. 30000(H-1', H-8), 16000(others).

(3) C2の脱離したN3, 5'-Oシクロ体

化合物8~9の ^{15}N -NMRスペクトルを第三図にしめす。N3(アデノシンのナンバリング)は84~90Hzの ^1J の他, 6Hz程度のスピン結合があり, これはH-5'の一つをデカップリングすると消える。8のみ76.2PPMに約90Hzの ^1J をもつシグナルがあり, これはN1に帰属できる。10はパラトルイル基がN'に付いているものと考えられてきた。その根拠は ^1H -NMRでNHらしきシグナルが1.7PPM離れてあったからである。今回の ^{15}N -NMRによって, N'に帰属した84.2PPMのシグナルは8や9と同じく三重線になる(INEPTでは2倍の J)92.3Hzの ^1J を持っている。したがって, 今回図のように訂正する。なお, シクロヌクレオシドではしばしばN'の NH_2 基の ^1H シグナルが離れて観測される。これは温度を上げると一本になる傾向がある。

Fig.3 ^{15}N -INEPT Spectra of 8,9,10.



文献

- 1) J. Uzawa and K. Anzai, 第25回NMR討論会(1986). Can. J. Chem., 65, (1987), in press.
- 2) W. Stadel, P. Bigler and W. von Philipsborn, Org. Magn. Reson., 16, 170(1981).
- 3) J. Uzawa and K. Anzai, ibid, 63, 3537(1985).

セルロース アセテートの ^1H 及び ^{13}C -NMRスペクトル帰属
の戦略

(北大理・花王和歌山1研*)○加藤 徹*・伊倉光彦・
引地邦男

Strategy for the assignments of ^1H and ^{13}C -NMR spectra of cellulose acetate
Tohru Katoh*, Mitsuhiro Ikura, Kunio Hikichi

(Faculty of Science, Hokkaido University and *Wakayama Research Laboratories,
Kao Corporation)

The NMR spectra of cellulose acetate (CA) were assigned and distribution of
substituent was determined. The strategy is as follows. (1)The ^1H and ^{13}C NMR
spectra of peracetylated cello-oligosaccharides were assigned completely with
various two-dimensional (2D) NMR methods and the chemical shifts of tri-
acetylglucose residue were determined. (2)The ring ^1H signals of diacetyl and
mono-acetylglucose residues of CA were assigned by various 2D NMR. (3)From
the comparison of the observed spectrum with the simulated one the
distribution of substituent was determined.

はじめに

セルロース アセテート(CA)は置換度(DS)により著しく異なった物性を示すため、そ
れを正しく知ることはCAの物性を研究する上で非常に重要である。置換度が3より小
さいCAは、1種類の三置換グルコース残基、3種類の二置換グルコース残基、3種類の一
置換グルコース残基と全然置換されていないグルコース残基の合計8種類のグルコース
残基からなるコポリマーと考えられ、これらのグルコース残基の比率によって全置換度
が同じであっても物性が異なることが考えられる。本研究はNMRを使って、それぞ
れのグルコース残基の定量をすることを目的としスペクトルの帰属を行なった。最初
からCAを直接調べるのはスペクトルがブロードかつ複雑で困難なため、セロオリゴ糖 per-
アセテートについて2次元NMRを用いて絶対的な帰属を行ない、それをもとに三置換
グルコース残基の化学シフトを決定し、次にこの結果を参考にしながらCAの2次元ス
ペクトルから二置換グルコース残基、一置換グルコース残基を帰属した。最後に、得
られた帰属をもとにスペクトルのシミュレーションを行ない実測のスペクトルとの一致を
検討し、置換基分布の定量化を試みた。

実験

セロオリゴ糖はセルロースを酸加水分解した後、活性炭のカラムクロマトグラフィー
で分離した。per-アセチル化はピリジン中、無水酢酸で行ない、エタノールで再結晶し
て精製した。 ^1H -NMRから生成物は β -体だった。セルロース アセテートは旭化成製
のものを用いた。 ^1H -NMRスペクトルは試料20mgをDMSO- d_6 0.5mlに溶解したものを、
 ^{13}C -NMRは100mgを溶解したものを日本電子製GX-400またはGX-500を用いて測定した。
 ^1H -NMRスペクトルのシミュレーションは日本電子製COMICで行なった。

結果と考察

1. 三置換グルコース残基の帰属

・・・セロテトラオース per-アセテートのスペクトル解析・・・

(1) リングプロトンの帰属

セロテトラオース per-アセテートは還元末端 R、2つの内部残基 I(1)、I(2)、非還元末端 N の4個のグルコース残基が1,4-グルコシド結合してできた四糖である。セロテトラオース per-アセテートのリングプロトン領域のNMRスペクトルには1位プロトンに由来する4つのダブルットが現われる。いま仮にこれらのピークを低磁場側から順に A-1, B-1, C-1, D-1 と名付け、それぞれ糖 A, B, C, D の1位プロトンとする。これらのピークからのJカップリングによるつながりをCOSY (図1)及びMultiple Relayed COSY

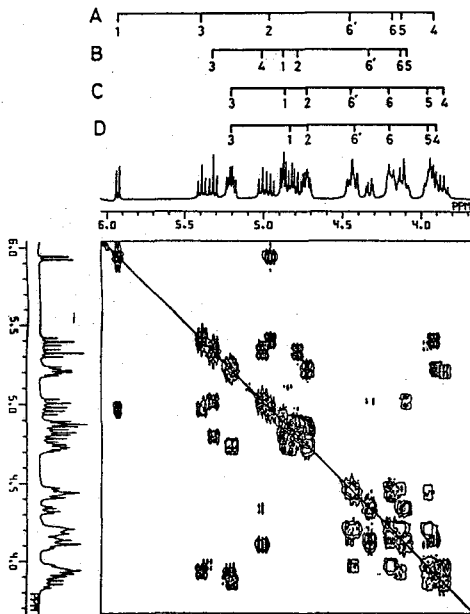


Fig. 1 COSY spectrum of cellotetraose per-acetate

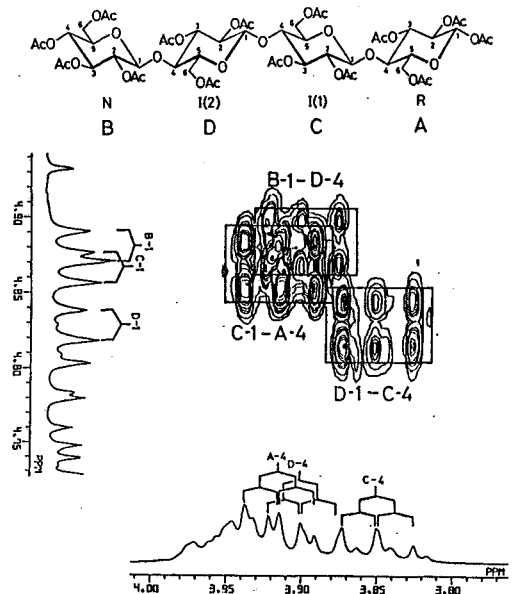


Fig. 2. Long-range COSY spectrum of cellotetraose per-acetate.

で調べることにより糖A~Dの1位から6位プロトンが帰属できた。しかし現段階では糖A~Dがどの残基に相当するのかわからないため、long-range COSYスペクトルを測定した。

Long-range COSY 糖環のつながりはlong-range COSYスペクトルから求めた²⁾。グルコシド結合を介した1位と4位のプロトン間には約1Hzの long-range coupling が存在し、これを観測すれば糖と糖のつながりがわかり、それぞれの残基への帰属が可能である。図2はセロテトラオース per-アセテートのlong-range COSYスペクトル ($\Delta = 250$ msecとした) の1位プロトンと4位プロトンの相関ピーク部分を拡大したものである。A-4とC-1、C-4とD-1、D-4とB-1の間にクロスピークが見られるので、糖A, B, C, Dはそれぞれ順に糖残基R, N, I(1), I(2)に帰属できた。

(2) アセチル基のカルボニル炭素とメチルプロトンの帰属

Long-range ^{13}C - ^1H COSY 糖のアセテートのアセチル基のメチルプロトンはリングプロトンとスピン系が分離しているため、その帰属は困難である。従来、その帰属にはメチル基を選択的に重水素置換したサンプルを合成したり²⁾、水酸基の反応性のちがいを利用するなどの経験的な方法がとられてきた³⁾。そこで我々は2次元NMRを使って絶対的に帰属することを試みた⁴⁾。アセチル基のカルボニル炭素はリングプロトンと2~3Hz、メチルプロトンと約7Hzでそれぞれ long-range coupling している。リングプロトン領域のシグナルは既に帰属しているため、これとの相関からカルボニル炭素の帰属をおこない、つぎにカルボニル炭素とメチルプロトンとの相関からメチルプロトンを帰属した。通常の ^{13}C - ^1H COSY のパルスシーケンスにおいて $\Delta_1 = \Delta_2 = 204\text{msec}$ とすることで両方の相関ピークを同時に観測することができた(図3)。

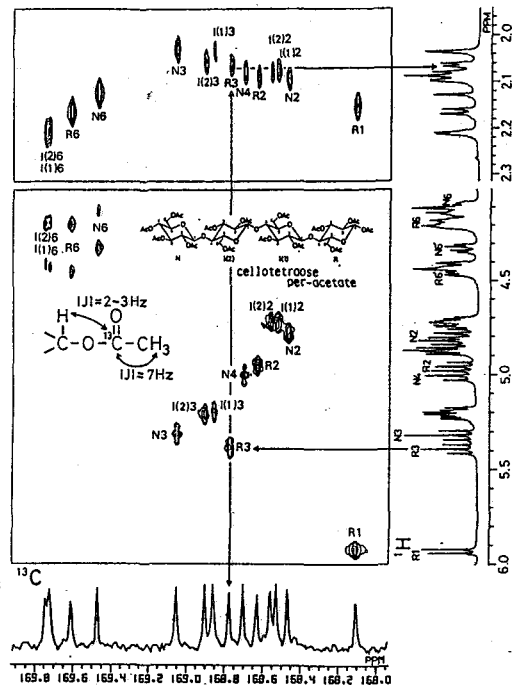


Fig.3. Long-range C-H COSY spectrum of cellotetraose per-acetate (carbonyl region)

(3) リング炭素の帰属

リング炭素のシグナルは先に帰属したリングプロトンとの相関を ^{13}C - ^1H COSY スペクトルから決定した。

(4) アセチル基のメチル炭素の帰属

アセチル-メチル炭素のシグナルはCH-COSY法によりメチルプロトンとの相関から決めた。

このようにして絶対的に帰属したセロテトラオース per-アセテートの内部残基の化学シフトは置換度の大きいセルロース アセテートのメインピークのそれとよく一致しており、これからCA中の三置換グルコース残基のピークが帰属できた。

2. 二置換、及び一置換グルコース残基の帰属

・・・セルロース アセテート(DS=2.46)のスペクトル解析・・・

置換度 2.46のセルロース アセテートのリングプロトン領域のPhase-sensitive double-quantum-filtered COSY、Relayed COSY スペクトル等から9種類の糖環について1位から6位までのピークが帰属できた。その化学シフトとセロオリゴ糖 per-アセテートで求めた結合定数、及び半値幅として20Hzを用いてシミュレーションしたそれぞれの残基の部分スペクトルの一部を図4に示した。上下に示したセロテトラオース per-アセテートの内部残基I(2)のスペクトルとセロトリオースの内部残基Iのスペクトルを比較してみると、アセチル基がはずれることにより全体的に高磁場シフトし、とく

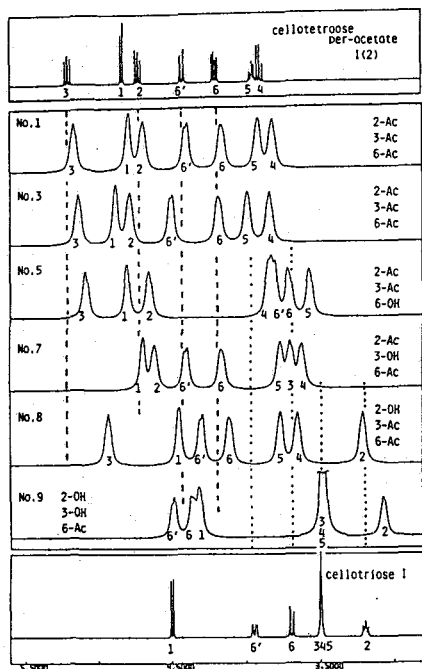


Fig.4. Simulation spectra of glucose residues

に置換位置である2,3,6位は大きく高磁場シフトしていることがわかる。これを考慮に入れて、それぞれの部分スペクトルを図に示したように同定した。たとえばNo.5のスペクトルは2,3位のピークはセルロテトラオース per-アセートの内部残基の化学シフトに近いが、6,6'位のピークはセルトリオースの内部残基のそれに近いので2位,3位のみがアセチル化された残基に由来するものと同定できる。三置換グルコース残基が4種類、2位,3位がアセチル化された残基が2種類存在するのは隣の残基が異なるためと考えられる。

3. 置換基分布の定量

図5に置換度2.46のセルロース アセテートのリングプロトン領域のスペクトルと、求めた9つの部分スペクトルをそれに一致するように足し合わせたスペクトルを示した。その時の比から求めたそれぞれのグルコース残基の含量を表1に示した。

References

- 1) G.Batta and A.Liptak, J.Am.Chem.Soc., 106 (1984) 248-250.
- 2) D.Horton and J.H.Lauterbach, Carbohydr. Res., 43 (1975) 9-33.
- 3) V.W.Goodlett, J.T.Dougherty and H.W.Patton, J. Polym. Sci., A-1, 9, (1971) 155-161.
- 4) Y.Kuramitsu, M.Ikura and K.Hikichi, Rep. Prog. Polymer Phys. Jpn., 28 (1985) 531-543.

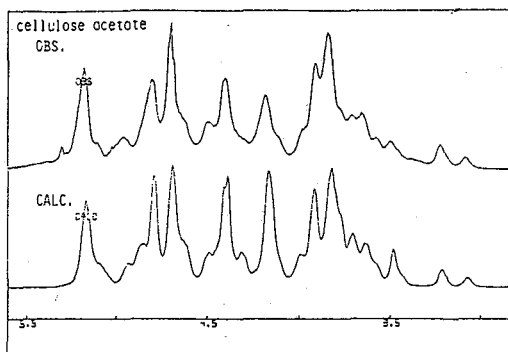


Fig.5. A observed spectrum and a calculated spectrum of cellulose acetate (DS 2.46)

Table 1. The contents of glucose residues of cellulose acetate (DS 2.46)

No.	Residues	Contents (%)
1	2-Ac, 3-Ac, 6-Ac	30
2	2-Ac, 3-Ac, 6-Ac	13
3	2-Ac, 3-Ac, 6-Ac	10
4	2-Ac, 3-Ac, 6-Ac	3
5	2-Ac, 3-Ac, 6-OH	9
6	2-Ac, 3-Ac, 6-OH	4
7	2-Ac, 3-OH, 6-Ac	17
8	2-OH, 3-Ac, 6-Ac	9
9	2-OH, 3-OH, 6-Ac	5
Total		100

異種核間デカップリングと同種核間交差分極の効率

- 多重パルスにおける長時間特性と短時間特性 -

(日本電子・生体研) 藤原敏道・永山国昭

Efficiency of Heteronuclear Decoupling and Homonuclear J Cross Polarization

Toshimichi Fujiwara and Kuniaki Nagayama
Biometrology Lab. JEOL Ltd.

Decoupling sequences have been evaluated, as shown in Waugh's theory¹⁾, with J-scaling factors which characterize the decoupling on a long time scale. The effective bandwidths of low power decoupling, however, have to be determined by cycling sidebands as well as by J-scaling factors when the sampling is not synchronized with the decoupling cycles. We introduced, therefore, a new scaling factor which characterizes the decoupling on a short time scale. Using these two scaling factors, we analyzed typical decoupling sequences. It is also shown that these scaling factors are useful to evaluate the efficiency of homonuclear J cross polarization.

<序> 現在まで数多くの複合パルスやその設計法が開発され、それに基づいていくつものデカップリング用の多重パルスが提案されている²⁾。その用途も、単に¹Hだけでなく周波数帯域の広い¹³Cデカップリングや同種核J交差分極(TOCSY, HOHAHA)への応用と多様化している。

このようなさまざまな目的や異なる実験条件・試料からくる制約(共鳴周波数, デカップリング帯域, J結合定数など)のもとでは、どのようなパルス系列が最適なのか、そして最適化のためにはどのような性能を持ったパルスを作ればよいのか、パルス系列の何を改良したらよいかの問題となる。また一般に、デカップリング・パルスの有効なオフレゾナンス帯域が $2\gamma B_1$ 以上にも及び全パルス巾が長く複雑なため、その全体的な性能の評価・分析は簡単ではない。(例えば、WALTZ-16の全パルス巾は 8640° でそのあいだに35回の位相シフトをおこなう。)

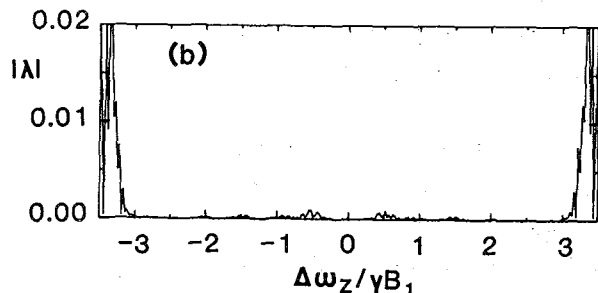
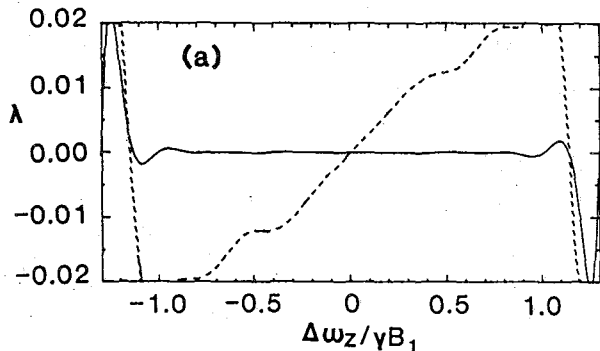


図1 Jスケーリング因子 $\lambda(\Delta\omega_z)$ のオフレゾナンス依存性。

(a) 実線は、WALTZ-16
破線は、MLEV-17。

(b) M4P5F5³⁾。Jスケーリング因子は絶対値を取っている。

今回は、パルス系列が持つ特性を少数のパラメーターで明かにするために、異なった時間尺度でパルス系列を特徴づける2つのスケーリング因子を導入し、典型的なデカップリング・パルス系列の分析をおこなった。また、それらが同種核間J交差分極用のパルス系列の評価にも役立つことを示す。

1 広帯域デカップリング・パルスの効率

広帯域デカップリング・パルスの性能は、デカップリングされたシグナルの残留J結合定数 ($J_{r.o.s.}$) とサイクリング・サイドバンドの大きさで決まる。これらは、それぞれパルス系列の長時間特性と短時間特性を反映したものである。特に低パワーでデカップリングを行いパルス系列の周期が長くなる時、サイドバンドは顕著になる。

1-1 広帯域デカップリング・パルスの長時間特性

これは、デカップリングされた観測磁化の運動のうちJに起因する最大周期の運動によって特徴づけることができ、次のJスケーリング因子で表す。(図1参照)

$$\lambda(\Delta\omega_z) = J_{r.o.s.} / J, \quad (\Delta\omega_z; \text{照射されたスピンのオフレゾナンス周波数})$$

1-2 広帯域デカップリング・パルスの短時間特性

これを特徴づけるために、次のスケーリング因子 $\rho(\Delta\omega_z)$ を導入した。

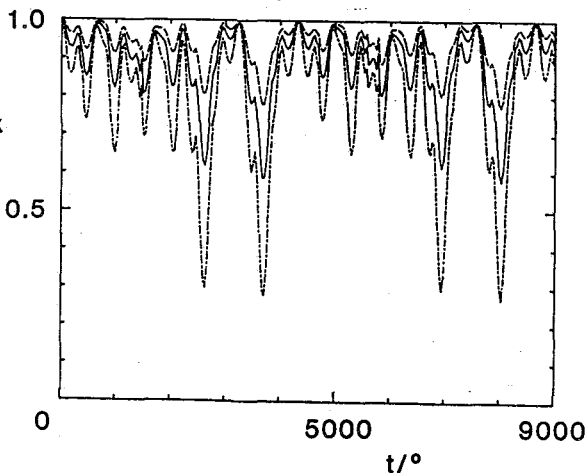
$$\int_0^t [M_0 - M_x(t)] dt \approx \rho(\Delta\omega_z) \cdot (2\pi J / \gamma B_1)^2 \cdot M_0 \cdot t.$$

ここで t はパルス列の1周期で、他の文字の意味は図2と同じである。この因子は完全デカップリング状態 $M_x = M_0$ からどの程度ずれているかの目安をあたえる。図2のようにサイドバンド強度が $(2\pi J / \gamma B_1)^2$ に比例することを利用した。

1-3 デカップリング・パルスの比較

上記2つの因子 $\lambda(\Delta\omega_z)$ 、 $\rho(\Delta\omega_z)$ を用いて ^1H と ^{13}C デカップリングについて、通常 ^1H デカップリングに用いる WALTZ-16 (デカップリング帯域 $2\gamma B_1$) と広いデカップリング帯

図2 WALTZ-16でデカップリングした時のFID。縦軸は熱平衡磁化 M_x で規格化している。時間はフリップ・アングルに換算している。観測シグナルのオフセットは0なので完全なデカップリングの時、 $M_x = 1$ になる。
 破線 $(2\pi J / \gamma B_1) = 0.2\sqrt{2}$
 実線 $(2\pi J / \gamma B_1) = 0.4$
 一点鎖線 $(2\pi J / \gamma B_1) = 0.4\sqrt{2}$
 照射されたスピンのオフレゾナンスは 2kHz 。 $\gamma B_1 / 2\pi = 10\text{kHz}$ 。



域を持つM4P5F5 (デカップリング帯域 $6\gamma B_1$)³⁾ を比べてみる。ただし¹Hの帯域は4 kHz, ¹³Cの帯域は20 kHz, $J = 200$ Hzで、全サイドバンド強度は3%以下、デカップリングされたシグナルの線巾は1 Hz以下となる条件で比べる。

ア) ¹Hデカップリングに必要な B_1 強度。

	デカップリング帯域からの要請	サイドバンドからの要請	必要な強度
WALTZ-16	2 kHz	1.3 kHz	2 kHz
M4P5F5	0.7 kHz	3 kHz	3 kHz

イ) ¹³Cデカップリングに必要な B_1 強度。

	デカップリング帯域からの要請	サイドバンドからの要請	必要な強度
WALTZ-16	10 kHz	1.3 kHz	10 kHz
M4P5F5	3.5 kHz	3 kHz	3.5 kHz

このように、¹Hデカップリングの場合、サイドバンドに関する制限のため、振動磁場強度はWALTZ-16の方が小さくできる。しかし、¹³Cのような大きな周波数帯域の場合、必要な B_1 はその帯域で決まりM4P5F5が有利になる。このような分析より、与えられた J とデカップリング帯域からどのようなパルス系列が最適なのかを明かにできる。

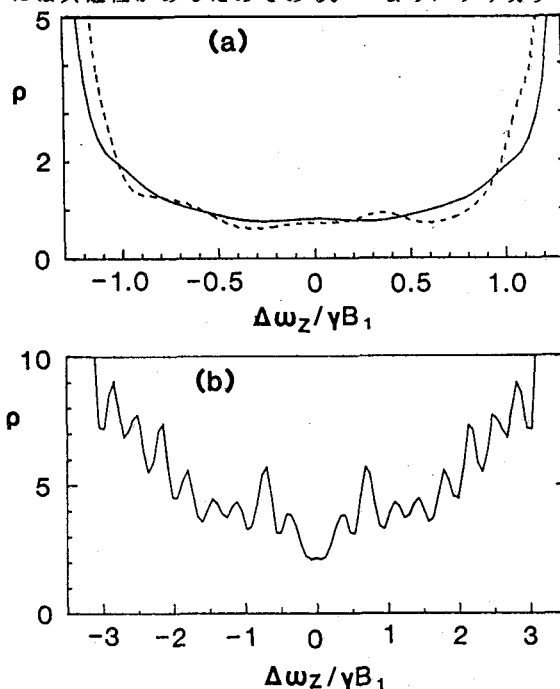
2 同種核間 J 交差分極の効率

この交差分極は、回転座標系でオフレゾナンス (化学シフト) の影響を消去し、完全な J スカラー結合を用いてスピン間の磁化移動を行う方法である。

この交差分極を行うためには、やはりデカップリング・パルスが有効である。これは、同種核間 J 交差分極と異種核間デカップリングには共通性があるためである。つまり、デカップリングの場合には、あるパルス系列の照射によって J で分裂した同種核スピンの、区別なく同じように回転していれば、実質的な異種核間 J 結合の影響はなくなり観測スピンはデカップリングされていることになる。一方、交差分極の場合には、化学シフトで分裂したスピンがあるパルス系列のもとで同じように回転していれば、化学シフトによる分裂の影響はなくなるが、スカラー量である同種核間 J 結合は残りそれによる交差分極がおこる。

図3 サイドバンドのためのスケールリング因子のオフセット依存性。

- (a) 実線は、WALTZ-16
破線は、MLEV-17
(b) M4P5F5



交差分極の効率は、 B_1 の大きさに比べオフレゾナンスの大きさが十分小さい時、最大になる。オフレゾナンスの影響でその効率がどのように低下して行くかを考えてみる。このために平均ハミルトニアン理論などを用いた近似を行うと、2-スピン系について次のようになる。

$$\mathcal{H}_{eff} \approx -\Delta\omega_I n_I \mathbb{I} - \Delta\omega_S n_S \mathbb{S} + J' \mathbb{I} \cdot \mathbb{S} \quad |n_I| = |n_S| = 1 \quad (1)$$

$$J' = J \left[1 - 2\rho \frac{(\omega_I + \omega_S)}{2} \cdot \left((\omega_I - \omega_S) / \delta B_1 \right)^2 \right] \quad \Delta\omega_I - \Delta\omega_S \approx \int_{\omega_S}^{\omega_I} \lambda(\Delta\omega_2) d\omega_2 = d$$

ここでハミルトニアンの第1項と第2項はパルス系列の1周期によるIとSスピンそれぞれの有効な回転を表し、 ω_I と ω_S はスピンの共鳴周波数である。

このハミルトニアンを用いてさらに近似を進めると、スピン間の交差分極の時間依存性は、

$$\frac{1}{2} [\text{tr}(\mathbb{I}_x e^{-i\mathcal{H}_{eff}t} \mathbb{S}_x + \mathbb{S}_x e^{-i\mathcal{H}_{eff}t} \mathbb{I}_x)] \approx \frac{1}{2} \sin\psi \sin\pi\varphi t (\sin\psi \sin\pi\varphi t + \sin\pi\varphi t \cos\pi d t) \quad (2)$$

$$\varphi = \sqrt{J'^2 + d^2} \quad \tan\psi = J'/d$$

のようになる。ただし $e^{i\Delta\omega_I n_I \mathbb{I} / J} \mathbb{I}_x \approx \mathbb{I}_x$, ($|\Delta\omega_I| < |\Delta\omega_S|$) とする。(図4参照)

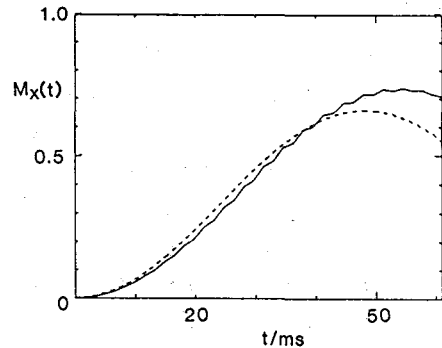
交差分極が有効に働くためには、 $J \approx J'$, ($\Delta\omega_I - \Delta\omega_S$) < J' となる必要がある。

(1)、(2)式からもわかるように、デッカプリング・パルスと同じように $\lambda(\Delta\omega_2)$ と $\rho(\Delta\omega_2)$ で、その効率を明かにできる。デッカプリング・パルス系列MLEV, WALTZの場合、その有効帯域 $(4\rho)^{-1/2} \delta B_1$ は、デッカプリング帯域の1/4になっている。換言すると、これらのパルス系列は、短時間特性 ρ によって有効に交差分極できる領域が決まっているにもかかわらず、それ以上に大きな帯域にわたって長時間特性 λ はよい値を持っている。

このような分析より、交差分極用のパルス系列を作る場合には、次のような改善の可能性が考えられる。必要以上に広い長時間特性のよい帯域を狭くする代わりに、1) 短時間特性をよくする、あるいは、2) B_1 の不均一性など実験条件が不完全でも働くようにする。後者の妥協を行ったのがMLEV-17である。

図4 MLEV-17によるIとSスピン間の磁化移動。 $M_x(t) = ((2)式の左辺)$ 。

実線は、正確な数値計値。破線は、(2)式による近似計算値。ただし、 $\delta B_1 / 2\pi = 10 \text{ kHz}$ 、 $J = 10 \text{ Hz}$ 、IとSスピンのオフレゾナンスは 2 kHz と -1 kHz 。



文献

- 1). J.S.Waugh, J.M.Reson.50.30(1982).
- 2). A.J.Shaka, J.Keeler, Progress in NMR Spectroscopy, 19.47(1987).
- 3). 藤原敏道, 永山国昭, 第25回NMR討論会、東京、(1986).

二次元NMRにおけるゴースト信号の消去法

(日本電子、東大応微研*) ○大内宗城、河野静江、
今成 司、降旗一夫*、瀬戸治男*

The Suppression of Artefacts in Two-dimensional NMR spectroscopy
Munekio Ohuchi, Shizue Kohno, Mamoru Imanari, Kazuo Furihata* and
Haruo Seto*

(JEOL and Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

One cause of artefacts in two-dimensional NMR spectroscopy is, "if the relaxation delay between scans is not longer than the longitudinal relaxation time, T_1 , undesirable signals appear." The components of undesirable signals were calculated by using product operators, and very elaborate phase-cycling procedures have been developed to suppress these artefacts.

<序> 二次元NMRは、構造解析に不可欠の手段となっているが、しかし、二次元NMR法の最大の欠点は、測定に要する時間が一次元NMRに比較して数十倍長いということである。もうひとつの欠点は二次元NMRスペクトル中に不必要なゴースト信号が生じるため、スペクトルの解析が困難になることである。この不必要なゴースト信号は、装置の安定度に依存するゴースト信号より大きな規則的な信号が生じることがある。このゴースト信号はパルス系列の繰り返し時間がサンプルの緩和時間 T_1 より短いときに特に大きくなることがある。この種のゴースト信号はパルス系列の繰り返し時間をサンプルの緩和時間の数倍以上に設定すれば消えるが、しかし、二次元NMRの測定に要する時間が非常に長くなり、現実的にでなくなってしまう。特に、天然存在比の ^{13}C NMRについて孤立した ^{13}C 核の大きな単一線の信号を消し、 $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ のにスピン系の信号のみを観測する INADEQUATE法などでは、測定不可能となることが多い。スペクトルを得るためには、パルス系列の繰り返しを短くしなければならない。この結果、不必要なゴースト信号が生じスペクトルの解析が困難となることがある。

このゴースト信号は1つのパルス系列が終了した後の待時間(繰り返し時間)が緩和時間 T_1 より短いため、次のパルス系列が始まるときにXY磁化成分が残っていることに起因している。単位時間あたりの感度を向上するためには、パルス系列の繰り返し時間を緩和時間とほぼ同程度 (T_1 の1.26倍くらい) に設定する必要がある。しかし、この繰り返し時間ではXYの磁化成分が残ることになる。そこでパルス系列の位相の回し方を工夫した結果、ゴーストを消去する方法を見出した。この結果は、product operatorを用いた結果とも一致した。この位相の回し方を単一線を消す多量子フィルタCOSY法や百分の一の信号を消去するINADEQUATE法等に応用したので報告する。

<実験> 装置はGSX400、GSX270で5mmφC/H dual probeを使用した。サンプルは、市販2-オクタノール、エルスロマイシンをそれぞれ d_6 -アセトン、 d_6 -ベンゼンに溶解し5mmφtubeに入れて使用した。スペクトルは二次元NMRの測定の後、

フーリエ変換を行ない絶対値表示、および、純吸収モード表示を行なった。

<原理および結果> INADEQUATE法および二量子フィルタCOSYでは、単一線の信号を取り除く必要がある。単一線はスピンの孤立し緩和時間が他の信号より一般に長いので、単一線の信号について注目すれば良い。パルスが一個、二個、三個以上のパルス系列の例を取り上げて説明を加える。

1) 単一パルス

磁化 I_z に x 軸より 90° パルスを加えると磁化は $-I_y$ となる。この磁化はこの共鳴周波数 ω なる XY 成分を持って静磁場の方向に回復する。ここで緩和時間 T_1 の数倍の時間を待った後、パルスを加えれば良いが、単位時間あたりの感度を向上させるために通常、緩和時間 T_1 と同程度の繰り返し時間で観測する必要がある。まず x 軸より 90° パルスを加えた後の磁化の XY 成分は $(-I_y \cos \omega t + I_x \sin \omega t) \times \exp(-t/t_2)$ で与えられる。次にこの xy 成分がゼロになるより短い時間に、 x 軸より 90° パルスを加えると、この xy 成分より生じる磁化は、 $-I_z \cos \omega t + I_x \sin \omega t$ となる。この $-I_x \sin \omega t$ が位相ずれを生じる原因となる。通常の Quadrature detection 法においては、 $x, y, -x, -y$ と位相を変化させ信号の積算を行なっている。最終的に、ゴースト成分は $-4I_x \cos \omega t - 4I_z \sin \omega t$ となる。

ここでゴースト信号の総和がゼロとなるようなパルスの位相を考え、その結果は、 $x, y, -y, -x, -y, y, x$ なる位相、 $x, -y, y, -x, -x, y, -y, x$ なる位相および、 $x, y, -x, -y, -x, y, x, -y$ なる位相の三通りが考えられる。

2) 2個のパルス

2個のパルスを使用した二次元相関NMRについても、前述のシングルパルスの場合と同様に考えれば良い。通常 $90^\circ \cdot t_1 - 90^\circ \cdot t_2$ (Ψ は観測の位相) なるパルス系列を使用し、位相を $\phi_1 = x, x, x, x, y \dots, -x \dots, -y \dots$, $\phi_2 = x, y, -x, -y, y \dots, -x \dots, -y \dots$ と16の位相を使用している。このような位相で測定を行なうとゴースト成分 $-I_y \sin \omega t_2$ が残ることになる。これをシングルパルスと同様、 $x, y, -y, -x, -x, -y, y, x$ となる位相の繰り返しを使用することによりゴースト成分をゼロとすることができる。

3) 多量子NMRにおける3個以上のパルス

3個以上のパルス系列には特に重要な測定法である INADEQUATE法および二量子フィルタCOSY法がある。

a) INADEQUATE法の場合、目的のサテライトの信号は消去したいメインピークの信号に比べ約 $1/200$ と非常に小さく、メインピークを消去することが重要な課題となる。INADEQUATE法では、パルスの位相を変えメインピークを消しているが、パルスの繰り返し時間が緩和時間の4倍~5倍でないと不要な信号が現われ、スペクトルの解析が困難となる。図1aは、2-オクタノールを使用し、パルス系列の繰り返し時間3秒として測定した INADEQUATE のスペクトルである。この2-オクタノールの ^{13}C 核の緩和時間 T_1 は5~10秒であった。この INADEQUATE 法は $90^\circ \cdot t_1 - 180^\circ \cdot t_2 - 90^\circ \cdot t_1 - 90^\circ \cdot t_2$ (Ψ) なるパルス系列を使用しており、 $90^\circ - t_1 - 180^\circ - t_2 - 90^\circ$ のパルス系列は、磁化の状態を変

えるものと考え、前述のダブルパルスと同様に処理できる。 ϕ_2 の位相を $x, y, -y, -x, -x, -y, y, x$ と繰り返すことによりゴースト信号をゼロにすることを可能にした。その結果を表1に示した。パルス系列の繰り返し時間を3秒でこの位相回しを使用したINADEQUATEのスペクトルを図1bに示す。このように、新しい位相回しを採用すれば、緩和時間 T_1 以下の繰り返し時間に設定しても、ゴーストの現われないスペクトルが得られる。

図1. 2-オクタノールのINADEQUATEスペクトル

a) $x, y, -x, -y$ の位相

b) $x, y, -y, -x, -x, -y, y, x$ の位相

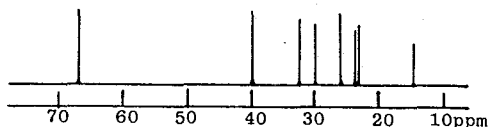
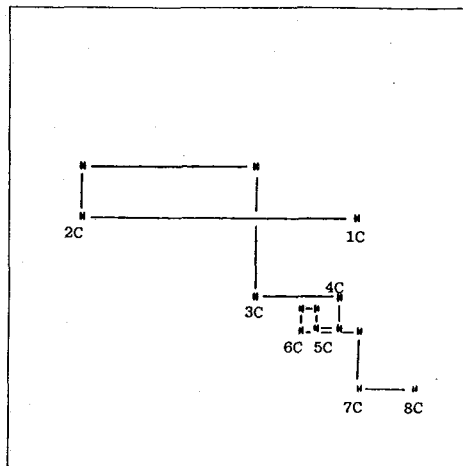
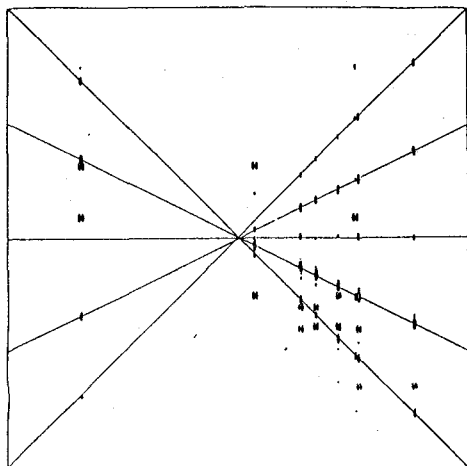


表1 INADEQUATE法の位相と-スピン系の信号の関係

第一パルス系列	第二パルス系列	観測信号	ゴースト信号
ϕ x	ϕ x	$-Iy$	$-Ix C - Iz S$
ϕ x	ϕ y	Iy	$Ix C - Iz S$
ϕ y	ϕ -y	$-Iy$	$-Ix C - Iz S$
ϕ -y	ϕ -x	Iy	$Ix C - Iz S$
ϕ -x	ϕ' -x	$-Iy$	$-Ix C + Iz S$
ϕ' -x	ϕ' -y	Iy	$Ix C + Iz S$
ϕ' -y	ϕ' y	$-Iy$	$-Ix C + Iz S$
ϕ' y	ϕ' x	Iy	$Ix C + Iz S$

($C = \cos \phi t, S = \sin \phi t$)

計 0

0

b) 二量子フィルタCOSY法(DQF-COSY)

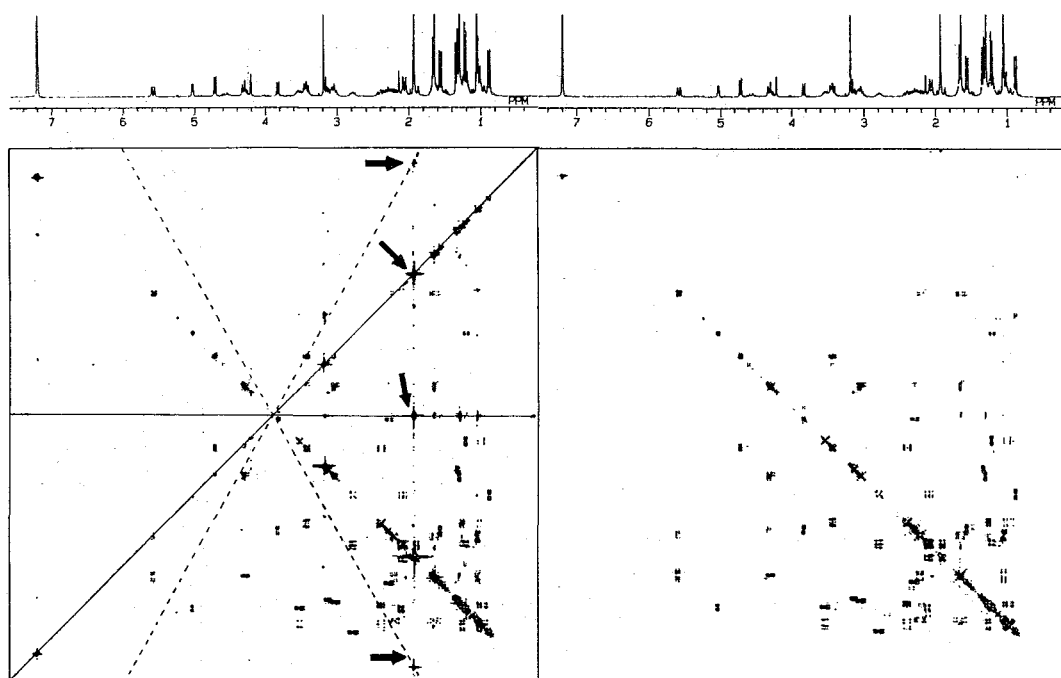
$90^\circ \cdot t_1 - 90^\circ \cdot t_2 - 90^\circ \cdot t_3 - 90^\circ \cdot t_4$ なるパルス系列を使用したDQF-COSY法は単一線を消し、ニスピン系以上の多重線のみスペクトルを得る方法である。この単

一線が完全に消えなければ二次元スペクトル中に不必要なゴースト信号が生じ、スペクトルの解析を困難にする。図 2 a に $\phi_1 = x, x, x, \dots$, $\phi_2 = x, x, x, x, -x, \dots$, $\phi_3 = x, y, -x, -y, x, y, -x, -y, \dots$ として得られたスペクトルを示す。矢印で示したピークがパルス系列の繰り返し時間を緩和時間 T_1 以下で繰り返したために生じた不要なゴースト信号である。図 2 b に $\phi_1 = x, x, x, x, \dots$, $\phi_2 = x, x, \dots$, $\phi_3 = x, y, -y, -x, -x, -y, y, x$, として得られたスペクトルを示す。図 2 b は明らかに不要なゴースト信号はなく、スペクトルの解析が容易にでき誤りのない結果が得られる。前記と同様に product operator を使用すればこの結果を説明でき、図 1 a のときゴースト成分が残り、図 2 b の時はゴースト成分がゼロとなる。

図 2 エルスロマイシンの D Q F - C O S Y スペクトル (純観取モードで表示している)

a) $x, y, -x, -y, \dots$ の位相

b) $x, y, -y, -x, -x, -y, y, x$ の位相



<まとめ> 二次元 NMR 法は構造解析をするため有益な方法であるが、単位時間の感度の向上を計るためには、パルス系列の繰り返し時間を緩和時間と同程度の長さに設定し、測定に要する時間を短縮する必要がある。その時、観測用パルスの位相を $x, y, -y, -x, -x, -y, y, x$ とし、かつ使用するパルス系列の位相回しを工夫することにより不要なゴースト信号の消去に行なった。

参考文献 A. Bax, "Two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids" (1982); O. W. Sørensen et al., Prog. NMR spectroscopy, **16**, 163 (1983); A. Bax, 26th ENC Baltimore USA (1986); M. Ohuchi et al., J. Magn. Reson., **72**, 279 (1987).

Time sharing照射磁場を用いた新しい差スペクトル法

(東大応微研・日本電子*) 降旗一夫、瀬戸治男、大内宗城

New Difference Spectral Method using Time Sharing Irradiation Field

Kazuo Furihata, Haruo Seto and Muneki Ohuchi*

(Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo and *JEOL Co.)

New one dimensional NMR techniques, TSD-COSY and TSD-Relayed COSY, which are based on difference spectral method utilizing time sharing gated decoupling (TSD) as highly selective irradiation field, are proposed. These methods enable to observe coherence transfers of protons in the crowded regions and are superior to selective coherence transfer method with regards to their easier operation and excellent selectivity. Since TSD-COSY and TSD-Relayed COSY facilitate to reveal the proton spin systems connected by small coupling constants, their application to structural analysis of complicated natural products is promising. As an additional application of difference spectral method and TSD technique, a new selective HOHAHA-COSY (2D) will be presented.

はじめに

天然有機化合物の構造解析において、2次元COSY法は非常に多用されている手段である。しかし、シグナルの重なりあった複雑な領域における解析が不可能となる場合がしばしばある。この問題を解決する方法として、我々は1次元NMRではデカップリング差スペクトル法、更にはselective coherence transfer法が優れている事を報告してきた¹⁾。しかし、従来のselective coherence transfer法では、選択的に励起するプロトンが他のシグナルから分離していなければ良い結果を得られなかった。従って、僅かに分離しているプロトンを励起する場合には、非常に選択性の高い励起パルスが要求された。

今回は、励起パルスに代えて、time sharing gated decoupling (以下TSD)を用いたsaturation差スペクトル法を考案し、実験したところ、非常に良い結果を得た。更にsaturation差スペクトル法の発展した手段として、selective HOHAHA-COSY法を考案したので報告する。

方法・原理

saturation差スペクトル法のパルス系列を図1に、TSD-COSY法の原理を図2に示す。TSD-COSYは、2次元基本パルス($90^\circ - t_1 - 90^\circ$)の第1パルスをソフトパルスとし、一つのプロトン(H_A)を選択的に励起する事により、 H_A とスピン結合したプロトンへの選択的なcoherence transfer磁化(H_M)の移動を観測するものである(図2a)。

saturation差スペクトル法の原理は、この方法の逆を行うことである。つまり基本パルスの第1パルスの前で、観測したいプロトンを予め選択的に飽和しておく。

照射磁場のない場合、第1パルス(90°_x)により、すべてのプロトンが励起され、時間と共に分裂していく。観測段階では、transferする磁化はZ軸に、またtransferを受けた磁化はX軸にそれぞれ配向する(図2a)。

一方、選択的に飽和されたプロトン H_A の磁化は、強度が小さくなった状態で測定する事になる。従って、 H_A とスピン結合したプロトン H_M に対するtransfer磁化も飽和によりシグナル強度が減少することになる(図2b)。そこで照射(図2a)と非照射(図2b)の場合の差をとることにより、照射磁場により強度の変化したシグナルのみを選択的に取り出す事が可能となる。

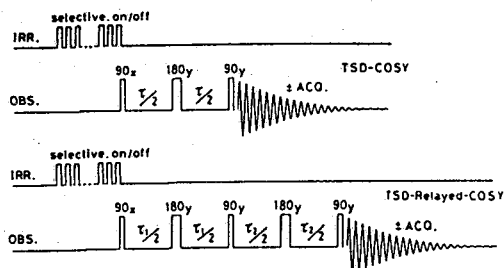


図1. saturation 差スペクトル法のパルス系列(上)。

図2. TSD-COSY法におけるAXスピンの磁化ベクトル展開図(右)。

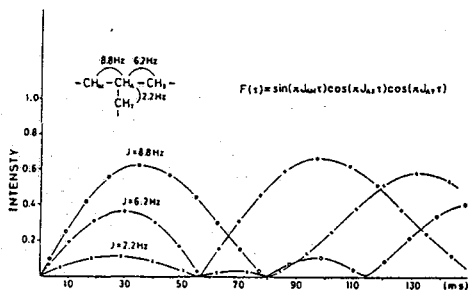
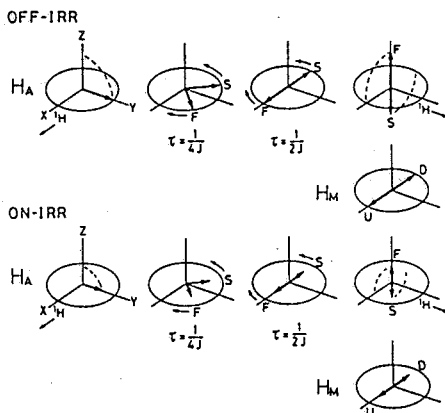


図3. TSD-COSY法 4スピン(AMXY)系、A→M、A→X、A→Yの transfer関数 ($J_{AM}=8.8\text{Hz}$, $J_{AX}=6.2\text{Hz}$, $J_{AY}=2.2\text{Hz}$)。

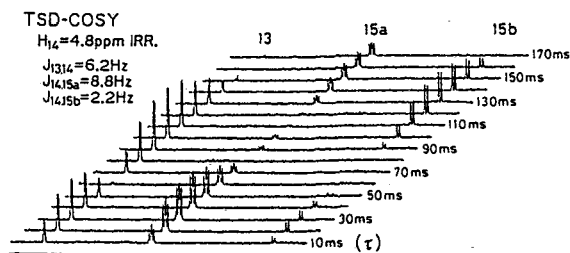


図4. ポートメチン H_{14} に対するTSD-COSYスペクトル。 delay timeを10ms毎に変変。

照射磁場について

飽和磁場として、感度の点で優れている選択的 180° パルス法と、条件設定の容易な gated decoupling法がある。我々は、条件設定が容易で、しかも極めて選択性の高い照射磁場を維持できるTSD法がすぐれている事を明かにしてきた²⁾。この方法では、プロトンの分離が不十分であってもシグナルの一部を飽和することが出来さえすれば、測定が可能になる。照射すべきシグナルが他のシグナルから十分に分離している場合は、そのシグナル全体を飽和するように設定すれば感度は一段と向上する。

展開時間の設定

selective coherence transfer法では展開時間を固定して測定するため、展開時間の設定が非常に重要な因子となる。展開時間はtransferの起こるプロトン間の結合定数と分裂パターンに依存する。2D-Relayed-COSY法に於けるtransfer関数の幾つかが報告されているが³⁾、ここではTSD-COSY法に於ける簡単なスピン結合のtransfer関数を示す。

1個のプロトンとのスピン結合： $F(\tau)=\sin\pi J_{AM}\tau$

2個のプロトンとのスピン結合： $F(\tau)=\sin\pi J_{AM}\tau \cdot \cos\pi J_{AX}\tau$

3個のプロトンとのスピン結合： $F(\tau)=\sin\pi J_{AM}\tau \cdot \cos\pi J_{AX}\tau \cdot \cos\pi J_{AY}\tau$

4個のプロトンとのスピン結合： $F(\tau)=\sin\pi J_{AM}\tau \cdot \cos\pi J_{AX}\tau \cdot \cos\pi J_{AY}\tau \cdot \cos\pi J_{AZ}\tau$

このtransfer関数を計算する事により、最もS/Nの良い最適値を容易に設定する事が可能である。

図3はポートメチンの14位のプロトン($J=8.8\text{Hz}$ 、 6.2Hz 、 2.2Hz)につき、TSD-COSY法

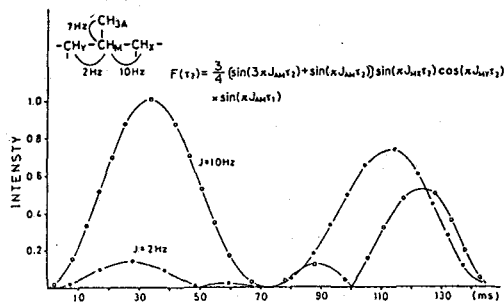
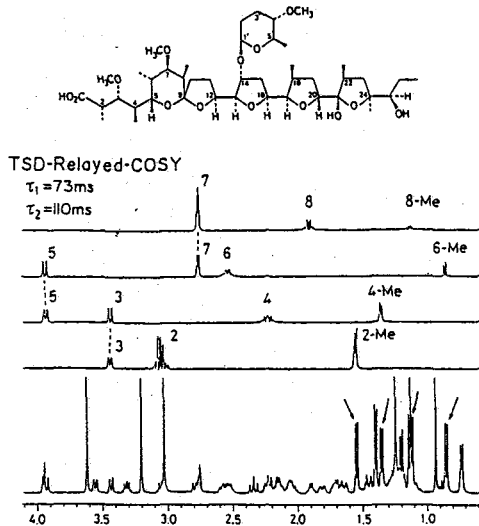


図5. TSD-Relayed-COSY法、6スピン(A₃MX₂)系の A→M→XとA→M→Yのtransfer関数(上)。

図6. ポートミシンのTSD-Relayed-COSYスペクトル。2-Me、4-Me、6-Me、8-Meを照射、τ₁=73ms、τ₂=110ms、γH₂/2π=5Hz (absolute value mode) (右)。



のtransfer関数を示したものである。図4は14位のプロトンにつき、展開時間を10ms

ごとに変化させて測定したTSD-COSYスペクトルである。図3と図4に於て、シグナルの強度の変化が非常によく一致している(13は—●—、15aは—○—、15bは—x—のカーブに相当する)。したがって展開時間を最適値に設定すれば、非常にS/Nの良いスペクトルが得られることが可能であることがわかる。特に2.2Hzのような小さなスピン結合したシグナルに対しても非常に良好な結果を与えることは重要である。

TSD-Relayed COSY法のポートミシンの構造解析への応用

ポリケタイド系物質では、(-CH_Y-CH_M(CH₃)_A-CH_X-)というスピン系が通常多く存在し、J_{MX}=10Hz、J_{MY}=2Hz程度の値を取ってスピン結合していることが多い。従来の方法では、複雑なスペクトルの領域において、2Hz程度の大きさでスピン結合したH_MとH_Yの関係を証明する事は、非常に困難であったため、A-M-Y、或いはY-M-Xの関係がわからないことが多かった。

このようなスピン結合の結びつきを明かに出来れば、多くの抗生物質の構造解析は、容易となるはずである。TSD-Relayed-COSY、あるいはTSD-double Relayed-COSY法はこの問題を容易に解決する手段である。図5は、このスピン系のTSD-Relayed-COSY法に於けるA→M→XとA→M→Yのtransfer関数である。

図5より得た最適値110msをもとに、TSD-Relayed-COSY法をポートミシンに適用した結果非常に良いデータを得ることが出来た(図6)。例えば、2-Meの選択的照射により、2位、3位のプロトンの関係が、同様に4-Meから3、4、5位、6-Meから5、6、7位、8-Meから7、8位のプロトンが観測される。これらのスペクトルから共通に観測された3位、5位、7位を結びつける事により、2-8位までの部分構造が容易に明かとなる。特に8-Meのように他のシグナルと重なりあっている場合でも、選択性を高く設定できる為、測定が容易であることは特筆すべきである。

Selective HOHAHA-COSY

2D-HOHAHAはJ結合で結ばれたプロトンのスピン系の観測を可能とする手段で、複雑な化合物構造解析に極めて強力である。また一次元saturation差スペクトル法への応用も早くから報告されてきた⁴⁾。このHOHAHA法の検討過程で新しい測定法であるselective HOHAHA-COSY法を考案した。

複雑な化合物の2D-HOHAHAスペクトルでは、クロスピークが非常に多く現れ、スベ

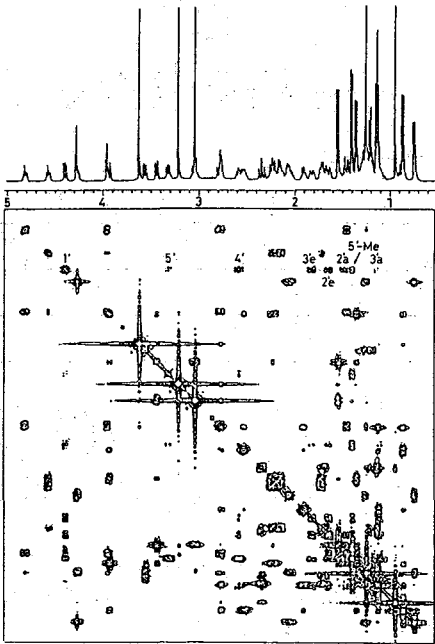


図7. ポートミシン、2D-HOHAHAスペクトル, $\tau=115\text{msec}$ 。

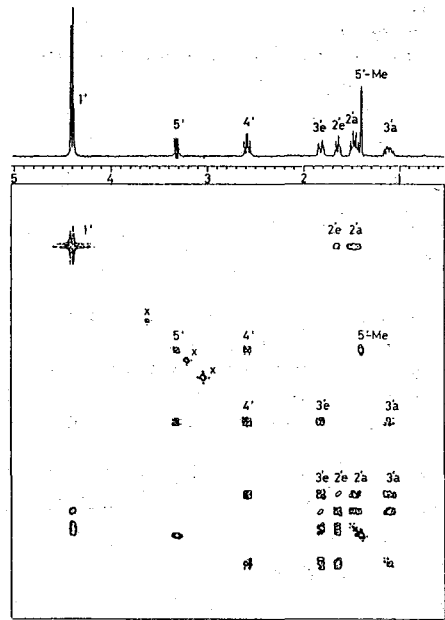


図8. ポートミシン、selective HOHAHA-COSYスペクトル, $\tau=115\text{msec}$ ($H_{1'}$ を照射)。

クトルの解析が困難となる。しかし構造決定に於ては、すべてのクロスピークの関係性を明らかにすることは必ずしも必要ではなく、ある特定のプロトンのクロスピークの解析が出来れば構造が決る場合が多い。そのため、1D-HOHAHAに於てdelay timeを数点可変し、特定のプロトンのみについてクロスピークの関係性を明らかにする方法が提案されている。

それに対し、我々は1D-HOHAHAスペクトルのプロトン-プロトンの関係を二次元展開することにより、特定のプロトンに関するスピン系を容易に明らかに出来ることを見出した(図7、8)。このselective HOHAHA-COSYスペクトルは、2D-COSYスペクトルにフィルターをかけたような特定のプロトンのクロスピークのみを与える方法であり、2D-COSYスペクトルの解析を容易にするという長所を有する。

まとめ

天然有機化合物の構造解析に於て、シグナルの重なりあった複雑な領域を解析する方法の一つとして、TSD-COSY、TSD-Relayed COSY法を開発した。この方法は、softパルス法に比べ条件設定がはるかに容易であり、しかも分離の悪いプロトンに対しても、その一部分のみの飽和による測定が可能である。従って、それだけ照射可能なプロトンの範囲を拡げることになる。またスペクトルが単純化されるために解析が非常に容易となるという長所もある。

文献

- 1) 降旗一夫、瀬戸治男、大内宗城、第24回NMR討論会要旨集、21(1985)筑波
- 2) K. Furihata, M. Ohuchi and H. Seto: Tetrahedron Lett. **28**, 3353 (1987)
- 3) A. Bax, G. Drobny: J. Mag. Reson., **61**, 306 (1985)
- 4) D. G. Davis, A. Bax: J. Am. Chem. Soc., **107**, 7197 (1985)

特 I

NEW TWO-DIMENSIONAL NMR TECHNIQUES

Ad Bax, Laura Lerner, Vladimir Sklenar, Rolf Tschudin, and Daniel Williamson

Laboratory of Chemical Physics, NIDDK, National Institutes of Health
Bethesda, Maryland 20892, USA

Heteronuclear correlation techniques are most sensitive when the nucleus with the highest magnetogyric ratio (usually ^1H) is observed during the detection period of a 2D experiment. This approach can have great advantages over conventional correlation schemes where the low-gamma nucleus (^{15}N , ^{13}C , ^{31}P , etc.) is detected directly. When applied to low-abundance nuclei, one potential problem is the suppression of signals from protons not coupled to the low-gamma nucleus. Suppression of these unwanted signals can be accomplished by selection of the most suitable pulse sequence but also requires high spectrometer stability. For most problems, heteronuclear multiple quantum NMR provides the best means for generating the heteronuclear correlation spectra. However, as will be demonstrated for ^{31}P , in some cases alternative methods can be superior.

The 2D NOE (NOESY) method provides direct information on interproton distances but fails for molecules of intermediate size for which the NOE is near zero. A new method, named ROESY, will be demonstrated that measures the NOE under spin-locked conditions and yields positive NOE values independent of the motional correlation time. Advantages and disadvantages of this method will be discussed.

A new method for generating coherent magnetization transfer between J-coupled spins will be demonstrated. This method is based on the principles of homonuclear Hartmann-Hahn (HOHAHA) cross polarization and can have substantial resolution and sensitivity advantages over conventional COSY and homonuclear RELAY experiments.

Several new methods will be presented that permit the recording of pure absorption 2D NMR spectra in H_2O solution without the need for presaturation. All proposed techniques are of the so called "two-stage" type. In the first stage, a modest level of suppression (30-50) is obtained, sufficient to overcome dynamic range problems in the receiver section of the spectrometer. In the second stage, further suppression is obtained by appropriate phase cycling. Application of the new schemes to NOESY, HOHAHA and ROESY experiments will be demonstrated.

A new technique for the measurement of previously unresolvable scalar couplings in macromolecules will be described. By suppressing all interactions but the coupling of interest in a 2D experiment, it becomes possible to measure the size of scalar couplings that previously were inaccessible, yielding valuable additional structural information. The method is demonstrated for the measurement of ^1H - ^1H and ^1H - ^{31}P couplings in the dodecamer $d(\text{CGCGAATTGCG})_2$.

MEMのNMRへの応用

(阪大産研) ○高井嘉雄 沢田正実 山田 将
 福田房子 田中高紀 花房昭静

Application of Maximum Entropy Method (MEM) to NMR

Yoshio TAKAI,* Masami SAWADA, Hitoshi YAMADA, Fusako FUKUDA,
 Takanori TANAKA, and Terukiyo HANAFUSA

The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University,
 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567, Japan

Determination of chemical shifts of ^{17}O -nmr signals is difficult because of extremely low natural abundance (0.037%) and short relaxation time ($<1 \times 10^{-1}$ sec) of ^{17}O nuclei. These properties provide low reproducibility of ^{17}O -nmr chemical shifts and coupling constants. In order to get these parameters more reproducibly, Maximum Entropy Method is applied to FID data of ^{17}O nmr. The results by MEM are compared with those by FFT method and discussed for 4-substituted pyridine N-oxides and triphenylphosphine oxide.

我々は強い薬理活性を示す $\text{N} \rightarrow \text{O}$ 官能基を有した複素環化合物研究の一部として、置換ピリジンN-オキシドの配位結合酸素原子の ^{17}O -nmrシフトに及ぼす置換基効果について報告してきた¹⁾。一般に ^{17}O -nmrスペクトルは、 ^{17}O 核の四重極緩和や希薄天然存在比(0.037%)のため、S/Nが悪い、ブロードなシグナルを与える。実例として、図-1に4-ニトロピリジンN-オキシド(10% DMSO溶液)の ^{17}O -nmrスペクトルを示した。この系の分子量が100~200と小さな化合物であるにもかかわらず、 $\text{N} \rightarrow \text{O}$ のシグナル半値幅は500~1000 Hzと非常に広い上、S/Nの悪い測定は可能でなかった。さらに、 ^{17}O -nmrのスペ

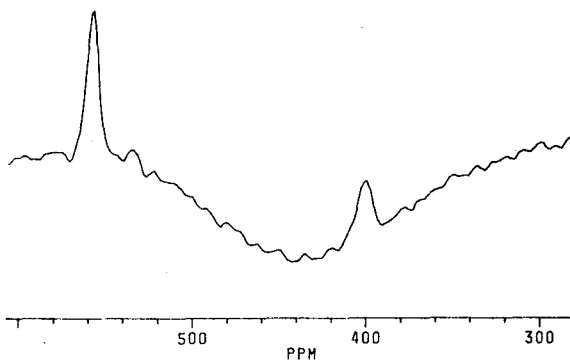


図-1 4-ニトロピリジンN-オキシドの
 ^{17}O -nmrスペクトル

クトルの様にスペクトル領域が広い核種測定の場合、図-1のようにベースラインのローリング現象が特徴的に見られた。この現象はブロードなシグナルの位相調整を一層困難にした。このような状況から再現性のある ^{17}O -nmrシフトを決定することは容易ではないことがわかる。今回、我々は最近注目されている MAXIMUM ENTROPY METHOD²⁾ (MEM)を、このような状況下にあるスペクトル変換法として、 ^{17}O -nmrに応用することにし、いくつかの結果について検討を加えるこ

にした。

(実験及び計算)

試料の置換ピリジンN-オキシド及びトリフェニルホスフィンオキシドは、市販品の再結晶が、置換ピリジンの酸化によって生成したものの再結晶などによって、精製した。測定溶媒としては、ピリジンN-オキシド系は重DMSO、ホスフィンオキシド系は重ベンゼンを用いた。ピリジンN-オキシドのケミカルシフトは溶媒DMSOのシグナルを基準に求めた。 ^{17}O -nmrの測定にはBruker AM360を使用した。 $80^{\circ}C$ 、 10ϕ nmrチューブ使用下、マルチキューブプローブを用い、共鳴周波数 48.82 MHz、パルス巾 $30\mu sec$ (約 90° フリップアングル)、測定データポイント1K、遅延時間 $100\mu sec$ 前後の測定条件を用いた。

測定データは、昨年報告したTASMACシステムに転送され、その後、16ビットパーソナルコンピュータ (Fujitsu 9450A) のBASICAで、以下のMEMなどの処理に利用された。

我々が利用したMEMは、Burgのアルゴリズムのそのを利用した。MEM計算の前に、AD法による測定データの cos 変換を行っている。MEMに使用したデータ点数は平均して128点であり、データのレフトシフト、アポダイゼーションなどが行われ、MEM次数はデータ長の最大半分までを利用した。また、得られた係数からパワースペクトルが計算され、その $\sqrt{\quad}$ をnmrスペクトルとした。

(結果と考察)

4-置換ピリジンN-オキシドのFFT、及びMEMによる ^{17}O -nmrスペクトル結果を図-2に示した。図-2aのFFTの結果はスペクトルのローリングをみかけ上カットするため、また、MEM結果と同等に取扱うため、 $\omega = \omega_0 + \omega_1$ で表示した。一方、3つのMEMスペクトル (図-2b, c, d) は、次数、データ点数、さらにアポダイゼーションなどの諸条件を考慮したものである。

図-2のいづれのMEMスペクトルも、図-2aのFFTスペクトルと比較して歴然とした S/N 比の良さを示している。しかし、3つのMEM結果はMEM処理条件によってスペクトルが大きく変化することを示している。すなわち、データ点数32点を用いた (図-2a) では、FFT

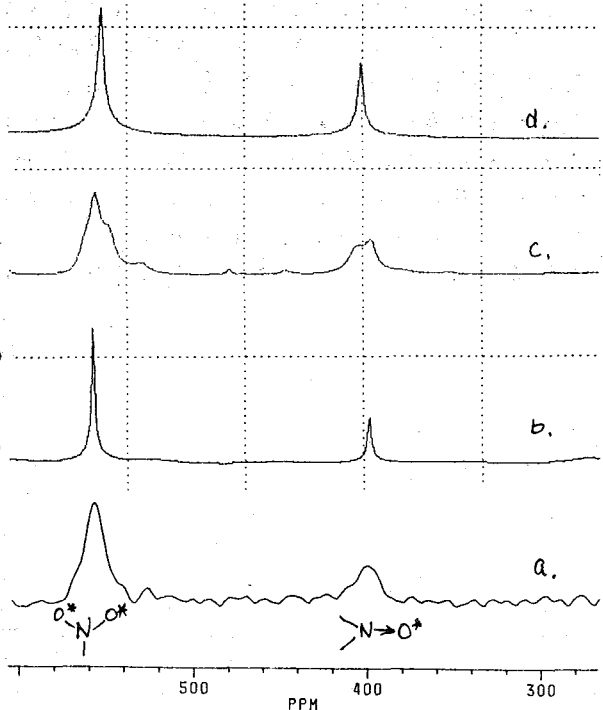


図-2 4-置換ピリジンN-オキシドの ^{17}O -nmr
a; FFT, b, c, d MEM

の結果と化学シフトが異なっている。又、アボダイゼーションを用いずに、2乗64でのMEMの結果(図-2c)の場合、スペクトルにブロードニングが見られる。データの後側ポイントにウェイトをかけたアボダイゼーションを利用したMEMスペクトル(図-2b)の場合、FFTスペクトルに比較して、半値中は約 $\frac{1}{5}$ 以下(約10%)の非常にジラープなシグナルが検出された。また、FFTスペクトルと全く別のスペクトルが重なり合うことがわかる。この4-ニトロピリジニンN-オキシドの場合の $N \rightarrow O$ の化学シフト値(400 ppm)決定は、FFTのスペクトルからのシフト値決定に比べて、容易であることがわかる。

次に、4-CO₂MeピリジニンN-オキシドの結果について図3に示した。置換基COOCH₃のC=O*, C-O*のシグナルは326, 113 ppmに見られる。しかし、 $N \rightarrow O$ のシグナル(376 ppm)は、FFTスペクトルにおいてブロードなシグナルとして現れている。一方、MEMの結果は溶媒シグナルを除いてほぼ同等である。しかし、溶媒シグナルは二本に分裂している。この現象は先ほどのニトロ基の場合(拡大スペクトル表示のため除外している)も同様に見える現象であるため、このMEMの本質的であることがおもしろい。化学シフトについて言えば、FFTの結果と比べて二本に分裂したシグナルの中心が正しいようである。結果として、 $N \rightarrow O$ シグナルの明確な検出が可能になることがわかる。

¹⁷O核と他核との $^nJ_{O-X}$ を ¹⁷O-

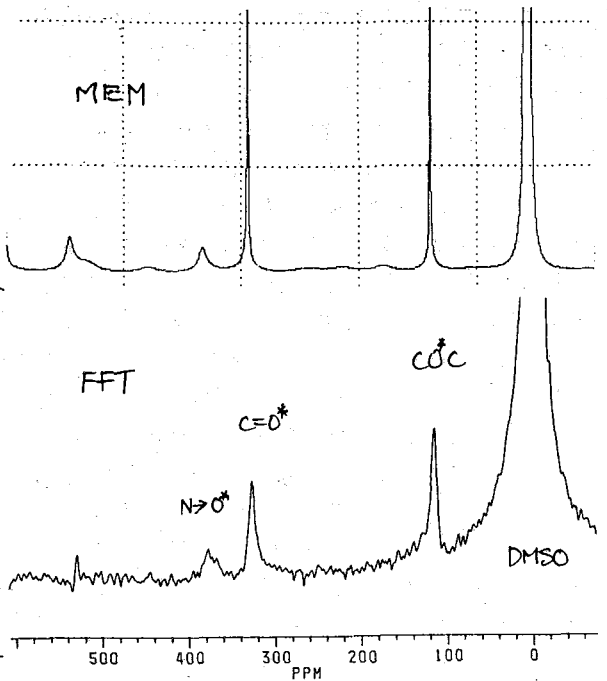


図-3. 4-CO₂MeピリジニンN-オキシドの¹⁷O-NMRスペクトル

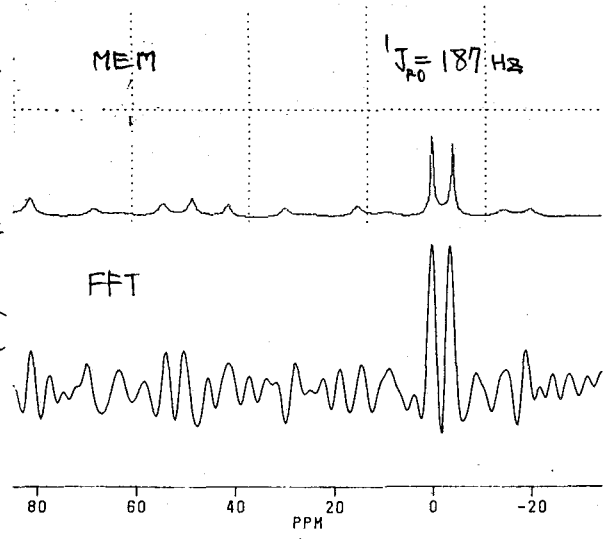


図-4. トリフェニルホスフィンオキシドの¹⁷O-NMRスペクトル

n 本の直接抽出することは 170 本の特性がわかるように、 $V_{1/2}$ (半価幅) $\ll J$ を除いて容易でなく、一般的に困難か、もしくは不可能である。ここで 1 例として、トリフェニルホスフィンオキサイドについて J の決定を MEM を用いて行ったこと (図 4)、この場合の測定溶液は重水にベンゼンを用いているので、試料以外からのシグナルは生じない。FFT の結果は、ローレンツプロードニング因子 500 Hz、ガウスプロードニング因子 0.1 Hz の 3 点ダイジエーションを行ったものである。このように FFT の前処理を極端にかなわなければならない。 ^{17}O シグナルの二本の分裂は正確には見えない、しかし、一方、MEM の場合は、 ^{17}O シグナルがよりシャープに出現し、さんま良しことがわかる。この結果は FFT の結果と全く一致し、この二本に分裂したシグナルはカップリング定数を現わすと考えられる。この分裂の大きさは、 187 Hz で、 $Me_3P=O$ の $J=120$ Hz、 $(MeO)_3P=O$ 165 Hz、 $O_3P=O$ 205 Hz とほぼ同程度の値である。この結果からトリフェニルホスフィンオキサイドの $J_{P=O}$ は 187 Hz であり、このように MEM を用いれば、正確にかつ容易に決定することが出来る。

以上まとめると、MEM の 170 -nm への応用は、MEM の次数の決定など難かしい問題はあるが、全体的に有効であると思われる。又、ここでは詳しい展開は出来なかったが、データ量が少なく、大容量の FFT とほぼ同等の 170 -nm スペクトルが得られた利点からして、スペクトルデータベースにも非常に有効と思われる。

(文献)

- 1) M. Sawada, Y. Takai, et al. Tetrahedron Lett., 27 (1986), 3013-3016; *ibid.*, 27 (1986), 5649-5650; *J. Org. Chem.*, 52 (1987), in press
- 2) 南 茂夫, 「科学計測のより濃形データ処理」, (1986) CQ 出版社
- 3) G. A. Gray, T. A. Ashright, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 3243 (1977).

(日女大・日本電子¹⁾○高橋征三・永山国昭¹

NMR Spectra of Aqueous Solution in a Microcell with Symmetric Geometry
Seizo Takahashi and Kuniaki Nagayama*

(Dept. Chemistry, Japan Women's Univ. & Biometrology Lab., JEOL Ltd.*)

This report describes a novel microcell with symmetric geometry along the B_0 axis. Magnetically, the cell makes a unified long block at the sample part by putting the same solvent into the inserts, leading to easy adjustment of the field homogeneity. Discussions were made on getting NMR spectra of H_2O solutions using this microcell.

市販のマイクロ試料管は生体試料を測定するにはかなり不便である。とくに試料の出し入れに問題があり、pH滴定とか溶媒変化の実験は諦めるしかなかった。そのうえマイクロ試料管を使うと十分な分解能を確保することが難しい、という問題がある。私達は、分解能つまり磁場を乱す要因を検討していく過程で、理想的な形状として対称型NMR試料管を考案した。この試料管は使い勝手の点で多少の問題はあるが、基本的に従来のマイクロ試料管より優れていると思われる。今回は水溶液系について検討した結果を報告する¹⁾。

1 液量と分解能

装置は日本電子のGX-400およびBruker WH-270を使った。サンプル量については通常の試料管で測定する場合、最適の液量があり、多すぎても分解能が低下するようである。そして試料液は検出コイルに対して上下対称に置くべきであり、いずれか一方に著しく偏った場合はどれも望ましい結果を得られなかった。これはふだん無意識にやっている事であるが、非対称に配置した場合、シムに時間をかけても磁場は補正できないことを改めて確認した。

最低の液量は渦と管底部が検出コイルの外形を横切らない量である。その限りにおいて、全部のシムを補正さえすれば必要十分な分解能が得られた。試料間の底部の形状と分解能との相関は認められない。しかし成形部分が検出コイルにかかると著しくスピニングサイドバンドが増大した。従ってデッドボリュームの点から平底がよいと結論した。

サンプルの液量が少ない場合、シムが困難になる理由として、ガラスの存在を考慮すると、試料管の上下方向と検出コイル周辺との関係が非対称な関係になっていることに注目した。

たかはし せいぞう、 ながやま くにあき

2 分解能に及ぼす ガラスの影響

試料管の材質は予想以上に分解能と関係する。図1はパイレックスの外管に上からそれぞれ石英、パイレックス、硬質ガラス製の内管を挿入し水の線幅を測定した結果である。ただし硬質ガラスは水と磁化率が近い特殊ガラスを使用している。この結果はガラスの磁化率が実際にスペクトルの分解能にかなり影響することをしめす。

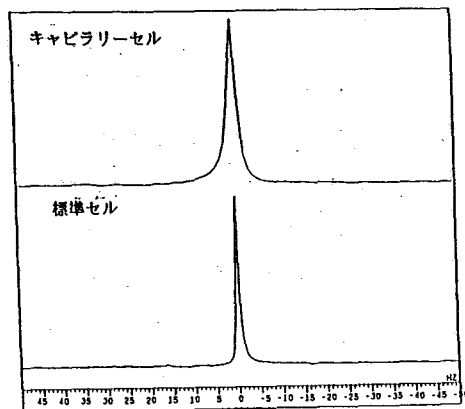
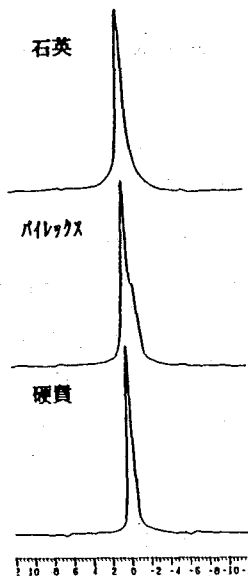


図1(左) ガラスの材質の違いによるH₂Oの線幅の差

図2(上) 試料管の内径の違いによるH₂Oの線幅の差

そこで高分解能スペクトル用にとしてこの硬質ガラスを採用することにした。

スペクトル分解能を上げるには、磁場の最も均一な場所に試料を置けば良い。試料管の内径を小さくして分解能が向上するかどうか調べるために、キャピラリー型試料管を用いてテストした。結果は予想に反して、図2に示すように、標準試料管で測定した場合に比べて著しく分解能が低下した。この結果はガラス管壁の影響が相対的に径が小さいほど大きいからであると解釈できる。図2の結果から試料管の内径を小さくする利点は特になく、ガラス管壁は薄いほど有利であることが結論された。

図3は5'-UMP·2Naを同一条件で測定した例である。AはWilmadの標準試料管528-PPでBは管壁0.24mmの545-PPTを使用した結果である。後者は14%余分に試料がいるがピークの高さで測って20%以上の感度向上が認められる。Cは硬質ガラスで試作した0.3mm厚の試料管であるが6位や1'位のピークで見ると限り、545-PPTと遜色がない。Cは分解能が優れているぶん得をしているからである。

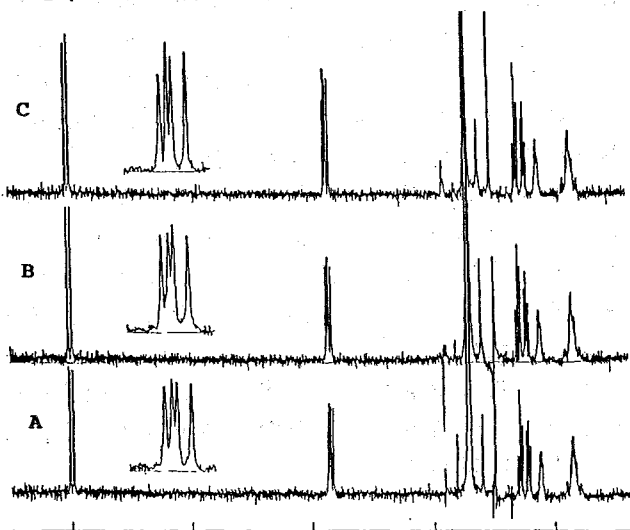


図3 試料管とスペクトルの感度との関係
(A) 528-PP (B) 545-PPT (C) SD

3. 対称型マイクロ試料管について

対称型マイクロ試料管とはガラスの影響を最小に抑えつゝ、ガラスの効果を補償するために、 B_0 と B_1 の両方向の形状を対称にしたものである。

まず上部はガラス製の渦止めストッパーを内管として用意し、測定中にストッパーがずり落ちないように、ゴム栓で止められるようにした(図4)。途中を絞ったのは毛管現象で液が這い上がるのを防ぐためである。この結果、液量に独立に試料の高さを調節できるようになった。

渦止めストッパーを挿入した効果を補償するために、標準試料管の下側に同様な管を挿入したのがこのマイクロ試料管の特徴である。下側内管の開口部は狭いのでそのままでも液漏れはないが、シリコン接着剤 KE-45で塞いでもよい。

ガラスの影響を最小にするために、上下の仕切り板をできるだけ薄く削った。この部分の工作精度が分解能およびスピニングサイドバンドの大きさを決めるようである。

図5は5'-ウリジル酸を同一濃度で測定した例である。aは従来の内挿型マイクロ試料管による結果で、内径が小さくなった分だけ実効感度が低下していることが分る。bは対称型マイクロ試料管、cは標準試料管を使用した結果である。bは液量をcの2/5しか使っていないにもかかわらず、感度はほとんど変わらない。dは試料の絶対量がcと同じであるとして標準試料管で測定した場合をシミュレートしたものである。実用上は感度が2.5倍上がったことに相当する。

図5の結果は、対称型マイクロ試料管は検出コイルの内側部分にしか試料が存在しないにもかかわらず、まったく分解能や感度を犠牲にしないで測定できることを意味する。その理由は試料部に高さ5mmの重水をおき、上下内管に軽水を入れて測定した、図6の結果から明らかである。検出コイル周辺部に相当する部分の H_2O シグナルは単に裾の盛り上りとしてしか効いていない。対称型マイクロ試料管は B_0 、 B_1 のもっとも均一な部分だけを使っているので、正確な 90° パルスや 180° パルスを必要とする実験にとくに有用であろう。

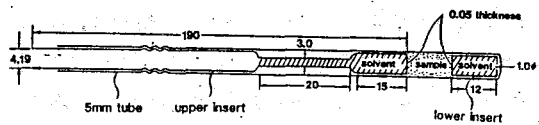


図4 対称型マイクロ試料管の構造

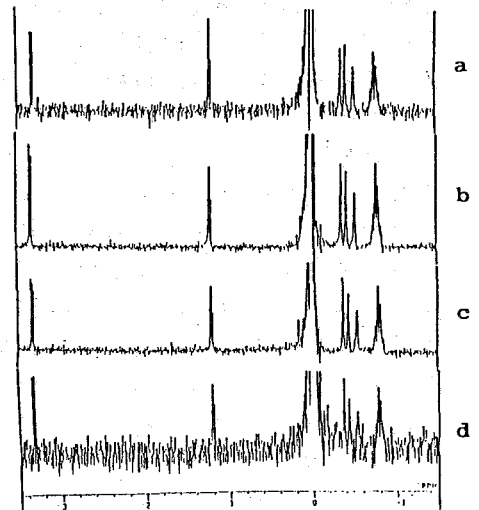


図5 試料管による感度の違い
a 内挿型マイクロ試料管 b 対称型マイクロ試料管
c 標準試料管 (a-c)はいずれも同一濃度
d bと同じ絶対量をcの条件で測定した場合。

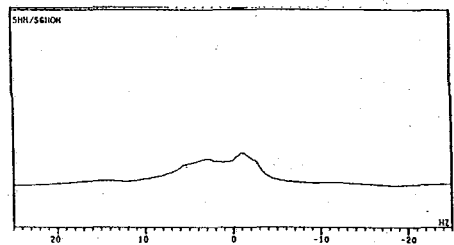


図6 D_2O の上下に H_2O をはさんだ試料のスペクトル
試料の長さは5mm 検出コイルの内径は10mm

4 軽水溶液の測定について

軽水溶液の測定は普通以上に調整が難しい。通常 5%ないし10%の重水を混ぜて測定するが、D含量が少ないため、ロックが不安定であり、noisy なのでシム調整がやりにくいという問題がある。さらに軽水測定で問題になるのは水から50ないし100Hz離れて残る成分である。つまり高次のシムをいかに調整するかでスペクトルの質が決まってしまう。現時点ではそれに対する有効な処方をもっていない。

対称型マイクロセルの場合、上下内管に重水を入れて測定しようとする時、その重水シグナルにロックシグナルが引っ張られて、シムは悪い方にずれていく。そこでND₂ClやND₂ODの飽和溶液を使い、exchange broadening を利用する方法を検討したが、試料との磁化率の差が増大し、有効でないことが解った。従っていまのところ上下内管ともに軽水を入れたシステムで妥協している。

図7と図8は上述のシステムで15mM濃度のアミノ酸溶液のスペクトルをそれぞれホモゲート・デカップル法と選択的励起法で測定した結果である。結論として、現時点では、標準試料管で測定したとき以上の品質で測定は成功していないが、対称型マイクロ試料管を使ってほぼ同等のスペクトルを得ることはさほど困難でないことが分った。

図7では、照射ラジオ波の位相をスイッチすると、効率よく水の信号を飽和することができ、かつた、き残った水の信号の位相をコントロールできることを示した。図8では11パルスと121パルスの組み合わせで1331パルスと同程度以上の効率で水信号を抑制できることを示している。その詳細は本講演で述べる予定である。

文献 (1) S. Takahashi and K. Nagayama, J. Magn. Reson. in press (Jan. 1988)

本研究を遂行するに当たりお世話になった東京大学理学部生物化学教室の宮澤辰雄教授ならびに日本電子(株)の加藤(実宝)敏代さんに感謝します。

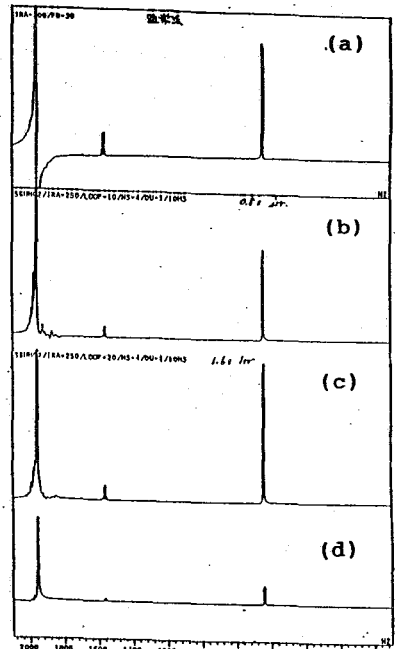


図7 ホモゲート・デカップル法による軽水中のスペクトル (a) 通常法[照射時間30秒] (b)~(d) 位相スイッチ法[0.8秒, 1.6秒, 3.0秒]

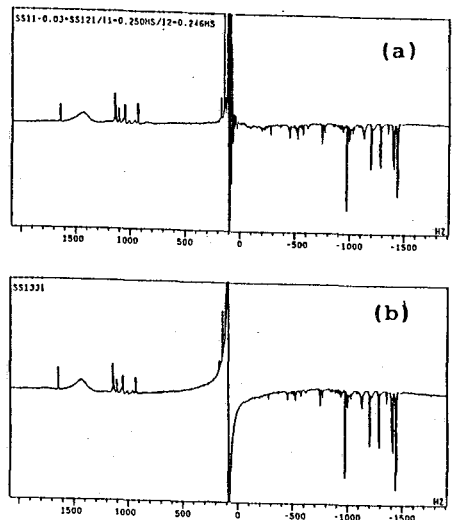


図8 選択励起法による軽水中のスペクトル (a) 11パルスと121パルスの組み合わせ法 (b) 1331パルス法

常用基準法の落とし穴と理想的な外部基準法の提案

(元横浜国大工・神奈川県工試*) O 桃木弘三・深沢宜行*

PMR Ideal Referencing Technique to Avoid Probable Pitfalls in the Ordinal External or Internal Method

Kozo Momoki and Yoshiyuki Fukazawa*

(Prof. Emeritus, Yokohama National University and *Industrial Research Institute of Kanagawa Prefecture)

The ordinal external or internal referencing technique has been established rather intuitively, as the diamagnetic term in the former or solvent effect in the latter has not always been well understood to be probable pitfalls which are avoided in a new bulbbed capillary external referencing method. The method can give a multi-points referencing technique in providing almost automatically the diamagnetic correction to yield normalized ideal chemical shifts of highly quantitative nature. The new method can also avoid and check inevitable solvent effects in the ordinal internal method. Thus, chemical shifts and solvent effects will have to be re-studied quantitatively.

10 数年前深沢の修士論文に「イオン交換樹脂を水に浸した系の PMR」というテーマを出し、外部基準測定を要するにも拘わらずこの分野では帯磁率項補正(D項補正)が行われていないことを疑問を持ったが、一般にもD項補正を要しない内部基準法が専ら行われるようになってD項補正法は未確立のまま放置されていることを知り、新たにD項補正法を開発した。その結果、画期的な理想的基準法がもたらされ、化学シフト値の定量性や溶媒効果が再検討を迫られることになった。

従来の外部及び内部基準法とその理解は意外なほど直観に基づいており、落とし穴が多かった、と言える。外部基準法のD項補正は、基本式

$$\delta_{cor} = (H_s - H_o) / H_r + \frac{g}{2\pi} (\chi_s - \chi_r) \quad (1)$$

$$= \delta_{obs} + \frac{(2\pi/3)(\chi_s - \chi_r)}{2\pi} \quad (1')$$

$$g = \text{geometry factor} = g_{cy} - g_{cp} = 2\pi - 4\pi/3 = 2\pi/3$$

$$\chi = \text{体積帯磁率 (cgs emu/cm}^3) \times 10^6$$

で説明されているが、何故D項が入るのかの説明は1)でもアイマイで、D項の意味は余り正しくは理解されていないらしい。

しばしば「D項補正 = 未知 χ_s の測定」とされるのが典型だが、疑問がある。式(1)は sample と reference と別々に Lorentz cavity とそれにかかる磁場 (Lorentz field)

$$H_{s,L} = H_{s,sp} = H_{s,cy} [1 - (g_{cy} - g_{cp}) \chi_s] \quad (2)$$

$$H_{r,L} = H_{r,sp} = H_{r,cy} [1 - (g_{cy} - g_{cp}) \chi_r] \quad (3)$$

を考へ、reference の磁場を基準にした sample の Lorentz shift

$$\delta_{s,L} = (H_{s,L} - H_{o,L}) / H_{r,L} \quad (4)$$

を实际的な cy-cy の場合について計算して得られている。

ここで、何故 Lorentz cavity を考へるのだろうか？ それは、容器の形 (g の項)

が大問題だからで、 $g_{ap} = 4/3$ だけが一義的に定義され、他の形では一義的に定義できないからである。通常 $g_{cy} = 2\pi$ も一義的のように扱い「cyの長さ(L)が直径(D)に較べて充分長い時」というアイマイな条件を付けて済ませているが、 L/D 値を定量的に与えなければ g_{cy} 値は決まらないのが正しい。 $L/D = 20$ でも g_{cy} は 2π よりまだ 0.6% 小さく、 $g_{cy} < 2\pi$ に気付かず実際測定している場合が少なくない。

更に、式(2)と(3)は1次近似式であり、実際系を式(2)と(3)とに分けて書けるのも、実は2つのcyが共に $g_{cy} = 2\pi$ であると仮定した近似にすぎない。式(4)に代入後も

$$\delta_{\alpha, L} = [H_{r,cy}(1-g\gamma_2) - H_{o,cy}(1-g\gamma_0)] / H_{r,cy}(1-g\gamma_2) \quad (5)$$

$$= [(H_{r,cy} - H_{o,cy}) + g(H_{o,cy}\gamma_0 - H_{r,cy}\gamma_2)] / H_{r,cy} \quad (5')$$

$$= (H_{r,cy} - H_{o,cy}) / H_{r,cy} + g[(H_{o,cy}/H_{r,cy})\gamma_0 - \gamma_2] \quad (5'')$$

$$= \delta_{obs} + g(\gamma_0 - \gamma_2) \quad (6)$$

と近似を加えて式(1)を導いている。= のように近似を重ねて理想化したのが式(1)のD項であるから、更に実験的非理想性も加わる=とを考えると、式(1)のD項はむしろ非現実的理想式であり実験的D項は少し異なる非理想式である=と理解される。少なくとも「 γ_0 を求めればD項補正は計算で出来る」とするのは早計であり、D項又はg項の実際非理想性にも対処できるD項補正法を考えなければならぬ。

=と=3が、D項は実験的に求める=とが出来る。D項一般式を書直すと

$$g(\gamma_0 - \gamma_2) = g_{cy}(\gamma_0 - \gamma_2) - g_{ap}(\gamma_0 - \gamma_2) \quad (6)$$

となり、=と=2の間にcy面又は α 面のある2つの状態の差を示すが、=の2つの状態を実際に作るべければ良い。=これは実は、NMRによる帯磁率測定法として提案²⁾、改造^{3),4)}された方法の延長に存する。試料相I(γ_2)の中に相II(γ_0)を異なる形(g_x と g_y)の手元でNMR測定すれば、IIの磁場は g_x と g_y で異なるか異なるピークが得られ

$$\Delta\delta_{II} = \delta_{II,x} - \delta_{II,y} = (g_x - g_y)(\gamma_2 - \gamma_0) \quad (7)$$

が近似的に成立する²⁾から、一方が既知な未知 γ_0 が $\Delta\delta_{II}$ の測定により実験的に求められる。文献²⁾ではcy形のIIを用い、外磁場に直角($g_x = 2\pi$)と平行($g_y = 0$)の2回スペクトルを測定し引算をしたが、³⁾ではIIのcy形と α 形とを同時にIの中に与えても唯1回測定したスペクトル上で式(7)が成立する=とを示し、⁴⁾ではcy形と α 形とを連続したdevice中にIIを入れても全く同様になる=とを明らかにしている。

以上の3報はいずれも帯磁率測定法が目的であつて、それ以上に進まなかつた。我々は文献⁴⁾のdeviceに注目し、I=sample, II=referenceとすれば式(7)より

$$\Delta\delta_r = \delta_{r,cy} - \delta_{r,\alpha} = (g_{cy} - g_{ap})(\gamma_0 - \gamma_2) \quad (8)$$

とD項がスペクトル上に $\Delta\delta_r$ として得られる=とに気がついた。そこで、5mm ϕ 通常試料管に適合し $g_{cy} = 2\pi$ を厳守する球付毛管(bulbed capillary)を改めて設計し、1mm ϕ 毛管の一端を吹いて2.5mm ϕ の球バルブとしたdeviceを自作した。referenceはTMSとして5~6cm長($L/D > 50$)で封入し $g_{cy} = 2\pi$ を確かに行っている。=の球付毛管を簡便精密に使用できるための実験的配慮が必須である。式(8)は

$$\Delta\delta_{TMS} = \delta_{TMS,cy} - \delta_{TMS,\alpha} = g(\gamma_{bulk} - \gamma_{TMS}) \quad (9)$$

と書ける。アセトンと水をそれぞれ *bulk sample* とした場合のスペクトルを示す。2つの TMS ピーク間の區別は球付毛管の寸法から明らかなが、式(9)のとおり $\chi_{bulk} > \chi_{TMS}$ 又は $\chi_{bulk} = \chi_{TMS}$ に応じて cy ピークは ap ピークより低又は高磁場に来ており間隔も χ 差に応じている。 $\Delta\delta_{TMS}$ が TMS と *bulk sample* の両者により決められることは明らかなが、D項が実験的に与えられる、また文献(4)と同じく未知 χ_{bulk} の測定も可能になる。

しかし、球付毛管の寸法はそれだけではなかった。式(9)と(1)に代入すると

$$\delta_{cor} = \delta_{obs} + \delta_{TMS, cy} - \delta_{TMS, ap} \quad (10)$$

となるが、 δ_{obs} は $\delta_{TMS, cy}$ ピークから測った *bulk* ピークの δ だから、式(10)は結局

$$\delta_{cor} = \delta_{bulk} - \delta_{TMS, ap} \quad (11)$$

となり、新たに $\delta_{TMS, ap}$ ピークから測った *bulk* ピークの δ が D項補正を済ませた δ_{cor} をスペクトル上で自動的に与えるのである。

この全く新しい D項補正法が誠に興味深いのは、未知 χ_{bulk} に関係なく D項補正できることで、「D項補正は χ の測定ではない」とを如実に示す。しかし実は、このままではここで論じた D項の実際非理想性までは及ばないのである。自作の球付毛管では g_{ap} (従って g) は非理想値となり、しかも自作の度には異なるから、球付毛管を変えると同一 *bulk* ピークに対して異なる δ_{cor} が与えられて、補正の意味が無くなる。この対策として考えたのが *normalization* である。

すなわち、D項の実際非理想性は式(9)に一連の既知 χ_{bulk} を与えて $\Delta\delta_{TMS}$ vs. χ_{bulk} の検量線を出せば示される。我々はアセトン ($\chi = -0.456, 25^\circ\text{C}$), ベンゼン (-0.617), シクロヘキサン (-0.623), 四塩化炭素 (-0.685), 水 (-0.719), 7クロロフルム (-0.731), 70モフルム (-0.936) の7つを用いた。検量線はいずれも直線

$$\Delta\delta_{TMS} = a \cdot \chi_{bulk} + b \quad (12)$$

となり、文献(4)も示したとおり直線性は秀れていた。しかし、球付毛管によって検量線は皆互に異なり、しかも実線を示した理想検量線

$$\Delta\delta_{TMS} = 2.094 \chi_{bulk} + 1.145 \quad (13)$$

から明らかに異なっていた。 $\chi_{TMS} = -0.547$ を使用した。

そこで、実際のバラバラな非理想検量線と理想検量線に *normalize* すれば、同一 *bulk* に対してバラバラに与えられる $\Delta\delta_{TMS}$ を一義的な $\Delta\delta_{TMS}^{\circ}$ に直すことができ、対応した一義的 δ_{cor} が得られるはずである。式(12)と(13)間で χ_{bulk} を消去すればよいが、

$$\begin{aligned} \Delta\delta_{cor} &= \Delta\delta_{TMS}^{\circ} - \Delta\delta_{TMS} \\ &= (2.094/a - 1)\Delta\delta_{TMS} - 2.094 b/a + 1.145 \end{aligned} \quad (14)$$

$$\delta_{cor} = \delta_{obs, ap} + \Delta\delta_{cor} \quad (15)$$

から一義的 δ_{cor} が直ちに与えられる。

この *normalization* の効果は実に素晴らしい。全くバラバラの検量線を使用したにも拘わらず表1のように驚くほど良く一致した δ_{cor} が得られた。我々はその一義性と定量性の高さゆえに δ_{cor} を理想化学シフトと考えたいが、それは球付毛管法が2つの異で厳格的な理想的基準法だからである。1) 球付毛管を使うことによ

表1	CHBr ₃	CHCl ₃	C ₆ H ₆	H ₂ O	C ₆ H ₁₂	(CH ₃) ₂ CO
$\delta_{\text{obs, cy}}$	7.931(4)	7.757(5)	6.879(4)	5.206(4)	1.613(5)	1.849(4)
δ_{cor}	7.099(33)	7.317(29)	6.644(41)	4.794(36)	1.390(35)	1.931(43)
$\Delta\delta_{\text{nor}}^{\circ}$	0.019(31)	0.057(35)	0.078(37)	0.060(35)	0.079(38)	0.111(43)
$\delta_{\text{cor}}^{\circ}$	7.115(6)	7.373(9)	6.722(9)	4.853(4)	1.469(5)	2.042(8)
$\delta_{\text{cor}}^{\circ} - \delta_{\text{obs, cy}}$	-0.815	-0.384	-0.157	-0.353	-0.144	+0.193

て reference (TMS) の Lorentz cavity ピークが理想的基準ピークとして始めて具体的に与えられた。1) normalization の為にはアセトンなどの物質を δ の基準物質として使用したが、これは基本式(1)で明らかになるように δ の sub-references の役割をも間接的に果たしていた。結局 TMS と都合の参考物質を使用する結果に付た為には δ_{cor} の一義性と定量性は当然高くなり、これに対して従来の基準法では reference は 1 コだけだから得られる化学シフト値は定性的で止むを得なかったのである。丁度 pH 測定における 1 基準と多基準の関係に相当しており、球付毛管法は NMR における多基準法を始めて可能にした理想的基準法なのである。

球付毛管法によって内部基準法⁵⁾の定量的なエッジが始めて可能になり、後者の致命的欠陥と前者の絶対必要性が決定的に付た。TMS はシフトを受けず存在しないと信じて扱われて来たが、根拠は「極性がない」「化学的に不活性」など直観に基いており⁵⁾ 直接測定されたものではない。球付毛管法はこの直接測定を始めて可能にしており、TMS 自体がシフトを受け与えること及び内部基準法のピーク間 δ は一義的な bulk シフトには付た付かないこと、を始めて明らかになっている。

この結果は、「溶解」の根本に立ち戻ってみればむしろ当然であって、シフトを受けず存在しないシフト不活性物質は元々存在しなかったであろう。当然ながら「溶媒効果」の従来の理解は根本的に見直されなければ付ないが、その為にも溶媒効果を全くもたらない球付毛管法の使用が絶対必要に付てくる。一義的で定量的な化学シフトは δ_{cor} によってのみ与えられるので、従来の化学シフト値は再測定した δ_{cor} で書き改められなければ付ない。

以上、従来の外部基準法も内部基準法もともに欠陥があり、球付毛管法で測定し直さなければ付ない。その上で、多くの系についての理想化学シフト値の化学的意味付けを十分に図らなければ付ない。

- 1) J. A. Pople, W. G. Schneider, H. J. Bernstein, "High Resolution Nuclear Magnetic Resonance", McGraw Hill, New York (1959), p. 80-81.
- 2) G. Feher, W. D. Knight, Rev. Sci. Instr., **26**, 293 (1955).
- 3) K. Frei, H. J. Bernstein, J. Chem. Phys., **37**, 1891 (1962).
- 4) L. N. Mulay, M. Haverbusch, Rev. Sci. Instr., **35**, 756 (1964).
- 5) G. V. D. Tiers, J. Phys. Chem., **62**, 1151 (1958).

ハロゲルマンの ^{73}Ge の緩和機構へのスカラー緩和の寄与

(東大教養) 原園としえ・田中克巳・○竹内教人

Contribution of the Scalar Relaxation to the ^{73}Ge Relaxation in Halogermanes
Toshie Harazono, Katsumi Tanaka and Yoshito Takeuchi
(Department of Chemistry, The College of Arts and Sciences,
The University of Tokyo)

As a part of our extensive study on the relaxation of ^{73}Ge nuclei, the two halogermanes GeBr_4 and GeI_4 were dissolved in toluene- d_8 , and their T_1 and T_2 were measured by inversion-recovery and by Carr-Purcell-Meiboom-Gill methods at 25-105°C, respectively. The latter was also measured from the line width. Plots of $\ln(1/T_1)$ and $\ln(1/T_2)$ with $1/T(\text{K})$ indicate that for T_1 the contribution of quadrupolar mechanism is predominant while for T_2 a contribution of scalar mechanism is evident as is the case with GeCl_4 . Based on the relation $J/\gamma = AZ^{1.25}$ where γ gyromagnetic ratio, A a constant and Z is the atomic number, $J(\text{Ge-Br})$ and $J(\text{Ge-I})$ were firstly estimated to be ca. 50Hz.

【序】

我々は、核スピン9/2を持つ ^{73}Ge 核の緩和機構を系統的に研究したところ、アルキルゲルマンの ^{73}Ge 核は、四極子緩和のみで緩和する一方、ハロゲルマン、特に GeCl_4 の緩和機構には四極子緩和のほかにもスカラー緩和が含まれることを見いだし、 $^{73}\text{Ge}-^{35}\text{Cl}$ 結合のスピン結合定数を求めた^{1,2)}。

これらの結果を踏まえて、今回、 GeBr_4 と GeI_4 における ^{73}Ge 核の緩和機構を研究したところ、いずれも高温領域で、 T_2 にスカラー緩和が含まれていることが見出された。これより、ゲルマニウム-ハロゲン結合のスピン結合定数、ハロゲンの緩和時間など、これ迄に知られていなかった知見が得られたので報告する。

【実験】

GeBr_4 と GeI_4 は文献に従って合成し³⁾、トルエン- d_8 に溶かし、脱気封管してNMRスペクトルを測定した。測定は低周波数用インサート NM-IT10LPを装備したJEOL JNM FX-90Qを用いた。共鳴周波数は3・10MHz、180°パルスは464 μs であった。 T_1 は反転回復法(IRFT)で、 T_2 は線幅($\Delta\nu_{1/2}$)とCarr-Purcell-Meiboom-Gill法(CPMG法)で測定した。

【結果と考察】

表1に GeBr_4 と GeI_4 の ^{73}Ge の T_1 (IR)、 T_2 (CPMG)、及び T_2 ($\Delta\nu_{1/2}$)を示した。いずれの場合も、CPMG法で得られた T_2 と線幅から得られた T_2 はほぼ同じ値を示した。一方、45°Cで、 GeI_4 の T_1 と T_2 はほぼ同じ値であったが、 GeBr_4 は、25°Cで T_2 が T_1 よりも短くなっている。

Table 1 The values of T_1 (IR), T_2 (CPMG), and $T_2(\Delta \nu_{1/2})$ for ^{73}Ge in Tetrahalogermanes in Toluene- d_8			
compound	T_1 (IR) ms	T_2 (CPMG) ms	$T_2(\Delta \nu_{1/2})$ ms
GeBr_4 (25°C)	88	80	81
GeI_4 (45°C)	51	54	59

四極子モーメントをもつ核の緩和は、一般に四極子緩和機構で起こる。四極子緩和は式(1)で表される。

$$\pi \Delta \nu_{1/2} = \frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_2} = \frac{3\pi^2}{10} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left[\frac{e^2 Q q}{h} \right]^2 \left[1 + \frac{\xi^2}{3} \right] \tau_0 \quad (1)$$

ここで、 $e^2 Q q / h$ は四極子結合定数、 ξ は非対象パラメーター、 τ_0 は相関時間である。 τ_0 は活性化エネルギー ΔE を用いて式(2)で表される。

$$\tau_0 = \tau_0^\circ \exp(\Delta E/RT) \quad (2)$$

T は絶対温度である。

GeBr_4 と GeI_4 の $\ln(1/T_1)$ と $\ln(1/T_2)$ を $1/T$ に対してプロットし

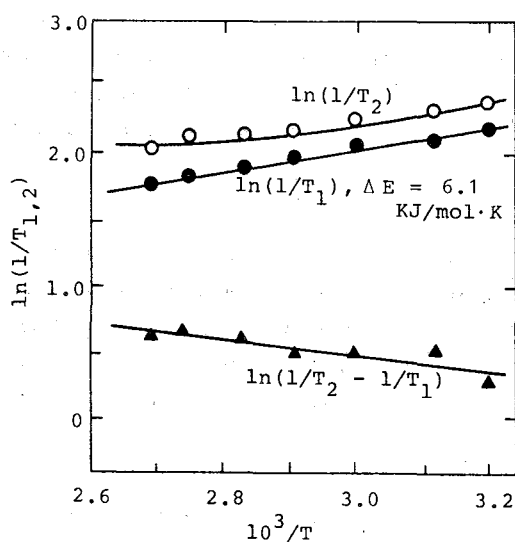


Fig. 1. Plots of $\ln(1/T_1)$, $\ln(1/T_2)$ and $\ln(1/T_2 - 1/T_1)$ vs. $1/T$ for ^{73}Ge in GeBr_4 .

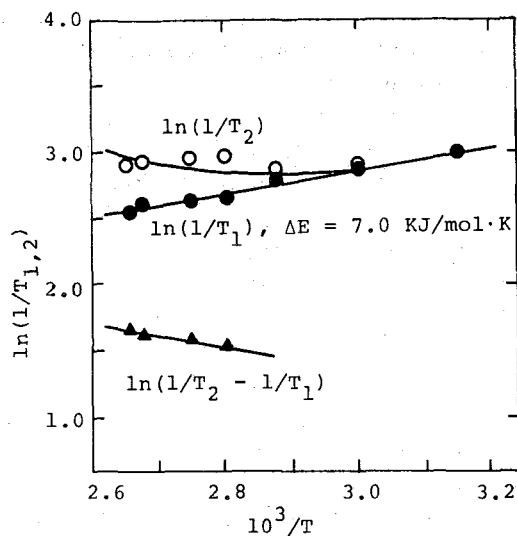


Fig. 2. Plots of $\ln(1/T_1)$, $\ln(1/T_2)$ and $\ln(1/T_2 - 1/T_1)$ vs. $1/T$ for ^{73}Ge in GeI_4 .

たものを図1と図2に示した。どちらも、 $\ln(1/T_1)$ は $1/T$ に対して正の傾きを持つ直線となり、 T_1 は四極子緩和機構のみで緩和していることがわかる。これに対して、 $\ln(1/T_2)$ の $1/T$ に対するプロットは高温になるにつれて直線からずれ、四極子緩和とは逆の温度依存性を示す緩和が含まれることを示唆している。この緩和は GeCl_4 の場合と同様にスカラー緩和である。スカラー緩和は次式で表される。

$$(T_1^{\circ\text{C}})^{-1} = \frac{2}{3} A^2 I_s (I_s + 1) \frac{\tau_2}{1 + (\omega_1 - \omega_s)^2 \tau_2^2} \cdot N_s \quad (3)$$

$$(T_2^{\circ\text{C}})^{-1} = \frac{1}{3} A^2 I_s (I_s + 1) \left[\tau_1 + \frac{\tau_2}{1 + (\omega_1 - \omega_s)^2 \tau_2^2} \right] \cdot N_s \quad (4)$$

ここで I_s は、ハロゲン原子の核スピン、 τ_1, τ_2 は相関時間、 ω_1, ω_s は ^{73}Ge 、ハロゲンの共鳴周波数、 N_s はハロゲン原子の数、 A は $2\pi J$ で J は Ge -ハロゲン間のスピン結合定数である。もし、 $1 + (\omega_1 - \omega_s)^2 \tau_2^2 \gg 1$ ならば、式(5)が成り立つ。

$$(T_2^{\circ\text{C}})^{-1} = (T_2)^{-1} - (T_1)^{-1} = A^2 I_s (I_s + 1) \tau_1 N_s / 3 \quad (5)$$

ここで τ_1 はハロゲンの T_1 で表わされる。 $T_1 \propto 1/\tau_1$ であるから、 $\ln(1/T_2 - 1/T_1)$ の $1/T$ に対するプロットは $\ln(1/T_1)$ の $1/T$ に対するプロットと、勾配

Table 2 J, |J/γ|, |K|, and τ₁ for Tetrahalogermanes and Tetrahalostannanes 4)

compound	solvent	J	J/γ	K ⁵⁾	τ ₁ s
		Hz	10 ⁻³ gauss	10 ²⁰ cm ⁻³	
⁷³ Ge ³⁵ Cl ₄	chloroform-d ₁	24	162	585	4.1 × 10 ⁻⁵ (30℃)
⁷³ Ge ⁸¹ Br ₄	toluene-d ₈	49	329	433	5.6 × 10 ⁻⁶ (90℃)
⁷³ Ge ¹²⁷ I ₄	toluene-d ₈	50	336	596	5.3 × 10 ⁻⁶ (100℃)
¹¹⁹ Sn ³⁵ Cl ₄	neat	375	236	855	2.2 × 10 ⁻⁵ (25℃)
¹¹⁹ Sn ⁸¹ Br ₄	neat	920	579	760	7.5 × 10 ⁻⁷ (21℃)
¹¹⁹ Sn ¹²⁷ I ₄	neat	940	592	1049	1.5 × 10 ⁻⁷ (150℃)

4) R. R. Sharp, J. Chem. Phys., 57, 5321 (1972); 60, 1149 (1973).

$$5) K = \frac{1}{h} \frac{J}{\gamma_M \gamma_X}$$

の絶対値が等しく、符号が逆の直線となる。実際に $\ln(1/T_2 - 1/T_1)$ を $1/T_1$ に対してプロットしたものを図1と図2に示した。この直線は $\ln(1/T_1)$ の直線と傾きが逆であり、絶対値は実験誤差内で一致している。このことは T_2 にスカラー緩和が含まれていることの確かな証拠である。

また、 MH_4 と $M(CH_3)_4$ ($M = C, Si, Ge, Sn, Pb$) の結合定数 $J(M-H)$ は、原子番号 Z と $J/\gamma = AZ^{1.25}$ (A : 定数、 γ : 磁気回転比) の関係にある。 MBr_4 、 MI_4 の J も同様の関係にあるとして、 $J(Ge-Br)$ 、 $J(Ge-I)$ を求めたところ、それぞれ 49 Hz、50 Hz となった。これまでこの組合せのスピ結合定数の報告は無い。さらに、 $GeBr_4$ と GeI_4 の $(T_2^0)^{-1}$ は、それぞれ $4.04 A^{0.12} \tau^{1.81}$ 、 $11.7 A^{1.27} \tau^{1.27}$ で表される。これより ^{81}Br と ^{127}I の τ_1 を求め、表2に示した。テトラハロソズの場合とよい対応をなしている。

文献

- 1) T. Harazono, K. Tanaka, Y. Takeuchi and N. Kakimoto, Chem. Lett., 1841 (1986).
- 2) T. Harazono, K. Tanaka and Y. Takeuchi, Inorg. Chem., 26, 1894 (1987).
- 3) A. W. Laubengayer and P. L. Brandt, J. Am. Chem. Soc., 54, 621 (1932)

イオン交換膜中における ^{23}Na -NMR ケミカルシフトの磁場強度依存性

(旭硝子研) 実桐幸男・米森重明 能代 誠 西村啓道

Magnetic Field-Dependency of ^{23}Na -NMR Chemical Shift in Ion Exchange Membranes

Yukio Jitsugiri, Shigeaki Yonemori, Makoto Noshiro, Hiromichi Nishimura (Research and Development Div., Asahi Glass Co. Ltd.,)

Sodium-23 NMR has been used to study Na^+ cation in a perfluorocarboxylate ion exchange membrane as a function of water content and temperature. A chemical shift change and line width decrease are seen upon increasing the water content. Magnetic field-dependency of the chemical shift is observed for a same sample. The change in chemical shift is large (80ppm) for perfluorocarboxylate ionomer from 2,3T to 9,4T.

1. 序

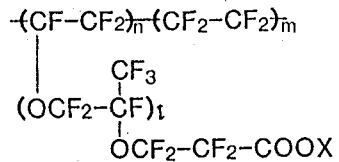
イオン交換樹脂中のイオンの水和現象を解明するため、 ^1H - ^{23}Na -NMRなどの測定が行われている。Creekmoreら¹⁾は Dowex樹脂を用い樹脂中のイオンの挙動を調べている。イオン交換膜では、Komoroskiら²⁾がパーフルオロスルホン酸膜(Nafion)中のイオンの易動度とイオンパーの研究を行い、膜中の含水率と ^{23}Na -NMRの関係を報告している。

食塩電解用イオン交換膜による苛性ソーダの製造においては、イオン交換膜中のナトリウムイオンの挙動が重要であり、膜中での Na^+ イオンの易動度の変化を把握することが必要であった。そこでナトリウムイオン対の束縛状態の解析方法として ^{23}Na -NMRをパーフルオロカルボン酸型イオン交換膜(フレミオン(1))に適用し、吸水率による変化などを検討したところ、磁場強度が異なるとケミカルシフトが変化することを確認したので報告する。

2. 実験

日本電子製GX-400を主に使用し、さらにGX-270, FX-200, FX-100 NMR装置を使用した。室温より90℃まで測定を行い、必要に応じて500~1000回の積算を行った。ケミカルシフトは0.1mol/l NaCl溶液をキャピラリー管へ封入したものを標準物質として、 δ ppmで示した。

試料はフレミオン膜をナトリウム型に変換し(イオン交換容量1.17ミリ当量/g)約2mm中に短冊状に切断したものを10mmφ試料管に入れ用いた。含水率は、膜の重量増を測定し求めた。



X:R,H,Na

(1)

3. 結果および考察

1. 含水率とケミカルシフト

フレミオン膜の含水率を変えた場合の ^{23}Na -NMRスペクトル(105.9MHz)を図1に示す。膜表面の苛性ソーダよりのピークが見られる場合があるが、この場合にも膜中のナトリウムからは単一のピークが観測された。含水率が增加するにしたがい、ピークの線幅は減少した。また図2に示すように、含水率の増加により、ケミカルシフトも変化し、低磁場側へシフトする。含水率の増加に伴い、標準物質である0.1M NaCl溶液のピークへ、ケミカルシフトも、線幅も近づくことは、 Na^+ イオンの束縛状態が弱まり、イオン対の結合、非結合の間の交換が速くなり、易動度が高まっていることを示している。この傾向はパーフルオロスルホン酸型膜(Nafion)でも同様であり、よく類似した結果を示している²⁾。

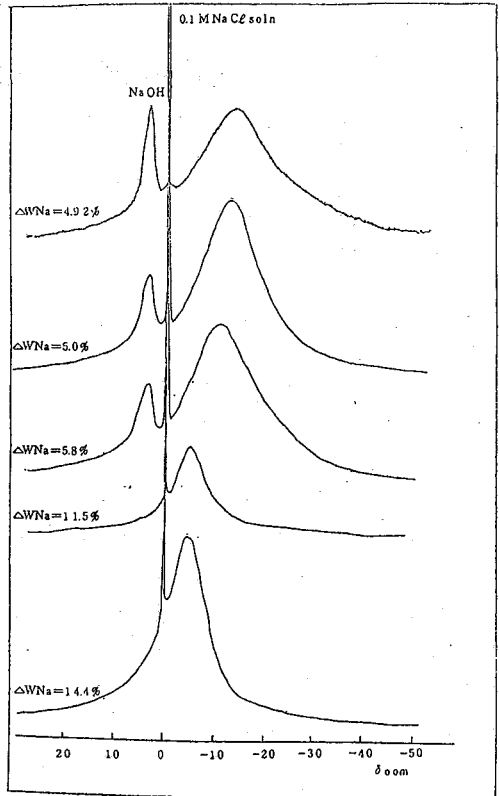


図1. 含水率(ΔW_{Na})を変えた場合のフレミオン膜の ^{23}Na -NMRスペクトル(105.9MHz)

2. 測定温度とケミカルシフト

測定温度を変化させた場合のケミカルシフトの変化を図3に示す。高温になるにつれてケミカルシフトは低磁場側へシフトすることがわかった。

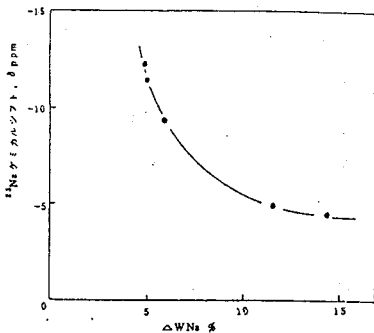


図2. フレミオン膜の吸水率(ΔW_{Na} %)と ^{23}Na -NMRケミカルシフトとの関係(105.9MHz)

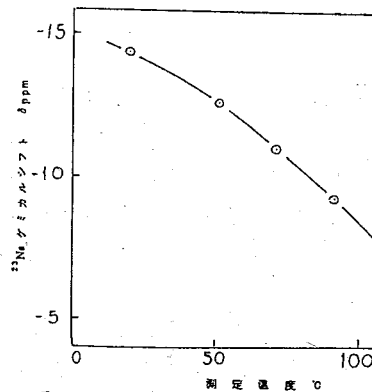


図3. ^{23}Na -NMRケミカルシフトと測定温度との関係

測定温度を高くすることで、 Na^+ イオンは膜中である程度束縛が解かれ、運動性が増して含水率が上昇した状態に近い挙動を示した。

3. ケミカルシフト・線幅の磁場強度による変化

同一試料・同一試料管で共鳴周波数の異なる4種のNMR装置；2.3T(^{23}Na 共鳴周波数 26.3 MHz)，4.7T (52.8 MHz)，6.3T (71.3 MHz)，9.4T (105.9 MHz)で測定を行った。代表的なスペクトルを図4に示す。膜に付着した苛性ソーダのケミカルシフトは共鳴周波数が変わり、でもほとんど変化しないが、膜中の Na^+ イオンのピークの線幅・ケミカルシフト共に大きく変化していることがわかる。表1にそれらの変化と、図5にケミカルシフトの変化を示す。

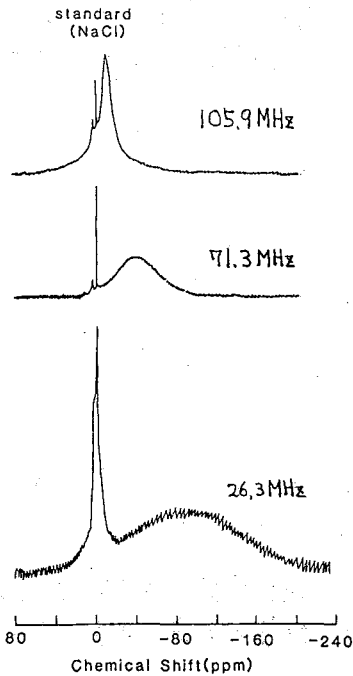


図4. イオン膜の ^{23}Na -NMRスペクトル

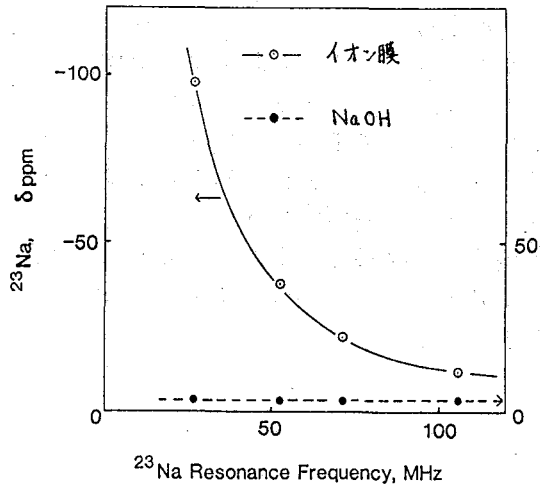


図5. ^{23}Na -NMRケミカルシフトと共鳴周波数との関係

表1. イオン膜中の Na^+ イオンのケミカルシフト・線幅の磁場強度による変化

磁場強度(T)	共鳴周波数(MHz)	ケミカルシフト(δ ppm)	線幅(Hz)
2.3	26.3	-10.5	3020
4.7	52.8	-21.1	2480
6.3	71.3	-39.4	1990
9.4	105.9	-91.7	1400

膜中のNa⁺イオンのケミカルシフトは大きく変化し、共鳴周波数が大きくなるにつれ低磁場へシフトすることが見いだされた。

磁場強度を変化させた際のイオン膜中のNa⁺イオンのピークの線幅の変化を図6に示す。共鳴周波数に対し、よい相関があることがわかった。

ケミカルシフトの磁場依存性については、固体¹³C-NMRにおいてポリエチレンの場合が報告されている³⁾が、そのケミカルシフト差は極めて小さく1ppm以下である。また、¹⁰⁹Ag, ¹¹³Cdなどでもいくつかの場合が報告されているが、やはり1~2ppm程度のケミカルシフトの変化である⁴⁾。このイオン膜中でのNa⁺イオンのケミカルシフトの変化は、Ramsey⁵⁾の指摘した「ケミカルシールドリングの磁場依存性」に相当するものであるが簡単に判断できないが、2.3Tから9.4Tの間で約80ppmのケミカルシフトの差が生じるのはかなり大きな変化であるといえる。膜中のカルボニル基との相互作用から、結合・非結合の間の平衡現象をとらえている可能性もあるが、このシフトの原因は明確でない。

非フッ素スルホン酸型イオン交換膜中のNa⁺イオンの測定においても、4.7Tから9.4Tまでで、約4ppmのケミカルシフトの変化を観測しており、イオン交換樹脂という極めて束縛された環境での測定であるが、ケミカルシフトの同様な変化が認められた。

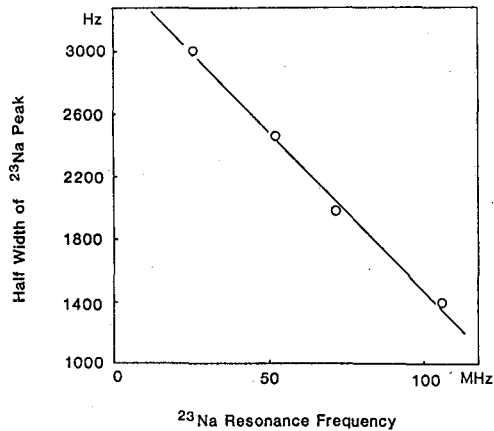


図6. ²³Na-NMRにおけるイオン膜中のNa⁺ピークの線幅と共鳴周波数の関係

References

1. R. W. Creekmore and C. N. Reilly, *Anal. Chem.*, **42**, 570 (1970)
2. R. A. Komoroski and K. A. Mauritz, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 7487 (1978)
3. D. L. Vander Hart, *J. Chem. Phys.*, **84**, 1196 (1986)
4. 遠藤一央, 山本京之介, 松下和弘, 出口健三, 第24回NMR討論会講演要旨集 B08 p77 (1985)
5. N. F. Ramsey, *Phys. Rev. A*, **1**, 1320 (1970)

モリブデン, タングステン, およびその混合金属
 クラスタ-錯体の ^{95}Mo および ^{183}W NMR

(東北大理) ○永澤 明・佐々木陽一・王巴特爾・猪狩伸治
 伊藤 翼

^{95}Mo and ^{183}W NMR of Molybdenum, Tungsten, and their Mixed Metal Cluster Complexes.

Akira Nagasawa, Yoichi Sasaki, Bateer Wang, Shinji Ikari, and Tasuku Ito
 (Faculty of Science, Tohoku University)

^{95}Mo and ^{183}W NMR chemical shifts of $[\text{W}^{\text{III}}_2\text{Cl}_9]^{3-}$, $[\text{W}^{\text{IV}}_3(\text{O})_4(\text{NCS})_9]^{5-}$, $[\text{M}^{\text{IV}}_3(\text{O})_2(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ ($\text{M}_3 = \text{Mo}_3, \text{Mo}_2\text{W}, \text{MoW}_2$, and W_3), and $[\text{M}^{\text{V}}_2(\text{O})_4(\text{edta})]^{2-}$ ($\text{M}_2 = \text{Mo}_2, \text{MoW}$, and W_2) show clear trends that the shielding at Mo and W atom increases with an increase in the oxidation state, and on replacement of W with Mo in classes of mixed metal(IV) trinuclear and -(V) dinuclear complexes.

[緒言] モリブデンやタングstenは錯体化学的に興味深い特徴を示す。それは、(1)様々な酸化数を取りうる、(2)各酸化数に特徴的な多核クラスタ-構造の化合物をつくる、(3)それらは金属-金属間結合の生成に伴う特異的な性質を示す、などである。1) ^{95}Mo NMRはそれらの多様な化合物群の電子状態、構造、および動的性質を調べるための有効な手段であり、多くのデータが得られている。2) ^{183}W 核のNMRは、 W^{VI} 単核錯体、 W^{VI} ポリ酸、 W^{VI} や W^{IV} のカルボニル錯体などで知られているが、W-W直接結合を持つ化合物についての研究例は少なかった。本研究は、III価～V価のモリブデン及びタングsten錯体のうち、特に金属間直接結合を持つ二核と三核のクラスタ-錯体を対象とし、金属核化学シフトと電子状態、酸化数、金属間結合の強さとの関連を明らかにすることを目的とする。

[実験] 試料とした錯体の塩は、既知の方法に従って合成し、³⁾ D_2O または CH_3CN (CD_3CN) 溶液を調製した。機器は日本電子JNM-GX-400または500型FT-NMR装置を用い、20-27°Cで3000-60000回積算した。

[結果] 得られたスペクトルの例を図1に、錯体の構造を図2に示した。化学シフト(δ)とその錯体の中心金属の酸化数および金属原子間距離(M-M)を表2にまとめた。

表1 測定条件

	^{95}Mo	^{183}W
周波数 / MHz	26.08 or 32.59	16.67 or 20.84
パルス間隔 / s	0.2	1.0
化学シフトの標準	Na_2MoO_4 (1.0M/ D_2O)	Na_2WO_4 (1.0M/ D_2O)

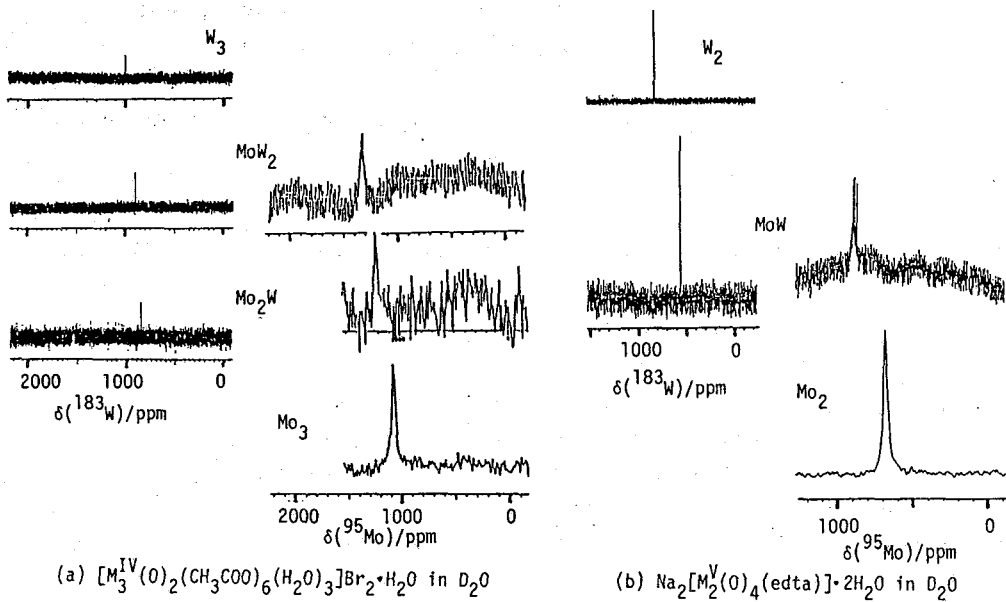


図 1. ^{183}W および ^{95}Mo の NMR スペクトルの例

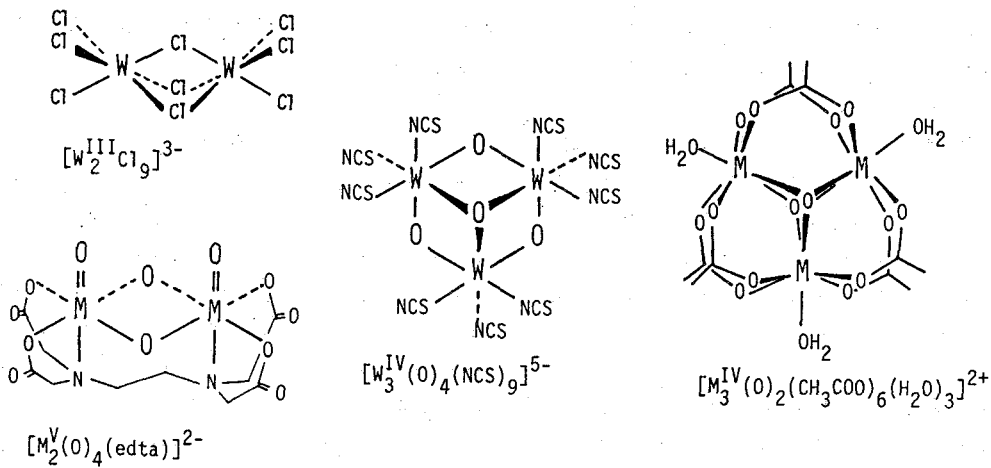


図 2. 錯体の構造

表 2. ^{183}W および ^{95}Mo の化学シフト

原子価	錯体	$\delta (^{183}\text{W})$	$\delta (^{95}\text{Mo})$	溶媒	$M-M^{(1)}$	その他
		ppm ^{a)}	ppm ^{b)}		Å	
II	$\text{W}_2(\text{O}_2\text{CCF}_3)_4$	6760	—	THF	(2.21)	(文献 e)
	$\text{Mo}_2(\text{O}_2\text{CCF}_3)_4$	—	4021	THF	2.09	(文献 f)
III	$\text{W}_2(\text{OBu}^t)_6$	4408	—	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	—	(文献 g)
	$\text{Mo}_2(\text{OBu}^t)_6$	—	2645	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	2.22	(文献 h)
	$\text{W}_2\text{Cl}_9^{3-}$	3539	—	CD_3CN	2.44	N_2 雰囲気
IV	$\text{W}_3\text{O}_4(\text{NCS})_9^{5-}$	2063	—	$\text{CH}_3\text{CN}^{\text{d)}$	2.54	N_2 雰囲気
	$\text{W}_3\text{O}_2(\text{OAc})_6^{2+}$	1005	—	D_2O	2.74	
	$\text{MoW}_2\text{O}_2(\text{OAc})_6^{2+}$	897	1360	D_2O	2.72	
	$\text{Mo}_2\text{WO}_2(\text{OAc})_6^{2+}$	848	1224	D_2O	—	
	$\text{Mo}_3\text{O}_2(\text{OAc})_6^{2+}$	—	1061	D_2O	2.77	
V	$\text{W}_2\text{O}_4(\text{edta})^{2-}$	798	—	D_2O	2.55	
	$\text{MoWO}_4(\text{edta})^{2-}$	549	877	D_2O	2.55	
	$\text{Mo}_2\text{O}_4(\text{edta})^{2-}$	—	612 ⁱ⁾	D_2O	(2.55)	

a) 1.0M $\text{Na}_2\text{WO}_4(\text{aq})$ 基準. b) 1.0M $\text{Na}_2\text{MoO}_4(\text{aq})$ 基準. c) 6.25% CD_3CN と 0.58M $\{(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}\}\text{NCS}$ を含む. d) $\delta (^{95}\text{Mo})=609\text{ppm}$ の報告あり. e) Santure et al., Inorg. Chem., 22, 1877 (1983). f) Gheller et al., J. Am. Chem. Soc., 105, 1527 (1983) g) Minelli et al., Coord. Chem. Rev., 68, 169 (1985). h) Young et al., cited in Ref 2a. i) () 内は同構造の類似化合物のデータ.

[考察] (1) M_2O_4 W核の化学シフトについての従来の知見 ^{183}W の化学シフトは W^{VI} ポリ酸の大部分が +300 ~ -300 ppm, 0 ~ II 価のカルボニル錯体や IV ~ VI 価の単核錯体では -300 ~ -3500 ppm であり, 酸化数が低くなると高磁場 (高しゃへい) 方向に移行する傾向がみられる.^{2,4)} ^{95}Mo 化学シフトも全く同様の傾向を示し, 対応する化合物の ^{183}W と ^{95}Mo の化学シフトの比は $\delta (^{183}\text{W})/\delta (^{95}\text{Mo}) = 1.7 \pm 0.1$ になるとされている.²⁾

(2) 二核および三核錯体での知見 ^{95}Mo , ^{183}W NMR シグナルとも, 同じ酸化数の単核錯体よりかなり低磁場に現れる. 中心金属の酸化数が低いほど, シグナルは低磁場に移る. また対応する錯体の ^{183}W と ^{95}Mo の化学シフトどうしの関係は $\delta (^{183}\text{W})/\delta (^{95}\text{Mo}) = 0.95 - 1.3$ と, 従来知られているものとはかなり異なる値を示している.

M^{VI} 間に架橋配位子がなく強い $\text{M}-\text{M}$ 結合を持つ $\text{W}_2(\text{t-BuO})_6$ や $\text{M}-\text{M}$ 四重結合のある W^{VI} 錯体では $[\text{W}_2\text{Cl}_9]^{3-}$ よりさらに低磁場にシグナルが現れる. 一般に, 多核錯体では低酸化数ほど金属間結合が強くなり (多重結合性が増す), $\text{M}-\text{M}$ 距離が短くなる (表 2). 金属間結合が強くなると, 金属核は脱しゃへいされると考えれば, 化学シフトの傾向が説明できる. Mo と W では価電子が金属間結合に関与する程度が異なるので, $\delta (^{183}\text{W})/\delta (^{95}\text{Mo})$ が単核錯体と異なるのであろう.

(3) $\text{Mo}^{\text{V}}\text{-W}^{\text{V}}$ 混合三核錯体および $\text{Mo}^{\text{V}}\text{-W}^{\text{V}}$ 混合二核錯体

$[\text{M}_3(\text{O})_2(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ および $[\text{M}_2(\text{edta})]^{2-}$ 錯イオンでは, $\text{M}_3 = \text{W}_3, \text{Mo}_2\text{W}, \text{Mo}_2\text{W}$ または $\text{M}_2 = \text{W}_2, \text{MoW}$ の順に ^{183}W の化学シフトが高磁場に移り, ^{95}Mo の化学シフトは $\text{M}_3 = \text{Mo}_3, \text{Mo}_2\text{W}, \text{MoW}_2$ および $\text{M}_2 = \text{Mo}_2, \text{MoW}$ の順に低磁場に移る(図2). すなわち, 骨格のWを順次Moで置換すると $^{183}\text{W}, ^{95}\text{Mo}$ 共に高磁場に移る. 骨格構造には変化がなく, M-M距離はWをMoに置換してもほとんど変わらないから, この化学シフトの変化は電子的要因によるものと考えられる. 前項で述べた, 低酸化数ほど低磁場シフトするという経験則に照らして考えれば, この混合金属錯体中のW原子は W_3 または W_2 錯体中よりもいくぶん高酸化状態にあり, Mo原子は Mo_3 または Mo_2 錯体中よりもいくぶん低酸化状態にあることを示している. 言い替えば, 電子がMo-W結合を通してWからMoへ流れこんでいると考えることができる. X光線電子分光によるMoとWのd電子の結合エネルギーのシフトもこの結果を支持する.⁴⁾

(4) Mo^{V} および W^{V} 錯体の骨格構造および配位子の影響

" $\text{M}_3(\text{O})_4$ " 型骨格を持つ $[\text{W}_3(\text{O})_4(\text{NCS})_9]^{5-}$ がかなり低磁場にシグナルを示すのに対して, " $\text{M}_3(\text{O})_2(\text{CH}_3\text{COO})_6$ " 型骨格の錯体群の ^{183}W 化学シフトは +1000ppm付近であり, 骨格構造が大きく影響するかのごとくに見える. 実際, 後者の方がM-M距離が長い. Popeらは $[\text{W}_3(\text{O})_4(\text{H}_2\text{O})_9]^{4+}$ の化学シフトを +1138ppm (飽和p-トルエンスルホン酸/ D_2O) と報告しており, " $\text{M}_3(\text{O})_4$ " 型の Mo^{V} 錯体が類似の条件で +990~+1162ppmにシグナルを示すことと考え合わせると次の結論が導かれる.

(a) この2種の骨格構造間では金属核の化学シフトに大きな違いはみられない.

(b) $[\text{W}_3(\text{O})_4(\text{NCS})_9]^{5-}$ が極めて低磁場にシグナルを示すのは, 配位子NCS⁻が中心金属との間に π 結合も形成可能であることと関連していると思われる.

[謝辞] 中村義之博士(東工大 資源研)および松下和弘氏(日本電子)には測定に際して大変お世話になりました. 中田耕氏, 原島和男氏(東北大理)には実験上のご援助いただきました. 記して感謝いたします. なおこの研究の一部は分子科学研究所の協力研究(1986-1987)として行われた.⁵⁾

[文献] 1) E.I. Stiefel, *Progr. Inorg. Chem.*, **23**, 1 (1975); Z. Dori, *ibid.*, **28**, 239 (1981)
2) a) M. Minelli, et al., *Coord. Chem. Rev.*, **68**, 169 (1985). b) R.A. Grieses and J. Mason, *Polyhedron*, **5**, 415 (1986). 3) a) M. Segawa and Y. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5565 (1985). b) A. Bino, et al., *Inorg. Chem.*, **17**, 3245 (1978). c) B. Wang, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6059 (1986). d) A. Bino, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 243 (1981); M. Ardon, et al., *Inorg. Chem.*, **21**, 1912 (1982). e) J. Novak and J. Podlaha, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **36**, 1061 (1974); S. Khalil, et al., *Inorg. Chem. Acta*, **25**, L83 (1977). f) S. Ikari, et al., to be published. g) R. L. Pecsok and D. T. Sawyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5496 (1956). 4) B. Wang, et al., *Chem. Lett.*, *in press*. 5) A. Nagasawa, et al., *Chem. Lett.*, **1987**, 1271.

四重結合を持つ Mo クラスター化合物の Diamagnetic Anisotropy

(近畿大・理工, テキサスA&M 大*)○北川 進, F. A. Cotton*

Diamagnetic Anisotropy of Mo⁴-Mo Bond in Mo₂Cl₄(PP')₂ Type Complexes

Susumu KITAGAWA and F. Albert COTTON*

(Department of Chemistry, Kinki University, and Department of Chemistry and Laboratory for Molecular Structure and Bonding, Teaxs A&M University)

Two components ($\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$ and $\chi_{\parallel} - \chi'_{\perp}$) of magnetic anisotropy of Mo⁴-Mo quadruple bonds have been first obtained by using the latest X-ray crystallographic molecular structure and the low temperature ¹H NMR spectrum of α -Mo₂Cl₄((C₆H₅)₂PCH₂CH₂P(p-RC₆H₄)₂)₂ (R=H(dppe); CH₃(dpdt), and tert-C₄H₉-(dpdbp)). The values of $\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$ and $\chi_{\parallel} - \chi'_{\perp}$ for dpdbp case are $-(8470 \pm 200) \times 10^{-36}$ and $-(5540 \pm 70) \times 10^{-36}$ m³/molecule, respectively.

1960年代の初期に実験, 理論両面からその存在が明らかにされた金属-金属結合を有する遷移金属錯体クラスター化合物はその後多種多様なものが合成され, 現在無機化学の分野で最も注目され, 発展著しい分野になっている⁽¹⁾。金属-金属結合は一~四重結合まで存在する。表1に各金属元素についてこれまで合成された系の最高結合次数を与えた。四重結合は有機化合物では存在しない結合であり, 表1に示した各金属元素の d⁴ 電子配置のイオンのみがこの結合の生成に関与する。M-Mの電子配置は $\sigma^2 \pi^4 \delta^2$ と表わされる。この四重結合を有する系を含め, 多重金属を有するクラスター化合物の構造, 理論化学は Cotton らにより精力的に研究が行なわれた。四重結合は構造上, M⁴-M間距離が通常金属の M-M 間距離より短い, $\delta \rightarrow \delta^*$ 遷移吸収帯が可視部に現れる等の特徴的な点があるが, 結合性についての情報は理論計算を除いて実験的に得ることは困難である。

遷移金属錯体クラスター化合物の NMR スペクトルの解析において, 金属-金属多重結合がアセチレン等の多重結合系同様大きな diamagnetic anisotropy を持つことが San Flippo⁽²⁾ によって示唆された。McGlinchey⁽³⁾ は Cotton と Chisholm の合成し単結晶 X線構造解析を行なった⁽⁴⁾ M₂(NMe₂)₆ (M=Mo, W) の構造パラメータを用いて三重結合系の diamagnetic anisotropy を見積った。それは -1800 ~ 1900 × 10⁻³⁶ m³/molecule とアセチレン(C≡Cの -340 × 10⁻³⁶ m³/molecule) の約5倍の大きさを持つことを示した。四重結合については Cotton⁽⁵⁾ らにより, Mo₂(RCOO)₄系で見積もった報告があるが, 精度の問題で信頼性のあるデータと

表 1. 金属-金属結合を与える遷移金属とその最高結合次数

(V~VII族)					
V	Cr	Mn	Fe	Co	
Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	
Ta	W	Re	Os	Ir	

注) 実線枠: 四重結合, 点線枠: 三重結合, 一点鎖線: 二重結合, 無枠: 一重結合

はいい難い。これは ① 四重結合を有する系の合成と単結晶化の困難さ, ② NMR スペクトルの測定が困難(溶けにくい)なためである。演者らは $\text{Mo}_2\text{X}_4(\text{P-P})_2$ 型 (P-P : 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane およびその誘導体)四重結合系を合成し, その ^1H NMR スペクトルの測定, 単結晶 X線構造解析に成功し, この系の diamagnetic anisotropy を見積ったので報告する。

[実験方法] (1)合成 1-bis(diphenylphosphino)-2-bis(di-p-alkylphenylphosphino)ethane (alkyl= CH_3 , (dpdt); t- C_4H_9 , (dpdbp)) は p-alkylbromobenzene からグリニヤール試薬を経て, PCl_3 との反応で tri(p-alkylphenyl)phosphine を合成し, Li または K 処理し, その後加水分解して di(p-alkylphenyl)phosphine を合成し, これと t-BuOK 下, diphenylvinylphosphine との反応から得た。

$\text{Mo}_2\text{Cl}_4(\text{P-P})_2$ は $\text{K}_2\text{Mo}_2\text{Cl}_8$ とメタノール中でアルゴン下, 3 時間還流し, カラムクロマト分離により精製し, 緑色の固体を得た。単結晶はメタノール/ヘキサンより得た。

(2) X線構造解析 反射強度の測定は Enraf Nonius 自動 X線回折計を用いて ω - 2θ 法で, Mo-K α 線を用い, $4 \leq 2\theta \leq 45^\circ$ 範囲の反射を測定した。構造は Patterson map で Mo 原子の位置を決定し, 精密化はブロック対角化近似最小二乗法により, 異方性温度因子を仮定して行ない, 最終的に SHELX-76 プログラムを用いて解を得た。最終 R 値は $\text{Mo}_2\text{Cl}_4(\text{dpdt})_2$ で $R=0.051$ ($R_w=0.068$)⁽⁶⁾, $\text{Mo}_2\text{Cl}_4(\text{dpdbp})_2$ で $R=0.0796$ ($R_w=0.105$)⁽⁷⁾ であった。

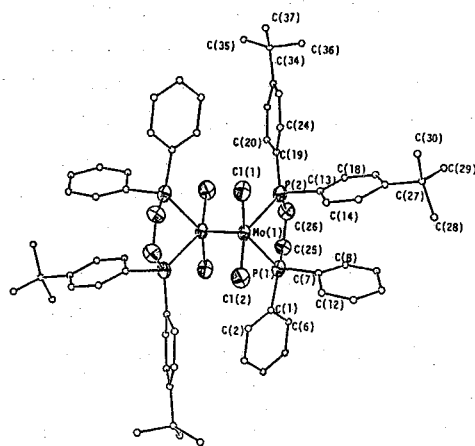


図1. anti- $\text{Mo}_2(\text{dpdbp})_2$ の X線構造

(3) ^1H NMR の測定 ^1H NMR スペクトルは varian XL-400 spectrometer を用い, 低温 (-25°C , -90°C) にて測定した。溶媒には CD_2Cl_2 を用いた。

[方法] 静磁場を \vec{H}_0 , またこの時誘起される磁気モーメントを $\vec{\mu}$ とすると $\vec{\mu} = \chi \vec{H}_0$ (1)

χ は磁化率テンソルであり, ここでは結合の磁化率のみを問題とする。この磁化率により観測される ^1H 核吸収線のシフトは一般的に次式であらわされる。

$$\Delta\sigma = 1/3r^3 \sum \chi_{ll} (1-3\cos^2\theta_{ll}) / 4\pi \quad (2)$$

r は結合の中心から観測核までの距離, θ_{ll} は軸 l と r とのなす角, ここで χ_{ll} を結合軸方向, $\chi_{\perp l}$, $\chi'_{\perp l}$ をこれに垂直な方向として, $\theta_{\perp l}$, $\theta'_{\perp l}$ を r と結合に垂直な軸とのなす角とすると

$$\Delta\sigma = 1/3r^3 [(\chi_{ll} - \chi_{\perp l})(3\cos^2\theta_{\perp l} - 1) + (\chi_{ll} - \chi'_{\perp l})(3\cos^2\theta'_{\perp l} - 1)] / 4\pi \quad (3)$$

となる。ここで $\chi_{\perp l} = \chi'_{\perp l}$ の時 (軸対称)

$$\Delta\sigma = 1/3r^3 (\chi_{ll} - \chi_{\perp l})(1-3\cos^2\theta) / 4\pi \quad (4)$$

本研究における dpdt (又は dpdbp) の CH_2CH_2 の 2つのプロトンは図2におけるように Mo-Mo 結合に対して異なる環境にある (distal, proximal)。この 2つのシフト値は diamagnetic anisotropy の差に対応すると考えられる。

$$\Delta = \Delta\sigma(\text{proximal}) - \Delta\sigma(\text{distal}) \quad (5)$$

このプロトンの位置は単結晶構造解析によりえられた CH_2CH_2 の炭素の位置に理論的に C-H 1.09 Å, C-C-H 109.0°, H-C-H 109.5° を仮定して得た。

$$G = (3\cos^2\theta - 1)/3r^3 \quad (6)$$

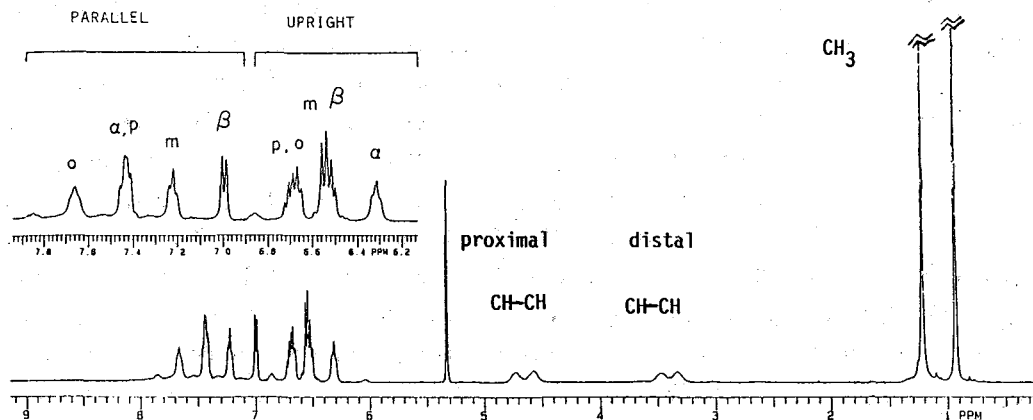


図2. $\text{Mo}_2\text{Cl}_4(\text{dpdbp})_2$ の ^1H NMR スペクトル

表2. Geometric Factor^a for Proximal (H(1) and H(3)) and Distal (H(2) and H(4)) Protons of $\alpha\text{-Mo}_2\text{Cl}_4(\text{PP}')_2$

PP'		r (Å)	θ_1' (deg)	θ_2'' (deg)	G_{\perp}^a	G_{\parallel}^a
dppe	H(1)	3.978	108.2	18.2	-3.752	9.046
	H(2)	4.769	103.0	24.4	-2.609	4.567
	H(3)	3.724	74.3	16.2	-5.037	11.401
	H(4)	4.727	75.6	23.0	-2.573	4.986
dpdt	H(1)	3.645	106.1	17.2	-5.299	11.974
	H(2)	4.676	105.2	21.2	-2.588	5.240
	H(3)	3.912	71.9	18.1	-3.961	9.521
	H(4)	4.725	77.9	23.1	-2.741	4.858
dpdbp	H(1)	3.655	105.7	16.2	-5.320	12.056
	H(2)	4.687	104.7	23.0	-2.608	5.076
	H(3)	3.947	72.6	17.4	-3.972	9.393
	H(4)	4.742	78.1	24.3	-2.730	4.660

^aUnit in $\times 10^{27} \text{ m}^{-3}$. The distance of C-H is 1.09 Å and the angle of C-C-H is 109°

とすると

$$\Delta\sigma = (\chi_{\parallel} - \chi_{\perp})\{(G_{\perp}^p - G_{\perp}^d)\} + (\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}')\{(G_{\perp}^d - G_{\perp}^p)\} \quad (7)$$

となる。2組のシグナルを観測することにより、(7)式から $\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$ 、 $\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}'$ が求められる。

[結果, 考察] 図2に $\text{Mo}_2\text{Cl}_4(\text{dpdbp})_2$ の ^1H NMR スペクトルを示した。1 ppm 付近, 6~8 ppm のメチル, 芳香族領域はこの系の anti, syn 二種の異性体のシグナルを与えている。この件については別に発表した⁽⁶⁾。本研究では問題とする 3~5 ppm の領域に注目する。3.33, 3.49 ppm のグループAのシグナル対と 4.58, 4.74ppm のグループBのシグナル対は図3におけるように CH_2CH_2 部分の distal, proximal プロトンシグナルに対応する。さらに各グループの2つのシグナルは非対称ホスフィン $(\text{BuC}_6\text{H}_5)_2\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ の $(t\text{-BuPh})_2\text{PCH}_2$ と $(\text{Ph})_2\text{PCH}_2$ に帰属される。これより2つのシグナルの差は $\Delta = 1.25$ ppm となる。 $\text{Mo}_2\text{Cl}_4(\text{dpdbp})_2$ (図3)に示したように2つのリン原子を結ぶベクトルと平行な方向を x 軸と定義し, χ_{\perp} をこの方向にとる。これより $\text{Mo}_2\text{Cl}_4(\text{dpdbp})_2$ の原子座標から r, θ, G を計算したものを表2に示した。あわせて $\text{P-P}=\text{dpdt}, \text{dppe}$ の系も示した。この値から式(7)を用いて $\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}, \chi_{\parallel} - \chi_{\perp}'$ に対応する diamagnetic anisotropy が容易に得られた。その値を表3に示した。得られた diamagnetic anisotropy, $\Delta\chi = \chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$, $\Delta\chi' = \chi_{\parallel} - \chi_{\perp}'$ は $\text{Mo}=\text{Mo}$ のそれに比べて $\Delta\chi$ で5倍, $\Delta\chi'$ で4倍もあり, 極めて大きな値を持つ。 Mo-Mo 四重結合性を調べる上で重要なデータと考えられる。

表3. Magnetic Anisotropy of Quadruple and Triple Bonds

Compound	$\times 10^{-36}$ ($\text{m}^3/\text{molecule}$)	
	$\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$	$\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}'$
$\alpha\text{-Mo}_2\text{Cl}_4(\text{dppe})_2$	-9340 ^b	-6300 ^c
$\alpha\text{-Mo}_2\text{Cl}_4(\text{dpdt})_2$	-8200 ^b	-5830 ^c
$\alpha\text{-Mo}_2\text{Cl}_4(\text{dpdbp})_2$	-8470	-5540 ^d
$\text{Mo}_2(\text{NMe}_2)_6$	-1784 ^e	
$\text{W}_2(\text{NMe}_2)_6$	-1960 ^e	

^a χ_{\parallel} is a value along with a metal-metal bond. χ_{\perp} and χ_{\perp}' are values along with axes defined in Figure 1, respectively.

^b Error limit, $\pm 200 \times 10^{-36} \text{ m}^3/\text{molecule}$. ^c Error limit, $\pm 70 \times 10^{-36} \text{ m}^3/\text{molecule}$. ^d Error limit, $\pm 90 \times 10^{-36} \text{ m}^3/\text{molecule}$.

^e Ref. 3. $\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$ ($\chi_{\perp} = \chi_{\perp}'$)

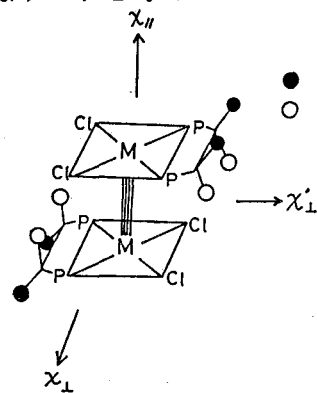


図3. 座標系

(●distal, ○proximal)

(文献)(1) F. A. Cotton and R. A. Walton, "Multiple Bond Between Metal Atoms", Wiley, N. Y., 1982. (2) J. San Filippo, Inorg. Chem., 1972, 11, 3140. (3) M. J. McGlinchey, ibid., 1980, 19, 1932. M. J. McGlinchey, et. al., Organometallics, 1986, 5, 104. (4) M. H. Chisholm, F. A. Cotton, et. al., J. Am. Chem. Soc., 1976, 98, 4469. ibid., 1976, 98, 4477. (5) F. A. Cotton, et. al., Polyhedron, 1986, 5, 899. (6) F. A. Cotton and S. Kitagawa, Inorg. Chem., 1987. in press. (7) F. A. Cotton and S. Kitagawa, Polyhedron, 1988. in press.

^{113}Cd NMR. 速い化学交換反応を有するCd(II)錯体の
溶液内平衡の研究

(近畿大・理工) ○宗像 恵, 北川 進, 田村義隆

^{113}Cd NMR. Studies on the Equilibrium of Cadmium(II) Complexes having the
Rapid Chemical Exchange in Solution

Megumu Munakata, Susumu Kitagawa and Yoshitaka Tamura

(Department of Chemistry, Kinki University)

Cadmium(II) complexes with 4-methyl-pyridine(4-Mepy), 3-Mepy and 2-Mepy do not have a large stability constant. In solution, some species coexist at equilibrium and their chemical exchanges are very rapid on the NMR time scale at ambient temperature. The chemical exchange rates of the Cd(II) complexes in ethanol solution were successfully reduced by the use of low temperature (-90°C), and all ^{113}Cd resonances of $\text{Cd}(2\text{-Mepy})_n^{2+}$ ($n=0\sim 2$), $\text{Cd}(3\text{-Mepy})_n^{2+}$ and $\text{Cd}(4\text{-Mepy})_n^{2+}$ ($n=0\sim 4$) were observed and assigned. The ^{113}Cd nucleus shielding of the complexes were found to decrease with increasing pKa of the ligands.

1. 金属核NMRは金属化合物の溶液内反応を研究する有力な手段として期待されている。しかし、それに答えられる状況では必ずしもない。これは大部分の金属イオンが置換活性(labile)であることによる。



(1)式に示すような化学交換反応がNMR time scale より速い場合、溶液中に存在する複数の化学種の金属核NMRシグナルは平均化された一本のシグナルしか与えない。ここでMは金属イオン, Lは配位子である。このため溶液中の金属核NMRの研究はしばしば困難を伴う。 ^{59}Co NMRの研究が他の金属核と比較して著しく突出した成果を上げている大きな理由はコバルト(III)錯体が置換不活性であることによる。ところでd¹⁰金属であるCd²⁺イオンは配位子場の安定化エネルギーがないため、置換活性なイオンである。演者らはCd(II)錯体の化学交換反応をNMR time scale より遅くするために、低温(-90°C)で測定を行い、平衡状態にある7種のCd(II)-イミダゾール錯体 $\text{Cd}(\text{im})_n^{2+}$ ($n=0\sim 6$)のすべてのシグナルを観測することに成功した¹⁾。2.-メチル-ピリジン(2-Mepy)及び3-メチル-ピリジン(3-Mepy)はイミダゾール同様、単座配位子で、安定度定数も大きくなく、そのCd(II)錯体は溶液中では複数の化学種が存在する。今回はこれら錯体の ^{113}Cd NMRシグナルを観測し、 ^{113}Cd NMRの化学シフトと錯体の構造及びCd-N結合との関係について検討した。

2. Cd²⁺イオンはすべて $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ を用いた。NMRの測定はJeol FX-200 およびGX-270 NMR spectrometer を用いた。 ^{113}Cd NMRのシフトの基準には0.1 M $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ 重水溶液を用いた。

3. Fig. 1に $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ と4-メチル-ピリジン(4-Mepy)のモル比が1:3のアルコ

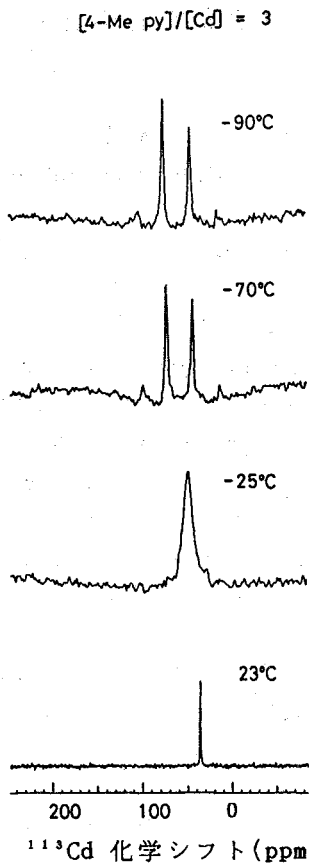


Fig. 1 0.5M $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ と 1.5M 4-Mepy を含むでエタノール溶液の ^{113}Cd NMR スペクトル

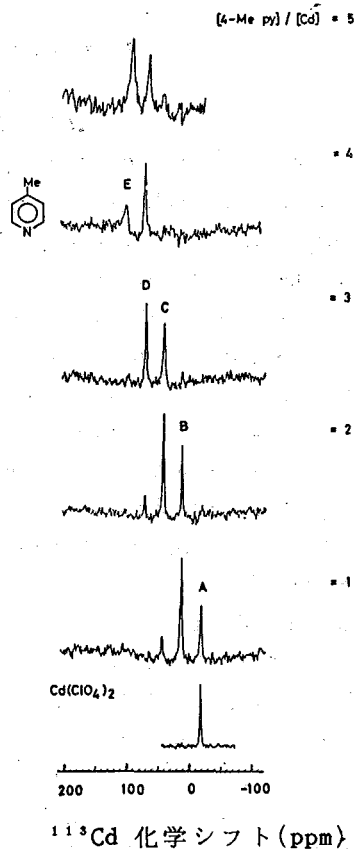
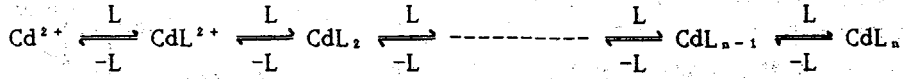


Fig. 2 $[4\text{-Mepy}]/[\text{Cd}]$ を変化したエタノール溶液の ^{113}Cd NMR スペクトル ($[\text{Cd}^{2+}] = 0.5\text{M}$; -90°C)

ール溶液中の ^{113}Cd NMR スペクトルを示す。23°Cでは1本のシグナルのみを与えた。-25°Cに冷却すると幅広いシグナルになり、-70°Cでは分裂した2本のシグナルを与えた。さらに-90°Cに冷却しても化学シフトおよび線幅は変化せず、2種の化学種に対応するシグナルであることを示している。この2本のシグナルは高磁場側から $\text{Cd}(4\text{-Mepy})_2^{2+}$ と $\text{Cd}(4\text{-Mepy})_3^{2+}$ に帰属されるシグナルである。つまり、-70°C以下ではカドミウム(II)-4-Mepy錯体の化学交換反応はNMR time scaleより遅いことが理解される。-90°C エタノール溶液中、モル比 $[4\text{-Mepy}]/[\text{Cd}^{2+}]$ を変化した時の ^{113}Cd NMR スペクトルをFig. 2に示した。モル比が増大するにつれて低磁場側に新しいシグナルが現れ、合計7つのシグナルが観測された。通常、錯形成反応は段階的に起こることはよく知られている。従ってほとんど例外なく逐次生成定数は $K_1 > K_2 > \dots > K_n$ となる。ここで $K_n = [\text{ML}_n] / [\text{ML}_{n-1}][\text{L}]$ である。4-Mepy(L)と Cd^{2+} の錯形成反応はScheme 1で表わされる。

Scheme 1



従って, Fig. 2の7つのシグナル(A~E)は次のように帰属される. A = Cd^{2+} (-18 ppm), B = $\text{Cd}(\text{4-Mepy})^{2+}$ (14 ppm), C = $\text{Cd}(\text{4-Mepy})_2^{2+}$ (43 ppm), D = $\text{Cd}(\text{4-Mepy})_3^{2+}$ (70 ppm), E = $\text{Cd}(\text{4-Mepy})_4^{2+}$ (94 ppm). $\text{Cd}(\text{4-Mepy})_5^{2+}$ 及び $\text{Cd}(\text{4-Mepy})_6^{2+}$ のシグナルは観測されなかった. 各化学種間のシフト差をみると B-A = 32ppm, B-C = 29ppm, D-C = 27ppm, E-D = 24ppmで一定ではなく, 錯形成反応が進むにつれて配位子1コ当りの遮蔽効果は小さくなるという注目される結果を得た. これは上で述べたように高次錯体ほど逐次安定度定数が小さくなるという事実によく対応している.

3-Mepyについて -90°C でモル比 $[\text{3-Mepy}]/[\text{Cd}]$ を変化させたときの ^{113}Cd NMRスペクトルを Fig. 3に示した.

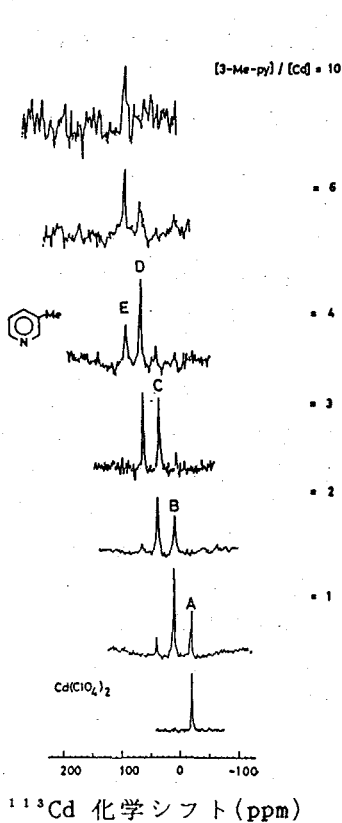


Fig. 3 エタノール溶液中のCd-3-Mepy錯体の ^{113}Cd NMRスペクトル (-90°C)

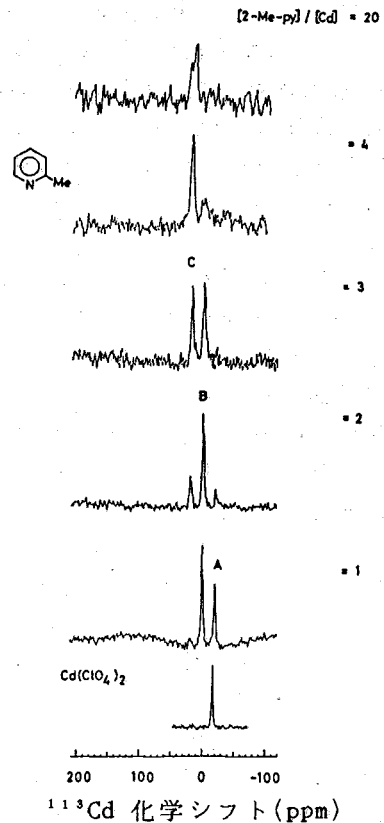


Fig. 4 エタノール溶液中のCd-2-Mepy錯体の ^{113}Cd NMRスペクトル (-90°C)

4-Mepyの場合と同様に, Cd(II)錯体の化学交換反応が遅くなるため, 溶液中の各化学種に対応する5つのシグナルがよく分離して観測された。これらのシグナル(A~E)は低磁場側より, A = Cd^{2+} (-18ppm), B = $\text{Cd}(\text{3-Mepy})^{2+}$ (14ppm), C = $\text{Cd}(\text{3-Mepy})_2^{2+}$ (43ppm), D = $\text{Cd}(\text{3-Mepy})_3^{2+}$ (70ppm), E = $\text{Cd}(\text{3-Mepy})_4^{2+}$ (94ppm)に帰属される。この場合も $\text{Cd}(\text{3-Mepy})_3^{2+}$ 及び $\text{Cd}(\text{3-Mepy})_4^{2+}$ のシグナルは観測されなかった。これらの配位子では4配位錯体までは容易に生成するがこれ以上の配位数のCd(II)錯体は生成しにくいものと考えられる。イミダゾールの6配位錯体 $\text{Cd}(\text{im})_6^{2+}$ が容易に生成されるのはCd(II)-im錯体の安定度定数 ($\log \beta_6 = 6.46$, $\log \beta_5 = 7.53$) が4-Mepy ($\log \beta_4 = 2.90$) や3-Mepy ($\log \beta_3 = 2.5$) に比べて極めて大きいことによる。

-90°Cにおけるエタノール溶媒中での Cd^{2+} -2-Mepy系の ^{113}Cd スペクトルをFig. 4に示した。3本のシグナルが観測され, 高磁場側より, A = Cd^{2+} (-18ppm), B = $\text{Cd}(\text{2-Me-py})^{2+}$ (1ppm), C = $\text{Cd}(\text{2-Me-py})_2^{2+}$ (20ppm)に帰属された。[2-Me-py]/[Cd^{2+}]=20でも1:3及び1:4錯体のシグナルは観測されなかった。2-Mepyが Cd^{2+} に配位する場合, メチル基とCdとの立体反発が生じるためと考えられる。Fig. 5にピリジン誘導体のCd(II)錯体の ^{113}Cd 化学シフトを配位子のpKaに対してプロットしたものである。すでに報告したように ^{113}Cd シグナルはpKaが大きくなるにつれて低磁場側にシフトすることが理解される。つまりCd(II)-N(ピリジン)結合が強くなるほど遮蔽が減少する。Fig. 5に示すように2-Mepyではこの関係から大きくずれている。2-MepyのpKaから予想されるよりも ^{113}Cd シグナルは高磁場にあり, Cd-N結合が弱いことを示している。

4-Mepyと3-Mepyでは1個あたりの ^{113}Cd NMRのシフトは32~24ppmであるが, 2-Mepyでは著しく小さく, 21ppmである。この2-Mepy1個当たりの ^{113}Cd NMRの小さなシフト幅は, 2-MepyではCd-2-Mepy結合がMe基の立体障害によって弱められていることを支持している。

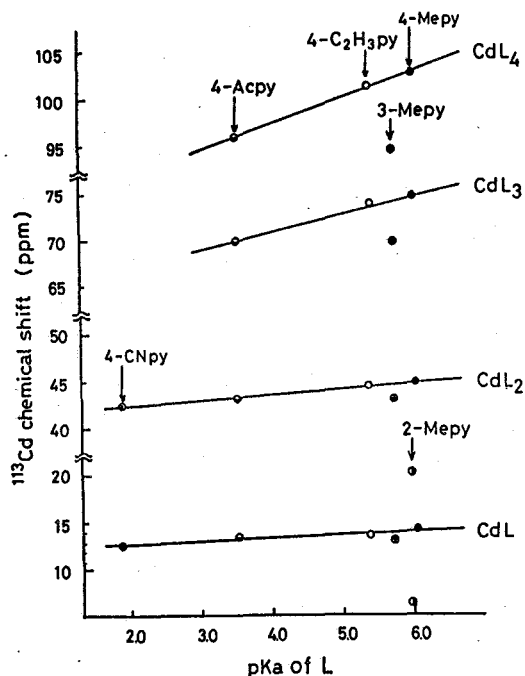


Fig. 5 $[\text{Cd}(\text{L})_n]^{2+}$ (L=ピリジン誘導体; n=1-4)の ^{113}Cd NMR化学シフトにおよぼす配位子(L)のpKaの効果

第 2 日

11 月 18 日 (水)

溶液内化学交換効果を考慮した核磁気共鳴法における
縦磁化回復と吸収スペクトル

(北大理) 〇市川和彦・神 隆

The Effect of Chemical Exchange on Energy Relaxation Process and Line Broadening in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Kazuhiko Ichikawa and Takashi Jin

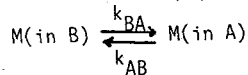
(Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University)

The influence of chemical exchange on the line shapes in the longitudinal magnetization recovery (LMR) curve and absorption spectra has been investigated. We derived, for the first time, a general solution of the coupled expressions for the time evolution of the longitudinal magnetization of sites A and B for the same kind of nuclei M, under the influence of chemical exchange reaction $M(\text{in B}) \rightleftharpoons M(\text{in A})$ in the presence of random molecular and atomic motion. The reaction, for the case where the product $R_{1,\alpha}^* \tau_\alpha$ ($\alpha=A$ or B) of the energy (spin-lattice) relaxation rate $R_{1,\alpha}^*$ and the lifetime τ_α is larger than ca. 1, gives a non-single-exponential decay of the recovery curve under the energy relaxation process. In the extreme rapid exchange (i.e., $R_{1,\alpha}^* \tau_\alpha \ll 1$) the magnitude of rate or time dependence of LMR associated with a single-exponential decay is determined by $f_A R_{1,A}^* + f_B R_{1,B}^*$.

溶液(拡散係数 $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, 粘性係数 1 cp 前後の値)内化学交換過程は, 構成粒子自身の揺動運動・プロトン移動・金属イオンの配位子置換・異重合体間, 異性体間, 異種多原子間の相互変換・結合と解離(例えば, 基質と金属イオン間での)挙動に相当する。核磁気共鳴法では, 対象を無損傷のまま, 特定の核のおかれている化学環境の違いを ppm の精度で識別可能である。高周波応答に対する溶液内化学交換効果を, 縦緩和(エネルギー緩和)と横緩和(位相緩和)の各ブロッホ方程式から出発して評価する。その結果, 化学交換反応の静的(化学種の濃度分率, 熱力学諸関数の変化量)と動的(化学種の寿命, 活性化状態のパラメータ)性質を決定可能である。特定の同一核種に対して各環境下のエネルギー緩和速度の決定は, 各環境下の溶質-溶質-溶媒相互作用に関する議論が可能になる。

[理論]

溶液内において, 同じ核種 M に対して相異なる 2 つの環境 A と B 下に存在している。2 つの溶存状態間で動力学的化学平衡



が成立している。核磁気共鳴法では, 各環境下での M 核は ppm の精度で相異なる共鳴周波数 ω_A 及び ω_B を示す。各環境状態下にある時間即ち寿命 τ_A 及び τ_B , 各状態下での M 核のエネルギー緩和速度(スピン-格子緩和速度) $R_{1,A}^*$ 及び $R_{1,B}^*$ を示す。¹⁾ 各寿命の逆数即ち A から B (B から A) の遷移確率 W_{AB} (W_{BA}) と各 $R_{1,\alpha}^*$ との比 $R_{1,\alpha}^* \tau_\alpha$ 及び $|\omega_A - \omega_B| / 2\pi$ の各値の大きさによって, 縦磁化時間発展とスペクトルの形状に対する化学交換反応効果の程度が決まる。尚, 上述の平衡式の正逆反応方向の速度定数 k_{BA} 及び k_{AB} は τ_B^{-1} 及び τ_A^{-1} に等しい。よって速度定

数と各環境下にある濃度分率 f_A と f_B との関係式は

$$f_A/f_B = k_{BA}/k_{AB}$$

相異なる化学環境 A と B 下に存在する同種核の縦磁化成分 $M_{z,A}$ と $M_{z,B}$ の時間発展は、溶液内化学交換反応効果によって次式で与えられる。

$$\frac{d(M_{z,A} - M_{z,A}^0)}{d\tau} = -(R_{1,A}^* + W_{AB}^0)(M_{z,A} - M_{z,A}^0) + W_{BA}^0(M_{z,B} - M_{z,B}^0) \quad (1)$$

$$\frac{d(M_{z,B} - M_{z,B}^0)}{d\tau} = -(R_{1,B}^* + W_{BA}^0)(M_{z,B} - M_{z,B}^0) + W_{AB}^0(M_{z,A} - M_{z,A}^0) \quad (2)$$

化学交換反応が成立している故、各成分の磁化回復は、相手側の時間発展と独立にはあつかえない。反転磁化回復法 ($\pi - \tau - \pi/2$ 法) では、(1) と (2) 式の一般解は²⁾

$$M_{z,A}(\tau) - M_{z,A}^0 = -2[M_{z,AA}^0 \exp(-R_{1,A}\tau) + M_{z,AB}^0 \exp(-R_{1,B}\tau)] \quad (3)$$

$$M_{z,B}(\tau) - M_{z,B}^0 = -2[M_{z,BA}^0 \exp(-R_{1,A}\tau) + M_{z,BB}^0 \exp(-R_{1,B}\tau)] \quad (4)$$

$$M_{z,A}^0 = M_{z,AA}^0 + M_{z,AB}^0; \quad M_{z,B}^0 = M_{z,BA}^0 + M_{z,BB}^0 \quad (5)$$

ここで、時定数の速度 $R_{1,\alpha}$ は $R_{1,\alpha}^*$ と τ_α ($\alpha = A$ と B) で表される。^{1, 2)}

$$R_{1,\alpha} = \frac{D \pm E^{1/2}}{2} \quad (6)$$

$$D = R_{1,A}^* + R_{1,B}^* + \frac{1}{\tau_A} + \frac{1}{\tau_B} \quad (7)$$

$$E = \left(R_{1,A}^* - R_{1,B}^* + \frac{1}{\tau_A} - \frac{1}{\tau_B} \right)^2 + \frac{4}{\tau_A \tau_B} \quad (8)$$

係数 $M_{z,AA}^0$, $M_{z,AB}^0$, $M_{z,BA}^0$ 及び $M_{z,BB}^0$ は $R_{1,\alpha}^*$, τ_α 及び $f_\alpha (= M_{z,\alpha}^0/M_z^0)$ で表される。但し、 $R_{1,A}^* > R_{1,B}^*$ とする。

$$M_{z,AA}^0/M_z^0 = [(D/2 + E^{1/2}/2 - D_B)f_A - f_B/\tau_B]/E^{1/2} \quad (9)$$

$$M_{z,AB}^0/M_z^0 = [(-D/2 + E^{1/2}/2 + D_B)f_A + f_B/\tau_B]/E^{1/2} \quad (10)$$

$$M_{z,BA}^0/M_z^0 = [-f_A/\tau_A + (D/2 + E^{1/2}/2 - D_A)f_B]/E^{1/2} \quad (11)$$

$$M_{z,BB}^0/M_z^0 = [f_A/\tau_A + (-D/2 + E^{1/2}/2 + D_A)f_B]/E^{1/2} \quad (12)$$

$$D_A = R_{1,A}^* + \tau_A^{-1} \text{ and } D_B = R_{1,B}^* + \tau_B^{-1} \quad (13)$$

全磁化 $M_z(\tau) [= M_{z,A}(\tau) + M_{z,B}(\tau)]$ の時間依存性は

$$M_z(\tau) - M_z^0 = -2[(M_{z,AA}^0 + M_{z,BA}^0) \exp(-R_{1,A}\tau) + (M_{z,AB}^0 + M_{z,BB}^0) \exp(-R_{1,B}\tau)] \quad (14)$$

$$M_z^0 = M_{z,A}^0 + M_{z,B}^0 \quad (15)$$

各環境下におけるエネルギー緩和速度と各環境間の交換速度定数(寿命の逆数)との比の値によって、(14)式の $M_z(\tau)$ とその時定数 $R_{1,\alpha}$ の評価が相異なってくる。

(I) 化学交換が存在しない時 (τ_α が無限大で $R_{1,\alpha}^* \tau_\alpha \gg 1$)、

$$M_z(\tau) - M_z^0 = -2[M_{z,A}^0 \exp(-R_{1,A}^*\tau) + M_{z,B}^0 \exp(-R_{1,B}^*\tau)] \quad (16)$$

(14) 式で $R_{1,A} = R_{1,A}^*$, $R_{1,B} = R_{1,B}^*$, 及び $M_{z,AA}^0 = M_{z,A}^0$, $M_{z,BB}^0 = M_{z,B}^0$, $M_{z,AB}^0 = M_{z,BA}^0 = 0$. 具体的な例として, アモルファス水素シリコン中及び液晶中の水素核の NMR 研究があげられる.

(II) かなり遅い化学交換速度の場合 ($R_{1,A}^* \tau_A \gg 20$)

$$M_z(\tau) = \sum_{\alpha}^{A,B} M_{z,\alpha}^0(\tau) \quad (17)$$

$$M_{z,\alpha}^0(\tau) = M_{z,\alpha}^0 [1 - 2 \exp(-R_{1,\alpha}^* \tau)] \quad (18)$$

(14) 式で $M_{z,AA}^0, M_{z,BB}^0 \gg M_{z,AB}^0, M_{z,BA}^0$. 例として, $AlCl_4^-$ と $AlCl_2^-$ との間の交換反応の場合で, 溶融クロロアルミナート系中の Al 核の NMR 研究があげられる.¹⁾

(III) 中間の化学交換速度の場合 ($R_{1,\alpha}^* \tau_{\alpha} \sim 1$), $M_z(\tau)$ 及び $R_{1,\alpha}$ は, (14) 式及び (6) 式で評価されるべきである. 例として $Al(III)$ の配位子 H_2O と SO_4^{2-} との配位子置換反応の場合で, $Al_2(SO_4)_3$ 水溶液中の Al 核の NMR 研究があげられる.⁵⁾

(IV) 非常に早い化学交換速度の場合 ($R_{1,\alpha}^* \tau_{\alpha} \ll 1$),

$$M_z(\tau) - M_z^0 = -2M_z^0 \exp(-R_{1,B} \tau) \quad (19)$$

但し, $R_{1,A}^* > R_{1,B}^*$ である. $M_{z,AB}^0/M_z^0$ 及び $M_{z,BA}^0/M_z^0$ は各々 f_A 及び f_B に限りなく近づき, $M_{z,AA}^0/M_z^0$ 及び $M_{z,BB}^0/M_z^0$ が零に限りなく近づく. (14) 式の $M_z(\tau)$ の時定数 $R_{1,\alpha}$ は,⁶⁾

$$R_{1,B} = f_A R_{1,A}^* + f_B^* R_{1,B}^* \quad (20)$$

$$R_{1,A} = \tau_A^{-1} + \tau_B^{-1} + f_B R_{1,A}^* + f_A R_{1,B}^* \quad (21)$$

よって, 測定される縦磁化回復の時間発展は指数型減衰で, $R_{1,B}$ 即ち各環境下のエネルギー緩和速度の相加平均量のみを測定から決定することができる. 配位子の水分子とバルクの水分子との交換速度は非常に早く, この場合に相当する.

[計算と議論]

図1(a) から明らかな様に, $R_{1,A}^* \tau_A \gg 20$ (但し, $R_{1,A}^* > R_{1,B}^*$) の時即ち (II) と (III) の場合, 全縦磁化回復の時間発展は非指数型の減衰を示している. 各環境下の磁化 $M_{z\alpha}(\tau)$

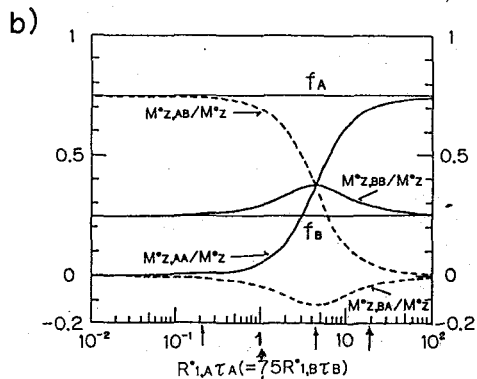
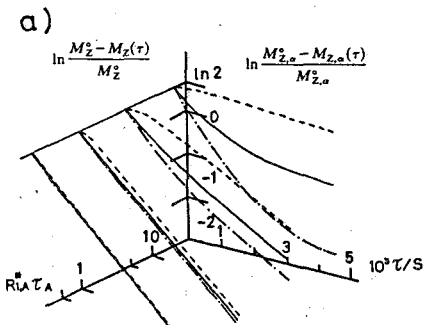


Figure 1. The effect of $R_{1,A}^* \tau_A$ (a) on the sum $M_Z(\tau)$ of sites A and B (—), (6) on $M_{Z,A}(\tau)$ of site A (---), and for $M_{Z,B}(\tau)$ of site B (----), and on the coefficients $M_{Z,\alpha\beta}^0/M_Z^0$ in eqns (9)-(12); they were calculated under the condition of $R_{1,A}^*/R_{1,B}^*=25$ and $f_A/f_B=3$ (i.e. $f_A=0.75$ and $\tau_A/\tau_B=3$). Each recovery curve was calculated at a given $R_{1,A}^* \tau_A$, the value of which locates at each vertical arrow, as shown in figure (b) of $M_{Z,\alpha\beta}^0/M_Z^0$ vs $R_{1,A}^* \tau_A$.

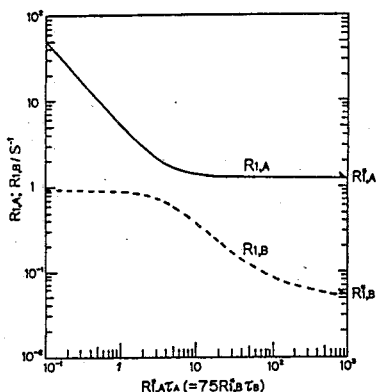


Figure 2. The effect of $R_{1,A}^* \tau_A$ on the calculated relaxation rates $R_{1,A}$ and $R_{1,B}$ under the condition as shown in figure 1.

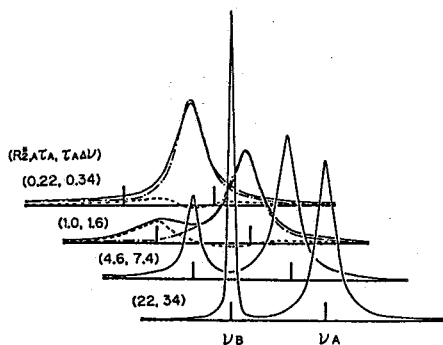


Figure 3. Several NMR spectra (total; —, A; --- and B; ----) calculated at various of $(\tau_A \Delta\nu, R_{1,A}^* \tau_A)$ vs ν under the condition as shown in figure 1.

の時間依存性も各々非指数型であり、値も異なる。他方 $R_{1,A}^* \tau_A \ll 1$ の時即ち(IV)の場合は、 $M_Z(\tau)$ と $M_{Z,\alpha}(\tau)$ は指数型減衰を示している。更に興味深い事は、各成分 $M_{Z,\alpha}(\tau)$ の時定数が遅い速度 $R_{1,B}$ (20 式) にいづれも同じになる事である。その理由は $M_{Z,\alpha\beta}^0$ の $R_{1,A}^* \tau_A$ 依存性(図1(b)) から明らかである。溶液内化学交換反応が認められる場合、観測された縦磁化回復から得られる時定数は、かならずしもエネルギー(スピン-格子)緩和速度ではない。各成分の時定数、速い速度 $R_{1,A}$ と遅い速度 $R_{1,B}$ の $R_{1,A}^* \tau_A$ 依存性を図2に示した。(I)の場合、 $R_{1,\alpha} = R_{1,\alpha}$ となり、(IV)の場合は $R_{1,B}$ と $R_{1,A}$ が(20)と(21)式の右辺の値に等しくなっている。尚、図1(b)の矢印↑に相当する各 $R_{1,A}^* \tau_A$ に対してNMRスペクトルの化学交換効果を図3に示した。(I)の場合は勿論、(IV)の場合も、2つの成分のスペクトルの重なりがほとんどない。これまで多く行われてきたスペクトルの化学交換効果に関する解析と縦磁化回復の時間発展に対しても同時に解析を行う必要がある。無機錯体系更には生物無機系を対象に⁷⁾、溶液内交換反応の機構及び溶質-溶質-溶媒の相互作用を明らかにしたい。

- References: 1) T. Matsumoto and K. Ichikawa, J. Am. Chem. Soc., 1984, 106, 4316. 2) K. Ichikawa, J. Chem. Soc., Faraday Trans., 2, 1986, 82, 1913. 3) e.g., K. Ichikawa, T. Matsumoto, T. Shibamura, T. Ito, K. Tsuji and S. Minomura, submitted to J. Electrochem. Soc. 4) K. Ichikawa and T. Matsumoto, J. Magn. Reson., 1985, 63, 445. 5) T. Jin and K. Ichikawa, submitted to J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1. 6) K. Ichikawa and T. Jin, Chem. Lett., 1987, 1179. 7) 市川和彦・神隆・和泉光則, 日本化学会誌, 投稿中。

* NMR測定は核磁気共鳴装置研究室(北大工学部・共同利用施設)内で行われた。

溶液内化学交換反応のキャラクタリゼーション
—多核の縦磁化回復とNMRスペクトル—

(北大理) ○神 隆・市川和彦

Characterization of Chemical Exchange Reaction on the Basis of its Effect on Longitudinal Magnetization Recovery and NMR Spectra

Takashi Jin and Kazuhiko Ichikawa

(Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University)

The NMR measurements were carried out for aqueous $Al_2(SO_4)_3$ solution between $-5^\circ C$ and $85^\circ C$ and for molten n-butylpyridium chloride + $AlCl_3$ mixture between $0^\circ C$ and $100^\circ C$: the ^{27}Al longitudinal magnetization recovery (LMR) was obtained from the free-induction decays measured by using inversion recovery method. The ^{27}Al NMR spectra consisted of two resonance signals due to $[Al(H_2O)_5SO_4]^+$ (=A) and $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ (=B) in the aqueous solution and due to $Al_2Cl_7^-$ (=A) and $AlCl_4^-$ (=B) in the molten salt. The static and kinetic properties of the dynamical equilibrium reaction $Al(\text{in A}) \rightleftharpoons Al(\text{in B})$ associated with exchange between different ligands H_2O and SO_4^{2-} or between different polyatomic species have been determined by reproducing the data of LMR and spectrum with the aid of the theory about the effect of chemical exchange on them.

溶液内化学交換は同一核種Mに対して、溶質-溶質-溶媒相互作用下での相異なる溶存状態の変化によって生じる。Mの各環境状態の安定度と存在率の大小と対応するが、静的性質の決定は重要である。状態間の変換過程での機構の究明も必要であり、動カ学的パラメーターの決定が不可欠である。その反応機構は、局所的な立体配座によって影響される、つまり特定の空間配座を取ること(フォールディング)によって始めて発現する。

溶液内化学交換反応の動的・静的性質を決定すべく、硫酸アルミニウム水溶液及び t-Butylpyridinium Chloride (BPCL) + $AlCl_3$ 室温イオン融体の ^{27}Al 核の縦磁化回復及び NMR スペクトルを測定し、化学交換効果を考慮したブロツホ方程式から導出した吸収スペクトル及び縦磁化回復の各式にもとづいてそれ等の測定値の再現を行なつた。溶液内化学交換反応の動的・静的性質及び各環境下のM核のエネルギー(スピン-格子)緩和を決定したので報告する。(スペクトルへの化学交換効果)

$Al_2(SO_4)_3$ 水溶液内
($Al_2(SO_4)_3$: H_2O : CH_3OH = 1:4:4)

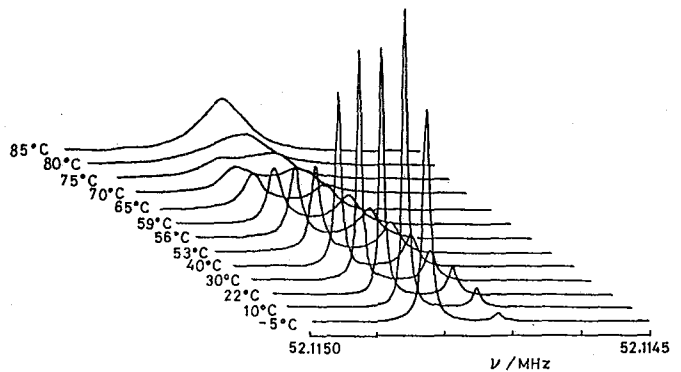
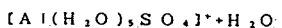
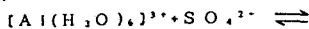


Figure 1. ^{27}Al spectra recorded at ca. 52.1 MHz in aqueous $Al_2(SO_4)_3$ solution between $-5^\circ C$ and $85^\circ C$. The spectra are displaced isomerically on a scale.

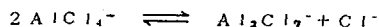
60.2, pH=3.)では, アコ錯体と配位水と SO_4^{2-} イオンとの間で次のような配位子置換反応



が起きている。温度 -5°C ~ 85°C における ^{27}Al 核スペクトルの温度依存性の測定結果を図1に示した。高磁場側のブロード化した、小さなピークは錯イオン $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_5\text{SO}_4]^{2+}$ (=A) のものであり、低磁場側のピークはアコ錯体 $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ (=B) 中の

ものである。室温以下で2つに分離していたピークは、温度上昇と共にみかけ上1つのピークへと顕著な形状変化を示した。2つの環境AとBとの顕著な化学交換効果がスペクトルの温度依存性に顕著に認められた。但し、ピークの半値巾が温度上昇と共に増加している事は、通常観測されるピークの尖鋭化とは逆の傾向である。後で議論するが、温度上昇と共にプロトン移動を伴う加水分解反応の寄与が顕著になるからである。

$\text{AlCl}_3 + \text{BPCl}$ 熔融塩 (61 mol% AlCl_3) の ^{27}Al 核スペクトルの温度依存性の測定結果を図2に示した。この系では、異重合体間の交換反応



が起きている。高温側で2つのピークが観測されたが、高磁場側のものが AlCl_4^- (=B) 中のものが低磁場側のものが Al_2Cl_7^- (=A) 中のものである。

[縦磁化回復への化学交換効果]

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 水溶液及び $\text{BPCl} + \text{AlCl}_3$ イオン融体の ^{27}Al 核の縦磁化回復の温度依存性を図3と4に各々示した。前者の場合、縦磁化回復は、何れの温度においてもほぼ指数型減衰を示す。低温側では、化学交換速度が遅く、異なる縦緩和速度を持つ2つの化学種からの寄与があるため磁化回復に屈曲が期待される。然し下ら、遅いエネルギー(スピン-格子)緩和速度を示す $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ (=B) の濃度が非常に大きい為に直線的になったと考えられる。よって図3の勾配は、室温以下では、 $R_{1,B}^*$ に相当して温度上昇と共に減少している。高温では温度上昇と共に勾配は逆に増加し、もはやエネルギー-緩和速度として評価できない。後者のイオン融体に対し、 50°C 以下で顕著な非指数型減衰であるのはかなり遅い化学交換速度の場合 ($R_{1,A}^* \tau_A \geq 20$, 前報を参照) である為であろう。 70°C 以上においても単純な指数型ではなく、中間領域ないし遅い交換速度 ($R_{1,A}^* \tau_A \geq 1$) を示すと考えられる。よって、縦磁化回復の時間依存性から直接 $R_{1,A}^*$ を決めることはできない。

[縦磁化回復及びスペクトルの計算]

縦磁化回復及びスペクトルへの溶液内化学交換効果に関する理論に基づいて、こ

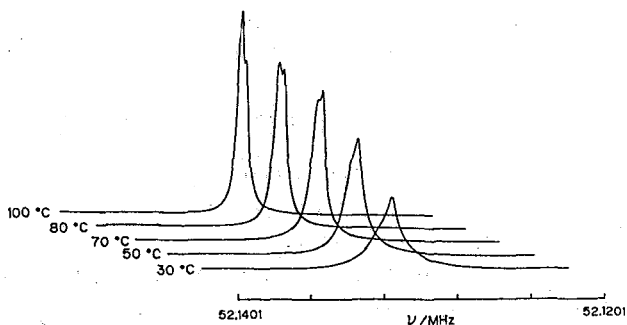


Figure 2. ^{27}Al spectra recorded at 52.1 MHz in molten $\text{BPCl} + \text{AlCl}_3$ at 61 ± 1 mol% AlCl_3 between 30°C and 100°C . The spectra are displayed isomerically on a scale.

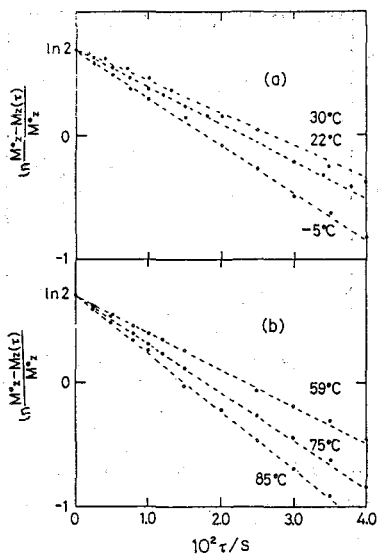


Figure 3. Typical data of ^{27}Al longitudinal magnetization recovery for aqueous $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ solution between -5°C and 85°C . The dashed line is a fit of the data to the theory.

れ等の観測値の再現を行った。その計算手順を図5に示した。理論式に表われたパラメータは、各環境AとBの濃度分率 f_A 、寿命 τ_A （即ち速度定数 $k_{AB} = \tau_A^{-1}$ ）、エネルギー緩和速度 $R_{1,\alpha}^*$ である。尚、2つの系に対して、スペクトルの温度依存性も又再現することができた。

〔溶液内化学交換反応の静的・動的性質〕

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 水溶液に注目して溶液内化学交換反応のキャラクタリゼーションの成果を示す。スペクトルのみの解析では決定不可能な、Al核に対し2つの異なる環境の濃度分布率の温度依存性を図6に示した。動力学的平衡式

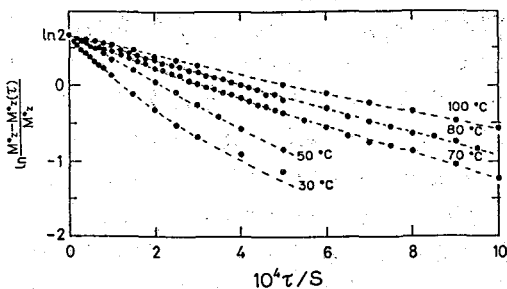
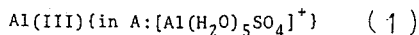
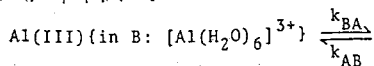


Figure 4. Experimental points of the longitudinal magnetization recovery for molten $\text{BPCl}+\text{AlCl}_3$ at 61 ± 1 mol% AlCl_3 between 30°C and 100°C . The dashed line is a fit of the data to the theory by using a nonlinear least-square method.

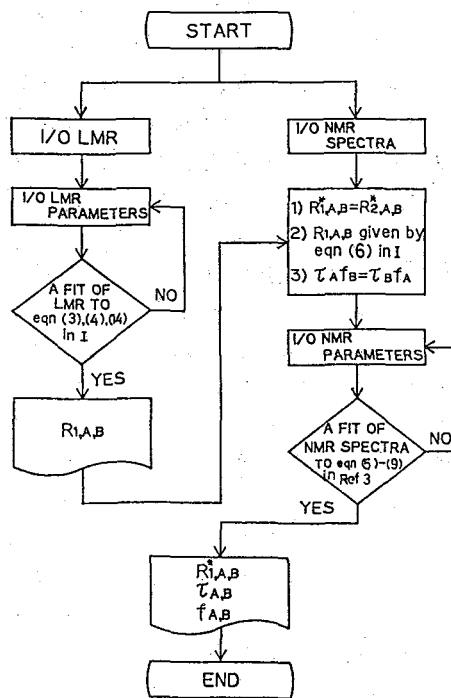


Figure 5. A flow chart of the calculation for a fit of the data of LMR and lineshape to the theory about the effect of chemical exchange on them.

の平衡定数 $K_{NMR} = f_A/f_B$ の温度依存性から決定した エンタルピー-, エンロピー及び Gibbs 自由エネルギーの変化量は、各々 $\Delta H^\circ = 28.7 \pm 0.5 \text{ kJ/mol}$, $\Delta S^\circ = 82.8 \pm 1.6 \text{ J/Kmol}$ 及び -5°C で $\Delta G^\circ = 63 \pm 0.4 \text{ kJ/mol}$ 且つ 85°C で $\Delta G^\circ = -1.2 \pm 0.6 \text{ kJ/mol}$ 。高温側になると、配位子1個が SO_4^{2-} に置換された環境Aの溶存状態が熱力学的により安定になることが判明した。図6からも明らかな様に 70°C 以上で f_A が f_B より大きくなった事と対応する。

〔溶液内化学交換反応の動的性質〕

図7に各環境AとBの寿命 τ_α の温度依存性を示した。 $-5^\circ\text{C} \sim 85^\circ\text{C}$ の温度領域で、 τ_α が $5\text{s} \sim 10^{-3}\text{s}$ と広範囲にわたって変化した。即ち、 $R_{1,A}^* \tau_A$ は $2 \times 10 \sim 7 \times 10^{-2}$ の大きな変化を示し、温度によって前報のかなり遅い化学交換反応速度の(II)の場合から非常に速い化学交換反応速度の(IV)の場合にわたっている事が判明した。(1)式の平衡式の反応速度定数の温度依存性から決定した正逆方向の動的パラメータを表1に示す。

正方向の ΔH_{BA}^\ddagger と ΔS_{BA}^\ddagger が大きな正の値を示す事から、配位数が減少した活性化状態を経て水分子に代って SO_4^{2-} が配位して環境Aの状態になる(結合機構, SN1)。その理由は配位した水分子の寿命が SO_4^{2-} の配位している滞在期間(図7の τ_A を参照)より非常に短いからである。逆方向の ΔS_{AB}^\ddagger は負で非常に小さい値を示す事から、水分子の配位数が増加した活性化状態を経て環境B状態になる(会合機構, SN2)。その理由は、 SO_4^{2-} が Al(III) の内圏に配位している間、配位水分子と溶媒水分子との頻繁な交換がある為と考えられる。各環境下の各エネルギー緩和速度を評価したので Al(III) と配位子との相互作用について議論可能である。

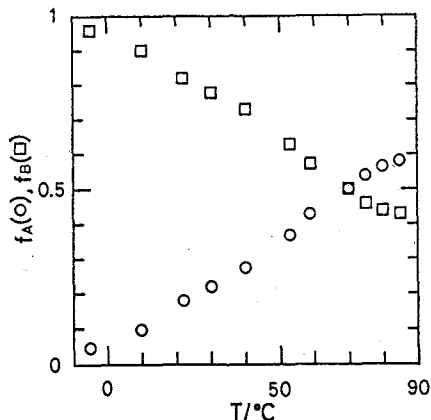


Figure 6. Fractional populations f_A (○) and f_B (□) as a function of temperature

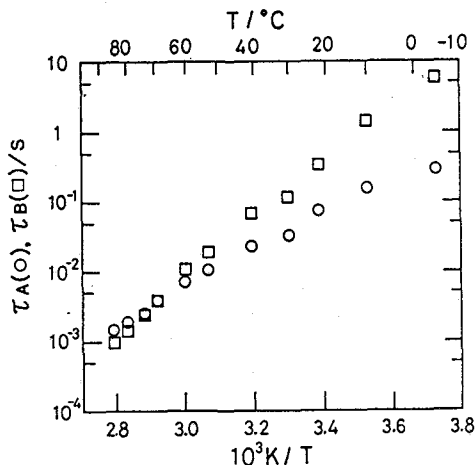


Figure 7. Lifetimes τ_A (○) and τ_B (□) as a function of temperature

Table 1. Kinetic properties of the ligand-exchange reaction of eqn(1)

Forward Reaction	ΔH_{BA}^\ddagger	75.1 (± 1.0) kJ/mol
	ΔS_{BA}^\ddagger	19.9 (± 3.3) J/Kmol
Reverse Reaction	ΔH_{AB}^\ddagger	46.1 (± 1.3) kJ/mol
	ΔS_{AB}^\ddagger	-64.8 (± 4.1) J/Kmol

高圧 NMR 法による金属イオンの溶媒交換反応の
活性化体積の測定

(名大理) ○石井雅男・舟橋重信・田中元治

Volume of Activation for Solvent Exchange on Metal Ions

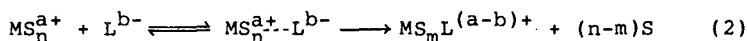
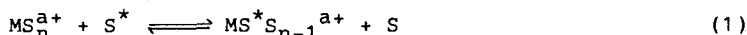
As Studied by a Variable-Pressure NMR Technique.

Masao Ishii, Shigenobu Funahashi and Motoharu Tanaka

(Laboratory of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Nagoya University)

The activation volume ΔV^\ddagger for solvent exchange on metal ions has been used successfully to consider the activation mode of reaction. We constructed two kinds of high-pressure NMR probe to be used with a JEOL-FX100 electromagnet and a JEOL-GX270 superconducting magnet, respectively, and measured the activation volume for the exchange of acetic acid and N,N-dimethylformamide on manganese(II) by the variable-pressure ^{17}O FT-NMR line broadening method. The unusual positive values obtained for this cation are discussed in terms of the bulkiness of the solvents and the bound ligand effect.

〈序〉溶媒交換反応(1)は、金属イオンの第一配位圏にある配位溶媒分子がバルクの溶媒分子と交換する反応である。錯形成反応(2)は金属イオンから溶媒分子が脱離する過程を含むので、溶媒交換反応の機構を明らかにすることは、金属イオンの関与する反応の本質を理解する上で非常に重要である。



速度定数の温度依存性から得られる活性化エンタルピー ΔH^\ddagger や活性化エントロピー ΔS^\ddagger に加え、速度定数の圧力依存性から求められる活性化体積 ΔV^\ddagger は、反応の遷移状態での構造変化を反映する量として極めて有用である。我々は既に、各種の溶媒中における鉄(III)イオンと大きさの異なる各種の配位子との錯形成反応の活性化体積を、高圧ストップフロー装置を用いて測定し、溶媒や配位子のかさ高さが錯形成反応の機構に影響を及ぼすことを明らかにした。¹⁾ また Merbachらは高圧 NMR 法によって第一遷移系列の八面体型金属イオンの溶媒交換反応の活性化体積を水など数種の溶媒中で測定し、イオン半径や電荷と反応機構の相関を明らかにした。²⁾

本研究では溶媒分子のかさ高さに着目しこれが溶媒交換反応の機構に及ぼす影響を明らかにするため、比較的かさ高い溶媒分子として N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)と酢酸を選び、これらの溶媒中におけるマンガン(II)の溶媒交換反応の活性化体積を測定した。また金属イオンに結合した配位子が溶媒交換反応の機構に及ぼす影響についても調べるため、酢酸中の酢酸マンガン(II)の配位酢酸分子交換反応の活性化体積を測定した。

く実験) 多くの溶媒交換反応はその速度定数が
 25℃で $10^2 \sim 10^8 \text{ s}^{-1}$ と非常に速い反応なので、
 その速度論的研究には溶媒分子中の ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O
 核などのNMRの横緩和速度を測定する方法が有用
 である。高圧下でNMRを測定するために、二種類
 の高圧NMRプローブを製作した。^{*} 一つはJNM-
 FX100 FT-NMR装置の電磁石に組み入れ180 MPa まで
 の高圧下で ^1H , ^{13}C , ^{17}O 核のNMRを観測できるプロ
 ープで、もう一つはJNM-GX270 FT-NMR装置の超伝導
 磁石に挿入し300 MPa までの高圧下で測定が行える
 多核プローブ(Fig. 1)である。ともに温度制御した
 窒素ガスをプローブの周囲に循環させ、内部の試料
 温度を調節できる。高圧NMR用試料管は、ガラス
 管、テフロンキャップと収縮テフロン管から成って
 いる。試料溶液は試料管内に満たす。プローブ内に
 満たされた圧力媒体に圧力が加えられると、テフロ
 ンキャップを介して試料溶液に圧力が伝わる。収縮
 テフロン管はガラス管とテフロンキャップとを繋ぎ、
 密封するために用いた。

溶液中の常磁性金属イオンの効果による溶媒分子
 の核磁化の横緩和時間の増大(T_{2P}^{-1})は次のように表
 される。

$$(T_{2P} P_M)^{-1} = \pi(\Delta\nu_{\text{sample}} - \Delta\nu_{\text{solvent}}) P_M^{-1} \quad (3)$$

$\Delta\nu_{\text{sample}}$ と $\Delta\nu_{\text{solvent}}$ はそれぞれ試料溶液と金属イオン
 を含まない参照溶媒についての、溶媒分子の任意の
 核のNMRスペクトルの半値幅、 P_M は金属イオンに
 配位している溶媒分子とバルク中の溶媒分子との存
 在比である。各々の系の ^{17}O 核の $(T_{2P} P_M)^{-1}$ の温度
 依存性をFig. 2に示す。³⁾ $(T_{2P} P_M)^{-1}$ はSwift-Connickの
 式(4)で表される。⁴⁾

$$\frac{1}{(T_{2P} P_M)} = \frac{1}{T_M} \frac{T_{2M}^{-2} + (T_M T_{2M})^{-1} + \Delta\omega_M^2}{(T_M^{-1} + T_{2M}^{-1})^2 + \Delta\omega_M^2} + \frac{1}{T_{2O}} \quad (4)$$

DMF中の系に関しては測定を行った全温度領域で、
 また酢酸中の二種の系に関しては低温側の領域で
 $(T_{2P} P_M)^{-1}$ の値は観測周波数に依存せず、その対数値
 の絶対温度の逆数に対するプロットはほぼ直線上に
 乗っている。この温度領域では(4)式は(5)式のよう
 に近似することができる。

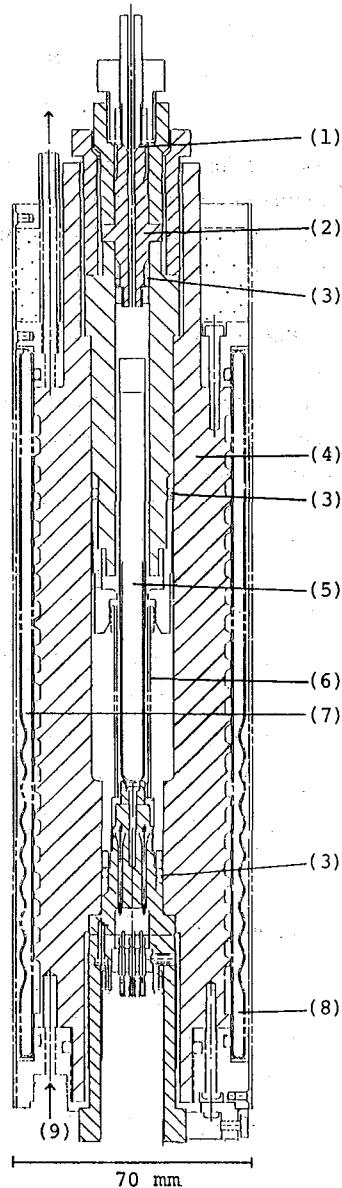


Fig. 1 Multinuclear high-
 pressure NMR probe for a GX270
 superconducting magnet
 (1)Cone-type seal (2)Adaptor
 (3)O-ring seal (4)Pressure pipe
 (5)Sample tube (6)Bobbin
 (7)Coil center (8)Dewar
 vessel (9) N_2 gas

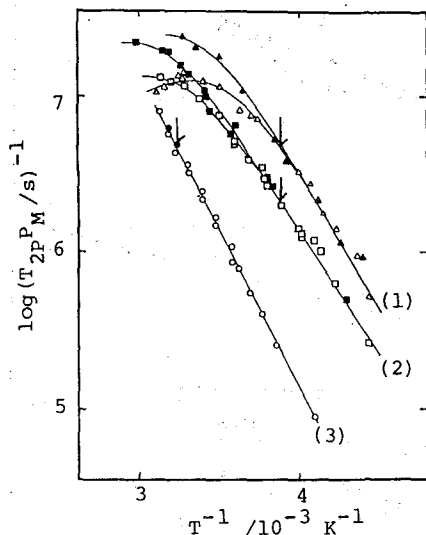


Fig. 2
Temperature dependence of $(T_{2p}P_M)^{-1}$
(1) $Mn(OAc)_2$ in HOAc: \blacktriangle 54.21MHz; \triangle 8.16MHz.
(2) $Mn(ClO_4)_2$ in HOAc: \blacksquare 54.21MHz; \square 8.16MHz.
(3) $Mn(ClO_4)_2$ in DMF: \bullet 54.21MHz; \circ 36.59MHz.
↓ indicates the temperature where high-pressure NMR was measured.

TABLE I. Compositions of Sample Solutions

Sample Solution	[Mn]/m ^a	solvent	[HClO ₄]/m	P _M	wt% of HOAc	atom% of ¹⁷ O	
soln A0	0	HOAc/CD ₂ Cl ₂	2.12×10 ⁻²	0	20.0	5.98	
soln A	$Mn(ClO_4)_2$	6.02×10 ⁻⁴	HOAc/CD ₂ Cl ₂	2.12×10 ⁻²	5.46×10 ⁻⁴	20.0	5.98
soln B0	0	HOAc/CD ₂ Cl ₂	0	0	20.4	5.13	
soln B	$Mn(OAc)_2$	2.30×10 ⁻⁴	HOAc/CD ₂ Cl ₂	0	2.06×10 ⁻⁴	20.4	5.13
soln C0	0	DMF	0	0		0.037	
soln C	$Mn(ClO_4)_2$	4.46×10 ⁻⁴	DMF	0	1.96×10 ⁻⁴		0.037

^a m is in the unit of mol kg⁻¹

〈結果〉 $\ln(\pi\Delta v_{solv})$ 及び $\ln(k_{ex}(P)/k_{ex}(0))$ の圧力依存性を Fig. 3に示す。

Fig. 3bの各プロットの傾きより得られた活性化体積の値を、既に得られているマンガン(II)の溶媒交換反応の活性化パラメーターとともに Table IIに示す。

〈考察〉測定される活性化体積には、結合の生成・開裂に伴う体積変化と、溶媒和の変化による体積変化の、二つの寄与があると考えられる。溶媒交換反応は中性配位子の交換反応なので、活性化過程における溶質-溶媒間の静電相互作用の変化は小さい。したがって得られる活性化体積の値は、主として活性化過程における結合の生成・開裂に伴う体積変化を反映すると考えられる。

今までに得られているマンガン(II)の溶媒交換反応の活性化体積の値はいずれも負であり、マンガン(II)の溶媒交換反応は会合的交替機構で起こるものと考えられてきた。しかし今回得た酢酸及びDMF中での値はわずかながら正であり、これら

$$(T_{2p}P_M)^{-1} = \tau_M^{-1} = k_{ex} \quad (5)$$

τ_M^{-1} は溶媒分子が金属イオンの第一配位圏にある平均寿命であり、その逆数は溶媒交換速度定数に等しい。(5)式の成り立つ温度領域において速度定数の圧力依存性を測定すれば(6)式に基づいて反応の活性化体積を求めることができる。

$$k_{ex}(P) = k_{ex}(0) \exp(-\Delta V^\ddagger/RT) \quad (6)$$

測定を行った試料の組成を Table I に示す。試料溶液の調製には、 $[Mn(OAc)_6](ClO_4)_2$ 、 $Mn(OAc)_2(OAc)_4$ および $[Mn(dmf)_6](ClO_4)_2$ の結晶を用いた。¹⁷Oを濃縮した酢酸は、¹⁷O濃縮水と精製した無水酢酸を等量混合して調製した。酢酸の試料は凝固点を下げて低温下で測定を行えるように不活性な溶媒である重ジクロロメタンで希釈した。過塩素酸マンガン(II)の酢酸溶液には、マンガン(II)の加溶媒分解を防ぐため過塩素酸を少量添加した。

のかさ高い溶媒中では解離的な傾向が増すことが明らかになった。これはかさ高い溶媒中ではマンガン(II)のまわりが立体的に混雑しているために、反応の遷移状態において進入溶媒分子・脱離溶媒分子とマンガン(II)との距離が、かさ高くない溶媒中に比べて長くなることによると考えられる。

酢酸マンガン(II)は酢酸中におけるマンガン(II)の加溶媒分解化学種である。その溶媒交換反応は、速度が過塩素酸マンガン(II)に比べて大きいばかりでなく、活性化体積も増大している。このような現象は水溶液中で鉄(III)の加水分解種についても観測されており、²⁾⁵⁾ 酢酸イオンや水酸化物イオンといった結合配位子が金属イオンへ電子を供与するため起こると考えられる。

* 製作にあたっては日本電子(株)の神部貞男氏にご協力頂いた。

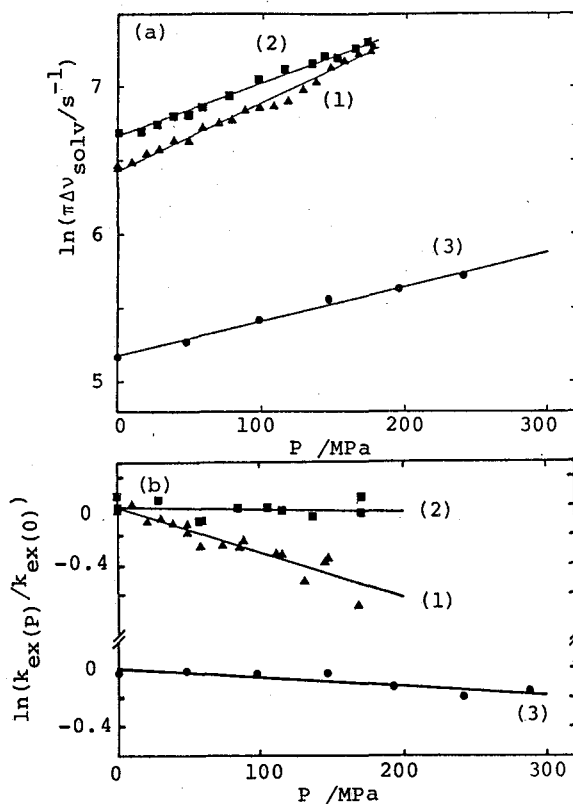


Fig. 3 (a) Pressure dependence of $\ln(\pi\Delta\nu_{\text{solv}})$
 (1) soln BO (2) soln AO (3) soln CO
 (b) Pressure dependence of $\ln(k_{\text{ex}}(P)/k_{\text{ex}}(0))$
 (1) $\text{Mn}(\text{OAc})_2$ in HOAc (2) $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2$ in HOAc
 (3) $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2$ in DMF

TABLE II. Kinetic Parameters for Solvent Exchange on Manganese(II)

	$k_{\text{ex}}(25^\circ\text{C})/$ s^{-1}	$\Delta H^\ddagger/$ kJ mol^{-1}	$\Delta S^\ddagger/$ $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$\Delta V^\ddagger/$ $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	ref
$\text{Mn}(\text{HOAc})_6^{2+}$	1.6×10^7	29 ± 2	-10 ± 7	$+0.4 \pm 0.7$ (258 K)	This work
$\text{Mn}(\text{OAc})_2(\text{HOAc})_4$	4.8×10^7	32 ± 3	9 ± 11	$+6.7 \pm 0.6$ (258 K)	This work
$\text{Mn}(\text{dmf})_6^{2+}$	2.7×10^6	35.8 ± 0.6	-2 ± 2	$+1.6 \pm 0.5$ (309.5 K)	This work
$\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$	2.1×10^7	32.9 ± 1.3	5.7 ± 5.0	-5.4 ± 0.1 (298 K)	2
$\text{Mn}(\text{CH}_3\text{OH})_6^{2+}$	3.7×10^5	25.9	-50.2	-5.0 ± 0.2 (279 K)	2
$\text{Mn}(\text{CH}_3\text{CN})_6^{2+}$	1.4×10^7	29.6 ± 0.5	-8.9 ± 2.0	-7.0 ± 0.4 (252-260 K)	2

References

- (1) K. Ishihara, S. Funahashi, and M. Tanaka, *Inorg. Chem.*, **22**, 2070; 2564; 3589 (1983).
- (2) A. E. Merzbach, *Pure Appl. Chem.*, **59**, 161 (1987).
- (3) (a) A. Hioki, S. Funahashi, M. Ishii, and M. Tanaka, *Inorg. Chem.*, **25**, 1360 (1986).
 (b) A. Hioki, S. Funahashi, and M. Tanaka, *Inorg. Chem.*, **25**, 2904 (1986).
 (c) M. Ishii, S. Funahashi, and M. Tanaka, *Chem. Lett.*, **1987**, 871.
- (4) T. J. Swift and R. E. Connick, *J. Chem. Phys.*, **37**, 307 (1962).
- (5) K. Ishihara, S. Funahashi, and M. Tanaka, *Inorg. Chem.*, **22**, 194 (1983).

Diffusion coefficients of toluene, cyclopentane and cyclohexane from room temperature to supercritical region by the nuclear spin echo method

Shigezo SHIMOKAWA

(NMR Laboratory, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo)

Abstract

Self-diffusion coefficients of toluene, cyclopentane and cyclohexane have been measured from liquid to supercritical region as a function of temperature under their own vapor pressure. The NMR spin-echo technique was employed for the measurement of the diffusion coefficients using a steady magnetic field gradient. Density was measured by one-dimensional spin projection method¹. Experimental diffusion coefficients are interpreted by the Enskog theory for hard-sphere fluids with the Percus-Yevic approximation. It is found that the calculated results with the hard-sphere model are in relatively good agreement with the experimental data in high density region. On the other hand, the agreement is poorer in the low density region, except for the case of toluene.

序論

超臨界流体の物性の研究は分光学的に色々と調べられているがその分子機構は未だ明確にされていない。例へばなぜ超臨界域でその溶解特性が増加するのか事実は良く知られて居るが、単に液とガスが混ざっている状態と言われているにすぎない。それは高温、高圧のもとでの実験条件が厳しくまだ分光法的に良く“見えない”為であると考えられる。

NMR分光法でも高温高圧の条件はやはり測定上の限界を与えていた。我々は数年来高温高圧で観測する事が出来る装置を作り、臨界点を越えた処での有機液体の振舞いをNMRで観測して来た。温度変化の実験では対応する体積の変化を正確に知る必要がある。我々は温度に依存する体積変化をNMRの一次元投影パターンとして観測し、オートクレブ中の液体、気体の密度を直接求める方法を考案した¹。それを用いて体積変化を計測しながら緩和時間(T₁)や、拡散係数を求め超臨界域前後を通しての分子の運動に関する詳細な情報を得る事が出来た²。

その結果はトルエンの例では、トルエン分子のスピン回転相互作用の著しい増大を認めた。この事は超臨界域では分子間の平均距離が液体の場合のそれよりも大きくなり、分子の衝突に因る回転運動の効果が分子内の双極子相互作用に因る緩和効果よりも優勢となる事を示した。

今回の報告では実験で得られた拡散係数の結果と剛体球モデルを仮定した流体の理論的な拡散係数の比較を行った。更に密度測定の結果から得られる臨界指数に付いても一言報告する。

実験法

高温高圧NMR装置はすでに報告したが³、耐圧容器はチタン合金を用いてその内部に共振コイルとヒーターを取り付けてある。容器の外部は水で冷却する様になっている。製作上注意すべき点はプロトンの化学シフトが観測出来る分解能を有すること、ヒーターの電流に因る分解能の低下を防ぐことが要点で、我々はヒーターをFID取り込み時にゲートすることで此の点を解決した。一次元投影法ではイメージング観測の場合と同様に磁場勾配の直線性を保つことが大切である。緩和時間は通常温度の上昇と共に長くなり場合に依っては100秒以上になる事もあるので積算を行う場合の観測系全体の安定度が重要となってくる。この為NMRによる磁場のロックは必達である。観測信号は温度の上昇と共にその感度が低下する。特に超臨界域でのS/N比の低下は著しいのでその測定には十分な注意が必要になる。

試料はトルエン、シクロペンタン、シクロヘキサン、等を用いた。これらの試料は予め臨界条件を満たすように計量して容量既知の耐熱ガラス容器に脱気封入する。そして試料は温度に依存する自己圧力によって膨張する。耐圧容器の圧力はガラス容器の試料圧力よりも幾分大きくなる様に外部よりガス圧を調節した。なお拡散係数の測定では酸素の影響は無視出来る。

モデル

理論的な拡散係数を求めるのには幾つかの方法があるが、我々は剛体球が濃密度流体中の拡散に対する Enskog の理論式を用いて計算した。拡散係数 D は次式の様に与えられる⁴。即ち

$$D = \left(\frac{\sigma}{4} \right) \left(\frac{\pi k_B T}{M} \right)^{1/2} \left(P_H V / k_B T - 1 \right)^{-1} \quad (1)$$

ここで P_H は Percus-Yevick の近似を用いて

$$P_H = \left(\frac{k_B T}{V} \right) \left(1 + \zeta + \zeta^2 \right) / \left(1 - \zeta \right)^3 \quad (2)$$

と書ける。 ζ は充填率で $\zeta = \pi \sigma^3 / 6 V$ である第1図の点線は剛体球が濃密度流体中の拡散に対する Enskog の理論式を用いて計算した値である。但し其の際の剛体球の半径は状態方程式として Percus-Yevick の近似による(2)式に加えて van der Waals 型の引力項を用い、臨界条件から決定したものをを用いた。この時 $\zeta_c = 0.12867$ となり、剛体球の直径は $\sigma = 0.62363 V c^{1/3}$ となる。

結果と考察

第1図より明らかなように実験値と計算値のそれとの違いは室温付近では計算値はやや大きな値を示している。室温での充填率は0.3033である。380kよりも上の温度では実験値とは計算値は良く一致した。臨界点付近になると実験値は密度揺らぎの為に測定は困難となるが臨界点を越えると再び測定は可能となる。此の領域では計算値はやや大きなDの値を示しているが、ほぼ満足すべき結果であった。トルエンの場合 Enskog 理論による拡散係数の計算は広い温度範囲で

成立する事が判った。

第2図はシクロペンタンに付いて調べた結果である。室温付近で実測値のDの値よりやや大きくなる事はトルエンの場合と同様である。400kから臨界温度付近までは実測値とほぼ一致する。しかし臨界温度以上では実験値は理論値とその傾向は大きく相違する。即ち図で示す様に実測値の大きなDの値に比べて、計算値はほぼ $60 \times 10^5 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ の値であり、実測値との間に著しい不一致が見られる。しかしAlder等の計算機実験の結果に依れば、剛体球流体の充填率が0.2-0.3程度では、拡散係数の値がEnskogの理論値よりも最大30%程度も増加する事が見いだされている。充填率が0.12付近の超臨界域での不一致はこれを示していると考えられる。これは剛体球粒子間のVortex(渦動)的な運動に起因すると考えられ、第2図の場合の実験結果はそれを反映していると言えよう。一方第1図のトルエンの場合は、この様な渦動的挙動を示さず、Enskog理論による計算値と一致した結果を与えるものと思われる。

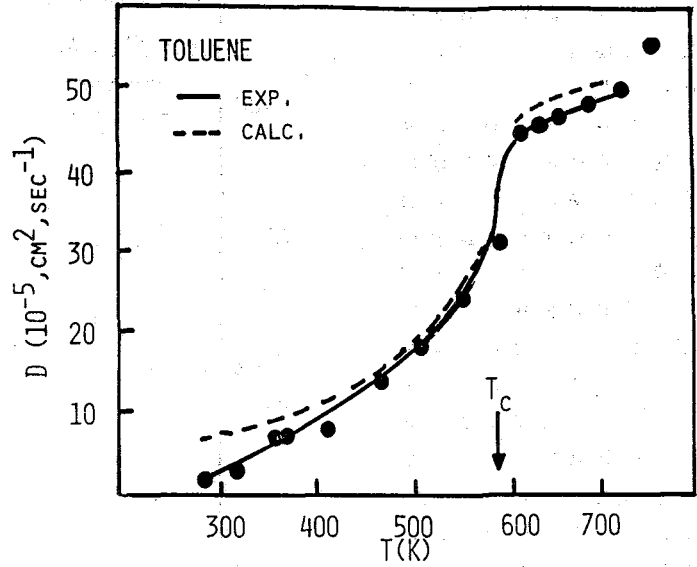


FIG. 1. Self-diffusion coefficients vs. temperature for toluene.

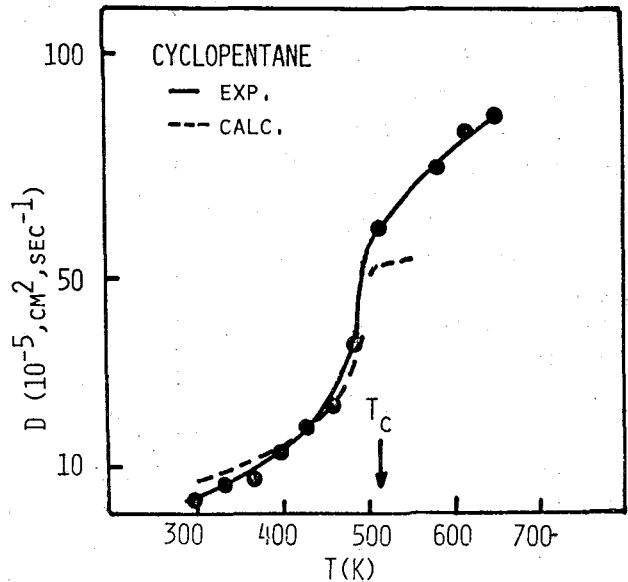
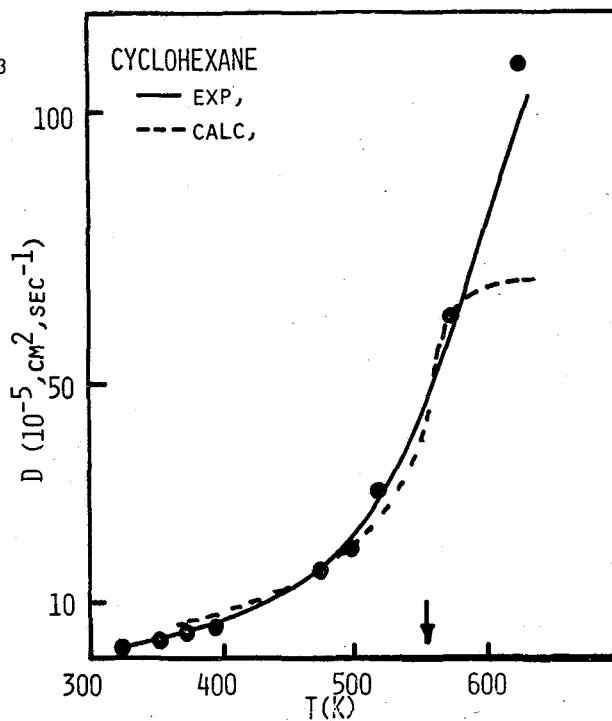


FIG. 2. Self-diffusion coefficients vs. temperature for cyclopentane.

以上の結果が物質を代えた場合にどう変化するかを調べる目的でシクロヘキサンに付いて同様に調べて見た。第3図はそれで室温から臨界点付近迄は実験値と理論値の結果は良い一致を示している。他方臨界点以上では理論値はやはり一定の値に留まりシクロペンタンの場合と同様であった。即ち実験値はそれよりも大きな値を示している。これらの結果は分子の形や分子間ポテンシャルの相違から来ると考えられる。

FIG.3



第4図は既に報告してあるシクロペンタンの密度の測定結果を用いて臨界指数を求めた結果を示す。其の値はシクロペンタンで0.36となり、いわゆる1/3乗則に従うものと見なされる。

FIG.4

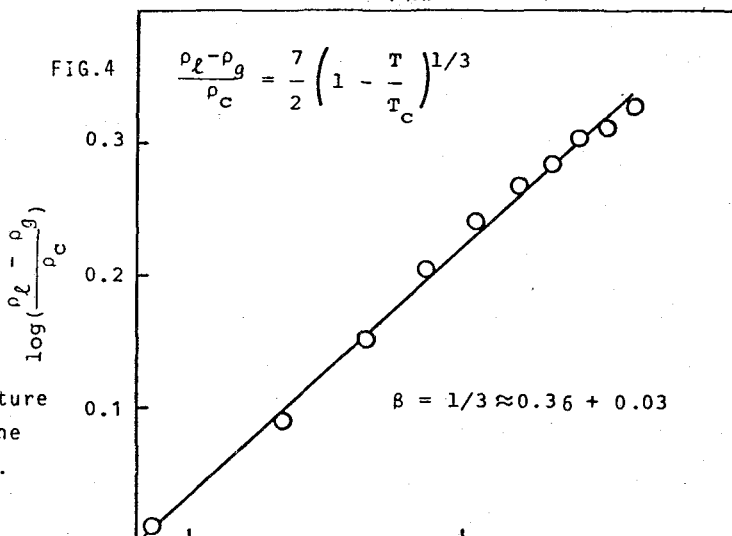


FIG. 3. Self-diffusion coefficients for cyclohexane.

FIG. 4. Density-temperature relation for cyclopentane near the critical point.

References

- 1) S. Shimokawa and E. Yamada; Rev. Sci. Instr. **56**, 1220 (1985)
- 2) S. Shimokawa; Ber. Buns. Phys. Chem. **90**, 126 (1986)
- 3) S. Shimokawa and E. Yamada; J. Magn. Reson. **51**, 103 (1983)
- 4) for example M. Shimoji; "Liquid Metals" p-187 (Academic Press 1977)

メタルフリーフタロシアニンのβ型結晶相における分子内水素のスイッチング運動
 (阪大理) ○宮久保圭祐・武田定・千原秀昭

Dynamics of Imino Proton of 29H,31H-Phthalocyanine in the β Phase

Keisuke Miyakubo, Sadamu Takeda and Hideaki Chihara

(Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University)

Two tautomeric forms may exist for 29H,31H-phthalocyanine molecule by switching two imino protons simultaneously. The switching of protons is accompanied by a change of electronic state of a conjugated system. To investigate the relation between the motion of protons and the electronic state of a molecule, we first studied the motion of the imino proton of 29H,31H-phthalocyanine in the β phase by the temperature dependence of the spin-lattice relaxation rate (T_1^{-1} and T_{1D}^{-1}). The switching motion is hindered by an asymmetric potential with unequal depth. The energy difference (7.5 kJ/mol) between two tautomers and the activation energy (33.3 kJ/mol) from the deep well to the shallow well were estimated.

《 序 》 カルボン酸の二量体では結晶中でも図1のような二重結名と単結名の組み換えを伴、た水素原子の運動が起こっており、この運動は多くのカルボン酸二量体で量子効果に支配されていることが最近わか、てきている¹⁾。また結晶中では、この運動を束縛するポテンシャルは一般に分子間相互作用により非対称となる、ている。

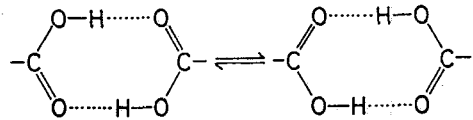


図1. カルボン酸二量体での分子運動

より大きな共役系を持つ環状分子であるフタロシアニン($C_{32}H_{18}N_8$)の中心にある2つの水素原子についてもカルボン酸二量体と同様な運動が起こ、ている可能性がある(図2)。¹³C核²⁾や¹⁵N核³⁾のMAS-NMRスペクトル測定によりこのような運動が起こ、ていると言われているが詳細は不明である。この水素原子の運動

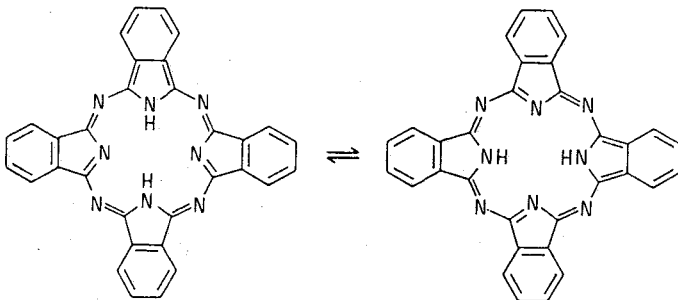


図2. フタロシアニンでの水素原子の運動

は分子の大きなπ電子系に直接の影響を与えると考えられるが、この影響について調べるためには水素原子の詳しい運動の様子を知る必要がある。今回はまず、2つの水素原子の運動の速さ及び活性化エネルギー等をプロトンのスピン格子緩和の

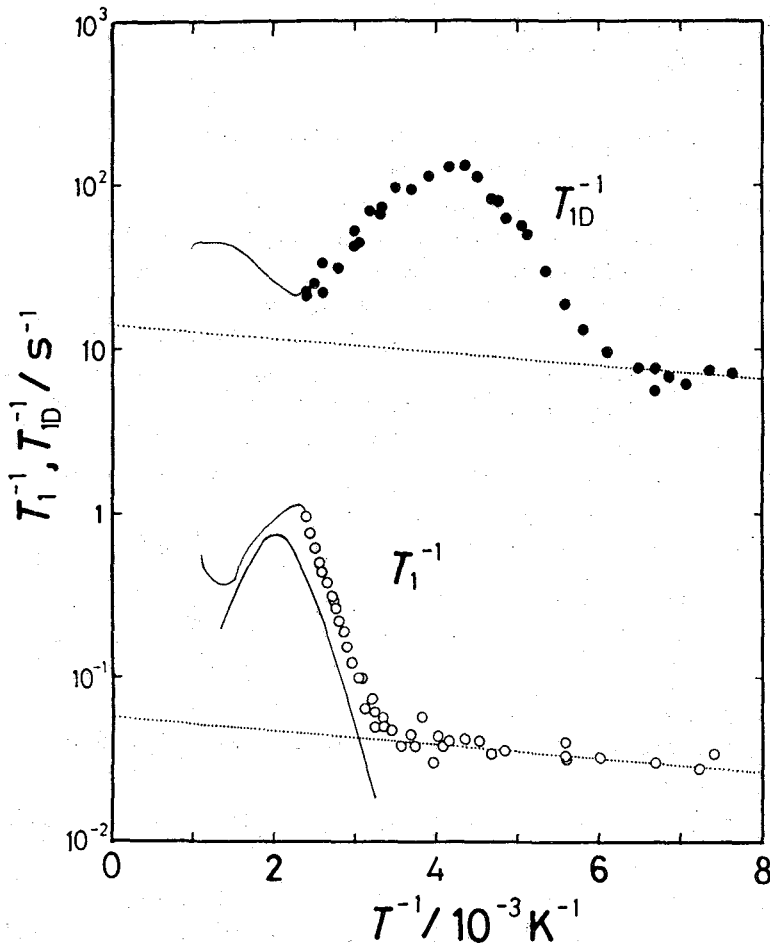


図3. フタロシアニンのプロトン緩和速度の温度変化

行。た。その反応は、 α -フタロニトリルをジメチルアミノエタノール中でアンモニアを通いながら130℃で5時間加熱して行。た。得られた生成物からアセトンとエタノールで大部分の不純物を除き、さらに残った不純物は真空昇華で除いた。元素分析の結果は重量%で、C: 74.70% (74.66%), H: 3.53% (3.55%), N: 21.78% (21.73%)。 () 内は $C_{12}H_{18}N_2$ に対する計算値。ラジカルによる常磁性中心を減らすために精製した試料を H_2 ガス中にて約300℃で12時間の加熱処理を行。た。これにより室温 (294 K) の緩和時間 T_1 は、7.1 s から21 s まで延びた。またこの試料が β 型結晶相であることは X 線 powder pattern と IR スペクトルにより確認した。

((測定)) 緩和時間の測定はパルス法で行。た。(37 MHz) T_1 の測定は 90° train - τ - 90° 法で、 T_{1D} は Jeener-Brokaert の方法 (90° x - 45° y

温度変化より求めた。

フタロシアニンはこの試料調製法により α , β , δ , γ 等の何種類かの多形をとるこ。とが知られているが、今回は最安定相の β 型結晶相について上記の運動を調べた。

((試料))

フタロシアニンは常磁性中心を含みやすい。その一つの原因は安定な常磁性金属塩を作ることにより、もう一つはそれ以外の何らかのラジカルである。常磁性中心があると緩和測定の妨げとなるので、試料の合成は常磁性中心となる金属を含まないように注意して

-45°C) で測った。さらに吸収線形を CW 法で測った。(10.7 MHz) 測定は
いづれも 4.2 K から 420 K にわたって行い、温度制御は ±0.1 K にみこめた。

((結果と考察)) 図3は緩和速度 T_1^{-1} , T_{10}^{-1} を温度の逆数に対しプロットしたものである。β-7タロニンンの T_1 については以前にも Dudreva らが報告しているが彼らの T_1 は我々の今回の結果の 1/4 程度であり、より強く常磁性中心による緩和に支配されていると考えられる。我々の測定値でも図3のように低温側では T_1 も T_{10} も常磁性中心による緩和に支配されているので、観測された緩和速度を運動による部分 $(T_1^{-1})_{\text{motion}}$, $(T_{10}^{-1})_{\text{motion}}$ とそれ以外の部分 $(T_1^{-1})'$, $(T_{10}^{-1})'$ とに分離した。

$(T_{10}^{-1}) = (T_{10}^{-1})_{\text{motion}} + (T_{10}^{-1})'$ (1)
 $(T_1^{-1})'$, $(T_{10}^{-1})'$ については低温側のデータを外挿して見積り、 $(T_1^{-1})_{\text{motion}}$, $(T_{10}^{-1})_{\text{motion}}$ を分離した。 $(T_1^{-1})_{\text{motion}}$, $(T_{10}^{-1})_{\text{motion}}$ の温度変化から緩和を支配する運動の活性化エネルギーを求めることに加えて、 $(T_{10}^{-1})_{\text{motion}}$ の極大より低温側で求めた活性化エネルギーは 26.5 kJ mol⁻¹, 極大より高温側では 18.2 kJ mol⁻¹, また $(T_1^{-1})_{\text{motion}}$ から求めた活性化エネルギーは 33.3 kJ mol⁻¹ となった。このように $(T_1^{-1})_{\text{motion}}$, $(T_{10}^{-1})_{\text{motion}}$ の傾きが一致しないという事実は緩和を支配している運動を束縛するポテンシャルが非対称 (図4) であることを示している。

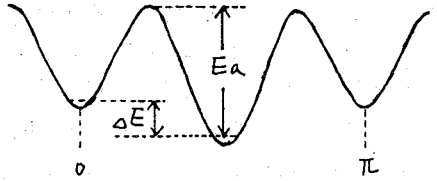


図4. 非対称周期ポテンシャル

測定した温度範囲では $(T_{10}^{-1})_{\text{motion}}$, $(T_1^{-1})_{\text{motion}}$ とともに低温近似 ($1 \ll \omega_0^2 \tau_c^2$) が成り立つのでプロトンの運動が古典的であれば

$$(T_1^{-1})_{\text{motion}} \propto a \cdot (1+a)^{-2} \cdot \tau_c^{-1} \propto a \cdot (1+a)^{-1} \cdot \exp\{-E_a / RT\} \quad (2)$$

$$(T_{10}^{-1})_{\text{motion}} \propto a \cdot (1+a)^{-2} \cdot \tau_c \propto a \cdot (1+a)^{-3} \cdot \exp\{E_a / RT\} \quad (3)$$

が成り立つ。但し (2), (3) 式中で

$$\tau_c = \tau_{c0} \cdot (1+a)^{-1} \cdot \exp\{E_a / RT\} \quad (4)$$

$$a = \exp\{\Delta E / RT\} \quad (5)$$

である。 ΔE , E_a は図4で定義している。実験データと (2), (3) 式を比較して、 $E_a = 33.3 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta E = 7.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ を得た。

図2のように分子の中心の2つのプロトンが同時にジャンプするとして、この2つのプロトン間の双極子相互作用だけを考える。2サイト間のジャンプで近似すると T_1^{-1} は

$$T_1^{-1} = m (9/4) a (1+a)^{-2} \gamma^4 \hbar^2 A \{J(\omega_0) + 4J(2\omega_0)\} \quad (6)$$

$$A = (2/15) \cdot \{r_1^{-6} + r_2^{-6} + (1-3\cos^2\theta) r_1^{-3} r_2^{-3}\} \quad (7)$$

$$J(\omega) = \tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2) \quad (8)$$

となる。(6) 式の係数 m は運動によって直接緩和するプロトン数の試料に含まれる全プロトン数に対する割合が今の場合 (2/18) となる。(8) 式の r_1 , r_2 は図

2 a 各々の conformation でのプロトン間距離, θ は 2 々のプロトンの同時ジャンプが起こる前と後でのその 2 々のプロトン間を結ぶベクトルの作る角である。 r_1, r_2 $\theta \in$ Robertson の X 線回折と Hoskins の中性子回折の結果から求めると $r_1 \approx r_2 \approx 1.95 \text{ \AA}$, $\theta = 92.3^\circ$ となる。これをいろいろ変えて実験値と合わせて見た。図 3 の実験は $\tau_c = 4.5 \times 10^{-10} \text{ s}$ とした場合の計算値である。結晶中の分子には conformation としては 2 つしかないが、プロトンのとりうる位置としては 4 つあるわけだから (6) 式の計算値より大きくなるだろう。さらに $^{14}\text{N} - ^1\text{H}$ 間の距離が短いので $^{14}\text{N} - ^1\text{H}$ の相互作用も考慮に入れると T_1^{-1} は大きくなる。

吸収線中の ΔH の 2 次モーメント M_2 の温度変化を図 4 に示す。分子の中心の 2 々のプロトンだけ考えると固定格子における 2 次モーメントの値は $M_2^{\text{rigid}} = 6.5 \text{ G}^2$ となる。図 2 のような分子の中心の 2 々のプロトンの運動による 2 次モーメント減少分 ΔM_2 は、 T_1^{-1}, T_1^0 から求めた $E_a, \Delta E$ の値を用いて計算すると 400 K では $\Delta M_2 = 1.7 \text{ G}^2$ となり実験値とだいたい一致する。

以上のように β 型結晶中では 7 タロニアニ分子の中心の 2 々のプロトンの運動は、7 タロニアニ分子同士の相互作用のために図 4 に示したように、非対称なポテンシャルによる変調を受けていることがわかった。

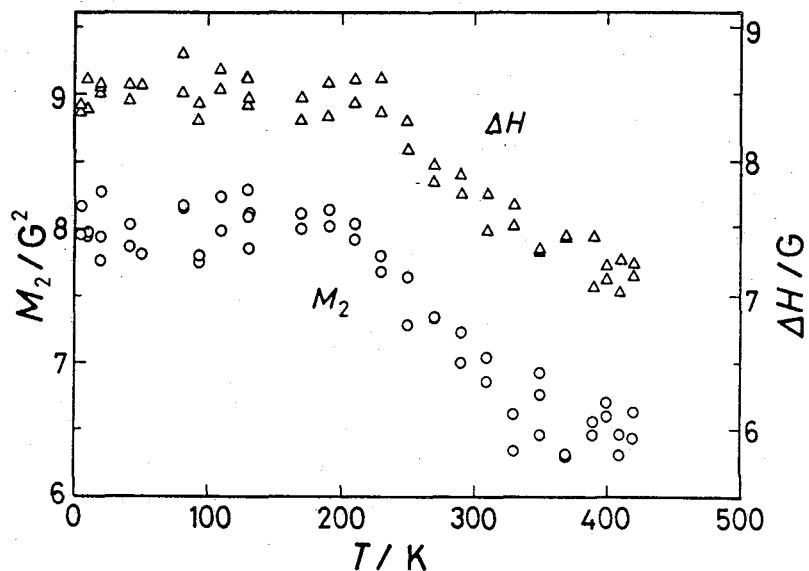


図 5. 7 タロニアニの吸収線中、2 次モーメントの温度変化

references

- 1) B.H. Meier, F. Graf, R.R. Ernst, J. Chem. Phys. 76 (1982) 767
S. Nagaoka, T. Terao, F. Imashiro, A. Saitka, N. Hirota, *ibid*, 79 (1983) 4694
今田, 武田, 千原 分子構造学会討論会 (1984) 4009
- 2) B.H. Meier, C.B. Storm, W.L. Earl J. Am. Chem. Soc. 108 (1986) 6072
- 3) R. Kendrick et al., J. Magn. Reson. 65 (1985) 159
- 4) B. Dudreva, S. Grande, J. Phys. (Paris) Collog. 33 (1972) 183
- 5) J.M. Robertson, J. Chem. Soc., (1936) 1195
- 6) B.F. Hoskins, S.A. Mason, J.B. White J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1969) 554

固体高分解能 ^{13}C -NMRによる液晶の研究(第2報)
強誘電性液晶のCP-MAS法による ^{13}C -NMRの温度変化

(化技研) 早水紀久子、○松村和紀、植村寿公、柳沢勝

Studies of Liquid Crystalline Compounds by High-Resolution Solid-State ^{13}C -NMR (II):
Temperature Dependence of ^{13}C -NMR Spectra of Ferroelectric Liquid Crystalline Compound by
CP-MAS Method

Kikuko Hayamizu, Kazunori Matsumura, Toshimasa Uemura, and Masaru Yanagisawa
(National Chemical Laboratory for Industry)

CP-MAS ^{13}C -NMR spectra of p-(2-Methylbutoxy) phenyl p-Octyloxybenzoate (80BEB05*), which is ferroelectric liquid crystalline, were obtained changing the temperature and the spinning rate. It is considered that 80BEB05* shows two types of crystal structures at the temperature below 0°C , and the ratio of these two structures varies depending on the temperature. Above 0°C the broadening of the spectra was observed, which is regarded as the result of the interference between the MAS and the slow molecular motion. The real temperature of the sample becomes higher than the setting one by the influence of MAS, and the extent of the increase of the temperature depends on the spinning rate.

(結言)

強誘電性液晶は、高速表示デバイスの材料として現在さかんに研究されているが、この液晶は分子内に不斉炭素を持ち、系が光学活性でカイラル・スメクティック相を示すことが特徴的である。その構造の特殊性から、固体状態での分子の立体構造および運動性についても興味をもたれる。

最近、当研究室では、JEOLの温度可変MASシステムの導入により、固体高分解能スペクトルの温度変化測定が可能となり、固体サンプルの分子運動性についての知見が得られるようになった。そこで今回は、強誘電性液晶であるp-(2-Methylbutoxy) phenyl p-Octyloxybenzoate (80BEB05*) (S体)のCP-MAS ^{13}C -NMRスペクトルの温度変化と回転速度変化について報告する。また、MASがサンプル温度に与える影響についても述べる。

(実験)

液晶サンプル80BEB05*は、チッソ(株)より提供されたものをそのまま用いた。この物質の相転移温度は、理学電機社製の示差走査熱量計(TAS100-DSC8230)を用いて測定した。

固体高分解能 ^{13}C -NMRの測定はJEOL FX-200 spectrometerにCP-MASユニットを接続し、温度可変用MASプローブを用い、50.10MHzで行った。液体窒素で冷却した窒素ガスをプローブに導き、サンプルローターを回転させるとともに、温度を調節した。(以下に示すMASスペクトルの温度は設定温度であり、実際のサンプルの温度とは異なる。)サンプルは、通常4.7KHz程度で回転させたが、必要に応じて回転数を変えた。 ^{13}C 化学シフトは、アダマンタンの高磁場側のピーク(29.5ppm)を外部基準として決定した。

(結果および考察)

-120℃から+100℃まで、80BEB05*を熱分析測定した。-56℃で固相から固相への転移、46℃で固相から液晶相(Sm*A)への転移、57℃で液晶相から液相への転移が観測された。(Sm*Cは冷却時に観測される。)

Fig. 1に、この液晶のクロロホルム溶液の¹³C-NMRスペクトルを、帰属とともに示す。

また、Fig. 2-Aに、室温(26℃)でのCP-MASスペクトルを示す。この室温でのMASスペクトルは、線幅が狭く、溶液のスペクトルとよく一致しこの温度では、分子の運動性が良いことがわかる。Fig. 2-Bに、-70℃でのMASスペクトルを示す。26℃のスペクトルと比べると、全体的に線幅が広がっているが、常温では一本であった8、9のシグナルが、低温では二本に分裂していることが特徴的である。

ベンゼン環の水素の結合した炭素5、6、8、9のシグナルの温度変化を、Fig. 3に示す。5、6のシグナルは低温では2本ずつあるが、温度上昇にともない、1本は大きくなり、もう1本は小さくなるため、高温では1本となる。8、9のシグナルでは、温度上昇にともない、分裂の中央部に新しいピークが徐々に成長し、元のピークは消滅していく。これらの変化より、0℃以下では、このサンプルには、異なる結晶構造があり、その存在比が温度変化すると考えられる。(ただし、この変化は、DSCで観測される-56℃での相変

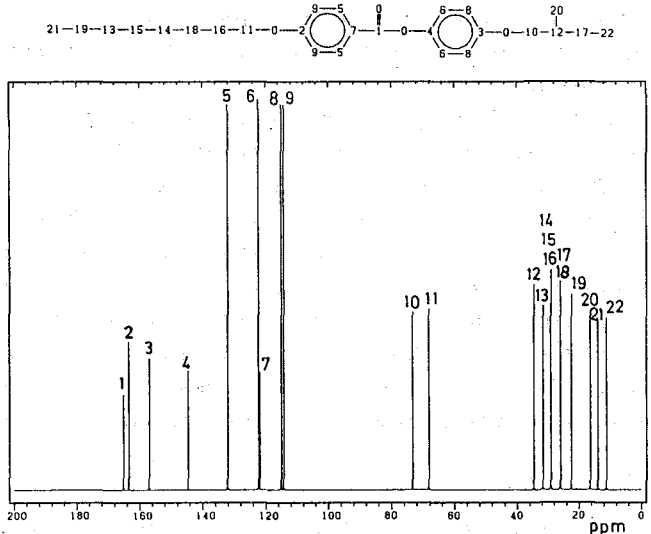


Fig. 1 クロロホルム溶液の¹³C-NMR

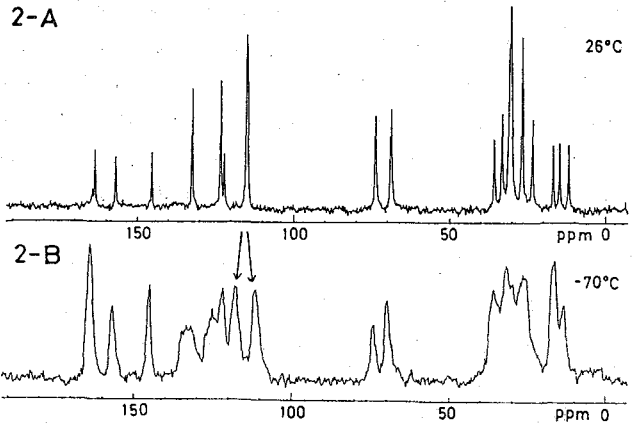


Fig. 2 CP-MAS ¹³C-NMR

(温度は設定温度、MAS: 4.7kHz)

化とは、別の種類のものと思われる。また、その温度変化の様子は、5、6の炭素と8、9の炭素では異なる。）

次に、温度を -5°C に固定し、回転速度を変化させて測定した。Fig.4にそのスペクトルを示すが、回転速度が下がると、8、9のシグナルの中央部のピークが減少していく。これは、Fig.3で温度が下がった時の変化と同じであり、5、6のシグナルについても同様である。

0°C 以上では、5、6、8、9のシグナルは、温度の上昇につれて広幅化していくが、その変化をFig.5に示す。この広幅化は、MASの周期と分子運動の周期との干渉の影響¹と考えられたので温度を 15°C に固定し、回転速度を変えて測定した。Fig.6に、その結果を示すが、回転が遅くなると、これらのシグナルは尖鋭化するが、この変化は、Fig.5で温度が下がった時の変化に対応しているようにもみえる。

さらに、 20°C 以上での温度変化をFig.7に示す。急激に5、6、8、9のシグナルが尖鋭化していくことが分かる。これから、サンプルが相変化している可能性が考えられたので、ローターの中を見ると、一部分サンプルが融けていた。この時、サンプルの温度を直接計ると 32°C であったが、実際にはもっと高温であったと思われる。

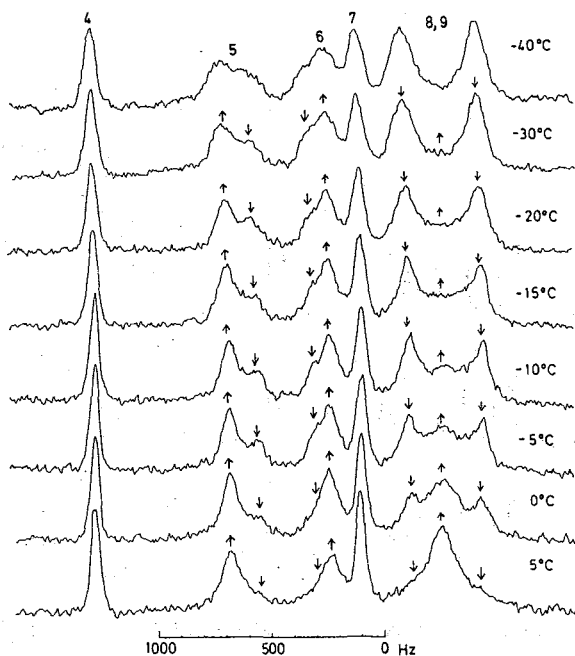


Fig.3 CP-MAS ^{13}C -NMRの温度変化
(温度は設定温度、MAS : 4.9-4.8kHz)

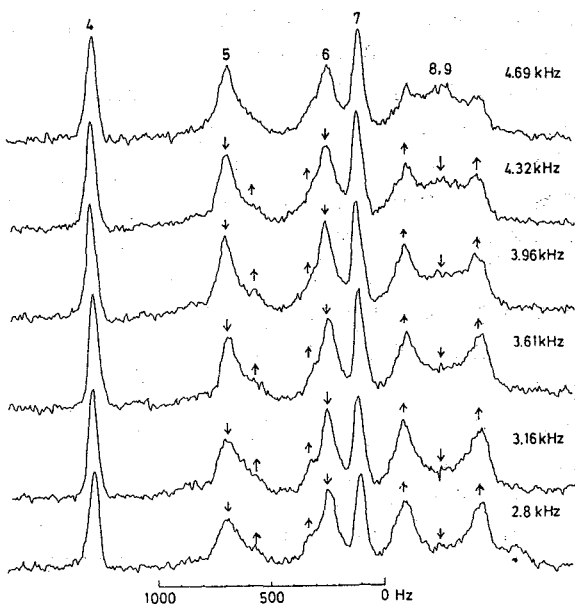


Fig.4 CP-MAS ^{13}C -NMRの回転速度変化
(-5°C に設定)

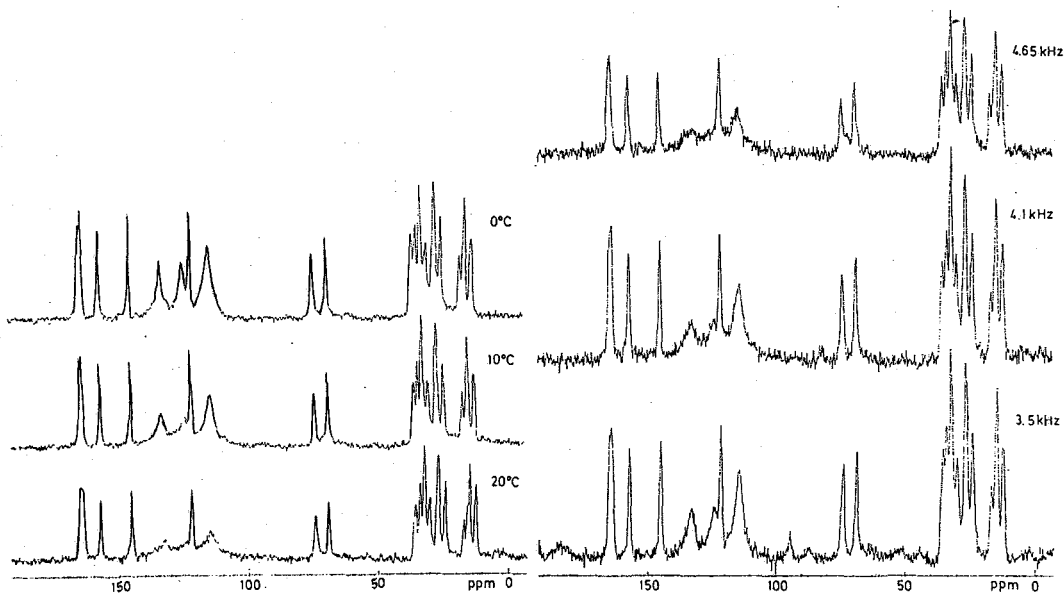


Fig.5 CP-MAS ^{13}C -NMRの温度変化
(温度は設定温度、MAS : 4.6kHz)

Fig.6 CP-MAS ^{13}C -NMRの回転速度変化
(+15°Cに設定)

MASによりサンプルの温度が上昇し、また回転速度の変化によって温度上昇の程度が異なると考えると、表示温度22~23°Cでサンプルが融けることと、Fig.4,6の回転速度の変化によるスペクトル変化は、説明できる。このようにMASによりサンプルの温度が上昇することには、注意が必要であると思われる。

(参考文献)

I.D.Suwelack, W.P.Röthwell,
and J.S.Waugh
J.Chem.Phys.73,2559(1980)

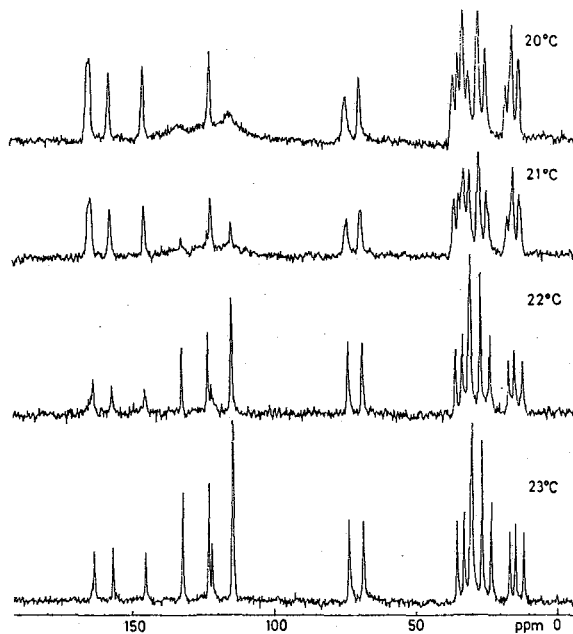


Fig.7 CP-MAS ^{13}C -NMRの温度変化
(温度は設定温度、MAS : 4.6kHz)

VI/MAS ^{13}C NMR Study of Hydrated Samples

Tsukasa Ito, Fumitaka Horii and Ryozo Kitamaru

(Insitute for Chemical Research, Kyoto University)

The phase structure and hydrogen bonds of solid PVA samples with different water contents have been examined at different temperatures by high-resolution solid-state NMR spectroscopy using MAS rotors with O-ring seals. Two noncrystalline components, which are discriminated by the extent of intramolecular hydrogen bonds, exist together with the crystalline component for dried and hydrated samples. In addition, the hydrated samples contain the rubbery component, which is selectively observable as a long T_{2C} component. This component increases in intensity increasing temperature, resulting in the direct observation of triplets due to the triad tacticity.

1. 緒言

親水性高分子試料については水存在下でCP/MAS ^{13}C -NMR測定を行うことは重要であるが、一般にはMASによる脱水が起るため困難である。我々^{1,2)}は、既に室温用についてはOリング付きMASロータを開発し、セルロース、アミロース、デキストランなどの研究に有効であることを示した。また、最近セラミックス製Oリング付きMASロータを開発し、2-3の試料について温度可変用として利用できることを確認した。本研究では、ポリビニルアルコール (PVA) 固体についての結果を中心に述べる。PVAのCP/MAS ^{13}C -NMRスペクトルのCH共鳴線が分子内水素結合に応じて3本に分裂することは寺尾ら³⁾により見だされており、この分裂が含水量および温度により受ける影響について結晶および非晶成分の寄与を考慮して検討した。

2. 実験方法

クラレ(株)より提供された重合度1700のPVAを常法により完全ケン化、精製した後、キャスト法によりフィルムを作製した。相構造を明瞭にする目的であらかじめ乾燥後フィルムを180°Cで10分間熱処理した。調湿は65%R.H.、95%R.H.、98%R.H.の雰囲気下のデシケータ中で恒量に達するまで行なった。含水率は乾燥PVAに対する含水量を重量百分率で表わした。固体高分解能NMR測定はJEOL JNM-FX200 分光計により4.7 Tの静磁場下で行った。CP過程での各回転磁場の振幅 $\gamma B_1/2\pi$ は69.4kHz、dipolar decoupling時の ^1H のそれは59kHzとした。図1 (a)には室温用Oリング付きロータ^{1,2)}と今回新しく開発した温度可変(VI)用Oリング付きロータを示す。MASはこれらのロータを使用し、回転数3~3.5kHz(室温用)、

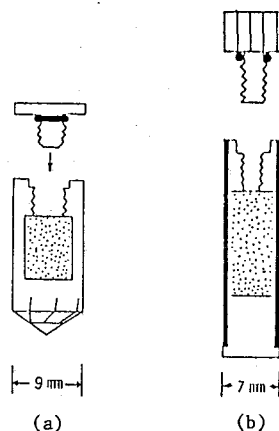


Fig.1 MAS rotors with O-ring seals for room temperature measurements (a) and variable temperature measurements (b).

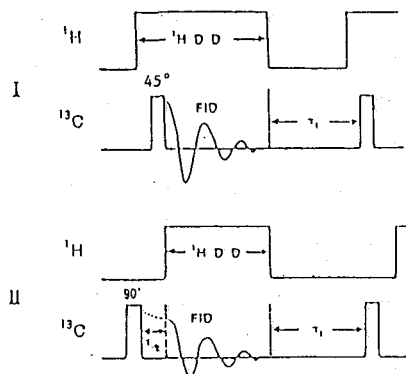


Fig.2 Pulse sequences used in this work.

3.8~4.0kHz(VI用)で行なった。図2には本研究で用いたパルス系列を示す。

3. 結果及び考察

図3に乾燥及び調湿試料の CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルと溶液状態でのスペクトル⁽⁴⁾を棒状スペクトルで示す。60~80ppm付近の3本のメチン炭素の吸収線を低磁場側からピーク I、II、IIIとする。また(c)、(d)においてピーク II、III間に表われるピークをIVとする。

調湿によりピーク I、II、III及びメチレン炭素の化学シフトは変化しなかったが、含水率が25%を越えると寺尾らの研究では認められなかったかなりシャープなピークIVが67ppm付近に現われる。このピークの帰属については後で述べるが調湿により分子間水素結合はもとより分子内水素結合が切断された結果生成したゴム状成分であると考えられる。表1にはこれらのスペクトルの化学シフト値をまとめて示す。

次に乾燥、調湿試料の相構造を明らかにするために ^{13}C スピナー格子緩和時間 $T_{1\rho}$ を測定した結果を表2に示す。測定は、短い $T_{1\rho}$ に対しては saturation recovery法、長い $T_{1\rho}$ に対してはTorchia⁵⁾ のパルス系列により行なった。含水率 7%の試料に対する saturation recovery法による実験は行っていないが、いずれの試料に対しても3種類の $T_{1\rho}$ が存在することがわかる。まず各試料の長い $T_{1\rho}$ を持つ成分について考察する。我々の測定条件下で、少なくとも乾燥状態では、 $T_{1\rho}$ が長いことは運動性が低いことを示す。また得られたメチン炭素の吸収線の線幅が狭く、その分裂が明瞭であることより長い $T_{1\rho}$ を持つ成分は結晶成分と帰属できる。しかしその他の成分の帰属は容易ではないので、内包する成分をより明確にするために、 $T_{1\rho}$ の差を利用して得られたスペクトル及び差スペクトル法を用いた line shape 解析を行なった。

図4には乾燥試料に対し図2のパルス系列 I により得られた全成分を反映したスペクトル(a)、Torchiaのパルス系列で測定した

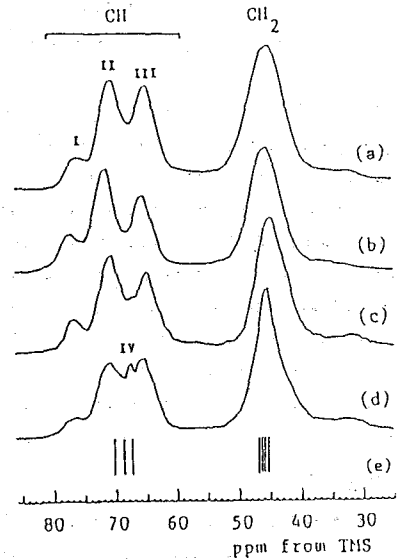


Fig.3 50MHz CP/MAS ^{13}C NMR spectra of PVA samples with different water contents: (a) 0%, (b) 7%, (c) 25%, (d) 38%, (e) solution.

Table 1 ^{13}C Chemical Shifts of Poly(vinyl alcohol).

water content %	CH			CH ₂
	mm	mf	rf	
0	76.87	70.94	65.29	45.64
7	77.46	71.52	65.49	45.64
25	76.87	70.64	67.24	45.05
38	76.68	71.13	67.62	45.44

Table 2 ^{13}C Spin-Lattice Relaxation Times $T_{1\rho}$ of Respective Carbons of PVA.

water content %	$T_{1\rho}$ of CH/s			$T_{1\rho}$ of CH ₂ /s
	mm	mf	rf	
0	1.0	1.5	2.0	3.2
	9.4	23.5	24.2	19.3
	-	76.5	74.8	72.2
7	-	-	-	-
	7.0	7.7	6.8	9.7
	-	41.1	42.0	40.6
25	0.3	0.2	0.2	0.1
	7.4	9.8	4.9	4.6
	55.1	48.3	44.7	42.3

$T_{1\rho}$ が72~77sの結晶成分のスペクトル(b)、(a)より(b)を差し引いて得られた非晶成分のスペクトル(c)、図3(a)より図4(b)を差し引いて得られた非晶成分のスペクトル(d)を示す。図4(c)、(d)のCH共鳴線が3本に分裂することより、非晶中においても分子内水素結合が存在することがわかるがこの成分は表2において9~24sの $T_{1\rho}$ を持つ非晶成分に相当する。一方、1~3sの $T_{1\rho}$ をもつ成分は、分子内水素結合がほとんど形成されていないガラス状非晶と思われるが、詳細は現在検討中である。また図4(a)、(b)のメチン炭素の共鳴線ピークの面積比より算出した結晶化度は53%であった。

図5には含水率25%の試料に対しパルス系列Iにより得られた全成分を反映したスペクトル(a)、Torchiaのパルス系列で測定した $T_{1\rho}$ が55~42sの結晶成分のスペクトル(b)、(a)より(b)を差し引いて得られた非晶成分のスペクトル(c)、図2のパルス系列IIにおいて $\tau_c=40\mu\text{s}$ とし得られた横緩和時間 $T_{2\rho}$ の長いゴム状非晶成分のスペクトル(d)を示す。(d)に示したスペクトルとsaturation recovery法にて得られたスペクトルの形状及び化学シフトの比較により、この成分は表2において0.1~0.3sの $T_{1\rho}$ を持つ成分であることが判明した。図5(e)は(c)より(d)を差し引いて得られた分子内水素結合を持つ非晶成分、また図5(f)は図3(c)より(b)、(d)を差し引いて得られた分子運動性の低い非晶成分のスペクトルである。(e)、(f)の非晶成分のスペクトルを比較すると、(e)にはさらにブロードな成分が含まれている様に思われる。そこで(e)より(f)を差し引いて得られたスペクトルが(g)であり、分子内水素結合のほとんど存在しないガラス状非晶成分と考えられる。表2に示した4~9sの $T_{1\rho}$ を持つ成分がガラス状非晶か分子内水素結合を持つ非晶のいずれに属するかについては現在検討中である。また、乾燥試料と同様に結晶化度を求めると54%であった。よって結晶化度は調湿により影響を受けないものと考えられる。

次に温度変化が水素結合形態、分子運動性に与える影響を調べるために含水率25%の試料に対してVT/MAS実験を行

Fig.5 ^{13}C NMR spectra of PVA sample with 25% water content: (a) whole spectrum, (b) crystalline, (c) noncrystalline (a-b), (d) rubbery, (e) noncrystalline (c-d), (f) noncrystalline (Fig.3c-Fig.5c-Fig.5d), (g) glassy (e-f)

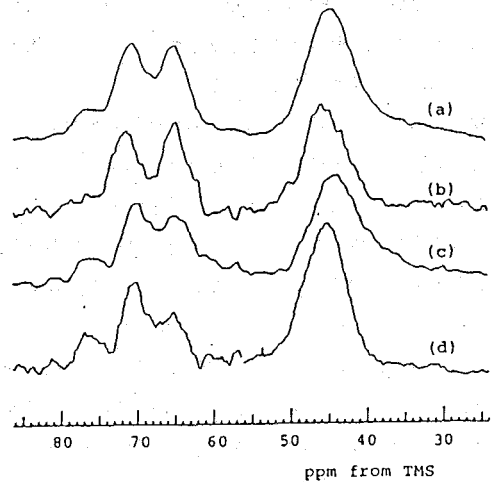
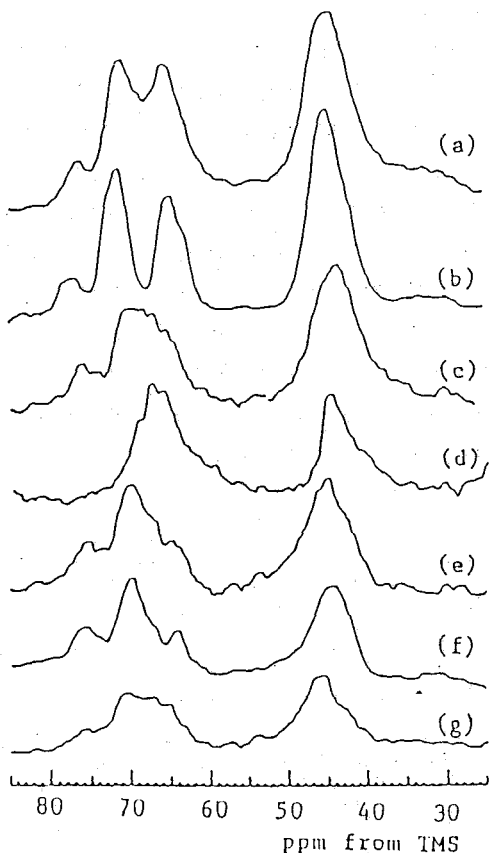


Fig.4 ^{13}C NMR spectra of dried PVA: (a) whole spectrum, (b) crystalline, (c) noncrystalline (a-b), (d) noncrystalline (Fig.3a-Fig.4b).



った。図6に各温度でのCP/MASスペクトルを示す。0°C以下ではピークIIIの相対強度が大きくなっている。この程度の含水率では全ての水は不凍水と考えられる⁸⁾。従ってこのピークIIIの強度の増大は温度低下に伴って水分子の配位状態が変化し分子内水素結合が切断され水素結合を持たないCH炭素が増加したためと考えられるがその詳細については現在検討中である。一方、27°C以上におけるCH共鳴線に注目すると、高含水率試料の場合と同じくゴム成分のピークが現れる。90°Cにおいては、溶液状態での¹³C-NMRスペクトルに認められる *mm*、*mr*、*rr*、と同様なtripletが僅に認められる。このtripletがゴム状非晶成分であることを確認するために図1のパルス系列IIにおいて $\tau_c=47\mu s$ とし横緩和時間 T_{2c} の長い成分のみを選択的に測定した。図7にその結果を示す。図7のline shapeと溶液状態の化学シフトとの比較により90°Cでは立体規則性を反映したゴム状非晶成分が観測されることが明らかになった。

4. 結論

種々の含水率を持つPVAフィルムについて固体高分解能¹³C NMR法により相構造、分子内水素結合を中心に検討した。その結果、含水率25%以下の試料では結晶成分、分子内水素結合の存在する非晶成分、及び分子内水素結合がほとんど存在しない非晶成分の計三成分が存在することが判明した。一方、含水率25%以上の試料には、さらにゴム状非晶成分が存在することが確認され、合計三成分の非晶成分が存在することが明らかになった。含水率25%の試料に対するVT/MAS¹³C NMR実験により温度上昇に伴い分子内及び、分子間水素結合が切断されゴム成分が増加することが判明した。一方、温度低下に伴い分子内水素結合を持たない成分が増加するが、詳細は現在検討中である。

References

- 1) F. Horii, A. Hirai, R. Kitamaru, I. Sakurada, *Cellulose Chem. Technol.*, **19**, 513 (1985).
- 2) F. Horii, A. Hirai, R. Kitamaru, *Macromol.*, **19**, 930 (1986).
- 3) T. Terao, S. Maeda, A. Saika, *Macromolecules*, **16**, 1513 (1983).
- 4) T.K. Wu, D.W. Ovenall, *Macromolecules*, **6**, 582 (1973).
- 5) D.A. Torchia, *J. Magn. Reson.*, **44**, 117 (1981).
- 6) S. Takami, F. Horii, R. Kitamaru, Y. Ikada, T. Mita, M. Hatada, *Rep. Polval Comm.*, No. 67, p.61, 1970.

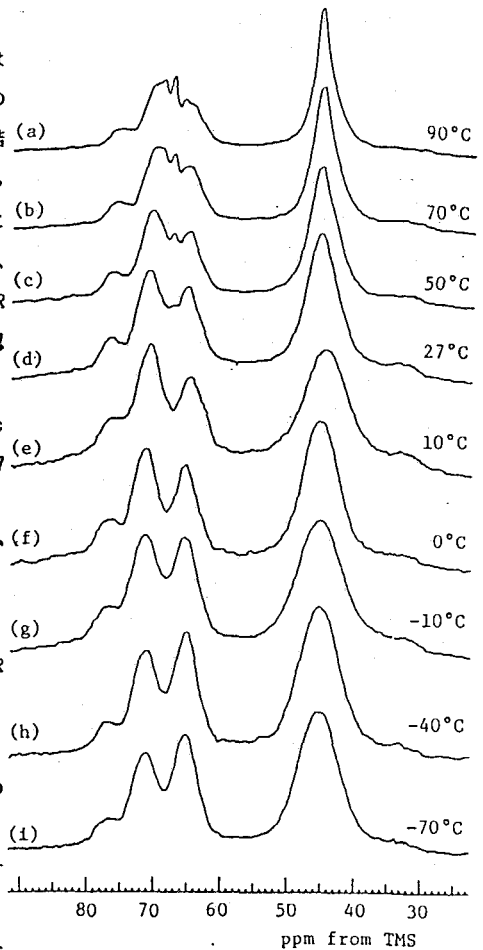


Fig.6 ¹³C NMR spectra of PVA sample with 25% water content at different temperatures.

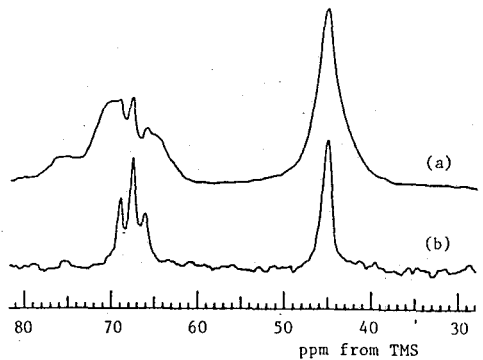


Fig.7 ¹³C NMR spectra of PVA sample with 25% water content at 90°C: (a) CP/MAS, (b) rebbery component measured by pulse sequence II.

ポリプロピレン等温結晶化物の相構造に関する VT/MAS
 ^{13}C NMR 研究

(昭和電工大分研, 京大化研*) 齋藤茂樹・茂木義博・中川将*・
 堀井文敬*・北丸竜三*

VT/MAS ^{13}C NMR Study of Phase Structure of Isotactic Polypropylene Isothermally
 Crystallized from the Melt

Shigeki Saito, Yoshihiro Moteki, Masaru Nakagawa*, Fumitaka Horii* and
 Ryozo Kitamaru*

(Oita Research Laboratory, Showa Denko K. K. and *Institute for Chemical
 Research, Kyoto University)

Solid-state high-resolution ^{13}C NMR spectroscopy is a powerful technique for
 studying phase structure of crystalline polymers such as polyethylene. In
 this paper we report the phase structure of isotactic polypropylene isother-
 mally crystallized from the melt and its dependence on temperature using VT/
 MAS (Variable Temperature/Magic Angle Spinning) system. We also discuss
 molecular motion of each phase and each resonance line ($\text{CH}_2, \text{CH}, \text{CH}_3$) in terms
 of relaxation times above room temperature.

1) 固体高分解能 ^{13}C NMR 法はポリエチレンのような結晶性高分子の相構造、すなわち結
 晶、非晶の成分数とその割合および各相の構造を調べる有力な方法である。我々はこれまで固
 体高分解能 ^{13}C NMR 法によりポリエチレンの相構造とその分子量依存性¹⁾、および各相の空
 間的配置状態²⁾について明らかにしてきた。さらに最近、ポリエチレンと同様に結晶性が高く、
 分子運動に関して興味深いメチル基を含むアイソタクチックポリプロピレンのバルク等温結晶
 化物についてその相構造を調べ、結晶、3らせん構造に近いコンホメーションの非晶および溶
 液状態と同様のランダムなコンホメーションの非晶の三成分より成ることを明らかにした。³⁾
 今回は VT/MAS (Variable Temperature/Magic Angle Spinning) システムを使い、ポリプ
 ロピレンの種々の温度での固体高分解能 ^{13}C NMR 測定を行い、相構造の温度依存性および分
 子運動性を検討した。

2) 昭和電工製アイソタクチックポリプロピレン (MA510) 粉末をソックスレー抽出
 により精製して用いた。抽出残の重量平均分子量は GPC より約 23 万、isotacticity は溶液
 の ^{13}C NMR スペクトル (1,2,4-trichlorobenzene/benzene- d_6 =3/1, 120°C) より (mm) = 98.
 0% であった。結晶化は 230°C で融解後、
 140°C 6 日間行い、得られた試料を PP
 140 と略称する。この試料は球晶構造をと
 り、結晶形は単斜晶系であった。固体高分解
 能 ^{13}C NMR 測定は JEOL JNM-
 FX200 分光計により 4.7 T の静磁場下
 で行い、 ^{13}C および ^1H の回転磁場強度 $\gamma B_1 /$
 2π は 69.4 kHz で dipolar decoupling
 (DD) 時は ^1H のそれを 54.3 kHz とした。
 また、室温以外の測定は温度可変型プロ
 ープを取り付けた VT/MAS システムによ
 り行った。

3) 結果と考察

3-1 室温での相構造

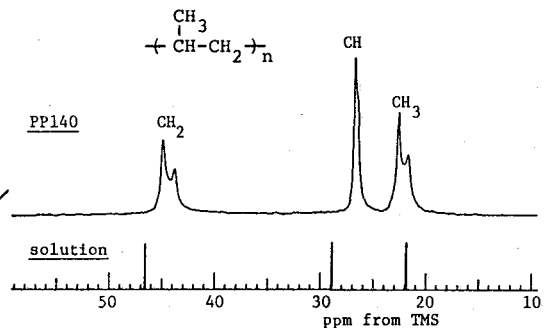


Fig. 1 50MHz CP/MAS ^{13}C NMR spectrum of PP140
 and scalar-decoupled ^{13}C NMR spectrum
 of the solution of isotactic polypropylene

図1にPP140の室温でのCP/MAS ^{13}C NMRスペクトルを示す。ポリプロピレンはCHの不斉炭素に関してメソ、ラセミが存在するが、このアイソタクチック物では98%がmmシーケンスである。また、結晶中で分子鎖は3らせん構造をとっている。

結晶化物のCH₂、CHの共鳴線は溶液状態のそれらに比べてかなり高磁場シフトするが、これは両状態のコンホメーションの違いに基づくと考えられる。結晶化物の各相はその分子運動性の違いに基づき異なったT₁、T₂、NOEを示すが、今回は ^{13}C のスピン-格子緩和時間により相構造を検討した。表1にTorchiaのバルス系列およびsaturation recovery法より求めた各共鳴線のスピン-格子緩和時間(T_{1c})を示す。各共鳴線は相構造を反映した複数成分より成り、CH₂、CHには3成分、CH₃には2成分が存在する。ここでCH₃のみ2成分となったが、その原因として3成分中の2つのT_{1c}が近いことが考えられる。また、CH₃の最も長いT_{1c}は結晶成分に帰属されるがCH₂、CHのそれらに比べてかなり短い。これは結晶中であってもT_{1c}に影響する10⁸HzオーダーのCH₃の内部回転が可能なためと考えられる。

次に各成分の帰属を行うためDD/MAS法により全成分を反映した ^{13}C NMRスペクトルを測定し、CH₂の共鳴線に対してスペクトル解析を行った。結果を図2に示す。AがTorchiaのバルス系列により測定したT_{1c}が最も長い成分のスペクトルであり、結晶成分に帰属される。B、CがLorentz曲線を仮定して非線形最小2乗法で実験曲線と一致するように決めた成分で、T_{1c}がそれぞれ7.6、~0.4sの成分に対応する。後で述べる温度変化の結果よりB、Cはいずれも非晶に帰属され、その化学シフトよりBは結晶中同様3らせん構造に近いコンホメーションをとり、Cは溶液状態と同様のランダムなコンホメーションをとっていると考えられる。

3-2 相構造の温度依存性

図3に室温から110℃までの種々の温度でのCP/MAS ^{13}C NMRスペクトルを示す。温度上昇に伴い、CH₂、CHで溶液とほぼ同じ位置に明瞭に共鳴線が観測されるようになる。これは測定温度がガラス転移温度(T_g)以上になることにより、図2に示したCの成分が主として分子運動性の向上

Table 1 ^{13}C spin-lattice relaxation times (T_{1c}) of PP140

sample	T _{1c} /s				
	CH ₂		CH	CH ₃	
	44.82ppm	43.70ppm	26.62ppm	22.49ppm	21.61ppm
PP140	64.3	63.3	38.6	0.91	1.14
	7.6	7.5	8.7	0.28	0.28
	~0.4	~0.4	~0.4		

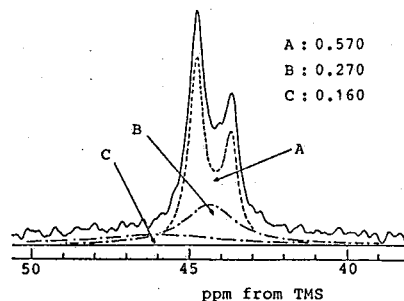


Fig. 2 DD/MAS ^{13}C NMR spectrum of PP140 in the CH₂ region

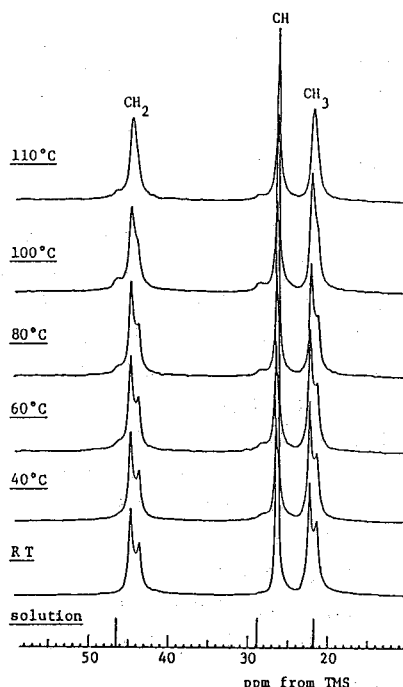


Fig. 3 CP/MAS ^{13}C NMR spectra of PP140 above room temperature

に伴って線幅の狭化を起こしたものであり、Cの成分の帰属の正しさを示すものである。一方化学シフトの温度依存性に関しては、特にCH₂の分裂ピークで温度が高くなると低磁場側の共鳴線に高磁場側の共鳴線が近づくという挙動が認められる。Bunnら⁴⁾は、アイソタクチックポリプロピレンの単斜晶系においては2つのsiteが2:1の割合で存在し、各々の化学シフトが異なるため分裂を示す、すなわちバックギングが分裂の原因であるとしている。しかし、この考え方では高磁場側の共鳴線が低磁場側の共鳴線に近づくという挙動は説明できず、現在分裂の原因を考察中である。

図4に-80℃から室温までの種々の温度でのCP/MAS ¹³C NMRスペクトルを示す。温度低下に伴って室温以上の場合と同様にCH₂, CH₃の分裂が不明瞭になるが、この場合は主として線幅の増大によるものである。一般に高分子結晶においては温度低下により熱的乱れが減少するため、線幅は減少すると予想される。しかし図4の結果は逆になっており、このことは室温付近では熱振動により結晶中での微妙な構造の違いに基づく共鳴線の広がり平均化されるのに対し、低温ではそれらが凍結されそのため線幅が増大したものと考えられる。また、室温以下ではCH₂の低磁場側に図2のCに相当するランダム非晶が多少強く観測される。この原因として、1)ランダム非晶成分の増加、2)線幅の狭化、3)CP効率の増大が考えられるが、1)ランダム非晶は減少する傾向にある、2)線幅の大きな変化はないことより、T_{1ρH}の変化によるランダム非晶のCP効率の相対的増大によるものと考えられる。

図5に室温と同様の解析により求めたPP140の相構造の温度依存性を示す。結晶化度は温度依存性をほとんど示さないのに対し、非晶では特に40から100℃の間で3₁らせん構造に近いコンホメーションの非晶からランダムな非晶への構造変化が起こる。さらにいくつかの実験よりこの構造変化はほとんど可逆的であることがわかった。これは、温度上昇により3₁らせんに近い構造からエントロピーが増大する方向のランダムな構造に変化したものと考えられる。

3-3 T_{1c}の温度依存性と分子運動性

図6に室温と同様の方法で測定したT_{1c}の温度依存性を示す。各成分は分子運動性の違いに基づく異なったT_{1c}の値および温度依存性を示す。すでにLyerlaら⁵⁾は、室温から-180℃付近までのT_{1c}を相構造を考慮せず一成分として求めたが、その結果によるとT_{1c}はCH₃の内部回転により決まり、-100℃から室温の温度領域で単調に増加した。



Fig. 4 CP/MAS ¹³C NMR spectra of PP140 below room temperature

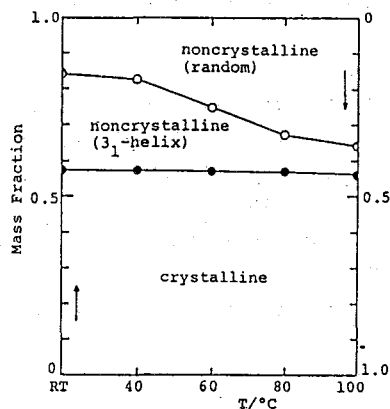


Fig. 5 Temperature dependence of phase structure of PP140

図4のCH₂, CH, CH₃の結晶成分については、そのT_{1c}および温度依存性より特に60℃付近まではCH₃の内部回転の寄与が大きいものと考えられる。しかし、CH₂, CHのランダム非晶はCH₃より短いT_{1c}を示しており、主鎖自身が関与する10⁸Hzオーダーの分子運動の寄与が大きいものと考えられる。また、CH₃では結晶、非晶ともに温度上昇に伴いT_{1c}は増大する。単一相関時間モデルをあてはめて考えると、いずれも極度尖鋭化条件($\omega_0\tau_c \ll 1$, ω_0 : ラーマ周波数, τ_c : 相関時間)を満足し、結晶の方が τ_c が小さい、すなわち分子運動性が高いという結果になる。しかし、これは結晶中では別のピコ秒オーダーの分子運動が存在し、そのためT_{1c}が増大したのと考えられる。今後、より詳細な分子運動の解析を行うため、より広い温度領域での各成分のT_{1c}測定を行う予定である。

3-4 まとめ

固体高分解能¹³C NMR法によりバルク等温結晶化アイソタクチックポリプロピレンの相構造を調べ、結晶、3₁らせん構造に近いコンホメーションの非晶、ランダムなコンホメーションの非晶の三成分より成ることがわかった。また、VT/MASシステムによる室温から100℃の測定より、スピナー格子緩和時間(T_{1c})および相構造の温度依存性を調べた。その結果、40~100℃の間で3₁らせん構造に近いコンホメーションの非晶からランダムな非晶への可逆的な構造変化が起こることがわかった。

References

- 1) R. Kitamaru, F. Horii, K. Murayama, *Macromolecules*, 19, 636(1986).
- 2) M. Nakagawa, F. Horii, R. Kitamaru, *Polym. Prepr., Japan*, 35, 3472(1986).
- 3) S. Saito, Y. Moteki, M. Nakagawa, F. Horii, R. Kitamaru, *Polym. Prepr., Japan*, 36, 985(1987).
- 4) A. Bunn, M. E. A. Cudby, R. K. Harris, K. J. Packer, B. J. Say, *Polymer*, 23, 694(1982).
- 5) J. R. Lyerla, C. S. Yannoni, *IBM J. Res. Develop.*, 27, 302(1983).

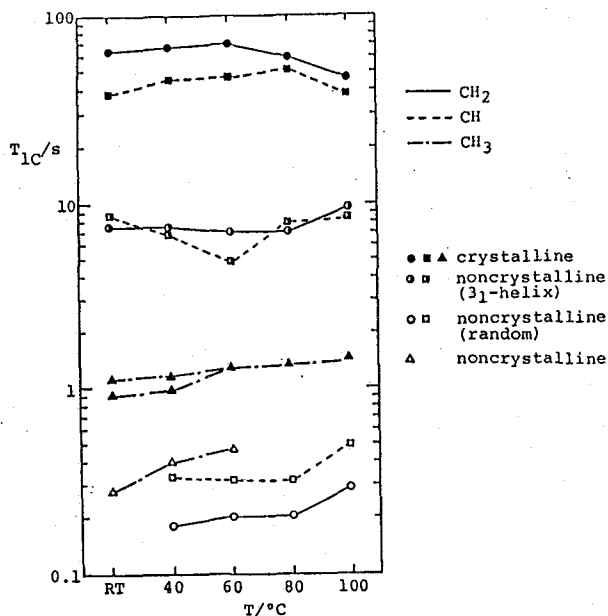


Fig. 6 ¹³C spin-lattice relaxation times (T_{1c}) of PP140 at various temperatures

(京大化研、東農工大^{*}、三菱化成総研^{**})⁰中川 将、堀井文敬、北丸竜三田中康之^{*}、佐藤寿弥^{*}、坂田育幸^{**}、早瀬哲郎^{**}VT/MAS ^{13}C NMR Studies of Cycloalkane CrystalsM. Nakagawa, F. Horii, R. Kitamaru, Y. Tanaka^{*}, H. Sato^{*}, Y. Saka^{**}, T. Hayase^{**}(Institute for Chemical Research Kyoto Univ., ^{*}Tokyo University of Agriculture and Technology and ^{**}Mitsubishi Chemical Industries Ltd.)

The structures of crystalline cores and folds of cycloalkanes such as cyclooctatetracontane and cyclohexacontane have been studied at different temperatures by VT/MAS ^{13}C NMR spectroscopy. At low temperatures the CP/MAS spectra of the samples consist of the enhanced line at 34.7ppm, assignable to the CH_2 carbons in the crystalline cores, and several smaller upfield lines assigned to the CH_2 carbon in the folds. These upfield lines begin to broaden above 16°C, suggesting the onset of the local motion of the order of 10^2Hz . Above 37°C the 34.7ppm line also broadens and a sharp line appears at 28.8ppm above 65°C possibly due to the onset of enhanced molecular motions including the trans-gauche conformational transition. As a result of the analysis of the chemical shift in terms of motional models, gggt or gtgg defects seem to be favored in the crystals at 67°C.

1. 緒言

シクロパラフィン分子は結晶中において平行な2本のtrans-zigzag分子鎖とそれらを繋ぐfold部分からなっている。そのため、ポリエチレンの結晶表面モデルの一つと考えられているが、その詳細な構造および分子運動については明らかではない。今回、我々は高純度のシクロパラフィンを合成し、良く制御された条件下で結晶化させた試料について、種々の温度で固体高分解能 ^{13}C -NMRスペクトルを測定し、その化学シフト値、 ^1H - ^{13}C cross-polarization (CP) 挙動および ^{13}C スピン-格子緩和時間 $T_{1\rho}$ により結晶およびfold部分の分子運動について検討した。

2. 実験方法

試料：炭素数12のシクロドデセンを出発物質として、 $\text{WCl}_6/\text{EtAlCl}_2$ 触媒下でオリゴマー化し、GPCを用いて4量体および5量体を分離精製した後、残留二重結合をp-トルエンスルホンヒドライドにより還元して環状パラフィンを得た¹⁾。GC法およびFD-MS法により決定したシクロオクタテトラコンタンの純度は97%であった。結晶化は5%酢酸ブチル溶液を3°C/hで80°Cから室温まで徐冷することにより行った。電子線回折のデータからシクロオクタテトラコンタン結晶は単斜晶系であることを確認した。

NMR測定：50MHz ^{13}C -NMR測定はVT/MASプローブを接続したJEOL JNM-FX200NMR分光計を用いて行った。

3. 結果および考察

3. 1. シクロオクタテトラコンタン ($\text{C}_{40}\text{H}_{96}$)

3. 1. 1. lineshapeと化学シフト

図1には種々の温度で測定したシクロオクタテトラ

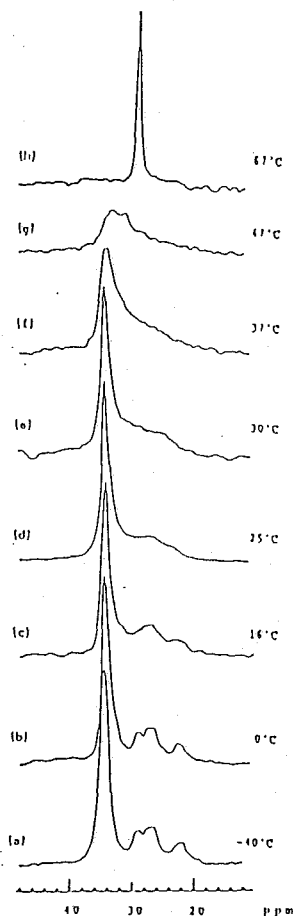


Fig.1. 50MHz solid-state ^{13}C NMR spectra of cyclooctatetracontane at different temperatures. (a)-(g): CP/MAS, (h): DD/MAS

コンタン結晶の50 MHz ^{13}C -NMRスペクトルを示す。シクロオクタテトラコンタン結晶のfold部分はg-g-t-g-g (g: ゴーシュ, t: トランス) のコンホメーションシーケンスをとり、環境の異なる4種のメチレンからなる²⁾。図1 a, bから明らかのように、0°C以下では結晶コアのメチレン炭素の低磁場側の共鳴線とともにその高磁場側にfold部分を構成する個々の炭素の共鳴線が明瞭に観測される^{3), 4)}。表1に各ピークの化学シフトおよび帰属を示した。なお、結晶コア内のメチレン炭素の化学シフト値は比較的大きいが、これは三斜晶系⁵⁾に基づくものではなく、結晶系は単斜晶系であるが、その subcellがn-パラフィンの三斜晶系に似ていることによるものと考えられる。

Table 1. ^{13}C chemical shifts of cyclooctatetracontane at -40°C (in ppm from TMS)

conform. sites	tt.tt	gt.tt	tg.gt	gg.tt	gt.gg
	34.7	29.2	27.5	26.9	22.2

さて、fold部分の共鳴線は測定温度が高くなると10² Hz程度の局所運動のためブロードになる。この場合結晶コア部の共鳴線は変化しない(図1 c~e)。一方、37°C以上では結晶コアの共鳴線もブロードになる(図1 f~g)。このときCP/MAS法により得られる共鳴線の強度は温度の上昇と共に減少し、55°C以上ではCP/MAS法による測定は困難であった。従って、図中の67°CのスペクトルはDD/MAS法により測定したものであり、一本の鋭い共鳴線が28.8ppmにみられる。従って、融点から20°C以上も低い67°Cにおいても、異なるコンホメーション間の速い交換により全ての炭素は磁氣的等価な状態にあるものと思われる。我々はシクロオクタテトラコンタン分子がどのような運動をしているかを検討するため、次の2つのモデルを用いて化学シフト値を計算し、67°Cでの化学シフト値28.8ppmと比較した。

- (i) モデルA: 結晶コア内をt-g-t defectがkink運動するモデル(図2 a)。
- (ii) モデルB: 低温でのコンホメーションを保ちながら、環状分子が全体として回転運動するモデル(図2 b)。

表2に両モデルによる計算結果を示す。なおこの値は両方のモデルにおいて存在するコンホメーションに対する化学シフトの平均値である。いずれのモデルによる化学シフト値も実験値に比べて3~5ppm大きい。従って、67°Cにおいては、結晶コア内にもfold構造に似たg-g-t-tやg-t-g-gなどのdefectが存在し、結晶構造はより乱れた状態にあるものと考えられる。

3. 1. 2. CP挙動

図3および表3にはCPのコンタクトタイム依存性を種々の温度

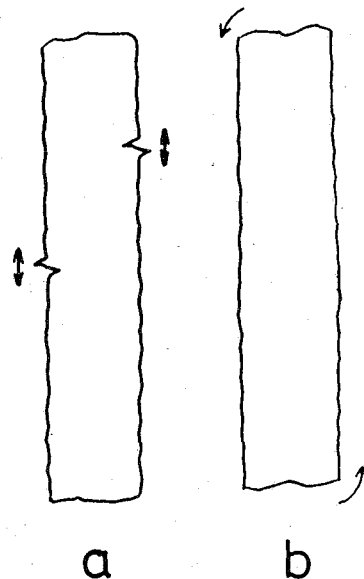


Fig. 2. Molecular motional models for cyclooctatetracontane

Table 2 Calculated ^{13}C chemical shifts of cyclooctatetracontane at 67°C

model A	model B	experimental
33.95	31.95	28.8

temp. (°C)	T_{CH}/ms		$T_{1\rho H}/ms$	
	crystalline	fold	crystalline	fold
25	0.20	0.11	10.0	11.7
35		0.10		4.98
45		0.036		3.56
50		0.19		2.60

Table 3 Spin relaxation parameters in the cross-polarization process for cyclooctatetracontane at different temperatures

で測定した結果および最小二乗法により求めた T_{CH} 、 $T_{1\rho H}$ の値を示した。図で明らかにように温度の増大と共に fold 部分、結晶コア部分の $T_{1\rho H}$ の値はいずれも減少する。従って、3.1.1 で述べた CP/MAS スペクトルの強度の低下は $T_{1\rho H}$ の減少によるものであると結論できる。

3. 1. 3. スピン-格子緩和

表 4 には Torchia のパルス系列により測定した各成分の $T_{1\rho}$ の測定結果を示す。室温では fold 部分と結晶コア部の炭素の値はほとんど差がない。また -40°C でも fold 部分の $T_{1\rho}$ の方が短い値を持つようにみえるが大差はない。このことから室温以下では $T_{1\rho}$ に関与する 10^8 Hz 程度の速い運動については fold 部分と結晶部分は同程度であると考えられる。

3. 2. シクロヘキサコンタン ($\text{C}_{80}\text{H}_{120}$)

図 4 には種々の温度で測定したシクロヘキサコンタン結晶の ^{13}C -NMR スペクトルを示す。図 4 (b) から明らかなようにシクロオクタテトラコンタン結晶の場合と異なり、 5°C において既に fold 部分の共鳴線が 10^2 Hz 程度の運動によりブロードになっていることがわかる。 30°C においては結晶コア部の共鳴線はかなり高磁場側にすそを引くようになる。さらに温度をあげると 32.4ppm の位

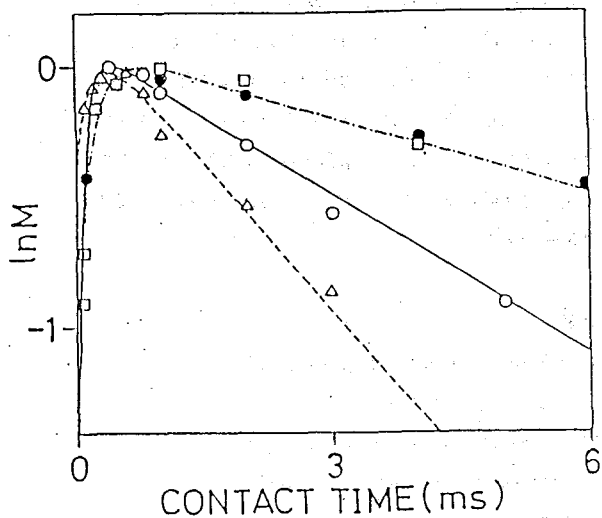


Fig. 3. ^{13}C cross-polarization processes for cyclooctatetracontane at different temperatures: \square (25°C), \bullet (25°C), \circ (35°C), Δ (50°C); \square crystalline, \bullet fold

Table 4 ^{13}C spin-lattice relaxation times of cyclooctatetracontane at different temperatures

temp. (°C)	$T_{1\rho}/s$				
	tt.tt	tt.tg	tg.gt	tt.gg	gt.gg
-40	145	159	133	119	123
25	28.6			27.0	
35			9.52		
45			6.90		
50			6.13		

置に新しくピークが現われる。この共鳴線はその化学シフトの値から subcell が orthorhombic である結晶⁴⁾によるものと思われる。この成分の T₁ρ は数百 ms であり、結晶内部で 10³ Hz 程度の局所運動が著しく起こっているものと考えられる。

一方、60°C 以上になると 31.0 ppm の位置にあらたにピークが観測されるようになる。このピークはその化学シフト値から 67°C でシクロオクタテトラコンタン結晶に観測されたものと同じく、g-t-g-g などの fold 構造に近い defect を持つ乱れた結晶成分で、これらの各コンホメーション間で 10³ Hz 程度の t-g 遷移をしているものと考えられる。また、この成分の T₁ρ は数百 ms であった。以上述べたようにシクロヘキサコンタン結晶はシクロオクタテトラコンタン結晶とは異なる温度依存性を示すことが明らかになったが、この原因については現在検討中である。

文献

- 1) H.Sato, K.Okimoto, Y.Tanaka, J.Macromol.Sci. chem., **A11**, 767(1977).
- 2) I.Trezebiatowski, M.Dräger, G.R.Strobl, Makromol. Chem., **183**, 731(1982).
- 3) M.Möller, W.Gronski, H.J.Cantow, H.Höcker, J.Am.Chem.Soc., **106**, 5093(1984).
- 4) H.Drotloff, D.Eneis, R.F.Waldron and M.Möller, Polymer, **28**, 1200(1987).
- 5) I.Sorita, I.Yanobe, T.Komoto, I.Ando, H.Sato, K.Deguchi, M.Imanari, Makromol.Chem., Rapid commun., **5**, 657(1984).

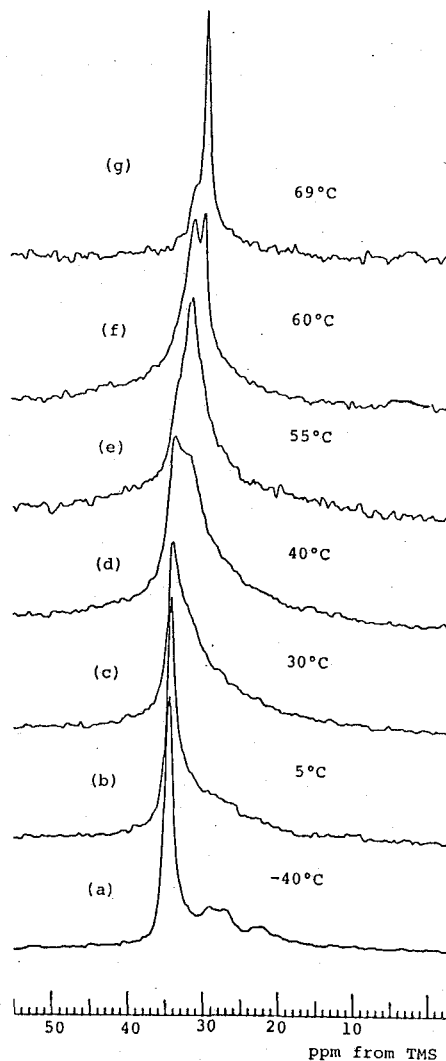


Fig.4 50MHz solid-state ¹³C NMR spectra of cyclohexacontane at different temperatures.

固体状態における高分子鎖の ^{13}C NMR化学シフトと電子構造: ポリオキシメチレンの鎖間相互作用

(東工大工・東工芸大工*) ○黒子弘道・山延 健*

甲本忠史・安藤 勲

^{13}C NMR Chemical Shift and Electronic Structure of Polymers. Interchain Interaction in Polyoxymethylene.

Hiroimichi Kurosu, Takeshi Yamanobe*, Tadashi Komoto, Isao Ando

(Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology and

*Department of Industrial Chemistry, Tokyo Institute of Polytechnics)

High resolution ^{13}C NMR spectra of trigonal and orthorhombic polyoxymethylene(POM) were measured in the solid state. In order to understand the relationship between the ^{13}C NMR chemical shift and electronic structure of POM, quantum-chemical calculations will be carried out by using tight-binding MO theory with single chain model and 7 chains model and will be compared with the experimental data. Further the interchain interaction will be discussed.

1. はじめに

固体高分解能NMR法の発展により、高分子鎖の化学シフトが固体状態においても観測可能となった。本来、化学シフトは磁場が加えられた方向と、それによって生ずる遮蔽の方向によって与えられる2階のテンソル量である。通常の測定あるいは固体CP-MAS法によって得られる等方平均化学シフト($(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})/3$)より多くの情報を持つ化学シフトテンソルの主値(σ_{11} , σ_{22} , σ_{33})を得ることによって、固体の電子構造をより良く把握することが可能となる。このテンソル量として得られるNMR化学シフトは、立体構造、電子構造あるいは結晶構造等に関する電子構造、あるいは立体構造に関する情報を含んでいる。これらの情報をさらに深く理解し、詳細な知見を得るためには理論的な手法を用いたアプローチが必要となる。そこで、高分子鎖の電子構造を直接評価することのできるtight-binding(TB)近似を用い、モデル分子として一本鎖、そして鎖間相互作用を考慮するために3本鎖、さらに、結晶構造を再現するため7本鎖

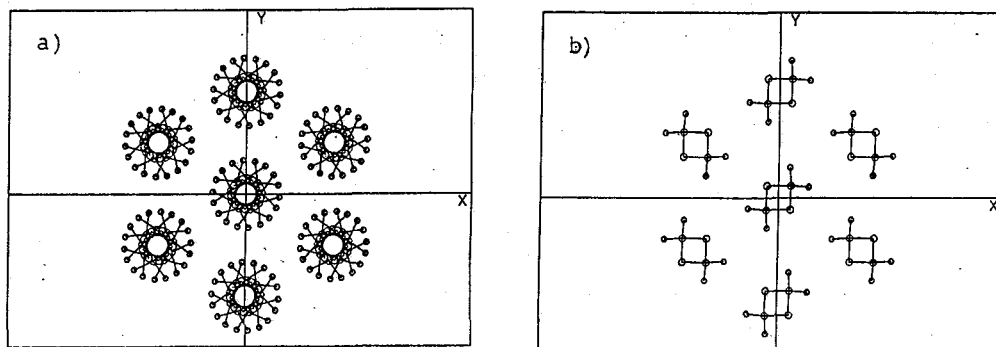


Fig. 1. 7 chains model of POM. a)trigonal b)orthorhombic

(図1)による計算を行い、分子鎖の相互作用と化学シフトの関係を明らかにすることを試みた。このように、本研究の目的は、鎖間相互作用を考慮できる3あるいは7本鎖モデルによって固体状態におけるポリオキシメチレン(POM)の ^{13}C -NMR化学シフトと結晶構造の関係を議論することである。

2. 理論

系のポテンシャルエネルギーが

$$V(r+a) = V(r) \quad (1)$$

を満足する系に対して、TB近似ではn番目の結晶軌道に属している位置rの波動関数はブロッホの定理から

$$\psi_n(k, r) = N^{-1/2} \sum_{\nu} \sum_{j=0}^M \exp(ikj) C_{\nu n}(k) \phi_{\nu}(r-ja) \quad (2)$$

と表される。ここで、kは波数、 ν はj番目のセル内の軌道、lは単位セル中の原子軌道、Nは全セル数、 $\phi_{\nu}(r-ja)$ はj番目のモノマー単位内の ν 番の軌道の波動関数を示している。(2)式を用いて高分子の全電子エネルギーは次式で表される。

$$E = \int_{-\pi/a}^{\pi/a} \langle \psi_n(k) | H | \psi_n(k) \rangle dk \quad (3)$$

この式を解くことによって(2)式の展開係数が得られる。本研究で用いたCNDO/2法ではFock行列の要素は次式で与えられる。

$$\begin{aligned} F_{\mu\mu}(k) &= -\frac{1}{2} (I_{\mu} + A_{\mu}) + \frac{1}{2} (1 - P_{\mu\mu}) \gamma_{AA}^{00} + \sum_{\nu} \sum_{j=-M}^M (P_{\nu} - Z_{\nu}) \gamma_{AB}^{0j} \\ &\quad + 2K \pi \beta_A \sum_{j=1}^M S_{\mu\mu}^{0j} \cos(kj) - \sum_{j=1}^M \gamma_{AA}^{0j} \cos(kj) P_{\mu\mu}^{-jR} \\ F_{\mu\nu}(k) &= K \pi / 2 (\beta_A + \beta_B) \sum_{j=-M}^M \exp(ikj) S_{\mu\nu} \\ &\quad - \frac{1}{2} \sum_{j=-M}^M P_{\nu}^{-jR} \exp(ikj) \gamma_{AB}^{0j} \end{aligned} \quad (5)$$

ここで、

$$\begin{aligned} P_{\mu\nu} &= 2 \sum_{k=0}^{\pi} \sum_{s=0}^{\infty} C_{s\mu}^*(k) C_{s\nu}(k), \\ P_{\nu} &= \sum_{\mu} P_{\mu\nu}, \\ P_{\mu\nu}^{-jR} &= \sum_{k=0}^{\pi} \sum_{s=0}^{\infty} \text{Re} [\exp(-ikj) C_{s\mu}^*(k) C_{s\nu}(k)] \end{aligned} \quad (6)$$

以上の方法で求めた展開係数を用い、遮蔽定数を求める方法としてsum-over-site(SOS)法により、次式に従って遮蔽定数を求めた。

$$\sigma_A^d(k) = \frac{\mu_0 e^2}{6\pi m_e^2} \sum_{\mu} \sum_{\nu} P_{\mu\nu}(k) \langle \phi_{\mu}(r) | r^{-1} | \phi_{\nu}(r) \rangle \quad (7)$$

$$\sigma_{A, \alpha\beta}^p(k) = - \frac{\mu_0 \hbar^2 e^2}{4\pi m_e^2} \sum_{m} \sum_{n} \sum_{\gamma} \langle r^{-3} \rangle_{2p} \quad (8)$$

$$\begin{aligned} &\cdot (1E_n^n - 1E_0^0)^{-1} \sum \sum [X(j, m, n, \beta, \gamma) \\ &\cdot X(l, n, m, \gamma, \alpha) - Y(j, m, n, \beta, \gamma) \\ &\cdot Y(l, n, m, \gamma, \alpha) + X(j, m, n, \gamma, \alpha) \\ &\cdot X(l, n, m, \beta, \gamma) - Y(j, m, n, \gamma, \alpha) \\ &\cdot Y(l, n, m, \beta, \gamma) \end{aligned}$$

但し、

$$P_{\mu\nu}(k) = \sum_n C_{\mu n}^*(k) \cdot C_{\nu n}(k)$$

$$X(j, m, n, \beta, \gamma) = C_{jm}^{R\beta} C_{jn}^{I\gamma} + C_{jn}^{R\beta} C_{jm}^{I\gamma} - C_{jn}^{R\gamma} C_{jm}^{I\beta} - C_{jm}^{R\gamma} C_{jn}^{I\beta}$$

$$Y(j, m, n, \beta, \gamma) = C_{jm}^{R\beta} C_{jn}^{I\gamma} - C_{jn}^{R\beta} C_{jm}^{I\gamma} + C_{jm}^{R\gamma} C_{jn}^{I\beta} - C_{jn}^{R\gamma} C_{jm}^{I\beta}$$

$$({}^1E_m^n - {}^1E_0)^{-1} = \varepsilon_n - \varepsilon_m - J_{nm} + 2K_{nm}$$

ここで k は波数、 μ は unit cell 内の μ 番目の軌道、 n は n 番目のバンド、 $C_{\mu n}$ は n 番目のバンドにおける μ 番目の軌道の係数、 ε_n 、 ε_m はそれぞれ非占有軌道、占有軌道のエネルギー、 J_{nm} 、 K_{nm} はそれぞれクーロン積分、交換積分を表している。

3. 実験・測定結果

POMにはX線、IR等の研究から、斜方晶と三方晶の2つの結晶系が存在することが知られている。これら、結晶構造の違いやコンホメーションの違いを、固体物質の構造に対して多くの知見を得ることのできる固体高分解能 ^{13}C NMRCP-MASを用いて解析した。

試料は以下の方法により調製した。市販のs-トリオキサンを $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ および水を触媒として、約 40°C のair bath中で一昼夜置き、重合を行った。これは、X線回折によって、三方晶と斜方晶の混合試料であることが確認された。 ^{13}C CP-MASスペクトルおよび粉末スペクトル測定は日本電子GX-270 NMR (67.8MHz)を用いて室温で行った。その結果、ショルダーピークはメインピークから 3.1ppm 高磁場にシフトし、このショルダーピークは斜方晶によるものと思われる。また、メインピークの低磁場側にショルダーピークが認められるが、これはVeemanらの研究¹⁾から非晶に対応するものと考えられる。また、化学シフトテンソルについても粉末スペクトルに対して、コンピュータシミュレーションを行うことによってdeconvolutionし、各成分に対する各主値を得た。これらの結果を表1に示す。

5. 計算結果および考察

理論的なアプローチとして、高分子鎖を直接評価できるTB近似を用いたMO計算を行い、遮蔽常数を評価した。ここで用いた幾何パラメータはX線回折の

Table 1. Observed ^{13}C -NMR chemical shift (ppm from TMS)

	tri.	ort.	amo.
σ_{190}	88.2	86.0	90.2
σ_{11}	108	109	101
σ_{22}	86	84	86
σ_{33}	71	65	84
$\sigma_{11} - \sigma_{33}$	37	44	17

Table 2. Geometry data of POM

	tri.	ort.
a (Å)	4.47	4.77
b (Å)	4.47	7.65
c (Å)	17.40	3.58
helix type	9/5	2/1
r(C-O)(Å)	1.43	1.41
r(C-H)(Å)	1.06	0.98
$\angle\text{OCO}(\text{deg.})$	109.9	112.8
$\angle\text{COC}(\text{deg.})$	112.3	114.1
$\angle\text{HCH}(\text{deg.})$	113.0	113.0
二面角(deg.)	77.6	64.4

データ^{2,3)}は表2に示し、全ての計算結果を表3に示した。

Table 3-1. Calculated ¹³C-NMR chemical shift and total energy of trigonal POM(in ppm and eV)

Number of chains	1	3	7
σ_{iso}	-77.57	-61.23	-59.29
σ_{11}	-149.92	-131.71	-124.65
σ_{22}	-132.44	-116.47	-116.00
σ_{33}	-117.76	-102.84	-104.98
$\sigma^{33} - \sigma^{11}$	32.16	28.87	19.67
Energy	-26.090	-78.286	-182.629

Table 3-2. Calculated ¹³C-NMR chemical shift and total energy of orthorhombic POM(in ppm and eV)

Number of chains	1	3	7
σ_{iso}	-74.81	-66.44	-52.39
σ_{11}	-152.48	-142.84	-126.33
σ_{22}	-127.27	-118.33	-108.21
σ_{33}	-112.00	-105.42	-92.04
$\sigma^{33} - \sigma^{11}$	40.48	37.42	34.12
Energy	-26.004	-78.007	-182.070

i. 1本鎖モデルによるTB近似計算

この1本鎖の計算は、斜方晶の三方晶に対する等方平均化学シフトの高磁場シフト、化学シフト異方性の大きさ、そしてエネルギー安定性に関しても実測を定性的に再現している。この結果から、これらの起因は、局所構造あるいは一本鎖においても考慮される鎖内の長距離相互作用であると考えられるが、斜方晶と三方晶という結晶系の違いについての議論である以上、鎖間相互作用の影響を考慮する必要があると思われる。そこで次に3本鎖による計算を行った。

ii. 3本鎖モデルによるTB計算

3本鎖の場合、化学シフト異方性の大きさおよびエネルギー安定性に関しては実測の傾向を再現しているが、等方平均化学シフトは実測と逆の傾向である。テンソルの各成分に関して、三方晶と斜方晶の差について見ると、 σ_{22} , σ_{33} は実測とほぼ同様の挙動を示す。しかし、 σ_{11} に関しては実測では1ppm斜方晶が低磁場側にシフトしているだけであるが、計算では11ppm以上低磁場シフトしている。この σ_{11} はほぼ(1,1,0)の方向で、これは、鎖間相互作用が考慮されていない方向であり、このため、 σ_{11} あるいは等方平均化学シフトが実測を再現し得なかったものと考えられる。

iii. 7本鎖モデルによるTB計算

最も良く結晶状態を再現していると考えられる7本鎖による計算では、等方平均化学シフトの高磁場シフト、化学シフト異方性の大きさ、そしてエネルギー安定性の全てに関して実測を定性的に再現している。斜方晶の高磁場シフトは σ_{33} の寄与が大きい。TB計算では7本鎖モデルによる結果が最もこの傾向を良く再現しており、POMのような孤立電子対をもつ異方性の大きい分子では、化学シフトの挙動を説明するには分子鎖の相互作用が重要であることが明らかとなった。

参考文献

- 1) W.S.Veeman, E.M.Menger, W.Ritchey and E.de Boer, *Macromolecules*, **12**, 924 (1979).
- 2) Y.Takahashi, H.Tadokaro, *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed*, **17**, 123 (1979).
- 3) V.Gramlich, ECM-4, 4th Europ, Cryst Meeting, Oxford, Abstract Book, 531 (1977).

ポリカルボシランの不融化機構の固体 ^{29}Si 高分解能
NMRによる解析

(徳島大工短大, 東北大金研*) 多木敏彦, 岡村清人*
佐藤光彦*

Analysis of Chemical Structure of Oxidation Cured Polycarbosilane Fibers
by Solid-State ^{29}Si High-Resolution NMR

Toshihiko Taki, Kiyohito Okamura*, and Mitsuhiko Sato*

(Technical College, Tokushima University and * The Oarai Branch, The Institute
for Materials Research, Tohoku University)

The chemical structure of oxidation cured polycarbosilane fibers for precursor of SiC fiber has been studied, but their quantification is very difficult. In this work, the molecular structure was examined by chemical analysis, IR spectroscopy and solid-state ^{29}Si and ^{13}C NMR spectroscopy. The six structural elements (Si-C, Si-H, Si-Si, Si-O-Si, Si-O-C and Si-O-CH₂) in oxidation cured polycarbosilane were determined quantitatively. The solid-state ^{29}Si high-resolution NMR spectroscopy has proved to be a powerful tool for investigating the structure and curing mechanism of oxidation cured polycarbosilane fibers in contrast with IR and other measurements including ^{13}C NMR spectroscopy.

はじめに 炭化ケイ素は高温セラミック材料として注目されている。矢島ら¹⁾は有機ケイ素ポリマーであるポリカルボシラン(PC)を熔融紡糸して、不融化处理をした後焼成して製造する方法を開発した。この方法では、焼成の過程で繊維間で融着することがないように、繊維を酸素気流中で加熱酸化するか、または放射線を照射して不融化する工程が不可欠である。このような不融不溶の物質の研究には固体高分解能NMR法が非常に有効である。PCの ^{13}C NMRは幅の広い吸収線を与え、必要な情報を与えないので、 ^{29}Si 固体高分解能NMRを用いて、不融化及無機化と分子構造の関係を明らかにする。

実験 固体高分解能NMRスペクトルは、Doty Scientific社のスピニング・システムを組み込んだ自作のプロープとJEOL FX-60Qとを組み合わせ、室温で測定した。共鳴周波数は ^{13}C では 15.04 、 ^{29}Si では 11.9 、および ^1H は 59.8MHz である。高周波磁場の強度は 51kHz である。スピニングの周波数は約 2.0kHz である。化学シフトはテトラメチルシラン(TMS)を基準として測定された。慣例に従って低磁場側を正にとった。PCは矢島ら¹⁾の方法によって合成されたものである。用いたサンプルは酸素気流中で 145°C から 195°C 迄の温度で処理したものである。酸素で処理

していないサンプルをP-151-Fとし、酸素気流中で処理したものを処理温度にしたがって、P-145、P-160、P-175、P-180、P-185、P-190、及P-195と呼ぶことにする。

結果 1. 化学分析 化学分析の結果得られた実験式を表1に示す。表1とFig. 1から分かるように酸素気流中での処理温度が上昇するとともに酸素の含有率は処理温度とともにほぼ直線で増加する。

表1. 熱酸化により不融化するポリカルボシラン繊維の実験式。

試料	実験式	処理温度
P-151-F	SiC _{1.94} H _{4.80} O _{0.01}	未処理
P-145	SiC _{1.93} H _{4.56} O _{0.17}	145
P-160	SiC _{1.80} H _{4.59} O _{0.39}	160
P-175	SiC _{1.79} H _{4.52} O _{0.64}	175
P-180	SiC _{1.80} H _{4.64} O _{0.65}	180
P-185	SiC _{1.68} H _{4.24} O _{0.65}	185
P-190	SiC _{1.69} H _{4.92} O _{0.82}	190
P-195	SiC _{1.70} H _{4.35} O _{0.89}	195

2. ¹³C NMR PC分子中のポリシラン、カルボシランやシロキサンの骨格の液体状態での¹³C NMRスペクトルが長谷川ら²⁾によって得られている。液体状態でのPCの¹³C NMRスペクトルは非常に幅が広くて、必要な情報が得られていない。固体についても、Fig. 2に示すようにやはり単一のlineで幅が広く重要な情報は得られない。

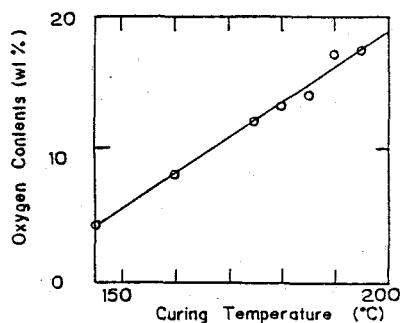
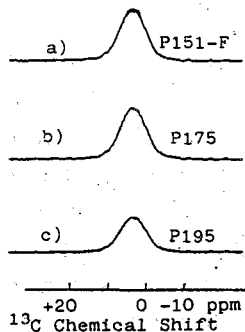


Fig. 1. PC繊維中の酸素含有率と処理温度の関係。

Fig. 2. ¹³C NMR スペクトル。

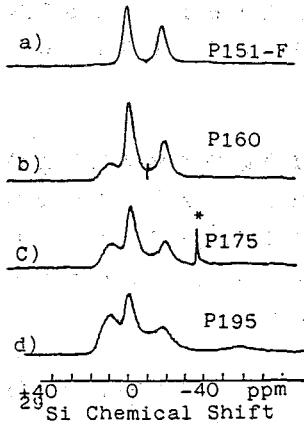


Fig. 3. PC 繊維の ^{29}Si NMR スペクトル。

Fig. 3 a で示す信号のほかに $+9.5$ と -53 ppm とに新たに信号が表われる。また、Fig. 4 b と c に示すように dipolar-dephasing によっても -17.5 ppm には信号がのこる。この原因は Si-O-CH_2 ³⁾ による信号が重なっているためと考えられる⁴⁾。 -53 ppm の信号は処理温度が 175°C 迄は非常に小さく、 175°C

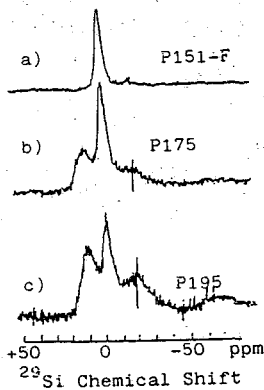


Fig. 4. PC 繊維の dipolar-dephasing スペクトル。

から大きくなってくる。この信号は Si-O-C ³⁾ 結合によるものと推定される。

ここで * で示す信号は固体の 2 次基準として用いられた PDMS からのものである。また、 $+9.5$ ppm の信号は処理温度が上昇するとともに増加する。その結果 この信号は Si-O-Si 結合によるものである。PC 繊維の考えうる 6 つの結合と酸素処理温度の関係を Fig. 5 に示す。これからわかるように、酸素原

3. ^{29}Si NMR . Fig. 3 に ^{29}Si NMR のデータを示す。 Fig. 3 a には未処理の PC 繊維のスペクトルを示す。 NMR スペクトルは -0.5 と -17.5 ppm の 2 本のシグナルで構成され、これらの信号の assignment をするために、dipolar-dephasing をもちいた。その結果、 -17.5 ppm の信号は Fig. 4 a に示すように殆ど消えてしまうために Si-H によるものである。 -0.5 ppm の信号は Si-C によるものである。 -38.5 ppm の信号は非常に小さくて、 Si-Si によるものである。 Fig. 3 b, c と d には酸素中で 160 , 175 と 195°C で処理した PC 繊維のスペクトルを示す。

Fig. 3 a で示す信号のほかに $+9.5$ と -53 ppm とに新たに信号が表われる。また、Fig.

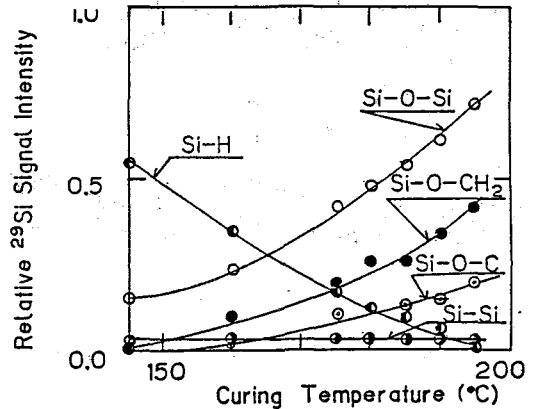


Fig. 5. 処理温度と ^{29}Si NMR 信号強度の関係。

子は先ず Si-H 結合を切り、Si-O-Si 結合を形成するようになる。次に、処理温度が 175℃になるとこの結合に加えて Si-O-CH₂ 及 Si-O-C を形成するようになる。

4. 化学構造 岡村達²⁾のこれまでの研究から PC 繊維の分子構造は単に鎖状または環状ではないことがわかっている。鎖状と環状の組み合わせたものであるといわれている。酸素で架橋した PC 繊維の基本的な結合は Si-C, Si-H, Si-Si, Si-O-Si, Si-O-C, 及 Si-O-CH₂ の 6 つで表わされることが、本実験と既に報告したこと⁴⁾からわかる。

結論 上の結果よりつぎのような分子構造が考えられる。PC 骨格は上で述べたように Si-C, Si-H, Si-Si, Si-O-Si, Si-O-C と Si-O-CH₂ の 6 つの結合よりなっていると結論できる。このように不融不溶の PC 繊維の分子構造の決定には固体²⁹Si 高分解能 NMR が他の分光手段 (IR や固体¹³C 高分解能 NMR) よりも非常に有効な手段であるといえる。主な結合変化は、Fig. 6 に示すようになっている。

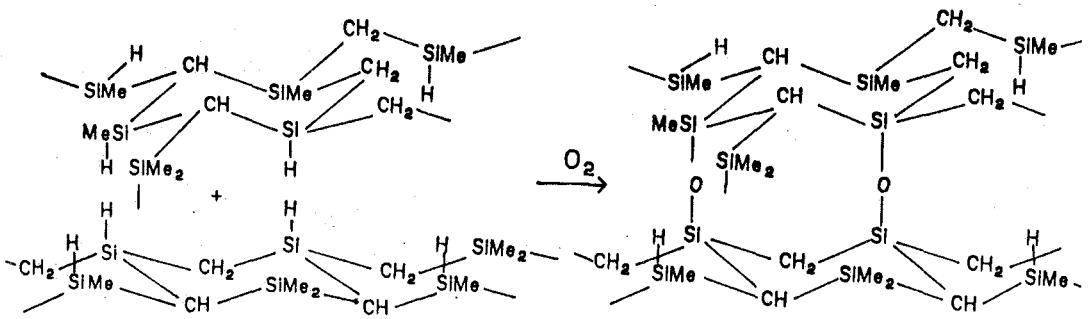


Fig. 6 酸素で架橋した PC 繊維の主たる化学構造の変化。

References

- 1) S. Yajima, "Handbook of Composites, Strong Fibers", Vol. 1 edited by W. Watt and D. V. Petrov (North-Holland, 1985) p. 201.
- 2) Y. Hasegawa and K. Okamura, J. Mater. Sci. **21** (1986) 321.
- 3) H. Marsmann, "NMR Basic Principles and Progress" Vol. 17 edited by P. Diehl, E. Fluck, and R. Kosfeld. (Springer, 1981) p. 65.
- 4) T. Taki, S. Maeda, K. Okamura, M. Sato and T. Matsuzawa, J. Mater. Sci. Letters **6** (1987) 826.

III-V族化合物半導体のNMR - InX ($X = \text{Sb}, \text{As}, \text{P}$)
 を中心として -

(キャノン中研、日本ブルカー*、北海道工大工**)
 ○ 柳引信男、 恵良田知樹*、 相馬純吉**

The NMR on the III-V group compound semiconductor. - InX ($X = \text{Sb}, \text{As}, \text{P}$) -
 Nobuo Kushibiki, Tomoki Erata* and Junkichi Sohma**
 (Central research Lab. Canon Co. Ltd., *Bruker Japan Co. Ltd. and
 **Faculty of Engineering, Hokkaido Institute of Technology)

The NMR spectra of ^{115}In nuclei in the III-V group compound semiconductor InX ($X = \text{Sb}, \text{As}, \text{P}$) are recorded. The chemical shifts of ^{115}In are various on the X-elements and this fact shows that the effective ionic charge, which closely relates the optical properties of these semiconductors, is varying in each compounds. However, the origin of remarkable change of the resonance linewidth on each compound is still not clear. For clarifying this problem, we are making the measurements of the spin-lattice relaxation time on each compounds.

1. 序

2つ以上の元素の組合せでつくられる化合物半導体は半導体特有の物性をもっており、主に周期律表のIIb, Vb族からなるIII-V族、IIb, VIb族からなるII-VI族化合物半導体がある。これらの化合物半導体は組あわせる元素により結晶構造、特に格子定数等が広い範囲にわたり変化し、結合も共有結合とイオン結合の中間的結合を示す。これらの事柄は化合物半導体における電子の挙動に大きく関与するため色々な性質を持った半導体ができる可能性があり注目をあびている。現在のところ半導体の主流はSi系であるが、Si結晶における ^{29}Si 核のNMRはその極度に長い T_1 のため事実上不可能といってもよいが、化合物半導体系ではその構成元素核の多くが感度(天然存在比を考慮しても)が良好であり T_1 も短く測定が容易である。そこで本研究では、III-V族化合物半導体の中でも特に電子移動度の大きい InX 系($X = \text{P}, \text{Sb}, \text{As}$)を中心に ^{115}In 核のNMR測定を行い、それらから得られる情報が、どの程度化合物半導体の物性を示し得るか考察を行った。

表-1 III-V族化合物半導体の基本物性表

化合物	密度 (g/cm^3)	結晶形 結晶構造	格子定数		熱膨張係数 ($10^{-6}/\text{K}$)	熱伝導率 ($\text{W}/\text{cm K}$)	比熱 ($\text{cal}/\text{g K}$)	融点 T_m ($^{\circ}\text{C}$)	解離圧 at T_m (atm)	反応熱 $-\Delta H$ (Kcal/mole)
			a. (\AA)	c.						
InP	4.787	CB ZB	5.968		4.5	0.7	5.32	1,070	25	21.2
InAs	5.667	CB ZB	6.058		5.19	0.26	5.67	943	0.3	14
InSb	5.775	CB ZB	6.478		5.04	0.18	5.167	525	$< 10^{-3}$	7.3

なお表-1にこの実験に用いられたInX系半導体の物性を簡単にしめず。また図-1に周期律表の一部を、図-2にこれらの化合物半導体の結晶構造であるZinc-Blend型の原子配置をしめす。

IIb	IIIb	IVb	Vb	VIb
	5 B	6 C	7 N	
	13 Al	14 Si	15 P	16 S
30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se
48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te
80 Hg				

III-V
II-VI

図-1

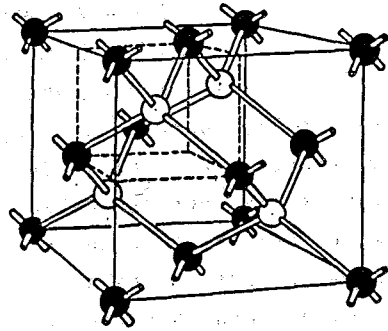


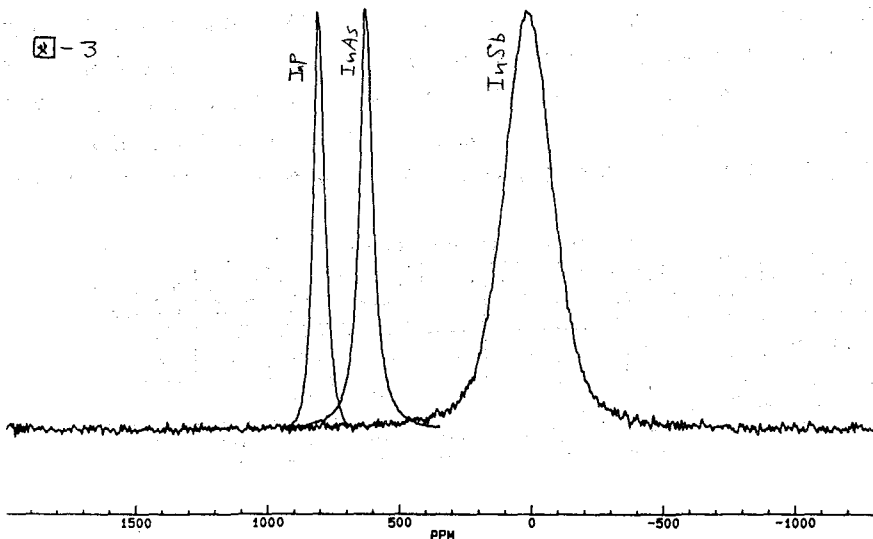
図-2

2. 実験

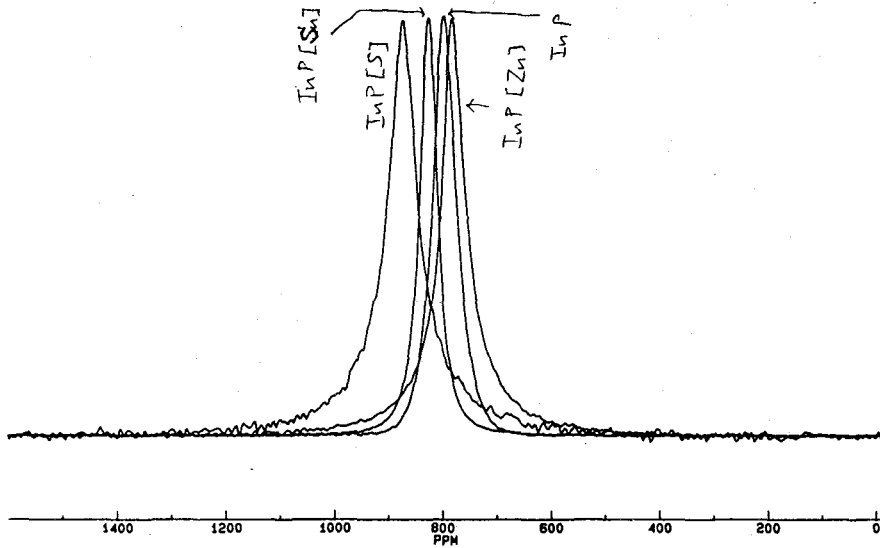
115In核NMR実験はBRUKER MSL300型分光器を用いた。また試料は住友電気社製InP, InAs, InSbならびにInP+dopant S, Zn, SnのウェハーでH₀ || (111)、繰り返し時間2秒、シングルパルスにより数10回積算された。なお化学シフトの基準はIn(NO₃)₃水溶液中のIn₃を用いた。

3. 結果と考察

図-3にInP, InAs, InSbの115In NMRスペクトル表-2に得られた化学シフトと共鳴線幅を記す。



化学シフトは $x = Sb$ でほぼ 0、 $x = As$ 、 P の順に大きくなり共鳴線幅は逆に $x = Sb$ でいちばん広く As 、 P は狭くなっている。 図-3 に $InP+dopant S(VI)$ 、 $Zn(II)$ 、 $Sn(IV)$ の $115In$ NMR スペクトルをしめす (比較のため pure- InP のスペクトルも挿入)。 Zn をドーブした InP では、 P 型半導体となり高磁場シフトをしめし S 、 Sn の場合は N 型半導体となり低磁場へシフトしている。



一般に化学シフトは核の位置における有効電荷密度をあらわす量であるため以上の結果は InX 系におけるイオン結合性をしめす指標として用いることが可能とおもわれる。 また同様に $InP+dopant$ 系においてしめす化学シフトの dopant 依存性はこれらのごく少量の dopant がミクロ的な影響のみを主物質にあたえているのではなく結晶全体の性質を支配していることがしめしている。

しかしながら図-1 にしめされるような InX 系における線幅の大きな変化は現在のところその原因がつかめていない。 現在、スピン-格子緩和時間の測定を実行中であり講演ではその結果と化学シフトの定量的な解析とあわせて報告する予定である。

(化技研・イリノイ大学・トロント大学) ○林 繁信・
R.J.Kirkpatrick・D.B.Dingwell・E.Oldfield

 ^{19}F MAS NMR of Inorganic Glass

Shigenobu Hayashi, R. J. Kirkpatrick,* D. B. Dingwell,** and E. Oldfield*

(National Chemical Laboratory for Industry, *University of Illinois, and **University of Toronto)

The structural environment of F in F-containing $\text{Na}_2\text{O}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ glass has been studied by high-resolution solid-state NMR spectra of ^{19}F as well as ^{23}Na , ^{27}Al , and ^{29}Si nuclei, using magic-angle sample spinning. In the sample with equal molar amounts of Na and Al, F substitutes for O in AlO_4 and SiO_4 tetrahedra without the formation of NaF or cryolite-like environments. In the peraluminous sample AlO_6-xF_x octahedra may also be present, in addition to the above environments. The peralkaline sample is phase-separated and contains an amorphous NaF environment, in addition to Al-F and Si-F linkages. The presence of a cryolite-like environment in this sample cannot be ruled out.

Fは地球内部のマグマの性質を決める重要な元素であるばかりでなく、最近の新材料のニューガラスにおいても重要な元素である。Fの添加により、無機ガラスの相平衡は変化し、高温での粘度が著しく低下する。また、光ファイバーにFを添加して屈折率を制御することはよく知られている。これらの性質の変化はFの結合状態及びFの添加に伴う他の原子の結合状態の変化によるものと考えられる。しかし、無機ガラス中でFがどのような状態で存在しているのかはよくわかっていない。

一方、固体高分解能NMRは結晶性のシリケートやアルミノシリケートの局所構造について有益な情報を与えてくれる。また、ガラス状態においても他の方法では得ることのできない情報を与えてくれる。

^{19}F は ^1H と同様、天然存在比が100%でしかも核磁気回転比が大きい。このためフッ化物では ^{19}F 同士間の双極子-双極子相互作用が大きく、マジック角回転(MAS)法で高分解能スペクトルを得ることは困難である。しかし、回転速度を上げることにより高分解能スペクトルを得ることは原理的には可能である。

本研究では、Fを含むNa-Al-Si-O系ガラスの ^{19}F MAS NMRスペクトルを測定することにより、Fの結合状態を明らかにした。同時に、 ^{23}Na 、 ^{27}Al 、 ^{29}Si 核のMAS NMRスペクトルも測定し、 ^{19}F の結果と対応する結果を得た。

<実験> 測定に用いた試料は Dingwellら¹⁾が粘度測定に用い

表1. ガラスの組成 (at%)

Sample	Na	Al	Si	O	F
ABF	7.36	6.91	22.87	56.64	6.22
JDF	9.86	9.59	19.30	54.53	6.73
NEF	14.24	13.35	14.18	52.65	5.61
ALF	5.43	8.18	22.84	57.77	5.77
AKF	9.56	4.06	24.51	57.94	3.93

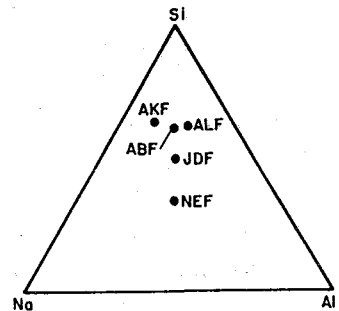


図1. ガラスの組成

たものと同じであり、表1に元素組成を示した。図1にNa、Al、Siの組成比を示した。ABF、JDF、NEFはNa/Al=1でSi濃度が異なっており、AKF、ALFはSi濃度がほぼ同じでNa/Al比が異なっている。ガラスの他にモデル化合物についても測定を行った。

NMR測定は自作の装置を用いて行った。測定周波数は ^{19}F が47.3及び470.3 MHz、 ^{23}Na が132.2 MHz、 ^{27}Al が130.2 MHz、 ^{29}Si が71.5 MHzである。MAS回転数は通常4.0~5.5 kHzであるが、モデル化合物では8~9 kHzを用いた。ケミカルシフトの基準は ^{19}F がヘキサフルオロベンゼン、 ^{23}Na が1 M NaCl水溶液、 ^{27}Al が1 M AlCl_3 水溶液、 ^{29}Si がTMSである。

<結果及び考察> 1. ^{19}F NMR

図2に47.3 MHzで測定した ^{19}F MAS NMRスペクトルを示し、表2にケミカルシフトをまとめた。3種類のピークが観測された。ピークIは-6~-20 ppmに現れ、全試料において見られた。ピークIIは25~22 ppmの範囲に現れ、Si濃度の低い試料NEFでは観測されず、しかもサイドバンドの強度が弱い。ピークIIIはアルカリ濃度の高いAKFのみに観測され、シフト値は-65 ppmである。

同じ測定を470.3 MHzで行ったところ、サイドバンドを伴わない線幅の広いピークが一本だけ観測された。センターピークの線幅が磁場に比例していることから線幅の原因はケミカルシフトの分散であると考えられる。即ち、ガラス状態の構造の不規則性のためにケミカルシフトが20~35 ppmにわたって分散している。このような物質では低磁場における測定の方が有効のようである。

各ピークの帰属はモデル化合物のケミカルシフトと比較して行った。ピークIIIはNaF (-58 ppm) との比較から、F-Naと帰属される。NaFとシフト値がほとんど同じであることから、試料AKFでは非晶質のNaF相が相分離して生成していると考えられる。ピークIIは、HF処理したシリカゲル (19 ppm) と同じようなシフト値を示すことか

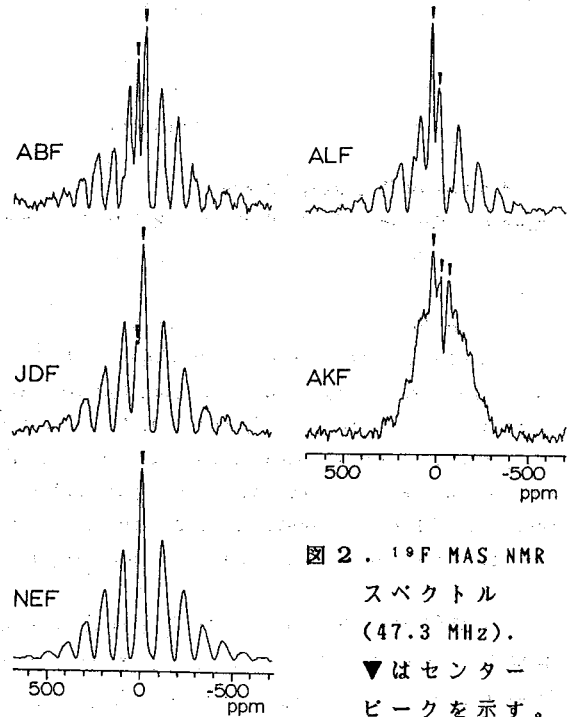


図2. ^{19}F MAS NMRスペクトル (47.3 MHz). ▼はセンターピークを示す。

表2. ケミカルシフト (ppm)

Sample	^{19}F	^{23}Na	^{27}Al	^{29}Si
ABF	23.2 -16.0	-18.3	52.5	-102.5
JDF	22.0 -12.5	-18.9	54.8	-96.4
NEF	-6.0	-13.0	57.5	-86.4
ALF	25.2 -12.3	-19.5	51.4 12	-103.2
AKF	23.4 -20 -65	-13.1 6.0	55.2 -1	-103.3
NaF	-58	9		
AlF_3	8		-15	
Na_3AlF_6	-9	-10	1	
F-silica gel	19			-113

らF-Siに帰属される。Si濃度が低くなるにつれこのピークの強度が減少することはこの帰属を支持している。よって、ピークIはF-Alに帰属される。AlF₃ (8 ppm) や Na₃AlF₆ (-9 ppm) との比較から、この帰属は妥当と考えられる。

AKFのスペクトルだけが他に比べて分解能が悪くなっている。3種類のピークとそのサイドバンドが重なっているためとも考えられるが、線幅の広い成分が重なっているとも考えられる。AlF₆³⁻のように¹⁹F同士の双極子-双極子相互作用の強い構造をとっているのかもしれない。

2. ²³Na NMR 図3に²³Na MAS NMRスペクトルを示した。全試料が-13~-20 ppmにピークを示した(ピークI)。AKFではさらに6 ppmに小さなピークを示した(ピークII)。ピークIはSi-Al-O骨格のO原子に囲まれたNa⁺イオンに帰属される。ピークIIはNaF(9 ppm)との比較からFに配位したNa⁺イオンに帰属される。この結果は¹⁹Fの結果と対応しており、AKFではNaF相が析出していることを示している。

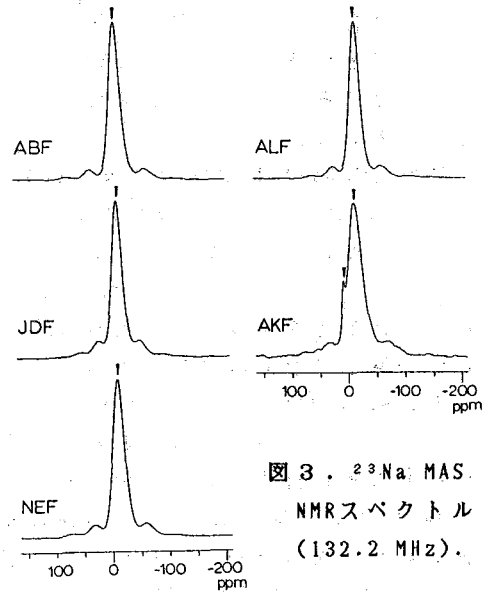


図3. ²³Na MAS NMRスペクトル (132.2 MHz).

3. ²⁷Al NMR 図4に²⁷Al MAS NMRスペクトルを示した。いずれのスペクトルも51~58 ppmにピークを示す(ピークI)。このピークは4配位のAl (AlO₄)に帰属される。¹⁹Fの結果からF-Al結合の存在が示されたが、AlのスペクトルにおいてAlO_{4-x}F_x (x≧1)はAlO₄のピークに重なっていると考えられる。

ALFでは12 ppm、AKFでは-1 ppmに小さいピークが見られる(ピークII)。これは6配位のAl (AlO_{6-x}F_x)に帰属される。

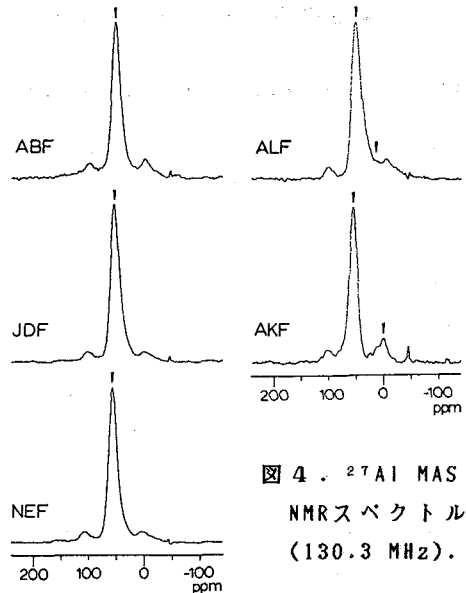


図4. ²⁷Al MAS NMRスペクトル (130.3 MHz).

4. ²⁹Si NMR 図5に²⁹Si MAS NMRスペクトルを示した。15 ppm程の広い線幅を持つ1つのピークしか観測されなかった。しかし、ケミカルシフト値は-86~-103 ppmの範囲内で組成により大きく変化した。このピークはSi_{4-x}(OAl)_{4-x}(OSi)_x (x=0~4)の局所構造に帰属される。結晶性のアルミノシリケートではxの異なるSi⁺が分離したピークとして観測

されるが、ガラスでは構造が不規則なためピークが広がってしまい分離されない。ピークのシフト値はxの平均値を反映しており、ガラスの元素組成により変化する。Fと結合したSiも別のピークとしては観測されない。

5. F含有ガラスの構造 Fを含まないNa-Al-Si-O系ガラスでは AlO_4 と SiO_4 四面体がO原子のところで結合し、3次元的な網目構造をとっている。

Fを含みNa/Al比が1である試料ABF、JDF、NEFでは、 AlO_4 及び SiO_4 四面体のO原子がFによって置換される。即ち、Fを添加することにより、 $Si(Al)-O-Si(Al)$ 結合が切れてSi-FやAl-F結合が生成する。Si濃度が減少すると、FはAl原子に選択的に結合するようになる。一方、NaF、 AlF_6^{3-} といった局所構造や非架橋酸素は生成しない。このことから、F含有による粘度の著しい低下はアルミノシリケートの網目構造がFで分断されるためと考えられる。

Na/Al < 1の試料ALFでは、前述の結合の他に6配位のAlも存在している。Fを含まないガラスのデータがないので、6配位のAlがFの添加によるものなのか、Na/Al < 1のためなのか現段階ではわからない。

Na/Al > 1の試料AKFでは、さらにNaF相の析出が見られた。6配位のAlも観測され、 AlF_6^{3-} 構造の存在も否定できない。

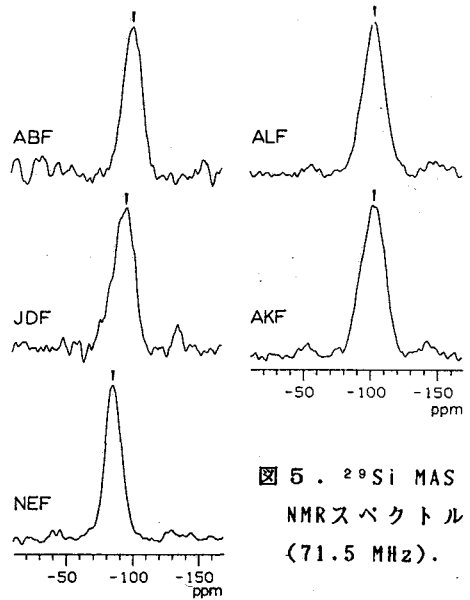


図5. ^{29}Si MAS NMRスペクトル (71.5 MHz).

1) D.B.Dingwell, C.M.Scarfe, and D.J.Cronin, Am. Mineral., 70, 80 (1985).

粉末試料における双極子相互作用測定のための
2次元及び3次元NMR

(京大理) O中井利仁、寺尾武彦、雑賀亜帆

Two- and three- dimensional NMR for measurements of the dipolar interactions in powdered samples. Toshihito Nakai, Takehiko Terao, Apollo Saika (Faculty of Science, Kyoto University)

Dipolar - chemical shift two-dimensional (2D) powder patterns in rotating solids are reported for polyethylene and calcium formate. The individual 2D powder patterns for magnetically inequivalent ^{13}C nuclei in calcium formate were separately obtained by means of the 3D SASS NMR method. ^1H broad line NMR spectra are also separated, correlated to the inequivalent ^{13}C nuclei in polypropylene by 2D MAS NMR method, and each second moment is obtained. This method is useful for signal assignments in CPMAS spectra

<序論>

固体試料において ^{13}C 化学シフト相互作用、 $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 双極子相互作用は、異方性をもつテンソル量であり、その主値および主軸方向は分子構造、分子運動、電子状態、結晶系における局所的な対称性など重要な知見を与える。しかし、適当な単結晶を作成することが困難である場合などでは、粉末試料を用いることで得られる情報はテンソルの主値のみに制限される。そこで我々は、高速回転させた粉末試料に対して、両相互作用の主軸の相対的な方向を決定する2次元NMR法を開発し、予備的な実験を行った結果について今年のNMR討論会で報告した。同方法は ω_1 軸方向に $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 双極子相互作用、 ω_2 軸方向に ^{13}C 異方的化学シフト相互作用が反映された2次元 powder pattern を与えるものである。今回、低分子ポリエチレンに対する改善された結果とともに、化学的に非等価な ^{13}C 核に対して2次元 powder pattern を分離測定する3次元NMR法を開発し、ギ酸カルシウムに適用した結果について報告する。

一方、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ 双極子相互作用は、広幅スペクトルを与え、能率計算から分子構造や分子運動に関する情報が得られる。我々は、 ^1H 間の双極子相互作用の情報を直接結合している ^{13}C 核に移行させて ^{13}C 核共鳴信号を観測し、間接的に広幅スペクトルを測定する2次元NMR法を開発した。この方法は非等価な ^{13}C 核を通じて広幅スペクトルを各 ^1H 毎に分離測定することを可能にし、CPMASスペクトルにおける CH 、 CH_2 、 CH_3 基の吸収線の assignment にも有効である。ポリプロピレンに対して行った実験結果を報告する。

<方法>

$^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 双極子相互作用 - ^{13}C 異方性化学シフト相互作用2次元 powder pattern を測定するためのパルス系列を図1に掲げる。試料は高速回転させ、2つの時間領域 t_1 、 t_2 の間で、回転軸が静磁場となす角を $\theta_{\text{off}1}$ から $\theta_{\text{off}2}$ へと switch させる。時間領域 t_1 の長さを試料の回転周期の整数倍とした場合、系は Hamiltonian

$\mathcal{H}_1^d = S_{\theta_{off1}} S_{rf} \mathcal{H}_{CH}^d(\Omega_1, \Omega) + S_{rf} \mathcal{H}_{CH}^J$ (1)
 で時間発展する。ここで、 \mathcal{H}_{CH}^d 、 \mathcal{H}_{CH}^J はそれぞれ $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 間の双極子相互作用および間接スピンスピン結合である。一方、時間領域 t_2 では系は Hamiltonian

$$\mathcal{H}_2^d = \mathcal{H}_C^{\sigma} + S_{\theta_{off2}} \mathcal{H}_C^{\Delta\sigma}(\Omega_2, \Omega) \quad (2) \quad \text{[VII]}$$

で時間発展する。 \mathcal{H}_C^{σ} 、 $\mathcal{H}_C^{\Delta\sigma}$ は化学シフトの等方成分と異方成分である。(1)、(2)における引数 Ω_1 、 Ω_2 はそれぞれ \mathcal{H}_{CH}^d 、 $\mathcal{H}_C^{\Delta\sigma}$ テンソルをその主軸系から結晶系へ変換する Euler 角、 Ω は結晶系から実験室系へ変換する Euler 角である。また $S_{\theta_{off1}}$ 、 $S_{\theta_{off2}}$ は、 $S_{\theta_{off1}} = \frac{1}{2}(3\cos^2\theta_{off1} - 1)$ で表される試料回転による scaling factor、 S_{rf} は homonuclear decoupling による scaling factor である。観測される FID $s(t_1, t_2)$ を 2次元 Fourier 変換することにより、2次元 powder pattern、

$$S(\omega_1, \omega_2) = \int d\Omega \delta(\omega_1 - \omega_1^d(\Omega_1, \Omega)) \delta(\omega_2 - \omega_2^d(\Omega_2, \Omega))$$

が得られる。 Ω_1 、 Ω_2 が Ω を介することで関係づけられ、 $S(\omega_1, \omega_2)$ は両相互作用テンソルの相対的な方向を反映する。

さらに、試料中に非等価な ^{13}C 核が複数存在する場合は、それぞれの ^{13}C 核に対する 2次元 powder pattern を分離測定するためにパルス系列を図 2 のように拡張する。即ち、試料回転軸を再び switch し、新しく導入した時間領域 t_3 において、magic angle spinning のもとで FID を観測する。 t_3 に関する Fourier 変換は等方シフトスペクトルを与え、分離された非等価な核 $^{13}\text{C}_1$ 、 $^{13}\text{C}_2$ 、 \dots 、 $^{13}\text{C}_i$ に対する各吸収線がそれぞれ t_1 、 t_2 の関数として 2次元 FID $s_i(t_1, t_2)$ 、

$s_2(t_1, t_2)$ 、 \dots 、 $s_i(t_1, t_2)$ 、 \dots を構成する。それぞれの ^{13}C 核に対する 2次元 FID $s_i(t_1, t_2)$ から 2次元 powder pattern $S(\omega_1, \omega_2)$ が得られる。

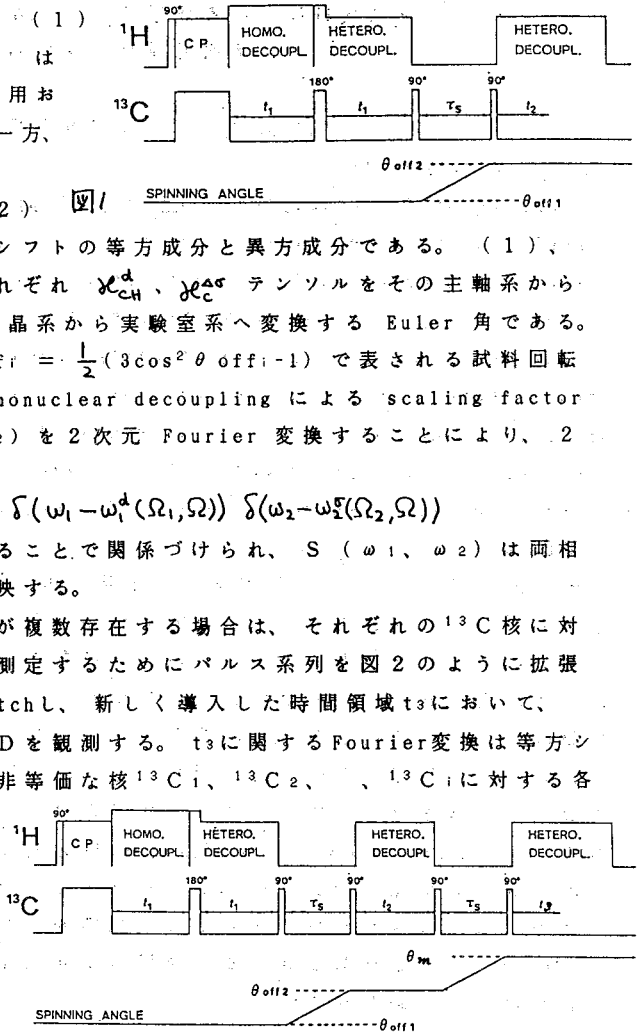


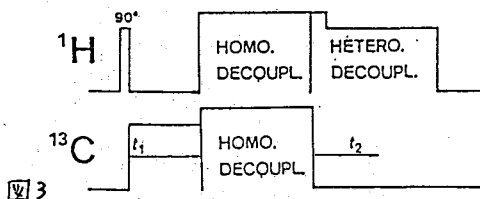
図 2

次に、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ 相互作用を、 ^{13}C 核を通じて間接的に測定する方法を示す。図 3 に掲げたパルス系列において、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ 双極子相互作用 Hamiltonian のもとで t_1 の間、時間推進した ^1H 横磁化は Hartmann-Hahn 条件を満たす ^1H 、 ^{13}C 同時 multiple pulse (MP) によって ^{13}C 核に移行する。 ^1H に対する MP は、この時間領域における ^1H spin diffusion をおさえ、 ^{13}C へ隣接 ^1H からのみ磁化を選択的に移行させる動きをする。同時 MP の代わりに $30 \mu\text{s}$ 程度の通常の cross polarization (CP) を用いることもできる。測定を magic angle spinning のもとで行うことにより、時間領域 t_2 で観測される FID から、隣接 ^1H の情報をもった ^{13}C 等方シフトスペクトルが得られる。非等価な核 $^{13}\text{C}_1$ 、 $^{13}\text{C}_2$ 、 \dots 、 $^{13}\text{C}_i$ 、 \dots に対する吸収線は、 t_1 の関数として FID $s_1(t_1)$ 、 $s_2(t_1)$ 、 \dots 、 $s_i(t_1)$ 、 \dots を与え、これを t_1 に関して Fourier 変換することによって、各 ^{13}C 核に correlate した $^1\text{H}-^1\text{H}$ 双極子スペクトル (広幅スペクトル) が分離して得られる。数 kHz 程度の試料回

転は、 t_1 時間領域における ^1H 双極子相互作用に影響を与えないと考えられる。

<実験>

測定は自作の装置を用いて常温で行なった。共鳴周波数は ^{13}C に対して22.6 MHzである。試料回転周波数は $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 双極子スペクトルを測定する際3226 Hz、その他の場合、3-4 kHzである。用いたMPはMREV-8 ($\tau = 3.2 \mu\text{s}$)である。



ギ酸カルシウムに対して $\theta_{\text{off}1}$ 、 $\theta_{\text{off}2}$ は共に $\theta_m + 4^\circ$ 、低分子量ポリエチレン ($M_v = 2000$)に対しては $\theta_{\text{off}1} = \theta_m + 4^\circ$ 、 $\theta_{\text{off}2} = \theta_m + 14^\circ$ である。ギ酸カルシウムは、 T_1 を短くするために常磁性イオンを若干ドーブし、 ^{13}C は20%エンリッチした。

<結果>

図4はポリエチレンに対する $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 双極子- ^{13}C 異方的化学シフト2次元 powder patternの実験(a)および計算(b)スペクトルである。図5はギ酸カルシウムにおいて非等価な2種の ^{13}C 核による各 pattern を、3次元NMR法を用いて分離測定した結果であり、表2に計算スペクトルとの比較により各々のC-H結合距離、化学シフトテンソルの主軸系におけるC-H結合方向 θ 、 ϕ および化学シフトテンソルの主値を求めた結果を示す。ポリエチレンの双極子 projection は構造に乏しいが、2次元に展開することで同様に各 parameter を求めることができた(表1)また、遠隔 ^1H との双極子相互作用を考慮することで実験スペクトルをよりよく再現できた。

図6はポリプロピレンに対し、広幅スペクトルをCH(a)、CH₂(b)、CH₃(c)に関して分離測定した結果である。2次元率はそれぞれ、21、32、27(Gauss²)であり、計算結果と併せて報告する。また、 t_1 次元におけるFIDの挙動に注目して、CPMASスペクトルからCH₂、CHの吸収線を除去できることを示したのが図7である。(a),(b),(c)は図3のパルス系列において、それぞれ t_1 を0、12、15 μs に固定して観測したFIDのFourier変換である。多くの場合より短い t_1 値でCH₂の吸収線が除去され、またCH₃吸収線は反転することがないのでCH、CH₂、CH₃のassignmentに利用できると思われる。

<結論>

回転させた粉末試料を用いた $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 双極子- ^{13}C 異方的化学シフト2次元 powder pattern は、通常粉末試料では得られない相互作用テンソルの主軸方向に関する情報を与える。また、1次元NMRでは構造に乏しいスペクトルを2次元的に展開することで、結合距離、結合角などに関してもより正確な情報を与える。試料回転の効果はCP効率の異方性による powder pattern の歪みを防ぎ、またSNを向上させ、patternの重なり部分の減少さらに3次元NMR法へ拡張することによる2次元 powder pattern の分離を可能にする。

^1H 広幅スペクトルの間接測定は、分子構造のより詳細な情報を与えるとともに、CPMASスペクトルのassignmentの一手段を与える。

Chemical shift

図4

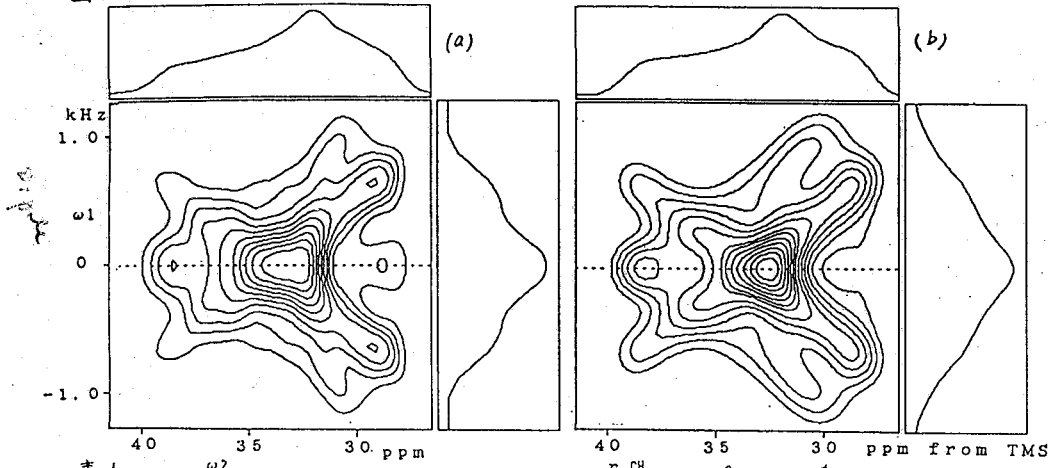


表1

σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}	水素1	r_{CH}	θ	ϕ
51	37	13 ppm	水素2	1.12 A	90°	36.5°
$\angle HCH = 107$						

図5

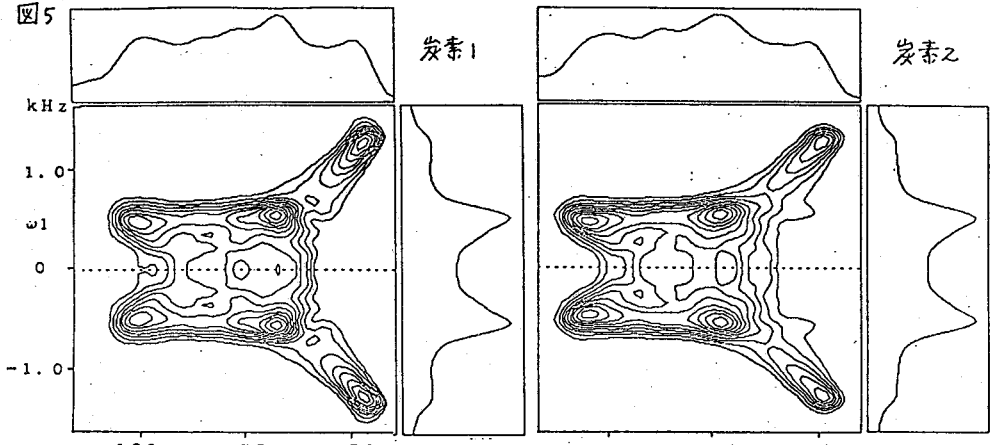


表2

	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}	r_{CH}	θ	ϕ
炭素1	239	181	105	1.126	88°	-12°
炭素2	232	184	106 ppm	1.130 A	88°	-5°

図6

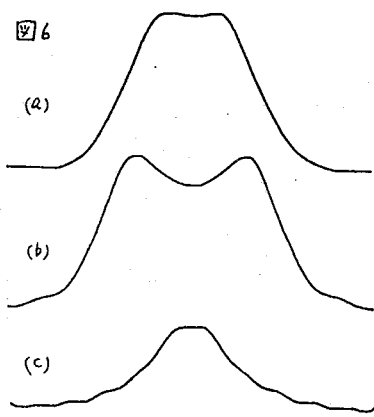
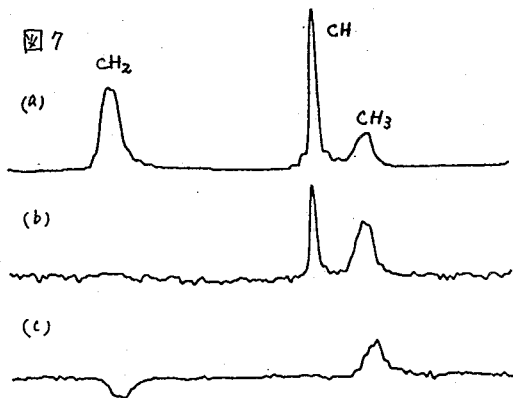


図7



α -D-グルコース-1-リン酸二カリウム二水塩単結晶の ^{13}C 及び ^{31}P 化学シフトテンソル、 ^{13}C - $\{^1\text{H}, ^{31}\text{P}\}$ 三重共鳴の応用
(プリティシユコロソビア大・京大理*) C.A. McDowell
○内藤 晶* D.L. Sastry 竹腰 清乃理

^{13}C and ^{31}P Chemical Shielding Tensors of Dipotassium α -D-Glucose-1-Phosphate Dihydrate; An Application of a ^{13}C - $\{^1\text{H}, ^{31}\text{P}\}$ Triple Resonance Technique
C.A. McDowell, A. Naito*, D.L. Sastry and K. Takegoshi
(Department of Chemistry, University of British Columbia and *Faculty of Science, Kyoto University)

The ^{13}C NMR spectra of a single crystal of dipotassium α -D-glucose-1-phosphate dihydrate were recorded by using ^1H and ^{31}P double nuclear decoupling, since the ^1H - ^{13}C dipolar interaction, and also ^{31}P - ^{13}C dipolar interaction, both caused marked line broadening and/or line splitting of the ^{13}C NMR lines. The directions of the most shielded principal value of the ^{13}C chemical shielding tensors for the C2-C6 carbon nuclei in the glucose group were directed along the C-O bond. The ^{31}P chemical shielding tensor was found to be axially symmetric and the direction of the least shielded principal value was almost parallel to the P-O1(R) bond.

(序)

固体高分解能NMRの発展により、化学的、生化学的に重要な分子の ^{13}C NMRが固体状態で観測されるようになり、分子の構造や局所運動に関して多くの情報が得られるようになった。固体生体関連分子は ^{13}C や ^1H 核以外に ^{31}P や ^{14}N 核を含んでいることが多い。この場合、 ^1H デカップリングを適用しただけでは ^{31}P や ^{14}N と ^{13}C との双極子相互作用のために線幅が広がったり、余分の分裂が現れる。¹ この付加的な線幅増大は分子構造に関する興味深い情報を提供することもあるが、多くの場合スペクトルの解析を複雑なものにする。本研究では ^1H と ^{31}P 核を同時にデカップルして ^{13}C 核を観測する三重共鳴システムを制作し、 α -D-グルコース-1-リン酸二カリウム二水塩の単結晶に応用し ^{13}C 化学シフトテンソルを決定することができたので報告する。

(実験)

α -D-グルコース-1-リン酸二カリウム二水塩の単結晶は $25^\circ\text{C}-20^\circ\text{C}$ 範囲で徐々に冷却することによって成長させた。この結晶は単斜晶系で空間群は $P2_1$ 、格子定数は $a=10.44$, $b=9.025$, $c=7.518\text{A}$, $\beta=110^\circ 24'$ である。結晶の a , b 軸と c 軸(c 軸= $a \times b$)軸を実験座標系に選び測定を行った。図1a, bに三重共鳴NMRシステムのブロック図を示す。ブルーカーCXP200の ^{13}C , ^1H 二重共鳴装置を基本とし、これに ^{31}P デカップリングの回路を付け加えた。 ^1H , ^{13}C 二重共鳴用のプローブのコイルに直角にサトル型コイルをまき ^{31}P デカップリングパルスを供給した。交差分極パルス系列には竹腰等によって開発された時間平均才差周波数法(CP-TAPF)²を用いた。このパルス系

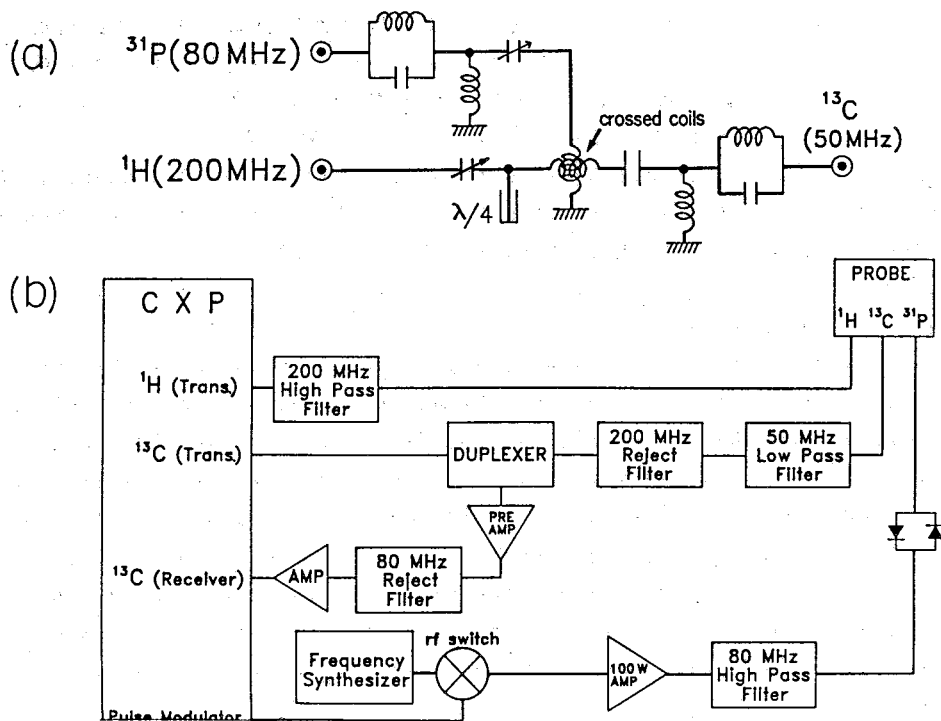


図1 (a) 三重共鳴プローブの回路図。(b) 三重共鳴NMR装置のブロック図。

列を使うことにより、 ^{13}C チャンネルのパワーを通常の40%に落とすことができ、アーキングを防止することができた。

(結果と考察)

a) 三重共鳴の実験

図2に α -D-グルコース-1-リン酸二カリウム二水塩単結晶の ^{13}C NMRスペクトルを示す。a)は ^1H デカップリングのみで測定したスペクトルで、b)のスペクトルは ^1H 、 ^{31}P 二重デカップリングにより測定された。図で明らかなように二重デカップリングは線幅の減少に有効である。特にC1炭素では ^{31}P - ^{13}C 双極子相互作用による分裂が完全に平均化されているのが認められる。

b) ^{13}C 化学シフトテンソル

a b, b c, c a 面内で磁場を回転させた場合の ^{13}C NMR線の角度変化を図3に示す。 ^1H デカップリングのみでは、特に、a b面で角度依存を追跡するのは不可能であった。結晶の空間群 $P2_1$ を反映して、a b及びb c面内で磁場を回転させたときには2サイトのNMR線が観測されたが、c a面内で回転させた時には1サイトの ^{13}C NMR線が観測された。角度回転の実験から、それぞれの ^{13}C 核について4個の化学シフトテンソルが決定されるが、このうち2個が正しいテンソルである。この正しいテンソルを決定し、それぞれを6個の ^{13}C 核に帰属するため

に次の点を考慮した。1) 過去の研究から、酸素原子に結合している脂肪族炭素核の最大遮へい軸はC-O結合に平行であることが知られている。2) 同一化合物の溶液の ^{13}C NMRスペクトルと固体の化学シフトテンソルの等方成分は似た値を示す。3) ^{31}P - ^{13}C 双極子相互作用はx線回折の結果を用いて計算できる。

以上の点を考慮して決定された ^{13}C 化学シフトテンソルの値を図4と表1に示す。C1炭素の最大遮へい軸はO1-C1-C5面内でC1-O5結合から 42° ずれていることが判明した。C2-C6炭素では最大遮へい軸がC-O結合方向を向いており、最小遮へい軸はC-C-O面に垂直であることが判明した。

c) ^{31}P 化学シフトテンソル

^{31}P NMRスペクトルは ^{31}P 、 ^1H 二重共鳴法を用いて測定した。角度回転の実験を行ったところ ^{31}P NMR線は、a-b面とc-a面では、1サイ

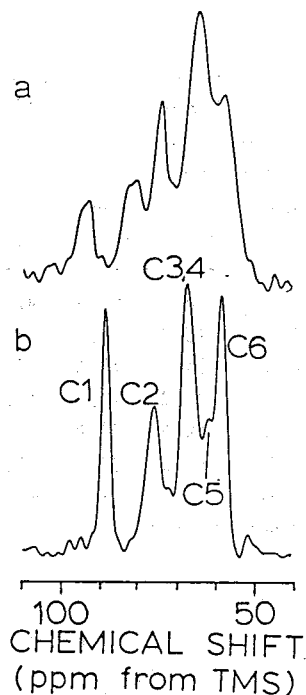


図2 ^{13}C NMRスペクトル (静磁場はc-a面内でa軸から 20° の方向)
(a) ^1H デカップリング
(b) ^1H , ^{31}P 二重デカップリング

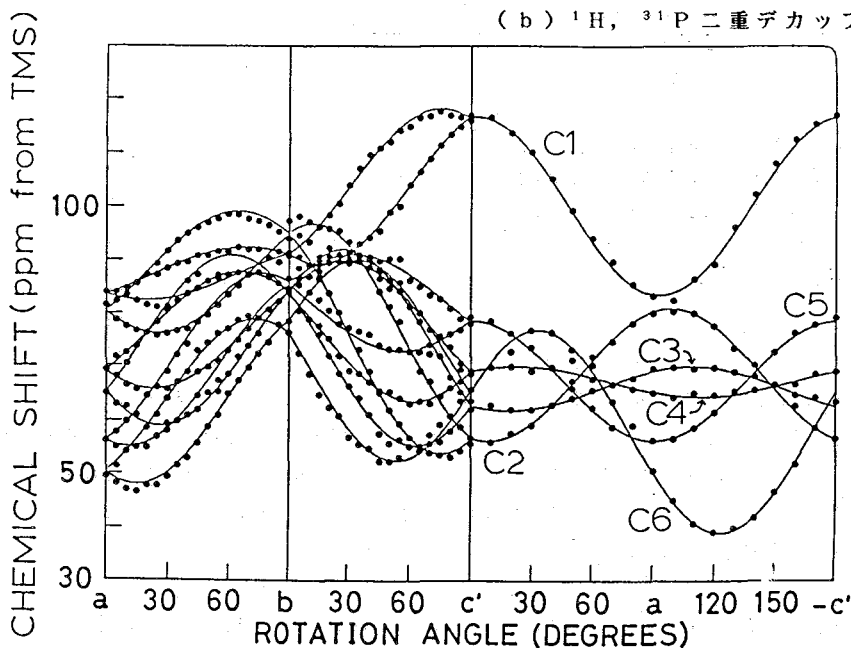


図3 ^{13}C NMR線の角度依存

表1 α -D-グルコース-1-リン酸二カリウム二水塩単結晶の ^{13}C 化学シフトテンソル

炭素	主値		
	σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}
C 1	118.4	91.3	82.2
C 2	92.3	74.2	54.8
C 3	94.1	70.0	55.5
C 4	93.0	70.1	53.3
C 5	100.7	79.0	52.7
C 6	90.5	71.1	32.8

基準試料 TMS

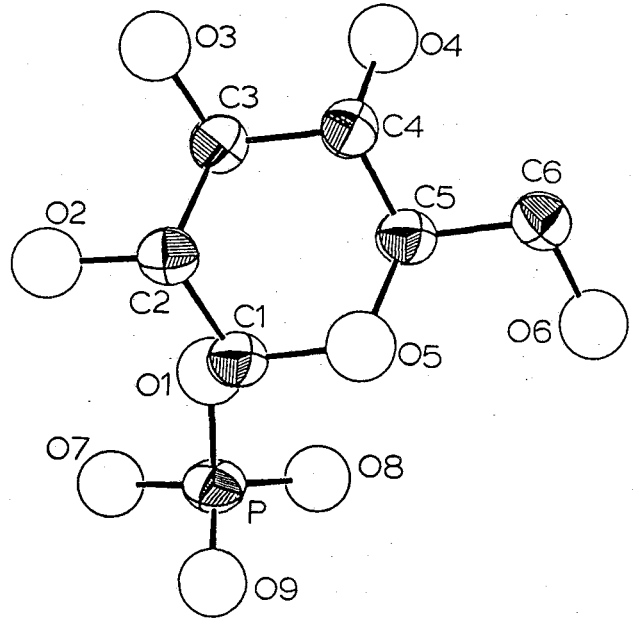


図4 ^{13}C , ^{31}P 化学シフトテンソルのORTEP図

表2 α -D-グルコース-1-リン酸二カリウム二水塩単結晶の ^{31}P 化学シフトテンソル

主値	主軸方向		
	a	b	c
75.9	-0.0363	-0.6036	0.7966
-30.1	-0.8850	0.3895	0.2549
-37.3	-0.4640	-0.6957	-0.5482

基準試料 H_3PO_4

トであり $b-c$ 面で2サイトであった。これから ^{31}P 化学シフトテンソルを直ちに決定することができ、その値を表2に示す。このテンソルは軸対称であり、対称軸である最小遮へい軸はP-O1 (R) 結合に平行である(図4)。x線回折の結果によれば、P-O1結合は4つのP-O結合の中で最も長く結合の電子密度は最低であると考えられる。このx線回折の結果はP-O1 (R) 結合方向が最小遮へい軸になる事を支持している。

(文献)

1. A. Naito and C.A. McDowell, J. Chem. Phys. 81, 4795 (1985).
2. K. Takegoshi and C.A. McDowell, J. Magn. Reson. 67, 356 (1986).

特II

緩和時間測定による固体の動的構造

(阪大理) 中村 亘男

Nuclear Magnetic Relaxation Studies of Dynamic Structure of Solids

Nobuo Nakamura

(Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University)

Nuclear magnetic and quadrupolar relaxation measurements are applied to some molecular crystals, organic glassy state, and hydrogen-bonded dielectrics with emphasis on the study of various kinds of molecular and/or ionic motions.

固体中の分子やイオンの運動には分子内部回転、コンホメーションの変化、分子全体回転、自己拡散などのいわゆるstochasticな運動、量子力学的なトンネル現象、相転移に伴う共同現象的な運動などがある。これらの運動はNMRの線形や核磁気緩和時間 (T_{12} , $T_{1\rho}$, T_{1D} , T_2) あるいはNQRの共鳴周波数 (ν_0) や核四極緩和時間 (T_{1Q}) などにそれぞれ特徴的な変化をもたらすので、緩和時間測定により、分子運動のモードを決定し、あるいは相転移の動的な機構をミクロな立場から調べることができる。ここでは主に緩和時間測定の固体構造、物性研究への応用について、我々のこれまでの研究を中心に解説し、今後の問題について考えてみる。

柔粘性結晶における分子運動と磁気緩和

結晶において熱励起される分子運動には分子内部回転、化学交換 (コンホメーションの変化)、分子全体回転、自己拡散などがある。緩和時間測定によって、これらの運動のモードを帰属し、運動の活性化パラメータを決定できる。その研究例として 2-bromo-2-methylpropane, $(\text{CH}_3)_3\text{CBr}$, を取り上げる。この物質には 208.7 K と 232.7 K に固相間転移があり、最低温相 (相III) は brittle phase で、中間相 (相II) と最高温相 (相I) は柔粘性結晶相である。

実験室座標系及び回転座標系における ^1H のスピン・格子緩和時間 T_1 (または T_{12}), $T_{1\rho}$ の測定結果を図1に示す。¹⁾ 相IIIでは T_1 , $T_{1\rho}$ に2つの極小が観測されるが、これは CH_3 -基及び $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ -基の軸性回転が励起されていることを示している。速い回転運動がある場合 (weak collision limit), T_1 , $T_{1\rho}$ は B P P 型の式

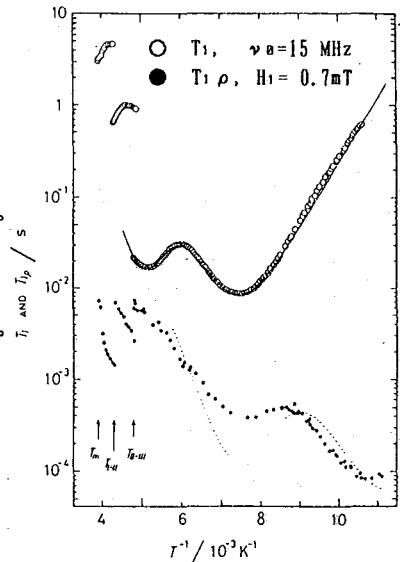


図1. $(\text{CH}_3)_3\text{CBr}$ 中の ^1H の T_1 , $T_{1\rho}$.

$$T_1^{-1} \propto \tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2) + 4\tau_c / (1 + 4\omega^2 \tau_c^2) \quad (1)$$

$$T_1 \rho \propto 2.5\tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2) + \tau_c / (1 + 4\omega^2 \tau_c^2) + 1.5\tau_c / (1 + 4\omega_1^2 \tau_c^2) \quad (2)$$

(またはいくつかの回転が同時に励起されているときはその重ね合わせ) で与えられる。 ω はラーモア周波数、 $\omega_1 = \gamma H_1$ はラジオ波磁場の強度である。 τ_c は分子運動の相間時間で、一般にアレニウスの活性化過程

$$\tau_c = \tau_0 \exp(E_a / RT) \quad (3)$$

に従うと考えられている。 E_a は回転の活性化エネルギーである。式(1)~(3)を図1の実験データに合わせることで、表1に示す活性化パラメータが得られる。

表1. $(\text{CH}_3)_3\text{CBr}$ の活性化パラメータ。

motion	parameters	phase III	phase II	phase I
methyl reorientation (C_3 reorientation)	$E_a/kJ\ mol^{-1}$ τ_0/s	13.9 ± 0.2 $(2.39 \pm 0.35) \times 10^{-14}$		
uniaxial molecular reorientation (C_2' reorientation)	$E_a/kJ\ mol^{-1}$ τ_0/s	22.0 ± 0.5 $(8.2 \pm 2.5) \times 10^{-15}$	9.5 ± 0.8	
overall molecular tumbling	$E_a/kJ\ mol^{-1}$ τ_0/s		18.4 ± 2.5	13.6 ± 4.9
translational self-diffusion	$E_a/kJ\ mol^{-1}$ τ_0/s			51.8 ± 3.6 $(1.2_{-1.0}^{+1.8}) \times 10^{-17}$

相IIでは T_1 に極大があり、この極大より低温側で分子の軸性回転が、高温側で全体回転がそれぞれ励起されていると考えられる。一方、 $T_1 \rho$ は温度が上がると長くなり、分子の全体回転が $T_1 \rho$ を支配していることがわかる。表1で、柔粘性結

晶相における分子全体回転の E_a が相IIIでの軸性回転の E_a より小さいことは注目に値する。相Iでは相転移点直上で分子全体回転が T_1 を支配し、融点(256.1 K)近傍では分子の自己拡散が T_1 を決めている。 $T_1 \rho$ の方は相Iの全温度領域で自己拡散によって支配されている。自己拡散による緩和の場合、一般に(1),(2)式は成り立たず、例えばTorreyらの並進拡散モデルによって $T_1 \rho$ はつぎの式で与えられる。

$$T_1 \rho = 1.5 \Delta M_2 y_1 F(k, 2y_1) / \omega_1, \quad y_1 = \omega_1 \tau_c / 2 \quad (4)$$

ΔM_2 は自己拡散励起による2次モーメントの変化、 $F(k, 2y_1)$ はTorreyの関数である。(4)と(3)を使うと実測の $T_1 \rho$ から自己拡散の活性化パラメータが得られる(表1)。

一般に、柔粘性結晶相の特徴は速い分子全体回転が起こっており、融点直下で自己拡散が励起されていることである。我々のグループがこれまでに調べたいくつかの物質の活性化エネルギーをまとめて表2に掲げる。ネオペンタンなどの普通の

表2. 柔粘性結晶における活性化エネルギー, $E_a/kJ\ mol^{-1}$.

	$(\text{CH}_3)_4\text{C}$	$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	$(\text{CH}_3)_3\text{CNO}_2$	$(\text{CH}_3)_3\text{CCl}$	$(\text{CH}_3)_3\text{CBr}$	CF_3CCl_3
全体回転の E_a^r	~3.8	5.5	6.8	4.9	13.6	5.9
自己拡散の E_a^d	33	20.4	46.5	33.5	51.8	35
E_a^d/E_a^r	8.7	3.7	6.8	6.8	3.8	5.9

柔粘性結晶では E_a^d/E_a^r は6~9の間にあるが、柔粘性結晶相を2つもつ $(\text{CH}_3)_3\text{CBr}$ と準安定な $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ で

はこの比が小さい。このパラメータが柔粘性結晶の安定性と関係づけられるものと思われる。

分子運動と核四極緩和

核四極緩和時間測定は10~100 Hzの、非常に遅い分子運動の研究に有功である。

ヘキサクロロベンゼンにおける ^{35}Cl のNQR共鳴線は38 MHz付近に3本観測されるが、そのスピン・格子緩和時間 T_1 は図2に示すように200 K以上で急激に短くなる。

$^{2)}$ これは分子の6回軸まわりの 60° 再配向運動が励起されたためである。このような場合の T_1 の解析はAlexanderらによる緩和理論(strong collision limit)によって行う。site α にあって核四極相互作用で分極していた核スピンのみが θ だけ回転してsite α' に移ったとすると、分極 P に対するrate equationは

$$dP_\alpha/dt = \sum_{\alpha'} [w_{\alpha\alpha'} \{ (1/2) \cdot (3\cos\theta_{\alpha\alpha'} - 1) P_{\alpha'} \} - w_{\alpha'\alpha} P_\alpha]$$

と与えられる。 $w_{\alpha\alpha'}$ はsite α' から α への遷移確率で、 α と α' が等価な場合は

$$w_{\alpha\alpha'} = w_{\alpha'\alpha} = 1/\tau_0$$

となる。上のrate equationを解き、

$$\theta_{\alpha\alpha'} = 60^\circ \text{ とすると}$$

$$T_1 = 0.502 \tau_0 \quad (5)$$

となって、実測の T_1 から直ちに再配向の相

間時間 τ_0 が求まる。また、図2の勾配から活性化エネルギー $E_a = 62 \text{ kJ mol}^{-1}$ が得られるが、この値は6-exp型の原子間ポテンシャルを仮定して計算した回転障壁の高さ、 $V_0 = 63 \text{ kJ mol}^{-1}$ とよく一致している。

C_6Cl_6 、 $\text{C}_6\text{Cl}_3\text{F}_3$ および C_6F_6 (NMR)に対する実測の E_a と計算した V_0 を表3に示す。

表3. ハロゲン化ベンゼンのエネルギー・パラメータ。

Substance	Space group	Lattice energy kJmol^{-1}	$\frac{\Delta H_s}{\text{kJmol}^{-1}}$	E_a kJmol^{-1}	V_0 kJmol^{-1}
C_6Cl_6	$F2_1/n$	-89.3	91.8	$61.9 \pm 0.9 (v_1)$ $59.8 \pm 1.7 (v_2)$ $64.1 \pm 2.4 (v_3)$	63.0
$\text{sym-C}_6\text{Cl}_3\text{F}_3$ (High)				35 ± 3	
(Low)	calc. $F6_3/m$	-71.6		18.2 ± 0.5^4	42.0
C_6F_6	$F2_1/n$	-54.8	46.62 ± 0.08	$31.2 \pm 0.3 (c)$ $12.6 \pm 0.1 (e)$	$27.6 (c)$ $15.3 (e)$

$\text{C}_6\text{Cl}_3\text{F}_3$ には296.7 Kに相転移があり、 ^{35}Cl NQR、 ^{19}F NMRと分子回転ポテンシャルの計算によって、低温相では分子は平衡位置とそこから約 25° 離れた準安定位置の間でジャンプしており、高温相では3回軸回りの再配向をしていることがわかった。 C_6F_6 の結晶では非等価な2種類の分子が異なる活性化エネルギーで分子の6回軸回りに再配向している。

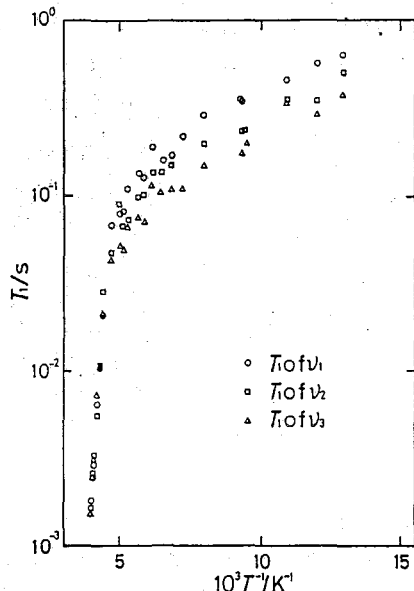


図2. C_6Cl_6 中の ^{35}Cl の T_1 。

低温のガラス状態 : SQUID NMR³⁾

SQUID (超伝導量子干渉計) による NMR は 1MHz 以下の低周波で核磁化とその緩和を超高感度で測定できる。図 3 (a) にそのブロック図、(b) に SQUID NMR で観測したグリセロールの ¹H の信号を示す。静磁場の強さは 5.5 mT、信号の減衰の時定数がそのまま T₁ となる。ガラス状態のグリセロールでは 8 K 以下で T₁ ∝ ω^{0.1-0.7} 及び T₁ ∝ T⁻¹ の関係が成り立つことがわかった。このような関係は古典的な運動のモデルでは説明できない。Anderson, Phillips らの 2 準位系 (TLS) トンネルモデルによってある程度まで説明できるがまだ完全ではない。

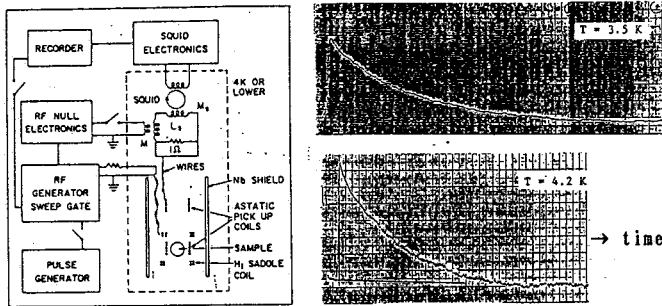


図 3. (a) SQUID NMR のブロック図と (b) glycerol の ¹H の信号。

相転移と磁気緩和

誘電体の相転移の代表的なものは秩序・無秩序型及び構造相転移出鱗、これらの相転移では結晶の対称性が変化するため、NMR や NQR スペクトルや緩和時間に異常な変化が観測されることが多い。特に、相転移点近傍では分子やイオンの共同現象的な運動が critical slowing down を起こし、そのために緩和時間にきわめて特異な変化が観測されることがあり、それ故緩和測定によって相転移の動的な側面をミクロな立場から研究できる。その一例を図 4 に示す。⁴⁾ Betaine phosphate には 96K に反強誘電性相転移があり、これは PO₄³⁻ イオンを結んでいる水素結合のプロトンの位置に関する秩序・無秩序転移と考えられている。図 4 で ³¹P の T₁ が転移点近傍で示す鋭い dip はこの ³¹P と双極子相互作用しているプロトンの運動が slowing down を起こしたために生じたものである。この様な系では、相転移の理論によると

$$T_1 \propto (T_c - T)^\nu$$

図 4. Betaine phosphate における ¹H (●), ³¹P (○) の T₁ (15 MHz). T_c = 96 K である。となり、実測の T₁ の異常部分もこの関係を満たしており、臨界指数 ν = 0.5 となる。

- 1) T. Hasebe, N. Nakamura and H. Chihara, JCS Faraday Trans. 2, 81, 749 (1985)
- 2) H. Yoshina, N. Nakamura and H. Chihara, to be published.
- 3) 赤木、中村、千原、分子構造総合討論会、仙台、1983.
- 4) H. Ohki, N. Nakamura and H. Chihara, Ferroelectrics Lett., in press.

血漿アルブミンの溶液、ゲル状態における水及び蛋白質構造の研究

(岐阜大・医・生理、*生理研、**京大・理・化学)

○ 恵良聖一、桑田一夫、藤井裕子、曾我美勝、鈴木英司*、
巨弘*、赤坂一之**

¹H-NMR studies on water structure and protein conformation in bovine mercaptalbumin (BMA) solution and modified bovine plasma albumin (BPA*) gel. Seiichi Era, Kazuo Kuwata, Hiroko Fujii, Masaru Sogami, Eiji Suzuki*, Hiroshi Watari* and Kazuyuki Akasaka**

(Department of Physiology, School of Medicine, Gifu University, *Department of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences, **Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University)

Cross-relaxation times between irradiated protein protons and observed protons, such as water protons (T_{1S} (HDO)), side chain protons (T_{1S}) were studied in BMA solution and BPA*-gel, using the saturation transfer (SATUR) and inversion recovery (INV) methods. Only in BPA*-gel, SATUR indicated the presence of two kinds of T_{1S} values (short and long T_{1S}). INV only gave a single kind of T_{1S} , corresponding to long T_{1S} by SATUR. The short T_{1S} values may be due to less mobile fibrous aggregates in BPA*-gel. T_{1S} (HDO) values of BPA*-gel, obtained by SATUR or INV were far shorter than those of BMA solution.

【要 旨】 ウシ血漿アルブミンの溶液、ゲル状態における水構造及び蛋白質構造研究のため、360 MHz ¹H-NMRを用い、 T_1 、 T_2 及び特定の側鎖プロトンを f_2 照射し、分子間、分子内交差緩和時間(T_{1S})を測定した。 T_{1S} 測定にはSaturation transfer法とInversion recovery法があるが、後者の方が測定精度は高かった。分子間 T_{1S} 測定により、アルブミンの溶液よりもゲル状態の方が水の T_{1S} 値は著しく短く、ゲル状態では蛋白質・水分子間相互作用の強いことが示唆された。またゲル状態の分子内 T_{1S} 測定において、Saturation transfer法では、長短2種類の側鎖の T_{1S} 値が観測されたが、Inversion recovery法では、前述の長い T_{1S} 値のみ観測された。Saturation transfer法の短い T_{1S} 値は、ゲル状態では溶液状態に比し、より「カタイ」部分の存在を示唆した。

【序 論】 ウシ血漿アルブミン(BPA)は、酸性pH域でN-F転移(pH 4.5~3.75)、酸膨潤(F-E、pH 3.6~2.8)、中性pH域でN-B転移(pH 7.0~9.0)と呼ばれるpHに依存した構造転移を示す(1,2)。また中性pH域では分子内SH、S-S交換反応によりN-A異性化反応(分子老化現象)を示す(1,2)。さらに、市販BPA(M.W.~66K)はF型状態(pH 3.8近傍)では、試料中に混在する微量のプロテアーゼにより、Gln-392とCys-435の間でペプチド鎖が1~2箇所加水分解され、BPA*(~66K)、BPA**(~63K)となり(3)、D₂O中では蛋白質濃度が7%以上で容易に透明なゲルになる(BPA*、BPA**混合物のゲル化で、以後BPA*-gelと呼ぶ(4,5))。一方、SE-セファデックスを用いて精製したウシメルカプトアルブミン(BMA)は、もはやこのプロテアーゼを含まず、F型状態で、濃度が12%においてもゲル化しない。筆者らは、血漿アルブミンの溶液、ゲル状態における水構造及び蛋白質構造を研究するため、360 MHz ¹H-NMR(岡崎生理研)を用いて、¹H-NMRスペクトル、HDOと側鎖の T_1 、 T_2 及び特定の側鎖プロトンを f_2 照射し、分子間、分子内 T_{1S} (6,7)を測定して興味ある結果を得た。

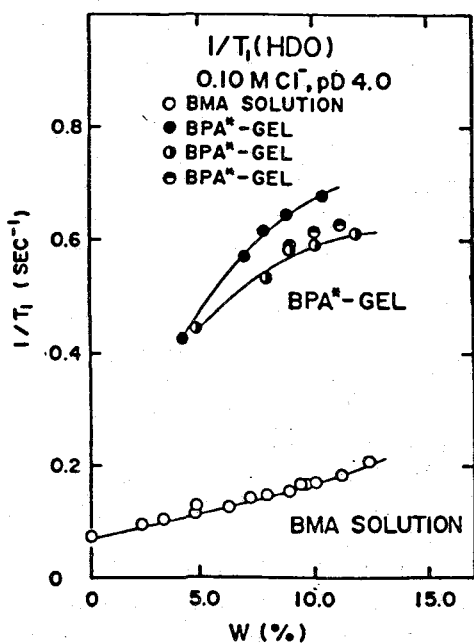
【材料と方法】 市販脱脂BPA Fr. V (Sigma社)をD₂O(99.75%)に溶解し(BPA濃度は8%以上)、0.10 M Cl⁻、pD 4.03(BPAのF型構造のpD域)で約48時間、3℃放置し重水素置換した後、Millex HV(0.45 μm)でろ過した。このろ過BPAを5mmφ NMR試験管に入れ、約72時間、35℃保つとBPA^{*}-gelが得られる。これを蛋白質のゲル状態の測定試料とした。また、蛋白質の溶液状態での試料はBMAを用いた。即ち、市販BPA Fr. V (Armour社)を活性炭処理により脱脂後、Hagenmaier&Poster(8)法に従い、SE-セファデックスを用いてBMAを分画精製した。このBMA分画では、試料中に含まれるプロテアーゼがほぼ完全に除去されていた。BMAはMillex HV(0.45 μm)でろ過後、凍結乾燥した。このBMAをD₂O(99.75%)に溶解し、pD 4.0~4.1、0.10 M Cl⁻、約48時間、3℃に放置し重水素置換した後Millex HV(0.45 μm)でろ過した。このろ過BMAを溶液状態での測定試料とした。

¹H-NMR測定には、Bruker社製WM 360 wb NMRスペクトロメーターを用いた(¹Hプローブ、5 mm φ; 測定温度、25±1℃; 化学シフト、TSP基準)。T₁は通常のパルス系列によるInversion recovery法、T₂はCPMG法、T_{1ρ}測定はAkasaka(6,7)の方法に従い、Saturation transfer(SATUR)法とInversion recovery(INV)法の両測定法を用いた。T_{1ρ}測定の際のf₂照射は、7.13、4.72、0.40、-2.45 ppmをそれぞれ69、20、39、107 Hzで行った。

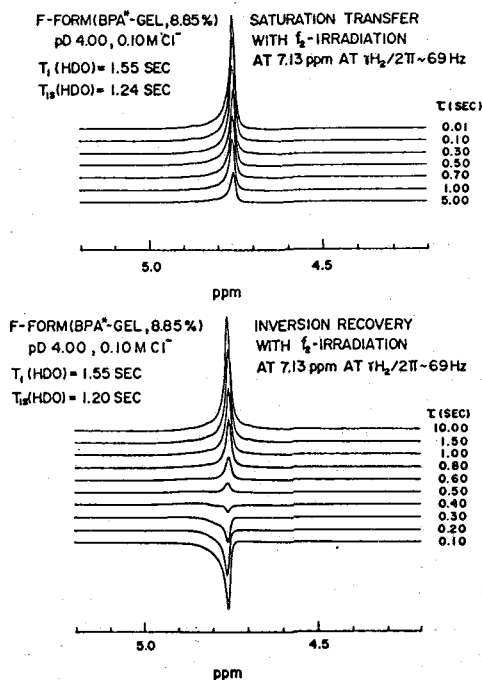
【結果と考察】

蛋白質の溶液、ゲル状態での¹H-NMRスペクトル、T₁、T₂測定 蛋白質側鎖(メチルプロトン、リジンのε-メチレンプロトン、芳香環プロトンなど)のスペクトル像をみると、BMAがN→F→E型と変化するにつれシグナルは鋭くなるものの、T₁値はN型とF型を比較してもそれぞれのT₁値に大きな差は認められなかった。この現象は、次節で重要

(図 1)



(図 2)

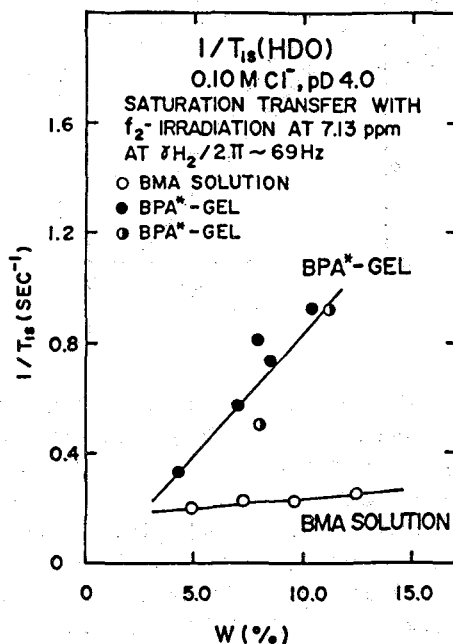
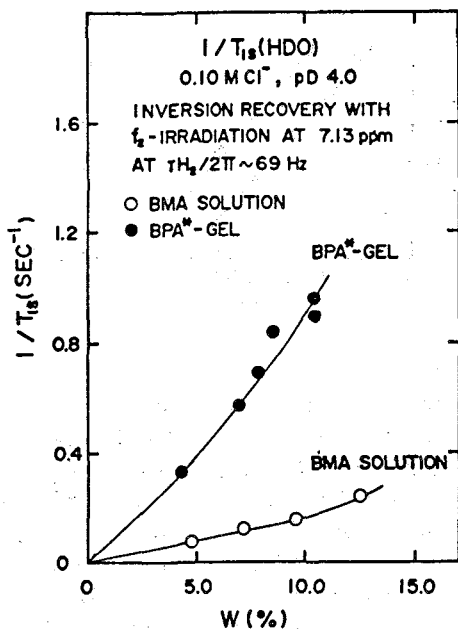


な、 T_1 の時間スケールで蛋白質分子内に交差緩和が存在し、速やかな磁化の平均化が生じていることを示している。一方、HDOに着目すると、BPA*-gelのHDOシグナルの線幅はBMA(F型)溶液のそれよりも幅広い。このことはBPA*-gelの T_2 (HDO)がBMA溶液のそれよりも短くなっている結果と対応している。図1に、BPA*-gelとBMA溶液の $1/T_1$ (HDO)を示す。BPA*-gelの T_1 (HDO)はBMA溶液のそれに比し、いずれの蛋白質濃度に対してもかなり短い。この現象は、次節の T_{1s} 測定でさらに顕著になってくる。

蛋白質よりHDOへの分子間 T_{1s} 測定 $^1\text{H-NMR}$ による交差緩和現象には分子間及び分子内交差緩和現象があり、筆者らは蛋白質側鎖間(分子内) T_{1s} 測定により、BMA分子の各種構造転移における「カタサ」の変化について研究し、さらに蛋白質より水への分子間 T_{1s} 測定により、蛋白質・水分子間相互作用について研究してきた。また、この T_{1s} 測定にはSATUR法(図2上段)とINV法(図2下段)とがあり、両測定法の比較検討も行った。即ち、BPA*-gelとBMA溶液において、7.13 ppmを69 Hzで f_2 照射した時の、蛋白質濃度に対する $1/T_{1s}$ (HDO)プロットを図3に示す(図3-A、INV法; 図3-B、SATUR法)。図からも明らかのように、同一蛋白質濃度では、BPA*-gelの T_{1s} (HDO)値はBMA溶液のそれよりはるかに短い(両状態での T_1 (HDO)値の差よりも顕著。図1参照)。このことは、蛋白質のゾル・ゲル変換により、ゲル状態では蛋白質周囲の水の構造化が進み(9)、水和量も増加し(4)、蛋白質・水分子間相互作用が強くなっていることを示唆している。また測定精度については、観測磁化の変化分はINV法の方が大きいため、SATUR法よりINV法の方が精度は良い(図3の各プロットでは、BMA溶液の場合、INV法による T_{1s} (HDO)値はSATUR法による値よりも少し長く、その精度はINV法の方が良い。一方、BPA*-gelでは、 T_{1s} (HDO)値は両測定法で良い一致を示した)。

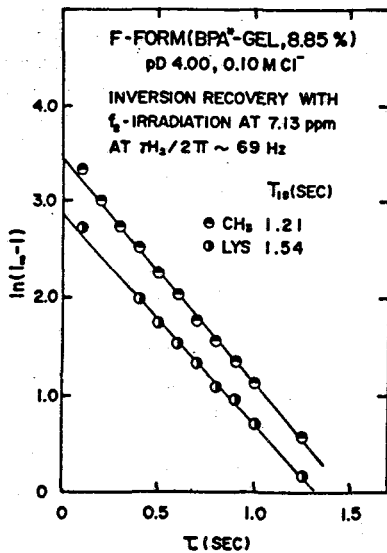
(図 3-A)

(図 3-B)

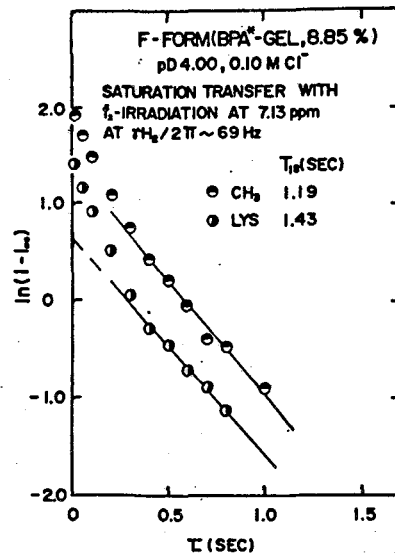


蛋白質の分子内 T_{IS} 測定 BPAまたはBMAは酸性pH域でN-F転移(pH 4.5~3.75)、酸膨潤(F-E, pH 3.6~2.8)の二段階構造転移を示す(1,2)。BMAのN、F、E型構造での分子の「カタサ」を調べるため、7.13、4.72、0.40、-2.45 ppmをそれぞれ69、20、39、107 Hzで f_2 照射して分子内 T_{IS} (側鎖の T_{IS})を測定したが、N→F→E型構造になるにつれ、側鎖(メチルプロトン、リジンの ϵ -メチレンプロトン、芳香環プロトンなど)の T_{IS} 値は増大した(SATUR法、INV法でほぼ同じ値)。即ち、E型になると分子の「カタサ」は減少し、分子の内部運動は増大している。このようなBMA側鎖の T_{IS} 測定に際し、図4に相当したプロット($\ln(I_{\infty}-I)$ または $\ln(I-I_{\infty})$ vs τ)は、SATUR法、INV法の両測定法で直線となり、 T_{IS} 値は両測定法でほぼ一致した。ところがBPA*-gelの側鎖の T_{IS} 測定では、INV法(図4-A)ではプロットの直線性は良いが、SATUR法(図4-B)では短い時間域において、プロットは直線よりずれる。このことは、BPA*-gelではBPA*分子の鎖状集合体形成により部分的に側鎖の運動が束縛された状態が生じ、側鎖の T_{IS} 値が異なる少なくとも2種類の状態(長・短)があり、SATUR法では長・短両状態の時間的変化が同時に観測されるため、図4-Bのようにプロットが直線よりずれるが、INV法では T_{IS} の長い成分のみが観測され、プロットの直線性が良いと考えられる。

(図 4-A)



(図 4-B)



【文献】 (1) J. F. Foster (1977) in Albumin Structure, Function and Uses (V. M. Rosenoer et al, eds.) pp.53-84, Pergamon Press, Oxford (2) 曾我美勝 (1984) 血漿アルブミン—生体におけるその役割, pp.37-80, 講談社サイエンティフィック, 東京 (3) W. D. Wilson et al (1971) Biochemistry 10, 1772-1780 (4) M. Sogami et al (1986) Int. J. Peptide Protein Res. 28, 130-140 (5) S. Era et al (1986) Biomed. Res. 7, 41-46 (6) K. Akasaka (1981) J. Magn. Resonance 45, 337-343 (7) K. Akasaka (1983) J. Magn. Resonance 51, 14-25 (8) R. D. Hagenmaier et al (1971) Biochemistry 10, 637-645 (9) G. N. Ling (1984) in Search of the physical Basis of Life, pp.145-181, Plenum Press, N.Y.

固体アミノ酸，タンパク質の重水素 NMR

(京大理，日本電子*) 内藤 晶，田村厚夫，○赤坂一之，
清水章三*

Deuterium magnetic resonance of solid amino acids and proteins
Akira Naito, Atsuo Tamura, Kazuyuki Akasaka, and Shozo Shimizu*
(Faculty of Science, Kyoto University and *JEOL LTD)

Deuterium magnetic resonance spectra with reasonably good lineshapes were obtained from deuterium-labeled polycrystalline amino acids on a JEOL GX-61D NMR spectrometer equipped with a solenoid-coil probe tuned for deuterium frequency of 61.25 MHz. The results for L-methionine- α D1, L-methionine- α , β D3, L-methionine- ϵ -D3, L-valine- β , γ D7 and DL-cysteine- β D2 showed that, while the C_{α} -D groups of L-valine and DL-cysteine are held rigid, the C_{β} -D group of L-methionine considerably fluctuates at room temperature, narrowing the quadrupolar splittings of the β D and ϵ D resonances. Results for deuterated amino groups and deuterium-labeled protein will also be reported.

はじめに

タンパク質はダイナミックな存在であり，常に構造のゆらぎをもっていることは今や常識となっているが，それを直接的な実験で明らかにすることはあまりなされていない。われわれはタンパク質における内部運動を研究する手段として，重水素 NMR を適用しようとしているが，その出発点として固体（多結晶）アミノ酸から研究を着手した。今回はアミノ酸の中でも特にメチオニンに重点をおいて，その側鎖の運動を中心に研究した結果について述べる。特にメチオニンを取り上げる理由は，側鎖が長くその運動に興味を持たれるとともに，後に適用しようとするタンパク質 *Streptomyces subtilisin inhibitor* (SSI) では，メチオニンがその反応中心に存在するからである。

重水素化アミノ酸

L-Met- ϵ D3 および DL-システイン (DL-Cys- β D2) はフランス CEA より購入した。L-Met- α D1 は京大化学研究所の左右田研究室で Racemase を用いて合成されたものである。L-Met- α , β D3 は同じく左右田研究室で精製された γ -lyase を用いて酵素反応により合成した。また，L-Val- β , γ D7 は都立大甲斐荘氏により合成されたものである。

重水素ラベルしたタンパク質 SSI の合成

Streptomyces albogriseolus S-3253 を L-Met- ϵ D3 を含む混合アミノ酸培地で培養し，菌体外に放出された SSI を硫酸沈澱，イオン交換—およびゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製した。

固体重水素 NMR の測定

日本電子製 GX-61D 型重水素核 NMR 測定装置 (61.25 MHz) を用いて行った。

基本的な仕様は、出力120ワットのトランスミッター（溶液用仕様）に、ソレノイド型コイルをもつ重水素核専用固体用プローブを装着したのものである。直径10mmのコイルで9.5マイクロ秒、自作の直径5mmのコイルで約6マイクロ秒の90度パルスが得られた。パルスシーケンスとしては16回の phase cycle を伴った quadrupole echo を用いた。12ビットのADコンバーターを用いて観測幅は200KHzである。アミノ酸試料については数十〜数百回の積算で十分な信号/雑音比のスペクトルが得られた。内部運動のないC-D結合については線形はかなりの歪みを伴ってはいるが、内部回転しているメチル基やアミノ基については十分満足できるものである。測定はすべて室温で行った。

実験結果

図1にL-Val-D7 と L-Met-εD3 のスペクトルを比較して示す。L-Val-D7 では 117KHz の幅広い分裂を示す成分と、37kHzの分裂を示す成分とが観測された。前者は静止した C_γ-D 結合に由来し、後者は三回軸まわりの回転を行うメチル基に由来することは明らかである。またメチル基の線形は典型的な軸対称性を示している。L-Metのメチル基の分裂は26kHzとL-Valのメチル基のそれよりはるかに小さく、且つその線形も幅広い。この結果はMetのメチル基はそれ自身の回転以外の内部運動を行っていることを示している。

図2 a-cにはそれぞれラベルの位置を変えたL-Metについての重水素NMRの結果を示している。aは図1aと同じものだが、bはC_α水素を重水素化したものであり、cはC_αおよびC_β水素を重水素化したものである。dはDL-CysのC_β水素を重水素化したものである。まず、bのスペクトルは117kHzの明瞭な分裂を示し、MetのC_α-Dが静止していることを示している。これに対し、C_β-D2を含むcのスペクトルは42kHz程度狭い分裂を示す成分をもち線幅は広い。すなわち、L-MetのC_β-D結合は静止しているのではなく、かなりのゆらぎをもっていることがわかる。これに対して、dに代りDL-CysのC_β-DのスペクトルはMetのC_α-Dに比べればわずかに小さいが幅広い114kHzの成分を明瞭に示し、ほぼ静止していることがわかる。

まとめ

以上の結果から、アミノ酸L-メチオニンに関して、そのα炭素は完全に静止しているが、側鎖はその根元のC_α-C_β結合からゆらいであり、そのゆらぎが末端のメチル基にまで影響していることが結論される。

謝辞

L-Val-β,γD7を提供していただいた都立大の甲斐荘正恒氏、L-Met-αDおよびγ-lyaseを提供していただいた京大化研の田中英彦氏に厚く感謝します。

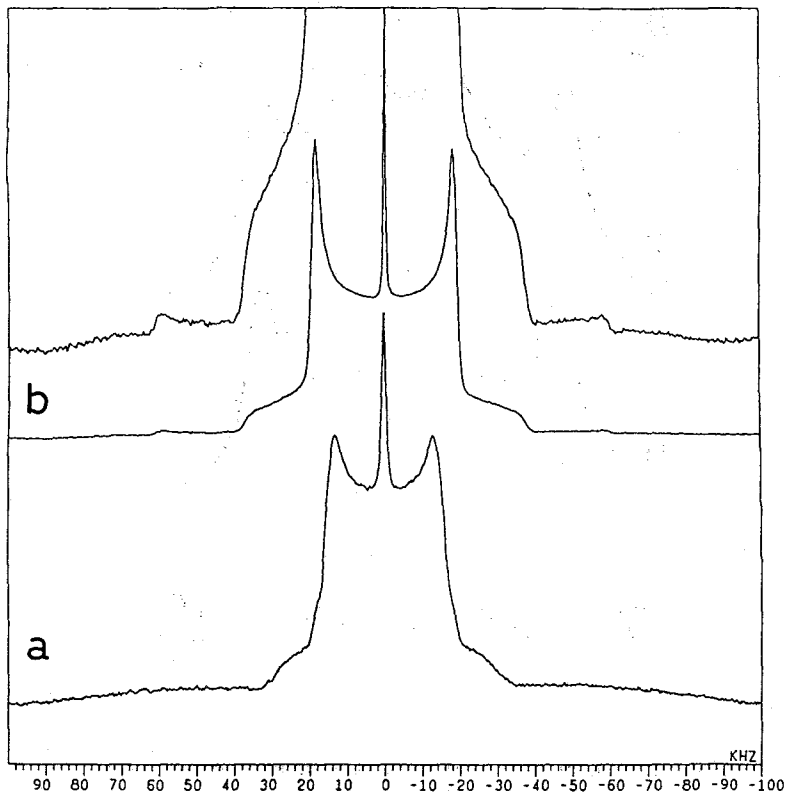
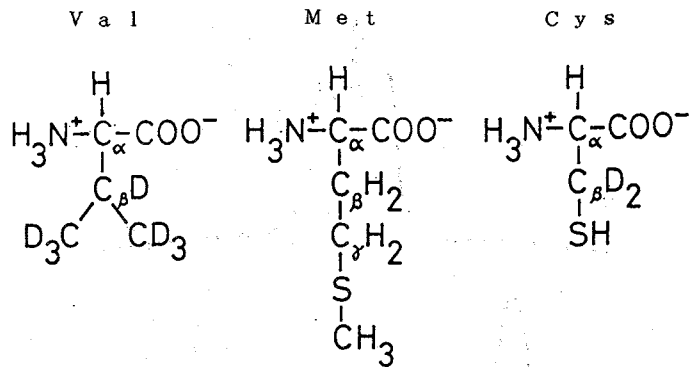


図 1 . 固体アミノ酸の重水素 NMR スペクトル
 a) L-Met-εD3
 b) L-Val-β,γD7

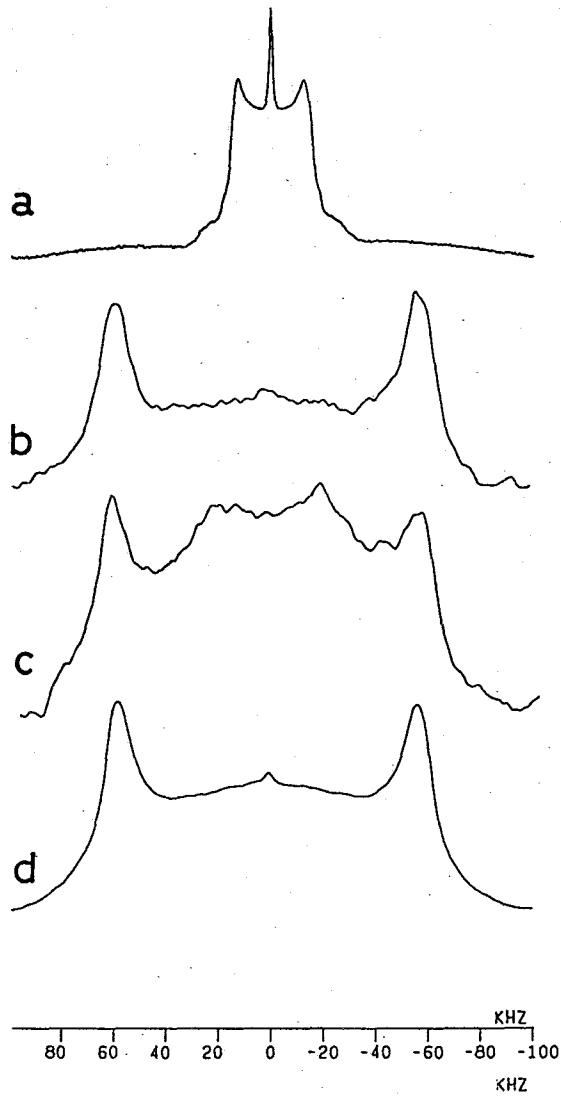


図 2 . 固体アミノ酸の重水素 NMR スペクトル

- a) L-Met- ϵ D3
- b) L-Met- α D
- c) L-Met- α, β D3
- d) DL-Cys- β D2

高出力 ^2H NMR. Choleic Acids におけるホスト-ゲスト
相互作用

(国立がん研) 齊藤 肇、[○]横井もと子

High power ^2H NMR Analysis of Host-Guest Interaction in Choleic Acids
Hazime Saito and Motoko Yokoi

(Biophysics Division, National Cancer Center research Institute)

High-resolution solid-state ^{13}C NMR spectra as well as high-power ^2H NMR spectra of ^2H -labelled choleic acids in the solid state were recorded to analyze the manner of their host-guest interaction.

Displacements of ^{13}C chemical shifts in deoxycholic acid were well correlated by the conformational change due to complex-formation.

A mode of molecular orientation of guest molecule in the channel of the complex was analyzed by means of the quadruple splittings of ^2H NMR signals.

1. はじめに

胆汁酸はわれわれの体内で脂肪の吸収に
関与する天然の界面活性剤である。とりわ
け、デオキシコール酸 (DCA) (図1)は、
界面活性剤としては最も強力で、大腸にあ
っては大腸癌の発癌促進物質であると考え
られる。実際、われわれはすでに ^2H 、

^{31}P NMRによりDCAにより生体膜、

大腸粘膜のorganizationが大きく変えられ

ることを明らかにした。^{1,2)} DCAはまた種々の炭化水素、脂肪酸、アルコール、
ケトン、エステル等をゲストとし、自身が作るチャンネル内にとじこめた包接化合
物を形成することが古くから知られている。この包接体を総称してCholeic Acidsと
呼ぶが、DCAの特異的な生理作用と関連して、包接体におけるホスト-ゲスト相
互作用の解明は極めて興味ある問題である。

ホスト-ゲスト相互作用に関しては、われわれはすでにシクロデキストリン^{3,4)}、
合成及び天然型イオノファー⁵⁻⁷⁾ について、包接、金属イオンの配位にともなうホ
スト分子のコンホメーション変化、ゲスト分子の動的挙動の解析にはそれぞれ ^{13}C
固体高分解能NMR、高出力 ^2H NMRスペクトルの線形解析が、それぞれ有用であ
ることを示した。

今回、 ^2H 標識のゲスト分子を包接した種々のCholeic Acidsを合成し、ホスト、
ゲスト両面から調べた。

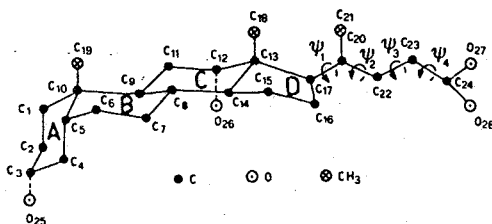


図 1

2. 実験方法

^2H 標識 Choleic Acids は、ゲスト分子の性質によっては溶媒とし、あるいはエタノール溶媒中で適当量混合し、結晶として析出させることによって得た。包接分子が生成しているかどうかは、Choleic Acids それ自身あるいは同等の無標識ゲストを包接した Choleic Acids の ^{13}C 固体高分解能 NMR スペクトルによってチェックした。

^{13}C 固体高分解能 NMR および高出力 ^2H NMR スペクトルはいずれも Bruker CXP-300 スペクトロメーターにより測定した。前者の場合、試料はセラミック製のダブルベアリング型のロータに充填した。また、後者の場合は、スペクトルは四極子エコー法によった。

3. 結果と考察

A. ^{13}C 固体高分解能 NMR スペクトルによるホスト分子の挙動

図 2 に種々の条件で結晶化を行った Choleic Acids の固体 (A~E) およ

び溶液のスペクトルを示す。溶液の場合にくらべて、固体状態のスペクトルが著しく変化するが、前者は D 環の Puckering、および側鎖の運動性による。X 線回折によれば、酢酸、アセトン、パルミチン酸を包接した場合はいずれも orthorhombic で、D 環は half-chair、 ϕ が 60° (ゴーシェ) (図 1 参照) 配置をとる。一方、メタノール/水の場合は hexagonal で envelope、 ϕ が 190° (トランス) である。⁸⁾

このような構造の差異は図 2 の 40~50ppm 領域のスペクトルパターンの変化で顕著である。さらに、overall のホスト分子のサイズに応じて図 3 に示す a/2、b 軸方向の長さを調節することが示されている。

ホスト、ゲスト相互作用およびピーク帰属の一助として、交差分極を利用した ^{13}C T₁ 測定を行った。delay 時間 t についての図 4 のピーク強度 $M_{n,t}(t)$ とすると、

$$M_{n,t} = 2 M_{n,0} (0) \exp(-t/T_1)$$

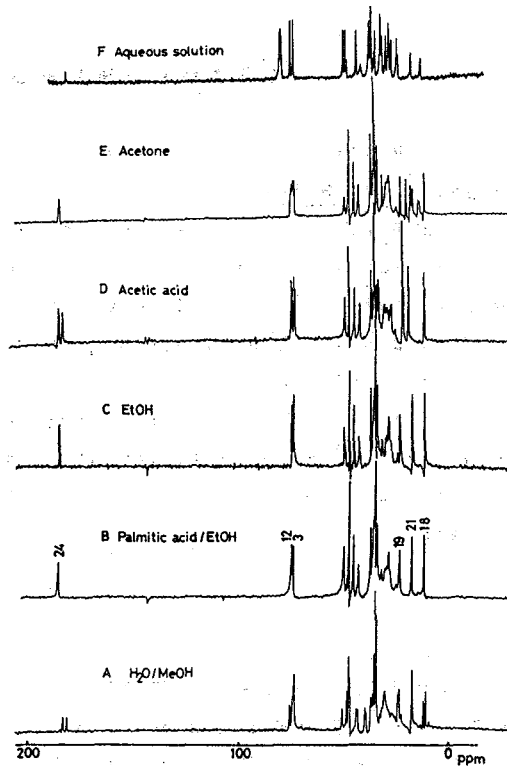


図 2 Choleic Acids の固体
高分解能 NMR ^{13}C NMR

で ^{13}C T₁を求めた。⁹⁾ ゲストがパルミチン酸の場合、18,21,19炭素が各2.9, 14, 3.6秒それに隣接する ^{13}C がスピン拡散によって10~30秒、それ以外は40~100秒である。これに対して、アセトンを包接した場合、すべてのピークが20秒以下に減少し、ゲストの内部運動とカップルした分子間のスピン拡散による緩和過程が存在するのは興味深い。

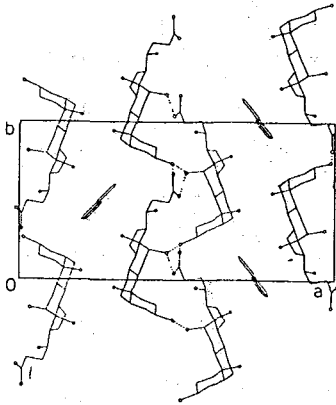


図3 Choleic Acids の X 線回折

B. ^2H NMR スペクトルによる
ゲストの挙動

図5、図6にそれぞれパルミチン酸- d_3 、アセトン- d_3 を包接したCholeic Acidsの ^2H NMRスペクトルを示す。いずれの場合も、メチルのC-3回転と、C-C軸ジャンプあるいは拡散による平均化がおこり、そのため大幅な四極子分裂の平均化がみられる。なお $-55^\circ \sim -70^\circ$ 領域では、電場勾配テンソルの非対称性因子が0.38のスペクトルパターンがみられ、それはC-C軸のジャンプにともなうスペクトルパターンの変化である。アセトンがゲストの場合、ホスト-ゲスト間のスピン拡散によるホストのT₁の大幅な減少がみられたが、この ^2H NMRスペクトル測定による結果と一致する。 $-100^\circ \sim 120^\circ$ において、非対称性因子がゼロの四極子分裂パターンが見られ、その大きさは36.0KHzであり、実際にパルミチン酸- d_3 の場合は固体試料の場合と同一パターンを与える。

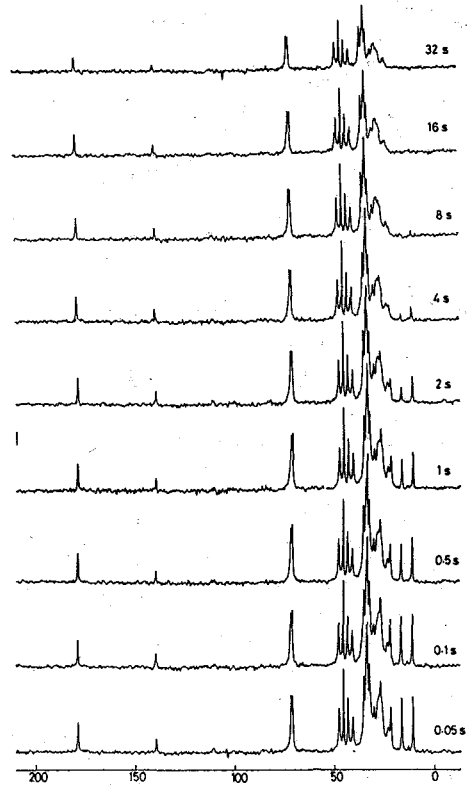


図4 DCA-パルミチン酸
の ^{13}C T₁測定

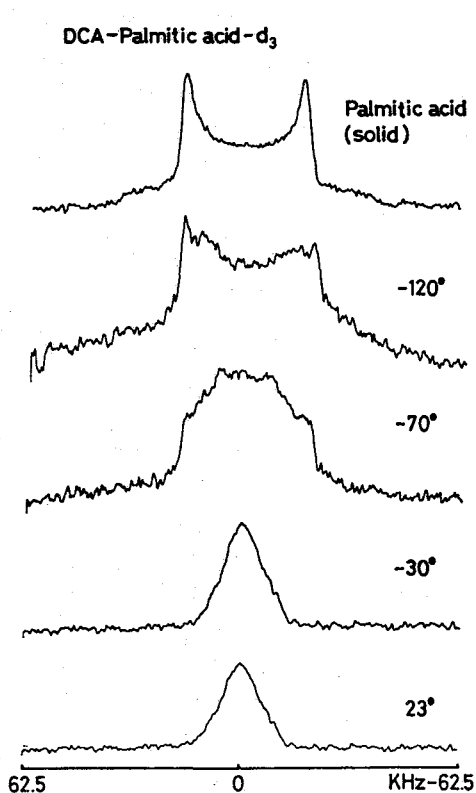


図5 DCA-パルミチン酸-d₃の²H NMR

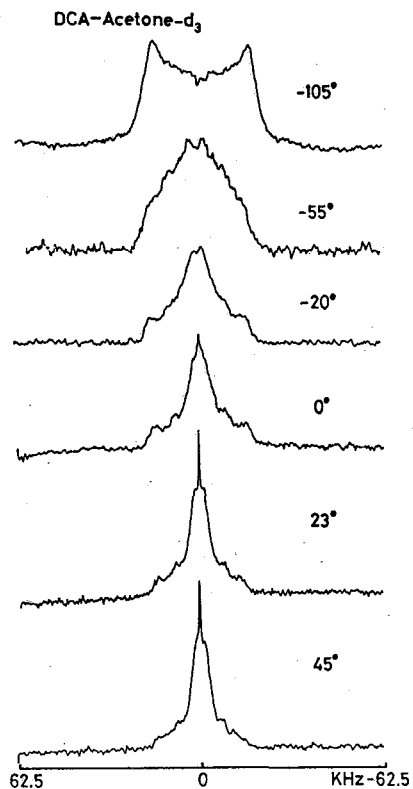


図6 DCA-アセトン-d₃の²H NMR

3. 結論

Choleic Acidsのホスト、ゲストの各挙動をそれぞれ¹³C、²H NMRで観測できると同時に、ホスト-ゲスト相互作用には¹³C T₁測定が有用であることがわかった。

- 1) H. Saitô, Y. Sugimoto, R. Tabeta, S. Suzuki, G. Izumi, M. Kodama, S. Toyosima and C. Nagata, *J. Biochem.*, 94 1877 (1983)
- 2) Y. Sugimoto, H. Saitô, R. Tabeta, M. Kodama, C. Nagata, M. Itabasi, T. Hirota and S. Toyoshima, *Gann.*, 75 798 (1984)
- 3) H. Saitô, G. Izumi, T. Mamizuka, S. Suzuki and R. Tabeta, *JCS. Chem. Commun.* 1982, 1386
- 4) 斉藤肇、多部田涼子、第23回NMR討論会要旨集、P.148 鳴子、1984
- 5) R. Tabeta and H. Saitô, *Biochemistry*, 24 7696 (1985)
- 6) R. Tabeta and H. Saitô, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 58 3215 (1985)
- 7) R. Tabeta, M. Aida and H. Saitô, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 59 1957 (1986)
- 8) E. Giglio, in "Inclusion Compounds" ed. by I.L. Atwood et. al, vol 2 p. 207 1984
- 9) D. A. Torchia, *J. Mag. Reson.* 30, 613 (1978)

^{13}C CP-MAS NMR. β -(1 \rightarrow 3)グルカンの固体構造におけるNMR、X線回折の比較

(¹国立がんセンター、²日本アルカー) 齊藤肇¹, 多部田涼子¹,
横井もと子¹, 恵良田知樹²

^{13}C CP-MAS NMR: Comparison of secondary structures of β -(1 \rightarrow 3)glucans as determined by NMR and x-ray diffraction.

Hazime Saitô¹, Ryoko Tabeta¹, Motoko Yokoi¹ and Tomoki Erata²

(¹Biophysics Division, National Cancer Center Research Institute,

²Bruker Japan Co. Ltd.)

High-resolution solid-state ^{13}C NMR spectra of annealed curdian were recorded in order to obtain reference data of the ^{13}C chemical shifts of the triple-helix form. We found that the laminaran-type form turned out to be the triple-helix conformation irrespective of better or poor crystallinity. On the contrary, the curdian-type form was proved to be the single helix on the basis of solution NMR data, although no detailed conformational elucidation is feasible by x-ray diffraction.

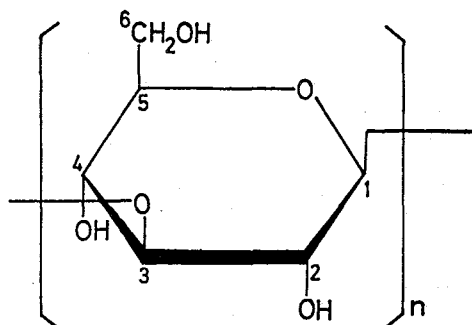
1. はじめに

(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン(1)は、単離源の種類により重合度、分岐度に差異がみられ、その結果溶液物性が著しく異なる。¹⁾ 言うまでもなく、これは固体状態での高次構造の違いに由来する。しかし、一般に(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンは結晶性が悪く、詳細なX線回折データがあるのは150 $^{\circ}\text{C}$ 以上で熱処理を行ったカードラン(DPn540)のみである。

^{2,3)} しかも、このような試料の形態では、常温での溶液物性を必ずしも十分

に説明し得るものではない。このような場合の高次構造解析には、固体高分解能 ^{13}C NMRが有用で、⁴⁾ 試料の形態を問わない。実際、凍結乾燥やスプレードライ試料の高次構造は、予想されるようなアモルファスでなく、カードラン型とラミナラン型の二種類が存在し、そのどちらの構造をとるかが、ゲル生成能と関連していることを示した。^{5,6)}

本研究では、種々の条件で熱処理したカードランの高次構造を ^{13}C NMR、粉末X線回折で比較し、カードラン、ラミナラン型は、それぞれ一重ヘリックス、三重ヘリックス構造であることを明らかにした。



(1)

2. 実験方法

熱処理はカードラン粉末の懸濁液を封管に入れ、表1の条件で行った。各試料につき、NMR、密度、粉末X線回折測定を行った。¹³C NMR測定は、BrukerCX P-300 スペクトロ

表1 カードランの熱処理条件と密度

試料番号	熱処理温度	後処理	密度 (g/cm ³)	結晶比度*
1	180℃	徐冷/空冷	1.49	高
2	150℃	徐冷/MeOH乾燥	1.49	高
3	180℃	急冷/MeOH乾燥	1.45	低
4	150℃	急冷/空冷	1.49	高
5	120℃	急冷/MeOH乾燥	1.48	低
6	80℃	徐冷/MeOH乾燥	1.46	極めて低い
カードラン粉末			1.44	極めて低い
パラミロン			1.53	高

* X線回折による

メーターにより、ダブルエアベアリング型のローターを使用したCP-MASプロープによって行った。

3. 結果と考察

図1, 2に種々の熱処理カードランの¹³C CP-MAS NMRスペクトルを示す。150°-180°での熱処理/徐冷試料は、乾燥状態の差異にかかわらず図1 D, Eに示すように、鋭いNMRピークをあたえる。粉末X線回折データから、熱処理条件から期待される三重ヘリックスが、試料1, 2の場合形成されることがわかる。図1のNMRスペクトルをもう少し詳細に検討してみると、線巾以外にC-3ピー

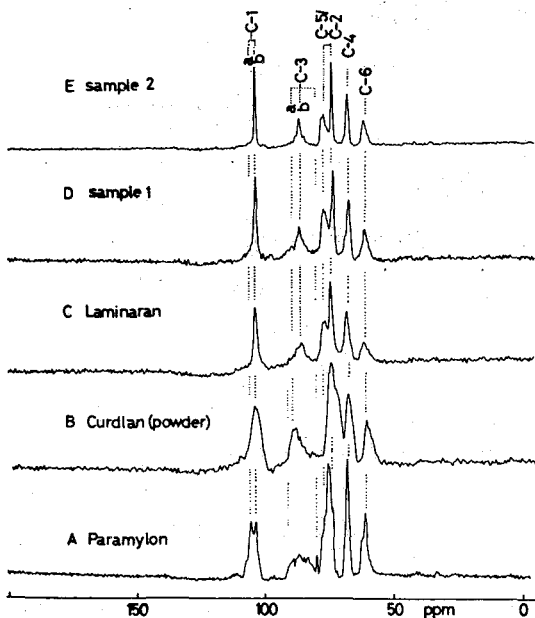


図1 二、三の(1→3)-β-D-グルカンと熱処理カードランの¹³C NMR

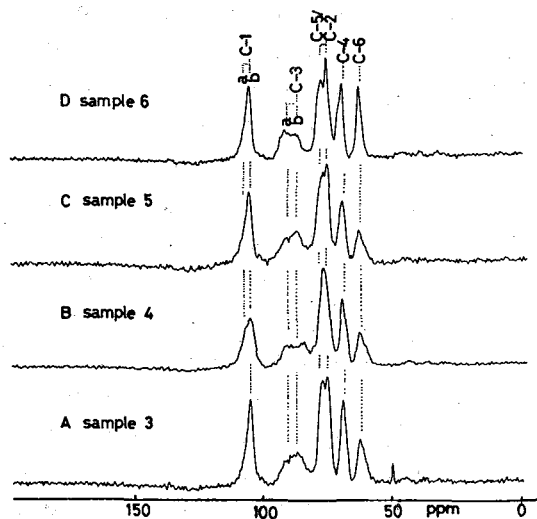


図2 種々の熱処理カードランの¹³C NMR

クが、出発物質のカードラン(図1B)に比べて高磁場にシフト(2.6ppm)しており、スペクトルパターンは線巾の違いを除けばラミナランに極めて類似している。ただし、後の場合、理想的な三重ヘリックス構造に比べ、グリコシド結合のねじれ角に構造の乱れによる分布が生じるために、線巾の広がりが生じたものである。それゆえ、ラミナラン型のコンホメーションは分岐グルカンの場合も含め、三重ヘリックスであることがわかる。^{7,8)} ただし、X線的にはラミナランはアモルファスであった。

一方、熱処理温度が上記の場合と同様であっても、熱処理後急冷の場合であるとか、熱処理温度が120°以下の場合には、三重ヘリックスへの転移が十分でなく、カードラン型構造との混在になっている(図2)。表1でもっとも結晶性の高いのは、パラミロンであるが、図1に示すようにX線回折から期待されるような⁹⁾単純な三重ヘリックス構造とは考えにくい。試料4(図2B)はスペクトルの線巾に広がりが見られるものの、密度、結晶性が高い(表1参照)。一方、スペクトルパターンはむしろパラミロンに近い。完全とは言いがたいが、試料の処理条件によって、パラミロン様の構造が再現できている点は極めて興味深い。

繊維試料のX線回折のよりどころであるエネルギー計算からは、三重ヘリックス以外の構造は(1→3)-β-D-グルカンには考えにくい。しかし、スプレードライあるいは凍結乾燥試料の場合には、溶液あるいはゲル状態の構造がそのまま凍結していると考えてよい場合が多い。実際、カードラン粉末の結晶化度は30%程度であること、膨潤時には65-80%の高分解能NMRピーク強度が観測されることから、熱処理をしていない粉末の場合三重ヘリックス含量はせいぜい10%である。主たる構造はゲル状態に直ちに入り得ること、上記の65-80%が容易に水和し得ることを考慮すると一重ヘリックスでなければならない。

Table 2. ¹³C Spin-lattice Relaxation Times of (1-3)-β-D-Glucans (s)^a

	Curdlan		Laminaran	Paramylon
	Powder	Annealed		
C-1	14	16	26	31, 30
C-2	10	18	24	22
C-3	11	16	20	26, 34, 32
C-4	7.8	8.2	13	12
C-5	10	9	10	22
C-6	1.0	1.2	1.7	6.3

^a Estimated error ± 15%

表2にスピン格子緩和時間の測定値をまとめるが、一重、三重ヘリックス間で T_1 値に差はみられないが、パラミロンとは大きな差異がある。 ^{13}C T_1 は固体的場合 C-6 のように MHz 領域での内部回転が存在し得る構造の場合、他のピークも C-6 へのスピン拡散による緩和がメインである。実際、ラミナラン、熱処理カードランの場合、C-1 ~ C-3 (16-26秒)、C-4, C-5 (8-13秒)、C-6 (1-2秒) の三段階に T_1 の分布がみられる。これは、スピン拡散の速度が C-6 との距離を r として、 r^{-6} 依存性があることを考慮すると化学構造から期待される通りである。このため、ピーク位置に近い C-2、C-5 ピークの識別は、 ^{13}C T_1 によるのが最も有効である。パラミロンの ^{13}C T_1 が一様に長いのは C-6 の回転によるスピン拡散十分でないからであり、この部分の運動性が束縛された構造に由来すると考えられる。この点からも、パラミロンは単純な三重ヘリックス構造とは考えにくい。

本研究にあたって、カードラン熱処理、X線回折、密度測定をお願いした大阪府放射線中央研究所の小川宏蔵博士に厚く御礼を申し上げる。

- 1) H.Saitô, ACS symp.ser.No150, pp.125-147 1981
- 2) R.H.Marchessault, Y.Deslandes, K.Ogawa, and P.R.Sundararajan, Can.J.chem.55,300 (1977)
- 3) Y.Deslandes, R.H.Marchessault and A.Sarko, Macromolecules, 13, 1466 (1980)
- 4) H.Saitô, Magn.Reson.Chem.24,835 (1986)
- 5) H.Saitô, R.Tabeta, and T.Harada, Chem.Lett.1981,571
- 6) H.Saitô, R.Tabeta and Y.Yoshioka, Bull.Chem.Soc.Jpn.59,2093 (1986)
- 7) H.Saitô, R.Tabeta, M.Yokoi and T.Erata, Bull.Chem.Soc.Jpn.in press
- 8) H.Saitô, R.Tabeta, Y.Yoshioka, C.Hara, T.Kiho and S.Ukai Bull.Chem.Soc.Jpn in press
- 9) C.T.Chuah, A.Sarko, Y.Deslandes and R.H.Marchessault, Macromolecule ,16, 1375 (1983)

^{15}N NMR法による合成ポリペプチドの固体構造の研究

(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**

Conformational Studies of Synthetic Polypeptides in the Solid State by the ^{15}N NMR Method.

Akira Shoji, Takuo Ozaki, Teruaki Fujito*, Kenzo Deguchi* and Isao Ando**
(College of Technology, Gunma University, *JEOL Ltd, and **Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology)

We have studied the relation between the ^{15}N chemical shifts (σ_{iso} , σ_{11} , σ_{22} and σ_{33}) and the molecular conformation, amino acid residue, and amino acid sequence of solid copolypeptides containing ^{15}N -labeled L-alanine (Ala*) residue by the ^{15}N NMR methods. As a result, it was found that the anisotropic chemical shift (tensor), σ_{22} , remarkably depends on conformation in particular. Furthermore, it was found that the σ_{22} is varied with copolymer composition, although the isotropic chemical shift σ_{iso} is almost independent of copolymer composition.

我々は、すでに ^{15}N CP-MAS (Cross Polarization - Magic Angle Spinning) 法がホモポリペプチド及びコポリペプチドの固体構造解析に有効な研究手段となることを報告した¹⁻⁴⁾。又、最近、我々は ^{15}N 標識 L-アラニン (Ala*) を含むコポリペプチドを合成し、その ^{15}N CP-MAS 及びパウダーパターンスペクトルを測定し得られた異方性化学シフト (テンソル量: σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) が、これらの試料の一次、二次又は高次構造を敏感に反映するらしいことを見出した^{3,4)}。本研究では、 ^{15}N 標識 L-アラニンを含むポリ(L-アラニン) 及び種々のコポリペプチドについて、 ^{15}N 化学シフト (特に σ_{iso} と σ_{22}) とアミノ酸の種類、共重合組成 (アミノ酸配列) 或いはコンホメーションとの相関性を明らかにすることを目的とした。

本研究で用いた L-Ala* (MSD アイソトープ社; 99% ^{15}N) と他のアミノ酸 (天然存在比) とのコポリペプチドの試料は、N-カルボキシアミノ酸無水物 (NCA) を重合させて得た。合成したポリペプチドの固体コンホメーションの解析は、 ^{13}C CP-MAS NMR 法、赤外吸収 (IR) 及び遠赤外吸収 (Far-IR) 法により行った。得られた結果を Table I に示す。

^{15}N CP-MAS NMR スペクトルは、JEOL GX-270 型分光計に 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 27 kHz 及びデータポイント 8K であり、積算は 100~4400 回行った。 ^{15}N パウダーパターン (static) スペクトルの測定は、試料管をマジック角にセットし、回転を静止させて行った。 ^{15}N 化学シフトの基準には、 $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ (飽和水溶液) を外部基準 ($\delta = 0$) とし、グリシン- ^{15}N の δ 値 (11.59 ppm) を二次基準として ppm 単位で表示した。 ^{15}N 化学シフト値の実験誤差は、 σ_{iso} と σ_{22} については、

Table 1. ^{15}N Chemical Shift (σ_{150}) and Tensor Components (σ_{11} , σ_{22} and σ_{33}) of L-Alanine- ^{15}N of Various Polypeptides (ppm from $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$)

Sample ^{a)}	Ala Content, %	Conformation ^{b)}	^{15}N Chemical Shift σ_{150}	Tensor Component		
				σ_{11}	σ_{22}	σ_{33}
A1 (Ala*,Ala) _n	(20)	α	98.8	204	54.4	38
A2 (Ala*,Ala) _n	(20)	β	102.2	201	61.7	44
A3 (Ala*,D-Ala) _n	20	α_L	96.5	198	55.1	36
A3-1 (Ala*,D-Ala) _n	5	α_L	96.7		57.1	
A4 (Ala*,Ala,Gly) _n	80	α	98.6	202	57.4	36
A5 (Ala*,Gly) _n	20	β	98.8	200	59.6	37
A6 (Ala*,Leu) _n	20	α	98.6	204	56.9	35
A6-1 (Ala*,Leu) _n	5	α	98.6		56.0	
A6-2 (Ala*,Ala,Leu) _n	50	α	98.3		54.2	
A6-3 (Ala*,Ala,Leu) _n	80	α	98.1		57.1	
A7 (Ala*,Val) _n	20	β	99.7	202	62.4	35
A7-1 (Ala*,Val) _n	5	β	107.0		63.5	
A7-2 (Ala*,Ala,Val) _n	30	α	98.6		53.1	
A8 (Ala*,Ile) _n	20	β	101.0	200	63.0	40
A9 (Ala*, ^{OBzl} Asp) _n	20	α	101.5	208	58.7	38
A9-1 (Ala*, ^{OBzl} Asp) _n	5	α	101.3		54.7	
A9-2 (Ala*, ^{OBzl} Asp) _n	10	α	101.1		56.0	
A10 (Ala*, ^{OBzl} Glu) _n	20	α	100.4	206	56.7	39
A11 (Ala*, ^{OMe} Glu) _n	20	α	99.9	205	58.1	37

^{a)}Ala*: L-Alanine- ^{15}N (99%). ^{b)} α : Right-Handed α -Helix, α_L : Left-Handed α -Helix, β : β -Sheet Form

±0.3 ppm以内, σ_{11} と σ_{33} については ±1 ppm である。

IR 及 Far-IR スペクトルは, 日本分光製 JASCO-A702 分光計を用い, KBr disc. 法により $4000 \sim 300 \text{ cm}^{-1}$ の波数範囲で測定した。

用いた試料のキャラクタリゼーションの結果, Ala*残基の ^{15}N 化学シフト (σ_{150} , σ_{11} , σ_{22} , σ_{33}) 値を Table 1 にまとめる。

(1) ポリ(L-アラニン)の異方性 ^{15}N 化学シフトとコンホメーションとの関係

Table 1 のポリ(L-アラニン) (A1 及 A2) に着目すると, 右巻 α -ヘリックス (α と略す) 形の等方性化学シフト (σ_{150}) 値は 98.8 ppm で, β -シート (β と略す) 形の値 102.2 ppm より 3.4 ppm 高磁場側になる。一方, 異方性化学シフト値を

比較すると、 σ_{22} 及び σ_{33} はいずれも α 形の方が β 形より 6~7 ppm 高磁場側に現れる。この傾向は、 σ_{iso} の場合と同じである。 σ_{11} は逆に β 形の方が 3 ppm 程高磁場側に現れる。このような化学シフトテンソル量の変化は、ポリマーのコンホメーション変化に伴って起る Ala^* 残基の ^{15}N 核の電子構造の変化によると考えられる。今後、各テンソルの主値と分子の結晶構造との関係を明らかにする必要がある。特に ^{15}N 核は不対電子を有するために、電子構造の異方性が大きく変化するのであろうから、 σ_{11} 、 σ_{22} 、 σ_{33} の値には、水素結合の方向と距離、分子のコンホメーション、及びアミノ酸シークエンスの影響など多くの有益な情報が秘められているであろう。これらの関連性が明らかになれば、この方法がタンパク質の構造解析にも応用できるものと期待される。特に σ_{22} は、ピークの極大値であるから、他の σ_{11} や σ_{33} に比べ実験精度・感度ともに高いので、有用性も高い。

(2) Ala^* (20%) を含むコポリペプチドの σ_{iso} 及び σ_{22}

コポリマー中の Ala^* の σ_{iso} 値は、もう一方のアミノ酸の種類によって影響を受けやすい。 σ_{iso} 値を、それぞれのホモポリペプチドの値 (文献 1, 2 を参照) と比較すると、 α 形の場合、相関が見られ Ala^* の σ_{iso} 値の方がホモポリマーよりも、いずれも 2~3 ppm 低磁場側に現れる傾向が認められた。一方、 β 形の場合には、データ数が少ないが、 Val と Ile とのコポリマーでは、 Ala^* の σ_{iso} は各ホモポリマーの値より 5~6 ppm 高磁場側にシフトしている。(Gly では、約 15 ppm 低磁場側にシフトするが、これは $(Gly)_n$ の σ_{iso} 値 (83.5 ppm) が極めて小さいことによる)。

コポリマー中の Ala^* の σ_{iso} 値は、もう一方のアミノ酸残基の種類によって異なり α 形では 98~102 ppm、 β 形では 99~107 ppm の範囲内で変化するため、 σ_{iso} 値からコポリマーのコンホメーションを直接推定することは危険である。しかしながら、このような場合には、 σ_{22} が極めて有用であることが見出された。すなわち、種々のコポリマーに関して、 Ala^* の σ_{22} 値は α 形の場合 54~59 ppm、 β 形の場合 62~64 ppm の範囲内に納まる。従って、 σ_{22} 値は、コポリマー (又はタンパク質) のコンホメーションを知る上で重要な物理量であると言える (但し、特定のアミノ酸の ^{15}N 標識が必要)。

(3) コポリペプチド中の Ala^* 残基の ^{15}N 化学シフトに及ぼすアミノ酸組成の影響

3-1. $(Ala^*, Leu)_n$ (α -ヘリックス形)

α -ヘリックス形成能の高い Leu と Ala とのコポリマーについて σ_{iso} 値の Leu 含量による変化を比べると、 σ_{iso} 値は、 Leu 含量 20~95% の広い範囲で殆んど変化が見られない (98.4 \pm 0.3 ppm)。しかも、この値は $(Ala)_n$ の値 (98.8 ppm) に近い。これに対して、 σ_{22} 値は 54~57 ppm の範囲内で変化する。ここで Leu 含量 50% のとき、他と比べ高磁場側に観測される点は興味深い。このように、 σ_{22} 値は、 α 形のコポリペプチドのアミノ酸組成 (又はアミノ酸配列) に関する情報源と考えられる。現在、詳細な研究を進めている。

3-2. $(Ala^*, Asp(OBzl))_n$ (α -ヘリックス形)

側鎖にベンジルエステル基を持つ $Asp(OBzl)$ と Ala^* とのコポリマーについて、 σ_{iso} 値の $Asp(OBzl)$ 含量による変化を調べた。コポリマー中の Ala^* 残基の σ_{iso} 値は、

Asp(OBzl)含量が80~95%の範囲では、殆んど一定値(101.3±0.2 ppm)を示し、共重合組成依存性は、ほぼ無視できる。この傾向は(Ala^{*}, Leu)_nの場合と同じである。しかし、コポリマーの σ_{iso} 値は、(Ala)_n(98.8 ppm)と(Asp(OBzl))_n(99.2 ppm)のいずれとも異なり、ホモポリマーより約2 ppm低磁場側に現れている。

次に、各コポリマーの σ_{22} 値を比較すると、明らかに組成依存性が観測される。即ち、Asp(OBzl)含量が80%から95%に増加するにつれ、Ala^{*}の σ_{22} 値は、直線的に高磁場側にシフトし、シフト量もこの範囲で約4 ppmと大きい。この系については、今後、更に共重合組成のない範囲に渡って詳細に調べる必要がある。又、同時に(Asp(OBzl))^{*}残基の¹⁵N化学シフト値についても調べる価値があると思われる。

3-3. (Ala^{*}, D-Ala)_n (α_L -ヘリックス形)

本実験で用いたA3及びA3-1の試料について言えば、Ala^{*}残基は、ポリ(D-アラニン)の左巻 α -ヘリックスに巻き込まれた、いわゆる α_L -ヘリックス構造をとる。このことは、¹³C CP-MAS NMR及びFar-IRの結果から確認した。 α_L -ヘリックス形におけるAla^{*}の σ_{iso} 値(96.6 ppm)は、 α 形の値(98.8 ppm)より2 ppm高磁場側に観測され、¹⁵N化学シフトからも α_L 形の特徴を見ることができる。D-Ala含量が80%と95%との間に σ_{iso} 値の違いは見られない。しかしながら、 σ_{22} 値を調べると、D-Ala含量80%(55.1 ppm)と95%(57.1 ppm)との間でD-Ala含量の増加とともに約2 ppmの低磁場シフトがみられ、この場合にも σ_{22} 値は、共重合組成依存性を示す。

3-4. (Ala^{*}, Val)_n (α -ヘリックス形, β -シート形)

一般に(Val)_nは β 形をとることが知られており、従って(Ala^{*}, Val)_nは、Val含量が減少するにつれ、 β 形ではなく α 形をとると予想できる。事実、¹³C CP-MAS NMRの結果から、試料A7及びA7-1(Val含量80%以上)は、殆んど β 形をとり、A7-2(Val含量70%)は、殆んど α 形をとることが確認された。

さて、Table 1の σ_{iso} 値に注目すると、 α 形のA7-2の σ_{iso} 値(98.6 ppm)は α (Ala)_n(98.8 ppm)とほぼ同じ値を示す。次に β 形における σ_{iso} 値は、Val含量が80%から95%に増加すると、約7 ppm低磁場シフトを示す。従って、この系では、 σ_{iso} 値は大きな共重合組成依存性を示す。これと比較すると β 形の σ_{22} 値の共重合組成依存性は、それほど大きくない。むしろ β 形から α 形へのコンフォメーション変化のところで、 σ_{22} 値が約9 ppmと大きな変化を示すことに注目したい。

文献 1) 莊司・尾崎・藤戸・出口・安藤: 第24回NMR討論会講演要旨集(1985) p.263

2) A. Shoji, T. Ozaki, T. Fujito, K. Deguchi, I. Ando; Macromolecules, in press

3) 莊司・尾崎・藤戸・出口・安藤・安藤: 第35回高分子学会年次大会予稿集(1986) p.731.

4) A. Shoji, T. Ozaki, T. Fujito, K. Deguchi, I. Ando; XIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (Todtmoos, Germany, 1986) Abstracts P 76.

絹フィブロインの構造と利用に関するNMRによる研究

(東京農工大工) 朝倉哲郎 ○平野幸喜 吉水広明

NMR Study on the Structure Analysis of Silk Fibroins and Its Application to Biomaterials

Tetsuo Asakura, Kōki Hirano, Hiroaki Yoshimizu

(Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology)

It has been recently shown that silk fibroins are one of the excellent biomaterials. In order to clarify the origin of the superiority and use these silk fibroins widely as enzyme-immobilized materials, NMR and ESR spectroscopies have been applied to the structure analysis of the silk fibroins. The recognition of the presence of both "Structure Domain" and "Reaction Domain" in the chain is important. The heterogeneous structure of the silk fibroin membrane used for the enzyme-immobilized material was clarified.

1) 緒言：最近我々は、絹フィブロインの独自の構造特性を生かすことによって、それが、酵素固定化担体等のバイオ材料の素材として十分に有力であることを報告してきた。^{1,2)}すなわち、酵素を絹フィブロインキャスト膜中に包括固定すると、酵素の溶出はほとんど認められないと同時に高活性が維持され、さらにpH・熱に対する酵素の安定性が増加する結果が得られた。絹フィブロインのこの優れた特性は、その構造と密接に関連しているので、絹フィブロインの構造解析から得られる情報は絹がなぜ酵素固定化担体として優れているかはもちろん、今後絹をバイオ材料として広く利用する時の分子設計の指針をあたえる。絹フィブロインは、Gly, Ala, Serからなり構造発現に関与する"Structure Domain"と、Tyr, Asp, Gluらの極性残基を含み反応性に富む"Reaction Domain"にわけることができる。⁴⁾本研究では各Domainの情報を主にNMR、ESR法を用いて得、今後の絹のバイオ材料への利用に向けた指針を立てることを目的とした。

2) 実験：【材料】①家蚕再生絹フィブロイン溶液を塩化ビニリデン膜上にキャストして得た絹フィブロイン膜を必要に応じてメタノール処理した。②絹フィブロイン結晶部シーケンスモデル化合物は本学工業化学科・成田教授から供与された。③Tyr残基側鎖部位をスピンラベルした試料をESR測定に供した。⁴⁾④3-フルオロ-Phe絹フィブロインは、3-フルオロ-Pheを5齢期カイコに取り込ませることにより得られた。【測定】⑤二次元NMRはJEOL GX-270を用いて270.05MHz(プロトン)にて内蔵のパルスシーケンスで測定した。⑥¹⁹F-NMRはJEOL FX-90Qで84.29MHzにて測定した。⑦ESRの測定はJEOL JES-3XGを用いてXバンドでおこなった。

3) 結果と考察：

【Structure Domain】家蚕絹フィブロインのアミノ酸組成はGly, Ala, Serだけで実に85%にもなる。Fig.1は再生絹フィブロインのカルボニル領域の拡大図⁵⁾であるが、各ピークの定量結果からGSGAGAのシーケンスが70%を占めることがわかる。この主シーケンスの溶液中の局所的コンホメーションを検討するため、シーケンスモデル化合物TFA-GSGAGA-OHについてNOESYを測定した。NOE相関は隣接残基にのみ観測され(Fig.2)、この主シーケンスは基本的にランダムコイル構造をとることがわかる。これは、Fig.1に見られるように、分子量が30万程度であるにもかかわらず、水溶液の¹³C-NMRスペクトルが極めてシャープであり、セグメント運動の相関時間が10⁻¹⁰秒で低分子なみの運動性を持つことと対応する⁵⁾。このシーケンスはメタノール処理により容易に緻密な逆平行β構造を形成するので、後に述べるように酵素を包括固定するうえで重要である。さらに、Structure Domainの情報を得るために、精練糸、キャスト膜、パウダー、結晶部のプロトン・パルスNMRを測定しスピン-格子緩和時間T₁を決定した。(Fig.3)その温度依存性は、いずれのサンプルも-80~-70℃に最小値を持ち、類似した曲線となる。これは、そのアミノ酸組成を考慮すると、Ala側鎖メチル基の速い回転に起因するスピン拡散によると考えられる。また、固体状態においては

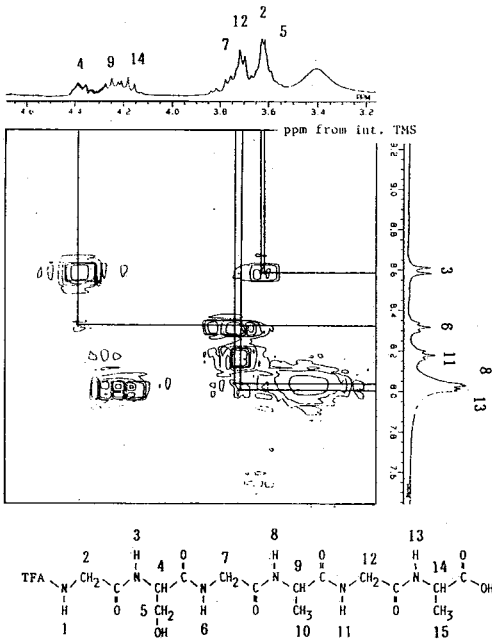


Fig.2 NOESY spectrum of TFA-GSGAGA-OH.

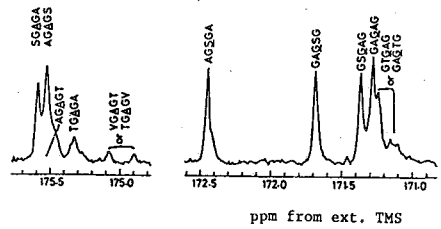


Fig.1 The carbonyl spectrum of *B. mori* silk fibroin

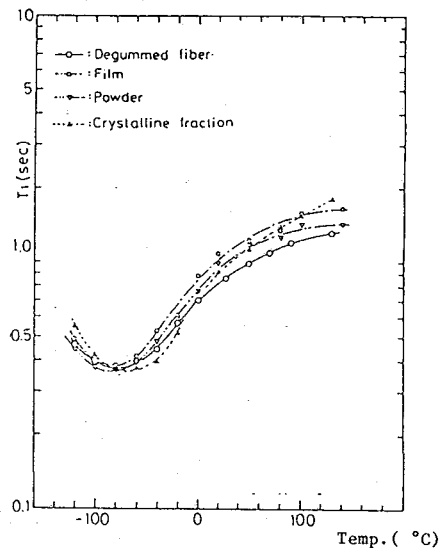


Fig.3 Temperature dependence of ¹H T₁ for *B. mori* silk fibroins in solid state

Ser側鎖OH基は水素結合に関与し、その側鎖の運動性が室温で凍結されていることが $^2\text{H-NMR}$ による研究から報告されている。⁶⁾

【Reaction Domain】特にTy r側鎖は重要である。すなわちTy r芳香環は染料オレンジIIとのスタッキングによる相互作用のサイト⁷⁾、絹フィブロインを溶解する時の Ca^{2+} イオンとの相互作用のサイト

、絹の構造解析をおこなう上でのスピラベルのサイト⁴⁾、酵素を絹に共有結合させる時のサイト³⁾となる。Fig.4はメタノール処理したTy rスピラベル絹フィブロイン膜の膨潤状態でのESRスペクトルであり、バイオセンサーとして用いる時の絹の状態を再現している。

fast, slow, very slow成分からなる3成分を仮定し、シミュレーションにより各成分の割合を求めた。また、膨潤状態でも、膜内部に溶液に対応する $^{13}\text{C-NMR}$ ピークが認められること、さらにIR $^{13}\text{C-CP/MAS NMR}$ 、のデータも考慮して、膜の断面はFig.5のような不均一構造になっていると考えられる。

Ty r以外の極性基は1%未満のものが多く、長時間積算することにより、Asp, Glu, Argらの $^{13}\text{C-NMR}$ ピークが観測される。(Fig.6)例えばこれら側鎖の緩衝作用が酵素を絹フィブロインで包括した時にpHに対する酵素の安定性の増加をもたらすと考えられるが、微小ピークのために、得られる情報は必ずしも十分でない。そこで、例えば、フッ化アミノ酸ラベルをおこない、高感度の $^{19}\text{F-NMR}$ でそのピークを検討することが考えられる。Fig.7に一例として3-フルオロPhe絹フィブロインの ^{19}F スペクトルを示した。液状絹(c)でピークが観測され、3-フルオロPheは絹フィブロイン中に取り込まれていること、一部がTy rに転換されていることがわかる。3-フルオロPhe残基の

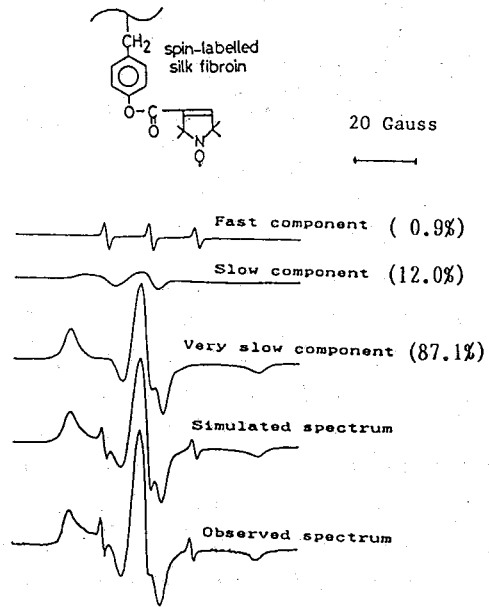


Fig.4 ESR spectra of spin-labelled *B.mori* silk fibroin and the simulated spectra

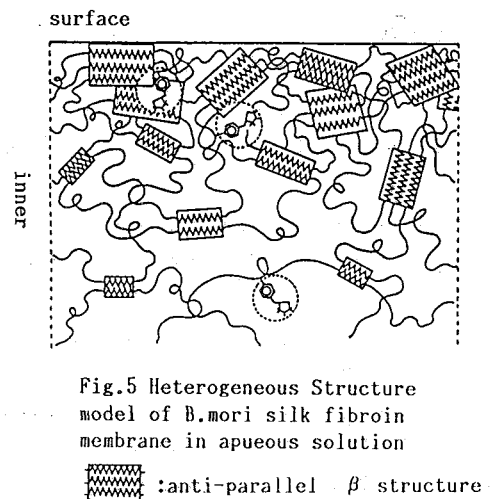


Fig.5 Heterogeneous Structure model of *B.mori* silk fibroin membrane in aqueous solution

^{19}F ピークの T₁ は、フリーのアミノ酸 (a) の値と一致することから、Phe の側鎖は自由に運動していることがわかる。

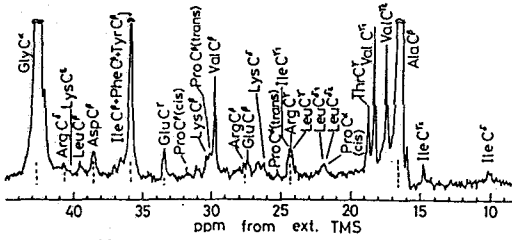


Fig.6 ^{13}C -NMR spectrum of *B.mori* silk fibroin. The aliphatic region was expanded

以上を総括すると、絹フィブロイン膜中に酵素を固定化した場合、絹フィブロイン膜表面付近はメタノール処理により緻密な逆平行β構造 (GSGAGA からなる Structure Domain の構造転移) を形成し、膜を不溶化するとともに酵素分子の溶出を防ぐ。一方、膜内部の運動性の高い領域の存在は酵素の立体障害ならびに基質との接触を考えると高活性の原因となろう。

最後に、パルス NMR のデータを提供していただいた出光石油化学 橋渡 安朗、佐藤 和夫 両氏に感謝します。

参考文献

- 1) 化学工業日報(1987): 6月10日版、
日本工業新聞(1987): 6月8日版
- 2) A. Kuzuhara, T. Asakura, R. Tomoda, T. Matsunaga: J. Biotech., 5, 199(1987)
- 3) 朝倉哲郎: 繊維学会昭和62年度年会要旨集, 71(1987)
- 4) 朝倉哲郎, 吉水広明, 塚田益裕, 瀬戸山幸一, 光田慶一: 繊維学会誌, 43, 335(1987)
- 5) T. Asakura, Y. Watanabe, and T. Itoh, Macromolecules, 17, 2421, (1984)
- 6) H. Saitō, R. Tabeta, A. Kuzuhara, and T. Asakura: Bull. Chem. Soc. Jpn., 59, 3383(1986)
- 7) 朝倉哲郎, 福田昌秀: 繊維学会昭和62年度年会要旨集, 68(1985)

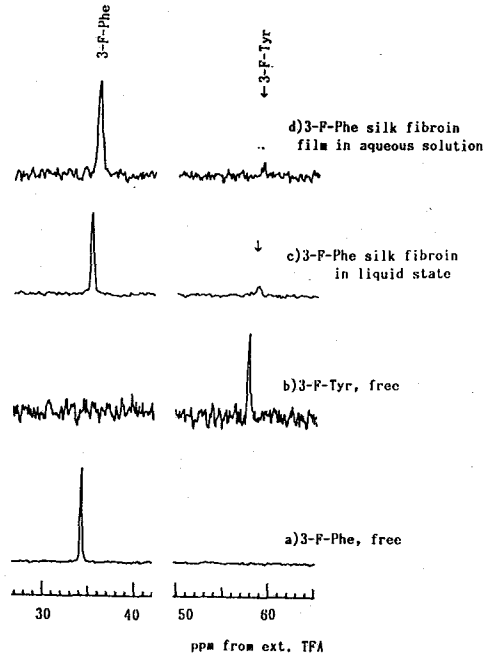


Fig.7 ^{19}F -NMR spectra of 3-fluoro phenylalanine *B.mori* silk fibroin

(東薬大・中央大理工) ○杉渕直文、神藤平三郎、松本 潮、
千喜良 誠*

Effect of Small Binding Molecules on Oriented DNA Fibers: ^{31}P NMR Study in Solids, Naofumi Sugibuchi, Heisaburo Shindo, Ushiho Matsumoto and Makoto Chikira*

(Tokyo College of Pharmacy, and Faculty of Science and Technology, Chuo University*)

Many small molecules are known to interact with DNA in different modes, intercalation, electrostatic interaction, covalent bonding and so on. We have studied oriented DNA fibers interacting with ethidium bromide and arginine as typical examples. Intercalation of EtBr caused phosphodiester conformation disordered only at or near intercalating sites, while binding of Arginine eliminated the conformational transition between A and B forms and accelerated isotropic motion of phosphodiester groups of DNA in the fiber.

二重鎖DNAと薬物との相互作用は古くから知られており、その作用様式として次の三つが考えられる。1)塩基面間にインタカレートする、2)リン酸基との静電的相互作用、または水素結合する、3)塩基などと共有結合する。薬物によってはその相互作用の強さが違い、また複数のモードを持つものがある。本報においては上述の(1)で作用する代表的な化合物として Ethidium bromide (EtBr)及び(2)で作用する Arginine (Arg) を取り上げ、またその他の化合物について、それらの結合によるDNAの構造変化及び分子運動への影響について固体の ^{31}P NMR法を用いて検討した。

【実験方法】

市販のサケ精子DNAの10 mM NaCl溶液(100 mg/20 ml)を調製し、25000 rpm、2 hrで超遠心し、難溶性のDNAを取り除いたのち、EtBrの適当量を加えて一昼夜攪はんした。45000 rpm 16 hrで遠沈した粘性の高いDNA溶液から高配向試料を調製した。また、Arginineについては、上記のDNA溶液を10 mM NaCl、10 mM Arg (pH 7.5)に対して平衡透析を2日間行い、同様な方法で配向DNAを調製した。 ^{31}P NMRの測定にはFX-200(JEOL)固体NMR装置を用いた。数本のDNA繊維をゴニオメータに平行に取り付け、種々の相対湿度(RH)下で、DNA繊維軸と磁場との成す角を変えてNMRスペクトルを得た。また、紫外、可視吸収スペクトルの測定には日立U-3200を用いた。

【結果と考察】

1. 一軸配向NaDNA試料の ^{31}P スペクトルパターン

A型DNAの ^{31}P NMRスペクトルについて、図1に示したように、繊維軸が磁

場と平行 ($\phi = 0^\circ$) のとき、鋭い一本線が観測され、直角 ($\phi = 90^\circ$) のとき二重線が観測される。これらのスペクトルはリン酸基のコンホメーションがラセン軸に対称であるときに予測されるスペクトルに一致する。一方、B型DNA (図1B, Li DNA)、平行のときのスペクトル線は異常に幅広い (~ 80 ppm)。このことはリン酸基の向きがラセン軸に対してかなり不規則になっていることを示しており、おそらく塩基配列に依存する局所構造の存在を意味する。92% RHにおけるB型DNAの平行スペクトルでは分子運動の存在のため線幅は狭くなるが、A型に比べ幅広い (40 ppm)。これらの結果からA型は塩基配列に無関係に単一な骨格構造を持ち、運動性も乏しいが、一方B型DNAは塩基配列に依存して不規則な構造であること、またかなり振幅の大きな運動があることが知られている^{1,2)}。以上を参考にして、結合低分子によるDNAの構造や運動に及ぼす影響について検討する。

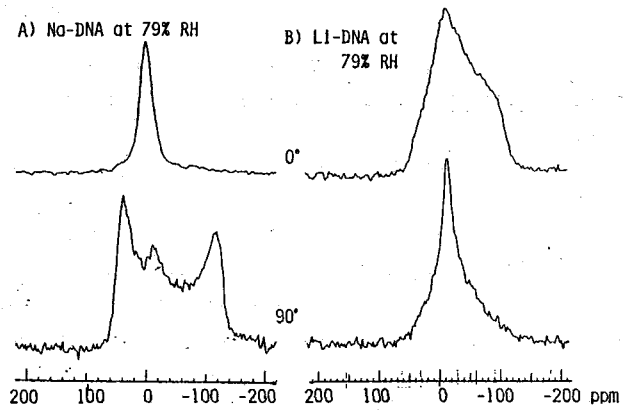


Fig. 1. ^{31}P NMR spectra of Na- and Li-DNA fibers oriented at 0 and 90, and at 79% RH.

2. 薬物のDNA繊維構造への影響

(a) EtBrの場合 通常、DNAと薬物との相互作用を調べる手段として多くのものが用いられているが、いくつかの系についてX線単結晶の結果も報告されている³⁾。今回、EtBr-DNA複合体の配向繊維を調製する条件を決めるために、まず可視部吸収スペクトルで検討した。0.1 M NaCl、10 mM Tris-HCl、pH 7.5においてDNAの濃度(P)を一定にし、EtBr濃度(D)を変えて、最大吸収波長(λ_{max})を測定した。

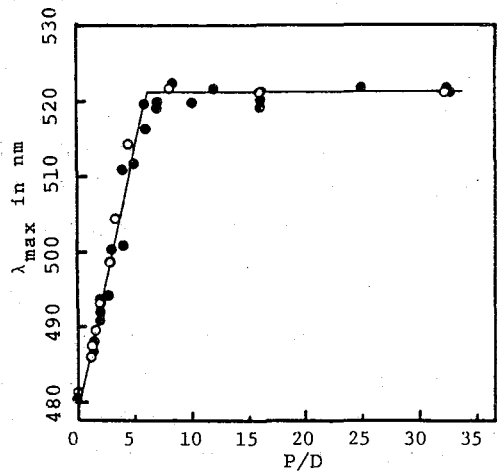


Fig. 2. Plots of λ_{max} vs. P/D

P/Dに対する λ_{max} のプロットを図2に示した。P/Dに比例して長波長側に λ_{max} がシフトしたのち、P/D=10以上では一定になった。このことはP/D=10以上では結合したEtBrのみ存在することを意味する。(P/D=10はEtBr 1分子に対してDNA 5

塩基対に相当する。) この挙動は 10mM NaCl 溶液においても変化しなかった。従って、この結合は塩濃度には無関係であり、静電的相互作用の弱いことを意味する。幾つかの P/D 値について配向 DNA 試料を調製し、79、92 (または 98%) RH で NMR を測定した。図 3 は P/D = 12 の場合の EtBr-Na DNA 繊維のスペクトルを示す。79% RH でのスペクトル (図 3 A) は、図 1 と比べて分かるように、ほとんどパウダーパターンに近似できて、EtBr のインタカレーションにより無配向性に近い構造の乱れがある。しかしながら、98% RH では、スペクトルの異方性は明かであり、平行スペクトルは線幅の広い非対称

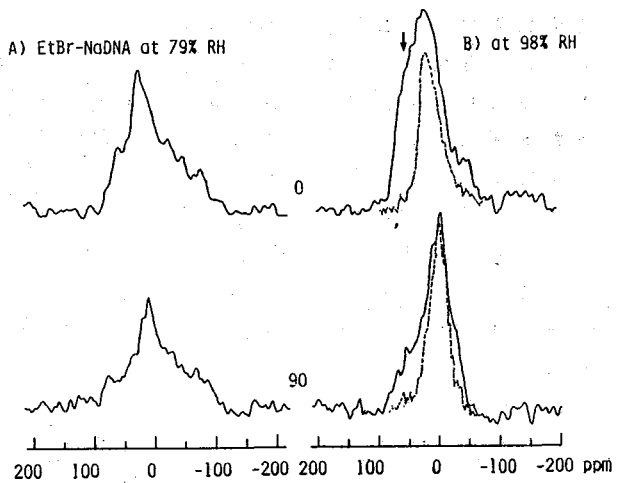


Fig. 3. ^{31}P NMR spectra of EtBr-DNA fibers at 79% and 92% RH.

なものになっている (図 3 B)。図で点線で示したスペクトルは 92% RH における B 型 DNA のスペクトルであるが、そのピーク位置は EtBr-DNA のそれと一致している。また、EtBr-DNA は低磁場側 (50ppm) にスペクトル成分を与える。この成分がインタカレーション部位の近傍のリン酸基に帰属出来るものと思われる。事実、Sobell らの 5-Iodocytidyl(3-5)Guanosine-EtBr 複合体の単結晶構造の原子座標³⁾に基づいて計算した化学シフトの平均値は実測値 (矢印、 ~ 50 ppm) とよい一致を示した。P/D = 12 のものを除き、P/D = 48、62 のものは RH による A-B 型転移が見られた。これらの結果は EtBr-DNA 複合体の DNA はインタカレート部位を除いてほぼ B 型構造を保持しており、その部位の構造はオリゴマーと DNA との間で同じであることが示唆される。

(b) Arginine の場合 Arginine は DNA の主溝と相互作用し、P/D = 1.2 以下では全ての RH において B 型構造をとることが X 線解析から示唆された⁴⁾。Arg-Na DNA の ^{31}P スペクトル (図 4 B) は、同じ条件下での Li DNA のそれに近いが、次の点でことなる、1) 交差分極法による測定はシングルパルス法より不利である、2) 緩和の異方性が見られない。図 4 から分かる通り、同一の条件下で同一の積算回数に対して交差分極法によるスペクトルの S/N はシングルパルス法によるものの約半分となっている。表 1 は交差分極法でその分極時間を変えて信号強度の変化から得られた交差緩和時間 T_{IS}

Cross Relaxation Time T_{IS} and $T_{1\rho}$ of Oriented DNA Fibers at 79% r.h.

	Parallel		Perpendicular	
	T_{IS} (ms)	$T_{1\rho}$ (ms)	T_{IS} (ms)	$T_{1\rho}$ (ms)
Li-DNA	0.36	9.8	0.52	6.4
Arg-NaDNA	0.8	2.1	0.8	2.1

とプロトン $T_{1\rho}$ の値を示す。Li DNA に比べ Arg-DNA では T_{1s} は長く、 $T_{1\rho}$ は短い。また、Li DNA に見られた緩和時間の異方性がみられない。これらの結果は Arg-DNA において DNA の運動は等方的であること、結合した Arg はリン酸基の運動を促進させる傾向がある事を示唆する。おそらくそれは DNA の主溝に作られた水和構造が Arginine の結合により破壊されることによってリン酸基の運動が活発になったものと予想される。

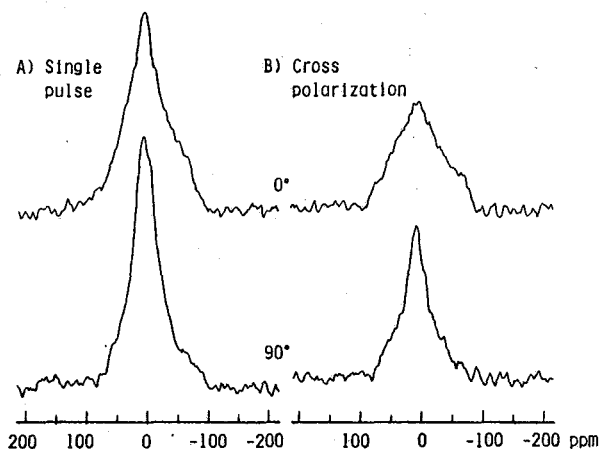


Fig. 4. Comparison of relative intensity of ^{31}P NMR spectra obtained for Arg-NaDNA by single pulse and cross polarization experiments.

References

- 1) H. Shindo et al., *Biochemistry*, 24, 887(1985).
- 2) T. Fujiwara and H. Shindo, *Biochemistry*, 24, 896(1985).
- 3) S. C. Jain et al., *J. Mol. Biol.*, 114, 317(1977).
- 4) I. Fita et al., *J. Mol. Biol.*, 167, 157(1983).

第 3 日

11 月 19 日 (木)

NMRによる病態解析 (VIII)
 —遅延型アレルギー反応薬の解析—

○山崎政城、石松隆志* (熊本大医・生化学、*北原署村彦)

Studies on Delayed Hypersensitivity Skin Sites by NMR

Masaki Yamasaki and Takashi Ishimatsu*

(Department of Biochemistry and Department of Urology*, Medical School Kumamoto University)

The mechanisms of delayed hypersensitivity reactions are the focus of much current interest in the field of cellular immunity. Some chemotactic factors for macrophages and alkaline proteases were already found in delayed hypersensitivity skin sites. The activity of these substances are very sensitive to changes in pH, however, the pH at target sites in inflamed tissue is still unclear. In the present study, we could clarify the pH and the relaxation times of delayed hypersensitivity skin sites in the guinea pig skin by using ^{31}P and ^1H nuclear magnetic resonance.

遅延型アレルギー反応薬について

免疫機構は体液性免疫と細胞性免疫の2つに大別される。体液性免疫は抗体である免疫グロブリンが単離・精製されていて、分子レベルでの解析が可能である。一方、細胞性免疫は体液性免疫における免疫グロブリンに相当する抗体様物質が物質としてとらえられていない現状があり、免疫応答の機構については不明な点が多い。われわれはここ数年、細胞性免疫のひとつである遅延型アレルギー反応薬の免疫応答の機構の解析にn.m.r.ガウのアプローチをこころめていた。

遅延型アレルギー反応薬ではマクロファージ・リンパ球などの単核球の浸潤が著しく、単核球に特異的に作用するマクロファージ遊走因子や、その産出にある数種のプロテアーゼが見いだされている。これらの活性物質の活性発現に炎症局所のpHが重要な意味をもち、本反応の免疫応答の機構を説明する過程で病薬の正確なpHを明らかにする必要性が生じた。

本研究では、遅延型の炎症として① BGG(牛血清グロブリン)感作・BGG惹起による遅延型アレルギー反応薬 ② BCG(結核菌)感作・PPD惹起による遅延型アレルギー反応薬、さらに急性の炎症として③ 熱傷による反応薬の①②③の系についてn.m.r.ガウのアプローチをこころめ、各病薬のpHを明らかにした。さらに炎症薬の木の緩和時間から病態の解析をこころめた。本研究データの一部は、すでに22回n.m.r.討論会で発表されたものを含んでいる。

BGGを抗原とする遅延型アレルギー反応薬について

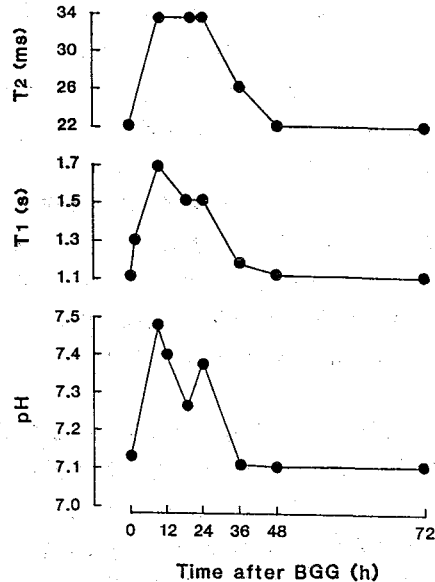
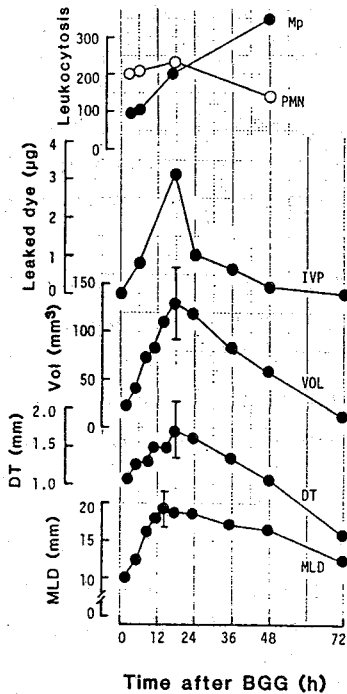
本炎症薬は抗原としてウシ血清グロブリン(BGG)を用い、感作にはBGGを完全 Freund's adjuvantとともにモルモット(300~350g, ♀)の両足蹠の皮下に接種した。感作1週後、背脊皮下にBGGを注射して惹起した。

炎症局所での毛細管透過性亢進とともに血液タンパクの滲出はIVP曲線(エ

パンスブルーを静注し、皮フに透過してくる色素量から炎症部位にくる血管タンパクを定量)から明らかにより、発起後18時間で滲出がピークをむぎえ、24時間後には回復が再びはじめている。また炎症巣の範囲(MLD)・炎症巣の厚さ(DT)・炎症巣の体積(VOL)も18時間後には炎症のピークをむぎえ、72時間後には修復がおこなわれている。

遅延型アレルギー皮フ炎症巣では単核細胞の浸潤が著しく、炎症巣の皮フ組織中の水の存在状態が大きく変化しているものと見られる。発起9時間後でT₂・T₁値がともにピークに達していることは、炎症発現とともに自由水と結合水との量的な変化、すなわち自由水の結合水に対する割合が増大していること、また炎症皮フ組織内では水の構造化の割合が相対的に減少していることを反映しているものと思われる。さらに36時間後、毛細管透過性が回復する時期に合わせて、炎症巣の水の運動性も正常値に近づいた。

遅延型炎症巣のpHは、発起後9時間でpH 7.48、炎症が最大に達するとされる24時間後pH 7.38と2峰性を示した。従来病理学の分野では“炎症巣のpHは乳酸の蓄積により酸性に傾く”とされてきた。しかしBGGを抗原とする遅延型炎症巣では“炎症局所のpHの酸性化”とはまったく逆の結果を得た。すでに本炎症巣よりアルカリ性プロテアーゼが精製されており、本炎症巣の局所のpHもアルカリ性側にがたがたしていることが明らかになった。さらに36時間後には、正常皮フ組織のpH値を示した。

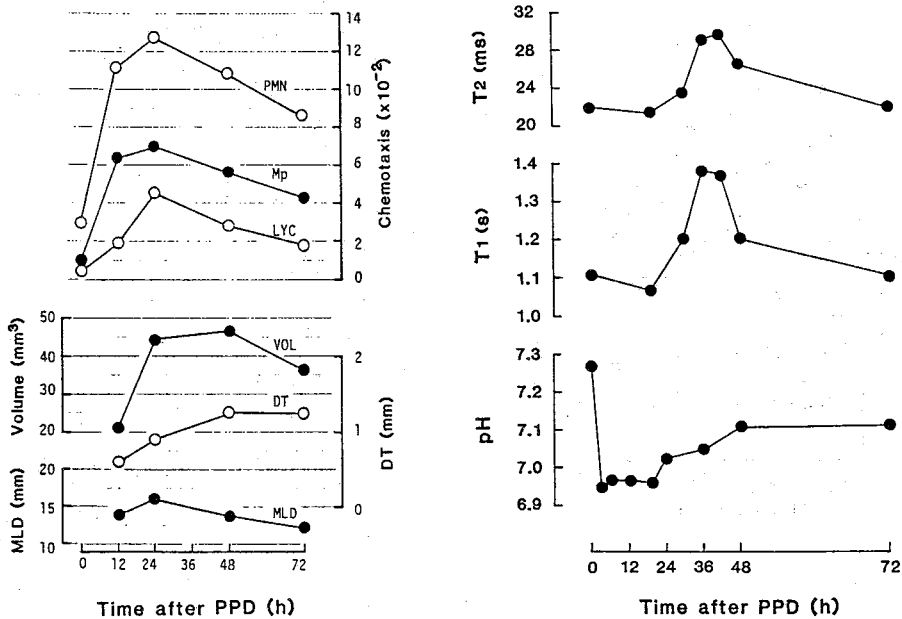


BCGを抗原とする炎症薬について

本炎症薬は、モルモットを青山B株(ヒト型結核菌・BCG)死菌乾燥粉末を抗原として感作し、5~6週後感作成立の確認を行った後背部皮内PPDを注射して惹起した炎症をおこした遅延型アレルギー反応で、いわゆるマブクリン型アレルギー反応といわれているものである。

惹起後12~24時間の炎症薬では、マクロファージ(Mp)や白血球(Lyc)などの単核球および多形核白血球(PMN)などの多核球の増大が認められた。炎症薬の木の緩和時間は、炎症が最高に達する24時間後まではすこし減少し、炎症が回復に向かり30~48時間後に自由木の割合が増大し、72時間後には正常の皮肉組織の状態にもどることが明らかになった。

マブクリン反応薬のpHは、惹起直後の炎症部位ではpH7.27と正常皮肉組織のpHよりも高い値を示したが、惹起後3~24時間の炎症薬では酸性側にがり、30時間以降に正常の皮肉のpHに近づいた。炎症が最大に達するとさき24時間後の皮肉病巣部からの抽出液には単核球に対する遊走活性因子が見いだされ、さうにその産出にあたる酸性プロテアーゼの存在が明らかにされている。BCGを抗原とした遅延型炎症薬の病変局所ではアルカリ性側にがりたpH値を示し、一方BCGを抗原とした遅延型炎症薬では酸性側にがりたpH値を示した。これらの結果、遅延型アレルギー病変局所のpHは炎症の種類により炎症局所のpHが異なることが明らかになった。



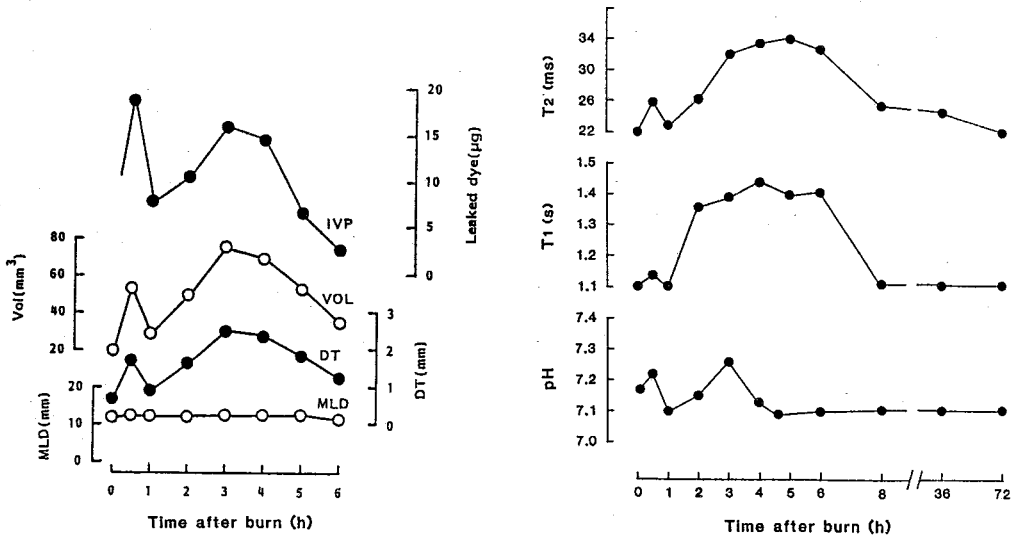
熱傷による炎症薬について

こゝまでの遅延型の炎症と対比する意味が、急性の炎症の薬として熱傷に

よる炎症薬をとりあげた。モルモット背却皮フを脱毛したのち剃り、熱(57°C・20s)により炎症をおこした。この程度の熱傷による炎症薬では、皮フの紅斑・皮内血管の拡張が認められるが、熱による細胞障害や氷泥の形成は認められなかった。この熱傷においても(ヒトの熱傷の分類にあてはめるとⅠ度とⅡ度の中頃ぐらいの熱傷)、熱傷部局所に毛細血管の透過性の亢進がみられ、血漿タンパクの血管外への逸脱が認められた。炎症薬での毛細血管透過性亢進とともに血漿タンパクの滲出はIVP曲線がより明らかに、受傷直後の30分後におこり、さらに遅期の滲出として3時間後の2相が区別されて観察され、さらに6時間後には回復がおこりはじめていることが認められた。炎症薬(MLD)の範囲は一定にもやわらぐ、炎症薬の厚さ(DT)および体積(VOL)もIVP曲線と同様の2相性を示した。

熱傷による炎症薬の水の緩和時間は、受傷直後および3時間後炎症局所の自由水の増加により増大し、8時間後毛細血管の透過性が回復する時期にあわせて炎症薬の水の動きも正常皮フ組織に近づくことが明らかになった。

熱傷による炎症薬のpHは、受傷30分後アルカリ性側へがたより、1時間後には正常皮フ組織のpHを示すが、3時間後pH7.25と再びアルカリ性側へがたよった。受傷6時間後、毛細血管透過性が回復する時期にあわせて炎症薬のpHも正常値に近づいた。これらの結果、熱傷による炎症薬では炎症局所のpHがアルカリ性側へがたよっていることが明らかになった。



(農業環境技研) ○吉田 充・能勢和夫

Physiological Change and Change of Relaxation Times of Water Proton in Mycelial Cells by Fungicide Treatment

Mitsuru Yoshida and Kazuo Nose

(National Institute of Agro-Environmental Sciences)

T_1 and T_2 of water proton in the mycelial cells of *Botrytis cinerea* were estimated using non-linear least squares by simplex. Two kinds of water with different relaxation times were detected and their relaxation times were shortened by fungicide treatments. The reasons for the shortening of the relaxation times were considered, by checking the amounts of water, sugar, protein and paramagnetic metals in the cells. Change of the membrane water permeability was also checked by Mn doping method.

生体内の水のプロトンの緩和時間を利用した病態解析が医学の分野で進められている。そこで演者らは、この生体の水の緩和時間を農業の場面で利用することを考え、農薬の作用研究への応用を試みた。その手はじめに、園芸作物の重要病原菌である灰色かび病菌の菌糸細胞の水の T_1 と T_2 を測定し、各種農業用殺菌剤処理によるそれらの変化をみた。その結果、殺菌剤処理により T_1, T_2 が短くなることが明らかとなり、ここではさらにこの水の緩和時間短縮の原因について考察してみる。

(1) 殺菌剤処理による菌糸の水の緩和時間変化

ジャがいも煎汁培地で培養した灰色かび病菌菌糸をろ過によって集めた後、ペーパータオルにはさんで菌糸の外側についている水を除き、10mmφ試料管に詰めてJNM FX-90Q装置で緩和時間の測定を行った。 T_1 についてはinversion-recovery法で、 T_2 についてはC.P.M.G.法で測定したところ、緩和時間は1種類ではなく、存在状態の異なる複数種の水の存在が示された。そこで、simplexを用いた非線形最小自乗法によるプログラム^{1,2)}を用いて緩和曲線の解析を行い、菌糸中の水の各成分の存在率と T_1, T_2 を推定した。次に培地中に殺菌剤を添加した場合の菌糸の水の T_1, T_2 の変化を調べた。その結果をFig. 1に示す。このグラフの横軸は、水の各成分の緩和時間を表し、縦軸はその各々の成分がNMRで検出される菌糸の水全体の中で占める割合を%で示したものである。

菌糸の水は2つの成分からなると考えられ、無処理の菌糸では T_1 が約400msec、 T_2 が約60msecの水が大部分を占め、その他に緩和の速い成分が僅かに検出された。殺菌剤処理を行うと、水の主成分の T_1 が100~250msec、 T_2 が約15~20msec短くなり、ベノミル0.2ppm処理の場合のように T_1 の短い成分の割合の増加が認められる場合も

あった。なお、ベノミルやEDDP処理では菌糸の生育阻害が認められ始める処理濃度から緩和時間の短縮が認められるが、プロシミドンの場合は生育阻害開始濃度1ppmでは変化はなく、2ppmにして初めて緩和時間の短縮が認められた。

この殺菌剤処理による菌糸の水の緩和時間の短縮の原因が何であるのか、また殺菌剤の作用機構とどういう関係があるのかについて考察を行った。

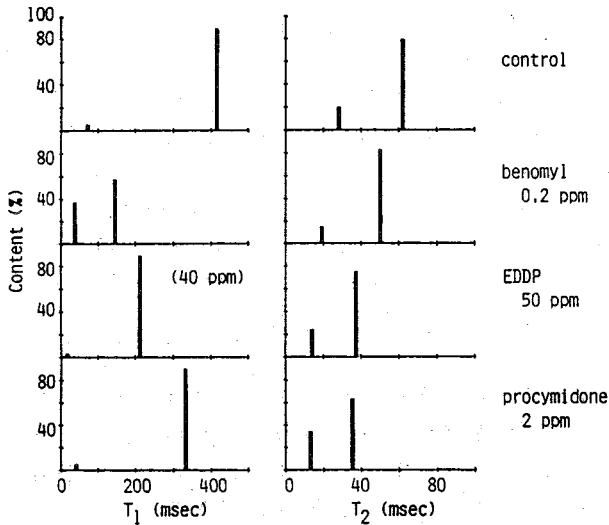


Fig. 1 Change of relaxation times of mycelial water proton by fungicide treatment.

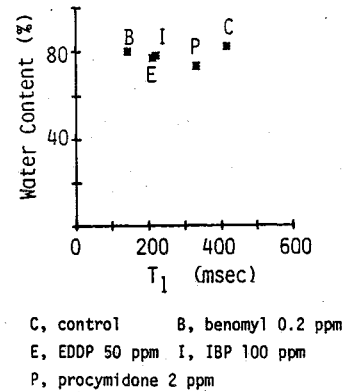


Fig. 2 Change of water content of mycelia by fungicide treatment.

(2) 殺菌剤処理による緩和時間短縮の原因の考察

① 含水率の変化

まず緩和時間短縮の原因として、細胞の水分の減少を考えた。Bakkerらは、マウスの摘出組織の水の T_1 は含水率に比例すると報告している³⁾。菌糸を 105°C で30時間乾燥させたときの重量の減り方から含水率を求め、殺菌剤処理による水の主成分の T_1 の変化と含水率の関係を調べてみた(Fig. 2)。殺菌剤処理により含水率はやや低下するもののその変化は10%以内にとどまり、かつ水の主成分の T_1 との相関はみられず、細胞水分の減少を殺菌剤処理による水の緩和時間短縮の主な原因と見なすことはできなかった。

② 糖、タンパク質の蓄積

次に水の緩和時間短縮の原因として、糖やタンパク質の原形質中への蓄積による原形質の粘度の上昇を予想した。糖やタンパク質が多量に水に溶けた状態で存在すれば、菌糸の ^{13}C NMRスペクトル中にそれらのシグナルが現れると考えられる。そこで、殺菌剤処理菌糸の ^{13}C NMRスペクトルを無処理の菌糸のものと比較してみた(Fig. 3)。すべてのスペクトル中にトレハロース(t)、マンニール(m)及びトリグリ

セライド (tg) のシグナルが見いだされ、一方、タンパク質のシグナルは認められなかった。このように、殺菌剤処理によるスペクトルの質的变化はなく、また各シグナルの強度も外部標準の酢酸のシグナル (a) と比較して増減はなく、殺菌剤処理による糖やタンパク質の原形質内への蓄積は考えられなかった。

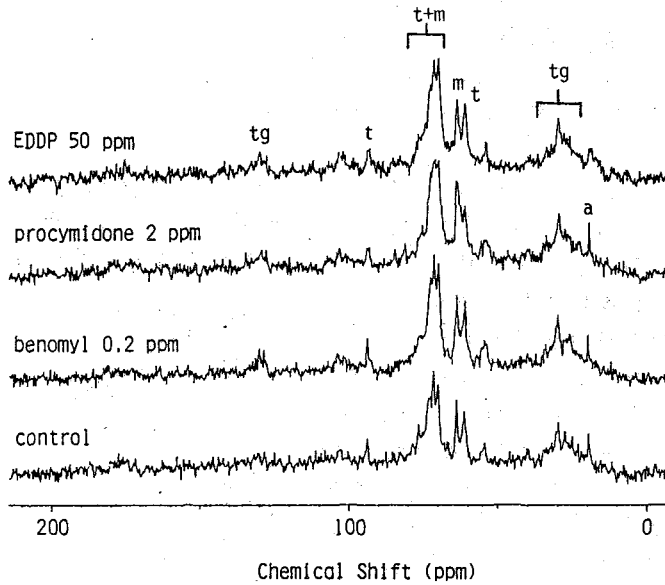
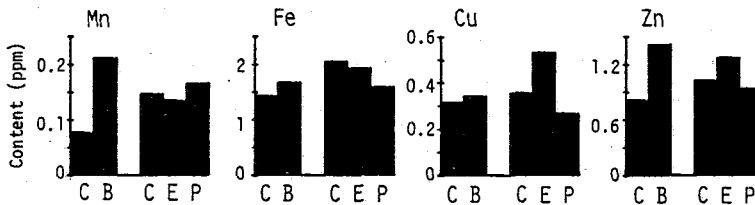


Fig. 3 ^{13}C NMR spectra of mycelia of Botrytis cinerea.

③ 常磁性金属の蓄積

そこで、膜や細胞壁及びそれらに結合しているタンパク質の殺菌剤処理による破壊に伴う常磁性金属の原形質への溶出を考えた。菌糸を80%エタノールで処理し、抽出されてくる常磁性金属の量を原子吸光法により定量した (Fig. 4)。殺菌剤処理による可溶性常磁性金属の量変化は菌糸の fresh weight あたり 1ppm 以下で、到底 200 msec の T_1 変化を説明することはできなかった。



C, control; B, benomyl 0.2 ppm; E, EDDP 50 ppm; P, procymidone 2 ppm

Fig. 4 Soluble paramagnetic metals in the mycelia of Botrytis cinerea.

④膜の水透過性の変化

Conlonら及びStoutらは、膜の水透過性が原形質内の水の見かけの緩和時間に影響することを指摘し、膜を通じた原形質内外の水の交換速度(τ_0)と原形質内の水の見かけの $T_2(T'_{2a})$ との間に次式が成り立つとしている^{4,5)}。なお、 T_2 は原形質内の水の真の(水の交換がない場合の) T_2 、 T_{2b} は原形質外の水の T_2 、 P_a と P_b は各々原形質内、外の水の存在率を表している。

$$1/T'_{2a} = 1/T_2 + 1/\tau_0 - (P_a T_{2b}) / (P_b \tau_0^2)$$

Stoutらは細胞をマンガン水溶液の中に置き、マンガンの濃度を変化させることにより T_{2b} を変化させ、それに伴う T'_{2a} の変化から τ_0 を求めている⁵⁾。また、細胞を凍結したり薬剤処理したりして膜にダメージを与え、膜の水透過性を高めると T'_{2a} が短くなるということも報告されている^{6,7)}。

このことが灰色かび病菌菌糸細胞についても言えるかどうかを確認するべく、演者らは菌糸を25mM $MnCl_2$ 水溶液中に漬け、 $T_{2b}=0.5\text{msec}$ とした時の T'_{2a} を測定し、さらに $MnCl_2$ 水溶液に殺菌剤を添加したときの T'_{2a} の変化を求め、殺菌剤の膜の水透過性に及ぼす影響を調べてみた(Fig. 5)。なお、原形質中に入りにくいと言われるマンガンを経細胞の外側の水に添加することは、 T_2 に影響をあたえずに T'_{2a} を短くするが、それにも増して T_{2b} を極めて短くするので、原形質内の水の測定を容易にする。

ホスファチジルコリン生合成阻害剤であるEDDPは菌糸細胞の T'_{2a} を短縮したが、細胞分裂阻害剤ベノミルや作用機構未知の殺菌剤プロシミドン処理の場合は T'_{2a} の短縮は認められなかった。このことから、Fig. 1の殺菌剤処理による菌糸の水の T_1 、 T_2 の短縮は膜の水透過性の増加のみでは説明できないと思われる。さらに検討を要する問題である。

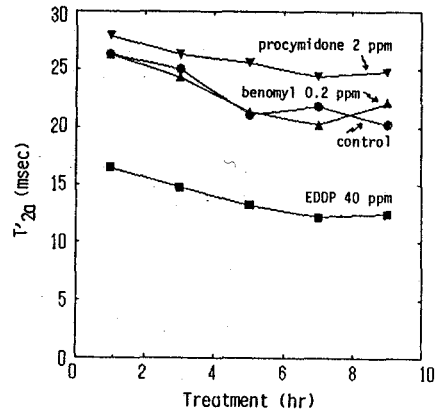


Fig. 5 T'_{2a} change of Mn doped mycelia by fungicide treatment.

- 1) 小林和彦、農林水産研究計算センター報告、A17, 51 (1981)。
- 2) M. Yoshida and K. Nose, Agric. Biol. Chem., 51 (1987) in press.
- 3) C. J. G. Bakker and J. Vriend, Phys. Med. Biol., 28, 331 (1983)。
- 4) T. Conlon and R. Outhred, Biochim. Biophys. Acta, 228, 354 (1972)。
- 5) D. G. Stout et al., Plant Physiol., 62, 636 (1978)。
- 6) P. M. Chen et al., Plant Physiol., 61, 878 (1978)。
- 7) G. Benga et al., Biosci. Rep., 5, 223 (1985)。

差分NMR法による左右大脳半球機能差. 一次視覚野の時間
応答

(電子技術総合研究所) 亀井裕孟, 片山義朗, 横山浩

Time-Resolved Measurement of the Functional Defference of Cerebral Hemispheres by "Differential NMR"

Hirotake Kamei, Yoshiro Katayama, and Hiroshi Yokoyama

(Electrotechnical Laboratory)

A non-invasive method to detect the difference in functions of cerebral hemispheres is described. We applied the technique to normal volunteers and observed the evoked proton NMR signals from visuo-sensory areas.

精神作業を行ったり外的刺激を受容することによって、大脳は活動し、活動部位の局所血流量が増大する。大脳のプロトンNMR信号を観測すれば、この血流増大に伴う信号強度変化が観測される筈である。しかし、このときのプロトンNMR信号強度の変化は大脳全体から得られるプロトンNMR信号強度の僅か0.1-10ppm程度と見積られ、通常のA/D変換器を使用しているMRI (magnetic resonance imaging) 装置では、この微弱な変化は1ビット内に隠れてしまうため観測することができない。もし、この変化が観測されれば、プロトンNMR信号の観測から大脳の活動部位および活動度を知ることができ、NMRの新しい応用分野が拓かれるものと期待される。

演者は微弱なNMR信号の変化を観測することのできる新手法として"差分NMR法"を開発し、精神作業、聴覚および味覚の受容による大脳活動に伴うプロトンNMR信号を観測し、左右大脳半球機能差に関する知見を得ている[1]。ここでは視覚情報受容による一次視覚野からのプロトンNMR信号の時間変化を観測したので、その結果について報告する。

[実験]

差分NMR法の原理: 大脳は機能的にも構造的にも左右対称ではないが、プロトンNMR信号を観測すると極大雑把には左右対称の信号が得られる。そこで、2個の表面コイルを正中面に対して対称的な頭表面上の位置に設置し、それらに誘導される信号の差信号を平衡検出回路を通して観測する(図1)。アナログ信号時に差信号をとるので微小な信号変化を有効に取り出すことができる。平衡検出回路で強制的に平衡をとるが、完全に平衡をとることは不可能であり、非平衡分の信号が出力に現れる。そこで、まず、安静時の信号を観測し、それをコンピュータの記憶装置に蓄えておく。ついで、脳を活動させた時の信号を記憶させ、両者の差をとることによって、活動時のNMR信号のみを得ることができる(図2)。正中面に対して対称的な磁場勾配を加えることによって、得られる信号の周波数から大脳の活動

部位の正中面から垂直方向の位置に関する情報を得ることができる(図3)。これと頭部表面上に設置した表面コイルの位置から、大脳活動部位の位置を三次元的に求めることができる。

測定: 使用した装置は研究室で試作した全身用MRI装置で、磁束密度0.019T, ポア径1mの常伝導磁石を使用し、観測周波数800kHzである。高周波パルスは $9^\circ - 45^\circ$ パルスを使用し、これに伴うFID信号を観測した。パルス繰り返し時間は25-100ms, 信号積算回数は64-128回である。パルス繰り返し時間25ms, 積算回数64回するときデータ取り込み時間は1.6sであるが、データ転送格納時間として0.6s必要なので、測定の繰り返し時間, すなわち, 測定の時間分解能は2.2sである。被験者は全て健康人である。被験者の前方にスクリーンを置き, そこに鏡を介してプロジェクタからの映像を投影する。被験者はスクリーン中央部を眺め, 眼球を動かさない状態にして右あるいは左視野に投影される映像を眺める。2個の検出用表面コイルは後頭部に, 正中面に対して対称的な位置になるように設置する(図4)。

【結果】

照度と信号強度: 左あるいは右視野のスクリーン上にスポット光を照射し, その照度を変化させたときの一次視覚野と思われる部位からのNMR信号を観測した。結果を図5に示す。照度とNMR信号強度との間にはWeber-Fechner則が成り立っているとみることができる。このことからNMR信号強度は大脳活動の度合を反映しているとみることができよう。照度の増大および減少を繰り返しても, 網膜からの出力のようなヒステリシスが観測

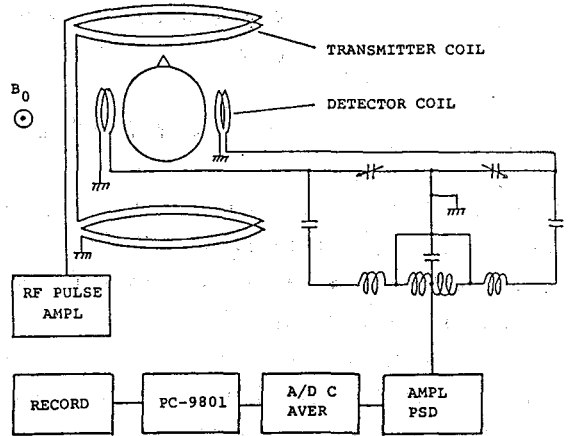


図1. 差分NMR装置ブロック図。

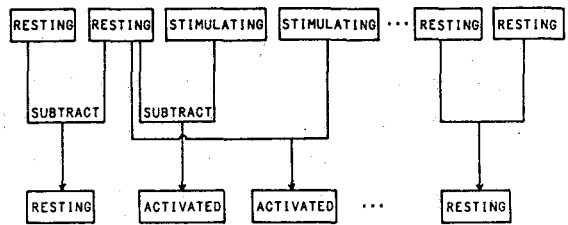


図2. データ収集法。

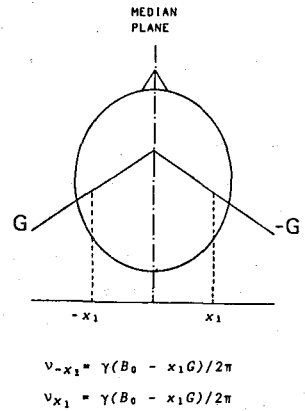


図3. 位置情報の求め方。

されない。このことは一次視覚野の活動はトランスデューサからの出力が何れかの段階で相対尺度に置き換えられた形で起こっていることを示している。

視覚野からの信号の時間応答：左あるいは右視野のスクリーン上に画像を投影したときの一次視覚野からと思われる信号の時間変化を測定した。左および右視野にそれぞれ画像を投影し続けたときのFTスペクトルの例を図6に示す。これらは投影開始後、11.0-12.6sに得られた信号である。左視野に画像を投影した場合には右半球からの信号が観測され、右視野の場合には左半球からの信号が観測された。この結果は、従来、種々の手法によって測定された結果と一致する。

信号強度の時間応答の例を図7に示す。右視野に画像を投影したときの結果である。信号強度は投影開始後、0-1.6sで最大値を示し、時間の経過と共に減少していき、25s近傍で信号は観測されなくなる。同一被験者について左視野に画像を投影した場合、および他の被験者についての測定でもほぼ同様の結果が得られた。このことは同一画像を眺め続けた場合、活動が持続しないことを示しているのか、あるいは、眼球運動によって目的としている半球とは逆の半球も活動したためかも知れない。眼球運動の有無を他の手法によって確認することによって、何れの原因によるものかを判定することができる。

差分NMR法の脳機能計測への応用として、大脳の活動に関する情報を時分割で得ることを試みた。時間分解能は決して十分とはいえないが、画像を眺めたときの一次視覚野からのNMR信号の時間分解計測を行うことができた。今後の技術的課題として高時間分解能

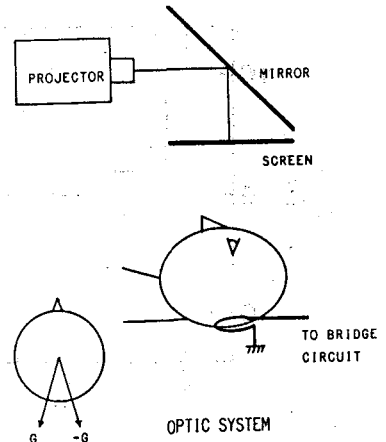


図4. 視覚系の測定。

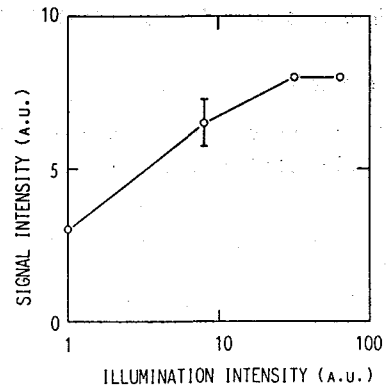


図5. 照度と誘発信号強度。

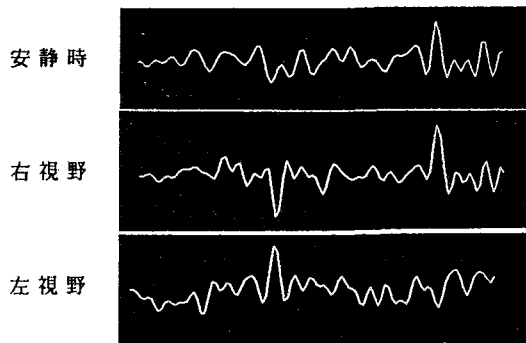


図6. 一次視覚野からの誘発信号。

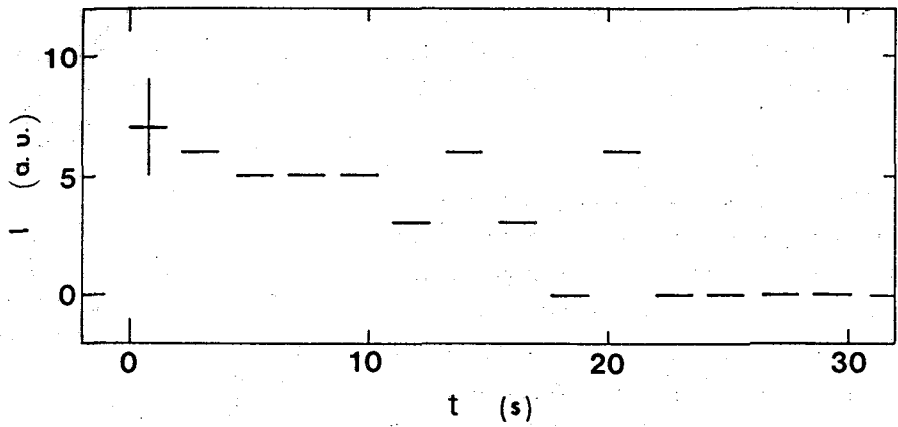


図7. 一次視覚野からの誘発信号の時間変化.

化があるが、それは信号の S/N を改善することによって達成することができる。

[文献]

1. H. Kamei, Y. Katayama, and H. Yokoyama: Proc. 4th World Cong. Micro-circulation, in press.

In situ ラット心の ^{31}P -NMR

(京都府立医大・武田薬品中研*) ○西川弘恭・嶋本典夫*
新谷元章*・沈行良・吉崎和男

 ^{31}P -NMR in situ Study on Rat Heart

Hiroyasu Nishikawa, Norio Shimamoto*, Motoaki Shintani*, Shen Xingliang and Kazuo Yoshizaki
(Kyoto Prefectural University of Medicine and *Central Research Division, Takeda Chemical Industries, LTD)

Recent development of NMR made it possible to study on in situ metabolism of tissues. Besides NMR, we need many methods of physiological measurement to analyze the role of the metabolism. A homemade NMR probe was made to measure ^{31}P -NMR spectrum, ECG, blood pressure and rectum temperature at the same time. It was made clear by ^{31}P -NMR spectra observed with the probe that the energy metabolism of rat heart were affected by blood pressure, heart rate and body temperature. The probe was applied further to rat heart partially ligated coronary artery to obtain its pH and ^{31}P -NMR spectrum.

はじめに

心筋のエネルギー代謝研究への ^{31}P -NMRの応用は従来よりランゲンドルフの還流心を用いた報告がある。近年高磁場で口径の大きい横置き型または縦置き型超伝導磁石のNMR装置への導入により、ヒトや実験動物の心筋エネルギー代謝の In situ (生体組織が形態的および機能的に元来生体内に存在する状態) での ^{31}P -NMR研究が可能となってきた。in situ ^{31}P -NMR研究では測定中対象の状態をより正確に捉えるため ^{31}P -NMR以外に同時に種々の生理学的計測を行なう必要がある。本報告ではラット心臓を in situ測定するため自作した縦置き型広口径超伝導磁石用の多項目同時測定用プローブを用いてNMR測

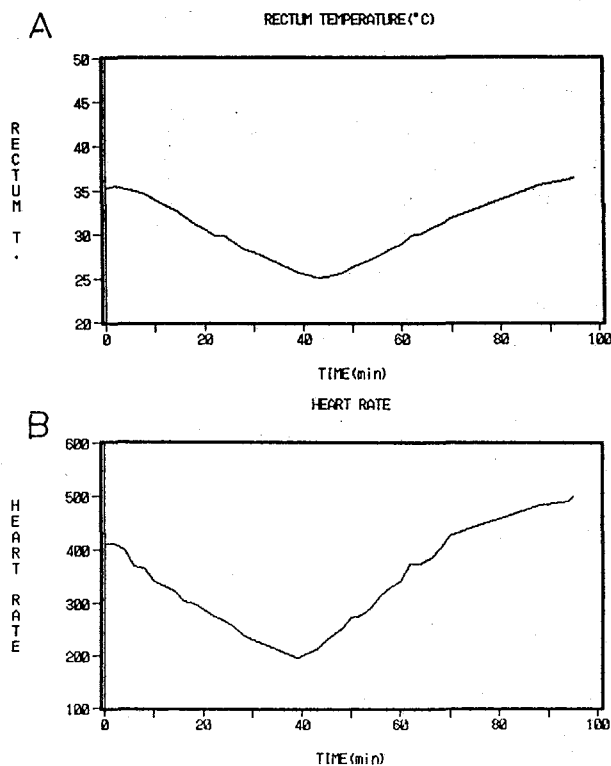


図1 直腸温と心拍数 A: 冷水と温水還流による直腸温の変化、B: 直腸温の変化に伴う心拍数の変化。

定時のラットの状態（体温、心拍数、血圧、 ^{31}P -NMRスペクトル）を明らかにし、かつ心筋の栄養血管である冠状動脈結紮の心筋エネルギー代謝への影響を *in situ* ^{31}P -NMRスペクトルで得られるリン含有エネルギー代謝関連物質の消長と Pi から求められる心筋内 pH より検討する。

試料と方法

実験動物としてラット (Wistar rat、体重 250~300 g) を用いた。ラットはベントバルビタール (腹腔内投与、50 mg/kg) で麻酔後、気管切開し気管カニユーレを人工呼吸器 (Model 141, Princeton Medical Instruments, INC., U.S.A.) に接続した。呼吸は 70回/min、1 回換気量 4~5 ml で維持された。用いた混合ガスは 3%CO₂ - 97%O₂ であった。気道確保後、血圧測定用動脈カニユーレを大腿動脈に挿着し、胸部正中切開にて心臓を露出し、心外膜の一部を剥離してラットを自家製アクリル製プロープに置いた。さらにプロープに置かれたラットに心電計用熱電対を挿着した。RFパルス送・受信用ループコイルは

プロープを垂直に立てた状態で心臓と丁度良い位置にあるように挿着された。自家製プロープはアクリル樹脂円筒 (外径 70 mm) で作られた。RFパルス送・受信用ループコイルの位置は試料の位置に合わせて x, y, z 方

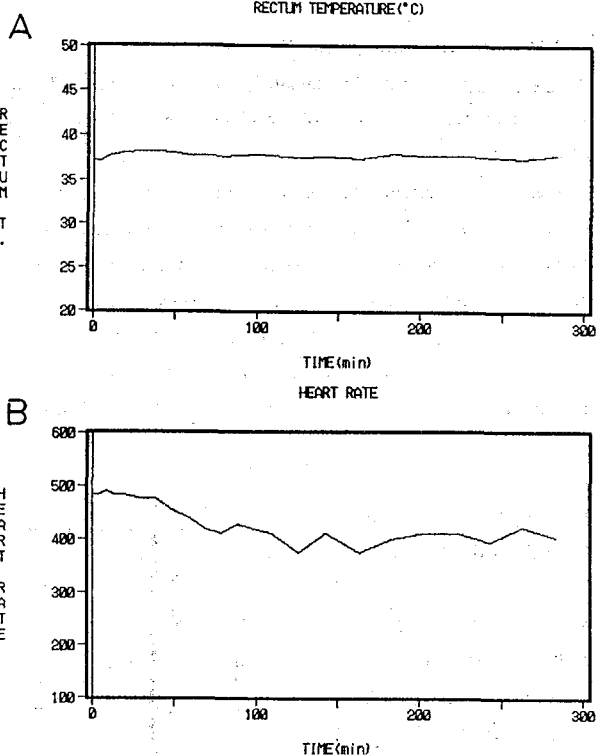


図2 直腸温を一定に維持した時 (A) の心拍数 (B)

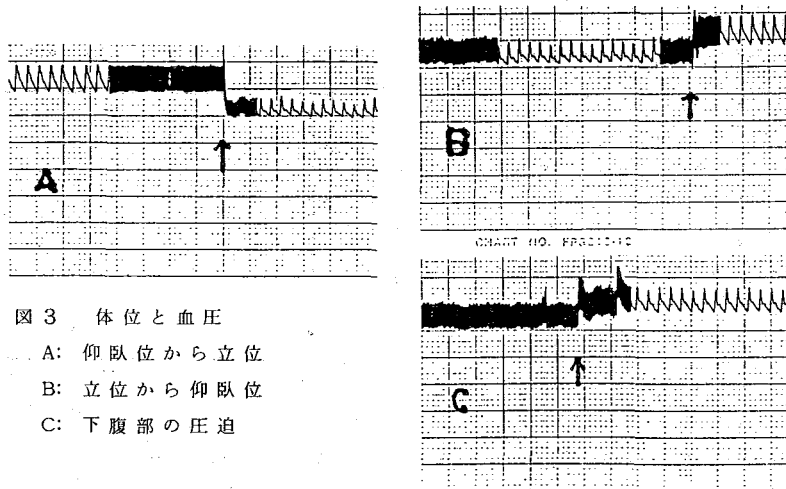


図3 体位と血圧

- A: 仰臥位から立位
- B: 立位から仰臥位
- C: 下腹部の圧迫

向で微調整出来るよう工夫された。またプローブを磁石に挿着後ループコイルの整合・同調を取れるようにした。本プローブは表1に示した機能を持つよう各種センサーと実験動物維持装置を備えている。

血圧測定にポリグラフシステム (RM-6000, 日本光電)、血圧測定ユニット (AP-601G, AP-611G, 日本光電) と圧トランスデューサー (TP-200P, 日本光電) を使用した。血圧はカニューレを大腿動脈から圧トランスデューサーまで延長して測定した。カニューレの詰まりと波形のなまりを防ぐよう工夫した。

心電図は上記ポリグラフシステムと心電図用アンプ (AC-601G, 日本光電) で測定した。電極は双極標準肢誘導と単極肢誘導が可能なようにラット四肢に付けられた。

体温は直腸温で得た。温度センサーは熱電対 (1T-18, Baily Instruments, U.S.A.) を用い、肛門より5cmの位置で測定した。

実験動物の体温制御はプローブに敷いた自家製の水循環マットの水温を直腸温をモニターしながら調節して行なった。

用いたNMR装置は広口径超伝導磁石NMR (SCM-200, 日本光電) で、磁場は4.8Tであった。測定条件を表2に示した。

結果と考察

磁気の心電図と血圧への影響

4.8Tの磁場外と内で心電図と血圧に変化は見られなかった。

体温と心拍数

麻酔下のラットでは体温調節中枢が働かないため体温は室温に近づく。図1-Aに体温制御用マットによる体温変化、図1-Bに同時測定した心電図から得た心拍数を示した。図2-A, Bに同マットにより体温を $37.7 \pm 0.3^\circ\text{C}$ に保持した時の心拍数 (433.3 ± 36.8) を示した。生体のエネルギー代謝は心筋をはじめ全ての臓器において血液循環状態と密接に関係しており、上記事実はその ^{31}P -NMRによる研究における体温制御の重要性を示唆している。

体位と血圧

図3-A, Bに麻酔下のラットの体位を仰

表1 自家製プローブに備えた機能

ループコイル	$^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ NMRスベクトル
心電計電極	心電図
熱電対	直腸温
血管カニューレ	血圧

気管カニューレ	人工呼吸
体温制御用マット	体温制御

表2 ^{31}P -NMR測定条件

OBP	80.75MHz
Spectral Width	7507.5Hz
Points	2048
Scans	200
Pulse Width	14.0 μsec
Repetition Time	1.9sec

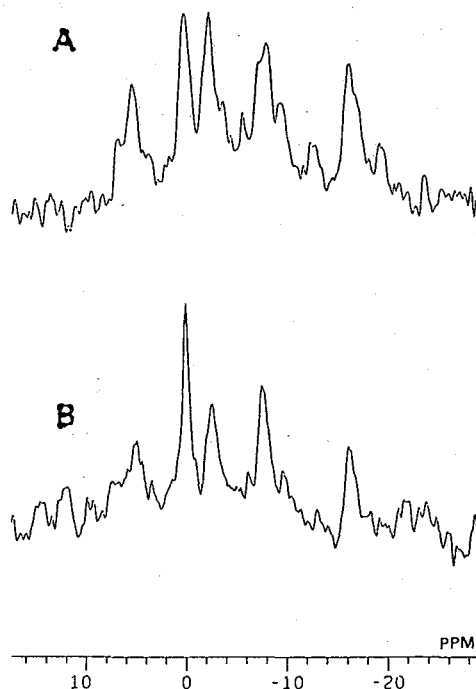


図4 心拍数と in situラット心 ^{31}P -NMRスペクトル、A: 心拍数417、B: 心拍数326。

臥位から立位および立位から仰臥位に変換させた時の血圧変化を示した。前者では最高血圧は113 mmHgから73 mmHgに、最低血圧は77 mmHgから48 mmHgに、後者では最高血圧は86 mmHgから115 mmHgに、最低血圧は52 mmHgから74 mmHgに変換した。一方立位で下腹部を圧迫すると図3-Cに見られるように血圧が上昇した。この事実は立位での血圧低下とそれに対する補正の可能性を示している。

心拍数と³¹P-NMRスペクトル

図4-A, Bに同一ラットで体温低下により心拍数が417から326に減少した時の³¹P-NMRスペクトルを示した。(0 ppmのphosphocreatine (PCr) 共鳴線) / (高磁場側のATP共鳴線)の比が心拍数の少ないBの方が大きく、かつ低磁場側のPiは心拍数の少ないBの方が小さい。これら事実は心拍数の少ないBの方がエネルギーの貯蔵量が多い事を示している。すなわち生理的な心拍数を示す心臓はエネルギー貯蔵状態はむしろ悪い条件にある。

冠状動脈結紮とスペクトルおよびpH

左冠状動脈前下行枝起始部でターニケットにより結紮し、30分後結紮糸を緩め血流量を最開通させた。結紮後から³¹P-NMRスペクトルを測定した。図5にスペクトルから求めたPi/PCr比を結紮前・中・後について経時的に示した。図6に図5で用いたスペクトルのPiの化学シフト値から求めたpHを経時的に示した。Pi/PCr比は再開通後10分ではほぼ結紮前値に回復しているが、pH値は30分を回復に要している。このpHは結紮時の虚血による嫌氣的解糖系での乳酸の増加とその血流最開通による除去を反映しており、Pi/PCrの動きと時間的なズレが見られる。

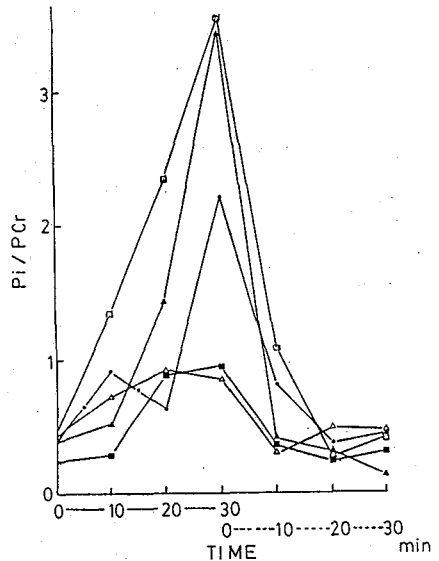


図5 冠状動脈結紮前・中・後でのPi/PCr比。結紮時間30分

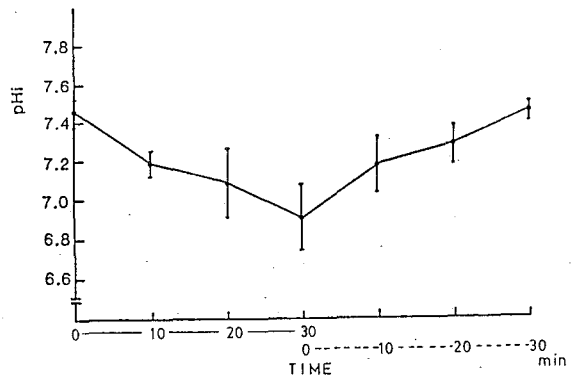


図6 図5と同一スペクトルのPi化学シフト値より求めたpH。

³¹P-NMRによる軟体動物平滑筋の
catch収縮機構の検討

(国立公害研, 東大理*) ○三森文行, 石井直方*, 高橋景一*

³¹P-NMR Study on Catch Contraction of Molluscan Smooth Muscle

Fumiyuki Mitsumori, Naokata Ishii* and Keiichi Takahashi*

(National Institute for Environmental Studies and Tokyo University*)

Some molluscan smooth muscles display a catch contraction which is characterized by the sustained tension after the stimulus is turned off. The mechanism of the catch contraction is not known so far. We have examined the intracellular pH and the concentrations of phosphorus metabolites in the live muscle from the mussel (*Mytilus edulis*) during catch contraction as well as other stages by ³¹P-NMR spectroscopy. On the basis of above results the mechanism of the catch contraction is discussed.

【はじめに】

二枚貝の閉殻筋や、足糸を駆動する筋肉 (byssus retracor muscle) は平滑筋に属し、catch収縮と呼ばれる特異な筋収縮を行なう (1)。これらの筋肉は短かい電気パルスによる繰り返し刺激を受けたときには、骨格筋と同様の収縮-弛緩を示す。しかし、アセチルコリンや、10秒間以上継続する直流電気パルスによる刺激を受けた場合には、刺激が終了した後も一時間以上にわたって張力を保持し続け、この間極めてゆっくりした弛緩しか示さない。この、刺激が終了した後の持続的な収縮状態をcatch収縮と呼び、刺激が継続中の活動的な収縮と区別する。catch収縮の間は、活動的な収縮時に比べて酸素消費量が少ないことなどから、エネルギー消費が小さいと考えられているが、その収縮機構はまだ明らかにされていない。最近、石井らはサボニンを用いて細胞膜に穴をあけた筋細胞 (skinned cell) において、catch収縮時の弛緩速度が外液のpHに依存していることをみいだした (2)。本研究においては、ムラサキガイ (*Mytilus edulis*) のintactなanterior byssus retracor muscle (ABRM) に、灌流法を用いて、NMR試料管内で静止→収縮→catch収縮→弛緩を行なわせ、各ステージにおける細胞内pH、高エネルギーリン酸化合物の変動を³¹P-NMRにより追跡し、この特異なcatch収縮の機構について検討を行なった。

【実験】

新鮮なムラサキガイより取りだしたABRM筋 16~20本 (湿重量~0.8g) を外径4mmのガラス管の外側に保定し、10mmφのNMR試料管内で、人工海水 (434 mM NaCl, 9.8 mM KCl, 52 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 5 mM Hepes, pH 7.5) を8ml/minの流速で灌流させた。人工海水のリザーバーは15°Cの恒温水槽中に保持し、95% O₂, 5% CO₂の混合ガスをバブルし、筋を好気条件に保った。NMR試料管内での収縮、弛緩は、ABRM筋本来の神経伝達物質を灌流液に加えることにより行なった。すなわち、10⁻³M acetylcholine (ACh)により収縮、人工海水の再灌流によりcatch収縮、10⁻⁴M 5-hydroxytryptamine (5-HT)により弛緩をひきおこ

した。この方法により収縮-弛緩サイクルが達成されていることは、磁石の外で同様のpreparationにstrain gaugeを接続し、張力測定を行なうことにより確認した。図1に、この張力応答と、灌流液の切り換え、およびこれと同期したNMR測定のタイミングを示す。NMR測定は日本電子GX-400分光計を用い、 ^{31}P を161.8 MHzで測定した。フリップ角 30° 、パルス繰り返し時間1秒で各ステージ300回の積算を行なった。化学シフト値の測定にはキャピラリーに封入したMDPピークを基準として用いた。筋細胞内pHは細胞内のPiとアルギニンリン酸(Arg-P)の化学シフト差より、標準溶液(5 mM Pi, 5.5 mM Arg-P, 150 mM KCl)で作製したpH滴定曲線を用いて推定した。各メタボライト濃度は共鳴線の面積強度を、飽和がない状態に外挿して求めた。すべての測定は 15°C において行なった。

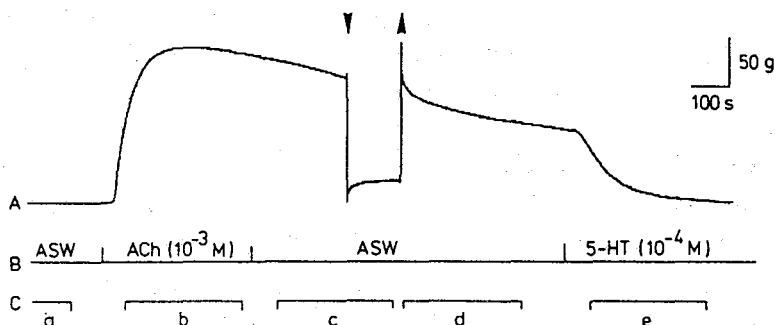


図1. 灌流液の切り換え (B) に伴うABRM筋の張力応答 (A)、およびNMRデータ取得のタイミング a: 静止、b: ACh収縮、c, d: catch収縮、e: 弛緩

【 結 果 】

ムラサキイガイのABRM筋の ^{31}P -NMRスペクトルには糖リン酸、Pi、ATPの他に高等動物のクレアチンリン酸に対応する高エネルギー化合物としてアルギニンリン酸(Arg-P)が観測される。この試料は調製直後には、高いPi信号を示し、完全な静止状態になっていないが、 15°C で灌流を行なうと、次第にPiが低下、Arg-Pが上昇して、一時間以内に定常状態 ($[\text{Pi}] = 0.89 \pm 0.06$, $[\text{Arg-P}] = 7.18 \pm 0.20$, $[\text{ATP}] = 1.47 \pm 0.10 \mu\text{mol/g wet weight}$, $\text{pH} = 7.10$) に達する。灌流を続ければ、この定常状態は10時間以上にわたって持続する。灌流液に神経伝達物質を加えて、静止→収縮→catch収縮→弛緩を行なわせたときのABRM筋の ^{31}P -NMRスペクトルの一例を図2に示す。また、4例のABRM筋サンプルで得られた、細胞内pH, [Arg-P], [ATP], [Pi]の変動を図3に示す。ACh収縮中に細胞内pHは7.1から7.0に低下し、[Arg-P]も約12%減少する。これにひき続くcatch収縮では、[Arg-P]はほぼ静止状態と同レベルまで回復するが、細胞内pHはかえって酸性化している。これに対して5-HTを用いて筋を弛緩させると、細胞内pHは7.2まで上昇する。このとき、[Arg-P]は約0.6 $\mu\text{mol/g}$ 減少する。すべてのステージにわたって、[ATP]はほとんど変化していない。これらのpH、および[Arg-P]の変化は、差の検定により、危険率5%以下で有意であった。

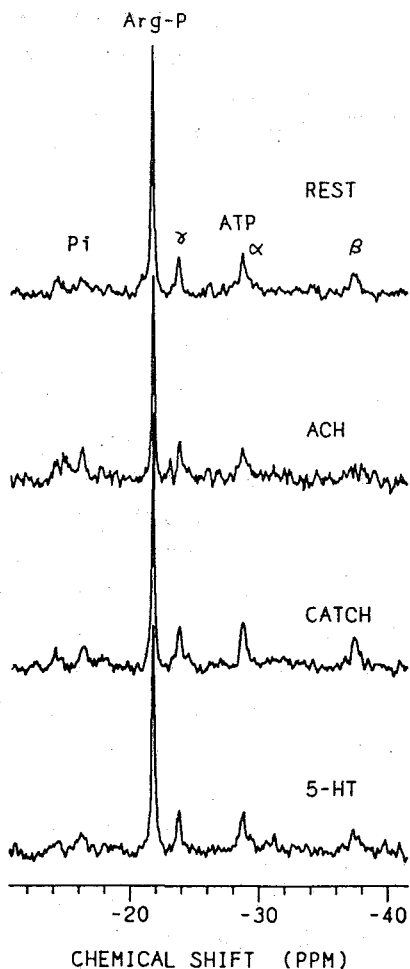


図2. 静止→ACh収縮→catch収縮→弛緩、の各ステージにおけるABRM筋の³¹P-NMRスペクトル
化学シフト基準：外部MDP

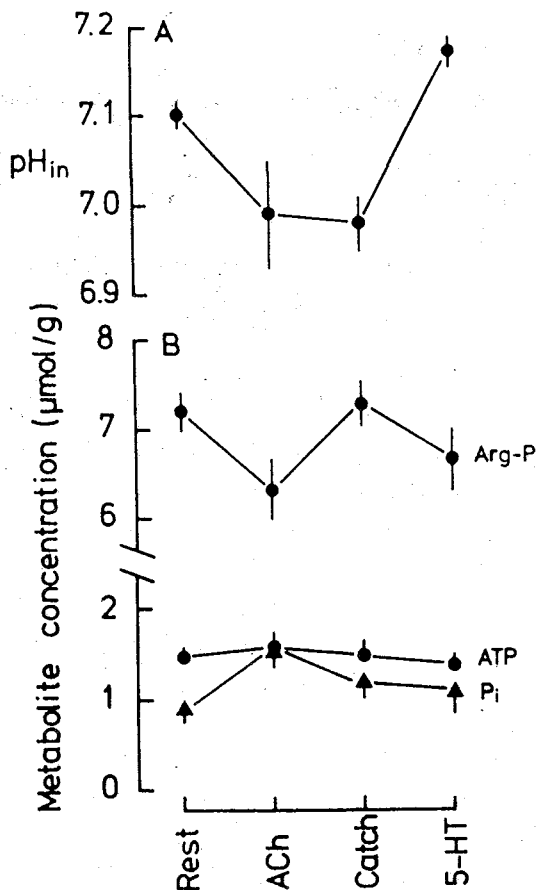
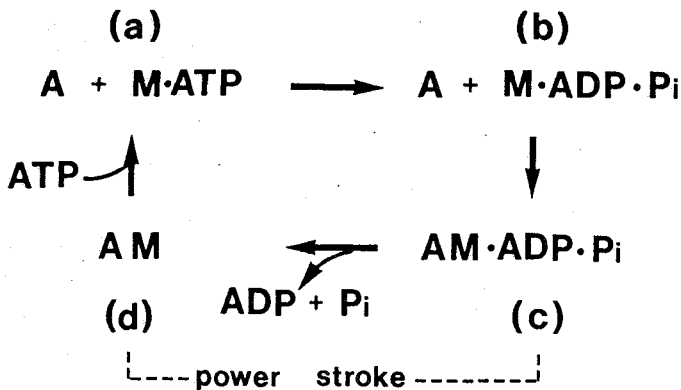


図3. ABRM筋の収縮の各段階における (A) 細胞内pH, (B) [Arg-P], [ATP], [Pi]の変化

【考 察】

catch収縮による長時間の収縮がどのようにしてひきおこされるかについて、現在までのところ明らかではないが、さまざまな仮説が提案されている。これらの仮説は、大きく、パラミオシン仮説とリンケージ仮説に大別される。パラミオシン仮説は、catch収縮が筋細胞内のパラミオシン分子間の相互作用に由来するとする説である。リンケージ仮説は、本来の収縮では回転するアクチンとミオシンのリンケージが、catch収縮では、どこかで固定されると考えるものである。図5にATPの加水分解と共

図4. ATPの加水分解
と共役したアクチン(A)
ミオシン(M)の相互作
用モデル



役したアクチン、ミオシンの相互作用のモデルをあげる。リンケージ仮説の中には catch 収縮は筋細胞内の ATP の涵濁により、状態 (d) から (a) への反応が阻害され、アクトミオシンリンケージ (AM) が固定されることによりひきおこされるとする説があるが、NMR 測定の結果から、これは否定される。また、細胞内 P_i の増大が状態 (c) から (d) への P_i の離脱を減速することにより AM がロックされるという可能性も考えられていたが、catch 収縮中には $[\text{P}_i]$ は既に回復を示しており (図 3)、これも妥当ではない。一方、skinned cell でみられた catch 収縮の pH 依存性 (酸性側で弛緩速度が遅くなる) については、intact 筋でもこれと合致する結果が得られた。すなわち、ACh 収縮から catch 収縮に移ると $[\text{Arg-P}]$, $[\text{P}_i]$ はすぐに回復するのに対し、pH のみはさらに酸性化する傾向を示し、5-HT による弛緩ではじめてアルカリ側にシフトした。この結果は定性的には、細胞内 pH が catch 収縮の制御に関与していることを示唆する。しかし、catch 収縮 → 弛緩でみられる細胞内 pH の 0.2 pH unit の変化は、弛緩速度にして約 3 倍の変化を起こしうるが、実際に観測される、20 倍の速度変化を説明するには小さ過ぎる。この違いを説明する可能性として、灌流法による筋の収縮が不十分で、実際にはもっと大きな pH 変化を過小評価していること、あるいは、pH の他に相補的な catch 収縮の制御機構が存在することなどが考えられる。後者の例として、最近、catch 収縮 → 弛緩に際してパラミオシン、ミオシンの重鎖、軽鎖などのリン酸化が関与するという知見が得られている (3)。5-HT による弛緩時に、 P_i の増加を伴うことなく、 Arg-P が減少しているのは、このリン酸化に対応しているのかもしれない。

【 文 献 】

1. B.M.Twarog, *Physiol. Rev.* 56, 829-838 (1976)
2. N.Ishii, *J. Muscle Res. Cell Motility* 8, 281 (1987)
3. L.Castellani, C.Cohen, *Science* 235, 334-337 (1987)

31P-NMR 化学シフト・イメージング法の生体組織への応用

(京都府立医大・生理・脳外科*) ○吉崎和男、西川弘恭
成瀬昭二*

Application of 31P-NMR chemical shift imaging on living tissues.
Kazuo Yoshizaki, Hiroyasu Nishikawa and Shoji Naruse*
(Departments of Physiology and Neurosurgery*, Kyoto Prefectural University
of Medicine)

31P-NMR chemical shift imaging technique has successfully applied on isolated frog muscles, and a set of 31P-NMR spectra scanned along the muscle fibers has been obtained with 40 min accumulation. The contour plot of phosphorus metabolites (creatine phosphate and inorganic phosphate) is quite useful for the detection of the distribution of intracellular pH along the muscle fibers.

〔はじめに〕

NMR イメージング法を用いれば人体断面像が容易に得られる。一方、31P-NMR スペクトル分析では生体組織中のリン化合物や細胞内 pH が測定できる。この両者を結びつけた化学シフト・イメージング法を用い、今回、単離した骨格筋を対象に、骨格筋の線維軸に沿った 31P-NMR 走査スペクトルの測定が可能となったので報告する。

〔方法〕

装置は JEOL SMR-200 でリンの共鳴周波数 80 MHz、ワイド・ボアの超伝導磁石を用いた。スペクトル走査には JEOL NMR イメージング・システムのコントロール・ユニットおよび磁場勾配コイルとその電源を用いた。

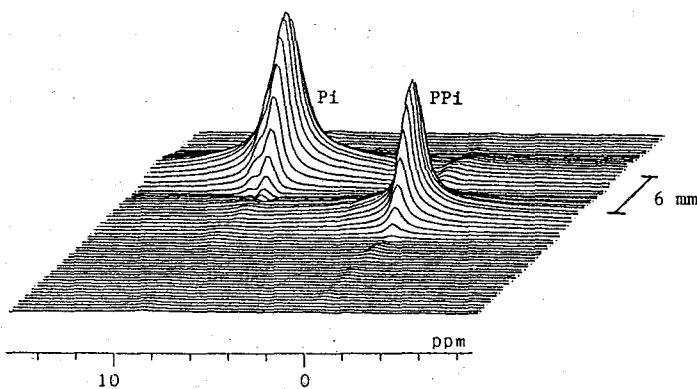


図1 一次元³¹P-NMR 化学シフト・イメージング法による 1M 無機リン酸 (Pi) および 0.5M ピロリン酸 (PPi) の共鳴線図。(各々の溶液は厚さ 3mm の容器に入れ 3mm 間隔あけて置いた)。

よしぎき かずお, にしがわ ひろやす, なるせ しょうじ

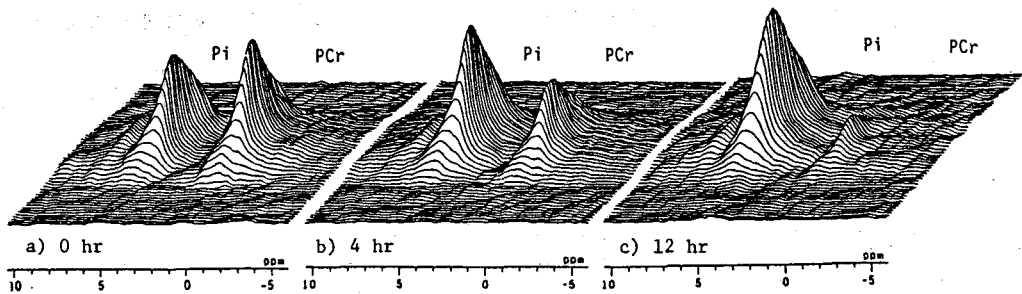
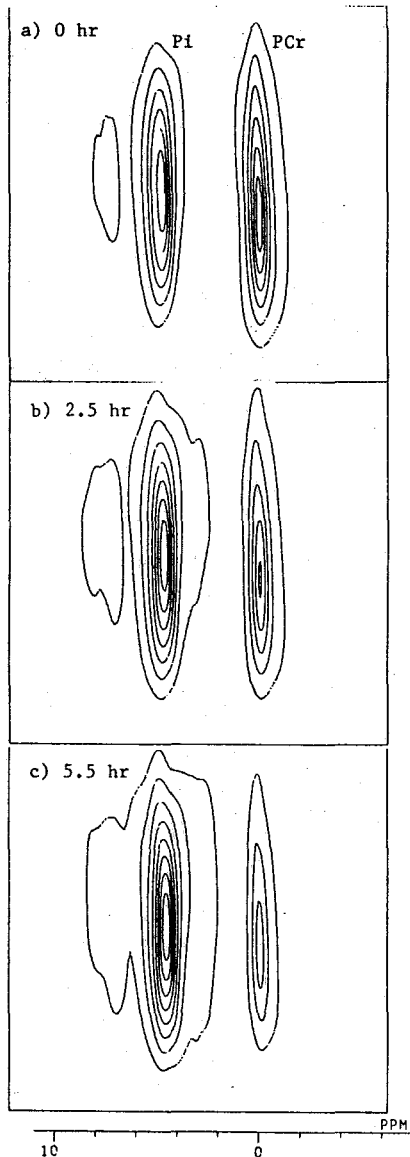


図2 カエル腓腸筋(1ヶ)の嫌氣的条件下における ^{31}P -NMR走査スペクトルの経時変化。



^{31}P -NMR スペクトルの測定には自作した4 ターンの直径25mmのソレノイド・コイルを用い、コイル内にモデル溶液あるいは食用ガエルの骨格筋を置いた。スペクトル走査にはスピン・エコー法を用い、走査軸方向に最大約 1 gauss/cm の種々の強度の磁場勾配パルスを加え、位置情報を位相変調としてとらえ、二次元フーリエ変換によって走査軸に沿ったパワースペクトル群を得た。

〔結果および考察〕

図1 はモデル溶液として無機リン酸 (Pi) およびピロリン酸 (PPi) の各々の溶液を厚さ3 mmの容器に入れ3 mm間隔あけてコイル内に置いて測定した結果を示す。横軸が化学シフト、奥行きが試料の軸を示し、PPi とPiとが分離して検出できている。

同様にカエル骨格筋では約40分の積算で走査スペクトルが得られ、クレアチンリン酸 (PCr) と無機リン酸 (Pi) が検出でき、両者の化学シフ

図3 カエル腓腸筋の ^{31}P -NMR走査スペクトルの等高線図。嫌氣的条件下における経時変化 (図2 もは異なる試料である)。

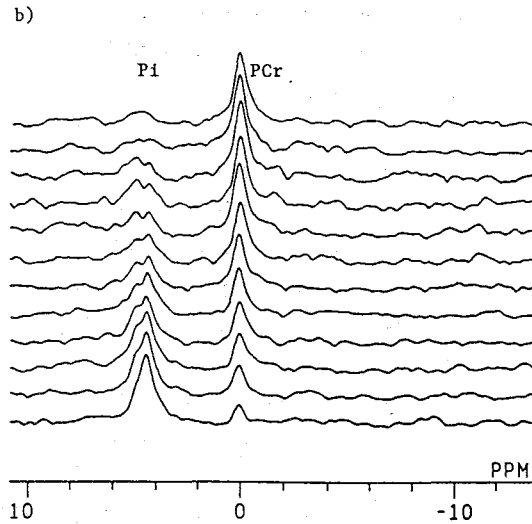
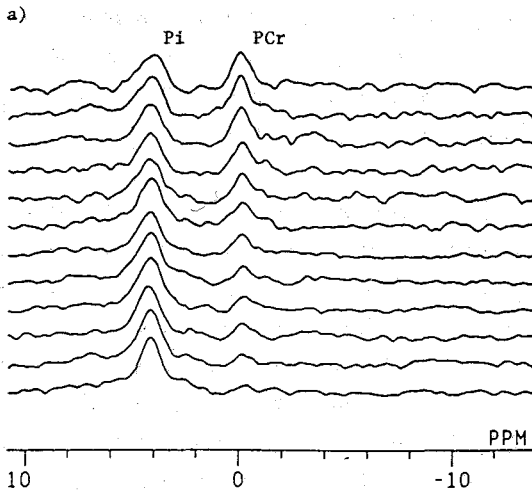
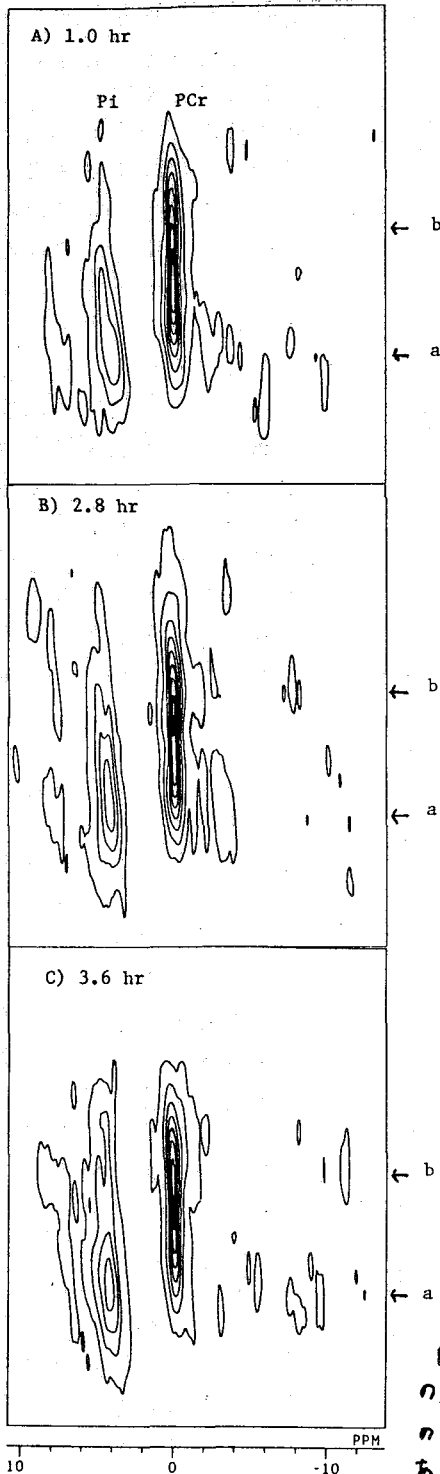


図4 カエル縫工筋のカフェイン拘縮部位(a)および健常部位(b)の ^{31}P -NMR スペクトルの経時変化。測定部位は図5を参照、3ヶの縫工筋を用い、嫌気的条件下筋線維軸に沿った走査スペクトルから一定部位のスペクトルを抜き出したものである。

トの差から細胞内 pH の分布も求まることが明らかとなった。しかし ATP は T2 が短いため検出できていない(図2)。図3 に等高線図を示し嫌気的な経時変化の追跡から細胞内 pH の酸性化は、線維全体にわたって比較的均一にすすむことがわかる。

ところで骨格筋はその長軸に沿った細長い筋細胞の集合体である。この細胞の一部に障害を与えた時の健常部位への影響をみる目的で以下の実験をおこなった。長い筋線維の半分を 5 mM カフェインにつけると、筋小胞体からの Ca^{2+} イオンの遊離によって筋線維の半分は収縮状態となる(カフェイン拘縮)。この筋線維を30分後に洗った後に長軸に沿った走査スペクトルを測定した。

図4 はカフェイン拘縮の部位(a)ならびに健常部位(b)のスペクトルの経時変化を示す。最初のスペクトルを比較するとカフェイン拘縮をおこした部位では健常部位よりも PCr が少なく Pi が増加し、しかも Pi が右の高磁場側にあることから細胞内 pH が酸性化していることがわかる。経時変化で



は両部位とも酸素欠乏のためにPCrが徐々に減少している。ところで、健常部位(b)ではPiが増加しているのみならず二峰性となり、細胞内pHの酸性化の速く進んでいる筋線維群が出現していることを示している。

図5は筋線維に沿った等高線図の経時変化を示し、等高線図A)の上部は健常部位であり、下部のカフェイン拘縮をおこした部位ではPiが高磁場側にあり細胞内pHの酸性化を示している。図A)、B)およびC)を比較するとPiの増加のみならず細胞内pHの酸性化がカフェイン拘縮をおこした部位から健常部位へと進行しているのが認められる。

すなわち細胞内(細胞質)の H^+ イオンがその濃度勾配に従って移動していることを示している。従って心筋梗塞や脳梗塞などで細胞の一部が障害を受けた場合、その障害部位の酸性化が細胞全体に波及する、あるいは、そのことが局所の H^+ イオンの濃度をうすめているのかもしれない。また、クレアチン・キナーゼ反応 ($PCr + ADP + H^+ \leftrightarrow Cr + ATP$) を右へとかたよらせ、ATPを補給するのに役立っているのかもしれない。

以上の様に ^{31}P -NMRの二次元化学シフト・イメージング法を用いれば生体組織のスペクトルの走査が可能となり、細胞や組織の機能や疾病の研究に有用であることが明らかとなった。

〔謝辞〕

種々の御助言を頂きましたJEOLの小川氏に感謝します。

図5 カエル縫工筋の ^{31}P -NMR走査スペクトルの等高線図。経時変化を示す。矢印a、bは図4のスペクトルの位置を示す。(図4と同一試料である)。

DESPOT法を用いた ^{31}P -NMR T_1 緩和時間測定
(生理研)

鈴木英司・村上政隆・前田宗宏・○瀬尾芳輝・亘 弘

An experimental approach to ^{31}P spin-lattice relaxation time measurement in biological systems.

Eiji Suzuki, Masataka Murakami, Munehiko Maeda, Yoshiteru Seo and Hiroshi Watari

(Department of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

The low sensitivity of the ^{31}P nucleus is a bottleneck for the measurement of the spin-lattice relaxation times (T_1) of phosphorus-containing compounds in biological systems. By using the inversion recovery method, a common pulse sequence for T_1 determination, about $13 \times T_1$ hours would be necessary to measure T_1 values (in sec). We tried to use one of the less commonly used method, DESPOT method (Driven-equilibrium single-pulse observation of T_1 , Homer and Beevers, 1985) for biological systems. The DESPOT method provides an extremely rapid and also accurate technique for the measurement of T_1 and should allow various applications in the investigation of phosphorus metabolism in biological systems.

生体組織の ^{31}P NMR スペクトルの燐化合物の T_1 緩和時間は0.1~10秒程度の緩和時間を持つ。また、臓器により T_1 緩和時間は大きく異なることが知られている。この様に広い範囲の緩和時間を正確に測定しようとするに反転回復 (Inversion recovery, IR) 法や、飽和回復 (Saturation Recovery, SR) 法では測定時間が長くなり、生体組織の緩和時間の測定には適していない。今回繰り返し時間を一定にして、フリップ角を変化させ、全測定時間を $1/5 \sim 1/10$ に短縮できるHomer等の報告した (1985) Driven-Equilibrium Single-Pulse Observation of T_1 Relaxation (DESPOT) 法を灌流顎下腺・肝臓などに適用し、 T_1 緩和時間を測定した。また、DESPOT法の測定精度について計算機実験を行ったので報告する。

(実験方法)

DESPOT法による ^{31}P -NMR T_1 緩和時間測定にはブルッカー-WM-360wb (8.45T) を用い、測定周波数145.8MHz、測定周波数中10KHz、パルス繰り返し時間0.6秒、積算回数1024回、フリップ角には 15° 、 30° 、 45° 、 60° 、 75° 、 90° を用いた。下記の灌流臓器

Signal Intensity of a Steady State

$$\frac{M(\theta)}{M_0} = \frac{[1 - \exp(-\tau/T_1)] \sin \theta}{1 - \cos \theta \exp(-\tau/T_1)}$$

M_0 : Equilibrium magnetization
 θ : Flip angle, Phase angle
 T_1 : Spin-lattice relaxation time
 τ : Pulse repetition time

Time required for T_1 measurement ($T_1 = 1.0$ sec)

- 1) DESPOT sequence 第 1 式
 Flip angle : 15°, 30°, 45°, 60°, 75°, 90°
 Pulse repetition time : 0.5 - 1.0 sec
 Number of scan : 1024 scans
 Time required for measurement : 1 - 2 hours

- 2) Inversion recovery sequence
 Recovery time : 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 5.0 sec
 Relaxation delay : 5.0 sec
 Number of scan : 1024 scans
 Time required for measurement : 12.6 hours

Linearization on DESPOT's data

$$\frac{M(\theta_i)}{\sin \theta_i} = \frac{\cos \theta_i \cdot M(\theta_i)}{\sin \theta_i} \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right)$$

Y
X
A (slope)

$$+ M_0 [1 - \exp(-\tau/T_1)]$$

B (Y-intercept)

表 1. DESPOT法とIR法による T_1 緩和時間測定の比較。 第 2 式

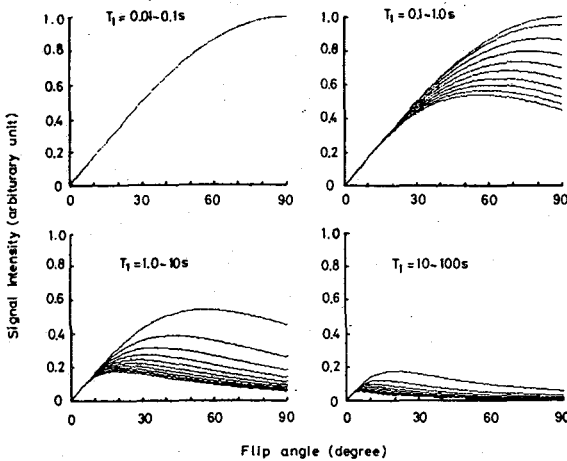


図 1. DESPOT法による T_1 緩和時間の適用範囲。

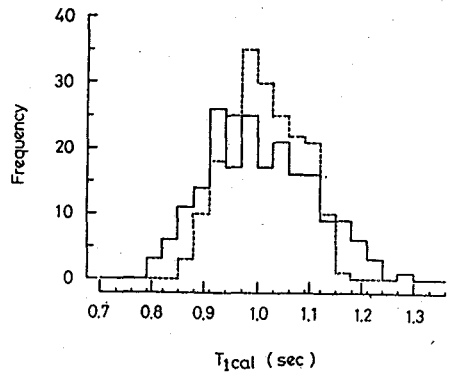


図 2. DESPOT法により得られた T_1 緩和時間の精度

を用いて T_1 緩和時間を求めた。ラット顎下腺(湿重量約0.2g)は摘出後Krebs-Henseleit灌流液(pH 7.4、100% O_2 で飽和、37°C)で定流灌流(2ml/分)し外径10mmのNMR試料管内に設置した。また、ラット肝右葉(湿重量約0.8g)のみを摘出した部分灌流肝をKrebs-Henseleit-Bicarbonate灌流液(pH 7.4、95% O_2 +5% CO_2 で飽和、37°C)で定流灌流(3-4ml/g·liver/min)し外径15mmのNMR試料管内に設置した。得られた信号強度により、糖磷酸(S-P)、無機燐(Pi)クレアチン燐酸(PCr)、 γ -ATP、 α -ATP、 β -ATPの T_1 緩和時間を求めた。

(結果と考察)

IR法とDESPOT法による T_1 緩和時間に必要な測定時間を比較した(表1)。 T_1 緩和時間が1秒の生体試料を測定するにはIR法では12.6時間必要であり、長時間安定な試料を用いなければならない。一方、DESPOT法を用いれば測定時間を1/10に短縮することができ、1~2時間である。これは、灌流臓器など生体試料を用いた T_1 緩和時間測定に適している。

DESPOT法を灌流臓器へ応用する前に、DESPOT法の精度について検討した。DESPOT法ではフリップ角 θ と T_1 緩和時間との関係は式(1)の様に表される。この式は式(2)の様に $Y = AX + B$ の直線に書き直すことができる。 $Y(\theta_i) = M(\theta_i) / \sin(\theta_i)$ 、 $X(\theta_i) = \cos(\theta_i) * M(\theta_i) / \sin(\theta_i)$ 、 $A(\text{slope}) = \exp(-\tau/T_1)$ 、 $B(Y\text{-intercept}) = M_0 [1 - \exp(-\tau/T_1)]$ で表わされる。従って、 $Y(\theta_i)$ をY軸に取り、 $X(\theta_i)$ をX軸に取ることにより、その直線の傾きAが $\exp(-\tau/T_1)$ で表され、ここから T_1 値を求めることができる。

DESPOT法による T_1 緩和時間の適用範囲について検討した(図1)。熱平衡状態における磁化 $M_0 = 1$ 、パルス繰り返し時間 $\tau = 0.6$ 秒とすると、フリップ角 θ における $M(\theta)$ は T_1 と θ の関数になる。この関係式を用いて、 $M(\theta)$ と T_1 及び θ の関係をコンピュータ・シミュレーションした。ある T_1 値についてフリップ角 θ を 0° より 90° まで変化させた時の $M(\theta)$ の変化をグラフ上に表し、 T_1 値の差がフリップ角を振ることによって磁化の差となって分離できるかどうかを検討した。 T_1 値を0.1秒より1秒まで0.1秒間隔の値を取らせた場合、各々のグラフは分離することができ、また1秒より10秒の間に T_1 緩和時間を持つ場合でも分離された。しかし、0.01~0.1秒、10~100秒については、曲線の分離が困難になった。このことは、DESPOT法では T_1 値が0.2~数十秒までの広い範囲にわたり測定可能なことを示しており、生体の持つ燐の T_1 緩和時間の全域を測定することができる。

次に、DESPOT法により求められた T_1 値の精度について検討した(図2)。

FT-NMR法では、フリップ角 θ を決める時と得られた信号強度 $M(\theta_i)$ を計算する時に誤差を生じる可能性がある。破線はフリップ角 θ_i は正確にとられたとして、得られた信号強度 $M(\theta_i)$ に $\pm 5\%$ 範囲の誤差を考慮した場合の T_1 値の分布を表した。 T_1 値は1秒と仮定したが、200回の試行で0.85~1.2秒の間に100%含まれた。実線はフリップ角 θ_i と得られた信号強度 $M(\theta_i)$ の両方に $\pm 5\%$ 範囲の誤差を含ませて T_1 値を計算させた。 T_1 値は0.85~1.2秒の間に90%が含まれた。一方、これまで通常行われてきたIR法で得られた信号強度 $M(\theta_i)$ に $\pm 5\%$ 範囲の誤差を含ませて T_1 値を計算させると、DESPOT法の破線の場合に一致した。このシミュレーション結果は、フリップ角を正確に求めることにより精度の高い T_1 値を得ることができ、これはIR法により得た T_1 の精度と変わりがないことを示している。以上の結果をふまえ、DESPOT法を灌流臓器を用いて T_1 緩和時間を求めた。図3にフリップ角を変えた時の灌流顎下腺のスペクトル、表2にこの方法で測定した顎下腺と肝臓の T_1 緩和時間を表した。

(結論)

1. 0秒の T_1 緩和時間を持つ生体成分を測定した場合、従来のIR法では12.6時間かかる。しかし、DESPOT法を用いると測定時間を1/10に短縮することが出来、1~2時間である。これは灌流臓器を用いた T_1 緩和時間測定に適している。DESPOT法の精度は、フリップ角を正確にとればIR法と変わらない。DESPOT法により T_1 値は0.2~10秒の間の広い範囲にわたり測定可能である。

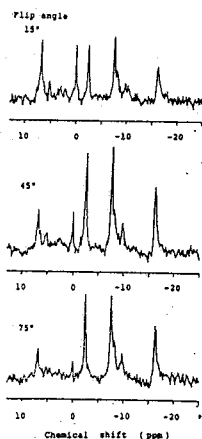


図3. 灌流顎下腺スペクトル

(参考文献)

J. Homer and M. S. Beevers: J. Mag. Reson. 63, 287-297 (1985)

T_1 relaxation time measured by DESPOT (^{31}P NMR)

Contents	Salivary gland*	Liver
S-P	3.74 ± 0.49 (6)	1.10 ± 0.07 (5)
Pi	2.00 ± 0.39 (4)	0.57 ± 0.01 (5)
PCr	4.78 ± 0.89 (6)	-
γ -NTP	0.91 ± 0.07 (6)	0.19 ± 0.01 (5)
α -NTP	0.71 ± 0.08 (6)	0.24 ± 0.03 (5)
β -NTP	0.85 ± 0.18 (6)	0.16 ± 0.01 (5)

mean ± SE, 37°C

* during secretion (ACh 10^{-6}M)

表2. 灌流臓器の T_1 緩和時間

^{13}C -標識フラビンを用いたフラビン酵素の複合体及び反応中間体の ^{13}C -NMR

(国立循環器病センター研究所) 三浦 洸

^{13}C -NMR Studies on the Complexes and Reaction Intermediates of Flavoproteins Reconstituted with ^{13}C -Enriched Flavins

Retsu Miura

(National Cardiovascular Center Research Institute)

Brewer's yeast old yellow enzyme and porcine kidney D-amino acid oxidase were reconstituted with FMN and FAD, respectively, which were selectively enriched with ^{13}C in the isoalloxazine nucleus. The ^{13}C -NMR spectra were obtained with these ^{13}C -labeled flavoproteins in the absence and presence of competitive inhibitors. Spectra were also taken with the reaction intermediates of ^{13}C -labeled D-amino acid oxidase. The results were interpreted in terms of the flavin-ligand and flavin-protein interactions with relation to the reaction mechanisms.

^{13}C -標識したフラビンで再構成したフラビン酵素の ^{13}C -NMR分光法はフラビン酵素の反応中心の情報を得るのに優れた方法であり、反応機構の理解に有効である。フラビンは反応性に富む分子種で多種多様な反応を触媒する潜在能力をもっている。個々のフラビン酵素では、これらの触媒能力が選択的に制御されたり強調されることによって個々の反応特異性が発現されている。このようなフラビン分子の反応性の制御や発現は、フラビン-蛋白質相互作用、フラビン-リガンド(基質、反応中間体、エフェクター)相互作用に負っている。ここでは、それぞれFMN、FAD酵素であるビール酵母旧黄色酵素(OYE)と、豚腎臓D-アミノ酸酸化酵素(DAO)について、 ^{13}C -標識したFMN、FADで再構成し、 ^{13}C -NMRスペクトルを種々の条件下に測定し、 sp^2 炭素の化学シフトが電子密度にもっとも敏感であるということ considering、結果をこれらの酵素におけるフラビン-蛋白質、フラビン-リガンド相互作用、反応機構に関連して考察した。

実験 [2- ^{13}C] -, [4a- ^{13}C] -, [4,10a- $^{13}\text{C}_2$] -リボフラビンを文献記載の方法で化学合成した。図1はフラビン部分の位置番号を示す(●は標識位置)。リボフラビンからFMNへの誘導は POCl_3 によるリン酸化により、FADへの誘導は、部分精製した

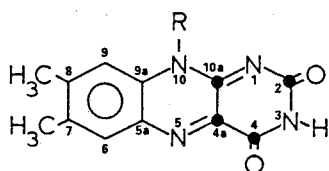


図1

それぞれ、5mmφ、10mmφセルにて測定した。用いた酵素濃度は0.6 - 2.2 mM (OYE)、0.3 - 0.6 mM (DAO)であった。化学シフトは、TSPのメチル- ^{13}C を外部標準にした。

FAD合成酵素(細菌由来)を用いて酵素的に行った。アポOYE、アポDAOにそれぞれ ^{13}C -FMN、 ^{13}C -FADを導入して、再構成 ^{13}C -標識OYE、DAOを調製した。

^{13}C -NMR測定は、JEOL GX270によった。OYE試料は、50mM Na-ピロリン酸-DCI/D₂O, pH8.0中、DAO試料は、5mM Na-リン酸/D₂O, pH8.0中にて、それ

結果と考察 OYEはフェノール化合物と電荷移動(CT)複合体を作ることが知られている。このCT複合体はフラビン酵素に特徴的で、かつ触媒活性上重要なCT複合体の

表 1 FMN, OYE, OYE-PBP複合体における
標識¹³Cの化学シフト

	¹³ C-Chemical Shifts (ppm)			
	Positions			
	2	4	4a	10a
FMN	161.4	165.3	137.8	153.7
OYE	162.1	165.8	139.0	154.7
OYE-PBP	161.6	164.8	135.3	154.7
$\Delta\delta_{CT}^*$	-0.5	-1.0	-3.7	0

(* OYE-PBP - OYE)

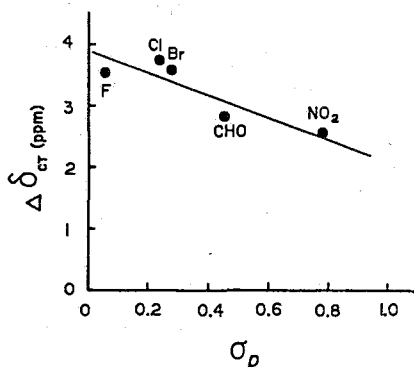


図 2 CT複合体形成による化学シフト変化とハメット σ_p 値の関係

モデルとしての研究の蓄積がある。表1は、遊離FMN, OYE, OYE-p-プロモフェノール(PBP)複合体における標識¹³Cの化学シフトを示す。また、OYE-PBPとOYEの化学シフトの差($\Delta\delta_{CT}$)も併せて示す。4つの¹³C-信号のうち、4a-¹³CのそれがCT複合体形成に特に敏感で3.7ppm高磁場シフトしている。次に、CT複合体形成による4a-¹³C化学シフトの変化($\Delta\delta_{CT}$)を種々のp-置換フェノールとの複合体について求めた。図2は、p-置換基のハメット σ_p 値と $\Delta\delta_{CT}$ の関係を示す。OYE(酸化型)とフェノール化合物のCT複合体では、フェノールの水酸基が解離したフェノラート型になっている¹⁾ことを考慮すると、表1, 図2の結果から以下のように推定できる。すなわち、フェノール化合物から酸化型フラビンへのCTの結果、移動した電荷によって4a-位の電子密度が選択的に高くなっている。この電子密度の上昇はフェノラートイオンの酸素の電子密度に依存しており、したがって、このCTはフェノラートの酸素を介したn \rightarrow π 型である。

DAOには、CT複合体を作るいくつかの拮抗阻害剤や、CT吸収帯で特徴づけられる反応中間体がいくつか知られている。この反応中間体には酸化型フラビンを含むものと還元型フラビンを含むものがある。図3は、酸化型DAOと拮抗阻害剤、基質反応中間体とのCT複合体における¹³C-化学シフトの比較である。ここで、OAB, MAB, PABは、それぞれ、o-, m-, p-アミノ安息香酸、BZは安息香酸である。DAO-D-BCNA, DAO-D-Proは、それぞれ、 β -シアノ-D-アラニン、D-プロリンを基質にした時の反応中間体で、DAO-3-シアノ-2-アミノアクリル酸複合体²⁾、DAO- Δ^1 -ピロリジン-2-カルボン酸複合体³⁾であることがわかっている。OYEの場合と異なり、CT複合体形成に対して、4a-¹³C信号はそれほど敏感ではなく、むしろ、2-, 4-位のカルボニル-¹³Cがより敏感に変化している。このことは、DAOにおけるこれらのリガンドと酸化型フラビンとのCT相互作用で、移動した電荷は4a-位に局在していないこと、これらの複合体では、C(2)=O, C(4)=Oの酸素を介する蛋白質との水素結合が変化していることを示唆する。基質結合や、反応中間体におけるこれらの水素結合の変化による

フラビンの反応性の制御機構が考えられる。

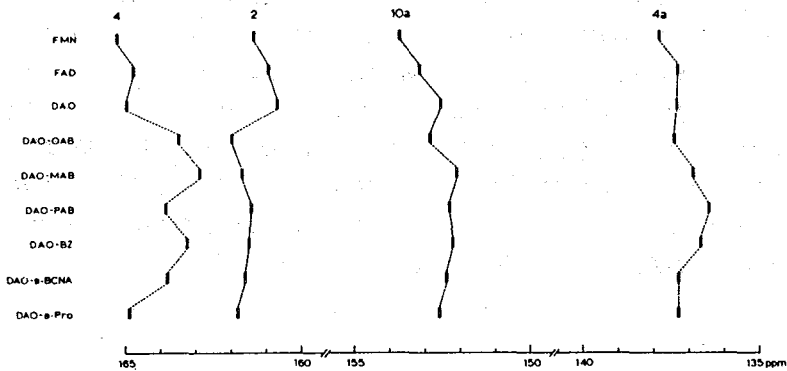


図3 DAO, DAO-拮抗阻害剤複合体、反応中間体における標識¹³Cの化学シフト比較

次に、還元型DAOの¹³C-NMRを測定し、標識¹³Cの化学シフトと還元型FMNのそれらとの比較から(表2)、還元型DAOのFADはアニオン性還元型(FADH⁻)であることがわかった(図4に中性還元型フラビン(FMNH₂, FADH₂)、アニオン性還元型フラビン(FMNH⁻, FADH⁻)の構造を示す)。さらに、還元型DAOと生成物(イミノ酸)とのCT

表2 還元型FMN, 還元型DAO, 紫色中間体における標識¹³Cの化学シフト

	¹³ C-Chemical Shifts (ppm)			
	Positions			
	2	4	4a	10a
FMNH ₂	152.7	159.9	104.4	145.6
FMNH ⁻	159.8	159.3	103.0	157.1
DAO (reduced)	159.8	158.9	100.1	156.9
Purple (D-Alanine)	160.0	160.6	97.7	155.9
Purple (D-Proline)	160.3	159.8	98.2	156.2

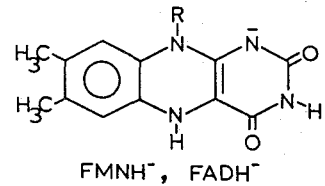
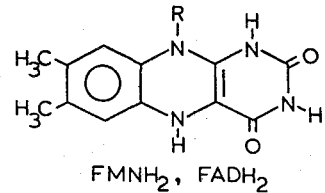


図4 還元型フラビンの構造

複合体であることが知られている^{4,5}。「紫色中間体」の¹³C-NMRスペクトルを測定し、それぞれの¹³C-化学シフトを還元型FMN, 還元型DAOのそれらと比較した(表2, 図5)(Purple (D-Alanine), Purple (D-Proline)は、それぞれ、D-アラニン、D-プロリンを基質に用いた時の紫色中間体である)。その結果、紫色中間体におけるFADは還元型DAOと同様、アニオン性還元型(FADH⁻)であることが明らかになった。さらに、紫色中間体では、4a-¹³C信号が遊離還元型に比べて、特に大きく高磁場シフトして

おり、紫色中間体において、4a-位の電子密度が遊離還元型よりも高く、したがって、4a-位の求核性がより高いことが示される。一般に、還元型フラビンの4a-位は、再酸化過程における分子状酸素との反応部位の一つであることを考慮すると、DAOの再酸化過程が、紫色中間体の4a-位のO₂への求核反応を経て進むことが示唆される。これらのことは、O₂に対する反応性が還元型DAOよりも紫色中間体の方が高く（図5、 $k_5 > k_4$ ）、触媒サイクルで、還元型DAOのO₂による再酸化が生成物の遊離の前に、紫色中間体（E_r・・・P）を経由する（図5、下側ループ）という反応動力学的結果⁶⁾の分子的根拠を与える。図5のE_o、E_rは、それぞれ、酸化型DAO、還元型DAOを示し、S、Pは、それぞれ、基質D-アミノ酸、生成物イミノ酸を示す。

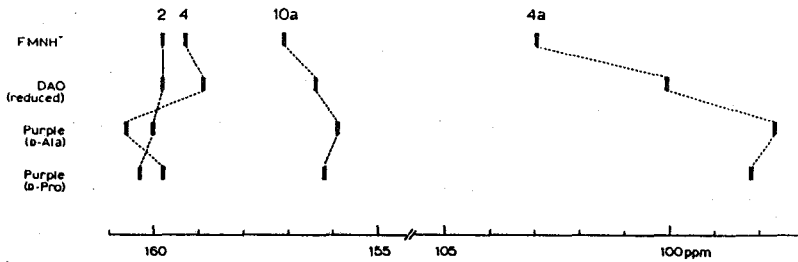


図5 還元型DAO、紫色中間体における標識¹³Cの化学シフトの比較

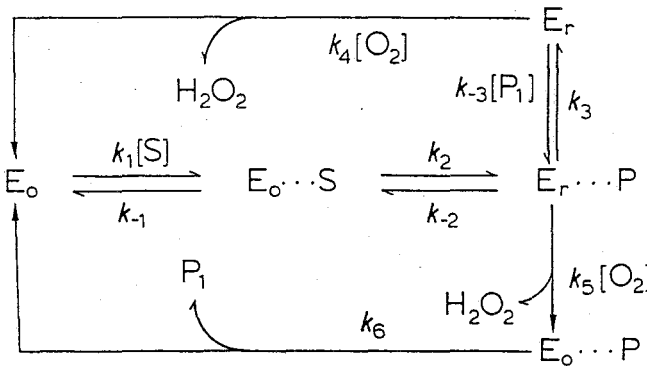


図6 DAOの触媒サイクル

参考文献

- 1) Beinert, W.-D., Rüterjans, H., Müller, F., Bacher, A. (1985) Eur. J. Biochem. 152, 581-587.
- 2) Miura, R., Shiga, K., Miyake, Y., Watari, H., Yamano, T. (1980) J. Biochem. 87, 1469-1481.
- 3) Massey, V., Ganther, H. (1965) Biochemistry 4, 1161-1173.
- 4) Nishina, Y., Shiga, K., Watari, H., Miura, R., Miyake, Y., Tojo, H., Yamano, T. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 818-822.
- 5) Miura, R., Nishina, Y., Ohta, M., Tojo, H., Miyake, Y., Yamano, T., Watari, H. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 111, 588-594.
- 6) Porter, D.J.T., Voet, J.G., Bright, H.J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4446-4473.

酸化型と還元型 Thioredoxin の構造の比較

(北大工・University of Calgary*) 平沖敏文・

Hans J. Vogel*

A Structural Comparison between Oxidized and Reduced E.coli Thioredoxin

Toshifumi Hiraoki and Hans J. Vogel*

(Faculty of Engineering, Hokkaido University and Department of Biological Sciences, University of Calgary*)

Thioredoxin functions as a hydrogen carrier protein which undergoes reversible oxidation/reduction reactions of its active site disulfide linkage. The half spin-systems out of the residues in the oxidized form could be identified by a series of 2D NMR. The protein undergoes minor changes in its overall conformation upon reduction of its active site. Only groups close to this site undergoes substantial changes in ^1H NMR spectra upon reduction. Although the apparent similarity in the secondary and tertiary structures of the both forms, the protein is less stable in the reduced form than in the oxidized form.

〔序〕 Thioredoxinは真核細胞から原核細胞まで広く存在する分子量12,000のタンパク質で、活性部位cys-gly-pro-cysの分子内ジスルフィド結合の可逆的な還元により多くの酵素反応におけるredox反応を触媒する。チオール基をもつ還元型と分子内ジスルフィド結合をもつ酸化型が存在する。大腸菌thioredoxinは108個のアミノ酸からなり¹⁾、酸化型は結晶構造解析(2.8Å)がなされている²⁾。酸化型の構造は5本鎖からなる1個の β -sheetのまわりを4本の α -helixが囲んでいる。活性部位は β -sheetから1本の α -helixにつながる分子表面に突きでたターン部分である。還元型の構造は明かではないが、蛍光・CD測定は還元により二次構造は変化せず局所的な変化のみが生じたことを示している^{3,4)}。本研究では ^1H NMRにより二次元NMRを用いて酸化型thioredoxinのジグナルの帰属を行い、酸化型と還元型の構造の比較を行った。

〔実験〕酸化型thioredoxin(TRS_2)は大腸菌のsuperproducer BH2012/pCJF4系から得た。還元型($\text{TR}(\text{SH})_2$)は TRS_2 に3-4等量のdithiothreitolを加えて得た。測定はBruker AM-400WB (ASPECT 3000 system, 400 MHz)で行った。試料は0.1M KCl D_2O または10% D_2O に溶かし、pHを調整した。TSP- d_4 を内部基準に用いた。二次元NMRの測定にはCOSY, NOESY, Relayed-COSY, Double-Quantum-Filtered COSY(DQF-COSY), Triple-Quantum-Filtered COSY(TQF-COSY), Double Quantum 2D(DQ2D)を用いた。NOESYを除いて、magnitude modeを用いた。

〔結果〕

§ TRS_2 のジグナルの帰属

図1に示した TRS_2 のスペクトルには0ppm付近と芳香族領域に環電流シフトしたジグナルが観測され、 β -sheet構造に由来する $\text{C}\alpha\text{H}$ が4.6-5.8ppmに交換が遅い7ミッドNHが8-10ppmに観測された。NOESYスペクトルには7ミッドNH間にクロスピークが観測され α -helixの存在を示す。これらは TRS_2 が β -sheet, α -helix, 高次構造を保持していることを示す。

Thioredoxinは9個(his 1, tyr 2, trp 2, phe 4)の芳香族アミノ酸を含む。これらのスピニング系はCOSYとRelayed-COSY(図2)から帰属出来た。さらに DQF-COSY, TQF-COSY, DQ2D により帰属を確認した。H₂O中での trpのインドール環NHの純吸収位相 NOESYスペクトルを図3に示す。2個の trpのインドール環NHと結合しているC₂HとC₇Hが明らかになった。

Glyとserのシグナルは3.8ppm付近にかたまっていって現れ、区別することがしばしば困難である。D₂O中ではglyのシグナルはTQF-COSYスペクトルには現れないのでserと区別出来る。DQF-COSYとTQF-COSYから9個のglyと1個のserを帰属し、DQ2Dで確認した。

Alaとthrの帰属はDQF-COSYとDQ2Dで行った(図4)。DQ2DではJ-結合しているシグナルは擬対角線の両側に対称に現れる。AlaとthrはRelayed-COSYとTQF-COSYにより区別した。Ile, leu, valのDQF-COSY, TQF-COSYスペクトルを図5A, Bに示す。両者からval, leuとileの δ -CH₃と γ -CH₃が分離できた。さらにRelayed-COSYとDQ2Dを用いてile, leu, valを帰属した。

TRS₂をD₂Oに溶かした直後は交換の遅い7ミットNHが観測され、そのNH- α H- β H領域のCOSYスペクトルを図7に示す。Ala, ile, thr, alaが帰属出来た。交換の遅いNHは4.5-6ppmに現れるC₂Hと結合しており、これらの残基が β -sheetを形成していることと一致する。H₂O中でのCOSYとNOESYスペクトルのfinger print領域に現れたクロスピークの数は少なく

てsequentialな帰属をすることが出来なかった。そこでcomputer graphicsにより、主鎖構造が明かなTRS₂にアミノ酸側鎖を導入して分子全体の構造を検討した。まずtrp28, tyr-49, phe-102は他の芳香環と互いに離れていることがわかった。NOESYからphe-aとtrp-a, tyr-aは近いので, tyr-aはtyr-70, tyr-bはtyr-49と帰属された。

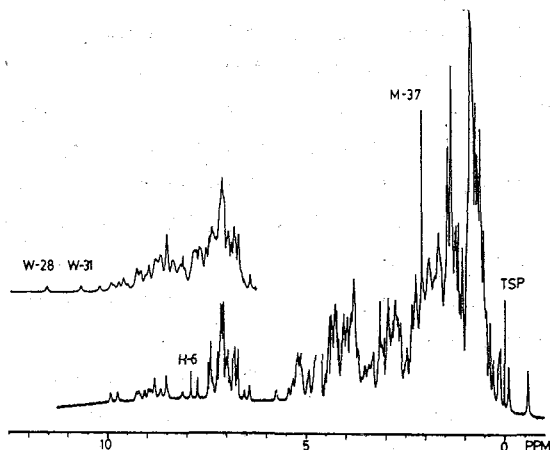


Fig.1 ¹H NMR spectra of TRS₂ in D₂O(bottom) and in H₂O(top) at 55°C and pH 6.2.

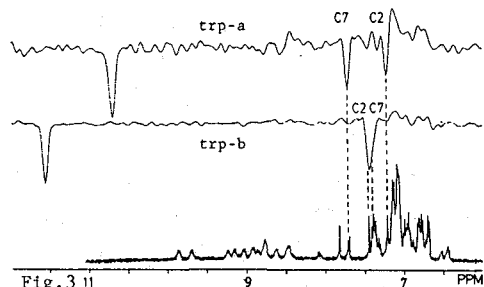


Fig.3 11 Traces from NOESY in H₂O of trp-a and trp-b rings. The bottom shows a 1D spectrum in D₂O at pH6.2, 55°C.

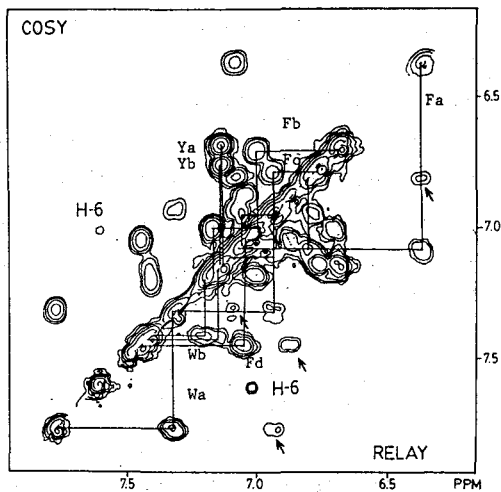


Fig.2 Combined COSY and Relayed-COSY spectrum at 40°C and pH 7.8, showing the extra peaks by arrows.

Phe-aとphe-dのC α Hの化学シフトはこれらの残基が β -sheetにあることを示している (phe-27, phe-80)。このうちphe-27だけがtrp-31に近く、phe-aはphe-27, trp-aはtrp-31と帰属出来た。従ってtrp-bはtrp-28, phe-dはphe-80と帰属できた。Phe-aとval-a, ala-aの間でNOEが生じるので、val-a, ala-aはそれぞれval-25, ala-29と帰属できた。

§ TRS₂とTR(SH)₂の比較

1Dスペクトル 図7にD₂O中のTRS₂とTR(SH)₂のスペクトルを示す。両者は良く似ているが、幾つかの相違点が見いだせる。Val-25, phe-27, trp-28, ala-29, trp-31の化学シフトが異なる。一方、his-6, tyr-49, try-70, 低磁場シフトしたCHは変化しない。H₂O中では、還元すると2つtrpのインドール環NHはいずれも高磁場シフトする。

2Dスペクトル COSYスペクトルの比較を図8(aromatic)と図9(ala/thr)示す。Trp-28が最も変化し、trp-31とphe-27も変化する。しかし、他のピークはほとんど変化しない。Ala-29は還元により低磁場シフトし、他の2個のalaも変化する。

pH滴定 his-6のpKaとHill係数(n)を表1に示す。両者でほとんど差が無い。これらのpKa値はhisが分子表面にあるとき(pKa-6.8)より低く、his-6はプラス電荷をもつ残基と相互作用しているものと推定される。Tyr-49とtyr-70の化学シフトはpH12まで変化

せず、これらが他の残基と分子内水素結合

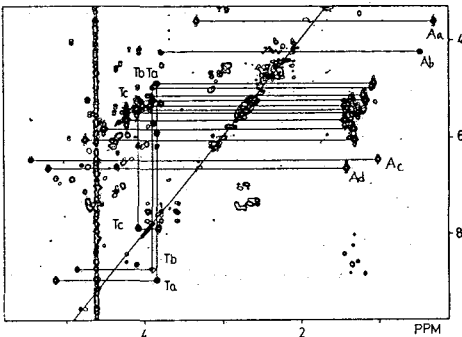


Fig.4 DQ2D spectrum(60 ms) of ala/thr region, showing the connectivities by the solid line.

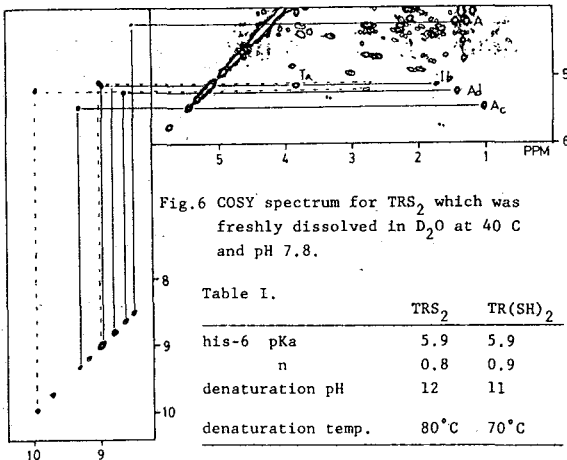


Fig.6 COSY spectrum for TRS₂ which was freshly dissolved in D₂O at 40°C and pH 7.8.

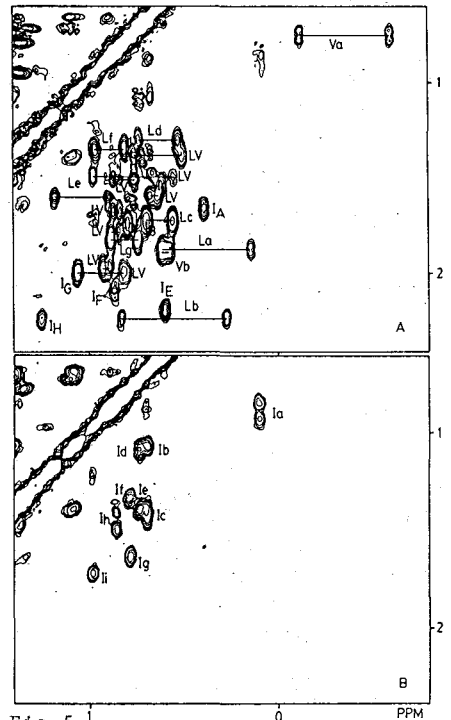


Fig.5
A. DQF-COSY spectrum of the CH₃ groups of ile, leu, and val.
B. TQF-COSY spectrum of the δ -CH₃ of ile.

をしている可能性がある。TRS₂もTR(SH)₂もpH2.5で高次構造が存在する。TRS₂の7Mが変性はpH11.5から始まり、pH12.5で完了する。この過程はslow-exchangeで、交換速度は300 s⁻¹より小さい。TR(SH)₂では変性の中点はpH11である。

温度変化 TRS₂では60°Cで全ての7ミド'NHが消え、熱変性の中点は約80°Cで、協同的のようである。TR(SH)₂の中点は約70°Cである。

H-D交換 両者とも大部分の7ミド'NHは10分以内に交換しスペクトルから消えるが、約12個のNHが残る。これらはβ-sheetのNHと考えられる。NHの消失時間はTR(SH)₂で4時間、TRS₂で67時間で、ほぼ10倍異なる。

〔考察〕 芳香族7ミド'酸はthioredoxin分子中に散在しており、分子構造の変化を調べるために良い"reporter"になっている。得られた結果は還元により分子の活性部位近傍のみが構造変化することを示している。この領域はthioredoxinとそのtarget proteinとの相互作用する領域と考えられており、還元による構造変化でTR(SH)₂とtarget proteinが結合し易くなると推定される。しかし、分子全体の構造は酸化型と還元型ではほとんど差が無い。ジ'スルフィド'結合はタンパク質を安定させることは知られているが、TRS₂のような小さな14員環の分子内ジ'スルフィド'結合でも分子をかなり安定化させること分かった。

本研究は Medical Research Council of Canada と Alberta Heritage Foundation for Medical Research の補助を受けた。

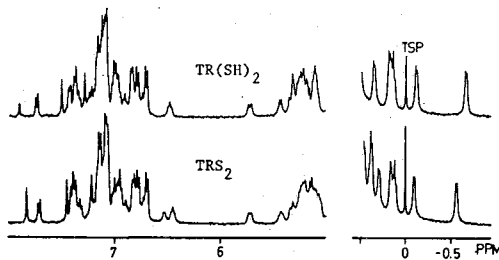


Fig.7 Comparison between TRS₂ and TR(SH)₂ in D₂O at pH 6.2 and 50°C.

- 文献 1)A.Holmgren, Eur.J.Biochem 6, 475(1968) 2)A.Holmgren, et al Pro.Natl.Acad. Sci.,2305(1975) 3)L.Stryer, et al.,Biochemistry, 6, 1016(1967) 4)S.B.Brown, et pal., Biochemistry,26, 863(1987)

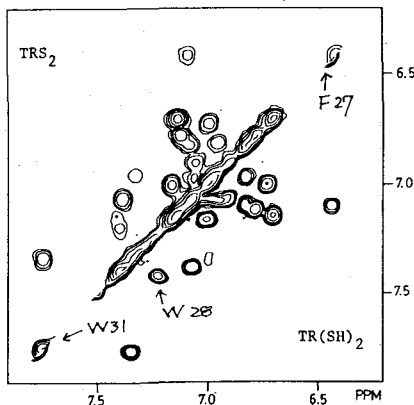


Fig.8 Combined COSY spectrum for TRS₂ and TR(SH)₂

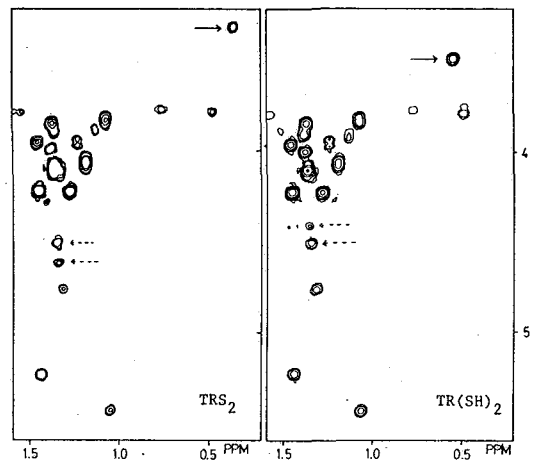


Fig.9 Parts of COSY spectra for TRS₂ and TR(SH)₂.

常磁性ヘムタンパク質の ^{13}C -NMR

(東工大) 〇山本泰彦

 ^{13}C -NMR of Paramagnetic Hemoproteins

Yasuhiko Yamamoto

(Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Technology)

The hyperfine shifted resonances arising from the heme carbons of the paramagnetic low-spin complexes of hemoproteins have been identified in their NMR spectra even at the level of natural abundance and the four individual heme methyl carbon resonances have been assigned unambiguously for the first time with the aid of ^1H - ^{13}C COSY. Alteration of the in-plane symmetry of the heme electronic structure induced by the ligation of the proximal histidyl imidazole spreads the heme methyl carbon resonances to more than 30 ppm at 25°C, indicating the sensitivity of these resonances to the heme electronic structure. The hyperfine shifted heme ^{13}C resonances are expected to serve as new potentially powerful probes in characterizing the nature of the heme electronic/molecular structure of the paramagnetic hemoproteins.

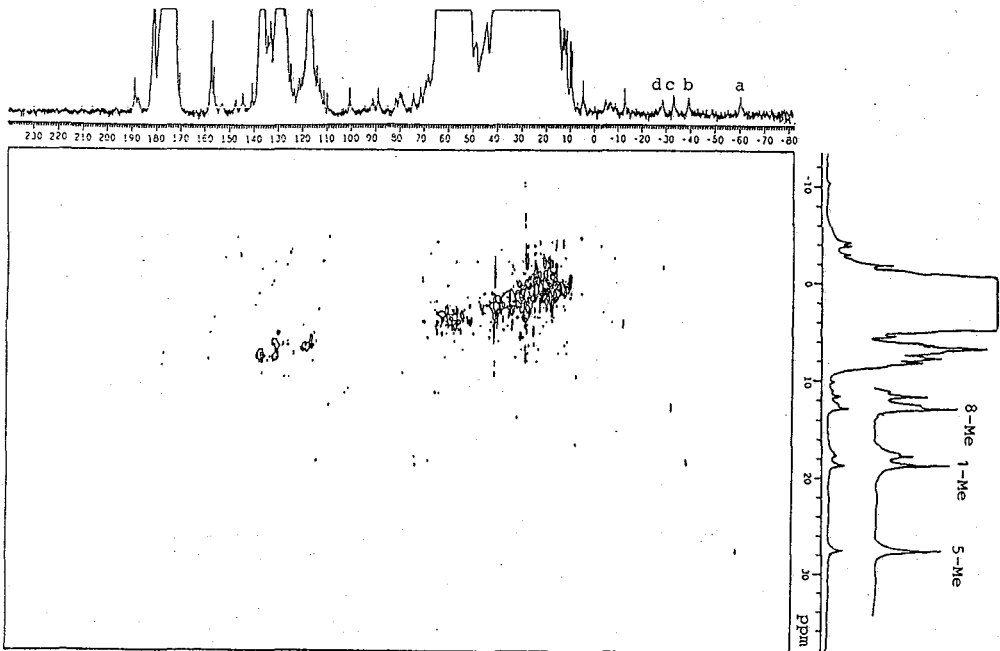


図1. Mb-CN⁻ (22°C) の ^1H - ^{13}C COSY スペクトル。 ^1H と ^{13}C 1D スペクトルはそれぞれ F_1 と F_2 軸に示してある。低磁場側に超微細シフトしたヘムメチル基のプロトン核から由来するシグナルの帰属は ^1H スペクトルに示してある。それらのシグナルとのクロスピークから高磁場シフトした ^{13}C シグナル(ピーク a~d) の帰属は容易に行なえる。

〈序〉

NMRは、常磁性ヘムタンパク質のヘムの電子/分子構造を解明するための有用な情報を与えてきた。それは、観測される超微細シフトしたNMRシグナルのスペクトルパラメーターが、それらのシグナルが由来する核スピンとヘム鉄のd軌道電子との超微細相互作用に関して、ほぼ定量的に解析可能であるからである。ところで、今までヘムタンパク質のNMRの研究では、その感度の高さという点から、ほとんどの場合¹H-NMRが利用されてきた。それに対しヘムを構成するその他の核(たとえば¹³C, ¹⁵Nなど)からのNMRシグナルは観測されていなかった。特に、¹³C-NMRから得られる情報が、ヘムの電子構造解析

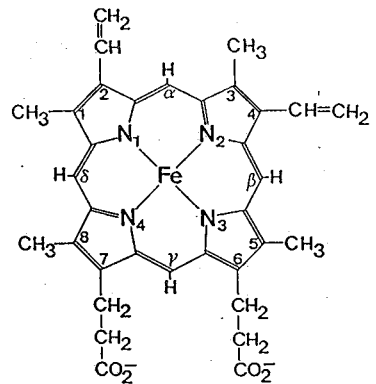


図2. ヘムの構造。

において高い有用性があることは盛んに指摘されており、Wüthrich¹をはじめ Goff²が、さまざまなモデル化合物について¹³C-NMRの測定を行ない、得られた結果を¹H-NMRの結果と比較検討することによって、ヘム平面のπ電子密度をより正確に評価できることを示した。さらに、常磁性ヘムモデル錯体で観測される¹³C-NMRシグナルのスペクトルパターンから、ヘムタンパク質のヘムから由来する¹³Cシグナルがタンパク質部分の¹³Cシグナルからは分離した所に観測可能であることを示唆した。そこで著者は、フェリックススピンヘムタンパク質の天然存在比での¹³C-NMRスペクトルにおいて、ヘムの¹³C核から由来するシグナルの観測を試みた。その結果、ヘムの¹³Cシグナルが明らかに観測可能であることを見いだした。特に、ヘムの4個のピロール環のスピン密度を評価するのに重要な4つのメチル基炭素の¹³Cシグナルが、高磁場側にきれいに分離して観測できることを示し、それらのシグナルの帰属を初めて行なった。講演では、マッコウクジラのミオグロビン(Mb)とウマの心臓のチトクロームC(Cyt-C)のシアン化物(Mb-CN⁻, Cyt-C(CN⁻))を例に掲げ、¹³C-NMRから得られた結果を発表する。

〈実験〉

Mb(タイプII)とCyt-C(タイプVI)は、Sigma Chemical Co. から購入し、特に精製を行なわずそのまま使用した。それぞれのシアン化物を調製するために5当量と20当量のKCNを50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解させたMbとCyt-Cにそれぞれ加えた。Mbの濃度は8mMでCyt-Cは20mMとした。NMRスペクトルは、JEOL GX-270で測定し、¹³Cスペクトル及び¹H-¹³C COSYには、10mm チューナルプローブを使用した。¹³C{¹H}スペクトルは、スペクトル幅30KHz, 90°パルス幅16μs, データポイント32K, パルス繰り返し時間1S, 積算回数約2万回で得られた。また、S/N向上のために10Hzのウィンドウ関数を使用した。¹H-¹³C COSYスペクトルは、標準的なパルスシーケンス((2J)⁻¹=3.6ms)を用いて得られた。約1000回の積算をそれぞれのτ₁値について行ない、得られたデータマトリックス 2K (¹³Cスペクトル幅-約25KHz) × 64 (¹Hスペクトル幅-約15KHz)

をゼロフィリングにより最終的に $2K \times 256$ にし、二次元フーリエ変換を行ない、スペクトルは絶対値モードで示してある。なおケミカルシフトは、2,2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホネートを基準に示してある。
 〈結果と考察〉

図3-Bにヘミンシアン錯体(Hemin(CN)₂)の¹³C-NMRスペクトルを示した。シグナル帰属は最近、著者らが行なった³。Aに示したMb-CN⁻のスペクトルでは、いくつかのシグナルが、タンパク質部分から由来する¹³Cシグナルからは分離した領域に観測される。そして、高磁

場側にシフトしたピークa~dは、シフト値及び線幅から、ヘムのメチル炭素のシグナルであると推測される。シグナル帰属は¹H-¹³C COSYにより、すでに発表されている¹Hの帰属を用いて行なうことができた⁵(図1)。¹H-NMRでは、四本すべてのヘムメチル¹Hシグナルを分離した領域で観測することは不可能であるが、¹³C-NMRで四本のヘムメチル¹³Cシグナルがはっきりと観測できる。その結果、¹Hスペクトルでは分離して観測できなかった3-Meの¹Hシグナルのシフト値が、¹H-¹³C COSYのクロスピークから読み取ることができた。

Cyt-C(CN⁻)の¹³C-NMRスペクトル(図4)にも、高磁場側にシグナル、a~g、が分離されて観測でき、Mbの場合と同様に¹H-¹³C COSYよりヘムメチル¹³Cシグナル(a:5-Me,

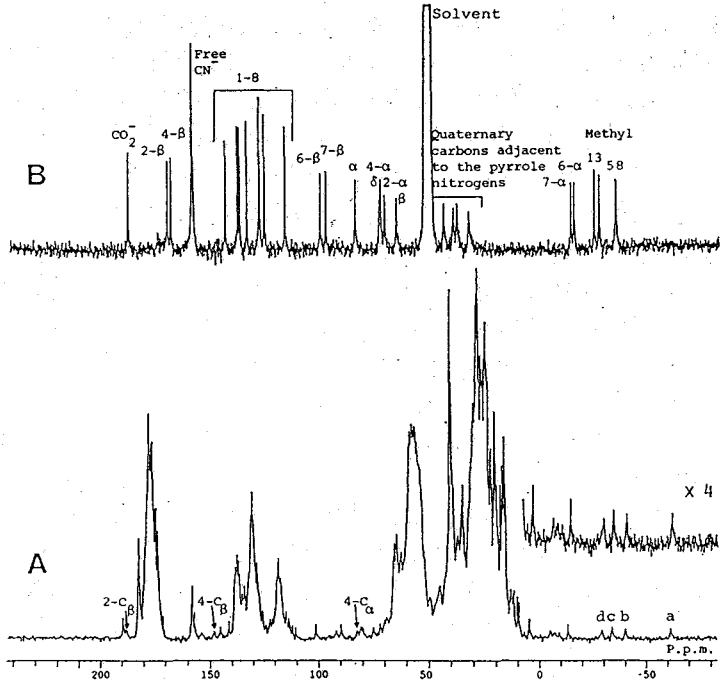


図3. Mb-CN⁻(A)とHemin(CN)₂(CD₃OD中)(B)の¹³C{¹H}スペクトル。測定温度は22°C。最近La Mar⁴により帰属されたヘムピコル基 α, β ¹³Cシグナルを(A)に示した。

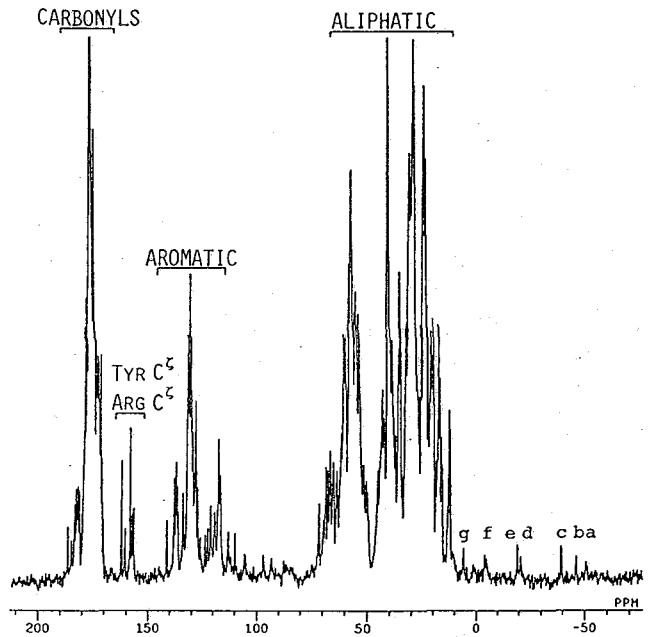


図4. Cyt-C(CN⁻) (35°C)の¹³C{¹H}スペクトル。

b: 8-Me, c: 1-Me, e: 3-Me)の帰属ができた⁶。天然存在比での¹³C-NMRスペクトルでヘムからのシグナルを観測することは、ヘムとタンパク質部分との間に共有結合が存在するためにヘムの炭素を選択的に¹³Cエンリッチ不可能なCyt-C等のC-タイフヘムタンパク質を¹³C-NMRで研究する場合に重要となる。4本のヘムメチル¹³Cシグナルの分離幅は、ヘム鉄の配位場における斜対称性に関する歪みの程度を反映する。Hemin(CN)₂の場合は10.3ppmであるのに対し、Mb-CN, Cyt-C(CN)では約31ppmとなっており、ヒスタジンのイミダズル環がヘム鉄に配位することによって変化するヘムの電子構造に対して、これらの¹³Cシグナルは敏感であることがわかる。なお、MbとCyt-Cでは、ヘム平面に対するイミダズル環の配向が異なっている(図5)にもががあらわ、ヘムメチル¹³Cシグナル分離幅が、両タンパク質でほぼ等しいことは、31ppmの分離幅は、Fe³⁺含タンパク質に対して典型的な値であるといえることができる。

次に、ヘムメチル¹Hと¹³Cシグナルの超微細シフトを比較してみる。メチル¹Hにヒロ-1³C炭素のp軌道から超共役(図6)によって生み出す対電子スピンドル核スピンの超微細

カップリング定数(A_{CH_3})は、McConnellタイプ⁷の式を使って(1)式のように書ける。

$$A_{CH_3}^H = \frac{Q_{CCH_3} \rho_C^\pi}{2S} \quad (1)$$

$$\delta_{con}^H = A_{CH_3}^H \frac{|\gamma_e|}{|\gamma_H|} \frac{S(S+1)}{3kT} \quad (2)$$

$$\delta_{con}^C = Q_{C-C}^C \rho_C^\pi \frac{|\gamma_e|}{|\gamma_C|} \frac{S(S+1)}{3kT} \quad (3)$$

A_{CH_3} を用いて(2)式のように表わされる。 γ_e と γ_H は、電子と¹Hの磁気回転比。メチル¹³Cのコンタクトシフト(δ_{con}^C)は、近似的に、 π - σ 相互作用パラメータ(Q_{C-C}^C)を用いて同様な式(3)で表わされる。したがって、それぞれのメチル基について、 δ_{con}^H に対して δ_{con}^C をプロットすれば、傾き($Q_{C-C}^C \gamma_H / Q_{CCH_3} \gamma_C$)の色線と与えるはずである。実際に δ_{con} を見積もることは困難なため、ここでは、擬コンタクトシフトの δ_{para} は、メチル¹H核及び¹³C核間でほぼ等しいと仮定して、 δ_{con} の代わりに $\delta_{para} = \delta_{obs} - \delta_{dia}$, δ_{obs} , δ_{dia} は観測シフト及び非磁性性シフトを用いてプロットした結果が図7である。

REFERENCES

1. K. Wüthrich and R. Baumann, *Helv. Chim. Acta* **57**, 336 (1974).
2. H. M. Goff, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3714 (1981).
3. Y. Yamamoto and N. Fujii, *Chem. Lett.*, 1703 (1987).
4. S. S. Sankar, G. N. La Mar, K. M. Smith, and E. M. Fujinari, *Biochim. Biophys. Acta* **912**, 220 (1987).
5. Y. Yamamoto, *FEBS Lett.* (1987), in press.
6. Y. Yamamoto, N. Nanai, Y. Inoue, and R. Chūjō, submitted for publication.

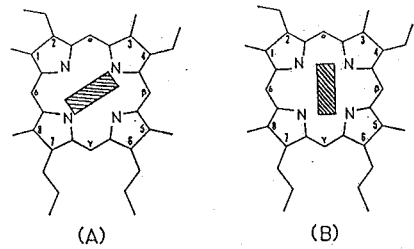


図5.ヘム鉄に配位したイミダズル環の配向。(A)Mbでは、イミダズル環平面がN-Fe-Nの軸より約19°おかれている。(B)Cyt-Cでは、イミダズル環はほぼ α - γ メソプロトンの軸に沿っている。

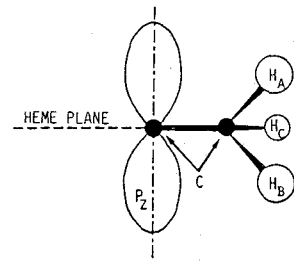


図6.ヘムのメチル基の立体配置。

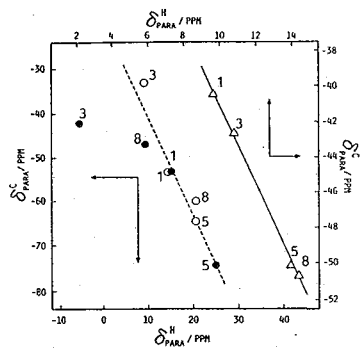


図7.ヘムメチルプロトンの超微細シフト(δ_{para}^H)に対してヘムメチルカーボンの超微細シフト(δ_{para}^C)とそれぞれのメチル基についてプロットしたものである。Cyt-C(O), Mb(●), Hemin(Δ)。图中数字は、メチル基の番号を示す。 δ_{dia}^H は、Cyt-C(Fe³⁺), Mb-CO, Znポルフィリンより得た。 δ_{dia}^C は13.85ppmとした。

¹H-NMRで見た meso-テトラプロピルヘミンを含むミオグロビンの構造

(京都薬大) 〇根矢 三郎・舟崎 紀昭

Proton NMR Study of the Myoglobin Reconstituted with meso-Tetra(n-propyl)hemin.

Saburo Neya and Noriaki Funasaki

(Department of Physical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University)

Sperm whale myoglobin was reconstituted with meso-tetra(n-propyl)hemin. The structure of the reconstituted myoglobin was examined by monitoring the hyperfine-shifted pyrrole-proton signals of the hemin. The NMR results suggests that introduction of the synthetic hemin totally disrupts the highly stereospecific heme-globin contacts, making the prosthetic group very mobile in the heme cavity.

ミオグロビン、ヘモグロビンおよびパルオキシダーゼなどのヘムたんぱく質は活性中心にプロトヘミンを持つ。それらの機能発現にはヘムとグロビンとの相互作用が重要であると言われている。ヘムグロビン相互作用を調べるためにプロトヘミンを化学修飾しアポたんぱく質と結合させる再構成法が広く使われている。今まで使われたヘムはプロトヘミン類似物が多い。一方、meso-テトラプロピルヘミン(TnPzP, 図1)は化学合成で得られるヘムで4つのピロール環に置換基が無く meso位炭素にn-プロピル基をもつ。天然のプロトヘミンに比べかなり構造の異なるTnPzPは付加するHの種類が少なく分子対称性もよい。またアポたんぱく質との結合に際しウラーオモテの入れ違いが起らない。TnPzPをミオグロビンに組み込めばヘムグロビン相互作用の激変が期待できる。しかし今までTnPzPをミオグロビンに導入した例は無い。そこで私達はTnPzPを含むミオグロビンを作り、常磁性シフトしたNMRシグナルを調べ、その構造について知見を得た。

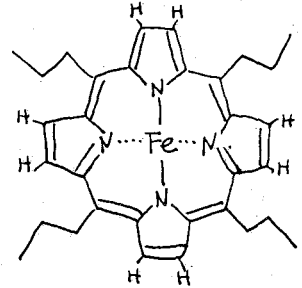


図1 meso-テトラプロピルヘミン(TnPzP)。8個のピロールHとメソ位炭素につく4個のn-プロピル基をもつ。

[実験]——TnPzPは既報の方法で合成し、鉄錯体はジメチルホルムアミド中FeCl₂存在下でTnPzPを還流して得た。TnPzP(Fe)とアポミオグロビンの再構成は文献に従った。¹H-NMRスペクトルはVarian XL-300分

光器にて得た。

[結果]

電子スเปクトルによる観察 —— Λ_4 を取り除いたアポタンパク質とTnPrP(Fe)と9分光濃度より両者の1:1結合を確かめた。セルロースカラムクロマトグラフィーにより精製した分画はタンパク質および Λ_4 に由来するそれぞれ280, および416 nmの吸収極大をもつが, その吸光度比 A_{416}/A_{280} は3.8と大きくサンプルによる変動はほとんど無かった。TnPrP(Fe^{3+})を含むニオグロビンの可視吸収はpH5-10間で変わらず, 天然ニオグロビンに見られるようなpHに依存した著しいスเปクトル変化は起らなかった。TnPrP(Fe^{3+})ニオグロビンは CN^- や N_3^- などの外部配位子と1:1で結合するがその親和性は天然ニオグロビンと比べて1/100程度と低い。 CN^- を過剰に加えても可視吸収変化は見られず2分子目の CN^- 結合は起らないと考えられる。TnPrP(Fe^{3+})ニオグロビンは還元剤添加で鉄2価化合物となり明瞭なスเปクトル変化を示す。鉄2価, 3価の化合物のスเปクトルは何れも天然ニオグロビンのものとは全く似ていない。これは天然のプロト Λ_4 とTnPrPとで Λ_4 置換基の種類, 巻数, 向きが全く異なるためであると考えられる。

1H -NMRによる観察 —— TnPrPはピロール環に8個のプロトンをもつ(図1)。このピロールHは分子内に対称的に並んでいるが, 非対称なニオグロビン環境の影響を受け易く, Λ_4 鉄の電子状態も反映しやすい。更に8つのピロールHはNMRスเปクトル上で吸収強度も大きく容易に判別できる利点がある。私達は主にピロールHに着目してニオグロビンの構造解析を進めた。

図2は鉄3価のTnPrP(Fe^{3+})ニオグロビンおよびその SCN^- , CN^- 錯体のNMRスเปクトルを示す。吸収強度の大きいピロールHは容易に同定でき, 何れも-5~-15 ppm領域にみられる。ピロールHシグナルのパターンや線幅は各化合物で大きく異なりTnPrP(Fe^{3+})ニオグロビンでは1本線, SCN^- 錯体では広幅な一本線(半値幅約1200 Hz), CN^- 錯体では4本線(約5, 6, 9および12 ppm)となっている。一方, 鉄2価のデオキシニオグロ

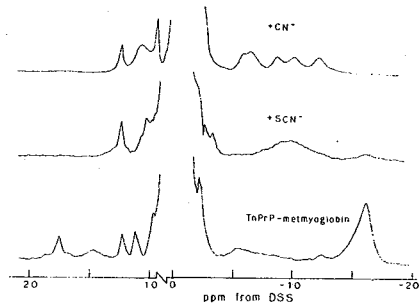


図2 $meso$ -テトラプロピルアミンを含む酸化型ニオグロビンのNMRスเปクトル。温度は23°C。ピロールHに由来するシグナルが何れも-5~-15 ppmにみられる。

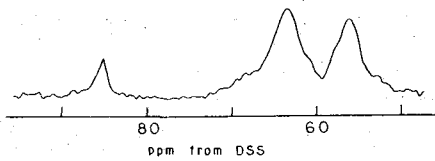


図3 デオキシ TnPrP(Fe³⁺)三オクロビンのNMRスペクトル。温度23°C。H₂O中にて測定。約85 ppmのピークは交換性プロトンでD₂O中では出現しない。約55および65 ppmシグナルはセロールHの共鳴線。

セもハ4鉄の常磁磁性により大きく低磁場シフトしたセロールHシグナルを55~65 ppm領域に示す(図3)。図3ではセロールHは2本の共鳴線としてみられる。85 ppmの約1個のプロトンに由来するシグナルは交換性ピークで重水中ではみられない。

NMRスペクトルの温度依存性—— TnPrPのセロールHに由来するシグナルは温度により著しくパターン変化を示す。この様なスペクトルパターン変化は天然三オクロビンでは観察された事が無く TnPrP・三オクロビンに固有の現象である。図4には例として、CN⁻錯体のスペクトル変化を示す。昇温につれてセロールHに由来する4本のシグナルは徐々に融合し40°Cでは広幅な1本線、60°Cでは更に線幅の狭い単一ピークになる。40°Cおよび60°CでのセロールHシグナルパターンは室温でのSCN⁻錯体およびTnPrP(Fe³⁺)三オクロビンのもの(図2)と類似している。図4の変化は可逆的で再現性があった。同様なスペクトルパターン変化はデオキシ三オクロビンのセロールHシグナルでも見られ、昇温とともにシグナルは1本の狭い共鳴線へと可逆的に融合した。このようなセロールHシグナルの融合は三オクロビンに結合したTnPrPにおいて動的過程が存在する事を示している。

[議論]

TnPrPを含む三オクロビンの構造——
一分光滴定により TnPrPとアポEはく質が1:1で結合することが判明した。図3でハ4鉄の常磁性交差効果を受けた交換性プロトンが1個のみ産生測定されることはTnPrPと三オクロビンとの結合がランダムではなく特異的であることを示唆する。TnPrPは疎水性分子であり親水性たんぱく質表面よりも疎水性なハ4ポケットにあると考えられる。この考え方はCN⁻滴定の結果からも支持される。2分子目のCN⁻結合がみられなかったことはハ4鉄の第5配位座がブロックされ、たんぱく質表面にハ4

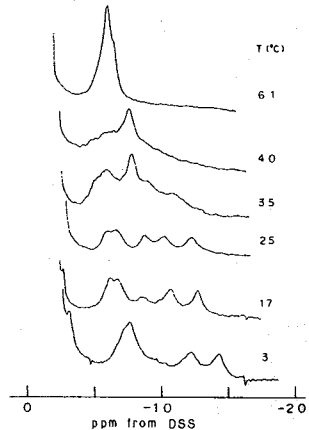


図4 TnPrP(Fe³⁺)三オクロビン・CN⁻錯体のNMRスペクトルの温度依存性。

がゆるく結合しているのでは無いと考えるのが妥当である。従って図3の交換性Hシグナルは近位His (F8)に由来すると考えられ、Fe-N(His F8)結合を通じ鉄のスピンの近位Hisに流れ込んでいることを示している。

興味深いことに、外部配位子を加えないニオグロビンではゼロールHが-16 ppmに見られる。一般にホルフィン(Fe³⁺)のゼロールHはスピン状態に敏感で、高および低スピン錯体ではそれぞれ+55および-15 ppm近くに出現する⁽¹⁾。図2では-16 ppmにゼロールHがあり、TnPrP(Fe³⁺)ニオグロビンが低スピン状態にあることを示している。このニオグロビンの可視スペクトルはpH依存性が無く、4鉄に水は配位していないと考えられる。CN⁻などの外部配位子に対する親和性も小さい事より4鉄の第6配座には遠位His (E7)残基が存在すると思われる。

重く4鉄 — TnPrPの等価なゼロールH (図1)は非対称な4鉄ポケット内では非等価になり単一の共鳴線を与えないと考えられる。この予想に反し、TnPrP(Fe³⁺)ニオグロビンおよびSCN⁻錯体ではゼロールHは単一の吸収線となっている(図2)。これは4鉄環境の非対称性を消す効果がTnPrPに作用するためである。一般に、低スピン型4鉄たんぱく質では最高被占軌道を通してπ型の不均等スピン密度分布が4鉄で起きるとされるが⁽¹⁾、スピン密度分布を決める主要因の一つにHis (F8)イミダゾール面の配向性が挙げられている⁽²⁾。イミダゾール平面がFe-N(イミダゾール)結合まわりに自由回転するとスピン密度分布が平均化され単一のゼロールHシグナルがみられる⁽³⁾。一方ニオグロビンではHis (F8)イミダゾール面の配向性は共有結合で固定されているのでその自由回転は考えにくい。従ってTnPrP(Fe³⁺)ニオグロビンやSCN⁻錯体の単一ゼロールHシグナルに反映されたスピン密度分布の対称性は4鉄ポケット内でTnPrPがFe-N(His F8)結合を軸に自由回転しているために生じると考えられる。SCN⁻錯体にはTnPrP・ニオグロビンではゼロールHシグナルの線幅が半分程度なのは動的過程の速度差を反映していると考えられる。図4に示される様に、CN⁻化合物の4本のゼロールHシグナルも昇温とともに融合し遂には狭い1本線になるが、これは昇温によるTnPrPの自由回転促進によるスピン密度分布平均化を反映すると考えられる⁽⁴⁾。

[結論]

TnPrPを4鉄ポケットに導入すると4鉄-グロビン相互作用は著しく変化す。このため遠位His (E7)の4鉄への結合が起きたり、ホルフィン環の運動性が大きくなりFe-N(His F8)結合を軸に動的自由回転をする様になる。

[文献]

- (1) La Mar, G. N., and Wakler, F. A. (1979) *The Porphyrins*, 4, 61-157.
- (2) Shulman, R. G., Glarum, S. H., and Karplus, M. (1984) *J. Mol. Biol.* 57, 93-115.
- (3) Wakler, F. A. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102, 3254-3257.
- (4) Neya, S., and Funasaki, N. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 6725-6728.

多ヘムタンパク質の酸化還元電位の¹H-NMRによる決定

(横浜国大工・阪大蛋白研・) ○阿久津秀雄・苑 可君・
仁木克己・京極好正・

Determination of the Redox Potentials of a Multiheme Protein by ¹H-NMR

Hideo Akutsu, Kejun Fan, Katsumi Niki and Yoshimasa Kyogoku*

(Faculty of Engineering, Yokohama National University and *Institute for Protein Research, Osaka University)

The redox potential of a redox protein is an essential physicochemical parameter needed to elucidate the mechanism of an electron transport system. Although the redox potential of a single redox center can be easily determined, those of a protein with multiredox centers are difficult to be determined. We have established a new method to determine the macroscopic and microscopic redox potentials of a multiheme protein by employing ¹H-NMR in combination with OTTE (optically transparent thin layer electrode). The feature of this method is discussed in comparison with other methods.

硫酸還元菌は末端電子受容体として硫酸塩を利用し、分子状水素などが酸化されるときエネルギーで生活を営む、もっとも原子的な呼吸を行う嫌気性菌である。この菌のマーカー蛋白質であるチトクロムC₃は四つのヘムを持ち、電子伝達に参与している。このような多ヘム蛋白質は嫌気性菌、光合成細菌を中心にかなり見いだされている。しかし、複数のヘムの果たす生理的役割についてはまだ明らかになっていない。多ヘム蛋白質は主に電子伝達に関係していると考えられているが、その場合酸化還元電位が重要な意味を持つ。モノヘム、即ち酸化還元中心が一つの場合は電気化学的な方法で容易に酸化還元電位を決定できる。しかし、酸化還元中心が複数になると酸化還元電位が複数個存在する為その決定は容易ではない。図1に、本講演で取り上げるチトクロムC₃のように四つの酸化還元中心を持つ場合の酸化還元状態と電位の関係を示す。まず、蛋白質分子を単位にしてみると完全酸化、一電子、二電子、三電子還元と完全還元の五つの状態（巨視的酸化還元状態）が存在する。これらの状態の分子の存在割合（ $f_0 \sim f_{10}$ ）を決めているのが E_1, E_2, E_3, E_4 の四つの巨視的酸化還元電位である。一方、一口に一電子還元といっても、ミクロに見れば四つの分子種が存在する。1~4の分子種では還元されているヘムが異なっている。このようなミクロな酸化還元種は図のように16個存在する。これらの間には32個の微視的酸化

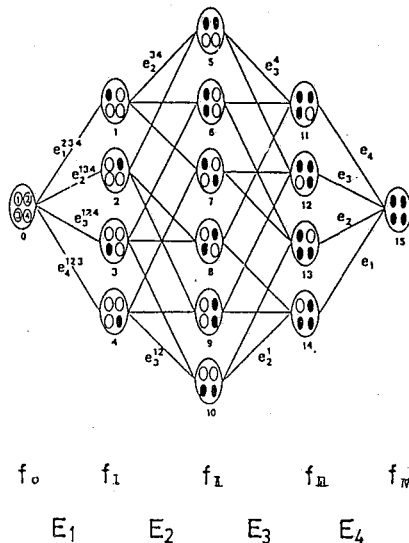


Fig. 1 Definition of macroscopic and microscopic redox potentials of a tetraheme protein. E_i : macroscopic redox potential, e_{ijkl} : microscopic redox potential of i -th heme with j, k, l -th hemes oxidized, f_i : fraction of molecules in the i -electron redox state.

還元電位 $e_{i,j,k,l}$ が定義される。これは個々のヘムについての酸化還元電位で、基本的には四つしかない筈だが、ヘム間相互作用の為に数が多くなる。このようにパラメータが多くなると通常の電気化学的方法では一義的に決定できない。XavierらはNMRで微視的酸化還元電位を決められる可能性を示したが、実測値が足りない為に決められなかった。従って、現在まで多ヘム蛋白質の全ての酸化還元電位をヘム間相互作用を考慮にいたした上で決めた例はない。われわれはNMRを主な手段として、これらを決定することに成功したので報告する。

I. 巨視的酸化還元電位の決定

図2に *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki株より精製したチトクロムC₃の500 MHz ¹H NMRスペクトルを示す。一番上は完全酸化型のスペクトルで、典型的な酸化型低スピンのヘム蛋白質の特徴を示す。ここで、ヒドロゲナーゼ存在下で、アルゴンガスと水素ガス分圧を変えていくと様々な還元状態のスペクトルを得ることができる。その変化の様子が図2の上から下に向かって示されている。還元が進むとシグナルの位置は変化せず、強度が減少してゆき、全く新しいシグナルが別の所に現われて来る。全過程をとうして、五セットのスペクトルが現われては消える。この現象から、それぞれのスペクトルは五つの巨視的酸化還元状態に対応し、電子の移動速度は分子内のヘム間ではNMRの時間尺度よりも速く、分子間では遅いとして説明される。この結果を用いれば、各酸化還元状態のスペクトル強度より、中間状態での各巨視的酸化還元状態の分子の存在割合を知ることができる。そこで、これをその電位的環境と関係づけることができれば巨視的酸化還元電位を決定でき

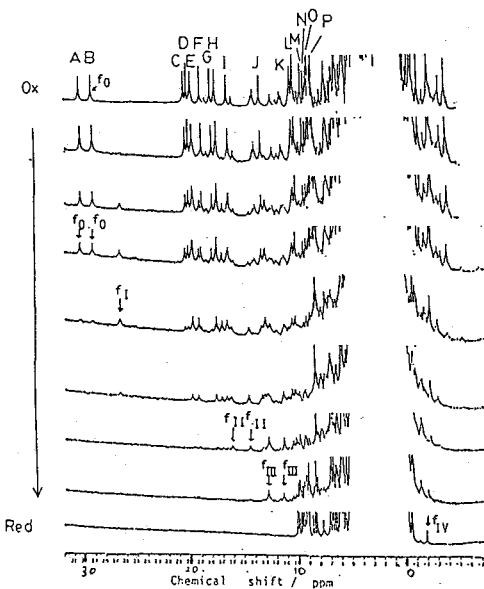


Fig. 2 500MHz ¹H NMR spectra of cyt. c₃ (MF) in several redx states at 30°C, p^H 7.0.

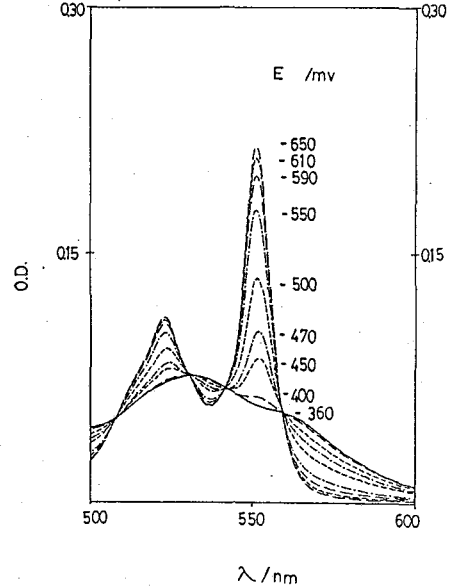


Fig. 3 OTTLE absorption spectra of cyt. c₃ (MF) at several applied potentials (30°C, pH 7.0).

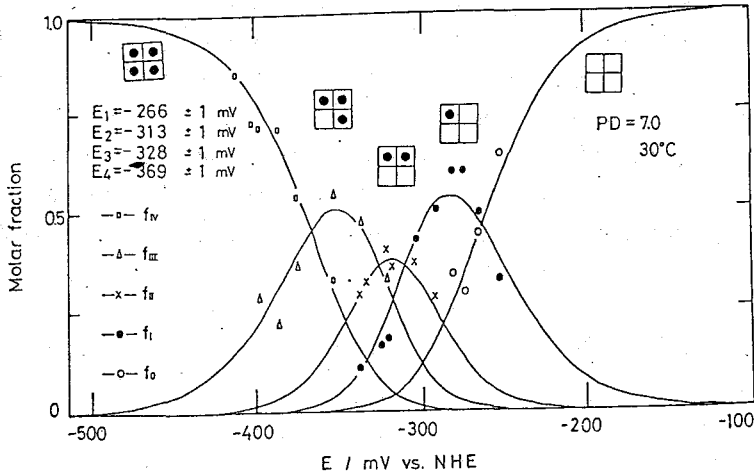
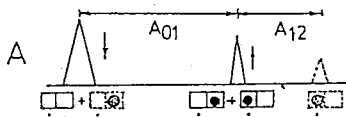


Fig. 4 Molar fraction of cyt. c₃ in each state as a function of potentials. Symbols represent the observed values. Solid lines are best-fit curves obtained by nonlinear least square fitting. The obtained macroscopic redox potentials are given in the figure.

した。実線は非線形最小二乗法によりフィッティングしたものである。隣り合う状態の曲線の交点が巨視的酸化還元電位を与える。求めた値は図中に示してある。

II. 微視的酸化還元電位の決定

図2のスペクトルの強度からは巨視的酸化還元電位が決定されたが、化学シフトの情報は微視的酸化還元電位の情報を含んでいる。図5は二つの酸化還元中心(A, B)を例にとって、その関係を示している。電子が分子内で速い交換をしている場合、ヘムA, Bのシグナルは共に完全酸化と完全還元の中間に現れ、そのシフトの位置は図に示したようにそれぞれのヘムに電子が存在する割合に比例する。これを電子分布確率Rと定義すると、ヘムAとヘムBの微視的酸化還元電位の差は式(1)のようにRによって与えられる。従って、それぞれのヘムについて全ての巨視的酸化還元状態での化学シフトを決定し、電子分布確率を見積れば、微視的酸化還元電位の相対値を決めることができる。更に微視的酸化還元電位と巨視的酸化還元電位の関係を用いれば絶対値を求めることができる。



$$\frac{A_{01}}{A_{01} + A_{12}} = \frac{[\text{A}^{\bullet}]}{[\text{A}^{\bullet}] + [\text{B}^{\bullet}]} = R_I^A$$

$$\frac{B_{01}}{B_{01} + B_{12}} = \frac{[\text{B}^{\bullet}]}{[\text{B}^{\bullet}] + [\text{A}^{\bullet}]} = R_I^B$$

$$e_A^{\circ} - e_B^{\circ} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{A}^{\bullet}]}{[\text{B}^{\bullet}]} \\ = \frac{RT}{F} \ln \frac{R_I^A}{R_I^B} \quad \dots (1)$$

Fig. 5 Relationship between microscopic potential (e) and electron distribution probability (R). $A_{01} + A_{12}$ = paramagnetic shift of heme A.

る。

この目的の為に光透過性薄膜電極(OTTE)を用いた。OTTEで様々な電位をかけて、測定した吸収スペクトルを図3に示す。NMR測定の前後も吸収スペクトルを測定し、それを図3の結果と比較することにより、電位を決定した。図4にNMRより求めた各巨視的還元状態の存在比を電位に対してプロット

ヘムメチル基の各巨視的酸化還元状態での化学シフトは様々な中間状態に対して飽和移動(saturation transfer)法を適用して決定した。16本のヘムメチル基の内7本については全ての状態

で、残りの9本については部分的に化学シフトが決まった。これらの値から、第一次近似としての電子分布確率Rを計算し、これを使って16本のヘムメチルシグナルを四つのヘムに分類することができる。各ヘムの内で全ての状態での化学シフトが決まったヘムメチル基について電子分布確率の平均をとったものが表1である。縦についても、横についてもその和がほぼ1に近いことは第一次近似としては妥当な値であることを示している。この値を用いて計算した32個の微視的酸化還元電位を図6に示す。但し、この計算ではヘム間の相互作用ポテンシャル(I_{ij})を導入して、パラメータを10個に落としている。

III. 考察

多ヘム蛋白質の巨視的酸化還元電位の決定はバルスポーラログラフイー等の電気化学的方法、及びESRによる方法などがある。これらの方法では電子移動に関するモデルを立て、それを

Table Electron distribution probability at each heme in four one-electron redox steps

	R_I	R_{II}	R_{III}	R_{IV}	Σ
Heme 1	0.670	0.051	0.112	0.168	1.001
Heme 2	0.076	0.535	0.336	0.050	0.997
Heme 3	0.047	0.233	0.535	0.185	1.000
Heme 4	0.184	0.210	0.022	0.584	1.000
Σ	0.977	1.029	1.005	0.987	

基にした理論曲線へのフィッティングより、巨視的酸化還元電位を見積る。これらと比較して今回の方法は精度において若干劣るが、モデル抜きで巨視的酸化還元電位を直接決められる点で優れている。また、微視的酸化還元電位に関しては、今のところNMRがこれを決定できる唯一の方法である。現在、擬コンタクト項の寄与を見積ることによる微視的酸化還元電位の値の精密化を進めている。

Redox potential
mV vs. Ag/AgCl

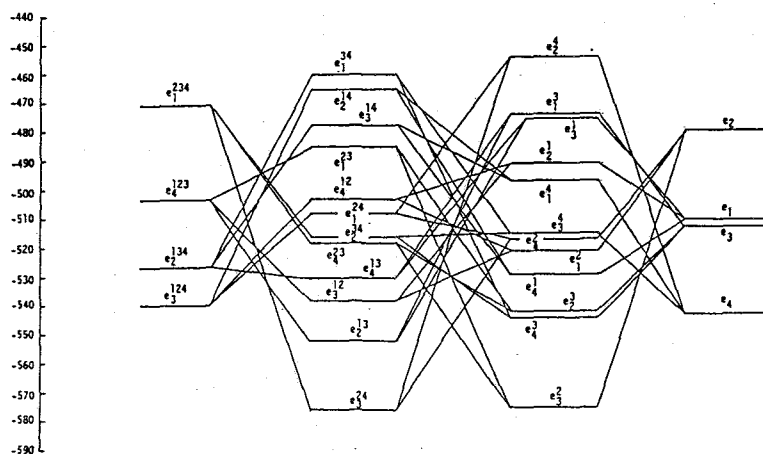


Fig. 6 Obtained 32 microscopic redox potentials of cyt. c_3 (MF). The definition of e_j^{k1} is given in figure 1. Left and right sides are completely oxidized and reduced states, respectively.

謝 辞

本測定の一部で便宜をはかっていただいた日本電子株式会社に感謝します。

転移リボ核酸の動的構造と機能との関連性の解析

(東大理) ○河合剛太・横山三紀*・横山茂之・宮澤辰雄
(*現・日大松戸歯)

¹H-NMR Analyses of the Dynamic Structure and Functions of tRNA

Gota Kawai, Miki Hara-Yokoyama, Shigeyuki Yokoyama and Tatsuo Miyazawa
(Faculty of Science, University of Tokyo)

The functions of tRNA are closely related with the dynamic structure of tRNA. To observe ¹H-NMR signals from the flexible parts of tRNA, we applied the methods of spin echo, spin diffusion and 2D-NMR. With these methods, the signals from the flexible parts, the anticodon loop and 3' terminus, were observed selectively. Some of proton signals of the adenosine residue of the 3' terminus and the 5-methylaminomethyl-2-thiouridine residue in the first position of the anticodon of *E. coli* tRNA^{Glu} were assigned by NOESY and HOHAHA. The functions of these residues will be discussed.

転移リボ核酸 (tRNA) は、約80個のヌクレオチドから成る分子量2万8千ほどの分子 (図1) であり、タンパク質合成において、アミノ酸とコドンをつなげるアダプターの役割を果たしている。tRNAは、その3'末端 (CCA_{OH}) にアミノ酸を結合し、アンチコドンでmRNAのコドンと塩基対を形成する。多くのtRNAは4つのステムと4つのループおよびCCA末端から成っている。X線結晶解析によれば¹⁾、Tループ、Dループおよびバリアブルループは、おたがいに水素結合を形成してまとまっており、アンチコドンループおよびCCA末端部分のみが1本鎖である。すなわち、tRNAのアミノ酸結合およびコドン認識という2つの重要な機能を担う部分はそれぞれ1本鎖として存在している。私たちは、複雑なtRNAの¹H-NMRスペクトルから、これらの2つの部分についての情報を抽出し、その動的構造と機能との関連性を解析することをめざしている。

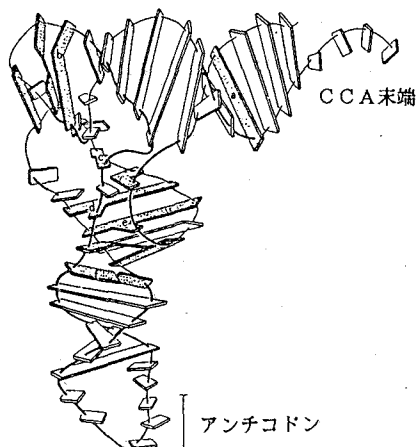


図1. tRNAの構造

水素結合によって固定されている部分にくらべ、1本鎖の部分は運動性が高いと考えられる。したがって、それらのシグナルを抽出するために、スピンエコーやスピン拡散などの方法をもちいた。さらに、2次元NMRによっても運動性の高いプロトンからのシグナルを抽出することを試みた。2次元NMRにおいては、展開期および混合期に、運動性の低いプロトンのシグナルは、 T_2 緩和により小さくなる。また、shifted sine-bell等の適当なウィンドウ関数を利用することによっても、運動性の高いプロトンのシグナルのみを抽出することができる。

今回は、大腸菌より精製したグルタミン酸に特異的なtRNA (tRNA^{Glu}) について、37°Cで400MHz ¹H-NMRの測定を行なった。図2にそのノーマル・スペクトル、NOESYの投影スペクトルおよびスピンエコー、スピン拡散のスペクトルを示した。NOESYは、混合時間50msecで測定し、t₂およびt₁方向について、それぞれπ/8シフトしたsquared sine-bellおよびsine-bellのウインドウ関数を持ちいてフーリエ変換した。スピンエコーは、CarrとPurcellの方法により30msec間おこなった。また、スピン拡散は、リボースのプロトンのシグナルが集まる4.4ppmをラジオ波で50msec照射して測定したものである。NOESY、スピンエコーおよびスピン拡散の3つのスペクトルは、非常によく似ており、これらのいずれの方法によっても運動性の高いプロトンのシグナルを同程度に抽出することができることがわかった。

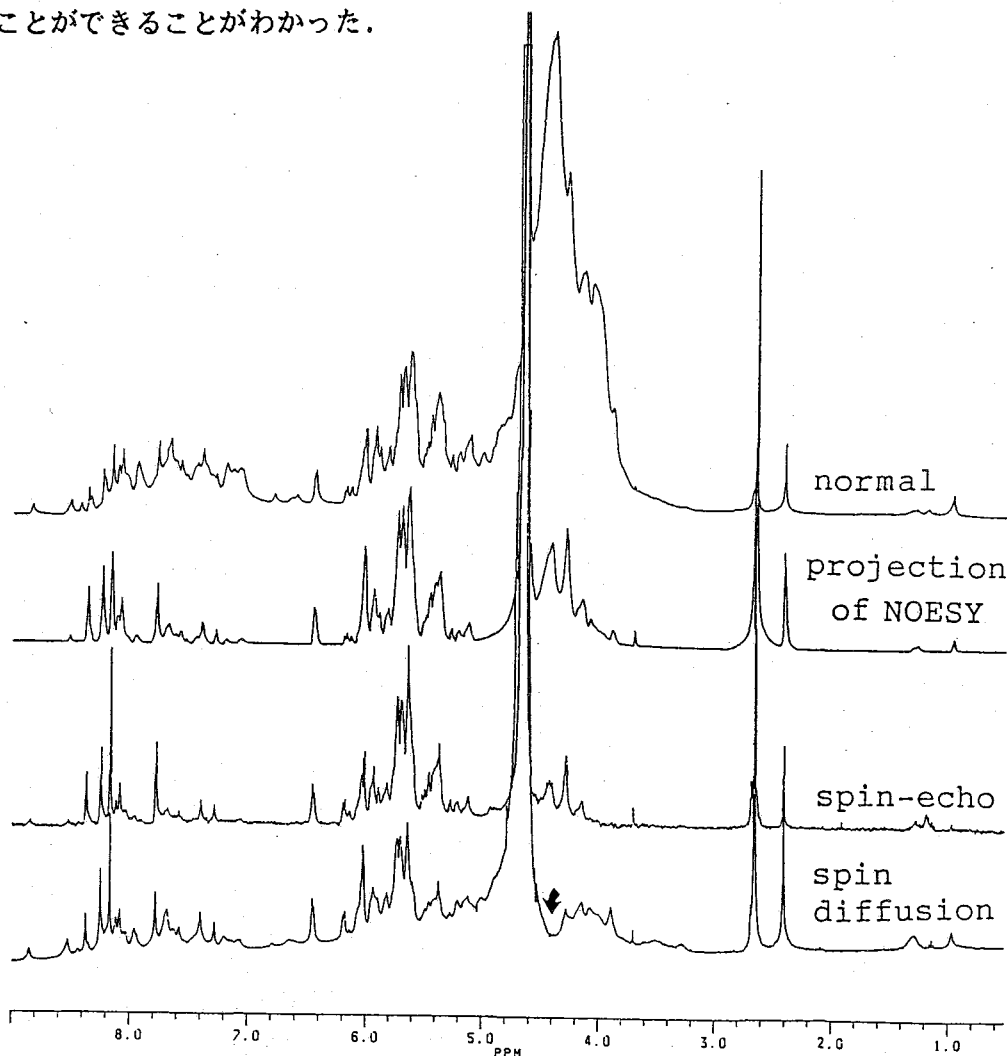


図2. E. coli tRNA^{Glu}のNMRスペクトル

つぎに、CCA末端のアデノシン (A_{76}) 残基および、アンチコドン1字目の修飾ウリジン (5-methylaminomethyl-2-thiouridine, mnm^5s^2U) のプロトンのシグナルの帰属を試みた。 A_{76} の3'の水酸基にはアミノ酸が結合し、 mnm^5s^2U は、コドン3字目のAまたはGと水素結合を作る重要な残基である。

A_{76} の塩基のプロトン ($H8$, $H2$) のシグナルは、非常にシャープであり、ほかのシグナルと区別することができる。図3に、*E. coli* の $tRNA^{Glu}$ および 枯草菌の $tRNA^{Val}$ の スピンエコー・スペクトルにおいて、 A_{76} の塩基のプロトンのシグナルを示した。このように、 A_{76} のシグナルは、2つの $tRNA$ において、非常によく似ていた。このことは、この残基の共通の機能を反映していると考えられる。

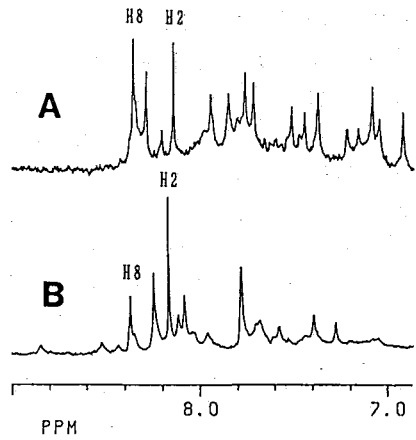


図3. 枯草菌 $tRNA^{Val}$ (A) および *E. coli* $tRNA^{Glu}$ (B) のスピンエコー・スペクトル

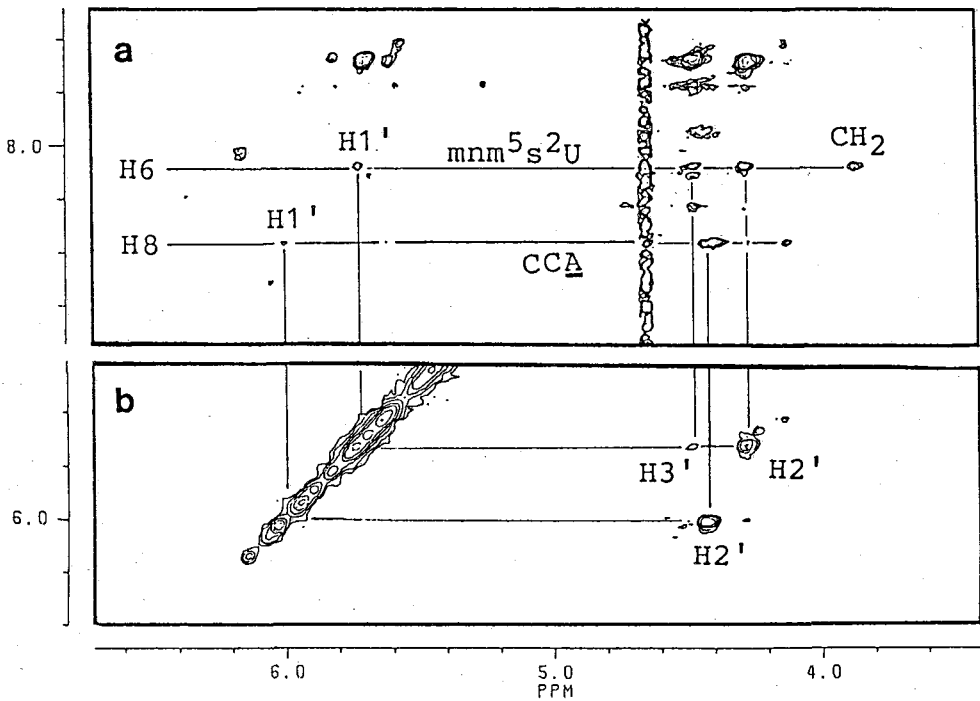


図4. *E. coli* $tRNA^{Glu}$ の NOESY (a) および HOHAHA (b) スペクトル

図4に、*E. coli* tRNA^{Glu}のNOESYおよびHOHAHAスペクトルの一部を示した。NOESYは、magnitude modeで測定し、運動性の低いプロトン由来のブロードなシグナルを消すために、t2およびt1について、それぞれ $\pi/8$ シフトしたsquared sine-bellおよびsine-bellのウインドウ関数を用いてフーリエ変換した。また、HOHAHA (phase-sensitive mode) の場合には、混合時間の間にスピネコーを行なっているため、シグナルを観測するときに、すでに運動性の低いプロトンのシグナルは減衰している。したがって、t2、t1の両方向について、 $\pi/2$ シフトしたsine-bellという比較的弱いウインドウ関数を用いてフーリエ変換した。どちらのスペクトルにおいても少数のシグナルのみが、選択的に観測された。

NOESYスペクトルにおいて、A₇₆のH8とリボースのプロトンの間にNOEが観測された。それらのプロトンのなかで、H1'は、その化学シフトにより帰属された。さらにHOHAHAスペクトルにおいて、H1'とのカップリングによりH2'が帰属できた。また、枯草菌のtRNA^{Val}においても、A₇₆について同様な帰属に成功している。

mnm⁵s²Uの場合は、5位の側鎖のメチルおよびメチレン・シグナルは、その化学シフトから容易に帰属できる。NOESYスペクトルにおいて、メチレン・シグナルとの間のNOEによって塩基のH6のシグナルが帰属できた。H6とリボースのシグナルの間にいくつかのNOEが観測されたが、そのなかで、H1'のシグナルはその化学シフトにより帰属した。さらにHOHAHAスペクトルにおいて、カップリングによりH2'を帰属し、弱い間接的なクロスピークの存在からH3'を帰属した。

mnm⁵s²Uにおいて、H8とH2'およびH3'との間にNOEが観測されることから、この残基が、C3'-endo形をとっていることがわかった。グルタミン酸のcodonはGAAおよびGAGであり、もし、mnm⁵s²UがC2'-endo形をとると、codon3字目がUであるアスパラギン酸のcodonGAUをまちがって認識してしまう。私たちはすでに、モノヌクレオチドにおいて、mnm⁵s²UがC3'-endo形を非常にとりやすいことを明らかにしており、そのコンホメーション特性がまちがった塩基対の形成を防いでいるというモデルを提出している²⁾。したがって、tRNA中においてもmnm⁵s²UがC3'-endo形をとっているという結果は、このモデルを強く支持している。

このように、1Dおよび2Dの様々な手法をもちいて、運動性の高い部分のシグナルを選択的に観測することは、tRNAの動的構造と機能の関連性を解析するために、非常に有効であると考えられる。現在、さまざまなtRNAについてさらに詳細な解析をおこなっている。

なお、枯草菌のtRNAに関しては、自治医大・化学の石倉久之博士、村尾捷利博士および長谷川典巳博士との共同研究である。

REFERENCES

- 1) Kim, S. -H., 1979, TRNASFER RNA:structure,properties, and recognition, Schimmel, P. R. et. al. (eds.), Cold Spring Harbor NewYork, 83-100.
- 2) Yokoyama, S. et. al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4905-4909.

完全緩和行列法による 2D NOE スペクトルの解析

--- DNA オリゴマーの詳細な分子構造 ---

(University of California, S. F.) ○*鈴木榮一郎

DETAILED STRUCTURE DETERMINATION OF DNA FRAGMENTS USING COMPLETE RELAXATION MATRIX ANALYSIS OF 2D-NOE, DQF-COSY METHOD AND MOLECULAR MECHANICS CALCULATIONS.
 Ei-ichiro SUZUKI, Nagarajan PATTABIRAMAN, Gerald ZON and Thomas L. JAMES
 (Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, San Francisco)

Our experimental and theoretical two-dimensional nuclear Overhauser effect spectra, double-quantum-filtered COSY experiments, and molecular mechanics calculations on the self-complementary oligomers $[d-(AT)_n]_2$ indicate that the duplex as a time-average assumes a wrinkled D conformation (B DNA family) with a hydration tunnel in the minor groove. Formation of tunnel is favored by non-bonded and electrostatic interchain sugar-phosphate and ion-DNA interactions in the minor groove. The complete relaxation matrix analysis (CORMA) method played an important role in the structure refinement process of these biopolymers.

《はじめに》 近年、生体高分子の構造解析は、NMR法の発展による恩恵を受け、着実に精密化が進み、溶液中のコンホメーションが詳しく議論されるようになった。即ち、2次元(2D)NMR技法、特に位相敏感手法の発明と発展により、NMR信号の帰属が明確にできる時代となった。しかし、明確に帰属された、定量性のあるNMR信号のデータ・セットを得たとして、それをどう扱うかが肝心である。その意味では、ディスタンス・ジオメトリー法⁽¹⁾は、画期的である。これにより、生体高分子の溶液中の構造をNMRを用いて、本格的に調べられるようになった訳であり、それは、結晶構造をX線で解析するのと同種の作業と言い得る。⁽²⁾だが、NMR現象を利用した手法は、距離や角度の情報だけでなく、分子全体および分子内部の運動状態に関する情報をも与えてくれるし、逆に、それに関する議論抜きでは、距離などの情報が不正確なものとなる点を、その本質としている。その辺の問題意識を掘り下げて、緩和行列を、近似でなく行列解法により、完全に解くことに基づくNOE解析法、すなわち、完全緩和行列法⁽³⁾が、提案された。NOE強度の理論値は、既知の分子構造と相関時間から計算され、行列の形で与えられる(a_{calc})。この時、理論強度は、スピン拡散をも含み込んでいる。そこで、それを実測のNOE強度の行列(a_{obs})と比較して、理論強度との一致を、一番敏感に良くする構造因子から、順次動かして、最適化を行う。いわゆる、偏微分によるヤコビアン:

$$\partial(a_{obs} - a_{calc}) / \partial w_i$$

(但し、 w_i は各々のプロトンのデカルト座標または個々の二面角など)

を数値計算するのが、理想的であるが、この計算は、長時間を要する。⁽⁴⁾そこで、まずは、候補となるモデル構造が入手できる具体的検討対象を探す必要がある。そして、1960年代からの懸案である、A(アデニン)、T(チミン)の交互配列のDNAポリマー $(A-T)_n$ の分子構造の問題に注目した。A・T塩基対は、G・C塩基

*現在・味の素(株)中研分析研究所

対に比べて、水素結合の数が一つ少なく、固定した構造を取り難く、A-T交互配列 DNA の良い結晶が得られていない。そこで構造の推定は、x線繊維写真や NMR に頼らざるを得ず、いくつものモデル構造が提出されるに至った。A型、B型、左巻きB、変形B型、C型、D型、左巻きD型、しわの寄った(wrinkled) D⁽⁵⁾ (W Dと略す)型等、いくつもの提案が成されている。生体内のDNA配列の中で、A、Tに富む領域は、いわゆる遺伝子の発現上、重要な意味を持つことが多い為、問題の難解さにも拘らず、多くの研究発表が成されている。その中の、どのモデル構造が、最も良く実測の2D-NOEスペクトルを説明するかを検討し、有力な構造を2つに絞り込み、最適化計算の代替として、モデル周辺の、エネルギー極小構造を探す計算、即ち、分子力学計算法⁽⁶⁾を用いることを考えた。

《方法》【試料調製】 DNAオリゴマー [d-(AT)_n]₂としては、常法⁽⁷⁾によって合成されたものを用いた。測定溶媒としては、180 mM リン酸緩衝液、200 mM 食塩、0.2 mM EGTA の組成の重水溶液を用いた。3回に渡る凍結乾燥で重水置換を行って、99.996 % D₂O を 0.3 ml 加えて試料とした。測定 pH は、約 7.0 である。DNA オリゴマーの最終濃度は、各試料によって異なるが、約 3-7 mM であった。測定温度は、15 °C を選んだ。

【各種 2D-NMR スペクトル】 PS-2D-NOE、1331-PS-2D-NOE、DQF-COSY の各種スペクトルを測定した。

【NOE 強度の理論計算】 化学交換の速度を求める方法として、いわゆる、"Accordion"法を、Bodenhausen と Ernst が提唱し、⁽⁸⁾ その論文の中で、多スピン系のスペクトル強度を行列解法で求める方法が示されている。その後、化学交換も、NOE 現象も、数学的には、同等なので、その中で用いられた行列解法は、Keepers と James よって、2D-NOE 強度の理論計算に対して実用化された。⁽³⁾ 理論計算の具体的手順を以下に述べる。

① 分子運動のモデル化を行う。

これは、いわゆるスペクトル密度 $J(\omega)$ の計算に必要であり、通常、等方的運動モデルを用いる。その際、パラメータである相関時間 τ_c を見積る必要がある。

$$J(\omega) = 2\tau_c / (1 + \omega^2\tau_c^2)$$

$$\omega = 2\pi\nu \quad (\nu \text{ は、観測周波数})$$

② 分子構造として適当なモデルを見つける、または、新たに、モデル構造を組む。

これは、最適化計算を行うに当たって、出発となるモデル構造を設定する必要性があるためである。例えば、ディスタンス・ジオメトリー法の解などが良い。

③ ②のプロトンの座標と、スペクトル密度から、緩和行列 R を構築する。

$$R = \begin{bmatrix} R_{11} & R_{1j} & \dots \\ R_{j1} & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots \end{bmatrix}$$

$$R_{ii} = \sum (W_{e^{ij}} + 2W_{i^{ij}} + W_{e^{ij}}) + R_{ii}$$

$$R_{ij} = (W_{e^{ij}} - W_{e^{ij}})$$

④ 緩和行列 R を対角化する行列 χ (固有ベクトルの行列)と、その対角行列 λ (固有値)を求める。

$$\chi^{-1}R\chi = \lambda$$

⑤ 2D-NOE スペクトル中の交差及び対角ピークの理論強度 $a(\tau_m)$ (τ_m は、混合時間)が計算される。

$$a(\tau_m) = \chi \exp(-\lambda \tau_m) \chi^{-1}$$

【分子力学計算】 分子力学 (Molecular Mechanics) および分子ダイナミックス (Molecular Dynamics) の計算には、AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) プログラム (Version 3.0)⁽⁶⁾ を用いた。このプログラムは、いわゆるエネルギー局所極小 (local minimum) 構造を探すものである。

【分子グラフィックス】 分子モデルの図形表示をするために、MIDAS (Molecular Interactive Display and Simulation) プログラム⁽⁹⁾ を使い、次のような機能を利用した。

- ① 各原子 (プロトン以外) の座標をもとに、分子構造を構築する。
- ② 構造の単位要素 (部品) を複数個入力しておいて、それらを連結させる。
- ③ それを基に、プロトンの原子座標を計算する。これが、NMR データと対応する。
- ④ 溶媒が近づき得る限界としての分子の表面像を計算する。

《結果と考察》 先ず、対象とした DNA オリゴマーの塩基配列は、[d(5'ATATATATATS')]₂ である。生物学的意義と関連して、TATA ボックスの分子構造は、深く興味を惹くものである。詳細は、文献⁽¹⁰⁾を参照されたいが、以下簡単に概略を述べる。即ち、”本研究で、候補となるモデル構造の範囲を広げて、それら全てについて平等に、2D-NOE スペクトルの理論計算を行い、実測のスペクトルと、全領域で比較したところ、WD 型⁽⁵⁾が最も良い一致度を示した。この構造は、いわゆる B 型に近い構造であるが、5'-AT-3' 部分のスタッキングの方が、5'-TA-3' 部分のそれよりも良いなどの点で、若干異なっている。それにも拘らず、最初から単純な B 型だと決め込んで眺めれば、そう見えなくもないようなスペクトルを示す。⁽¹¹⁾ 即ち、2つの構造の違いを識別するのは、極めて難しかったのである。また、おそらく、ディスタンス・ジオメトリー法は、入力データとしての距離の精度を要しない方法であるだけに、B 型と WD 型とを区別し得ないと予想される。その意味で、ある構造からより正確に理論的 NOE 強度を計算する完全緩和行列法は、重要な方法である。次に、こうして得られた WD 型のエネルギー安定性を分子力学計算法によって検証した。その結果、分子内に水和水、外側にナトリウム・イオンを配置した系のエネルギー値の比較では、この構造の場合の方が、B 型の場合よりも安定であることが判った。そして、その理由として、主溝側の相互作用エネルギーは、両者で大差はないが、副溝側では、WD 型が有利であること、とくに、向かい合ったデオキシ糖同志の疎水相互作用と、ナトリウム・イオンを介したリン酸基同志のイオン結合とが、交互にならんでいる状態は、水中では、極めて有利であると考えられること、などが、列挙された。また、加えて、副溝内の連鎖状水和水モデルを提案し、それが、塩基ス

タッキング上の特徴の満足すべき説明と、エネルギー上の不利を補うに足る考案である点が強調された。”

以上のようなデカマーの結果をさらに確認するために、ヘキサマー

[d(5'ATATAT3')] について、以下に述べるような検討を行った。

① PS-2D-NOE スペクトル

結果は、デカマーと同一のパターンを示した。即ち、5'-AT-3' における残基間距離の方が、5'-TA-3' におけるそれよりも短い傾向などが認められた。

② DQF - COSY スペクトル

デオキシリボース環のカップリング定数 (J 値) の解析を行い、表 1 に掲載した (Obs.欄)。その結果、次のようなことが明らかになった。

a. 実測値は、エネルギー極小化 (e.m.) 構造の値に近い。尚、B 型は、エネルギー極小化により、WD 型構造に似た外観を示すようになってきていることを付記したい。

b. 従来のいわゆる、N, S 2 つの立体構造に基づく、二状態モデル⁽¹²⁾では、モル分率の如何に拘らず、実測値を説明できない。即ち、J(H2"-H3') と J(H3'-H4') とは、同程度でなければならない筈だが、実測では、前者は観測されていないのに対し、後者は明瞭に観測されている、という大きな矛盾がある。

以上、①および②を通じて、ヘキサマーも、デカマーと同じような特色を持っていることが明らかになった。更に、溶液中での分子ダイナミックス計算も、デカマーについて実行され、ナトリウム・イオンの初期配置を修正して、成功しつつある。即ち、AT 交互配列 DNA では、多分に、WD 型構造が安定である。

表 1. モデル構造における二面角と J 値
Torsion angles and coupling constants for DNA deoxyribose models

	B-form				WD-form				Two-state model				Obs.
	initial		e.-m. ^a		initial		e.-m. ^a		N		S		
	θ	J	θ	J	θ	J	θ	J	θ	J	θ	J	
H1'-H2'	147	9.0	162	10.6	167(T)10.9	157	10.1	96	1.8	154	9.9	9.9(T)	
					160(A)10.4							9.8(A)	
					43(T)4.7							5.9(T)	
H1'-H2"	25	7.1	38	5.4	36(A)5.7	33	6.1	-25	8.0	34	6.0	5.2(A)	
					-40(T)4.7							5.9(T)	
H2'-H3'	-37	5.1	-30	6.2	-45(A)3.9	-28	6.5	39	7.2	-34	5.7	6.3(A)	
					85(T)1.3								
H2"-H3'	86	1.3	96	1.1	80(A)1.6	105	1.4	160	9.7	87	1.3	<1.3	
					-102(T)1.4							3.5(T)	
H3'-H4'	-89	0.9	-114	2.4	-92(A)0.9	-126	3.9	-158	8.1	-99	1.2	3.1(A)	

^aValues from these energy-minimized(e.-m.) models were averaged for all residues.

《引用文献》

1. T. F. Havel, G. M. Crippen, and I. D. Kuntz, *Biopolymers*, **18**, 73 (1979).
2. A. D. Kline et al., *J. Mol. Biol.*, **189**, 377 (1986).
3. J. W. Keepers and T. L. James, *J. Magn. Reson.*, **57**, 404 (1984).
4. G. B. Young and T. L. James, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7986 (1984).
5. S. Arnott et al., *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1457 (1983).
6. P. K. Weimer and P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.*, **2**, 287 (1981); *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 765 (1984).
7. M. S. Broido et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **119**, 663 (1984).
8. G. Bodenhausen and R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1304 (1982).
9. L. Gallo, C. Huang, T. Ferrin, and R. Langridge, *Molecular Interactive Display and Simulation (MIDAS)*, Computer Graphics Lab., UCSF, 1985.
10. E. Suzuki et al., *Biochemistry*, **25**, 6854 (1986).
11. N. Assa-Munt and D. R. Kearns, *Biochemistry*, **23**, 791 (1984).
12. C. Altona, *Org. Magn. Reson.*, **15**, 43 (1981).

特III

DETERMINATION OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURES OF PROTEINS IN SOLUTION

A.M. Gronenborn and G.M. Clore

Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried bei München, F.R.G.

The determination of 3D-structures of proteins in solution using NMR spectroscopy comprises three stages: (i) the assignment of proton resonances by 2D-techniques to demonstrate through-bond and through-space connectivities; (ii) the determination of a large number of short ($< 5\text{\AA}$) interproton distances using nuclear Overhauser effect (NOE) measurements; and (iii) the determination of the 3D-structure on the basis of these distances. Our approach for step (iii) has involved the use of restrained molecular dynamics. The principles of the restrained dynamics approach will be illustrated for model calculations on crambin (1,2) and examples from the set of 3D-structures in solution that we have determined to date will be presented: puorothionin (3), phoratoxin (4), hirudin (5), the globular domain of histone H5 (6), growth hormone releasing factor (7), secretin and potato carboxypeptidase inhibitor (8).

References:

1. Brunger, A.T., Clore, G.M., Gronenborn, A.M. & Karplus, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3801-3805
2. Clore, G.M., Brunger, A.T., Karplus, M. & Gronenborn, A.M. (1986) *J. Mol. Biol.* 191, 523-551
3. Clore, G.M., Nilges, M., Sukumaran, D.K. Brunger, A.T. Karplus, M. & Gronenborn, A.M. (1986) *EMBO J.* 5, 2729-2735
4. Clore, G.M., Sukumaran, D.K., Nilges, M. & Gronenborn A.M. (1987) *Biochemistry* 26, 1732-1745
5. Clore, G.M., Nilges, M., Sukumaran, D.K., Zarbock, J. & Gronenborn A.M. (1987) *EMBO J.* 6, 529-537
6. Zarbock, J., Clore, G.M. & Gronenborn, A.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 7628-7632
7. Clore, G.M., Martin, S.R. & Gronenborn, A.M. (1986) *J. Mol. Biol.* 191, 553-561
8. Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Nilges, M. & Ryan, C.A. *Biochemistry* (1987) in press

計算機実験によるタンパク質のプロトン緩和機構の研究

(京大理・近畿大*)の伊島理枝子・柴田 進*・赤坂 一之

Computer simulation of proton relaxation in proteins

Rieko Ishima, Susumu Shibata*, and Kazuyuki Akasaka

(Faculty of Science, Kyoto University and *School of Medicine, Kinki University)

The earlier proposal (Akasaka, J. Mag. Reson. 45,337(1981)) for the longitudinal relaxation of protons I. ($i=1,2,\dots,n$) of a rigid polymer system in solution under selective saturation of one or a group of protons (S) that the longitudinal relaxation times of the I spins is commonly given by $T_{1i}^{*i} = T_{1i}^{i-1} + T_{1i}^{i-1}$ where T_{1i}^{i-1} is the spin-lattice relaxation time obtained by regular non-selective excitation and T_{1i}^{i-1} is the cross relaxation time with the S spins, was reexamined by computer simulation using the program developed by Shibata and Akasaka. The result of the simulation, carried out for the core region of a protein *Streptomyces* subtilisin inhibitor upon saturation of one of the ring protons of Tyr 93 under the approximation of a rigid rotar model with a correlation time of 10^{-7} s, clearly demonstrated that the protons behave indeed nearly as two-spin systems, with $T_{1i}^{*i} = (1/n) \sum_j \rho_{ij}$, and $I_i^\infty = I_0 \times (T_{1i}^*/T_{1i})$, where ρ_{ij} is the cross relaxation rate between the spin S and the individual spin I, and I_0 and I_i^∞ are, respectively, the initial magnetization and the equilibrium magnetization of I under saturation of the spin S.

〈序〉我々は、これまで代表的なタンパク質として *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor (SSI) を対象とし、柴田・赤坂によって開発されたプロトン緩和のシミュレーション・プログラムを用いて、SSI のコア領域と露出セグメント間の選択的スピンの弛散についてのシミュレーションをおこなってきた。今回は、(Ⅰ) SSI のコア領域を対象とした選択的飽和下での縦磁化の緩和の計算機実験と、(Ⅱ) SSI の全プロトンを対象とした横緩和時間の解析の結果について報告する。

〈計算方法〉プロトン間の双極子相互作用のみを考慮し、多スピン系の各スピンの磁化の時間変化を、然るべき初期条件に従って計算する。この際、プロトンの座標はX線回折による結晶構造に基いて決める。分子の運動としては、単一の相対時間をもった等角的回転弛散を考慮し、必要に応じて、メチル基の回転を内部運動として考慮する。

単一の回転相対時間を用いる場合の縦磁化の振舞いは、 i 番目のプロトンについて、

$$\frac{d(I_i(t) - I_i^0)}{dt} = \sum_j \rho_{ij} (I_j(t) - I_j^0) + \sum_{j \neq i} \sigma_{ij} [I_j(t) - I_j^0] \quad (1)$$

ここで、

$$\rho_{ij} = \frac{3}{2} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r_{ij}^6} \left[\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right] \quad (2)$$

$$\sigma_{ij} = \frac{3}{2} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r_{ij}^6} \left[-\tau_c + \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right] \quad (3)$$

I_i^0 : 磁化の平衡値

ω : 共鳴周波数

r_{ij} : プロトン間距離

γ : 磁気回転比

τ_c : 分子の回転相対時間

(1) 式によって与えられ、この連立微分方程式を解くことによって、それぞれのプロトンの緩和曲線を求める。現在は、ギア法で解いている。メチル基の内部回転を、

含む場合は、D.E. WOESSNER^[2]に従い、 P_j をそれぞれ定めた。

シミュレーションの対象としては、SSIを用いる。SSIは、等価な2個のサブユニットから成る、分子量23000のタンパク質で、比較的大きな"コア"をもつ。三井らにより、X線回折の座標が得られている。

以下のシミュレーションは、共鳴周波数を400MHzに設定して行った。

<Ⅰ> SSIのコア領域を対象にした、選択的飽和下での縦緩和の計算機実験

球状タンパク質のコア領域には、いつ、どのように縦緩和がおこなっているか、タンパク質中に於ける交叉緩和の取り扱い《赤坂, J.M.R. 1981, 45 337》に、対するシミュレーションをおこなった。

【仮定】 赤坂によれば、磁化 I_i ($i=1, 2, \dots, m$)をもつ m 個のプロトンに対し、

$$I_1(t) \approx I_2(t) \approx \dots \approx I_m(t) = \frac{1}{m} I(t) \quad (4)$$

$$I = \sum_{i=1}^m I_i \quad (5)$$

が、成り立つとき、ひとつまたはそれ以上のプロトン S_{i_2} ($i_2=1, 2, \dots$)を選んで、その磁化を飽和しつづけた場合の、他のプロトン I_i ($i=1, 2, \dots, m, i \neq i_2$)の縦緩和の緩和時間(T_i^*)は、全スピン系を、 S と I の2スピン系として近似できる。

(4)式は、2スピン系の近似によって

$$\frac{dI}{dt} = -(I - I^0) / T_1 - I / T_{1S} \quad (6)$$

があらわされ、みかけの T_1 を、 T_1^* とすれば、

$$T_1^{*-1} = T_1^{-1} + T_{1S}^{-1} \quad (7)$$

即ち、交叉緩和分 T_{1S}^{-1} だけ、みかけの T_1 が、短くなる。この T_{1S} は、熱平衡磁化 I^0 と、 S を飽和しつづけたときの平衡磁化 I^0 と、

$$I^0 = I^0 \times T_1^* / T_1 \quad (8)$$

の関係にある。更に、 T_{1S} は、プロトンペア毎のマイクロな交叉緩和速度 $\sum_i P_{i_2}$ を用いて、

$$T_{1S}^{-1} = \frac{1}{m} \sum_i \left(\sum_{i_2} P_{i_2} \right) \quad (9)$$

と、ほぼ推定できるとされている。

【計算機実験】 SSIのコア領域にあるTyr 93を中心とした10Å内の残基に含まれる合計258個のプロトンを対象とする。また、選択的励起し、飽和しつづける場合、 $\tau_c = 10^{-7}$ secでは、(4)式がほぼ成り立つという結果を得ているので、 $\tau_c = 10^{-7}$ secとする。以下の3つのシミュレーションをおこなう。(図1参照)

① 非選択的励起をおこなう

② Tyr 93の ϵ_2 -プロトンを選択的に励起し、飽和しつづける。(図1実験A)

③ ②の平衡から180°反転させ、②と同じプロトンを飽和しつづける。(図1実験B)

【結果】 (8)式は、各プロトンについて、ほぼ成り立っている。特に、各プロトンの平衡磁化 I^0 の平均 $\langle I^0 \rangle$ と、(8)式の右辺、 $T_1 / T_1^* \times I_i^0$ の平均 $\langle T_1 / T_1^* \times I_i^0 \rangle$ は、0.116 I^0 と、0.117 I^0 であり、非常に一致する。

次に、各プロトンについて (7) 式より求められる T_{1S} は、図 2 に示した通り、ほとんどのプロトンについて等しく、その平均値は、2.98 sec である。また (9) 式で示される、 $[\frac{1}{N} \sum \rho_{ik}]^{-1}$ は、2.74 sec であり、両者は、ほとんど一致している。

さらに、シミュレーション ②, ③ において両者の T_1^* は一致している。

以上、SSI において、内部運動を無視し全体の相関時間を 10^7 sec 以上に選んだ時、先の 2 スピン系 の近似で得られる関係式 (7) (8) (9) を、個々のプロトンの磁化 I_{ik} がみたし、適切に成立することを証明した。

[考察] まず、(7) 式に従って、求められた T_{1S} と (9) 式右辺で示される $[\frac{1}{N} \sum \rho_{ik}]^{-1}$ が一致するという結果は、 $[\frac{1}{N} \sum \rho_{ik}]^{-1}$ は、緩和されたプロトン ρ_{ik} と、 I_{ik} の直接の交叉緩和の和であるが、これは、 I_{ik} は 12- μ 間、平均化さ

$$\rho_{ik}^{-1} = \frac{r_{ik}^6}{5695.0} \text{ SEC} \quad (10)$$

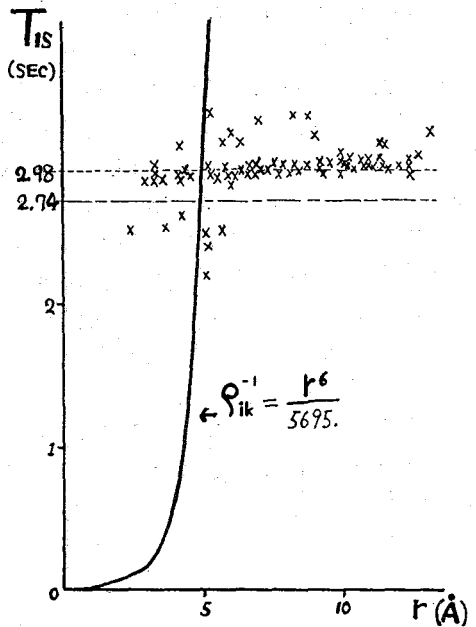
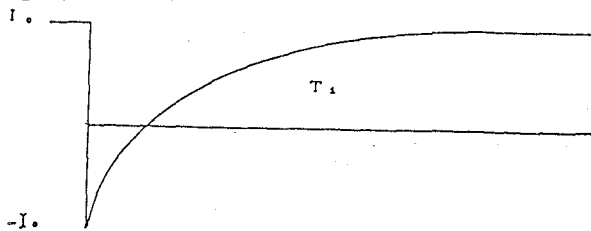


図 2. S_2 と各プロトン I_{ik} のプロトン距離 r に対する T_{1S} プロット

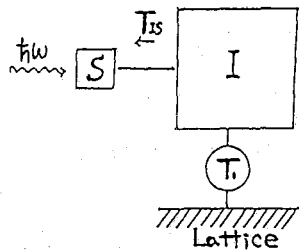
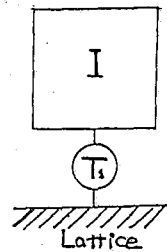
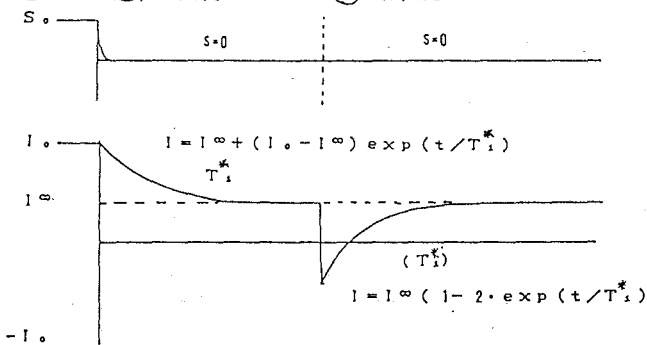
図 1. (A) 飽和シミュレーションにおける磁化変化 概略図

① 非選択的励起



② 交叉緩和実験 A

③ 交叉緩和実験 B



された結果(9)式が成立することを示している。

一考、図2の曲線は、(2)式より、(10)式のように求められる。I_i スピン間で、交叉緩和がはたらくと、(9)式で示したように、T_{1s}ⁱ は、M₀のΣP_{ij}の平均であるが、I_i スピン間で、交叉緩和が働かないとすれば、平均はとらず、T_{1s}は、個々のプロトンに対して、 r_{ij} からの距離 r_{ij} に反比例する。(10)式で決まる。このとき、 r_{ij} は、プロトン間距離 r_{ij} の6乗に比例するので、遠くのプロトンとの緩和には、非常に時間がかかることになる。

以上、極めて理想化された場合についてであるが、みかけの交叉緩和時間T_{1s}についての性格づけが、より明らかになった。内部運動の効果、その実際面への応用については、学会の際に報告する予定である。

<2> SSIの全プロトンを対象とした横緩和時間の解析

横緩和時間は、交叉緩和が無視できるので、磁化がその平衡値に向かって緩和する状態を、単一の指数関数に近似できる。

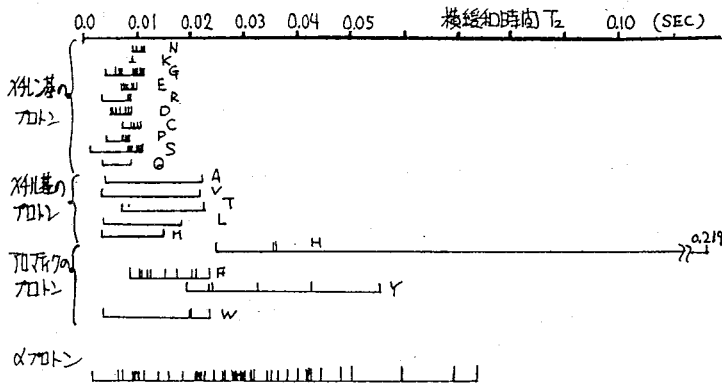
$$T_2^{-1} = \sum_{j=1}^n \{ 2.5 (Q_j - 20r_{ij}) \} \approx 4.5 \sum_{j=1}^n (Q_j) \quad (11)$$

(ω_{0i} → 1 のとき)

(11)式は、シミュレーションプログラム中で、(1)式の微分方程式を解く際に、得ることができた。X4ル基内のプロトン緩和についてはX4ル基の内部回転を考慮した。

[結果] SSIについての結果を、プロトン種類別に整理すると、X4ル基のプロトンは、~10msec, X4ル基のプロトンは、~30msec, 芳香環のプロトンは、~70msec程度の値をとった。

図3 プロトンの種類別横緩和時間



[1] Merritt et al. "Protein Protease Inhibitor: The Case of Streptomyces Subtilisin Inhibitor, Elsevier, 1985

[2] D.E. Woessner. J.C.P. 1, 36, 1962

微生物起源蛋白性プロテアーゼ・インヒビター S S I 立体構造の揺らぎに関して

(都立大理) ○ 甲斐荘正恒・長尾洋昌・広沢敦彦・佐藤晴哉
内田健一・三宅洋子・細谷仁子

^{13}C -NMR Studies on the Conformational Dynamics of Microbial Proteinase Inhibitor SSI in Solution

Masatsune Kainosho, Hiromasa Nagao, Atsuhiko Hirose, Haruya Sato, Kenichi Uchida, Yoko Miyake, Yosiko Hosoya

(Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University)

The dynamic structural aspect of the polypeptide backbone of a proteinase inhibitor SSI has been studied by the assigned carbonyl ^{13}C -NMR signals as the conformational probes. The N-terminus of SSI, which was not visible by the X-ray study, was found to show a abrupt motional gradient up to Leu-6. The other residues having the large crystallographic B-factors in general were conformationally flexible in solution, as evidenced by the carbonyl carbon line-widths or by the facile amide hydrogen exchange rates.

(序) 我々は過去数年間にわたり、微生物起源の蛋白性プロテアーゼ・インヒビター S S I を対象に構造化学的研究を続けてきた。その中で最も努力を集中してきたことは、蛋白質の主鎖カルボニル炭素 ^{13}C -NMR シグナルを用いる新しい構造研究手法の開拓である。一般的に NMR スペクトルによる構造化学的研究手法の基本は、第一に構造化学プローブとしての NMR シグナルの帰属を確定することであり、第二にはそれら帰属の確定したシグナルのもたらず構造情報を選択的に入手することにある。我々はこれらの基本的条件を一挙に満足しうる手法としての、安定同位体ラベルの徹底的な利用こそが NMR による蛋白質の構造研究にとって必要不可欠であると考えた。

S S I はサブユニット 2 個から形成されるダイマーであり、その分子量 23、000 は通常の二次元 NMR 法の対象とはなりえない巨大分子である。従って、各残基毎に帰属の確定した主鎖カルボニル炭素シグナルから構成される構造化学的プローブのネットワークは得難い財産であり、高分子量蛋白質としての S S I 分子全体の高次構造(変化)を観測する“モニター・システム”としての機能を持つ。このシステムにおいては、蛋白質分子の全体構造(変化)は各観測点のもたらず局所的構造情報の集合としてのみ表現できる。本報告では、長年にわたって続けてきた研究結果のうち、S S I の立体構造の動的揺らぎに関して“モニター・システム”がどのような構造情報をもたらずかについて紹介したいと思う。

(実験) 同位体ラベル S S I の調製は、アミノ酸混合物を用いる合成培地中、適当なアミノ酸のみをラベルアミノ酸に置換することにより生合成的におこなった。主鎖カルボニル炭素の NMR シグナルの帰属は主として ^{15}N , ^{13}C -グブルーベル法”を利用した。 ^{13}C -NMR スペクトルは XL-300 (バリアン社製)を用いて 75.2 MHz、プロトン照射下で測定した。

(結果と考察) (I) N-末端残基の揺らぎとNMRスペクトルの線幅 三井等は S S I の X 線解析により N 末端数残基の電子密度が全く観測できないほど低いことを見出した。この結果は S S I の N 端部分が結晶中において動的に揺らいているか、あるいは静的な構造の不規則性があることを意味している。また赤坂は S S I の ¹H-NMR スペクトル中にアラニン、ロイシン、アスパラギン酸残基側鎖等に相当する著しく線幅の狭いシグナルを見出した。これらのシグナルが容易にプロテアーゼ処理により失われる部分に由来することから、S S I の N-末端の数残基は溶液内において高い運動性をもつことを結論した。我々は主鎖カルボニルシグナルの線幅がペプチド鎖の運動性と良い相関を示すことを利用して、N-末端付近の揺らぎの分布に関してより詳細な知見を得ることができた。

図-1 はプロリンのカルボニル炭素を ¹³C-ラベルした (P) S S I の ¹³C-NMR スペクトルの温度変化である。プロリンは環状の側鎖構造をもつイミノ酸であり、低温では側鎖プロトンによる緩和機構が有効に働きカルボニルシグナルの線幅が著しく広幅化すると考えられる。ところが、Pro-3 のみは室温においても約 2 Hz 程度と極めて鋭いシグナルとして現れ、主鎖ペプチド自身が異常に高い運動性をもつことは明らかである。我々は Asp-1, Ala-2 も同様に極めて鋭いシグナルを室温において示すことを見出した。しかし、Ser-4, Ala-5 と N-末端から遠ざかるにつれ徐々に室温での NMR シグナルの線幅が増加し、Leu-6 では他のシグナルの線幅の半分程度までに広幅化し、Tyr-7 では他のチロシン残基 (Tyr-75, -93) と同程度となる。つまり、S S I の N-末端ポリペプチド鎖の揺らぎは C-端側に向かい徐々に減少し、Leu-6 と Tyr-7 を境にしてほぼ残りの部分と類似していることが明らかである。従って、X 線解析において明瞭な電子密度は Tyr-7 以降のみに得られた事実は、N-末端部分の本質的な柔らかさにより説明できる。

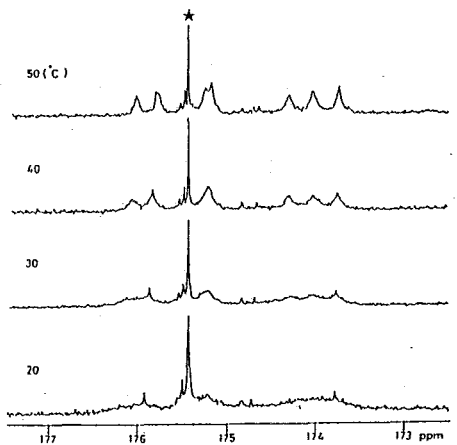


図-1 (P) S S I の ¹³C-NMR スペクトルの温度異存性。
*印が Pro-3 のシグナル

(II) X 線解析における温度因子とカルボニルシグナルの線幅との関連 について: X 線解析結果の電子密度図では失われている N-末端 6 残基が溶液内においても高い運動性をもつことが明らかになった。この知見を受けて、結晶内で高い B 因子を示す主鎖ポリペプチド部分のカルボニル炭素 NMR シグナルの線幅を検討した。三井等の求めた S S I 結晶構造解析での温度因子の分布 (主鎖) を見ると、明らかに S S I における B 因子の分布と二次構造とは強い相関がある。即ち、β-鎖の方向が変わるターン部分、或いは α-ヘリックスの前後の部分の B 因子は増大する傾向にある。例えば、β-1 鎖から β-2 鎖に移る長いターン部分 (Ser-21~Ala-25) の B-因子は 30 前後であり、β-1 鎖の平均値 2.2 と比較すると顕著に大きい。このような傾向は他のターン部分においても見出されている。また Leu-60, ~Asp-

68 にかけての不規則性ポリペプチド鎖部分も異常に高い B 因子が見られる領域である。そこで Thr のカルボニル炭素の ^{13}C -NMR スペクトルを用いて B 因子と溶液中の線幅との関連を検討した。サブユニット当たり 8 個の Thr は 23, 24 (ターン)、15, 32, 34, 42, 81 (β -鎖)、64 (不規則領域) に分布しており、この目的に極めて適

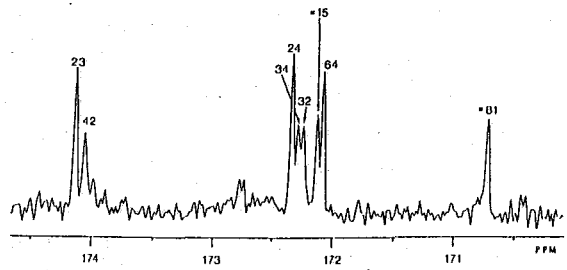


図-2 [T]SS1 の重水中での ^{13}C -NMR スペクトル。~62°C、pH = 7.3

している。Thr 残基のカルボニル炭素 ^{13}C -NMR スペクトルは室温においては分離が悪く、測定はシグナル相互の分離が最もよい 62°C で行った。図-2 に示されるように、著しく線幅の狭い (ピーク強度の大きい) シグナルは 23, 24, 64 の 3 本であり、これらはいずれも B 因子の大きい領域に由来する。この他、種々の残基をラベルした SSI について行った同様な実験から、B 因子と線幅の関連が一般的であることを見出した。

(Ⅲ) アミド水素交換速度と主鎖ペプチドの揺らぎ：以上に紹介した二例は X 線解析の結果 B 因子の大きいとされた部分が、溶液内でも揺らぎやすい傾向にあることを示している。主鎖の揺らぎは線幅以外にも色々な NMR パラメーターに反映される。従来よりアミド水素の交換速度は蛋白質の動的揺らぎとの関連で重要な構造情報と考えられてきた。事実、 ^1H -NMR スペクトルのアミド水素シグナルの重水中における減少速度が揺らぎに関する有用な情報として現在でも用いられている。ところが、この方法では測定に要する時間により時間分解能が規定されてしまう欠点に加えて、分子量が大きい蛋白質ではアミド水素の NMR シグナルは個別に分離観測することは困難となり、当然帰属は困難となるために適用できない。一方、選択的にカルボニル炭素をラベルした SSI を用いれば、全く別の角度からアミド水素の交換速度を測定・評価することができる。この方法はアミド水素の重水素化に伴うカルボニル・シグナルの化学シフト (同位体シフト) を利用するものであり、二種類のアプローチがある。一方は、昨年度紹介した DEALS 法 (Deuterium-hydrogen Exchange of Amide on the Line-Shapes) となずけた手法であり、50% 重水中におけるアミド・カルボニル炭素の NMR シグナルの線型 (定常状態) を利用する。もう一方は重水の中に蛋白質を溶解し徐々にアミド水素が重水素置換される過程を、NMR スペクトル変化 (非定常状態) により追跡する方法である。前者は測定時間と交換速度は独立であるために速い交換速度をもつアミド水素に、後者は遅い交換速度のそれに有効である。

DEALS 法においては「速い交換」は、同位体シフト値の逆数により定義される。つまり、 i -番のカルボニルに注目するとき、 $(i+1)$ 番のアミド水素の重水素化によるシフト (β -シフト) 値により時間分解能は決まる。通常、数ミリ秒以下の場合にのみ鋭いシグナルが平均位置に生じる。従って、速い交換のリミットに入るアミド水素の多くは溶媒に露出しており、相対溶媒接触度 (Ra 値; %) の

大きいものである。我々は多くの残基のDEALS実験から、この経験則には例外があることを見出した。例えばpH 7.3における(T)SSIのDEALS実験では、Thr-23のシグナルは62℃において既に鋭いシングル・ピークとなる。これは結晶中においてAla-24のRa値が極めて低いことと矛盾するが、既に線幅と揺らぎの関係で議論したように、Thr-23の部分は極めて運動性が高く、揺らぎやすいことにより説明できる。一般的に云えば、同じ表面残基であり、アミド水素のRa値が低い環境にあっても、X線解析結果得られるB因子の大きい部分は他の部分と異なり、著しく高いアミド水素交換速度を示す。

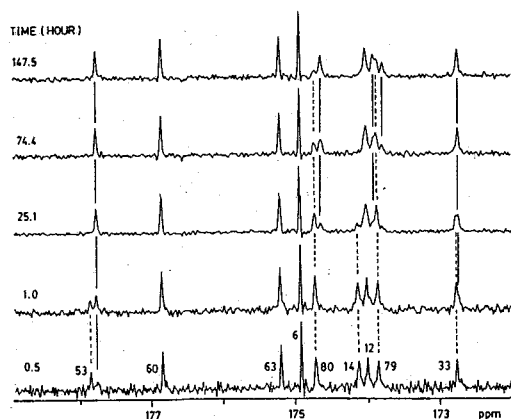


図-3 [L]SSIの重水素化に伴うカルボニルNMRシグナルは約30分積算の結果

にランダムに重水素交換するようである。このようなアミド水素の交換速度を種々の条件(例えばEXI機構の成り立つ高pH領域)で行うことにより、SSIの立体構造の揺らぎの特徴に関するより詳細な知見が得られることと期待される。

〔終わりに〕帰属の確定したカルボニル・シグナルを利用することにより、蛋白質構造の動的揺らぎについて、かつてないほどの精密な知見が得られることが上述したわずかの事例からも理解されよう。このような動的構造に関する知見は、安定同位体ラベル法の有効な活用により、従来は手のつけられなかった高分子量蛋白質に関しても同様に得られることを特に強調したい。また我々のSSIに関する研究のもう一方の側面は、機能に関するものである。従って、本討論会において構造化学的観点からのみ述べる知見は、実はSSIのインヒビターとしての機能を合理的に説明する上でも極めて重要なものであることを付記すべきであろう。

〔参考文献〕(1) "Protein Proteinase Inhibitor. The Case of Streptomyces Subtilisin Inhibitor (SSI)", 広海ほか編;(2) 甲斐荘・辻、Biochemistry, 21 (1982), 6273-6279;(3) 甲斐荘ほか、J. Mol. Str., 126 (1985), 549-562;(4) 甲斐荘、長尾、辻、Biochemistry, 26 (1987), 1068-1075;(5) 甲斐荘、"精密結晶構造からタンパク質・核酸の動的挙動と機能の解明へ"(昭和60年度科学研究費補助金(総合A)研究成果報告書)(1986), 13-26.

トリプトファン合成酵素のプロトンNMRスペクトルに
及ぼすアミノ酸置換の影響

(阪大蛋白研・横浜国大工*) ○油谷克英、阿久津秀雄*、
澤田慎太郎、小笠原京子

Proton NMR Studies on the Wild-Type and Single Amino Acid Substituted
Tryptophan Synthase α -Subunits

Katsuhide Yutani, Hideo Akutsu*, Shintaro Sawada, and Kyoko Ogasahara
(Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Osaka, and
*Faculty of Engineering, Yokohama National University, Hodogaya, Yokohama)

In order to elucidate the effect of single amino acid substitution on the conformation of the tryptophan synthase α -subunit from *Escherichia coli* in solution, ^1H NMR spectra of the wild-type and mutant proteins were measured at various pHs. Two of the 4 His C2-proton resonances of the α -subunit were assigned to two His residues at positions 92 and 146, using a mutant protein with Thr substituted for the His at position 92. The proton resonances of all the Tyr residues in the aromatic region could be picked up from other resonance peaks, employing the wild-type α -subunit deuterated at all of the Phe residues. On comparison of the spectra of the wild-type protein with those of the mutant protein with Met substituted for the Glu at position 49, it was concluded that the substitution only affects the residues close to the substituted residue at acidic pH but that a larger part of the protein is affected at alkaline pH.

私たちは大腸菌のトリプトファン合成酵素 α サブユニット(TSase A)の立体構造の安定化機構を、一残基のみ置換した変異型をもちいて、置換残基の特性から明らかにしようとしている¹。その場合、置換によって他の残基及び立体構造にどのような影響を与えるか予めしらべておく必要がある。変異型 TSase Aの遠紫外部(200-250nm)のCDスペクトルは野生型のそれと良く一致した¹。これはこれらの置換がTSase Aの骨格構造に影響を及ぼさないことを示唆している。しかし、近紫外部(250-320nm)のCDスペクトルは芳香族残基以外の残基に置換した変異型(49位)と野生型間で、また変異型間でも異なった²。そこで、置換残基の芳香族残基に及ぼす影響を明らかにするために、TSase Aの芳香族領域でのプロトンNMRスペクトルを解析した³。

「実験」TSase Aは分子量29,000で268残基からなる単量体。His、Tyr、Pheはそれぞれ分子中に4、7、12残基あり、SS結合、Trpは含まない。用いた試料はTSase Aの野生型と49位のGluがMetに置換した変異型。HisのNMRシグナルを帰属するために92位のHisがThrに置換した変異型。Tyr残基のシグナルをうきぼりにするために全てのPhe残基がD化した野生型(DPhe-TSase A)。NMRスペクトルはJEOL-GX500Sを用いて測定。全ての測定は30℃でおこなった。

「結果と考察」

1. 野生型 TSase A のNMRスペクトルのHisC2プロトンの帰属

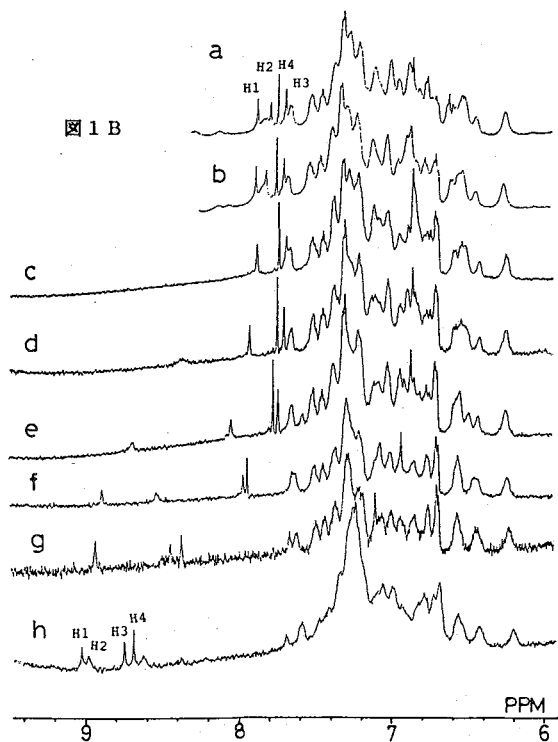
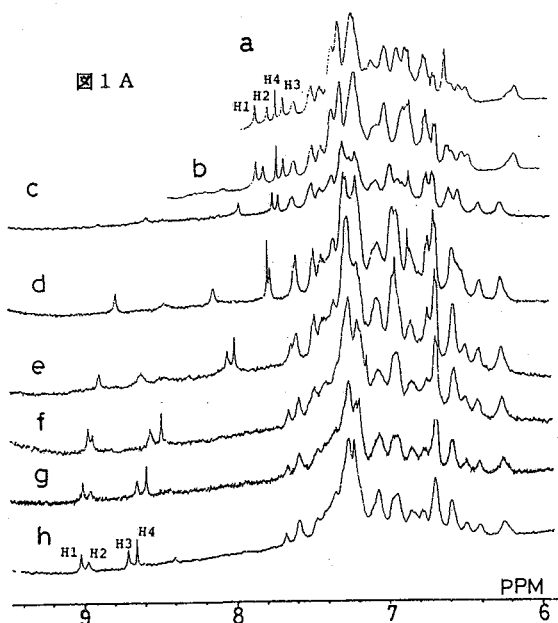
図1AはpD4.32(pHメータの読み)からpD10.45までの野生型 TSase Aの芳香族領域でのプロトンNMRスペクトルである。H1からH4はHisのC2プロトンとして帰属できる。本蛋白質は2個のドメイン(α -1;N端188残基、 α -2;C端80残基)からなり、それぞれのドメインに2個ずつのHis残基が含まれている(His-92,-146,-195,-244)。

図1. TSase A の芳香族領域でのプロトンNMRスペクトルのpH変化。A: 野生型 a-h はpD 10.45, 9.66, 7.50, 6.97, 6.20, 5.23, 4.83, 4.32で測定。B: Met49 a-h はpD 10.20, 9.53, 8.87, 7.89, 7.34, 6.38, 5.56, 4.10で測定。

図のH1とH2が α -1ドメインのHisに、H3とH4が α -2のそれらに帰属できることは既に報告されたデータから推論できる⁴。His-92をThrに置換した変異型のスペクトルを図2にしめす。類似pHでの野生型と対比すると変異型(図2A)では明らかに野生型のH1バンドのみが欠けている。そこでH1をHis-92と帰属できる。よって、同じドメインにあるH2バンドをHis-146と帰属できる。

2. 野生型 TSase A のTyrに基づくNMRスペクトル

図3Bは全てのPhe残基がD化した野生型(DPhe-TSase A)の芳香族領域でのプロトンNMRスペクトル。これを図3A(正常な野生型)と比較すると、Phe残基に基づくスペクトルが消失していることが分かる。つまり、図3BはTSase Aの4個のHisと7個のTyr残基に基づくスペクトル。図3Cは図3Aから図3Bを差し引いた差NMRスペクトルで、TSase Aの12個のPhe残基のみに基づくNMRスペクトルとみなせる。酸性側ではDPhe-TSase Aの7個のTyr残基のシグナルを図4に示すようにY1からY7へと全て区別できた。これらのケミカルシフトのpH依存性を



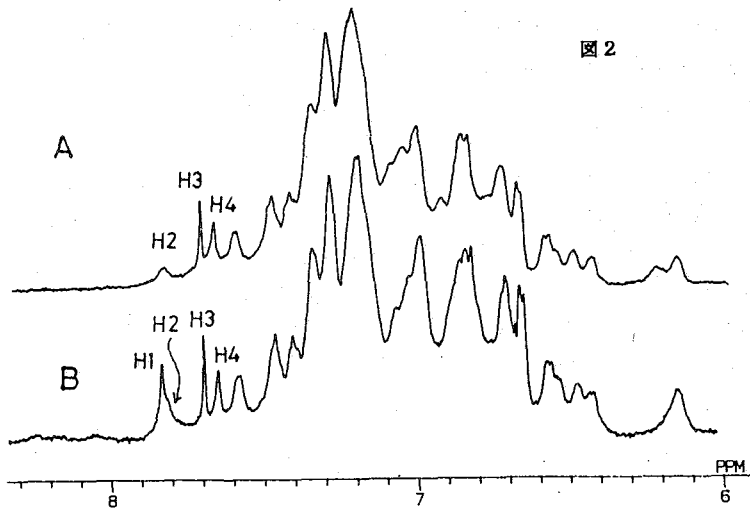
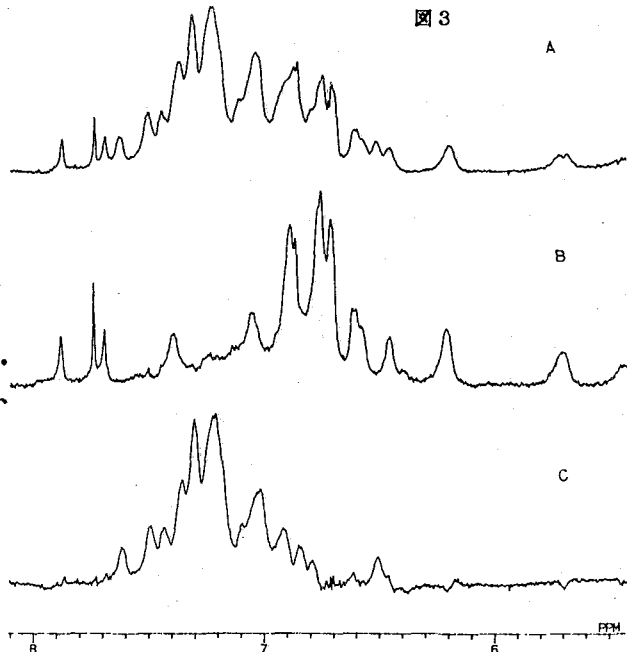


図2. 変異型(Thr92) TSase A, pD 9.18(A)と野生型 pD 9.31(B)のNMRスペクトルの比較

図3. 正常な野生型 TSase A, pD 8.98(A)と全てのPheがD化された野生型 pD 9.00(B)のNMRスペクトルの比較。(C)は(A)と(B)の差スペクトル

3. 変異型 TSase A のNMRスペクトル

49位のGluがMetに置換した変異型(Met49)の芳香族領域でのプロトンNMRスペクトルのpH変化を図1Bに示す。4個のHisのシグナルは野生型との比較から帰属できる。Met49の4個のHisのpKは、H1(His-92):6.67、H2(His-146):8.00、H3:5.93、H4:5.81であった。野生型のそれらはH1(His-92):6.39、H2(His-146):7.79、H3:5.86、H4:5.76であった。Met49と野生型のHisのpKの差異は置換部位を含むドメイン(α -1)の方が著しかった。



4. 野生型と変異型 TSase A のNMRスペクトルの比較

図1A、1Bのスペクトルを比較すると酸性側では限られたTyrのピークだけが野

測定した。その結果、4本のピークのpH依存性がpD4-10で観察された。それらの転移点はY1(pD=8.9), Y2(7.9), Y2'(7.8), Y7'(8.4)であった。これらのTyr残基間の近隣関係を明らかにするためにNOEの実験を行った。それらの結果は最近得られたX線結晶解析から得た立体構造にほぼ近いものであった(図5)。

生型と変異型での差異としてみられたがアルカリ側においては更に多くのピークに差異がみられた。このことは49位のGlu(野生型)とMet(変異型)の残基の差異に起因している。特に、49位Glu(野生型)のpKは7.5なので、アルカリ側での著しい差異は49位Gluの解離の影響と見ることができる。そこで、49位Gluの解離の影響をうけて変化したシグナルを見出すために、区別のできるピークのpH依存性を両蛋白質で比較した(図6)。Phe残基に帰属できるF1とTyrのY7'に差異がみられた。Met49のF1の転移点は7.5であったが、野生型では転移が見られなかった。一方Y7'は野生型のみ8.8で転移点があった。これらの転移点がGlu49のpKと離れているのでGlu49の解離が直接的に影響を与えたとは言えない。逆に、このことは置換の影響がかなりの範囲まで及ぶことを示唆している。野生型のY2とY2'はGlu49の影響を最も受けているように見えるがMet49で解析できていないので、まだ、確かなことは分からない。

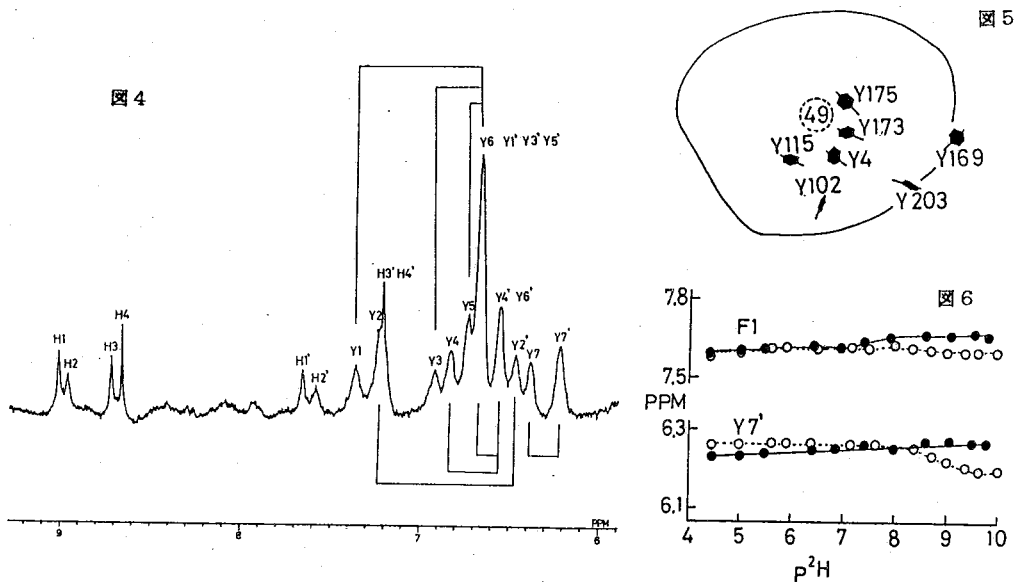


図4. DPhe-TSase A の芳香族領域でのNMRスペクトル。pD 4.64での測定。Y1-Y7及びY1'-Y7'はTyr残基に、H1-H4はHisC2プロトンに、H1'-H4'はHisC4プロトンに起因。Tyr2,6とTyr3,5プロトンのカップリングは直線で示す。

図5. X線解析結果によるTSase Aの7個のTyrの近隣関係

図6. 野生型(白丸)とMet49(黒丸)のF1とY7'シグナルのpH依存性。F1はPhe、Y7'はTyrに起因するシグナル。

参考文献

- 1) K. Yutani et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1987) 84, 4441-4444
- 2) K. Yutani et al. J. Biochem. (1980) 87, 117-121
- 3) K. Yutani et al. Biochemistly (1987) in press.
- 4) H. Iwahashi et al. Biochemica. Biophysica Acta (1983) 744, 189-192

ヒトおよびマウス上皮成長因子 (EGF) の連鎖帰属
(sequence-specific resonance assignment) と高次構造

(都臨床研・東大理・湧永製薬・・岐阜薬大) ○稲垣冬彦・
神田大輔・宮澤辰雄・三宅哲雄・・不破享・・林恭三

Sequence-Specific Resonance Assignment and Solution Structures of Human and Mouse Epidermal Growth Factors (EGFs)

Fuyuhiko Inagaki, Daisuke Kohda, Tatsuo Miyazawa, Tetsuo Miyake,
Toru Fuwa and Kyozo Hayashi

(Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, University of Tokyo,
Wakunaga Pharmaceutical Co. and Gifu Pharmaceutical University)

Sequence-specific resonance assignment of human and mouse EGFs was made using DQF-COSY, HOHAHA and NOESY. HOHAHA is useful for identification of spin systems and assignment of the types of amino acid residues. The secondary structures of both EGFs are very similar with a triple stranded antiparallel pleated β -sheet structure in the N-terminal domain and a double hairpin in the C-terminal domain. A mechanical model is now being constructed based on the distance constraints from NOESY spectra.

はじめに 上皮成長因子 (EGF) は 53 個のアミノ酸残基よりなるペプチド性のホルモンであり、上皮細胞の増殖分化促進因子として見いだされた。しかし、その生理活性には細胞に対する特異性や、種特異性がないことから、EGF は生体内で普遍的な役割を果たしていると考えられている。またヒト EGF はウロガストロンとして、胃酸の分泌を抑制することが知られている。これらの作用は EGF が細胞膜上の EGF 受容体と結合することにより誘起されるが、EGF の立体構造を決定することは、構造と活性の相関を明らかにするためにも重要な研究課題となる。二次元 NMR 法など最近の NMR の発展のおかげで、分子量一万程度の小さなタンパク質については、NMR 情報のみにもとずいてその立体構造を原子レベルで決定することが可能となった。EGF はこのような研究の良い対象と言えよう。本研究ではヒトおよびマウス EGF について連鎖帰属法 (sequence-specific resonance assignment) により NMR シグナルの帰属を行うと共に、NOE より求められる距離情報にもとずいて二次構造及び三次構造について検討した。

実験 ヒト EGF は遺伝子組換え体大腸菌を用い産生した。マウス EGF は雄マウス顎下腺より Savage, Cohen の方法に従い精製後、逆相 HPLC により分取した。NMR の測定試料として 3 mM (重水) および 6 mM (軽水) を用いた。測定温度は 28°C, pH は 2.0 (マウス)、及び 2.8 (ヒト) で行った。測定には日本電子製 JNM-GX400 および GX500 を用いた。軽水及び重水試料それぞれについて DQF-COSY, HOHAHA, NOESY (いずれも phase sensitive mode) の測定を行った。溶媒ピークはラジオ波照射により suppression した。2K ポイントの取り込みで 64-128 回の積算を 512 ブロックについて繰り返し、カラム方向についてゼロフィルを行った後、shifted sinebell, Gaussian を適宜用い、二次元スペクトルのデータ処理を行った。

結果と考察 一次構造情報のみを用いてタンパク質のNMRスペクトルを帰属する連鎖帰属法の確立は、NMR情報のみによるタンパク質の構造研究を可能にしたといえる。既にWüthrichのグループにより詳細に報告されているように、連鎖帰属法は(1) D Q F-C O S Yによるスピン系の解明とアミノ酸タイプへのNMRシグナルの帰属(2) N O Eにもとづく距離情報によるアミノ酸配列の決定の二つのステップに分けられる。このうち(1)のステップが正確に行われていることが連鎖帰属の信頼性を高める上で不可欠となる。本研究ではH O H A H Aを用いたアミノ酸タイプへの帰属について始めに述べる。図1にヒトEGFの重水におけるH O H A H Aスペクトルのアリファティック領域を示す。C O S Yとは異なり回転座標系では効率的な磁化移動が行われるため、多数のリレーピークが観測される。

比較的よく分離された α プロトンの化学シフトに沿って β, γ, δ 等のプロトンとの交差ピークが展開される。とくに長い側鎖を持つアミノ酸のスピン系の解析にH O H A H Aは有効である。図1に示すようにリジン(K)では α プロトンの磁化は ϵ プロトンまで伝わっている。またグリシン(G)は、 α プロトン間の大きなスピン結合のため特徴的な花弁型の交差ピークを示すことより容易に判別できる(図1)。

次にアミドプロトンの化学シフトと対応させる必要がある。この目的には図2に示す軽水におけるH O H A H Aスペクトルが有効である。図2はアミドプロトンとアリファティックプロトンとの交差領域を示したものである。 α プロトンが重なっている場合(Y37とC31)でもアミドプロトンの化学

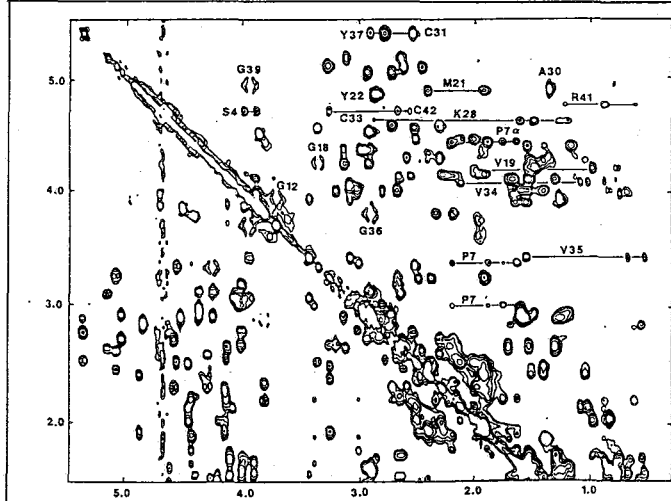


図1 ヒトEGFのHOHAHAスペクトル(重水)

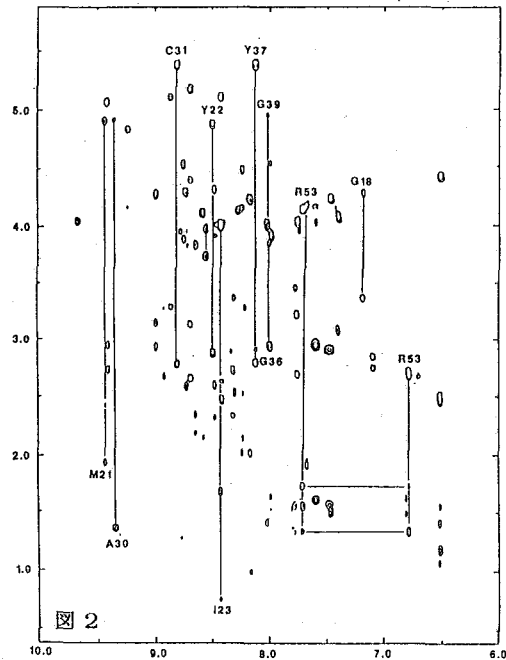


図2 ヒトEGFのHOHAHAスペクトル(軽水)

シフトが異なる場合には、軽水におけるHOHAHAスペクトルより二つのスピン系を区別することができる。また Guanidinium 基のNHプロトンからの展開を参照することによりアルギニン(R)のスピン系をあきらかにできる。図3はヒトEGFの軽水中のDQF-COSYのアミドプロトンと α プロトンの交差領域(指紋領域)をしめしたものである。DQF-COSYではアミノ酸残基について1個の交差ピーク(Gでは2個)が観測されること、分解能がよいため、交差ピークが重なった場合でも判別できる長所を持つ。図3には溶媒に重なった4このアミノ酸残基を除き観測可能な全てのシグナルが観測されている。以上のプロセスによりスピン系と各アミノ酸タイプへの帰属が完了する。次にこれらのアミノ酸タイプ別に帰属されたスピン系を、NOE情報に従って順次つなげていく。図4はヒトEGFのNOESYスペクトル(軽水)のうち、 α プロトンとアミドプロトンの交差領域を示したものである。四角で囲んだピークは同一残基の α プロトンとアミドプロトンのNOE相関ピークである。アラニン(A30)より出発するとこのアラニンのアミドプロトンはチロシンの α プロトンに近接していることがわかる。このようにアミノ酸タイプの帰属が行われていることは重要である。ヒトEGFの一次構造の上でY-AのならばをさがすとY29-A30が見つかる。これよりY29とA30の帰属が確立する。同様にして α プロトンとアミドプロトン間のconnectivityを順次たどれば、Y29-A30-C31-N32の帰属が決まる。図4にはV34-V35-G36-Y37-I38-G39-E40, W50-E51-L52-

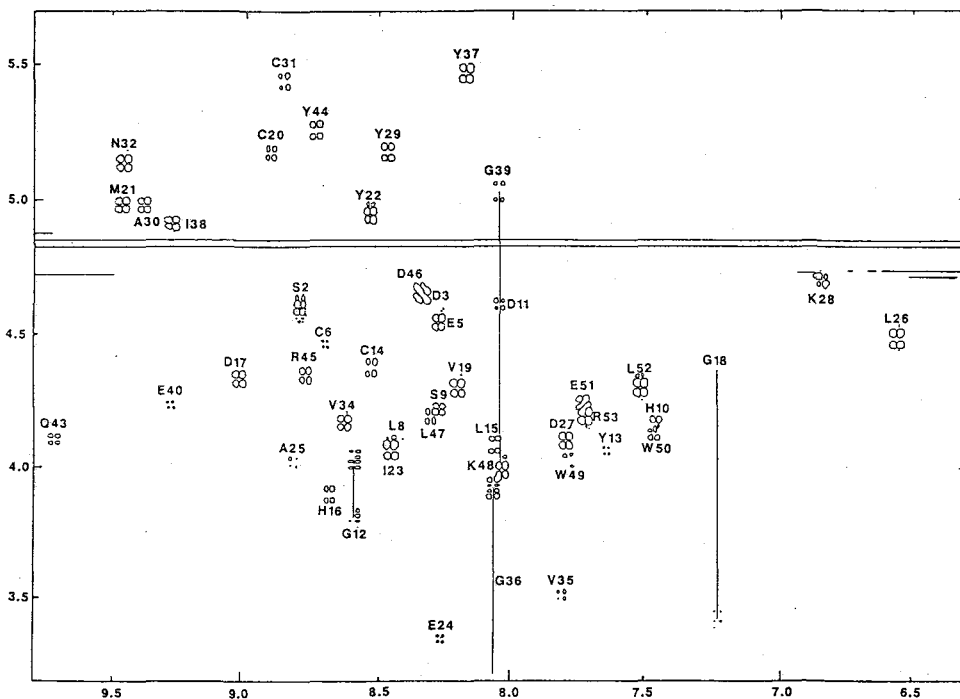


図3 ヒトEGFのDQF-COSYスペクトル、NHと α プロトンの交差領域

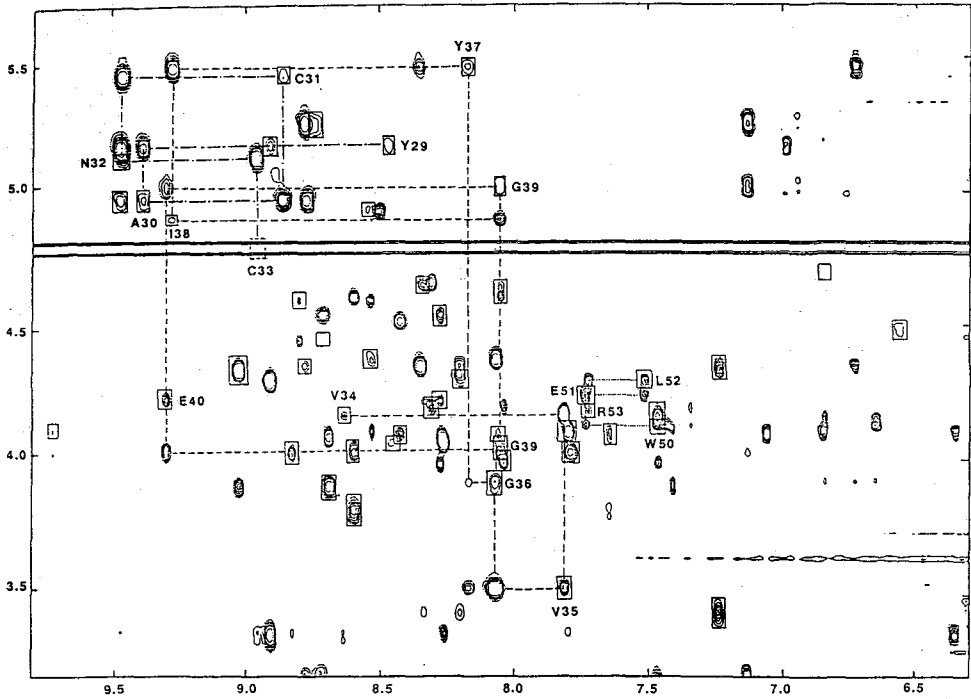
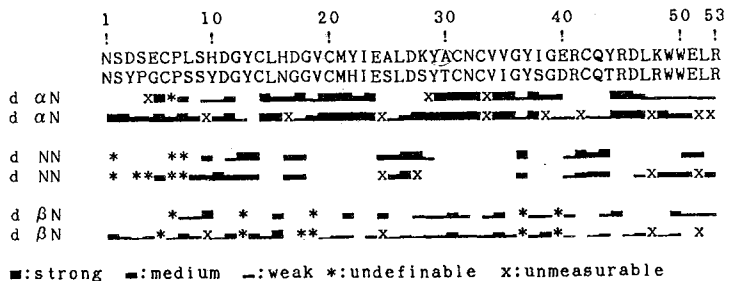


図4 ヒトEGFのNOESYスペクトル。NHと α プロトンの交差領域

R53のconnectivityも示されている。NOESYの感度が高いため、 α とアミドプロトンのconnectivity ($d_{\alpha N}$)を用いて8割以上の残基について帰属を行うことができた。図5はヒトおよびマウスEGFについて観測された隣接残基間のNOE connectivityを示したものである。主に $d_{\alpha N}$ で結ばれる領域は β シート、 d_{NN} で結ばれる領域はターン構造を取る。ヒト、マウス共によく似た二次構造を取ることが分かる。交換の遅いアミドプロトンを考慮するとN末は三重鎖の β シート構造、C末はdouble hairpin構造を取ることが分かった。この結果はMontelioneやCarverの短報の結果と一致する。一次構造上離れた残基同士に観測されるNOEを用いてメカニカルモデルの組立を行うと共に、distance geometryの計算を行い立体構造の精密化を行っている。

図5

ヒト(上段)及びマウスEGF(下段)に於て観測されたNOEによる結合。



糖-タンパク質間相互作用のTRNOEと

量子化学計算による研究

(国際基督大、千葉大、理研、国立がんセ研) ○梅本公子、
笈川節子、菅原洋子、相田美砂子

Wheat Germ Agglutinin-Saccharide Interactions Studied by TRNOE and Pair-Potential Calculations

Kimiko Umemoto, Setsuko Oikawa, Yoko Sugawara, Misako Aida (International Christian University, Chiba University, The Institute of Physical and Chemical Research, National Cancer Center Research Institute)

The binding mechanism of O-methyl-N-acetyl-D- α -glucosamine (OMe-GlcNAc) to wheat germ agglutinin (WGA) was studied using ^1H - ^1H transferred NOE (TRNOE) and pair-potential calculations. Negative TRNOE was observed on the ^1H NMR spectrum of OMe-GlcNAc in a solution containing WGA, when the aromatic region of the WGA spectrum was irradiated. From the initial slope of the time dependent TRNOE and from the calculations, it was concluded that in the bound state the N-acetyl group of OMe-GlcNAc is most likely situated close to tyrosine 64 of WGA.

レクチンとして知られる一群の糖結合性タンパク質は、細胞表面に露出している糖タンパク質や糖脂質の糖鎖部分と立体特異的に結合する事により細胞を凝集する能力を持つ。本研究はレクチンの一つである小麦胚芽レクチン(WGA)と糖の間の相互作用の詳細をNMRと量子化学的手法を用いて明らかにする事を目的としている。

WGAはその三次元構造がX線により精密に解析されており、分子量も比較的小さく、金属を含まないので理論的扱いが容易である。また機能的には特にがん細胞を凝集する能力を持つなど興味ある性質を示す。WGAは分子量約17500のサブユニットの二量体からなるタンパク質で、1分子当たり2カ所の結合部位でN-acetylglucosamine(GlcNAc)とそのオリゴマー、N-acetylneuramic acidなどと特異的に結合する。X線解析によれば、その双方の結合部位においてチロシン残基2コが存在しており、糖との結合に重要な位置にあることが示唆されている。

研究方法

(1) ^1H NMR測定

WGAは一部粗WGAからアフィニティクロマトグラフィにより精製したものを、また一部はVector Laboratories Inc.から購入した。糖として用いた1-O-methyl-N-acetyl-D- α -glucosamine(OMe-GlcNAc)、N-acetyl-D-mannosamine monohydrate(ManNAc)、N-acetyl-D-galactosamine(GalNAc)、およびN,N'-diacetylchitobiose(ChitNAc)は市販のものを用いた。

WGAは D_2O より2回凍結乾燥し重水置換を行った。WGAの濃度は0.12mM、糖の濃度は2.5mM程度、溶液のpDは6.8であった。サンプルは真空下で数回凍結-融解を繰り返して脱気した。 ^1H NMR測定はVarian XL300を用いた。パルス列(ti-

$t_2 - t_3 - \pi / 2 - AT$)_nにおいて、選択的照射時間 t_2 を0.02-4秒で変化させ、差スペクトルを取った。パルス列間の待ち時間 t_1 は4秒とした。

(2) 量子化学計算

糖-タンパク質などの巨大な分子系の相互作用エネルギーを計算する方法として、Fragaにより開発された Atomic Pair Potential²⁾を用いた。これは、Clementiらによるアミノ酸分子についての精度の高い *ab initio*分子軌道法計算値を再現するように定めたもので、分子 A-B間の相互作用エネルギー (E_{ab})を、以下の式(1)に示すように全ての原子pair間距離 (R_{ab})の1、4、6、12乗の各逆数の項の総和で表す。

$$E_{ab} = \sum \sum [C_{ab}(1) / R_{ab} + C_{ab}(4) / R_{ab}^4 + C_{ab}(6) / R_{ab}^6 + C_{ab}(12) / R_{ab}^{12}] \dots \dots (1)$$

ここで、原子 a は分子 A に、原子 b は分子 B に属する原子である。 $C_{ab}(1)$ は $1 / R_{ab}$ の係数。計算は、各分子の原子配置を下記のように決め、エネルギー勾配法により、最も安定な相互作用エネルギー E_{ab} と、その時の二分子間相互配置を決定した。使用したプログラムは Fragaより提供を受けたものを一部改良して用い、東大計算機センター M682H コンピュータを利用して計算した。

WGA の三次元構造は東大計算機センターのプロテイン・データバンク (PDB) に登録されている WGA の最新データを用いた。まず、PDB のデータに基づいて WGA の精密分子構造模型を組み立て、それを基に第一結合サイトの18コのアミノ酸残基を選んで主鎖の原子も含めて原子数255コについて計算を行った。その際、X線データには水素原子の座標は除かれているので、これを回復するプログラムを作りアミノ酸残基構造としてもちいた。また、種々の活性測定が行われるのは pH が7.0付近であるから、His と Tyr は中性型、Glu は解離型 (COO⁻) であるとして構造を決定した。

糖としては、WGA と特異的に結合する GlcNAc と、結合を作らない ManNAc および GalNAc について、その WGA との相互作用の様式を調べた。

結果と考察

WGA を添加すると OMe-GlcNAc の線幅は増加し、かつ NAcメチルと O-メチルプロトンピークは高磁場シフトした。線幅増加もシフトも NAcメチルの方が顕著であった。リングプロトンも線幅が大きくなったが、その増加は一様ではなかった。例えば、3位のプロトンはかなりシャープなままであったが、4位のプロトンは完全にブロードになってつぶれてしまっている。

ChtNAc の場合では線幅増加はさらに顕著であり、ChtNAc-WGA の結合定数が大きいことと一致した³⁾。また、結合が起こらないとされている ManNAc では、WGA を加えてもまったく変化なく、したがって OMe-GlcNAc の線幅増加は WGA との結合によるものであることが確かめられた。

WGA の D₂O 溶液の ¹H NMR スペクトルにおいて、6.5-8.5ppm の部分には芳香族残基の吸収がみられる。X線解析およびアミノ酸分析の結果によればこの部分に

は Tyr 7 個、Trp 2 個、Phe 2 個、His 2 個の芳香族残基から合計 54 個のプロトンの吸収が含まれているはずである。これらは互いに重なり合っているため個々のピークの解析は不可能であった。したがって選択的照射は主なピークの集まりに対して行った。第 1 図は OMe-GlcNAc と WGA を含む溶液のプロトン NMR スペクトルと、7.17 ppm を照射して得られた差スペクトルの例である。負の NOE が主として 2.0 ppm (NAc メチルプロトン) と 3.9 ppm (2 位または 6 位のプロトン) に見られる。OMe-GlcNAc は WGA と結合-解離の早い平衡にあると考えられ、また OMe-GlcNAc 自身は芳香族領域のプロトン吸収を持たないので、この負の NOE は WGA と結合した糖における分子間差緩和に起因する NOE の寄与によるものであり、かつ結合体の溶液内における運動の相関時間は比較的長いと思われる。

分子間 NOE に加えて WGA 分子内の NOE も観測された。たとえば第 1 図において 6.83 ppm に見られるものは照射時間が非常に短くても観測され、おそらく同一分子内のプロトンによるものと思われ、7.17 ppm と 6.83 ppm の吸収は同じ Tyr に帰属されるのではないかと推測される。

照射時間を変えて 6.5-8.5 ppm の主なピークを次々に照射し、得られた NAc メチルプロトンの吸収の強度を照射周波数に対してプロットしたのが第 2 図である。最も大きな負の NOE は 7.15 ppm のあたりに現れている。しかしながら、照射時間が長くなると共に NOE は次第に選択性を失っているのが見られる。これはスピン拡散によるもので、このような二次的な効果を避けるために time-dependent TRNOE の測定を行った。照射時間を 0.02-4 秒の間で変化させ、得られた NOE を照射時間に対してプロットし、その初期の傾斜から OMe-GlcNAc の NAc メチルプロトンと 2 位 (または 6 位) のプロトンが芳香族残基 (おそらく Tyr) から約 4 Å 以内の距離に位置し、その

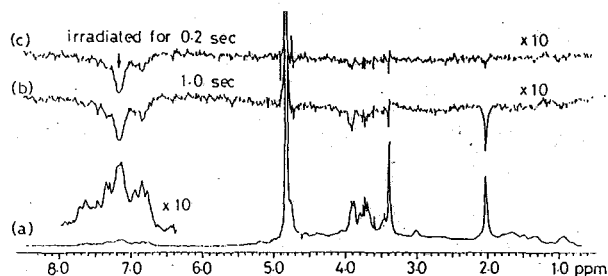


図 1. OMe-GlcNAc と WGA の溶液の ^1H NMR スペクトル (a) と、7.17 ppm を 0.2 秒間 (b) および 1 秒間 (c) 照射した時の NOE 差スペクトル

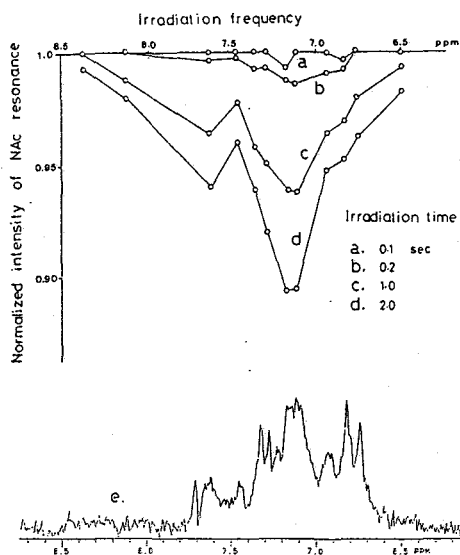


図 2. WGA の芳香環残基のスペクトル (e) と、その各ピークを照射時間を変えて照射した際の OMe-GlcNAc の NAc メチルピークの強度比 (a-d)

他のプロトンはそれよりは離れているとの結論を得た。

一方、量子化学計算の結果のよれば、WGA-GlcNAc間の特異的結合にはWGAのGlu115と糖の3-OH、4-OH間の水素結合が最も大きく寄与しており、その結果、糖はWGAの二量体結合部のくぼみにはまり込んだ形になって安定化する。その様子を第3図に示した。糖はまず、解離したGlu115によって捕らえられ、さらに、糖内の他の極性基による水素結合によって固定される。この時、糖のNAc基と2位のプロトンの近傍にはTyr64があり、また6位のプロトンのそばにはHis66が位置することが判明した。この結果は上記のNMRの結果をよく説明する。従来、Wright等のX線解析とモデルビルディングの結果から糖のNAc基はTyr73の近傍にあるとされてきたが、Tyr73は蛋白の表面からはかなり奥に位置しており、我々の計算の結果は糖がそれほど奥に入るのは困難であることを示した。NMRではどちらのTyrがNAc基のそばにあるかを判定するのはいまのところ困難であるが、理論計算と組み合わせることによりさらに詳細な検討を加えている。

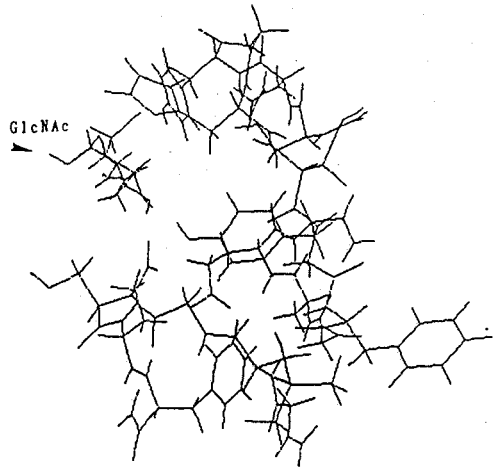


図3. WGAの第一結合サイトと、結合した糖分子(GlcNAc)

謝辞

実験材料に用いた粗WGAとカラム剤を提供していただき、その精製方法をご教示くださった、お茶の水大学理学部松本勲武助教授に感謝いたします。また、本研究に対しては「女性のためのエッセ研究奨励制度」より援助を受けました事を記し謝意を表します。

参考文献

- 1) C.S. Wright, J. Mol. Biol., 111, 439(1977); ibid, 139, 53(1980); ibid, 141, 267(1980); ibid, 178, 91(1984); C.S. Wright, F. Gavilanes and D.L. Peterson, Biochemistry, 23, 280(1984); C.S. Wright, J. Mol. Biol., 194, 501(1987)
- 2) I. J. Goldstein and C. E. Hayes, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 35, 214(1977)
- 3) S. Fraga, J. Comput. Chem., 3, 329(1982)

TRNOEによるイソロイシルtRNA合成酵素に結合した
アミノ酸のコンホメーション解析

(東大理) ○横山茂之・河合剛太・神田大輔*・宮澤辰雄
(*現在, 東京都臨床研)

TRNOE Analyses of the Conformations of Amino Acids Bound to Isoleucyl-tRNA Synthetase

Shigeyuki Yokoyama, Gota Kawai, Daisuke Kohda and Tatsuo Miyazawa
(Faculty of Science, University of Tokyo)

By analysis of time-dependent transferred nuclear Overhauser effect (TRNOE), the conformations of L-isoleucine and L-valine bound to *Escherichia coli* isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS) were determined. The IleRS-bound L-isoleucine takes the gauche⁺ form about the C_α-C_β bond and the trans form about the C_β-C_{γ1} bond. The conformation of IleRS-bound L-valine is the same as that of IleRS-bound L-isoleucine except for the δ-methyl group.

【序】 タンパク質の生合成において、アミノ酸は、それに特異的なtRNAにエステル結合し、リボソームに運ばれてポリペプチド鎖の延長に用いられる。そのようなタンパク質生合成に用いられる20種類のアミノ酸のそれぞれについて、アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)が1種ずつ存在し、アミノ酸とtRNAの双方を厳密に識別してエステル結合させる。もしARSが、それに特異的でないアミノ酸を誤って認識して、そのアミノ酸とは対応しないtRNAにエステル結合させると、誤ったアミノ酸配列のタンパク質が合成されることになる。したがって、ARSによる基質識別は、タンパク質生合成における翻訳の信頼性を左右する、もっとも重要な分子認識過程である。

このようなARSによるアミノ酸の厳密な分子認識のメカニズムを解明するためには、ARSとの複合体におけるアミノ酸のコンホメーションを解析することが重要である。NMRは、そのようなコンホメーションの解析に有力であると期待されが、ARSは高分子量(50,000-300,000)の酵素タンパク質であるので、アミノ酸との複合体について、通常のNMR法でコンホメーションを解析することは、現実には不可能であった。本研究では、転移核オーバーハウザー効果(TRNOE)¹⁾の手法により、イソロイシンに特異的なARS(イソロイシルtRNA合成酵素, IleRS, 分子量 115,000)との複合体におけるL-イソロイシンおよびL-バリンのコンホメーションを決定することに成功した²⁾。

【実験】 大腸菌のIleRSは、*ileS*遺伝子をクローニングし、大腸菌により大量に調製したもの³⁾を用いた。IleRS(10 mg)について、セントリコン-30(アミコン)による限外ろ過を数回繰り返すことにより、緩衝液を交換するとともに濃縮し、最終的に、IleRSの濃度が0.3 mMの重水緩衝液(50 mM塩化カリウムと10 mMリン酸カリウムを含む, pH 7.0, 3.5 ml)を得た。このIleRSの溶液に、モル比で16倍量のL-イソロイシン、または26倍量のL-バリンを加えた。

400-MHzプロトンNMRスペクトル(37°C)は、Bruker AM-400型分光計を用いて測定した。FIDは200-300回積算した。FIDの取り込みに先立ち、L-イソロイシン(またはL-バリン)のプロトンを選択的に照射して、TRNOEを観測した。

照射時間 ($t = 0.0 \sim 0.8$ 秒) の関数として, L-イソロイシン (またはL-バリン) のプロトンシグナルの強度 $I(t)$ を測定した. スピン拡散の効果を補正するため, IleRSのプロトン (4.3 ppm) を照射した時のシグナル強度 $I_c(t)$ に対する比 $[I(t)/I_c(t)]$ をとり, 解析に用いた¹⁾.

【結果と考察】 遊離のL-イソロイシン (重水溶液) のプロトンNMRスペクトルを図1 Aに示す. γ 1メチレン基のふたつのプロトンについても, 帰属が確定している⁴⁾. 図1 Bは, L-イソロイシン (4.8 mM) にIleRS (0.3 mM) を加えた試料 (L-イソロイシンの6.3%がIleRSと1:1複合体を形成) のスペクトルである. IleRS存在下での遊離L-イソロイシンのプロトンシグナル (図1 B) は, IleRS非存在下の場合 (図1 A) と比較してブロードになっている [L-イソロイシンが遊離の状態とIleRSに結合した状態を移りかわる化学交換のため]. 30-50°Cでの温度上昇にともない, L-イソロイシンのプロトンシグナルがさらにブロードになることから, この化学交換は化学シフトのスケールに対して遅く, 図1 Bに観測されているシグナルは, 遊離状態のL-イソロイシン (93.7%) のものである. これは, IleRS・L-イソロイシンの解離速度が 15秒^{-1} と遅いこと⁵⁾と対応する. IleRS存在下のL-バリンについても, 化学交換によるブロードニングが見られた (図1 C, D). この場合は, 交換は, L-イソロイシンの場合と比べてかなり速く, 観測されたL-バリンのシグナルは, 遊離状態 (96.5%) とIleRS結合状態 (3.5%) の両方の寄与によるものである.

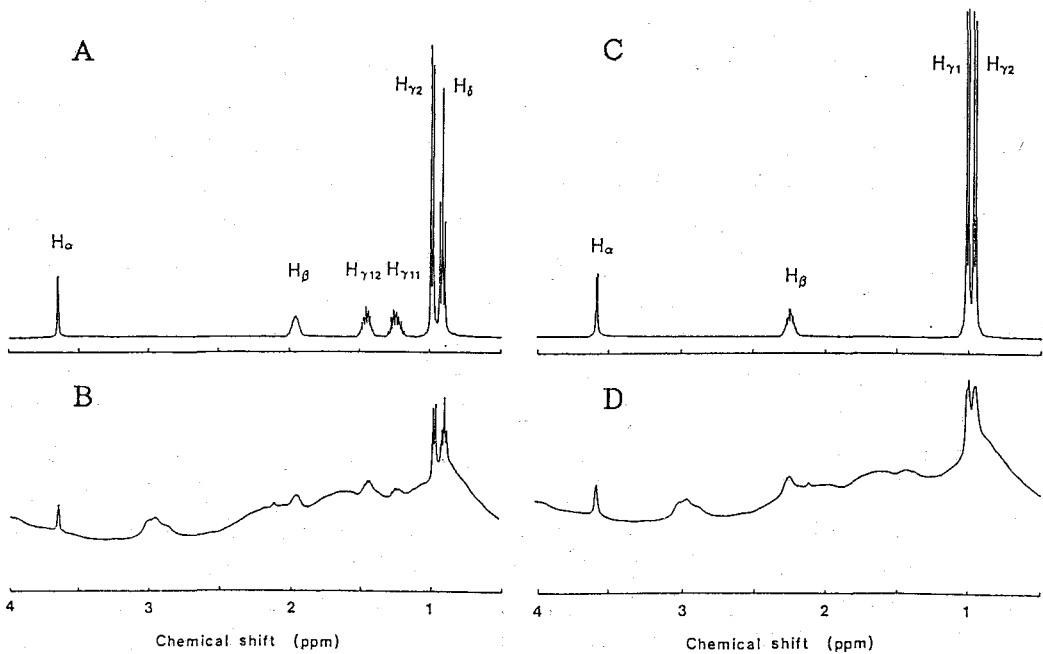


図1. IleRSの非存在下 (A, C) および存在下 (B, D) でのL-イソロイシン (A, B) およびL-バリン (C, D) の 400-MHz ^1H -NMR スペクトル.

L-イソロイシンのプロトンの間では、選択的な照射（0.8 秒以内）を行なうと、IleRSの存在下でのみ、NOE（負）が観測された。H α プロトン，あるいはH β プロトンを照射したときに，他のプロトンシグナルの相対強度 $[I(t)/I_c(t)]$ が，照射時間に対してどのように変化するかを図2に示した．いずれのプロトンのシグナル強度も，照射とともにただちに減少することではなく，0.05秒程度のラグが見られた．これは，遊離状態と結合状態の間の交換速度が遅く $[IleRS \cdot L\text{-イソロイシンの解離は} 15 \text{秒}^{-1}]$ ，遊離状態での照射によってあるプロトンを飽和されたL-イソロイシン分子が，結合状態へと移行し，さらに，結合状態において生じたNOEが再び遊離状態へと移行して観測されるという2つの段階に時間がかかるためである．シミュレーション（図3）により，約0.05秒の「交換ラグ」が観測されることが確認され，交換ラグに引き続くシグナル強度の減少の勾配は，IleRSに結合したL-イソロイシンについての交叉緩和速度に，およそ比例することがわかった．図2に示した中には，さらに長い 0.2秒程度のラグの後でシグナル強度の減少する場合もあるが，これらは，他のプロトンを経由する間接的なNOEのためであって，直接の交叉緩和速度は，きわめて遅いと考えられる．以上のようにして，IleRSに結合したL-イソロイシンについて，図2に示したメチン，メチレンプロトンの間の交叉緩和速度の相対値が求められた．

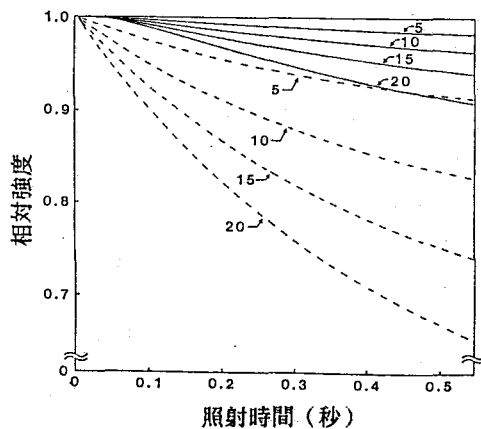
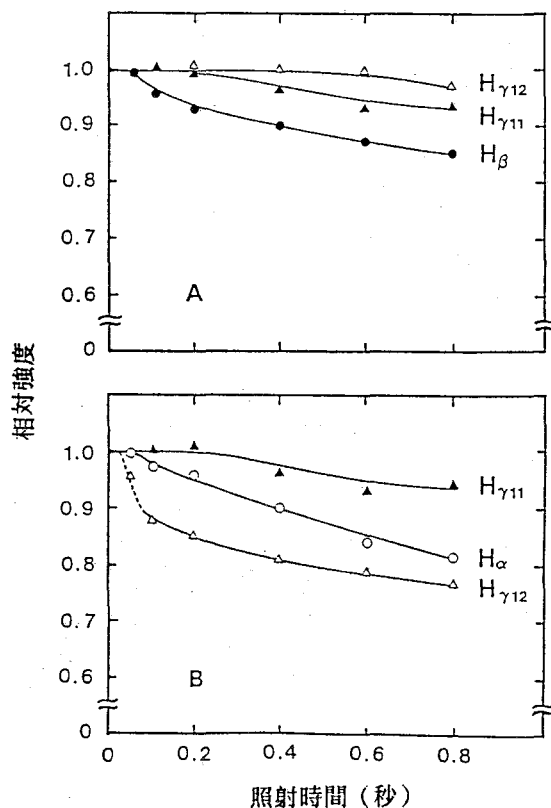


図3. TRNOEのシミュレーション²⁾．実線は交換の遅い場合，破線は交換の速い場合．数字は交叉緩和速度（秒⁻¹）．

図2. IleRS存在下のL-イソロイシンのH α プロトン（A）およびH β プロトン（B）の照射時間に対する，他のプロトンシグナル強度の依存性．

このようにして得られた交叉緩和速度と、L-イソロイシンの可能なコンホマーにおけるプロトン間距離の6乗の逆数を比較して、IleRSに結合したL-イソロイシンの分子は、 $C\alpha-C\beta$ 結合のまわりではgauche⁺形、 $C\beta-C\gamma_1$ 結合のまわりではtrans形をとっていることが明らかになった(図4A)。

L-バリンの場合には、遊離状態と結合状態との交換が十分に速く、通常の間接²⁾が可能であった。得られた交叉緩和速度に基づいて、IleRSに結合したL-バリンは、図4Bのようなコンホメーションをとっていることがわかった。すなわち、IleRSに結合した状態で、L-バリンは、L-イソロイシンの δ メチルを除いた部分と同様のコンホメーションをとるのである。分子間のTRNOEの観測により、IleRSとアミノ酸側鎖との疎水性相互作用は、L-イソロイシンの方が、L-バリンよりかなり強いことも明らかになった。これは、L-イソロイシンが、L-バリンと比べて、70倍強くIleRSに結合することと対応すると思われる。この方法を用いて、IleRSに結合した他のアミノ酸アナログのコンホメーションを解析することによって、この酵素によるアミノ酸識別のメカニズムを、コンホメーションのレベルで解明できると期待される。

なお、本研究は、水島昭二教授(名大農)ならびに川上実博士(名大理)との共同研究により行なった。

REFERENCES

1. Clore, G. M. and Gronenborn, A. M. (1983) *J. Magn. Reson.* **53**, 423-442.
2. Kohda, D., Kawai, G., Yokoyama, S., Kawakami, M., Mizushima, S. and Miyazawa, T. (1987) *Biochemistry*, in press.
3. Kawakami, M., Miyazaki, M., Yamada, H. and Mizushima, S. (1985) *FEBS Lett.* **185**, 162-164.
4. Crout, D. H. G., Gregorio, M. V. M., Müller, U. S., Komatsubara, S., Kisumi, M., Chibata, I. (1980) *Eur. J. Biochem.* **106**, 97-105.
5. Holler, E. and Calvin, M. (1972) *Biochemistry* **11**, 3741-3752.

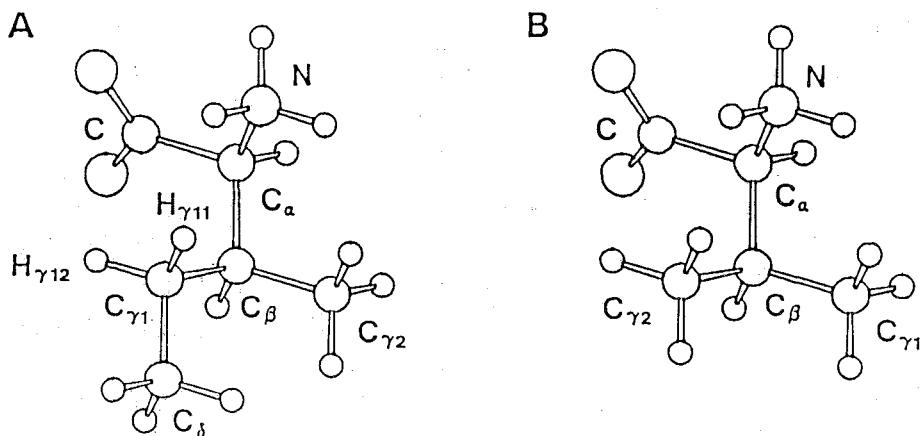


図4. 大腸菌のIleRSに結合したL-イソロイシン(A)およびL-バリン(B)のコンホメーション(TRNOE法によって決定)。

¹H NMR による
多機能巨大タンパク質の高次構造研究法
(東大・薬) 田中俊之 西村実和
矢田信久 遠藤聡史
荒田洋治

【はじめに】 球状タンパク質の構造と機能の関連を追究する上で、NMRは本質的な役割をはたす。BPTI に代表される超小型タンパク質の場合には、全てのアミノ酸残基を分離し、解剖学的な構造解析が行われている。一方、さまざまな機能を搭載したタンパク質は、必然的に巨大な分子となる。分子量の増大に伴う線幅の増加、重なりのため、解剖学的アプローチは、意味があるかどうかは別として、いずれにしても、不可能となる。われわれは、これまで、免疫グロブリン、補体系第三成分 C3、 α -2-マクログロブリンなど、異なる機能を担う複数のドメインからなる多機能タンパク質を対象として、¹H NMR による研究を行って来た。これまでの経験から、たとえ巨大であっても、タンパク質分子内部に flexibility が存在すれば、この部分からのシグナルを、十分に狭い線幅をもって観測することが可能である。一般に、タンパク質の機能は、分子表面に露出した部分(面)によって表現されている。この部分は、広い意味で認識にかかわり、一般に flexibility に富む。したがって、なんらかの方法によって、シグナルを単純化することができれば、巨大タンパク質を対象として、NMRはさらに有用な手段となるはずである。このための方策として、われわれは、一般には極めて労力を要するが、得られる結果が劇的な、安定同位体によるラベルを研究に取り込むことを計画した。本講演では、モノクローナル抗体(MAb)の選択的重水素化を軸とする、¹H NMRによる多機能タンパク質の研究法探索の現状について報告する。

【本研究の方針】 ①選択的に重水素化した、高純度の MAb を、10 mg - 20 mg 以上、常時確保するためのプロトコルを確立し、②さまざまなクラス、サブクラス、特異性をもつ、可能なかぎり多種類のモノクローナル抗体を生産する。これによって、③ Fab を舞台とする抗原認識、Fc を舞台とするエフェクター機能発現の分子機構をアミノ酸レベルで研究する。

【実験】

選択的重水素化 MAb の調製

1. ハイブリドーマの無血清化と培養

10% FCS を添加した日水製薬無血清培地 NVSF-404 中で、ハイブリドーマを継代培養し、FCS 濃度を 7.5%、5.0%、2.5% の順に下げ、最終的には無血清培地に順応させる。この後、ハイブリドーマをラベルしたいアミノ酸、例えば、チロジン、フェニルアラニン、トリプトファンを含まない培地中で 6 時間にわたってスターブさせ、つづいて Tyr-3,5-d₂ + Phe-d₅ + Trp-d₅ を添加した培養液に移す。培養は、通常、1% のスケールで、80 ml 培養フラスコ 15 個を用いて行っている。

2. MAb の単離と精製

培養液は、ミリポア社製ミリタン(分画分子量 30,000)により、10-20倍に濃縮し、Protein A カラムにより抗体画分を分離する。抗体は、10 mM MES, pH 5.6 に対して透析し、T. Baker 社製 ABx カラムを用いて、HPLC により分取する。1% の培養液により、最終精製標品(SDS PAGE, 二次元電気泳動により、単一であることを確認) 10 - 20 mg が得られる。

¹H NMR スペクトルの測定

スピン拡散法およびスピンエコー法を併用する。スピンエコースペクトルは、パルス系列 $\pi/2-(\tau-\pi-\tau)_n$ により、 $\tau = 1$ msec, $n = 2 - 10$ として測定した。

【結果】

1. 抗 dansyl MAb (γ 2a) の¹H NMR スペクトル

図1aに示すように、通常の測定を行う限り、His C2-H プロトン以外には、明確なシグナルを与えるものはない。光 CIDNP によって、Tyr と Trp に由来すると見られるシグナルが出現する(図1b)が、シグナルの分裂および線幅の広がりのため、このままでは解析に用いることが困難である。

2. 選択的重水素化 MAb の ^1H NMR スペクトル

図1のスペクトルが複雑な原因は、Tyr 残基に関していえば、3,5-H プロトンのシグナルが、2,6-H プロトンとのスピン結合によって分裂し、さらに双極子緩和によって、線幅が広がることにある。Phe 残基、Trp 残基のスペクトルは、さらに複雑な多重線構造をもち、このままでは解析は絶望である。Tyr 残基の2,6-Hを重水素化すると、3,5-Hのシグナルがシングレット(芳香環の運動が速い場合)となり、かつ、ラベルした周辺のシグナルがシャープになるおまけがつく。

図2Aに Phe- d_5 ; Tyr-2,6- d_2 ; Phe- d_5 + Tyr-2,6- d_2 ; Phe- d_5 + Tyr-2,6- d_2 + Trp- d_5 を導入した抗 dansyl MAb (γ 2a) の ^1H NMR スペクトル(通常測定による)を、ラベルしていないスペクトルと比較して示す。予期されたごとく、Phe- d_5 ラベルでは、分離の本質的な向上は見られない。これに対して、Tyr-2,6- d_2 ラベルの効果は甚だ劇的であり、あらたに多くのピークを分離して観測することができる。さらに、Trp- d_5 を導入すると、図1aの光 CIDNP スペクトルにおいて、 δ 7.2 - 7.4 ppmに見られる幅の広いピークが、Trp 残基に由来するらしいことが分かる。抗原結合において Trp 残基のはたす役割の重要性は、しばしば指摘されることであるが、高次構造との関連については、明らかでない。この点を考慮し、4位にだけプロトンをもつトリプトファン Trp-2,5,6,7- d_4 を用いて抗体をラベルすること(甲斐荘正恒博士のアイディアにヒントを得た)を計画している。

3. スピンエコースペクトル

図2Aに、スピンエコー法によって得たスペクトルを、通常測定によって得たスペクトルと比較する。一見して明らかのように、短い T_2 をもつシグナルの除去の効果は、劇的である。これらのスペクトルには、高磁場側にも、いくつかの特徴的なピークが見られる点で興味深い。

【マーカーとなるシグナルの探索】

現在われわれの考えている戦略は、つぎの三点に要約される。

- ① Switch variant MAb (共通の V_H , V_L , C_L を持ち、H 鎖の C 領域を異にする一連のモノクローナル抗体)の利用。この場合には、H 鎖 C 領域由来の、サブクラス特異的なアミノ酸残基の帰属を行うことができる。
- ② Deletion mutant の利用。特定のドメインを欠損した MAb を用いる。本研究では、 C_H1 ドメインを欠損した抗 dansyl MAb を、正常の抗 dansyl MAb と比較する。
- ③ 同一サブクラスに属し、アロタイプが同じで、しかも特異性の異なる MAb を用いる。この場合には、V 領域のシグナルの帰属につながる結果が得られることが期待される。

Switch variant MAb の ^1H NMR スペクトル

図3に、三種類の抗 dansyl MAb : γ 1, 2a, 2a short (C_H1 を欠損した MAb) のスピンエコースペクトルを比較する。芳香環領域において見られるシグナルは極めて類似している。とくに、 γ 2a MAb と γ 2a short MAb は、His C4-Hのシグナルの線幅が異なる点を除くと、極めて良く一致している。同じ MAb について、 H_{D0} の位置(バックボーンのシグナルを含む)を presaturation したスピン拡散スペクトルを図4に示す。この二種の MAb は、同一の抗原結合部位をもつにもかかわらず、スピン拡散の振舞が著しく異なっている。この実験結果は、抗原結合部位の構築にあたって、C 領域のドメインの存在が重要であることを直接に示す点で、甚だ興味深い。

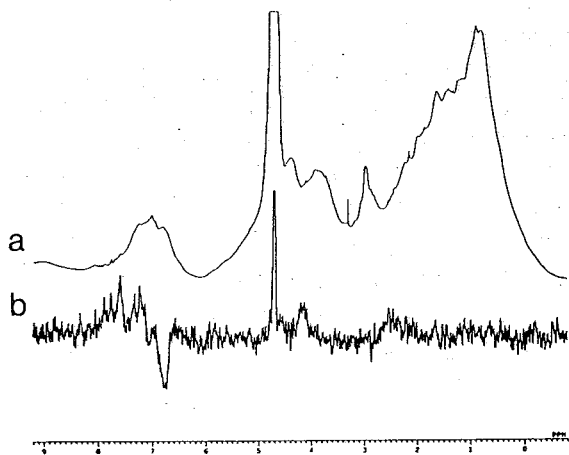


図1 抗 dansyl MAb ($\gamma 2a$) の
400 MHz ^1H NMR スペクトル
a. 通常のスペクトル
(presaturation していない)
b. 光 CIDNP スペクトル

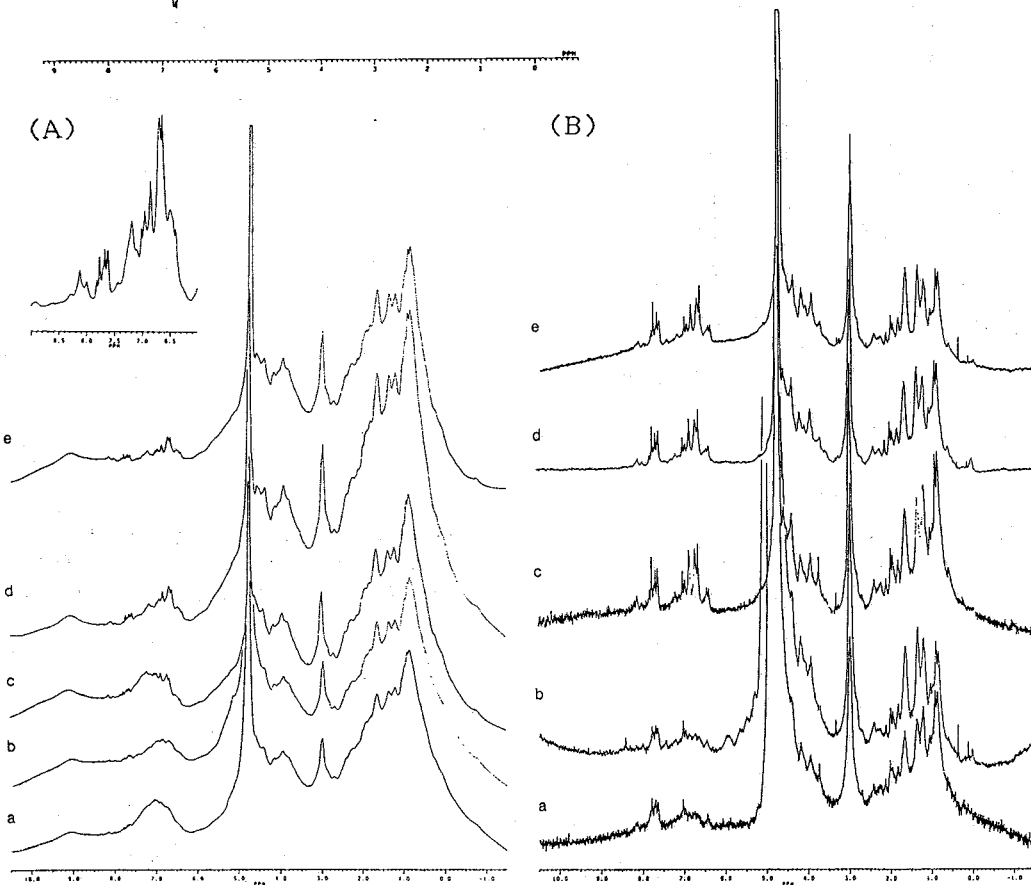


図2 選択的重水素化 抗 dansyl MAb ($\gamma 2a$) の ^1H NMR スペクトル：(A) 通常のスペクトル
(presaturation していない) . . (B) スピンエコースペクトル ($n = 10$)

- a. ラベルしていない MAb
- b. Phe- d_5 ラベル MAb
- c. Tyr-2,6- d_2 ラベル MAb
- d. (Phe- d_5 + Tyr-2,6- d_2) ラベル MAb
- e. (Phe- d_5 + Tyr-2,6- d_2 + Trp- d_5) ラベル MAb

異なる抗原結合部位をもつモノクローナル抗体の比較

つぎに、同じサブクラス IgG1 に属する二種のモノクローナル抗体：抗 dansyl MAb および抗ニワトリリゾチーム MAb を比較する。図5参照。Tyr 残基の 3,5-H プロトンのシグナルは、大部分が異なっている。以上の結果は、ここで見えている Tyr 残基のシグナルの多くが、抗原結合部位に由来していることを示している。さらに、サブクラスに特異的なピークが見られる。とくに、 $\gamma 1$ MAb における δ 2.2, 2.0 ppm のピーク、 $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2a$ short MAb に共通に見られる δ 3.0 ppm のピークが注目に値する。

【謝辞】 ^1H NMR スペクトルの測定に便宜をはかって頂いた宮澤辰雄教授、光 CIDNP スペクトルの測定をしていただいた林文晶氏、京極好正教授、ハイブリドーマの重水素ラベルの実験にあたって、種々の本質的な議論をしていただき、かつ貴重な試料を提供して頂いた甲斐荘正恒博士にお礼申し上げます。

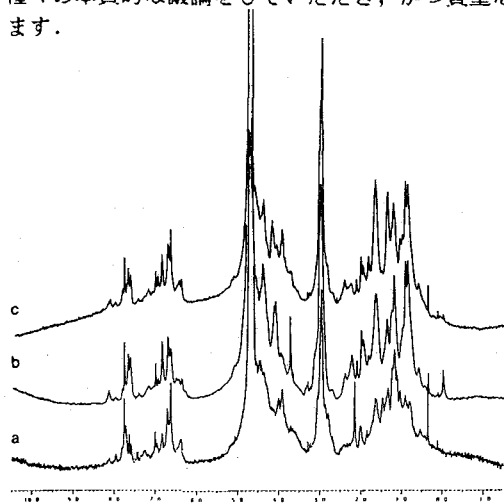


図3 Switch variant 抗 dansyl MAb の
スピンエコースペクトル (n = 8)
a. IgG1; b. IgG2a short; c. IgG2a

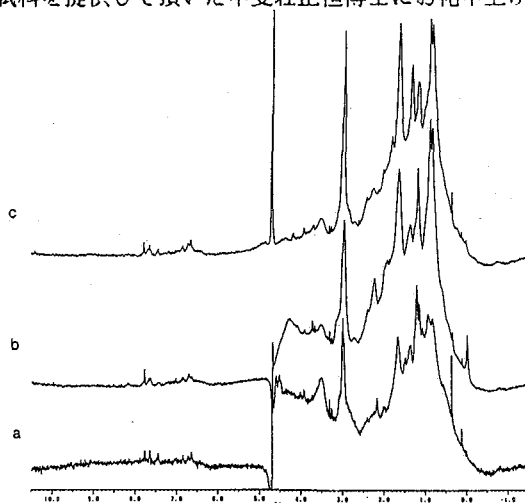


図4 Switch variant 抗 dansyl MAb におけるスピン拡散
(presaturation: H₂O の位置を照射) の効果
a. IgG1; b. IgG2a short; c. IgG2a

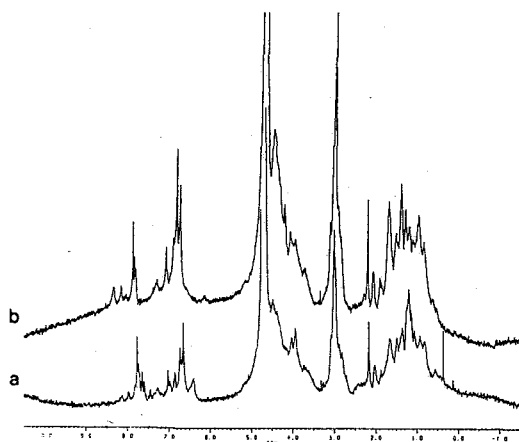


図5 二種類の IgG1 MAb のスピンエコースペクトル
(n = 8) の比較
a. 抗 dansyl MAb
b. 抗ニワトリリゾチーム MAb

図 3.4.5 は、いずれも、(Phe-d₅ + Tyr-2,6-d₂ + Trp-d₅) ラベル MAb を用いて得た結果である。

免疫グロブリンのCPMG法による解析

(阪大蛋白研・東大薬*) ○林 文晶・京極好正・遠藤聡史*
荒田洋治*

A Study of Immunoglobulin G by CPMG Method

Fumiaki Hayashi, Yoshimasa Kyogoku, Satoshi Endo* and Yoji Arata*

Institute for Protein Research, Osaka University and *Faculty of Pharmaceutical Sciences,
University of Tokyo

There are many large proteins whose structures in solution have to be solved, although it is difficult to analyse the structure of a large protein by NMR because of severe overlapping and broadening of its signals. In this study, CPMG method has been applied to the analysis of a large protein, immunoglobulin G (IgG; MW 150,000). The method provided us sharpened signals from mobile domains with longer T_2 , which the cross-saturation method could not give. The difference in the spectra obtained by the two methods were compared and discussed. Application of the method to polyclonal IgG from the patients of rheumatoid arthritis (RA) will be reported.

[はじめに] 一般に、分子量の大きいタンパク質のNMRスペクトルを解析することは容易ではない。その主要な原因は、極端な線幅の広がりやシグナルの重なりによる。ここで解析例を紹介する免疫グロブリンは、分子量が約15万、およそ1330残基から成っている大きなタンパク質である。単純計算すると、1分子中に60数個の同じアミノ酸残基が含まれていることになり、解析は絶望的であるかのように見えるが、そうではないことが遠藤らによって示された。これによると、ドメインを形成している残基の遅い運動性を利用して、これに由来するシグナルを照射すると、ドメイン由来のシグナル強度がスピン拡散により押えられ、ヒンジ領域と呼ばれる、ドメインを形成しない、運動性の高いセグメントのシグナルが相対的に強調され、シャープなシグナルとして観測できる。これはヒンジ領域の解析には極めて有効であったが、逆にこのことは、ドメイン領域に由来するシグナルは決してこの手法では解析できないことを意味している。これに対して、我々はこれまで主に光CIDNP法によってドメイン領域由来のシグナルの解析を試みてきた。これにより、V領域およびFc領域の各ドメインからそれぞれいくつかのシャープな分極が観測され、帰属されてきた。ここで帰属された残基は、免疫グロブリン分子の中で最もよく露出した芳香族残基としてこれまでの解析で重要な地位を占めてきたが、より細部にわたる解析のためにはいくつかの問題点があった。1つには情報量が不足していること(露出したHis, Tyr, Trpの三残基のみの情報しか得られない) 2番目はCIDNP実験が破壊的であるために生じるいくつかの困難である。具体的には、濃度のうすい系(0.1 mM以下)では積算回数が増やせないために測定が困難であること、いくつかの実験を行ないたい場合サンプル量が多量に必要となること、およびやり直しがきかないことなどである。これらの問題点はCIDNP法の本質的な部分に由来しており、容易には解決できないので、さらに解析を進めるた

めには、どうしても別の解析法が必要であった。

今回我々は、この系にCPMG法を適用した結果、ヒンジに由来するシグナルおよびCIDNPの観測されるシグナルはもちろん、その他多くのシャープなシグナルを幅広いスペクトルから分離することができ、スピン拡散を起こさせたスペクトルとはきわだ、た違いを示した。本研究では、CPMGスペクトルをこれまで使われてきた手法と比較・検討した。さらに、これまでの手法では解析が困難であった応用例についても報告する。

[NMR測定] NMR測定はJEOL GX-500s を用いて行なった。CPMG法 [$90^\circ_x - (\tau - 180^\circ_y - \tau)_n - FID$] は、 $\tau = 1\text{ms}$ とし n を変えてスピンエコーを観測した。測定時にはHDOピークを抑制するために、短時間(0.2s ~ 0.5s) 弱いパワー (IRATN = 290 ~ 300) で照射した。この条件ではスピン拡散の影響は無視できる。くり返し時間は2sで行なった。スピン拡散スペクトルはHDOピーク的位置を0.5 ~ 1s 強いパワー (IRATN = 90 ~ 150) で照射することによって得た。測定は、約5mgの試料を0.3 mlの0.2 M NaCl 重水溶液に溶かして行なった。リウマチ IgGに関しては、pH 7, 0.15 M リン酸バッファー重水溶液で行なった。

[結果と考察] 最初にスピン拡散スペクトルとCPMGスペクトルが比較された。FcフラグメントIke-Nに対する結果が図1に示されている。Fcフラグメントは分子量が約5万であるが、この場合には normal スペクトルにおいても、broadな成分の上にとくさんのシャープなシグナルが顔をのぞかせており、スピン拡散スペクトルでは、それらがSNを悪くした形でそのまま見えているようである。すなわち、スピン拡散の効果は、ドメイン全体に比較的均一に伝達され、全体的に様にシグナル強度が減少している。一方、CPMGスペクトルはスピン拡散スペクトルとは大きな違いを示した。驚いたことに28ms CPMGスペクトルでは、数本のシャープなシグナル以外の成分は完全にスペクトルから消えており、それぞれのシグナルはほぼ独立なシグナルとして与えられた。またこのスペクトルでは、normal スペクトルで顔をのぞかせていたいくつかのシグナルに関する情報が失われているが、これはここには示されていないが、8ms CPMGスペクトルでは明瞭に見えている。この様に90°パルスと観測されるエコー間の時間を変えた一連のスペクトルを比較することにより

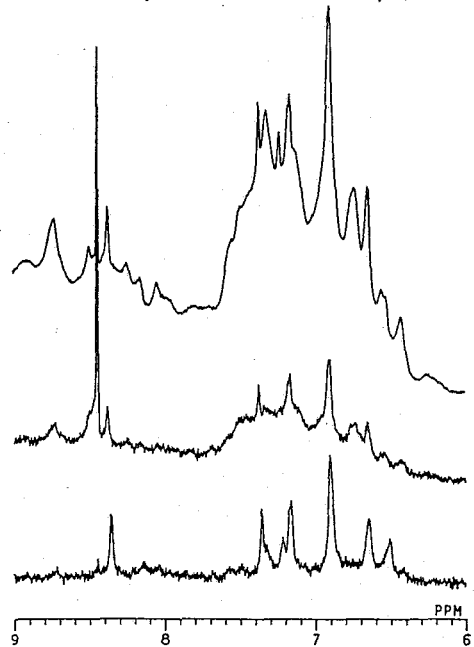


図1 Fc Ike-Nの芳香族領域

(A) normal スペクトル, (B) スピン拡散スペクトル, (C) 28ms CPMG スペクトル

他の手法よりもはるかに容易にシャープなシグナルに関する情報が得られることがわかった。

この両者の差異は分子量の増大とともにより歴然としてくる。図2は IgG1 IRe-N の芳香族領域のスペクトルを比較したものである。normal スペクトルを見てわかるように、Fc のものと比べて比較的シャープなシグナルもブロードな成分の肩としてしか観測されないものも多く、このままでは解析は難しい。スピン拡散スペクトルではヒンジの His 224 がきわめて明瞭に強調されているほかは、一様に強度が減少し全く解析できそうにない。ところが CPMG スペクトルでは、normal スペクトルでは肩としてしか観測されなかった多くのシグナルが1本のピークとして分離し、マーカーシグナルを得るという目的に対し、一応満足すべき結果を与えた。

この CPMG の結果を CIDNP スペクトルと比較すると、CPMG スペクトルで観測された T_2 の長いシグナルの多くは CIDNP シグナルを与えていた。このことは、ここで観測されたシグナルは運動性の高い露出した残基に由来していることを意味する。さらに、これらのうち帰属のついたものについて構造上の特徴を調べてみると、すべて「immunoglobulin fold」を形成している β -鎖間をつなぐ loop 部分に由来していた。従ってこれらのシグナルは、ドメイン内においてセグメントレベルでの運動性を持っている残基に由来しているものと思われる。ではなぜスピン拡散スペクトルがこれらのシグナルを浮び上がらせることができなかつたかについては、この場合、照射の効果がスピンを介して伝達された結果という定常状態を観測しているため、微妙な運動性の差を反映できなかったのに対し、C

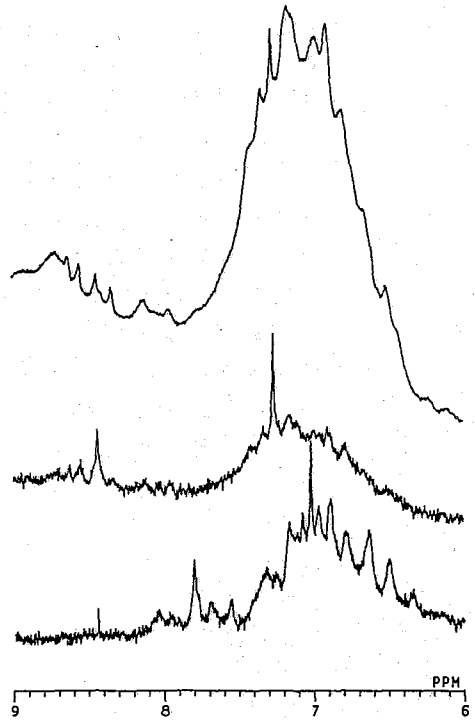


図2 IgG1 IRe-Nの芳香族領域
(A) normalスペクトル, (B) スピン拡散スペクトル, (C) 20 ms CPMG スペクトル

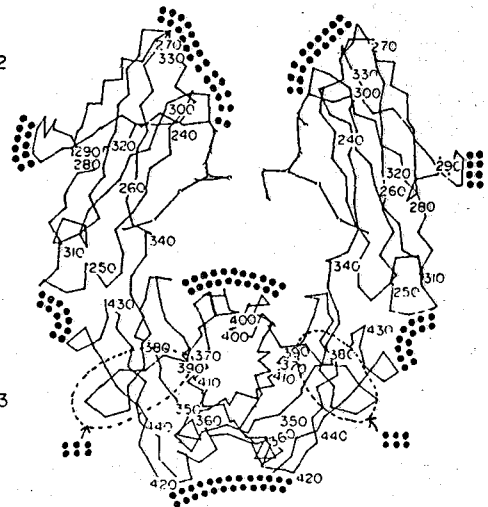


図3 FcフラグメントのX線図

:::印はループセグメントの位置を示す。

PMGスペクトルの場合は最近接プロトンによる T_2 緩和によって変化しているため、より local な環境が反映されたものと思われる。

次に、リウマチ患者血漿より得られたポリクローナル IgG への応用例を示す。リウマチ疾患 (RA) には免疫異常が見られ、特に、リウマチ因子の出現や糖鎖付加の異常のような IgG の異常が報告されており、病気との関係が注目されている。ここでは正常 1 例、リウマチ患者軽症 2 例、中症 2 例、重症 2 例および全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 1 例の計 8 種の IgG に対して CPMG スペクトルを測定し比較した。(図 4) 図よりブロードな成分はほぼ完全に除かれ、SN は悪いながらもいくつかのシャープなシグナルを観測することができた。これまでの実験から、ここで観測されたほとんどのシグナルはすでに帰属されており、その内のいくつかは図に示されている。比較より明らかなように、Tyr 296 と Phe 296 および 2 本の His 285 の相対強度比が異なっている。また 7.86 ppm 付近の His 268 のシグナル強度も変化している。これはサブクラス間のスペクトルの比較のデータより、IgG1 と IgG2 サブクラスに由来するシグナルであり、このスペクトル変化は 2 種のサブクラスの相対含量の変化に由来していることがわかった。図はリファレンスとして用いた (A) のスペクトルを除いて、IgG 2 サブクラスの相対量の多いものが下にくるように並べられているが、さらにおもしろいことに、これを病状と比較したところ、正常と軽症 RA 2 例の IgG のスペクトルが図の上 3 つを、中症・重症 RA および SLE の IgG が下の 5 つを占め、症状とサブクラス含量の相対量 (IgG1 と IgG2) の間に相関が見られた。ここで得られた変化のもつ意味は今のところ明らかではないが、ここで得られたような情報はこれまでの手法では得られないものであった。

[謝辞] リウマチ IgG の研究に際して、試料調製および有意義な助言をいただいた順天堂大学医学部・戸叶嘉明氏に感謝いたします。

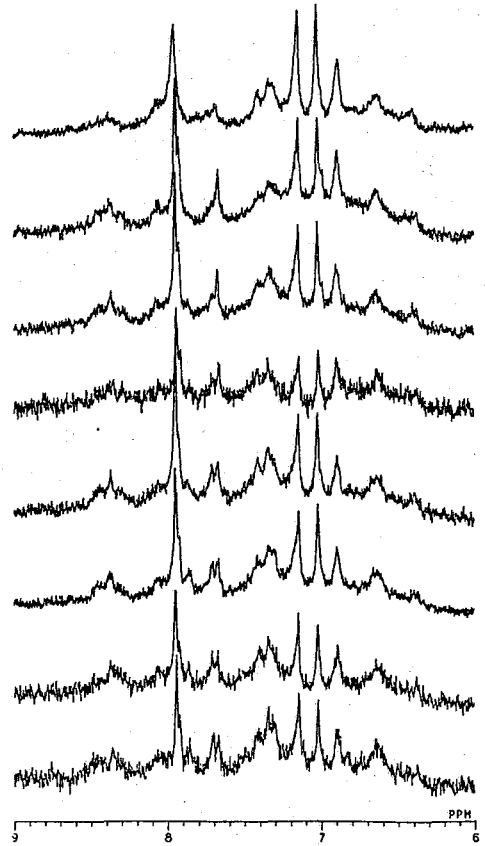


図4 ヒトポリクローナル IgG の 16ms CPMG スペクトル

(A) 市販 IgG ; (B), (C) リウマチ IgG 軽症 ; (D), (H) 中症 ; (E), (F) 重症 ; (G) SLE IgG